Numéro d'ordre : D. U. 2271

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

(U.F.R. Recherche Scientifique et Technique)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° 726

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Chimie Médicinale)

par

Alexandre Vogrig

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

Synthèse et évaluation d'antalgiques originaux : Les inhibiteurs de protéines à domaines PDZ

Soutenue publiquement le 28 septembre 2012, devant la Commission d'Examen :

Président :	
Fabrice Anizon	Professeur Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	
Muriel Duflos	Professeur Université de Nantes
Jean-Claude Florent	Directeur de Recherche Institut Curie de Paris
Examinateurs :	
Christine Courteix	Professeur Université d'Auvergne
Sylvie Ducki	Professeur ENS de Chimie de Clermont-Ferrand
Lu-Yun Lian	Professeur Université de Liverpool
Philippe Marin	Directeur de Recherche Université de Montpellier
Isabelle Thomas	Maître de conférences ENS de Chimie de Clermont-Ferrand

Remerciements

Ces travaux ont été effectués au sein du laboratoire de Conception et Synthèse de Molécules Antalgiques (CESMA, CNRS …..) de l'Université Blaise Pascal à Clermont-Ferrand, sous la Direction du Professeur Sylvie Ducki et du Docteur Isabelle Thomas.

Je remercie sincèrement le Professeur Sylvie Ducki, responsable du laboratoire, de m'avoir convaincu de travailler sur ce sujet de thèse, de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir permis de m'ouvrir à de nouvelles disciplines au-delà de la chimie.

Je souhaiterais également exprimer ma gratitude au Docteur Isabelle Thomas pour m'avoir encadré et soutenu durant cette thèse. Ses connaissances en chimie organique et en recherche ont été un réel atout au cours de ces trois ans.

Le travail de thèse étant réellement un travail d'équipe, j'exprime mes plus vifs remerciements au Docteur Isabelle Ripoche, pour ses précieux conseils, son appui et sa bonne humeur qui mon réellement permis d'avancer durant ses trois années, au Docteur Benjamin Boucherle mon camarade de Liverpool et ami avec qui j'ai pu partager bien plus que des points de vue scientifiques lors de longues discussions rugbystiques et enfin au Docteur Naoual Bouzidi pour son soutien et nos longues discussions.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame Muriel Duflos, Professeur de l'Université de Nantes et Monsieur Jean-Claude Florent, Directeur de Recherche de l'Institut Curie de Paris, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Madame Lu-Yun Lian, Professeur de l'Université de Liverpool pour m'avoir accueilli durant mon séjour en Angleterre et pour avoir accepté de participer à ce jury ainsi que Madame Christine Courteix, Professeur de l'Université d'Auvergne. Je souhaiterais également adresser mes remerciements à Monsieur Philippe Marin, Directeur de Recherche à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et apporté son expérience et ses plus vifs encouragements. Je remercie enfin Monsieur Anizon Fabrice, Professeur de l'Université Blaise Pascal d'avoir accepté d'examiner ces travaux et de présider le jury de cette thèse.

Sans oublier enfin les autres membres de l'équipe et du laboratoire que je remercie pour les nombreuses discussions de toutes natures et leurs sympathies durant ces trois années : Professeur Yves Troin, Docteur Pierre Chalard, Docteur Khalil Bennis qui m'a appris à ranger un bureau, Docteur Jean-Philippe Roblin pour son aide pendant les petites galères et son expérience culinaire, Docteur Jean Louis Canet pour ses conseils toujours très enrichissants et Docteur Gilles Figueredo pour nos importantes discussions au 2ème étage.
Je remercie également les membres du service de chimie organique de l'Ecole de Chimie : Safia Laid et Gaëlle Framery.

Un grand merci à mes camarades qui m'ont permis de rendre ses années inoubliables : Aurélie, Delphine, Nuno, Tomas, Hemant, Jérémy, Ouana, Marie, Wahid.

Pour terminer je remercie profondément mes parents et mon frère Clément qui m'ont apporté tout leurs soutiens durant toutes ses années et sans qui je n'en serais pas arrivé là. J'ai vraiment beaucoup de chance d'avoir une telle famille.

Merci de tout cœur à mes beaux parents et beau frère Benjamin qui m'ont continuellement encouragé.

Un merci du plus profond de mon cœur à mes grands parents Alma et Valentin qui m'ont tout donné et qui je sais sont très fiers de leurs petits fils.

Merci à ma grande tata Mireille qui m'a apporté certainement une grande partie de mon sens de l'humour.

Et enfin ma femme Mélanie qui depuis le début prend soin de moi, qui n'a jamais cessée de m'encourager, de m'aider et qui sans relâche a toujours su trouver les mots pour me faire rire pour me faire avancer et pour continuer.

Merci de tout cœur.

Abbréviations et acronymes

Å : Angström
AF6 : Afadin protein
APP : Amyloid precursor protein
aq : aqueux
ar : aromatique
ASIC : Acid-sensing ion channels
Bn : benzyl
Boc : *tert*-butoxycarbonyl
Calcd: calculated
Cbz ou Z : benzyloxycarbonyl
CCM : chromatographie sur couche mince
CDI : carbonyldiimidazole
COX : Cylco-oxygenase
Cyc : cyclohexane
DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM: dichlorométhane
DCC : *N*,*N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DIEA : *N*,*N*-diisopropylethylamine
DMAP : 4-(*N*,*N*-diméthylamino)pyridine
DMF : *N*,*N*-diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxide
Dvl : Dishevelled protein
EDC : 1-éthyl-3-(3-*N*,*N*-diméthylaminopropyl) carbodiimide
éq ou equiv: equivalent
EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique
FC : Flash Chromatography
FDA: Food and Drugs Administration
Fmoc: Fluorenylmethyloxycarbonyl
Fz: frizzled
g : gramme
h: heure
HOBt: hydroxybenzotriazole
HT: hydroxytryptamine
Hz : Hertz
IASP: International Association for the Study of Pain
Ic_{50}: concentration inhibitrice médiane
IPP: Interaction Proteine-Protéine
IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ITC : Isothermal titration calorimetry
J : constante de couplage
Ki : constante d'inhibition
Kd : constante de dissociation
min : minute
mg : milligramme
mL : millilitre
mmol : millimole
Mp : melting point
MS: spectroscopie de masse
MUPP1 : Multi-PDZ Domain protein 1
nM : nanomolaire
NMDA :*N*-Methyl-D-Aspartate
NMDAR: *N*-Methyl-D-Aspartate receptor
NS1: Influenza protein
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Pd : Palladium
PDB : Protein Data Bank
PDZ: Postsynaptic density protein 95 (PSD-95)/Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)/Zonula occludens-1 protein (zo-1)
PICK1: Protein interacting with C kinase 1
PSD: Postsynaptic density protein
p-TsOH : acide *para*-toluènesulfonique
Quant: Quantitatif
QSAR : Quantitative structure-activity relationship
NHERF1 : $Na^{+/}H^{+}$ exchanger regulatory factor-1
NOE : Effet Nucléaire Overhauser
nNOS : nitric oxide synthase
rdt : rendement
R_f : Rapport frontal
RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
RX : Rayons X
SAP : Synapse-associated protein
t.a. : température ambiante
TFA : Acide trifluroacétique
THF : tétrahydrofurane
Ts : Tosyl
UA : Unité Arbitraire
VDW : Van Der Waals

Sommaire

Abbréviations et acronymes **5**
Sommaire **7**
Table des Figures **13**
Chapitre 1: Introduction **19**
1 Interactions Protéine/Protéine, le domaine PDZ 19
1.1 Interactions protéine/protéine 19
1.2 Les protéines à domaines PDZ 21
1.2.1 Structure des domaines PDZ 22
1.2.2 Classification des domaines PDZ 23
1.2.3 Sites d'interactions 24
1.2.3.1 Le site S0 et la boucle GLGF 24
1.2.3.2 Le site S1 27
1.2.4 Domaines PDZ et pathologies 29
1.2.4.1 Le cancer 29
1.2.4.2 La mucoviscidose 29
1.2.4.3 La maladie de Parkinson 30
1.2.4.4 La maladie d'Alzheimer 30
1.2.4.5 La grippe aviaire 30
1.2.4.6 Attaque ischémique 30
1.2.5 Inhibition du domaine PDZ 31
1.2.5.1 Les inhibiteurs peptidiques 31
1.2.5.2 Petites molécules organiques 35
2 La douleur 39
2.1 Historique 39
2.2 La Douleur, un fléau encore mal traité 40
2.3 Neuro-physiologie de la douleur 43
2.4 Différents types de douleur 45
2.4.1 La douleur aiguë 45
2.4.2 La douleur chronique 45
2.5 Traitements de la douleur 46
2.5.1 Evaluation de la douleur 46
2.5.2 Antalgiques et Analgésiques 47
2.5.2.1 Antalgiques de palier 1 47

2.5.2.2 Antalgique de palier 2 50
2.5.2.3 Antalgique de palier 3 51
2.5.2.4 Autres médicaments 52
3 Le projet 54
3.1 Les domaines PDZ et la douleur 54
3.1.1 Récepteurs N-méthyl-D-aspartate 54
3.1.2 Récepteur « Acid-sensing ion channels » 54
3.2 Contexte du projet 55
3.3 Objectif du projet 56
3.3.1 Les collaborations nécessaires au projet 57
3.3.2 Travaux antérieurs 57
Chapitre 2: Les Biligands 61
1 Introduction 61
1.1 Stratégie des biligands 61
1.2 Noyau indolique 62
1.3 Synthèse de l'indole 64
1.3.1 Bibliographie 64
1.3.1.1 A partir d'hydrazines (synthon **A**) 65
1.3.1.2 A partir du synthon **B** 68
1.3.1.3 A partir du synthon **C** 69
1.3.1.4 A partir du synthon **D** 72
1.3.1.5 A partir du synthon **E** 73
1.3.2 Analyse rétrosynthétique 76
1.3.3 Travaux antérieurs du laboratoire 76
1.3.4 Synthèse en solution 78
2 La synthèse des biligands 80
2.1 Molécules cibles 80
2.2 Première voie de synthèse 81
2.2.1 Couplage peptidique de l'espaceur (n = 6, 8) 81
2.2.2 Couplage avec les acides aminés (n = 8) 83
2.2.3 Synthèse des biligands (n = 6) 85
2.3 Deuxième voie de synthèse 86
2.3.1 Formation de l'ester benzylique de l'indole. 86
2.3.2 Couplage peptidique de l'espaceur (n = 4, 2) 87
2.3.3 Couplage peptidique avec les acides aminés (n= 2, 4) 88
3 Evaluation Biologique 92

3.1 Pull-down Assay 92
3.1.1 Principe 92
3.1.2 Résultats 94
3.2 Criblage RMN 95
3.2.1 Synthèse de la protéine PSD-95 PDZ1 95
3.2.1.1 Préparation du plasmide d'expression 95
3.2.1.2 Production de la protéine 100
3.2.2 Cartographie 102
3.2.3 Evaluation 104
4 Conclusion 105
Chapitre 3 : Optimisation 109
5 Optimisation de l'indole 52. 109
5.1 Analogues 119 et 121 110
5.1.1 Synthèse des analogues 110
5.1.2 Interactions des analogues **119** et **121**/PDZ par RMN 111
5.2 Relation structure activité autour de 121 114
5.2.1 Préparation du composé **133** 115
5.2.2 Synthèse de **139** et **140** 116
5.2.3 Synthèse de **149** et **150** 118
5.2.4 Interactions des analogues **149** et **150** avec le domaine PDZ1 de PSD-95 .. 119
5.2.5 Conclusion 119
6 Influence d'un espaceur en C2 sur l'indole 121 120
6.1 Synthèse des amides 153, 154, 155 120
6.1.1 Synthèse de l'indole **153** 120
6.1.2 Synthèse de l'indole **154** 121
6.1.3 Synthèse de l'indole **155** 121
6.2 Interactions des indoles 153, 154, 155 avec le domaine PDZ1 de PSD-95 par RMN 122
7 Optimisation de l'indole 121 par modélisation moléculaire 122
7.1 Etude de modélisation moléculaire 122
7.2 Synthèse des indoles 160, 161 et 162. 124
7.2.1 Analyse rétrosynthétique 124
7.2.2 Synthèse de l'indole **160** et **161** 125
7.2.3 Synthèse de l'indole **162** 126
7.2.4 Synthèse de l'hydroxyindole **178** 127

7.2.5 Evaluation de l'interaction des indoles **160, 161, 162, 178** avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN 127
7.2.6 Impact des molécules **160-162, 178** sur l'interaction entre le C-terminal de 5-HT_{2A} et PDZ1 de PSD-95 130
8 Influence d'un espaceur en C2 sur 162 132
8.1 Analogue substitué en position 2 132
8.1.1 Synthèse 132
8.1.2 Evaluation de l'interaction de l'indole **179** avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN 133
8.1.3 Impact de la molécule **179** sur l'interaction entre le C-terminal de 5-HT_{2A} et PDZ1 de PSD-95 135
8.2 Analogue substitué sur l'azote N-1 de l'indole 135
8.2.1 Synthèse 135
8.2.2 Evaluation de l'interaction des indoles **185** et **186** avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN 137
8.2.3 Impact de la molécule **185** sur l'interaction entre le C-terminal de 5-HT_{2A} et PDZ1 de PSD-95 139
9 Optimisation de l'indole 185 139
9.1 Synthèse 139
9.2 Evaluation de l'interaction des indoles 187 et 188 avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN 140
10 Structure NOESY 142
10.1 Introduction 142
10.2 Structure RMN des complexes 185 et 187 /PSD-95 PDZ1 143
11 Résultats de sélectivité 145
12 Conclusion 147
Chapitre 4: Evaluation pharmacologique *in vivo* 151
1 Principe 151
2 Résultats 153
Conclusion et Perspectives 157
Travaux parallèles 165
3 Introduction 165
4 Docking 166
4.1 Synthèse 168
4.1.1 Synthèse du phénylglucopyranosylamine 168
4.1.2 Synthèse de la N-acyl hydrazone **192** 168
4.1.3 Synthèse de la quinoléine **197** 169

4.2 Résultats Biologiques 170
4.3 Conclusion 171
Experimental Part 175
Annexes 261
Bibliographie 269

Table des Figures

Figure 1 : Homo-oligomère : P22 Arc repressor (PDB : 1ARQ) et Hétéro-oligomère : cathepsin D (PDB : 1LYW) 19
Figure 2 : Représentation des protéines du génome humain (points) et de leurs interactions (traits)[3] 20
Figure 3 : Kinase (PDB : 1BXD), Tubuline (PDB: 1JFF), Interleukine 2 (PDB: 1Z92), PDZ (PDB : 1OBY) 20
Figure 4 : Evolution du nombre de publications sur les protéines PDZ depuis leur découverte (Recherche basée sur le mot-clé « PDZ » sur sciverse base : PubMed 1 juillet 2012) 21
Figure 5 : a) Structure 3D d'un domaine PDZ (PSD-95 PDZ1) (PDB : 2KA9) b) Structure 3D en surface (en jaune boucle GLGF) 22
Figure 6 : Les trois classes de domaines PDZ 23
Figure 7 : Les deux sites d'interactions des domaines PDZ (S0 et S1) et la boucle GLGF (PSD-95 PDZ1, PDB : 2AK9) 24
Figure 8 : Interactions entre PSD-95 PDZ3 et le peptide VSTQ (PDB : 1BE9) 25
Figure 9 : Représentation surfacique des interactions entre PSD-95 PDZ3 et le peptide VSTQ (PDB : 1BE9) 25
Figure 10 : Détails sur les distances entre le peptide VSTQ et la protéine PSD-95 PDZ3 (PDB : 1BE9)[15] 26
Figure 11 : Interactions entre le S1 en (-7), (-8) de la protéine à domaine PDZ Erbin et le peptide ErbB2 (PDB : 1MFG) 27
Figure 12 : Représentation 3D des interactions hydrogène (vert) entre la protéine à domaine PDZ Erbin et le peptide ErbB2 (rouge) (PDB : 1MFG) 27
Figure 13 : De gauche à droite : Erbin (1MFG), PDZ 1 (PDB : 1IU0) 2 (PDB : 2KA9) et 3 (PDB : 1TQ3) (PSD-95) et PDZ 13 (PDB : 2FNE) (MPDZ) 28
Figure 14 : Alignement FASTA des domaines PDZ de la Figure 13 28
Figure 15 : Inhibiteur de Udugamasooriya *et al.* 31
Figure 16 : Inhibiteur de Hammond *et al.* 32
Figure 17 : Inhibiteurs de Sharma *et al.* 32
Figure 18 : Inhibiteur de Paduch *et al.* 32
Figure 19 : Inhibiteur de Klosi *et al.* 33
Figure 20 : Inhibiteurs de Stromgaard *et al.* 33
Figure 21 : Inhibiteur de Leblanc *et al.* 34
Figure 22 : Inhibiteurs de Zheng *et al.* 34
Figure 23 : Représentation 3D par *docking* des molécules **9** et **10**[52] 34
Figure 24 : Inhibiteurs de Fujii *et al.* 35
Figure 25 : Mise en évidence des parties de la molécule mimant le ligand endogène de MAGI3 35

Figure 26 : Peptide et inhibiteurs (*docking)* de Shan *et al.*[55] 36
Figure 27 : Inhibiteur de Joshi *et al.* 37
Figure 28 : Inhibiteur de Chen *et al.* 37
Figure 29 : Inhibiteur de Lee *et al.* 37
Figure 30 : Inhibiteur de Thorsen *et al.* 38
Figure 31 : Inhibiteurs PSD-95/nNOS 38
Figure 32 : Voie de la douleur par Descartes 39
Figure 33 : Marché mondial des antalgiques[64] 43
Figure 34 : Voie de la douleur 44
Figure 35 : Echelle visuelle analogique 46
Figure 36 : Echelle numérique de la douleur 47
Figure 37 : Antalgiques de classe I 47
Figure 38 : Le célécoxib 49
Figure 39 : Antalgiques de classe II 50
Figure 40 : La morphine 51
Figure 41 : Les antidépresseurs 52
Figure 42 : Extrémité C-terminale du peptide 5-HT_{2A} (GVNEKVSCV). 55
Figure 43 : Stratégie peptido-mimétique 56
Figure 44 : LEAD après screening RMN 57
Figure 45 : Autre structure indolique identifiée 58
Figure 46 : Schéma récapitulatif de la stratégie 61
Figure 47 : Noyau indolique des Biligands 61
Figure 48 : Indole avec espaceur 62
Figure 49 : Indole-Cn-AA 62
Figure 50 : Indole **39** de Fujii *et coll.* mimant les interactions du ligand naturel et son analogue simplifié **40** 63
Figure 51 : Docking des indoles **39** et **40**/PSD-95 PDZ1 (PDB : 2KA9) 63
Figure 52 : *seco*-duocarmycin 66
Figure 53 : U86192A 67
Figure 54 : Acides aminés sélectionnés 81
Figure 55 : Résultats de chromatographie d'affinité 94
Figure 56 : Préparation du plasmide d'expression[153] 96
Figure 57 : Principe de la PCR 98
Figure 58 : Résultats de PCR 98
Figure 59 : Cartographie du plasmide d'expression 99
Figure 60 : Boîte de pétri après transformation 100
Figure 61 : Culot de cellules 100
Figure 62 : Résultats de purification sur gel d'électrophorèse (A et B : Brut après rupture de la membrane, C : Après colonne de nickel, D et E : Autres fractions de colonne de nickel, F : Après clivage et purification par exclusion stérique, G : Marqueur) 101
Figure 63 : Spectre ^{1}H de PSD-95 PDZ1 102
Figure 64 : Spectre HSQC de la littérature $^{1}H/^{15}N$ [154] 103

Figure 65 : Spectre HSQC $^{1}H/^{15}N$ expérimental de PSD-95 PDZ1. 103
Figure 66 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 104
Figure 67 : Interactions de **52** avec le domaine PDZ1 de PSD-95 (violet :interaction, jaune :boucle GLGF) 105
Figure 68 : Extrémité C-terminale de 5-HT_{2A}. 109
Figure 69 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec **119** = rouge). 112
Figure 70 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand **119** avec la protéine PSD-95 PDZ 1 113
Figure 71 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec **121** = rouge). 113
Figure 72 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand **121** avec la protéine PSD-95 PDZ1 114
Figure 73 : Composés **139** et **140** 116
Figure 74 : Influence du méthyle en position 1 et 3 118
Figure 75 : Encadré en rouge sonde hydrophobe pour **153**, polaire (charge négative) pour **154**, polaire (charge positive) pour **155** 120
Figure 76 : Modélisation moléculaire des trois éthers avec leurs énergies et leurs poses en 3D. 123
Figure 77 : F16 de PSD-95 PDZ1 avec et sans les indoles a) **121**, b) **160**, c)**161**, d) **178** et e) **162** (même échelle) 128
Figure 78 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec **162** = rouge) 129
Figure 79 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand **178** a) et du ligand **162** b) avec la protéine PSD-95 PDZ1 130
Figure 80 : Gels de chromatographie d'affinité à différentes concentrations de a) **160**, b) **161** et c) **178** 131
Figure 81 : Gel de chromatographie d'affinité de **162** à 100 et 30 µM. 131
Figure 82 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec **179** = vert) 134
Figure 83 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand **179** avec la protéine PSD-95 PDZ1 134
Figure 84 : Gel de chromatographie d'affinité de **179**. 135
Figure 85 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec **185** = vert). 137
Figure 86 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand **185** avec la protéine PSD-95 PDZ1 138
Figure 87 : Gel de chromatographie d'affinité de **185**. 139
Figure 88 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = noir, avec **188** = bleu) 140
Figure 89 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul= noir, avec **187** = bleu) 141

Figure 90 : Structure RMN du complexe **185**/PSD-95 PDZ1 montrant les interactions du ligand avec le domaine PDZ (sur la surface, rose = résidus polaires, vert = hydrophobes, rouge = exposés)..... 143
Figure 91 : Structure RMN du complexe **185**/PSD-95 PDZ1 montrant les interactions du ligand avec le domaine PDZ (sur la surface, rose = résidus polaires, vert = hydrophobes, rouge = exposés)..... 144
Figure 92 : Superposition 3D de PSD-95 1 et 2 (2KA9)/ SAP-97 1 (1ZOK)/ SAP-97 2 (2AWU) et alignement FASTA. 145
Figure 93 : HSQC $^{1}H/^{15}N$ du complexe **178**/SAP-97 PDZ1 en rouge déplacement chimique de la Glycine 18 (Bon) 146
Figure 94 : HSQC $^{1}H/^{15}N$ du complexe **178**/PSD-95 PDZ1 en rouge déplacement chimique de la Glycine 15 (Faible)..... 146
Figure 95 : Schématisation des nerfs sciatique et saphène, leurs branches terminales et leurs origines spinales. 151
Figure 96: Analgésimètre Ugo Basile (Bioseb®) utilisé pour l'appréciation de l'hypersensibilité mécanique des rats.. 153
Figure 97 : Effet antalgique des composés **121**, **160**, **161**, **162**, **185** et **187**..... 154
Figure 98 : PSD-95 et le récepteur 5-HT_{2A} 157
Figure 99 : Biligands du chapitre 2 157
Figure 100 : Structure RMN **187**/PSD-95 PDZ1 159
Figure 101 : Molécules envisagées 160
Figure 102 : Comparaison site S1 en rouge de deux protéines à domaine PDZ 160
Figure 103 : Les meilleures poses de docking de **189**, **190**, **191**..... 167
Figure 104 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD95 PDZ1 (seul = bleu, avec **197** = bleu ciel). 170
Figure 105 : Effet antalgique de la quinoléine **197** 171

CHAPITRE 1

Chapitre 1: Introduction

1 Interactions Protéine/Protéine, le domaine PDZ

1.1 Interactions protéine/protéine

Les interactions protéine/protéine (IPP) jouent un rôle essentiel à tous les niveaux de fonctionnement de la cellule : dans la structure des organites subcellulaires, dans la régulation de l'expression des gènes mais aussi dans la traduction des signaux.[1]
Il existe plusieurs types d'IPP : dans le premier cas les deux surfaces de contact sont identiques, il s'agit alors d'une association isologue et donc d'homo-oligomères, dans le cas contraire il s'agit d'une association hétérologue et donc d'hétéro-oligomères (Figure 1).[2]

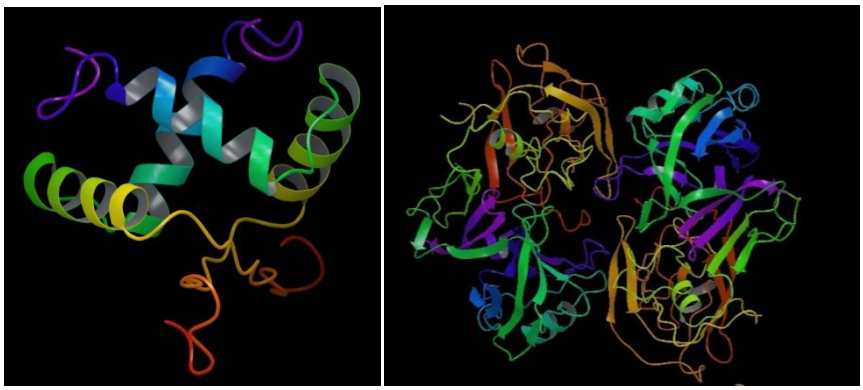


Figure 1 : Homo-oligomère : P22 Arc repressor (PDB : 1ARQ) et Hétéro-oligomère : cathepsin D (PDB : 1LYW)

Nous pouvons également souligner la diversité fonctionnelle des interactions protéine/protéine :

- Pour celles qui ne sont ni stables ni fonctionnelles indépendamment (complexes protéiques : ADN polymérase, ribosome…), l'interaction est obligatoire.
- Pour celles qui sont stables et fonctionnelles indépendamment, l'interaction est responsable d'une action (complexes antigène-anticorps, enzyme-co-enzyme, complexes de signalisation intracellulaire…).

Le dernier point à souligner se situe au niveau dynamique, en effet certaines interactions sont permanentes et d'autre transitoires, c'est-à-dire que les protéines s'associent et se dissocient *in vivo*.

La complexité des interactions protéine/protéine se comprend d'autant mieux grâce à la Figure 2 ci-dessous. Chaque point représente une protéine du génome humain et les traits reliant ces points indiquent une interaction entre ces protéines:

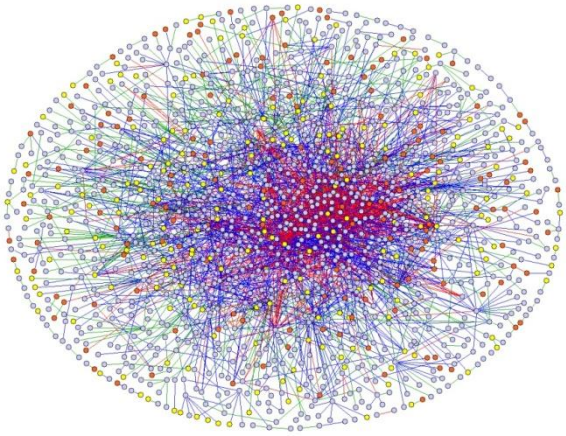


Figure 2 : Représentation des protéines du génome humain (points) et de leurs interactions (traits)[3]

Les IPP sont généralement classées en fonction de la nature du site d'interaction ou de celle du ligand. Nous pouvons citer quelques exemples de groupes d'interactions protéine/protéine tels que : les protéines kinases, les dimères de la tubuline, l'Interleukin 2, et les domaines PDZ (Figure 3).

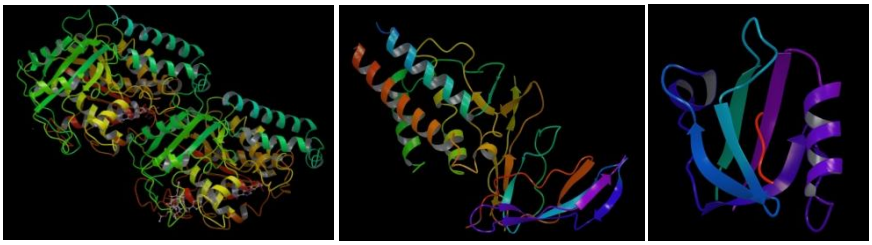


Figure 3 : Tubuline (PDB: 1JFF), Interleukine 2 (PDB: 1Z92), PDZ (PDB : 1OBY)

D'après la littérature[4], dans la plupart des cas la surface d'interaction entre les deux protéines concernées est d'environ 6 nm². Les deux protéines interagissant tendent à former un complexe au niveau de la surface d'interaction dont la force est régie par plusieurs caractères physicochimiques comme l'hydrophobicité, la polarité, ou les charges ioniques.[4, 5]

Ces différents facteurs rendent la conception de petites molécules inhibitrices de ces interactions très difficiles d'autant qu'ils s'ajoutent aux différentes contraintes de solubilité et de passage membranaire.[1]

1.2 Les protéines à domaines PDZ

Les protéines à domaines PDZ sont impliquées dans des interactions protéine/protéine et portent ce nom en référence aux trois premières protéines découvertes possédant ce domaine :[6]

- Post synaptic density-95 (PSD-95)
- Discs large tumor suppressors (Dlg1)
- Zona oculdens-1 (Zo-1)

A ce jour, 267 domaines PDZ ont été identifiés dans 142 protéines humaines. Une même protéine peut en effet contenir un ou plusieurs domaines PDZ.[7] Par exemple, la protéine MUPP1, avec ses 13 domaines, est connue pour être celle qui en contient le plus.[8]

Ces protéines à domaines PDZ sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que le cancer ou la douleur. Leur étude est assez récente et représente donc un centre d'intérêt important pour les chercheurs.[9]

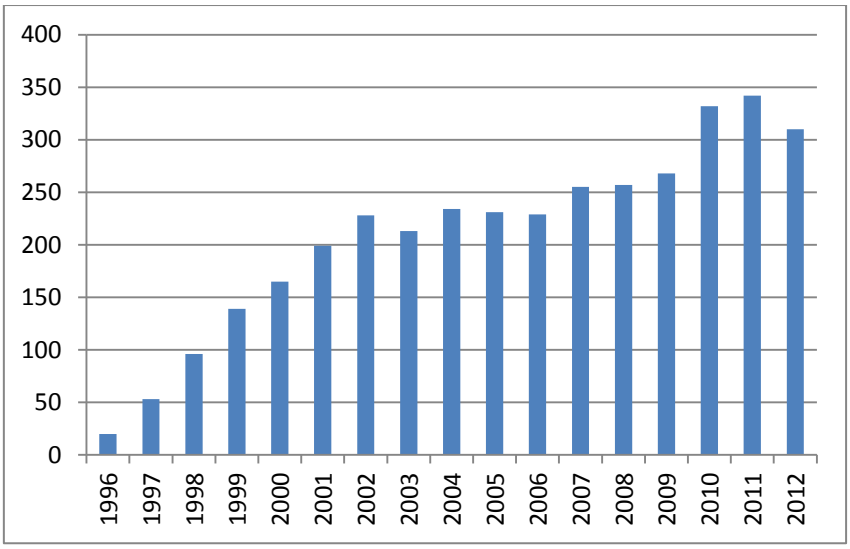


Figure 4 : Evolution du nombre de publications sur les protéines PDZ depuis leur découverte (Recherche basée sur le mot-clé « PDZ » sur sciverse base : PubMed 1 juillet 2012)

Nous pouvons constater que l'augmentation (Figure 4) du nombre de publications en quinze ans est assez importante, cependant il reste énormément de travail à effectuer sur les interactions protéine/protéine incluant un domaine PDZ.

En comparaison avec les protéines kinase sur la même période, le nombre de publications est passé de 6021 en 1990 à un maximum atteint en 2005 de 262460. Il y a approximativement mille fois plus de travaux réalisés sur les kinases que sur les protéines à domaines PDZ.

1.2.1 Structure des domaines PDZ

Les domaines PDZ sont des régions présentent sur un grand nombre de protéines du génome humain et qui sont composés d'une centaine d'acides aminés.[10-12] Ces domaines possèdent une structure secondaire très conservée comprenant 2 hélices α et 5 ou 6 feuillets β (Figure 5) : α_1, α_2, β_1, β_2, β_3, β_4, β_5, β_6 ou α_A, α_B, β_A, β_B, β_C, β_D, β_E, β_F.[13-19]

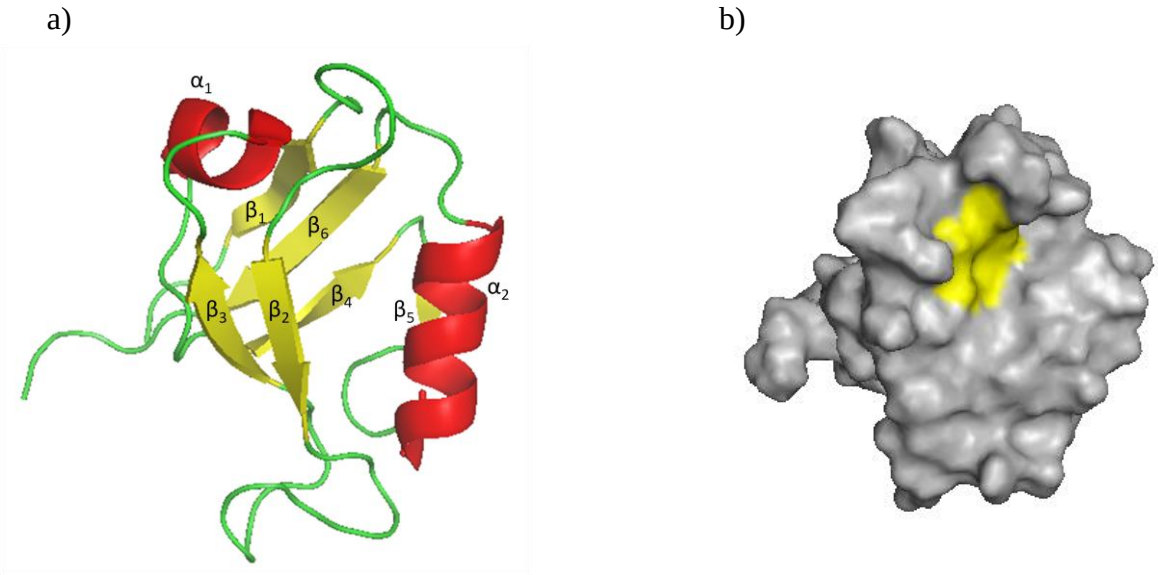


Figure 5 : a) Structure 3D d'un domaine PDZ (PSD-95 PDZ1) (PDB : 2KA9) b) Structure 3D en surface (en jaune boucle GLGF)

La poche créée entre l'hélice α_2 (ou α_B) et le feuillet β_2 (ou β_B) de la protéine forme le site d'interaction des domaines PDZ. Les protéines (ligand PDZ) interagissant avec ce domaine se lient grâce à leur extrémité C-terminale à la boucle constituée de 4 acides aminés (GLGF) que l'on retrouve très conservée dans tous les domaines PDZ. Il se peut parfois que la seconde glycine soit remplacée par un petit résidu hydrophile tel que la Proline, la Thréonine ou la Serine (Domaine PDZ de la protéine erythroid p55, PDB : 2EV8, Domaine PDZ de la protéine CASK/LIN-2, PDB : 1KWA).

Nous pouvons également noter dans la littérature qu'un second domaine PDZ peut interagir avec le premier pour former un dimère.[20, 21, 22] Ces domaines peuvent également se lier à des lipides.[23,24] Cependant l'interaction la plus commune, et celle qui nous intéressera pour la suite, est celle décrite en premier lieu dans ce paragraphe.

La structure des domaines PDZ peut être obtenue soit par spectroscopie rayons-X, soit par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces informations sont regroupées dans la « Protein Data Bank » (PDB).[25] Grâce à cette base de données, nous pouvons accéder à de nombreuses informations, notamment à la séquence et la structure 3D de la protéine à domaine PDZ avec ou sans ligand PDZ.

1.2.2 Classification des domaines PDZ

La classification la plus commune pour différencier les domaines PDZ consiste à les regrouper en différentes classes dépendantes de la nature du ligand PDZ, et notamment de l'importance du résidu (-2) dans la sélectivité des interactions domaine/ligand.[26] L'extrémité C-terminale est notée (0), les résidus suivant du ligand PDZ et qui interagissent avec la protéine sont les résidus adjacents (-1), (-2) et (-3).[10, 27]

Les domaines sont divisés en trois classes selon la nature de leurs ligands : les classes I et II étant les plus communes, la classe III étant beaucoup moins fréquente.[17]

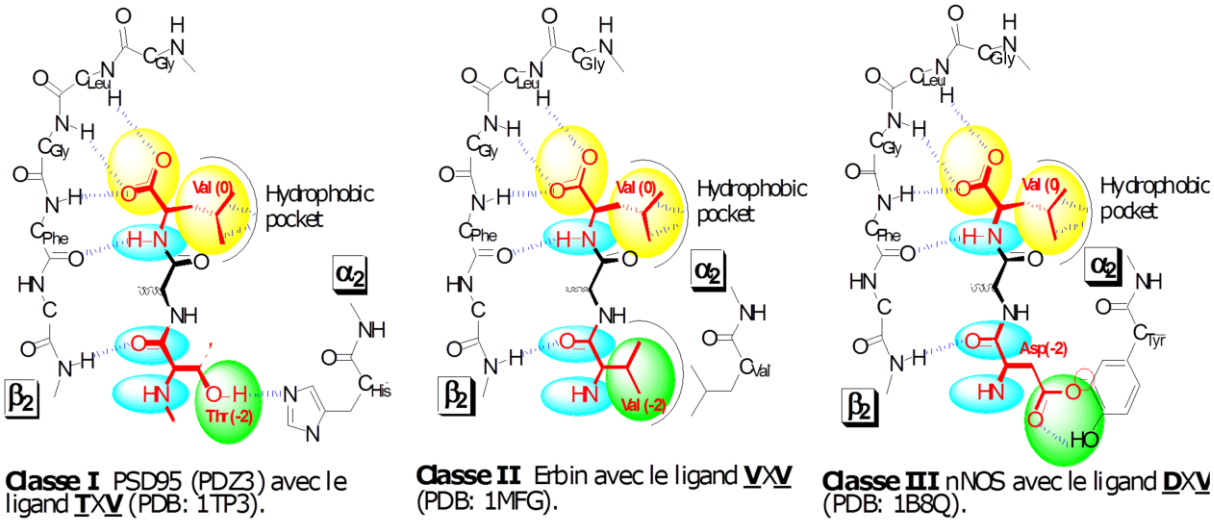


Figure 6 : Les trois classes de domaines PDZ

Appartiennent à la Classe I, les domaines PDZ pour lesquels les ligands peptidiques contiennent un acide aminé hydrophobe en position (0) (Val/Leu) et un acide aminé Ser/Thr en position (-2). Ce dernier interagit avec une histidine conservée sur l'hélice α_2.

Les domaines appartenant à la Classe II interagissent avec des ligands qui contiennent un résidu hydrophobe (Val) porté par le C-terminal ainsi qu'en position (-2). Ces derniers interagissent également avec des poches hydrophobes sur α_2.

Les ligands qui arborent un résidu chargé négativement en position (-2) interagissent avec une tyrosine sur l'hélice α_2 du domaine PDZ de classe III (Figure 6).

Il existe deux autres types de classification qui sont très peu utilisées et très peu citées dans les publications impliquant les domaines PDZ.

La première consiste à organiser les domaines en 25 groupes qui diffèrent par le premier résidu de l'hélice α_2 et le premier résidu de la boucle précédent β_2.[28]

La seconde proposée par Fan est basée sur une classification par fonction du domaine PDZ, le premier regroupe ceux n'ayant aucune activité enzymatique, le deuxième ceux qui en possède une, et enfin le troisième est réservé aux autres domaines.[29]

1.2.3 Sites d'interactions

Nous allons maintenant présenter les différents sites qui interviennent dans les interactions domaine/ligand PDZ. Tout d'abord, le site S0 qui comprend la boucle GLGF commune à tous les domaines PDZ (Figure 7), puis nous présenterons le site S1 qui se situe au niveau de la boucle comprise entre les feuillets β_2 et β_3.

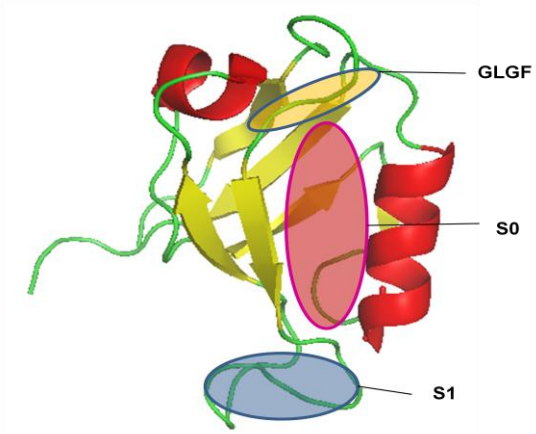


Figure 7 : Les deux sites d'interactions des domaines PDZ (S0 et S1) et la boucle GLGF (PSD-95 PDZ1, PDB : 2AK9)

1.2.3.1 Le site S0 et la boucle GLGF

De nombreuses publications faisant l'étude des interactions entre le ligand PDZ et les domaines PDZ ont montré que les résidus (0), (-1),(-2) et (-3) du ligand interagissaient avec le site S0[30], plus particulièrement avec la boucle GLGF.[14, 15, 17, 31] Ainsi, la plupart des études qui rapportent ce type d'interactions se contentent de ligands tétrapeptides comme mimes des ligands endogènes.

La Figure 8, tirée des travaux de Doyle *et al.*[15], illustre les interactions entre le domaine PDZ3 de la protéine PSD-95 et le tétrapeptide VSTQ. La Figure 9 nous permet de voir le sillon d'interaction en surface avec le peptide en question.

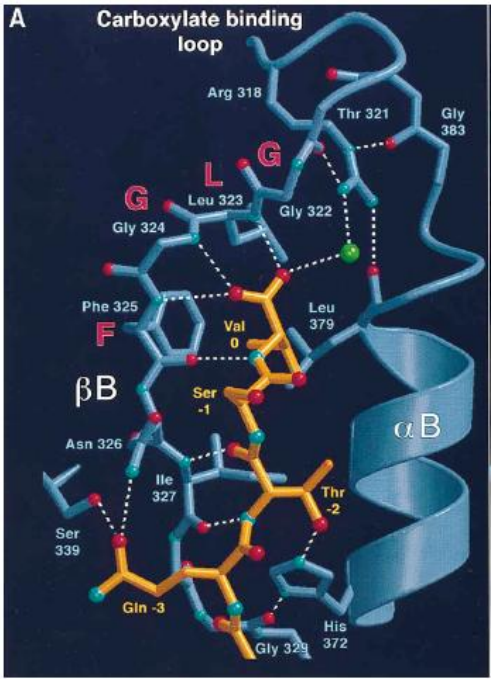


Figure 8 : Interactions entre PSD-95 PDZ3 et le peptide VSTQ (PDB : 1BE9)

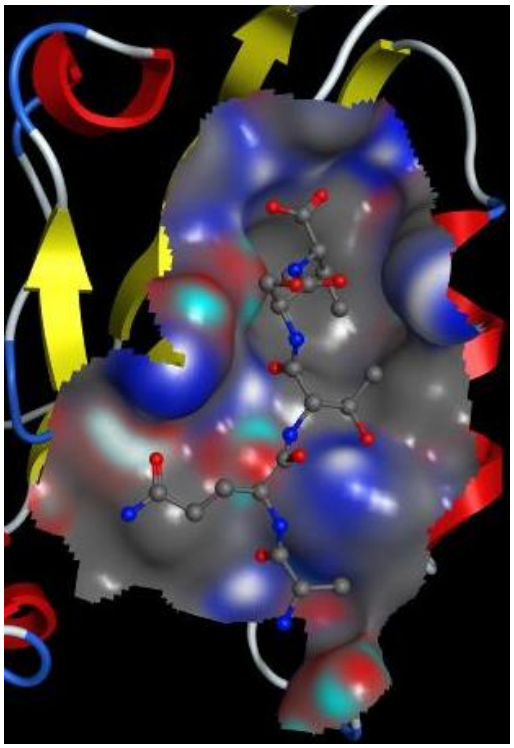


Figure 9 : Représentation surfacique des interactions entre PSD-95 PDZ3 et le peptide VSTQ (PDB : 1BE9)

Une représentation en 2D des interactions domaine/ligand permet de donner des informations sur les distances entre ligand et domaine PDZ, ainsi que sur les interactions avec la boucle GLGF et avec les résidus Valine (0) et la Thréonine (-2) (Figure 10). Nous pouvons également constater que ces résidus interagissent aussi avec des acides aminés du feuillet β_2 (Asn326) et de l'hélice α_2 (His372).

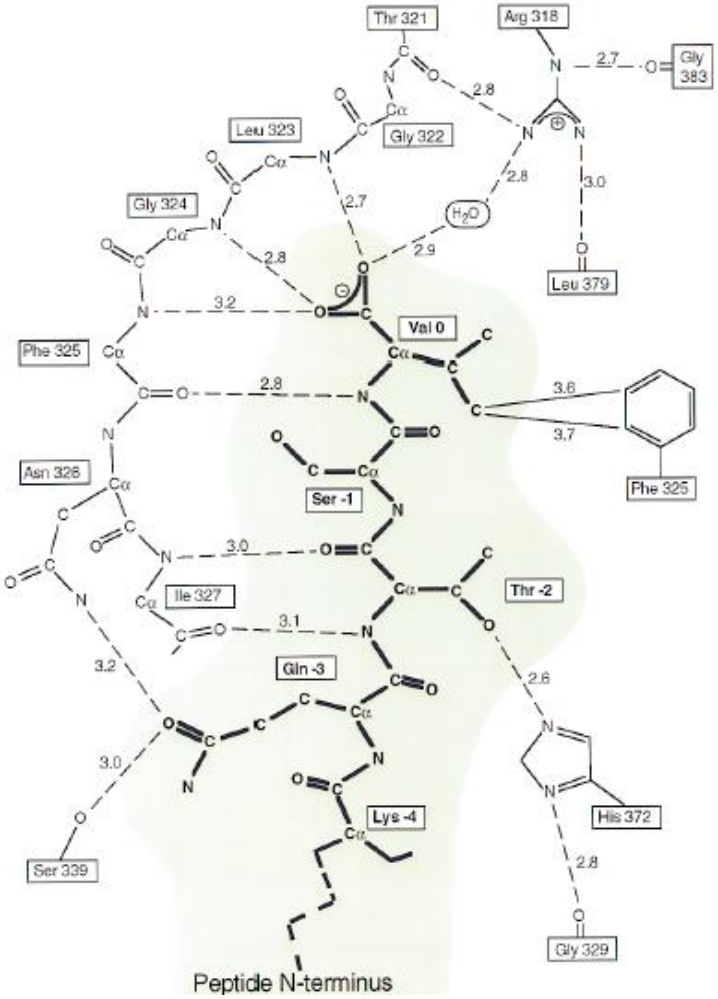


Figure 10 : Détails sur les distances entre le peptide VSTQ et la protéine PSD-95 PDZ3 (PDB : 1BE9)[15]

On note un réseau d'interactions (principalement liaisons hydrogène) entre la Valine (0) du ligand et la boucle GLGF du domaine PDZ (par sa fonction acide carboxylique et son azote). La chaîne latérale de la Valine (0) interagit quant à elle avec une Phénylalanine hydrophobe de la boucle GLGF. La Thréonine (-2) du ligand interagit avec le feuillet β_2 du domaine à travers deux liaisons hydrogène (antiparallèles) alors que la chaîne latérale forme une liaison hydrogène avec l'histidine de l'hélice α_2.

1.2.3.2 Le site S1

La poche S0 interagit avec l'extrémité C-terminal du ligand PDZ (4 premiers acides aminés), le reste du domaine interagit avec les résidus du ligand en amont de l'acide aminé (-4) comme le montre la Figure 11 (2D) et la Figure 12 (3D).[30]

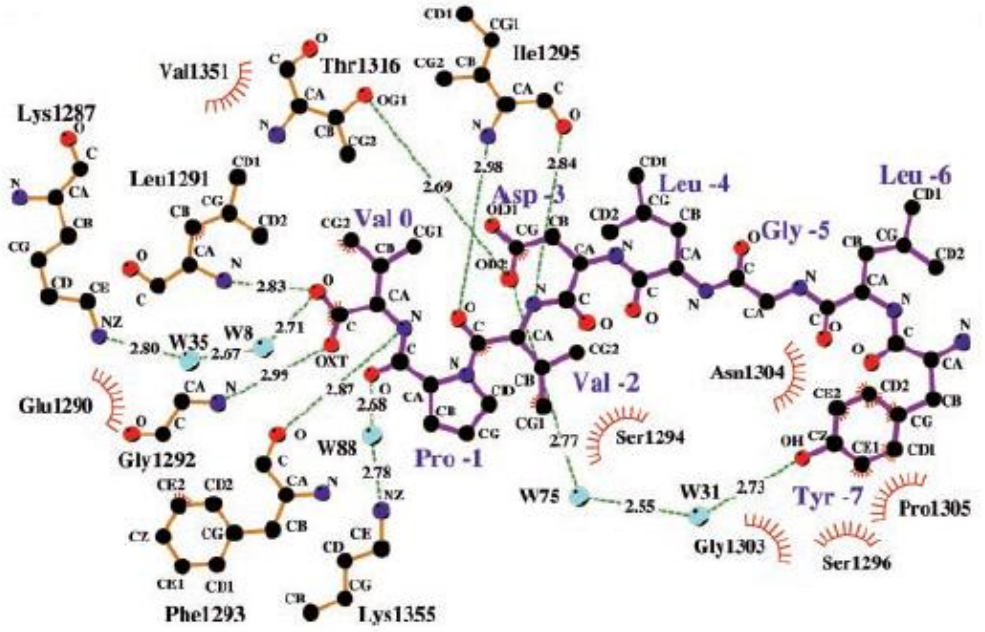


Figure 11 : Interactions entre le S1 en (-7), (-8) de la protéine à domaine PDZ Erbin et le peptide ErbB2 (PDB : 1MFG)

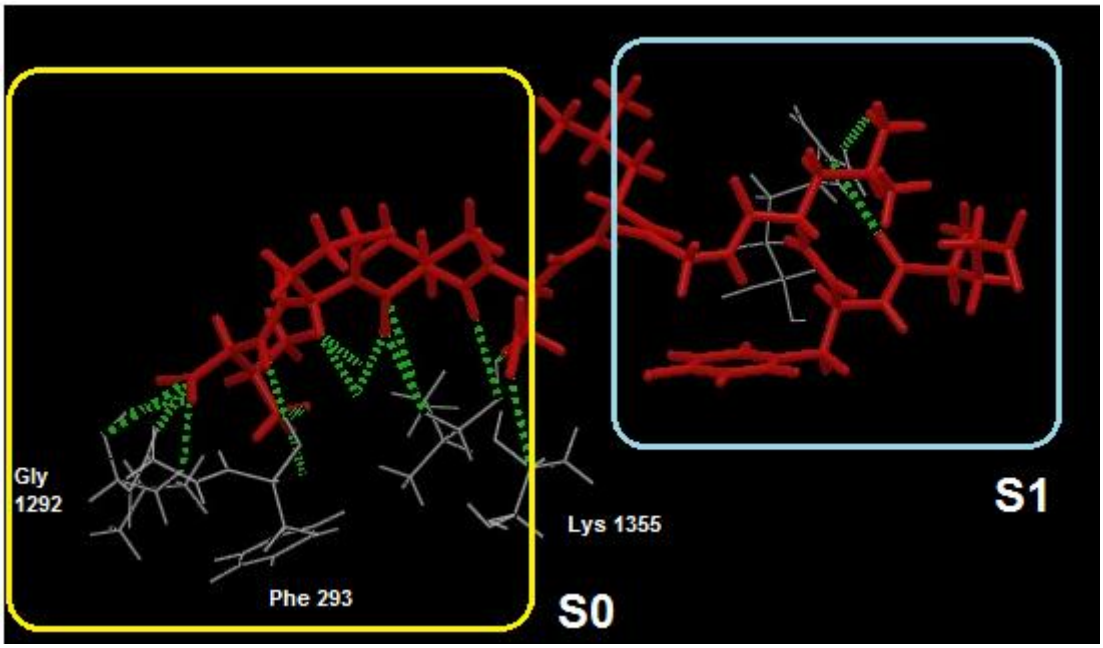


Figure 12 : Représentation 3D des interactions hydrogène (vert) entre la protéine à domaine PDZ Erbin et le peptide ErbB2 (rouge) (PDB : 1MFG)

On note, Figure 11 et 12, les interactions classiques (liaisons hydrogènes) entre Val(0) du ligand et la boucle GLGF et entre Val(-2) et Ile(1295) sur α_2. Les résidus (-3) à (-6) ne semblent pas interagir avec le domaine PDZ alors que la chaîne latérale de Tyr(-7) occupe une poche hydrophobe formée par les résidus Asn(1304), Gly(1303), Ser(1296) et Pro(1305) qui se situent sur la boucle entre les feuillets β_2 et β_3. Cette région, identifiée comme S1, présente une grande variabilité selon les domaines PDZ. En effet, il a été constaté que non seulement la longueur de cette boucle, mais aussi la nature des acides aminés qui la composent, peuvent être différents (Figure 13 et Figure 14).

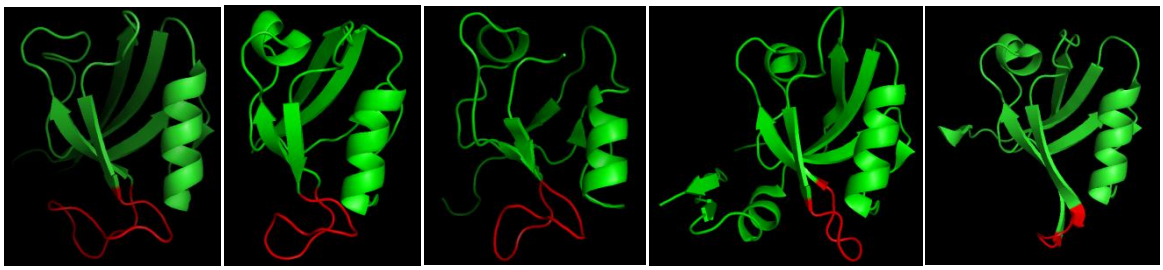


Figure 13 : De gauche à droite : Erbin (1MFG), PDZ 1 (PDB : 1IU0) 2 (PDB : 2KA9) et 3 (PDB : 1TQ3) (PSD-95) et PDZ 13 (PDB : 2FNE) (MPDZ)

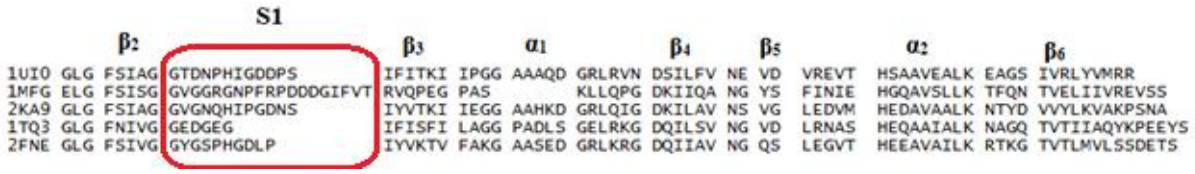


Figure 14 : Alignement FASTA des domaines PDZ de la Figure 13

Beaucoup d'études font appel à des peptides ou des molécules organiques trop petites ne permettant pas d'étendre leur champ d'interaction jusqu'au site S1. Ainsi, la majorité des publications décrivant des interactions entre les domaines PDZ et leurs ligands se contentent de décrire les interactions avec la poche S0.[32]

Cependant, le site S1 a également été proposé, entre autre par Nourry *et al.*,[20,33] en tant que site ayant également une importance dans les interactions avec les ligands. En résumé, les travaux effectués avec des peptides courts ne permettent pas de mettre en évidence la sélectivité/spécificité de l'interaction.

1.2.4 Domaines PDZ et pathologies

Un grand nombre d'interactions protéine-protéine, incluant les domaines PDZ sont à l'origine de diverses pathologies notamment le cancer ou la mucoviscidose. Ainsi, la compréhension de ces interactions et la détermination structurale de ces domaines apparait comme de nouvelles opportunités contre ces maladies.

1.2.4.1 Le cancer

Il existe un grand nombre de cancers et chacun d'entre eux a une origine et un fonctionnement différent. De nombreuses protéines peuvent être associées à ces pathologies, et plusieurs d'entre elles contiennent un ou plusieurs domaines PDZ.

La protéine E6 est une oncoprotéine exprimée par le papillomavirus humain (HPV). Elle a été identifié comme cause du cancer du col de l'utérus[34] et interagit avec plusieurs protéines à domaines PDZ comme CAL, TIP-1.[35] Cette interaction entraîne un processus de dégradation faisant intervenir l'ubiquitine. MUPP-1 est un exemple de protéine ayant pour fonction la suppression tumorale et qui se dégrade après s'être liée à E6 via le domaine PDZ.

Certaines protéines kinases (PBK), surexprimées dans le cas du cancer du sein par exemple, se lient aux domaines PDZ de protéines telles que SAP-97 par leur extrémité C-terminale jouant un rôle dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses...[36, 37]

1.2.4.2 La mucoviscidose

Le gène CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) code une protéine CFTR membranaire responsable du flux d'ions chlorure dont la fonction est essentielle à l'organisme. Les mutations de ce gène sont responsables de la mucoviscidose et de l'aplasie congénitale. La mutation la plus fréquente est la mutation ΔF508 qui consiste en une délétion de trois nucléotides au niveau du dixième exon du gène, aboutissant à l'élimination d'un acide aminé, la phénylalanine, en position 508. Cette suppression d'acide aminé affecte la conformation de la protéine CFTR et donc sa fonction. Il a été démontré que l'expression et la fonction de la protéine CFTR peuvent être régulées par la protéine à domaine PDZ NHERF1 (Na+-H+ exchanger regulatory factor 1).[38, 39]

1.2.4.3 La maladie de Parkinson

Une des protéines associées à la maladie de Parkinson (Parkin) joue un rôle très important dans le processus d'ubiquitination responsable de la dégradation des protéines. Une mutation de la protéine Parkin entraîne une perte de fonction et conduit à une neurodégénérescence, due à une agrégation toxique de protéines non-dégradées. L'extrémité C-terminal de Parkin se lie aux protéines à multiple domaines PDZ CASK/LIN-2 (Calcium/calmodulin-dépendent serine kinase) et PICK1 empêchant l'ubiquitination.[41]

1.2.4.4 La maladie d'Alzheimer

L'accumulation de peptides β-amyloïdes (Aβ, catabolite "normal" de la maturation de βAPP) engendre la formation de plaques amyloides qui sont à l'origine de cette maladie. Aβ sont des peptides de 40-42 acides aminés qui proviennent d'une protéine amyloïde plus importante (βAPP : β-Amyloid Precursor Protein) par un processus protéolytique.

Il a été démontré que les deux protéines à domaines PDZ X11α et X11β stabilisent l'APP, en inhibant ainsi la production des peptides β-amyloïdes.[26]

1.2.4.5 La grippe aviaire

L'action du virus H5N1 a été associée à la protéine NS1 qui l'encode. Il a été démontré que l'extrémité C-terminale de NS1 interagit avec 24% des domaines PDZ du génome humain et ceci pourrait expliquer la virulence du virus.[42]

1.2.4.6 Attaque ischémique

Une attaque ischémique conduit à une libération de glutamate. Ce neurotransmetteur agit sur le récepteur NMDAR dans les cellules nerveuses. Cette interaction a pour conséquence l'augmentation du flux entrant de calcium au niveau des cellules post synaptiques qui engendre une excitotoxicité. Il a été démontré que la protéine PSD-95 interagit avec NMDAR.[43] De ce fait, l'inhibition entre ces deux protéines pourrait réduire les risques d'attaque ischémique.

1.2.5 Inhibition du domaine PDZ

L'implication des protéines à domaines PDZ dans ces différentes pathologies montre bien l'intérêt de développer des inhibiteurs sélectifs de ces interactions protéine-protéine.

Le travail sur les domaines PDZ étant très récent, peu d'inhibiteurs ont été rapportés. La plupart du temps les inhibiteurs décrits dans la littérature sont des peptides modifiés à taille variable. Très peu d'exemple de petites molécules organique inhibitrices de protéine à domaine PDZ ont été décrites. Aucun de ces inhibiteurs n'a pour le moment été approuvé comme agent thérapeutique.

1.2.5.1 Les inhibiteurs peptidiques

De nombreux travaux effectués sur les inhibiteurs d'interactions PDZ/ligand consistent en la modification de ligands endogènes, Il s'agit en fait de construire un peptide de taille réduite mimant les interactions du ligand naturel et dans certains cas d'apporter des modifications structurales.

Udugamasooriya *et al*. ont développé une série de peptides cycliques. La stratégie étant de rigidifier la structure des peptides et de les stabiliser. Le peptide **1** (Figure 15) se lie au domaine PDZ3 de PSD-95, cependant les études ont été réalisées seulement par ITC (isothermal titration calorimetry, K_d = 3.76 µM), et aucun test *in vitro* n'est disponible.[44]

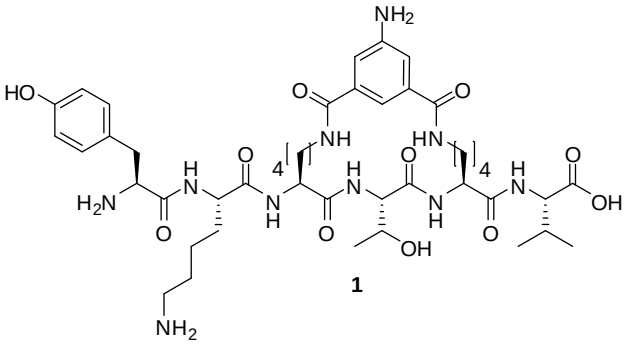
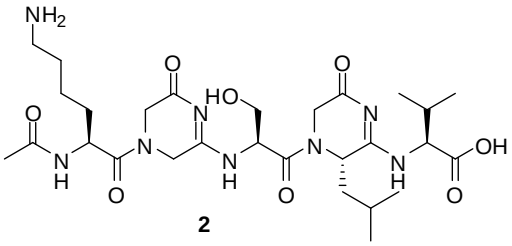


Figure 15 : Inhibiteur de Udugamasooriya *et al.*

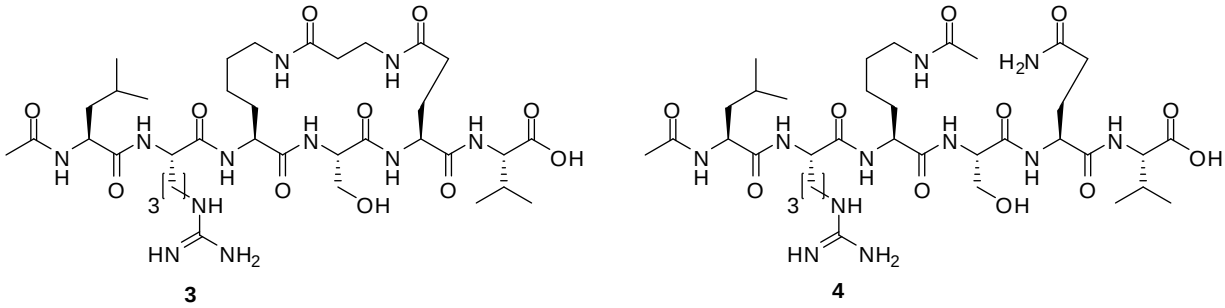
Des résultats intéressants ont été obtenus par Hammond *et al* avec le peptide **2** (Figure 16) se liant au domaine PDZ de la protéine α_1-syntrophin dans des concentrations plus faibles que le ligand naturel (K_d = 0.32 µM évalué par tests de compétition avec ligand endogène et suivi par un dosage de fluorescence).[45]



2

Figure 16 : Inhibiteur de Hammond *et al.*

Sharma *et al.* ont comparé (ITC) les formes cyclique et linéaire des peptides **3** (K_d = 11 µM) et **4** (K_d = 10 µM) (Figure 17) ligands du domaine PDZ10 de la protéine MUPP1. Ils ont montré que la forme linéaire se dégrade beaucoup plus vite *in vivo* que la forme cyclique. Par conséquent, l'effet du peptide cyclique **3** est plus prononcé que son homologue linéaire **4**.[46]

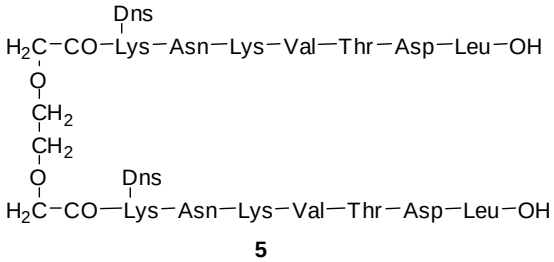


3 **4**

Figure 17 : Inhibiteurs de Sharma *et al.*

Paduch *et al.*[47](Figure 18) et Klosi *et al.*[48](Figure 19) ont synthétisé et évalué par ITC les peptides bivalents **5** (K_d = 25.8 µM) et **6a-e** dans le but de se lier à deux domaines PDZ en même temps, que ces domaines appartiennent à une même protéine ou à deux protéines distinctes.

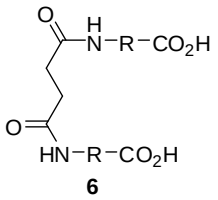
Paduch *et al.* ont démontré que lorsque les domaines PDZ sont sous forme de dimère, l'affinité avec le peptide bivalent est 20 fois plus importante qu'avec le monomère, celle-ci étant comparable à celle du ligand endogène.



5

Figure 18 : Inhibiteur de Paduch *et al.*

Klosi *et al*. ont démontré, quant à eux, qu'un minimum de six résidus est nécessaire pour se lier à un maximum de domaines PDZ. Ils ont également mis en évidence que ces six résidus sont nécessaires pour que le peptide puisse se lier simultanément à deux domaines PDZ3 de deux protéines PSD-95 avec des constantes d'affinité équivalentes.[48]

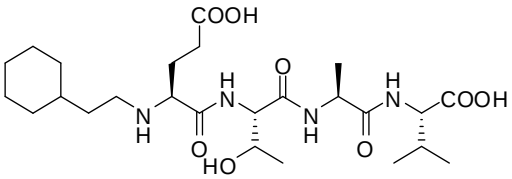


6

R		Kd (µM)
Lys–Gln–Thr–Ser–Val	**6a**	23.2 (±0.5)
Tyr-Lys–Gln–Thr–Ser–Val	**6b**	6.7 (±0.1)
Asn–Tyr-Lys–Gln–Thr–Ser–Val	**6c**	6.6 (±0.1)
Lys–Asn–Tyr-Lys–Gln–Thr–Ser–Val	**6d**	5.5 (±0.2)
Gly–Lys–Asn–Tyr-Lys–Gln–Thr–Ser–Val	**6e**	4.3 (±0.1)

Figure 19 : Inhibiteur de Klosi *et al.*

Une étude réalisée par Stromgaard *et al*. sur l'interaction entre PSD-95 et NMDA a permis de mettre en évidence le peptide modifié **7** (Figure 20) ayant une très bonne affinité avec PDZ1 et 2 de PSD-95. Ce tripeptide correspond à l'extrémité C-terminale de NMDA. Sa synthèse a été réalisée par troncation et par substitution des acides aminés naturels par des non-naturels afin de comprendre les interactions nécessaires. Ils ont évalués par « Fluorescence Polarization Assay » le peptide **7** sur les trois domaines PDZ de Dvl et ont obtenus trois valeurs de K_i : 0.94 µM pour PDZ1, 0.45 µM pour PDZ2, 11 µM pour PDZ3. Ils ont ainsi montré qu'un même ligand n'interagit pas de la même façon selon le domaine PDZ (début de sélectivité).[49]

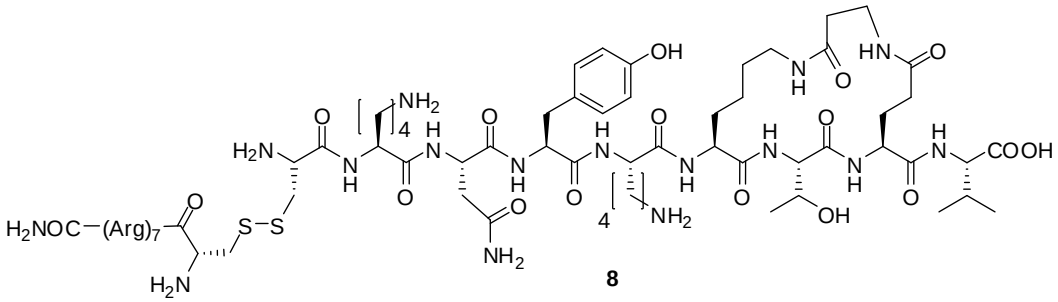


7

Figure 20 : Inhibiteurs de Stromgaard *et al.*

Lee *et al.* ont publié en 2009 l'évaluation par RMN de deux tripeptides (VVV et VWV) sur la protéine à domaine PDZ, Dvl. Ils ont mis en évidence, grâce à cette méthode, le site d'interaction dans le domaine PDZ de leurs peptides. La substitution d'une valine par un tryptophane a permis de mettre en évidence l'importance d'un résidu hydrophobe à cet endroit.[50]

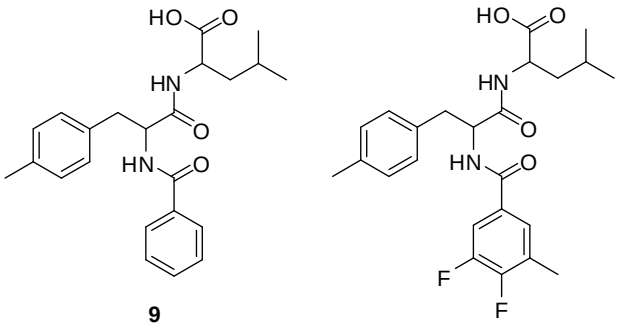
Leblanc *et al.* ont publié en 2010, le peptide complexe **8** (Figure 21) capable de se lier à la protéine à domaine PDZ, PSD-95. Ce peptide atténue l'hyperalgie thermique chez le modèle de rat sciatique neuropatique dans les conditions de douleur chronique.[51]



8

Figure 21 : Inhibiteur de Leblanc *et al.*

Pour terminer sur les inhibiteurs peptidiques de domaines PDZ, Zheng *et al*. ont récemment réalisé une étude portée sur la protéine à domaine PDZ Dvl impliquée dans la prolifération tumorale. Cette étude a permis, en partant du peptide **9** (K_i = 7.1 ± 2.8 µM) (Figure 22 et 23) et à l'aide d'une étude QSAR, d'optimiser les différents groupements de ce peptide afin d'obtenir le peptide **10** qui possède une constante d'affinité déterminée par fluorescence environ cinq fois meilleure (K_i = 1.5 ± 0.52 µM) que celle du peptide **9**. Cette étude a mis également en évidence la complémentarité des techniques de fluorescence et de RMN en vue d'obtenir les constantes d'affinité.[52]



9 **10**

Figure 22 : Inhibiteurs de Zheng *et al.*

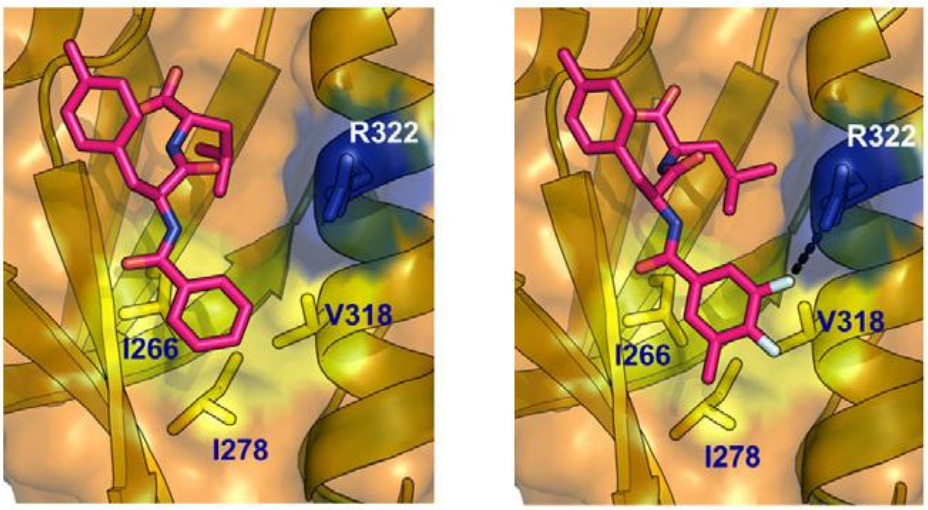
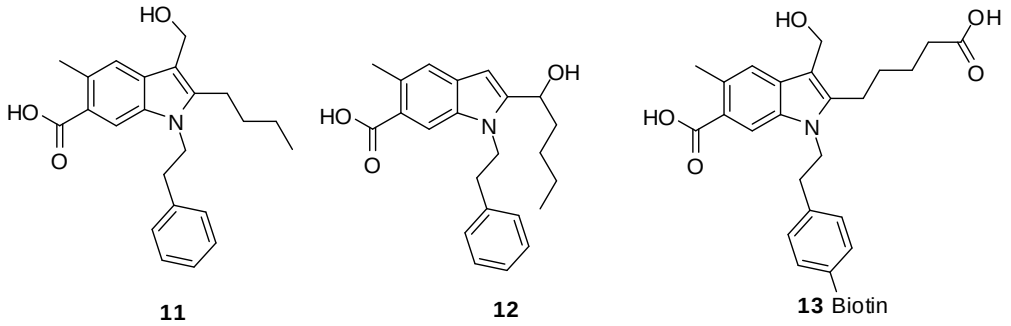


Figure 23 : Représentation 3D par *docking* des molécules 9 et 10[52]

Ces inhibiteurs peptidiques donnent un bon point de départ au développement de petites molécules organiques plus stables en vue d'inhiber les IPP en question. En effet, par une approche peptidomimétique et/ou par modélisation moléculaire, il est possible de concevoir de petites molécules organiques capables de mimer les ligands naturels et inhiber les IPP.

1.2.5.2 Petites molécules organiques

En 2003 Fujii *et al.* ont décrit la synthèse et l'évaluation de la molécule **11** (Figure 24) possédant un noyau indolique, qui se lie irréversiblement au second domaine PDZ2 de la protéine MAGI3.[53] Ce composé est issu d'un criblage d'une bibliothèque de molécules.

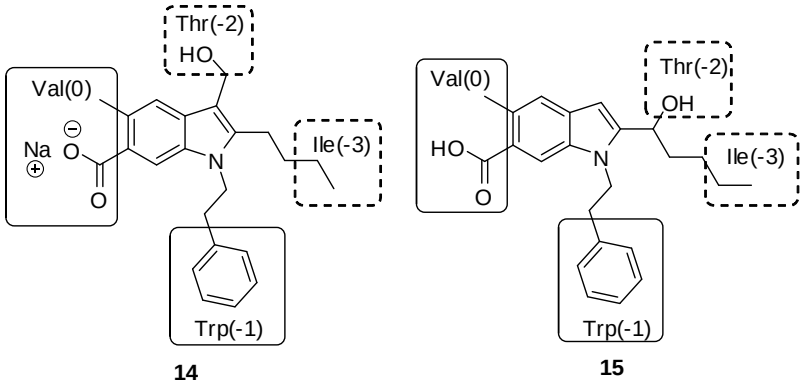


11 **12** **13** Biotin

Figure 24 : Inhibiteurs de Fujii *et al.*

La même équipe a également démontré que les inhibiteurs **12** et **13** (Figure 24) étaient des ligands réversibles de la même protéine mais sur le domaine PDZ1. Ces résultats mettent en évidence une sélectivité des molécules d'un domaine PDZ à un autre.[54]

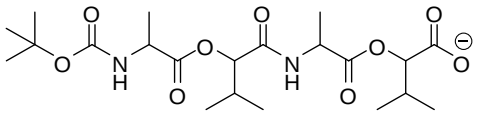
Il a été postulé que ces indoles pourraient mimer les interactions des quatre résidus de l'extrémité C-terminale du ligand PDZ avec le domaine PDZ. L'indole **14** (Figure 25) se lierait de manière covalente, agissant ainsi de manière irréversible, alors que l'indole **14** n'interagirait qu'avec des interactions non-covalentes.



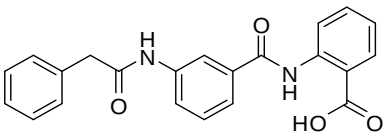
14 **15**

Figure 25 : Mise en évidence des parties de la molécule mimant le ligand endogène de MAGI3

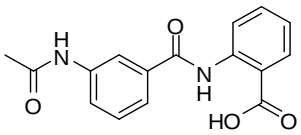
En 2005, Shan *et al.*[55] ont synthétisé et testé une structure issue d'un criblage virtuel d'une librairie (NCI), le carboxylate **16** (Figure 26) qui a montré des interactions significatives avec le domaine PDZ de la protéine Dvl par HSQC $^{1}H/^{15}N$. En 2009, le même groupe[56] a mis en évidence deux autres amides **17** et **18** à partir de la même librairie (mise à jour). Il s'agit également de *pseudo peptides* rigidifiés. Les tests *in vitro* de l'acide **17** donnent une constante d'affinité de 237 µM par rapport au domaine PDZ de la protéine Dvl. Cette molécule est capable d'inhiber l'interaction avec le ligand naturel Fz. Il s'avère que cette molécule s'aligne très bien avec le ligand naturel (Figure 26), il est donc supposé qu'elle est spécifique à ce domaine.



16



17



18

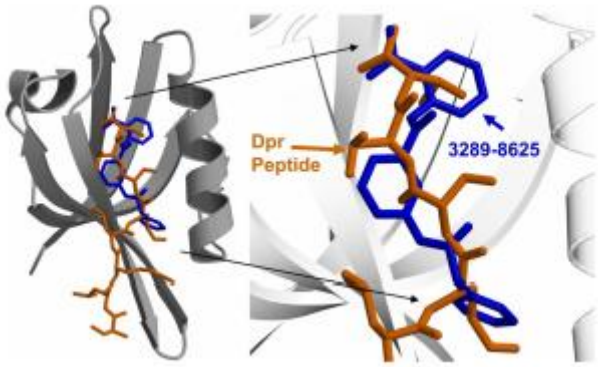
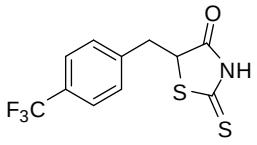


Figure 26 : Peptide et inhibiteurs (*docking*) de Shan *et al.*[55]

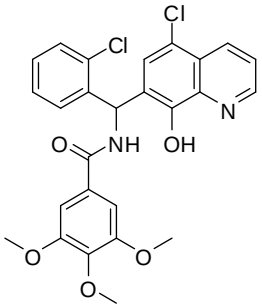
Joshi *et al*. ont étudié la protéine AF6 qui contient un domaine PDZ de classe II et ont réalisé un criblage par RMN pour identifier un inhibiteur. Le thiazole **19** (Figure 27) a montré une activité pour le domaine PDZ concerné. En effet, cette molécule est capable d'interagir avec le domaine PDZ de la même manière que le ligand naturel, notamment en mimant la Valine terminale. L'affinité est d'autant plus intéressante que la constante est du même ordre que celle du ligand naturel (100 µM). Cependant ce ligand s'avère non sélectif et se lie à tous les domaines PDZ de classe II.[57]



19

Figure 27 : Inhibiteur de Joshi *et al.*

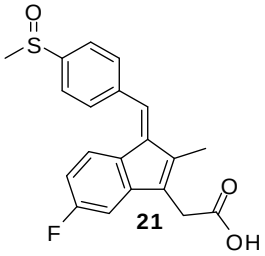
Chen *et al*. ont également identifié un « lead » inhibant l'interaction entre la protéine X11 et son ligand naturel. Ils sont parvenus à identifier la quinoléine **20** (Figure 28) parmi 100000 molécules en utilisant une technique de criblage à haut débit (HTFR : « homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer »). Cependant il n'a pas été prouvé que ce soit le domaine PDZ de X11 qui entre en interaction avec la quinoléine **20**. En effet, le test de fluorescence utilisé ne permet pas de savoir à quel endroit de la protéine la molécule se lie, mais uniquement de détecter s'il y a interaction entre une protéine et un ligand donné.[58]



20

Figure 28 : Inhibiteur de Chen *et al.*

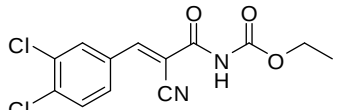
Lee *et al*. ont synthétisé la molécule **21** (Figure 29) et déterminé par RMN HSQC $^{1}H/^{15}N$, sur la protéine à domaine PDZ « Dishevelled », une valeur de Ki de l'ordre de 10 µM.[59]



21

Figure 29 : Inhibiteur de Lee *et al*.

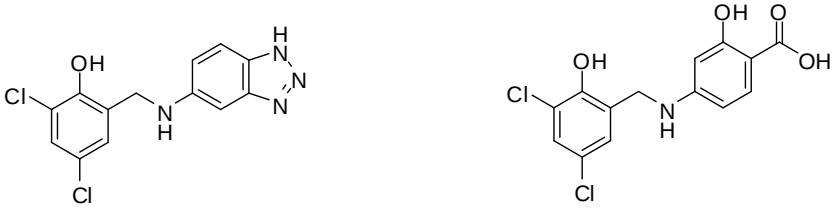
Récemment, Thorsen *et al*. ont criblé 44000 molécules par un test de fluorescence sur la protéine à domaine PDZ PICK1. Le carbamate **22** (Figure 30) présente un certain intérêt, puisqu'en chromatographie d'affinité, il se lie à PICK1 et non au domaine PDZ de PSD-95. De plus, le Ki est comparable à celui du ligand naturel (10 µM).[60]



22

Figure 30 : Inhibiteur de Thorsen *et al*.

Dernièrement Doucet *et al*. ont publié deux composés **23** et **24** (Figure 31) permettant d'inhiber les interactions entre la protéine à domaine PDZ PSD-95 et la protéine à domaine PDZ nNOS (IC_{50} = 31 µM et 82 nM). Cette inhibition impacte ainsi le complexe NMDA/PSD-95/nNOS et a pour effet de lutter contre la dépression en régulant le signal glutamatergique.[61]



23 **24**

Figure 31 : Inhibiteurs PSD-95/nNOS

Nous pouvons donc constater qu'un certain nombre de petites molécules organiques ont déjà été identifiées comme inhibiteurs des protéines à domaine PDZ. Toutes ces molécules ont été évaluées sur une seule cible, il n'apparait pas de réelle étude de sélectivité. Or pour pouvoir traiter une pathologie sans trop d'effets secondaires, il est nécessaire de s'assurer d'interagir avec une seule protéine PDZ voir même un seul domaine sur cette protéine et d'inhiber l'interaction de cette protéine avec son ligand de manière spécifique.

2 La douleur

2.1 Historique

La notion de douleur apparait pour la première fois dans le corpus hippocratique (430-380 av JC). A cette époque les causes de maladies ne sont pas connues et la douleur permet la localisation du mal qui amène ensuite le médecin à établir un diagnostic juste.[62]

Les idées évoluent ensuite avec Galien qui définit la douleur comme « *le passage d'un état à un autre du fait de modifications internes ou externes* ». Il met en place une classification qui va persister jusqu'à la Renaissance : la douleur est soit pulsative, soit gravative (sensation de lourdeur), soit tensive, soit pongitive (sensation de pénétration d'un objet dur et pointu). Pour lui, chaque organe a une douleur spécifique.

Grâce à la médecine Arabe et Avicenne (980-1038), la douleur devient un symptôme qui permet le diagnostic et renseigne sur l'évolution de la maladie.

Descartes (Figure 32) permet l'évolution de l'idée de douleur dans son *Traité de l'Homme*, il explique le fonctionnement du corps humain à une époque où la partie chimioélectrique du système nerveux est encore inconnue, il propose une conception linéaire des voies de la douleur.[63]



Figure 32 : Voie de la douleur par Descartes

Durant le siècle des Lumières le phénomène douloureux se complexifie, les causes possibles vont se ramifier, c'est-à-dire que la douleur peut être le signe de maux pouvant provenir de différents endroits du corps humain.

Aux XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècle, les scientifiques de l'époque se détournent de la théorie de Galien grâce à l'étude de la substance cérébrale. Ils découvrent que celle-ci est composée de deux parties, la substance grise et la substance blanche. C'est alors que les premières théories impliquant la relation entre structure cérébrale et fonctions cérébrales voient le jour: puisque la substance blanche est en continuité avec les nerfs du corps, il est envisageable qu'elle contienne les fibres qui véhiculent la douleur vers et à partir de la substance grise.

La douleur est enfin prise en charge au niveau thérapeutique à partir de la fin du XVIII^{ème} par l'utilisation de l'opium, puis au XIX^{ème} avec la découverte de la morphine et de l'aspirine.

Grâce à Bonica (1917-1994), la prise en charge de la douleur devient un point crucial pour la médecine, c'est dans ce but qu'il ouvre en 1960 la première clinique multidisciplinaire de la douleur dans l'état de Washington aux Etats-Unis et fait appel à des neurologues, psychiatres, pharmacologues, entre autres.

2.2 La Douleur, un fléau encore mal traité

La douleur est une sensation à laquelle nous avons tous été confrontés. Elle résulte de la détection par le système nerveux d'un stimulus nociceptif, c'est-à-dire d'un signal d'alarme de l'organisme.

Selon l'International Association for the Study of Pain (IASP), la douleur est "une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle (ou décrite en des termes évoquant une telle lésion)".[64]

La douleur a différentes classes (éthologique, physiopathologique) dont nous pouvons distinguer trois groupes : provoquée par un traumatisme, par une maladie, ou qui découle d'un dysfonctionnement du système nerveux qui est responsable de sa transmission.

La douleur est, heureusement, la plupart du temps légère et sans conséquence, néanmoins elle peut aussi être intolérable et nécessiter un traitement. Dans le pire des cas, elle peut persister dans le temps et donc devenir chronique, réduisant ainsi les activités de la personne souffrante et lui rendant la vie insupportable.

Dans le milieu médical, plus de 80% des patients consultent en vue de réduire la douleur ressentie. Nous ne sommes pas tous égaux face à elle, en effet les femmes souffrent davantage que les hommes, et les jeunes sont moins sujets aux douleurs de type chronique que les personnes âgées. Le vieillissement de la population est donc à l'origine d'un nombre de plus en plus important de personnes souffrant quotidiennement. Une enquête réalisée en 2003 a montré que 78 % des Français de plus de 18 ans ont été confrontés à la douleur dans les deux années précédant celle-ci :

- 57 % y ont été confrontés personnellement, pour eux-mêmes ou un de leurs enfants de moins de 15 ans (54% ont été touchés personnellement, dont 28 % souffraient encore lors de l'enquête et 9 % ont été confrontés à la douleur par le biais d'un de leurs enfants de moins de 15 ans);
- 21 % des personnes interrogées ont été confrontées plus indirectement pour une personne de leur entourage ou un de leurs enfants de 15 ans ou plus.

Seul un Français sur 5 (22 %) n'a pas été confronté à la douleur durant les deux dernières années.[65]

Le médecin a donc constamment à faire face à la réalité de la souffrance humaine et à sa complexité, qui se traduit par une difficulté de la prise en charge thérapeutique par le clinicien.

Sur le plan de la recherche fondamentale et clinique, la douleur prend une place de plus en plus conséquente. Les connaissances ont beaucoup évoluées et cela nous a permis de mieux comprendre les phénomènes douloureux ainsi que les mécanismes neurophysiologiques et psychologiques.

Les façons d'intervenir ont également évolué et de nouvelles notions sont apparues comme la douleur occulte ou idiopathique. Cela a permis de définir les douleurs qui n'ont pas de causes physiologiques.

La prise en charge de la douleur est actuellement insuffisante car nous ne possédons pas encore tous les outils pour satisfaire la demande qui est de plus en plus grande. En France, 20 Millions de personnes présenteraient des douleurs chroniques.[66] On dénombre 233 « structures douleur » dans le millier d'établissements hospitaliers de France, soit à peine un quart des établissements en sont pourvus. Le délai moyen pour obtenir un premier rendez-vous est d'environ 4 mois, ces structures étant très sollicitées.[67]

Des progrès sont à réaliser dans tous les domaines. En effet de nombreux mécanismes biologiques sont encore inconnus, un grand nombre de cibles thérapeutiques sont à identifier et par conséquent la recherche de nouveaux médicaments est incontournable. Des efforts importants sont réalisés, et un « Plan Douleur » de 14 M € a été mis en place en France entre 2006 et 2010 visant plusieurs points :[68]

- Améliorer la prise en charge des douleurs des populations les plus vulnérables notamment des enfants et des adolescents, des personnes polyhandicapées, des personnes âgées et en fin de vie.
- Améliorer la formation pratique initiale et continue des professionnels de santé pour mieux prendre en compte la douleur des patients.
- Améliorer les modalités de traitement médicamenteux et d'utilisation des méthodes non pharmacologiques pour une prise en charge de qualité.
- Structurer la filière de soins de la douleur, en particulier celle de la prise en charge des douleurs chroniques dites rebelles, pour rendre plus efficace le dispositif.
- Etudier et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'importance du phénomène douloureux se comprend d'autant mieux par les sommes dépensés dans les traitements (Figure 33). Les analgésiques représentent 1 M d € annuels de dépenses remboursées, auxquels il faut ajouter quelques 350 k € d'automédication. Il est fait ici abstraction des traitements non médicamenteux de la douleur, pour lesquels les données manquent presque totalement (acupuncture…). Avec 1 M d €, l'antalgie coûte autant que tous les antibiotiques confondus, que les antihypertenseurs, que les hypocholestérolémiants et que les antiulcéreux. Elle se situe ainsi dans le peloton de tête des postes de dépenses pharmaceutiques dans notre pays.[69] Sans compter qu'il très difficile d'évaluer les coûts engendrés par les hospitalisations et les congés maladies ayant pour cause la douleur.

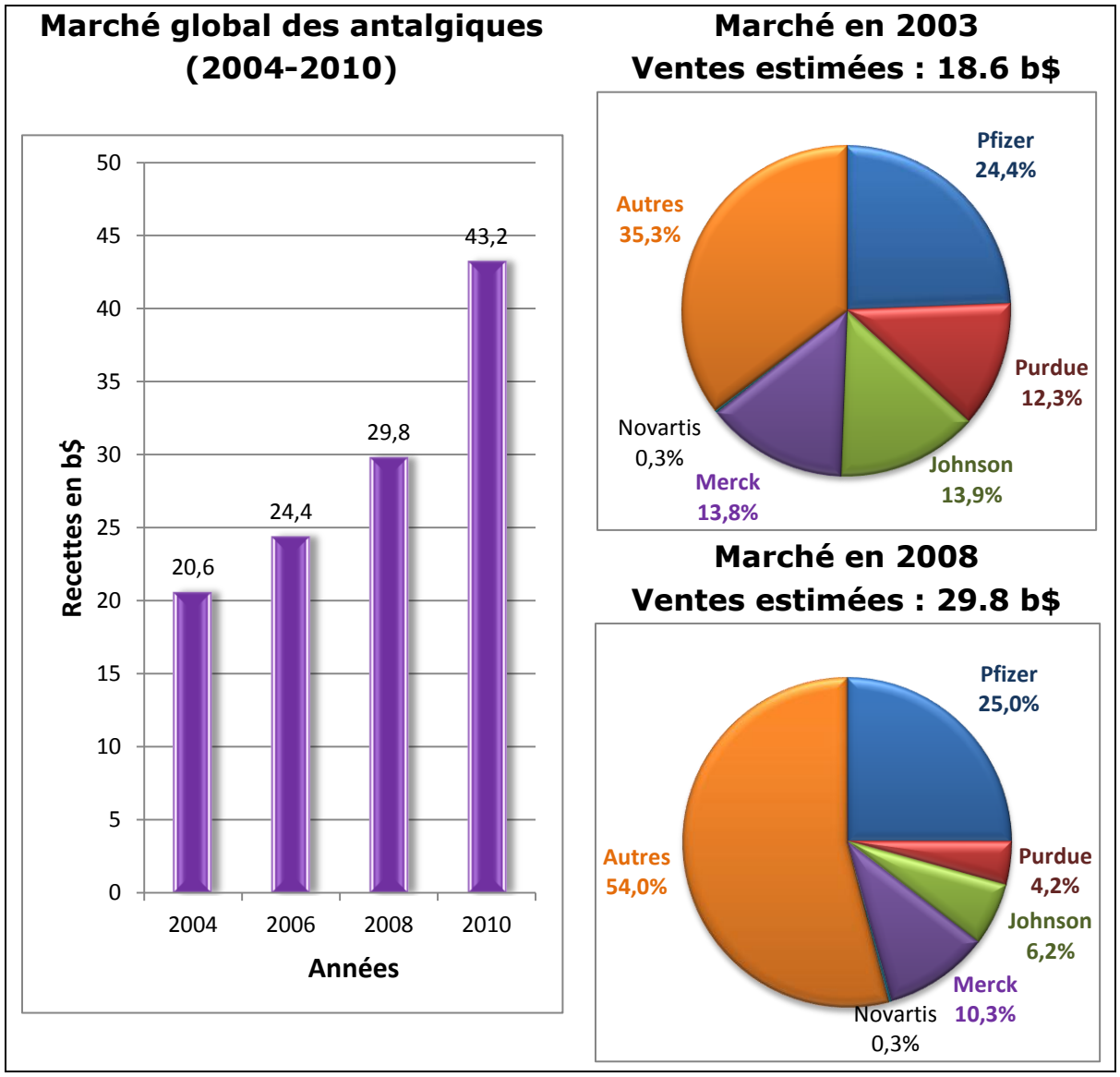


Figure 33 : Marché mondial des antalgiques[64]

2.3 Neuro-physiologie de la douleur

Nous allons dans cette partie détailler le mécanisme de transmission du message douloureux de la périphérie aux centres nerveux supérieurs. Pour commencer, il nous faut définir le terme nociception qui découle des observations de Sherrington.[70] La nociception a une fonction défensive, d'alarme. C'est l'ensemble des phénomènes permettant l'intégration au niveau du système nerveux central d'un stimulus douloureux *via* l'activation des nocicepteurs (récepteurs à la douleur) cutanés, musculaires et articulaires. Le transport de l'information sensorielle par les nerfs se fait de la périphérie au niveau des terminaisons des fibres amyéliniques jusqu'au système nerveux central. Il faut que la stimulation dépasse un certain seuil de dépolarisation de la membrane pour qu'il y ait un déclenchement de PA (potentiel d'action.[71,72]

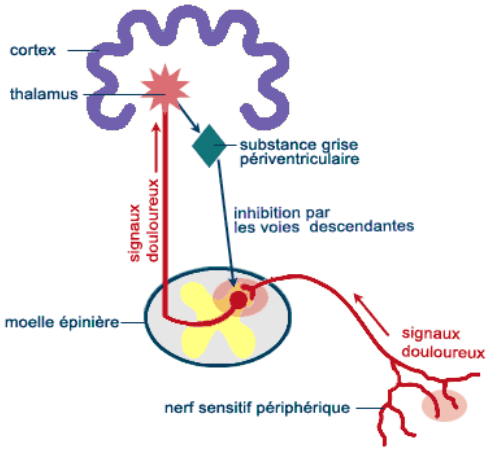


Figure 34 : Voie de la douleur

La voie de la douleur comprend trois types de neurones : le premier véhicule le message des nocicepteurs vers la moelle épinière, où s'effectue un premier relais synaptique. Ce dernier traverse la moelle et conduit l'information jusqu'à différentes régions des complexes du thalamus où s'établit un contact synaptique avec le troisième neurone qui conduit enfin l'information nociceptive vers le cortex et les structures limbiques.

Il est très important de noter qu'à chaque fois que l'un des trois neurones établit un contact synaptique, il y a une intégration de l'information qui subit des influences inhibitrices ou excitatrices. Ce sont des régions d'intégration qui sont les cibles de la plupart des médicaments antalgiques.[73, 74]

Le stimulus nociceptif initial ne constitue pas l'unique facteur contribuant à la douleur ressentie. Quatre étapes se succèdent, marquées par une série de réactions chimiques et électriques : la transduction, la transmission, la modulation et la perception.[75]

- La transduction sensorielle correspond à la conversion d'une énergie physique (mécanique, thermique, chimique) en potentiel d'action dans les terminaisons nerveuses.
- La transmission de l'influx nerveux se présente en trois temps : de la périphérie à la moelle épinière, de la moelle épinière au tronc cérébral et au thalamus, et pour finir du thalamus au cortex.[76]
- La troisième étape, la modulation, concerne les neurones responsables de la transmission du message douloureux de la périphérie vers le cortex et leurs facultés à ajuster l'information.
- La quatrième étape, la perception de la douleur, constitue l'aboutissement d'un stimulus nociceptif et cette étape est propre à chaque personne car en effet chacun la perçoit différemment.[77]

2.4 **Différents types de douleur**

2.4.1 La douleur aiguë

La douleur aiguë est une douleur immédiate, et généralement brève. Elle est causée par une stimulation nociceptive de l'organisme, telle qu'une lésion tissulaire, pouvant se produire sous la forme d'un stimulus thermique (contact de la peau avec du feu) ou mécanique (un pincement, un coup). La douleur aiguë s'atténue habituellement d'elle-même si la cause est supprimée. La durée d'évolution est l'élément prépondérant qui permet de distinguer une douleur aiguë "signal d'alarme" et une douleur chronique "douleur maladie".

2.4.2 La douleur chronique

Une douleur chronique est une douleur qui évolue pendant 3 à 6 mois. La douleur qui persiste et qui est rebelle aux antalgiques usuels est soit continue (douleur cancéreuse, algie post-zostérienne, céphalées de tension chronique...), soit intermittente (névralgie faciale, migraine, algie vasculaire de la face, crise drépanocytaire...). Au stade de la douleur chronique, elle représente pour le patient l'essentiel de sa maladie avec un fort impact psychologique et social.

Parmi ces deux catégories de douleur il existe :

► La douleur neurophatique provient directement d'une affection du système nerveux. Elle est liée à un défaut majeur de la transmission douloureuse avec genèse d'influx douloureux au sein des voies de la douleur. Elle est causée par une destruction ou une lésion d'une structure du système nerveux. C'est le type de douleur caractérisant un zona, une amputation ou un traumatisme.

► La douleur nociceptive ou douleur par excès de nociception est généralement aiguë et fait suite à une stimulation mécanique, thermique ou chimique. Elle joue un rôle important dans les réflexes de retrait et est donc nécessaire pour la survie. Elle est provoquée par la mise en jeu normale des voies neurophysiologiques de la douleur et est transmise par le système nerveux intact. Ce type de douleur est le plus répandue (brûlure, entorse, fracture…).[78]

► La douleur psychogène existe en l'absence de lésion. Elle est dépendante du psychisme et par conséquent des processus relevant de l'esprit, de l'affectivité… Elle est liée aux problèmes psychologiques, psychiques ou sociaux de l'individu et c'est en traitant ces problèmes que l'on traite ces douleurs. Elle reste réellement ressentie par l'individu. Les mécanismes physiologiques de ces douleurs ne sont pas clairement définis mais l'utilisation d'antalgiques semble inefficace.

2.5 Traitements de la douleur

La prise en charge thérapeutique de la douleur n'a pas toujours été la priorité du monde médical. Les idées ont heureusement évoluées et la prise en charge de celle-ci est devenue incontournable pour la qualité de vie, le confort et le bien-être du patient. L'usage pharmacologique dans le but de réduire le phénomène douloureux est essentiel et repose sur la connaissance des mécanismes physiologiques ainsi que sur les caractéristiques propres à la personne.[79].

Une méthodologie commune a été adoptée en vue d'effectuer la meilleure approche pharmaceutique possible.[80] Dans un premier temps il faut déterminer le type de douleur, sa localisation et son intensité, dans un deuxième temps, l'évolution temporelle et le facteur déclenchant, et dans un dernier temps l'écoute des informations du patient.

2.5.1 Evaluation de la douleur

Pour évaluer le degré douleur d'un patient plusieurs techniques peuvent être utilisées :

- L'échelle visuelle analogique (EVA) : le patient positionne le curseur en un point d'une ligne dont l'extrémité de gauche correspond à « pas de douleur » et celle de droite « Douleur maximale imaginable ». Au verso, le soignant lit le chiffre correspondant à la position du curseur sur une échelle de 0 à 100 (Figure 35).

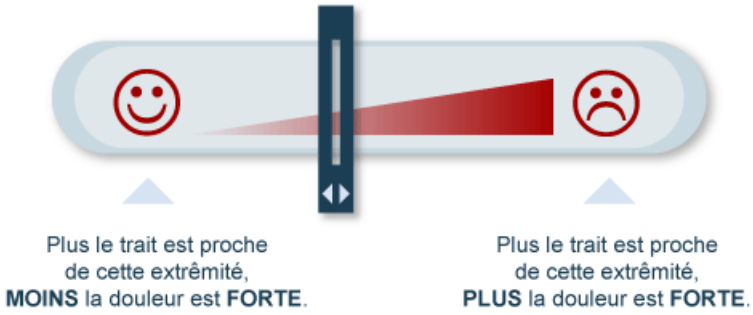


Figure 35 : Echelle visuelle analogique

- L'évaluation verbale simple (EVS) : le patient décrit l'intensité de sa douleur à l'aide de mots simples : pas de douleur, faible, modérée, intense, extrêmement intense.

- Evaluation numérique (EN) : le patient note sa douleur au moment présent sur une échelle allant de 0 à 10 (Figure 36).[81]

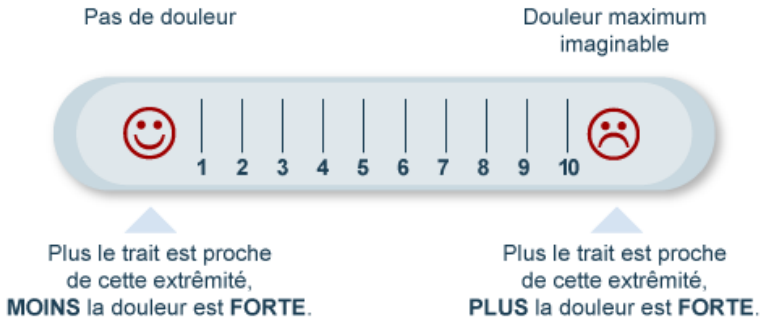


Figure 36 : Echelle numérique de la douleur

2.5.2 Antalgiques et Analgésiques

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini une échelle hiérarchique d'utilisation des antalgiques en trois paliers successifs : le palier 1 pour les antalgiques non opiacés, le palier 2 pour les antalgiques opiacés faibles et le palier 3 pour les antalgiques opiacés forts. Cette échelle permet une hiérarchisation des analgésiques en fonction de leur niveau de puissance. Cette échelle permet au médecin de traiter la douleur de façon graduelle.

Cette classification n'est utile qu'à condition d'une bonne communication patient/médecin et de la bonne évaluation de l'intensité douloureuse.[82] En effet il est important d'essayer plusieurs antalgiques d'un même palier avant de passer au suivant.

2.5.2.1 Antalgiques de palier 1

Les antalgiques de palier 1 doivent être prescrits dans le cas d'une douleur légère ou modérée. Ils agissent principalement par inhibition de la cyclo-oxygénase, une enzyme responsable d'une cascade de réactions à l'origine, entre autre, de la douleur. Les effets secondaires les plus fréquents sont surtout gastriques, mais d'autres troubles très graves peuvent survenir en cas de surdosage.

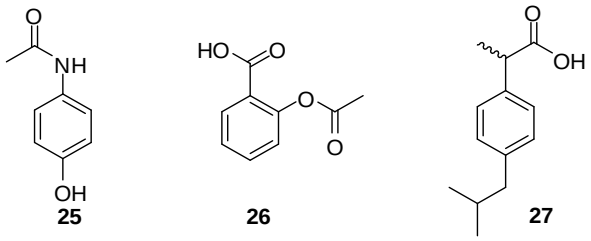


Figure 37 : Antalgiques de classe I

- Le paracétamol

En 1878, Harmon Northrop Morse synthétisa une substance baptisée acylaminophénol, mais c'est seulement 50 ans plus tard qu'elle fut commercialisée comme médicament sous le nom de paracétamol **25** (Figure 37). C'est le médicament le plus prescrit en France (260 millions de doses). Le mécanisme d'action complet du paracétamol reste inconnu, cependant, il a été démontré qu'il agit principalement au niveau du système nerveux central. Selon une étude de 2006, le paracétamol agirait en inhibant au niveau central la production de prostaglandines, impliquées dans les processus de la douleur et de la fièvre, par le biais d'une action inhibitrice sur l'enzyme prostaglandine H_2 synthase (PGHS), qui comporte notamment un site actif COX, cible de la majorité des AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), et un site peroxydase (ou POX), sur lequel agirait le paracétamol. Le paracétamol n'aurait pas d'action directe sur les enzymes cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2), les deux formes de COX sur lesquelles agissent les AINS comme l'aspirine ou l'ibuprofène.[83]

- L'aspirine®

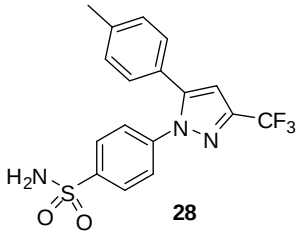
Découverte par les Sumériens il y a 2000 ans et synthétisée par Hoffman, chimiste Allemand en 1897, l'aspirine® **26** (Figure 37) est l'antalgique le plus utilisé au monde avec 35,000 tonnes produites chaque année. L'aspirine, par une réaction chimique d'acétylation, inhibe de façon irréversible les enzymes cyclo-oxygénases (COX 1 et COX 2), des enzymes participant à la production de prostaglandines et de thromboxanes. L'aspirine est différente des autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui inhibent de façon réversible cette enzyme. L'aspirine fait baisser la fièvre (antipyrétique), en réduisant la production de prostaglandines dans l'hypothalamus, thermostat de la température corporelle.
Elle réduit la douleur en bloquant la production des hormones responsables des messages transmis aux récepteurs de la douleur dans le cerveau, d'où son efficacité sur les migraines et les douleurs d'origines diverses.

Le mécanisme non-sélectif de l'aspirine est à l'origine de ses effets indésirables puisque le récepteur COX-1 entraîne l'inhibition de la synthèse des prostaglandines provoquant des effets indésirables tels que des risques hémorragiques, de l'hypersensibilité, ou des effets hépatiques…

- L’ibuprofène

Découvert en 1961 par Nicholson et Burrows des Laboratoires Boots en Angleterre, cet antalgique est le plus vendu au monde (en 2003, 15 millions de doses prescrites en France seulement). L’ibuprofène **27** (Figure 37) provoque l’inhibition non-sélective des COX-1 (protège la muqueuse) et des COX-2 (douleur) et donc la baisse de prostaglandines. L'ibuprofène est commercialisé en mélange racémique bien que l'activité inhibitrice des cyclo-oxygénases est due à l'énantiomère *S*-(+). En effet, dans le corps humain, l'énantiomère *R*-(-) se bio-convertit en son énantiomère *S*-(+).
L’ibuprofène provoque lui aussi des effets secondaires tels que des nausées, des vomissements, lorsqu’il est pris à trop forte dose.

- Autres



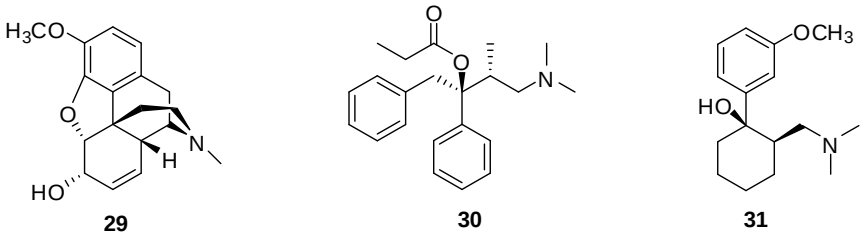
28

Figure 38 : Le célécoxib

Le célécoxib **28** (Figure 38) est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de la famille des coxib (inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase-2) utilisé essentiellement dans le traitement symptomatique d'affections rhumatismales (arthrose, polyarthrite rhumatoïde et spondylarthrite ankylosante). Il est fabriqué par la multinationale Pfizer.[84]

2.5.2.2 Antalgique de palier 2

Le palier 2 de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) concerne les analgésiques opiacés « faibles » et opioïdes tels que la codéine, la dihydrocodéine, le dextropropoxyphène et le tramadol.[85] La codéine et le dextropropoxyphène sont souvent associés à des antalgiques de palier 1, car leurs modes d'action sont différents et complémentaires voir synergiques. Ce type de substance agit au niveau du cerveau sur des récepteurs spécifiques responsables de la diminution de la douleur. Ce type de composés expose souvent à une dépendance physique.



29 **30** **31**

Figure 39 : Antalgiques de classe II

- La codéine

En 1932, la codéine **29** (Figure 39) a été découverte par le chimiste Robiquet. C'est un alcaloïde de l'opium utilisé comme antalgique, antitussif (Neo-Codion®) et antidiarrhéique. Elle exerce une action antalgique par liaison directe avec les récepteurs opioïdes-μ (MOR).
Elle est aussi métabolisée en morphine par déméthylation, avant d'être glycuro-conjuguée pour être éliminée par le foie. Les effets indésirables de cette molécule sont les troubles digestifs: constipation et nausées auxquels on peut ajouter l'altération de la vigilance et l'accoutumance.
Elle est souvent associée au paracétamol comme dans le Codoliprane® (Sanofi-Aventis) en vue d'obtenir une meilleure efficacité dans le cas de douleurs aigües ou chroniques.[86]

- Le dextropropoxyphène

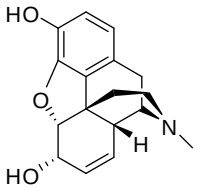
Le dextropropoxyphène **30** (Figure 39) est un antalgique opioïde dérivé de la morphine. Quinze fois moins puissant que cette dernière, il est commercialisé en association avec le paracétamol (Di-Antalvic®).
Alors qu'il était commercialisé depuis environ 45 ans, l'Agence Européenne des Médicaments a recommandé en 2009 le retrait progressif en Europe des médicaments contenant le dextropropoxyphène du fait des risques, notamment mortels, en cas de surdosage (retiré du marché en 2011).

- Le tramadol

Le tramadol (Zaldiar®,Biodalgic®) **31** (Figure 39) est un analgésique central de synthèse proche des opiacés qui agit selon deux mode d'action. Il possède un effet opioïde avec une sélectivité plus marquée pour les récepteurs opioïdes-μ et un effet inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine.
La molécule se présente sous la forme d'un mélange de deux énantiomères. L'énantiomère (-) inhibe la recapture de la noradrénaline, quant à l'énantiomère (+), il inhibe la recapture de la sérotonine. L'énantiomère (+) agit également sur les récepteurs-μ, mais a une affinité faible par rapport à la codéine ou la morphine. Par contre son affinité augmente quand il est métabolisé au niveau hépatique par le cytochrome CYP2D6 du foie en tramadol-*O*-méthylé. Ce métabolite joue un rôle important dans l'activité antalgique.
Le tramadol peut provoquer des effets indésirables similaires aux opiacés. Il est souvent utilisé dans le cas d'arthrose et de douleur cancéreuse.
L'association de tramadol et de paracétamol (Ixprim®) a permis de soulager la douleur plus efficacement que chacun des principes actifs utilisé seul et que le placebo. Par comparaison à l'ibuprofène, l'effet antalgique de l'association a été comparable mais le délai d'action a été deux fois plus court (17 minutes contre 34 minutes).[87]

2.5.2.3 Antalgique de palier 3

La majorité des actifs du palier 3 concerne les analgésiques opiacés et opioïdes forts : la morphine et ses dérivés. Ces médicaments ont les mêmes caractéristiques et le même mode d'action que les précédents, mais sont plus puissants. Ils sont utilisés en cas de douleurs intenses ou rebelles aux antalgiques de niveau 2. Ils ont les mêmes effets indésirables que les analgésiques opiacés et opioïdes faibles et peuvent entraîner les mêmes problèmes de dépendance.



32

Figure 40 : La morphine

Découverte en 1804 par Seguin, Courtois et Derosne, la morphine **32** (Figure 40) agit sur le système nerveux central par l'intermédiaire des récepteurs opioïdes (μ, δ, κ). Elle mime des endomorphines appelés enképhalines qui sont des neurotransmetteurs libérés par les neurones en cas de douleur trop forte et qui se lient aux récepteurs opioïdes.[88] La morphine est également synthétisée par le système nerveux central, cette découverte date des années 80.[89]

La morphine et ses dérivés sont très efficaces contre la douleur mais ils sont à l'origine de nombreux effets indésirables qui ne sont pas négligeables (effets contrôlés ou qui cèdent après quelques temps):

- ✓ Dépression respiratoire : la morphine provoque une réduction de la sensibilité des centres respiratoires qui peut conduire à l'apnée. La dépression des centres de la toux apparaît dès les plus faibles doses : inhibition du réflexe de toux et diminution de la sensibilité des récepteurs trachéo-bronchiques.
- ✓ Effets digestifs : nausées et vomissements apparaissent chez la moitié des patients. Ils peuvent être, à de rares exceptions prés, contrôlés par les produits antivomitifs. Elle est également source de constipation et de rétention d'urine.
- ✓ Système nerveux central : la somnolence est constatée surtout en début de traitement, si elle persiste c'est le premier signe du surdosage. On peut également constater une sensation d'euphorie. L'effet secondaire le plus important reste le phénomène de dépendance. En pratique, il est souvent difficile de distinguer la tolérance véritable, du renforcement des processus douloureux.

2.5.2.4 Autres médicaments

Dans certains cas on utilise la co-analgésie. Il s'agit en fait d'utiliser un autre type de médicament comme les corticoïdes ou les antidépresseurs qui favorisent l'action des antalgiques décrits précédemment.

- Les antidépresseurs[90]

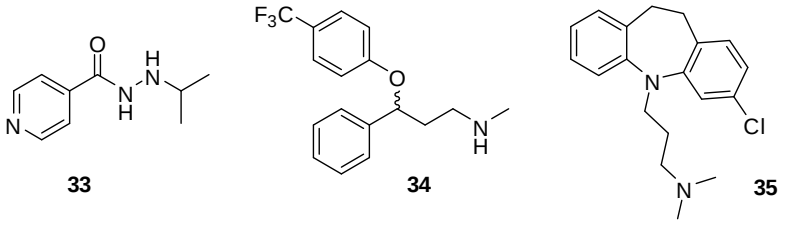


Figure 41 : Les antidépresseurs

C'est depuis les années 50 que l'on connait les antidépresseurs, avec la découverte de l'imipramine en 1957 par Kuhn, un psychiatre suisse. Le mécanisme d'action des antidépresseurs est généralement lié à un effet sur les neurotransmetteurs (en particulier la sérotonine et la noradrénaline).

- ✓ Les IMAO (Inhibiteurs des monoamines oxydases) comme l'iproniazide (Marsilid®) **33** (Figure 41) augmentent la concentration en sérotonine en inhibant les enzymes (les monoamines oxydases ou MAO) chargées de sa dégradation. Leur usage requiert une surveillance très contraignante de l'alimentation et ils ne sont maintenant que très rarement utilisés.

- ✓ Les ISRS (inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine) comme la fluoxétine **34** (Figure 41) augmentent la concentration de sérotonine dans la synapse en empêchant sa recapture dans le neurone pré-synaptique.
- ✓ Les antidépresseurs tricycliques comme la clomipramine **35** (Figure 41) empêchent la recapture de divers neurotransmetteurs, y compris la sérotonine, la noradrénaline et la dopamine. Ces antidépresseurs sont les plus anciens et restent très efficaces malgré des effets secondaires parfois gênants.
- ✓ Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine-noradrénaline (IRSNa) inhibent de façon sélective la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine (venlafaxine, milnacipran…).

En présence de douleurs neuropathiques ou d'une composante neuropathique participant à une douleur chronique, les antidépresseurs restent à l'heure actuelle parmi les médicaments de premier choix d'après des études cliniques.[91]

Les effets secondaires des antidépresseurs sont très nombreux, sur le système nerveux central (sédation), sur le système cardio-vasculaire (hypotension), sexuels (diminution de la libido), sur la prise de poids.

- Les anticonvulsivants

Les anticonvulsivants (gabapentine et prégabaline) sont utilisés dans le cas de douleurs neuropathiques, mais l'inconvénient est qu'ils doivent être utilisés à des doses importantes, ce qui entraîne une multiplication des effets indésirables (somnolence, troubles hépatiques).[92]

3 Le projet

3.1 Les domaines PDZ et la douleur

La douleur est un problème important de santé publique. Les traitements actuels, qu'ils soient à base d'opiacé ou non, sont largement insuffisants. La nécessité de trouver de nouvelles cibles pour mettre au point de nouveaux médicaments est donc indispensable, ainsi que la réduction des effets secondaire en étant le plus sélectif possible.

Plusieurs domaines PDZ ont déjà été mis en avant comme étant impliqués dans la transmission du message douloureux, notamment PSD-93 et 95 ainsi que SAP-97. Nous allons présenter quelques exemples d'interactions protéine-protéine impliquées dans ce domaine thérapeutique.[93-101]

3.1.1 Récepteurs N-méthyl-D-aspartate

Le récepteur NMDA interagit par le biais de son extrémité C-terminale avec les domaines PDZ de PSD-93, PSD-95 et de SAP-102. Ces protéines sont capables de réguler le message douloureux (neuropathique et inflammatoire) dépendant de ce récepteur.[99]

Il a été démontré *in vivo* chez le rat et la souris que l'interruption de l'interaction entre NMDA et ces protéines entraîne une réduction significative des douleurs chroniques. Cette hypothèse a été validée en utilisant un peptide de 20 acides aminés capable de mimer le ligand naturel et prouvant ainsi qu'il était possible d'inhiber l'interaction NMDA/PSD-95, produisant ainsi un effet antalgique.[51, 100]

3.1.2 Récepteur « Acid-sensing ion channels »

Les récepteurs ASICs (« Acid-sensing ion channels ») ont également une importance dans la transmission du message douloureux surtout en cas d'inflammation.[103] Plusieurs protéines à domaines PDZ interagissent avec ces récepteurs, notamment CIPP. En effet, cette protéine interagit avec le récepteur ASIC3 par le biais de son quatrième domaine PDZ.[96] La protéine PICK1, quant à elle, interagit avec plusieurs récepteurs ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b.[104] L'inhibition de ces interactions pourrait permettre de réguler le pH au niveau des neurones sensoriels qui véhiculent le message douloureux.

3.2 Contexte du projet

Certains récepteurs de la sérotonine (5-HT), qui jouent un rôle essentiel dans la modulation de la transmission du message douloureux, sont associés (5-HT_{2A}, $5HT_7$ et $5HT_{2C}$) par l'intermédiaire de leur extrémité C-terminale à des protéines à domaines PDZ.[105]

L'interaction entre le récepteur de la sérotonine 5-HT_{2A} (Figure 42) et la protéine à domaine PDZ PSD-95 joue un rôle important dans l'adressage du récepteur, en particulier au niveau apical des dendrites des neurones pyramidaux.[106] Dans le cortex préfrontal, PSD-95, en s'associant directement au récepteur 5-HT_{2A}, régule sa signalisation et son trafic, et entraîne une baisse de l'internalisation du récepteur.[107]

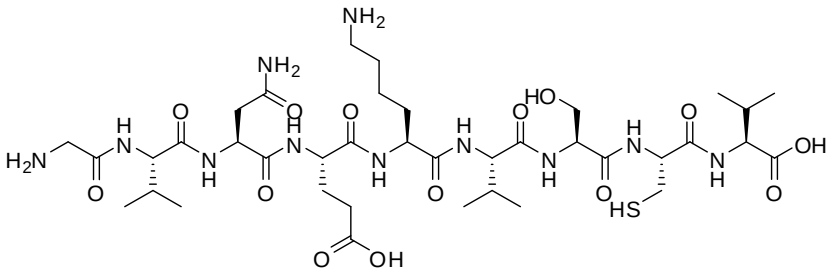


Figure 42 : Extrémité C-terminale du peptide 5-HT_{2A} (GVNEKVSCV).

Plus récemment, Pichon *et al*. ont démontré qu'un dysfonctionnement de l'interaction protéine PDZ/récepteur 5-HT_{2A} au niveau spinal était responsable, au moins en partie, d'une altération de la sensibilité à la sérotonine (résistance) de la douleur neuropathique diabétique. Ainsi, en utilisant une stratégie peptidomimétique qui consiste à introduire, par voie spinale, un peptide présentant la séquence du ligand PDZ entrant en compétition avec l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{2A}, et permettant d'interrompre l'interaction, ils ont pu restaurer la sensibilité à la sérotonine endogène et révéler l'effet antinociceptif de la fluoxétine, quasi inefficace lorsque administrée seule dans ce contexte douloureux (Figure 43).[108]

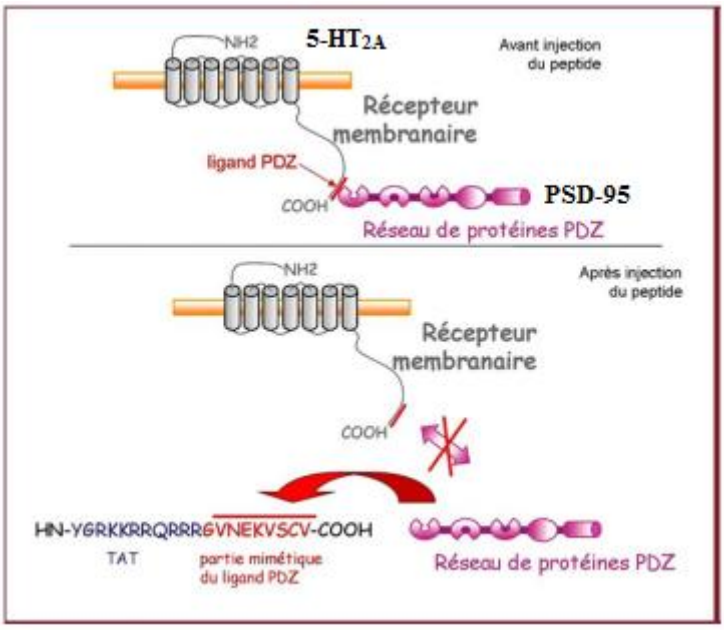


Figure 43 : Stratégie peptido-mimétique

3.3 Objectif du projet

L'objectif de ce projet est de développer des antalgiques originaux qui agiraient par de nouveaux modes d'action. Le but est donc de développer des inhibiteurs sélectifs des interactions protéine-protéine impliquant des protéines à domaines PDZ.

La protéine que nous allons cibler n'est autre que celle étudiée par nos collaborateurs, c'est-à-dire PSD-95 (contient 3 domaines PDZ). Ne sachant pas quel domaine PDZ de la protéine constitue notre cible, nous allons baser notre étude sur le domaine 1 sachant que le deuxième est très similaire, le troisième pourra ensuite être étudié également.

Notre but est donc de développer des molécules capables d'entrer en interaction avec le site S0, décrit précédemment, qui représente le site d'interaction générique des domaines PDZ mais entrant également en interaction avec le site S1 qui lui nous permettrait, de part sa grande variabilité, d'obtenir une molécule sélective.

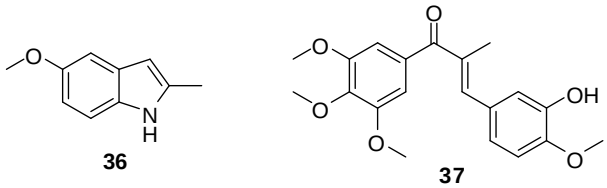
3.3.1 Les collaborations nécessaires au projet

Plusieurs collaborations sont nécessaires pour permettre à ce projet d'aboutir, en effet un grand nombre de savoir-faire différents entre en jeu dans la conception de nos molécules et dans l'évaluation de leur action.

- Modélisation moléculaire : La modélisation moléculaire sera effectuée au sein de notre laboratoire par un post-doctorant nous permettra de visualiser nos molécules avec la cible et ainsi nous aiguiller dans le choix des modifications structurales à apporter.
- Biologie structurale : Une collaboration avec l'Université de Liverpool plus précisément avec le laboratoire de biologie structurale, nous permettra de préparer les domaines PDZ et d'étudier par RMN les interactions entre nos molécules et le domaine protéinique en question.
- Biologie moléculaire : Une collaboration avec l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier nous permettra d'étudier l'activité de nos composés en compétition avec le ligand naturel par chromatographie d'affinité.
- Activité antalgique : L'activité antalgique de nos composés sera évaluée à l'UMR1107 de Clermont Ferrand *in vivo*.

3.3.2 Travaux antérieurs

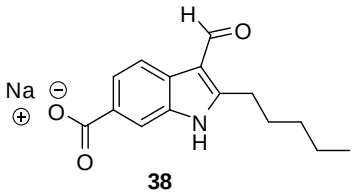
Une étude d'identification de composés « lead » a été réalisée au cours de la thèse d'Elizabeth Bennett à l'Université de Salford (UK), qui avait pour but la synthèse d'inhibiteurs de protéine à domaine PDZ. Elle a réalisée un screening de 85 molécules d'un poids moléculaire compris entre 95 et 400 g/mol par RMN (HSQC $^{1}H/^{15}N$; NOE) sur une protéine contenant un seul domaine PDZ (TIP-1). Deux molécules, l'indole **36** et la chalcone **37,** ont montré de bonnes affinités avec le domaine PDZ de TIP-1 lors de cette expérience (Figure 44). L'indole **36** s'est révélé un meilleur ligand que la chalcone **37**.



36 **37**

Figure 44 : LEAD après screening RMN

Une étude de relation structure activité, suivie de tests RMN, a permis d'identifier le « lead » **38** (Figure 45)**,** présentant une structure comparable aux indoles décrits par Fujii *et al.*, qui interagit notamment avec le domaine PDZ2 de SAP-97.[53]



38

Figure 45 : Autre structure indolique identifiée

Les dérivés indoliques constituent donc une classe de molécules capables d'inhiber les interactions protéine-protéine, notamment de protéines à domaines PDZ. Compte tenu de ces résultats nous avons choisi de concevoir et développer des molécules possédant un noyau indolique, inhibiteur sélectif de l'interaction entre la protéine PSD-95 (Protéine à domaine PDZ) et le récepteur de la sérotonine 5-HT_{2A} (Ligand PDZ).

CHAPITRE 2

Chapitre 2: Les Biligands

1 Introduction

1.1 Stratégie des biligands

Notre objectif est de développer des inhibiteurs spécifiques des protéines à domaines PDZ. Notre première stratégie consiste à préparer des biligands qui pourront interagir à la fois avec les sites S0 et S1 de la protéine, conférant ainsi la sélectivité désirée. Pour ce faire, nous envisageons de synthétiser des molécules possédant un noyau indolique, connu pour interagir avec le site S0, un bras espaceur, puis une entité susceptible d'interagir avec le site S1, spécifique d'un domaine PDZ donné (Figure 46).

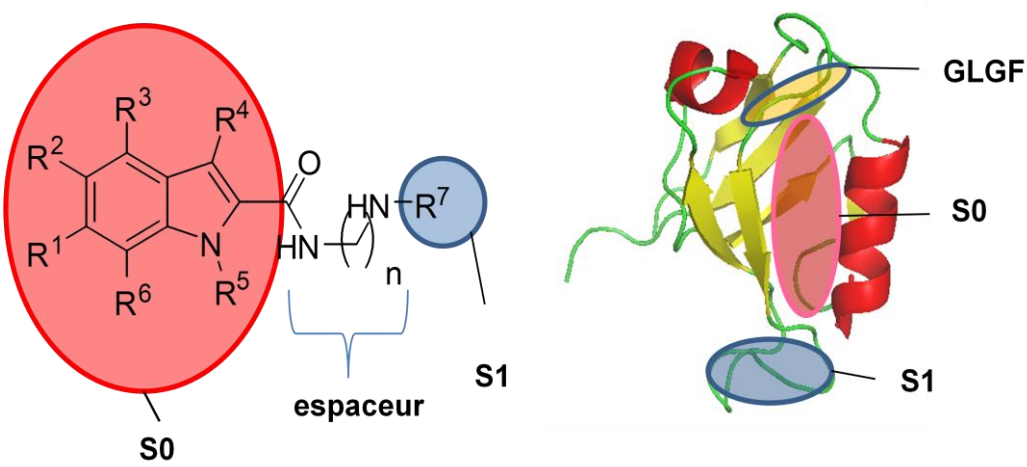


Figure 46 : Schéma récapitulatif de la stratégie

- Concernant le noyau indolique, nous nous sommes inspirés des travaux de Fujii *et coll.* (cf chapitre 1) et nous envisageons d'introduire comme substituant R^1 ou R^2 un acide carboxylique en vue d'interagir avec la boucle GLGF du domaine PDZ (Figure 47).

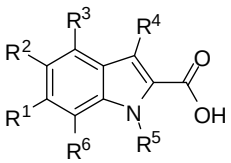


Figure 47 : Noyau indolique des Biligands

- L'espaceur, quant à lui, sera lié au noyau indolique *via* une fonction amide et comportera une amine terminale en vue d'introduire le groupement R^7. Il comprendra un nombre variable de carbones qui nous permettra de sonder le site S1 (Figure 48).

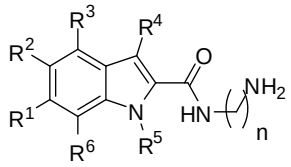
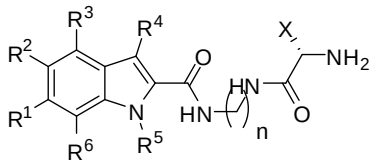


Figure 48 : Indole avec espaceur

- La troisième partie de la molécule (R^7) se liera à l'amine terminale, nous choisirons différents acides aminés ayant des caractéristiques différentes (hydrophobe, hydrophile, polaire chargé ou non…), afin d'explorer le site S1 et d'étudier la spécificité des molécules préparées vis-à-vis de diverses protéines à domaine PDZ.



X = Chaîne latérale de l'acide aminé

Figure 49 : Indole-Cn-AA

Pour faciliter la compréhension, nous nommerons de manière simplifiée les biligands de la façon suivante : Indole-C_n-AA, qui signifie indole lié à un espaceur comportant n carbones, lié à l'acide aminé (Figure 49).

1.2 Noyau indolique

Nous avons, dans un premier temps, identifié un noyau indolique diversement substitué pouvant interagir avec le site S0 de la protéine PSD-95 PDZ1. Nous nous sommes donc inspirés des travaux de Fujii *et coll.*, plus particulièrement des indoles reconnus actifs sur les protéines à domaine PDZ.[109] Fujii *et coll.* ont montré que l'indole tétrasubstitué **39** (Figure 50) interagit avec la protéine NHERF1 par le biais notamment de l'acide carboxylique terminal, mimant celui du ligand naturel. Afin de simplifier la molécule et compte tenu des interactions observées par Fujii *et coll*, nous avons choisi l'indole **40** possédant deux fonctions acide carboxylique en position 2, en position 5 et un groupement méthyle en position 3 afin de mimer l'extrémité C-terminale du ligand naturel.
Nous avons choisi de garder un groupement méthyle en position 3 pour ne pas trop diminuer les interactions hydrophobes, nous avons supprimé celui en position 5 afin de faciliter la synthèse.

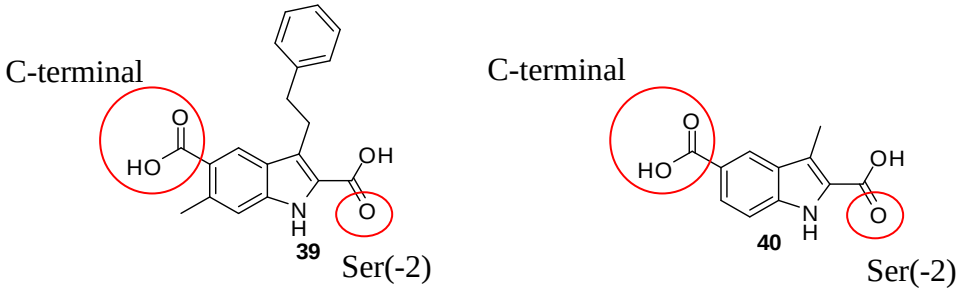


Figure 50 : Indole 39 de Fujii *et coll*. mimant les interactions du ligand naturel et son analogue simplifié 40

Une simulation d'interactions moléculaires par docking (Figure 51) entre les indoles **39** et **40** et la protéine PSD-95 PDZ1 a permis de conclure que la molécule **40** adopte une pose similaire à l'indole **39**.[110] Nous observons de nombreuses interactions entre le ligand et la protéine, notamment avec la boucle GLGF. En termes d'énergie, celle de l'indole **40** est de -6.8 Kcal/mol contre -7.4 Kcal/mol pour celle de l'indole **39**. La faible différence d'énergie observée nous conforte quant à la simplification de la molécule.

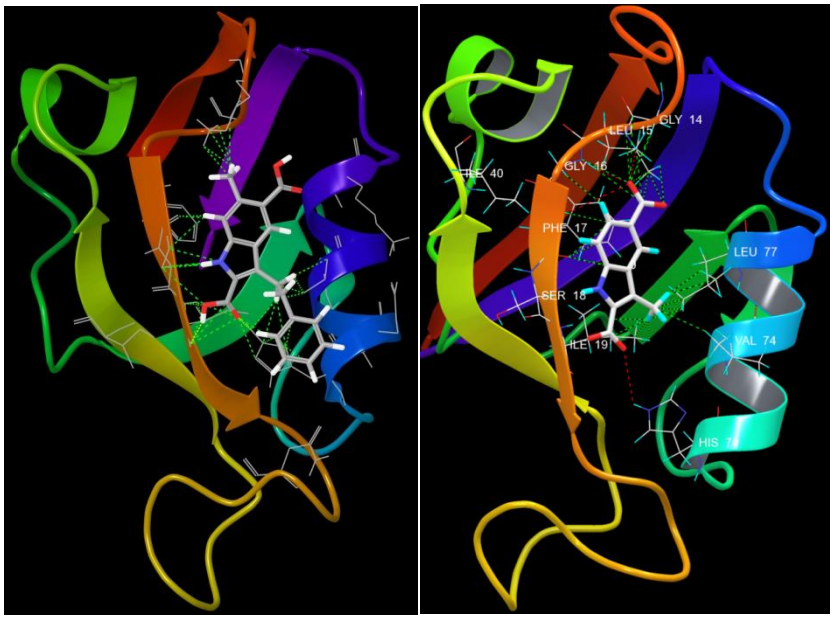


Figure 51 : Docking des indoles 39 et 40/PSD-95 PDZ1 (PDB : 2KA9)

1.3 **Synthèse de l'indole**

1.3.1 Bibliographie

Parmi les différentes synthèses décrites dans la littérature concernant la préparation de composés indoliques diversement substitués, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux méthodes permettant d'accéder à des indoles possédant en position 2 une fonction acide carboxylique ou une fonction ester. Elles ont été classées en fonction de la nature du dérivé aromatique diversement substitué, précurseur du noyau indolique. Nous avons ainsi identifié cinq synthons précurseurs d'indoles substitués en position 2 par un acide carboxylique (Schéma 1) :

- A partir de dérivés de phénylhydrazines (synthon **A**): indolisation de Fischer.

- A partir de 2-nitrobenzaldéhydes ou d'aminobenzaldéhydes (synthon **B**): réaction tandem couplage C-N/carbonylation.[111]

- A partir de 2-halogénobenzaldéhydes et de 2-halogénoacétophénones diversement substitués par le groupement R^3 (synthon **C**): réaction en cascade catalysée par du cuivre sans ligand, cyclisation par réaction intramoléculaire *N*-arylation catalysée par du cuivre ou du palladium en présence de ligands.

- A partir de 2-méthylnitrobenzènes (synthon **D**): synthèse de Reissert.

- A partir de 2-halogénonitrobenzènes ou de 2-halogénoanilines (synthon **E**): *via* un réarrangement sigmatropique [1,5] en présence d'un complexe pallado-nitrène ou une cyclisation de Heck en présence de palladium ou encore une réaction en cascade catalysée par du palladium.

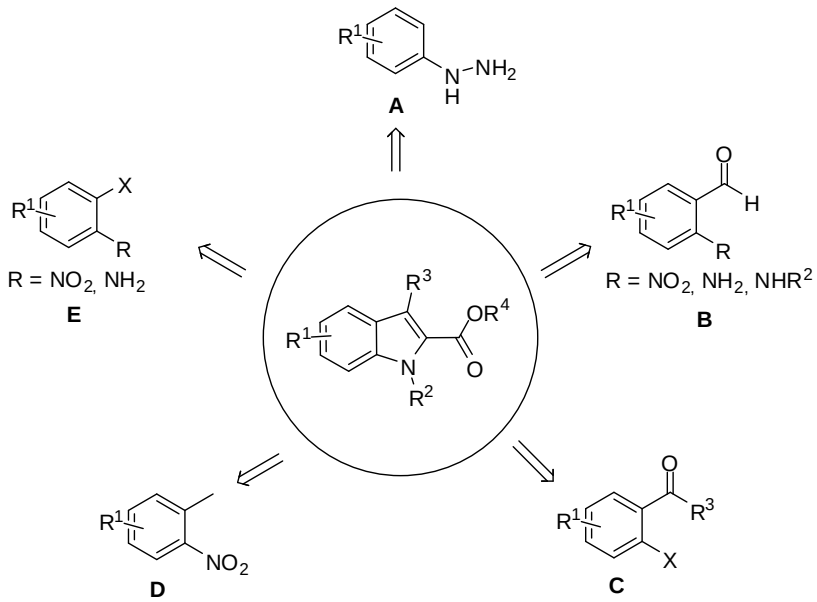
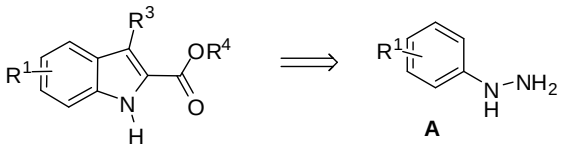


Schéma 1

1.3.1.1 A partir d'hydrazines (synthon **A**)



1.3.1.1.1 Synthèse de Fischer

La synthèse de Fischer est la méthode la plus ancienne décrite dans la littérature pour préparer un indole.[112, 113] Elle consiste en une condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone sur de la phénylhydrazine en milieu acide (Schéma 2).

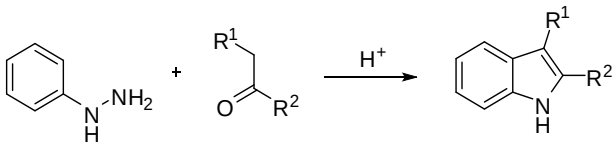


Schéma 2

L'intermédiaire clé de cette transformation est la phénylhydrazone **I** (Schéma 3) obtenue en présence d'une phénylhydrazine par réaction avec un aldéhyde ou une cétone. La phénylhydrazone générée est ensuite activée en milieu acide et s'isomérise pour former une énamine, qui après protonation et réarrangement sigmatropique [3,3], génère l'intermédiaire cyclique diaminé **II**. L'indole est ensuite obtenu après l'élimination d'une molécule d'ammoniac en milieu acide.

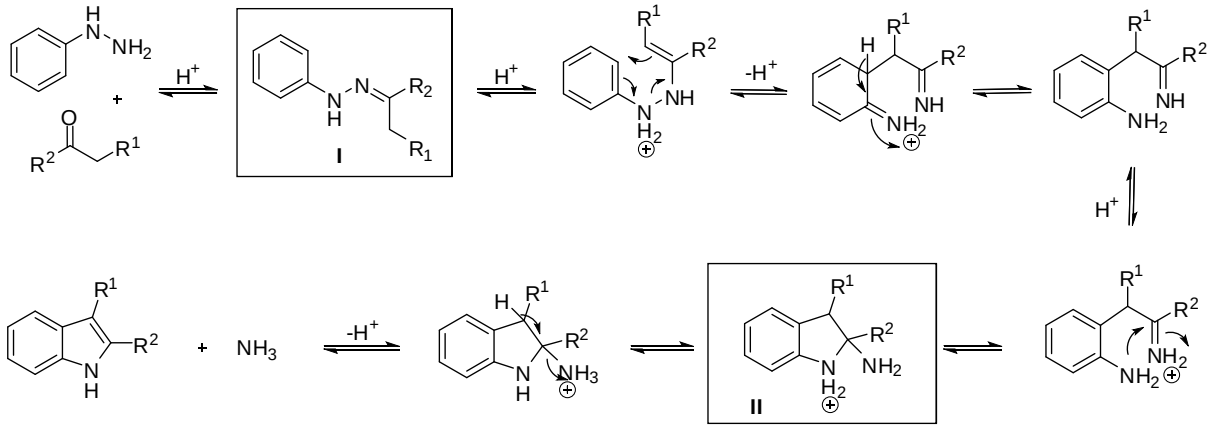


Schéma 3

La méthode de Fischer a été très utilisée pour préparer des indoles substitués en position 2 par un acide carboxylique. A titre d'exemple, Watson,[114] Cook,[115] Moody[116] et Buchwald[117] ont décrit plusieurs procédés d'activation de l'intermédiaire hydrazone.

Watson *et coll.* ont appliqué cette synthèse à la préparation de l'indole **III,** précurseur du composé **IV**, antagoniste du récepteur NMDA (Schéma 4). L'hydrazone intermédiaire, formée à partir de la 3,3'-dichlorophénylhydrazine commerciale en présence de pyruvate d'éthyle est, dans ce cas, activée par de l'acide polyphosphorique (PPA) pour conduire au composé indolique souhaité **III** avec un rendement de 97 %.[114]

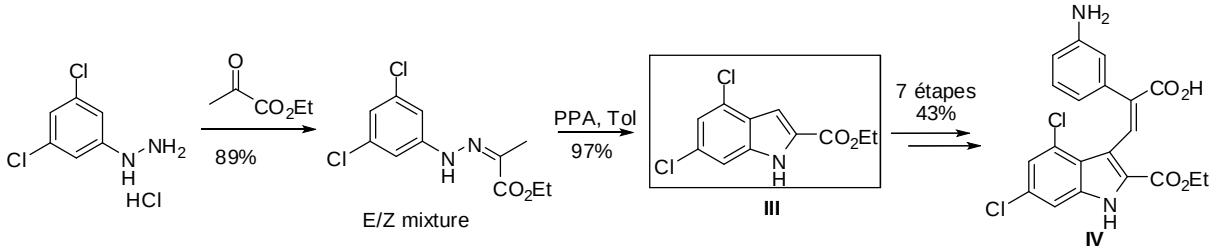


Schéma 4

Cook *et al.*[115] ont également décrit la synthèse de plusieurs acides indole 2-carboxyliques polysubstitués[118]. Leur méthode consiste à générer des hydrazones (Schéma 5) à partir d'anilines *via* la formation d'un sel de diazonium. Celui-ci est ensuite réduit et se condense avec la cétone désirée pour former l'hydrazone. Les indoles sont ensuite obtenus par indolisation de Fischer en milieu acide avec des rendements moyens de 60%.[119]

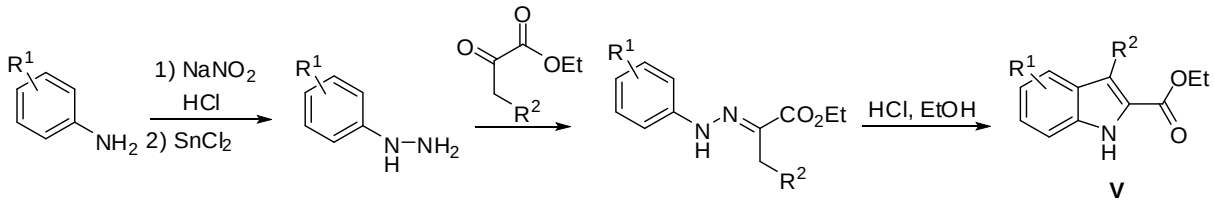


Schéma 5

Ce procédé a notamment était utilisé pour la préparation de la *seco*-duocarmycine, molécule possédant une activité anticancéreuse (Figure 52).[120]

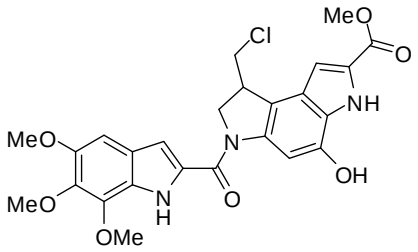


Figure 52 : *seco*-duocarmycin

Moody et Buchwald ont, quant à eux, montré qu'il était possible de préparer des hydrazines à partir d'un dérivé aromatique halogéné, en présence d'hydrazine mono protégé par un groupement Boc (réaction de Buchwald, en présence de cuivre) ou d'azodicarboxylate de diterbutyle (*via* la formation d'un dérivé de type Grignard).[117] Ces différentes hydrazines sont ensuite engagées dans la réaction d'indolisation de Fischer, *via* la formation des

hydrazones correspondantes, en présence de pyruvate de méthyle ou d'acide oxobutyrique (Schéma 6). Ces indoles sont obtenus avec des rendements moyens de 55%.

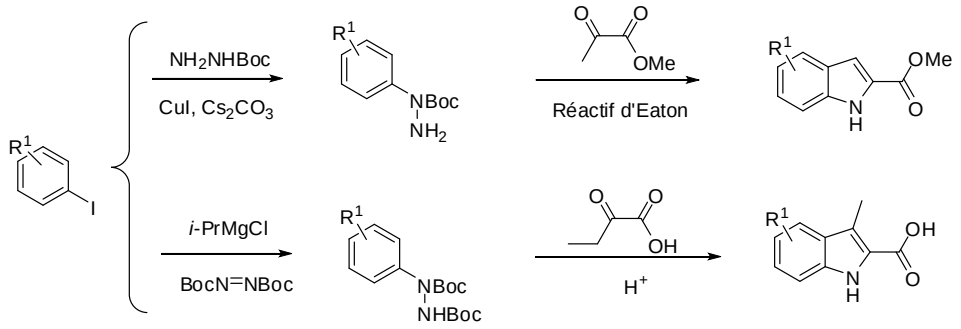


Schéma 6

La méthode de Buchwald a permis d'accéder au composé U86192A (Figure 53), molécule présentant une activité anti-hypertensive, à partir du 2-(allyloxy)-1,3-dibromo-5-iodobenzene.

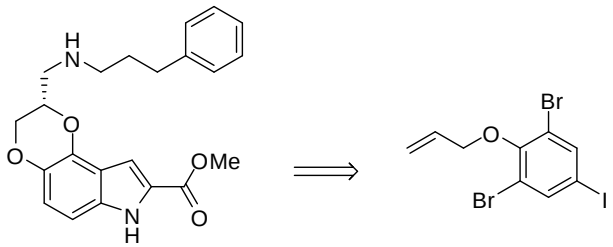


Figure 53 : U86192A

1.3.1.1.2 Cyclisation par activation de liaison C-H

A partir d'anilines substituées, Ning Jiao *et al.* ont montré qu'il était possible d'accéder au cycle indolique possédant une fonction acide carboxylique en position 2, par réaction pallado-catalysée en présence d'alcynes (Schéma 7).[121]

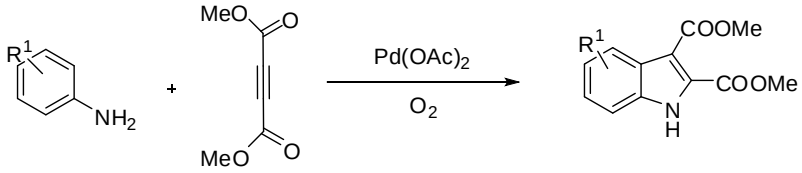


Schéma 7

L'alcyne est, dans un premier temps, activé par le palladium II qui joue le rôle d'acide de Lewis.[122, 123] Deux voies sont ensuite décrites pour générer l'intermédiaire **VII** (Schéma 8). Soit il est obtenu *via* le composé **VI** par un mécanisme d'hydroamination puis palladation électrophile, suivie d'une déprotonation,[124] soit il est formé par aminopalladation directe. L'intermédiaire **VII** subit alors une palladation électrophile aromatique pour former **VIII** qui, après élimination réductrice, génère l'indole **IX** attendu avec des rendements moyens de 70%.

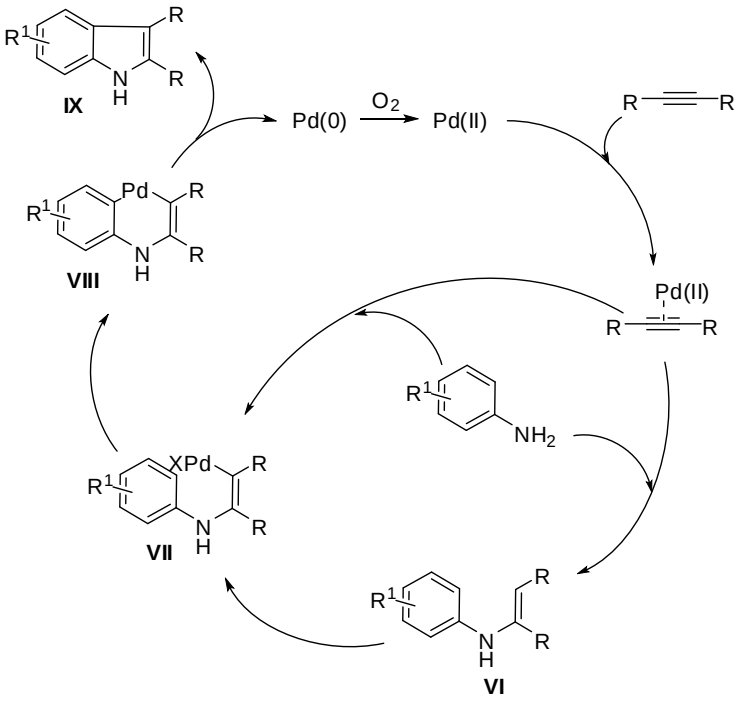
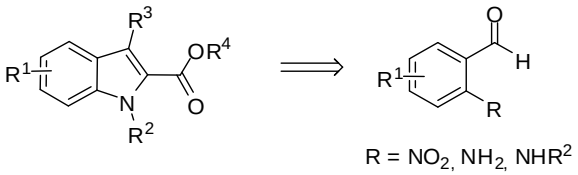


Schéma 8

1.3.1.2 A partir du synthon **B**



B

Le groupe d'Alper[125] a décrit la formation de dérivés d'acide 2-indole carboxylique *via* une réaction tandem de couplage C-N suivie d'une carbonylation en présence de monoxyde de carbone. Le précurseur *gem*-dihalovinylaniline **X** du noyau indolique est obtenu en deux étapes à partir du synthon **B** (Schéma 9).

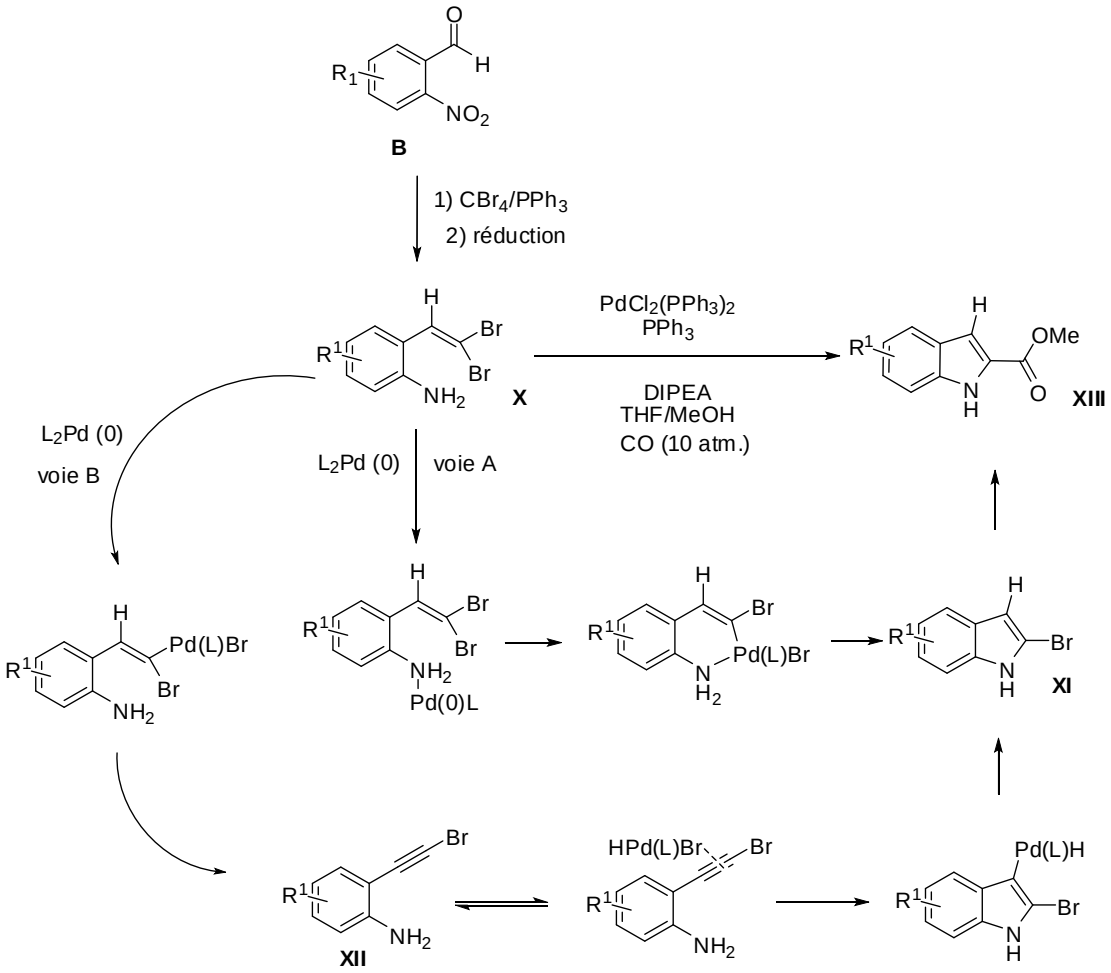
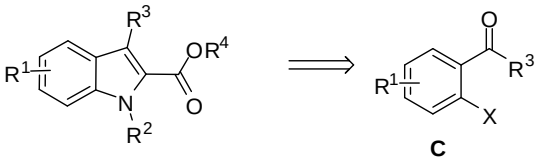


Schéma 9

Le dérivé *gem*-dihalovinylaniline **X** est ensuite transformé en 2-halogénoindole **XI** par réaction pallado-catalysée. Une étude de cette cyclisation a permis de montrer que le mécanisme le plus probable est un couplage C-N de Buchwald Hartwig (Voie A) pour générer le 2-bromoindole **XI** correspondant. Une deuxième voie « minoritaire » (Voie B), impliquant l'intermédiaire alcyne **XII**, a également été mise en évidence. Une réaction de carbonylation en présence de monoxyde carbone (10 atmosphères) puis estérification *in situ* en présence de méthanol permet de fournir l'indole **XIII** correspondant.[126]

1.3.1.3 A partir du synthon **C**



A notre connaissance, trois méthodes sont décrites dans la littérature pour la préparation d'acides 2-indole carboxyliques à partir du synthon **C**. Le cycle indolique est, dans les trois cas, généré par une *N*-arylation intramoléculaire métallo-catalysée, à partir de différents réactifs.

1.3.1.3.1 A partir de β-amino esters.

La réaction « one-pot » du synthon **C** en présence d'un α-amino ester protégé, catalysée par de l'iodure de cuivre, permet la formation du noyau indolique avec des rendements moyens de 55% (Schéma 10).[127]

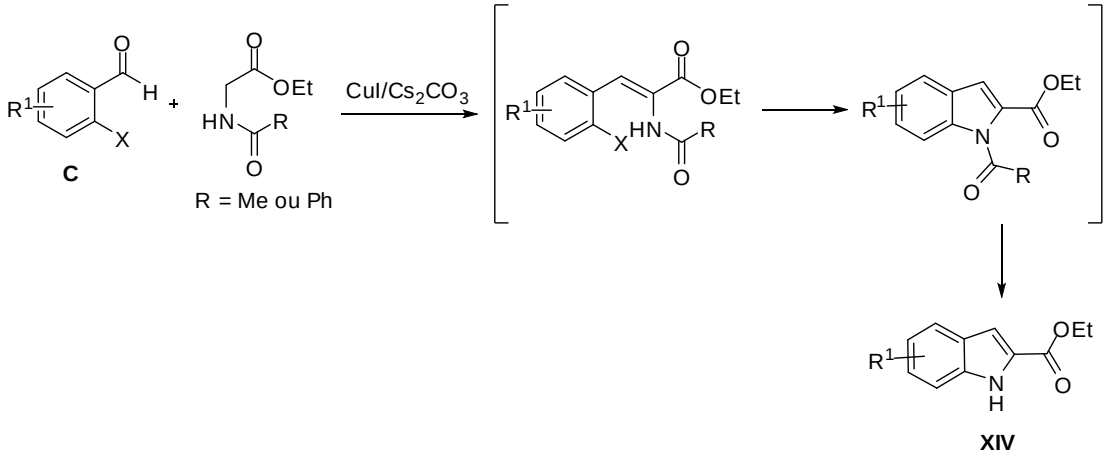


Schéma 10

Dans un premier temps, il y a une condensation aldolique du α-amino ester sur le synthon **C**, suivie par la formation intramoléculaire de la liaison C-N assistée par du cuivre. L'indole **XIV** est finalement obtenu après une *N*-désacylation induite par le cuivre.[128]

1.3.1.3.2 A partir d'isocyanoacétates

Ding *et al.* ont utilisé de l'isocyanoacétate d'éthyle en réaction avec le synthon **C** pour conduire à l'acide indole 2-carboxylique correspondant (Schéma 11).[129]

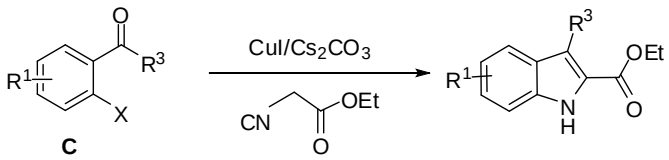


Schéma 11

Cette réaction en cascade (condensation/couplage/déformylation) de l'éthylisocyanoacétate avec des aldéhydes, catalysée par le cuivre, pourrait débuter par une condensation de l'éthylisocyanoacéate, préalablement complexé au cuivre, sur le carbonyle aromatique **XV** en milieu basique (Schéma 12). L'espèce formée se réarrangerait ensuite pour générer l'intermédiaire α-formylaminoacrylate d'éthyle **XVI**, coordiné avec le cuivre. L'indole désiré **XVII** est ensuite obtenu, après une étape de *N*-arylation, dans les conditions de type Ullmann, suivie d'une déformylation.[130]

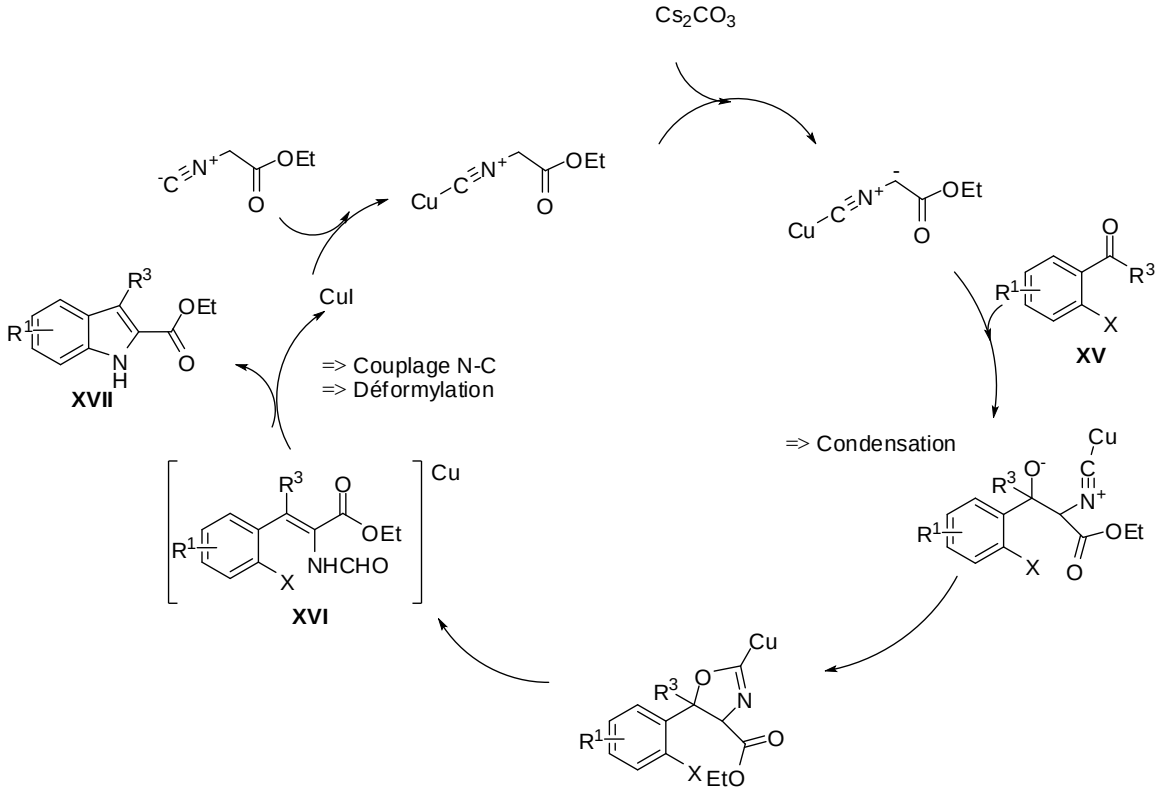


Schéma 12

1.3.1.3.3 A partir de phosphonates

Brown[131] et Cusack *et al.*[132] ont préparé divers acides 2-indole carboxyliques en 2 étapes à partir du synthon **C** (Schéma 13). L'intermédiaire **XVIII** est préalablement obtenu, dans ces deux cas, selon une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons, avant d'être engagé dans une réaction de couplage C-N intramoléculaire métallo-catalysée en présence de ligands.

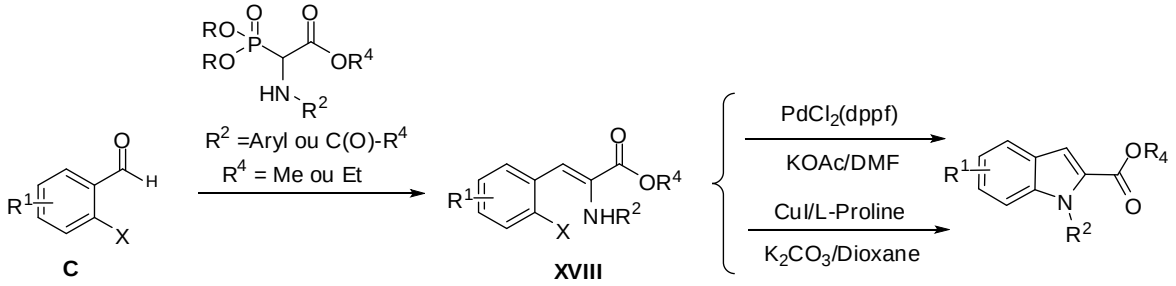


Schéma 13

Cette méthode a été appliquée sur support solide en utilisant de la résine REM (Regenerable Michael Resin) par Kondo *et al.*. L'indole **XIX** est ainsi obtenu avec un rendement de 60% (Schéma 14).[133]

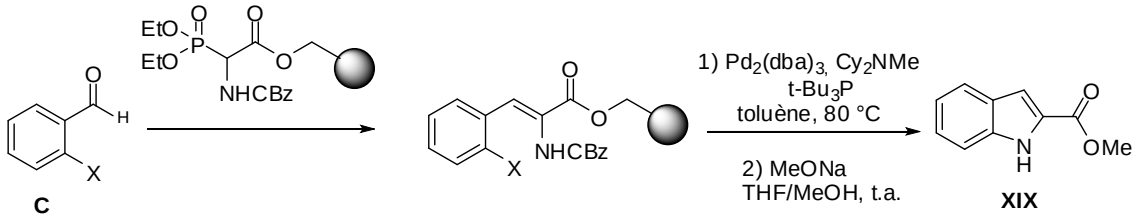
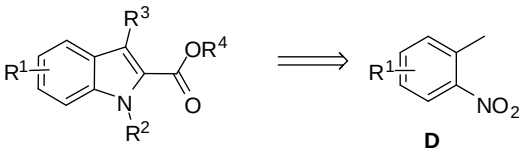


Schéma 14

1.3.1.4 A partir du synthon **D**



La synthèse de Reissert (Schéma 15) permet d'obtenir, à partir du synthon **D**, des dérivés indoliques substitués en position 2 par un ester.[134] La réaction se déroule en milieu basique, en deux étapes, en présence de l'oxalate de diéthyle *via* la réduction du groupement nitro en groupement amine.

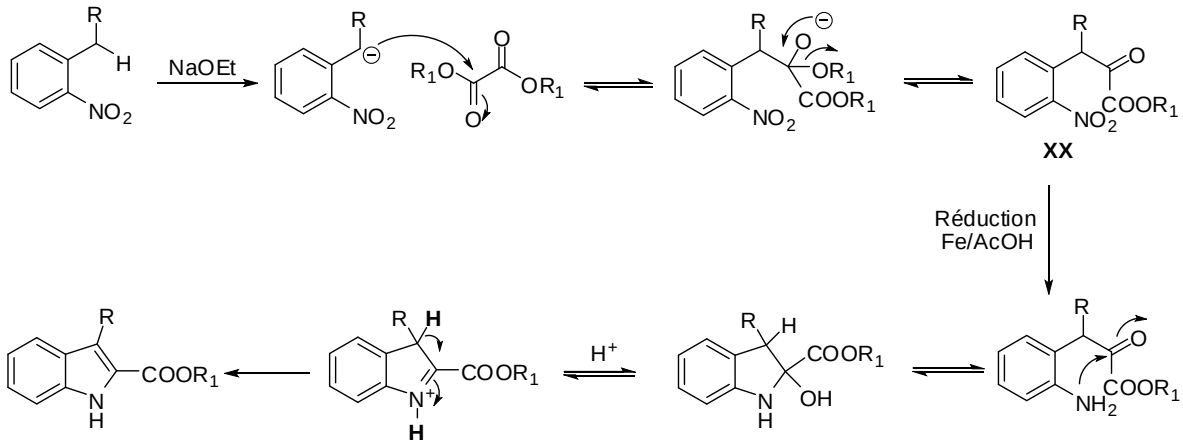


Schéma 15

Après déprotonation en présence d'éthanoate de sodium, le 2-méthylnitrobenzène se condense sur l'oxalate de diéthyle pour former le composé nitro dicarbonylé **XX**. Le groupement nitro est ensuite réduit en amine, qui vient aussitôt réagir avec la fonction cétone, pour conduire à une imine et ainsi permettre la cyclisation. L'équilibre imine/énamine est alors déplacé vers l'énamine par aromatisation pour former le noyau indolique correspondant.[135]

Cette méthode a été appliquée par Jimenez *et al.* à partir de 3,6-dimethyl-2,4-dinitroanisole en présence de l'oxalate de diméthyle pour générer l'indole **XXI**, précurseur de la mitomycine (Schéma 16).[136]

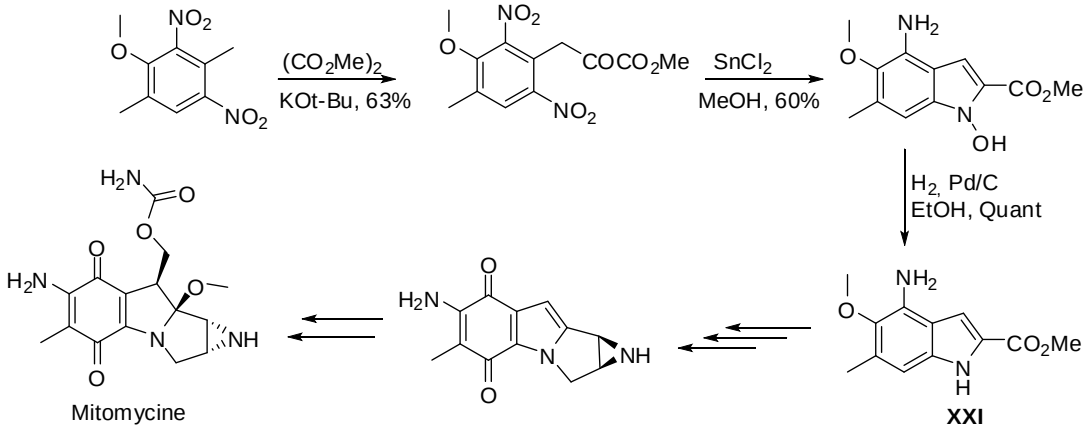
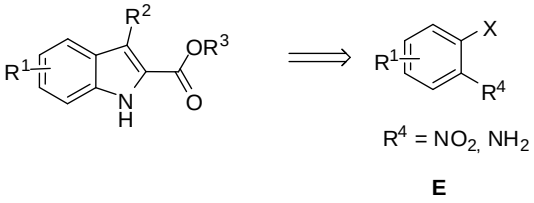


Schéma 16

1.3.1.5 A partir du synthon **E**



1.3.1.5.1 A partir de 2-halogénonitrobenzènes.

Watanabe *et al.* ont développé une méthode de cyclisation réductrice de nitrostyrènes, à partir du synthon **E**, pour préparer des dérivés d'acides 2–indole carboxyliques (Schéma 17).[137]

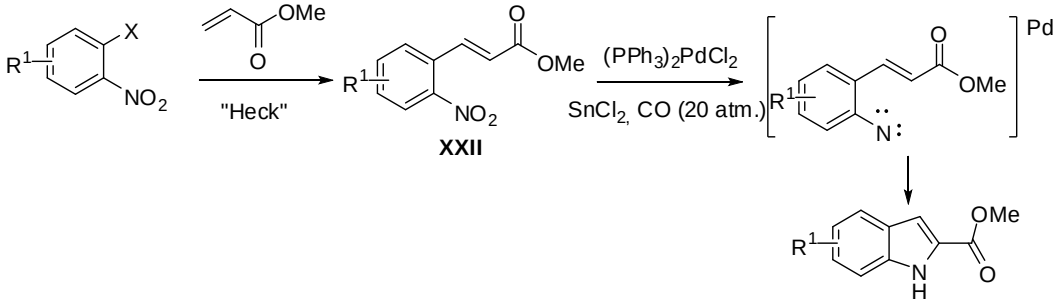


Schéma 17

Dans un premier temps, le nitrostyrène **XXII** est préparé à partir du dérivé 2-halogénonitrobenzène selon une réaction de Heck, en présence d'un accepteur de Michael. La seconde étape fait intervenir du monoxyde de carbone sous 20 atmosphères, en présence de métaux, ceci afin de réaliser la désoxygénation du groupement nitro. Il se forme alors un intermédiaire nitrène complexé au palladium qui, *via* un réarrangement sigmatropique [1,5], va subir un transfert d'hydrogène pour générer le cycle indolique. La charge en palladium peut atteindre dans cette réaction jusqu'à 6 % molaire.

1.3.1.5.2 A partir de 2-halogénoanilines.

Koeber-Plé *et coll.* ont préparé des acides 2-indole carboxyliques à partir d'halogénoanilines, en deux étapes, *via* la formation d'une énamine intermédiaire (Schéma 18). L'énamine est, dans un premier temps, formée en milieu acide en présence du synthon **E** et du dérivé dicarbonylé correspondant, puis le cycle indolique est généré par une réaction de Heck intramoléculaire.[138]

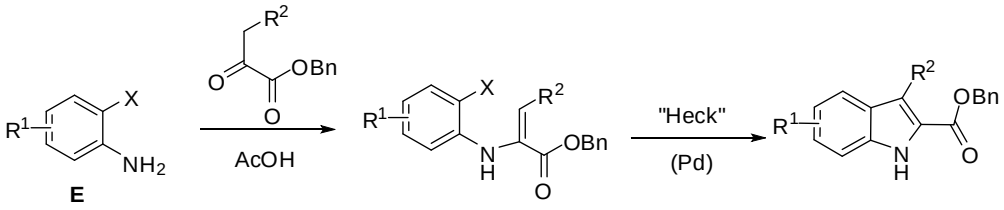


Schéma 18

Reider *et al.* ont optimisé cette voie de synthèse en montrant qu'il était possible de générer *in situ* l'énamine avant la cyclisation de Heck. Dans les conditions optimales de cette annélation, des systèmes aromatiques pauvres en électrons, ou encore polysubtitués avec des groupements de différentes natures (donneurs ou accepteurs par effet mésomères ou inductifs) ont pu être engagés dans cette cyclisation et former le cycle indolique désiré.[139, 140]

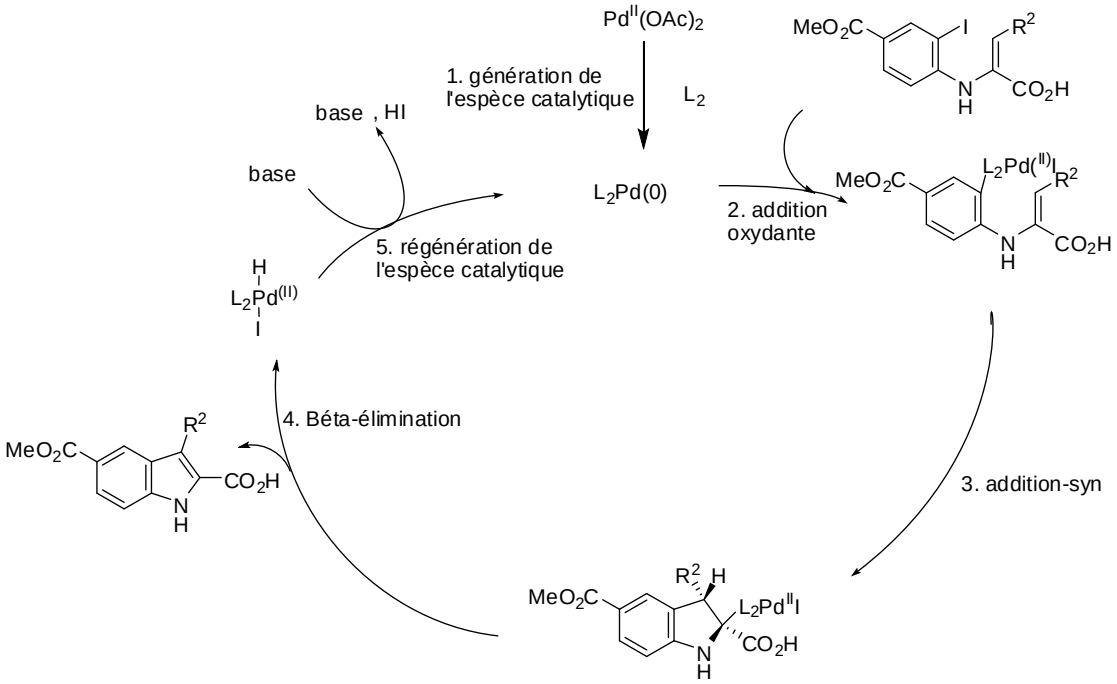


Schéma 19

Le cycle catalytique de la cyclisation de Heck (Schéma 19) débute par la génération de l'espèce catalytique, suivie de l'addition oxydante du palladium sur la liaison C-Br. L'étape suivante consiste en une addition-*syn* de la double liaison de l'énamine sur le palladium. L'indole est obtenu ensuite par une β-H élimination favorisée par l'aromatisation du cycle.[141] L'espèce catalytique est ensuite regénérée en présence de base.

Cette dernière méthode a notamment été utilisée par Fujii *et coll.* pour former des dérivés indoliques diversement substitués (Schéma 20) se rapprochant beaucoup de ceux que nous souhaitons synthétiser.[109]

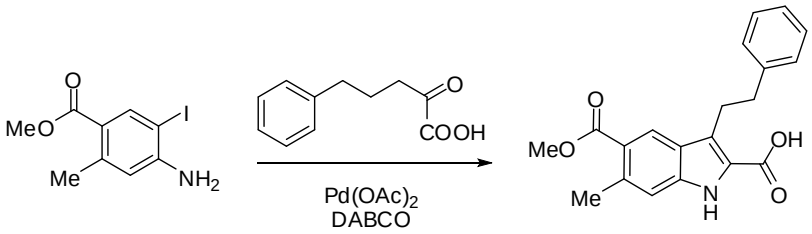


Schéma 20

Parmi les synthèses précédemment décrites, nous avons opté pour celle utilisée par Fujii *et coll.* pour la formation de dérivés d'acide 2-indole carboxylique. Cette méthode nous a semblé la plus appropriée pour préparer des indoles diversement substitués en position 3 et 5 et possédant une fonction acide en position 2. Elle donne de bons rendements (de l'ordre de 60%) quels que soient les substituants présents sur le cycle aromatique, et permet de travailler sur la fonction acide en position 2 du cycle indolique, sans interagir sur la fonction ester présente en position 5. De plus, cette réaction a été appliquée en synthèse sur support solide,

c'est la molécule dicarbonylée qui était fixée sur résine et 5 équivalents du dérivé iodé étaient alors nécessaires pour obtenir une bonne conversion en dérivé indolique.[142]

1.3.2 Analyse rétrosynthétique

Afin de synthétiser l'ester de l'indole **a** nécessaire à la construction des biligands, nous avons envisagé le schéma rétrosynthétique suivant:

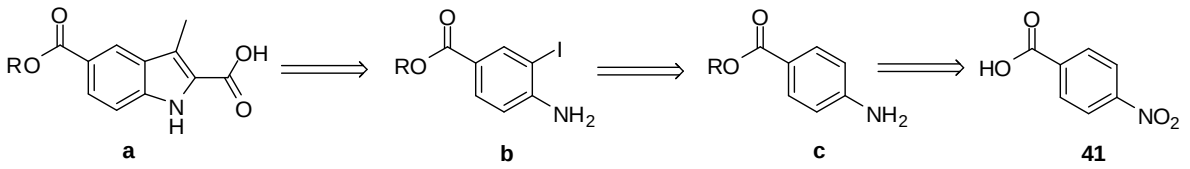


Schéma 21

L'indole **a** serait issu de l'aniline iodée **b**, préalablement préparée par iodation de l'ester **c**. Ce dernier pourra être obtenu à partir du composé **41** par protection de l'acide carboxylique par un groupement R puis réduction. Un couplage peptidique sera ensuite réalisé sur l'indole **a** afin d'obtenir les biligands souhaités (Schéma 21).

1.3.3 Travaux antérieurs du laboratoire

Ces travaux ont été réalisés par un post-doctorant de notre équipe, le Dr. Benjamin Boucherle (2009-2011).

En vue de faciliter le couplage peptidique qui sera effectué sur l'acide carboxylique en position 2 du noyau indolique, et afin de s'affranchir de purifications difficiles, nous avons envisagé d'effectuer la synthèse de l'indole sur support solide. Notre choix s'est orienté vers l'utilisation d'une résine de Wang (résine On) sur laquelle nous pouvons greffer l'acide de départ. Le fait d'obtenir l'indole fixé sur une résine nous permet d'envisager une synthèse convergente dans les étapes ultérieures.

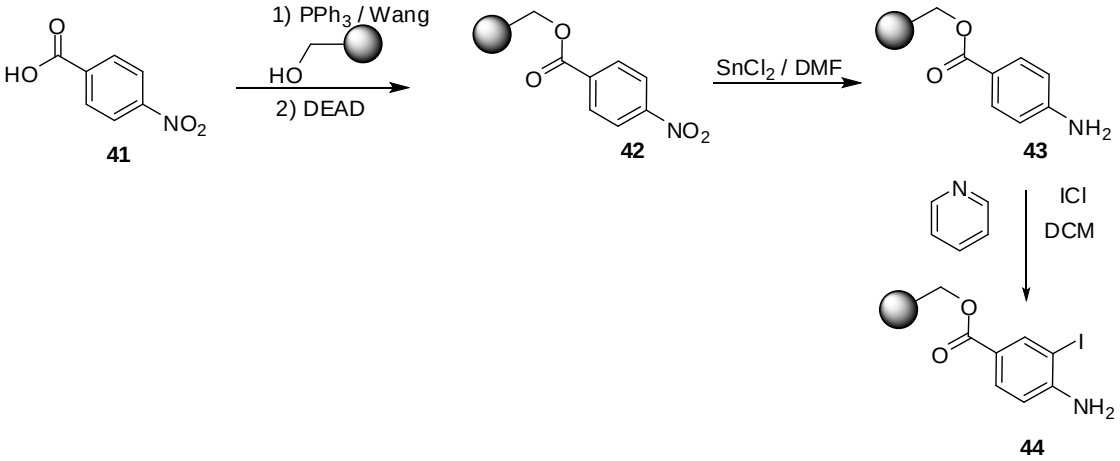


Schéma 22

Dans un premier temps, l'acide **41** est fixé sur la résine de Wang par une réaction de Mitsunobu (Schéma 22). La réduction du groupement nitro du composé **42** est effectuée en présence de chlorure d'étain.[144] La présence de l'amine **43** est confirmée par IR. L'étape d'iodation est effectuée après formation du complexe pyridine/ICl et mis en présence avec la résine.[145, 146] Le spectre IR montre la bande caractéristique de la liaison C-I (550 cm^{-1}). Nous avions confirmé la structure du composé **44** à cette étape, en décrochant le produit de la résine, mais les divers essais réalisés en présence de TFA n'ont pas permis d'isoler le produit désiré. Il a semblé préférable de préparer le produit iodé avant de le fixer sur la résine (Schéma 23).

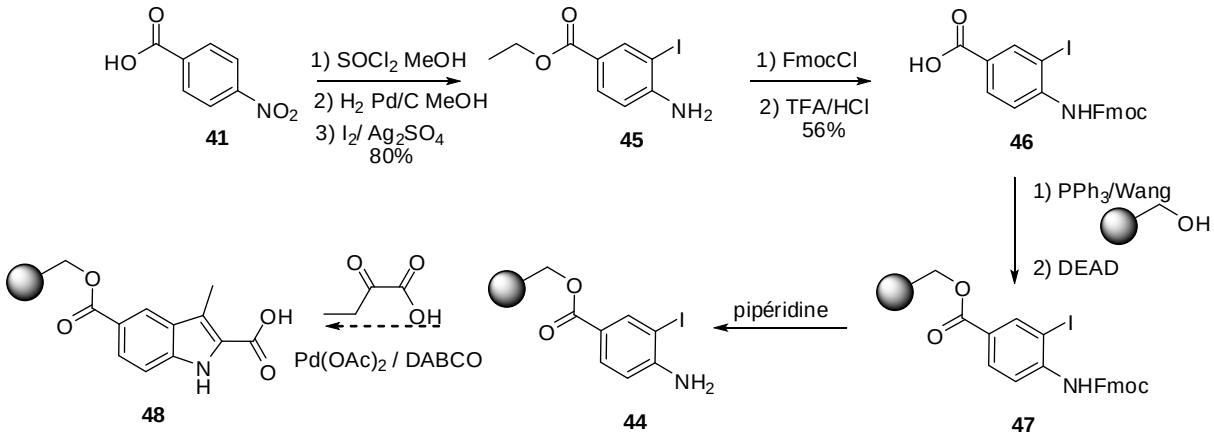


Schéma 23

L'amine **45** est obtenue à partir de l'acide **41** par estérification, réduction du groupement nitro puis iodation en présence de diiode et de sulfate d'argent avec un rendement global de 80% (Schéma 23). La fonction amine est ensuite protégée par un groupement Fmoc et l'ester déprotégé pour donner l'acide **46** avec un rendement de 56%. Après greffage sur résine de l'acide **46** et déprotection de l'amine, différents essais de cyclisation en présence d'acide oxobutyrique, de DABCO et de palladium acétate ont été réalisés. Malgré de très nombreux essais sous différentes conditions, il n'a pas été possible de mettre en évidence la formation du produit **48** attendu. Cet échec a marqué la fin des études de synthèse sur support solide et le retour vers la synthèse en solution.

1.3.4 Synthèse en solution

Nous avons donc réalisé la synthèse de l'indole **50** à partir de l'amine **49** commerciale en s'inspirant de la méthode décrite par Fujii *et coll*. (Schéma 24).[109]

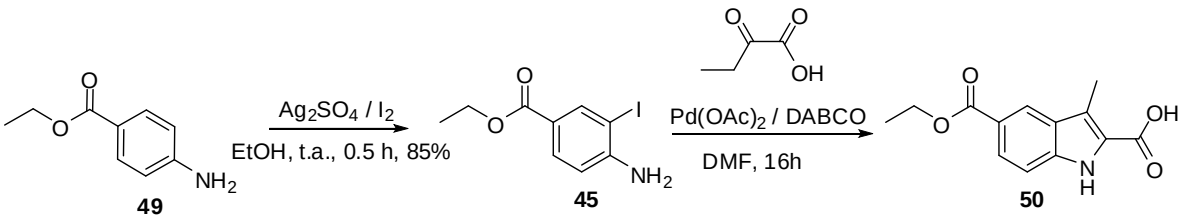


Schéma 24

L'étape de iodation de l'amine **49** est réalisée comme précédemment en présence de diiode et de sulfate d'argent, ce qui permet de générer le composé **45** avec 85% de rendement.[147] Cette réaction s'accompagne de la formation du composé iodé en position 3 (10%) ainsi que de dérivés diodés (5%). La présence de ces composés secondaires a été confirmée par GCMS et par RMN.

La seconde étape est une condensation/cyclisation intramoléculaire en présence d'acide oxobutyrique et de DABCO catalysée par de l'acétate de palladium. Le cycle catalytique (Schéma 25) est composé des étapes classiques de génération de l'espèce catalytique, le DABCO jouant le rôle de ligand, suivie de l'addition oxydante du palladium sur l'énamine formée entre l'aniline **45** et l'acide oxobutyrique, d'une *syn*-insertion, pour finir par une β-H élimination et régénération de l'espèce catalytique par le DABCO, jouant cette fois le rôle de base.

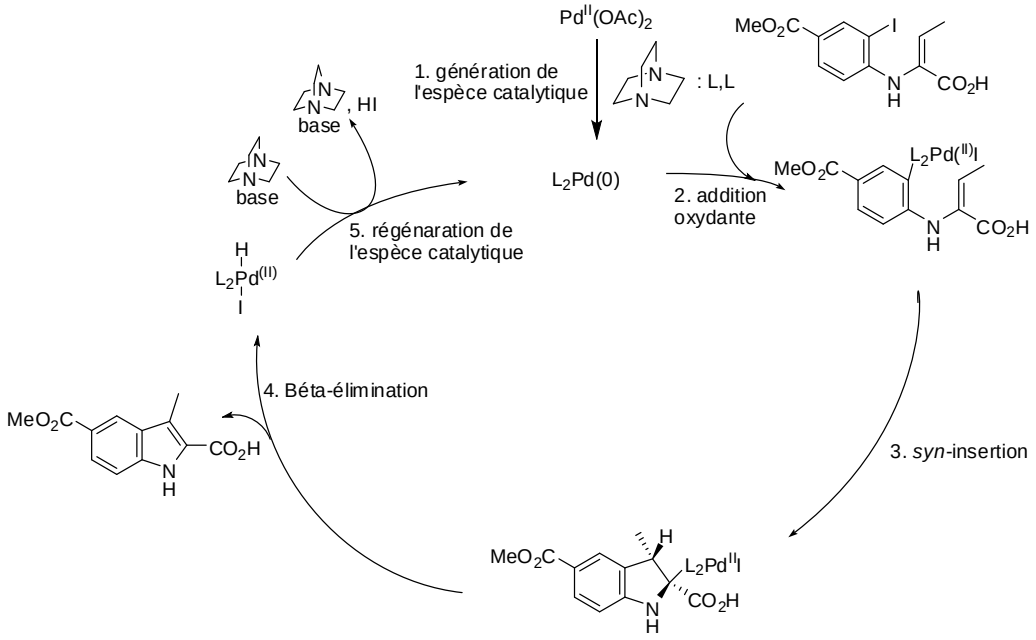


Schéma 25

Cette réaction a nécessité une optimisation de différents paramètres tels que le nombre d'équivalents d'acide oxobutyrique ou la température de réaction. Cette réaction s'accompagne de la formation d'un produit secondaire, l'indole **51,** résultant d'une décarboxylation (Schéma 26). Cette décarboxylation pourrait se dérouler, soit après la condensation sur la cétone, au niveau de l'énamine intermédiaire, avant la cyclsation, en milieu basique, soit après la formation du noyau indolique, en présence de palladium (Schéma 26). La température élevée favoriserait cette décarboxylation.

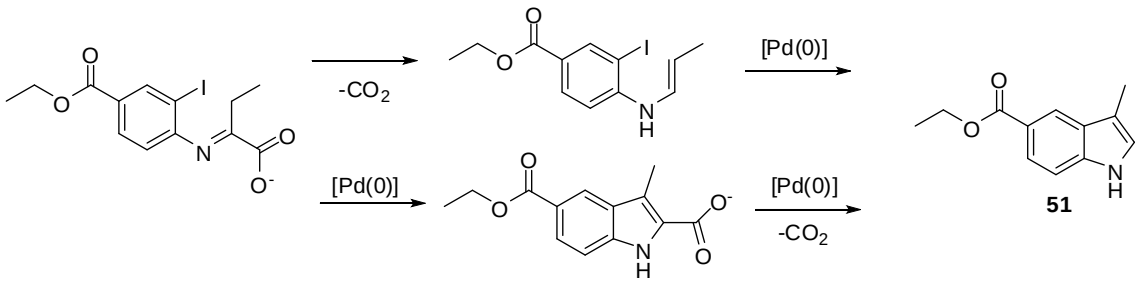


Schéma 26

Les résultats obtenus lors de l'optimisation de la réaction de formation de l'indole **50** sont résumés dans le Tableau 1.

Entrée	Acide oxo-butyrique (eq.)	Température (°C)	Rdt (%)
1	8	150	40
2	5	150	35
3	8	105	60
4	5	105	65
5	3	105	30

Tableau 1

A haute température (entrées 1 et 2 T = 150 °C) les rendements sont relativement faibles quelque soit le nombre d'équivalents d'acide oxobutyrique utilisé. Une baisse de la température (T = 150 °C) entraîne l'augmentation du rendement en produit désiré **50** de 35% (entrée 2) à 65% (entrée 4) en limitant la formation du produit secondaire. Une augmentation du nombre d'équivalents d'acide (entrée 3) n'améliore pas le rendement, par contre une diminution du nombre d'équivalents entraîne une baisse significative du rendement de 65% à 30% (entrée 5). En conclusion, les meilleurs conditions sont : 5 équivalents d'acide oxo-butyrique et une température de 105 °C.

L'indole **50** est donc obtenu en deux étapes à partir de l'aniline **49** avec un rendement de 55%.

Afin de déterminer les interactions du noyau indolique avec le domaine PDZ1 de PSD-95, l'indole **50** est saponifié pour fournir le dicarboxylate **52** avec un rendement quantitatif (Schéma 27). En effet, il est nécessaire de générer l'acide carboxylique dans cette position pour mimer l'extrémité C-terminale du ligand naturel.

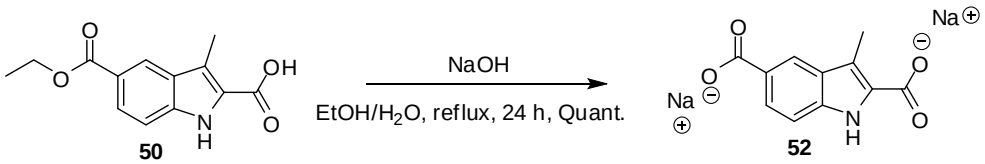


Schéma 27

2 La synthèse des biligands

2.1 Molécules cibles

A partir de l'indole **a,** que nous avons identifié précédemment pour se fixer dans le site S0, nous allons lier par couplage peptidique un espaceur sous forme de diamine comprenant un nombre variable de carbones (2, 4, 6, 8), pour obtenir **b**. A l'autre extrémité de cette diamine nous avons opté pour fixer différents acides aminés protégés menant à **c** puis à **d**. En effet, de cette manière, nous pourrons obtenir une sonde qui aura différentes propriétés physico-chimiques selon la nature de l'acide aminé choisi ce qui devrait nous permettre de sonder efficacement le site S1 (Schéma 28).

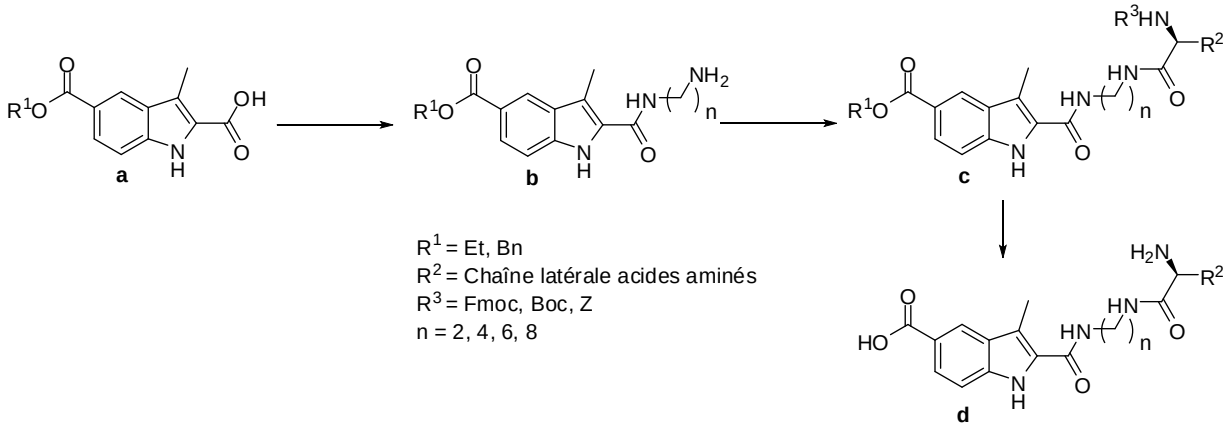


Schéma 28

Nous avons donc sélectionné des acides aminés présentant les propriétés suivantes : polaire non chargé (glutamine), polaires chargés (arginine, lysine), hydrophobes aromatiques (phénylalanine, tryptophane) et hydrophobe non aromatique (isoleucine) qui permettent d'étudier différents types d'interactions avec la protéine (Figure 54).

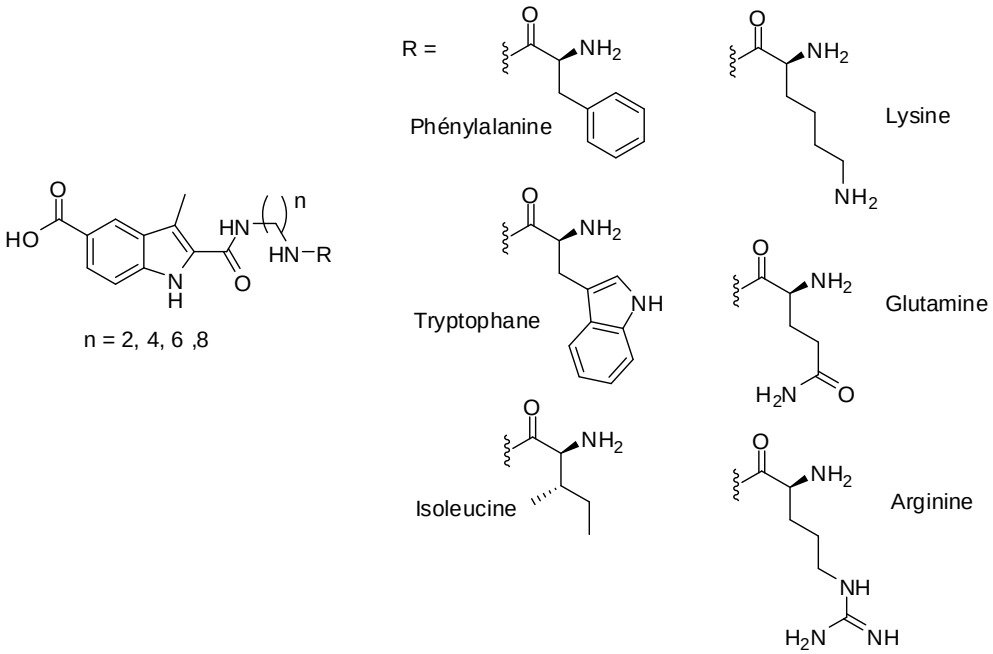


Figure 54 : Acides aminés sélectionnés

2.2 Première voie de synthèse

2.2.1 Couplage peptidique de l'espaceur (n = 6, 8)

A partir de l'indole **50** précédemment préparé, le couplage peptidique avec l'espaceur a pu être réalisé en présence d'EDC, d'HOBt et de diamine (Schéma 29).[148, 149] En effet, après plusieurs essais, notamment avec du CDI ou du DCC, seul le couple EDC/HOBt a permis d'isoler les composés souhaités.

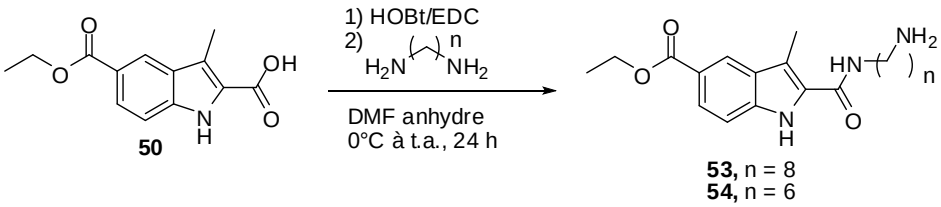


Schéma 29

Cependant les deux indoles **53** et **54** ont été obtenus, après purification, avec des rendements très faibles de l'ordre de 5 à 10%, ceci est certainement dû à des réactions parasites. En effet, la diamine peut réagir à chaque extrémité et conduire à la formation de dimères. De plus, des produits secondaires ont pu être identifiés notamment l'urée **55** représentée sur le Schéma 30.

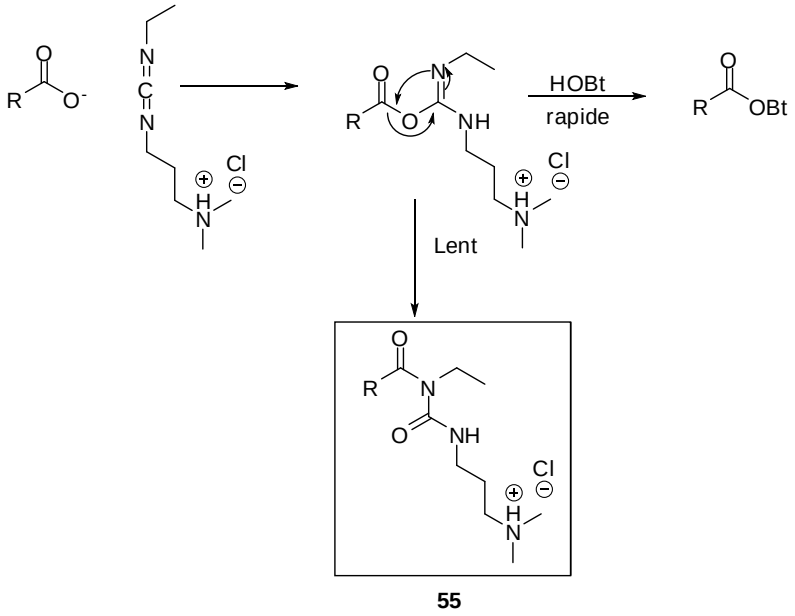


Schéma 30

Afin d'éviter les réactions parasites résultant de la double réactivité des diamines, nous avons envisagé de préparer des diamines monoprotégées. Le groupement Boc a été choisi pour sa facilité de déprotection dans un mélange TFA/DCM, de plus il nous a paru intéressant d'obtenir les sels de TFA qui seront plus simples à traiter en fin de réaction et plus stables que les amines libres. Les diamines ont donc été protégées selon la méthode décrite par Tang *et al.*.[150]

Dans un premier temps, le réactif **56,** utilisé pour la mono protection des diamines, a été préparé par réaction du phénol sur du di-*tert*-butyl dicarbonate catalysé par du DMAP (Schéma 31) avec un rendement de 98%. Cet intermédiaire est mis en réaction avec la diamine en présence d'eau pour donner la diamine monoprotégée **57**.[151]

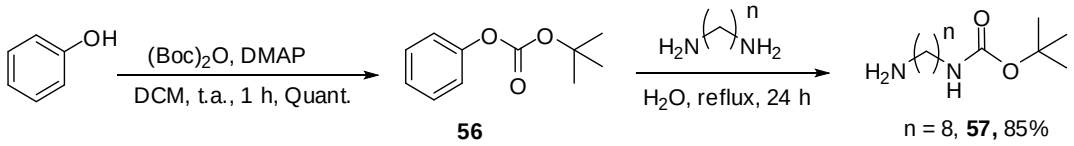


Schéma 31

Cette technique a notamment été utilisée pour préparer la diamine monoprotégée **57** avec 8 atomes de carbone, l'analogue avec 6 atomes de carbone est, quant à lui, commercial.

Ayant maintenant à notre disposition les diamines monoprotégées, les couplages peptidiques peuvent être réalisés.

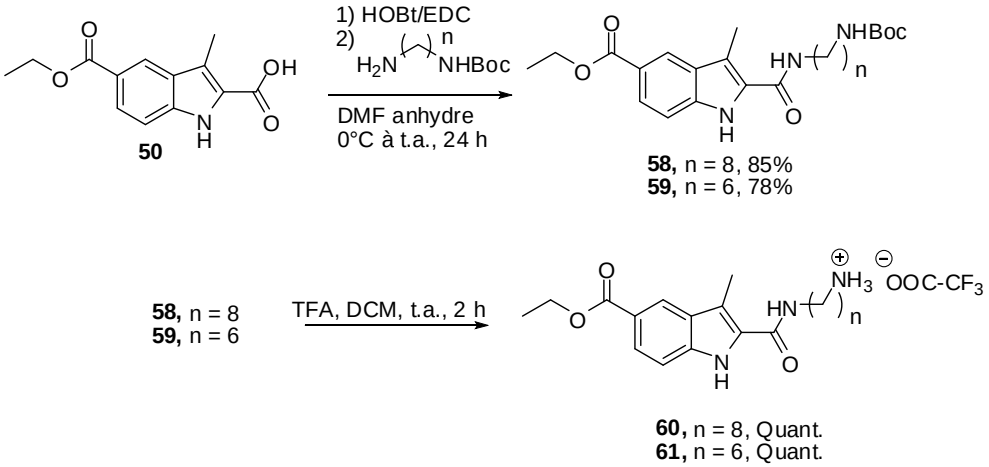


Schéma 32

L'indole **50** est couplé avec les différentes diamines monoprotégées (n = 6, 8) en présence d'EDC et d'HOBt (Schéma 32). Le groupement Boc est ensuite clivé en présence de TFA pour obtenir les produits désirés. Nous avons ainsi synthétisé les deux sels de TFA **60** et **61** avec des rendements globaux respectifs de 85% et 78% à partir de l'indole **50**.

2.2.2 Couplage avec les acides aminés (n = 8)

A partir du sel **60** préparée précédemment, nous avons réalisé des couplages peptidiques avec des acides aminés protégés. Nous avons choisi le groupement protecteur Fmoc pour son clivage en milieu basique. En effet, la dernière étape de la synthèse étant une saponification de l'ester éthylique, le groupement Fmoc sera également clivé pour donner le composé final sous forme de sel de carboxylate.

Afin de réaliser le couplage peptidique, il est nécessaire de régénérer l'amine par traitement des sels de TFA en présence de DIEA.[152]

Nous avons, dans un premier temps, choisi de réaliser un test de couplage avec la Fmoc-phénylalanine en présence de CDI.[149] Ainsi le biligand **62** est obtenu avec un rendement de 60% (Schéma 33). Contrairement à la première réaction de couplage, le CDI donne de meilleurs rendements que le couple EDC/HOBt.

Le biligand **62** est ensuite traité en milieu basique pour générer le produit **63**, malheureusement le composé s'est avéré insoluble dans tous les solvants organiques et donc impossible à analyser (insoluble) (Schéma 33).

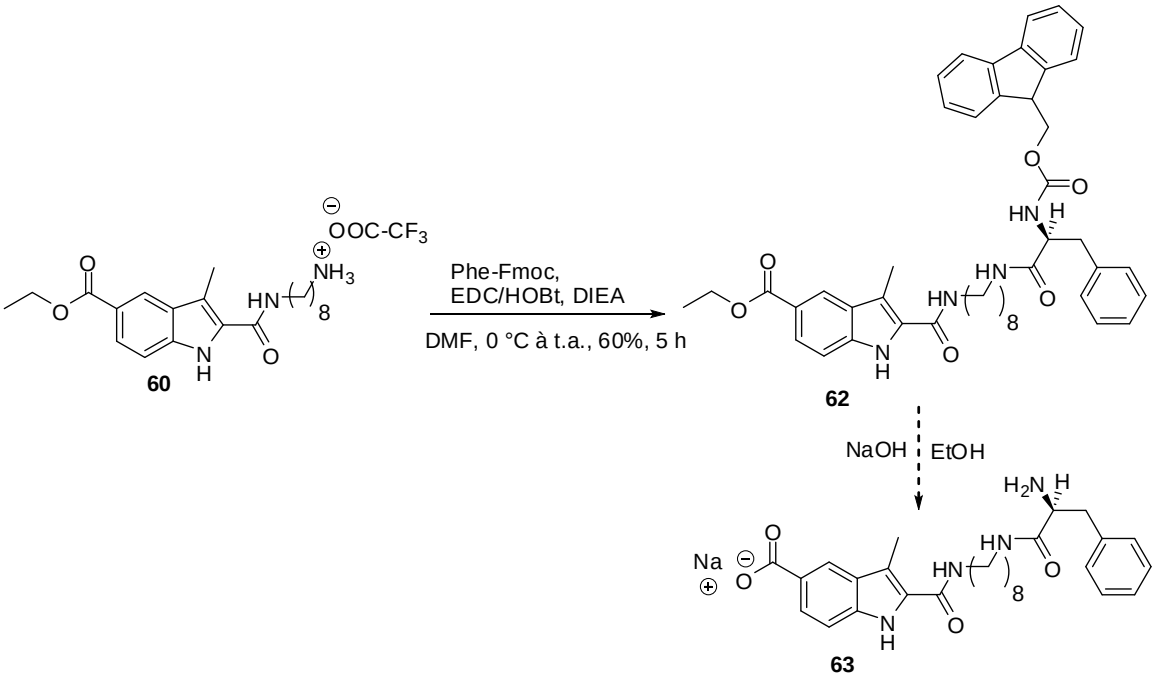


Schéma 33

Plusieurs essais de couplage, réalisés avec différents acides aminés protégés sous forme de Fmoc (Fmoc-Tryptophane, Fmoc-Glutamine), n'ont pas permis d'identifier les produits attendus **64** et **65** (Schéma 34) en raison de problème de solubilité. En effet, les composés étant complètement insolubles même dans le DMSO, nous avons abandonné la série n = 8.

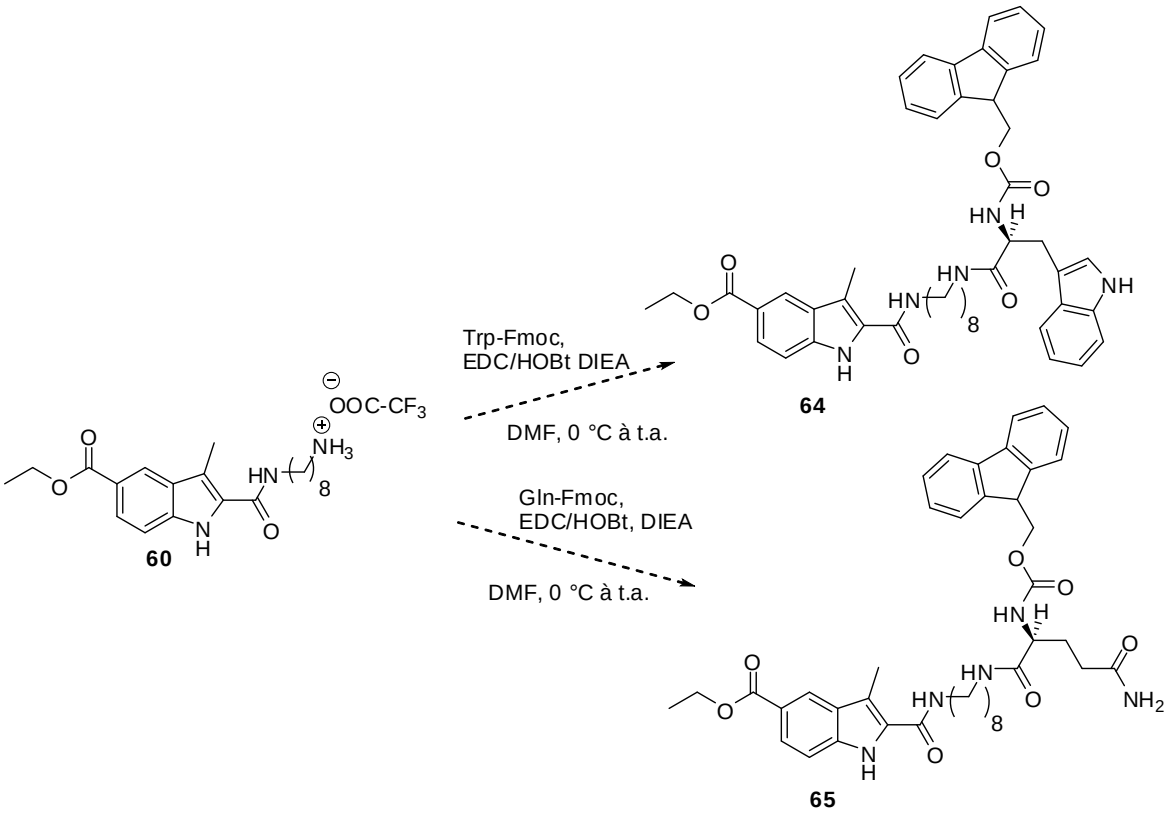


Schéma 34

2.2.3 Synthèse des biligands (n = 6)

De la même façon que pour la série n = 8, les couplages avec les acides aminés protégés en Fmoc sont réalisés en présence de CDI, le sel de TFA **61** étant préalablement traité en milieu basique.

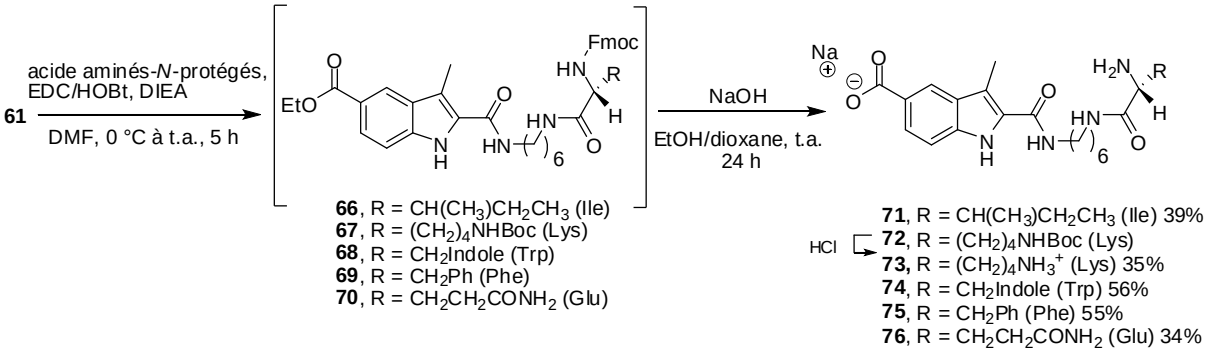


Schéma 35

Différents acides aminés, Ile, Lys, Trp, Phe et Glu protégés sont introduits (Schéma 35) en présence de l'agent de couplage. Nous avons ainsi obtenus les cinq intermédiaires **66-70** qui, étant peu stables, sont engagés directement dans l'étape de saponification. La structure des intermédiaires est confirmée par RMN ^{1}H.

Les intermédiaires **66-70** sont donc engagés dans une étape de saponification pour obtenir les carboxylates **71, 73-76** correspondants, le Fmoc n'étant pas stable en milieu basique, la déprotection de l'amine a lieu simultanément. Pour le composé **72** possédant une lysine une étape de clivage du groupement Boc de l'amine de la chaîne latérale est nécessaire pour conduire à **73.**

Les composés finaux sont obtenus avec des rendements globaux, sur les deux étapes, compris entre 34 et 56%.

Pour le composé résultant du couplage avec l'arginine (prévue § 2.1), il n'a pas pu être obtenu pour des raisons de stabilité. En effet, nous avons observé une dégradation, notamment sur silice neutralisé, du composé final comprenant cet acide aminé.

L'intermédiaire **54** (Schéma 36) a également été saponifié, avec un rendement quantitatif, en vue d'étudier l'influence de l'espaceur sur les interactions du composé **77** avec la protéine.

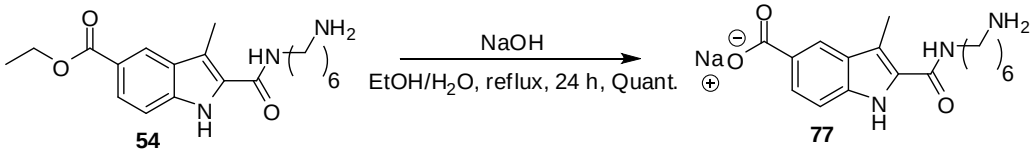


Schéma 36

Nous avions envisagé, dans un premier temps, d'appliquer cette stratégie aux deux autres séries de composés (n = 4 et n = 2), cependant nous avons constaté pendant la saponification des rendements médiocres, qui sont dus à une dégradation du lien amide entre l'acide aminé et l'espaceur. Afin de palier à cette réaction parasite, il nous a semblé judicieux de changer l'ester éthylique par un ester benzylique qui pourra être clivé par hydrogénation catalytique, conditions neutres, qui ne devraient pas affecter les autres fonctions de la molécule.

2.3 **Deuxième voie de synthèse**

2.3.1 Formation de l'ester benzylique de l'indole.

L'amine **80** sera issue du composé **a** par protection de l'acide carboxylique suivie d'une déprotection de l'amine. La protection de l'amine **45,** suivie d'une saponification de l'ester éthylique, devrait mener à l'acide **a** (Schéma 37).

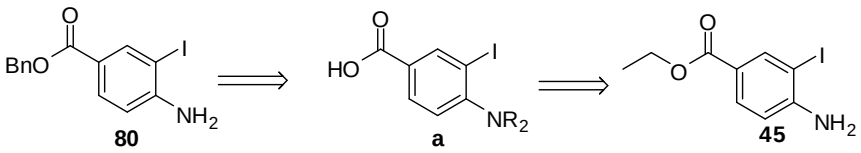


Schéma 37

L'amine **45** est protégée par deux groupements Boc en présence de Et_3N et de DMAP dans le DCM. Les groupements protecteurs Boc sont choisis pour leur stabilité dans les conditions basiques utilisées lors de la saponification (Schéma 38). Le composé **78** est ensuite engagé dans une saponification en présence de NaOH dans un mélange H_2O/EtOH. Cet intermédiaire est engagé directement dans un couplage en présence de CDI et d'alcool benzylique pour générer l'ester benzylé **79** avec un rendement de 95%. Le clivage des groupements Boc est effectué avec un rendement quantitatif en présence de TFA dans le DCM pour conduire à l'aniline **80**. L'indole **81** est, quant à lui, obtenu dans les conditions de cyclisation mises au point précédemment avec un rendement de 75%.

Le rendement obtenu au cours de la synthèse de l'indole **81** est meilleur que pour l'indole **50** car l'ester benzylique, apportant un caractère hydrophobe plus important que l'ester éthylique correspondant, la purification s'en trouve facilitée.

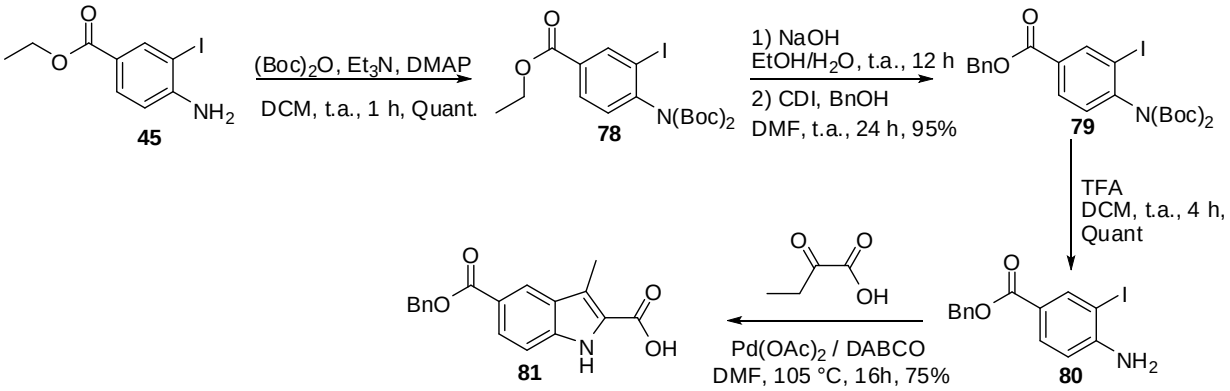


Schéma 38

La synthèse de cet indole étant maintenant au point, nous allons réaliser les couplages peptidiques en présence des espaceurs possédant 2 et 4 carbones.

2.3.2 Couplage peptidique de l'espaceur (n = 4, 2)

L'indole **81** est donc couplé aux espaceurs diamines protégés en n = 4 et n = 2 pour obtenir respectivement les molécules **82** et **83** (Schéma 39). Ce couplage est réalisé dans les conditions mises au point à partir de l'ester éthylique **50** en présence du couple HOBt/EDC et des diamines monoprotégées sous forme de groupement Boc. Ces intermédiaires sont isolés et caractérisés par RMN puis déprotégés en présence de TFA dans le DCM. Les sels de TFA désirés **84** et **85** ont été générés avec des rendements respectifs, sur les deux étapes, de 76% et 80%.

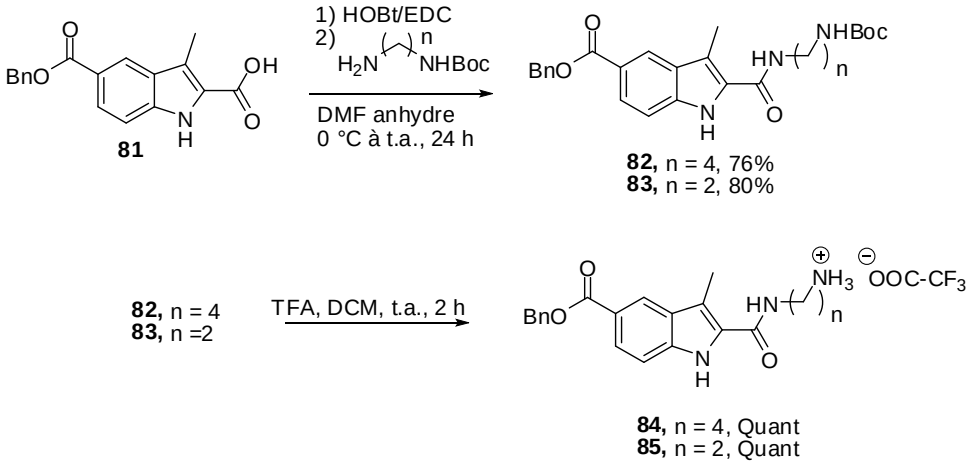
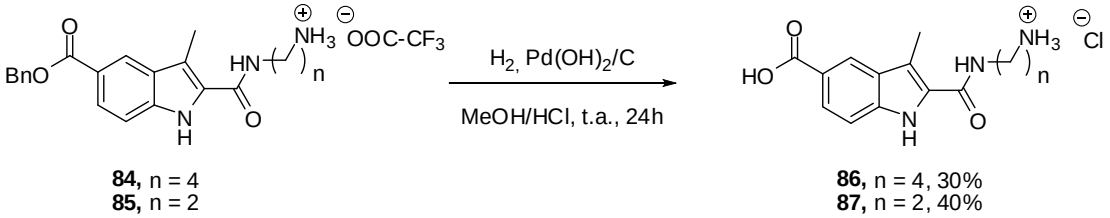


Schéma 39

Les intermédiaires **86** et **87** sont préparés par hydrogénation catalytique (Schéma 40) des indoles **84** et **85** avec des rendements respectifs de 30% et 40% en vue d'étudier l'influence des deux espaceurs sur les interactions avec le domaine PDZ1 de PSD-95.



84, n = 4
85, n = 2

86, n = 4, 30%
87, n = 2, 40%

Schéma 40

Ces composés ont été préparés sous forme de chlorhydrate pour faciliter la solubilisation dans l'eau et pour garantir leur stabilité.

2.3.3 Couplage peptidique avec les acides aminés (n= 2, 4)

Le couplage peptidique nécessitant l'utilisation de DIEA pour générer l'amine libre, nous avons choisi d'utiliser des acides aminés protégés par un carbamate de benzyle. En effet, de cette manière, l'ester benzylique et le groupement protecteur des acides aminés pourront être clivés dans les mêmes conditions d'hydrogénation catalytique et donner les biligands finaux souhaités.

L'isoleucine-Z étant commerciale et disponible au laboratoire, nous avons choisi de réaliser un test de couplage sur le sel de TFA **84**.

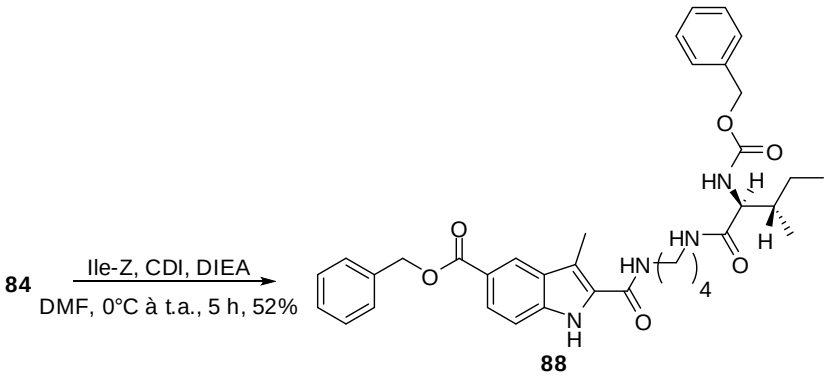


Schéma 41

Le biligand protégé **88** est obtenu dans les conditions de couplage peptidique décrites précédemment avec un rendement de 52% (Schéma 41). La structure a été confirmée par RMN et par LC-MS. Le composé final **89** est obtenu par hydrogénation catalytique de **88** avec un rendement de 40%. Ce rendement assez faible s'explique par des difficultés de purification dues à l'insolubilité du produit dans les solvants organiques.

Nous avons également tenté le couplage avec d'autres acides aminés protégés par un carbamate de benzyle (Schéma 42), notamment la phénylalanine et le tryptophane, mais malheureusement les rendements obtenus étaient très faibles (inférieurs à 5%).

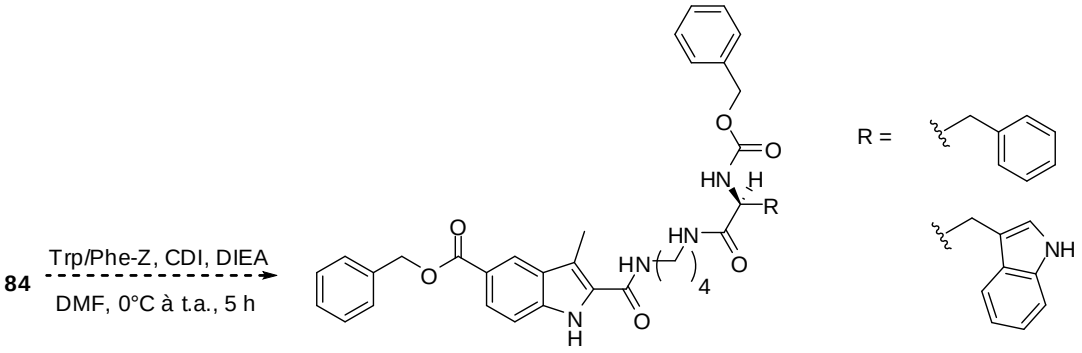


Schéma 42

Nous avons donc décidé de changer le groupement protecteur des acides aminés. Nous avons utilisé des acides aminés protégés par un groupement Boc, stable en milieu basique (DIEA), clivable dans des conditions acides, et permettant d'isoler les sels de TFA correspondants.

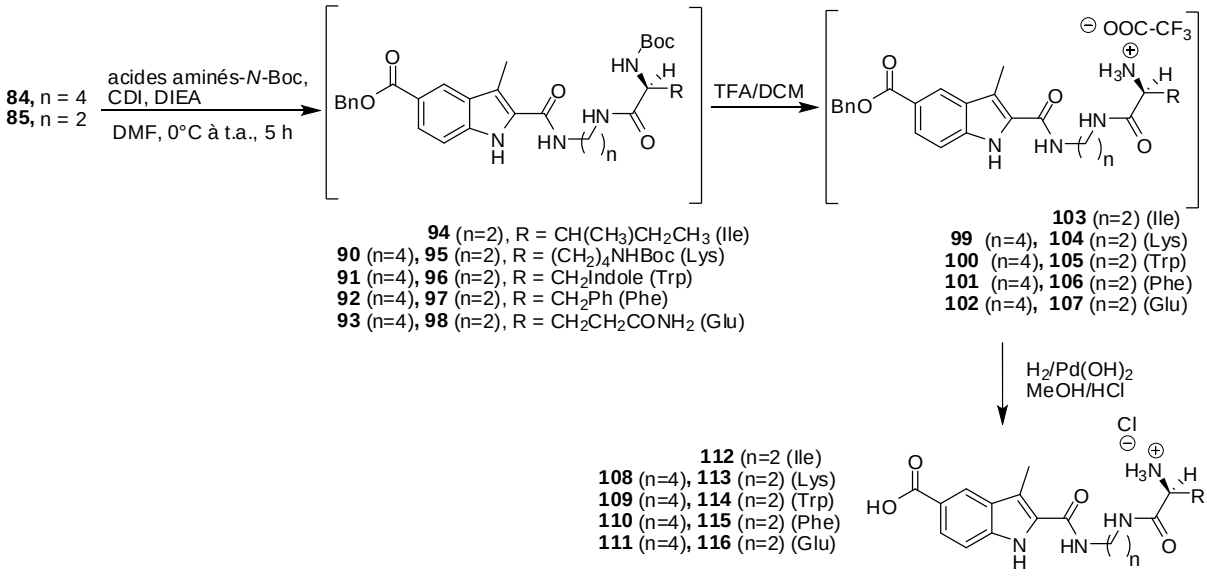


Schéma 43

Le couplage peptidique est réalisé dans les conditions classiques à partir des indoles **84** et **85** pour donner les intermédiaires protégés **90-93** (n = 4) et **94-98** (n = 2) sous forme de Boc dont les structures sont confirmées par RMN (Schéma 43).

Ces intermédiaires **90-98** instables sont engagés directement dans l'étape de clivage du groupement Boc en présence de TFA. Les difficultés de purifications des intermédiaires nous ont conduits à engager une nouvelle fois les produits **99-107** dans l'étape d'hydrogénation sans purification, suivie d'un traitement acide en vue d'obtenir les biligands **108-116** souhaités sous forme de chlorhydrate.

Les rendements globaux à partir de **84-85** sont présentés dans le Tableau 2.

Biligands	n	Acides aminés	Rdts (%)
108	4	Lysine	16
109	4	Tryptophane	22
110	4	Phénylalanine	26
118	4	Glutamine	19
112	2	Isoleucine	37
113	2	Lysine	25
114	2	Tryptophane	25
115	2	Phénylalanine	15
116	2	Glutamine	22

Tableau 2

Les rendements varient de 15 à 37% pour les espaceurs en n = 2 et de 16 à 26% pour les espaceurs en n= 4. Nous pouvons également constater que, globalement, les rendements sont meilleurs pour les indoles possédant un espaceur en n = 2. En effet leur solubilité étant meilleure dans les solvants organiques usuels, les purifications sont plus aisées exceptée pour la glutamine qui est totalement insoluble.

Une réaction parasite a été identifiée pour la glutamine en n = 4, il s'agit de la formation du produit **118** par cyclisation (Schéma 44). Cette structure a été confirmée par LC-MS.

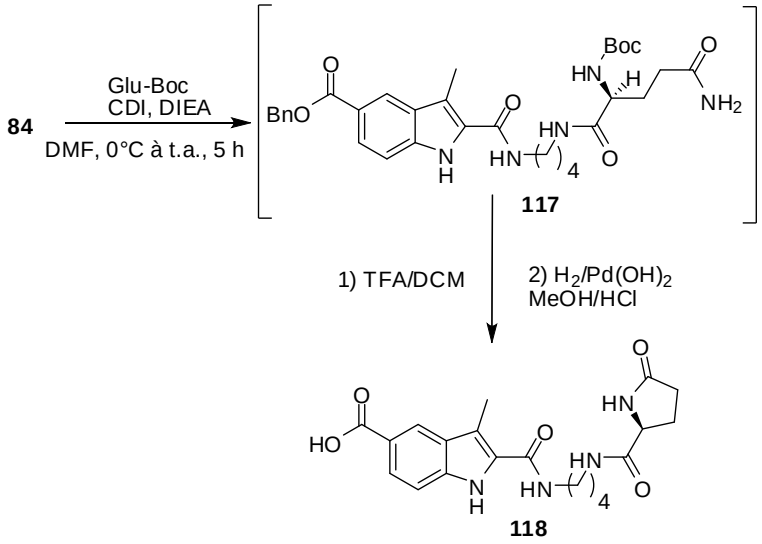


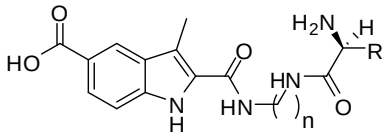
Schéma 44

Nous avons ainsi préparé quinze biligands possédant trois types d'espaceur (n = 2, 4, 6) et cinq acides aminés différents.

3 Evaluation Biologique

3.1 Pull-down Assay

Tous les composés du Tableau 3 ainsi que l'indole **52** ont été évalués *in vitro* pour leur capacité à perturber l'association entre l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{2A} et la protéine PSD-95, en utilisant une technique de chromatographie d'affinité puis analyse par Western Blot.



n = 2, 4, 6

n	a.a.	Phe	Trp	Ile	Lys	Glu	Sans a.a.
2		115	114	112	113	116	87
4		110	109	89	108	118	86
6		75	74	71	73	76	77

Tableau 3 : Récapitulatif numéro des composés

3.1.1 Principe

Un décapeptide comprenant l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{2A} (GVNEKVSCV) est couplé par son extrémité N-terminale à des billes d'agarose. Un contrôle du filtrat, par spectrométrie de masse, permet de confirmer l'efficacité du couplage (Schéma 45).

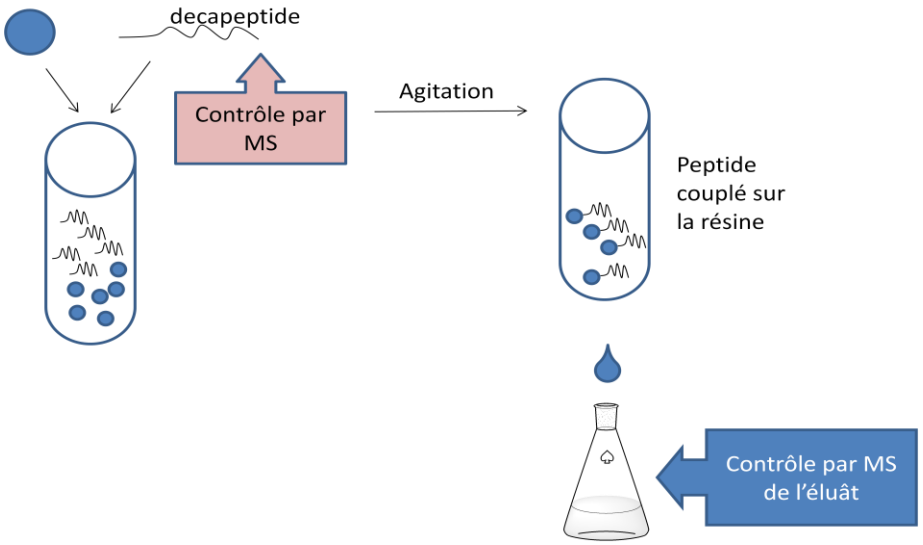


Schéma 45

Les différentes concentrations de composés (Tableau 3) sont ensuite incubées avec de l'extrait de cerveau de souris contenant la protéine PSD-95. Après incubation, la résine couplée au peptide est ajoutée. Le mélange est agité plusieurs heures, puis après centrifugation, le surnageant, comprenant les composés non fixés et les protéines n'interagissant pas avec le peptide sur résine, est filtré. La dernière étape consiste à cliver les protéines liées au peptide supporté pour les analyser par Western Blot (Schéma 46).

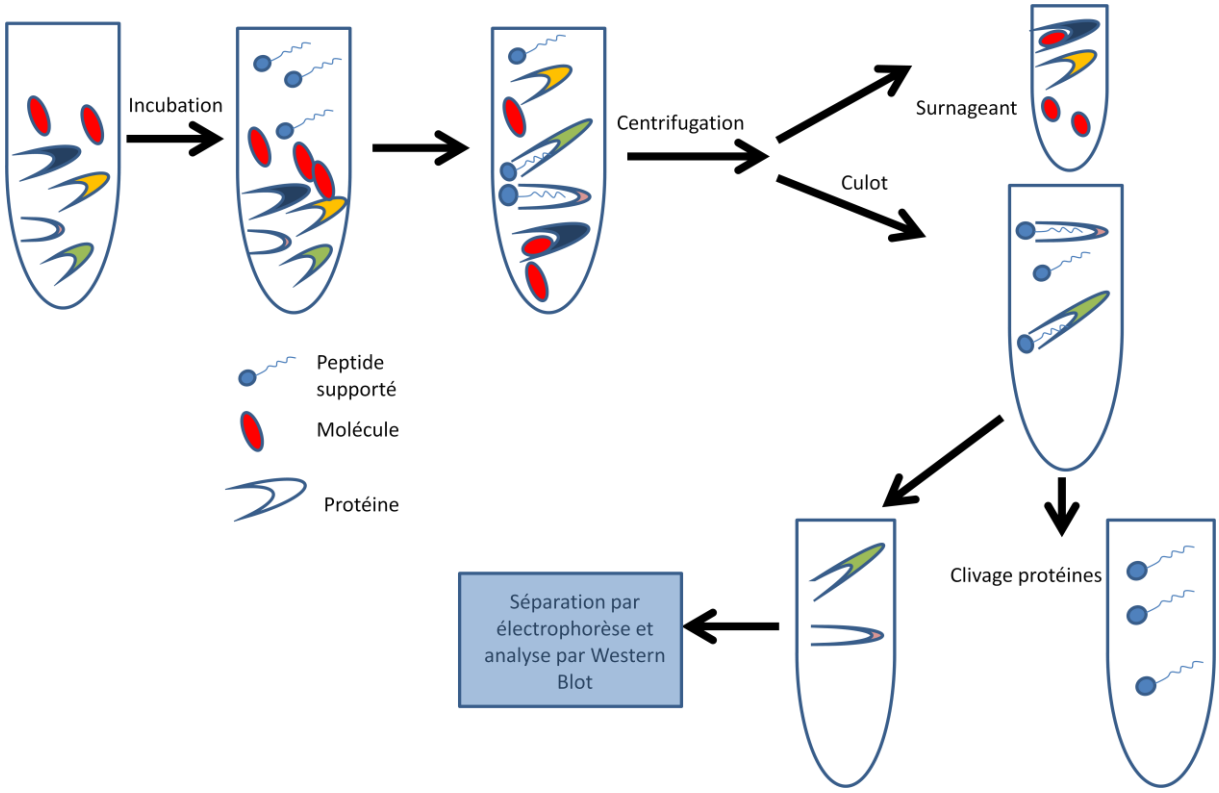


Schéma 46

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sont transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées en présence d'anticorps anti-PSD-95. Après rinçage, une deuxième incubation en présence d'un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire a lieu. L'anticorps secondaire étant lié à une peroxydase, l'ajout d'un réactif chimioluminescent permet de détecter les zones immunoréactives.

En fonction de la molécule et de la concentration utilisée, on observe une différence d'intensité lors de la révélation du gel correspondant à une quantité différente de protéine PSD-95 fixée sur la résine, *via* l'interaction avec le peptide. En effet, plus un ligand entre en compétition avec le peptide, moins il y a de protéine liée à la résine, et plus le ligand est efficace.

3.1.2 Résultats

Le décapeptide mimant l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT_{2A} se lie bien à PSD-95 (Figure 55). Cette interaction est inhibée de manière « concentration dépendante » par trois ligands **52**, **87** et **109**. En effet, on observe une diminution du signal (correspondant à la quantité de protéine PSD-95 retenue) lorsque la concentration en inhibiteur augmente.

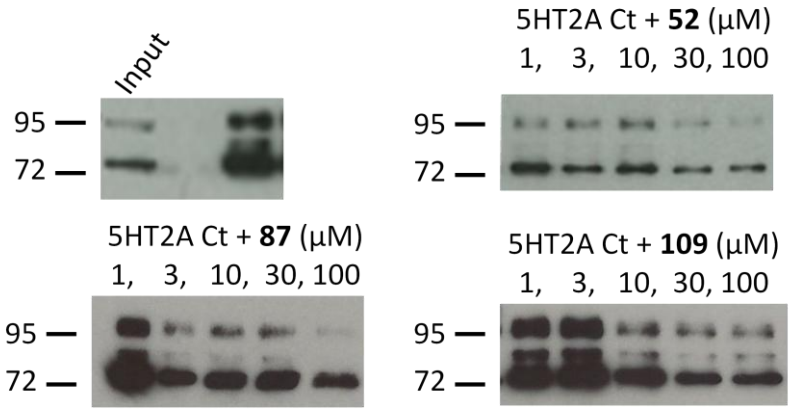


Figure 55 : Résultats de chromatographie d'affinité

La révélation du gel nous permet de déterminer la quantité de protéines se liant au peptide supporté. Ainsi, plus notre molécule est compétitive avec le peptide moins il y a de protéine sur le gel.

Nous pouvons donc conclure que les composés **52**, **87** et **109** sont des inhibiteurs de l'interaction PSD-95/5-HT_{2A} aux concentrations de 100 µM.

3.2 **Criblage RMN**

Pour évaluer l'interaction de nos molécules avec la protéine par RMN HSQC $^{1}H/^{15}N$, nous avons procédé à la synthèse du domaine PDZ1 de PSD-95 marqué à l'azote 15.

3.2.1 Synthèse de la protéine PSD-95 PDZ1

3.2.1.1 Préparation du plasmide d'expression

3.2.1.1.1 Préparation de l'ADN

La première étape consiste à insérer le plasmide de clonage (contenant le gène d'intérêt et un gène de résistance à l'ampicilline) dans des bactéries (*E.Coli*). Pour cela le plasmide est ajouté aux cellules, puis un choc thermique est effectué pour rendre la membrane plus perméable et permettre au plasmide de pénétrer dans la cellule. Un milieu nutritif est ensuite ajouté pour que les bactéries se régénèrent après le choc thermique. Les bactéries sont ensuite déposées sur boîte de pétri (gel d'agar-agar et ampicilline). Celles qui contiennent le plasmide, donc un gène de résistance à l'antibiotique, vont survivre et se développer, les autres non (Figure 56).

Le laboratoire disposait déjà du plasmide de clonage avec le gène d'intérêt, cette étape était donc déjà réalisée.

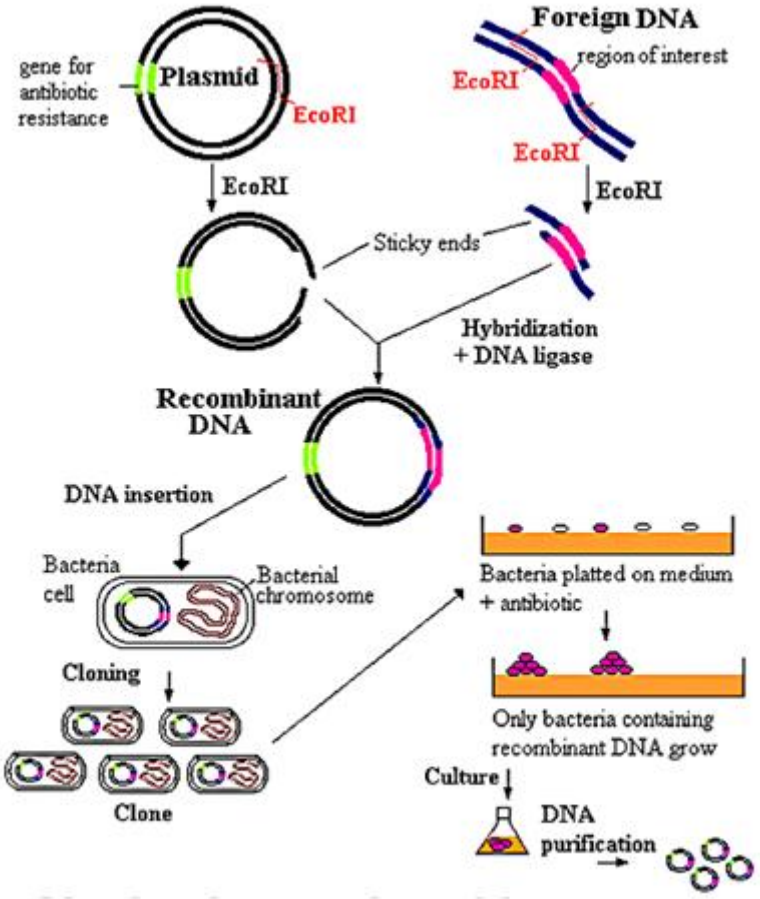


Figure 56 : Préparation du plasmide d'expression[153]

Une seule colonie de bactéries est ensuite prélevée, le but étant d'éviter les mutations pendant la croissance. Une quantité suffisante de bactéries est ensuite préparée pour en extraire une quantité d'ADN suffisante pour la suite.

3.2.1.1.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR) :

Une PCR (Figure 57) est ensuite réalisée pour amplifier et purifier l'ADN :

(a) Le matériel de départ est une molécule d'ADN bicaténaire.

(b) Le double brin d'ADN est séparé en chauffant (96 °C) le mélange de réaction; en le refroidissant, on permet aux amorces de s'associer à leurs séquences complémentaires qui bordent la région à amplifier (température à calculer).

(c) La polymérase Taq synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires à la matrice, au delà de la position du site de fixation de l'amorce sur l'autre brin (72 °C).

(d) Le mélange de réaction est à nouveau chauffé (96 °C).

(e) La polymérase Taq synthétise les brins complémentaires mais l'élongation est cette fois limitée à la séquence que l'on désire amplifier. Ces deux chaînes nouvelles représentent exactement la région spécifiée par la position des amorces.

(f) Le cycle est répété et les amorces s'associent aux brins nouvellement synthétisés (ainsi qu'à ceux de longueur variable que l'on a volontairement omis sur cette figure).

(g) La polymérase Taq synthétise des brins complémentaires, produisant des fragments d'ADN double brin identiques à la séquence de départ. Le cycle est ensuite répété autant de fois que nécessaire pour obtenir une quantité suffisante d'ADN.

Pour réaliser la PCR, il faut donc trouver la séquence ADN de la protéine PSD-95 puis trouver la partie qui code pour PDZ1 (expasy, PDB : 2KA9). Une fois la séquence trouvée, il faut rechercher les amorces qui conviennent ainsi que la température permettant la liaison des amorces.

Pour trouver la température de PCR il suffit d'appliquer la formule suivante:

Tm = (4 x [nG+nC])+(2 x [nA + nT]) nA,nT,nG,nC : Nombre de base azotée de l'ADN.

Pour cela on utilise la séquence ADN des gènes à cloner en partant d'une moyenne de 20 bases, les meilleurs rendements étant obtenus avec des amorces de cette taille.

Voici les amorces que nous avons déterminées :
Pour PDZ1
Tm = 70 °C
-> atatccatgg gagatggagtatgaggagatcaca et <- tcatcggct tcggctgggggtttccggcg
Forward Backward

Deux gènes codant pour les enzymes de restriction ECOR1 et NCO1 sont inclus en début et fin de gène (attention il faut choisir ces gènes en s'assurant que l'enzyme correspondante ne coupe pas le gène au milieu).

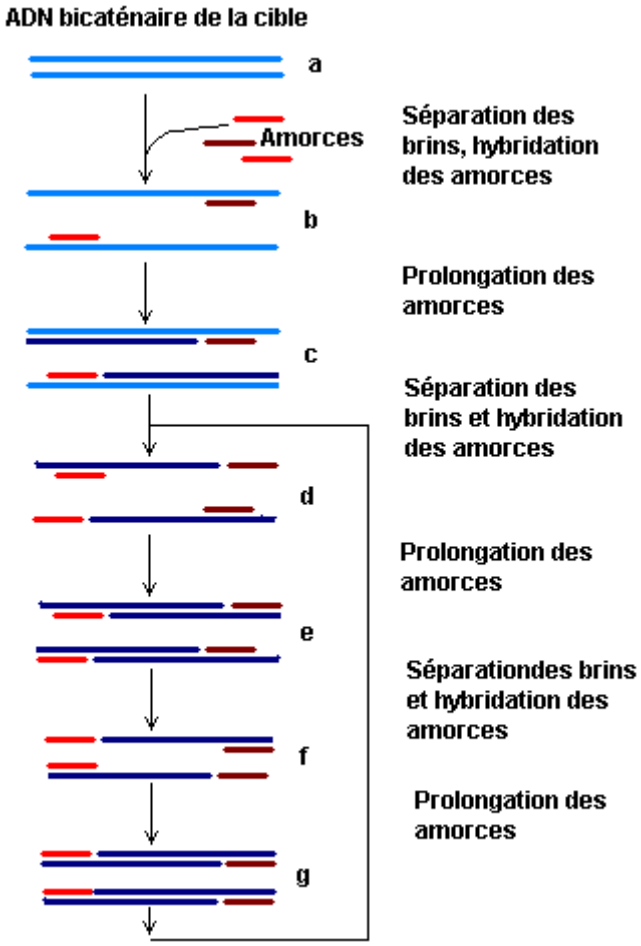


Figure 57 : Principe de la PCR

Ci-dessous le gel d'Agarose qui nous montre que la PCR a bien fonctionnée. L'échelle sur la droite de chaque quart du gel représente le marqueur de poids moléculaire et les traits brillants les gênes amplifiés (Figure 58) (4 essais avec PDZ1).

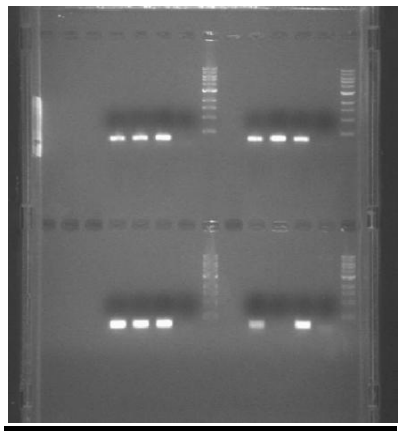


Figure 58 : Résultats de PCR

3.2.1.1.3 Formation du plasmide d'expression

Voici le plasmide tel que nous allons le construire :

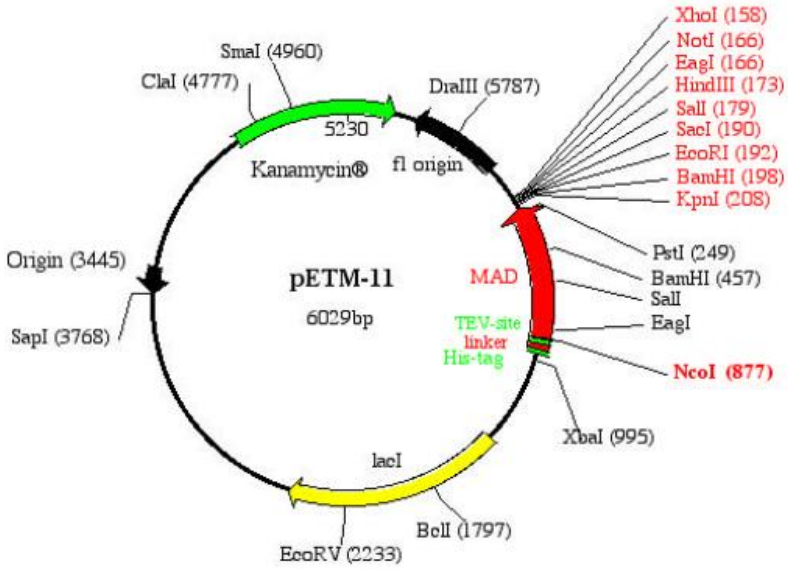


Figure 59 : Cartographie du plasmide d'expression

L'ADN linéaire de PCR va être utilisé pour construite le plasmide auquel sont ajoutées les ligases spécifiques et le plasmide afin de le rendre circulaire (Figure 59). Puis une incorporation du plasmide dans E. coli est réalisée, suivie d'une culture en boîte de pétri.

Un contrôle de ligation est réalisé par PCR soit sur colonie, ou soit par digestion du plasmide (une petite quantité de plasmide est prélevée pour être digérée et une électrophorèse est réalisée pour s'assurer que l'on a bien une seule fois le gêne et le plasmide : bande à 6000 kDa et 200 kDa pour les domaines PDZ).

La dernière étape consiste à préparer une quantité de plasmide qui est ensuite extrait des cellules et purifié. Notre plasmide d'expression est ainsi obtenu (un échantillon est envoyé au séquençage pour une dernière vérification).

Les plasmides de clonage et d'expression n'ont pas le même gène de résistance à l'antibiotique. Cela permet d'éviter les erreurs de manipulation.

3.2.1.2 Production de la protéine

3.2.1.2.1 Transformation

Notre plasmide est incorporé dans une souche mutante de E. coli conçue pour l'expression de protéine : BL21. Une culture sur boîte de pétri est ensuite effectuée (Figure 60).

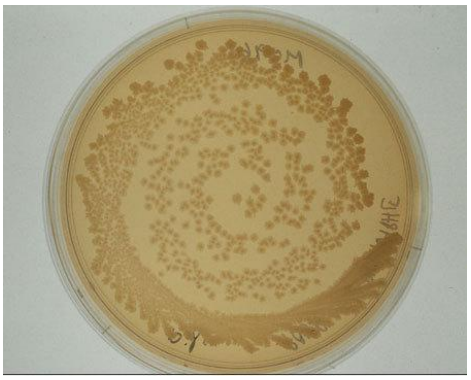


Figure 60 : Boîte de pétri après transformation

3.2.1.2.2 Expression

Après 24 h d'incubation, une colonie est prélevée et cultivée dans un volume plus large de milieu nutritif. Il est important de prélever une seule colonie pour s'assurer que les bactéries auront le même cycle de développement en fonction du temps.

Le milieu nutritif est ensuite centrifugé pour récupérer uniquement les bactéries dans le culot (Figure 61).



Figure 61 : Culot de cellules

Ce culot est ensuite dissout dans un petit volume de milieu nutritif puis la production se fait ensuite dans un volume plus large en suivant l'évolution de la densité optique à 600 nm, ce qui permet de suivre la multiplication des bactéries.

Lorsque la quantité de bactéries (entre 5 à 9 heures) est suffisante, une induction à l'IPTG est réalisée. Cet agent permet de déclencher la lecture du plasmide et donc la production de la protéine. Cette étape est réalisée à une température plus basse de celle de la multiplication des cellules. En effet, la diminution de la température permet de ralentir la multiplication des bactéries favorisant l'expression de la protéine.

Le lendemain, le milieu est centrifugé pour récupérer le culot qui est dissout en présence d'anti-protéase et d'EDTA (les éventuels métaux sont ainsi complexés et les éventuelles enzymes qui pourraient dégrader les protéines sont inhibées). Le mélange est congelé une nuit pour fragiliser les membranes des bactéries.

3.2.1.2.3 Purification

Dans un premier temps, les bactéries sont lysées par une presse mécanique pour détruire les membranes et libérer les protéines et l'ADN génomique. Notre protéine et les déchets bactériens sont ainsi récupérés (ajout d'ADNase pour détruire l'ADN génomique).

La protéine extraite des bactéries contient six histidines (His) ajoutées dans la séquence, nécessaires à la purification, qu'il faudra cliver. Ces Histidines permettent la complexation de la protéine avec le nickel fixé sur une colonne, ainsi la protéine intéressante reste seule fixée sur la colonne et une fois toutes les impuretés éliminées, la protéine est décrochée puis éluée pure de la colonne grâce à une solution d'imidazole.

La dernière étape consiste au clivage enzymatique des histidines, puis à une purification sur colonne d'exclusion stérique pour obtenir la protéine pure (Figure 62).



Figure 62 : Résultats de purification sur gel d'électrophorèse (A et B : Brut après rupture de la membrane, C : Après colonne de nickel, D et E : Autres fractions de colonne de nickel, F : Après clivage et purification par exclusion stérique, G : Marqueur de poids moléculaire)

Une fois la protéine propre obtenue, pour obtenir la protéine dans un tampon choisi à une concentration voulue, il est nécessaire d'avoir recours à des techniques de concentration, lyophilisation ou changement de tampon par dialyse.

Une dernière vérification est réalisée par RMN ^{1}H en effectuant le spectre de la protéine pour s'assurer que la structure globulaire a été conservée (Figure 63).

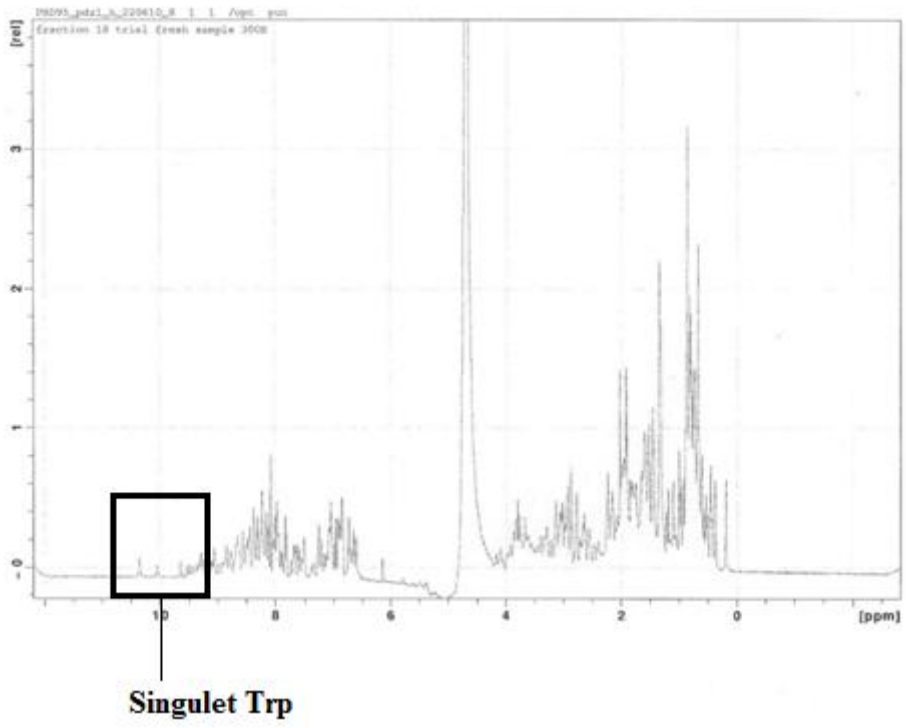


Figure 63 : Spectre ^{1}H de PSD-95 PDZ1

Pour cela, il suffit de constater au niveau des NH des tryptophanes, la présence de singulets qui indique que tous les tryptophanes de la protéine ne sont pas équivalents et donc que la structure secondaire de la protéine est conservée. En effet, si la structure était linéaire tous les NH seraient équivalents et nous n'observerions pas plusieurs singulets.

3.2.2 Cartographie

Pour évaluer l'interaction de nos composés avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 par HSQC $^{1}H/^{15}N$, il faut d'abord réaliser la cartographie de la protéine. Cette cartographie est réalisée par RMN en effectuant plusieurs expériences (NOESY, TOCSY ….) ce qui permet d'associer chaque signal du spectre aux acides aminés de la protéine. Dans le cas de PSD-95 PDZ1, ce travail a été réalisé par Piserchio *et al.*[154](Figure 64). Nous avons ensuite enregistré le spectre de la protéine produite au laboratoire (Figure 65) afin de le comparer à celui de la littérature dans les mêmes conditions.

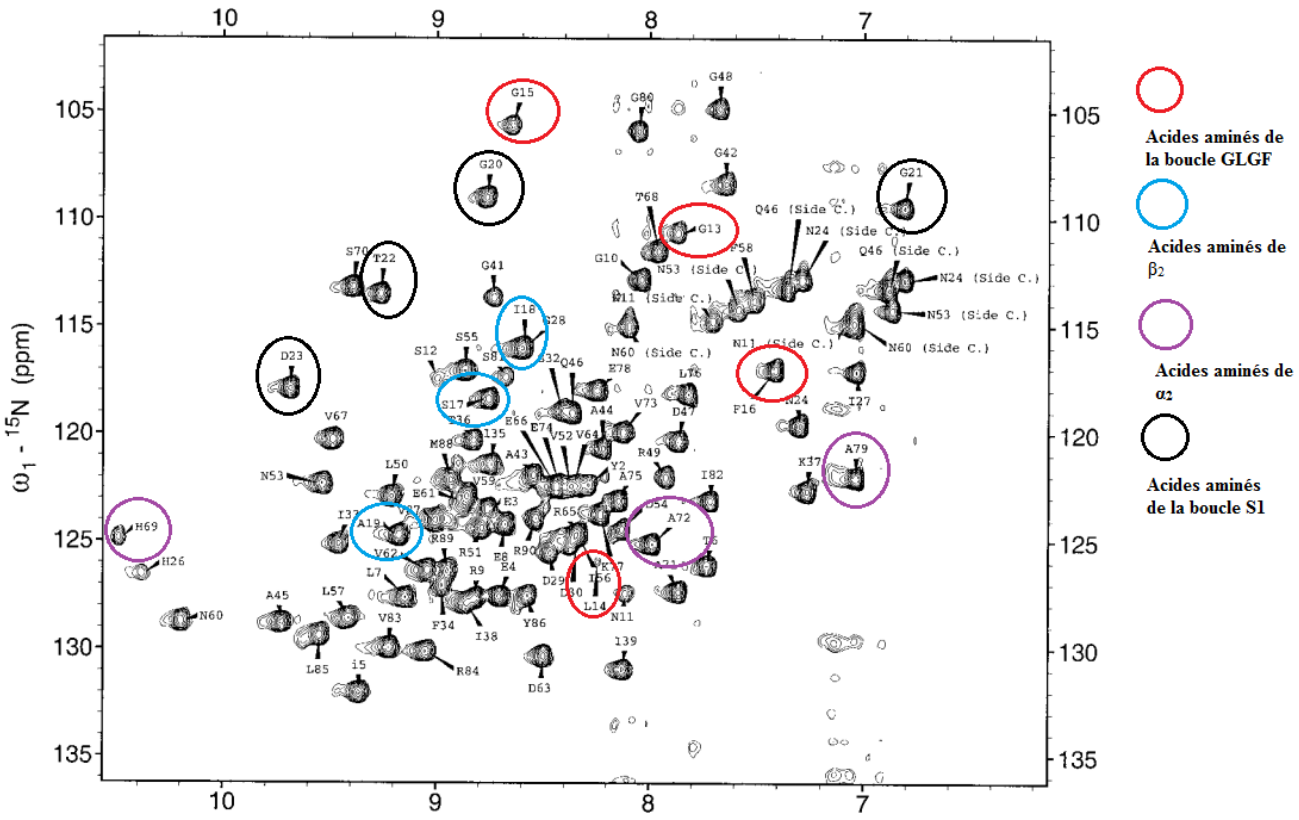


Figure 64 : Spectre HSQC de la littérature $^{1}H/^{15}N$ [154]

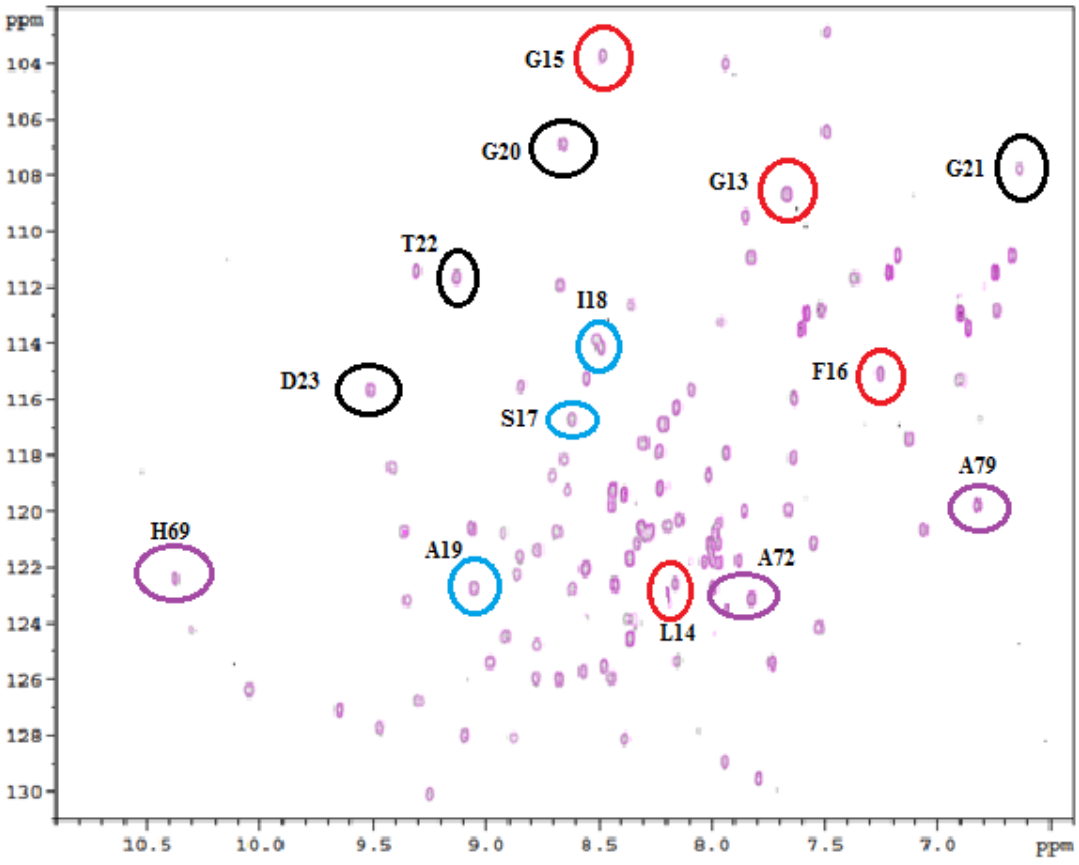


Figure 65 : Spectre HSQC $^{1}H/^{15}N$ expérimental de PSD-95 PDZ1.

Chaque tâche de corrélation sur ces spectres correspond au couplage entre l'azote de l'acide aminé et son hydrogène. Ainsi une tâche correspond à un acide aminé de la protéine (sauf pour les acides aminés ayant des azotes sur les chaînes latérales, dans ce cas il y a plusieurs tâches de corrélations). Nous avons repéré sur les deux spectres Figure 64 et Figure 65 quelques acides aminés : en rouge ceux de la boucle GLGF, en bleu quelques acides aminés du feuillet β_2, en violet quelques acides aminés de α_2 et en noir ceux de la boucle S1. Nous ne travaillerons pas sur la région centrale des spectres car les acides aminés sont trop proches.

3.2.3 Evaluation

Afin d'évaluer les interactions de nos composés avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 nous enregistrons le spectre $^{1}H/^{15}N$ du mélange (protéine/ligand ; 1/10), puis le superposons au spectre de la protéine seule Figure 65. Si les deux spectres se superposent parfaitement, il n'y a aucune interaction ; entre le ligand et le domaine PDZ ; par contre si les signaux ne se superposent pas parfaitement cela signifie que l'environnement de la protéine est modifié par le composé et nous pouvons ainsi identifier les signaux (acides aminés) qui sont perturbés par l'interaction du composé avec la protéine.

Tous les composés ont été testés par RMN. Malheureusement, aucun biligand n'a engendré de résultats intéressants. L'indole **52** est le seul composé à avoir perturbé légèrement 4 acides aminés (N24, I27, H69, L76) (Figure 66). Nous avons également indiqué sur la représentation en 3D de la protéine (Figure 67), les acides aminés perturbés par l'interaction de composé **52**.

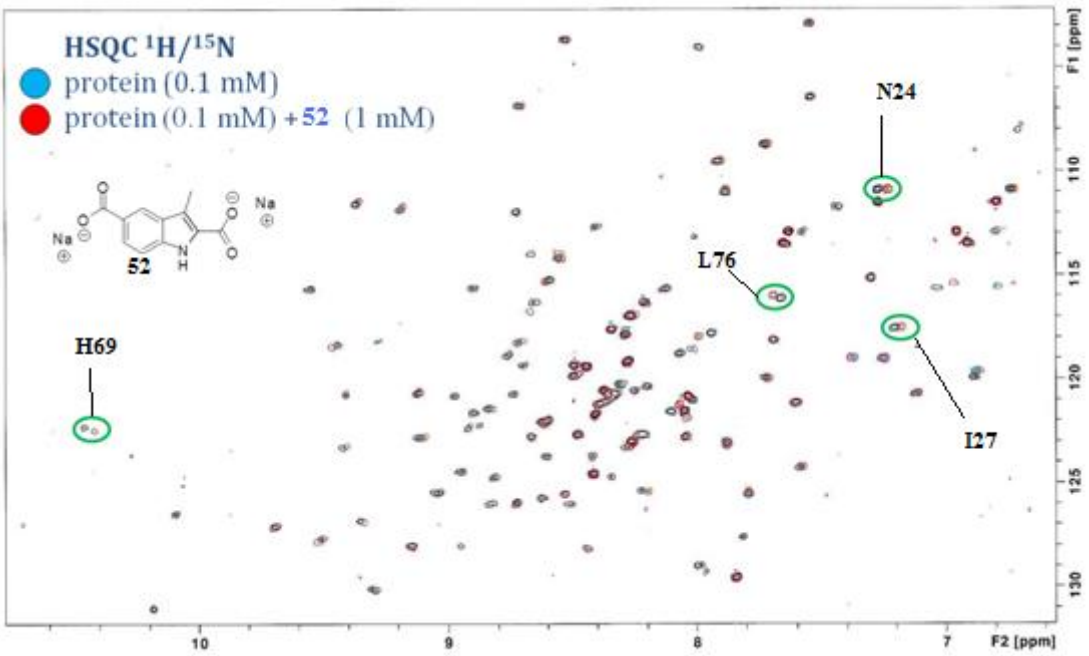


Figure 66 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1

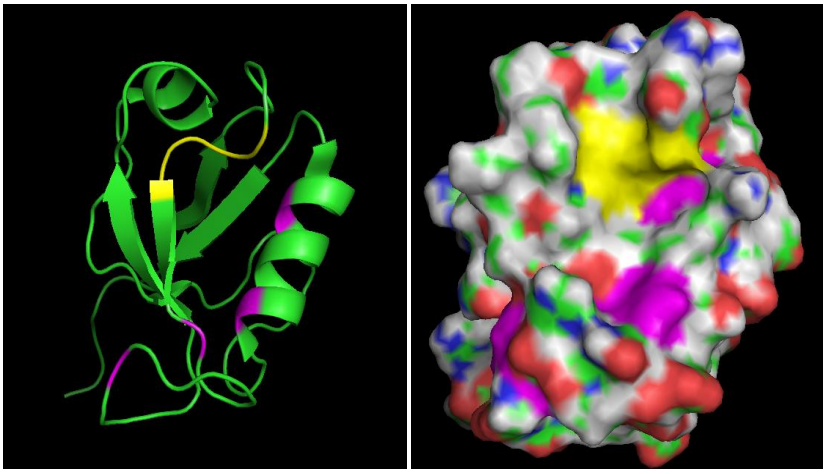


Figure 67 : Interactions de 52 avec le domaine PDZ1 de PSD-95 (violet :interaction, jaune :boucle GLGF)

Nous constatons que **52** ne perturbe pas la boucle GLGF ce qui signifie que ce ligand est trop faible comme accroche pour le site S0.

4 Conclusion

Nous avons réalisé la synthèse de 19 biligands possédant un noyau indolique, lié à des acides aminés de différentes natures (hydrophobe, hydrophile, polaire chargé ou non…) *via* un espaceur de longueur variable (de 2 à 6 atomes de carbone). Ces biligands n'ont pas montré d'interactions significatives avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 par HSQC $^{1}H/^{15}N$, par contre certaines molécules ont montré des activités par chromatographie d'affinité. Ceci est peut être dû aux conditions opératoires. En effet, le pH utilisé pour les deux tests est différent ; pH 6.8 en RMN pour des problèmes de stabilité du domaine PDZ et pH 7.2 pour la chromatographie d'affinité ce qui peut avoir une influence sur la protonation de certains acides aminés et donc modifier l'interaction du composé avec la protéine. De plus, pour la chromatographie d'affinité, la source de protéine provient d'extrait de cerveaux de souris, le test est donc réalisé sur la protéine PSD-95 dans son ensemble alors qu'en RMN il s'agit du domaine PDZ1 isolé.

Il faut également noter que l'indole utilisé pour construire les biligands ne perturbe pas les acides aminés de la boucle GLGF ce qui est le signe d'un ligand faible. Il va donc falloir envisager de modifier le noyau indolique pour obtenir une accroche forte au niveau du site S0 avant de construire d'autres biligands pour sonder le site S1.

CHAPITRE 3

Chapitre 3 : Optimisation

Nous avons montré, dans le chapitre précédent, que les biligands présentent de faibles interactions avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95. Compte tenu des études réalisées, nous avons conclu que les interactions entre le noyau indolique choisi et le site S0 de PSD-95 n'étaient pas optimales pour pouvoir sonder le site S1. Nous avons donc envisagé de réaliser une étude de relation structure activité (RSA) du noyau indolique afin d'optimiser les interactions avec le site S0.

1 Optimisation de l'indole 52.

Dans un premier temps, nous avons étudié la nature et l'orientation des acides aminés de l'extrémité C-terminale du ligand PDZ, 5-HT_{2A}, se liant à la protéine PSD-95 PDZ1, afin d'identifier les pharmacophores qui pourraient nous permettre d'optimiser les interactions entre le noyau indolique et le site S0 de la protéine (Figure 68).

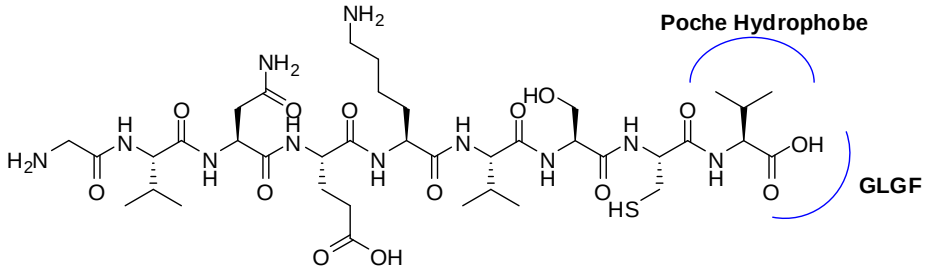


Figure 68 : Extrémité C-terminale de 5-HT_{2A}.

Nous constatons que le C-terminal du ligand PDZ interagit avec la boucle GLGF *via* le carboxylate de la Val(0) et la chaîne latérale avec une poche hydrophobe du domaine PDZ. Pour mimer cette interaction, il semble nécessaire d'introduire un groupement hydrophobe tel qu'un méthyle sur le cycle aromatique de l'indole. Nous envisageons de préparer les indoles **119** et **121** (Schéma 47) afin de déterminer la position la plus favorable de l'acide carboxylique et du groupement méthyle sur le cycle aromatique.

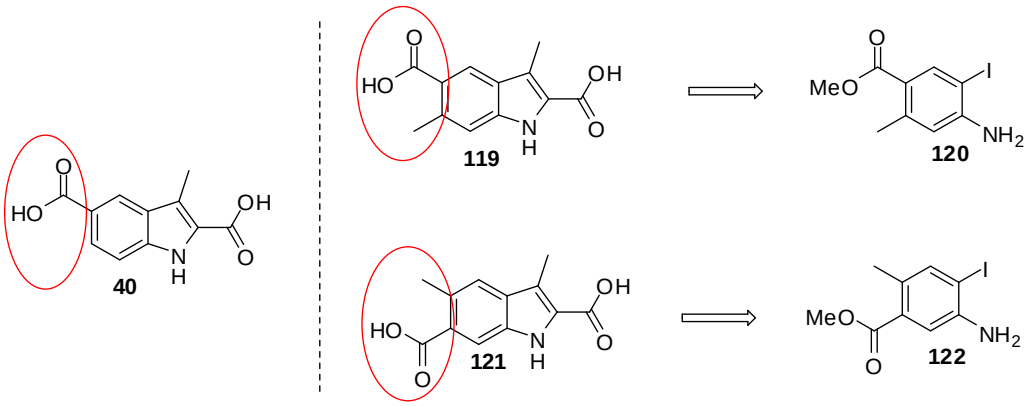


Schéma 47

Les deux indoles **119** et **121** seront préparés, selon la méthode utilisée précédemment, à partir des deux iodoanilines **120** et **122** en présence d'acide oxobutyrique par réaction pallado-catalysée.

1.1 Analogues 119 et 121

1.1.1 Synthèse des analogues

Nous avons utilisé la voie de synthèse décrite par Fujii *et coll*. pour préparer ces deux analogues.[53, 54] Dans un premier temps, nous avons préparé les anilines **120** et **122**, nécessaires à la formation du noyau indolique, en trois étapes à partir des nitrobenzènes **123** et **127** commerciaux (Schéma 48). Une estérification de ces acides en présence de chlorure de thionyle et de méthanol, suivie d'une hydrogénation catalytique des groupements nitro en présence de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène conduit aux anilines correspondantes **125** et **129** avec des rendements quantitatifs. Une iodation en présence de chlorure d'iode génère les iodoanilines **120** et **122** avec des rendements respectifs de 80% et 34%. Cette différence de rendement s'explique par des effets mésomères beaucoup plus défavorables pour le dérivé aniline **129**, pour orienter l'iodation sur le noyau aromatique. En effet, nous obtenons un mélange des deux isomères **122** et **130** dans un rapport 1/1, d'où la chute de rendement en composé souhaité.

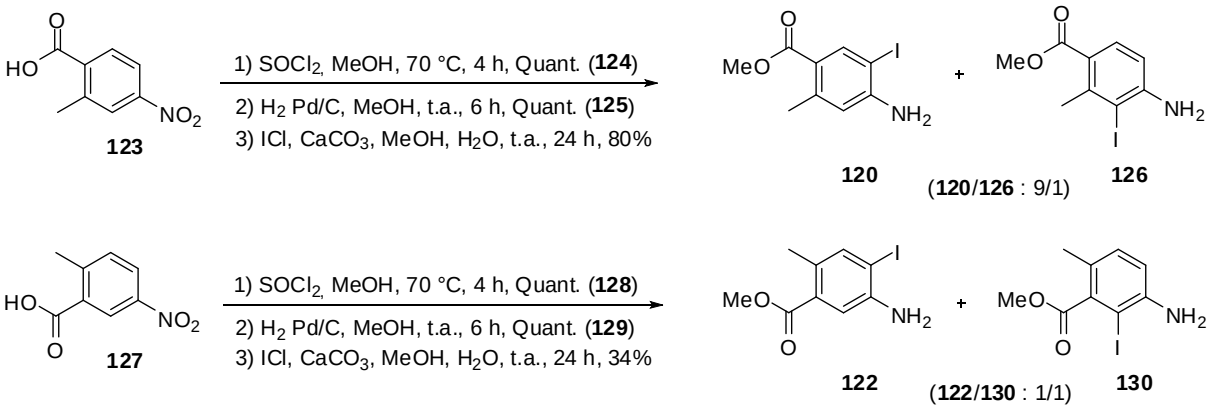


Schéma 48

Les deux indoles **131** et **132** sont obtenus à partir des deux anilines **120** et **122** (Schéma 49) dans les conditions décrites précédemment avec des rendements respectifs de 50 et 55%. La saponification des deux indoles fournit les deux composés **119** et **121** avec des rendements quantitatifs.

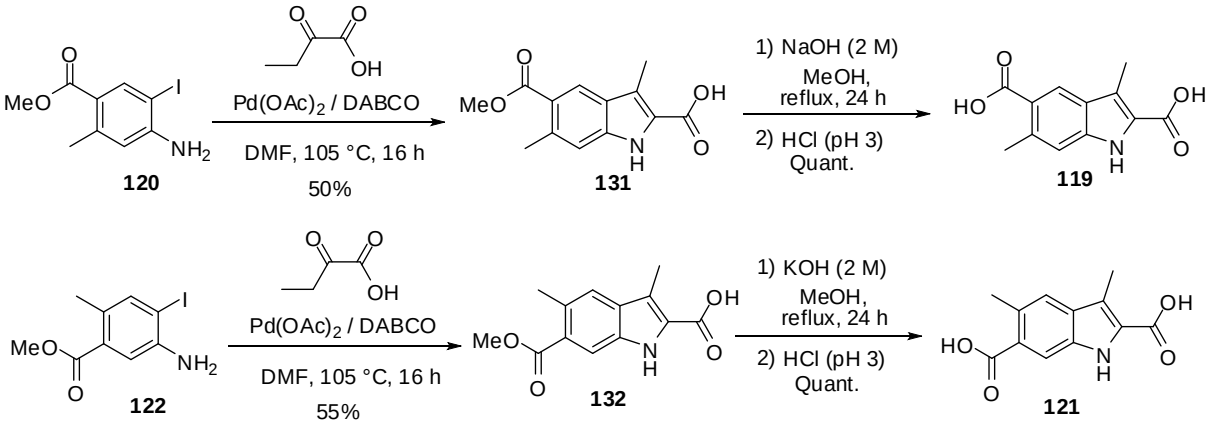


Schéma 49

Les deux indoles **119** et **121** ont été préparés en 5 étapes à partir des nitrobenzènes **123** et **127** avec des rendements globaux respectifs de 40% et 19%.

*1.1.2 Interactions des analogues **119** et **121**/PDZ par RMN*

Les spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de la protéine PSD-95 PDZ1 en présence et en absence des composés **119** et **121** sont analysés et comparés (Figure 69). Le composé **119** perturbe quelques acides aminés (Tableau 4), mais aucun de la boucle GLGF. Or il est indispensable de perturber des acides aminés de cette région qui sont impliqués dans l'interaction entre le domaine PDZ et son ligand naturel.

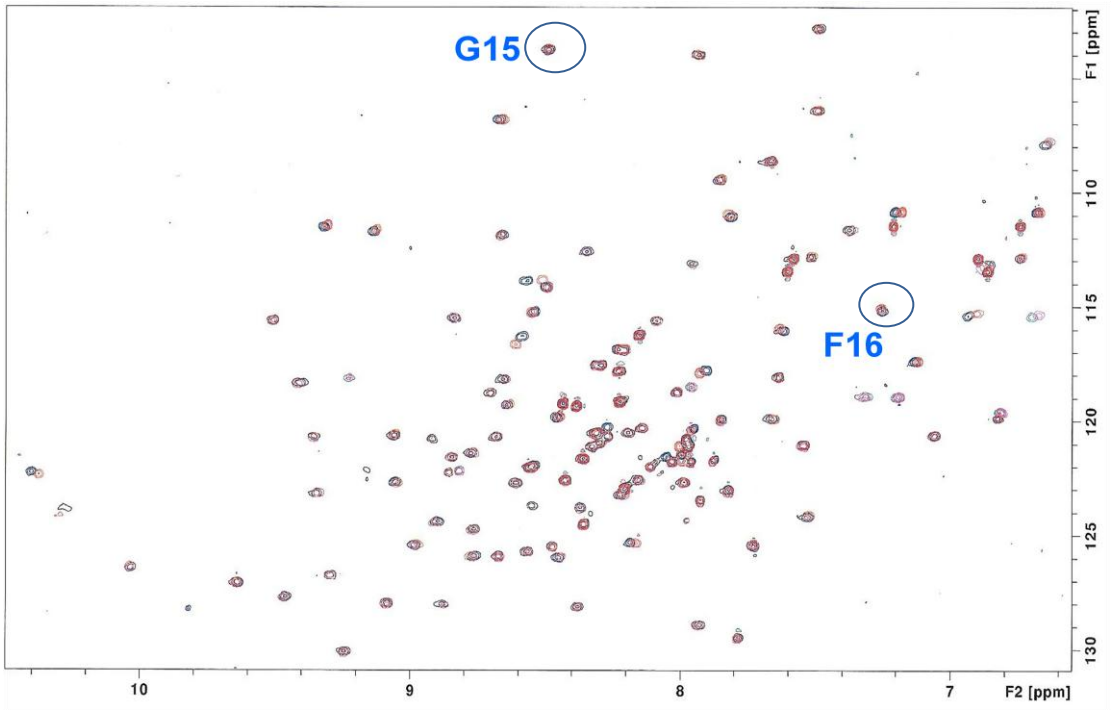


Figure 69 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec 119 = rouge).

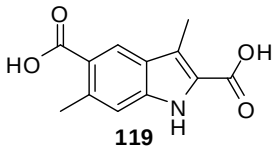
Indoles	Acides aminés perturbés
 **119**	**N11, S17, I18, G21, N24 H26, I27, H69, V73.**

Tableau 4 : Récapitulatif des acides aminés perturbés par l'indole 119 observés par HSQC $^{1}H/^{15}N$.

Nous avons interprété visuellement les résultats RMN en 3D avec le logiciel Pymol (Figure 70). Les acides aminés perturbés par l'interaction de l'analogue **119** avec la protéine sont représentés en violet, et en jaune nous avons mis en évidence les acides aminés appartenant à la boucle GLGF. Nous pouvons ainsi constater que le composé **119** n'interagit qu'avec la partie inférieure du site S0.

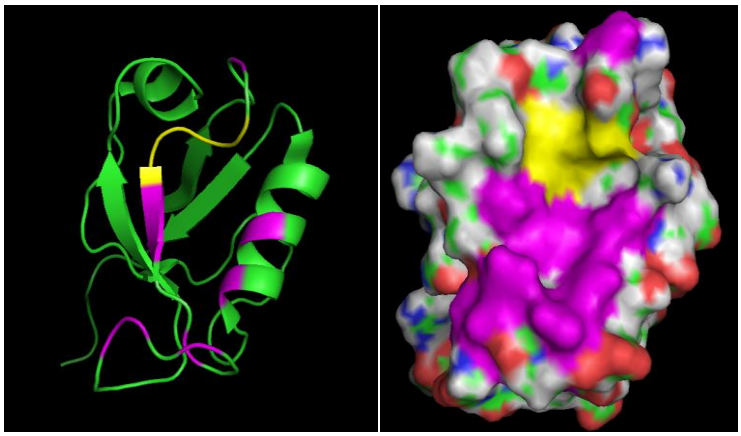


Figure 70 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand 119 avec la protéine PSD-95 PDZ 1

Les spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ (Figure 71) de la protéine PSD-95 PDZ1 en absence et en présence de l'analogue **121** montre que cet indole présente des interactions très intéressantes. En effet deux acides aminés de la boucle GLGF (G15 et F16) sont particulièrement affectés par la présence du ligand (Tableau 5).

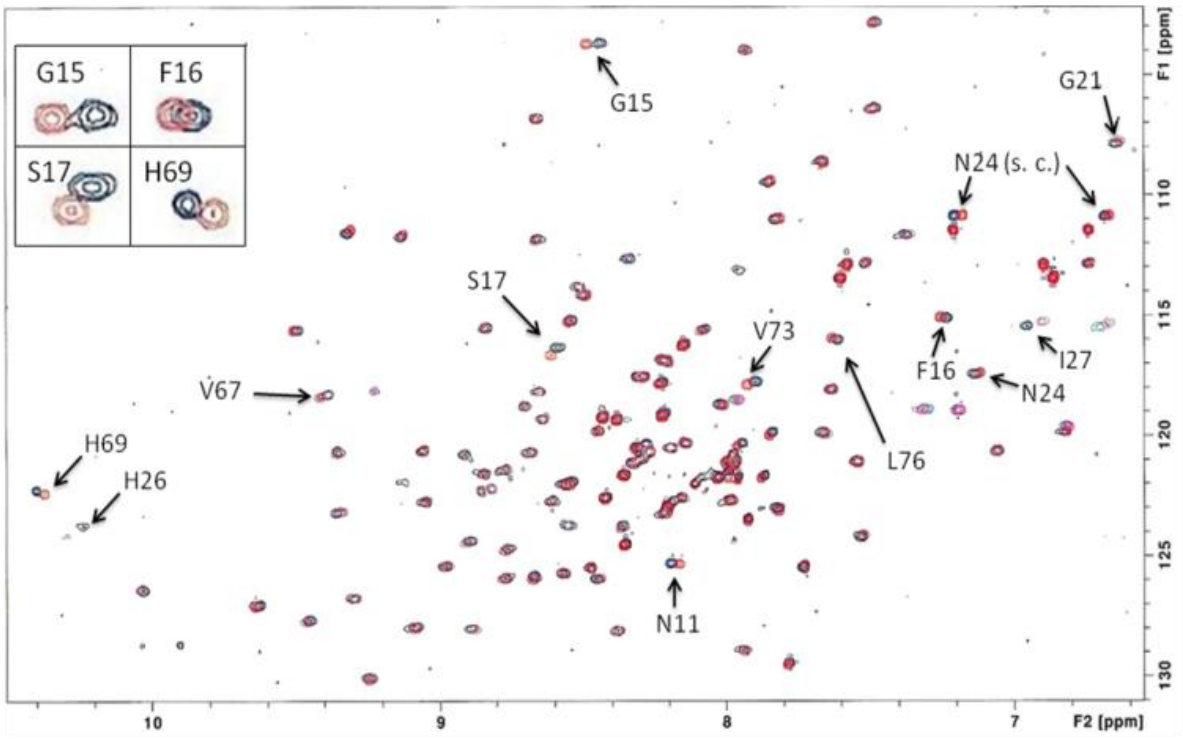


Figure 71 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec 121 = rouge).

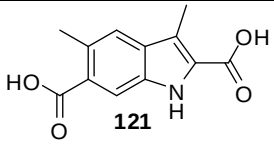
Indole	Acides aminés perturbés
 **121**	**G15, F16, N11, S17, G21, N24, H26, I27, V67, H69, V73.**

Tableau 5 : Récapitulatif des acides aminés perturbés par l'indole 121 observés par HSQC $^{1}H/^{15}N$.

Ayant identifié les acides aminés perturbés par l'interaction de l'analogue **121**, nous les avons représentés, comme précédemment, sur une structure en 3D (Figure 72) (en violet les acides aminés perturbés, en jaune ceux de la boucle GLGF et en orange ceux de la boucle GLGF eux-mêmes perturbés par la présence du ligand).

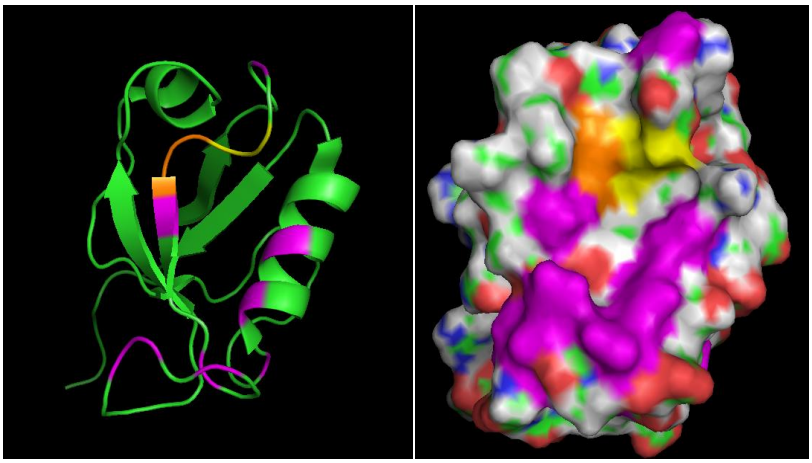


Figure 72 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand 121 avec la protéine PSD-95 PDZ1

Les études RMN réalisées sur les deux indoles **119** et **121** ont montré que seul l'indole **121** perturbe les acides aminés de la boucle GLGF et par conséquent présente des interactions significatives avec le site S0. Compte tenu de ces résultats, nous en avons conclu que l'acide carboxylique en position 6 ainsi que la présence du groupement hydrophobe en position 5 sont nécessaires pour obtenir de bonnes interactions entre l'indole et le site S0 de la protéine.

1.2 Relation structure activité autour de 121

Nous avons ensuite envisagé d'étudier l'influence de la position et de la nature du groupement hydrophobe sur les interactions de l'indole avec la protéine PSD-95. Pour cela nous avons choisi de synthétiser l'indole **133** (Schéma 50) possédant un groupement méthyle en position 4.

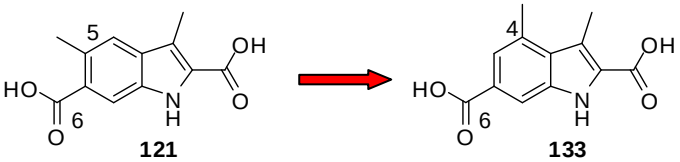


Schéma 50

*1.2.1 Préparation du composé **133***

Afin de préparer l'indole **133** nous devons, dans un premier temps, synthétiser l'aniline **134**. Cette aniline pourrait être obtenue à partir du dérivé nitro **135**. Trois voies de synthèse pourraient être envisagées pour la préparation de **135** (Schéma 51).

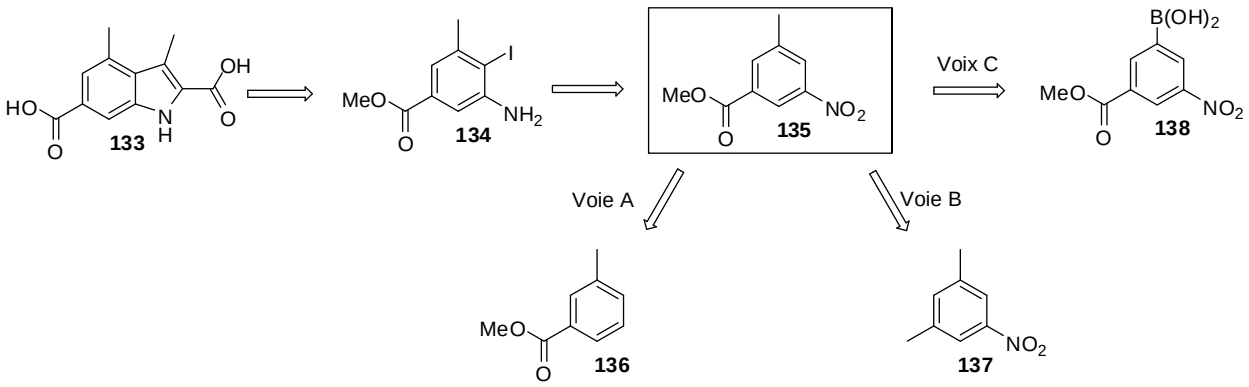


Schéma 51

- Par nitration du 3-méthylbenzoate de méthyle **136** (voie A).
- Par oxydation du 3,5-diméthyl nitrobenzène **137** (voie B).
- Par une réaction de Suzuki sur l'acide 3-(méthoxycarbonyl)-5-nitrophénylboronique **138** (voie C).

Les différentes tentatives réalisées pour obtenir le dérivé nitro **135** selon les voies A et B ne nous ont permis d'accéder qu'à des mélanges complexes non séparables de diverses isomères et produits. Le composé désiré était malheureusement toujours obtenu en minorité d'après les analyses GC-MS. Seule la voie C a permis d'obtenir le composé désiré à partir de l'acide boronique **138**. Un brevet décrit sa formation dans les conditions de Suzuki, avec un rendement de 47 %.[155] Les couplages de Suzuki, catalysés au palladium, sont largement décrits sur des acides boroniques aromatiques avec des halogénures de type vinyle, aryle, benzyle ou allyle. Par contre, très peu de méthodes sont connues sur des halogénures non activés. Nous avons donc appliqué les conditions mises au point par Großen *et al.*[156] et utilisées dans le brevet,[155] en utilisant de l'acétate de palladium et du tri-*ortho*tolylphosphine pour former le complexe catalytique en présence de iodure de méthyle et d'acide boronique. Cependant, malgré plusieurs essais réalisés dans les mêmes conditions (Schéma 52), nous n'avons jamais pu dépasser 7 % de rendement pour cette réaction.

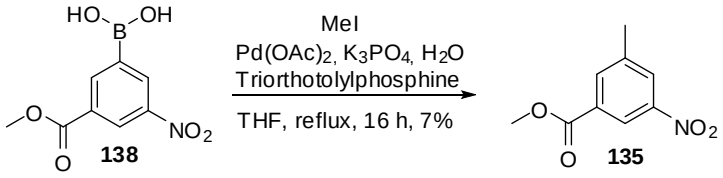


Schéma 52

Ayant essayé plusieurs voies de synthèse et compte tenu du très faible rendement obtenu, nous n'avons pas poursuivi la synthèse de l'indole **133**.

Nous avons alors envisagé de préparer les indoles **139** et **140** possédant un groupement éthyle en position 4 et 5, afin de pouvoir étudier l'influence de la position et de la nature du groupement hydrophobe sur le cycle aromatique et sur les interactions avec la protéine (Figure 73). En effet, l'introduction d'un groupement éthyle sous forme éthylique ou vinylique, est mieux décrite dans la littérature que celle d'un groupement méthyl.

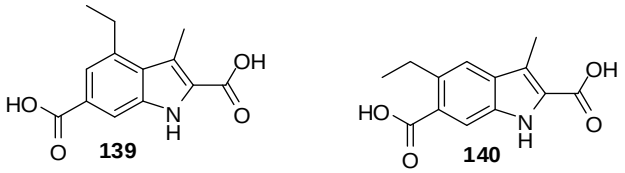


Figure 73 : Composés 139 et 140

*1.2.2 Synthèse de **139** et **140***

Les indoles **139** et **140** pourraient être obtenus à partir des anilines **141** et **142** correspondantes selon la méthode de cyclisation décrite précédemment pour générer le noyau indolique, en présence d'acide oxobutyrique et de palladium. Le groupement éthylique sera introduit par réaction pallado-catalysée de type Suzuki ou Stille à partir du dérivé boronique **138** ou du dérivé halogéné **143**, tous deux commerciaux (Schéma 53).[155]

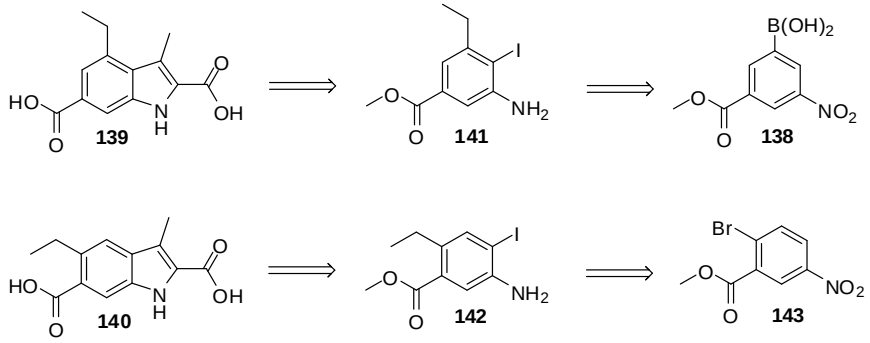


Schéma 53

Le composé **144** (Schéma 54) est obtenu selon un couplage de Suzuki entre le bromure de vinyle et l'acide boronique commercial **138**[156] avec un rendement de 31%. Celui-ci est ensuite hydrogéné en présence de palladium sur charbon pour donner quantitativement l'amine **145**. Cette dernière est iodée en présence de diiode et de sulfate d'argent.[147] Malheureusement, cette étape d'iodation est difficile à contrôler et malgré toutes nos tentatives (baisse de température à 0 °C et temps d'addition plus lent du sulfate d'argent), le produit diiodé **146** est obtenu exclusivement avec un rendement de 50%.

Cet échec nous a contraints à abandonner la préparation de **139**.

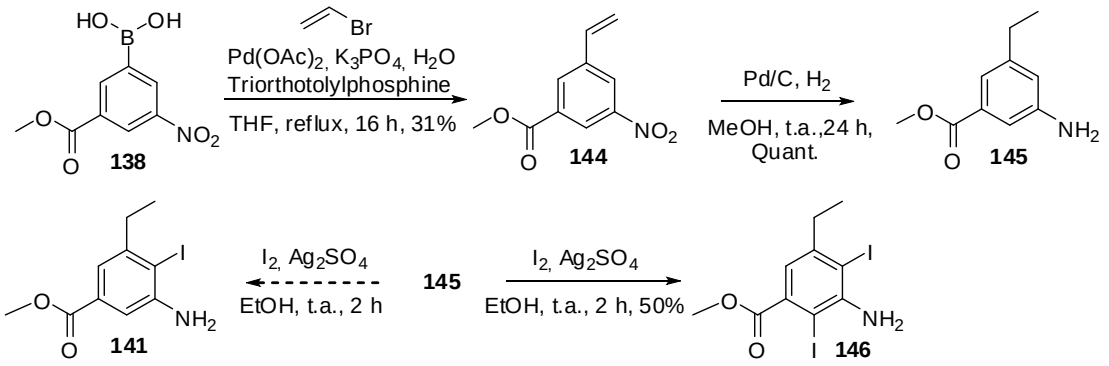


Schéma 54

Parallèlement, nous avons envisagé la synthèse du composé **142**, précurseur du noyau indolique **140**. La 2-iodo-aniline serait obtenue en deux étapes, à partir du dérivé bromé **143** commercial. Le groupement R vinylique ou éthylique pourrait être introduit par couplage au palladium (Suzuki ou Stille).[156, 157]

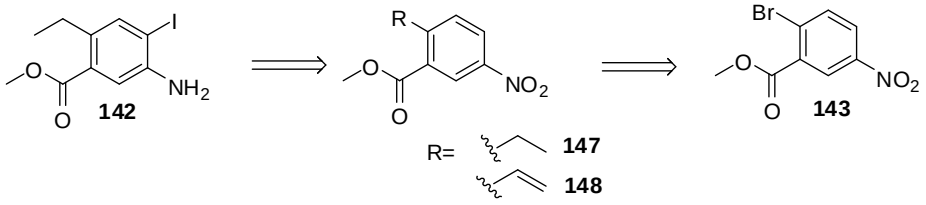


Schéma 55

Dans un premier temps la synthèse du composé **147** est réalisée à partir du dérivé bromé **143** en présence de tetraéthylétain catalysé par du chlorure de bis(triphenylphosphine)-palladium(II) (Schéma 56).[158]

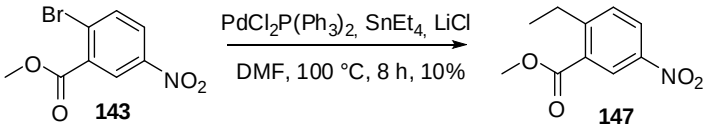


Schéma 56

Malheureusement le composé **147** est isolé avec un très faible rendement de 10%, ceci est essentiellement dû au traitement difficile des sels d'étain en fin de réaction. Pour palier ce problème, nous avons alors envisagé de préparer le composé **148** par une réaction de Suzuki en présence du dérivé boré vinylique (Schéma 57). Cependant, les rendements n'ayant pas excédé 20 %, et compte tenu du coût du réactif de départ, nous avons décidé de poursuivre notre étude de structure activité en conservant le groupement méthyle sur l'indole en position 5.

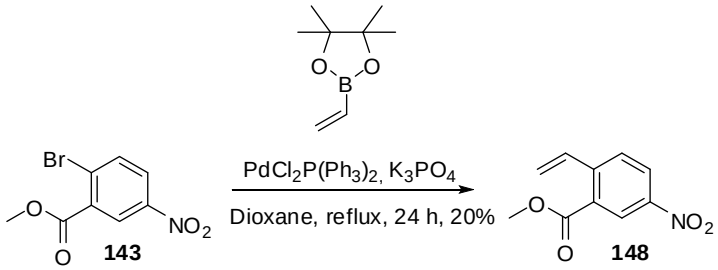


Schéma 57

*1.2.3 Synthèse de **149** et **150***

Pour compléter l'étude de relation structure activité de l'indole **121**, nous avons étudié l'influence du méthyle en position 3 sur le noyau indolique, ainsi que l'influence d'un groupement méthyl sur l'azote du noyau indolique. La synthèse des indoles **149** et **150** (Figure 74) est ainsi présentée.

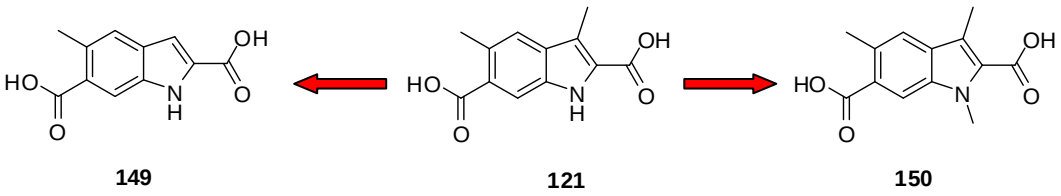


Figure 74 : Influence du méthyle en position 1 et 3

La synthèse du composé **149** est réalisée dans les conditions classiques de formation de l'indole en utilisant de l'acide pyruvique au lieu de l'acide oxo-butyrique utilisée habituellement (Schéma 58).

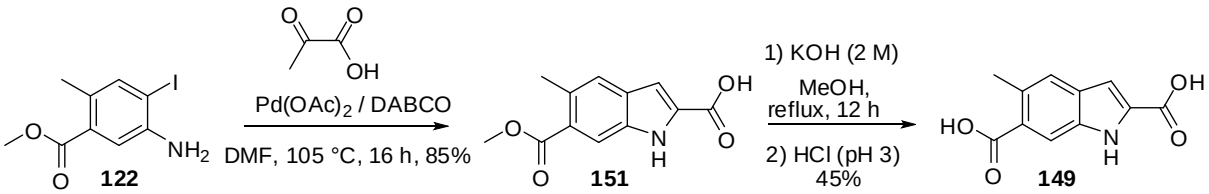


Schéma 58

L'intermédiaire **151** est isolé avec un rendement de 85% et sa structure confirmée par RMN. Nous observons la présence du proton éthylénique H-3 à δ_H 7.07 ppm. Le diacide **149** est ensuite obtenu par saponification avec un rendement de 45%.

Pour la préparation du composé **150**, l'indole **132** précédemment synthétisé est méthylé en présence d'iodure de méthyle pour donner l'intermédiaire **152** avec un rendement de 90%.[54] La RMN ^{1}H confirme la structure par l'apparition de deux singulets à δ_H 3.95 et 3.97 ppm (2 x 3H), correspondant à l'ester méthylique et au méthyle sur l'atome d'azote (Schéma 59). La dernière étape consiste en une saponification qui conduit au diacide **150** avec un rendement quantitatif.

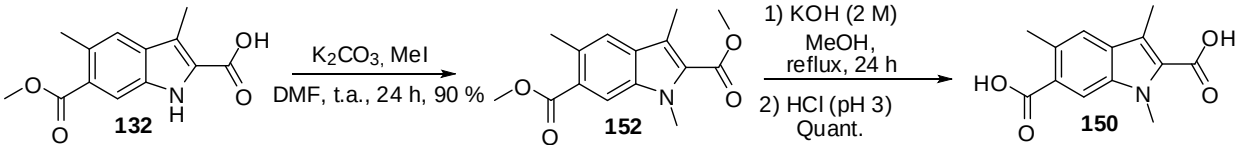


Schéma 59

*1.2.4 Interactions des analogues **149** et **150** avec le domaine PDZ1 de PSD-95*

Les spectres HSQC ($^{1}H/^{15}N$) de la protéine PSD-95 PDZ1 en absence et en présence des composés **149** et **150** ne montrent aucune perturbation des acides aminés du domaine PDZ1 de PSD-95. Nous pouvons donc en conclure que la présence du groupement méthyle en position 3 de l'indole est importante pour une interaction optimale avec le domaine PDZ et que l'hydrogène porté par l'atome d'azote de l'indole est préférable à un méthyle. Nous pouvons supposer soit que cet hydrogène contribue à une liaison hydrogène soit que le méthyle est trop encombrant et gène l'interaction avec la protéine.

Nous avons ainsi conservé l'indole **121** comme molécule « LEAD » pour la suite de notre étude.

1.2.5 Conclusion

Nous pouvons conclure que l'indole **121** présente des meilleures interactions avec le domaine PDZ1 de PSD-95, notamment avec la boucle GLGF, à savoir le site S0, que les autres composés testés. Dans le chapitre 2, nous avions émis l'hypothèse que les biligands avaient certainement besoin d'interagir avec plus d'affinité avec le site S0 pour pouvoir atteindre le site S1. Nous avons alors envisagé de fonctionnaliser l'acide carboxylique en position 2 de l'indole **121** en vue d'étudier l'influence de cette substitution sur les interactions avec la protéine par RMN HSQC ($^{1}H/^{15}N$) et de sonder le site S1.

2 Influence d'un espaceur en C2 sur l'indole 121

2.1 Synthèse des amides 153, 154, 155

Nous avons choisi de substituer l'acide carboxylique en position 2 de l'indole par différents types de substituants (hydrophobe, polaire chargé ou non chargé) en vue de sonder le site S1 de la protéine. Les trois indoles **153**, **154** et **155** (Figure 73) possédant respectivement un amide aliphatique, un amide fonctionnalisé avec un acide carboxylique et une amine sont envisagés. Ils seront préparés à partir de l'acide carboxylique **121** par couplage peptidique.

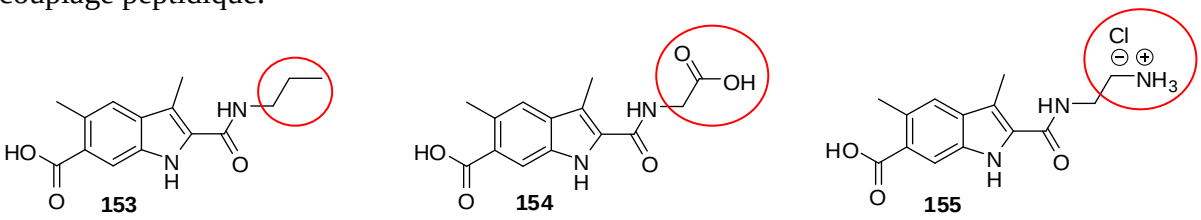


Figure 75 : Encadré en rouge sonde hydrophobe pour 153, polaire (charge négative) pour 154, polaire (charge positive) pour 155

*2.1.1 Synthèse de l'indole **153***

Nous avons choisi de préparer cet indole en vue d'interagir avec des résidus hydrophobes de la protéine, et de sonder l'espace disponible. La présence de l'amide en position 2 de l'indole nous permettra également de conclure quant à l'importance de l'acide carboxylique dans cette position.

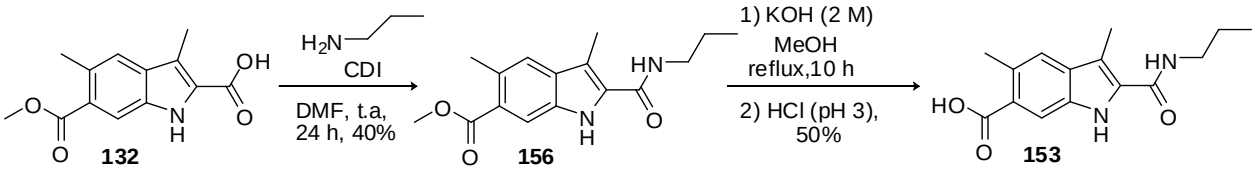


Schéma 60

Le couplage peptidique entre la propylamine et l'acide carboxylique **132** est effectué en présence de CDI pour former l'intermédiaire **156** avec un rendement de 40%.[149] La structure est confirmée par RMN et LC-MS. Cet intermédiaire est engagé dans une étape de saponification en présence de potasse pour donner le composé final **153** avec un rendement de 50% (Schéma 60).

*2.1.2 Synthèse de l'indole **154***

L'ajout de la glycine sur l'indole va permettre d'interagir éventuellement avec des résidus polaires de la protéine.

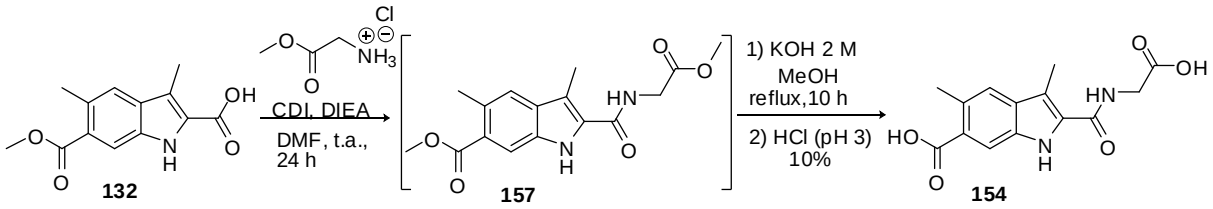


Schéma 61

Un couplage peptidique entre la glycine et l'acide carboxylique **132** est effectué en présence de CDI pour fournir l'intermédiaire **157**.[149] Cet intermédiaire n'est pas isolé et est directement engagé dans l'étape de saponification. Ainsi, l'indole **154** est obtenu avec un rendement de 10% (Schéma 61). Ce faible rendement peut s'expliquer par la formation de l'indole **121** due à l'hydrolyse de l'amide **154**.

*2.1.3 Synthèse de l'indole **155***

Nous avons choisi de substituer l'acide de l'indole avec une amine qui pourrait interagir avec des résidus de la protéine via des liaisons hydrogènes ou ioniques.

L'indole **159** est ainsi préparé par couplage entre l'éthylènediamine monoprotégée et l'acide carboxylique **132** en présence de CDI[149] (Schéma 62) pour conduire à l'intermédiaire **158**, non isolé, directement engagé dans l'étape de déprotection de l'amine en présence de TFA avec un rendement de 61%. L'intermédiaire **159** est ainsi formé et la structure confirmée par RMN. La saponification de ce dernier en présence de potasse génère l'indole **155** avec un rendement quantitatif.

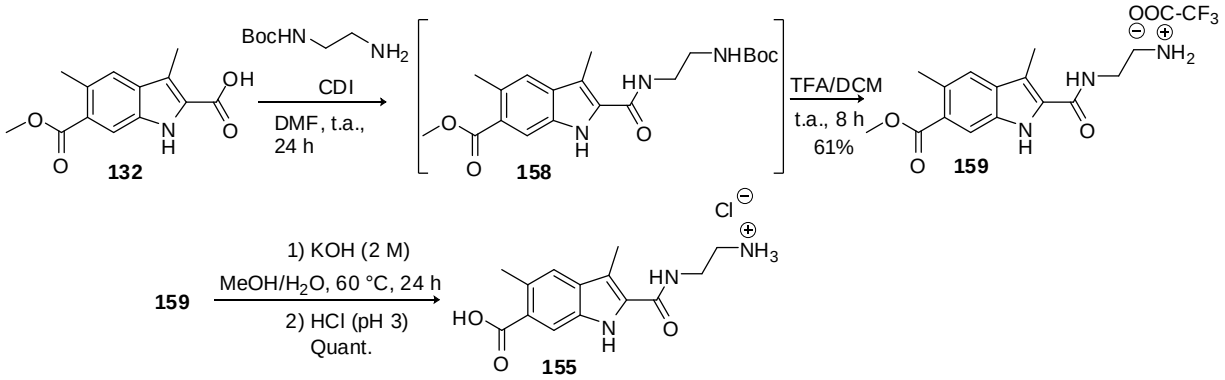


Schéma 62

2.2 Interactions des indoles 153, 154, 155 avec le domaine PDZ1 de PSD-95 par RMN

Trois nouveaux indoles **153**, **154**, **155** (Figure 75) substituées de chaînes latérales de différentes natures ont ainsi été préparés et leurs interactions avec la protéine PSD-95 PDZ1 ont été déterminées par HSQC $^{1}H/^{15}N$.

Aucun des trois indoles ne présente d'interactions significatives avec le domaine PDZ1 de PSD-95. L'introduction de groupements de diverses natures sur l'acide carboxylique n'a pas permis d'améliorer les interactions de l'indole avec le domaine PDZ. Il est probable que ces substituants sont trop encombrants et empêchent ainsi l'indole d'interagir avec le domaine PDZ. Il semblerait aussi que l'acide carboxylique en position 2 soit indispensable à l'interaction de l'indole avec la protéine.

Compte tenu de ces résultats, nous avons poursuivi l'étude de relation structure activité à partir de l'indole **121**, afin de déterminer les substituants donnant les meilleures interactions avec la protéine par modélisation moléculaire.

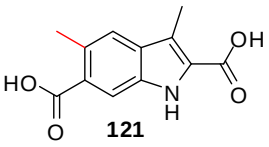
3 Optimisation de l'indole 121 par modélisation moléculaire

3.1 Etude de modélisation moléculaire

Nous avons constaté précédemment que la présence d'un méthyle en position 5 et d'un acide carboxylique en position 6 (indole **121**) avait permis d'améliorer considérablement les interactions avec le domaine PDZ. Nous avons ainsi décidé de modéliser des molécules comprenant des groupements hydrophobes plus encombrants que le méthyle pour sonder la poche hydrophobe du site S0. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec un post-doctorant de notre équipe, le Dr. Hemantkumar Deokar.

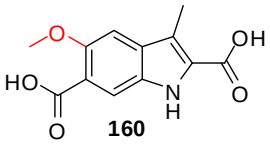
Devant l'échec de la préparation des indoles **139** et **140**, substitués par un groupement éthyle en position 4 ou 5, nous avons choisi de substituer le méthyle en position 5 par des groupements éther (méthoxy, éthoxy, benzyloxy), plus faciles à obtenir à partir du phénol correspondant. Des études de docking sur les molécules envisagées (Figure 76) ont alors été conduites.

La structure de la protéine PSD-95 PDZ1 avec le peptide cypin (PDB 2KA9) est utilisée pour étudier l'influence des groupements hydrophobes sur les interactions avec PSD-95 PDZ1. Ainsi les trois éthers **160**, **161** et **162** (Figure 76) ont été *dockés* de manière rigide dans le site actif de la protéine et un calcul d'énergie d'interactions a été effectué. En effet, l'énergie globale d'interactions de l'éther benzylique est la moins élevée, traduisant une meilleure interaction de la molécule avec le domaine PDZ.



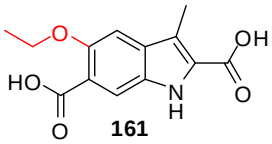
121

E = -7.41 kcal/mol



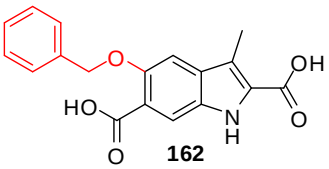
160

E = -7.94 kcal/mol



161

E = -8.06 kcal/mol



162

E = -8.31 kcal/mol

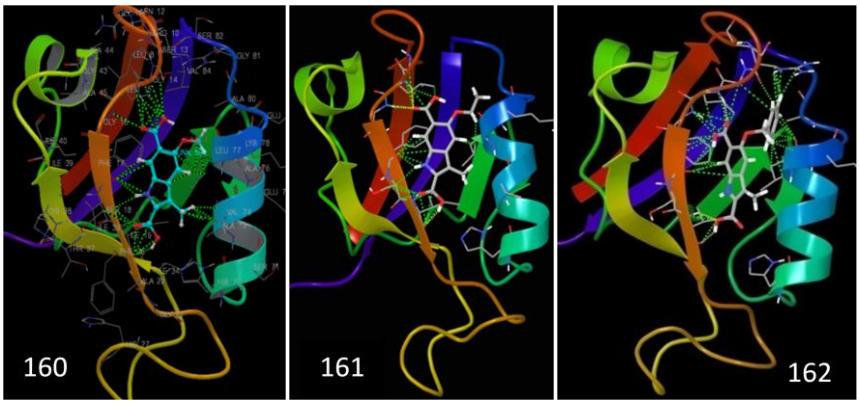


Figure 76 : Modélisation moléculaire des trois éthers avec leurs énergies et leurs poses en 3D.

Nous avons comparé les différentes poses et avons constaté que les interactions hydrophobes avec la protéine augmentent avec la taille de l'éther. La modélisation moléculaire a permis de conforter l'hypothèse qu'un groupement hydrophobe plus encombrant en position 5 serait nécessaire. Afin de valider ces hypothèses de travail, nous avons décidé de synthétiser les trois indoles **160**, **161**, **162** et d'étudier leurs interactions avec la protéine PSD-95 PDZ1.

3.2 **Synthèse des indoles 160, 161 et 162.**

3.2.1 Analyse rétrosynthétique

Les indoles **160-162** (Schéma 63) seront obtenus à partir des anilines iodées correspondantes par réaction avec l'acide oxobutyrique. Celles-ci seront elles-mêmes préparées en trois étapes à partir de l'iodosalicylate **163** commercial.

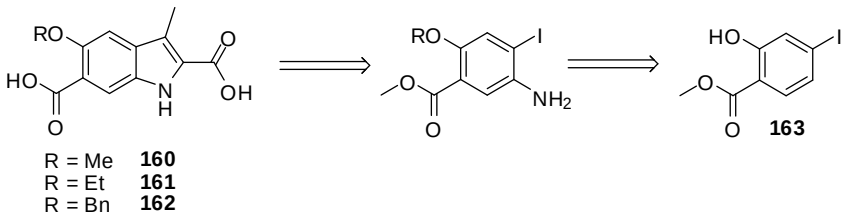


Schéma 63

La stabilité des différents éthers nous a conduits à envisager deux voies de synthèse pour la préparation de nos structures indoliques. En effet, il est décrit que certains éthers aromatiques, et notamment les dérivées benzyloxy, ont une certaine instabilité dans des conditions acides.[159] Nous allons, dans un premier temps, décrire la synthèse des dérivés méthylique et éthylique réalisée dans les mêmes conditions. Nous décrirons dans un second temps la préparation du dérivé benzylique.

*3.2.2 Synthèse de l'indole **160** et **161***

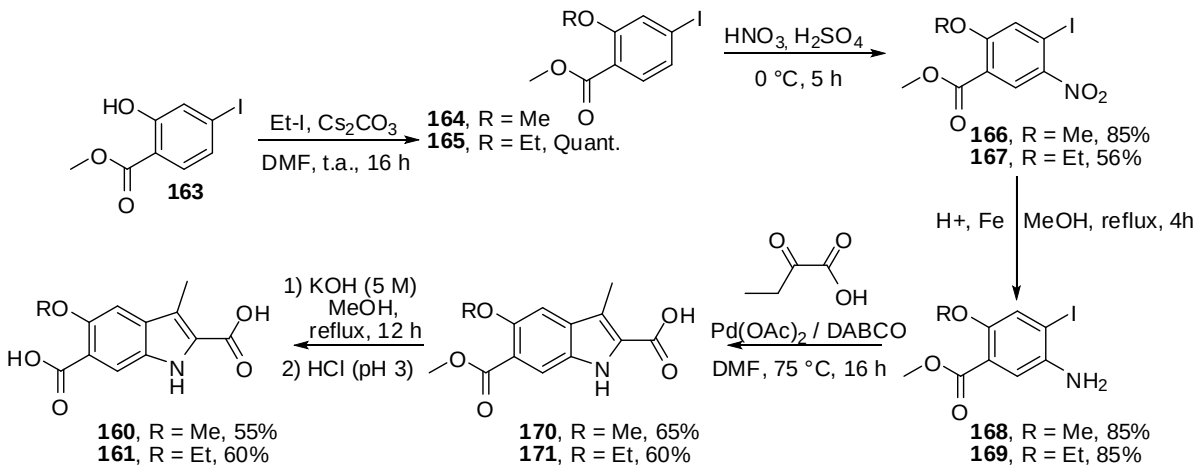


Schéma 64

La première étape consiste en une alkylation de type Williamson de l'iodosalicylate **163** en présence d'iodure d'éthyle et de carbonate de césium (Schéma 64).[160, 161] Le composé **165** est ainsi obtenu avec un rendement quantitatif. Pour la série méthylique, le dérivé **164** étant commercial, il est directement engagé dans l'étape de nitration.

La deuxième étape est une nitration classique par génération d'ions nitronium à partir d'un mélange d'acides sulfurique et nitrique.[162] Les dérivés **166** et **167** sont obtenus avec des rendements de 85% et 56% respectivement. Le rendement plus faible obtenu en série éthylique peut s'expliquer par la dégradation du groupement éther en milieu acide, en effet le méthoxy est beaucoup plus stable que l'éthoxy.

La troisième étape, une réduction du groupement nitro en groupement amine, est réalisée en milieu acide en présence de copeaux de fer conduisant aux deux composés souhaités **168** et **169** avec un rendement de 85%.[163]

L'étape suivante consiste à former le noyau indolique en utilisant les conditions décrites précédemment. Dans le cas des éthers, afin de limiter la formation de produits de décomposition, la cyclisation est réalisée à une température de 75 °C. Nous obtenons ainsi les deux indoles **170** et **171** avec des rendements respectifs de 65% et 60%.

Enfin, une saponification conduit aux deux indoles **160** et **161** avec des rendements respectifs de 55% et 60%.

Les indoles **160** et **161** sont donc préparés respectivement en 4 et 5 étapes avec des rendements globaux de 26% et 17%.

*3.2.3 Synthèse de l'indole **162***

L'instabilité du benzyloxy en milieu acide nous a contraints à réaliser la nitration avant la protection du phénol (Schéma 65). La nitration est réalisée directement sur le composé **163** avec un faible rendement de 30%. En effet, l'isomère 3-nitro se forme également dans un rapport 50/50 (vérifié par RMN : présence de deux doublets entre δ_H 7-8 ppm) et les deux composés sont très difficilement séparables.

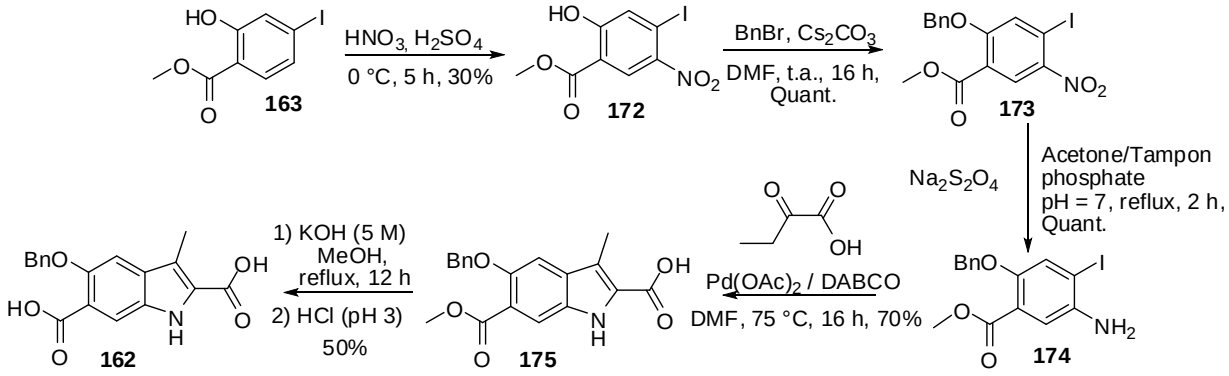


Schéma 65

Une alkylation de type Williamson du phénol **172**, en présence de bromure de benzyle et de carbonate de césium, conduit à l'éther **173** avec un rendement quantitatif. La réduction du groupement nitro n'a pas été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment (Fe/H^+) compte tenu de la faible stabilité du groupement benzyloxy en milieu acide. Nous avons opté pour des conditions plus douces en milieu tamponné (pH 7) en présence de dithionite de sodium.[164] L'iodoaniline **174** souhaitée est ainsi obtenue avec un rendement quantitatif. La formation de l'indole **175** est réalisée de manière classique avec un rendement de 70%. Une saponification conduit au composé final **162** attendu avec un rendement de 50%. L'indole **162** est ainsi obtenu en 5 étapes à partir de l'iodosalicylate **163** avec un rendement global de 10%.

*3.2.4 Synthèse de l'hydroxyindole **178***

A titre comparatif et aussi pour vérifier l'importance de groupements hydrophobes en position 5, nous avons préparé l'indole **178** (Schéma 66).

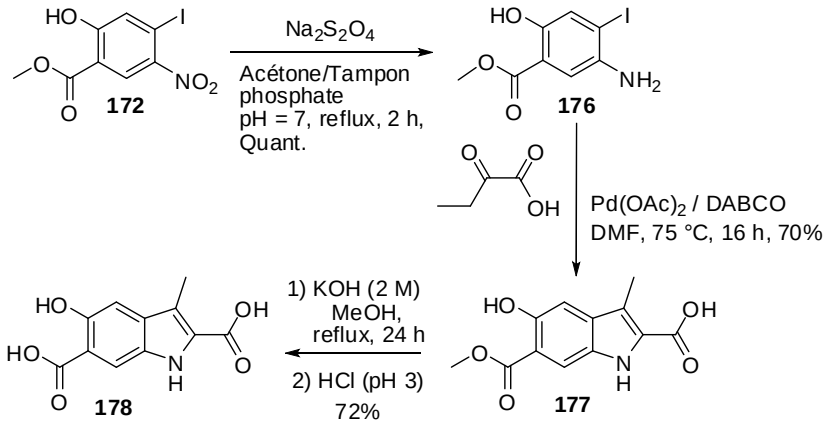


Schéma 66

L'indole **178** est préparé à partir du dérivé nitré **172** décrit précédemment (Schéma 65). Ce dernier est réduit en présence de dithionite de sodium avec un rendement quantitatif. L'hydroxyindole **178** est obtenu par cyclisation en présence d'acide oxobutyrique dans les conditions décrites précédemment, puis saponification avec un rendement de 50% sur les deux étapes (Schéma 66).

L'indole **178** est donc obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 50%.

*3.2.5 Evaluation de l'interaction des indoles **160, 161, 162, 178** avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN*

Les interactions des indoles **160**, **161**, **162, 178** avec le domaine PDZ1 de PSD-95 ont été évaluées par HSQC ($^{1}H/^{15}N$). A partir des quatre spectres, nous avons identifié les acides aminés de la protéine perturbés par l'ajout du ligand. Ces résultats sont répertoriés dans le tableau 6.

Nous avons également quantifié ces perturbations grâce aux HSQC. Pour un acide aminé donné nous avons évalué le shift dû à la présence de l'indole et ainsi attribué arbitrairement si un acide aminé est perturbé fortement (rouge), moyennement (orange) ou faiblement (vert).

A titre d'exemple, pour la phénylalanine 16 (F16) de PSD-95 PDZ1, nous avons présenté sur la Figure 77 l'évolution du déplacement chimique de F16 en fonction des indoles.

Nous avons défini trois degrés de perturbation en fonction des shifts de l'acide aminé F16 avec et sans ligand. Soit l'acide aminé est faiblement perturbé (cas a-c, couleur verte), soit l'acide aminé est moyennement perturbé (case d, orange) soit la présence du ligand perturbe fortement l'aide aminé et le shift est important (case e, rouge).

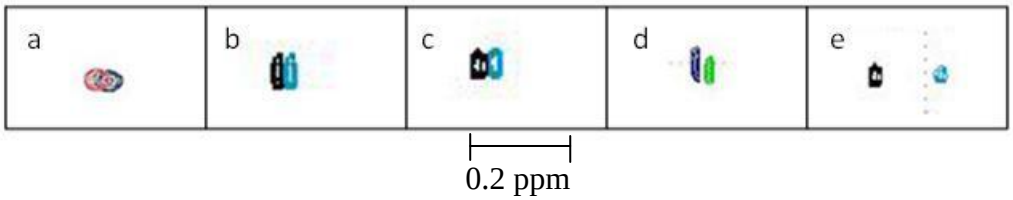


Figure 77 : F16 de PSD-95 PDZ1 avec et sans les indoles a) 121, b) 160, c)161, d) 178 et e) 162 (même échelle)

Après analyse des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$, nous avons répertorié les acides aminés avec le code couleur précédemment décrit dans le Tableau 6.

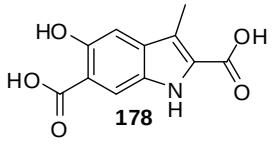
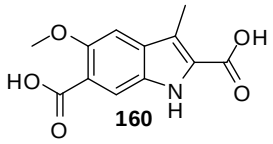
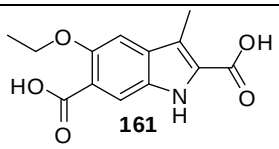
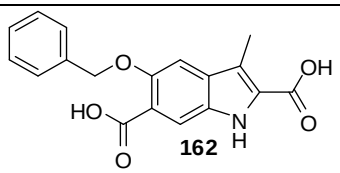
Indoles	Acides aminés perturbés
 **178**	**G15, F16, I18, I27, F34, H69**
 **160**	**G15, F16, N11, S17, I18, I27, F34, H69, V73**
 **161**	**G15, F16, N11, S17, I18, I27, F34, H69, V73**
 **162**	**G10, G15, F16, S17, I18, G20, T22, H69, V73, A79, S82**

Tableau 6 : Récapitulatif des acides aminés perturbés par les indoles 160-162, 178, observés par HSQC $^{1}H/^{15}N$

Il s'avère donc que l'indole **162** interagit assez fortement avec PSD-95 PDZ1 comme nous pouvons le constater par les perturbations importantes de plusieurs signaux des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ (Figure 78).

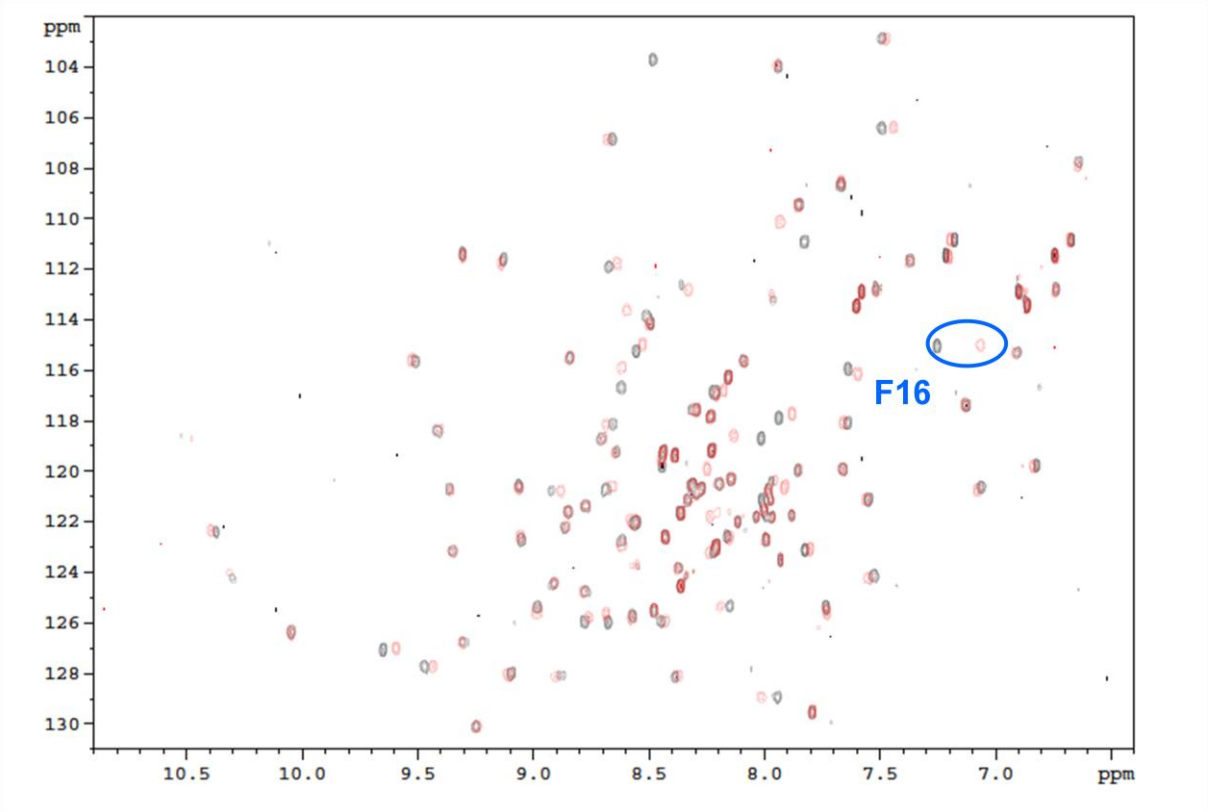


Figure 78 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec 162 = rouge)

L'analyse des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ montre que tous les ligands testés perturbent les acides aminés G15 et F16 de la boucle GLGF. Ils se lient donc au site S0. La capacité à interagir est déterminée par différence entre les déplacements chimiques des acides aminés de la protéine en absence et en présence du ligand. Afin de visualiser le site d'interaction du ligand, nous avons effectué deux représentations 3D de la protéine pour les deux meilleurs indoles **162** et **178** avec la légende couleur déterminée précédemment (Figure 79).

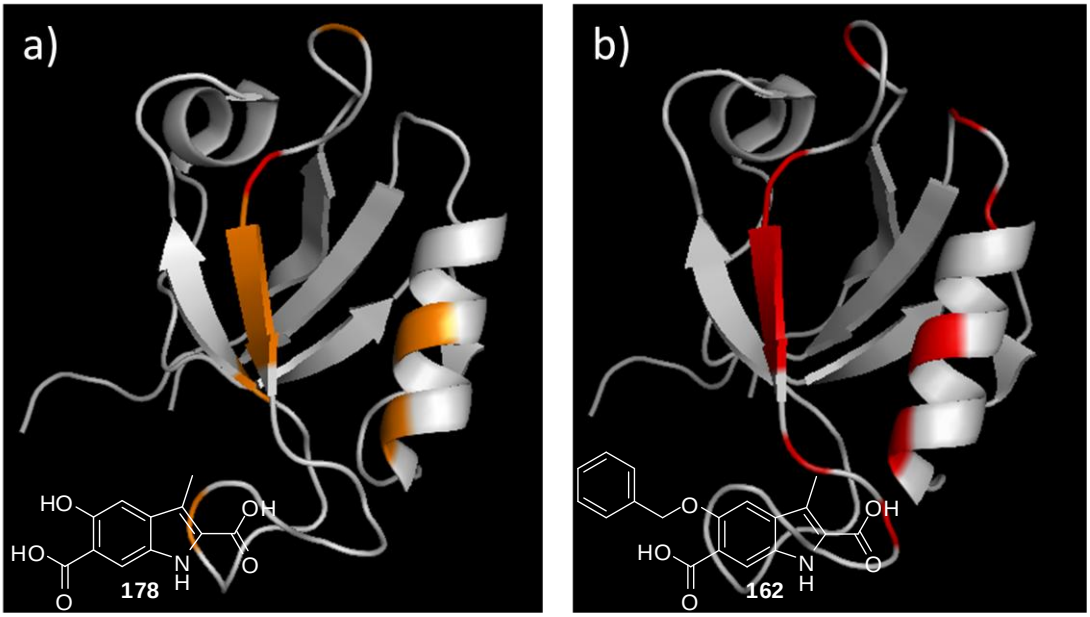


Figure 79 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand 178 a) et du ligand 162 b) avec la protéine PSD-95 PDZ1

Nous constatons que l'indole qui se lie le plus fortement à la protéine et dans le site S0 est l'indole **162** possédant un groupement benzyloxy sur le cycle aromatique. Les deux indoles **160** et **161** se lient plus faiblement. Quant à l'indole **178**, ne possédant pas de groupement hydrophobe sur le cycle aromatique, il perturbe moins d'acides aminés que l'indole **178**. Ces résultats confirment l'hypothèse que la présence d'un groupement hydrophobe en position 5 est préférable pour que celui-ci se lie au site S0.

Ayant validé l'interaction des indoles avec le domaine PDZ1 de PSD-95 par RMN, nous avons ensuite évalué leur capacité à entrer en compétition avec le ligand naturel 5-HT_{2A} par chromatographie d'affinité.

*3.2.6 Impact des molécules **160-162, 178** sur l'interaction entre le C-terminal de 5-HT_{2A} et PDZ1 de PSD-95*

L'impact des molécules à interagir *in vitro* sur l'interaction 5-HT_{2A}/PDZ1 PSD-95 a été évalué à l'aide du domaine PDZ préparée pour l'évaluation RMN et non sur les extraits de cerveau de souris. En effet, ceux-ci contiennent plusieurs protéines à domaine PDZ rendant l'interaction encore plus compétitive, ce qui complique l'interprétation des résultats.

L'évaluation a été conduite comme précédemment (Chapitre 2 §3.1) mais avec une incubation supplémentaire de 40 min. des ligands à trois concentrations (30, 100, 300 µM) avec PSD-95 PDZ1 ($1{,}8.10^{-3}$ µM), puis ajout du ligand endogène 5-HT_{2A} ($1{,}4.10^{-2}$ µM). Les gels sont révélés directement après électrophorèse et sont représentés sur la Figure 80.

Pour les trois ligands **160, 161** et **178**, on observe que la quantité de protéine diminue quand la concentration augmente, ce qui signifie que les indoles inhibent l'interaction entre le domaine PDZ et le C-terminal du peptide 5-HT_{2A}.

Ces trois gels confirment les résultats obtenus par RMN, à savoir que les indoles **160** et **161** se lient au domaine PDZ1 de PSD-95 et inhibent l'interaction avec 5-HT_{2A}. Quant à l'hydroxyindole **178**, nous constatons une inhibition à partir de 300 µM.

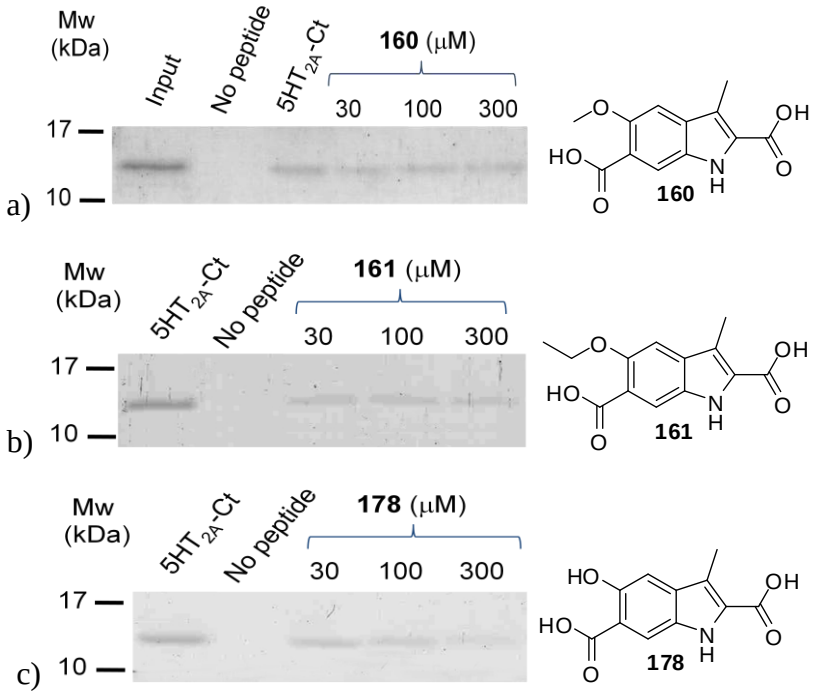


Figure 80 : Gels de chromatographie d'affinité à différentes concentrations de a) 160, b) 161 et c) 178

Pour la molécule **162**, nous avons diminué les concentrations (30-100µM), nous observons une inhibition pour une concentration de 100 µM (Figure 81).



Figure 81 : Gel de chromatographie d'affinité de 162 à 100 et 30 µM

Nous avons ainsi démontré que la présence d'un groupement hydrophobe et encombrant tel que le benzyloxy en position 5 améliore l'interaction du ligand avec la protéine en se liant favorablement à la boucle GLGF et inhibe ainsi l'interaction entre PDZ1 de PSD-95 et le C-terminale du récepteur 5-HT_{2A}.

4 Influence d'un espaceur en C2 sur 162

Ayant optimisé l'indole **121** avec l'indole **162** pour son interaction avec le site S0, nous allons l'utiliser pour sonder le site S1 en substituant l'acide carboxylique en position 2, puis l'azote du cycle indolique.

4.1 Analogue substitué en position 2

4.1.1 Synthèse

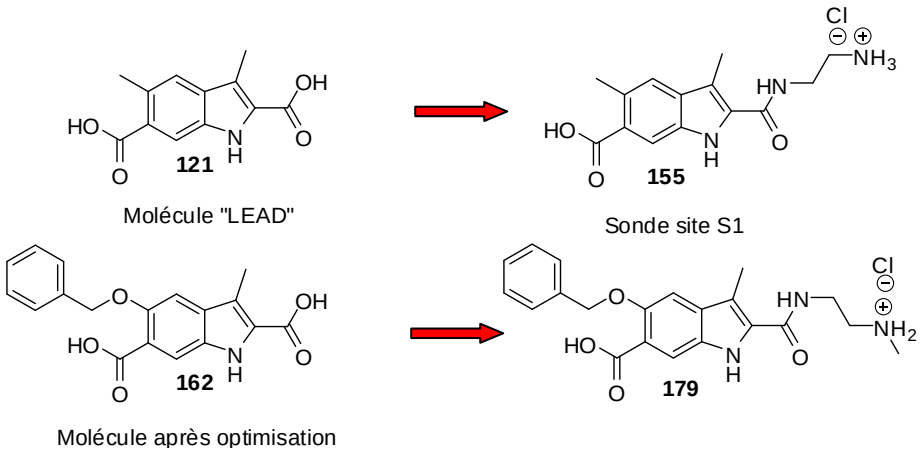


Schéma 67

Précédemment nous avons déjà couplé une diamine sur l'indole **121** pour obtenir l'indole **155** mais cet analogue n'interagissait pas avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 (Schéma 67). Deux hypothèses ont été émises : soit l'indole **121** n'interagissait pas assez fortement avec la protéine, soit une gêne stérique trop importante résulte de la substitution de l'acide. Pour valider une des deux hypothèses, nous allons synthétiser le composé **179**.

Nous avons choisi la *N*-méthyléthylènediamine plutôt qu'une diamine Boc pour faciliter le couplage en s'affranchissant de l'étape de déprotection de l'amine primaire.

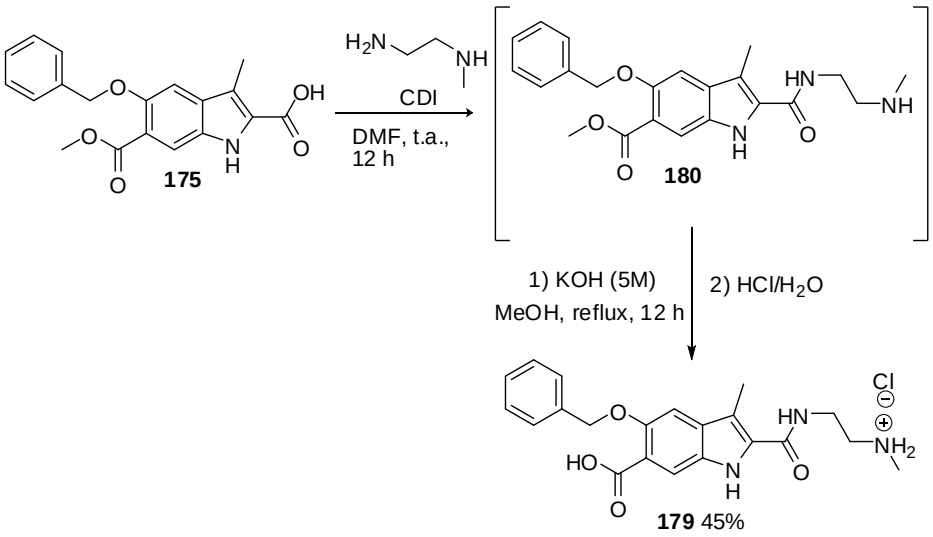


Schéma 68

L'acide **175** est engagé dans une étape de couplage peptique en présence de CDI et de *N*-méthyléthylènediamine pour former l'intermédiaire **180**, directement converti dans une étape de saponification pour conduire au composé final **179** avec un rendement global de 45% (Schéma 68).

*4.1.2 Evaluation de l'interaction de l'indole **179** avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN*

Les interactions de l'indole **179** avec le domaine PDZ1 de PSD-95 ont été évaluées par HSQC ($^{1}H/^{15}N$). Les acides aminés perturbés sont donnés, avec le code couleur précédemment établi, (Chapitre 3 § 3.2.5) dans le Tableau 7.

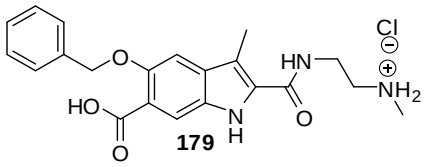
Indoles	Acides aminés perturbés
	**F16, H69**

Tableau 7 : Récapitulatif des acides aminés perturbés par l'indole 179, observés par HSQC $^{1}H/^{15}N$

D'après la superposition des deux spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 avec et sans ligand **179** (Figure 82), seul F16 présente un shift intéressant (intensité = orange) et H69 (intensité = vert) (Tableau 7).

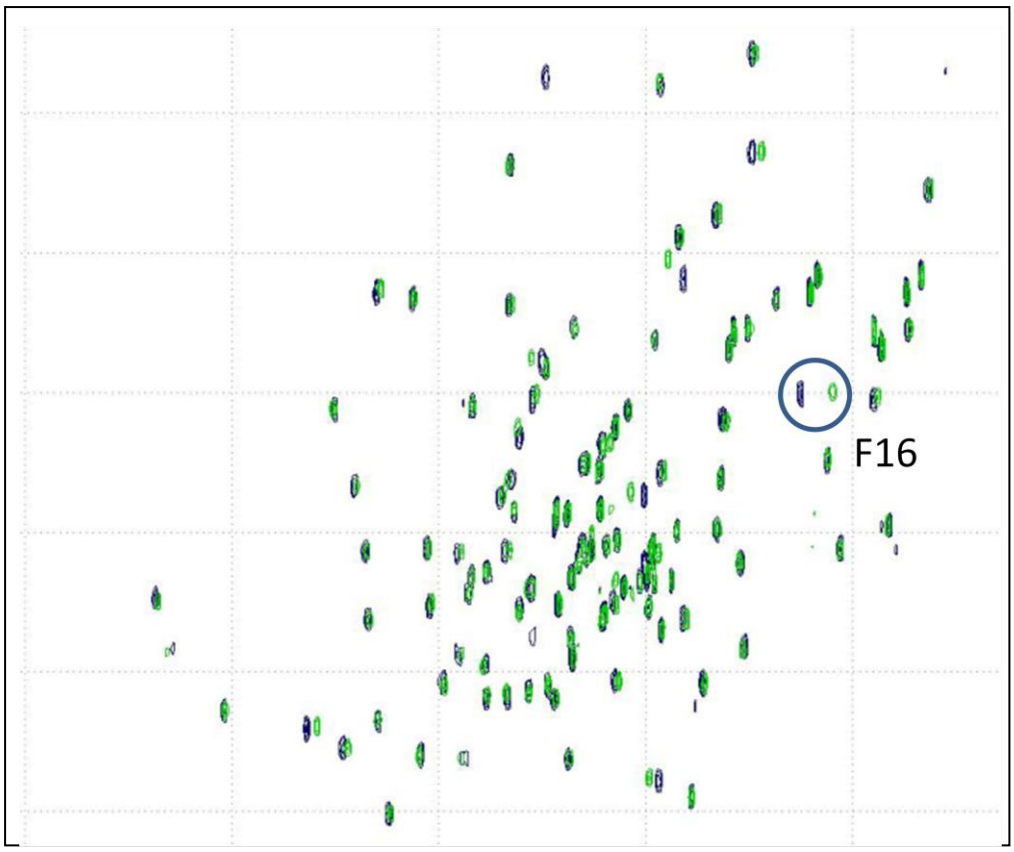


Figure 82 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec 179 = vert)

Ainsi, nous constatons sur la représentation 3D (Figure 83) que le ligand **179** interagit très faiblement avec la protéine, confirmant l'hypothèse que l'ajout de groupements sur l'acide en position 2 diminue l'interaction du ligand avec la protéine. Plusieurs raisons peuvent être avancées : l'acide carboxylique en position 2 est important car il est impliqué dans une interaction cruciale avec la protéine et/ou la chaîne est encombrante et empêche le ligand d'interagir avec la protéine.

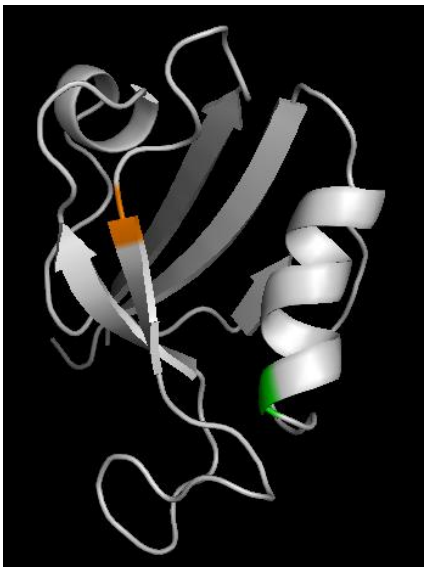


Figure 83 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand 179 avec la protéine PSD-95 PDZ1

*4.1.3 Impact de la molécule **179** sur l'interaction entre le C-terminal de 5-HT$_{2A}$ et PDZ1 de PSD-95*

L'évaluation a été conduite comme précédemment (§ 3.2.6). On observe une très légère compétition à 300 µM du ligand **179** suggérant une faible inhibition de l'interaction 5-HT$_{2A}$/PSD-95 PDZ1 (Figure 84).

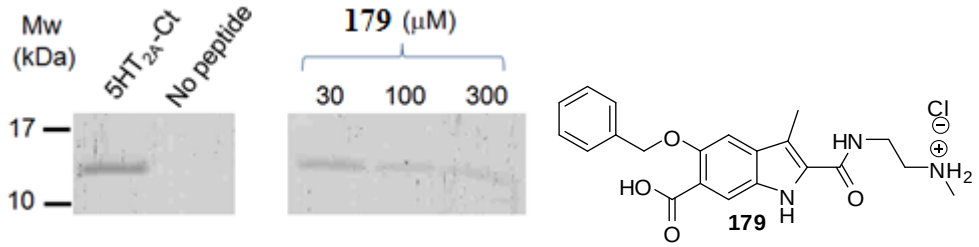


Figure 84 : Gel de chromatographie d'affinité de 179.

La substitution de l'acide carboxylique en position 2 n'étant pas optimale, nous avons envisagé de substituer l'azote N-1 de l'indole pour former nos biligands.

4.2 Analogue substitué sur l'azote N-1 de l'indole

4.2.1 Synthèse

L'étude de relation structure activité se poursuit en vue d'obtenir le meilleur ligand possible pour inhiber l'interaction PSD-95/5-HT$_{2A}$. Nous envisageons de substituer l'azote du noyau indolique par des groupements ayant des extrémités polaires. Nous avions précédemment déjà substitué l'azote du cycle indolique avec un groupement apolaire (indole **150**) sans apporter d'amélioration à l'interaction avec la protéine.

Nous avons choisi de réaliser la substitution de N-1 avec trois substituants R (Schéma 69), deux ayant pour extrémité un ester mais une chaîne carboné de taille différente qui conduiront aux acides carboxyliques ; et le dernier substitué par un alcool. La comparaison des trois composés **184-186** nous permettra de déterminer si l'ajout d'un groupement sur l'azote améliore les interactions avec la protéine et la nature de la fonction optimale.

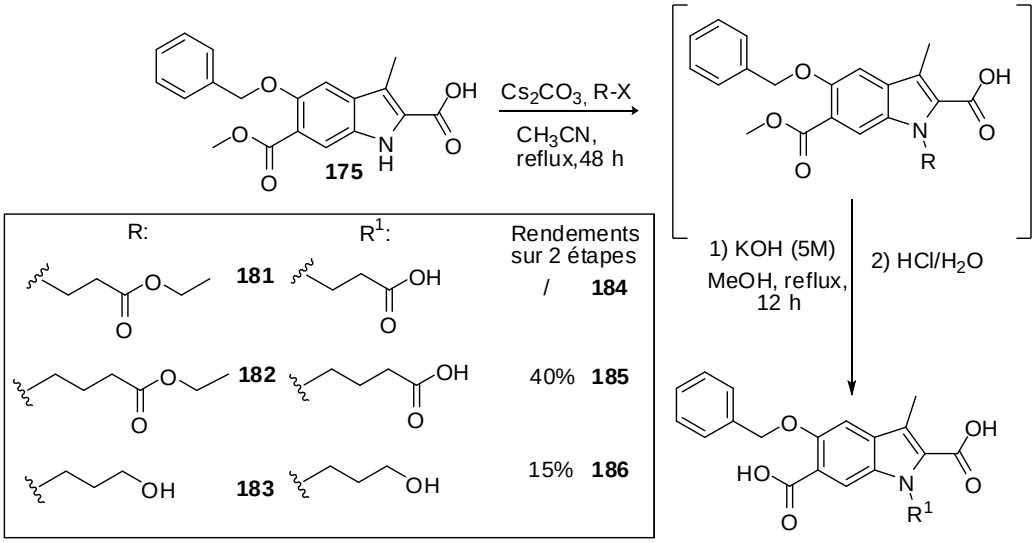


Schéma 69

A partir de l'indole **175** nous avons réalisé une première étape de *N*-alkylation sur le noyau indolique, en milieu basique, en présence de carbonate de césium et du dérivé halogèné R-X. Les composés **181-183**, obtenus lors de cette étape, sont directement engagés dans la réaction de saponification. En effet, quelque soit le dérivé halogèné utilisé, nous n'avons malheureusement jamais pu isoler les intermédiaires **181-183** purs. Ceux-ci sont toujours présents en mélange avec l'excès d'halogénure et l'indole de départ. Après saponification, nous obtenons les composés **185** et **186** avec des rendements globaux respectifs de 40 et 25%. Pour le composé **184**, nous n'avons pas réussi à *N*-alkyler totalement le noyau indolique, et nous n'avons pas réussi, que se soit après l'alkylation ou la saponification, à isoler séparément le composé *N*-H et *N*-alkylé (Schéma 69).

*4.2.2 Evaluation de l'interaction des indoles **185** et **186** avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN*

Les deux composés **185** et **186** sont évalués par HSQC $^{1}H/^{15}N$.

L'alcool **186** ne perturbe pas les acides aminés des spectres HSQC.$^{1}H/^{15}N$ de la protéine, signifiant que cet analogue n'interagit pas avec celle-ci.

Le triacide **185**, quant à lui, perturbe significativement des acides aminés des spectres HSQC.$^{1}H/^{15}N$ de la protéine (Figure 85). Nous constatons le déplacement d'au moins 13 signaux correspondant aux acides aminés cités au Tableau 8.

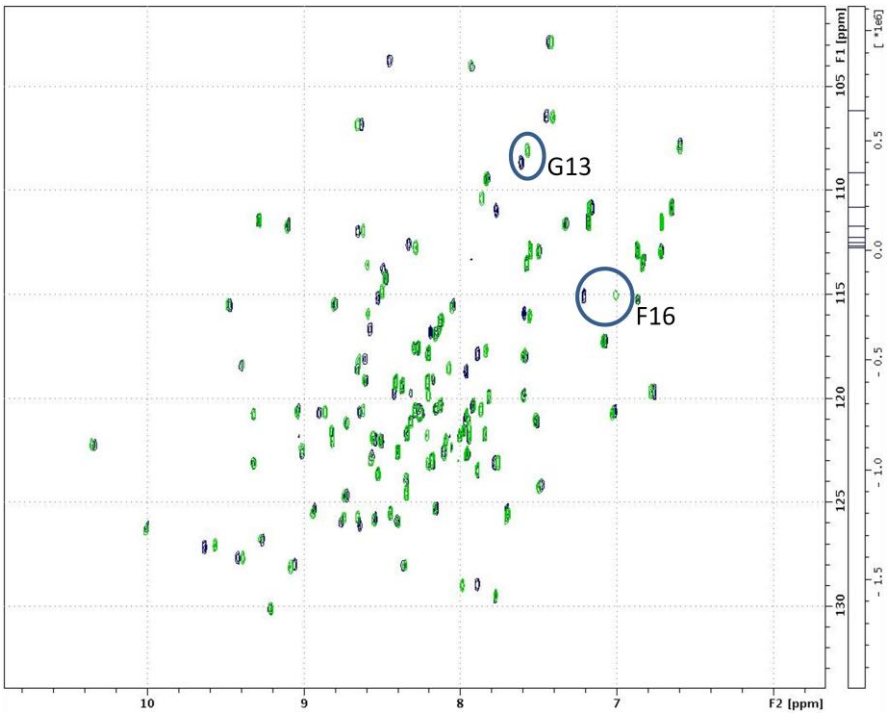


Figure 85 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = bleu, avec 185 = vert).

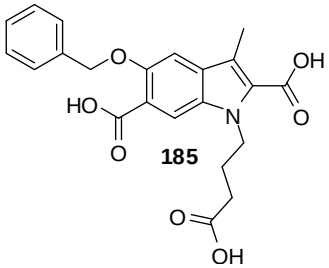
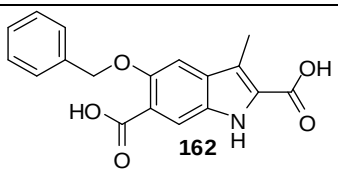
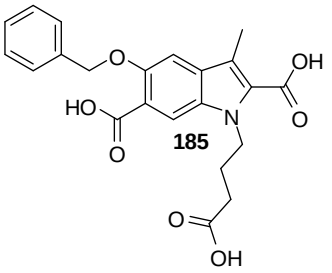
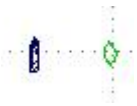
Indoles	Acides aminés perturbés
 **185**	**G10, G13, G15, F16, I18, G20, T22, G41, G42, G48,A45, V73, S82**

Tableau 8 : Récapitulatif des acides aminés perturbés par l'indole 185, observés par HSQC $^{1}H/^{15}N$

A ce stade, nous avons comparé les spectres HSQC.$^{1}H/^{15}N$ de **185** et de **162**. Nous constatons que le nombre d'acides aminés perturbés est plus important avec l'indole **185** qu'avec l'indole **162**, les déplacements des signaux de F16 et G13 de la boucle GLGF sont particulièrement affectés (Tableau 9).

Indoles	F16	G13
		
		

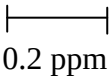


Tableau 9 : Perturbation des shifts pour F16 et G13 de PSD-95 PDZ1 en présence des indoles 162 et 185 (même échelle).

Grâce aux représentations 3D (Figure 86), nous constatons qu'un nombre important d'acides aminés est affecté par l'interaction de l'indole 185 avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95.

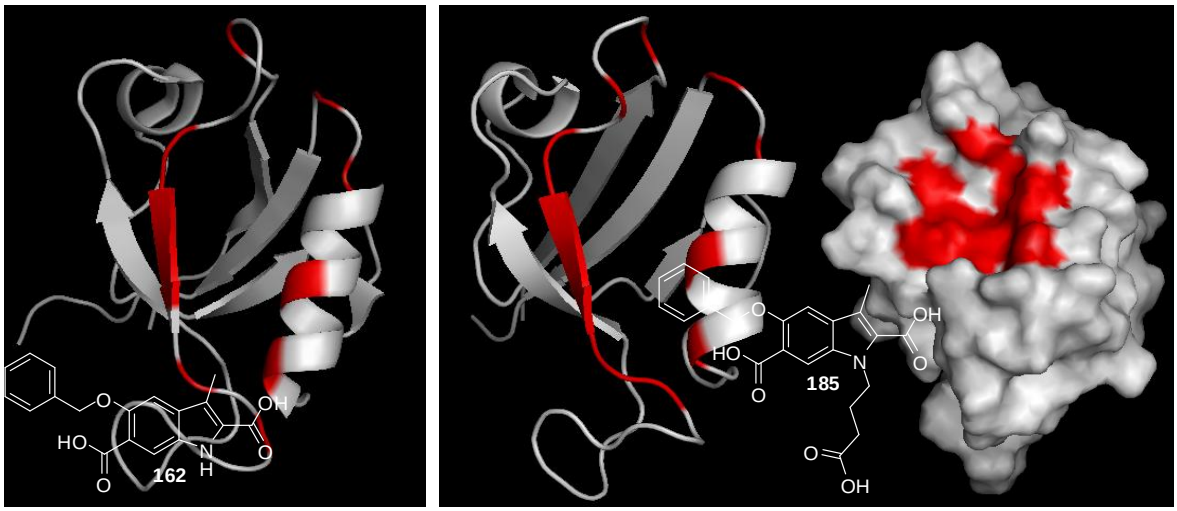


Figure 86 : Représentation 3D des acides aminés perturbés par l'interaction du ligand 162 et 185 avec la protéine PSD-95 PDZ1

*4.2.3 Impact de la molécule **185** sur l'interaction entre le C-terminal de 5-HT$_{2A}$ et PDZ1 de PSD-95*

L'évaluation a été conduite comme précédemment (§ 3.2.6). On observe qu'une concentration de 100 µM de ligand **185** est nécessaire pour inhiber l'interaction 5-HT$_{2A}$/PSD-95 PDZ1 (Figure 87).

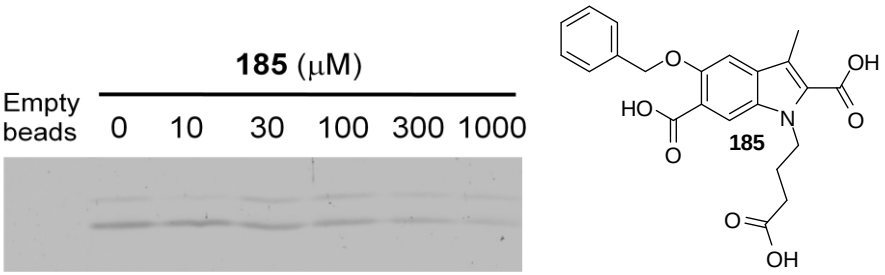


Figure 87 : Gel de chromatographie d'affinité de 185.

En conclusion, l'indole **185**, présente une bonne affinité comme ligand du domaine PDZ1 de PSD-95 et est capable d'inhiber l'interaction entre 5-HT$_{2A}$ et le domaine PDZ.

5 Optimisation de l'indole 185

L'indole **185** présente la meilleure affinité avec le domaine PDZ1 de PSD-95. La position 5 est substituée par un groupement benzyloxy et l'azote par une chaîne carbonée substituée par un acide carboxylique terminal. Nous envisageons maintenant de substituer la position 5 par un groupement hydrophobe plus encombrant qu'un éthyle, ne pouvant pas réaliser de π-stacking comme le groupement phényl (§ Chapitre 3 3.2.5), nous avons choisi le groupement cyclopentyle.

5.1 Synthèse

Le composé **185** subit une hydrogénation catalytique en présence d'hydroxyde de palladium sous atmosphère d'hydrogène et conduit au phénol souhaité **187** avec un rendement quantitatif (Schéma 70).

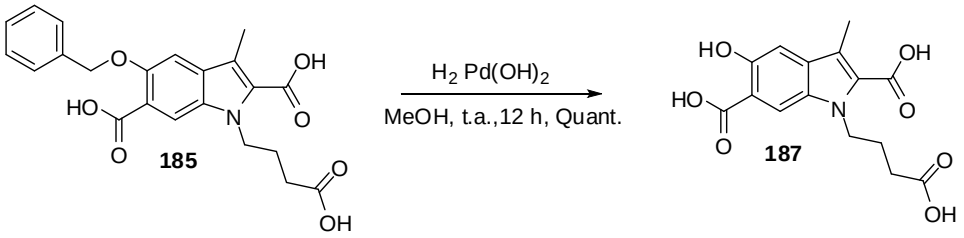


Schéma 70

Le cyclopentyloxy **188** est obtenu par alkylation du phénol **187**, en présence d'iodocyclopentane avec un rendement moyen de 60% (Schéma 71).

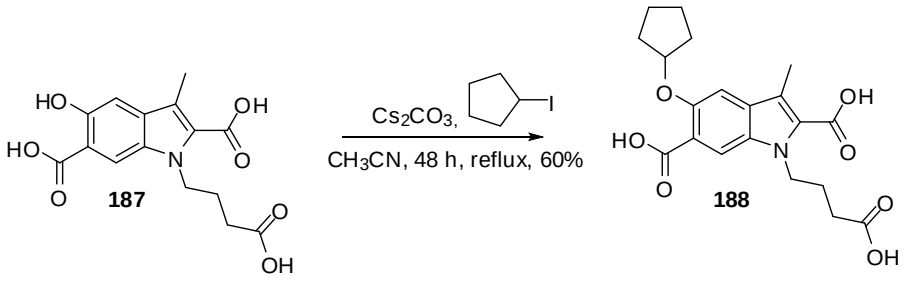


Schéma 71

5.2 Evaluation de l'interaction des indoles 187 et 188 avec la protéine PSD-95 PDZ1 par RMN

L'indole **188** (Figure 88) déplace les mêmes acides aminés que son analogue **185** mais moins intensément. Par exemple, le G13 de la boucle GLGF n'est presque pas perturbé par **188** alors qu'il l'était par **185** (Tableau 10). Nous pouvons donc conclure que le groupement benzyle présente le caractère hydrophobe le plus approprié pour interagir avec le domaine PDZ1 de PSD-95. La flexibilité et/ou la géométrie plane du benzyle serait plus favorable que la conformation du cyclopentyle.

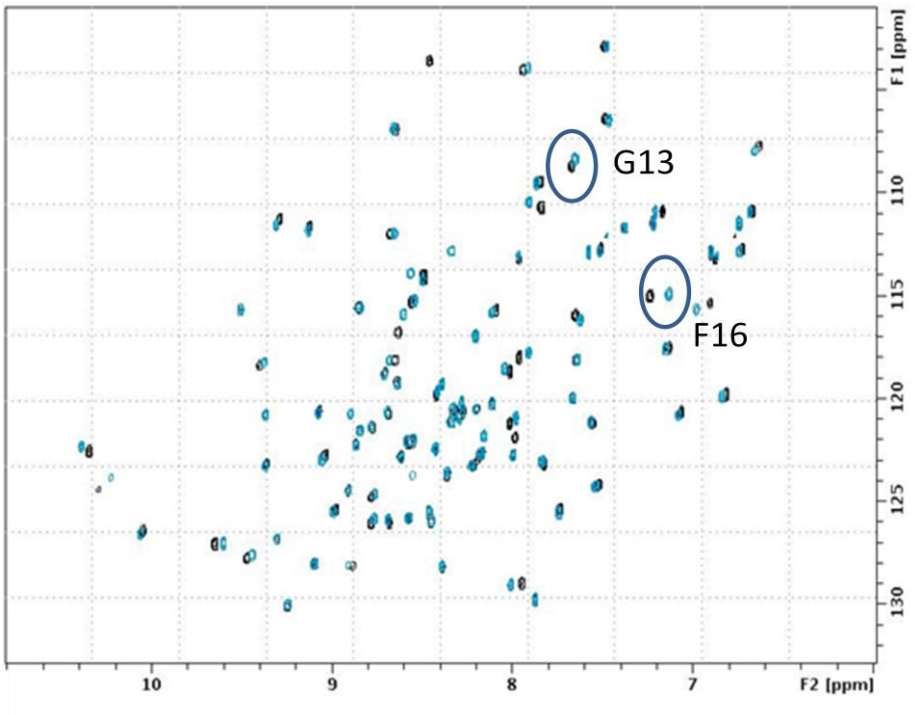


Figure 88 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul = noir, avec 188 = bleu)

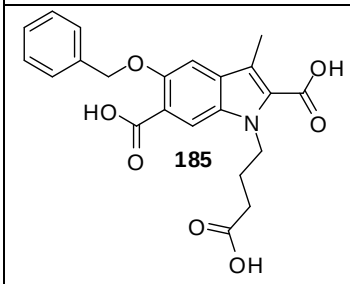
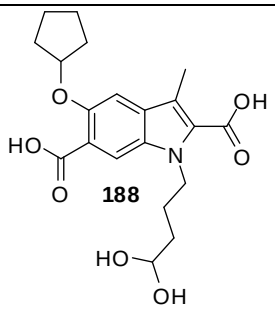
Indoles	G13
	
	

Tableau 10 : Différence de shift pour G13 de PSD-95 PDZ1 des indoles 185 et 188 (même échelle).

L'intermédiaire **187** a également été testé par HSQC $^{1}H/^{15}N$ (Figure 89), et il s'avère être un bon ligand à en juger par la perturbation de G15 et F16. Cependant il est difficile d'identifier les interactions à partir de ces spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ car tous les acides aminés sont perturbés. Des tests complémentaires devront être conduits sur ce composé **187**.

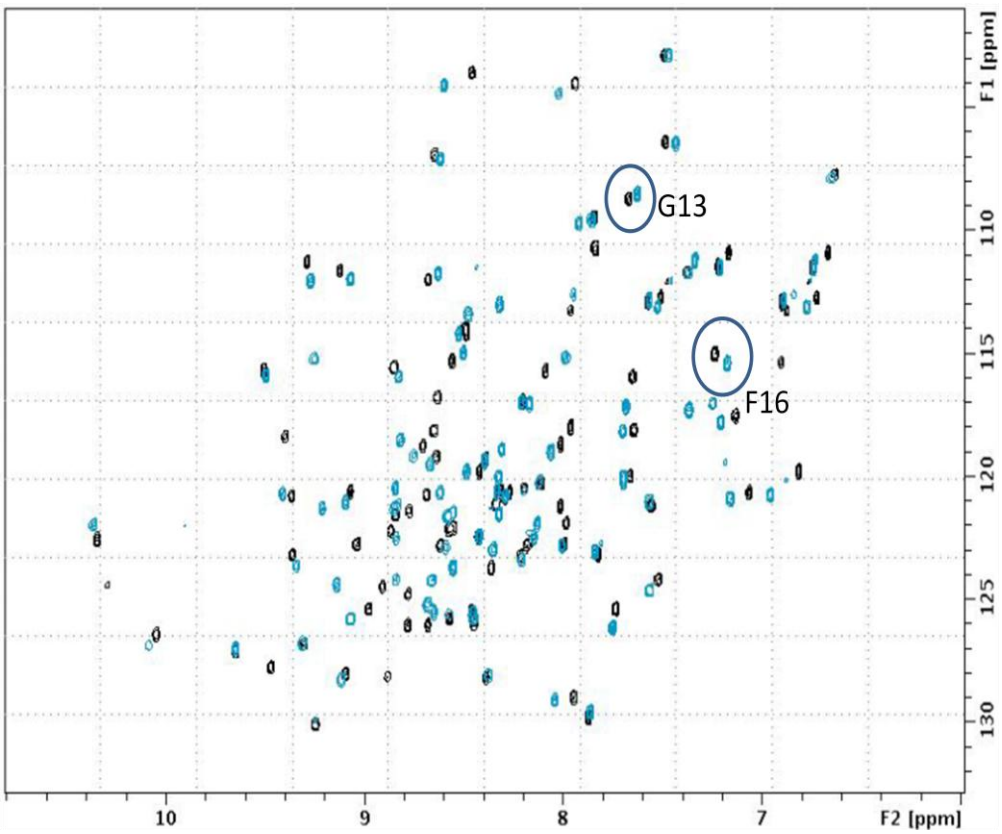


Figure 89 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD-95 PDZ1 (seul= noir, avec 187 = bleu)

Nous nous sommes donc posés la question du rôle du groupement benzyle dans l'interaction du ligand **185** avec le domaine PDZ. En effet, le benzyloxy en position 5 du ligand **185** est stériquement encombrant et hydrophobe alors que l'hydroxyle en position 5 du ligand **187** est petit et polaire, toutefois tous deux parviennent à interagir avec des affinités équivalentes avec le domaine PDZ1 de PSD-95(d'après les spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$). Ceci est assez contradictoire et laisse à supposer que ces deux molécules présentent sans doute une orientation et des interactions différentes avec le site actif.

6 Structure NOESY

Une analyse structurale par RMN NOESY inter et intra-moléculaires a donc été réalisé, sur les composés **185** et **187**.

Ces structures RMN nous permettront de comprendre comment ces ligands interagissent avec la protéine.

6.1 Introduction

Pour déterminer la structure 3D d'un complexe protéine/ligand deux types de distances sont nécessaires :

- Les distances entre les protons du ligand (NOESY intramoléculaire) : cela permet d'obtenir sa géométrie spatiale.
- Les distances entre les protons du ligand et ceux de la protéine (NOESY intermoléculaire) : cela permet de localiser le ligand par rapport à la protéine.

Ces deux séries de distances sont obtenues par NOE (cf Annexe) avec un filtre $^{13}C/^{15}N$ qui peut être enregistré en 2D ou 3D. Ce type d'expérience requiert que la protéine soit marquée en ^{15}N et ^{13}C pour faciliter l'interprétation des données. En utilisant cette méthode, les seuls signaux détectés sont ceux des protons du ligand, qui n'est pas marqué, ainsi que les corrélations entre ces protons. Si un proton de la protéine marquée se trouve à moins de 6 Å d'un proton du ligand, alors un effet NOE est observé. L'avantage d'utiliser cette technique est qu'en une seule expérience, il est possible d'obtenir simultanément les distances intramoléculaires du ligand et les distances intermoléculaires entre la protéine et le ligand. Ces deux séries de distances vont permettre par modélisation moléculaire de déterminer la structure du complexe.[165]

6.2 Structure RMN des complexes 185 et 187 /PSD-95 PDZ1

La structure du complexe PDZ/ligand **185** est présentée Figure 90.

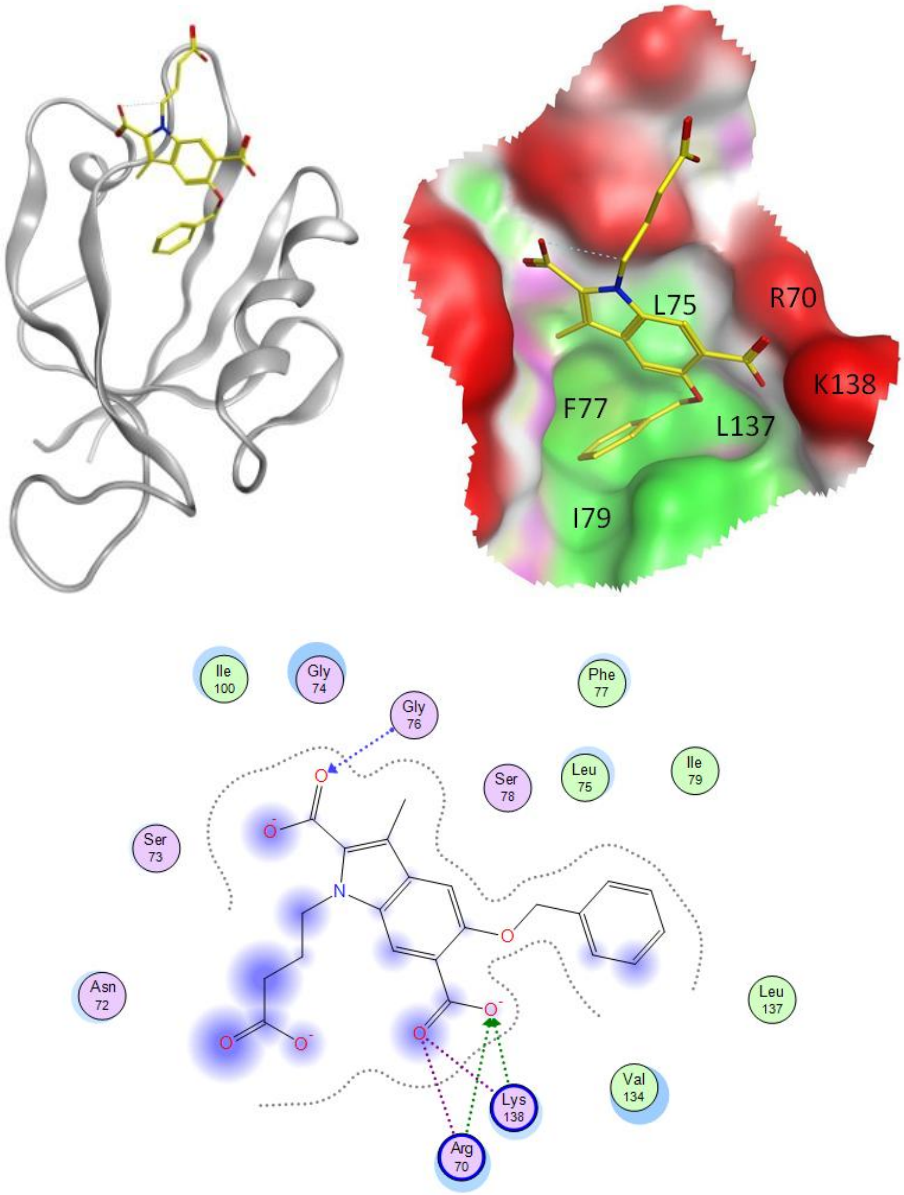


Figure 90 : Structure RMN du complexe 185/PSD-95 PDZ1 montrant les interactions du ligand avec le domaine PDZ (sur la surface, rose = résidus polaires, vert = hydrophobes, rouge = exposés)

Nous constatons que l'orientation du ligand **185** dans le site de la protéine n'est pas celle qui avait été prédite par le *docking*. En effet, l'indole se fixe en haut de la poche hydrophobe du domaine 1 de PSD95, le cycle benzylique occupe une poche hydrophobe formée par les chaînes latérales des acides aminés L15/Leu75, F17/Phe77, I19/Ile79 et L77/Leu137. L'acide carboxylique en position 2 est impliqué dans une liaison hydrogène avec la glycine 16 de la boucle GLGF, quant à l'acide en position 6 il présente des interactions avec les acides aminés R10/Arg70 et K78/Lys138 (Figure 90). La chaîne présente sur l'azote n'est pas orientée vers le site S1 mais vers une boucle située entre les feuillets β1 et β2.

La structure du complexe PDZ/ligand **187** est présenté Figure 91.

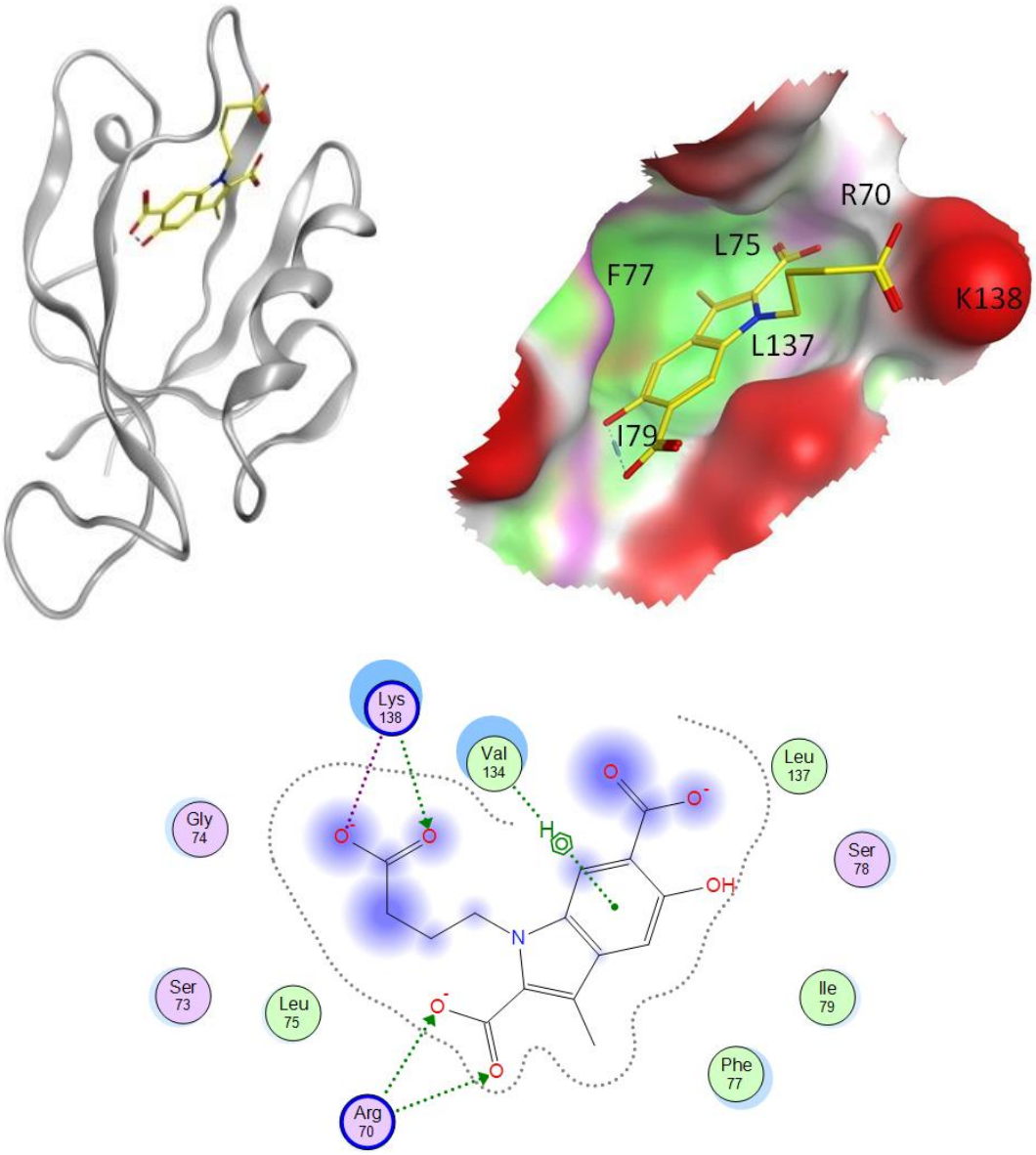


Figure 91 : Structure RMN du complexe 185/PSD-95 PDZ1 montrant les interactions du ligand avec le domaine PDZ (sur la surface, rose = résidus polaires, vert = hydrophobes, rouge = exposés)

Pour le ligand **187**, ne comportant pas de groupement benzyloxy, l'orientation est différente de celle de l'indole **185**. En effet, le méthyle du cycle indolique s'oriente dans une poche hydrophobe formée par les chaînes latérales des acides aminés L15/Leu75, F17/Phe77, L77/Leu137. Les trois acides carboxyliques forment des interactions avec la protéine. L'acide en position 2 est impliqué dans une interaction avec R10/Arg70, l'acide de la chaîne en N-1 présente une interaction avec l'acide aminé K78/Lys138. Quant à l'acide en position 6 il semble former une liaison hydrogène intramoléculaire avec l'hydroxyle en position 5, il présente également une interaction avec Il9/Ile79. Cette orientation pourra permettre de sonder le site S1 par fonctionnalisation de l'acide carboxylique en position 6.

7 Résultats de sélectivité

Nous avons ensuite souhaité étudier la sélectivité de nos ligands envers d'autres domaines PDZ.

Nos collaborateurs de Liverpool disposant de trois autres domaines PDZ, l'un de la même protéine PSD-95 mais PDZ2 et les deux autres de la protéine à domaine PDZ SAP-97 PDZ1 et 2 (Classe I), nous avons alignés les séquences des 4 protéines afin de les comparer (Figure 92).

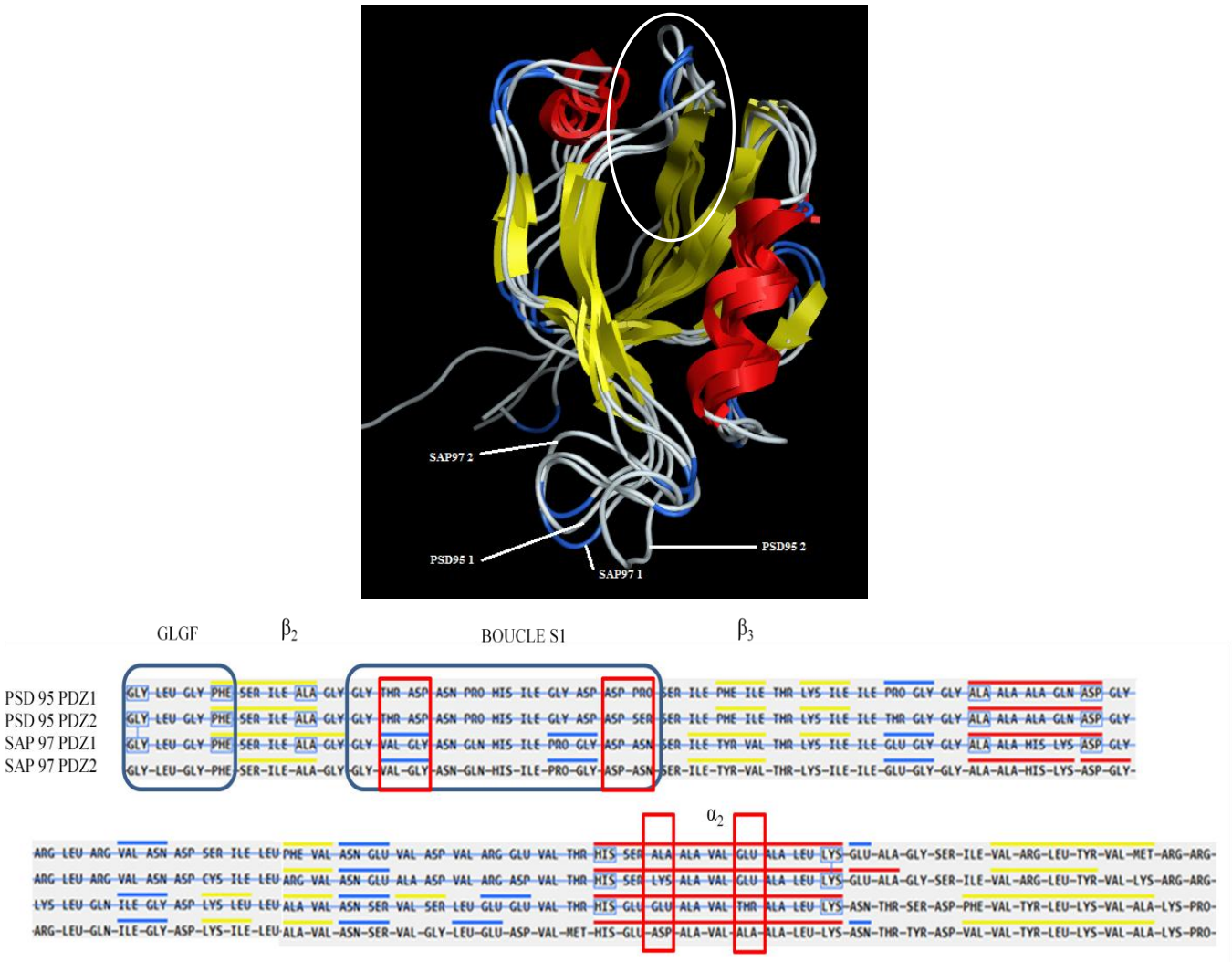


Figure 92 : Superposition 3D de PSD-95 1 et 2 (2KA9)/ SAP-97 1 (1ZOK)/ SAP-97 2 (2AWU) et alignement FASTA.

Nous constatons que ces quatre domaines présentent quelques différences notamment au niveau de la boucle S1 (Figure 92). Si ces 4 protéines ont une boucle S1 de longueur équivalente, les acides aminés qui les composent diffèrent entre PSD-95 et SAP-97 de 4 acides aminés en début et fin de boucle. En ce qui concerne le site S0, les feuillets β_2 sont identiques alors que les hélices α_2 diffèrent de deux acides aminés.

Nous avons ainsi étudié l'interaction de 8 ligands avec ces quatre domaines PDZ par RMN. Nous avons déterminé leur affinité par inspection visuelle. Pour cela, le déplacement chimique des acides aminés G15 pour PSD-95 PDZ1 et 2 et G18 pour SAP-97 PDZ1 et 2 ont

été comparés. En fonction de cette différence de déplacement chimique, en présence du ligand, nous avons établi arbitrairement une échelle d'affinité (Très Bon, Bon, Moyen, Faible, Très Faible) (Figure 93 et 94).

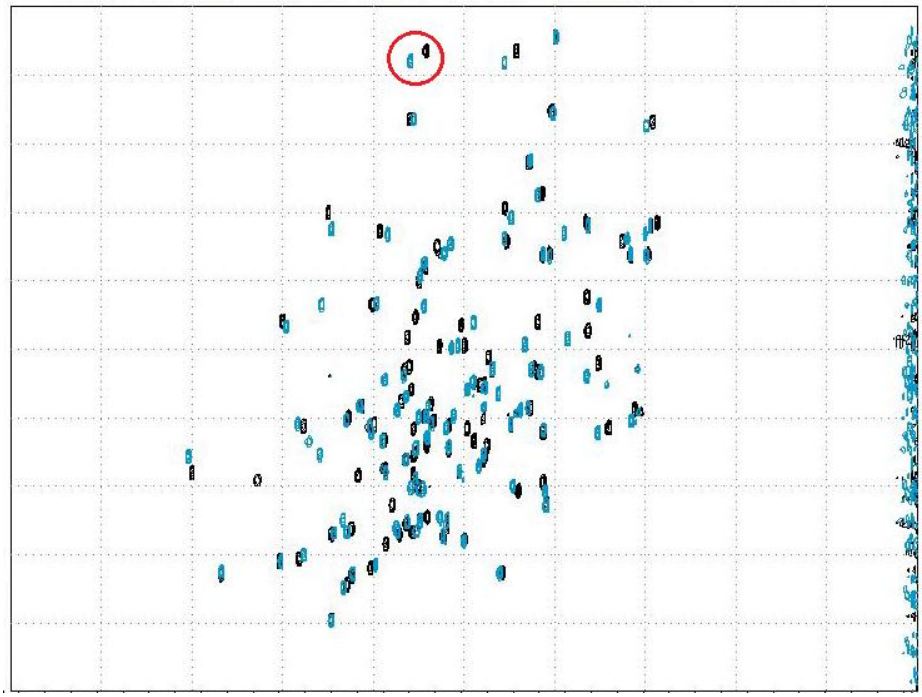


Figure 93 : HSQC $^{1}H/^{15}N$ du complexe 178/SAP-97 PDZ1 en rouge déplacement chimique de la Glycine 18 (Bon)

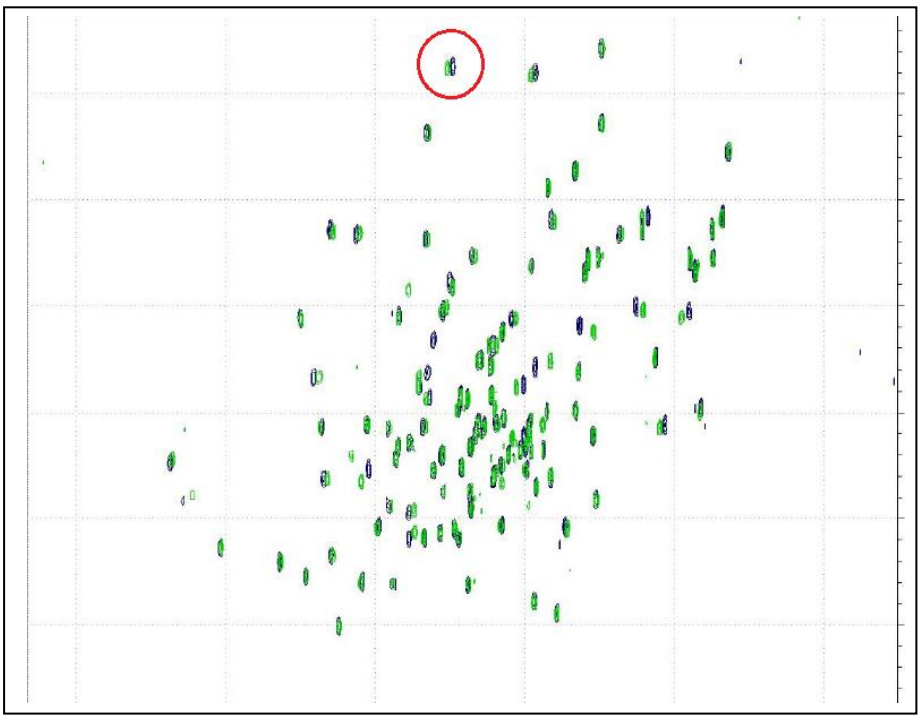


Figure 94 : HSQC $^{1}H/^{15}N$ du complexe 178/PSD-95 PDZ1 en rouge déplacement chimique de la Glycine 15 (Faible)

Composés	SAP-97 PDZ1	SAP-97 PDZ2	PSD-95 PDZ1	PSD-95 PDZ2
160	++	+++	-	+
161	-	-	-	-
162	++	++	++	++
185	+++	+++	++	+++
186	--	-	--	**NR**
188	+++	++	++	-
178	+++	++	-	++
187	+++	++	+++	**NR**

Tableau 11 : Composés testés sur les différents domaines par HSQC ^{1}H/15 et leurs forces d'interactions (- = Faible, + = Moyen, ++ = Bon, +++ = Très Bon, NR : Non Réalisé)

Alors que certains ligands ne présentent que peu sélectivité (**161**, **162, 185, 187**,**188**) pour une des deux protéines, d'autres sont au contraire un peu plus sélectifs, c'est le cas de **160** et de **178** qui présentent une bonne affinité respectivement pour les domaines PDZ2 et PDZ1 de SAP-97.

L'indole **178**, quant à lui, présente une bonne affinité pour PDZ1 de SAP-97 alors qu'il ne présente pas d'affinité pour PDZ1 de PSD-95. Enfin **187** présente de très bonnes affinités pour les domaines PDZ1 de SAP-97 et PSD-95.

8 Conclusion

Nous avons, dans ce chapitre, réalisé une étude de relation structure activité, à partir de l'indole **52**, afin de mettre en évidence un ligand capable d'inhiber l'interaction entre la protéine à domaine PDZ PSD-95 PDZ1, et le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2A}.

Par conséquent, 16 indoles possédant divers substituants en position 2, 5, 6 et N-1, plus ou moins hydrophobes et encombrés ont été synthétisés. Les composés **185** et **187** se sont avérés être les meilleurs ligands du domaine PDZ1 de PSD-95.

Nous avons également étudié deux structures protéine/ligand par RMN NOESY, qui nous ont permis de constater la position des ligands dans le site d'interaction. Nous avons montré que l'orientation du ligand **185** dans le site S0 est régie par une interaction hydrophobe forte avec le groupement benzyle. Cependant le ligand **187** ne possédant pas de groupement hydrophobe a une orientation très prometteuse pour sonder le site S1.

Les résultats préliminaires encourageants de sélectivité montrent que nos composés interagissent préférentiellement avec un domaine PDZ plutôt qu'un autre et c'est via le site S1 que nous espérons affiner cette sélectivité.

CHAPITRE 4

Chapitre 4: Evaluation pharmacologique *in vivo*

1 Principe

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

Nos collaborateurs de l'Institut Neurodol (UMR1107) ont montré que l'interruption de l'interaction entre les protéines à domaine PDZ et le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2A} par une stratégie peptido-mimétique (administration spinale d'un peptide contenant les neuf résidus terminaux du récepteur $5HT_{2A}$ empêchant ainsi de manière compétitive, l'interaction entre le domaine PDZ et son ligand) s'accompagne d'un effet anti-hyperalgique *in vivo* et potentialise l'activité analgésique d'un antidépresseur inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine chez des rats diabétiques souffrant de douleur neuropathique.[108] Il a aussi été vérifié que l'effet antalgique du peptide est lui-même bloqué par un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}. Des résultats identiques ont été obtenus dans ce même symptôme d'hypersensibilité mécanique, chez des rats présentant une douleur neuropathique d'étiologie traumatique (ligature du nerf sciatique, rat CCI).

L'activité anti-hyperalgique des molécules synthétisées a donc été évaluée sur un symptôme d'hypersensibilité mécanique (test de pression de la patte) chez des rats neuropathiques (ligature du nerf sciatique) CCI.

Le nerf sciatique est un nerf mixte qui provient de toutes les branches du plexus sacral. Il sort du bassin par le foramen infra-piriforme et se dirige vers le bas et en dehors de la fosse, puis verticalement à la cuisse. Le nerf sciatique se divise ensuite en 3 branches, le nerf sural, le nerf péronéal et le nerf tibial (Figure 95).

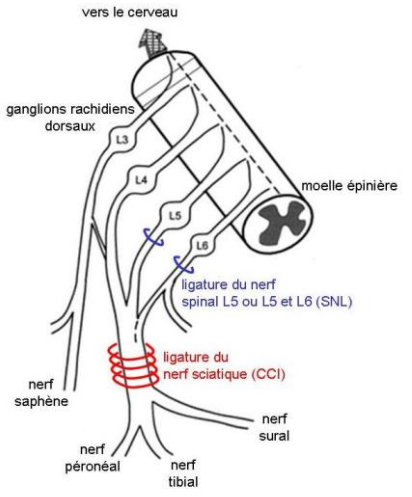


Figure 95 : Schématisation des nerfs sciatique et saphène, leurs branches terminales et leurs origines spinales.

La présence de fibres sensitives (L5 ou L6) et motrices (L4), fait que la ligature du nerf sciatique peut entraîner des troubles moteurs (paralysie de la patte) comportementaux (autophagie) conduisant à écarter de l'étude les animaux présentant de telles perturbations.

La mononeuropathie unilatérale périphérique est induite selon une méthode décrite par Bennett et Xie.[144] Les rats (200-225 g) sont anesthésiés à l'aide de pentobarbital (6%, 1 ml/kg de poids corporel, i.p.). La patte postérieure gauche du rat est tondue puis désinfectée avec de la povidone iodée 10% (Bétadine®). Après incision de la peau, les muscles de la cuisse sont séparés, le nerf sciatique gauche est exposé et quatre ligatures (Monocryl® 5-0, Ethicon®, Johnson-Johnson) espacées de 1 mm sont posées autour du tronc commun du nerf, de façon à ralentir la vascularisation sans l'interrompre totalement. Le nerf est remis en place entre les muscles, et la peau est suturée (Mersuture® 3.0, Ethicon®, Johnson-Johnson). La zone opérée est alors de nouveau désinfectée et les animaux sont isolés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil.

Les rats sont soumis au test de pression de la patte décrit par Randall et Selitto afin de détecter la survenue d'une hyperalgie mécanique.[166] Le seuil de nociception, objectivé par la vocalisation ou la réaction de lutte (« *struggle* ») est mesuré à l'aide d'un analgésimètre Ugo Basile (Bioseb®).

Comme ce test nécessite la préhension de l'animal, l'expérimentateur habitue les rats : 3 jours avant le début de l'expérience: les rats sont maintenus par l'expérimentateur pendant 20 s sans qu'ils ne s'échappent, ne se débattent ou n'émettent de cris. Le jour de l'expérience, les rats sont de nouveau maintenus par l'expérimentateur à plusieurs reprises, tout en faisant fonctionner l'analgésimètre afin que les animaux s'habituent au bruit de l'appareil.
La patte postérieure (gauche) du rat est alors placée sous un cône et une force mécanique croissante et linéaire est appliquée grâce à un poids se déplaçant sur une échelle graduée (Figure 96), ceci jusqu'à l'obtention d'une vocalisation ou d'un struggle de la part du rat. Le seuil de vocalisation peut alors être lu sur l'échelle graduée. Trois à quatre mesures sont réalisées à des intervalles de 10 min afin d'obtenir deux valeurs consécutives qui ne diffèrent pas de plus de 10%. Le seuil de vocalisation est défini comme la moyenne de ces deux valeurs et est exprimé en unités arbitraires (AU). La pression maximale (cut-off) appliquée correspond à 75 AU.



Figure 96: Analgésimètre Ugo Basile (Bioseb®) utilisé pour l'appréciation de l'hypersensibilité mécanique des rats

Les seuils de vocalisation sont mesurés avant l'induction de la neuropathie. Quatorze jours après la ligature du nerf sciatique, les rats mononeuropathiques hyperalgiques (c'est-à-dire présentant une diminution du seuil de vocalisation de plus de 15 % par rapport au seuil obtenu avant neuropathie) sont soumis au test de pression de la patte (détermination des seuils de vocalisation), puis reçoivent un des traitements par voie intrathécale. Les seuils de vocalisation sont alors mesurés toutes les 15 min après l'injection intrathécale, pendant 90 min.

2 Résultats

Les composés **121, 160, 161, 162, 185** et **187** ont été évalués in vivo pour leur effet antalgique. Les résultats sont résumés dans la Figure 97, les cinétiques correspondantes sont données en annexe, l'histogramme correspond aux aires sous ces courbes de cinétique.

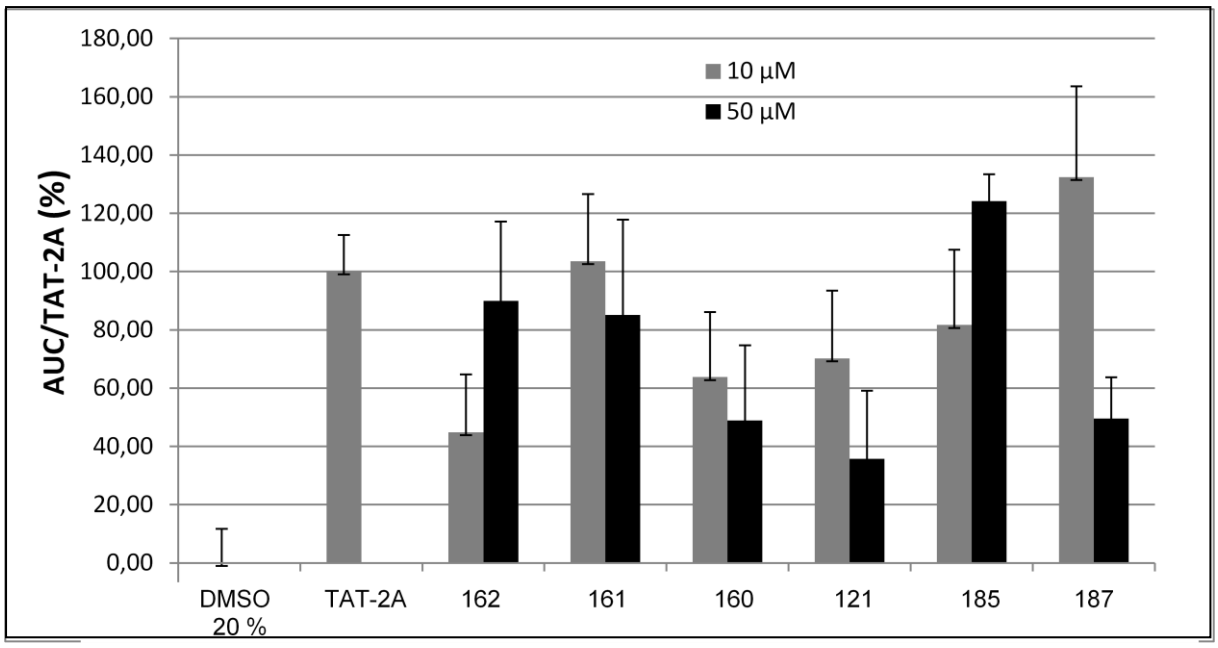


Figure 97 : Effet antalgique des composés 121, 160, 161, 162, 185 et 187

Le véhicule (DMSO) n'a aucun effet sur l'animal traité, alors que le traitement avec le peptide TAT-2A (4 µM) est pris comme référence (Extrémité C-terminale du peptide 5-HT_{2A}).

Nous constatons que les composés **121** et **160**-**162** ont un effet anti-hyperalgique mais inférieur à celui du TAT-2A. Par contre, les composés **185** et **187** présentent des activités anti-hyperalgiques supérieures à celle du TAT-2A, ce qui est très prometteurs puisque ce sont nos deux meilleurs ligands PDZ de PSD-95 et qu'ils inhibent l'interaction avec 5-HT_{2A} *in vitro* à 50 µM.

CONCLUSION

ET

PERPESPECTIVES

Conclusion et Perspectives

Les protéines à domaines PDZ, impliquées dans des interactions protéine/protéine, peuvent être à l'origine de diverses pathologies, telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer ou la douleur. Il a été montré que l'interruption de l'interaction de la protéine PSD-95 avec divers ligands naturels entraîne une réduction de différents types de douleur telle que la douleur chronique (récepteur NMDA) ou la douleur neuropathique (récepteur à la sérotonine 5-HT_{2A}).[108] La conception de molécules permettant d'inhiber spécifiquement l'interaction entre la protéine PSD-95 et le récepteur 5-HT_{2A} devrait donc permettre le développement de nouveaux antalgiques capables de traiter les douleurs neuropathiques (Figure 98).

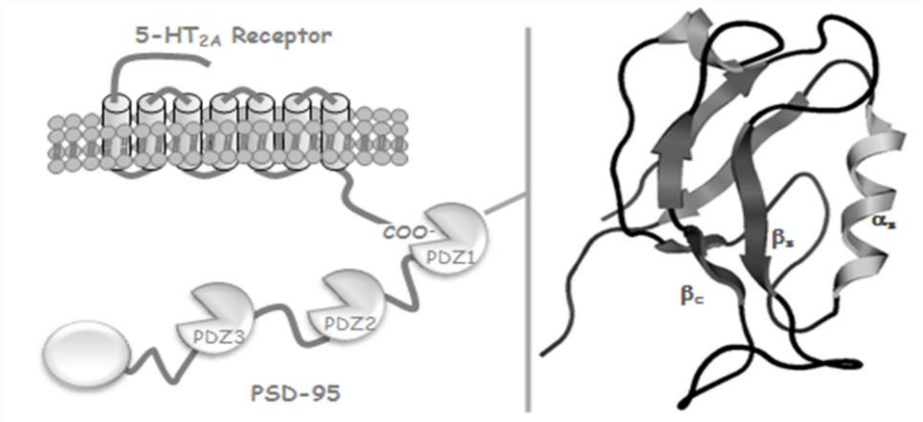
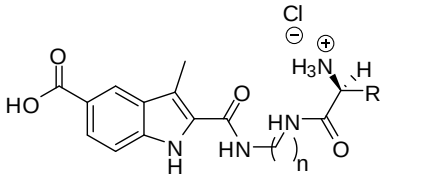


Figure 98 : PSD-95 et le récepteur 5-HT_{2A}

L'objectif de ce travail consistait à concevoir des ligands capables d'interagir avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 tout en étant compétitifs de l'interaction PSD-95/5-HT_{2A}. L'évaluation de l'interaction entre les molécules synthétisées et la protéine PDZ a été réalisée par RMN, l'étude de l'inhibition de l'interaction PDZ1 PSD-95/5-HT_{2A} par les molécules a été effectuée par chromatographie d'affinité et l'activité antalgique a été évaluée *in vivo* dans un modèle de douleur neuropathique en comparaison avec le peptide TAT-2A.

Nous nous sommes intéressés (Chapitre 2) à la synthèse de biligands (Figure 99) possédant un noyau indolique substitué pouvant interagir avec le site S0, site très conservé des protéines à domaine PDZ, puis un bras espaceur lié à divers acides aminés capables de se lier au site S1, spécifique de chaque protéine. Nous avons ainsi synthétisé 15 biligands possédant un noyau indolique commun, des linkers à 2, 4 et 6 carbones et 5 acides aminés différents en 6-8 étapes avec des rendements globaux de 5-10%.



n = 2, 4, 6
R = Chaîne latérale acides aminés

Figure 99 : Biligands du chapitre 2

Malheureusement aucun de ces composés n'a présenté d'affinité avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95, ceci étant probablement dû au fait que le noyau indolique ne se liait pas suffisamment dans le site S0 du domaine PDZ.

Les biligands synthétisés à partir de l'indole **52** n'ayant pas donné les résultats attendus, nous nous sommes naturellement tournés vers l'optimisation de cet indole en vue de construire un ligand avec plus d'affinité pour le site S0 du domaine PDZ1 de PSD-95 (Chapitre 3). La première étude de relation structure-activité nous a permis de mettre en évidence l'indole **121**. Trois biligands (**153-155**) substitués en C-2, ont alors été synthétisés et une nouvelle fois, les résultats n'ont pas été probants. Une deuxième phase d'optimisation a fourni les indoles **160-162** et **178**. A partir de **162**, qui s'est avéré avoir le plus d'affinité pour le domaine PDZ, nous avons construit le biligand en C-2 **179** qui lui aussi a conduit à une diminution des interactions avec la protéine. Nous avons donc opté pour des biligands en N-1. Ainsi les indoles **185-188** ont été synthétisés en 6-7 étapes avec rendements globaux de 6-9%. Deux d'entre eux (**185** et **187**) se sont avérés être de très bon ligands du domaine PDZ1 de PSD95 (Schéma 72).

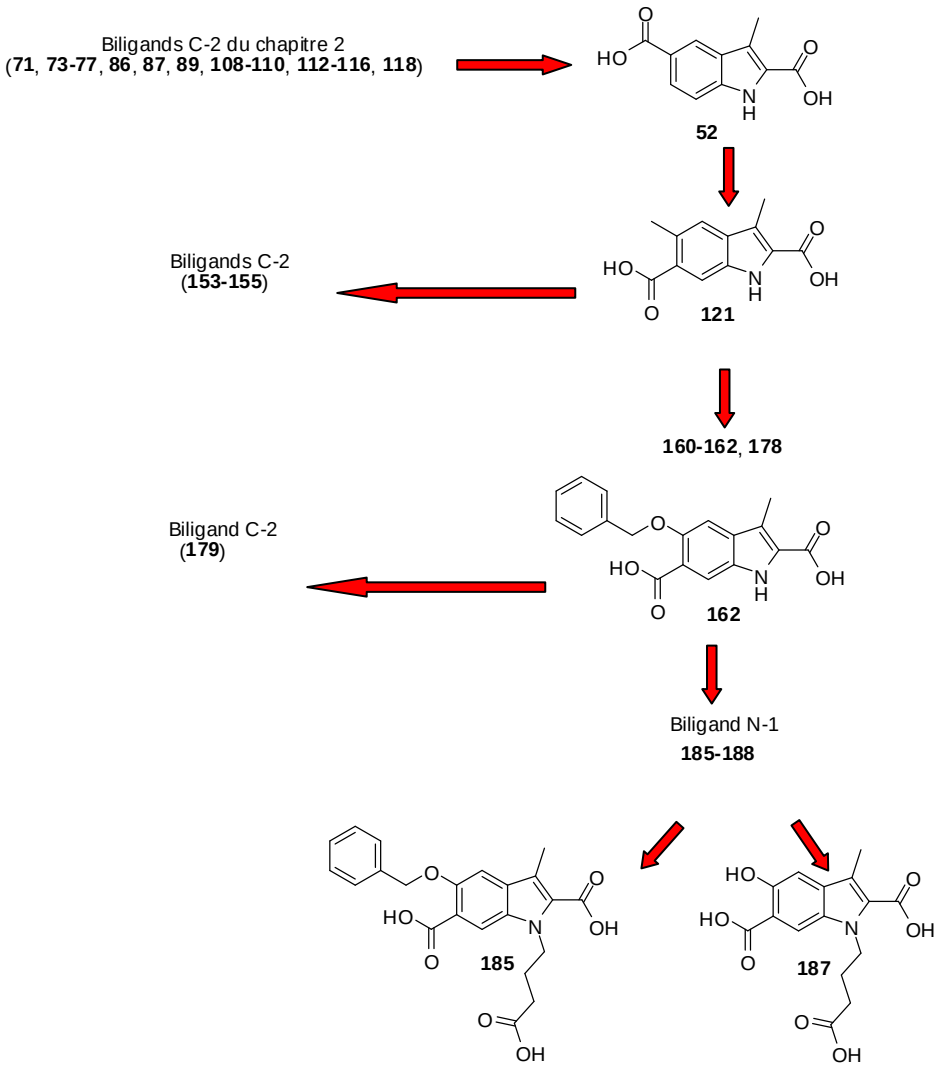


Schéma 72

Nous avons dû développer des voies de synthèse pour accéder à ces molécules qui incluent des réactions telles que : des réactions de couplage de Suzuki, de Heck, de nitration, de couplage peptidique. Dans la plupart des cas, il a fallu optimiser les voies de synthèse (variation des réactifs en fonction des stabilités, réactivités et solubilité, variation des procédures décrites). Toutes les molécules finales ont été caractérisées par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, HPLC (pureté >95%) et HRMS.

Les deux indoles **185** et **187** présentent de fortes interactions avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95. Nous avons montré que ces deux molécules étaient capables d'inhiber l'interaction PSD-95 PDZ1/5-HT_{2A}. L'évaluation de l'activité antalgique sur des rats souffrants de douleurs neuropathiques a montré que ces deux molécules étaient plus actives que le TAT-2A.

Les structures des complexes protéine/ligand pour ces deux molécules, réalisées par RMN NOESY, ont permis de mettre en évidence des orientations différentes de ces deux indoles au sein du site S0. Concernant le composé **185**, l'interaction de Van der Waals entre le groupement benzyle en C-5 et une poche hydrophobe située dans le site S0 semble déterminante alors que pour la molécule **187**, c'est le méthyle en C-3 qui prend place dans cette poche hydrophobe. La chaîne en N-1 ne permet donc pas d'atteindre le site S1 comme anticipé, cependant, l'orientation de **187** devrait permet d'entrevoir des perspectives pour atteindre S1 par la substitution de l'acide en position 6 (Figure 100).

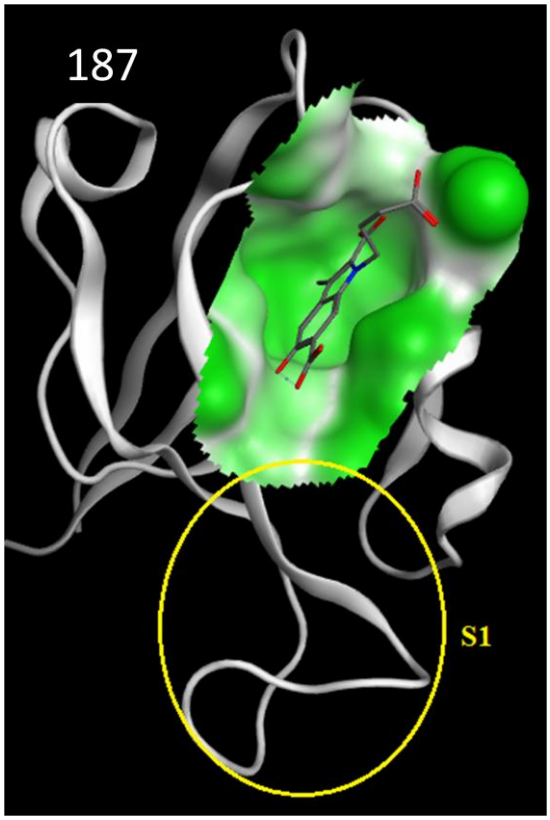


Figure 100 : Structure RMN 187/PSD-95 PDZ1

Au vue de la structure RMN NOESY du complexe PSD-95 PDZ1/**187**, nous pouvons donc envisager de concevoir des biligands se liant à la fois aux sites S0 et S1 en substituant l'indole **187** en C-6 pour obtenir une molécule de type A avec n = nombre variable de carbones et R = NH_2, OH, alkyl (Figure 101).

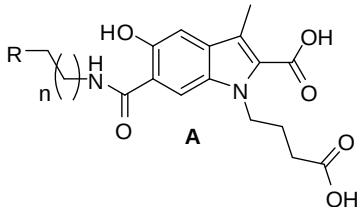


Figure 101 : Molécules envisagées

Maintenant que nous possédons des ligands de bonne affinité pour le domaine PDZ, des études préliminaires par ITC (Isothermal titration calorimetry) (cf Annexe) sont conduites à Liverpool en vue de déterminer des Ki (constante d'inhibition) de **185** et **187**. En effet, compte tenu de leur orientation différente dans le sillon du domaine PDZ, il important de quantifier, par cette technique, la force d'inhibition entre nos composés et la protéine en compétition avec un peptide donné. Des résultats préliminaires ont été obtenus avec le peptide 5-HT_{2C} (Kd = 22,7 µM) qui a plus d'affinité pour le domaine PDZ1 de PSD-95 que 5-HT_{2A} (Kd = 76,3 µM). Pour les composés **185** (Ki = 932 µM) et **187** (Ki = 353 µM), le peptide utilisé pour la détermination des Ki étant 5-HT_{2C}, et non 5-HT_{2A}, seul l'ordre de grandeur est important. Ces résultats préliminaires suggèrent que l'indole **187** serait le meilleur inhibiteur.

Des études préliminaires de sélectivité entre domaines PDZ ont été conduites dans le chapitre 3. Ces domaines PDZ étant très similaires entre eux, il serait donc intéressant de poursuivre l'étude avec des domaines PDZ de différentes classes et présentant des différences plus prononcées notamment au niveau du site S1, comme par exemple le domaine PDZ13 de la protéine MPDZ (PDB : 2FNE) (Figure 102).

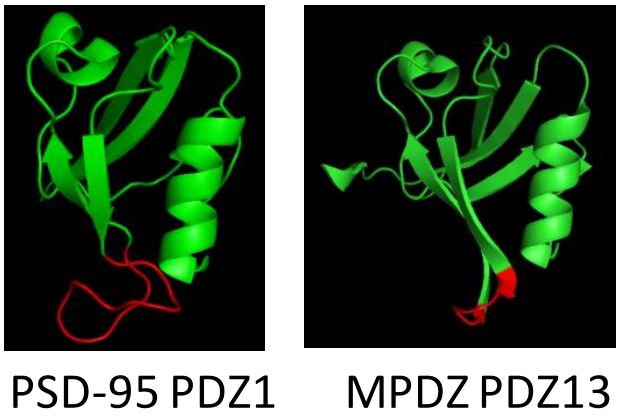


Figure 102 : Comparaison site S1 en rouge de deux protéines à domaine PDZ

Enfin, des études *in vivo* supplémentaires pourraient être conduites sur les composés les plus prometteurs, **185** et **187**, pour confirmer que l'interruption de l'interaction PSD-95/5-HT_{2A} est bien à l'origine de l'effet antalgique observé. En co-administrant un antagoniste de 5-HT_{2A} (M100907), l'effet antalgique devrait disparaitre si tel est le cas.

TRAVAUX PARALLELES

Travaux parallèles

1 Introduction

Parallèlement à la synthèse de dérivés indoliques, nous avons envisagé d'identifier de nouvelles molécules organiques, inhibitrices spécifiques de l'interaction entre la protéine à domaine PDZ PSD-95 et le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2A}, pouvant constituer une nouvelle classe d'antalgiques originaux.

Pendant de nombreuses années, le screening expérimental, par le biais de tests biologiques, s'est avéré être une méthode très utilisée pour identifier de nouveaux « LEAD » innovants. Cette étape, très importante dans le processus de découverte d'un nouveau médicament, reste cependant relativement coûteuse. C'est pourquoi le criblage virtuel, technique alternative au screening expérimental, s'est particulièrement développé ces dernières années. En effet, il constitue une technique de choix pour un criblage haut débit de base de données de molécules.[167] L'utilisation du criblage virtuel de ligands s'est montrée très efficace dans la recherche de « LEAD » grâce notamment à l'augmentation d'informations sur les cibles, disponibles en ligne, ainsi qu'aux nombreuses structures RX et RMN découvertes récemment. Les progrès informatiques, par la puissance de calcul de plus en plus importante, ont permis également à la technique de docking de devenir de plus en plus précise, elle permet notamment de donner des énergies d'interactions fiables du complexe protéine/ligand.

La structure de PSD95 PDZ 1 et 2 avec le peptide cypin (PDB 2KA9)[168] étant disponible, nous avons envisagé de tester une technique de criblage sur notre cible. La méthode de docking décrite par Tiziano semble la plus adaptée pour nos travaux.[169] Cette méthode de docking moléculaire fournit une estimation de l'orientation optimale entre la molécule ligand et son récepteur, lorsqu'ils se lient pour former un complexe stable[170], ainsi qu'une estimation des énergies d'interactions recepteur/ligand (hydrogène, VDW, ionique, isotropie…).

Pour réaliser le docking moléculaire sur la protéine PSD95, nous avons utilisé la base de molécules commerciales Asinex (Gold, Platinum et Synergy) comprenant 514957 composés[171]. Nous avons docké toute la base de données sur le domaine PDZ1 de PSD95 en utilisant trois systèmes de filtres différents, afin de déterminer les meilleurs « hits ». Ces filtres tiennent compte de l'encombrement stérique, de l'affinité d'interactions et de la pose de docking. Les « hits » seront classés en fonction de leurs natures chimiques.

2 Docking

Cette étude de docking[110] a été réalisée avec le module MOE sur la base Asinex (Gold, Platinum et Synergy) comprenant 514957 molécules (cf Annexe). Le criblage virtuel a permis d'identifier 500 molécules présentant les meilleures énergies d'interaction et la meilleure conformation avec la protéine, après avoir utilisé trois filtres. Nous avons constaté alors, par inspection visuelle, que toutes les molécules pouvaient être classées en cinq familles en fonction de leurs nature chimique : indoles, quinoléines, nucléotides, *N*-acyl hydrazones, et phényl glycosylamines diversement substituées. Les nucléotides interagissant avec de nombreuses cibles biologiques, ils ne pourront pas être sélectifs des protéines à domaines PDZ et les indoles ayant été étudiés précédemment nous nous sommes intéressés aux trois autres familles.

Pour chaque famille, nous avons sélectionné des molécules en fonction de leurs énergies d'interactions et de leurs poses, qui doivent présenter des interactions fortes avec la poche S0. Nous avons choisi des molécules relativement simples à synthétiser, dans l'optique d'un screening RMN, et facilement fonctionnalisables.

Pour la famille des quinoléines nous avons choisi de nous servir des résultats antérieurs et donc de synthétiser l'analogue de l'indole **121** possédant un noyau quinoléique. En effet, lorsque nous avons réalisé la synthèse de la quinoléine **189**, l'indole **121** était alors le meilleur « LEAD » lors de cette étude, de plus, la synthèse paraissait relativement facile à réaliser (Schéma 73).

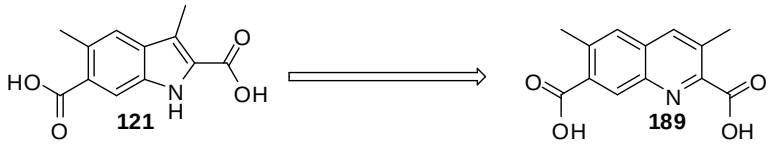


Schéma 73

Nous avons alors sélectionné une molécule par famille présentant de fortes énergies d'interaction, la quinoléine **189**, l'hydrazone trihydroxylée **190** et le phénylglycosylamine **191** possédant une fonction acide carboxylique sur le cycle aromatique (Tableau 6). Les trois molécules ainsi choisies, nous avons pu constater par l'intermédiaire du docking, qu'elles interagissaient avec de nombreux résidus de la protéine, notamment des acides aminés de la boucle GLGF, à la fois par des liaisons hydrogènes, de VDW et des interactions hydrophobes (Tableau 12). Les meilleures poses obtenues au cours de ce docking sont représentées sur la Figure 103.

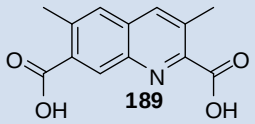
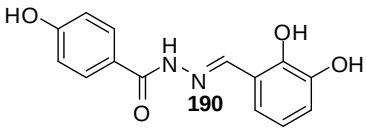
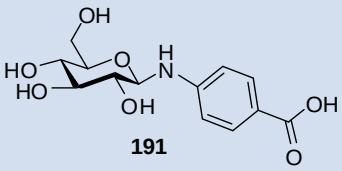
Molecules	Energie d'interaction	Amino-acides de la protéine affectés par la présence du ligand
 189	-7.52 kcal/mol	Liaisons H: L15, G16, F17, I19, Autres interactions : L15, G16, F17, I19, H70, L77.
 190	-8.52 kcal/mol	Liaison H: G16, F17, I19, L77 Autres interactions: G16, F17, I19, H70, V74, L77.
 191	-7.32 kcal/mol	Liaison H: I19, L77. Autres interactions: G14, L15, G16, F17, S18, I19 and L77

Tableau 12 : Molécules sélectionnées avec leurs énergies d'interactions et les acides aminés perturbés par la présence du ligand.

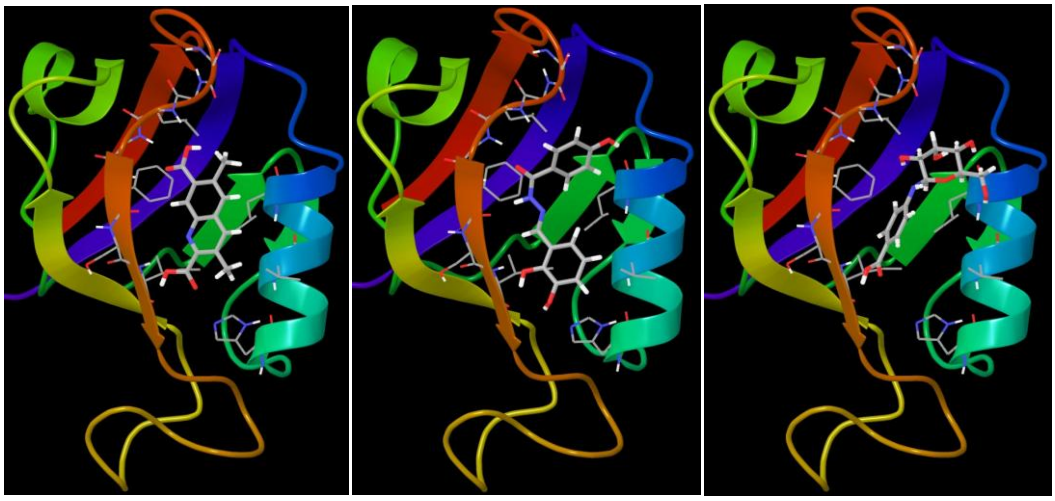


Figure 103 : Les meilleures poses de docking de 189, 190, 191.

2.1 Synthèse

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec une post doctorante de notre laboratoire, le Dr.Naoual Bouzidi.

2.1.1 Synthèse du phénylglucopyranosylamine

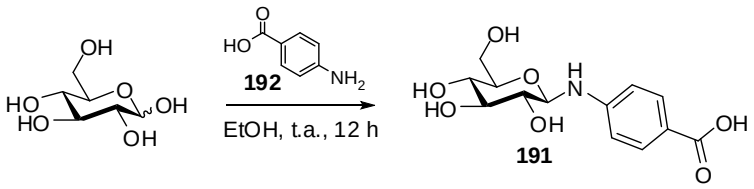


Schéma 74

La synthèse du phénylglucopyranosylamine **191** a été décrite par Wang *et al.*.en une étape à partir du glucose en présence de l'aniline **192.**[172] La synthèse conduit à un mélange d'anomères (α/β : 20/80) facilement séparables par recristallisation. L'anomère β souhaité est obtenu avec un rendement de 45% (Schéma 74).

*2.1.2 Synthèse de la N-acyl hydrazone **192***

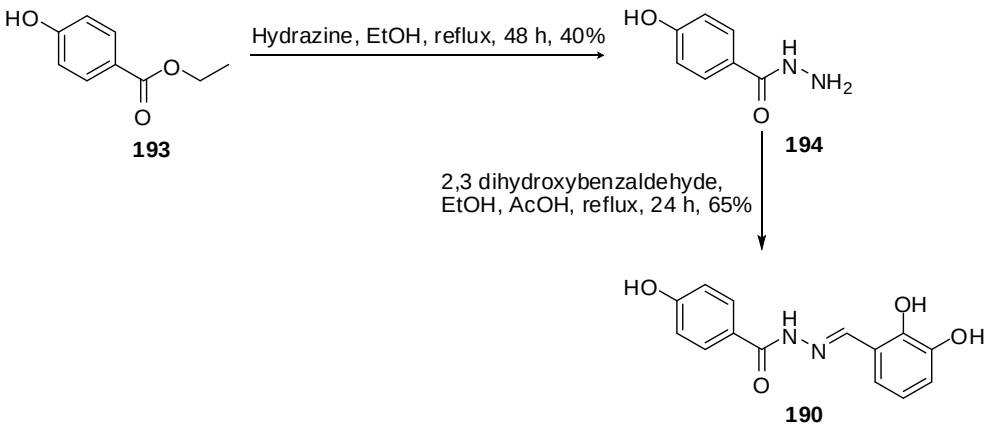


Schéma 75

L'hydrazone **190** a été synthétisée en 2 étapes à partir du 4-hydroxy benzoate d'éthyle **193** selon la méthode décrite par Forman *et al.*.[173] L'acyl hydrazide **194** est obtenu, dans un premier temps, par traitement de l'ester **193** en présence d'hydrazine, avec un rendement de 50%. L'hydrazone **190** est générée par réaction de l'hydrazide **194** en présence de l'aldéhyde correspondant en milieu acide avec un rendement de 66% (Schéma 75).

*2.1.3 Synthèse de la quinoléine **197***

La quinoléine est obtenue en une étape selon la méthode décrite par Shimizu *et al.*[174] à partir de l'aniline correspondante **129** et de glyoxylate d'éthyle *via* la formation d'une imine (schéma 75). Cette réaction conduit à la formation des deux quinoléines régioisomères **195** et **196**. Les deux quinoléines ont pu être séparées et le composé désiré est obtenu avec un rendement de 19 %. Le rendement reste relativement faible mais l'avantage de cette méthode est d'obtenir en une seule étape directement la quinoléine **195** souhaitée

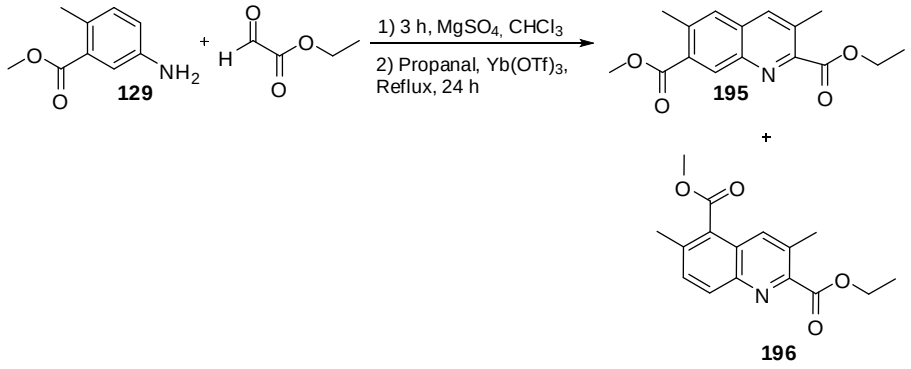


Schéma 76

Pour obtenir la quinoléine **195**, l'aniline **129** a d'abord été condensée sur le glyoxylate d'éthyle en vue d'obtenir l'imine correspondante i (Schéma 77). Puis le propanal et du triflate d'Yterbium sont ajoutés pour former le cycle quinoleique. Le triflate d'Yterbium joue le rôle d'acide de Lewis en vue de faciliter l'attaque du propanal sur l'intermédiaire ii. L'étape suivante est une réaction type Friedel-Crafts qui conduit à l'intermédiaire iv, qui subit une déshydratation puis une aromatisation pour enfin conduire à la quinoléine **195**.

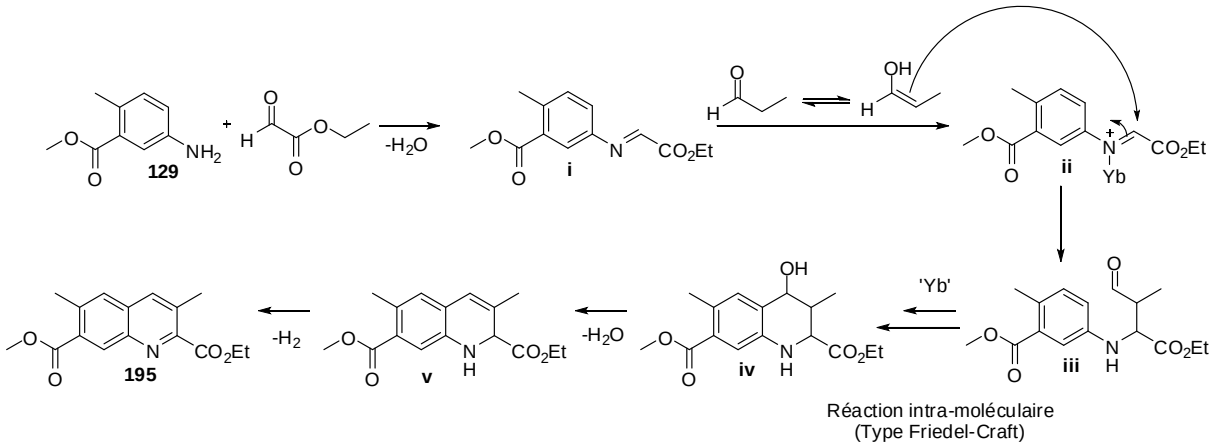


Schéma 77

La deuxième et dernière étape consiste a réaliser une saponification en présence de potasse pour conduire à la quinoléine final **197** avec un rendement de 37% (Schéma 78) après acidification.

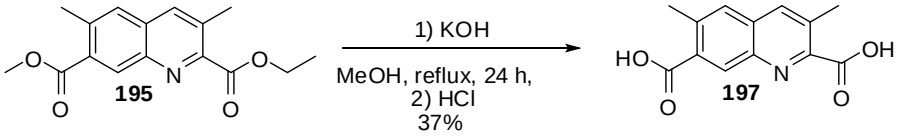


Schéma 78

Ayant ainsi préparé une molécule par famille de composés issus du screening virtuel, nous avons évalué les interactions entre le ligand et le domaine 1 PDZ1 de la protéine PSD95 par RMN.

2.2 Résultats Biologiques

Seule la quinoléine **197** interagit avec la protéine PSD95 PDZ1, mais faiblement d'après les spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$.

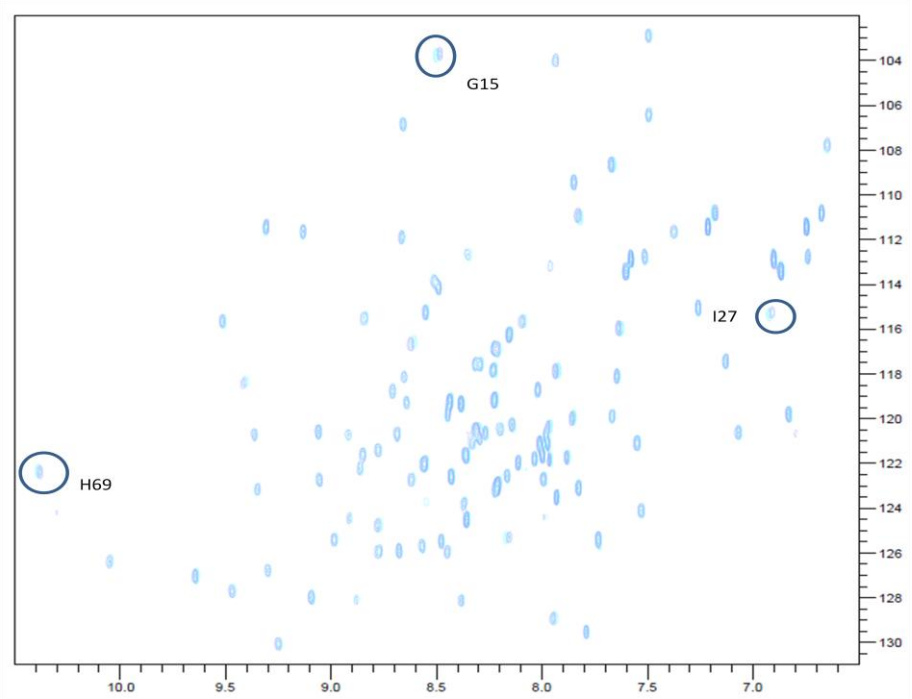


Figure 104 : Superposition des spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de PSD95 PDZ1 (seul = bleu, avec 197 = bleu ciel).

Malgré cela nous avons testé la quinoliéine **197** *in vivo* et les résultats sont encourageants car on observe une activité antalgique plus élevée que pour le ligand naturel TAT-2A (Figure 100).

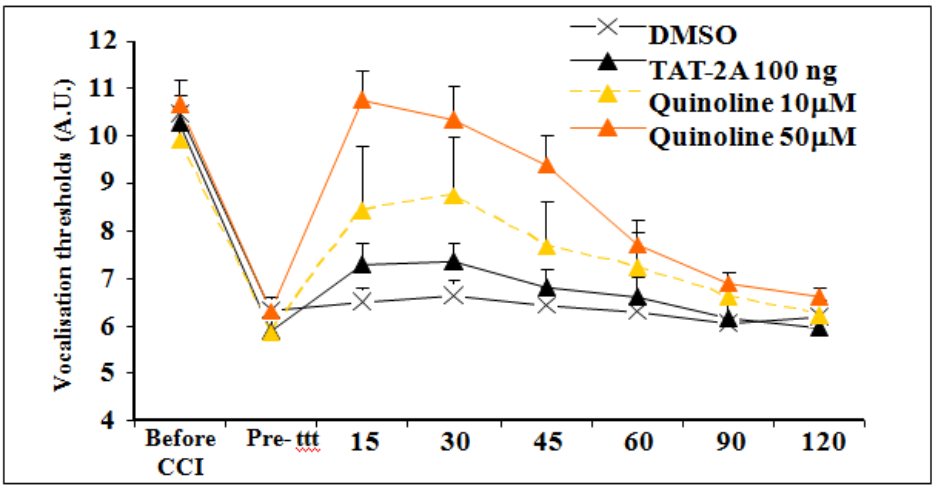


Figure 105 : Effet antalgique de la quinoléine 197

2.3 Conclusion

Un criblage virtuel nous a permis d'identifier la quinoléine **197** comme « LEAD ».Les spectres HSQC $^{1}H/^{15}N$ de la protéine montre que cette molécule interagit avec la protéine et l'étude pharmacologique montre que la quinoléine présente un effet antalgique prometteur. Une optimisation du noyau quinoléique pourra être conduite pour interagir plus fortement avec le domaine PDZ. Cette perspective est très importante pour s'affranchir des indoles qui sont brevetés par *Fujii et al.*.[182]

EXPERIMENTAL PART

Experimental Part

General remarks :

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

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

Flash chromatography was performed with ARMEN Spot® and colums:

- Column A: Gotec Labortechnik (VWR), Si60 15-40µm 10 g
- Column B: Gotec Labortechnik (VWR), Si60 15-40µm 30 g
- Column C: Gotec Labortechnik (VWR), Si60 15-40µm 100 g
- Column D: Gotec Labortechnik (VWR), RP18 25-40µm 15 g
- Column E : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 15 g
- Column F: Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 25 g

Purity was controlled by HPLC (Agilent® serie 1600 (254 and 280 nm)) and >95%.

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

^{1}H NMR and ^{13}C NMR, spectra were recorded on a Bruker Advanced spectrometer at 400 and 101 MHz. Chemical shifts δ are reported in ppm relative to residual solvent. The coupling constants *J* are given in Hertz (Hz). The abbreviations used for signal descriptions are as:

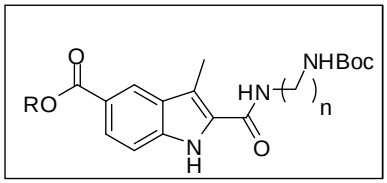
- s: singlet
- brs: broad singlet -
- d: doublet
- t : triplet
- q: quartet
- qt: quintuplet

High Resolution Electro-Spray Ionisation Mass Spectra (HR-ESI-MS) were obtained from the 'Centre Régional de Mesures Physiques de l'Université Blaise Pascal' (Clermont II). In majority of cases, the nomenclature used is the official IUPAC nomenclature (ChemDraw).

CHEMISTRY PART

General procedures:

Peptidic coupling : introduction of the linker



R = Benzyl, Ethyl

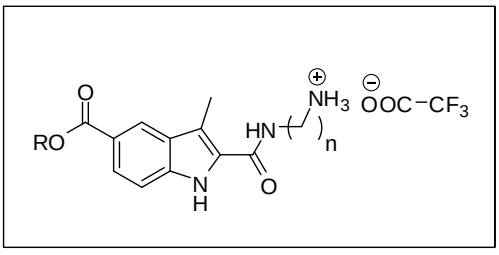
A

Procedure A:

To a solution of 2-indole carboxylic acid (1 eq.) in anhydrous DMF at 0 °C were added HOBt (1.1 eq.) and EDC (1.1 eq.). The solution was stirred for 1 hour at 0 °C. Then, a solution of mono-Boc-protected diamine (2 eq.) in anhydrous DMF was slowly added to the mixture. The reaction was slowly allowed to warm up to room temperature and stirred for 24 h. After removal of DMF, the resulting residue was dissolved in EtOAc and washed with H_2O. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and the resulting solid was purified by FC (gradient 100% Cyc / 100 % EtOAc) to give the desired indole **A**.

……

Cleavage of the Boc protecting group



R = Benzyl, Ethyl

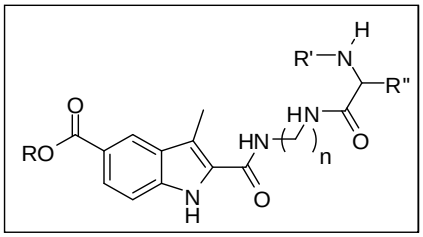
B

Procedure B:

To a solution of **A** in DCM, TFA was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was then concentrated *in vacuo* and the resulting residue was purified by trituration in diethyl ether and filtration to obtain the desired trifluoro acetate salt **B**.

……

Peptidic coupling



R' = Fmoc, Boc, Z R'' = amino acid lateral chain

C

Procedure C1:

To a solution of salt **B** (1 eq.) in anhydrous DMF was added DIEA (1.1 eq.) and the reaction was stirred for 15 min at room temperature to give solution **a.**

To a solution of *N*-protected amino acid (1.1 eq.) in anhydrous DMF, HOBt (1.2 eq.) and EDC (1.2 eq) were added at 0 °C and the mixture was stirred for 1 hour to give solution **b.**

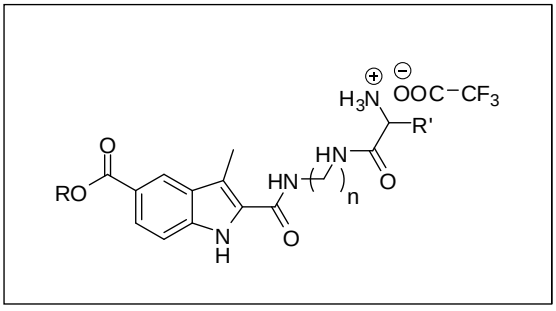
Solution **a** was added dropwise to solution **b** at 0 °C and allowed to warm up to room temperature with stirring for 4 h. The mixture was then concentrated *in vacuo* to obtain the desired biligand **C**.

Procedure C2:

Same procedure as procedure **C1** except HOBt/EDC (1.2 eq.) was replaced by CDI (1.2 eq.).

……

Deprotection of the amino acid:



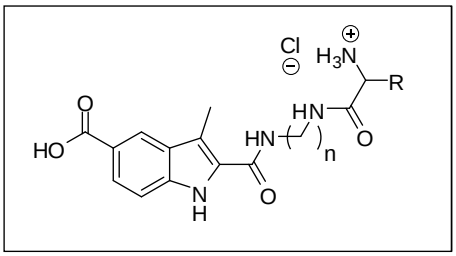
D

Procedure D:

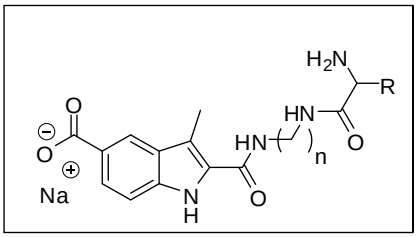
To a solution of biligand **C** in DCM, TFA was added and the solution was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was concentrated *in vacuo* to obtain the desired crude salt **D**.

……

Hydrogenation (E1) and saponification (E2) of ester group



E



E'

Procedure E1:

To a solution of salt **D** (R = Benzyl) in degassed MeOH, $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon was added. The mixture was hydrogenated under H_2 pressure (60 psi) during 24 h at room temperature. Then the solution was filtrated over Celite®, an excess of HCl (1 M) was added and then the mixture was concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired ammonium chloride salt **E**.

Procedure E2:

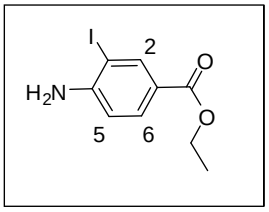
To a solution of **C** (R = Ethyl) in EtOH and dioxane, NaOH (5 M) was added and the reaction was stirred at room temperature for 24 h.

The mixture was then concentrated *in vacuo*, the resulting solid washed with Et_2O and purified by FC (Column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired salt **E'**.

……

Ethyl 4-amino-3-iodobenzoate[109]

45



$C_9H_{10}INO_2$ M = 291.1 g/mol

CAS: 62875-84-7

To a solution of iodine (13.80 g, 54.50 mmol, 1 eq.) and silver sulfate (17.00 g, 54.50 mmol, 1 eq.) in ethanol (300 mL) was slowly added a solution of ethyl 4-aminobenzoate **49** (CAS: 619-45-4) (9.00 g, 54.50 mmol, 1 eq.) in ethanol (100 mL). After 30 min of stirring at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in DCM (300 mL), washed with NaOH (1 M, 2 x 150 mL) and saturated Na_2SO_3 (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give a brown solid which was purified by FC (Column C, 100% Cyc to 100% DCM) to give the desired iodo compound **45** as a pale yellow powder (13.48 g, 46.32 mmol, 85%).

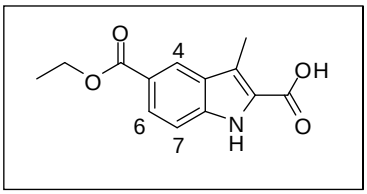
Mp: 80-83 °C (81-83 °C litt.[175]).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.33 (d, 1H, *J* = 1.5, H-2), 7.81 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 6.69 (d, 1H, *J* = 8.5, H-5), 4.50 (brs, 2H, NH_2), 4.32 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 1.36 (t, 3H, *J* = 7.0, CH_3).

……

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

50



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

To a solution of amino compound **45** (1.00 g, 3.44 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL) under argon, 2-oxobutyric acid (1.75 g, 17.18 mmol, 5 eq.) and DABCO (1.16 g, 10.31 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 5 min before addition of palladium(II) diacetate (386 mg, 0.17 mmol, 0.05 eq.). The mixture was stirred at 105 °C for 16 h. After cooling to room temperature, DMF was removed. The resulting solid was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with NaOH (1 M, 4 x 150 mL). The aqueous layers were combined, acidified with HCl (1 M) to pH 3 and extracted with EtOAc (3 x 150 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to obtain a brown solid which was purified by trituration in Et_2O to give the desired indole **50** as a pale brown powder (554 mg, 2.24 mmol, 65%).

Mp : 265-266 °C.

R_f = 0.32 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 7/3).

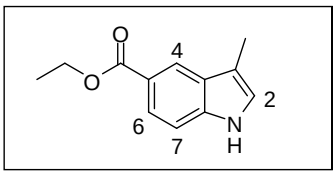
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.39 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 7.90 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.43 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 4.38 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.63 (s, 3H, CH_3), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.0, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 169.2 (C=O), 165.1 (C=O), 140.3 (C), 129.2 (C), 126.9 (C), 126.6 (CH), 124.5 (CH), 122.7 (C), 121.8 (C), 112.8 (CH), 61.9 (CH_2), 14.7 (CH_3), 9.9 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{14}NO_4$ 248.0923 found 248.0926.

Secondary Product (10-20%):

51



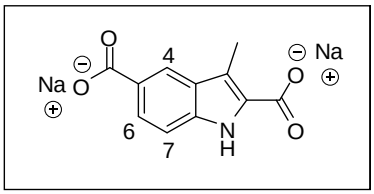
$C_{12}H_{13}NO_2$ M = 203.2 g/mol

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.25 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 7.78 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.33 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 7.05 (s, 1H, H-2), 4.33 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.31 (s, 3H, CH_3), 1.38 (t, 3H, *J* = 7.0, CH_3).

……

3-Methyl-1*H*-indole-2,5-sodium dicarboxylate

52



$C_{11}H_7NO_4Na_2$ M = 263.1 g/mol

Indole **50** (100 mg, 0.40 mmol) was engaged with EtOH (10 mL) and NaOH (2 M, 2 mL) and heated under reflux for 24 h. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired salt **52** as a white salt in a quantitative yield (89 mg, 0.40 mmol).

R_f = 0.21 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.41 (d, 1H, *J* = 1.0, H-4), 7.92 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.0, H-6), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 2.63 (s, 3H, CH_3).

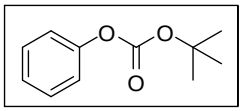
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.4 (C=O), 165.1 (C=O), 140.2 (C), 128.8 (C), 126.3 (C), 125.7 (CH), 123.5 (CH), 122.9 (C), 121.2 (C), 111.9 (CH), 9.9 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-2Na+H)^-$ *m/z* calcd for $C_{11}H_8NO_4$ 218.0459 found 218.0455.

……

***Tert*-butyl phenyl carbonate**[151]

56



$C_{11}H_{14}O_3$ M = 194.2 g/mol

CAS: 6627-89-0

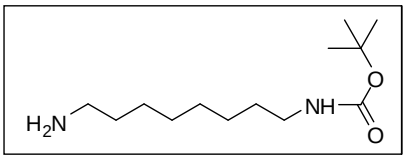
To a solution of phenol (10.00 g, 0.11 mol, 1 eq.) in DCM (50 mL) were added DMAP (1.30 g, 0.01 mol, 0.1 eq.) and Boc_2O (23.40 g, 0.11 mol, 1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then the solvent was removed to give a crude oil which was purified by FC (Column C, 4/1 Cyc/EtOAc to 100% EtOAc) to give the desired compound **56** in a quantitative yield (20.60 g, 0.11 mol).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.26 (m, 3H, 3 x CH_{ar}), 1.59 (s, 9H, 3 x CH_3).

……

***Tert*-butyl 8-aminooctylcarbamate**[150, 176]

57



$C_{13}H_{28}N_2O_2$ M = 244.3 g/mol

CAS: 88829-82-7

To a solution of octane-1,8-diamine (CAS: 373-44-4) (1.00 g, 6.93 mmol, 3 eq.) in DCM (40 mL) were added **56** (1.34 g, 6.93 mmol, 1 eq.) and H_2O (0.8 mL). The mixture was stirred and warmed to reflux for 24 h, then was washed with $NaHCO_3$ (1 M, 3 x 100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and purified by FC (Column B, 4/1 DCM/MeOH to 7/3 DCM/MeOH) to obtain the desired carbamate **57** as a waxy solid (480 mg, 1.96 mmol, 85%).

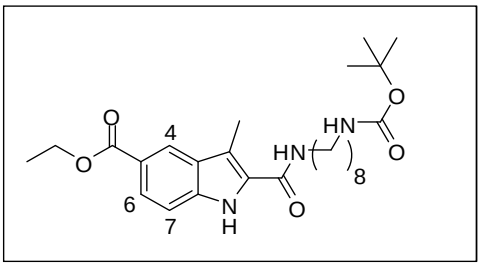
R_f = 0.10 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.50 (s, 1H, NH), 3.10-3.08 (m, 2H, CH_2), 2.67 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 1.44-1.23 (m, 23H, 6 x CH_2, 3 x CH_3, NH_2).

……

Ethyl 2-(8-(*tert*-butoxycarbonylamino)octylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

58



$C_{26}H_{39}N_3O_5$ M = 473.6 g/mol

Ethyl-indole-C8-Boc **58** was obtained, following procedure **A** using indole **50** (200 mg, 0.81 mmol), monoprotected diamine **57** (395 mg, 1.62 mmol), HOBt (120 mg, 0.89 mmol), EDC (170 mg, 0.89 mmol) and DMF (6 + 2 mL), as a white solid (325 mg, 0.69 mmol, 85%).

Mp : 114-115 °C.

R_f = 0.52 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 7/3).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.40 (s, 1H, NH), 8.42 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 7.99 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.43 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 6.10 (m, 1H, NH), 4.45 (s, 1H, NH), 4.41 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.55-3.50 (m, 2H, CH_2), 3.13-3.06 (m, 2H, CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3), 1.70-1.62 (m, 2H, CH_2), 1.50-1.26 (m, 22H, 5 x CH_2, 4 x CH_3).

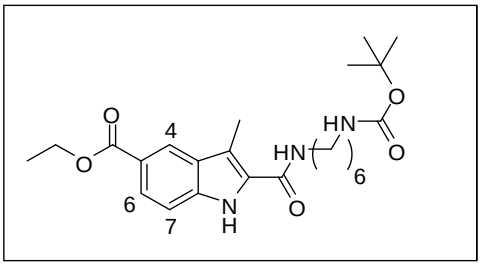
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 167.5 (C=O), 162.3 (C=O), 156.0 (C=O), 137.6 (C), 128.8 (C), 128.4 (C), 125.5 (CH), 123.3 (CH), 122.2 (C), 113.0 (C), 111.4 (CH), 79.1 (C), 60.7 (CH_2), 40.6 (CH_2), 39.9 (CH_2), 30.0 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.1 (2 x CH_2), 28.4 (3 x CH_3), 26.8 (CH_2), 26.6 (CH_2), 14.5 (CH_3), 10.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{26}H_{40}N_3O_5$ 474.2968 found 474.2974.

……

Ethyl 2-(6-(*tert*-butoxycarbonylamino)hexylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

59



$C_{24}H_{35}N_3O_5$ M = 445.6 g/mol

Ethyl-indole-C6-Boc **59** was obtained, following procedure **A** using ethyl-indole **50** (200 mg, 0.81 mmol), *tert*-butyl 6-aminohexylcarbamate (CAS: 51857-17-1) (350 mg, 1.62 mmol), HOBt (120 mg, 0.89 mmol), EDC (170 mg, 0.89 mmol), DMF (5 + 5 mL), as a white powder (281 mg, 0.63 mmol, 78%).

Mp : 260 °C (Dec.).

R_f = 0.68 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.65 (brs, 1H, NH), 8.41 (d, 1H, *J* = 2.0 , H-4), 7.97 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.38 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 6.32 (m, 1H, NH), 4.63 (brs, 1H, NH), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.56-3.43 (m, 2H, CH_2), 3.14 (t, 2H, *J* = 7.0 , CH_2), 2.63 (s, 3H, CH_3), 1.69-1.62 (m, 2H, CH_2), 1.53-1.35 (m, 18H, 3 x CH_2, 4 x CH_3).

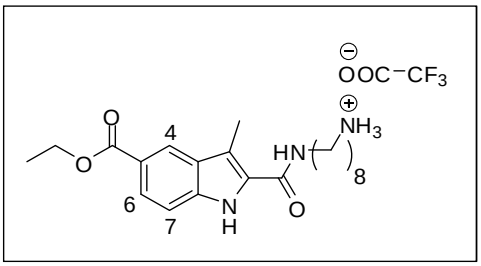
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 167.6 (C=O), 162.4 (C=O), 156.3 (C=O), 137.8 (C), 128.6 (C), 128.4 (C), 125.5 (CH), 123.3 (CH), 122.1 (C), 114.2 (C), 111.4 (CH), 79.4 (C), 60.7 (CH_2), 40.1 (CH_2), 39.5 (CH_2), 30.1 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.5 (3 x CH_3), 26.2 (CH_2), 25.8 (CH_2), 14.6 (CH_3), 10.4 (CH_3)**.**

MS (ES+): ($M+H^+$) *m/z* = 446.

……

8-(5-(Ethoxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)octan-1-amonium 2,2,2-trifluoroacetate

60



$C_{23}H_{32}F_3N_3O_5$ M = 487.5 g/mol

Ethyl-indole-C8-TFA **60** was obtained, following procedure **B** using ethyl-indole-C8-Boc **58** (325 mg, 0.69 mmol), TFA (1 mL), DCM (20 mL), as a pale yellow salt in a quantitative yield (336 mg, 0.69 mmol).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.38 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 7.92 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.44 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.48 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.93 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.60 (s, 3H, CH_3), 1.70-1.60 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.40-1.30 (m, 11H, 4 x CH_2, CH_3).

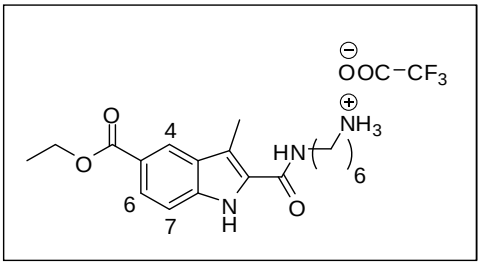
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 169.2 (C=O), 164.7 (C=O), 140.2 (C), 130.3 (C), 129.4 (C), 126.0 (CH), 124.0 (CH), 122.8 (C), 117.0 (C), 112.6 (CH), 61.8 (CH_2), 40.7 (CH_2), 40.6 (CH_2), 30.6 (CH_2), 30.1 (2 x CH_2), 28.6 (CH_2), 27.9 (CH_2), 27.4 (CH_2), 14.7 (CH_3), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}CF_3COO^-)^+$ *m/z* calcd for $C_{21}H_{32}N_3O_3$ 374.2444 found 374.2443.

……

6-(5-(Ethoxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)hexan-1-amonium 2,2,2-trifluoroacetate

61



$C_{21}H_{28}F_3N_3O_5$ M = 459.5g/mol

Ethyl-indole-C6-TFA **61** was obtained, following procedure **B** using ethyl-indole-C6-Boc **59** (223 mg, 0.50 mmol), TFA (1 mL), DCM (20 mL), as a pale yellow powder in a quantitative yield (227 mg, 0.49 mmol).

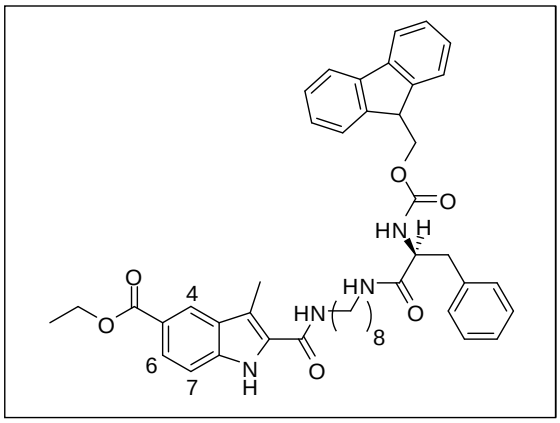
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.36 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.42 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 4.38 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.44 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.93 (t, 2H, *J* = 7.5, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.74 – 1.65 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.51 – 1.44 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.0, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 169.2 (C=O), 164.8 (C=O), 139.9 (C), 130.2 (C), 129.4 (C), 126.1 (CH), 124.0 (CH), 122.8 (C), 117.01 (C), 112.6 (CH), 61.9 (CH_2), 40.7 (CH_2), 40.4 (CH_2), 30.4 (CH_2), 28.5 (CH_2), 27.4 (CH_2), 27.0 (CH_2), 14.7 (CH_3), 9.8 (CH_3).

MS (ES+): $(M\text{-}CF_3COO^-)^+$ *m/z* = 346.

……

(S)-Ethyl 2-(8-(2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-phenylpropanamido)octylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate
62



$C_{45}H_{50}N_4O_6$ M = 742.9 g/mol

Biligand **62** was obtained, following procedure **C1** using ethyl-indole-C8-TFA **60** (232 mg, 0.48 mmol), DIEA (91 µL, 0.52 mmol), Fmoc-*L*-Phenylalanine (CAS: 35661-40-6) (202 mg, 0.52 mmol), HOBt (77 mg, 0.57 mmol), EDC (109 mg, 0.57 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), after purification by FC (column A, 100% DCM to 4/1 DCM/MeOH) as a white powder (212 mg, 0.29 mmol, 60%).

Mp: 152-154 °C.

R_f= 0.92 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.60 (brs, 1H, NH), 8.43 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 7.93 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.71 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.57-7.54 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.45-7.15 (m, 10H, H-7, 9 x CH_{ar}), 6.11 (brs, 1H, NH), 5.97 (brs, 1H, NH), 5.60 (brs, 1H, NH), 4.47-4.36 (m, 5H, CH, 2 x CH_2), 4.19 (m, 1H, CH), 3.55-3.45 (m, 2H, CH_2), 3.22-3.00 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3), 1.60-1.10 (m, 15H, 6 x CH_2, CH_3).

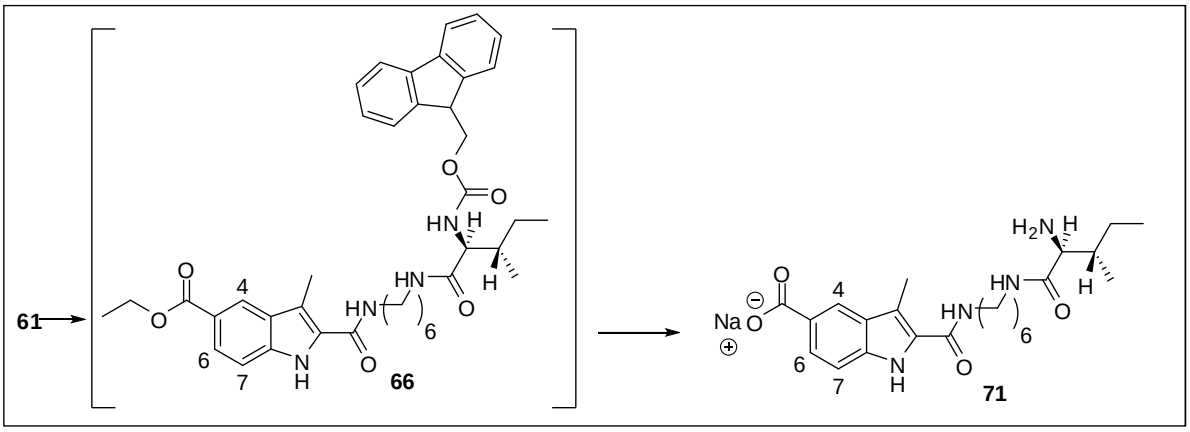
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.8 (C=O), 167.5 (C=O), 162.3 (C=O), 156.2 (C=O), 143.7 (C), 141.3 (2 x C), 137.7 (C), 136.6 (2 x C), 129.0-120.0 (15 x CH), 128.8 (C), 127.1 (C), 122.3 (C), 112.8 (C), 111.5 (CH), 67.1 (CH_2), 60.7 (CH_2), 54.8 (CH), 47.1 (CH), 39.8 (CH_2), 39.3 (CH_2), 39.0 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.6 (CH_2), 28.5 (CH_2), 26.4 (CH_2), 26.3 (CH_2), 14.5 (CH_3), 10.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{45}H_{51}N_4O_6$ 743.3809 found 743.3818.

……

Sodium 2-(((2S,3S)-2-amino-3-methylpentanamido)hexylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

71



$C_{40}H_{48}N_4O_6$ M = 680.8 g/mol **$C_{23}H_{33}N_4NaO_4$ M = 452.2 g/mol**

Biligand **66** was obtained, following procedure **C1** using ethyl-indole-C6-TFA **61** (280 mg, 0.61 mmol), DIEA (117 µL, 0.67 mmol), Fmoc-*L*-isoleucine (CAS: 71989-23-6) (285 mg, 0.67 mmol), HOBt (98 mg, 0.73 mmol), EDC (140 mg, 0.73 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), , as a white foam (282 mg, 0.41 mmol, 68%), $\mathbf{R_f}$ = 0.86 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1), **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.19 (brs, 1H, NH), 8.40 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.76 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.66 – 7.52 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.49 – 7.24 (m, 5H, H-7, 4 x CH_{ar}), 7.03 (brs, 1H, NH), 6.31 (brs, 1H, NH), 5.60 (d, 1H, *J* = 8.5, NH), 4.53 – 4.22 (m, 6H, 2 x CH, 2 x CH_2), 3.80 – 3.70 (m, 1H, C**H**H), 3.50 – 3.42 (m, 1H, C**H**H), 3.41 – 3.32 (m, 1H, C**H**H), 3.22-3.12 (m, 1H, C**H**H), 2.63 (s, 3H, CH_3), 2.13 – 1.80 (m, 2H, CH_2), 1.76-1.07 (m, 12H, CH, 4 x CH_2, CH_3), 1.01 – 0.78 (m, 6H, 2 x CH_3).
Because of its low stability biligand **66** (160 mg, 0.23 mmol) was directly engaged into the next step following procedure **E2** using EtOH (6 mL), dioxane (6 mL), NaOH (5 M, 6 mL) for 18 h to obtain the desired salt **71** as a white foam (59 mg, 0.14 mmol, 58%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.32 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 7.91 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 3.42 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.29 – 3.13 (m, 2H, CH_2), 3.09 (m, 1H, CH), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.70 – 1.37 (m, 10H, 5 x CH_2), 1.20 – 1.07 (m, 1H, CH), 0.96 – 0.85 (m, 6H, 2 x CH_3).

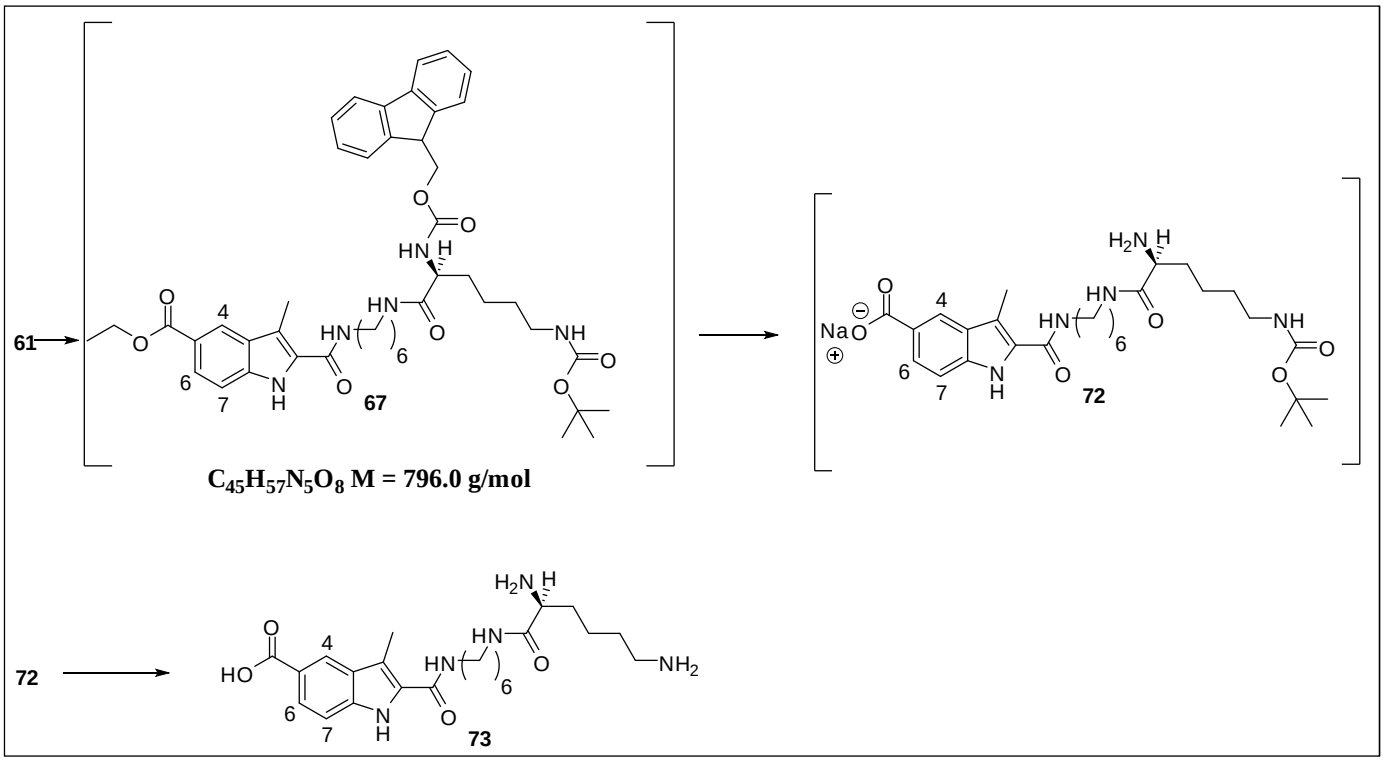
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 176.9 (C=O), 176.6 (C=O), 165.1 (C=O), 138.8 (C), 130.4 (C), 129.3 (C), 129.1 (C), 127.1 (CH), 123.0 (CH), 117.1 (C), 111.5 (CH), 61.0 (CH), 40.5 (CH_2), 40.4 (CH), 40.1 (CH_2), 30.6 (CH_2), 30.4 (CH_2), 27.7 (2 x CH_2), 25.5 (CH_2), 16.0 (CH_3), 11.9 (CH_3), 10.0 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Na+2H)^+$ *m/z* calcd for $C_{23}H_{35}N_4O_4$ 431.2653 found 431.2670.

……

(S)-2-((2,6-Diaminohexanamido)buthylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylic acid

73



$C_{45}H_{57}N_5O_8$ M = 796.0 g/mol

$C_{23}H_{35}N_5O_4$ M = 445.6 g/mol

Biligand **67** was obtained following procedure **C1** using ethyl-indole-C6-TFA **61** (200 mg, 0.43 mmol), DIEA (84 µL, 0.48 mmol), *N*-ε-Boc-*N*-α-Fmoc-*L*-Lysine (CAS: 71989-26-9) (224 mg, 0.48 mmol), HOBt (71 mg, 0.522 mmol), EDC (162 mg, 0.52 mmol), DMF (2 mL + 5 mL), as a white foam (294 mg, 0.37 mmol, 85%), $\mathbf{R_f}$ = 0.89 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1), **^{1}H NMR** (400 MHz, CD_3OD) δ 8.35 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 7.89 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 7.75 (d, 2H, *J* = 7.5, CH_{ar}), 7.66 – 7.59 (m, 2H, CH_{ar}), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 7.36 (t, 2H, *J* = 7.5, CH_{ar}), 7.27 (t, 2H, *J* = 7.5, CH_{ar}), 4.42-4.32 (m, 4H, 2 x CH_2), 4.17 (m, 1H, CH), 4.01 (m, 1H, CH), 3.40 (m, 2H, CH_2), 3.20 (m, 2H, CH_2), 3.02 (m, 2H, CH_2), 2.55 (s, 3H, CH_3), 1.80 – 1.25 (m, 26H, 7 x CH_2 +4 x CH_3).

Because of its low stability, biligand **67** (218 mg, 0.27 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **E2**, using EtOH (6 mL), dioxane (6 mL), NaOH (5 M, 6 mL) for 36 h to obtain **72** after neutralization and removal of the solvent. The crude product **72** was directly engaged into the next step. To a solution of crude product **72** in MeOH (6 mL), HCl (1 M, 4 mL) was added and the reaction was stirred at room temperature for 36 h. After neutralization with NaOH (1 M) the mixture was concentrated *in vacuo* and purified by FC (Column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired acid **73** as a white foam (51 mg, 0.11 mmol, 41%).

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O/CF_3COOD 95/5) δ 8.00 (s, 1H, H-4), 7.59 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.14 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 3.80 (t, 1H, *J* = 7.0, CH), 3.24 – 2.95 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.82 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.16 (s, 3H, CH_3), 1.81 – 1.64 (m, 2H, CH_2), 1.59 – 1.48 (m, 2H, CH_2), 1.44 – 1.23 (m, 6H, 3 x CH_2), 1.21 – 1.08 (m, 4H, 2 x CH_2).

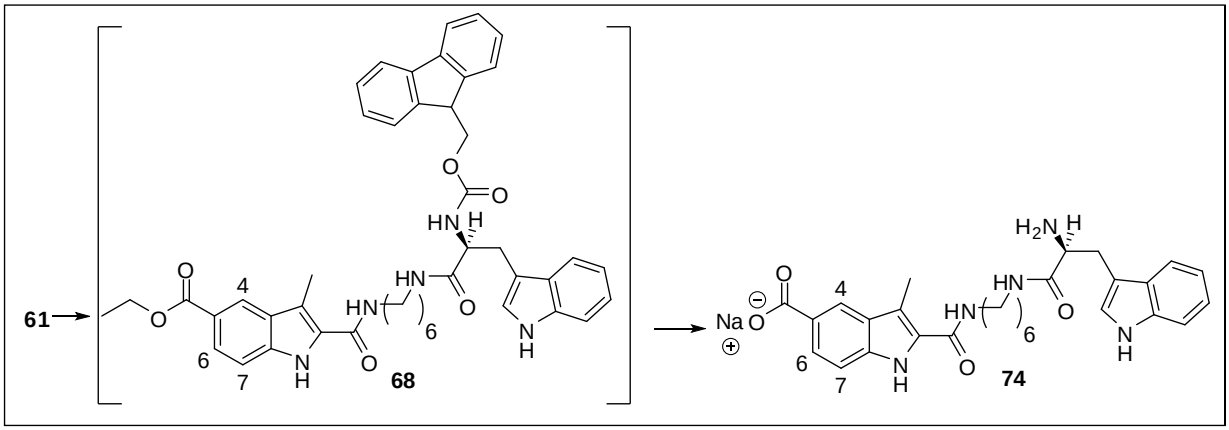
^{13}C NMR not soluble enough in classical NMR solvents for analysis.

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{23}H_{36}N_5O_4$ 446.2762 found 446.2786.

……

Sodium (S)-2-((2-amino-3-(1*H*-indol-2-yl)propanamido)hexylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

74



$C_{45}H_{47}N_5O_6$ M = 753.9 g/mol **$C_{28}H_{32}N_5NaO_4$ M = 525.6 g/mol**

Biligand **68** was obtained, following procedure **C1** using ethyl-indole-C6-TFA **61** (280 mg, 0.61 mmol), DIEA (117 µL, 0.67 mmol), Fmoc-*L*-tryptophane (CAS: 35737-15-6) (285 mg, 0.67 mmol), HOBt (98 mg, 0.73 mmol), EDC (140 mg, 0.71 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), as a white foam (335 mg, 0.44 mmol, 73%), $\mathbf{R_f}$ = 0.56 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1), **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.81 (brs, 1H, NH), 8.70 (brs, 1H, NH), 8.41 (d, 1H, *J* = 1.0, H-4), 7.93 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.0, H-6), 7.77 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.68 (m, 1H, CH_{ar}), 7.58 – 7.52 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.44 – 7.27 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 7.16 (m, 1H, CH_{ar}), 7.10 – 6.96 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 6.23 (brs, 1H, NH), 6.08 (brs, 1H, NH), 5.67 (brs, 1H, NH), 4.68 (m, 1H, CH), 4.48 – 4.38 (m, 4H, 2 x CH_2), 4.20 (m, 1H, CH), 3.43 – 3.00 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3), 1.66 – 1.48 (m, 2H, CH_2), 1.43 (t, 3H, *J* = 7.0, CH_3), 1.30 – 1.16 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.09 – 1.00 (m, 2H, CH_2).

Because of its low stability, biligand **68** (200 mg, 0.26 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **E2**, using EtOH (5 mL), dioxane (5 mL), NaOH (5 M, 5 mL) for 36 h to obtain the desired salt **74** as a white foam (105 mg, 0.20 mmol, 77%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.34 (d, *J* = 1.0, 1H, H-4), 7.92 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.0, H-6), 7.57 (d, 1H, *J* = 8.0, CH_{ar}), 7.36 – 7.30 (m, 2H, H-7, CH_{ar}), 7.08 – 6.95 (m, 3H, 3 x CH_{ar}), 3.60 (m, 1H, CH), 3.37 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.16 – 3.07 (m, 2H, CH_2), 3.05 – 2.97 (m, 2H, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.63 – 1.52 (m, 2H, CH_2), 1.36 – 1.24 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.18 – 1.07 (m, 2H, CH_2).

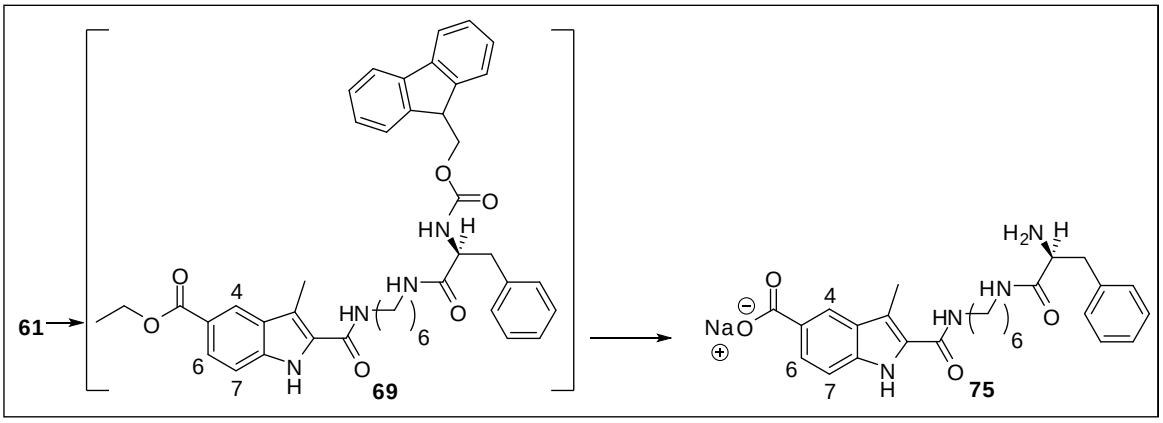
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 176.9 (C=O), 176.6 (C=O), 165.1 (C=O), 138.8 (C), 138.1 (C), 130.3 (C), 129.3 (C), 129.1 (C), 128.8 (C), 127.1 (CH), 124.6 (CH), 123.0 (CH), 122.4 (CH), 119.8 (CH), 119.5 (CH), 117.2 (C), 112.3 (CH), 111.6 (CH), 111.2 (C), 57.1 (CH), 40.5 (CH_2), 40.2 (CH_2), 32.3 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.0 (CH_2), 27.6 (CH_2), 27.4 (CH_2), 10.0 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Na+2H)^+$ *m/z* calcd for $C_{28}H_{34}N_5O_4$ 504.2611 found 504.2628.

……

Sodium (S)-2-((2-amino-3-phenylpropanamido)hexylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

75



$C_{43}H_{46}N_4O_6$ M = 714.3 g/mol **$C_{26}H_{31}N_4NaO_4$ M = 486.5 g/mol**

Biligand **69** was obtained, following procedure **C1** using ethyl-indole-C6-TFA **61** (230 mg, 0.50 mmol), DIEA (95 µL, 0.55 mmol), Fmoc-*L*-phenylalanine (CAS: 35661-40-6) (213 mg, 0.55 mmol), HOBt (81 mg, 0.60 mmol), EDC (116 mg, 0.60 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), as a white salt (251 mg, 0.35 mmol, 70%), $\mathbf{R_f}$ = 0.81 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),**^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.60 (brs, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H-4), 8.01 – 7.90 (m, 2H, 2 x NH), 7.86 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.80 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.67-7.55 (m, 3H, 3 x CH_{ar}), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 7.42-7.35 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 7.33 – 7.15 (m, 7H, NH, 6 x CH_{ar}), 4.32 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 4.26 – 4.06 (m, 4H, 2 x CH, CH_2), 3.39 – 3.22 (m, 2H, CH_2), 3.15 – 2.97 (m, 2H, CH_2), 2.96 – 2.85 (m, 1H, C**H**H), 2.84 – 2.70 (m, 1H, C**H**H), 2.49 (s, 3H, CH_3), 1.60 – 1.46 (m, 2H, CH_2), 1.44 – 1.20 (m, 9H, 3 x CH_2, CH_3).

Because of its low stability, biligand **69** (200 mg, 0.28 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **E2,** using EtOH (5 mL), dioxane (5 mL), NaOH (5 M, 5 mL) for 36 h to obtain indole **75** as a white salt (107 mg, 0.22 mmol, 79%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.35 (s, 1H, H-4), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 7.28 – 7.15 (m, 5H, 5 x CH_{ar}), 3.51 (m, 1H, CH), 3.38 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 3.18 – 3.09 (m, 1H, C**H**H), 3.07 – 2.97 (m, 1H, C**H**H), 2.97 – 2.87 (m, 1H, C**H**H), 2.87 – 2.73 (m, 1H, C**H**H), 2.59 (s, 3H, CH_3), 1.64 – 1.52 (m, 2H, CH_2), 1.39 – 1.26 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.24 – 1.13 (m, 2H, CH_2).

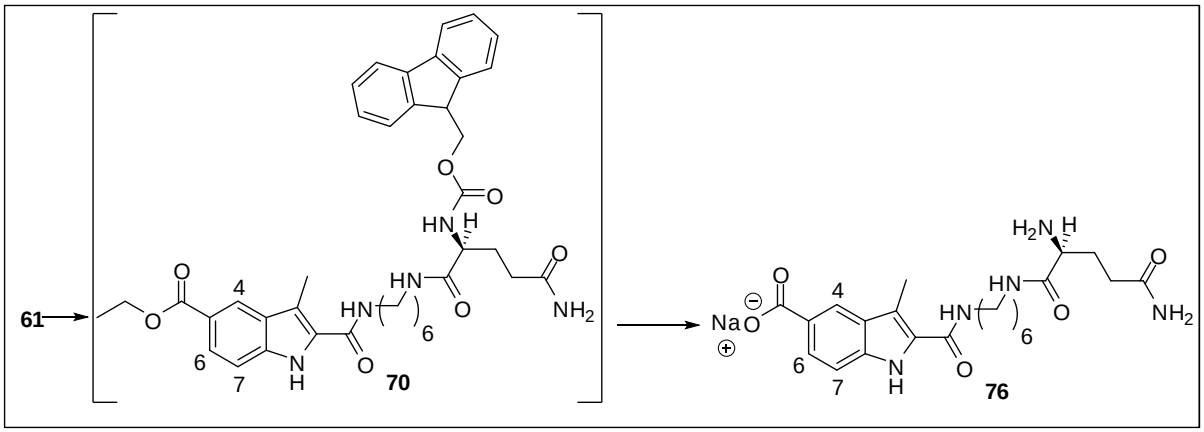
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 176.7 (C=O), 176.3 (C=O), 165.0 (C=O), 138.8 (C), 130.4 (2 x CH), 130.3 (C), 129.5 (2 x CH), 129.4 (2 x C), 129.1 (C), 127.7 (CH), 127.1 (CH), 123.0 (CH), 117.3 (C), 111.7 (CH), 57.8 (CH), 42.6 (CH_2), 40.5 (CH_2), 40.1 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.2 (CH_2), 27.7 (CH_2), 27.5 (CH_2), 10.1 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Na+2H)^+$ *m/z* calcd for $C_{26}H_{33}N_4O_4$ 465.2496 found 465.2511.

……

Sodium (S)-2-((2-amino-4-carboxybutanamido)hexylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

76



$C_{39}H_{45}N_5O_7$ M = 695.8 g/mol **$C_{22}H_{29}N_4NaO_6$ M = 468.5 g/mol**

Biligand **70** was obtained, following procedure **C1** using ethyl-indole-C6-TFA **61** (286 mg, 0.62 mmol), DIEA (118 µL, 0.68 mmol), Fmoc-*L*-glutamine (CAS: 118609-68-0) (251 mg, 0.68 mmol), HOBt (100 mg, 0.75 mmol), EDC (143 mg, 0.75 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), as a white foam (294 mg, 0.42 mmol, 68%), $\mathbf{R_f}$ = 0.72 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),**^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.55 (brs, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H-4), 7.95 - 7.25 (m, 14H, 4 x NH, 8 x CH_{ar}, H-6, H-7), 6.77 (brs, 1H, NH), 4.32 (q, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 4.28 – 4.14 (m, 3H, CH, CH_2), 3.91 (m, 1H, CH), 3.30 – 3.23 (m, 2H, CH_2), 3.10 – 3.02 (m, 2H, CH_2), 2.50 (s, 3H, CH_3), 2.15-2.03 (m, 2H, CH_2), 1.90-1.83 (m, 1H, C C**H**H), 1.78 – 1.68 (m, 1H, C**H**H), 1.55 – 1.47 (m, 2H, CH_2), 1.46 – 1.28 (m, 9H, 3 x CH_2, CH_3).

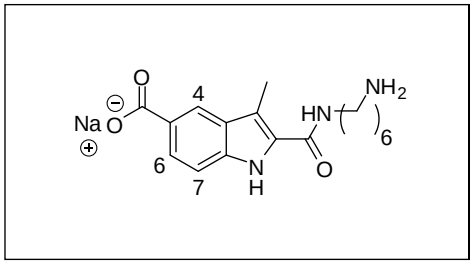
Because of its low stability, biligand **70** (200 mg, 0.29 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **E2**, using EtOH (8 mL), dioxane (8 mL), NaOH (5 M, 8 mL) for 14 h to obtain the desired salt **76** as a white foam (67 mg, 0.14 mmol, 50%).
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.34 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 7.93 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 3.42-3.16 (m, 5H, 2 x CH_2, CH), 2.61 (s, 3H, CH_3), 2.27 (t, 2H, *J* = 7.5, CH_2), 2.02-1.93 (m, 1H, C**H**H), 1.88-1.78 (m, 1H, C**H**H), 1.70 – 1.60 (m, 2H, CH_2), 1.57 – 1.47 (m, 2H, CH_2), 1.46 – 1.35 (m, 4H, 2 x CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 181.8 (C=O), 177.1 (C=O), 176.7 (C=O), 165.0 (C=O), 138.8 (C), 130.2 (C), 129.3 (C), 129.0 (C), 127.0 (CH), 122.9 (CH), 117.4 (C), 111.6 (CH), 55.9 (CH), 40.5 (CH_2), 40.2 (CH_2), 35.4 (CH_2), 33.6 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.3 (CH_2), 27.7 (CH_2), 27.6 (CH_2), 10.0 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Na+2H)^+$ *m/z* calcd for $C_{22}H_{31}N_4O_6$ 447.2238 found 447.2264.

……

Sodium 2-(6-aminohexylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate
77



$C_{17}H_{22}NaN_3O_3$ M = 339.1 g/mol

To a solution of ethyl-indole-C6-TFA **61** (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) in EtOH (5 mL) was added NaOH (1 M, 0.5 mL). The solution was heated under reflux for 24 h, and the mixture was concentrated *in vacuo.* The resulting salt was purified by FC (Column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired salt **77** in a quantitative yield (38 mg, 0.11 mmol).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.38 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 3.44 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.93 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.71 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.69 (m, 4H, 2 x CH_2).

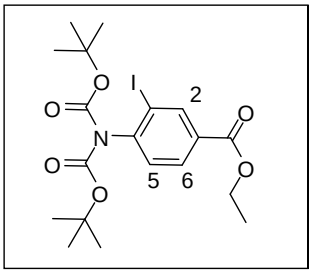
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 172.1 (C=O), 165.2 (C=O), 140.0 (C), 130.0 (C), 128.7 (C), 126.2 (CH), 124.3 (CH), 122.9 (C), 117.4 (C), 112.5 (CH), 40.2 (CH_2), 39.6 (CH_2), 33.0 (CH_2), 31.5 (CH_2), 27.5 (CH_2), 25.8 (CH_2), 9.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Na+2H)^+$ *m/z* calcd for $C_{17}H_{24}N_3O_3$ 318.1818 found 318.1819.

……

Ethyl 4-(bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-iodobenzoate

78



$C_{19}H_{26}INO_6$ M = 491.3 g/mol

To a solution of substituted aniline **45** (4.00 g, 13.65 mmol, 1 eq.) in DCM (100 mL), DMAP (0.17 g, 1.36 mmol, 0.1 eq.), triethylamine (1.9 mL, 13.65 mmol, 1 eq.) and Boc_2O (6.30 g, 28.66 mmol, 2.1 eq.) were added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and washed with HCl (0.1 M, 100 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and the resulting solid was purified by FC (Column C, 9/1 Cyc/EtOAc to 4/1) to give the desired product **78** as a pale yellow powder in a quantitative yield (6.71 g, 13.65 mmol).

Mp : 118-120 °C.

R_f = 0.48 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.50 (d, 1H, *J* = 1.0, H-2), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.0, H-6), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.0, H-5), 4.38 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 1.43-1.39 (m, 21H, 7 x CH_3).

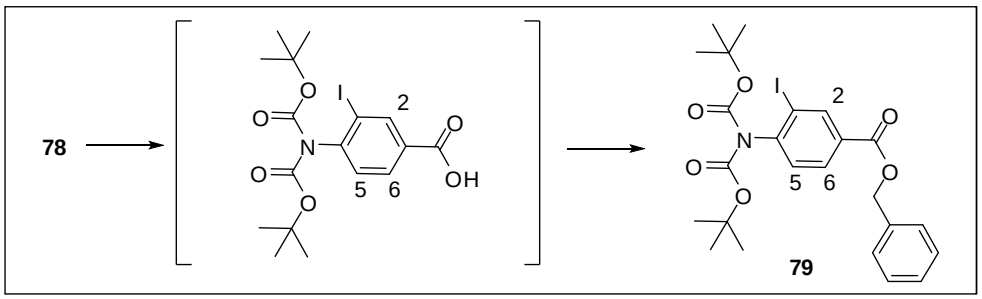
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.6 (C=O), 149.7 (2 x C=O), 146.0 (C), 140.2 (CH), 130.9 (C), 130.1 (CH), 128.7 (CH), 99.4 (C), 83.3 (2 x C), 61.6 (CH_2), 27.8 (6 x CH_3), 14.3 (CH_3).

HR-ESIMS: M^+ *m/z* calcd for $C_{19}H_{26}INO_6$ 491.0805 found 491.0815.

……

Benzyl 4-(bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-iodobenzoate

79



$C_{24}H_{28}INO_6$ M = 553.4 g/mol

To a solution of **78** (6.70 g, 13.65 mmol, 1 eq.) in EtOH (200 mL) was added NaOH (1 M, 40 mL). The solution was stirred for 12 h at room temperature and then concentrated *in vacuo* to remove EtOH. The resulting solid was dissolved in H_2O, acidified with HCl (1 M) to pH 3 and then extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The organic layers was dried over anhydrous Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* to give the acid intermediate which was directly engaged into the next step.

To a solution of this intermediate in DMF (100 mL), CDI (2.43 g, 15.01 mmol, 1.1 eq.) were added and stirred 30 min then benzyl alcohol (1.56 mL, 15.01 mmol, 1.1 eq.) was added. The reaction was stirred for 24 h then concentrated *in vacuo* and purified by FC (column C, 100% Cyc to 100% EtOAc) to give the desired product **79** as a pale yellow powder (7.17 g, 12.97 mmol, 95%).

Mp : 96-98 °C.

R_f = 0.60 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.52 (s, 1H, H-2), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.47-7.25 (m, 6H, H-5, 5 x CH_{ar}), 5.37 (s, 2H, CH_2), 1.42-1.39 (m, 18H, 6 x CH_3).

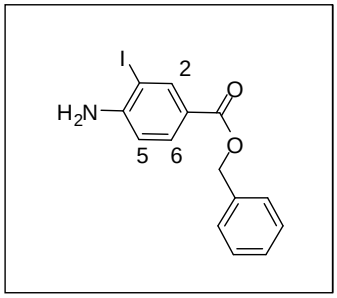
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.6 (C=O), 149.8 (2 x C=O), 146.4 (C), 140.4 (CH), 135.7 (C), 130.7 (C), 130.4 (2 x CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (2 x CH), 99.7 (C), 83.5 (2 x C), 67.4 (CH_2), 28.0-27.0 (6 x CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{24}H_{28}INO_6Na$ 576.0859 found 576.0879.

……

Benzyl 4-amino-3-iodobenzoate

80



$C_{14}H_{12}INO_2$ M = 353.1 g/mol

To a solution of carbamate **79** (5.66 g, 10.23 mmol, 1 eq.) in DCM (100 mL) was added TFA (6 mL). The mixture was stirred at room temperature for 4 h and then NaOH (1 M) was added to reach basic pH (10-12). The aqueous layer was extracted with DCM (2 x 100 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give the desired amine **80** as a yellow powder in a quantitative yield (3.60 g, 10.23 mmol).

Mp : 80-82 °C.

R_f = 0.32 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.33 (d, 1H, *J* = 2.0, H-2), 7.86 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.0, H-6), 7.46-7.33 (m, 5H, H_{ar}), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.5, H-5), 5.32 (s, 2H, CH_2), 4.53 (brs, 2H, NH_2).

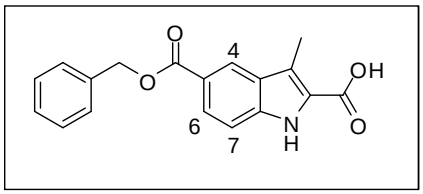
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165.1 (C=O), 150.9 (C), 141.1 (CH), 136.2 (C), 131.4 (CH), 128.6 (2 x CH), 128.2 (3 x CH), 121.3 (C), 113.1 (CH), 82.1 (C), 66.5 (CH_2).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{14}H_{13}INO_2$ 353.9811 found 353.9811.

……

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

81



$C_{18}H_{15}NO_4$ M = 309.3 g/mol

To a solution of iodoaniline **80** (1.00 g, 2.83 mmol, 1 eq.) in DMF (10 mL), 2-oxobutyric acid (1.44 g, 14.16 mmol, 5 eq.) and DABCO (945 mg, 8.49 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 5 min and then palladium (II) diacetate (32 mg, 0.14 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 105 °C, stirred for 16 h, and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with H_2O (150 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4, then concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid which was purified by FC (Column B, 100% Cyc to 100% EtOAc) to afford the desired indole **81** as a brown powder (656 mg, 2.12 mmol, 75%).

Mp : 192-194 °C.

R_f = 0.29 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.36 (s, 1H, H-4), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.45-7.30 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.34 (s, 2H, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3).

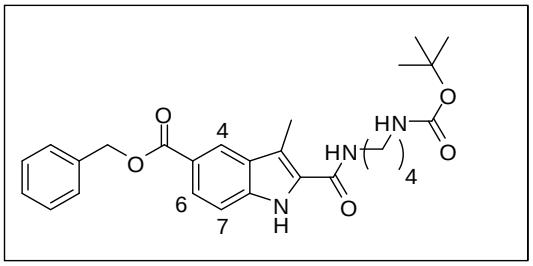
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.2 (C=O), 164.5 (C=O), 139.7 (C), 137.4 (C), 129.0 (2 x CH), 128.6 (C), 128.4 (3 x CH, C), 126.1 (CH), 124.1 (CH), 121.9 (C), 121.2 (C), 112.3 (CH), 66.9 (CH_2), 9.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{18}H_{15}NO_4Na$ 331.0820 found 331.0824.

……

Benzyl 2-(4-(*tert*-butoxycarbonylamino)butylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

82



$C_{27}H_{33}N_3O_5$ M = 479.6 g/mol

Indole **82** was obtained, following procedure **A** using indole **81** (1.00 g, 3.23 mmol), *tert*-butyl 2-aminobutylcarbamate (CAS: 68076-36-8) (1.12 g, 6.50 mmol), EDC (0.74 g, 3.88 mmol), HOBt (0.52 g, 3.88 mmol), DMF (15 + 5 mL), as a brown foam (1.17 g, 2.45 mmol, 76%).

R_f = 0.22 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 9.57 (brs, 1H, NH), 8.46 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 8.00 (dd, *J* = 8.0, 1.5, 1H, H-6), 7.52-7.34 (m, 7H, H-7, 5 x CH_{ar}, NH), 6.60 (brs, 1H, NH), 5.41 (s, 2H, CH_2), 3.56 (m, 2H, CH_2), 3.22 (m, 2H, CH_2), 2.63 (s, 3H, CH_3), 1.76-1.56 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.41 (m, 9H, 3 x CH_3).

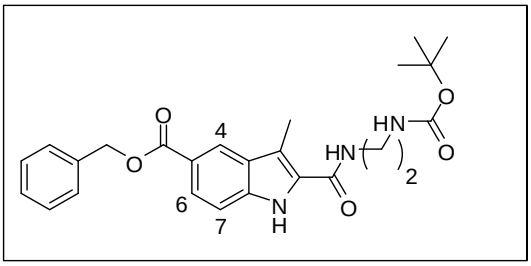
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.9 (C=O), 164.7 (C=O), 158.7 (C=O), 140.0 (C), 138.0 (C), 130.3 (C), 129.6 (2 x CH), 129.4 (C), 129.2 (3 x CH), 126.1 (CH), 124.1 (CH), 122.5 (C), 116.9 (C), 112.6 (CH), 79.5 (C), 67.5 (CH_2), 40.4 (CH_2), 38.1 (CH_2), 28.7 (3 x CH_3), 28.6 (2 x CH_2), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M)^+$ *m/z* calcd for $C_{27}H_{33}N_3O_5$ 479.2420 found 479.2418.

……

Benzyl 2-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate

83



$C_{25}H_{29}N_3O_5$ M = 451.5 g/mol

Biligand **83** was obtained, following procedure **A** using indole **81** (1.00 g, 3.23 mmol), *tert*-butyl 2-aminoethylcarbamate (CAS: 57260-73-8) (1.03 g , 6.46 mmol), EDC (740 mg, 3.88 mmol), HOBt (523 mg, 3.88 mmol), DMF (15 + 5 mL), as a brown foam (1.18 g, 2.61 mmol, 80%).

Mp : 168-170 °C.

R_f = 0.32 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.39 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.49-7.31 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.38 (s, 2H, CH_2), 3.48 (m, 2H, CH_2), 3.30 (m, 2H, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.41 (m, 9H, 3 x CH_3).

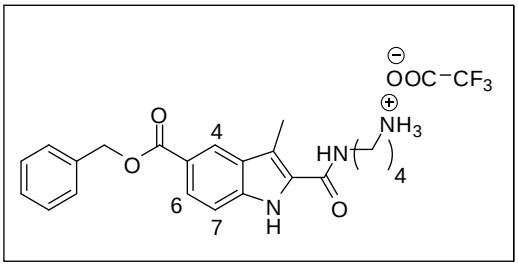
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 170.0 (C=O), 167.0 (C=O), 159.3 (C=O), 140.5 (C), 138.7 (C), 129.6 (2 x CH), 129.2 (C), 129.0 (3 x CH, C), 126.1 (CH), 124.2 (CH), 117.5 (C), 122.5 (C), 112.6 (CH), 79.4 (C), 67.5 (CH_2), 41.0 (2 x CH_2), 28.7 (3 x CH_3), 9.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd $C_{25}H_{30}N_3O_5$ for 451.2107 found 451.2113.

……

4-(5-(Benzyloxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)butan-1-amonium 2,2,2-trifluoroacetate

84



$C_{24}H_{26}F_3N_3O_5$ M = 493.5 g/mol

Indole **84** was obtained, following procedure **D** using benzyl-indole-C4-Boc **82** (1.46 g, 3.03 mmol), TFA (3 mL), DCM (30 mL), as a yellow salt in a quantitative yield (1.49 g, 3.03 mmol).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.38 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.48-7.32 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.36 (s, 2H, CH_2), 3.47 (m, 2H, CH_2), 2.99 (m, 2H, CH_2), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.75 (m, 4H, 2 x CH_2).

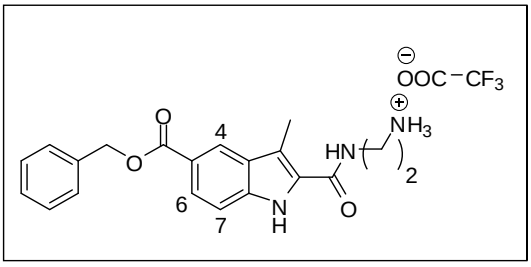
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.8 (C=O), 164.8 (C=O), 140.0 (C), 138.0 (C), 129.6 (2 x CH), 129.4 (C), 129.2 (3 x CH, C), 126.2 (CH), 124.1 (CH), 122.6 (C), 117.1 (C), 112.7 (CH), 67.5 (CH_2), 40.4 (CH_2), 39.8 (CH_2), 27.7 (CH_2), 26.0 (CH_2), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}CF_3COO^-)^+$ *m/z* calcd for $C_{22}H_{26}N_3O_3$ 380.1969 found 380.1972.

……

2-(5-(Benzyloxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethanamonium 2,2,2-trifluoroacetate

85



$C_{22}H_{22}F_3N_3O_5$ M = 465.4 g/mol

Salt **85** was obtained, following procedure **D** using benzyl-indole-C2-Boc **83** (1.18 g, 2.61 mmol), TFA (3 mL), DCM (20 mL), as a waxy solid in a quantitative yield (1.21 g, 2.61 mmol).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.42 (s, 1H, H-4), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.51-7.31 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.38 (s, 2H, CH_2), 3.71 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.20 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3).

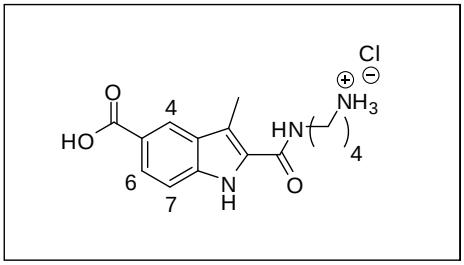
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.8 (C=O), 165.7 (C=O), 140.0 (C), 138.0 (C), 129.6 (2 x CH), 129.4 (C), 129.2 (3 x CH, C), 126.4 (CH), 124.3 (CH), 122.7 (C), 117.7 (C), 112.8 (CH), 67.5 (CH_2), 41.2 (CH_2), 38.6 (CH_2) 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}CF_3COO^-)^+$ *m/z* calcd for $C_{20}H_{22}N_3O_3$ 352.1656 found 352.1660.

……

4-(5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)butan-1-amonium chloride

86



$C_{15}H_{20}ClN_3O_3$ M = 325.8 g/mol

Indole **86** was obtained, following procedure **E1** using benzyl-indole-C4-TFA **84** (100 mg, 0.20 mmol), $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (10 mg), MeOH (5 mL), as a pale yellow salt (19 mg, 0.06 mmol, 30%).

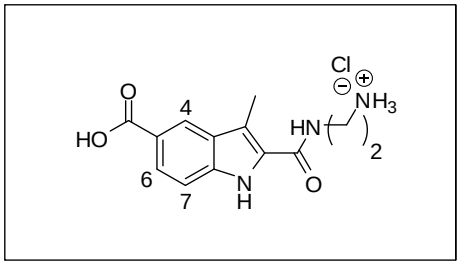
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.37 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 3.50 (m, 2H, CH_2), 3.00 (m, 2H, CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.75 (m, 4H, 2 x CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.3 (C=O), 164.9 (C=O), 139.9 (C), 129.9 (C), 129.4 (C), 126.5 (CH), 124.2 (CH), 123.4 (C), 117.2 (C), 112.4 (CH), 40.4 (CH_2), 39.8 (CH_2), 27.6 (CH_2), 26.0 (CH_2), 9.9 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{20}N_3O_3$ 290.1505 found 290.1512.

……

2-(5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethylamonium chloride
87



$C_{13}H_{16}ClN_3O_3$ M = 297.7 g/mol

Salt **87** was obtained, following procedure **E1** using benzyl-indole-C2-TFA **85** (100 mg, 0.21 mmol), $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (10 mg), MeOH (5 mL), as a pale yellow salt (25 mg, 0.08 mmol, 40%).

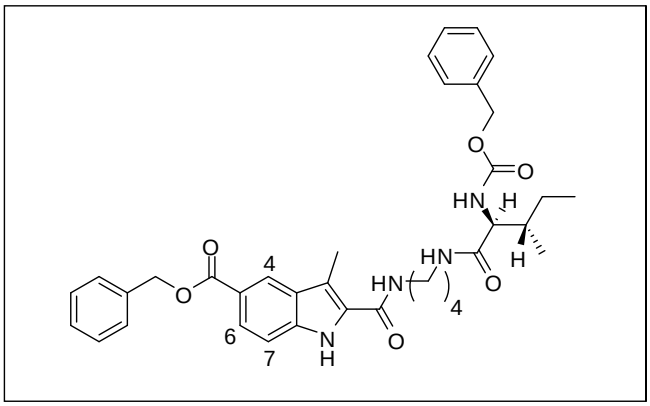
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.41 (s, 1H, H-4), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 3.72 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.19 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.62 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 170.5 (C=O), 165.1 (C=O), 139.4 (C), 137.6 (C), 129.4 (C), 128.2 (C), 125.9 (CH), 123.7 (CH), 116.4 (C), 111.9 (CH), 41.5 (CH_2), 40.8 (CH_2), 9.2 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{16}N_3O_3$ 262.1192 found 262.1202.

……

Benzyl 2-(4-((2S,3S)-2-(benzyloxycarbonylamino)-3-methylpentanamido)butylcarbamoyl)-3-methyl-1*H*-indole-5-carboxylate
88



$C_{36}H_{42}N_4O_6$ M = 626.7 g/mol

Biligand **88** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C4-TFA **84** (286 mg, 0.58 mmol), DIEA (111 µL, 0.64 mmol), *N*α-Z-*L*-Isoleucine (3160-59-6) (169 mg, 0.64 mmol), CDI (112 mg, 0.70 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), as a yellow powder (188 mg, 0.30 mmol, 52%).

R_f = 0.32 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

Mp : 198-200 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.12 (brs, 1H, NH), 8.40 (s, 1H, H-4), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.52-7.24 (m, 11H, H-7, 10 x CH_{ar}), 6.89 (brs, 1H, NH), 6.62 (brs, 1H, NH), 5.53 (brs, 1H, NH), 5.38 (s, 2H, CH_2), 5.09 (s, 2H, CH_2), 4.10 (m, 1H, CH), 3.45 (m, 2H, CH_2), 3.30 (m, 2H, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.54-1.51 (m, 7H, 3 x CH_2, CH), 0.92-0.83 (m, 6H, 2 x CH_3).

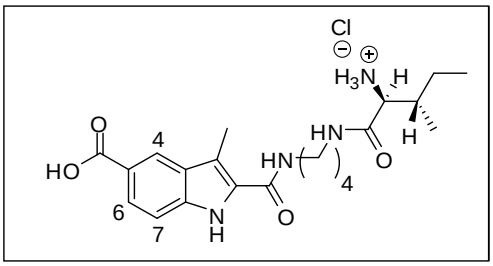
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.0 (C=O), 167.2 (C=O), 162.5 (C=O), 156.5 (C=O), 137.9 (C), 136.4 (C), 135.9 (CH), 128.5-127.8 (9 x CH, 2 x C), 125.5 (C),123.5 (C), 121.6 (CH), 117.6 (C), 115.3 (CH), 111.4 (CH), 67.1 (CH_2), 66.4 (CH_2), 59.7 (CH), 39.2 (CH_2), 38.9 (CH_2), 36.4 (CH), 26.7 (CH_2), 26.5 (CH_2), 24.6 (CH_2), 15.5 (CH_3), 11.1 (CH_3), 10.1 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M)^+$ *m/z* calcd for $C_{36}H_{42}N_4O_6$ 626.3104 found 626.3106.

……

(2S,3S)-1-((5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)butylamino)-3-methyl-1-oxopentan-2-amonium chloride

89



$C_{21}H_{31}ClN_4O_4$ M = 438.9 g/mol

Biligand **89** was obtained, following procedure **E1** using biligand **88** (188 mg, 0.30 mmol), $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (20 mg) and MeOH (5 mL), as a pale yellow salt (51 mg, 0.12 mmol, 40%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.28 (s, 1H, H-4), 7.85 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.28 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 3.48 (m, 1H, CH), 3.36 (m, 2H, CH_2), 3.22 (m, 2H, CH_2), 2.51 (s, 3H, CH_3), 1.60-1.57 (m, 6H, 3 x CH_2), 1.17-1.04 (m, 1H, CH), 0.93-0.82 (m, 6H, 2 x CH_3).

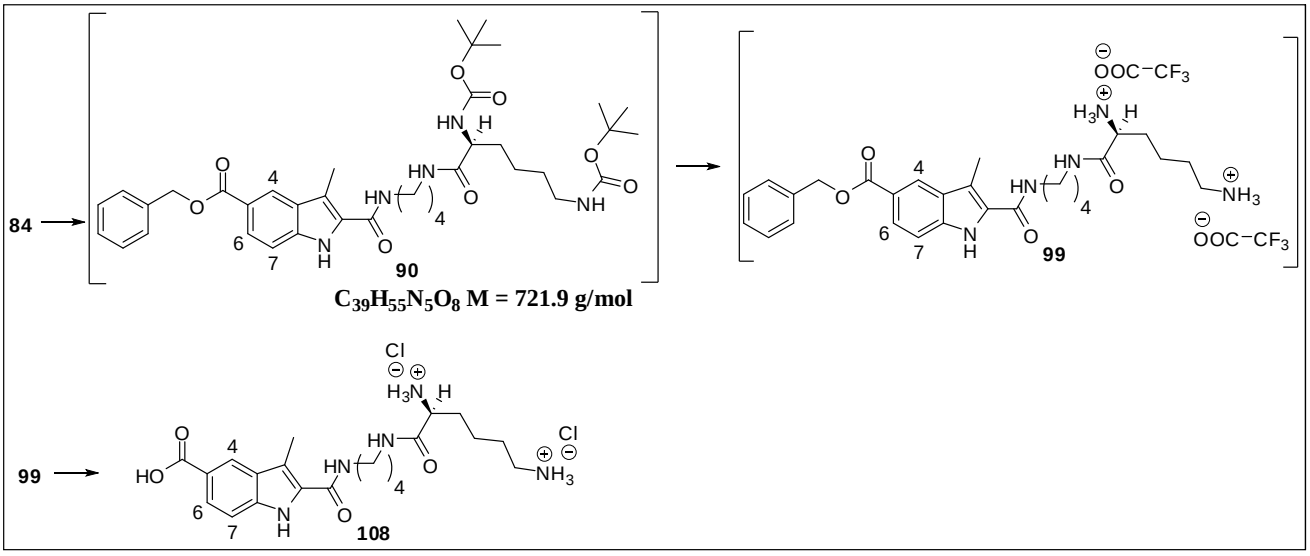
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.0 (C=O), 164.3 (2 x C=O), 138.5 (C), 136.4 (C), 128.6 (C), 126.2 (CH), 122.7 (CH), 118.5 (C), 116.6 (C), 111.3 (CH), 58.9 (CH), 39.5 (2 x CH_2), 38.0 (CH), 27.4 (CH_2), 27.1 (CH_2), 25.0 (CH_2), 14.7 (CH_3), 11.0 (CH_3), 9.4 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{21}H_{31}N_4O_4$ 403.2345 found 403.2328.

……

(S)-6-(4-(5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)butylamino)-6-oxohexane-1,5-diamonium chloride

108



$C_{21}H_{33}Cl_2N_5O_4$ M = 490.4 g/mol

Biligand **90** was obtained, following procedure **C1** using benzyl-indole-C4-TFA **84** (228 mg, 0.46 mmol), DIEA (110 µL, 0.60 mmol), (*N*α,*N*ε)diBoc-*L*-Lysine (CAS: 2483-46-7) (176 mg, 0.51 mmol), HOBt (75 mg, 0.56 mmol), EDC (106 mg, 0.56 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), after purification by FC (column A, 100% DCM to 4/1 DCM/MeOH), as a white solid (216 mg, 0.30 mmol, 65%), $\mathbf{R_f}$ = 0.68 (SiO_2, 100% EtOAc).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.51 (brs, 1H, NH), 8.35 (d, 1H, *J* = 1.0, H-4), 7.89 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.0, H-6), 7.60-7.33 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 7.14 (brs, 1H, NH), 6.92 (brs, 1H, NH), 5.55 (brs, 1H, NH), 5.20 (s, 2H, CH_2), 4.82 (brs, 1H, NH), 4.10 (m, 1H, CH), 3.44 (m, 2H, CH_2), 3.25 (m, 2H, CH_2), 3.03 (m, 2H, CH_2), 2.59 (s, 3H, CH_3), 1.80-1.20 (m, 28H, 6 x CH_3, 5 x CH_2).

Because of its low stability, biligand **90** (195 mg, 0.30 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (20 mL) to obtain the desired crude salt **99**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (20 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **108** (37 mg, 0.07 mmol, 25%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.20 (d, 1H, *J* = 1.0, H-4), 7.79 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.0, H-6), 7.19 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 3.29 (m, 2H, CH_2), 3.11 (m, 3H, CH_2, CH), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.41 (m, 2H, CH_2), 1.52-1.16 (m, 10H, 5 x CH_2).

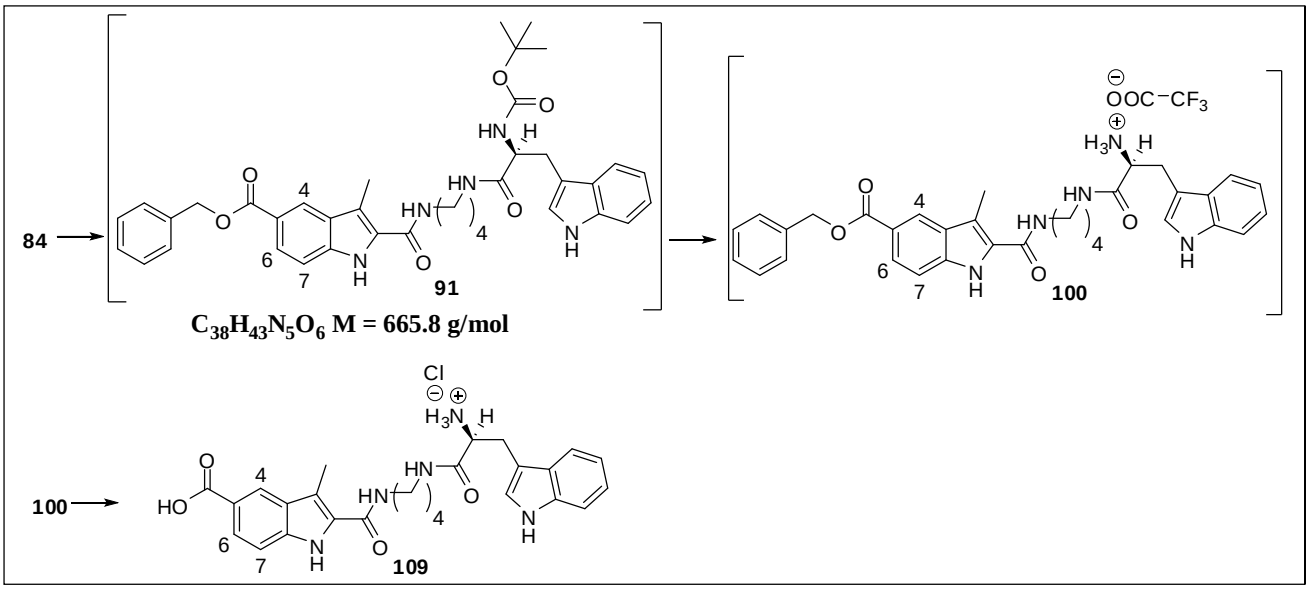
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 177.6 (C=O), 176.7 (C=O), 165.1 (C=O), 138.8 (C), 130.3 (C), 129.4 (C), 129.1 (C), 127.0 (CH), 122.9 (CH), 117.4 (C), 111.7 (CH), 56.2 (CH), 42.3 (CH_2), 40.2 (CH_2), 39.9 (CH_2), 36.3 (CH_2), 33.7 (CH_2), 28.0 (CH_2), 27.9 (CH_2), 24.1 (CH_2), 10.1 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}H\text{-}2Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{21}H_{32}N_5O_4$ 418.2449 found 418.2446.

……

(S)-1-(4-(5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)butylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-amonium chloride

109



$C_{38}H_{43}N_5O_6$ M = 665.8 g/mol

$C_{26}H_{30}ClN_5O_4$ M = 512.0 g/mol

Biligand **91** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C4-TFA **84** (286 mg, 0.58 mmol), DIEA (111 µL, 0.64 mmol), *N*α-Boc-*L*-Tryptophane (CAS: 144599-95-1) (194 mg, 0.64 mmol), CDI (112 mg, 0.70 mmol), DMF (3 mL + 6 mL) as a yellow crude oil (285 mg, 0.43 mmol, 74%), $\mathbf{R_f}$ = 0.79 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.83 (brs, 1H, NH), 8.57 (brs, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H-4), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.65 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 7.51-7.09 (m, 10H, 10 x CH_{ar}), 6.46 (brs, 1H, NH), 6.02 (brs, 1H, NH), 5.42 (s, 2H, CH_2), 4.47 (brs, 1H, NH), 3.73 (m, 1H, CH), 3.40-3.00 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3), 1.55-1.20 (m, 13H, 2 x CH_2, 3 x CH_3).
Because of its low stability, biligand **91** (285 mg, 0.43 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (10 mL) to obtain the desired crude salt **100**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (30 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **109** (66 mg, 0.13 mmol, 30%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.37 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 7.40-7.00 (m, 5H, 5 x CH_{ar}), 4.06 (m, 1H, CH), 3.36-3.03 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.59-1.40 (m, 4H, 2 x CH_2).

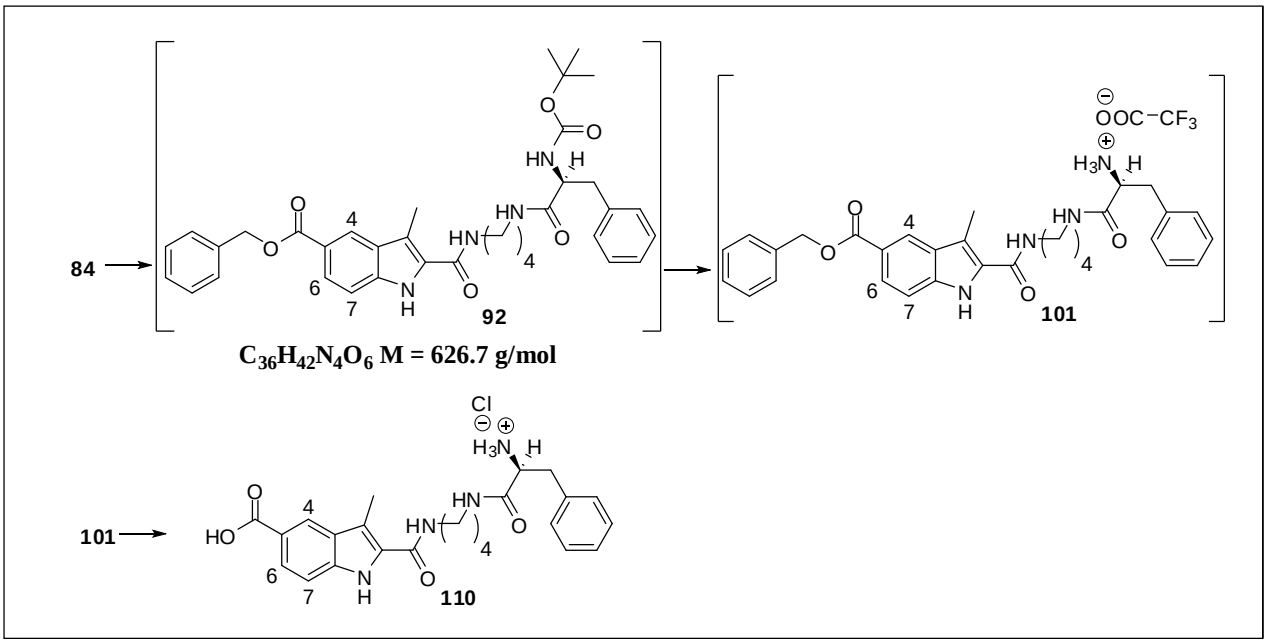
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 170.7 (2 x C=O), 165.2 (C=O), 140.1 (C), 138.6 (C), 130.3 (C), 129.8 (C), 128.8 (C), 127.0 (C), 125.9 (CH), 124.5 (2 x C), 123.3 (CH), 120.7 (CH), 119.6 (CH), 117.6 (CH), 113.0 (CH), 112.8 (CH), 108.7 (CH), 55.8 (CH), 40.6 (CH_2), 40.7 (CH_2), 29.4 (CH_2), 28.3 (CH_2), 27.8 (CH_2), 10.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{26}H_{30}N_5O_4$ 476.2298 found 476.2314.

……

(S)-1-((5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)buthylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-amonium chloride

110



$C_{36}H_{42}N_4O_6$ M = 626.7 g/mol

$C_{24}H_{29}ClN_4O_4$ M = 473.0 g/mol

Biligand **92** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C4-TFA **84** (286 mg, 0.58 mmol), DIEA (111 µL, 0.64 mmol), *N*α-Boc-*L*-Phenylalanine (CAS: 13734-34-4) (169 mg, 0.64 mmol), CDI (112 mg, 0.70 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), as a yellow crude oil (272 mg, 0.43 mmol, 75%), $\mathbf{R_f}$ = 0.89 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.33 (brs, 1H, NH) 8.41 (s, 1H, H-4), 7.94 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.51-7.35 (m, 11H, H-7, 10 x CH_{ar}), 6.79 (brs, 1H, NH), 6.47 (m, 1H, NH), 5.39 (s, 2H, CH_2), 5.01 (m, 1H, NH), 4.36 (m, 1H, CH), 3.50 (m, 4H, 2 x CH_2), 3.01 (m, 2H, CH_2), 2.59 (s, 3H, CH_3), 1.78 (m, 13H, 2 x CH_2, 3 x CH_3).

Because of its low stability, biligand **92** (272 mg, 0.43 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (10 mL) to obtain the desired crude salt **101**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (30 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **110** (71 mg, 0.15 mmol, 35%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.36 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 7.31-7.13 (m, 5H, 5 x CH_{ar}), 4.06 (m, 1H, CH), 3.37-3.09 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.52-1.63 (m, 4H, 2 x CH_2).

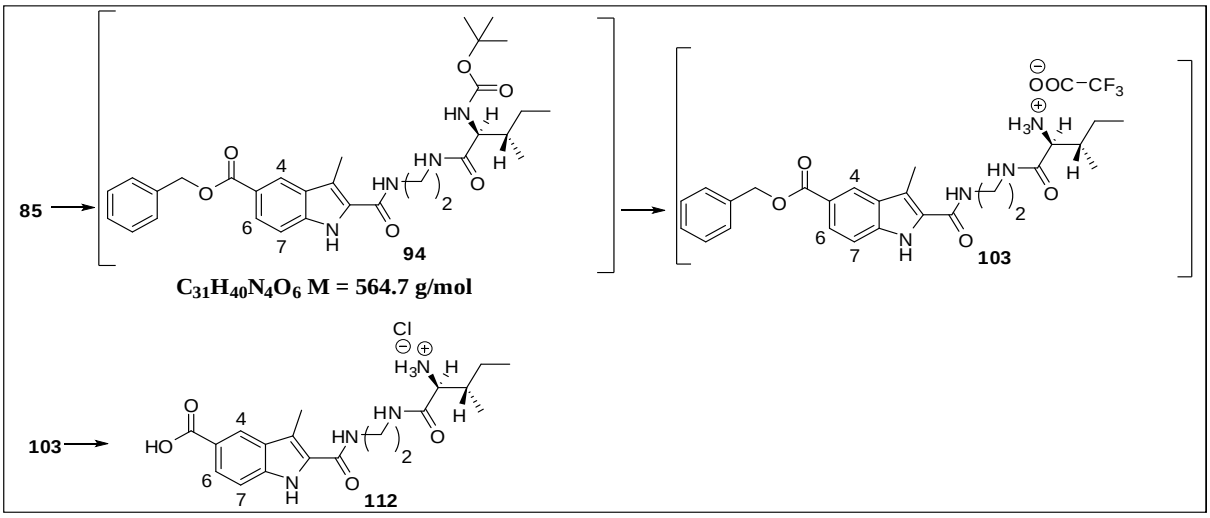
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 169.7 (C=O), 164.7 (2 x C=O), 139.7 (C), 135.8 (C), 130.5 (2 x CH), 130.0 (2 x CH), 129.8 (C), 129.3 (C), 128.7 (C, CH), 126.5 (CH), 124.1 (CH), 117.3 (C), 112.4 (CH), 55.9 (CH), 40.1 (2 x CH_2), 38.8 (CH_2), 27.8 (CH_2), 27.4 (CH_2), 9.9 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{24}H_{29}N_4O_4$ 437.2189 found 437.2178.

.....

(2S,3S)-1-(2-(5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethylamino)-3-methyl-1-oxopentan-2-amonium chloride

112



$C_{19}H_{27}ClN_4O_4$ M = 410.9 g/mol

Biligand **94** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C2-TFA **85** (300 mg, 0.64 mmol), DIEA (123 µL, 0.71 mmol), *N*α-Boc-*L*-Isoleucine (CAS: 13139-16-7) (164 mg, 0.71 mmol), CDI (126 mg, 0.77 mmol), DMF (3 mL + 8 mL) as a yellow crude oil (294 mg, 0.52 mmol, 82%), $\mathbf{R}_f$ = 0.88 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.39 (s, 1H, H-4), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.49-7.32 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.38 (s, 2H, CH_2), 3.86 (m, 1H, CH), 3.57-3.31 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.75 (m, 1H, CH), 1.45-1.38 (m, 9H, 3 x CH_3), 1.14 (m, 1H, C**H**H), 0.93-0.80 (m, 7H, 2 x CH_3, C**H**H).

Because of its low stability, biligand **94** (294 mg, 0.52 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (20 mL) to obtain the desired crude salt **103**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (30 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **112** (94 mg, 0.23 mmol, 45%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.33 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 3.67 (m, 1H, CH), 3.58 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.58 (s, 3H, CH_3), 1.85 (m, 1H, CH), 1.52 (m, 1H, C**H**H), 1.16 (m, 1H, C**H**H), 0.88-0.84 (m, 6H, 2 x CH_3).

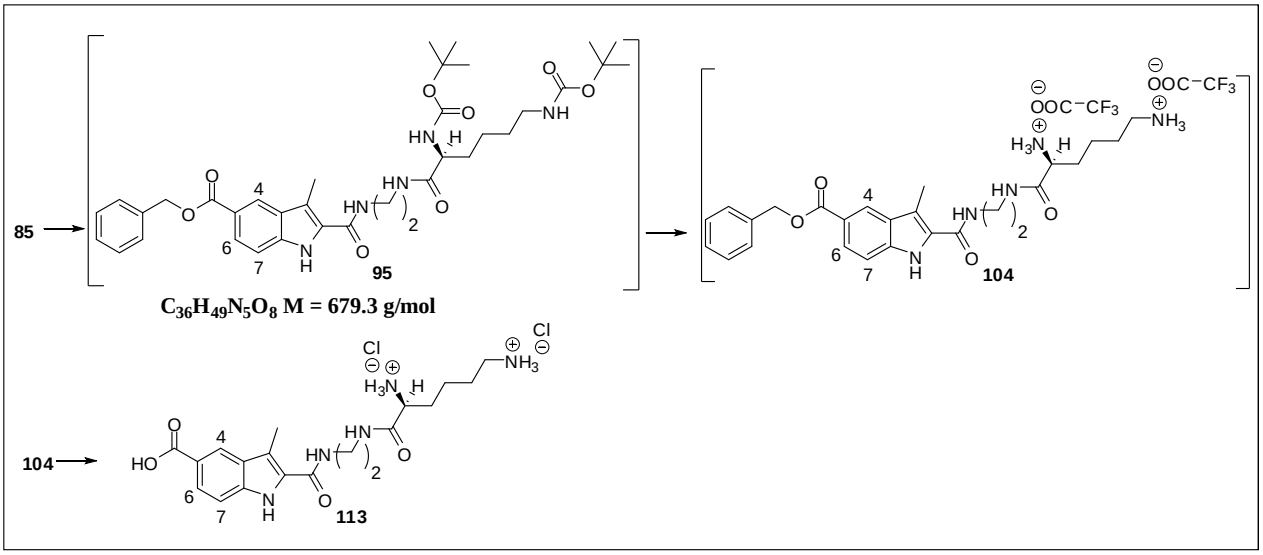
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 165.2 (C=O), 164.9 (C=O), 139.4 (C), 129.3 (C), 126.8 (CH), 125.8 (C), 125.5 (C), 123.9 (CH), 117.4 (C), 112.2 (CH), 59.6 (CH), 40.5 (CH_2), 40.2 (CH_2), 38.3 (CH), 25.5 (CH_2), 15.2 (CH_3), 11.6 (CH_3), 10.0 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{19}H_{27}N_4O_4$ 375.2032 found 375.2030.

……

((S)-6-(2-(5-(Benzyloxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethylamino)-6-oxohexane-1,5-diamonium chloride

113



$C_{19}H_{29}Cl_2N_5O_4$ M = 462.4 g/mol

Biligand **95** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C2-TFA **85** (256 mg, 0.55 mmol), DIEA (106 µL, 0.61 mmol), *(N*α*,N*ε)-diBoc-*L*-Lysine (CAS: 2483-46-7) (211 mg, 0.61 mmol), CDI (107 mg, 0.66 mmol), DMF (3 mL + 8 mL) as a yellow crude oil (272 mg, 0.40 mmol, 72%), $\mathbf{R_f}$ = 0.88 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.72 (brs, 1H, NH), 8.45 (m, 1H, H-4), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.51-7.27 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 6.84 (m, 2H, 2 x NH), 5.41 (s, 2H, CH_2), 5.31 (brs, 1H, NH), 4.61 (m, 1H, NH), 4.02 (m, 1H, CH), 3.74-3.61 (m, 4H, 2 x CH_2), 3.05 (m, 2H, CH_2), 2.63 (s, 3H, CH_3), 1.62-1.24 (m, 24H, 6 x CH_3, 3 x CH_2).

Because of its low stability, biligand **95** (272 mg, 0.40 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (20 mL) to obtain the desired crude salt **104**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (30 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **113** (65 mg, 0.14 mmol, 35%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.37 (s, 1H, H-4), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.46 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 3.95 (m, 1H, CH), 3.65-3.48 (m, 4H, 2 x CH_2), 2.89 (m, 2H, CH_2), 2.60 (s, 3H, CH_3), 1.93-1.86 (m, 2H, CH_2), 1.67 (m, 2H, CH_2), 1.50 (m, 2H, CH_2).

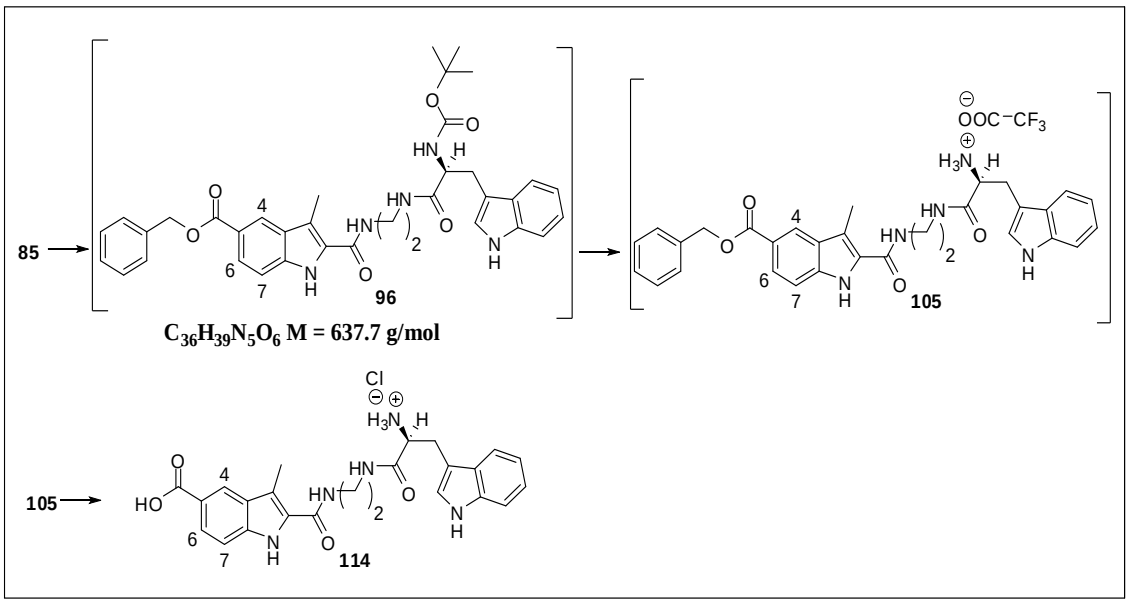
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) 171.2 (C=O), 170.6 (C=O), 165.1(C=O), 140.0 (C), 129.8 (C), 129.5 (C), 126.7 (CH), 124.5 (CH), 123.2 (C), 117.9 (C) 112.8 (CH), 54.5 (CH), 40.6 (CH_2), 40.4 (CH_2), 40.3 (CH_2), 32.2 (CH_2), 28.2 (CH_2), 23.1 (CH_2), 10.2 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H-2Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{19}H_{28}N_5O_4$ 390.2141 found 390.2122.

……

(S)-1-(2-(5-(Benzyloxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-amonium chloride

114



$C_{24}H_{26}ClN_5O_4$M = 483.9 g/mol

Biligand **96** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C2-TFA **85** (150 mg, 0.32 mmol), DIEA (61 µL, 0.35 mmol), *N*α-Boc-*L*-Tryptophane (CAS: 144599-95-1) (106 mg, 0.35 mmol), CDI (62 mg, 0.38 mmol), DMF (2 mL + 5 mL), as a yellow crude oil (130 mg, 0.20 mmol, 63%), $\mathbf{R_f}$ = 0.95 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.18 (brs, 1H, NH), 8.41 (m, 2H, H-4, NH), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.50-6.79 (m, 13H, H-7, 10 x CH_{ar}, 2 x NH), 5.41 (s, 2H, CH_2), 5.31 (brs, 1H, NH), 4.54 (m, 1H, CH), 3.27-3.16 (m, 6H, 3 x CH_2), 2.53 (s, 3H, CH_3), 1.39 (s, 9H, 3 x CH_3).
Because of its low stability, biligand **96** (130 mg, 0.20 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (20 mL) to obtain the desired crude salt **105**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (10 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **114** (47 mg, 0.08 mmol, 40%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.35 (s, 1H, H-4), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.0, CH_{ar}), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 7.30 (d, 1H, *J* = 8.0, CH_{ar}), 7.15-6.97 (m, 3H, 3 x CH_{ar}), 4.00 (m, 1H, CH), 3.30-3.30 (m, 5H, C**H**H, 2 x CH_2), 3.14 (m, 1H, C**H**H), 2.46 (s, 3H, CH_3).

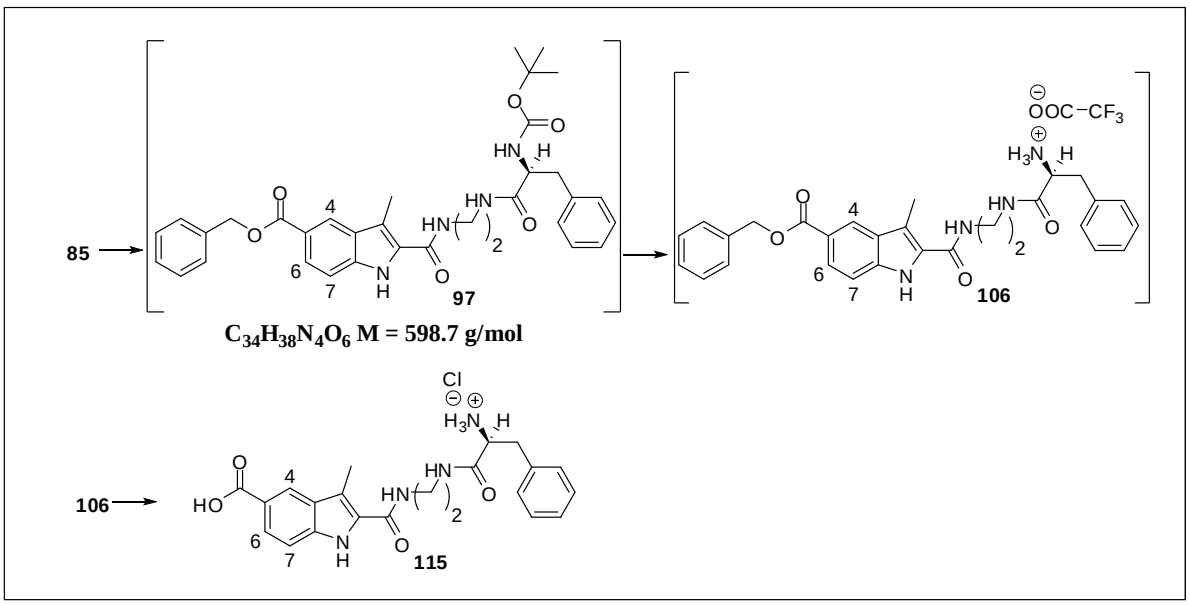
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.4 (2 x C=O), 164.8 (C=O), 139.3 (C), 137.9 (C), 129.1 (C), 129.0 (C), 128.0 (C), 126.4 (C), 125.0 (CH), 123.8 (CH), 122.6 (CH), 119.9 (CH), 118.8 (CH), 117.1 (CH), 112.3 (CH), 112.1 (CH), 108.3 (C), 55.2 (CH), 40.3 (CH_2), 39.9 (CH_2), 29.1 (CH_2), 9.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Cl)^+$ m/z calcd for $C_{24}H_{26}N_5O_4$ 448.1985 found 448.1974.

.....

(S)-1-(2-(5-Carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-amonium chloride

115



$C_{34}H_{38}N_4O_6$ M = 598.7 g/mol

$C_{22}H_{25}ClN_4O_4$ M = 444.9 g/mol

Biligand **97** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C2-TFA **85** (150 mg, 0.32 mmol), DIEA (61 µL, 0.35 mmol), *N*α-Boc-*L*-Phenylalanine (CAS: 13734-34-4) (93 mg, 0.35 mmol), CDI (62 mg, 0.38 mmol), DMF (2 mL + 5 mL) as a yellow crude oil (96 mg, 0.16 mmol, 50%), $\mathbf{R_f}$ = 0.93 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.31 (brs, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H-4), 8.02 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.53-7.14 (m, 11H, H-7, 10 x CH_{ar}), 6.76 (m, 1H, NH), 6.44 (m, 1H, NH), 5.41 (s, 2H, CH_2), 4.98 (m, 1H, NH), 4.33 (m, 1H, CH), 3.65-3.48 (m, 4H, 2 x CH_2), 3.05 (m, 2H, CH_2), 2.62 (s, 3H, CH_3), 1.43-1.38 (m, 9H, 3 x CH_3).

Because of its low stability, biligand **97** (96 mg, 0.16 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (10 mL) to obtain the desired crude salt **106**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (10 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **115** (21 mg, 0.05 mmol, 30%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.27 (s, 1H, H-4), 7.82 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 7.38-7.07 (m, 5H, 5 x CH_{ar}), 3.98 (m, 1H, CH), 3.55-3.30 (m, 4H, 2 x CH_2), 3.10 (m, 1H, C**H**H), 2.94 (m, 1H, C**H**H), 2.46 (s, 3H, CH_3).

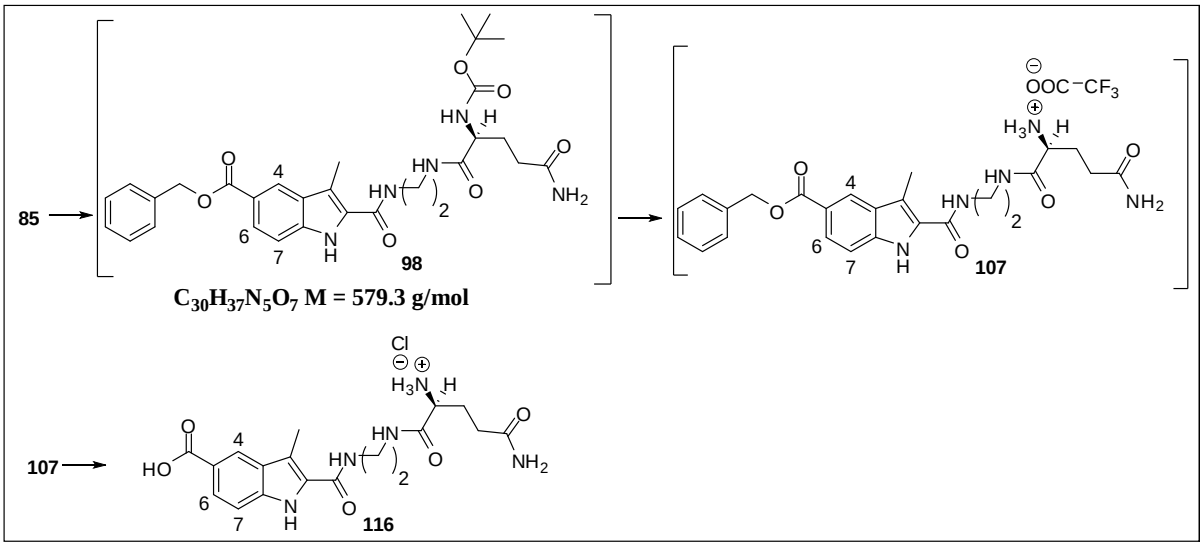
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.8 (C=O), 170.4 (C=O), 164.8 (C=O), 139.5 (C), 135.7 (C), 130.3 (2 x CH), 129.8 (2 x CH), 129.4 (C), 129.2 (C), 128.5 (CH), 126.4 (CH), 124.0 (CH), 123.9 (C), 117.5 (C), 112.3 (CH), 55.9 (CH), 40.2 (CH_2), 40.0 (CH_2), 38.6 (CH_2), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M- Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{22}H_{25}N_4O_4$ 409.1876 found 409.1859.

……

(S)-5-Amino-1-(2-(5-carboxy-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethylamino)-1,5-dioxopentan-2-amonium chloride

116



$C_{30}H_{37}N_5O_7$ M = 579.3 g/mol

$C_{17}H_{24}ClN_5O_5$ M = 413.8 g/mol

Biligand **98** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C2-TFA **85** (300 mg, 0.64 mmol), DIEA (123 µL, 0.71 mmol), *N*α-Boc-*L*-Glutamine (CAS: 13726-85-7) (175 mg, 0.71 mmol), CDI (126 mg, 0.77 mmol), DMF (3 mL + 8 mL), as a yellow crude oil (299 mg, 0.52 mmol, 80%), $\mathbf{R_f}$ = 0.74 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

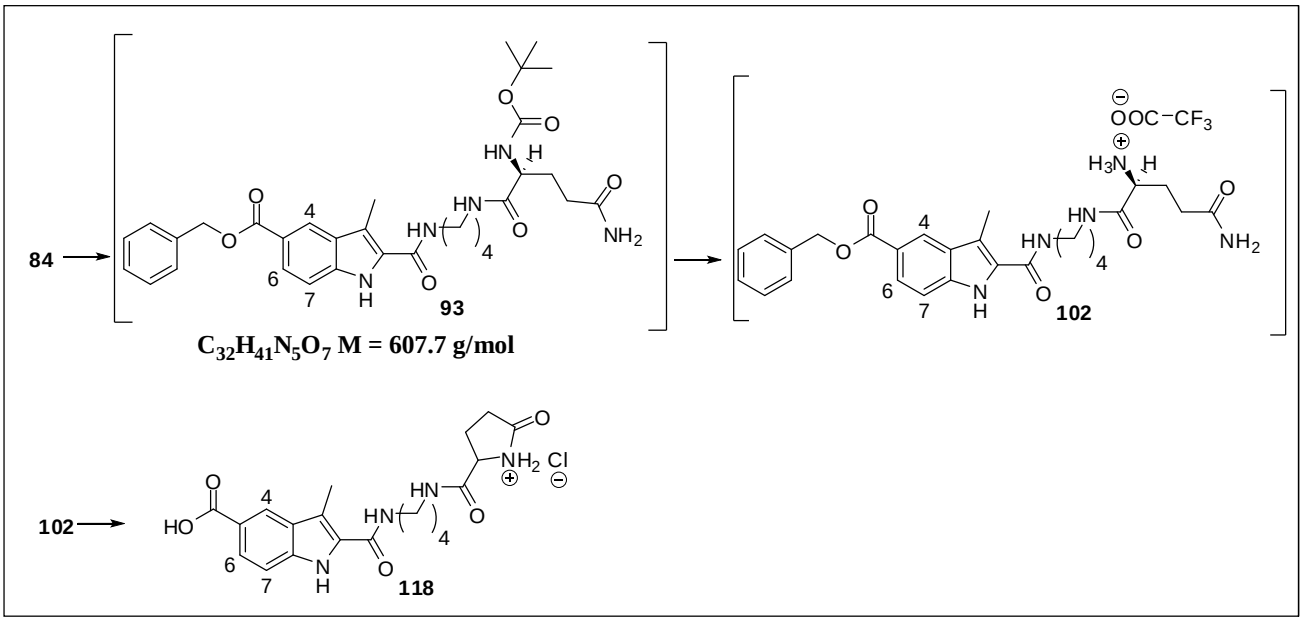
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.45 (s, 1H, H-4), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.49-7.37 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.40 (s, 2H, CH_2), 4.17 (m, 1H, CH), 3.81-3.69 (m, 4H, 2 x CH_2), 3.05 (m, 2H, CH_2), 2.60 (s, 3H, CH_3), 1.44-1.23 (m, 11H, 3 x CH_3, CH_2).

Because of its low stability, biligand **98** (299 mg, 0.52 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (20 mL) to obtain the desired crude salt **107**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (30 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **116** (88 mg, 0.21 mmol, 40%). **Insoluble Product**

……

3-Methyl-2-(4-(5-oxopyrrolidine-2-carboxamido)butylcarbamoyl)-1*H*-indole-5-carboxylic acid

118



Biligand **93** was obtained, following procedure **C2** using benzyl-indole-C4-TFA **X** (286 mg, 0.58 mmol), DIEA (111 µL, 0.64 mmol), *N*α-Boc-*L*-Glutamine (CAS: 13726-85-7) (169 mg, 0.64 mmol), CDI (112 mg, 0.70 mmol), DMF (3 mL + 6 mL), as a yellow crude oil (218 mg, 0.36 mmol, 62%), $\mathbf{R_f}$ = 0.75 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.39 (s, 1H, H-4), 7.93 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.59-7.33 (m, 6H, H-7, 5 x CH_{ar}), 5.38 (s, 2H, CH_2), 3.87 (m, 1H, CH), 3.45 (m, 2H, CH_2), 3.31 (m, 2H, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.41 (m, 2H, CH_2), 2.10 (m, 2H, CH_2) 1.65-1.70 (m, 13H, 2 x CH_2, 3 x CH_3).

Because of its low stability, biligand **93** (218 mg, 0.36 mmol) was directly engaged into the next step, following procedure **D**, using TFA (1 mL), DCM (10 mL) to obtain the desired crude salt **102**. This crude salt was directly engaged into the next step following procedure **E1** using $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (20 mg), MeOH (5 mL) to obtain the desired salt **118** (65 mg, 0.13 mmol, 30%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.36 (s, 1H, H-4), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.5, H-6), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.5, H-7), 4.16 (m, 1H, CH), 3.43 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.27 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.50-2.25 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.76-1.57 (m, 4H, 2 x CH_2).

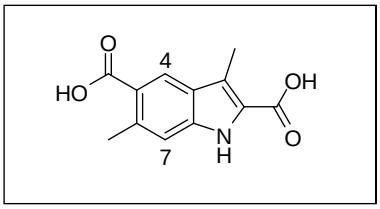
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 179.5 (C=O), 175.2 (C=O), 166.1 (C=O), 161.5 (C=O), 140.0 (C), 130.1 (C), 129.6 (C), 126.8 (CH), 122.5 (CH), 124.3 (C), 117.3 (C), 112.5 (CH), 58.5 (CH), 40.4 (CH_2), 40.3 (CH_2), 30.7 (CH_2), 28.1 (CH_2), 28.0 (CH_2), 27.0 (CH_2), 10.1 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Cl\text{-}H+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{20}H_{24}N_4O_5Na$ 423.1644 found 423.1643.

……

3,6-Dimethyl-1*H*-indole-2,5-dicarboxylic acid

119



$C_{12}H_{11}NO_4$ M = 233.2 g/mol

To a solution of indole **131** (358 mg, 1.45 mmol) in MeOH (15 mL) was added NaOH (2 M, 2 mL) and the reaction mixture was heated to reflux for 24 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired diacid **119** as a white solid in a quantitative yield (338 mg, 1.45 mmol).

Mp : 284-286 °C (Dec.).

R_f = 0.31 (SiO_2, DCM/MeOH: 8/2).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.35 (s, 1H, H-4), 7.24 (s, 1H, H-7), 2.67 (s, 3H, CH_3), 2.60 (s, 3H, CH_3).

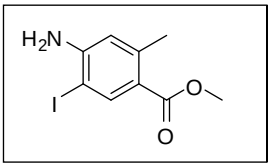
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.8 (C=O), 165.3 (C=O), 139.9 (C), 137.9 (C), 127.5 (C), 126.1 (C), 126.0 (CH), 123.0 (C), 121.8 (C), 114.9 (CH), 23.1 (CH_3), 9.95 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{12}H_{10}NO_4$ 232.0610 found 232.0622.

…….

Methyl 4-amino-5-iodo-2-methylbenzoate[109]

120



$C_9H_{10}INO_2$ M = 291.1 g/mol

CAS: 672293-33-3

To a solution of **125** (1.00 g, 6.06 mmol, 1eq.) in a mixture of MeOH (10 mL) and H_2O (1.5 mL) was wadded calcium carbonate (1.80 g, 18,0 mmol, 3 eq.). The mixture was cooled to 0 °C and a solution of iodine chloride in DCM (1M, 12 mL, 12,0 mmol, 2eq.) was added dropwise, then the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was filtered through a celite® pad, the celite was washed with EtOAc (2 x 100 mL). Then organic layers was washed with saturated sodium thiosulfate solution (100 mL) and dried over over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by FC (column A, 100% Cyc to 100% EtOAc), to give **120** as a gray solid (1.14 g, 4.84 mmol, 80%).

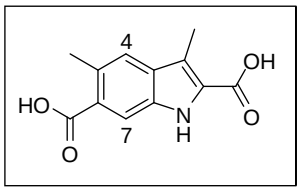
Mp: 77-79 °C.

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.27 (s, 1H, CH_{ar}), 6.53 (s, 1H, CH_{ar}), 4.38 (brs, 2H, NH_2), 3.83 (s, 3H, CH_3), 2.49 (s, 3H, CH_3).

…….

3,5-Dimethyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

121



$C_{12}H_{11}NO_4$ M = 233.2 g/mol

Indole **132** (504 mg, 2.04 mmol) was engaged with MeOH (15 mL), KOH (2 M, 5 mL) and the mixture was heated to reflux for 24 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired diacid **121** as a white solid in a quantitative yield (475 mg, 2.04 mmol).

Mp : 300-302 °C (Dec.).

R_f = 0.35 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.06 (s, 1H, H-7), 7.47 (s, 1H, H-4), 2.64 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3).

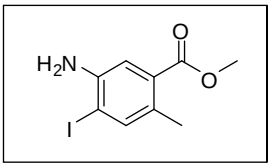
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.9 (C=O), 165.3 (C=O), 135.6 (C), 132.1 (C), 130.8 (C), 128.2 (C), 128.0 (C), 123.0 (CH), 119.4 (C), 116.6 (CH), 22.4 (CH_3), 9.9 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{12}H_{10}NO_4$ 232.0610 found 232.0612.

…….

Methyl 5-amino-4-iodo-2-methylbenzoate[54]

122



$C_9H_{10}INO_2$ M = 291.1 g/mol

CAS: 686342-80-3

To a solution of the amine **129** (1.80 g, 10.90 mmol, 1eq.) in a mixture of MeOH (20 mL) and H_2O (2 mL) was wadded calcium carbonate (2.94 g, 29.42 mmol, 2.7 eq.). The mixture was cooled to 0 °C and a solution of iodine chloride in DCM (1 M, 22 mL, 21.80 mmol, 2eq.) was added dropwise. The misture was left to stir at room temperature for 24 h, filtered through celite, washed with EtOAc (400 mL), dried over $Na_2S_2O_4$ and concentrated *in vacuo*. Then a saturated sodium thiosulfate solution (200 mL) was added, and the solution was extracted with EtOAc (3 x 300 mL), the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by FC (column A, 100% Cyc to 100% EtOAc), to give desired iodo derivative **122** as a grey powder (1.08 g, 3.71 mmol, 34%).

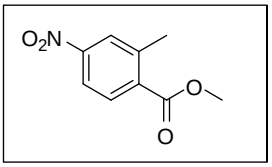
Mp: 96-98 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.50 (s, 1H, CH_{ar}), 7.29 (s, 1H, CH_{ar}), 4.01 (s, 2H, NH_2), 3.81 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3).

…….

Methyl 2-methyl-4-nitrobenzoate[109]

124



$C_9H_9NO_4$ M = 195.2 g/mol

CAS: 62621-09-4

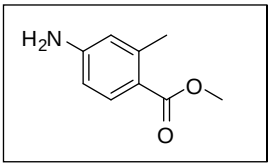
To a solution of 2-methyl-4-nitrobenzoic acid **123** (CAS: 1975-51-5) (2.00 g, 11.00 mmol, 1 eq.) in MeOH (20 mL) was added thionyl chloride (1.6 mL, 22.00 mmol, 2 eq.). The reaction was heated at 70 °C for 4 h, cooled to room temperature, the solvent and excess thionyl chloride were evaporated. The resulting solid was dissolved in EtOAc (350 mL) and washed with brine (200 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 350 mL), the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo* to give methyl 2-methyl-4-nitrobenzoate **124** as a yellow solid in a quantitative yield (2.10 g, 11.00 mmol).

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11–8.04 (m, 3H, 3 x CH_{ar}), 3.95 (s, 3H, CH_3), 2.69 (s, 3H, CH_3).

…….

Methyl 4-amino-2-methylbenzoate[109]

125



$C_9H_{11}NO_2$ M = 165.2 g/mol

CAS: 6933-47-7

A solution of methyl 2-methyl-4-nitrobenzoate **124** (2.10 g, 11.00 mmol, 1 eq.) in MeOH (40 mL) was degassed, 10% Pd-C (0.21 g) was added, the reaction mixture was degassed again and a hydrogen balloon was connected to the reaction flask. The reaction mixture was vigorously stirred for 6 h at room temperature, filtered through celite®, washed with EtOAc (2 x 100 mL) and concentrated *in vacuo* to afford methyl 4-amino-2-methyl-benzoate **125** as a white solid in a quantitative yield (1.80 g, 11.00 mmol).

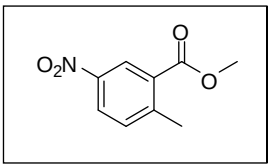
Mp: 68-69 °C (67-68 °C litt.[177]).

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (d, 1H, *J* = 8.0, CH_{ar}), 6.48–6.47 (m, 2H, 2 x CH_{ar}), 3.96 (brs, 2H, NH_2), 3.82 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3).

…….

Methyl 2-methyl-5-nitrobenzoate[178]

128



$C_9H_9NO_4$ M = 195.2 g/mol

CAS: 77324-87-9

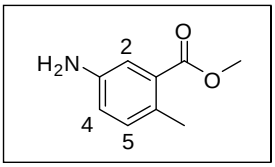
A solution of 2-methyl-5-nitrobenzoic acid **127** (CAS: 1975-52-6) (300 mg, 1.66 mmol, 1 eq.) in MeOH (4 mL) was cooled to 0°C and thionyl chloride (0.26 mL, 3.32 mmol, 2eq.) was added dropwise. The mixture was stirred for 4 h at 70 °C, then concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by FC (column A, 100% Cyc to 100% EtOAc) to give the corresponding ester **128** (324 mg, 1.66 mmol) as a colorless oil in a quantitative yield.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.78 (s, 1H, CH_{ar}), 8.25 (d, 1H, *J* = 8.5, CH_{ar}), 7.45 (d, 1H, *J* = 8.5, CH_{ar}), 3.96 (s, 3H, CH_3), 2.73 (s, 3H, CH_3).

…….

Methyl 5-amino-2-methylbenzoate[178]

129



$C_9H_{11}NO_2$ M = 165.2 g/mol

CAS: 18595-12-15

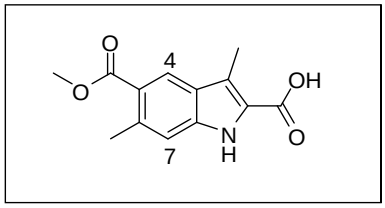
To a solution of the nitro **128** (320 mg, 1.64 mmol, 1 eq.) in degassed MeOH (10 mL) was added 10% Pd-C (32 mg) and the mixture was allowed to stir for 6 h at room temperature under H_2 atmosphere. The reaction was filtered through a celite® pad, and the filtrate was concentrated *in vacuo*.

The residue was purified by FC (column A, 100% Cyc to 100% EtOAc) to give the amine **129** (270 mg, 1.64 mmol) as a colorless oil in a quantitative yield.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.19 (d, 1H, *J* = 2.5, H-2), 6.95 (d, 1H, *J* = 8.0, H-5), 6.67 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.5, H-4), 3.79 (s, 3H, CH_3), 3.62 (brs, 2H, NH_2), 2.40 (s, 3H, CH_3).

……

5-(Methoxycarbonyl)-3,6-dimethyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid
131



$C_{13}H_{13}NO_4$ M = 247.2 g/mol

To a solution of methyl 4-amino-5-iodo-2-methylbenzoate **120** (840 mg, 2.90 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), 2-oxobutyric acid (1.48 g, 14.50 mmol, 5 eq.) and DABCO (975 mg, 8.64 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred during 5 min and then palladium (II) diacetate (32 mg, 0.14 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 105 °C, stirred for 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with H_2O (150 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid which was purified by trituration in EtOAc to give the desired indole **131** as a grey powder (358 mg, 1.45 mmol, 50%).

Mp : 280-282 °C (Dec.).

R_f = 0.61 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

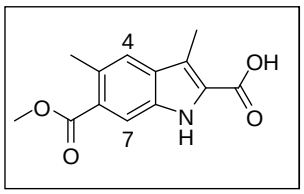
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.30 (s, 1H, H-4), 7.25 (s, 1H, H-7), 3.99 (s, 3H, CH_3), 2.65 (s, 3H, CH_3), 2.59 (s, 3H, CH_3).
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.1 (C=O), 165.3 (C=O), 139.6 (C), 137.2 (C), 128.0 (C), 127.7 (C), 125.6 (CH), 122.3 (C), 118.9 (C), 114.8 (CH), 52.1 (CH_3), 22.9 (CH_3), 9.94 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{12}NO_4$ 246.0766 found 246.0777.

……

6-(Methoxycarbonyl)-3,5-dimethyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid

132



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

To a solution of methyl 5-amino-4-iodo-2-methylbenzoate **122** (1.08 g, 3.71 mmol, 1 eq.) in DMF (10 mL), 2-oxobutyric acid (1.89 g, 18.55 mmol, 5 eq.) and DABCO (1.25 g, 11.13 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 5 min and then palladium (II) diacetate (42 mg, 0.19 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 105 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with H_2O (150 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid which was purified by trituration in EtOAc to give the desired indole **132** as a grey powder (514 mg, 2.04 mmol, 55%).

Mp : 265-267 °C (Dec.).

R_f = 0.45 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.59 (brs, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, H-7), 7.52 (s, 1H, H-4), 3.83 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.50 (s, 3H, CH_3).

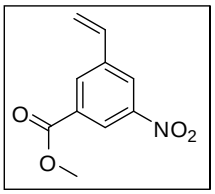
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 167.8 (C=O), 163.3 (C=O), 133.8 (C), 130.4 (C), 128.7 (C), 127.2 (C), 125.7 (C), 122.3 (CH), 116.9 (C), 115.2 (CH), 51.8 (CH_3), 21.7 (CH_3), 9.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{12}NO_4$ 246.0766 found 246.0768.

……

Methyl 3-nitro-5-vinylbenzoate[156]

144



$C_{10}H_9NO_4$ M = 207.2 g/mol

CAS: 178814-57-8

To a solution of 3-(methoxycarbonyl)-5-nitrophenylboronic acid **138** (CAS: 117342-20-8) (500 mg, 2.22 mmol, 1 eq.) in THF (10 mL), tri*ortho*tolylphosphine (49 mg, 0.16 mmol, 0.07 eq.), palladium (II) diacetate (16 mg, 0.07 mmol, 0.03 eq.), K_3PO_4 (1.41 g, 6.66 mmol, 3 eq.) and H_2O (80 µL, 4.44 mmol, 2 eq.) were added. To this solution was added vinyl bromide in THF (1 M, 13.3 mL, 13.32 mmol, 6 eq.). The resulting mixture was heated to reflux for 16 h, then the reaction mixture was cooled to room temperature and washed with H_2O (150 mL) and extracted with EtOAc (200 mL). The organic layer was dried over $Na_2S_2O_4$ concentrated *in vacuo* and purified by FC (Column E, 100% Cyc to 1/1 Cyc/EtOAc) to give the desired compound **144** as a white foam (143 mg, 0.69 mmol, 31%).

R_f = 0.91 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

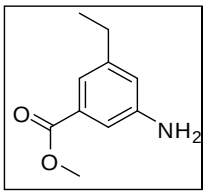
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.64 (s, 1H, H_{ar}), 8.35 (s, 1H, H_{ar}), 8.30 (s, 1H, H_{ar}), 6.76 (dd, 1H, *J* = 17.5, 10.5, CH), 5.94 (d, 1H, *J* = 17.5, CH_{vinyl}), 5.49 (d, *J* = 10.5, 1H, CH_{vinyl}), 3.95 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.4 (C=O), 147.8 (C), 136.6 (CH), 136.0 (C), 133.4 (CH); 130.9 (C), 127.4 (CH), 122.7 (CH), 114.3 (CH_2), 51.5 (CH_3).

……

Methyl 3-amino-5-ethylbenzoate

145



$C_{10}H_{13}NO_2$ M = 179.2 g/mol

To a solution of the compound **144** (300 mg, 1.44 mmol, 1 eq.) in MeOH (10 mL) was added 10% Pd/C (15 mg). The reaction was stirred for 24 h at room temperature under an atmosphere of H_2. The reaction was filtered through celite®, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to furnish the amine **145** as a yellow solid in a quantitative yield (260 mg, 1.44 mmol).

Mp : 168-170 °C.

R_f = 0.71 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.92 (s, 3H, CH_3), 2.72 – 2.57 (m, 2H, CH_2), 1.38 – 1.21 (m, 3H, CH_3).

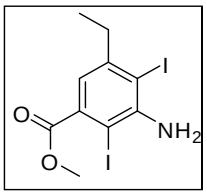
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 167.6 (C=O), 146.7 (C), 145.6 (C), 130.9 (C), 119.2 (CH), 119.1 (CH), 113.3 (CH), 51.9 (CH_3), 28.6 (CH_2), 15.3. (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{10}H_{14}NO_2$ 180.1019 found 180.1023.

……

Methyl 3-amino-5-ethyl-2,4-diiodobenzoate

146



$C_{10}H_{13}I_2NO_2$ M = 431.0 g/mol

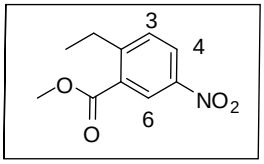
To a solution of iodine (330 mg, 1.31 mmol, 1 eq.) and silver sulfate (409 mg, 1.31 mmol, 1 eq.) in EtOH (10 mL) was slowly added a solution of methyl 3-amino-5-ethylbenzoate **145** (235 mg, 1.31 mmol, 1 eq.) in EtOH (4 mL). The mixture was stirred at room temperature during 2 h. The reaction mixture was then concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in DCM (300 mL), washed with NaOH (100 mL, 1 M) then with H_2O (2 x 150 mL) and Na_2SO_3 (1 M) (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give a brown solid which was purified by FC (Column C, 100% Cyc to 100% DCM) to give the diiodo compound **146** (117 mg, 0.65 mmol, 50%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.64 (s, 1H), 4.26 (s, 2H, NH_2), 3.97 (s, 3H, CH_3), 2.61 (q, 2H, *J* = 7.5, CH_2), 1.14 (t, 3H, *J* = 7.5, CH_3).

……

Methyl 2-ethyl-5-nitrobenzoate[158]

147



$C_{10}H_{11}NO_4$ M = 209.2 g/mol

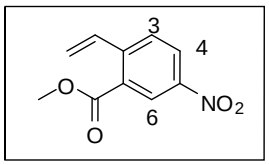
A suspension of 2-bromo-5-nitrobenzoic acid methyl ester **143** (CAS: 6942-36-5) (1.00 g, 3.85 mmol, 1eq.), lithium chloride (485 mg, 11.54 mmol, 3 eq.), tetraethyltin (905 mg, 3.85 mmol, 1 eq.) and bis(triphenylphosphine)-palladium(II)chloride (81 mg, 0.11 mmol, 0.03 eq.) in DMF (20 mL) was heated at 100 °C for 8 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by FC (Column C, 100% Cyc to 1/1 Cyc/EtOAc) to give the desired product **147** as a brown oil (79 mg, 0.38 mmol, 10%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.71 (s, 1H, H-6), 8.25 (d, 1H, *J* = 8.0, H-4), 7.46 (d, 1H, *J* = 8.0, H-3), 3.95 (s, 3H, CH_3), 3.09 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 1.27 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

……

Methyl 5-nitro-2-vinylbenzoate

148



$C_{10}H_9NO_4$ M = 207.2 g/mol

To a solution of 2-bromo-5-nitrobenzoic acid methyl ester **143** (CAS: 6942-36-5) (500 mg, 1.92 mmol, 1eq.) in dioxane (50 mL) were added bis(triphenylphosphine)-palladium(II)chloride (70 mg, 0.10 mmol, 0.05 eq.), K_3PO_4 (1.63 g, 7.68 mmol, 4 eq.) and 4,4,5,5-tetramethyl-2-vinyl-1,3,2-dioxaborolane (295 mg, 1.92 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred and heated to reflux for 24 h. The solvent was removed and the resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give a crude mixture which was purified by FC (Column F, 100% Cyc to 100% EtOAc) to give the desired product **148** as a yellow foam (79 mg, 0.38 mmol, 20%).

R_f = 0.85 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

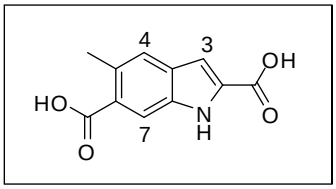
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.77 (s, 1H, H-6), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.0, H-4), 7.77 (d, 1H, *J* = 8.0, H-3), 7.56 (dd, 1H, *J* = 12.0, 16.0, CH), 5.84 (d, 1H, *J* = 16.0, C**H**H), 5.59 (d, 1H, *J* = 12.0; C**H**H), 3.99 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165.7 (C=O), 146.6 (C), 145.7 (C), 134.2 (CH), 129.3 (C), 128.3 (CH), 126.5 (CH), 125.9 (CH), 120.5 (CH_2), 52.7 (CH_3).

……

5-Methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

149



$C_{11}H_9NO_4$ M = 219.2 g/mol

Ester **151** (170 mg, 0.73 mmol) was engaged with MeOH (15 mL) and KOH (2 M, 10 mL) and heated to reflux for 12 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired diacid **149** as a white solid (72 mg, 0.33 mmol, 45%).

Mp: 268-270 °C (Dec.).

R_f = 0.1 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.12 (s, 1H, H-7), 7.50 (s, 1H, H-4), 7.08 (s, 1H, H-3), 2.63 (s, 3H, CH_3).

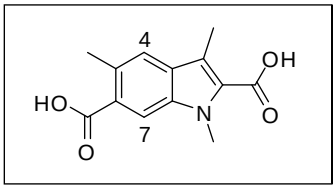
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.5 (C=O), 164.4 (C=O), 136.7 (C), 132.6 (C), 131.7 (C), 131.5 (C), 127.9 (C), 124.7 (CH), 116.7 (CH), 108.0 (CH), 22.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{11}H_8NO_4$ 218.0453 found 218.0446.

……

1,3,5-trimethyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

150



$C_{13}H_{13}NO_4$ M = 247.2 g/mol

Ester **152** (169 mg, 0.61 mmol) was engaged with MeOH (15 mL) and KOH (2 M, 10 mL) and heated to reflux for 24 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (6 M) and evaporated to dryness. H_2O (5 mL) was added and the precipitate was collected by filtration affording, in a quantitative yield, the desired diacid **150** as a white solid (150 mg, 0.61 mmol).

Mp: 290-292 °C (Dec.).

R_f = 0.22 (SiO_2, 100% EtOAc).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.01 (s, 1H, H-7), 7.53 (s, 1H, H-4), 3.96 (s, 3H, CH_3), 2.59 (s, 3H, CH_3) 2.50 (s, 3H, CH_3).

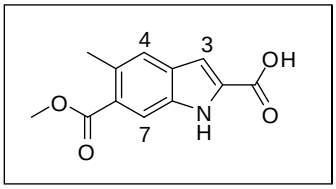
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 169.2 (C=O), 163.6(C=O), 136.0 (C), 129.2 (C), 128.8 (C), 128.4 (C), 127.3 (C), 122.2 (CH), 117.8 (C), 113.3 (CH), 32.0 (CH_3), 21.8 (CH_3), 10.5 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{12}NO_4$ 246.0766 found 246.0774.

……

6-(Methoxycarbonyl)-5-methyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid

151



$C_{12}H_{11}NO_4$ M = 233.2 g/mol

To a solution of methyl 5-amino-4-iodo-2-methylbenzoate **122** (250 mg, 0.86 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), pyruvic acid (0.3 mL, 4.29 mmol, 5 eq.) and DABCO (289 mg, 2.58 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 5 min and then palladium (II) diacetate (10 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 105 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid which was purified by FC (column A, 100% DCM to 4/1 DCM/MeOH) to give the desired indole **151** as a brown powder (170 mg, 0.73 mmol, 85%).

Mp: 278-280 °C (Dec.).

R_f = 0.38 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (s, 1H, H-7), 7.51 (s, 1H, H-4), 7.07 (s, 1H, H-3), 3.99 (s, 3H, CH_3), 2.61 (s, 3H, CH_3).

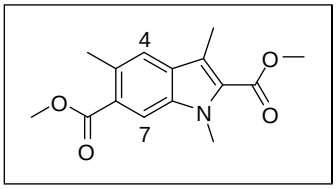
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.0 (C=O), 160.3 (C=O), 136.2 (C), 132.1 (C), 131.4 (C), 131.1 (C), 127.2 (C), 124.3 (CH), 117.0 (CH), 108.4 (CH), 52.2 (CH_3), 21.4 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{12}H_{10}NO_4$ 232.0610 found 232.0623.

……

Dimethyl 1,3,5-trimethyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylate

152



$C_{15}H_{17}NO_4$ M = 275.3 g/mol

To a solution of indole **132** (200 mg, 0.81 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), K_2CO_3 (784 mg, 5.67 mmol, 7 eq.) and iodomethane (1.0 mL, 16.17 mmol, 20 eq.) were added. The solution was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtAOc (150 mL) and washed with H_2O (150 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to give the desired product **152** as a white powder (199 mg, 0.72 mmol, 90%).

Mp : 127-128 °C.

R_f = 0.71 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 3/2).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.98 (s, 1H, H-7), 7.45 (s, 1H, H-4), 4.07, 3.97 et 3.95 (9H, 3 x CH_3), 2.67 (s, 3H, CH_3), 2.53 (s, 3H, CH_3).

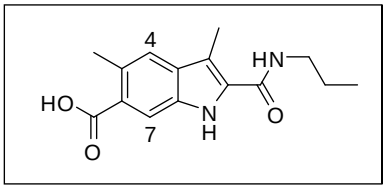
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.7 (C=O), 163.4 (C=O), 136.7 (C), 130.4 (C), 129.7 (C), 127.7 (C), 126.7 (C), 122.7 (CH), 119.6 (C), 113.6 (CH), 52.0 (CH_3), 51.7 (CH_3), 32.4 (CH_3), 22.3 (CH_3), 10.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{17}NO_4Na$ 298.1042 found 298.1055.

……

3,5-Dimethyl-2-(propylcarbamoyl)-1*H*-indole-6-carboxylic acid

153



$C_{15}H_{18}N_2O_3$ M = 274.3 g/mol

Ester **156** (23 mg, 0.08 mmol) was engaged with MeOH (15 mL) and KOH (2 M, 3 mL) and heated under reflux for 10 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired acid **153** as a white foam (11 mg, 0.04 mmol, 50%).

Mp : 245-247 °C (Dec.).

R_f = 0.38 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.49 (s, 1H, H-7), 7.34 (s, 1H, H-4), 3.37 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.52 (s, 3H, CH_3), 1.67 (sext, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 1.01 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

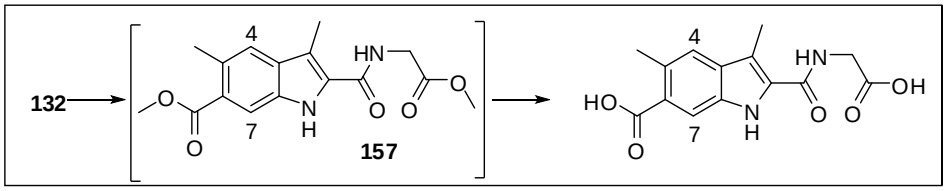
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 179.5 (C=O), 165.3 (C=O), 139.4 (C), 135.5 (C), 129.8 (C), 129.0 (C), 127.5 (C), 121.3 (CH), 115.5 (C), 111.5 (CH), 42.4 (CH_2), 23.9 (CH_2), 21.0 (CH_3), 11.8 (CH_3), 9.84 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{17}N_2O_3$ 273.1239 found 273.1247.

……

2-(Carboxymethylcarbamoyl)-3,5-dimethyl-1*H*-indole-6-carboxylic acid

154



$C_{14}H_{14}N_2O_5$ M = 290.3 g/mol

To a solution of indole **132** (100 mg, 0.40 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), CDI (84 mg, 0.52 mmol, 1.3 eq.) was added and the solution was stirred for 1 h. Then methyl glycine ester hydrochloride (CAS: 5680-79-5) (50 mg, 0.40 mmol, 1 eq.) and DIEA (69 µL, 0.40 mmol, 1eq.) were added at room temperature. The resulting mixture was stirred for 24 h, and then DMF was removed *in vacuo.* EtOAc (100 mL) was added into the resulting oil, the organic layer was washed with H_2O (2 x 150 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to obtain a brown solid which was not purified because of its low solubility. $\mathbf{R_f}$ = 0.43 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1),

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.52 (s, 1H, NH), 8.36 (t, 1H, *J* = 4.0, NH), 7.94 (s, 1H, H-7), 7.51 (s, 1H, H-4), 4.09 (d, 2H, *J* = 4.0, CH_2), 3.83 (s, 3H, CH_3), 3.68 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.53 (s, 3H, CH_3).

This intermediate **157** was directly engaged into the next step. MeOH (5 mL), H_2O (0.5 mL) and KOH (2 M, 3 mL) were added to the crude product and the mixture was stirred under reflux for 10 h. The solution was acidified with HCl (2 M) to pH 3 and the solvent was removed to a give a yellow powder which was purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired diacid **154** as a yellow foam (12 mg, 0.04 mmol, 10%).

$\mathbf{R_f}$ = 0.15 (SiO_2, 100% EtOAc).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.05 (s, 1H, H-7), 7.46 (s, 1H, H-4), 4.12 (s, 2H, CH_2), 2.64 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3).

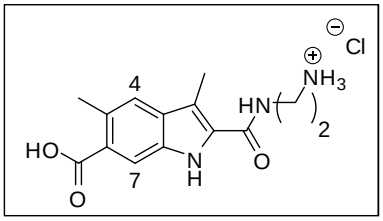
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.3 (C=O), 169.2 (C=O), 162.1 (C=O), 133.3 (C), 130.5 (2 x C), 129.0 (C), 125.9 (C), 121.6 (CH), 115.1 (CH), 112.6 (C), 41.1 (CH_2), 22.0 (CH_3), 9.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{14}H_{14}N_2O_5Na$ 313.0800 found 313.0798.

……

2-(6-Carboxy-3,5-dimethyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethanamonium chloride

155



$C_{14}H_{18}ClN_3O_3$ M = 311.8 g/mol

Indole **159** (90 mg, 0.22 mmol) was engaged with MeOH (5 mL), KOH (2 M, 4 mL) and was heated to 60 °C for 24 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (1 M), concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O (0.05 M HCl) to 100% MeOH) to give, in a quantitative yield, the desired ammonium chloride salt **155** (68 mg, 0.22 mmol).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.06 (s, 1H, H-7), 7.48 (s, 1H, H-4), 3.71 (t, 2H, *J* = 6.0, CH_2), 3.20 (t, 2H, *J* = 6.0, CH_2), 2.65 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3).

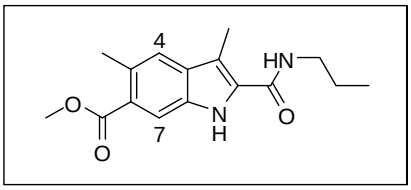
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 179.5 (C=O), 165.3 (C=O), 139.4 (C), 135.5 (C), 129.8 (C), 129.0 (C), 127.5 (C), 121.3 (CH), 115.5 (C), 111.5 (CH), 42.4 (CH_2), 23.9 (CH_2), 11.8 (CH_3), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}Cl)^+$ *m/z* calcd for $C_{14}H_{18}N_3O_3$ 276.1348 found 276.1349.

……

Methyl 3,5-dimethyl-2-(propylcarbamoyl)-1*H*-indole-6-carboxylate

156



$C_{16}H_{20}N_2O_3$ M = 288.3 g/mol

To a solution of indole **132** (50 mg, 0.20 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (6 mL), CDI (39 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq.) was added at room temperature. The mixture was stirred for 1 h and then propylamine (300 μL, 0.40 mmol, 2 eq.) was slowly added at room temperature. The resulting mixture was stirred for 24 h then DMF was removed *in vacuo.* EtOAc (100 mL) was added into the resulting oil and washed with H_2O (2 x 150 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to obtain a brown solid which was purified by FC (column A, 100% Cyc to 100% EtOAc) to give the desired indole **156** as a yellow foam (23 mg, 0.080 mmol, 40%).

Mp : 191-192 °C.

R_f = 0.65 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

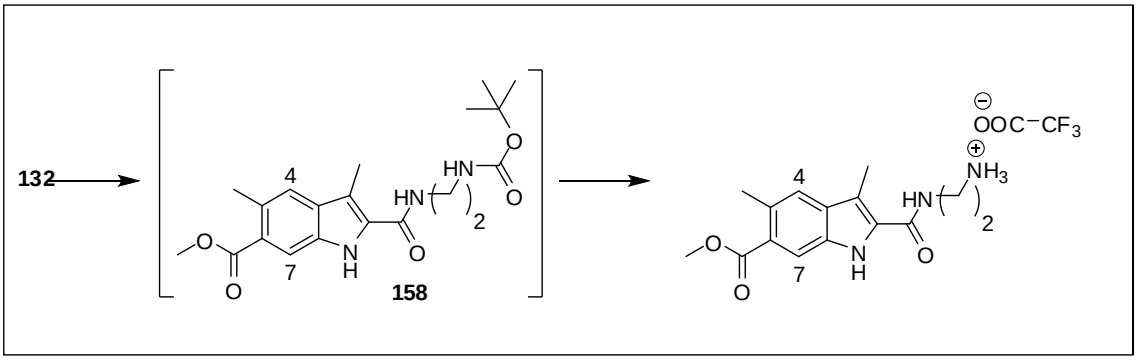
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.67 (brs, 1H, NH) 8.53 (brs, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, H-7), 7.43 (s, 1H, H-4), 3.91 (s, 3H, CH_3), 3.51 (m, 2H, CH_2), 2.69 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.70 (m, 2H, CH_2), 1.04 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.5 (C=O), 162.4 (C=O), 133.0 (C), 131.3 (C), 130.5 (C), 130.4 (C), 125.8 (C), 121.4 (CH), 111.5 (CH), 110.6 (C), 51.7 (CH_3), 41.6 (CH_2), 22.9 (CH_2), 22.2 (CH_3), 11.4 (CH_3), 10.2 (CH_3).

……

2-(6-(Methoxycarbonyl)-3,5-dimethyl-1*H*-indole-2-carboxamido)ethanamonium 2,2,2-trifluoroacetate

159



$C_{20}H_{27}N_3O_5$ M = 389.4 g/mol **$C_{17}H_{20}F_3N_3O_5$ M = 403.4 g/mol**

To a solution of indole **132** (110 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), CDI (94 mg, 0.58 mmol, 1.3 eq.) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature, then N-Boc-protected diaminoethane (57260-73-8) (352 mg, 2.20 mmol, 5 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 24 h. DMF was removed *in vacuo* and EtOAc (100 mL) was added into the resulting oil, the organic layer was washed with H_2O (2 x 150 mL), dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to afford brown solid. The residue was filtered trough a silice pad (EtOAc) to give the desired compound **158** as a light brown foam which was directly engaged in the next step. To a solution of **158** in DCM (15 mL), TFA (1 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 8 h at room temperature. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by FC (column D, 100% H_2O to 100% MeOH) to give the desired trifluoroacetate ammonium salt **159** as a white foam (112 mg, 0.27 mmol, 61%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.02 (s, 1H, H-7), 7.46 (s, 1H, H-4), 3.89 (s, 3H, CH_3), 3.68 (t, 2H, *J* = 6.0, CH_2), 3.20 (t, 2H, *J* = 6.0, CH_2), 2.64 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3).

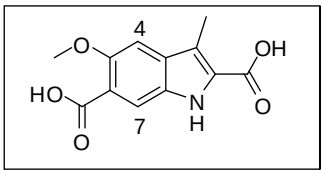
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 180.5 (C=O), 164.6 (C=O), 138.4 (C), 134.3 (C), 129.2 (C), 128.9 (C), 127.0 (C), 121.2 (CH), 115.1 (C), 111.0 (CH), 51.7 (CH_3), 42.2 (CH_2), 24.2 (CH_2), 11.4 (CH_3), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M\text{-}CF_3COO^-)^+$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{20}N_3O_3$ 290.1499 found 290.1502.

……

5-Methoxy-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

160



$C_{12}H_{11}NO_5$ M = 249.2 g/mol

Indole **170** (145 mg, 0.55 mmol) was dissolved in MeOH (15 mL) and a solution of KOH (5 M, 10 mL) was added. The reaction mixture was stirred under reflux for 12 h. After cooling to room temperature, the mixture was acidified to pH 3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired diacid **160** as a brown solid (75 mg, 0.30 mmol, 55%).

Mp: 260 °C (Dec).

R_f = 0.11 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.50 (s, 1H, NH), 7.73 (s, 1H, H-7), 7.18 (s, 1H, H-4), 3.83 (s, 3H, CH_3) 2.54 (s, 3H, CH_3).

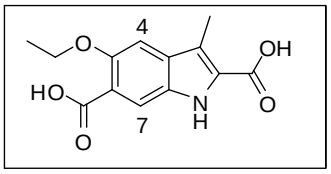
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 167.7 (C=O), 163.3 (C=O); 152.0 (C), 130.3 (C), 130.0 (C), 127.0 (C), 120.1 (C), 117.0 (C), 115.3 (CH), 101.5 (CH), 56.2 (CH_3), 9.83 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{12}H_{11}NO_5Na$ 272.0535 found 272.0548.

…….

5-Ethoxy-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

161



$C_{13}H_{13}NO_5$ M = 263.2 g/mol

Indole **171** (200 mg, 0.72 mmol, 1 eq.) was dissolved in MeOH (15 mL) and a solution of KOH (5 M, 10 mL) was added. The reaction mixture was stirred under reflux for 12 h. After cooling to room temperature, the mixture was acidified to pH 2-3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired diacid **161** as a white solid (114 mg, 0.43 mmol, 60%).

Mp: 260 °C (Dec).

R_f = 0.18 (SiO_2, 100% EtOAc).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.60 (s, 1H, NH), 7.67 (s, 1H, H-7), 6.99 (s, 1H, H-4), 4.09 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.44 (s, 3H, CH_3), 1.35 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

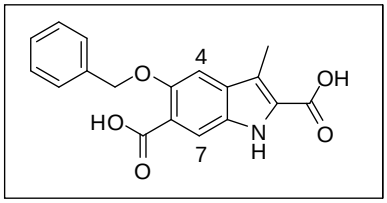
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 173.5 (C=O), 170.0 (C=O), 150.2 (C), 134.7 (C), 130.1 (C), 129.1 (C), 123.2 (C), 113.5 (CH), 110.7 (C), 103.0 (CH), 65.2 (CH_2), 15.0 (CH_3), 9.90 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{13}NO_5Na$ 286.0691 found 286.0705.

……

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

162



$C_{18}H_{15}NO_5$ M = 325.3 g/mol

Indole **175** (150 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) was heated under reflux with MeOH (15 mL) and KOH (5 M, 8 mL) for 12 h. The mixture was neutralized with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired diacid **162** as a white solid (72 mg, 0.22 mmol, 50%).

Mp: 260 °C (Dec).

R_f = 0.10 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/4).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 11.52 (s, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, H-7), 7.57-7.32 (m, 6H, 5 x CH_{ar}, H-4), 5.20 (s, 2H, CH_2), 2.50 (s, 3H, CH_3).

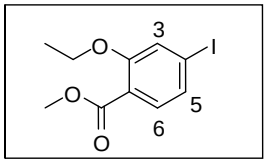
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 177.2 (C=O), 172.7 (C=O), 160.3 (C), 147.0 (C), 139.8 (C), 139.7 (C), 137.8 (2 x CH), 137.0 (CH), 136.7 (2 x CH), 136.5 (C), 130.2 (C), 126.5 (C), 124.7 (CH), 113.0 (CH), 79.9 (CH_2), 19.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{18}H_{15}NO_5Na$ 348.0848 found 348.0853.

……

Methyl 2-ethoxy-4-iodobenzoate[179]

165



$C_{10}H_{11}IO_3$ M = 306.1 g/mol

CAS: 1246765-31-0

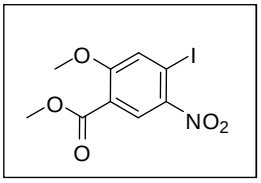
Methyl 4-iodosalicylate **163** (CAS: 18179-39-0) (1.00 g, 3.60 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (10 mL). Cesium carbonate (2.34 g, 7.20 mmol, 2 eq.) and ethyl iodide (0.38 mL, 4.78 mmol, 1.3 eq.) were added. The mixture was stirred for 16 h at room temperature and DMF was removed. The residue was diluted with EtOAc (20 mL) and washed successively with H_2O (2 x 100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give the ether **165** as a brown oil in a quantitative yield (1.10 g, 3.60 mmol).

R_f = 0.41 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.30-7.24 (m, 2H, H-3, H-5), 4.07 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.84 (s, 3H, CH_3), 1.43 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

…….

Methyl 4-iodo-2-methoxy-5-nitrobenzoate
166



$C_9H_8INO_5$ M = 337.1 g/mol

A cold mixture of HNO_3 (0.3 mL, 14 M) and H_2SO_4 (0.5 mL, 36 M) was added slowly to a solution of methyl 4-iodo-2-methoxybenzoate **164** (CAS: 148490-97-5) (500 mg, 1.71 mmol) dissolved in sulfuric acid (0.8 mL, 36 M) with vigorous stirring at 0 °C. Upon completion of the addition, the solution was allowed to warm to room temperature, stirred for 5 h and was poured onto crushed ice and H_2O (150 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 150 mL), the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give the nitro compound **166** as an orange powder (489 mg, 1.45 mmol, 85%).

Mp: 140-142 °C.

R_f = 0.53 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

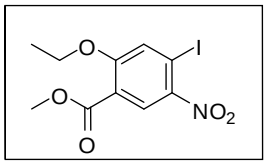
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.53 (s, 1H, CH_{ar}), 7.82 (s, 1H, CH_{ar}), 4.05 (s, 3H, CH_3), 3.95 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.9 (C=O) 161.1 (C) 144.8 (C) 129.2 (CH) 125.5 (CH) 120.0 (C) 93.2 (C) 57.0 (CH_3) 52.6 (CH_3).

……

Methyl 2-ethoxy-4-iodo-5-nitrobenzoate

167



$C_{10}H_{10}INO_5$ M = 351.1 g/mol

A cold mixture of HNO_3 (0.6 mL, 14 M) and H_2SO_4 (1.0 mL, 36 M) was added slowly to a solution of iodo-compound **165** (1.00 g, 3.27 mmol) dissolved in H_2SO_4 (1.6 mL, 36 M) within 30 min with vigorous stirring at 0 °C. Upon completion of the addition, the solution was allowed to warm to room temperature, stirred for 5 h and poured onto crushed ice and H_2O (150 mL). The aqueous layer was exctracted with EtOAc (3 x 150 mL), and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and purified by FC (Column B, 9/1 Cyc/EtOAc to 100% EtOAc) to give the desired product **167** as an orange powder (650 mg, 1.85 mmol, 56%).

Mp: 118-120 °C.

R_f = 0.68 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

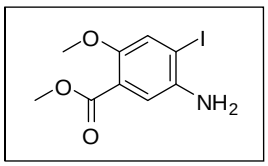
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.34 (s, 1H, CH_{ar}), 7.82 (s, 1H, CH_{ar}), 4.33 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.88 (s, 3H, CH_3), 1.31 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.0 (C=O), 160.6 (C), 144.5 (C), 129.2 (CH), 126.2 (CH), 120.2 (C), 93.0 (C), 65.9 (CH_2), 52.5 (CH_3), 14.3 (CH_3).

……

Methyl 5-amino-4-iodo-2-methoxybenzoate

168



$C_9H_{10}INO_3$ M = 307.1 g/mol

The nitro compound **166** (489 mg, 1.45 mmol, 1 eq.) was dissolved in MeOH (50 mL). Acetic acid (3.4 mL, 2.90 mmol, 2 eq) and iron filings (285 mg, 4.35 mmol, 3 eq.) were added at room temperature and the reaction was stirred and heated under reflux for 4 h under mechanic stirrer. After filtration through celite®, solvent was removed, the crude residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with a satured solution of $NaHCO_3$ (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and the residue was purified by FC (Column E, 100% Cyc to 5/5 Cyc/EtOAc) to give the desired amine **168** as an orange oil (377 mg, 1.23 mmol, 85%).

R_f = 0.50 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.27 (s, 1H, CH_{ar}), 7.21 (s, 1H, CH_{ar}), 3.86 (s, 3H, CH_3), 3.81 (s, 3H, CH_3).

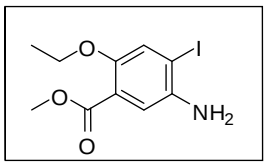
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.2 (C=O) 151.8 (C) 140.7 (C) 123.4 (CH) 121.1(C) 116.9 (CH) 89.6 (C) 57.0 (CH_3) 52.2 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_9H_{10}NO_3NaI$ 329.9603 found 329.9599.

……

Methyl 5-amino-2-ethoxy-4-iodobenzoate

169



$C_{10}H_{12}INO_3$ M = 321.1 g/mol

The nitro compound **167** (600 mg, 1.70 mmol, 1 eq.) was dissolved in MeOH (50 mL). HCl (0.2 M, 8.5 mL, 1.70 mmol, 1 eq.) and iron filings (280 mg, 5.10 mmol, 3 eq.) were added at room temperature and the reaction was stirred and heated under reflux for 4 h. After filtration through celite®, solvent was removed, the residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with a satured solution of $NaHCO_3$ (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and the residue was purified by FC (Column E, 100% Cyc to 1/1 Cyc/EtOAc) to give the desired amine **169** as an orange oil (464 mg, 1.44 mmol, 85%).

R_f = 0.48 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (s, 1H, CH_{ar}), 7.18 (s, 1H, CH_{ar}), 4.71 (brs, 2H, NH_2), 4.00 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3), 1.34 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

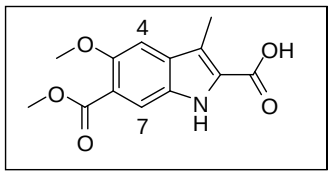
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.0 (C=O), 160.6 (C), 144.5 (C), 129.3 (CH), 126.2 (CH), 120.2 (C), 93.1 (C), 65.9 (CH_2), 52.5 (CH_3), 14.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{10}H_{13}INO_3$ 321.9935 found 321.9938.

……

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

170



$C_{13}H_{13}NO_5$ M = 263.2 g/mol

To a solution of methyl 5-amino-4-iodo-2-methoxybenzoate **168** (260 mg, 0.85 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), 2-oxobutyric acid (430 mg, 4.25 mmol, 5 eq.) and DABCO (283 mg, 2.5 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (10 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with HCl (0.1 M) (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid. The residue was purified by filtration under silica gel (EtOAc) and then by trituration in H_2O to give the desired indole **170** as a brown foam (145 mg, 0.55 mmol, 65%).

R_f = 0.18 (SiO_2, DCM/MeOH: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.5 (s, 1H, NH), 7.71 (s, 1H, H-7), 7.20 (s, 1H, H-4), 3.83 (s, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, CH_3) 2.52 (s, 3H, CH_3).

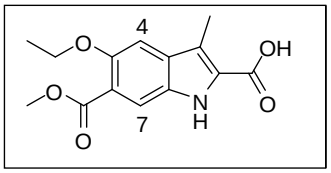
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 166.6 (C=O), 163.2 (C=O), 152.0 (C), 130.5 (C), 129.9 (C), 127.2 (C), 119.1 (C), 117.0 (C), 115.2 (CH), 101.7 (CH), 56.1 (CH_3), 51.9 (CH_3), 9.80 (CH_3).

HR-ESIMS: $[M+Na]^+$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{13}NO_5Na$ 286.0691 found 286.0701.

……

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

171



$C_{14}H_{15}NO_5$ M = 277.3 g/mol

To a solution of methyl 5-amino-4-iodo-2-ethoxybenzoate **169** (400 mg, 1.24 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), 2-oxobutyric acid (633 mg, 6.20 mmol, 5 eq.) and DABCO (417 mg, 3.72 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (13 mg, 0.06 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to obtain dark brown solid. The residue was purified by filtration over silica gel (EtOAc) and then by trituration in H_2O to give the desired indole **171** as a brown foam (206 mg, 0.74 mmol, 60%).

Mp: 260 °C (Dec).

R_f = 0.38 (SiO_2, 100% EtOAc).

^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) δ 10.60 (s, 1H, NH), 7.86 (s, 1H, H-7), 7.26 (s, 1H, H-4), 4.13 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.84 (s, 3H, CH_3), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.40 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

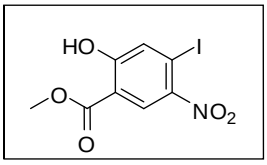
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-d_6) δ 167.8 (C=O), 163.3 (C=O), 152.9 (C), 131.9 (C), 131.5 (C), 127.5 (C), 122.0 (C), 119.0 (C), 116.0 (CH), 104.5 (CH), 66.0 (CH_2), 52.0 (CH_3), 15.2 (CH_3), 10.0 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{14}H_{16}NO_5$ 278.1018 found 278.1028.

……

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

172



$C_8H_6INO_5$ M = 322.9 g/mol

A cold mixture of HNO_3 (0.6 mL, 14 M) and H_2SO_4 (1.0 mL, 36 M) was added slowly to a solution of methyl 4-iodosalicylate (CAS: 18179-39-0) (1.00 g, 3.60 mmol) dissolved in H_2SO_4 (1.7 mL, 36 M) within 30 min with vigorous stirring at 0°C. Upon completion of the addition the solution was allowed to warm to room temperature, stirred for 5 h and was poured onto crushed ice and H_2O (150 mL).
The aqueous layer was exctracted with EtOAc (3 x 150 mL), and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and purified by FC (Column B, 9/1 Cyc/EtOAc to 100% EtOAc) to give the desired product **172** as an orange powder (349 mg, 1.08 mmol, 30%).

Mp: 126-128 °C.

R_f = 0.75 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/1).

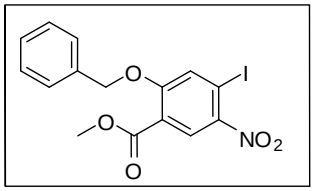
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) δ 11.15 (s, 1H, OH), 8.45 (s, 1H, CH_{ar}), 7.77 (s, 1H, CH_{ar}), 4.04 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-d_6) δ 168.7 (C=O), 163.2 (C), 144.8 (C), 131.0 (CH), 127.3(CH), 112.7 (C), 94.9 (C), 52.9 (CH_3).

……

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

173



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

Methyl 2-hydroxy-4-iodo-5-nitrobenzoate **172** (320 mg, 0.99 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Cesium carbonate (645 mg, 1.98 mmol, 2eq.) and benzyl bromide (153 µL, 1.28 mmol, 1.3 eq.) were added. The reaction was stirred for 16 h at room temperature and DMF was removed. The residue was diluted with EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (2 x 50 mL). The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo* to give compound **173** as a brown oil in quantitative yield (408 mg, 0.99 mmol).

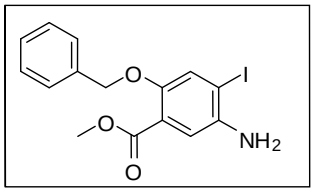
R_f = 0.78 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.52 (s, 1H, CH_{ar}), 7.66 (s, 1H, CH_{ar}), 7.49-7.36 (m, 5H, 5 x H_{ar}), 5.26 (s, 2H, CH_2), 3.92 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 159.4 (C=O), 155.0 (C), 144.2 (C), 134.0 (C), 128.6-126.1 (7 x CH), 119.8 (C), 92.3 (C), 70.7 (CH_2), 51.9 (CH_3).

……

Methyl 5-amino-2-(benzyloxy)-4-iodobenzoate
174



$C_{15}H_{14}NO_3I$ M = 383.2g/mol

Methyl 2-(benzyloxy)-4-iodo-5-nitrobenzoate **173** (380 mg, 0.92 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetone (50 mL). A saturated solution of $Na_2S_2O_4$ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7, 50 mL) was added and the solution was stirred at reflux for 2 h. Acetone was removed *in vacuo*, then the solution was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and the resulting oil was purified by FC (Column B, 9/1 Cyc/EtOAc to 100% EtOAc) to give the desired amine **174** as a yellow foam in a quantitative yield (350 mg, 0.92 mmol).

R_f = 0.38 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48-7.24 (m, 7H, 7 x CH_{ar}), 5.07 (s, 2H, CH_2), 3.89 (s, 3H, CH_3).

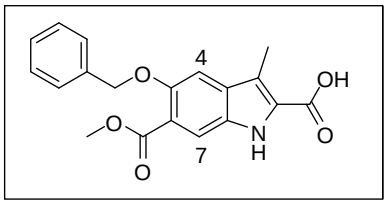
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.6 (C=O), 151.1 (C), 141.6 (C), 137.0 (C), 128.4-126.1 (6 x CH), 121.3 (C), 116.5 (CH), 89.3 (C), 72.4 (CH_2), 52.1 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{15}NO_3I$ 384.0097 found 384.0102.

…….

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

175



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

To a solution of methyl 5-amino-2-(benzyloxy)-4-iodobenzoate **174** (300 mg, 0.78 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), under argon, 2-oxobutyric acid (399 mg, 3.91 mmol, 5 eq.) and DABCO (262 mg, 2.34 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (8 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to afford a dark brown solid. The residue was filtered over silica gel (EtOAc) and the residue was purified by trituration in H_2O to give the desired indole **175** as a brown foam (185 mg, 0.55 mmol, 70%).

R_f = 0.38 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/4).

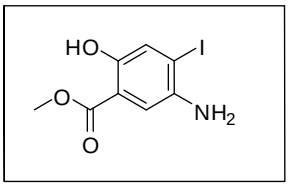
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 11.57 (s, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, H-7), 7.43-7.32 (m, 6H, 5 x CH_{ar}, H-4), 5.20 (s, 2H, CH_2), 3.83 (s, 3H, CH_3), 2.50 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 168.8 (C=O), 163.2 (C=O), 150.9 (C), 137.5 (C), 130.2 (C), 130.6 (C), 128.3 (2 x CH), 128.1 (CH), 127.5 (C), 127.1 (2 x CH), 119.3 (C), 117.0 (C), 115.4 (CH), 103.7 (CH), 77.9 (CH_2), 51.9 (CH_3), 9.8 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{19}H_{17}NO_5Na$ 362.1004 found 362.1020.

……

Methyl 5-amino-2-hydroxy-4-iodobenzoate
176



$C_8H_8NO_3I$ M = 293.1 g/mol

Methyl 2-hydroxy-4-iodo-5-nitrobenzoate **172** (200 mg, 0.62 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetone (50 mL). A saturated solution of $Na_2S_2O_4$ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7, 50 mL) was added and the solution was stirred at reflux for 2 h. Acetone was removed *in vacuo*, then the solution was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4, concentrated *in vacuo* and the resulting oil was purified by FC (Column B, 9/1 Cyc/EtOAc to 100% EtOAc) to give the desired amine **176** as a yellow oil in a quantitative yield (182 mg, 0.62 mmol).

R_f = 0.30 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 4/1).

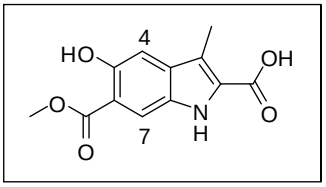
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.66 (s, 1H, OH), 7.29 (s, 1H, CH_{ar}), 7.20 (s, 1H, CH_{ar}), 3.86 (s, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 168.9 (C=O), 150.8 (C), 141.6 (C), 126.5 (CH), 113.7 (C), 113.4 (CH), 93.1 (C), 52.1 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{15}NO_3I$ 293.0659 found 293.0661.

……

5-Hydroxy-6-(methoxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid
177



$C_{12}H_{11}NO_5$ M = 249.2 g/mol

To a solution of methyl 5-amino-2-hydroxy-4-iodobenzoate **176** (250 mg, 0.85 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL) under argon, 2-oxobutyric acid (433 mg, 4.25 mmol, 5 eq.) and DABCO (287 mg, 2.56 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 20 min at room temperature before addition of palladium (II) diacetate (9 mg, 0.043 mmol, 0.05 eq.). The mixture was warmed to 75 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H_2O (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid. The residue was purified by filtration over silica gel (EtOAc) and then by trituration in H_2O to give the desired indole **177** as a brown foam (185 mg, 0.55 mmol, 70%).

Mp: 267-270 (Dec).

R_f = 0.15 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/4).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.92 (s, 1H, H-7), 7.09 (s, 1H, H-4), 3.93 (s, 3H, CH_3), 2.45 (s, 3H, CH_3).

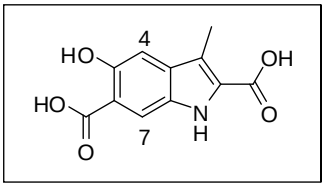
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.2 (C=O), 163.2 (C=O), 152.4 (C), 133.3 (C), 130.0 (C), 129.0 (C), 116.1 (C), 114.3 (CH), 111.1 (C), 104.8 (CH), 52.5 (CH_3), 9.6 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{12}H_{11}NO_5Na$ 272.0535 found 272.0539.

……

5-Hydroxy-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

178



$C_{11}H_9NO_5$ M = 235.2 g/mol

Indole **177** (100 mg, 0.40 mmol) was engaged with MeOH (10 mL) and KOH (2 M, 4 mL) and heated under reflux for 24 h. The mixture was acidified to pH 2-3 with HCl (1 M). The solvent was removed, the residue was purified by trituration in and H_2O (5 mL) to give the acid **178** as a pale yellow solid (68 mg, 0.29 mmol, 72%).

Mp: 260 °C (Dec).

R_f = 0.10 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 1/4).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.94 (s, 1H, H-7), 7.05 (s, 1H, H-4), 2.45 (s, 3H, CH_3).

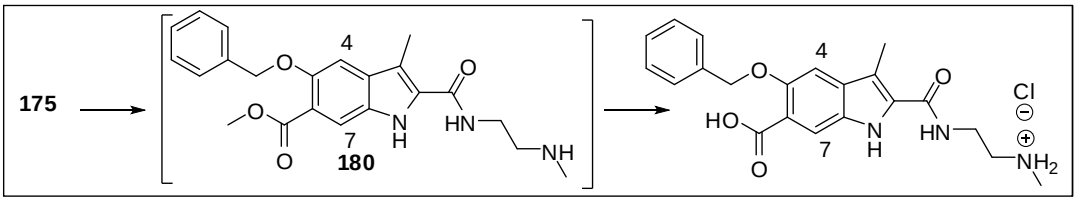
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 172.5 (C=O), 163.2 (C=O), 153.2 (C), 133.3 (C), 129.9 (C), 128.8 (C), 116.0 (C), 114.7 (CH), 111.3 (C), 104.3 (CH), 9.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{11}H_8NO_5$ 234.0402 found 234.0388.

……

2-(5-(benzyloxy)-6-carboxy-3-methyl-1H-indole-2-carboxamido)-N-methylethanaminium chloride

179



$C_{21}H_{23}N_3O_4$ M = 381.4 g/mol

To a solution of **175** (100 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (5 mL) was added CDI (56 mg, 0.35 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then *N*-methylethyleneamine (CAS: 109-81-9) (25 µL, 0.29 mmol, 1 eq.) was added. The solution was stirred for 12 h, DMF was removed and the mixture was directly engaged into the next step. The residue **180** was dissolved in a mixture of MeOH (8 mL) and H_2O (2 mL) and KOH (5 M, 5 mL) was added. The solution was heated to reflux with for 12 h., then acidified to pH 2-3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired salt **179** (49 mg, 0.13 mmol, 45%).

R_f = 0.20 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.57 (s, 1H, H-7), 7.36-7.09 (m, 6H, 5 x CH_{ar}, H-4), 5.17 (s, 2H, CH_2), 3.53 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.79 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.86 (s, 3H, CH_3), 2.48 (s, 3H, CH_3).

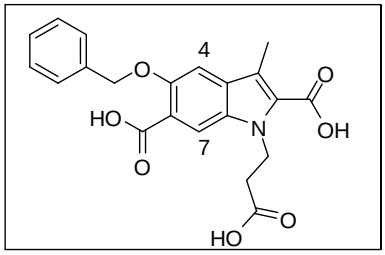
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 172.3 (C=O), 165.4 (C=O), 151.4 (C), 139.5 (C), 132.3 (C), 132.2 (C), 129.6 (C), 129.5 (C), 129.3 (2 x CH), 128.5 (2 x CH), 128.4 (CH), 116.2 (C), 112.2 (CH), 104.0 (CH), 73.3 (CH_2), 51.6 (CH_2), 35.8 (CH_2), 30.7 (CH_3), 9.9 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{21}H_{24}N_3O_4$ 382.1767 found 382.1745.

……

5-(Benzyloxy)-1-(2-carboxyethyl)-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

184



$C_{21}H_{19}NO_7$ M = 397.4 g/mol

To a solution of indole **175** (50 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) in anhydrous acetonitrile were added Cs_2CO_3 (97 mg, 0.30 mmol, 2 eq.) and ethyl 3-bromopropanoate (CAS: 539-74-2) (19 µL, 0.15 mmol, 1 eq.). The solution was heated to reflux for 48 h, then the solvent was removed and the mixture was directly engaged into the next step. The crude product was dissolved in MeOH (5 mL) and KOH (5 M, 2 mL) were added. The solution was heated to reflux for 12 h, then the solution was acidified to pH 2-3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give a mixture of triacid **184** (85%) and **162** (15%) impossible to separate (same R_f and too close by HPLC).

R_f = 0.35 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

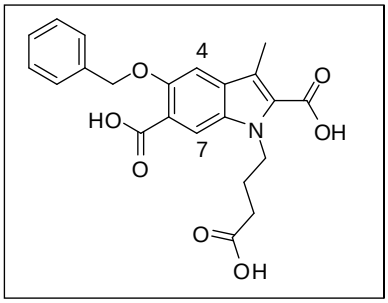
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.92 (s, 1H, H-7), 7.57-7.34 (m, 6H, 5 x CH_{ar}, H-4) 5.23 (s, 2H, CH_2), 4.71 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.61 (t, 2H, *J* = 7.0, CH_2), 2.50 (under solvent pic, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.2 (C=O), 169.7 (C=O), 164.3 (C=O), 151.7 (C), 136.5 (C), 131.3 (C), 130.6 (C), 129.2 (2 x CH), 128.7 (CH), 126.5 (C), 126.1 (2 x CH), 119.8 (C), 117.4 (C), 116.0 (CH), 104.4 (CH), 78.8 (CH_2), 49.9 (CH_2), 31.5 (CH_2), 9.9 (CH_3).

……

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

185



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

To a solution of indole **175** (50 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) in acetonitrile were added Cs_2CO_3 (41 mg, 0.30 mmol, 2 eq.) and ethyl 3-bromobutanoate (CAS: 2969-81-5) (20 µL, 0.15 mmol, 1 eq.). The solution was heated to reflux for 48 h, then the solvent was removed and the mixture was directly engaged into the next step. MeOH (5 mL) and KOH (5 M) (2 mL) were added and the solution was heated to reflux for 12 h. The solution was neutralized with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired triacid **185** as a yellow powder (25 mg, 0.06 mmol, 40%).

Mp: 240-250 °C (Dec).

R_f = 0.40 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.05 (s, 1H, H-7), 7.57-7.32 (m, 6H, 5 x CH_{ar}, H-4), 5.28 (s, 2H, CH_2), 4.61 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.54 (s, 3H, CH_3), 2.27 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.04 (qt, 2H, *J* = 8.0, CH_2).

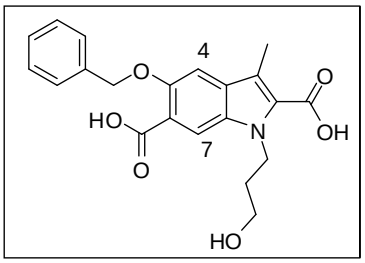
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 172.0 (C=O), 167.5 (C=O), 162.9 (C=O), 150.6 (C), 137.0 (C), 131.3 (C), 128.9 (C), 127.9 (2 x CH), 127.2 (CH), 127.0 (C), 126.8 (2 x CH), 121.0 (C), 118.3 (C), 113.0 (CH), 103.3 (CH), 70.0 (CH_2), 51.5 (CH_2), 40.2 (CH_2), 34.8 (CH_2), 10.3 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{22}H_{20}NO_7$ 410.1230 found 410.1240.

……

5-(Benzyloxy)-1-(3-hydroxypropyl)-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

186



$C_{21}H_{21}NO_6$ M = 383.4 g/mol

To a solution of indole **175** (50 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in acetonitrile was added Cs_2CO_3 (41 mg, 0.30 mmol, 2 eq.) and 3-chloropropan-1-ol (CAS: 627-30-5) (12 µL, 0.15 mmol, 1 eq.). The solution was heated to reflux for 48 h, then the solvent was removed and the mixture was directly engaged into the next step. MeOH (5 mL) and KOH (5 M) (2 mL) were added and the solution was heated to reflux for 12 h. Then the solution was acidified to pH 2-3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired compound **186** as a brow powder (9 mg, 0.02 mmol, 15%).

Mp: 290 °C (Dec).

R_f = 0.31 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1)

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.08 (s, 1H, H-7), 7.57-7.33 (m, 6H, 5 x CH_{ar}, H-4), 5.28 (s, 2H, CH_2), 4.64 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 3.53 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.55 (s, 3H, CH_3), 1.99 (qt, 2H, *J* = 8.0, CH_2).

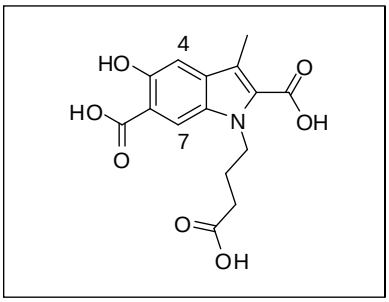
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) 168.1 (C=O), 163.4 (C=O), 150.9 (C), 137.5 (C), 132.1 (C), 128.9 (C), 128.4 (2 x CH), 127.6 (CH), 127.3 (2 x CH), 121.4 (C), 118.4 (C), 113.3 (CH), 103.7 (CH), 70.43 (CH_2), 58.1 (CH_2), 41.7 (CH_2), 33.8 (CH_2), 10.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{21}H_{20}NO_6$ 382.1296 found 382.1294

……

1-(3-Carboxypropyl)-5-hydroxy-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid

187



$C_{15}H_{15}NO_7$ M = 321.3 g/mol

Indole **185** (20 mg, 0.049 mmol, 1 eq.) was dissolved in MeOH (15 mL) and $Pd(OH)_2$ (20%) on carbon (1 mg, 0.007 mmol, 0.14 eq.) was added under an atmosphere of H_2. The reaction was stirred for 12 h at room temperature, then the mixture was filtered under celite® and solvent was removed to give the desired alcohol **187** as a brown foam in a quantitative yield (16 mg, 0.049 mmol).

Mp: 240 °C (Dec).

R_f = 0.22 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1).

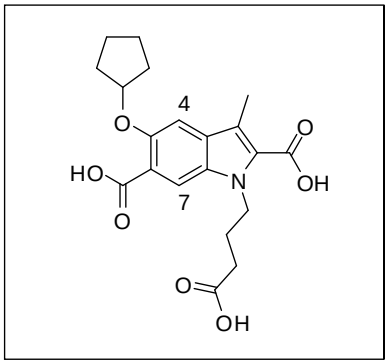
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.09 (s, 1H, H-7), 7.08 (s, 1H, H-4), 4.57 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.50 (s, 3H, CH_3), 2.27 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.02 (qt, 2H, *J* = 8.0, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 173.0 (C=O), 172.5 (C=O), 163.3 (C=O), 153.6 (C), 132.1 (C), 131.6 (C), 129.4 (C), 117.3 (C), 113.0 (CH), 111.7 (C), 104.8 (CH), 43.5 (CH_2), 30.6 (CH_2), 25.7 (CH_2), 10.5 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+Na)^+$ *m/z* calcd for $C_{15}H_{15}NO_7Na$ 344.0746 found 344.0751.

……

1-(3-Carboxypropyl)-5-(cyclopentyloxy)-3-methyl-1*H*-indole-2,6-dicarboxylic acid
188



$C_{20}H_{23}NO_7$ M = 389.4 g/mol

To a solution of indole **187** (60 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) in acetonitrile were added Cs_2CO_3 (182 mg, 0.56 mmol, 3 eq.) and iodocyclopentane (22 µL, 0.19 mmol, 1 eq.). The solution was heated to reflux for 48 h, then the solvent was removed. The solution was acidified to pH 2-3 with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H_2O to give the desired triacid **188** as a yellow powder (44 mg, 0.11 mmol, 60%).

Mp: 260 °C (Dec).

R_f = 0.40 (SiO_2, DCM/MeOH: 4/1)

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.22 (s, 1H, H-7), 7.32 (s, 1H, H-4), 5.18 (m, 1H, CH), 4.51 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.51 (s, 3H, CH_3), 2.23 (t, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 2.08- 1.85 (m, 10H, 5 x CH_2).

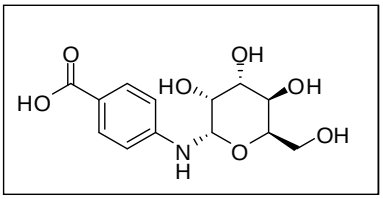
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 173.9 (C=O), 168.1 (C=O), 163.3 (C=O), 149.9 (C), 131.9 (C), 128.9 (C), 127.3 (C), 122.4 (C), 118.4 (C), 112.8 (CH), 104.7 (CH), 80.8 (CH), 43.5 (CH_2), 32.1 (2 x CH_2), 30.7 (CH_2), 25.8 (CH_2), 23.5 (2 x CH_2), 10.7 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M-H)^-$ *m/z* calcd for $C_{20}H_{22}NO_7$ 388.1396 found 388.1415.

……

4-amino-D-glucose benzoic acid[180]

191



$C_{13}H_{17}NO_7$ M = 299.3 g/mol

A mixture of D-glucose (1.00 g, 5.56 mmol), 4-aminobenzoic acid **192** (760 g, 5.56 mmol, 1 eq.), EtOH (10 mL), water (0.3 mL) and glacial acetic acid (150 µL) was stirred at room temperature until the starting materials dissolved completely. The mixture was cooled to room temperature and treated with diethylether (25 mL) and stirred for 12 h. The precipitate was filtered off and washed with EtOH. The residue was purified by reprecipitation from alcoholic solution by diethylether to obtain the desired glycosyle **191** as white powder (0.75 g, 2.50 mmol, 45%).

Mp : 126-127 °C.

R_f = 0.18 (SiO_2, EtOAc /MeOH: 6/4).

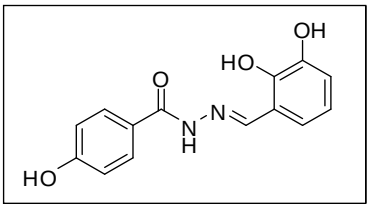
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.82 (d, 2H, *J* = 9.0, CH_{ar}), 6.80 (d, 2H, *J* = 9.0, CH_{ar}), 4.61 (d, 1H, *J* = 8.5, H-1), 3.86 (dd, 1H, *J* = 12.0, 2.0, H-6), 3.68 (dd, 1H, *J* = 12.0, 5.5, H-6'), 3.50-3.30 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{17}NO_7$ 299.1005 found 299.1009.

……

N'-(2, 3-dihydroxybenzylidene)-4-hydroxybenzohydrazide[181]

192



$C_{14}H_{12}N_2O_4$ M = 272.3 g/mol

CAS: 303759-26-4

To a solution of 4-hydroxybenzohydrazide **194** (0.26 g, 1.69 mmol, 1 eq.) and 2,3-dihydroxybenzaldehyde (0.27 g, 2.00 mmol, 1.2 eq.) in absolute EtOH (25 mL) was added 1 drop of acetic acid. The reaction mixture was refluxed for 24 h. The reaction mixture was cooling to room temperature and concentrated *in vacuo* to remove solvent. The resulting residue was solidified by EtOAc to give white solid **192** (0.30 g, 1.09 mmol, 65%).

R_f = 0.50 (SiO_2, 100% EtOAc).

Mp : 273-274 °C

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.92 (s, 1H), 11.32 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.54 (s, 1H, CH), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.5, 2 x CH), 6.93-6.71 (m, 5H, 5 x CH).

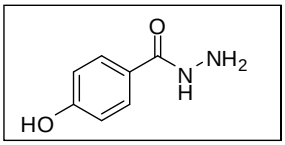
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.9 (C=O), 160.43 (C), 147.7 (CH), 144.5 (C), 145.1 (C), 129.2 (2 x CH), 122.7 (C), 119.7 (CH), 118.6 (CH), 118.3 (C), 116.7 (CH), 114.6 (2 x CH).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{14}H_{12}N_2O_4$ 272.0797 found 272.0801.

……

4-hydroxybenzohydrazide[173]

194



$C_7H_8N_2O_2$ M = 152.2 g/mol

CAS: 5351-23-5

A solution of methyl 4-hydroxybenzoate **193** (1.00 g, 6.00 mmol, 1eq.) in EtOH (20 mL) was treated with hydrazine hydrate (2.4 g, 48.00 mmol, 8 eq.) and the reaction mixture heated at reflux for 48 hours. The reaction mixture was concentrated and the residue was filtered to give the desired hydrazide as solid which was washed twice with EtOAc to give a white solid **194** (0.37 g, 2.39 mmol, 40%).

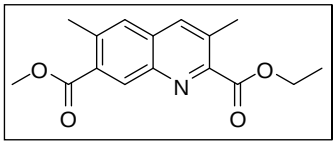
Mp: 267-268 °C (264-266 °C litt.)

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.49 (s, lH, OH), 7.67 (d, 2H, *J* = 8.5, 2 x CH), 6.77 (d, 2H, *J* = 8.5, 2 x CH), 4.37 (s, 3H, NH, NH_2).

……

2-Ethyl 7-methyl 3, 6-dimethylquinoline-2,7-dicarboxylate

195



$C_{16}H_{17}NO_4$ M = 287.3 g/mol

A mixture of methyl 4-amino-2-methylbenzoate **129** (CAS: 18595-12-15) (0.272 g, 1.65 mmol, 1 eq.), ethyl gloxylate (0.4 ml, 1.97 mmol, polymer 50% in toluene, 1.2 eq.) and $MgSO_4$ in $CHCl_3$ (10 ml) was stirred at reflux for 3h. Then $Yb(OTf)_3$ (85 mg, 0.132 mmol, 0.08 eq.) and propionaldehyde (114 mg, 1.97mmol, 1.2 eq.) were added to the mixture successively, under reflux for 24 h. Then the mixture was washed twice with H_2O (2 x 10 mL) and dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to obtain a brown oil. The residue was purified by FC (Column E 4/1 Cyc/EtOAc to 100% EtOAc) to furnish the quinoline **195** as a yellow foam (93 mg, 0.32 mmol, 19%).

R_f = 0.33 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 9/1).

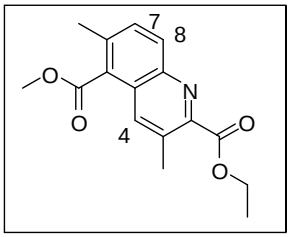
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.79 (s, 1H, H-8), 7.94 (s, 1H, H-5), 7.58 (s, 1H, H-4), 4.52 (q, 2H, CH_2), 3.94 (s, 3H, CH3), 2.79 (s, 3H, CH_3), 2.67 (s, 3H, CH_3), 1.47 (t, 3H, *J* = 7.0, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 167.4 (C=O), 166.3 (C=O), 150.4 (C), 143.7 (C), 138.4 (C), 136.5 (CH), 133.4 (CH), 132.0 (C), 131.2 (C), 130.4 (C), 128.1 (CH), 62.1 (CH_2), 52.0 (CH_3), 21.9 (CH_3), 20.0 (CH_3), 14.4 (CH_3).

HR-ESIMS: $(M+H)^+$ *m/z* calcd for $C_{16}H_{18}NO_4$ 288.1230 found 288.1228.

Secondary product :

196



$C_{16}H_{17}NO_4$ M = 287.3 g/mol

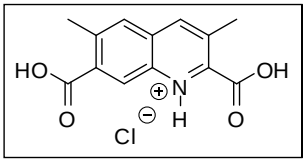
R_f = 0.28 (SiO_2, Cyc/EtOAc: 9/1).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (d, 1H, *J* = 8.0, H-7), 8.07 (s, 1H, H-4), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.0, H-8), 4.52 (q, 2H, *J* = 8.0, CH_2), 4.05 (s, 3H, CH_3), 2.66 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 1.47 (t, 3H, *J* = 8.0, CH_3).

……

3,6-Dimethylquinoline-2,7-dicarboxylic acid

197



$C_{13}H_{12}ClNO_4$ M = 281.7 g/mol

Quinoline **195** (93 mg, 0.32 mmol) was engaged with MeOH (15 mL) and KOH (0.179 g, 3.2 mmol, 10 eq.) and heated to reflux for 24 h. The mixture was neutralized with HCl (1 M). The solvent was removed and the residue was purified by filtration HCl (3 M) through a column of Amberlite® (IRA-401) to otain the chlorhydrate **197** as a yellow salt (22.8 mg, 0.093 mmol, 37%).

Mp : 260 °C (Dec).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.66 (s, 1H, H-8), 8.21 (s, 1H, H-5), 7.77 (s, 1H, H-4), 2.74 (s, 3H, CH_3), 2.71 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.6 (C=O), 162.7 (C=O), 149.4 (CH), 144.9 (C), 143.2 (C), 139.1 (C), 137.0 (C), 136.5 (C), 132.7 (C), 130.4 (CH), 124.6 (CH), 22.2 (CH_3), 20.6 (CH_3).

HR-ESIMS: $[M-H-Cl]^-$ *m/z* calcd for $C_{13}H_{11}NO_4$ 246.0688 found 246.0689.

BIOCHEMISTRY PART

Affinity chromatography:

- Peptide Affinity Chromatography

Synthetic peptides (>95% purity, Eurogentec, Seraing, Belgium) encompassing the 10 C-terminal amino acids of the 5-HT_{2A} receptors were coupled *via* their *N*-terminal extremity to activated CH-Sepharose 4B (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. MALDI-TOF mass spectrometry analysis indicated that the coupling efficacy was higher than 90%. Immobilized peptides were stored at 4 °C in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) and dithiothreitol (DTT, 10 mM) to prevent cysteine oxidation at the -1 position in the 5-HT_{2A} receptor sequence. Brains of Swiss mice (obtained from Janvier, Le Genest-St. Isle, France) were thoroughly washed in phosphate-buffered saline (PBS), homogenized with a Polytron homogenizer, and centrifuged at 200 × g for 3 min. Pellets were resuspended in ice-cold lysis buffer containing Tris-HCl (50 mM, pH 7.4), EDTA (1 mM), and a mixture of protease inhibitors (Roche Applied Science), homogenized 20 times on ice with a glass Teflon homogenizer, and centrifuged at 10,000 × g for 30 min. The membrane pellets were resuspended in CHAPS extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05 mM EDTA, 10 mM CHAPS, and protease inhibitors) for 3 h in rotation at 4 °C. Then samples were centrifuged for 1 h at 10,000 × g. Solubilized proteins (2 mg/condition) were incubated overnight at 4 °C with 20 µg of immobilized peptide in absence or presence of increasing concentrations of synthesized compounds. Samples were washed twice with 1 ml of extraction buffer and then 4 times with PBS. Proteins retained by affinity were eluted with 50 µl of SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 100 mM DTT, and bromophenol blue).

- Immunoblotting

Proteins, resolved on 8% gels, were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (Hybond-C, GE-Healthcare). Membranes were incubated in blocking buffer (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5, 200 mM NaCl, Tween 20, 0.1 % and 5% skimmed dried milk) for 1 h at room temperature and incubated overnight with primary antibodies (anti-PSD-95, 1:500 in blocking buffer) at 4°C. Blots were washed three times with blocking buffer and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:2,000 in blocking buffer) for 1 h at room temperature. Immunoreactivity was detected with an enhanced chemiluminescence method (Renaissance Plus, PerkinElmer Life Sciences).

Proteins synthesis, RMN evaluation:

- Plasmids

A new construct expressing PSD-95 PDZ1 domain in *E.Coli* was subcloned into pET-M11 vector from a GST-PSD-95-PDZ1 plasmid. Primers were designed including the restriction site for NcoI and the reverse sequence included a stop codon followed by the EcoRI restriction site sequence. The melting temperatures were similar at approximately 70 °C. (Fwd : atatccatgggagatggagtatgaggagatcaca, Rev : tcatcggcttcggctgggggtttccggcg). PSD-95PDZ1 was PCR amplified with primers, using GST-PSD-95 PDZ1 construct as a template and hot start polymerase. PCR conditions were: initial melting at 98 °C for 2 minutes followed by 30 cycles of 95 °C/15 seconds, 70 °C/15 seconds and 72 °C/40 seconds. PCR products were cleaned followed by restriction digest using Nco1 and EcoRI. Digest products were ligated into identically digested pET-M11 with QuickLigase (NEB) and transformed into *E. coli*. After an overnight culture, plasmids were extracted and purified to give expression plasmids.

- Recombinant protein production

PDZ1 PSD-95 was expressed in BL21 *E. coli*. ^{15}N-labeled protein was produced by inoculating minimal media, supplemented with 100 mg/l kanamycin and containing ($^{15}NH_4$)Cl as a sole nitrogen source with growth at 37°C to a density of 0.8 OD units and induction with 1 mM IPTG overnight at 30 °C. Following cell disruption using a French press, recombinant proteins were purified by Ni^{2+} affinity chromatography using a 5 mL HisTRAP HP column (GE Healthcare) on the AKTA purifier system. The His tag was removed from PDZ1 PSD-95 protein using TEV protease and the protein further purified to >95% purity, as assessed by SDS PAGE gel, by reloading onto the Ni^{2+} column. The protein is finally purified by gel filtration column.

- NMR experiments for binding

The NMR samples were: 0.1mM PDZ1 PSD-95, 0.2 mM phosphate buffer, 1 mM ligand, in 90% H_2O/10% D_2O at pH 6.5. If necessary, the ligands were dissolved in DMSO and a correct aliquot added to the protein sample to achieve a 1:10 protein:ligand ratio, and with <1% DMSO in the final sample. Spectra were recorded at 25 °C using a Bruker Avance 600 MHz spectrometer fitted with a triple resonance, single z-axis gradient cryogenic probehead. ^{15}N-^{1}H spectra were acquired using H_2O flip-back pulses. Spectra were processed using Bruker Topspin software.

ANNEXES

Annexes

A.Virtual Screening:

- Protein preparation

The virtual screening were performed using Molecular Operating Environment Software (MOE 2010.10). The 3D structure of the PDZ-1 domain of PSD-95 (PDB 2KA9) was downloaded from the protein database and prepared with MOE using LigX, partial charges were assigned using Gasteiger (POPE) method, protein structure was minimized to 0.01 kcal/mol, the peptide (cypin) ligand was removed, the same binding site was selected on X,Y,Z with coordinates of -15.0162, -14.112, 15.9645 respectively and amino acids within box size of 20Å. The binding energy of cypin peptide was found to be -2.80 kcal/mol.

- Database Preparation

For lead identification process using docking experiment, we selected a commercial database of molecules from Asinex containing 514957 molecules. All the ligands were imported into MOE as a new database. The all molecules were washed, the partial charges MMF94X were assigned to them and they were subjected to minimization.

- Docking Screening Experiment.

For the docking-based screening experiment, we created a protocol. The docking was carried out on the active site using the docking module in MOE. All the molecules were subjected to docking at three different levels to identify the top hits. Level I docking: we used alpha Triangle methodology to get molecules having good affinity towards the target. In alpha triangle method, the poses are generated by superposition of ligand atom triplets and triplets of receptor site points. The receptor site points are alpha sphere centres which represent locations of tight packing. At each iteration a random conformation is selected, a random triplet of ligand atoms and a random triplet of alpha sphere centres are used to determine the pose. At the end of this step molecules were sorted on the basis of interaction energy, the top 10% molecules were kept for the next step. Level II of docking has been carried out using Triangle Matcher method. In this method poses are generated by aligning ligand triplets of atoms on triplets of alpha spheres in a more systematic way than in the Alpha Triangle method (6). Same as step 1, the top 10% molecules were used for next step. Level III of docking: we carried out conformational search for all molecules obtained after level 2 docking screening filter. All output molecules of conformational search were used as input for level 3. The triangle Matcher methodology was used along with Forcefield-based refinement procedure of protein-ligand complex. In this refinement the energy minimization of the system is carried out using the conventional molecular mechanics setup. At the end of this step the molecules were examined visually for poses and binding energy. The top 10% of molecules were visually inspected and classified on the basis of their chemical structures. We found that the majority of molecules belong to mainly three families of skeletons.

B.NOE experiment:

Experimental set-up:

Two experimental parameters that require consideration are the NOE mixing times and the ratio of inhibitor to protein. For most experiments, a mixing time of about 300ms is adequate to detect both the intra and intermolecular NOEs. The ratio of ligand:protein is 5:1 although, within limits, the higher the ligand concentration, the better the signal-to-noise ratios as the absolute magnitude of the signal increases.

NOE Theory:

The Nuclear Overhauser Effect (NOE) is the transfer of nuclear spin polarization from one nuclear spin population to another via a process known as cross-relaxation. The magnitude and sign of the NOE varies with the tumbling rate of a molecule. Small molecules that tumble very fast will have a maximum NOE of +0.5. Large molecules that tumble very slowly have a maximum NOE of -1. Therefore, the NOEs of large molecules such as proteins will are often large than the NOEs of smaller molecules like an inhibitor.
The relationship between NOE and distance is given by:

$$NOE \equiv \sigma_{ij} \approx \frac{1}{10}\frac{\gamma^4}{r_{ij}^6}\hbar^2\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\tau_c$$

τ_c is the overall tumbling time, r_{ij} is the distance between two protons

Transferred NOE:

There are several types of NOEs and the type that is being used for the studies of ligand-protein interactions is referred to as transferred NOE. This type of NOE is commonly used when the inhibitor interactions are weak (eg when the dissociation constant, K_d, is greater than 100μM) and when the chemical exchange between the free inhibitor and the bound form is very fast on the NMR timescale. In the presence of fast chemical exchange, two concepts are important:
1. the observed chemical shift of a inhibitor signal is a weighted average between the free and bound inhibitor shifts.
2. the NOE between two protons in the bound inhibitor is transferred to the free molecule by chemical exchange between bound and free inhibitor
Transferred NOEs is carried out in a *large excess* of the ligand but the information obtained is still from the bound state since this latter state dominates the NOE kinetics. Put simply, by observing the large inhibitor signals, the transferred NOE method allows 'amplification' of the NOE from the bound species.
The basis of the transferred NOE experiment is that the cross-relaxation rate, σ^B , of the slowly tumbling bound form of the inhibitor is generally larger than σ^F, the corresponding cross-relaxation rate of the rapidly tumbling free form. Under conditions of fast exchange, the average cross-relaxation rate $<\sigma>$ is dominated by σ^B so that the measured NOE reflect the geometry of the inhibitor in its bound state. Therefore, a $^{13}C/^{15}N$-filtered 2D NOESY

experiment in which the inhibitor signals are observed can be used to provide distances between the protons of an inhibitor in the bound state.

Intermolecular NOEs:

The $^{13}C/^{15}N$-filtered 3D NOESY (and the 2D version) allows detection of NOEs between the inhibitor and protons from the protein. Most useful are datasets involving methyl groups of the proteins since these are the most sensitive signals. The 3D experiment is required since it provide better resolution. This experiment requires known sequence specific resonance assignments of the methyl groups of the protein. Once these are known, in the $^{13}C/^{15}N$-filtered 3D NOESY dataset each cross peak will have three shift values, F_1, F_2 and F_3: F_1 shift corresponds to the unlabelled ligand signal; F_2 to the ^{13}C carbon of the labelled protein and F_3 to the proton of the labelled protein. Since, through other datasets, the resonance assignments of the bound protein and bound ligand are known, it will be possible to assign each cross-peak in the 3D dataset to a specific set of protein-ligand interactions. These intensities (volumes) of these interactions will then give an idea of the distance between the protein and the ligand which will then be used as constraints for the structure calculations.

Distance Restraints

The NOE were calibrated using fixed distances from the benzyl protons in **185**. The equation used is:

$$\frac{I_{Obs}}{I_{Ref}} = \frac{r_{ref}^6}{r_{obs}^6}$$

HADDOCK Methodology to Determine the Structure of the Complex

The HADDOCK web server requires both the protein and the ligand information to be inputted as protein databank (PDB) files. The lowest energy conformation structure of the small molecule inhibitor **185** was produced using ChemBio3D Ultra 12.0 and saved as a PDB file. The protein PDB file used as an input was a monomeric, ligand-removed version of the PSD-95 crystal structure.

The HADDOCK structures were generated using solvated docking, inputting the distance restraints (with both inter- and intramolecular restraints included) as unambiguous values and turning off the option to 'remove non-polar Hydrogens' individually. The most suitable value for the clustering RMSD of a small molecule like **185** was found to be 1Å as this was the best balance between cluster size and overall bound conformation structural similarity. Interestingly, it was found to be only slightly important to include the Hydrogen bond restraints as a separate file and that the actual residue selected (Leu17 or Gly18) had little or no bearing on the final structure as they resulted in almost identical structures. This suggests that the GLGF loop of the PDZ domain may be too flexible and hence, exert little effect on the binding of small molecules (and possibly partner proteins) to PDZ domains.

The 20 lowest energy conformations of the lowest energy cluster were selected and analysed using the WHAT IF web interface.

C.ITC experiment:

Determination of K_D of the PSD-95 PDZ1/185 Interaction by ITC

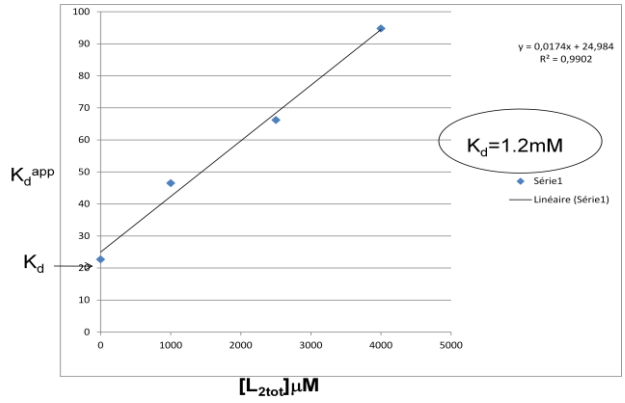
Isothermal titration calorimetry experiments were performed by Liam Dorr in the group of Professor Lu-Yun Lian at the University of Liverpool, UK.

Isothermal Titration Calorimetry was carried out on purified samples of protein exchanged into 20mM phosphate buffer at pH 6.3 using a PD-10 desalting column (GE Healthcare). The HPLC purified, lyophilised peptides (GenicBio) were directly resuspended in the required buffer and pH adjusted where necessary. The small molecule inhibitor compounds were dissolved in DMSO. For the initial protein – natural ligand binding experiments (i.e. with no small molecule inhibitor present), control experiments whereby the peptide was titrated into buffer and buffer into protein exhibited undetectable heat exchange, confirming that there was appropriate match of buffer conditions with no evidence of dilution effects. For the competition experiments, the exact final DMSO percentage present in the protein solution was calculated and peptide samples were then prepared in buffer containing this DMSO concentration. Control experiments whereby the peptide was titrated into buffer (containing DMSO) and buffer (containing DMSO) into protein exhibited undetectable heat exchange, confirming that there was appropriate match of DMSO/buffer conditions with no evidence of dilution effects. To maintain consistency between titrations the same stock buffer was used in all protein and peptide preparations. Experiments were conducted at 25 °C with an ITC200 (GE Healthcare) with a 60 µl syringe volume and 200 µl cell capacity. The protein - natural ligand titrations were carried out using between 94 µM of protein in the cell and 750 µM concentration of peptide in the syringe. For the competition experiments, the small molecule inhibitor was added the protein sample prior to being put in the cell, with the final concentration of inhibitor present in the sample being in the protein:inhibitor ratio of 1:5, 1:15, 1:30). The peptide was added into the cell in sequential 2.39 µl injections (at a rate of 1.195 µl per second) with a 180 second interval between each injection. One site (3 parameters) curve fitting was carried out using the MicroCal-supported ITC module within Origin version 7 to obtain the K_d values.

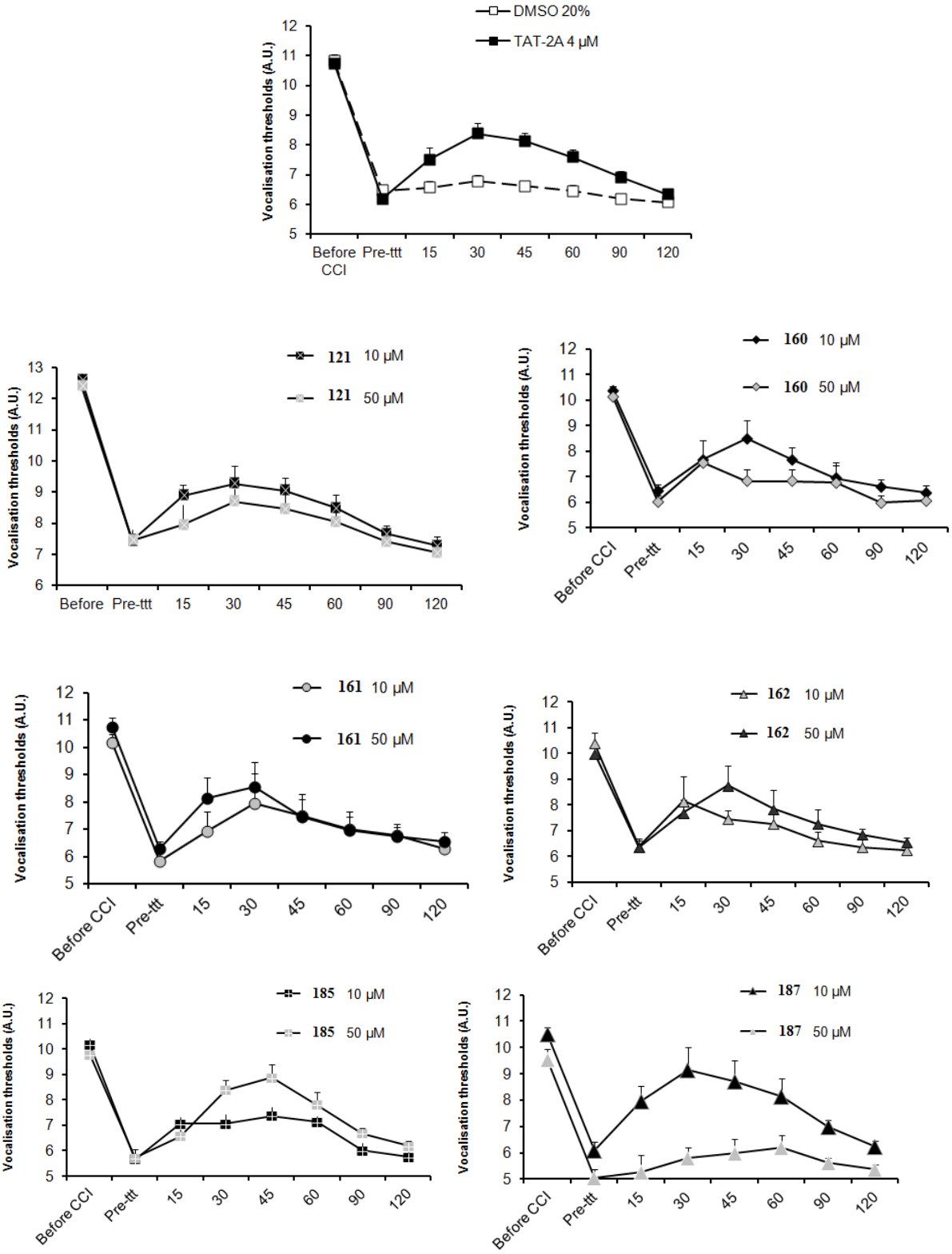
The Ki value of the ligand is determined using the equation:

$$K_D^{app} = K_D + \frac{K_D}{K_I}[L_{2tot}]$$

where K_D^{app} is the measured Kd in the presence of inhibitor, and L_{2tot} is the concentration of the ligand present.



D.:Kinetics of *in vivo* evaluation of analgesic activity (Hyperalgesic CCI rats were injected with compounds. The vocalization thresholds to paw-pressure were measured up to 120 minutes after injection.) :



BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Jubb, H.; Higueruelo, A. P.; Winter, A.; Blundell, T. L., *Trends Pharmacol. Sci.* **2012,** *33*, 241-248.
2. Nooren, I. M. A.; Thornton, J. M., *EMBO J.* **2003,** *22*, 3486-3492.
3. Stelzl, U.; Worm, U.; Lalowski, M.; Haenig, C.; Brembeck, F. H.; Goehler, H.; Stroedicke, M.; Zenkner, M.; Schoenherr, A.; Koeppen, S.; Timm, J.; Mintzlaff, S.; Abraham, C.; Bock, N.; Kietzmann, S.; Goedde, A.; Toksöz, E.; Droege, A.; Krobitsch, S.; Korn, B.; Birchmeier, W.; Lehrach, H.; Wanker, E. E., *Cell* **2005,** *122*, 957-968.
4. Fletcher, S.; Hamilton, A. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005,** *9*, 632-638.
5. Michelle, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005,** *9*, 317-324.
6. Kennedy, M. B., *Trends Biochem. Sci.* **1995,** *20*, 350.
7. Gianni, S.; Engström, A.; Larsson, M.; Calosci, N.; Malatesta, F.; Eklund, L.; Ngang, C. C.; Travaglini-Allocatelli, C.; Jemth, P., *J. Biol. Chem.* **2005,** *280*, 34805-34812.
8. Kimber, W. A.; Trinkle-Mulcahy, L.; Cheung, P. C. F.; Deak, M.; Marsden, L. J.; Kieloch, A.; Watt, S.; Javier, R. T.; Gray, A.; Downes, C. P.; Lucocq, J. M.; Alessi, D. R., *Biochem. J.* **2002,** *361*, 525-536.
9. www.hub.sciverse.com
10. Ducki, S.; Bennett, E., *Curr. Chem. Biol.* **2009,** *3*, 146-158.
11. Fuentes, E. J.; Der, C. J.; Lee, A. L., *J. Mol. Biol.* **2004,** *335*, 1105-1115.
12. Hamilton, A. C.; Inglese, J.; Ferrer, M., *Protein Sci.* **2003,** *12*, 458-467.
13. Harris, B. Z.; Lau, F. W.; Fujii, N.; Guy, R. K.; Lim, W. A., *Biochemistry* **2003,** *42*, 2797-2805.
14. Niv, M. Y.; Weinstein, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127*, 14072-14079.
15. Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R., *Cell* **1996,** *85*, 1067-1076.
16. Dev, K. K., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004,** *3*, 1047-1056.
17. Basdevant, N.; Weinstein, H.; Ceruso, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 12766 - 12777.
18. Ilya, B.; Anton, M., *FEBS Lett.* **2001,** *509*, 457-462.
19. Reynaud, C.; Fabre, S.; Jalinot, P., *J. Biol. Chem.* **2000,** *275*, 33962-33968.
20. Nourry, C.; Grant, S. G. N.; Borg, J.-P., *Sci. STKE* **2003,** 2003, re7-.
21. Maudsley, S.; Zamah, A. M.; Rahman, N.; Blitzer, J. T.; Luttrell, L. M.; Lefkowitz, R. J.; Hall, R. A., *Mol. Cell. Biol.* **2000,** *20*, 8352-8363.
22. Brenman, J. E.; Chao, D. S.; Gee, S. H.; McGee, A. W.; Craven, S. E.; Santillano, D. R.; Wu, Z.; Huang, F.; Xia, H.; Peters, M. F.; Froehner, S. C.; Bredt, D. S., *Cell* **1996,** *84*, 757-767.
23. Zimmermann, P.; Meerschaert, K.; Reekmans, G.; Leenaerts, I.; Small, J. V.; Vandekerckhove, J.; David, G.; Gettemans, J., *Mol. Cell* **2002,** *9*, 1215-1225.
24. Lee, H.-J.; Zheng, J., *Cell Communication and Signaling* **2010,** *8*, 1-18.
25. www.pdb.org
26. Songyang, Z.; Fanning, A. S.; Fu, C.; Xu, J.; Marfatia, S. M.; Chishti, A. H.; Crompton, A.; Chan, A. C.; Anderson, J. M.; Cantley, L. C., *Science* **1997,** *275*, 73-77.
27. Tonikian, R.; Zhang, Y.; Sazinsky, S. L.; Currell, B.; Yeh, J.-H.; Reva, B.; Held, H. A.; Appleton, B. A.; Evangelista, M.; Wu, Y.; Xin, X.; Chan, A. C.; Seshagiri, S.;

Lasky, L. A.; Sander, C.; Boone, C.; Bader, G. D.; Sidhu, S. S., *PLoS Biol.* **2008,** *6*, e239.
28. Bezprozvanny, I.; Maximov, A., *Proc Natl Acad Sci USA* **2001,** *98*, 787 - 789.
29. Fan, J. S.; Zhang, M., *NeuroSignals* **2002,** *11*, 315 - 321.
30. Birrane, G.; Chung, J.; Ladias, J. A. A., *J. Biol. Chem.* **2003,** *278*, 1399-1402.
31. Wiedemann, U.; Boisguerin, P.; Leben, R.; Leitner, D.; Krause, G.; Moelling, K.; Volkmer-Engert, R.; Oschkinat, H., *J. Mol. Biol.* **2004,** *343*, 703 - 718.
32. Zhang, Y.; Dasgupta, J.; Ma, R. Z.; Banks, L.; Thomas, M.; Chen, X. S., *J. Virol.* **2007,** *81*, 3618-3626.
33. Kaneko, T.; Sidhu, S. S.; Li, S. S. C., *Trends Biochem. Sci.* **2011,** *36*, 183-190.
34. Jeong, K. W.; Kim, H. Z.; Kim, S.; Kim, Y. S.; Choe, J., *Oncogene* **2006,** 26, 487-499.
35. Oliver, A. W.; He, X.; Borthwick, K.; Donne, A. J.; Hampson, L.; Hampson, I. N., *Br. J. Cancer* **2010,** *104*, 324-331.
36. Park, J.-H.; Lin, M.-L.; Nishidate, T.; Nakamura, Y.; Katagiri, T., *Cancer Res.* **2006,** *66*, 9186-9195.
37. Gaudet, S.; Branton, D.; Lue, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000,** *97*, 5167-5172.
38. Bossard, F.; Robay, A.; Toumaniantz, G.; Dahimene, S.; Becq, F.; Merot, J.; Gauthier, C., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2007,** *292*, L1085-L1094.
39. Lee, J. H.; Richter, W.; Namkung, W.; Kim, K. H.; Kim, E.; Conti, M.; Lee, M. G., *J. Biol. Chem.* **2007,** *282*, 10414-10422.
40. Dev, K. K.; Henley, J. M., *Trends Pharmacol. Sci.* **2006,** *27*, 574-579.
41. Fallon, L.; Moreau, F.; Croft, B. G.; Labib, N.; Gu, W.-J.; Fon, E. A., *J. Biol. Chem.* **2002,** *277*, 486-491.
42. Obenauer, J. C.; Denson, J.; Mehta, P. K.; Su, X.; Mukatira, S.; Finkelstein, D. B.; Xu, X.; Wang, J.; Ma, J.; Fan, Y.; Rakestraw, K. M.; Webster, R. G.; Hoffmann, E.; Krauss, S.; Zheng, J.; Zhang, Z.; Naeve, C. W., *Science* **2006,** *311*, 1576 - 1580.
43. Boukerche, H.; Su, Z.-z.; Emdad, L.; Baril, P.; Balme, B.; Thomas, L.; Randolph, A.; Valerie, K.; Sarkar, D.; Fisher, P. B., *Cancer Res.* **2005,** *65*, 10901-10911.
44. Udugamasooriya, G.; Saro, D.; Spaller, M. R., *Org. Lett.* **2005,** *7*, 1203-1206.
45. Hammond, M. C.; Harris, B. Z.; Lim, W. A.; Bartlett, P. A., *Chem. Biol.* **2006,** *13*, 1247 - 1251.
46. Sharma, S. C.; Rupasinghe, C. N.; Parisien, R. B.; Spaller, M. R., *Biochemistry* **2007,** *46*, 12709-12720.
47. Paduch, M.; Biernat, M.; Stefanowicz, P.; Derewenda, Z. S.; Szewczuk, Z.; Otlewski, J., *ChemBioChem* **2007,** *8*, 443-452.
48. Klosi, E.; Saro, D.; Spaller, M. R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007,** *17*, 6147-6150.
49. Bach, A.; Chi, C. N.; Olsen, T. B.; Pedersen, S. W.; Roder, M. U.; Pang, G. F.; Clausen, R. P.; Jemth, P.; Stromgaard, K., *J. Med. Chem.* **2008,** *51*, 6450 - 6459.
50. Lee, H. J.; Wang, N. X.; Shao, Y.; Zheng, J. J., *Bioorg. Med. Chem.* **2009,** *17*, 1701 - 1708.
51. LeBlanc, B. W.; Iwata, M.; Mallon, A. P.; Rupasinghe, C. N.; Goebel, D. J.; Marshall, J.; Spaller, M. R.; Saab, C. Y., *Neuroscience* **2009,** *167*, 490-500.
52. Shan, J.; Zhang, X.; Bao, J.; Cassell, R.; Zheng, J. J., *Chem. Biol. Drug Des.* **2012,** *79*, 376-383.
53. Fujii, N.; Haresco, J. J.; Novak, K. A. P.; Stokoe, D.; Kuntz, I. D.; Guy, R. K., *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125*, 12074-12075.
54. Fujii, N.; Haresco, J. J.; Novak, K. A. P.; Gage, R. M.; Pedemonte, N.; Stokoe, D.; Kuntz, I. D.; Guy, K. R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007,** *17*, 549-552.
55. Shan, J.; Shi, D. L.; Wang, J.; Zheng, J., *Biochemistry* **2005,** *44*, 15495 - 15503.

56. Grandy, D.; Shan, J.; Zhang, X.; Rao, S.; Akunuru, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Alpatov, I.; Zhang, X. A.; Lang, R. A.; Shi, D.-L.; Zheng, J. J., *J. Biol. Chem.* **2009,** *284*, 16256-16263.
57. Joshi, M.; Vargas, C.; Boisguerin, P.; Diehl, A.; Krause, G.; Schmieder, P.; Moelling, K.; Hagen, V.; Schade, M.; Oschkinat, H., *Ange. Chem. Int. Ed.* **2006,** *45*, 3790-3795.
58. Chen, X.; Longgood, J. C.; Michnoff, C.; Wei, S.; Frantz, D. E.; Bezprozvanny, L., *Assay Drug Dev. Technol.* **2007,** *5*, 769-784.
59. Lee, H. J.; Wang, N. X.; Shi, D. L.; Zheng, J. J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009,** *48*, 6448 - 6452.
60. Thorsen, T. S.; Madsen, K. L.; Rebola, N.; Rathje, M.; Anggono, V.; Bach, A.; Moreira, I. S.; Stuhr-Hansen, N.; Dyhring, T.; Peters, D.; Beuming, T.; Huganir, R.; Weinstein, H.; Mulle, C.; Stromgaard, K.; Ronn, L. C. B.; Gether, U., *PNAS* **2010,** *107*, 413-418.
61. Doucet, M. V.; Harkin, A.; Dev, K. K., *Pharmacol. Ther.* **2011,** *133*, 218-229.
62. Rey, R., *Histoire de la douleur*. Paris, **1993**.
63. Marchand, S., *Le phénomène de la douleur*. **2009**.
64. www.iasp-pain.org
65. *Livre Blanc de la douleur, Synthèse des travaux réalisés par le Comité d'organisation des Etats Généraux de la Douleur*. Ministère de la Santé: **2005**.
66. www.sfetd-douleur.org
67. www.fondation-apicil.org
68. www.sante.gouv.fr
69. Le Pen, C., Ensemble face à la douleur: prévention, traitement et prise en charge. **2005**.
70. Sherrington, C., *The integrative action of the nervous system*. **1906**.
71. http://forum.univbiskra.net/index.php?topic=1320.0
72. www.nia.nih.gov
73. Besson, J.-M.; Chaouch, A., *Physiological Rev.* **1987,** *67*, 67-186.
74. Besson, J.-M.; Guilbaud, G.; Abdelmoumene; Chaouch, A., *J. Physiol.* **1982,** *78*, 7-107.
75. Fields, H. L., *Pain* **1987**, 354.
76. Mann, C., Neuro-physiologie de la douleur. **2006**.
77. Marchand, S., *Pharmacologie de la douleur*. **2005**.
78. Beydoun, A.; Backonja, M. M., *J. Pain Symptom Manage* **2003,** *25*, 18-30.
79. Boccard, E.; De ymier, V., *Pratique du traitement de la douleur*. **2006**.
80. Relouzat, R.; Thiollet, J.-P., *Combattre la douleur*. **2002**.
81. www.demain-sans-douleur.com/fr/public/douleur_evaluation.html
82. Lazorthes, Y., *Les médicaments de la douleur*. **1993**; p 71-98.
83. Aronoff, D. M.; Oates, J. A.; Boutaud, O., *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006,** *79*, 9-19.
84. Huang, Y.-M.; Wang, C.-M.; Wang, C.-T.; Lin, W.-P.; Horng, L.-C.; Jiang, C.-C., *BMC Musculoskeletal Disorders* **2008,** *9*, 77.
85. Queneau, P.; Ostermann, G., *Le médecin le malade et la douleur*. **2004**.
86. Hantson, P., *RMLG. Revue médicale de Liège* **2002,** *57*, 645-650.
87. Michel, L.-M., *Revue du rhumatisme (Ed. française)* **2003,** *70*, 1-5.
88. Busse, G., *Morphine*. **2006**.
89. Goldstein, A.; Barrett, R. W.; James, I. F.; Lowney, L. I.; Weitz, C. J.; Knipmeyer, L. L.; Rapoport, H., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985,** *82*, 5203-5207.
90. Varache-Lembège, M., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **2007,** *146*, 131-148.

91. Piguet, V.; Cedraschi, C.; Allaz, A. F.; Desmeules, J.; Ahmadi, A.; Samer, C.; Dayer, P., *Med. Hyg. (Geneve)* **2004,** *62*, 1382-1385.
92. Wiffen, P.; Collins, S.; McQuay, H. J.; Carroll, D.; Jadad, A.; Moore, A., *Cochrane Database Syst. Rev.* **2000**.
93. Tao, Y.-X.; Raja, S. N., *Trends Pharmacol. Sci.* **2004,** *25*, 397-400.
94. Tao, Y.-X.; Johns, R. A., *Curr. Neuropharm.* **2006,** *4*, 217-223.
95. Zhuo, M., *Curr. Pharm. Des.* **2005,** *11*, 2797-2807.
96. Anzai, N.; Deval, E.; Schaefer, L.; Friend, V.; Lazdunski, M.; Lingueglia, E., *J. Biol. Chem.* **2002,** *277*, 16655-16661.
97. Baron, A.; Deval, E.; Salinas, M.; Lingueglia, E.; Voilley, N.; Lazdunski, M., *J. Biol. Chem.* **2002,** *277*, 50463-50468.
98. Li, P.; Kerchner, G. A.; Sala, C.; Wei, F.; Huettner, J. E.; Sheng, M.; Zhuo, M., *Nat. Neurosci.* **1999,** *2*, 972-977.
99. Zhang, B.; Tao, F.; Liaw, W.-J.; Bredt, D. S.; Johns, R. A.; Tao, Y.-X., *Pain* **2003,** *106*, 187-196.
100. Garry, E. M.; Jones, E.; Fleetwood-Walker, S. M., *Brain Res. Rev.* **2004,** 46, 216-224.
101. Deval, E.; Friend, V.; Thirant, C.; Salinas, M.; Jodar, M.; Lazdunski, M.; Lingueglia, E., *J. Biol. Chem.* **2006,** *281*, 1796-1807.
102. Aarts, M.; Liu, Y.; Liu, L.; Besshoh, S.; Arundine, M.; Gurd, J. W.; Wang, Y. T.; Salter, M. W.; Tymianski, M., *Science* **2002,** *298*, 846 - 850.
103. Voilley, N.; de Weille, J.; Mamet, J.; Lazdunski, M., *The Journal of Neuroscience* **2001,** *21*, 8026-8033.
104. Deval, E.; Salinas, M.; Baron, A.; Lingueglia, E.; Lazdunski, M., *J. Biol. Chem.* **2004,** *279*, 19531-19539.
105. Bécamel, C.; Gavarini, S.; Chanrion, B.; Alonso, G.; Galéotti, N.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; Marin, P., *J. Biol. Chem.* **2004,** *279*, 20257-20266.
106. Xia, Z.; Hufeisen, S. J.; Gray, J. A.; Roth, B. L., *Neuroscience* **2003,** *122*, 907-920.
107. Xia, Z.; Gray, J. A.; Compton-Toth, B. A.; Roth, B. L., *J. Biol. Chem.* **2003,** *278*, 21901-21908.
108. Pichon, X.; Wattiez, A. S.; Becamel, C.; Ehrlich, I.; Bockaert, J.; Eschalier, A.; Marin, P.; Courteix, C., *Mol. Ther.* **2010,** *18*, 1462-1470.
109. Mahindroo, N.; Punchihewa, C.; Bail, A. M.; Fujii, N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008,** *18*, 946-949.
110. *MOE 2010.10 Manual, 1997-2010 Chemical Computing Group Inc.* .
111. Zhao, Y.; Li, D.; Zhao, L.; Zhang, J., *Synthesis* **2011**, *6*, 873-880.
112. Fischer, E.; Hess, O., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884,** *17*, 559-568.
113. Fischer, E.; Jourdan, F., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883,** *16*, 2241-2245.
114. Watson, T. J. N.; Horgan, S. W.; Shah, R. S.; Farr, R. A.; Schnettler, R. A.; Nevill, C. R.; Weiberth, F. J.; Huber, E. W.; Baron, B. M.; Webster, M. E.; Mishra, R. K.; Harrison, B. L.; Nyce, P. L.; Rand, C. L.; Goralski, C. T., *Org. Process Res. Dev.* **2000,** *4*, 477-487.
115. Liu, R.; Zhang, P.; Gan, T.; Cook, J. M., *J. Org. Chem.* **1997,** *62*, 7447-7456.
116. Inman, M.; Moody, C. J., *Chem. Commun. (Camb.)* **2011,** *47*, 788-790.
117. Chae, J.; Buchwald, S. L., *J. Org. Chem.* **2004,** *69*, 3336-3339.
118. See Phillips, R. R., *Org. React.* **1959,** *10*, 143-178.
119. Heath-Brown, B.; Philpott, P. G., *J. Chem. Soc.* **1965**, 7185-7193.
120. Choi, T.; Ma, E., *Molecules* **2010,** *15*, 7971-7984.
121. Shi, Z.; Zhang, C.; Li, S.; Pan, D.; Ding, S.; Cui, Y.; Jiao, N., *Ang. Chem. Int. Ed.* **2009,** *48*, 4572-4576.

122. Asao, N.; Nogami, T.; Takahashi, K.; Yamamoto, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124*, 764-765.
123. Xiao, Y.; Zhang, J., *Ange. Chem. Int. Ed.* **2008,** *47*, 1903-1906.
124. Glorius, F., *Ange. Chem. Int. Ed.* **2004,** *43*, 3364-3366.
125. Vieira, T. O.; Meaney, L. A.; Shi, Y.-L.; Alper, H., *Org. Lett.* **2008,** *10*, 4899-4901.
126. Fang, Y.-Q.; Lautens, M., *J. Org. Chem.* **2007,** *73*, 538-549.
127. Koenig, S. G.; Dankwardt, J. W.; Liu, Y.; Zhao, H.; Singh, S. P., *Tetrahedron Lett.* **2010,** *51*, 6549-6551.
128. Wathen, S. P.; Czarnik, A. W., *J. Org. Chem.* **1992,** *57*, 6129-6133.
129. Cai, Q.; Li, Z.; Wei, J.; Ha, C.; Pei, D.; Ding, K., *Chem. Commun. (Camb.)* **2009**, 7581-7583.
130. Gulevich, A. V.; Zhdanko, A. G.; Orru, R. V. A.; Nenajdenko, V. G., *Chem. Rev.* **2010,** *110*, 5235-5331.
131. Brown, J. A., *Tetrahedron Lett.* **2000,** *41*, 1623-1626.
132. Barberis, C.; Gordon, T. D.; Thomas, C.; Zhang, X.; Cusack, K. P., *Tetrahedron Lett.* **2005,** *46*, 8877-8880.
133. Yamazaki, K.; Nakamura, Y.; Kondo, Y., *J. Chem Soc, Perkin Trans.* **2002**, 2137-2138.
134. Reissert, A., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897,** *30*, 1030-1053.
135. Noland, W. E.; Baude, F. J., *Org. Synth.* **1973,** *5*, 567.
136. Wang, Z.; Jimenez, L. S., *J. Org. Chem.* **1996,** *61*, 816-818.
137. Akazome, M.; Kondo, T.; Watanabe, Y., *J. Org. Chem.* **1994,** *59*, 3375-3380.
138. Koerber-Plé, K.; Massiot, G., *Synlett* **1994,** *9*, 759-760.
139. Chen, C.-y.; Lieberman, D. R.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J., *J. Org. Chem.* **1997,** *62*, 2676-2677.
140. Nazaré, M.; Schneider, C.; Lindenschmidt, A.; Will, D. W., *Ange. Chem. Int. Ed.* **2004,** *43*, 4526-4528.
141. Li, J.-H.; Wang, D.-P.; Xie, Y.-X., *Synthesis* **2005,** *13*, 2193-2197.
142. Worlikar, S. A.; Neuenswander, B.; Lushington, G. H.; Larock, R. C., *J. Com. Chem.* **2009,** *11*, 875-879.
143. Debenham, S. D.; Snyder, P. W.; Toone, E. J., *J. Org. Chem.* **2003,** *68*, 5805-5811.
144. Bennett, E. Modulating protein-protein interactions: novel inhibitors of PDZ domains and tubulin dynamics. University of Salford, **2008**.
145. Batsanov, A. S.; Howard, J. A. K.; Lightfoot, A. P.; Twiddle, S. J. R.; Whiting, A., *Eur. J. Org. Chem.* **2005,** *9*, 1876-1883.
146. Khansole, S. V.; Junne, S. B.; Sayyed, M. A.; Vibhute, Y. B., *Synth. Commun.* **2008,** *38*, 1792-1798.
147. Jones, T. V.; Slutsky, M. M.; Tew, G. N., *New J. Chem.* **2008,** *32*, 676-679.
148. Madigan, D. M.; Swenton, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1971,** *93*, 6318-6319.
149. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., *Tetrahedron* **2005,** *61*, 10827-10852.
150. Tang, W.; Fang, S., *Tetrahedron Lett.* **2008,** *49*, 6003-6006.
151. Nakamura, K.; Nakajima, T.; Kayahara, H.; Nomura, E.; Taniguchi, H., *Tetrahedron Lett.* **2004,** *45*, 495-499.
152. Levin, S.; Nowick, J. S., *Org. Lett.* **2009,** *11*, 1003-1006.
153. www.accessexcellence.org
154. Piserchio, A.; Pellegrini, M.; Mehta, S.; Blackman, S. M.; Garcia, E. P.; Marshall, J.; Mierke, D. F., *J. Biol. Chem.* **2002,** *277*, 6967-6973.
155. Priestley, E. S.; Zhang, X., **2007,** WO 2007/146719 PCT/US2007/070566.
156. Gooßen, L. J., *Appl. Organomet. Chem.* **2004,** *18*, 602-604.

157. Suryadevara, P. K.; Olepu, S.; Lockman, J. W.; Ohkanda, J.; Karimi, M.; Verlinde, C. L. M. J.; Kraus, J. M.; Schoepe, J.; Van Voorhis, W. C.; Hamilton, A. D.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H., *J. Med. Chem.* **2009,** *52*, 3703-3715.
158. Coulton, S.; Johns, A.; Porter, R. A., *WO 2000047577* **2000**.
159. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., **1999**.
160. Kivrakidou, O.; Bräse, S.; Hülshorst, F.; Griebenow, N., *Org. Lett.* **2004,** *6*, 1143-1146.
161. Zhu, J.; Lin, J.-B.; Xu, Y.-X.; Shao, X.-B.; Jiang, X.-K.; Li, Z.-T., *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 12307-12313.
162. Sapountzis, I.; Dube, H.; Lewis, R.; Gommermann, N.; Knochel, P., *J. Org. Chem.* **2005,** *70*, 2445-2454.
163. Trost, B. M.; O'Boyle, B. M., *Org. Lett.* **2008,** *10*, 1369-1372.
164. Capelli, L.; Manini, P.; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M., *J. Org. Chem.* **2009,** *74*, 7191-7194.
165. Lian, L.-Y.; Gordon, R., *Protein NMR Spectroscopy: Principal Techniques and Applications*. **2011**.
166. Randall, L.; Selitto, J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1957,** *111*, 409-419.
167. Caporuscio, F.; Rastelli, G.; Imbriano, C.; Del Rio, A., *J. Med. Chem.* **2011,** *54*, 4006-4017.
168. Wang, W.; Weng, J.; Zhang, X.; Liu, M.; Zhang, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2008,** *131*, 787-796.
169. Tiziano, T., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2009,** *12*, 303-314.
170. Lengauer, T.; Rarey, M., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996,** *6*, 402-406.
171. *ASINEX Ltd, Moscow, Russia*, www.asinex.com.
172. Wang, L.; Maniglia, C. A.; Mella, S. L.; Sartorelli, A. C., *J. Med. Chem.* **1983,** *26*, 1323-1326.
173. Forman, D.; Yu, D., **2008,** US20060189825.
174. Inada, T.; Nakajima, T.; Shimizu, I., *Heterocycles* **2005,** *66*, 611-619.
175. Isobe, A.; Takagi, J.; Katagiri, T.; Uneyama, K., *Org. Lett.* **2008,** *10*, 2657-2659.
176. Fujiwara, T.; Hirashima, N.; Hasegawa, S.; Nakanishi, M.; Ohwada, T., *Bioorg. Med. Chem.* **2001,** *9*, 1013-1024.
177. Niculescu-Duvaz, I.; Ionescu, M.; Cambanis, A.; Vitan, M.; Feyns, V., *J. Med. Chem.* **1968,** *11*, 500-503.
178. Ghosh, A. K.; Takayama, J.; Aubin, Y.; Ratia, K.; Chaudhuri, R.; Baez, Y.; Sleeman, K.; Coughlin, M.; Nichols, D. B.; Mulhearn, D. C.; Prabhakar, B. S.; Baker, S. C.; Johnson, M. E.; Mesecar, A. D., *J. Med. Chem.* **2009,** *52*, 5228-5240.
179. Michellys, P.-Y.; Petrassi, H. M.; Richmond, W.; Pei, W., *WO2006015259* **2006**.
180. Kublashvili, R., *Chem. Nat. Compd.* **2003,** *39*, 586-588.
181. Marambaud, P.; Vingtdeux, V., *WO 2012027548* **2012**.
182. Guy, R. K.; Kuntz, I. D.; Haresco, J.; Fujii, N.; Novak, K. P.; Stokoe, D.; He, B.; You, L.; Xu, Z.; Jablons, D. M.; *US 20080021082* **2008**.

Résumé :

Les protéines à domaine PDZ, en très grand nombre dans le génome humain, sont impliquées dans des interactions protéine-protéine. Elles participent ainsi à véhiculer des signaux à l'origine de différentes pathologies (cancer, douleur….). L'interruption de l'interaction entre la protéine à domaine PDZ, PSD-95, et le récepteur de la sérotonine, 5-HT2A, entraîne une réduction de l'hyperalgie chez le rat neuropathique. Le développement de molécules capables d'inhiber cette interaction pourrait donc conduire à une nouvelle classe d'antalgiques.

Nous avons réalisé, au cours de ces travaux, la synthèse de trois générations de ligands, comportant un noyau indolique, capables d'interagir avec le site S0, site très conservé des protéines à domaines PDZ. Dans un premier temps, nous avons préparé 15 biligands possédant un noyau indolique polysubstitué lié, *via* un espaceur de longueur variable (2 à 6 atomes de carbone), à différents acides aminés, dans le but d'interagir avec le site S1, montrant beaucoup de diversité en fonction du domaine. Nous avons ensuite, après une étude de relation structure/activité, développé deux autres générations d'indoles polysubstitués présentant notamment des substituants hydrophobes en position 5.

Nous avons montré, par RMN HSQC $^{1}H/^{15}N$ et chromatographie d'affinité, que deux de ces composés sont des inhibiteurs de l'interaction PSD-95/5-HT2A et présentent de fortes interactions avec le site S0 de PSD-95. Ces molécules présentent également des propriétés antalgiques particulièrement intéressantes in vivo. Nous avons également déterminé, par RMN NOESY, la structure du complexe protéine/ligand pour ces deux composés. L'orientation d'une de ces molécules dans le site de la protéine nous permet d'envisager le développement d'une nouvelle génération d'indoles polysubstitués, pouvant interagir avec le site S1 de la protéine et permettant ainsi d'obtenir des inhibiteurs sélectifs de l'interaction PSD-95/5-HT2A.

Abstract :

Protein-protein interactions play a central role in the regulation of biological processes and represent a promissing class of therapeutic targets. It has been recently reported that disrupting the interaction between the PDZ protein PSD-95 and the serotonin receptor 5-HT2A induced an antihyperalgesic effect in diabetic rats. In this context, the development of original ligands capable to inhibit specifically this interaction could lead to a new class of analgesic compounds.

We carried out the synthesis of three generations of ligands possessing an indole moiety in order to interact with the highly conserved carboxylate-binding loop (GLGF loop) of PSD-95. Two generations of compounds were developed to find out the position and the nature of the substituents furnishing the best interactions. One generation consists of a family of 15 biligands possessing a substituted indole moiety, coupled with a linker (having from 2 to 6 carbon atoms) *via* an amid function, ended with various amino acids to interact with the S1 site of the protein, in order to obtain specific ligands.

By various biological evaluations, NMR HSQC $^{1}H/^{15}N$, chromatography affinity assays and in vivo experiments, we identified two promising inhibitors of the interaction PSD-95/5-HT2A with strong interactions with S0 site of PSD-95. For these compounds, we determined the structure of the complex protein/ligand by NMR NOESY experiments. The orientation of one of these molecules in the S0 site allows us to envisage a new generation of ligands capable to interact with the S1 site of the protein.