

UNIVERSITE DE LILLE

Faculté de Pharmacie

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue le 16 décembre 2021

Par

Florine TOULOTTE

CONFIDENTIEL

**Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de
l'interaction YAP (TAZ) – TEAD ciblant la poche interne**

Membres du Jury

Rapporteurs :

Pr VIAUD-MASSUARD Marie-Claude, Professeur des Universités, Université de Tours

Pr VOISIN-CHIRET Anne-Sophie, Professeur des Universités, Université de Caen

Examineurs :

Pr GUICHOU Jean-François, Professeur des Universités, Université de Montpellier

Dr RENAULT Nicolas, Ingénieur de recherche, Université de Lille

Présidente du jury :

Dr ROUSSI Fanny, Directrice de Recherche, ICSN Gif-sur-Yvette

Directeur de thèse :

Pr COTELLE Philippe, Professeur des Universités, Centrale Lille Institut

UNIVERSITE DE LILLE

Faculté de Pharmacie

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue le 16 décembre 2021

Par

Florine TOULOTTE

CONFIDENTIEL

**Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de
l'interaction YAP (TAZ) – TEAD ciblant la poche interne**

Membres du Jury

Rapporteurs :

Pr VIAUD-MASSUARD Marie-Claude, Professeur des Universités, Université de Tours

Pr VOISIN-CHIRET Anne-Sophie, Professeur des Universités, Université de Caen

Examineurs :

Pr GUICHOU Jean-François, Professeur des Universités, Université de Montpellier

Dr RENAULT Nicolas, Ingénieur de recherche, Université de Lille

Présidente du jury :

Dr ROUSSI Fanny, Directrice de Recherche, ICSN Gif-sur-Yvette

Directeur de thèse :

Pr COTELLE Philippe, Professeur des Universités, Centrale Lille Institut

« Je ne perds jamais : soit je gagne, soit j'apprends. »

Nelson Mandela

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le **Pr. Philippe Cotelle**, mon directeur de thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir laissé ma chance pour passer le concours de l'école doctorale, pour votre encadrement, votre disponibilité, la confiance que vous m'avez accordé lors de ces trois années, pour les multiples relectures de mes manuscrits de comité de suivi individuel et de cette thèse, pour votre patience lors des corrections et enfin merci d'avoir été là dans les moments les plus difficiles.

Je souhaite remercier le **Pr. Patricia Melnyk**, directrice du laboratoire, pour votre accueil et pour vos conseils lors de discussions aussi bien professionnelles que personnelles.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Tout d'abord le **Pr. Marie-Claude Viaud-Massuard** et le **Pr. Anne-Sophie Voisin-Chiret** pour avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit, pour le temps consacré à la lecture et le regard critique et avisé qu'elles pourront y apporter.

Merci au **Dr. Fanny Roussi** de suivre ce projet depuis le début *via* mes comités de suivi individuels et d'avoir accepté d'être examinatrice de ce manuscrit.

Merci au **Pr. Jean-François Guichou** d'avoir également accepté d'être examinateur. Merci à vous ainsi qu'au **Dr. Frédéric Allemand** et à **Muriel Gelin** pour le temps consacré au projet, pour ces nombreuses structures cristallographiques ainsi que pour la TSA. Merci pour votre enthousiasme à chaque échange de mails et pour les idées que vous nous avez proposées. En résumé, merci d'avoir suivi le projet comme vous l'avez fait.

Un immense merci au **Dr. Nicolas Renault** de l'« Institute for Translational Research in Inflammation » d'être également examinateur de ce travail. Merci pour l'initiation à la modélisation (domaine que j'affectionne particulièrement aujourd'hui !), pour ta patience (ce n'était pas gagné vu mon niveau en informatique...) et pour tes nombreuses explications et conseils.

Je tiens à remercier le **Pr. Hassan Allouchi** de l'Université de Tours d'avoir cristallisé le produit FT62.

Je souhaite remercier chacun des membres de l'équipe BBC et plus particulièrement mes collègues de tous les jours. Je commence par **Mathilde Coevoet** sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Un immense merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, pour le temps passé sur le projet, pour l'obtention de tous ces résultats en un temps record, de mettre en valeur toutes ces molécules et de donner de la solidité au projet. Merci au **Dr. Fabrice Bailly**, pour votre aide et vos conseils pour la synthèse de certains produits et d'avoir suivi mon travail tout au long de ces trois ans. Merci au **Dr. Séverine Ravez** pour ta joie et ta bonne humeur au quotidien, pour m'avoir formé à la thermophorèse,

pour ton regard critique et ton enthousiasme après chaque nouveau résultat et pour ces macarons inoubliables ! Merci au **Dr. Laurence Agouridas** de m'avoir formé aussi bien à l'HPLC qu'aux mots fléchés, pour tes si nombreux conseils aussi bien dans la vie professionnelle que dans la vie personnelle, pour tes superbes mosaïques et pour tes conseils « zéro déchet ». Merci au **Dr. Jamal El Bakali**, au **Pr. Nicolas Lebègue** et au **Dr. Said Yous** pour leurs conseils en chimie et leur regard critique sur mes travaux. Je continuerais par le **Dr. Tarak Saied** ; merci pour ta bonne humeur, merci d'être venu à ma rescousse de si nombreuses fois quand la force physique me manquait ! Merci à **Paul-Emmanuel Larchanche** pour ton aide au quotidien, pour les distillations de THF et de DMF et de trouver des solutions pour réaliser les réactions les plus improbables. Merci au **Dr. Maxime Liberelle** pour ton aide en modélisation moléculaire et pour ton optimisme sans limite. Merci à mes anciens collègues **Dr. Manon Sturbaut**, **Dr. Florian Descamps** et **Dr. Raphaël Bolteau** d'avoir été présents à mon arrivée et pour vos nombreux conseils. Merci à **Alexandre Gobert**, **Guillaume Patient**, **Justine Peters** et **Amélie Laversin**, doctorants et à **Alice Thiry** pour tous ces bons moments passés ensemble. Enfin, un grand merci au **Dr. Benjamin Zagiel**, dernièrement arrivé dans l'équipe. Merci de prendre la suite du projet et pour ton soutien dans les derniers mois qui ont été les plus difficiles.

Je remercie également les RMNistes ; le **Pr. Stéphanie Delbaere** et le **Dr. Jérôme Berthet**. Merci pour votre aide à la résolution de structures de composés les plus improbables et d'avoir répondu à toutes mes interrogations.

Merci à **Djamila Amini** et à **Samantha Ploegarts** d'avoir répondu à mes commandes urgentes.

Merci à tous pour ces repas partagés tous ensemble et les soirées KickTipp.

Je remercie également **Catherine Piveteau** et **Alexandre Biela** du laboratoire « Drugs & Molecules for Living Systems » pour m'avoir formé à la LC-MS.

Je souhaite remercier l'équipe du Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN) : le **Pr. Nathalie Azaroual**, le **Dr. Vincent Ultré** et **Alexandre Rech**, merci pour tous ces spectres 2D, NOESY et fluor.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille et plus particulièrement mes parents et ma sœur de m'avoir soutenu et d'avoir cru en moi.

Le meilleur pour la fin, Cyrille. Tu m'as toujours encouragé et tu as toujours cru en moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi au quotidien, tu es mon pilier. J'espère que l'avenir nous réserve de belles surprises.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication:

Toulotte F., Renault N., Liberelle M., Gelin M., Allemand F., Melnyk P., Guichou J.-F., Cotelle P. *TEADS C-terminal domain, topographic homology and tools for the design of selective ligands*. *Eur. J. Med. Chem.* (Article soumis)

Poster:

Toulotte F., Renault N., Bailly F., Melnyk P., Cotelle P. *Design and synthesis of YAP(TAZ)-TEAD modulators: Plasticity and shape of the internal TEAD's pockets*, Drug Discovery Day, Lille, 18 janvier 2019.

Communications Flash poster:

Toulotte F., Coevoet M., Bailly F., Renault N., Melnyk P., Guichou J.F., Cotelle P. *Synthesis of TEAD ligands targeting the internal pocket*, 20^{ème} édition de la Journée André Verbert, 27 novembre 2020.

Toulotte F., Coevoet M., Renault N., Bailly F., Melnyk P., Gelin M., Allemand F., Guichou J.F., Cotelle P. *Conception et synthèse de modulateurs sélectifs de l'interaction YAP(TAZ)-TEAD ciblant la poche palmitate*, 28^{èmes} Journées de l'Association des Enseignants Chercheurs de Chimie Physique et de Chimie Minérale (AECCPCM), 3 juin 2021.

Communications orales:

Toulotte F., Coevoet M., Renault N., Guichou J.F., Melnyk P., Cotelle P. *Design of selective modulators of the YAP (TAZ)-TEAD interaction*, Drug Discovery Day, Lille, 17 décembre 2019.

Toulotte F., Coevoet M., Renault N., Guichou J.F., Melnyk P., Cotelle P. *Design of modulators of the YAP(TAZ)-TEAD interaction targeting the palmitate pocket*, Journée des doctorants du centre Lille Neuroscience et Cognition, 18 mars 2020.

Toulotte F., Coevoet M., Renault N., Guichou J.F., Melnyk P., Cotelle P. *Design of modulators of the YAP(TAZ)-TEAD interaction targeting the palmitate pocket*, Drug Discovery Day, Lille, 16 décembre 2020.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile	MST1/2	Mammalian STerile 20-like kinase
ADN	Acide désoxyribonucléique	NF2	Neurofibromin 2
AMPK	AMP-activated protein kinase	NLS	Nuclear Localization Sequence
ANKRD1	ANKyrin Repeat Domain 1	NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidone
APP	Amyloid beta Precursor Protein	OGT	O-linked N-acetylGlucosamine Transferase
ARN	Acide RiboNucléique	PDB	Protein Data Bank
BCD	Ballooning Cell Death	ppm	Parts per million
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	PTPN14	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 14
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle	RMN	Résonance magnétique nucléaire
Boc₂O	Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle	RUNX	Runt-related transcription factor
Bn	Benzyle	SAV	Scaffold protein Salvador
CCN	Cellular Communication Network factor	SPR	Surface Plasmon Resonance
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1	STD	Saturation Transfer Difference
CPP	Cell-Penetrating Peptide	SVF	Sérum de Veau Foetal
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	TAZ	Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
CYR61	CYsteine Rich angiogenic inducer 61	tBu	<i>tert</i> -Butyle
DBAD	Di- <i>tert</i> -butyl azodicarboxylate	TDU	TONDU
DCM	Dichlorométhane	TEAD	Transcriptional Enhanced Associate Domain
DMF	Diméthylformamide	TFA	Trifluoroacetic acid
DMAP	4-DiMéthylAminoPyridine	THF	Tetrahydrofuran
DMSO	Diméthylsulfoxyde	THP	Tétrahydropyrane
DSF	Differential Scanning Fluorimetry	T_m	Temperature de denaturation
EC₅₀	half maximal Effective Concentration	TR-FRET	Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	TRIAD	Transcriptional Repression- Induced cell Death
EtOH	Ethanol	TSA	Thermal Shift Assay
FAM181	FAMily with sequence similarity 181	VGLL	Vestigial-like
HEK	Human Embryonic Kidney	YAP	Yes-Associated-Protein
HIPK2	Homeodomain Interacting Protein Kinase 2	wt	wild-type
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography		
HSQC	Huntingtin		
Htt	Human Hepatoma cell line		
IC₅₀	half maximal Inhibitory Concentration		
ICM	Inner cell mass		
IGFBP3	Insulin-like Growth Factor Binding protein 3		
ITC	Isothermal Titration Calorimetry		
K_d	Constante de dissociation		
LATS1/2	LArge Tumor Suppressor kinase 1 and 2		
MAPK	Mitogen-activated protein kinase		
MeOH	Méthanol		

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
Introduction bibliographique	3
I. La voie Hippo	5
1. Fonctionnement de la voie Hippo	5
a. Phosphorylation de YAP/TAZ et dégradation.....	5
b. Désactivation de la voie Hippo	6
c. Caractéristiques des effecteurs terminaux de la voie Hippo	6
2. Stimuli entraînant l'activation ou la désactivation de la voie Hippo.....	7
a. Contacts inter-cellulaires.....	8
b. Mécanotransduction de la matrice extracellulaire et du cytosquelette	8
c. Autres voies de signalisation et récepteurs couplés aux protéines G.....	8
d. Métabolisme et stress cellulaire	8
II. Les facteurs de transcription TEAD dans le développement embryonnaire, l'homéostasie tissulaire et les maladies	9
1. La voie Hippo indispensable dans le développement embryonnaire	9
2. La voie Hippo permet l'homéostasie tissulaire au cours de la vie	10
3. La voie Hippo dérégulée entraîne la formation de cancers ou de maladies dégénératives.	10
a. La voie Hippo dans les cancers.....	10
b. La voie Hippo dans les maladies dégénératives	11
c. La voie Hippo : une cible thérapeutique pour la médecine régénérative ?	12
III. Le domaine C-terminal de TEAD et les complexes TEAD-coactivateurs	12
1. Le domaine C-terminal de TEAD.....	12
a. Structure.....	12
b. Importance de la palmitoylation de TEAD.....	13
2. Les complexes impliquant TEAD et importance des interfaces 2 et 3	14
a. Complexes YAP-TEAD, TAZ-TEAD, Vgll-TEAD et FAM-TEAD	14
b. Importance des interfaces 2 et 3.....	17
IV. Cibler le complexe YAP/TAZ-TEAD	19
1. Stratégies et modulateurs principaux de la voie Hippo	19
2. Sites « druggables » de la protéine TEAD et molécules agissant sur TEAD.....	20
a. Peptides mimétiques de YAP et Vgll4	20
b. Inhibiteurs ciblant l'interface 3	21
c. Inhibiteurs ciblant l'interface 2	22
d. Inhibiteurs ciblant la poche palmitate.....	23

V. Travaux préliminaires et objectifs du projet	28
Chapitre I : Etude structurale des quatre membre de la famille TEAD et modélisation moléculaire ...	31
I. Etude de la poche palmitate	33
1. Etude de la nature des acides aminés	33
2. Alignement de séquences et différences	33
3. Formes des poches	35
4. Calcul du volume des poches	36
II. A la recherche d'autres différences structurales entre les différents TEAD	38
1. Alignement de séquences	38
2. Etude des boucles A et B	39
III. Construction de modèles des 4 TEAD et validation	39
1. Construction des modèles avec une poche hydrophobe plus grande	39
2. Docking des seuls ligands sélectifs de la littérature	41
Chapitre II : Conception, synthèse et évaluation des dérivés du 5-benzyloxyindole	43
I. Conception, synthèse et caractérisation des dérivés du 5-benzyloxyindole	45
1. Conception des 5-aryloxy- et 5-alkyloxy-indoles	45
2. Synthèses des 5-aryloxy- et 5-alkyloxy-indoles	46
II. Evaluation des composés	48
1. Effet des composés sur la température de dénaturation de hTEAD ₂₁₇₋₄₄₇	48
2. Evaluation cellulaire	50
Chapitre III : Conception, synthèse et évaluation des molécules dérivées de la superposition du 5-benzyloxyindole et de l'acide palmitique	53
I. Conception, synthèse et caractérisation des molécules fonctionnalisées en position 1 et 3 par des chaînes alkyles	55
1. Conception des molécules « acide palmitique-like »	55
2. Synthèse : Fonctionnalisation en position 1	56
a. Synthèse d'acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkyloïques	56
b. Synthèse de 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkylamines et fonctionnalisation	56
3. Synthèse : Fonctionnalisation en position 3	59
a. Synthèses à partir de la 5-benzyloxytryptamine	60
b. Synthèses à partir du 5-benzyloxyindole	60
c. Synthèse à partir du 5-benzyloxy-3-formylindole	62
II. Evaluation des composés molécules fonctionnalisées en position 1 et 3 par des chaînes alkyles	64
1. Effet des composés sur la température de dénaturation de hTEAD ₂₁₇₋₄₄₇	64
2. Evaluation cellulaire	66
Chapitre IV : Conception, synthèse et évaluation des molécules dérivées de la superposition du 5-benzyloxyindole et de l'acide flufénamique	69

I. Conception, synthèse et caractérisation des molécules fonctionnalisées en position 1 par un groupement aryle.....	71
1. Conception des molécules issues de la superposition entre le 5-benzyloxyindole et l'acide flufénamique	71
2. Synthèse des composés arylés en position 1	72
a. Synthèse des acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoïques	72
b. Synthèse des acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)nicotinique et picoliniques.....	73
c. Synthèse des acides (4 ou 6-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoïques et picoliniques	75
d. Synthèse des esters (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoates et des (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzènes fonctionnalisés en méta	75
e. Synthèse des composés trisubstitués.....	78
II. Evaluations des composés arylés en position 1 de l'indole	79
1. Effet des composés sur la température de dénaturation de hTEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇	79
2. Evaluation cellulaire	81
Chapitre V : évaluation biologique des molécules les plus actives	83
I. Détermination des IC ₅₀ par test gène rapporteur luciférase.....	85
II. Tests sur cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231	87
1. Test de prolifération cellulaire	87
2. Effet sur les gènes cibles	91
Chapitre VI : Trempage des composés avec hTEAD2	93
I. Structures cristallographiques.....	95
1. Structures cristallographiques des composés substitués en position 1 de l'indole.....	95
2. Structures cristallographiques de composés non-covalents substitués en position 3 de l'indole	96
3. Structures cristallographiques de composés covalents substitués en position 3 de l'indole.....	98
II. Docking	98
1. Docking des molécules cristallisées	98
2. Docking des molécules les plus actives	99
Conclusion et perspectives.....	103
Annexes	107
Annexe I: Experimental Part.....	109
I. Material and instrumentation	111
II. Synthesis procedure	112
III. Biological evaluation	160
1. Cell cultures	160
2. Luciferase Reporter Assay	160
3. Protein expression.....	160

4. Proliferation of MDA-MB-231 cells	160
IV. Protein production and purification	161
V. Soaking with hTEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇	162
VI. TSA.....	162
VII. Molecular docking.....	162
Annexe II : Figures	163
Bibliographie.....	168

INTRODUCTION GENERALE

La voie Hippo est constituée d'une cascade de kinases entraînant la phosphorylation du cofacteur transcriptionnel YAP (Yes-Associated-Protein) et de son paralogue TAZ (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif). La phosphorylation de ces cofacteurs provoque leur séquestration dans le cytoplasme. A l'inverse, lorsqu'ils ne sont pas phosphorylés, ils entrent dans le noyau et se lient notamment aux facteurs de transcription TEAD (Transcriptional Enhancer Associated Domain). Cette interaction est la clé de la voie Hippo puisqu'elle est responsable de la prolifération cellulaire au travers de l'expression de gènes cibles.

L'impact des cancers et des maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Huntington) sur la voie Hippo et plus particulièrement sur le complexe YAP(TAZ)-TEAD a été identifié. Dans les cancers, YAP et TAZ sont surexprimés, de même qu'un ou plusieurs membres de la famille TEAD, entraînant alors des résistances à l'apoptose et des métastases. Dans la maladie d'Huntington, la sous-expression du complexe YAP-TEAD1 participe à la mort neuronale. Le ciblage du complexe protéique YAP/TAZ-TEAD constitue donc une approche thérapeutique prometteuse dans le cadre des cancers (inhibition) et dans le cadre des maladies neurodégénératives (activation).

L'activation de ce complexe a également été envisagée récemment dans le cadre de la médecine régénérative, issue d'un nouvel essor de la médecine axée sur la réparation ou la régénération de tissus.

L'objectif de ma thèse est de créer une chimiothèque de modulateurs de l'interaction YAP(TAZ)-TEAD en vue d'établir les requis structuraux pour concevoir des modulateurs sélectifs d'un ou plusieurs membres de la famille TEAD.

Dans un premier temps, un travail de modélisation moléculaire a été effectué afin d'identifier les domaines structuraux pouvant induire une sélectivité entre les membres de la famille TEAD.

Dans un deuxième temps, nous avons construit une chimiothèque autour du 5-benzyloxyindole, ligand de la poche palmitate de TEAD2, en pharmacomodulant les positions 1, 3 et 5.

La première partie récapitule les variations apportées à la fonction benzyloxy où le cycle phényle a été remplacé par divers groupes aryles ou alkyles.

Dans les deuxième et troisième chapitres, nous nous sommes basés sur la superposition de la structure cristallographique du 5-benzyloxyindole avec celles de l'acide palmitique et l'acide flufénamique pour concevoir de nouvelles molécules plus affines pour TEAD.

INTRODUCTION GENERALE

L'activité de nos molécules a été évaluée par mesure de l'activité transcriptionnelle de TEAD sur cellules HEK293T et d'affinité avec TEAD2 par TSA. Les cristaux de ce même TEAD ont également été trempés dans des solutions de nos composés. Pour finir, les composés les plus actifs ont été testés sur cellules cancéreuses MDA-MB-231 (lignée cellulaire triple négatif de cancer du sein représentant 15-20% de tous les cas de cancers et difficiles à traiter) pour mesurer leur capacité à inhiber l'expression des gènes cibles et la prolifération cellulaire.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. La voie Hippo

La voie Hippo, découverte chez la Drosophile en 1988 et hautement conservée chez les mammifères, est essentielle pour le développement embryonnaire. Elle permet également le contrôle de la taille des organes et de l'homéostasie tissulaire tout au long de la vie.^{1,2} Ces fonctions sont assurées par des processus biologiques tels que la division cellulaire, la mort cellulaire et le contrôle du pool de cellules souches.

1. Fonctionnement de la voie Hippo

La voie Hippo contrôle l'état de phosphorylation des co-activateurs YAP (Yes-associated protein) et TAZ (ou WWTR1) (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). Phosphorylés, YAP et TAZ sont cytoplasmiques et vont être dégradés. Non-phosphorylés, ils sont nucléaires et interagissent principalement avec les facteurs de transcription TEAD (Transcriptional Enhanced Associate Domain) (Figure 1).

a. Phosphorylation de YAP/TAZ et dégradation

Sous l'impulsion de stimuli qui seront détaillés plus loin, une cascade de kinases cytoplasmiques va phosphoryler YAP et TAZ. Elle est décrite en détail dans une revue publiée par Guan en 2016.³ Les kinases MST1/2 (Mammalian Ste20-like Protein kinase) s'autophosphorylent ou sont phosphorylées par les kinases TAOK1, 2 et 3 (Thousand and one kinase) au niveau de la T183 pour MST1 et de la T180 pour MST2. MST1/2 active et phosphoryle ensuite sa sous-unité SAV1 ; ce qui donne lieu à la formation d'un complexe entre MST1/2, LATS1/2 (Large tumor suppressor 1 et 2) et sa sous-unité MOB1A/B. Ce complexe entraîne alors la phosphorylation de MOB1A/B sur la T12 et la T35 et de la kinase LATS1/2 au niveau de la T1079 pour LATS1 et de la T1041 pour LATS2. D'autres kinases comme les MAP4K, activées par les kinases TAOK, peuvent agir en parallèle de MST1/2 pour phosphoryler LATS1/2.

La kinase LATS1/2 phosphoryle YAP sur le motif HXRXXS. La phosphorylation sur la S127 permet la fixation de la protéine 14-3-3 qui induit la rétention cytoplasmique de YAP alors que la phosphorylation sur la S381 conduit à l'ubiquitinylation et la dégradation de YAP par le protéasome. Pour TAZ, la phosphorylation sur la S89 se déroule de la même manière puisque le motif HXRXXS est hautement conservé.

Suite à cette dégradation, YAP et TAZ ne sont plus en mesure de rentrer dans le noyau, laissant ainsi la protéine TEAD se lier avec d'autres cofacteurs comme la famille des Vgll (Vestigial like), connus comme régulateurs et co-répresseurs des gènes cibles.⁴

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

b. Désactivation de la voie Hippo

Lorsque la voie est désactivée, YAP et TAZ ne sont donc pas phosphorylés et peuvent entrer dans le noyau. Les facteurs permettant la translocation de YAP/TAZ dans le noyau sont méconnus mais plusieurs hypothèses sont à l'étude dont la formation du complexe protéique YAP/TAZ-Mint3-APP.⁵ Dans le noyau, YAP/TAZ se lie à des facteurs de transcription tels que TEAD mais aussi SMAD, TBX5, RUNX1/2, ErbB4 ou p73.⁶ Les complexes formés entre YAP/TAZ et ces facteurs entraînent la transcription de gènes cibles tels que CTGF, CYR61, BIRC5, AXL ou encore ANKRD1. Ces gènes sont responsables de la survie, de la prolifération, de la différenciation et de la migration/invasion cellulaire.⁷⁻⁹

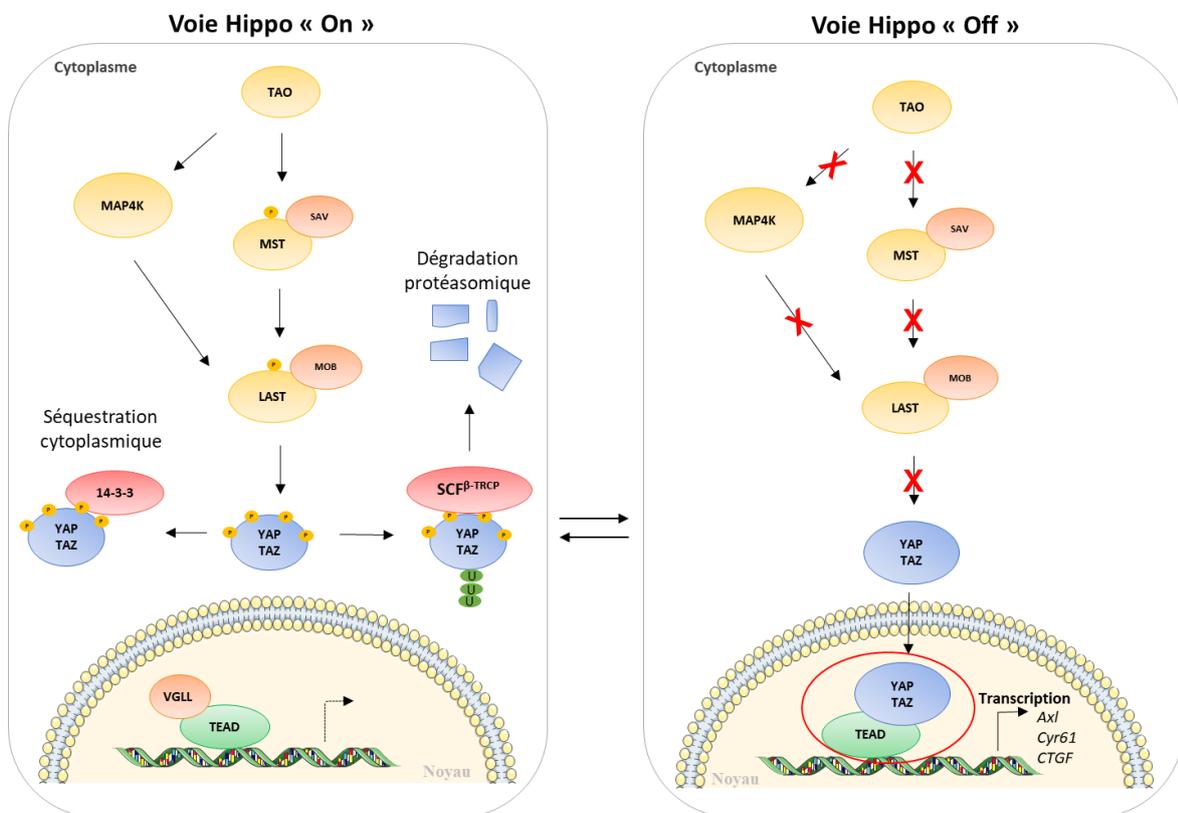


Figure 1: Résumé de la cascade de kinase de la voie Hippo

c. Caractéristiques des effecteurs terminaux de la voie Hippo

Bien que structurellement très différents, les coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ assurent globalement le même rôle. Huit isoformes de la protéine YAP ont été répertoriés chez l'Homme alors que la protéine TAZ n'a qu'un isoforme humain connu. Ces isoformes sont composés d'un domaine d'activation transcriptionnel, d'un domaine se liant à la protéine 14-3-3, d'un domaine de liaison à TEAD, d'un domaine PDZ et d'un ou deux domaines WW (un domaine pour YAP2 et TAZ et deux domaines pour YAP1) (Figure 2 A et B).¹⁰ Les protéines Vgll qui semblent aussi être des

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

coactivateurs de TEAD, sont au nombre de quatre : Vgll1-4. Elles se lient à TEAD grâce au domaine TDU (également appelé Vg) conservé pour Vgll1-4. Vgll4, qui possède deux motifs TDU, peut se lier à deux domaines C-terminaux de TEAD (voir structure cristallographique plus loin) (Figure 2 D).¹¹ Leur rôle semble un peu différent des coactivateurs YAP et TAZ et chaque isoforme aurait un rôle spécifique. Vgll1-3 sont considérés comme oncogènes alors que Vgll4 joue un rôle protecteur contre les cancers et est trouvé sous-exprimé dans de nombreux types de cancers.¹⁰

La famille TEAD est constituée de quatre membres : TEAD1, TEAD2, TEAD3 et TEAD4, issus de quatre gènes différents situés sur quatre chromosomes différents. Ils ont une structure générale divisée en quatre domaines : une partie N-terminale, un domaine se liant à l'ADN, un domaine PRR (récepteur de reconnaissance) et une partie C-terminale se liant à YAP et TAZ (Figure 2 C). Les membres de la famille TEAD possèdent une forte homologie (61 à 73% globalement). Celle-ci est très importante au niveau du domaine se liant à l'ADN (environ 90% d'homologie) et C-terminale (environ 80% d'homologie) mais diffèrent beaucoup au niveau de la partie N-terminale (environ 35% d'homologie) et du domaine PRR (environ 40% d'homologie).¹²⁻¹⁴

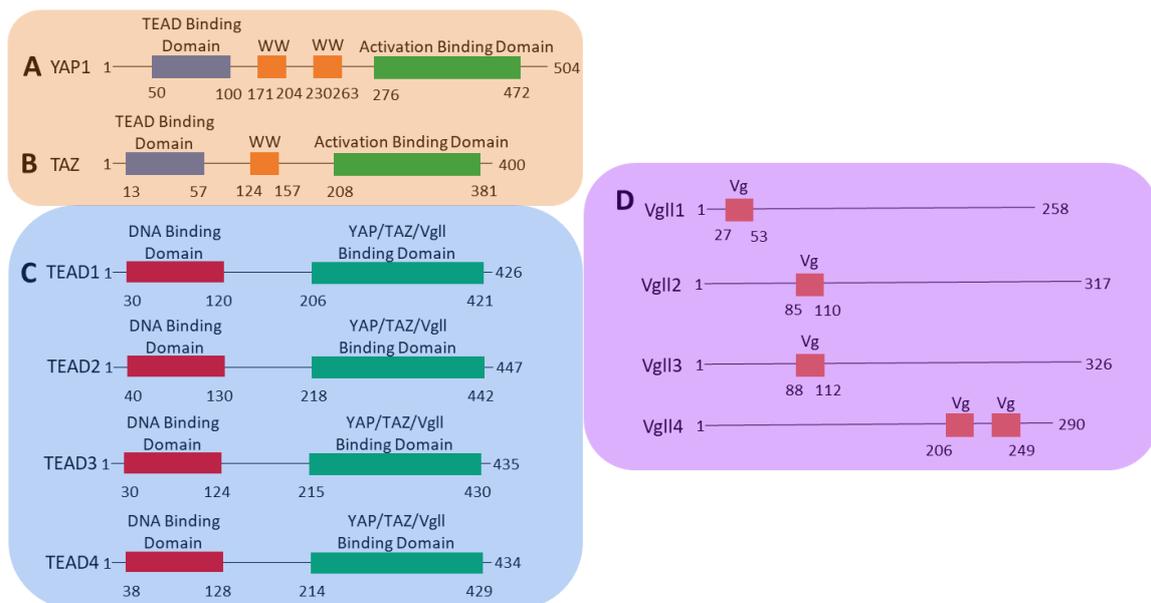


Figure 2: Structure simplifiée des domaines des coactivateurs YAP1, TAZ, Vgll1-4 et des membres de la famille TEAD, d'après Pobbati et al.¹⁰

2. Stimuli entraînant l'activation ou la désactivation de la voie Hippo

La voie Hippo est régulée sous l'effet de divers stimuli extérieurs que l'on peut classer en quatre types : contacts inter-cellulaires, forces mécaniques, autres voies de signalisation et voies métaboliques.^{3,15-18}

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

a. Contacts inter-cellulaires

Une cellule est composée de jonctions contenant des protéines ou complexes protéiques qui sont des régulateurs en amont de la voie Hippo répondant à des stimuli provenant de la déstabilisation de ces jonctions.

Parmi ces régulateurs, certains jouent un rôle d'activateur de la voie Hippo *via* la phosphorylation ou la séquestration de YAP/TAZ. C'est le cas notamment des protéines AMOT, SCRIB, PTPN14, RASSF1A, MARK4, PP2A, SIKs, de l' α -caténine (associée aux jonctions adhérentes) et des complexes Crumbs/Pals/Patj et NF2/Kibra/FRMD6. D'autres régulateurs ont cette fois un rôle de désactivateur de la voie Hippo comme l' α -caténine (associée à l'E-cadhérine) et les protéines AJUBA, MASKs, HIPK2 et WBP2.^{3,15,16,18}

b. Mécanotransduction de la matrice extracellulaire et du cytosquelette

Les cellules sont soumises à chaque instant de leur vie et de manière omniprésente à une mécanique de la matrice extracellulaire et du cytosquelette ayant des conséquences sur la localisation de YAP et TAZ. L'étalement des cellules avec une forte adhérence à la matrice extracellulaire entraîne la translocation de YAP et TAZ dans le noyau favorisant la prolifération cellulaire. *A contrario*, des cellules compactes et rondes avec une faible surface d'adhérence à la matrice extracellulaire induisent une localisation cytoplasmique de YAP et TAZ et une forme spécifique d'apoptose.¹⁵

c. Autres voies de signalisation et récepteurs couplés aux protéines G

D'autres voies de signalisation telles que les voies Wnt, Notch, Hedgehog et TGF- β peuvent réguler la voie Hippo.¹⁶ La plus connue de ces voies, la voie Wnt est étroitement liée à la voie Hippo car le complexe Axin/CK1/GSK3/ β -caténine est médié par YAP/TAZ et la dégradation de ce complexe entraîne la libération de β -caténine et de YAP ou TAZ.¹⁵

D'autres GPCR peuvent réguler la voie Hippo comme ceux couplés aux protéines $G_{\alpha 12/13}$, $G_{\alpha q/11}$ ou $G_{\alpha i/o}$ qui inhibent LATS1/2 et activent YAP. En revanche, ceux couplés aux protéines $G_{\alpha s}$ activent LATS1/2 et inhibent YAP.^{3,16,17}

d. Métabolisme et stress cellulaire

La voie Hippo répond à des signaux comme la privation de nourriture, le stress énergétique, le stress osmotique ou hypoxique et donc aux voies métaboliques des nutriments.¹⁷

Lorsque le niveau de glucose est faible, la voie métabolique du glucose peut intervenir *via* la kinase Adénosine monophosphate (AMPK) qui phosphoryle YAP soit directement soit par l'intermédiaire de LATS1/2, bloquant ainsi la consommation d'ATP et la prolifération cellulaire (Figure

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

3 A). *A contrario*, lorsque le taux est élevé, la transférase O- β -N-acétylglucosamine (OGT) empêche la phosphorylation de YAP par l'ajout d'un sucre sur une de ses sérines ou thréonines. Cette modification active donc la prolifération cellulaire (Figure 3 B).^{16,17}

Certains lipides et leurs voies métaboliques peuvent aussi réguler la localisation et l'activation de YAP et TAZ. L'acide palmitique, qui est un ligand naturel de TEAD,¹⁹⁻²¹ semble activer la phosphorylation de YAP en augmentant l'expression de la kinase MST1/2 à travers une autre voie de signalisation (Figure 3 C). A l'inverse, la voie des mévalonates active la translocation de YAP et TAZ dans le noyau à travers un mécanisme faisant intervenir la RhoGTPase : RhoA (Figure 3 D).¹⁷

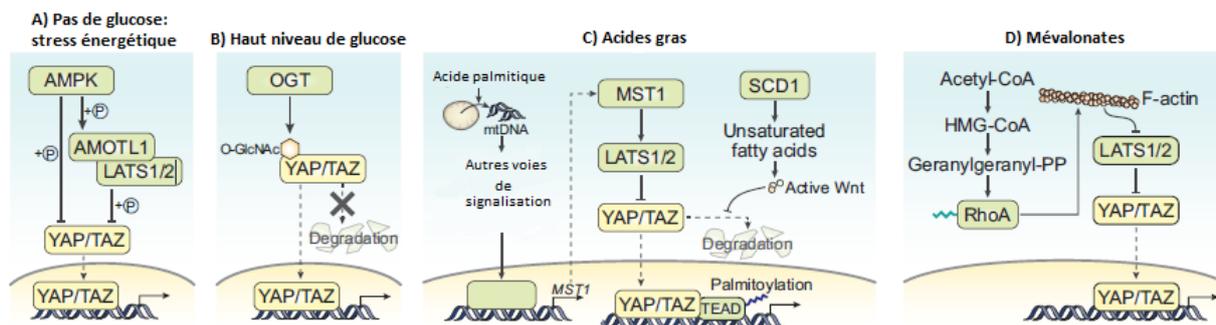


Figure 3: Régulation de la voie Hippo par des effecteurs de la voie métabolique du glucose et des acides gras d'après Koo et al.2018¹⁷

II. Les facteurs de transcription TEAD dans le développement embryonnaire, l'homéostasie tissulaire et les maladies

1. La voie Hippo indispensable dans le développement embryonnaire

La voie Hippo est l'une des premières voies de signalisation actives aux stades de la préimplantation de l'embryon.^{22,23} Aux stades zygote et blastomère, YAP et TAZ sont indispensables puisqu'ils empêchent la croissance précoce du futur embryon et leur inhibition entraîne la mort des cellules. Au stade blastocyte, la localisation des coactivateurs YAP et TAZ et leur interaction avec TEAD4 selon le type cellulaire (trophoblastes ou cellules pluripotentes de l'ICM (masse cellulaire interne)) sont cruciales pour le bon développement de l'embryon et des tissus entourant celui-ci. D'autres effecteurs en amont de la voie Hippo ont montré leur importance dans le destin des cellules blastomères puisque des mutations ou des inhibitions des kinases LAST, NF2 et AMOT ont provoqué un développement anormal des embryons.

Les autres membres de la famille TEAD semblent n'intervenir qu'au stade de l'organogénèse. Il a été montré que TEAD1 est impliqué dans le développement du cœur et des cellules de Schwann ainsi que de la notochorde (avec TEAD2). TEAD3 est inclus dans le développement du placenta.²⁴⁻²⁸

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Des expériences « Knock-Out » (KO) de TEAD2 montrent de lourdes malformations comme l'exencéphalie et son rôle dans le renouvellement des cellules souches embryonnaires chez la souris.²⁹

2. La voie Hippo permet l'homéostasie tissulaire au cours de la vie

L'impact des kinases et des autres effecteurs de la voie Hippo n'est pas toujours le même selon les organes. Des mutations effectuées sur des souris ont montré que dans certains organes, la délétion, la suractivation ou encore la modification de certains effecteurs est critique.

Une augmentation de la taille des organes est observée lors de l'inhibition de MST1/2, SAV et NF2 (foie, estomac, rate, voies respiratoires) de même que l'apparition de carcinomes par le KO de la kinase MOB1A/B (peau, poumon, sein). La suractivation de YAP entraîne un grossissement réversible du foie alors que sa délétion crée des anomalies des voies biliaires et du rein. Lors de la grossesse, cette délétion a pour conséquence une hypoplasie et une réduction des structures alvéolaires du sein.²²

Les protéines TEAD ont également des rôles différents selon les tissus. TEAD1 et 4 ont respectivement un rôle dans la prolifération et la différenciation des tissus musculaires ;^{30,31} TEAD1 et 3 ont aussi un rôle redondant dans la prolifération des cellules épidermiques.³² Enfin, TEAD1 intervient dans l'angiogenèse des cellules endothéliales et TEAD3 dans la formation de lignées cardiaques à partir de cellules souches pluripotentes induites.^{33,34}

3. La voie Hippo dérégulée entraîne la formation de cancers ou de maladies dégénératives

La voie Hippo peut être dérégulée de deux manières ; soit elle est suractivée dans le cas de cancers et entraîne une surexpression de certains gènes cibles, soit le complexe YAP/TAZ-TEAD est sous exprimé dans certaines maladies dégénératives.

a. La voie Hippo dans les cancers

L'Atlas du génome du cancer a classé la voie Hippo comme l'une des huit voies de signalisation les plus fréquemment altérées.³⁵ Dans la plupart des cancers, les protéines YAP et TAZ sont surexprimées et très présentes dans le noyau cellulaire.^{10,18,36-40} Cette localisation est corrélée à la malignité des tumeurs dans de nombreux cancers (du sein, des intestins, du foie, des ovaires, de l'estomac et du rein). Les coactivateurs Vgll sont eux-aussi altérés dans les cancers puisque des fusions de gènes et des surexpressions impliquant Vgll1-3 ont été observées alors que Vgll4 a été révélé comme un suppresseur de tumeur en supprimant l'activité transcriptionnelle de TEAD.⁴¹

Les mécanismes de transformation des cellules normales en cellules tumorales malignes médiés par YAP et TAZ ne sont pas connus mais plusieurs voies sont à l'étude dont la fusion de certains

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

gènes.^{36,37} Les effecteurs YAP et TAZ semblent également responsables de la transition épithélio - mésenchymateuse (TEM) qui consiste à faire passer des cellules épithéliales issues d'un carcinome à des cellules à phénotype mésenchymateux qui migrent et peuvent être le point de départ de métastases.

Les protéines de la famille TEAD sont surexprimées dans de nombreux cancers comme les cancers de la prostate, du rein, dans les cancers gastriques et dans des tumeurs du cerveau (TEAD1) ; dans les carcinomes hépatocellulaires (TEAD2) ; dans les adénocarcinomes pancréatiques et les métastases du sein (TEAD2 et TEAD3) ainsi que les hépatoblastomes, les cancers gastriques et du sein et les métastases de l'intestin (TEAD4).^{4,13,42-47}

Plusieurs agents anti-cancéreux comme l'association cisplatine/Gemcitabine, le 5-fluorouracile et le Paclitaxel ont montré des résistances liées à différents mécanismes comme la dérégulation du métabolisme de la Gemcitabine, l'entrée en dormance de cellules cancéreuses ainsi que les mutations des sites de phosphorylation par Cdk1.⁴⁸⁻⁵⁰ Les coactivateurs YAP/TAZ sont décrits comme étant au cœur de ces mécanismes de résistance ; ce qui fait du complexe YAP/TAZ-TEAD une cible de choix pour accentuer ou maintenir l'activité de ces agents anticancéreux.⁵¹ Une combinaison de la Verteporfin (Visudyne®) avec ces anticancéreux a pu montrer une diminution de la résistance et une synergie de la cytotoxicité des composés.⁵²

b. La voie Hippo dans les maladies dégénératives

L'impact de la voie Hippo sur l'atrophie chorioretinienne de Sveinsson, une dégénérescence de la rétine, a été reporté pour la première fois en 2004.⁵³ Celle-ci est due à une seule mutation d'une tyrosine par une histidine (Y421H) sur la protéine TEAD1 altérant son interaction avec les coactivateurs YAP et TAZ mais pas avec Vgll.^{54,55}

Dans des cellules photoréceptrices de la rétine (cellules de Müller) dégénératives, les protéines TEAD1 et YAP ont montré un niveau d'expression plus élevé en réponse à la dégénération.⁵⁶

L'analyse post-mortem de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Huntington a montré une augmentation significative de pMST1 et de pYAP cytoplasmiques et une diminution de YAP nucléaire. L'association de ces deux phénomènes entraîne la dérégulation de l'expression des gènes cibles de la voie Hippo.⁵⁷ La diminution de l'interaction YAP-TEAD1, qui découle de la chute du niveau de YAP dans le noyau, donne lieu à la mort des neurones *via* un mécanisme de mort cellulaire de type III appelé « ballooning cell death » (BCD, proche de la mort cellulaire « transcriptional repression-induced cell death » : TRIAD) médiée par le mutant Htt.^{58,59}

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

La diminution de l'interaction YAP-TEAD dans des stades précoces de la maladie d'Alzheimer est également responsable de la mort cellulaire des neurones par TRIAD. Cette diminution est provoquée par la séquestration de YAP dans le cytoplasme par des agrégats de la protéine A β .⁶⁰

c. La voie Hippo : une cible thérapeutique pour la médecine régénérative ?

La capacité des organes à se régénérer devient limitée à cause de l'âge et de certaines maladies. La désactivation de la voie Hippo dans le cadre de la médecine régénérative fait l'objet de nombreuses études référencées dans les revues suivantes.^{36,61,62}

La régénération cardiaque est très étudiée dans le cadre de la restauration du tissu après infarctus ou dystrophie cardiaque. La prolifération de ces cellules *via* l'activation de YAP est très importante au stade embryonnaire et elle le reste quelques jours après la naissance. L'expression artificielle de YAP permet de réactiver les voies embryonnaires et néonatales capable de régénérer ces cellules, ce qui constitue une thérapie prometteuse.

Certaines maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn diminuent le potentiel régénératif intestinal. L'activation artificielle de YAP a montré l'expansion des cellules souches de la crypte intestinale. Ces cellules souches, de manière surprenante, ne suivent pas le programme homéostatique habituel mais un programme qui inhibe toutes les voies présentes chez l'adulte et active, à l'instar des cellules cardiaques, des gènes fœtaux.

Le foie est l'un des organes qui a la capacité régénératrice la plus élevée. Cependant, les personnes âgées ou souffrantes de diabète, de cirrhose ou de cholestérase voient leur capacité de renouvellement des cellules diminuée. La suractivation de YAP chez des souris âgées ou malades et également chez l'humain a montré deux mécanismes distincts pour la régénération des hépatocytes : soit *via* la prolifération de ces cellules soit *via* leur transdifférenciation.

L'inactivation de la voie Hippo comme traitement thérapeutique pourrait induire la formation de cancers. Cependant, il a été montré que l'unique activation de YAP/TAZ n'est pas suffisante à l'apparition des tumeurs (cardiaques et hépatiques).⁶¹

III. Le domaine C-terminal de TEAD et les complexes TEAD-coactivateurs

1. Le domaine C-terminal de TEAD

a. Structure

Structurellement, le domaine C-terminal TEAD se comporte comme une immunoglobuline avec un repliement de deux feuillets β l'un contre l'autre pour former un β -sandwich. Le premier feuillet β est composé des brins β 1, β 2, β 5, β 8 et β 9 disposés antiparallèlement et le second contient les brins β 3, β 4, β 6, β 7, β 10, β 11 et β 12. Contrairement aux immunoglobulines, la protéine TEAD

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

possède également quatre hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$. Ces deux dernières se situent entre les deux feuillets β et stabilisent le β -sandwich (Figure 4).^{63,64} TEAD interagit avec ses coactivateurs par trois interfaces: l'interface 1 correspondant au brin $\beta 7$ (en rose), l'interface 2 aux hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (en vert) et l'interface 3 aux brins $\beta 4$, $\beta 11$, $\beta 12$ et aux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 4$ (en rouge). TEAD possède une poche interne dans laquelle s'insère un acide gras saturé en C14 (palmitique) ou C16 (myristique) (en bleu).

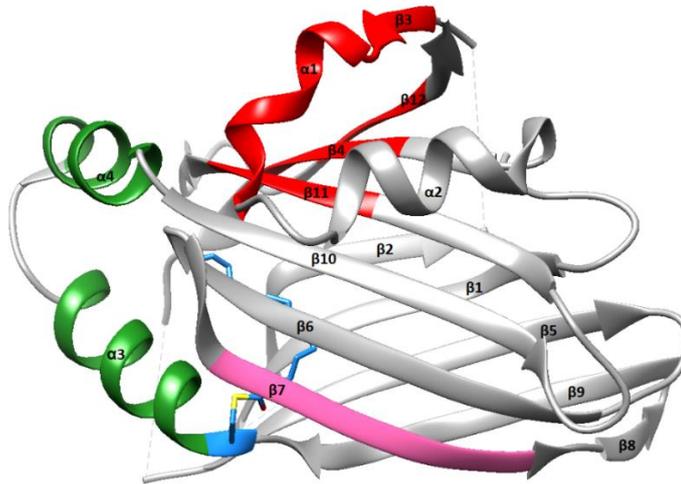


Figure 4: Structure de hTEAD2 (code PDB : 5EMV)

b. Importance de la palmitoylation de TEAD

La cavité contenant l'acide gras saturé se situe entre les deux feuillets β de la protéine TEAD.²⁰ L'acylation est nécessaire à la stabilité de la protéine TEAD (température de dénaturation de $61,1 \pm 0,2$ °C pour la protéine acylée contre $48,8 \pm 0,8$ °C pour la non-acylée) mais pas à sa localisation dans le noyau.^{20,65} Son rôle dans l'interaction avec YAP et sur l'activité transcriptionnelle qui en découle reste controversé.^{19–21,65} La protéine TEAD est le premier facteur de transcription connu à s'autopalmitoyer.⁶⁵

Sur l'ensemble des structures cristallographiques disponibles à ce jour, plusieurs modes de liaison de l'acide palmitique ou myristique ont été observés : soit libre et proche de la cystéine et de la lysine à l'entrée de la poche hydrophobe (code PDB : 5HGU), soit liée de manière covalente à cette cystéine (code PDB : 6GEE) ou à cette lysine (code PDB : 6GEI) (Figure 5).

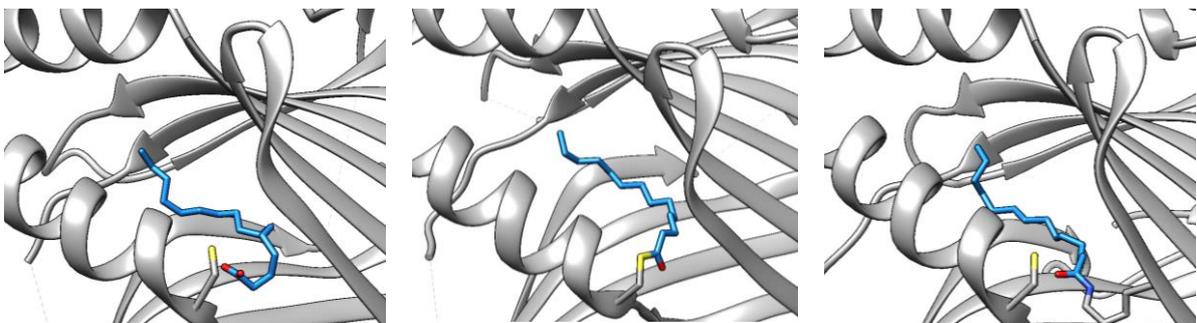


Figure 5: Structures cristallographiques de TEAD acylé: TEAD4 non covalent cystéine, code PDB: 5HGU à gauche, TEAD2 covalent cystéine, code PDB 6GEE au milieu et TEAD4 covalent lysine, code PDB: 6GEI à droite

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

2. Les complexes impliquant TEAD et importance des interfaces 2 et 3

a. Complexes YAP-TEAD, TAZ-TEAD, Vgll-TEAD et FAM-TEAD

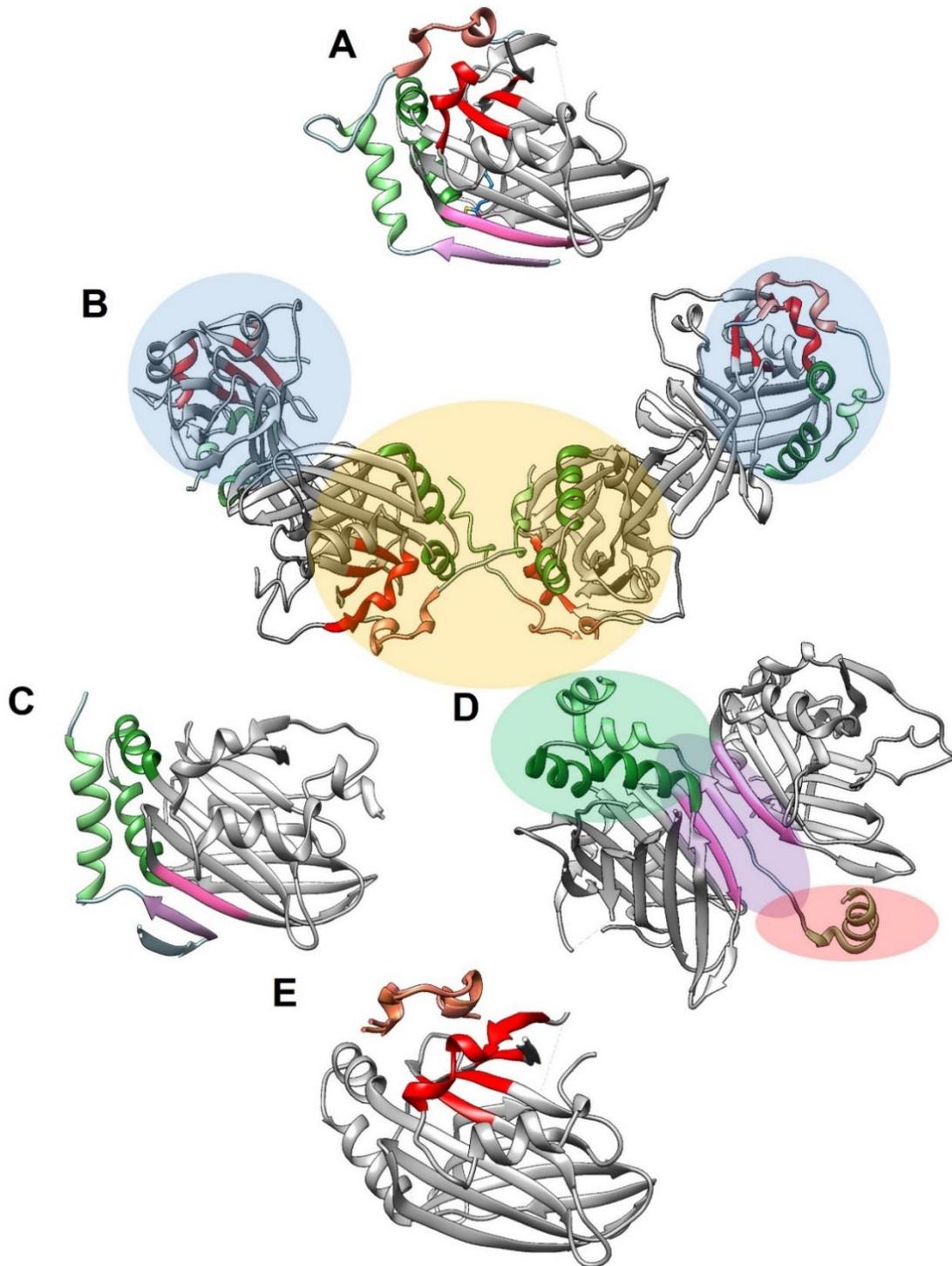


Figure 6: Structures cristallographiques des coactivateurs cristallisés avec TEAD: A) Complexe YAP-TEAD (code PDB: 3KYS), B) Complexe TAZ-TEAD (code PDB: 5GN0), C) Complexe Vgll1-TEAD (code PDB: 5Z2Q), D) Complexe Vgll4-TEAD (code PDB: 4LN0) et E) Complexe FAM-TEAD (code PDB: 6SEN et 6SEO). Les interfaces 1, 2 et 3 sont respectivement en rose, vert et rouge

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Plusieurs structures cristallographiques YAP-TEAD sont disponibles avec hTEAD1 (code PDB : 3KYS, 4RE1 et 6HIL),^{55,66} hTEAD4 (code PDB : 6HIK, 6GE3, 6GE4, 6GE5, 6GE6, 6GEC, 6GEE, 6GEG, 6GEI, 6GEK, 5OAAQ et 6Q2X)^{21,55,67,68} et mTEAD4 (code PDB : 3JUA).⁶⁹ Dans ces structures, YAP s'enroule autour de TEAD. YAP est soit résolu au niveau des 3 interfaces (YAP₅₀₋₁₀₀ ou YAP₅₀₋₉₉) (Figure 6 A) soit un plus court motif ne permet de voir que son interaction avec les interfaces 2 et 3 (YAP₆₄₋₉₈, YAP₆₀₋₉₉ et YAP₆₄₋₈₂).

La seule structure de TAZ-TEAD correspond à l'interaction mTAZ₂₆₋₅₇-mTEAD₄₂₀₄₋₄₂₅ (code PDB : 5GN0) (Figure 6 B).⁷⁰ Deux modes de liaison y sont observés. Le premier, similaire à celui observé pour YAP, ne permet d'observer que les interactions aux interfaces 2 et 3 (Figure 6 B, entouré en bleu). Le deuxième mode de liaison correspond à un hétérotétramère formé entre deux protéines mTAZ et deux protéines mTEAD. Les TAZ s'entrecroisent pour interagir avec les deux unités de TEAD selon les mêmes interfaces (Figure 6 B, entouré en jaune).

Les complexes mVgll1₁₉₋₅₃-mTEAD₄₂₀₃₋₄₂₆ (code PDB : 5Z2Q)¹¹ et mVgll4₂₀₃₋₂₅₂ – mTEAD₄₂₀₆₋₄₂₆ (code PDB : 4LNO)⁷¹ montrent uniquement des interactions aux interfaces 1 et 2 (Figure 6 C et D). L'interaction de la protéine Vgll4 avec TEAD est assez différente puisque deux unités de TEAD sont nécessaires *via* l'interface 1 (Figure 6 D, entouré en violet). Une de ces unités interagit au niveau de son interface 2 *via* les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du domaine TDU1 (Figure 6 D, entouré en vert) tandis qu'une troisième unité de TEAD interagit avec l'hélice $\alpha 1$ du domaine TDU2 avec son interface 2 (Figure 6 D, entouré en rouge).

Les protéines de la famille FAM, caractérisées par deux paralogues FAM181A et FAM181B, sont présentes chez une grande partie du règne animal mais leur rôle n'est pas encore bien connu. Elles semblent jouer un rôle dans le développement du système nerveux au stade embryonnaire.⁷² Trois structures cristallographiques FAM181A/FAM181B et TEAD sont disponibles (code PDB : 6SEN, 6SEO et 6L9F). Seule la partie interagissant avec l'interface 3 de TEAD est définie (Figure 6 E).⁷³

L'alignement des séquences canoniques des co-activateurs de TEAD montre la conservation de motifs impliqués dans les interfaces 1, 2 et 3 (Figure 7).

hYAP1	52	HQIVHV	----	RGDSETD	LEALF	NAVMN	PKTANV	PQTVF	MRLRKL	PDSFFK	PPE	100
mYAP1	37	HQVVHV	----	RGDSETD	LEALF	NAVMN	PKTANV	PQTVF	MRLRKL	PDSFFK	PPE	85
hTAZ	15	QQVIHV	----	TQDLDTD	LEALF	NSVMN	PK----	PSS-W	-RKKIL	PESFFK	EP-D	57
mTAZ	15	QQVIHV	----	TQDLDTD	LEALF	NSVMN	PK----	PSS-W	-RKKIL	PESFFK	EP-D	57
mVgll1	25	AGSVIFT	-YFEG	DINSMV	DEHFS	RALRNL	LK ⁵³					
mVgll4	225	PNSVSIT	----	G----	S-VDDHF	AKAL	GDTW ²⁴⁷					
hFAM181A							187	PGQVF	MRKRQL	PASFWEE	P	205
hFAM181B				165	LAALF	169		220	VPLRARNL	PPSFFTE	P	235

Figure 7: Alignement de séquences des coactivateurs YAP, TAZ, Vgll1, Vgll4 et FAM

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Au niveau de l'interface 1, le brin $\beta 1$ de YAP (Figure 8, en rose clair), le brin $\beta 2$ de Vgll1 et le brin $\beta 1$ du domaine TDU2 de Vgll4 interagissent avec le brin $\beta 7$ de TEAD de la même manière ; au travers de 7 liaisons hydrogènes n'impliquant pas les chaînes latérales. L'utilisation d'un court motif de TAZ ne permet pas de voir l'interaction au niveau de l'interface 1 dont le motif est conservé (Figure 7, en rose).

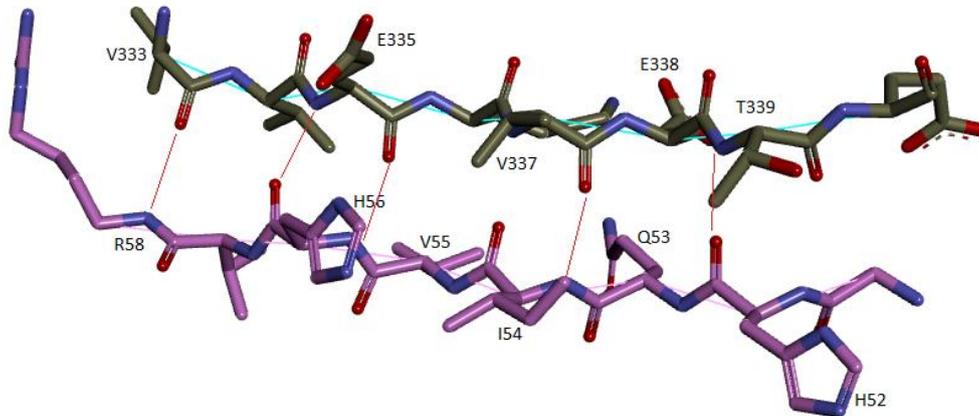


Figure 8: Interaction entre YAP et TEAD1 au niveau de l'interface 1 (code PDB: 3KYS)

L'interaction au niveau de l'interface 2 de TEAD est commune aux co-activateurs YAP, TAZ et Vgll. L'interaction a lieu entre les hélices α de YAP (Figure 9, en vert clair), de TAZ et des Vgll et les hélices $\alpha 3$ et 4 de TEAD. L'alignement de séquences permet de retrouver un motif commun aux coactivateurs : le motif L(V)xxL(H)F (Figure 7, encadré en rouge). Il est également présent au niveau de FAM181B bien qu'il ne soit pas résolu dans les structures existantes.⁷³

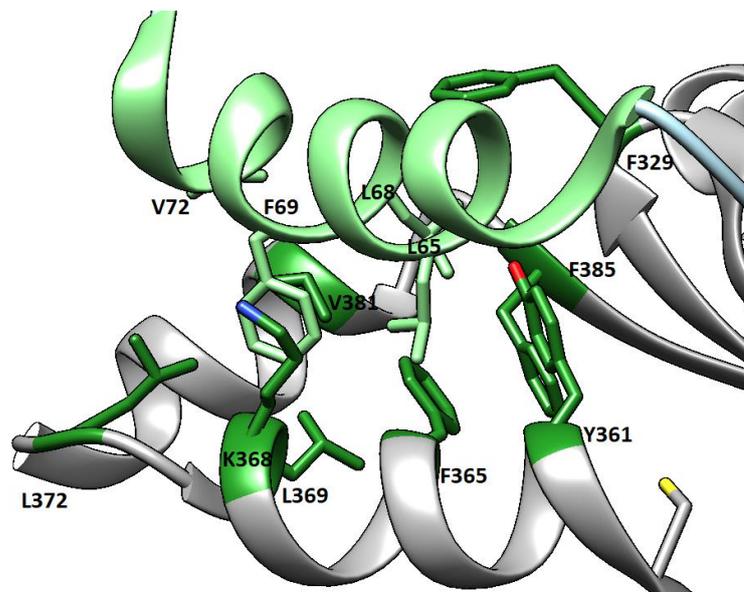


Figure 9: Interaction entre YAP et TEAD1 au niveau de l'interface 2 (code PDB: 3KYS)

Enfin, l'interface 3 de TEAD interagit avec les boucles Ω de YAP (Figure 10) et FAM et l'hélice $\alpha 2$ de TAZ. La protéine FAM181A a une grande similitude structurale avec YAP puisqu'elles possèdent

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

la même boucle Ω ; y compris le motif PXX Φ P indispensable à YAP pour l'interaction avec TEAD mais absent chez TAZ (Figure 7, encadré en jaune).⁷⁰

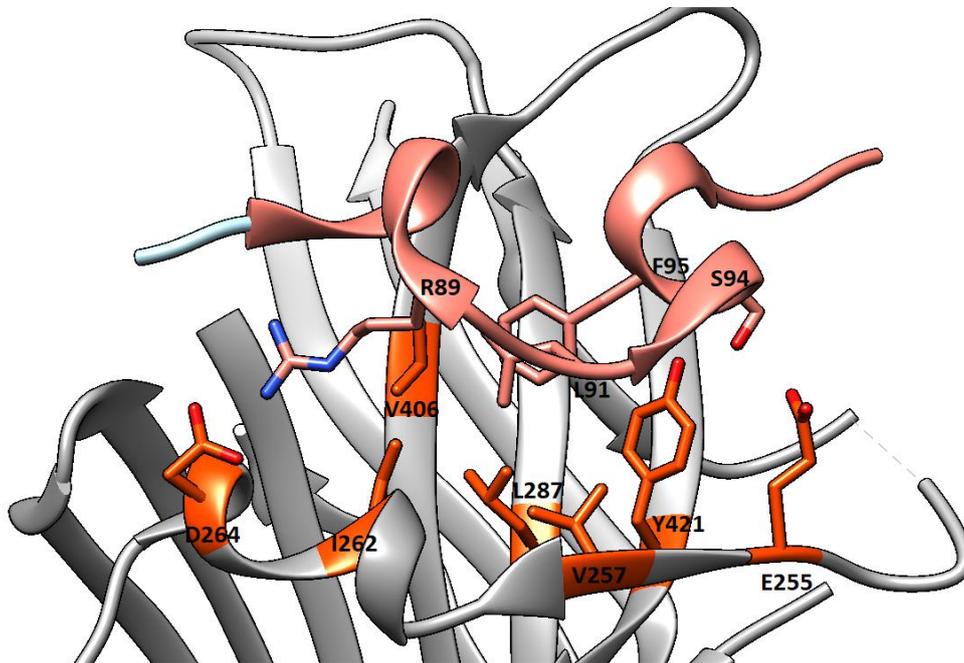


Figure 10: Interaction entre YAP et TEAD1 au niveau de l'interface 3 (code PDB: 3KYS)

b. Importance des interfaces 2 et 3

- *Etudes des interfaces par titration calorimétrique isotherme (ITC) et résonance plasmonique de surface (SPR)*

L'importance des trois interfaces de TEAD dans l'interaction avec les coactivateurs a suscité un grand intérêt. Les groupes de Luo, Kang et Chène ont mesuré les interactions YAP-TEAD et TAZ-TEAD par titration calorimétrique isotherme (ITC) (Tableau 1) et par résonance plasmonique de surface (SPR).^{19,64,74}

Tableau 1: Constantes de dissociation (K_D) des complexes contenant hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄ et différents fragments de YAP et TAZ mesurées par SPR par l'équipe de Chène⁷⁴

Complexe étudié	K_D (nM)
wt-YAP ₅₀₋₁₇₁ -hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	3
wt-YAP ₅₀₋₉₉ -hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	11
wt-YAP ₆₁₋₉₉ -hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	29
wt-TAZ ₁₃₋₁₂₄ -hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	5
wt-TAZ ₁₃₋₅₆ -hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	12
wt-TAZ ₂₄₋₅₆ -hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	45

Les protéines YAP₅₀₋₁₇₁ et TAZ₁₃₋₁₂₄ possèdent une excellente affinité pour TEAD. Lorsque ces protéines sont réduites aux trois interfaces (YAP₅₀₋₉₉ et TAZ₁₃₋₅₆), l'affinité diminue d'un facteur 2 mais

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

reste encore très forte (11 et 12 nM). Enfin, la délétion de l'interface 1 montre peu d'impact ; ce qui confirme que cette interface n'est pas essentielle à l'interaction (29 et 45 nM).

Cette même étude sur mVgll1 a montré que le complexe mVgll1₂₀₋₅₁ – hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄ a un K_D proche de celui obtenu avec YAP et TAZ (119 nM par SPR).⁷⁵ La délétion du brin β 1 a eu peu d'influence sur cette constante de dissociation contrairement à la délétion du brin β 2 ou de la boucle α . Cette étude a permis de montrer que les parties essentielles à l'interaction avec TEAD sont les interfaces 1 et 2, contrairement à YAP et TAZ.

Enfin, l'influence de l'interaction entre les fractions essentielles de YAP, TAZ et Vgll1 avec les différents membres de la famille TEAD a été étudiée et montre qu'il y a très peu de différences d'affinité entre les quatre isoformes de TEAD (Tableau 2).⁵⁵

Tableau 2: Constantes de dissociation (K_D) des complexes formés des fragments YAP₅₁₋₉₉, TAZ₁₄₋₅₆ et Vgll1₂₇₋₅₁ avec les quatre TEAD mesurées par SPR⁵⁵

Coactivateur	Membre de la famille TEAD	K_D (nM)
hYAP ₅₁₋₉₉	hTEAD1 ₂₀₉₋₄₂₆	77
	hTEAD2 ₂₂₁₋₄₄₇	63
	hTEAD3 ₂₁₈₋₄₃₅	44
	hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	44
hTAZ ₁₄₋₅₆	hTEAD1 ₂₀₉₋₄₂₆	49
	hTEAD2 ₂₂₁₋₄₄₇	17
	hTEAD3 ₂₁₈₋₄₃₅	12
	hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	17
Vgll1 ₂₇₋₅₁	hTEAD1 ₂₀₉₋₄₂₆	132
	hTEAD2 ₂₂₁₋₄₄₇	74
	hTEAD3 ₂₁₈₋₄₃₅	57
	hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	67

- *Etude des interfaces par mutagenèse dirigée*

Les interfaces 2 et 3 sont cruciales pour l'interaction YAP-TEAD et TAZ-TEAD et les interfaces 1 et 2 pour l'interaction Vgll1-TEAD. Des expériences de mutagenèse dirigée ont pu déterminer précisément quels acides aminés dans ces interfaces étaient importants.

Les mutations effectuées sur YAP montre l'importance de l'interface 3 (encadré en rouge sur la Figure 11, à gauche) par rapport à l'interface 2.^{63,67,74}

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

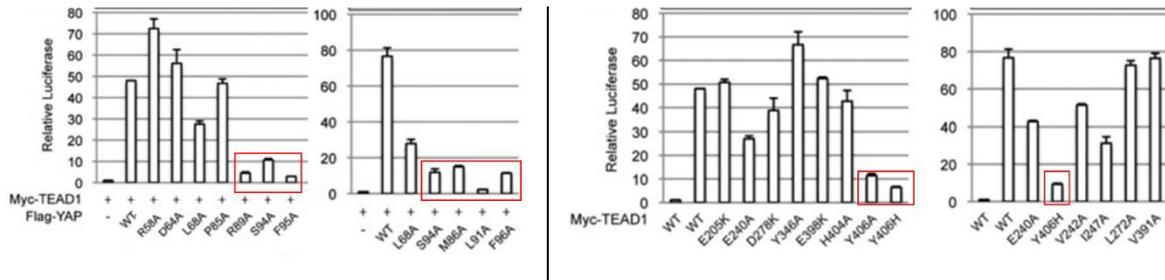


Figure 11: Etude de l'impact des mutations de YAP et TEAD sur l'interaction YAP - TEAD par mutagenèse dirigée mesurée par gène rapporteur par l'équipe de Xu ⁶³

L'impact des mutations d'acides aminés de la protéine TEAD sur l'interaction YAP - TEAD a également été étudié. Sur la protéine hTEAD1₂₀₉₋₄₂₆, seule la mutation de Y421 (située sur l'interface 3) entraîne une forte diminution de l'interaction (encadré en rouge sur la Figure 11, à droite). Ces résultats sont confirmés sur hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ puisque de nombreuses mutations au niveau de l'interface 3 ont montré une réduction significative de l'interaction.⁶⁴

Les mutations de K46 et W43 sur TAZ (interagissant au niveau de l'interface 3) ont réduit considérablement la capacité de TAZ à se lier à hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄.^{74,76}

L'étude de mutagenèse dirigée sur mVgll4 a montré que les mutations du domaine TDU1 et du brin β affectent peu l'interaction mVgll4 - mTEAD4 contrairement aux mutations sur le domaine TDU2 qui semble donc crucial pour maintenir l'interaction *via* l'interface 2.⁷¹

IV. Cibler le complexe YAP/TAZ-TEAD

1. Stratégies et modulateurs principaux de la voie Hippo

De nombreuses équipes se sont intéressées à la conception de modulateurs de la voie Hippo dans le cadre des cancers (inhiber l'interaction YAP/TAZ-TEAD) ou pour la régénération tissulaire (activer l'interaction YAP/TAZ-TEAD). Une première stratégie a consisté à concevoir des molécules capables de contrôler la phosphorylation de YAP/TAZ.

C19 (Schéma 1 A) agit notamment sur la voie Hippo et cible les kinases LAST1, MST1 et AMPK, entraînant la dégradation cytoplasmique de TAZ par GSK3- β alors que CA3 (Schéma 1 B) a été développé pour inhiber l'expression de YAP et l'activité transcriptionnelle qui en résulte.^{77,78} Ces molécules favorisent la phosphorylation de YAP ou de TAZ et inhibe l'interaction YAP/TAZ-TEAD.

XMU-MP-1 et TRULI (Schéma 1 C et D) sont des inhibiteurs réversibles des kinases MST1/2 de LATS1/2 respectivement.⁷⁹⁻⁸¹ Le TT-10 (Schéma 1 E) améliore la translocation nucléaire de YAP, l'activation de la voie Wnt et a montré une augmentation de la prolifération des cardiomyocytes.^{82,83} Ces molécules inhibent la phosphorylation de YAP ou de TAZ et activent l'interaction YAP/TAZ-TEAD.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

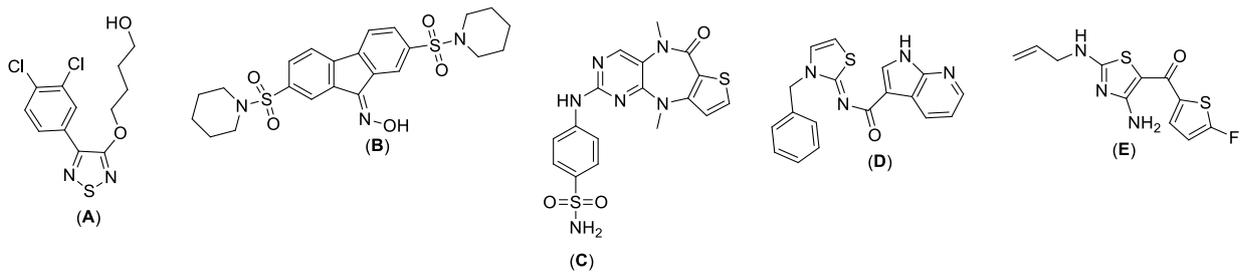


Schéma 1: Modulateurs de l'interaction YAP/TAZ-TEAD agissant directement ou indirectement sur la phosphorylation de YAP/TAZ

La stratégie la plus récente est de moduler l'interaction YAP/TAZ-TEAD en ciblant le facteur de transcription TEAD.⁸⁴⁻⁸⁶

Seul un état de l'art de cette stratégie est développé ici car cette dernière a été choisie dans ce projet.

2. Sites « druggables » de la protéine TEAD et molécules agissant sur TEAD

Les sites de la protéine TEAD considérés comme « druggable » sont les interfaces 2, 3 (impliquées dans la formation du complexe avec YAP et TAZ et décrites comme essentielles) et la poche hydrophobe hébergeant un acide gras de type palmitate ou myristate (Figure 12).

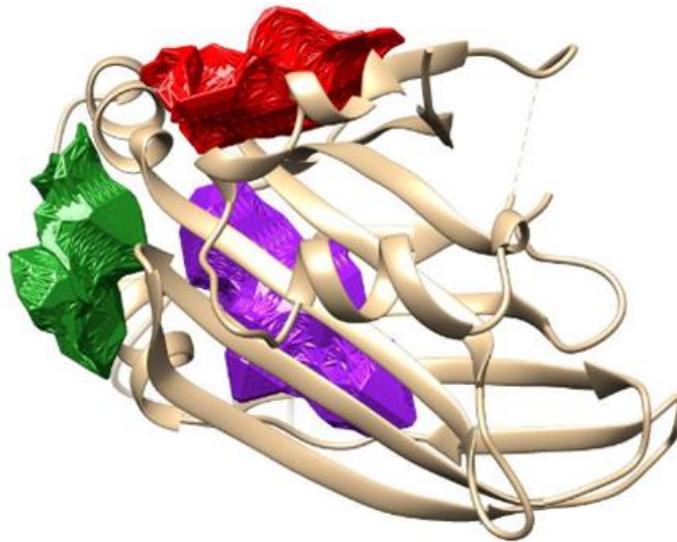


Figure 12: Sites "druggable" de la protéine TEAD avec l'interface 2 en vert, l'interface 3 en rouge et la poche hydrophobe en violet

a. Peptides mimétiques de YAP et Vgll4

- *Peptides mimétiques de YAP*

En 2014, les groupes de Hu et Qin ont développé chacun un peptide dérivé de l'interface 3 de YAP.^{66,87} Le fragment YAP₈₄₋₁₀₀ a été rigidifié en insérant un pont disulfure au niveau des positions R87 et F96 et des modifications ont ensuite été effectuées pour améliorer l'interaction au niveau des acides

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

aminés M86, L91, D93 et E100. Un des nouveaux peptides mis en compétition avec YAP₅₀₋₁₇₁ montre une IC₅₀ de 25 nM mesurée par SPR avec un K_D de 15 nM avec TEAD1₂₀₉₋₄₂₆. Une structure cristallographique de TEAD avec l'un des peptides a été obtenue (code PDB : 4RE1) et montre les mêmes interactions qu'avec YAP.

En 2019, le groupe de Chène a également effectué un peptide mimétique de YAP en partant du fragment YAP₈₅₋₉₉.⁶⁸ Plusieurs modifications de ce peptide (au niveau de M86, L91, P92, F96 et P98) ont permis d'améliorer l'IC₅₀ à 16 nM et le K_D à 25 nM (mesuré par SPR). Ce peptide a été cristallisé avec hTEAD4₂₁₆₋₄₃₄ (code PDB : 6Q36). Une dernière modification au niveau de L88 a permis de diminuer l'IC₅₀ à 9 nM.

L'approche consistant en l'association sur la séquence protéique porteuse de l'activité biologique, d'une séquence permettant la pénétration cellulaire (CPP) et d'une autre pour l'import nucléaire (NLS) a été appliquée par l'équipe du Dr. Rebollo.⁸⁸ Deux peptides contenant la séquence TEAD₂₂₆₋₂₄₄ ont montré une augmentation de l'apoptose de 45 à 63% dans des cellules cancéreuses MDA-MB-231 à 25 μM et l'un des deux a entraîné la diminution de la taille des tumeurs *in vivo* chez des souris modèles de cancers du sein.

- *Peptides mimétiques de Vgll4*

Jiao et *al.* ont développé un peptide mimétique de Vgll4, suppresseur de tumeur dans plusieurs cancers.⁷¹ Ce peptide appelé Super-TDU, possède le motif TDU2 de Vgll4 interagissant au niveau de l'interface 2 de TEAD et la boucle Ω de YAP interagissant au niveau de l'interface 3 de TEAD séparés par un linker. L'inhibition de l'interaction YAP-TEAD en présence de Super-TDU a été montrée, de même que l'inhibition de la viabilité cellulaire de plusieurs lignées cancéreuses gastriques et de l'expression des gènes cibles CTGF, CYR61 et CDX2.

En 2020, Adihou et *al.* ont développé un autre peptide mimétique du fragment TDU2 de Vgll4.⁸⁹ Ce nouveau peptide cristallise avec TEAD (code PDB : 6SBA). Associé à une séquence Tat et à un linker PEG₂, ce peptide active l'interaction YAP-TEAD qui augmente la prolifération cellulaire sur des cellules RKO, l'expression des gènes cibles et la translocation nucléaire de YAP dans des cardiomyocytes. Il semble que ce peptide inhibe la formation du complexe Vgll4-TEAD et ainsi favorise l'interaction YAP/TAZ-TEAD.

- b. *Inhibiteurs ciblant l'interface 3*

En 2017, Barth et *al.* ont breveté une série de molécules inhibitrices de l'interaction YAP-TEAD actives sur des mésothéliomes. La molécule 22 (Schéma 2) a montré la meilleure activité inhibitrice avec une IC₅₀ de 83 nM (mesurée par Alphascreen entre TEAD1 et YAP2).⁹⁰ En 2019, le groupe de Li a

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

effectué un test de compétition par polarisation de fluorescence entre la molécule 22 et une sonde fluorescence interagissant spécifiquement au niveau de l'interface 3.⁹¹

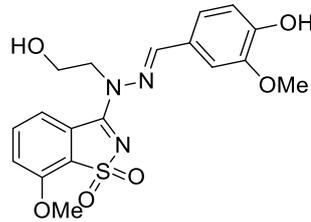


Schéma 2: Structure de la molécule 22

La même année, le groupe de Kang a identifié, à partir d'un criblage de 1685 fragments par TSA, un fragment (Schéma 3) stabilisant la protéine mTEAD4 avec un ΔT_m de + 1,8 °C.¹⁹ Cependant, seules des études par RMN (HSQC ¹H-¹⁵N) ont prouvé que ce fragment interagit au niveau de l'interface 3 et il n'est pas capable d'inhiber l'interaction YAP-TEAD.

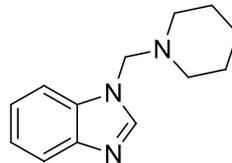


Schéma 3: Fragment reporté par l'équipe de Kang

En 2019, Smith et *al.* ont reporté le fragment CPD3.1 qui provient d'un criblage par docking de 160 millions de molécules (Schéma 4).⁹² Seules des expériences RMN STD et du docking prouvent l'interaction entre la protéine TEAD et CPD3.1. L'analyse ITC a permis d'estimer le K_D à 12 μ M en présence de hTEAD1. Cette molécule n'induit aucune sélectivité *vis-à-vis* d'un membre de la famille TEAD et présente des IC_{50} d'environ 40 μ M pour les quatre isoformes. Les tests cellulaires montrent que ce composé inhibe l'expression des gènes cibles (40% sur CTGF et 60% sur CYR61 à 80 μ M par test rapporteur luciférase) et la migration cellulaire sur cellules HeLa (50% d'inhibition à 80 μ M après 18 h) et sur cellules RaSVSMCs (90% et 65% d'inhibition des mARN de CTGF et CYR61 et 50% d'inhibition de la migration cellulaire).

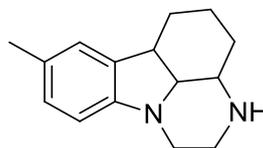


Schéma 4: Structure du CPD3.1

c. Inhibiteurs ciblant l'interface 2

En 2017, Kaan et *al.* ont rapporté vingt fragments capables d'inhiber l'interaction YAP/TAZ-mTEAD4 avec un ΔT_m compris entre +2 et + 20 °C en TSA.⁹³ Des essais de co-cristallisation en présence de ces fragments ont permis d'obtenir une structure cristallographique en présence de l'acide (S)-2-

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

phényl-2-(1H-pyrrol-1-yl)acétique (code PDB : 5XJD). Celui-ci a la particularité de cristalliser en présence de deux unités de TEAD, au niveau de l'interface 2 et plus précisément au niveau des acides aminés interagissant avec le motif LxxLF de YAP (Figure 13). Comme attendu, l'affinité du fragment par ITC et l'activité transcriptionnelle de TEAD mesurées sont très faibles.

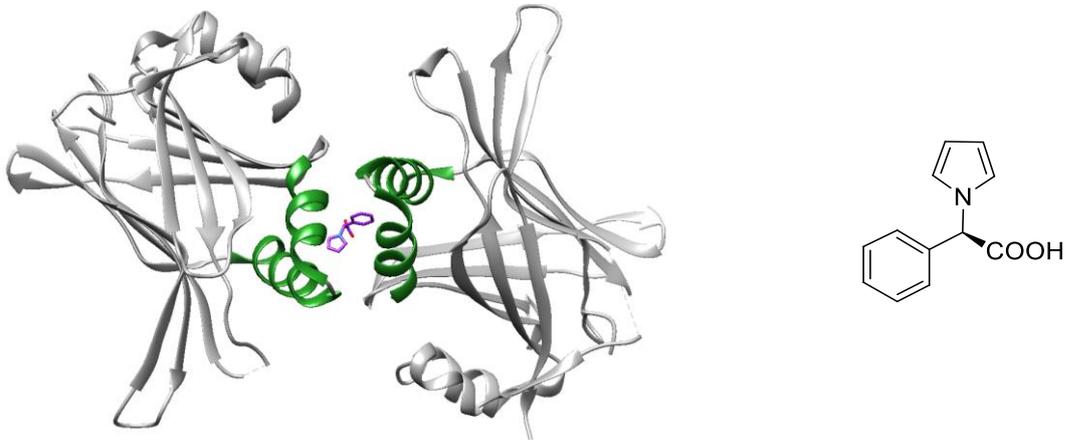


Figure 13: Structure cristallographique du fragment 1 en présence de deux unités de TEAD et structure de ce fragment

Récemment, notre équipe a synthétisé puis optimisé une série d'inhibiteurs de l'interface 2 agissant au niveau d'une poche cryptique non apparente (code PDB : 6S60, 6S6J, 6S69, 6S66 et 6S64) (Figure 14 A).⁹⁴ Le composé 6 (Figure 14) inhibe l'activité transcriptionnelle de TEAD (avec une IC_{50} de 4,5 μ M), l'expression des gènes cibles (mARN et protéines) et la prolifération cellulaire sur cellules MDA-MB-231.

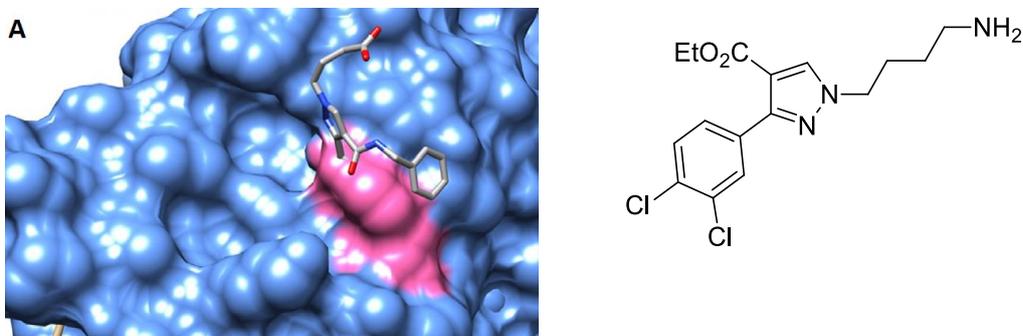


Figure 14: Site d'interaction et structure du composé 6

d. Inhibiteurs ciblant la poche palmitate

- *Inhibiteurs non covalents*

Le groupe de Poulsen est le premier à avoir identifié les acides fénamiques comme ligand de la poche interne de TEAD à partir d'un criblage réalisé sur hTEAD₄₂₁₇₋₄₃₄ par fluorimétrie différentielle à balayage (DSF).⁹⁵ L'acide flufénamique (Schéma 5, **F**) et l'acide bromofénamique (Schéma 5, **G**) cristallisent dans cette poche hydrophobe (code PDB : 5DQ8 et 5DQE) et l'acide niflumique (Schéma 5, **H**) diminue l'activité transcriptionnelle de TEAD lors d'un test gène rapporteur luciférase sur cellules

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

HEK293 et l'expression des gènes cible (*NF2*, *AXL*, *Jagged1*) sur cellules MCF-7 exprimant le mutant de YAP S127A à une concentration de 150 μM .

Le groupe de Gagnon s'est récemment inspiré de ces structures et a mené une étude de relations structure-activité autour du squelette de l'acide flufénamique. Celle-ci a permis de révéler LM98 (Schéma 5, I) qui réduit considérablement la palmitoylation mais n'inhibe pas l'interaction hTEAD1-YAP1.⁹⁶ Une inhibition de l'activité transcriptionnelle d'environ 30% à 10 μM a été mesurée en cellules HEK293 ainsi qu'une diminution de 60% et 40% de l'expression des gènes cible CTGF et CYR61 sur cellules MDA-MD-231. Par trempage avec hTEAD2, LM98 cristallise dans la poche interne (code PDB : 6VAH).

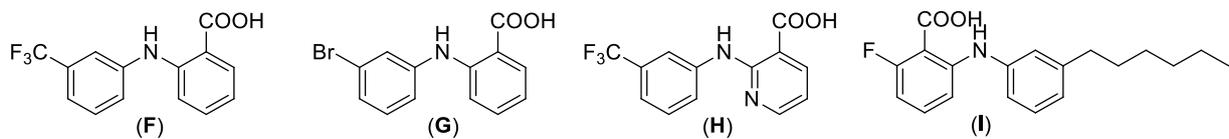


Schéma 5: Structure de la famille d'inhibiteurs de TEAD de la famille de l'acide flufénamique

X. Wu a breveté en 2015 MGH-CP-1 (Schéma 6), identifié à partir d'un criblage de 50 000 molécules sur cellules HEK293A par gène rapporteur luciférase.⁹⁷ Il a été montré que ce composé cible la poche hydrophobe grâce à un test d'autopalmitoylation *in vitro* par chimie click sur hTEAD2 et hTEAD4 par lequel des IC_{50} de 710 et 672 nM ont été mesurées. Il inhibe également l'interaction TEAD1/YAP avec une IC_{50} de 83 nM *in cellulo* et l'expression des gènes cibles CTGF et CYR61 à 5 μM sur lignées HeLa, JHH7 et HuH7. MGH-CP1 se fixe dans la poche interne de TEAD2 (code PDB : 6CDY) et sa sélectivité par rapport à YAP/TAZ et à la voie Hippo et son efficacité *in vivo* sur l'épithélium intestinal ont également été démontrées.⁹⁸

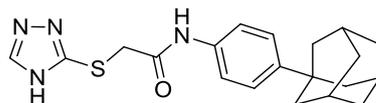


Schéma 6: Structure du MGH-CP-1

En 2020, l'équipe de Cunningham a identifié les molécule 1 et 2 (Schéma 7, J et K) par criblage par polarisation de fluorescence et TR-FRET. Elles possèdent respectivement une IC_{50} de 2,8 μM et 603 nM pour l'inhibition de la palmitoylation (par polarisation de fluorescence) et un K_D de 6,2 μM et 229 nM par SPR (en présence de TEAD2) mais sont incapable d'inhiber l'interaction YAP/TAZ-TEAD.^{99,100} Ces deux molécules sont ligands de la poche hydrophobe de hTEAD2 (code PDB : 6UYB et 6UYC). La molécule 2 plus active est présentée comme un substitut de la palmitoylation qui stabiliserait la protéine TEAD mutée et agirait comme un répresseur transcriptionnel de TEAD indépendant de YAP/TAZ en diminuant l'expression des gènes cible CTGF et CYR61, sans affecter les niveaux de transcription de YAP, TAZ et TEAD (sur cellules HUH-7, JHH-7, MDA-MB-231 et Detroit X1 562). La molécule 2 a aussi réduit la croissance tumorale sur modèles de souris Xenograft.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

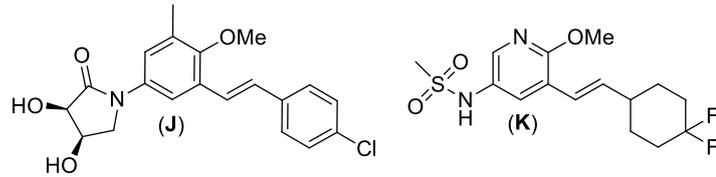


Schéma 7: Structure des composés 1 et 2 décrits par l'équipe de Cunningham

Brunschweiler a reporté l'utilisation d'une bibliothèque peptidomimétique codée en ADN pour cibler l'interaction YAP-TEAD.¹⁰¹ Ces peptoides miment respectivement le tryptophane et la tyrosine comme motif d'ancrage. Le peptotide hexT 21-A56 (Schéma 8) a montré le plus fort potentiel. Celui-ci a montré une affinité pour hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄ avec des IC₅₀ de 0,41 μ M et 6,75 μ M par polarisation de fluorescence pour la palmitoylation et l'interaction YAP-TEAD respectivement. Cependant, des cellules HEK293 traitées par ce composé n'a pas altéré l'expression du gène CTGF.

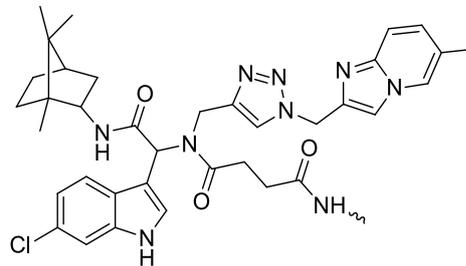


Schéma 8: Structure de l'indole modifié présent sur le peptotide hexT21--A56

Récemment, l'équipe de Post a reporté le premier inhibiteur sélectif de TEAD1 dérivé d'un criblage par test rapporteur luciférase.¹⁰²⁻¹⁰⁴ VT103 (Schéma 9, L) bloque sélectivement l'autopalmitoylation de hTEAD1 à 3 μ M sur cellules HEK293T alors que ses analogues sont actifs sur les quatre TEAD. La mesure du ΔT_m par TSA confirme que VT103 stabilise fortement la protéine hTEAD1 avec un ΔT_m de + 8,3 °C largement plus élevé que pour les autres TEAD. Le site d'interaction de cette famille de molécules a été déterminé grâce à la structure cristallographique de l'analogue le plus soluble VT105 (Schéma 9, M) dans la poche hydrophobe de hTEAD3 (code PDB : 7CNL). Dans des cellules NCI-H2373, VT103 inhibe sélectivement l'autopalmitoylation de hTEAD1 ainsi que l'interaction YAP-hTEAD1 et TAZ-hTEAD1. VT103 a considérablement diminué l'expression des gènes cibles CTGF et CYR61 dans les tumeurs NCI-H226 chez la souris.

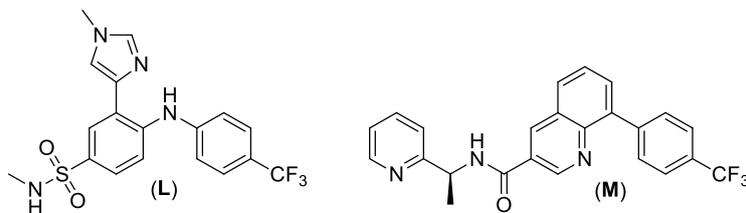


Schéma 9: Structures des composés VT103 et VT105

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

- *Inhibiteurs covalents*

Le groupe de Meroueh a synthétisé le premier inhibiteur covalent en s'inspirant des ligands flufénamiques et en remplaçant la fonction acide par un groupement chlorométhyle cétone (Schéma 10).¹⁰⁵ La liaison covalente de TED-347 avec TEAD a été validée par une structure cristallographique (code PDB : 5E6G) et par spectrométrie de masse. TED-347 a montré une inhibition TEAD4-(FAM-YAP₆₀₋₉₉) de 53% par polarisation de fluorescence, une activité transcriptionnelle réduite à 30% et une nette diminution de l'expression du gène CTGF à 10 μM sur cellules HEK-293. Sur des cellules dérivées de patients GMB43, il inhibe la viabilité cellulaire ainsi que l'expression de CTGF.



Schéma 10: Structure du composé TED-347

MYF-01-37 (Schéma 11) a été développé par l'équipe de Jänne qui s'est également inspirée de la structure cristallographique de l'acide flufénamique en conservant le cycle phényle trifluorométhylé et en remplaçant la fonction acide par une fonction acrylamide.^{106,107} Ce composé diminue l'interaction avec YAP avec une IC_{50} de 0,8 μM sur cellules HEK293T et diminue de plus de 50% l'expression du gène CTGF sur cellules PC-9. La liaison covalente entre ce composé et TEAD a été confirmée par spectrométrie de masse. Cet effet est inexistant lors de la mutation C359S ce qui prouve le rôle de la liaison covalente dans l'inhibition. Combiné à un anticancéreux, MYF-01-37 a également supprimé l'activité de YAP et a augmenté l'apoptose dans des cellules PC-9 et HCC4006.

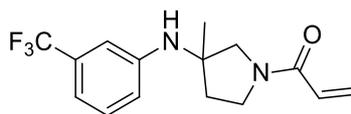


Schéma 11: Structure de MYF-01-37

DC-TEADin02 (Schéma 12), dérivé d'un criblage par docking de 22 000 composés, a été synthétisé par l'équipe de Luo.¹⁰⁸ Ce composé a montré une activité inhibitrice de la palmitoylation de 92% à 800 nM avec une IC_{50} de 197 nM et une atténuation de l'activité transcriptionnelle ainsi que des niveaux des gènes cibles CTGF et CYR61 sur cellules HCT116. La formation d'une liaison covalente a été prouvée par l'observation d'un adduit en spectrométrie de masse et par le ΔT_m de + 7 °C qui chute lors de la mutation de la cystéine en alanine.

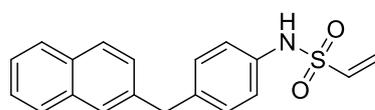


Schéma 12: Structure de DC-TEAD02

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Deux autres inhibiteurs covalents ont été reportés. Le premier, K-975 (Schéma 13), issu d'un criblage par rapporteur CTGF en cellules NCI-H226, a montré une inhibition de la palmitoylation, de l'expression des gènes CTGF et IGFBP3, ainsi qu'une inhibition des interactions YAP-TEAD1/4 et TAZ-TEAD1/4 dans ces mêmes cellules.¹⁰⁹ Le site d'action de cette molécule semble être la poche hydrophobe de TEAD puisqu'une structure cristallographique de ce composé dans hTEAD1 a été obtenue (code PDB : 7CMM). Sur des modèles murins de mésothéliome, l'effet anti-tumoral de la chimiothérapie ou d'anticancéreux a été amélioré en présence de K-975.

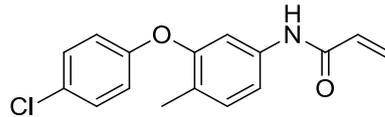


Schéma 13: Structure de K-975

Le deuxième inhibiteur, un dérivé de l'acide kojique appelé composé 19 (Schéma 14), a été développé par Karatas et *al.* en s'inspirant des hits issus d'un criblage virtuel de 14 000 composés.¹¹⁰ Ce composé a montré une IC₅₀ de 0,2 µM de la palmitoylation de TEAD, une IC₅₀ de 70 nM de l'interaction YAP-TEAD4 par polarisation de fluorescence et une réduction de 90% du niveau d'ARNm du gène ANKRD1 en cellules HEK293. La cible de cette molécule a été définie comme étant la poche hydrophobe de TEAD puisqu'en présence de mutants mTEAD4 aucun adduit n'est formé et la RMN HSQC ¹H-¹⁵N a permis de mettre en évidence la proximité du composé 19 avec différents acides aminés de la poche hydrophobe de TEAD4.

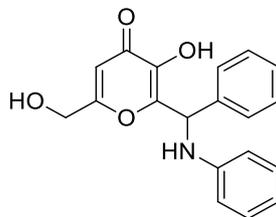


Schéma 14: Structure du composé 19, dérivé de l'acide kojique

Récemment, l'équipe de Luo a publié le premier inhibiteur covalent sélectif de TEAD1 et 3, DC-TEADin1072 et celui uniquement sélectif de TEAD3, DC-TEAD3in03 (**N** et **O**, Schéma 15).¹¹¹ DC-TEADin1072 inhibe la palmitoylation de TEAD1 et 3 avec des IC₅₀ de 0,58 µM et 0,61 µM respectivement. Un ΔT_m de 5 °C en présence de TEAD3 a été mesuré mais ce composé n'a aucun effet sur l'interaction YAP-TEAD. Son analogue DC-TEAD3in03 montre un ΔT_m de plus de 5 °C sur TEAD3 (nul pour les autres TEAD), une IC₅₀ de 0,16 µM sur la palmitoylation de TEAD3 et une IC₅₀ de 1,15 µM sur l'activité transcriptionnelle de TEAD3 qui est vingt fois supérieur pour les autres TEAD. La cible a été validée par docking et par les mutations des différentes cystéines ainsi que de Y230 de TEAD3 ; ce qui diminuent considérablement l'interaction.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

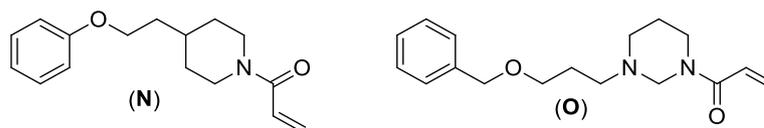


Schéma 15: Structure des composés DC-TEADin1072 et DC-TEAD3in03

- *Activateurs de l'activité transcriptionnelle de TEAD*

En 2019, Pobbati et *al.* ont reporté la première famille d'activateurs de l'interaction YAP/TAZ-TEAD.¹¹² Q2 (Schéma 16, **P**) possède une EC₅₀ de 1,7 μM dans un test Alpha screen TEAD4/palmitate et un K_D de 2,6 μM en présence de TEAD4, montrant son interaction avec la protéine TEAD. Ce composé augmente de manière dose-dépendante l'activité du rapporteur TEAD lors du test luciférase et l'expression des gènes cibles CTGF, CYR61 et ANKRD1 en cellules HEK293. Des modulations de ce hit ont permis d'identifier B22 (Schéma 16, **Q**) et B23 (Schéma 16, **R**) plus efficaces que Q2 sur l'activité du rapporteur TEAD avec des EC₅₀ de 0,89 μM et 1,9 μM. La cicatrisation d'une plaie sur souris a mis 13 jours après traitement par Q2 alors que la plaie mesure encore 2 mm pour le contrôle.

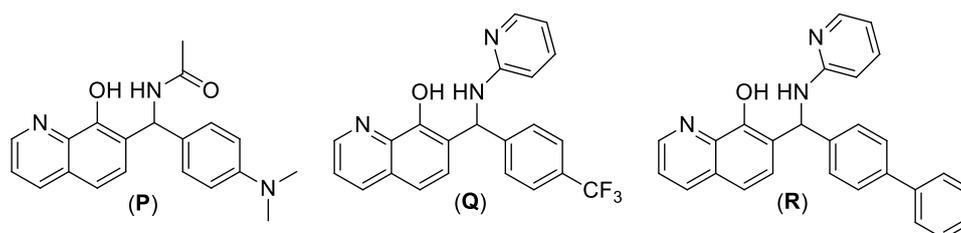


Schéma 16: Structures des composés Q2, B22 et B23 développés par Pobbati et *al.*

V. Travaux préliminaires et objectifs du projet

L'origine de ce projet est la structure cristallographique d'un cristal de TEAD2 trempé dans une solution de 5-benzyloxyindole réalisée par l'équipe du Pr. J-F. Guichou (Figure 15). Au début de mon travail de thèse, les seuls ligands cristallisés avec le domaine C-terminal de TEAD étaient les acides fénamiques.⁹⁵ Les inhibiteurs des interfaces externes étaient validés de manière indirecte ; aucun ligand covalent, aucun inhibiteur sélectif et aucun activateur n'étaient alors connus.

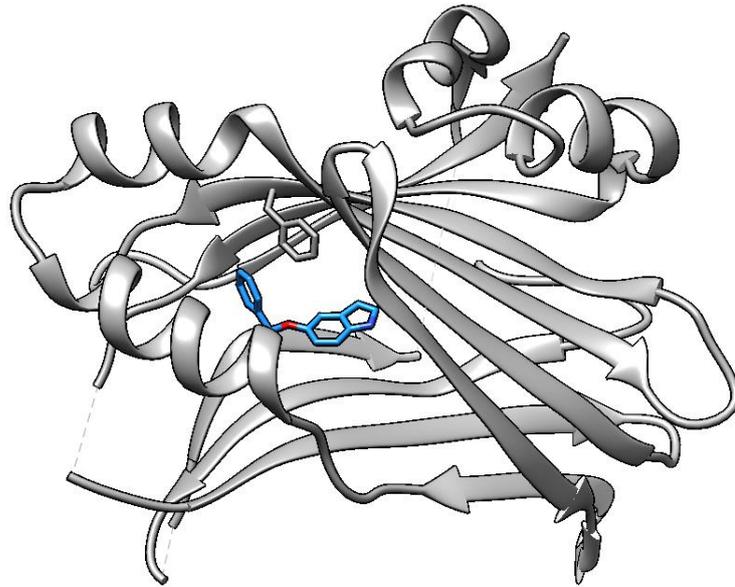


Figure 15: Structure cristallographique du 5-benzyloxyindole

Notre ambition, à l'époque, a été, à partir du 5-benzyloxyindole, d'établir une large chimiothèque visant à occuper la poche interne de TEAD en vue d'accéder à terme à des molécules potentiellement sélectives. La sélectivité *vis-à-vis* d'un ou plusieurs TEAD est un nouvel objectif crucial à la vue du tournant de la médecine vers la thérapie ciblée. Le rôle différent des isoformes de TEAD dans les cancers (surexpression d'un ou deux isoformes de TEAD) et dans les maladies neurodégénératives (TEAD1 le plus exprimé dans les neurones) fait du complexe YAP/TAZ-TEAD une cible privilégiée pour induire une sélectivité.

Nous avons donc entrepris une étude structurale des quatre protéine TEAD afin d'évaluer les différences structurales au niveau de la poche hydrophobe et d'identifier de nouvelles zones au niveau de la partie C-terminale pouvant induire une sélectivité.

Le deuxième objectif a consisté en la synthèse de composés à partir du 5-benzyloxyindole directement inspirés de la superposition de sa structure cristallographique avec d'autres composés cristallisés dans la poche hydrophobe afin de développer des composés les plus affins possible. Pour cela, des relations structure-activité ont été établies grâce au docking, à l'évaluation sur cellules HEK293T transfectées par un système Gal4-TEAD2, au TSA en présence de protéine TEAD2₂₁₇₋₄₄₇ et à des trempages en présence de cristaux de ce même TEAD.

En résumé, à partir de ce fragment, nous développons des ligands de la poche palmitate dont les plus affins pour TEAD pourront ensuite être évalués sur une série d'expériences sur cellules HEK293T transfectées par un système Gal4-TEADx et donner naissance à des ligands sélectifs d'un ou plusieurs TEAD.

**CHAPITRE I : ETUDE STRUCTURALE DES
QUATRE MEMBRE DE LA FAMILLE TEAD ET
MODELISATION MOLECULAIRE**

CHAPITRE I

I. Etude de la poche palmitate

1. Etude de la nature des acides aminés

L'examen des structures cristallographiques des domaines C-terminaux de TEAD montre que la poche accueillant l'acide palmitique est divisée en deux sous-poches (Figure 16 A et B). La sous-poche hydrophobe accueille la chaîne alkyle de l'acide palmitique avec des acides aminés aliphatiques (A, V, I, L et M) et aromatiques (F) (en bleu). La seconde sous-poche est plutôt polaire avec des acides aminés neutres (S, T, Y, C, N et Q) et chargés (K, R, H, D et E) (en jaune). Cette sous-poche présente un espace inoccupé en présence de l'acide palmitique.

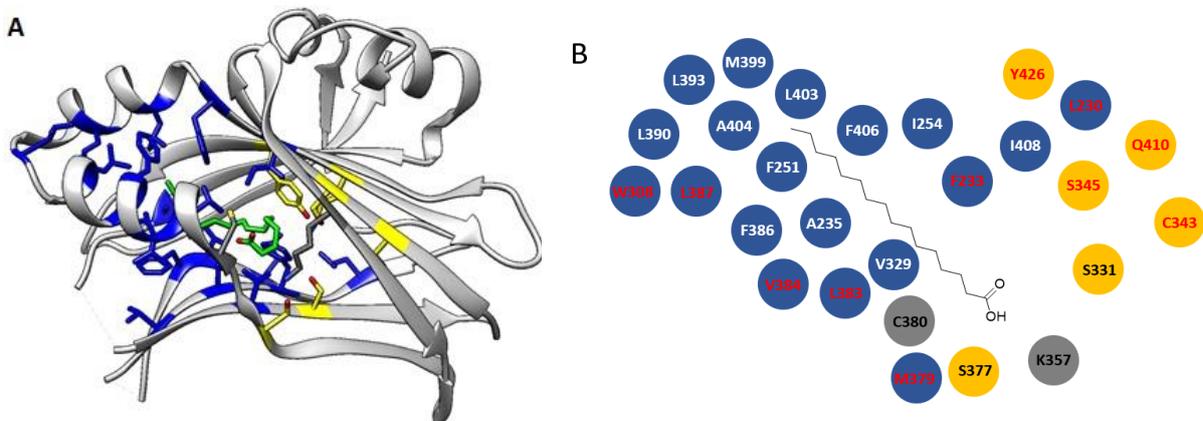


Figure 16: Structure cristallographique de hTEAD2 (code PDB : 5EMV) avec les sous-poches hydrophobe et polaire en bleu et orange respectivement ; l'acide palmitique en violet

2. Alignement de séquences et différences

L'alignement des séquences des domaines C-terminaux des quatre protéines TEAD humaines est exposé dans la Figure 17.

hTEAD1	206	WQGRS	IGTTKLR	L	I	V	E	F	S	A	F	L	E	Q	R	D	P	S	Y	N	K	H	L	F	V	H	I	G	H	N	S	Y	S	D	P	L	E	S	V	D	I	R	Q	T	Y	D	K	F	266												
hTEAD2	218	WQARGL	G	T	A	R	L	Q	L	V	E	F	S	A	F	V	E	P	P	D	A	V	D	S	Y	Q	R	H	L	F	V	H	I	S	Q	H	C	P	S	P	G	A	P	L	E	S	V	D	V	R	Q	T	Y	D	K	F	278				
hTEAD3	215	WQDR	T	I	A	S	S	R	L	R	L	L	E	Y	S	A	F	M	E	V	Q	R	D	P	T	Y	S	K	H	L	F	V	H	I	G	Q	T	N	P	A	F	S	D	P	L	E	A	V	D	V	R	Q	T	Y	D	K	F	275			
hTEAD4	214	WQGRS	V	A	S	S	K	L	W	M	L	E	F	S	A	F	L	E	Q	Q	D	P	D	T	Y	N	K	H	L	F	V	H	I	G	Q	S	S	P	S	Y	S	D	P	L	E	A	V	D	I	R	Q	T	Y	D	K	F	274				
hTEAD1	267	PEKKGGL	K	E	L	F	G	K	G	P	Q	N	A	F	F	L	V	K	F	W	A	D	L	N	C	N	I	Q	-	D	D	A	G	A	-	-	-	-	-	-	-	F	Y	C	V	T	S	Q	Y	E	S	S	E	N	M	318					
hTEAD2	279	PEKKGGL	R	E	L	Y	D	R	G	P	P	H	A	F	F	L	V	K	F	W	A	D	L	N	W	G	P	S	-	G	E	E	A	G	A	G	G	S	I	S	S	G	G	F	Y	C	V	S	S	Q	Y	E	S	L	E	H	M	339			
hTEAD3	276	PEKKGGL	K	E	L	Y	E	K	G	P	N	A	F	F	L	V	K	F	W	A	D	L	N	S	T	I	Q	-	E	G	P	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	F	Y	C	V	S	S	Q	Y	S	S	A	D	S	M	327					
hTEAD4	275	PEKKGGL	K	D	L	F	E	R	G	P	S	N	A	F	F	L	V	K	F	W	A	D	L	N	T	N	I	E	-	D	E	G	S	-	-	-	-	-	-	-	-	F	Y	C	V	S	S	Q	Y	E	S	P	E	N	M	326					
hTEAD1	319	T	V	T	C	S	T	K	V	C	S	F	G	Q	V	V	E	K	V	E	T	E	Y	A	R	F	E	N	G	R	F	V	Y	R	I	N	R	S	P	M	C	E	Y	M	I	N	F	T	H	K	L	K	H	L	P	E	K	Y	M	N	379
hTEAD2	340	T	L	T	C	S	S	K	V	C	S	F	G	Q	V	V	E	K	V	E	T	E	R	A	Q	L	E	D	G	R	F	V	Y	R	L	L	R	S	P	M	C	E	Y	L	V	N	F	T	H	K	L	R	Q	L	P	E	R	Y	M	N	400
hTEAD3	328	T	I	S	V	S	T	K	V	C	S	F	G	Q	V	V	E	K	V	E	T	E	Y	A	R	L	E	N	G	R	F	V	Y	R	I	H	R	S	P	M	C	E	Y	M	I	N	F	T	H	K	L	K	H	L	P	E	K	Y	M	N	388
hTEAD4	327	I	I	T	C	S	T	K	V	C	S	F	G	Q	V	V	E	K	V	E	T	E	Y	A	R	Y	E	N	G	H	Y	S	Y	R	I	H	R	S	P	L	C	E	Y	M	I	N	F	T	H	K	L	K	H	L	P	E	K	Y	M	N	387
hTEAD1	380	S	V	L	E	N	F	T	I	L	L	V	V	T	N	R	D	T	Q	E	T	L	L	C	M	A	C	V	F	F	V	S	N	S	E	H	G	A	C	H	H	I	Y	R	L	V	K	D	426												
hTEAD2	401	S	V	L	E	N	F	T	I	L	L	V	V	T	N	R	D	T	Q	E	L	L	L	C	T	A	Y	V	F	F	V	S	T	S	E	R	G	A	C	H	H	I	Y	R	L	V	R	D	447												
hTEAD3	389	S	V	L	E	N	F	T	I	L	L	V	V	T	S	R	D	S	Q	E	T	L	L	V	I	A	F	V	F	V	S	T	S	E	H	G	A	C	H	H	I	Y	R	L	V	K	D	435													
hTEAD4	388	S	V	L	E	N	F	T	I	L	L	V	V	T	N	R	D	T	Q	E	T	L	L	C	I	A	Y	V	F	F	V	S	A	S	E	H	G	A	C	H	H	I	Y	R	L	V	K	E	434												

Figure 17 : Alignement des séquences des quatre hTEAD

CHAPITRE I

Sur cet alignement, les acides aminés surlignés en vert et en rouge sont impliqués dans les interactions au niveau des interfaces 2 et 3 respectivement. Les acides aminés en bleu foncé correspondent à la sous-poche hydrophobe et ceux en jaune à la sous-poche polaire de la poche interne.

Il apparait que les interfaces 2 et 3 sont hautement conservées alors qu'au niveau des poches internes quelques différences sont observées (Tableau 3).

Tableau 3 : Acides aminés présents dans la poche pouvant induire une sélectivité

Acides aminés dans les TEAD et leurs positions correspondantes			
TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4
L218	L230	L227	M226
F221	F233	Y230	F229
C296	W308	S305	T304
C322	C343	V331	C330
T324	S345	T333	T332
M358	M379	M367	L366
M362	L383	M371	M370
I363	V384	I372	I371
I366	L387	I375	I374
L389	Q410	Q398	Q397
M403	T424	I412	I411
C405	Y426	F414	Y413

Les différences les plus marquantes (en gras dans le Tableau 3) sont pour TEAD3 vs les autres TEAD : une tyrosine vs une phénylalanine en position 233 (position pour TEAD2) et une valine vs une cystéine en position 343. TEAD1 diffère des autres TEAD au niveau de la position 410 par une leucine contre une glutamine pour les autres TEAD. D'autres variations sont visibles : en position 308, les quatre acides aminés sont différents (cystéine vs tryptophane, sérine et thréonine) (en rouge). Enfin, en position 424, il est observé une isoleucine pour TEAD3 et 4, une thréonine pour TEAD2 et une méthionine pour TEAD1 (en rose). En position 426, une cystéine pour TEAD1, une tyrosine pour TEAD2 et 4, ainsi qu'une phénylalanine pour TEAD3 sont à noter (en parme).

CHAPITRE I

D'autres différences moins significatives ont également été constatées comme en position 345 où se trouve une sérine pour TEAD2 contre une thréonine pour les autres TEAD ainsi qu'aux positions 230, 379 et 383 où les méthionines sont remplacées par des leucines sur l'un des membres de la famille TEAD. Le nombre de cystéines dans chacun des membres de la famille TEAD diffère (en jaune, Tableau 3). En comptant la cystéine sur laquelle s'effectue la S-palmitoylation, TEAD1 compte quatre cystéines contre deux pour TEAD2/4 et une seule pour TEAD3. Il apparaît clair que les différences sont suffisantes pour permettre de concevoir des ligands sélectifs au niveau de la poche interne.

3. Formes des poches

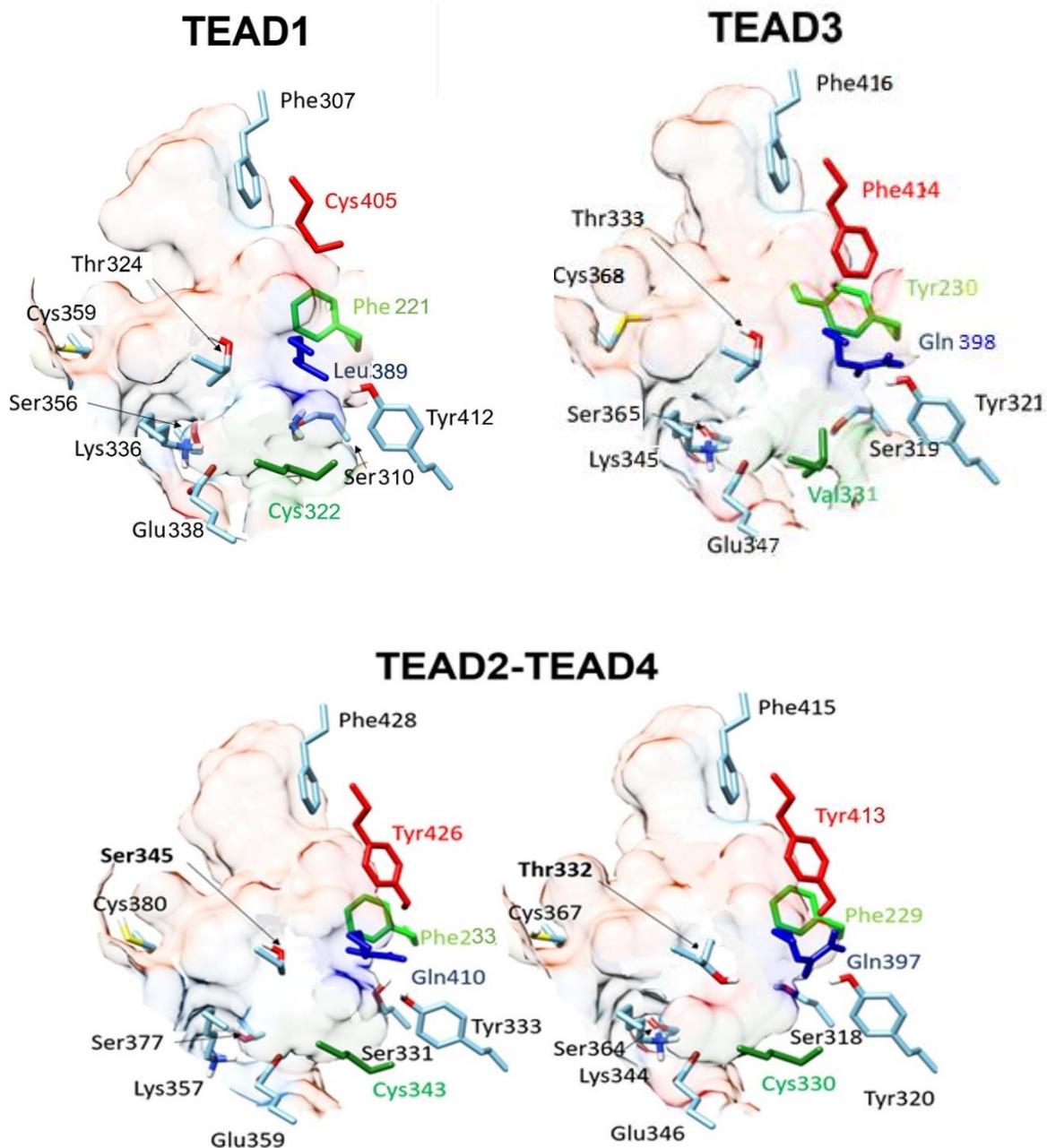


Figure 18: Formes des poches des différents TEAD

CHAPITRE I

La structure tridimensionnelle des poches montre des différences notables (Figure 18). Les poches de hTEAD2, hTEAD3 et hTEAD4 sont beaucoup plus étroites que celle de hTEAD1. Ceci est dû aux différences vu précédemment, comme les acides aminés aromatiques plus volumineux que C405 de TEAD1 (ligne parme du Tableau 3 et Figure 18, en rouge) et les glutamines de hTEAD2, hTEAD3 et hTEAD4 plus encombrées (et polaires) que L389 de hTEAD1 (Figure 18, en bleu). La poche de hTEAD3 semble encore plus restreinte dû à la présence de Y230 (Figure 18, en vert clair).

4. Calcul du volume des poches

Nous avons reporté dans le Tableau 4 le volume des poches internes de l'ensemble des structures cristallographiques publiées. Celles-ci ont été classées en fonction du membre de la famille TEAD et du ligand contenu. Le volume a été mesuré avec le logiciel Discovery Studio.¹¹³

Tableau 4: Volume de la poche palmitate des différentes cristallographies

Entrée	TEAD	Code PDB	Molécule dans la poche interne	Volume de la poche (Å ³)				Moyenne
				A	B	C	D	
1	hTEAD1 ²⁰⁹⁻⁴²⁶	3KYS	Acide palmitique	353	330	/	/	342
2	hTEAD1 ²⁰⁹⁻⁴²⁶	4RE1	Acide palmitique	392	394	/	/	393
3	hTEAD1 ²¹⁰⁻⁴²⁶	6IM5	Acide palmitique	391	379	/	/	386
4	hTEAD1 ²⁰⁸⁻⁴²⁵	6HIL	Acide myristique	361	349	320	320	338
5	hTEAD1 ²¹²⁻⁴²⁶	7CMM	Ligand covalent	364	400	361	422	387
6	hTEAD2 ²¹⁸⁻⁴⁴⁶	5EMV	Acide palmitique	383	374	/	/	379
7	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁵³	5HGU	Acide palmitique	376	408	/	/	392
8	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	3L15	Acide palmitique	464	466	/	/	465
9	hTEAD2 ²²²⁻⁴⁴⁶	/	5-benzyloxyindole	402 [#]	402	/	/	/
10	hTEAD2 ²²²⁻⁴⁴⁶	/	LG191	529	383 [#]	/	/	/
11	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6S66	Acide myristique	333	380	/	/	357
12	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6S60	Acide myristique	394	385	/	/	395
13	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6S6J	Acide myristique	378	378	/	/	378
14	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6S69	Acide myristique	374	378	/	/	376
15	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6S64	Acide myristique	400	423	/	/	412
16	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	5DQ8	Acide flufénamique	556	541	/	/	549
17	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	5DQE	Acide bromofénamique	557	546	/	/	552
18	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6CDY	MGH-CP-1	495	466	/	/	481
19	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6UYB	Pyrrolidin-2-one	455	454	/	/	455
20	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6UYC	Pyridine trisubstituée	383	411	/	/	397
21	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6VAH	Acide niflumique like	439	416	/	/	428
22	hTEAD2 ²¹⁷⁻⁴⁴⁷	6E5G	Ligand covalent	432	401	/	/	417
23	hTEAD3 ²¹⁹⁻⁴³⁵	5EMW	Acide palmitique	329	341	318	343	333
24	hTEAD3 ²¹⁹⁻⁴³⁵	7CNL	Quinoléine	322 [#]	355	326 [#]	346	/

CHAPITRE I

25	hTEAD4 ²¹⁷⁻⁴³⁴	5O AQ	Acide myristique	307	/	/	/	307
26	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴	6GE3	Acide myristique	319	/	/	/	319
27	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (E ²⁶³ A)	6GE4	Acide myristique	356	/	/	/	356
28	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (Y ⁴²⁹ F)	6GE5	Acide myristique	309	/	/	/	309
29	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (E ²⁶³ A, Y ⁴²⁹ F)	6GE6	Acide myristique	337	/	/	/	337
30	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴	6GEC	Acide myristique	293	/	/	/	293
31	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (E ²⁶³ A)	6GEE	Acide myristique	301	/	/	/	301
32	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (Y ⁴²⁹ F)	6GEG	Acide myristique	303	/	/	/	303
33	TEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (E ²⁶³ A, Y ⁴²⁹ F)	6GEI	Acide myristique	310	/	/	/	310
34	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴ (Y ⁴²⁹ F)	6GEK	Acide myristique	314	313	/	/	314
35	hTEAD4 ²¹⁶⁻⁴³⁴	6HIK	Acide myristique	357	/	/	/	357
36	hTEAD4 ²¹⁷⁻⁴³⁴	6Q36	Acide myristique	381	436	/	/	409
37	hTEAD4 ²¹⁷⁻⁴³⁴	6Q2X	Acide myristique	310	/	/	/	310
38	hTEAD4 ²¹⁷⁻⁴³⁴	6SEN	Acide myristique	349	290	/	/	320
39	hTEAD4 ²¹⁷⁻⁴³⁴	6SEO	Acide myristique	315	/	/	/	315
40	hTEAD4 ²⁰⁹⁻⁴²⁷	6L9F	Acide myristique	362	463	/	/	413
41	mTEAD4 ²¹⁰⁻⁴²⁷	5GN0	Acide myristique	520	519	444	475	490
42	mTEAD4 ²¹⁰⁻⁴²⁷	3JUA	Acide myristique	409	388	406	483	422
43	mTEAD4 ²⁰⁹⁻⁴²⁷	4LN0	Acide myristique	376	396	/	/	386
44	mTEAD4 ²¹⁰⁻⁴²⁷	5XJD	Acide myristique	478	516	/	/	497
45	mTEAD4 ²⁰⁹⁻⁴²⁷	6SBA	Acide myristique	362	/	/	/	362
46	mTEAD4 ²¹⁰⁻⁴²⁷	5Z2Q	Acide myristique	337	330	/	/	334
47	Sd ²²²⁻⁴⁴⁰	6Y20	Acide myristique	356	351	/	/	334

**Initialement absent sur la structure cristallographique mais la densité attribuée à de petites molécules semble mieux correspondre à l'acide palmitique²⁰*

Les résultats du Tableau 4 sont illustrés par un graphique afin d'être plus facilement comparés (Figure 19). Ces boxplots représentent la médiane des valeurs (en rouge) entourée par le premier et le troisième quartile (qui représentent une boîte autour de la médiane) et des valeurs minimales et maximales (traits noirs).

CHAPITRE I

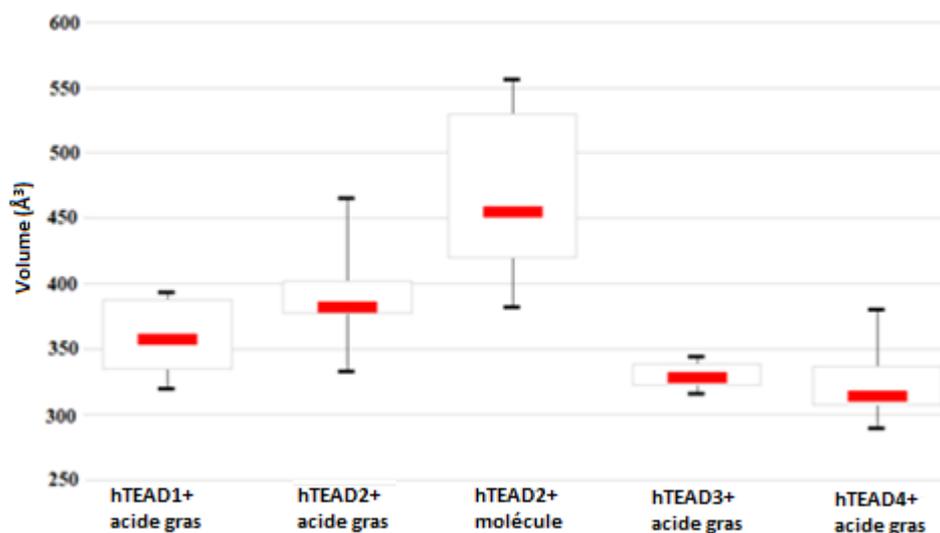


Figure 19: Box-plot représentant le volume de la poche interne de hTEAD1-4 en fonction de la molécule contenue

Les données montrent qu'en présence d'un acide gras, la poche présente un volume compris entre 293 et 466 Å³. La poche de hTEAD4 est plus petite que hTEAD1 et hTEAD2 (médiane de 313 Å³ contre 357 et 352 Å³). La poche de hTEAD2 semble très impactée par la présence d'un ligand avec des volumes pouvant atteindre 557 Å³ (entrée 17 du Tableau 4). Ces valeurs montrent que la poche est flexible et qu'elle paraît s'adapter à des ligands plus volumineux que l'acide palmitique.

II. A la recherche d'autres différences structurales entre les différents TEAD

1. Alignement de séquences

Afin de trouver d'autres zones pouvant amener une sélectivité entre les quatre protéines TEAD, l'alignement de séquence précédent correspondant à la partie C-terminale a été réexaminé (Figure 17).

Une première boucle (appelée boucle A) a retenu notre attention ; elle se situe entre les acides aminés 255 et 266 (avec la numérotation de hTEAD2). La longueur de chaîne est conservée mais la nature des acides aminés qui la compose varie (Figure 17, en rose). Seules P264 et L266 (numérotation de TEAD2, en kaki) sont conservées.

L'autre boucle (appelée boucle B) située entre les acides aminés 306 et 326 montre d'énormes différences. TEAD2 compte 9 acides aminés de plus que les autres TEAD (Figure 17, en bleu clair). En plus de ce gap, des différences d'acides aminés notables sont observées (en violet).

CHAPITRE I

2. Etude des boucles A et B

Seule une structure cristallographique de hTEAD3 et quelques structures de mTEAD4 ont ces boucles entièrement résolues (codes PDB : 7CNL, 5GN0, 3JUA et 5Z2Q). Certaines structures de hTEAD4 (codes PDB : 6HIK, 6GE6, 6GEI, 6L9F, 6Q36 et 6SEN) et mTEAD4 (code PDB : 4LN0) possèdent uniquement la boucle A résolue. La présence d'un ion phosphate (PO_4^{3-}) induisant une conformation commune à la boucle est observée au niveau des structures humaines 6GE6, 6GEI et 6HIK. Cet ion est complexé par deux résidus histidine et deux résidus sérine. Quant aux autres structures de TEAD4 (4LN0, 6Q36, 6L9F, 3JUA, 5GN0 et 5Z2Q), elles présentent une boucle structurellement très disparate.

La boucle B est complète sur plusieurs structures de hTEAD1 (codes PDB : 3KYS, 6IM5 et 7CMM), de hTEAD3 (code PDB : 5EMW) et mTEAD4 (codes PDB : 5XJD et 6SBA). Comme attendu, aucune structure de TEAD2 n'est résolue dû à la taille plus importante de la boucle qui la rend trop flexible pour être cristallisée.

Très récemment, les quatre membres de la famille TEAD ont été modélisés et sont disponibles sur la plateforme Alphafold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Ces quatre modélisations montrent une parfaite superposition de la boucle B (sauf pour TEAD2) et de la boucle A (contrairement à ce qui est observé dans les structures cristallographiques) (Figure 20).

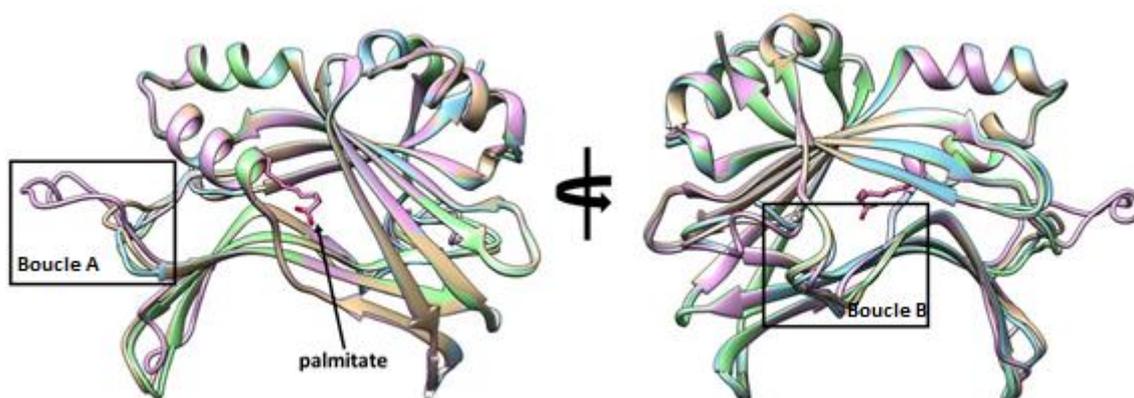


Figure 20: Superposition des modèles d'Alphafold des domaines C-terminal de hTEADx (hTEAD1 (marron), hTEAD2 (rose), hTEAD3 (vert clair) and hTEAD4 (bleu ciel). A gauche : vue de l'entrée de la poche interne, à droite : vue opposée

III. Construction de modèles des 4 TEAD et validation

1. Construction des modèles avec une poche hydrophobe plus grande

Le docking réalisé sur des unités de TEAD contenant un acide gras peut souvent être un échec dû à la faible taille de la poche contrairement aux unités ayant contenues des ligands. Au début de ma thèse, seules les structures de hTEAD2 avec des acides flufénamiques étaient connues (code PDB : 5DQ8 et 5DQE). Le volume de la poche interne de ces molécules permet le docking de molécules

CHAPITRE I

volumineuses (environ 550 \AA^3) alors que le volume de la poche interne renfermant l'acide palmitique n'est que de 380 \AA^3 environ (code PDB : 5EMV). Ainsi en vue de docker des molécules susceptibles de s'insérer dans la poche interne d'un membre de la famille TEAD, nous avons construit des modèles de hTEAD1, hTEAD3 et hTEAD4. Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe avec le Dr. Maxime Liberelle.

Les structures hTEAD1, hTEAD3 et hTEAD4 ont été modélisées avec le programme Modeller en utilisant la structure cristalline 5DQE de hTEAD2 comme « template ». Les résidus manquants dans le modèle ont été affinés à l'aide de la méthode d'optimisation de boucles dans Modeller. Nous avons ainsi obtenu trois modèles (TEADx_GP) où les volumes des poches internes ont été agrandis (568 \AA^3 pour hTEAD1, 506 \AA^3 pour hTEAD3 et 496 \AA^3 pour hTEAD4, mesurés à l'aide du logiciel Discovery Studio).

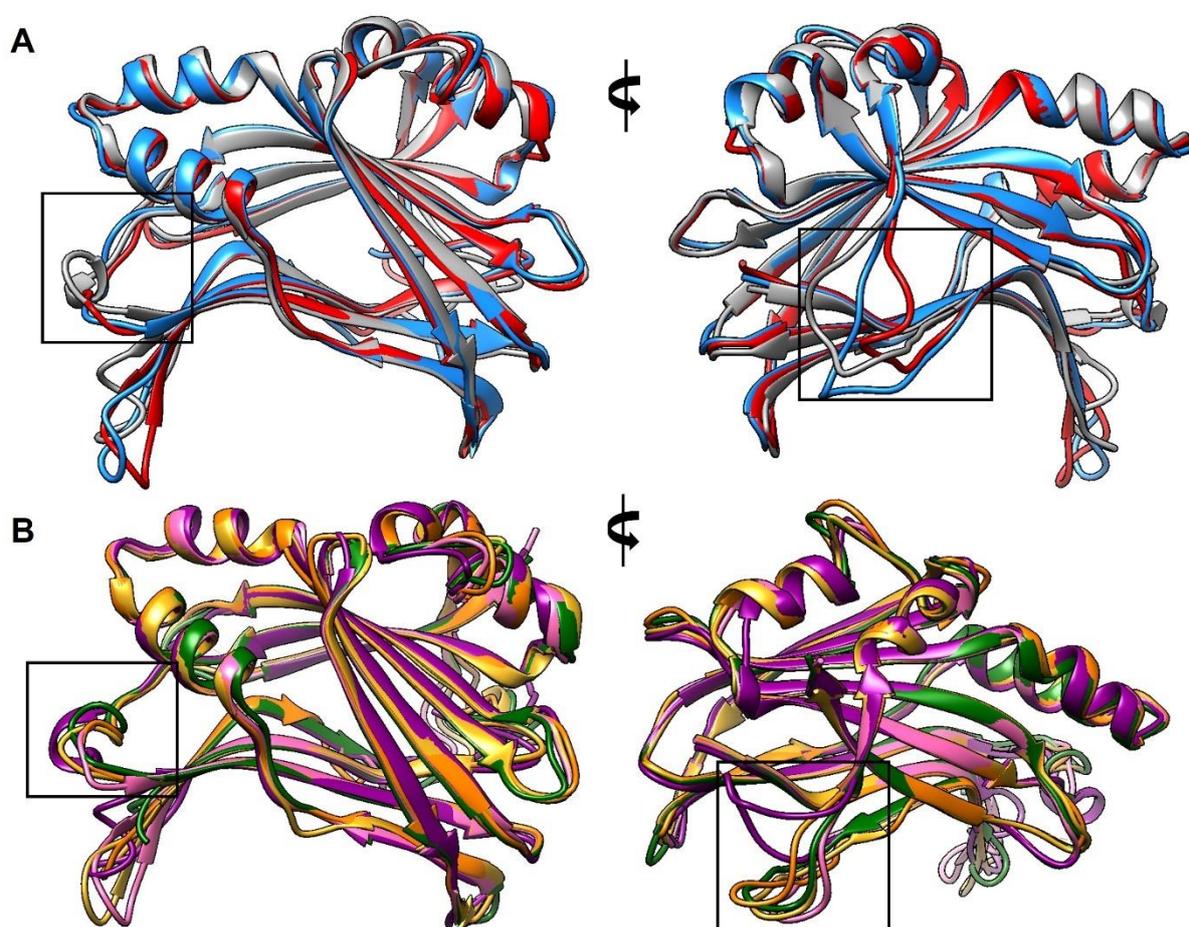


Figure 21: Superposition des modèles TEAD3_GP et TEAD4_GP et des structures où le domaine C-terminal est entièrement résolu (A) Modèle TEAD3_GP (en gris), modèle TEAD3 AlphaFold (en rouge) et structure de hTEAD3 (code PDB : 7CNL, en bleu) ; vue vers l'entrée de la poche interne et vue opposée (B) Modèle TEAD4_GP (en violet), modèle TEAD4 AlphaFold (en rose) et structures de mTEAD4 (codes PDB : 5GNO, 5Z2Q et 3JUA, en jaune, vert et orange) ; vue vers l'entrée de la poche interne et vue opposée

Une structure de hTEAD2 a également été modélisée (TEAD2_GP) pour assurer la présence des boucles A et B.

CHAPITRE I

Les superpositions des autres modèles obtenus (TEAD1_GP, TEAD3_GP et TEAD4_GP) avec les modèles d'Alphafold ainsi qu'avec les structures cristallographiques disponibles dans la littérature montrent une bonne superposition de la boucle B. Les boucles A sont totalement disparates au niveau de TEAD3 et notre modèle TEAD4_GP est plus éloigné des structures cristallographiques que celui d'Alphafold (Figure 21 **A** et **B**).

Les modèles TEADx_GP ont donc été considérés comme utilisables pour le docking de molécules ciblant la poche palmitate mais la validité de ces modèles au niveau des boucles flexibles (surtout la boucle A) est incertaine. Les modélisations d'Alphafold donnent pour cette zone un indice de confiance inférieur à 50%.

2. Docking des seuls ligands sélectifs de la littérature

Les modèles TEADx_GP ont été utilisés pour le docking de VT103 sélectif de TEAD1 et de DC-TEAD3in03 sélectif de TEAD3.^{102,111}

Pour rappel, VT103 est un analogue optimisé d'un hit développé par Vivace Therapeutics qui a été sélectionné par criblage à haut débit. La sélectivité de VT103 pour TEAD1 a été évaluée par un test de palmitoylation sur cellules HEK293T et par TSA où il a montré un effet stabilisant sur TEAD1 avec 8,3 °C de ΔT_m . La perturbation de l'interaction YAP/TAZ-TEAD menée dans des cellules NCI-H2373 mutantes *NF2* sur TEAD1 et TEAD4 a également montré que VT103 réduisait sélectivement l'interaction YAP-TEAD1 après 4 et 24 h et TAZ-TEAD1 après 4 h.

DC-TEAD3in03 est un analogue optimisé d'un hit issu d'un criblage. La sélectivité de DC-TEAD3in03 pour TEAD3 a été évaluée par un test de palmitoylation *in vitro*, un test gène rapporteur luciférase sur cellules HEK293T ainsi que par DSF où un ΔT_m de plus de 5 °C a été mesuré.

Ces molécules ont été dockées trois fois dans chaque modèle. Pour cela, le logiciel Chimera1.15 avec l'outil AutodockVina ont été utilisés. Les résultats sont reportés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Résultats de docking obtenus avec les molécules sélectives de TEAD1 et 3

Molécule	TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4
VT103	-8,7/Poche interne	-7,0/Sous-interface3	-6,8/Sous-interface3	-7,4/Interface3
DC-TEAD3in03	-7,5/Poche interne	-7,5/Poche interne	-7,6/Poche interne	-7,6/Poche interne

Les résultats montrent que VT103 s'insère bien dans la poche interne de hTEAD1 avec un très bon score de -8,7 pour la meilleure pose (Figure 22) alors que cette molécule est placée près de la boucle B pour les TEAD2 et 3 et au niveau de l'interface 3 pour TEAD4.

CHAPITRE I

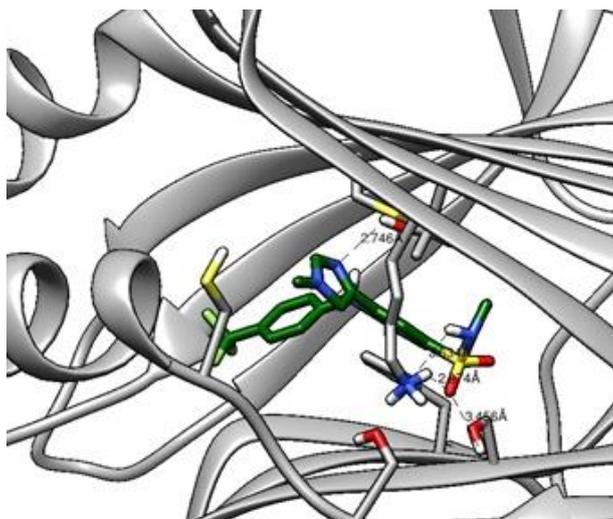


Figure 22: Docking du composé VT103 dans hTEAD1_GP

Le docking permet d'observer une proximité entre la fonction sulfonamide de VT103 et K336 et S310 de TEAD1 ainsi qu'entre le cycle pyrazole et T324. La sélectivité pourrait être induite par la forme de la poche qui est plus large pour TEAD1 que pour les autres TEAD. La superposition de la meilleure pose de docking dans TEAD1_GP et TEAD2, 3 et 4_GP montrent des clashes entre cette pose et Y230 de hTEAD3, F426 et F413 de hTEAD2 et hTEAD4 qui rendent la cavité beaucoup plus étroite.

Pour DC-TEAD3in03, le docking montre une non-sélectivité puisque le ligand s'insère dans la poche palmitate des quatre TEAD avec des scores de -7,5 et -7,6. La disparité des résultats peut être due à la non-considération de la réactivité de la liaison acrylamide par le logiciel de docking. Les auteurs, eux, ont fait du docking covalent et expliquent leurs résultats par des clashes entre leurs poses et les L383 et L366 de TEAD2 et TEAD4 et par la formation d'une liaison hydrogène avec Y230 de TEAD3 qui favoriserait la liaison du ligand dans TEAD3. La pose de docking dans la poche de hTEAD3 montre des rapprochements entre le cycle hexahydropyrimidine et Y230, S319, T333, et C368 de hTEAD3 (Figure 23).

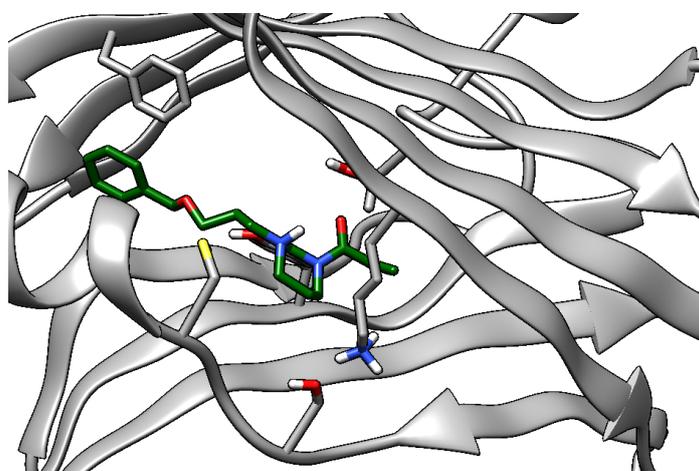


Figure 23: Docking de DC-TEAD3in03 dans hTEAD3

**CHAPITRE II : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DES
DÉRIVÉS DU 5-BENZYLOXYINDOLE**

CHAPITRE II

I. Conception, synthèse et caractérisation des dérivés du 5-benzyloxyindole

1. Conception des 5-aryloxy- et 5-alkyloxy-indoles

Sur la structure cristallographique du 5-benzyloxyindole, il apparaît que le motif benzyle occupe la partie hydrophobe de la poche palmitate. Il est proche de F428 de hTEAD2 alors que l'hétérocycle indolique est orienté vers la sous-unité hydrophile (Figure 24).

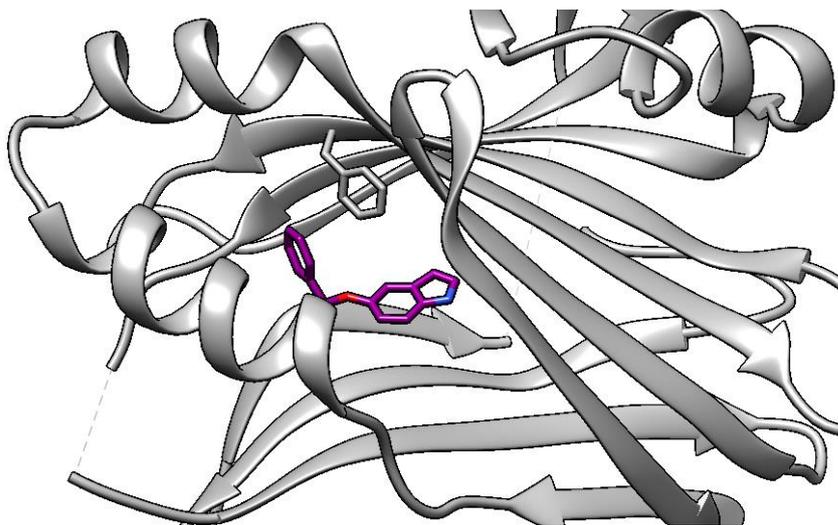


Figure 24: Positionnement de la fonction benzyle du 5-benzyloxyindole de hTEAD2

Afin de « sonder » la profondeur de la partie hydrophobe de la poche palmitate, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'importance de la fonction benzyle dans l'interaction entre le ligand et la protéine. Pour ce faire, celui-ci a été remplacé par différents groupements alkyles et arylalkyles.

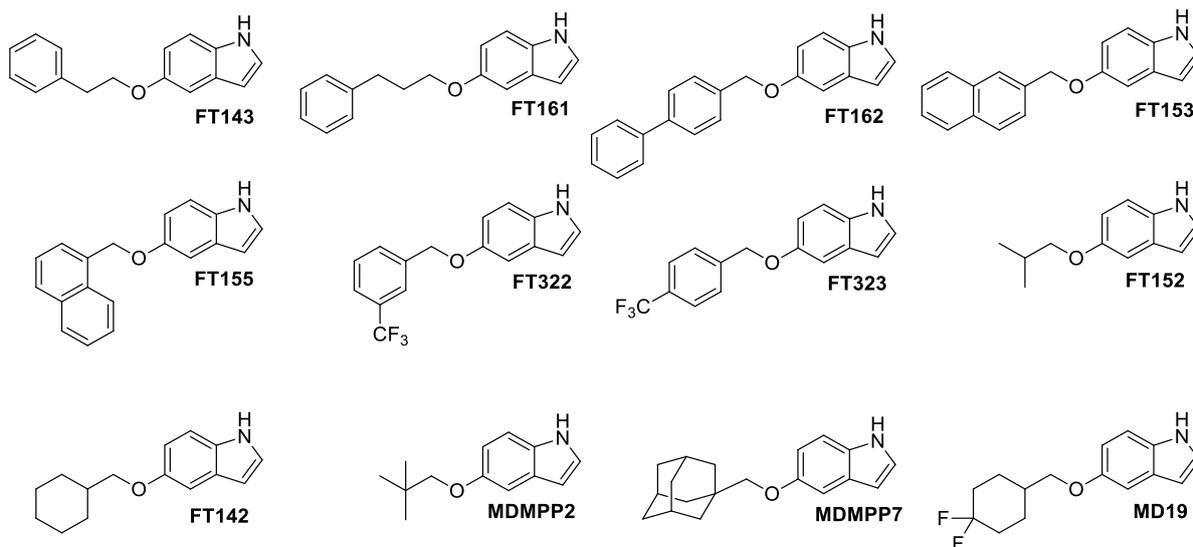


Schéma 17: Dérivés du 5-benzyloxyindole synthétisés

CHAPITRE II

Nous nous sommes alors appliqués à la synthèse des douze composés présentés ci-dessus (Schéma 17). Les motifs adamantyle (**MDMPP7**) et 4,4-difluorocyclohexyle (**MD19**) sont directement inspirés de travaux publiés par X. Wu et C. Cunningham.⁹⁷⁻⁹⁹ Le motif naphthyle (**FT153**) est, lui, inspiré des travaux de l'équipe de C. Luo¹⁰⁸ et les (trifluorométhyl)benzènes (**FT322** et **FT323**) de l'acide flufénamique,⁹⁵ de TED-347,¹⁰⁵ de VT103 - VT105,¹⁰² de MYF-01-37¹⁰⁶ et de B22.¹¹²

2. Synthèses des 5-aryloxy- et 5-alkyloxy-indoles

Les 5-aryloxy et 5-alkoxyindoles ont été synthétisés par deux méthodes classiques : une substitution nucléophile sur un dérivé halogéné en présence de carbonate de potassium dans le DMF à 80°C (Méthode A) et une réaction de Mitsunobu (Méthode B) (Schéma 18). Les résultats obtenus sont détaillés dans le Tableau 6.

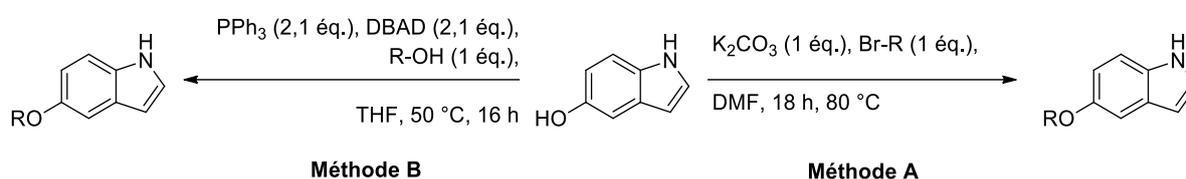


Schéma 18: Méthodes de synthèse des molécules dérivées du 5-benzyloxyindole

Tableau 6: Rendements obtenus avec les deux méthodes pour la synthèse des produits dérivés du 5-benzyloxyindole

Nom de molécule	Rendement Méthode A (%)	Rendement Méthode B (%)
FT143	90	42
FT161	92	39
FT162	96	35
FT153	88	46
FT155	85	41
FT142	63	72
FT152	58	77
FT322	72	/
FT323	75	/
MDMPP2	0	0
MDMPP7	0	0
MD19	50*	/

*réaction réalisée sous atmosphère inerte

Les éthers possédant un motif aromatique (**FT143**, **FT153**, **FT155**, **FT161**, **FT162**, **FT322** et **FT323**) (en vert) sont facilement obtenus par la méthode A. Les éthers avec un motif aliphatique peu encombré (carbone bêta secondaire) (**FT142**, **FT152** et **MD19**) donnent des rendements plus faibles selon la méthode A, un peu améliorés par réaction de Mitsunobu (en orange). Enfin, pour les composés

CHAPITRE II

possédant un groupement *tert*-butyle (**MDMPP2**) et adamantyle (**MDMPP7**), aucune des deux méthodes ne permet l'obtention des produits souhaités. Ceci est probablement dû à l'encombrement stérique de ces groupements. Ces deux composés ont finalement été obtenus avec des rendements très modestes en travaillant à reflux dans la N-méthyl-2-pyrrolidone en présence de carbonate de césium et d'iodure de sodium (Schéma 19 et Tableau 7).

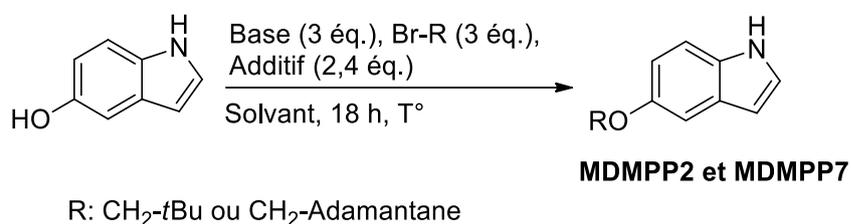


Schéma 19: Schéma général de la synthèse des produits **MDMPP2** et **MDMPP7**

Tableau 7: Conditions testées pour l'obtention des produits **MDMPP2** et **MDMPP7**

Entrée	Base (3 éq.)	R	Solvant	T° (°C)	Additif (2,4 éq.)	Rendement (%)
1	K ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	DMF	153	/	0
2	K ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	DMF	153	NaI	0
3	Cs ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	DMF	153	/	0
4*	K ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	/	153	/	0
5	K ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	NMP	202	/	Traces
6	Cs ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	NMP	202	/	Traces
7	K ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	NMP	202	NaI	<5
8	Cs ₂ CO ₃	CH ₂ - <i>t</i> Bu	NMP	202	NaI	9
9	Cs ₂ CO ₃	CH ₂ -Adamantyle	NMP	202	NaI	17

*réaction effectuée en ballon et en tube scellé

Les spectres ¹³C et ¹⁹F du composé **MD19** ont été analysés en détail. Les deux atomes de fluor n'étant pas équivalents (Schéma 20), les constantes de couplage des carbones 4' (²J_{C-Féq} = 25,2 Hz, ²J_{C-Fax} = 22,5 Hz) et 5' (¹J_{C-Féq} = 241,6 Hz, ¹J_{C-Fax} = 239,8 Hz) sont observées sur le spectre RMN ¹³C. Les carbones 1', 2' et 3' ne sont couplés qu'avec l'atome de fluor équatorial avec des constantes ⁵J_{C-Féq} = 2,7 Hz, ⁴J_{C-Féq} = 1,2 Hz et ³J_{C-Féq} = 9,6 Hz.

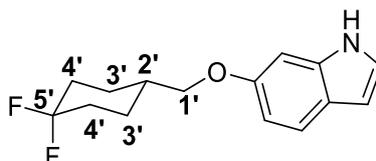


Schéma 20: Structure du **MD19** avec le groupement cyclohexyle en conformation chaise

CHAPITRE II

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont en accord avec la littérature à l'exception de la constante entre le fluor en équatoriale et le carbone **2'** pour le 4-méthyl-1,1-difluorocyclohexane qui est décrite à 0 Hz et que nous observons à 1,2 Hz.¹¹⁴

Le spectre ^{19}F non découplé du proton présente des déplacements chimiques à -91,8 (Fluor équatorial) et -102,3 ppm (Fluor axial). Les constantes de couplage mesurées sont $^1J_{\text{F-F}} = 235,3$ Hz, $^2J_{\text{ax-ax}} = 33,2$ Hz et $^2J_{\text{ax-éq}} = 9,2$ Hz (Figure 25).

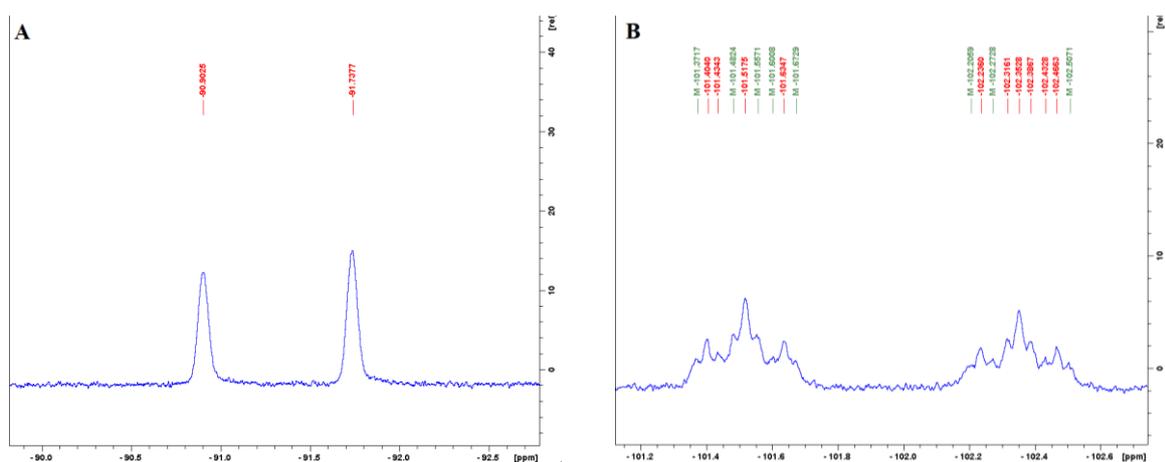


Figure 25: Massif observé pour chacun des fluors : A) le fluor équatorial sous forme de doublet et B) le fluor axial sous forme de doublet détriplé détriplé

II. Evaluation des composés

1. Effet des composés sur la température de dénaturation de hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇

Dans le but d'estimer leur capacité à se lier à TEAD, nos molécules et les 4-, 5- et 6-benzyloxyindoles commerciaux ont été évalués par Thermal Shift Assay (TSA). Cette technique permet de mesurer la température de dénaturation d'une protéine dans des conditions variables (comme en présence d'un ligand) et nécessite l'utilisation d'une molécule fluorescente : le SYPRO Orange. La nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF) n'a pas pu être utilisée ici car celle-ci se sert de la fluorescence intrinsèque du tryptophane ou de la tyrosine qui aurait été biaisée par nos molécules indoliques. Les mesures ont été réalisées au CBS de Montpellier par l'équipe du Pr. J-F. Guichou à une concentration de 500 μM en duplicat sur hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇.

Sur une courbe de nanoDSF, il est possible d'observer une ou deux températures de dénaturation T_m distinctes pour hTEAD2 dues à la présence ou non de l'acide gras.²¹ Sur la courbe contrôle (DMSO), la T_{m1} située à 51,3 °C correspond à la température de dénaturation de hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ non acylé alors que la T_{m2} à 59,3 °C correspond à la T_m de hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ acylé. Il avait été montré que l'obtention d'une seule température de dénaturation en présence d'un ligand montre une interaction au niveau de la poche interne ; la T_m de TEAD non-acylé disparaît et laisse place à la T_m de

CHAPITRE II

la protéine occupée par celle-ci (Figure 26 A). Si la molécule interagit au niveau des interfaces externes, deux températures de dénaturation sont observées (Figure 26 B).

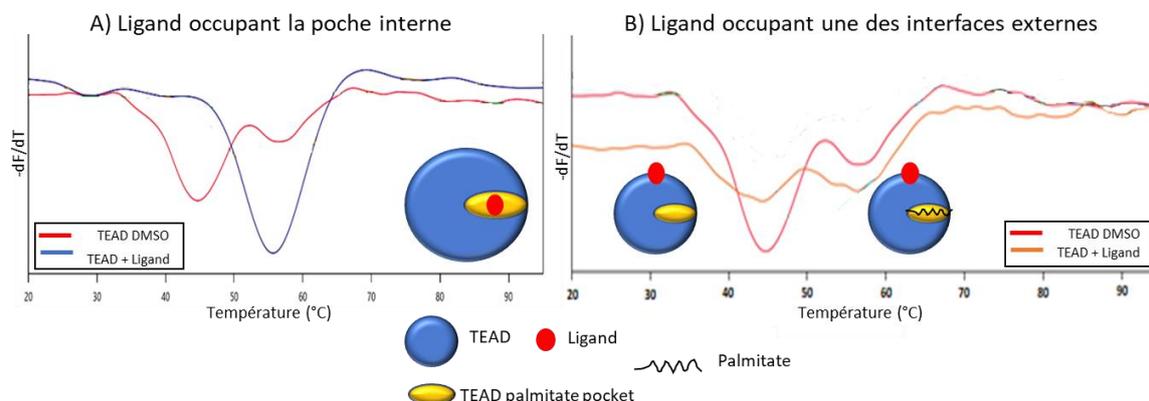


Figure 26: Profil des courbes de nanoDSF en fonction du site d'interaction ligand-TEAD

Les courbes obtenues en TSA sont plus difficiles à interpréter notamment au niveau du T_{m2} qui apparaît comme un épaulement parfois non mesurable. Ici, les ΔT_m correspondent à l'écart entre les T_m de la courbe contrôle (DMSO) et celles des composés (Figure 27 et Tableau 8). Par ailleurs, certains résultats non reproductibles (FT142, FT152, FT161, FT162 et MD19) ne permettent pas d'observer un effet sur la stabilité de TEAD.

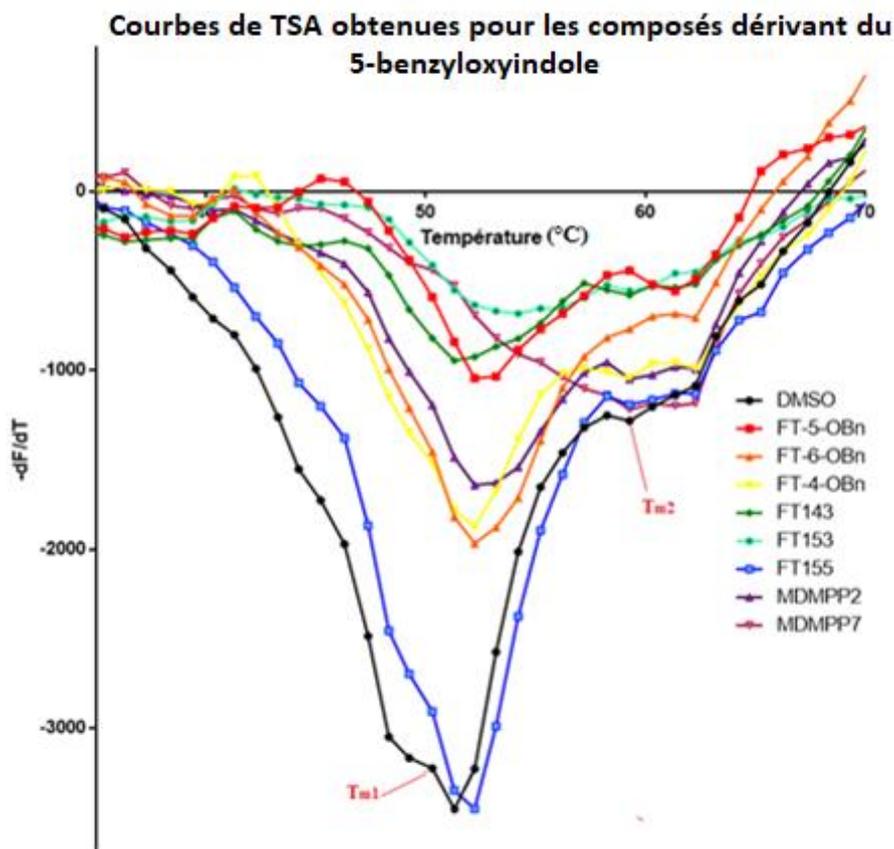
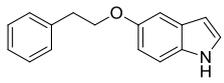
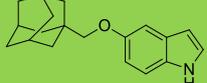
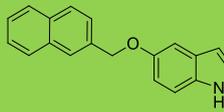
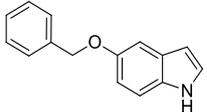
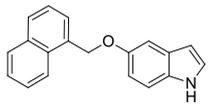
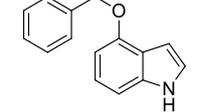
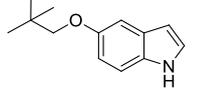
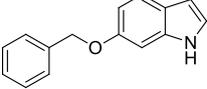


Figure 27: Courbes de TSA obtenues pour les composés dérivés du 5-benzyloxyindole

CHAPITRE II

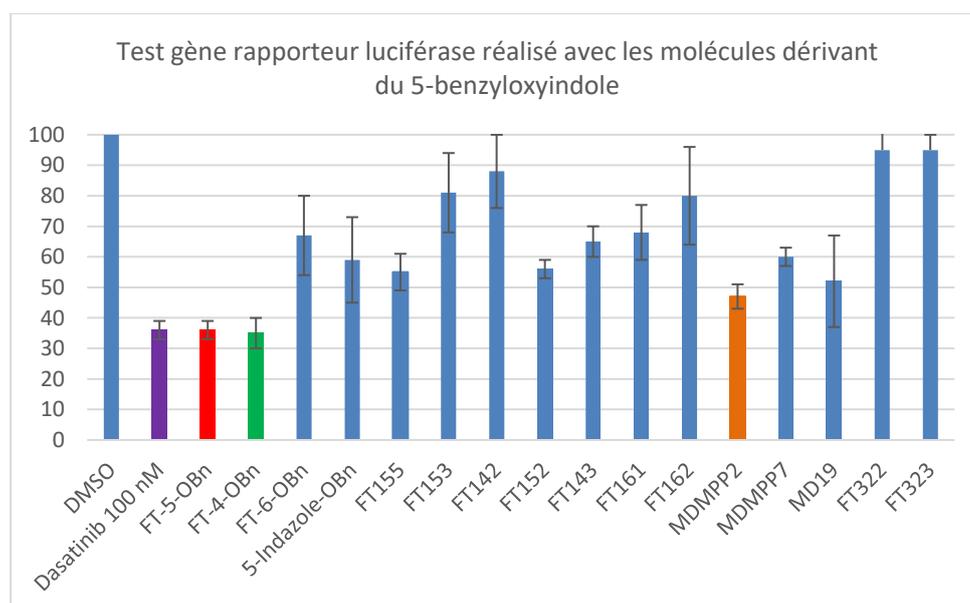
Tableau 8: Résultats de TSA des molécules dérivées du 5-benzyloxyindole

Nom	Structure	ΔT_{m1} (°C)	ΔT_{m2} (°C)	Nom	Structure	ΔT_{m1} (°C)	ΔT_{m2} (°C)
FT143		2,0	2,8	MDMPP7		/	3,0
FT153		1,1	/	5-benzyloxyindole		2,9	3,0
FT155		1,8	2,3	4-benzyloxyindole		1,9	1,5
MDMPP2		2,9	1,7	6-benzyloxyindole		1,9	1,2

Seules **FT153** et **MDMPP7** (en vert) ne semblent posséder qu'une seule température de dénaturation. Cependant, aucune des modifications effectuées ne fait perdre l'interaction avec hTEAD2. Des décalages thermiques (ΔT_m) de +1,1 °C pour **FT153** à +3 °C pour **MDMPP7** sont mesurés par rapport au hTEAD2 contrôle.

2. Evaluation cellulaire

Les molécules synthétisées et les benzyloxyindoles commerciaux ont été testés à une concentration de 10 μ M sur cellules HEK293T transfectées par le plasmide TEAD-luc reporter 8XGTIIc-luciférase. Les mesures ont été réalisées en triplicat biologique (3 cultures cellulaires différentes) et en triplicat sur chaque culture cellulaire en prenant comme référence le Dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, utilisé comme anticancéreux et ayant montré une activité inhibitrice sur l'expression de YAP.¹¹⁵ Les résultats cellulaires sont exposés dans la Figure 28.



CHAPITRE II

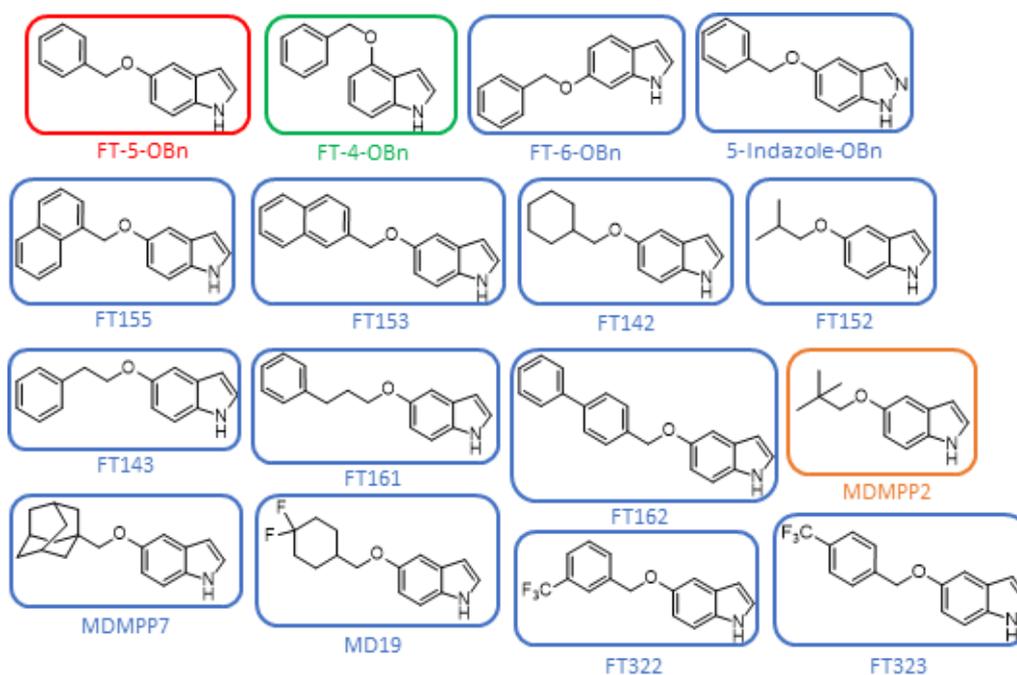


Figure 28: Résultats du test gène rapporteur luciférase réalisé sur les molécules dérivant du 5-benzyloxyindole

L'évaluation biologique a permis de mettre en évidence que le 5-benzyloxyindole, est l'un des composés les plus actifs avec 36% d'activité transcriptionnelle en moyenne (en rouge). Le 4-benzyloxyindole montre une activité similaire avec 35% d'activité transcriptionnelle moyenne (en vert). Le composé *tert*-butyle (**MDMPP2**) présente également une activité intéressante puisque l'activité transcriptionnelle de TEAD chute à 46% (en orange). Cependant, le déplacement de la fonction benzyle en position 6 (**FT-6-OBn**) ou l'allongement de la chaîne carbonée (**FT143** et **FT161**) fait perdre l'activité, de même pour la perte d'aromaticité (**FT142** et **MD19**) ou le greffage de groupements trop imposants (**FT153**, **FT155**, **FT162** et **MDMPP7**).

Ce chapitre a permis de mettre en évidence que le 5-benzyloxyindole est le composé le plus actif suivi de près par le 4-benzyloxyindole.

**CHAPITRE III : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET
ÉVALUATION DES MOLECULES DERIVEES DE LA
SUPERPOSITION DU 5-BENZYLOXYINDOLE ET DE
L'ACIDE PALMITIQUE**

CHAPITRE III

I. Conception, synthèse et caractérisation des molécules fonctionnalisées en position 1 et 3 par des chaînes alkyles

1. Conception des molécules « acide palmitique-like »

La sous-poche hydrophile n'étant pas impliquée dans les interactions du 5-benzyloxyindole à l'intérieur de la poche interne, notre première stratégie a été de concevoir des molécules en se basant sur la superposition du fragment 5-benzyloxyindole et du ligand naturel l'acide palmitique (Figure 29).

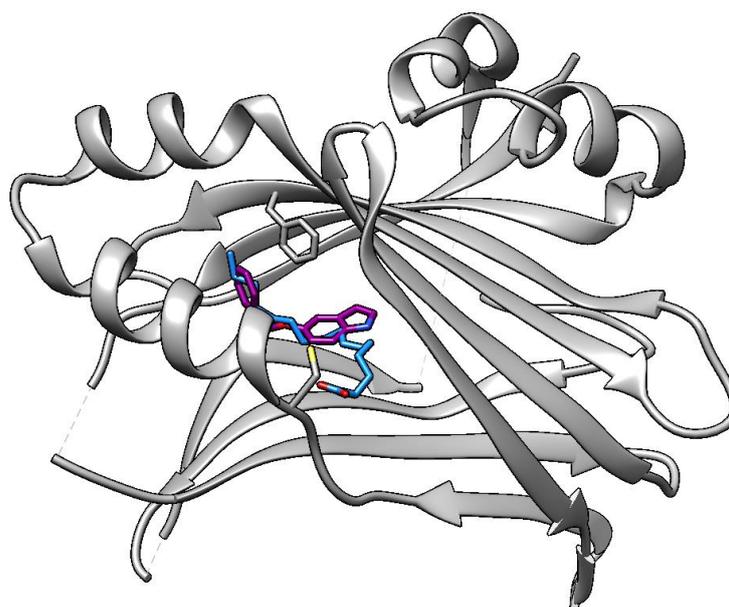
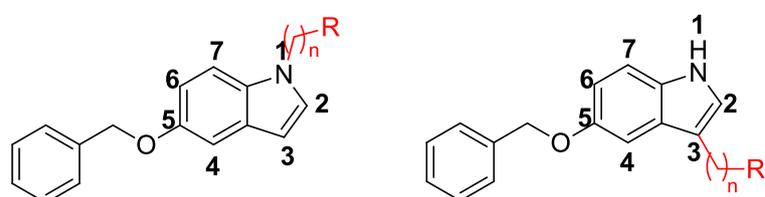


Figure 29: Superposition du 5-benzyloxyindole (en bleu) et de l'acide palmitique (en violet) (code PDB : 5HGU)

La chaîne alkyle de l'acide palmitique et la fonction benzyloxy du fragment sont parfaitement superposables. La superposition montre que la fonctionnalisation par une chaîne alkyle possédant un groupement polaire terminal en position 1 ou par rotation, en position 3 de l'indole permet de mimer le reste de l'acide palmitique dirigé vers la cystéine conservée (Schéma 21).



R et R': fonction polaire

Schéma 21: Numérotation de l'indole et stratégies de synthèse

CHAPITRE III

2. Synthèse : Fonctionnalisation en position 1

a. Synthèse d'acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkyloïques

Le 5-benzyloxyindole a été mis en présence de 1,5 équivalents d'hydrure de sodium (NaH) dans le DMF anhydre. La déprotonation est suivie d'une substitution nucléophile, en présence de 1,2 équivalent d' ω -bromoester éthylique. L'ester est ensuite hydrolysé en milieu acide pour conduire aux molécules **FT50**, **FT53**, **FT54** et **FT55** avec des rendements de 2 à 55% (Schéma 22 et Tableau 9).

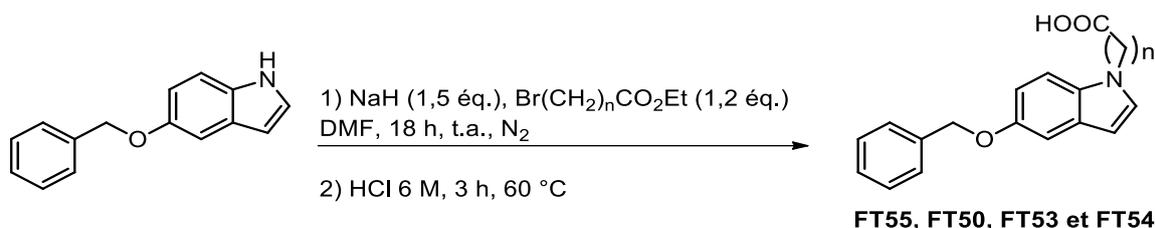


Schéma 22: N-alkylation du 5-benzyloxyindole par une chaîne alkyle acide

Tableau 9: Rendement obtenus en fonction de la longueur de chaîne alkyle acide

Entrée	n	Rendement (%)
FT55	1	55
FT50	2	44
FT53	3	2
FT54	4	20

Le faible rendement observé pour la synthèse de **FT53** est probablement dû à la cyclisation intramoléculaire du dérivé ω -bromoester éthylique.

b. Synthèse de 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkylamines et fonctionnalisation

Les premiers essais de fonctionnalisation de l'indole par un bras ω -aminoalkyle ont été réalisés dans un premier temps en utilisant le N-(2-bromoéthyl)phthalimide couramment utilisé au laboratoire (Schéma 23).⁹⁴

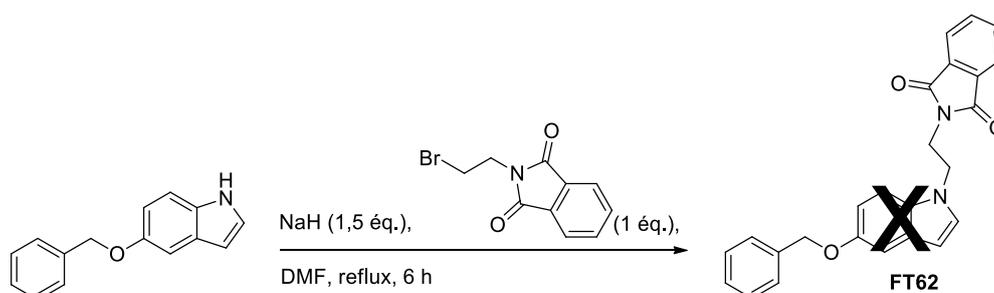


Schéma 23: Essais de fonctionnalisation par une fonction phthalimide

CHAPITRE III

Nous avons isolé un produit avec un rendement de 20% dont la masse correspond à la condensation sur le 5-benzyloxyindole d'un motif éthylphthalimide. Cependant les données RMN ne sont pas en accord avec la structure du composé attendu.

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C montre une complète inéquivalence des protons des deux CH_2 de la chaîne éthylque. Quatre signaux sont observés : deux doublets dédoublés dédoublés à 3,51 et 4,23 ppm et deux triplets dédoublés à 4,47 et 4,62 ppm. Les doublets dédoublés dédoublés possèdent 3 constantes de couplages en 3J de 11,0 ; 8,3 et 5,4 Hz et 11,0 ; 8,3 et 6,4 Hz respectivement. Les triplets dédoublés, quant à eux, possèdent 2 constantes de couplage en 3J de 8,3 et 6,4 Hz et 8,3 et 5,3 Hz respectivement.

En ^{13}C , une inéquivalence de l'ensemble des carbones du phthalimide avec huit pics distincts est observée. Ceux-ci sont situés à 122,1 ; 124,3 ; 131,2 et 133,9 pour les aromatiques et 106,6 ; 130,6 ; 143,0 et 171,9 pour les carbones quaternaires.

Le composé a été cristallisé par le Dr H. Allouchi (Figure 30).

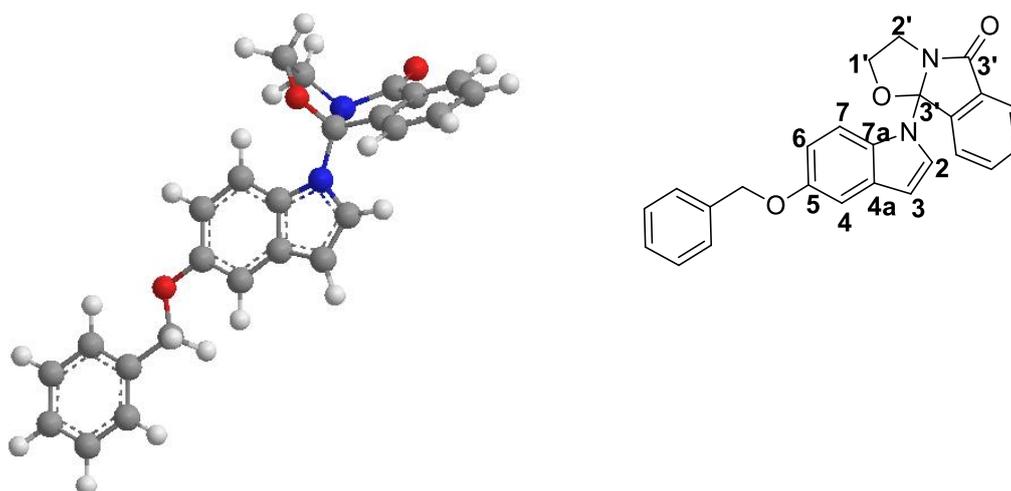


Figure 30: Structure cristallisée du composé **FT62**

Cette structure est en accord avec les signaux des différents spectres RMN puisque l'inéquivalence des protons **1'** et **2'** est justifiée par la cyclisation intramoléculaire ainsi que la différence entre les carbones **3'**.

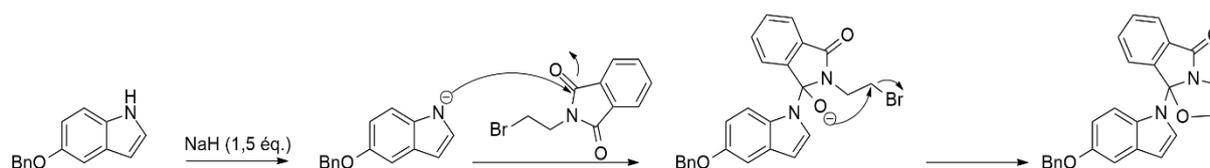


Schéma 24: Mécanisme proposé pour la formation du **FT62**

Ce produit provient de l'attaque de l'indolide préalablement formé par la déprotonation au NaH sur la fonction amide du phthalimide. L'ion 3-oxoisindolin-1-olate obtenu permet la fermeture du

CHAPITRE III

cycle par attaque sur le carbone portant l'halogène (Schéma 24). La formation du polycycle 2,3-dihydrooxazo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one est déjà décrite en présence d'amines primaires ou de phényllithiens ou magnésiens mais pas en présence d'hétérocycles azotés.^{116,117}

Des tentatives de déprotection du phtalimide ont été réalisées mais n'ont pas été couronnées de succès, quelles que soient les conditions réactionnelles utilisées (Schéma 25).

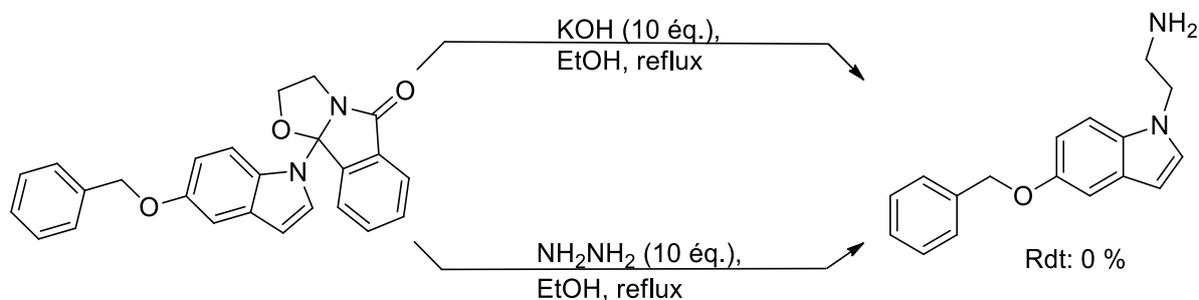


Schéma 25: Conditions de déprotection du phtalimide testées

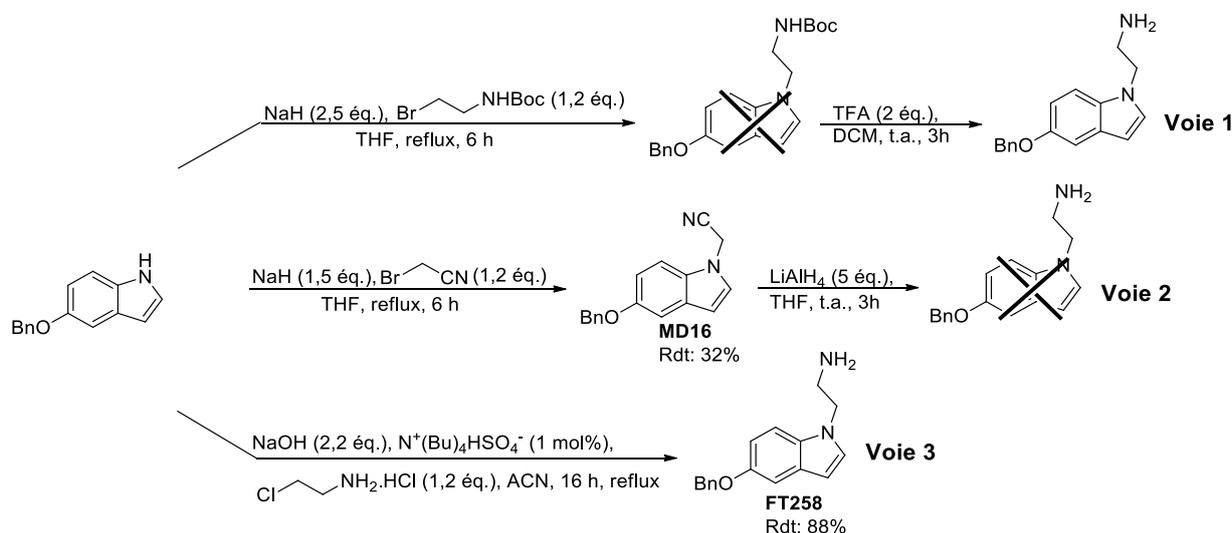


Schéma 26: Alternatives de synthèse pour l'obtention des 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkylamines

La fonctionnalisation de l'indole *via* un dérivé amine protégée par un motif *tert*-butyloxycarbone en présence de NaH en excès dans le THF à reflux (Schéma 26, Voie 1) n'a malheureusement donné aucune conversion du produit de départ. Le dérivé bromoacétonitrile a pu être greffé en position 1 de l'indole (MD16) avec un rendement de 32% (Schéma 26, Voie 2). Malheureusement, la réduction de la fonction nitrile en présence de tétrahydroaluminate de lithium n'a permis qu'une faible conversion vers un mélange complexe. Finalement, la fonctionnalisation de l'indole par un groupement éthanamine par une réaction de transfert de phase (Schéma 26, Voie 3) a été réalisée avec succès.¹¹⁸ Le produit souhaité (FT258) est obtenu avec un très bon rendement de 88%. Cette réaction a été étendue à la chaîne ω -aminopropyle (Schéma 27). Le produit FT260 a été obtenu avec un rendement du même ordre (81%).

CHAPITRE III

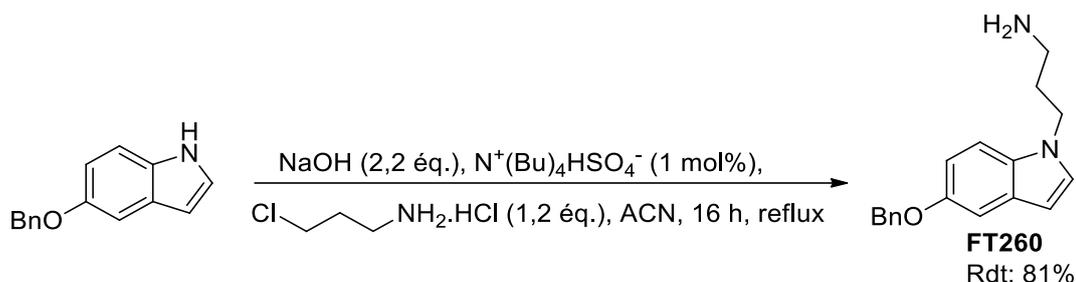


Schéma 27: Réaction de transfert de phase étendue au dérivé propan-1-amine

Les fonctions méthylsulfonamide, vinylsulfonamide, acrylamide et chloroacétate sont présentes au niveau des ligands reportés par Meroueh, Luo, Jänne, Kaneda, Cunningham et Post.^{99,102,105,106,108,109} Parmi ces composés, certains se lient covalamment avec la cystéine de l'entrée de la poche (vinylsulfonamide, acrylamide et chloroacétate). Ainsi, les acétamides, acrylamides, 2-chloroacétamides, méthylsulfonamides et vinylsulfonamides ont été synthétisés en présence des chlorures d'acide ou des chlorures d'alkylsulfonyle correspondant en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane (Schéma 28).

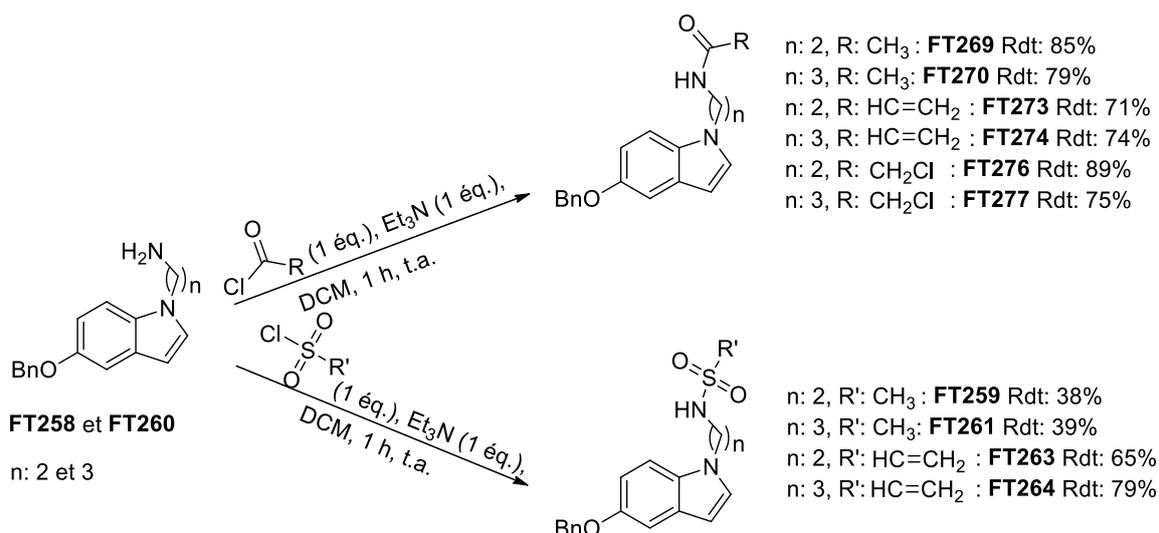


Schéma 28: Schéma de synthèse des fonctionnalisations des amines **FT258** et **FT260** en amides et sulfonamides

Les amides fournissent des rendements variants entre 71 et 89%, de même pour les vinyl sulfonamides qui sont obtenus avec des rendements de 65 et 79%. Cependant, les méthyles sulfonamides sont obtenus avec de faibles rendements de 38 et 39% dus à des problèmes de purification.

3. Synthèse : Fonctionnalisation en position 3

Les fonctionnalisations en position 3 ont été réalisées à partir de la 5-benzyloxytryptamine (**FT328**), du 5-benzyloxyindole et du 5-benzyloxy-3-formylindole commerciaux.

CHAPITRE III

a. Synthèses à partir de la 5-benzyloxytryptamine

La 5-benzyloxytryptamine (**FT328**) a été convertie en acétamide, acrylamide, 2-chloroacétamide, méthylsulfonamide et vinylsulfonamide avec de bons rendements allant de 69 à 82% (Schéma 29).

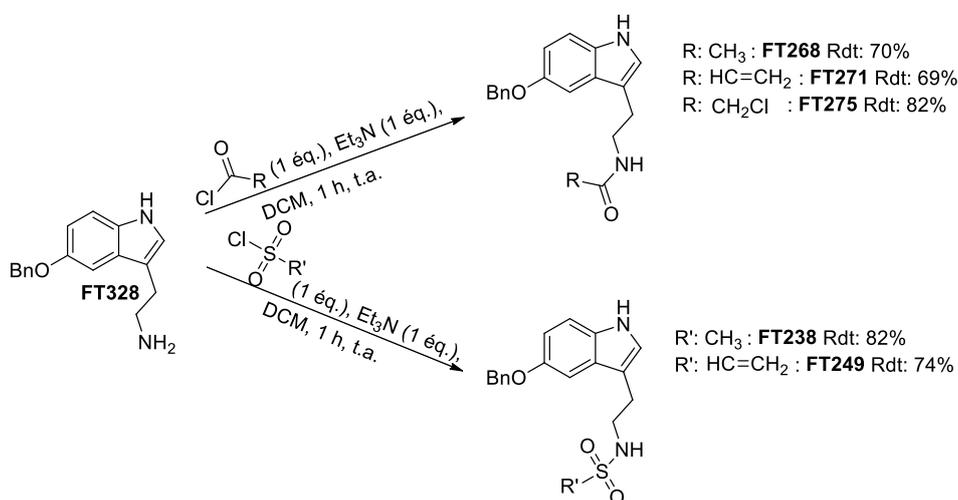


Schéma 29: Fonctionnalisations de la tryptamine en amides et sulfonamides

b. Synthèses à partir du 5-benzyloxyindole

- Synthèse des 2-(5-benzyloxy-1H-indol-3-yl)-2-oxoacétates (**FT88** et **FT103**) et du 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)éthanol (**FT112**)

La synthèse de la molécule **FT112** a été réalisée en deux étapes.¹¹⁹ Tout d'abord, le 5-benzyloxyindole est mis en réaction avec le chlorure d'oxalyle. L'ajout de méthanol conduit à l'ester méthylique correspondant (**FT88**) avec un rendement de 71% alors que l'ajout d'une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO₃, 1 M)¹²⁰ permet la formation de l'acide **FT103** avec un rendement de 78% (Schéma 30).

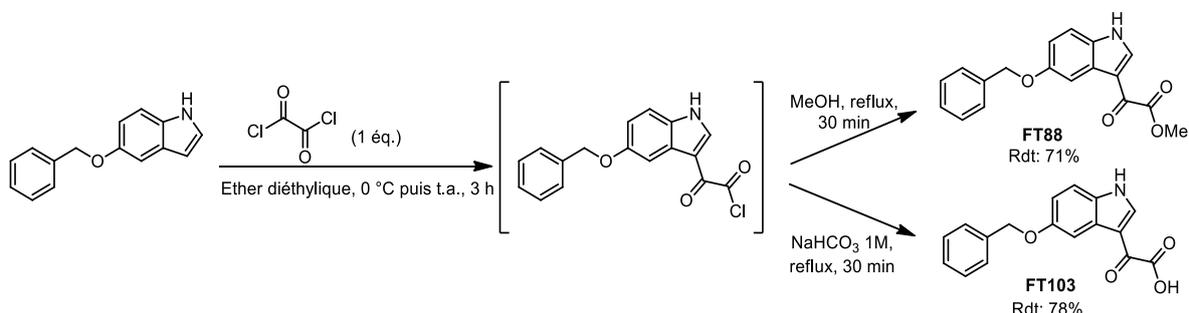


Schéma 30: Conditions d'obtention des produits **FT88** et **FT103**

La réduction de l'ester **FT88** par le LiAlH₄ dans le THF anhydre à reflux conduit à l'alcool **FT112** avec un rendement de 69% (Schéma 31).

CHAPITRE III

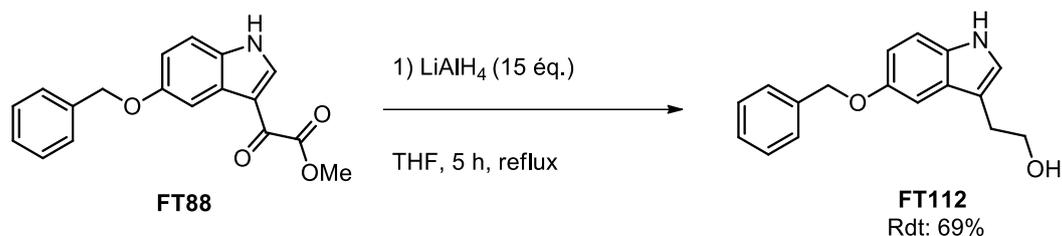


Schéma 31: Conditions d'obtention du produit **FT112**

- Synthèse du 4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)butan-2-one (**FT90**) et du 4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)butan-2-ol (**FT99**)

Le composé **FT90** est obtenu par une réaction d'alkylation en position 3 réalisée en présence de chlorure d'indium (III) (InCl_3).¹²¹ Cette réaction est résumée dans le Schéma 32.

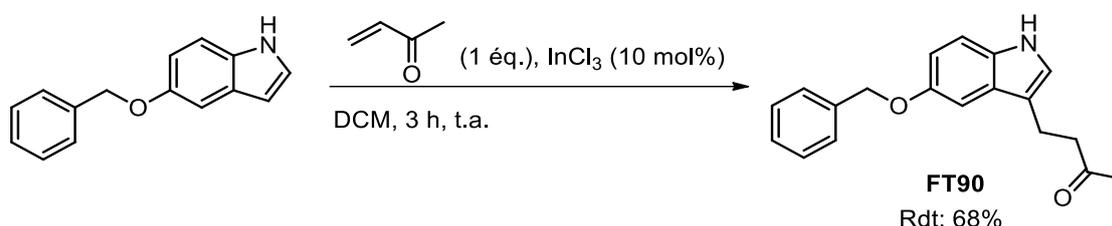


Schéma 32: Conditions d'obtention du produit **FT90**

Celle-ci a été réalisée en présence d'un équivalent de but-3-èn-2-one, de 10 mol% de chlorure d'indium pendant 3 heures à température ambiante dans le dichlorométhane et a permis d'obtenir la molécule **FT90** avec un rendement de 68%. En vue d'obtenir d'autres composés substitués en position 3, nous avons remplacé la but-3-èn-2-one par l'acrylate d'éthyle, l'acrylamide, l'acrylonitrile et l'acide acrylique mais sans succès. Cette réaction semble donc spécifique aux cétones. Les auteurs n'ont pas mentionné ni mis en réaction d'autres fonctions.¹²¹

Le produit **FT90** est réduit en alcool en présence de NaBH_4 dans le THF à température ambiante et catalysée par du méthanol (Schéma 33). Le produit **FT99** est obtenu avec un rendement de 93%.

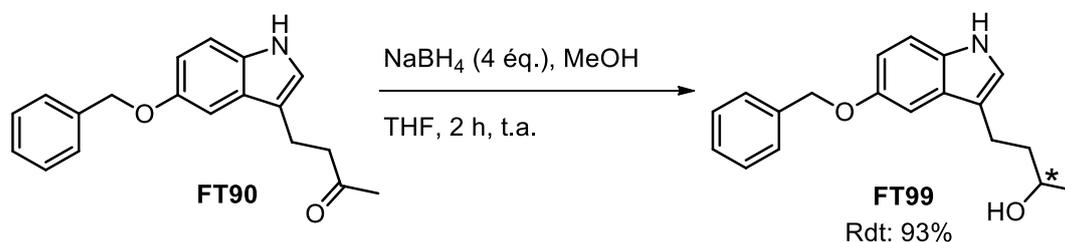


Schéma 33: Conditions réactionnels d'obtention du produit **FT99**

CHAPITRE III

c. Synthèse à partir du 5-benzyloxy-3-formylindole

- Synthèse du 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)acrylonitrile (**FT95**)

La molécule **FT95** a été synthétisée par réaction de Knoevenagel à partir de l'acide cyanoacétique.¹²² Les conditions sont résumées dans le Schéma 34.

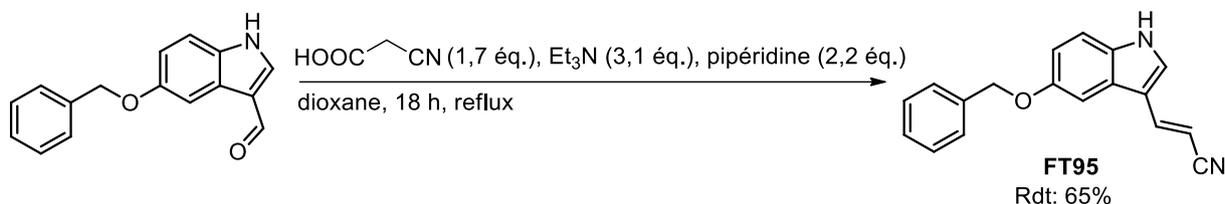


Schéma 34: Conditions d'obtention du produit **FT95**

Cette réaction a été réalisée en milieu basique en présence de triéthylamine afin de former l'anion carboxy(cyano)méthanide. De la pipéridine est également ajoutée comme catalyseur. Seul l'isomère E du produit **FT95** a été obtenu avec un rendement de 65% après une nuit à reflux dans le dioxane.

- Synthèse de l'acide 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)acrylique (**FT265**) et de son ester éthylique (**FT196**)

L'acide **FT265** et son ester **FT196** ont été synthétisés par réaction de Wittig à partir du 5-benzyloxy-3-formylindole. La première voie de synthèse réalisée est exposée dans le Schéma 35 et mène à l'obtention de l'ester **FT196**.

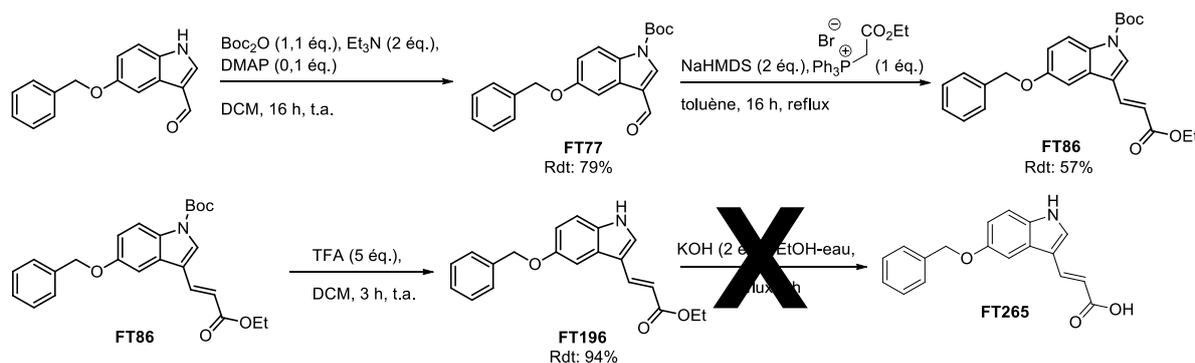


Schéma 35: Première voie de synthèse pour l'obtention du produit **FT196**

L'atome d'azote de l'indole est préalablement protégé par un groupement *tert*-butoxycarbonyl (Boc) en présence de triéthylamine et de 4-diméthylaminopyridine, pendant une nuit dans le dichlorométhane permettant l'obtention du composé **FT77** avec un rendement de 79%. La réaction de Wittig est effectuée dans le toluène à reflux pendant 16 heures en présence du bromure de (2-éthoxy-2-oxoéthyl)triphenylphosphonium et d'une base forte, le NaHMDS. L'isomère E du composé **FT86** est obtenu avec un rendement de 57%. La saponification de **FT86** par une base (KOH,

CHAPITRE III

éthanol/eau à reflux) ayant conduit à des produits de dégradation, **FT86** a été traité par un excès d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour donner l'ester éthylique **FT196** avec un rendement de 94%. Ici encore, la saponification de **FT196** n'a pas donné l'acide **FT265**.

Afin de profiter des conditions acides de déprotection finale, j'ai utilisé le bromure de (2-(*tert*-butoxy)-2-oxoéthyl)triphenylphosphonium (Schéma 36) pour synthétiser l'ester *tert*-butylique **FT262** par réaction de Wittig. Celui-ci est déprotégé en présence de quinze équivalents de TFA dans le dichlorométhane pour donner le produit souhaité **FT265** presque quantitativement.

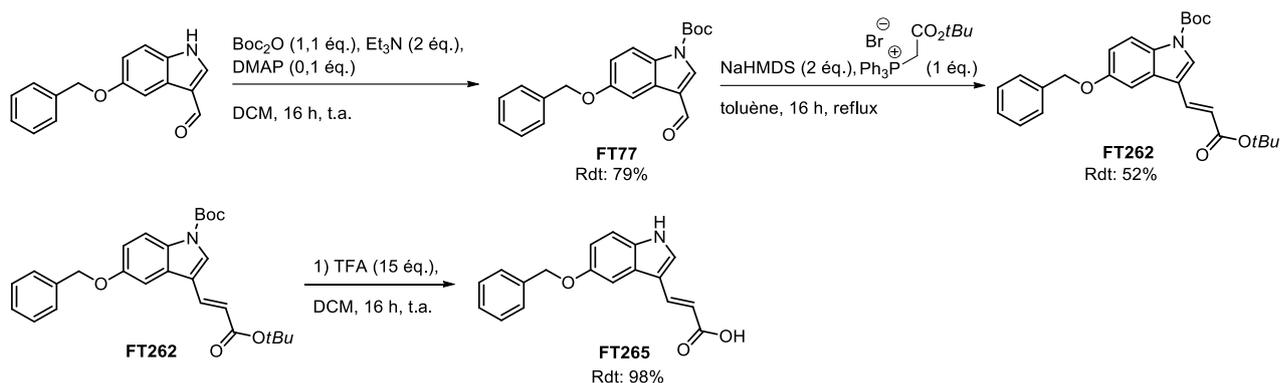


Schéma 36: Nouvelle voie de synthèse pour l'obtention du produit **FT265**

CHAPITRE III

II. Evaluation des composés molécules fonctionnalisées en position 1 et 3 par des chaînes alkyles

1. Effet des composés sur la température de dénaturation de hTEAD₂₁₇₋₄₄₇

Les molécules synthétisées et commerciales (le 5-benzyloxy-3-méthyl-indole (**FT191**), le 5-benzyloxytryptophane (**FT-trp**), le chlorure de 5-benzyloxytryptamine (**FT327**) et la tryptamine (**FT328**)) ont été testées à une concentration de 500 μM en duplicat sur hTEAD₂₁₇₋₄₄₇. La Figure 31 montre les courbes obtenues pour les composés substitués en position 3 de l'indole et le Tableau 10 l'exploitation des courbes. Les courbes des composés covalents ainsi que des composés substitués en position 1 de l'indole sont situées en Annexes (Annexes 2 et 3).

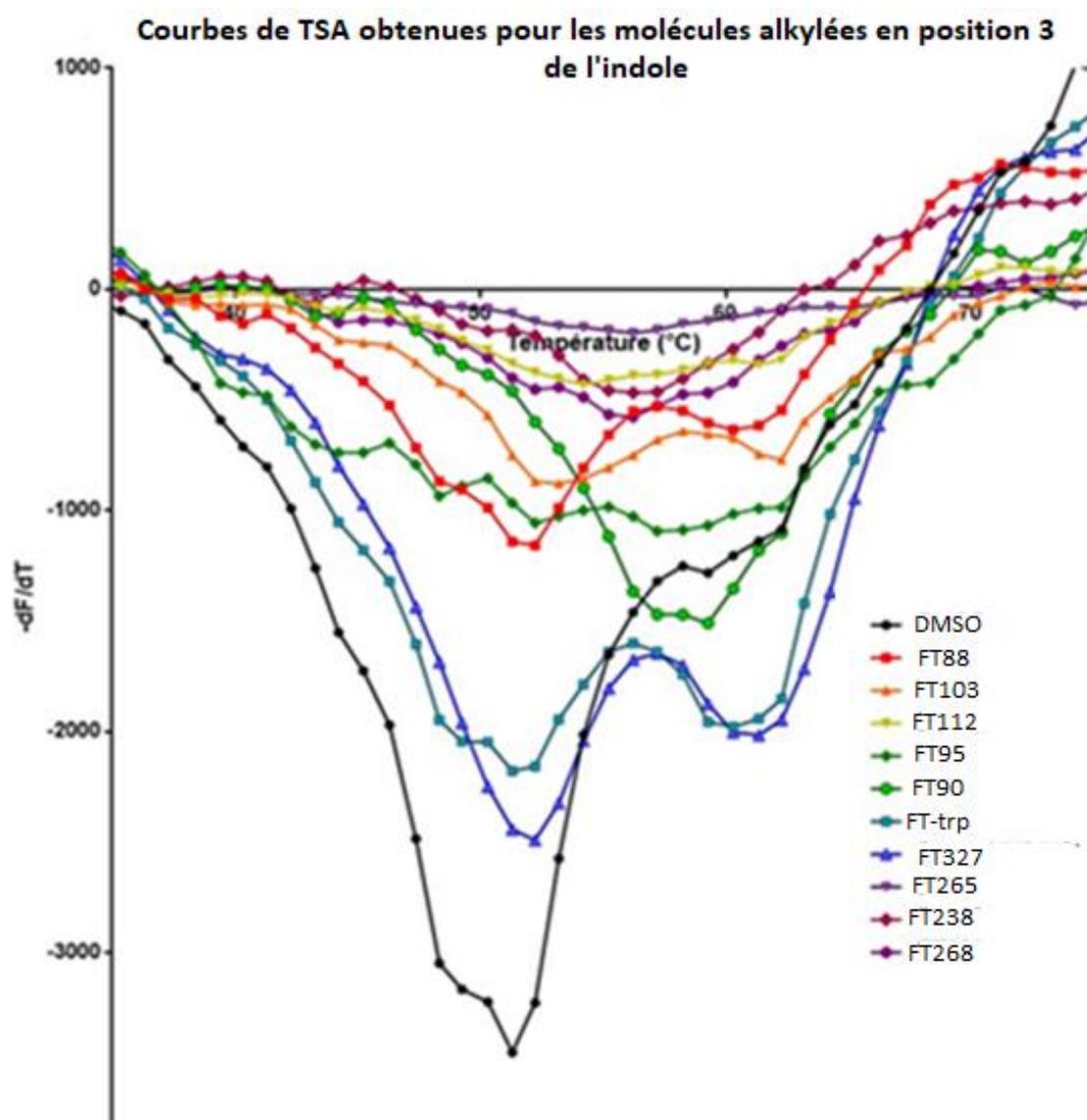
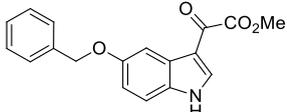
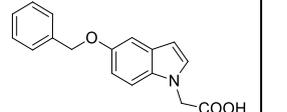
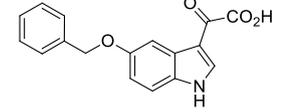
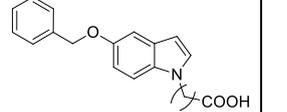
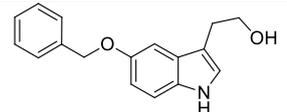
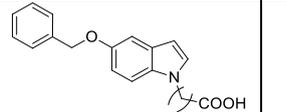
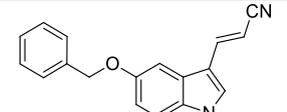
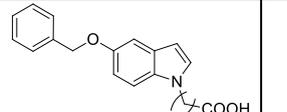
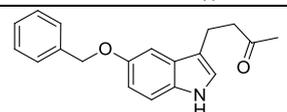
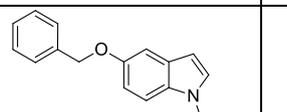
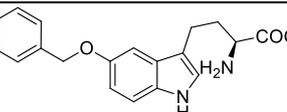
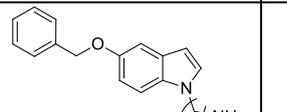
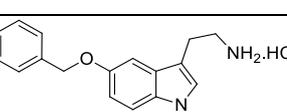
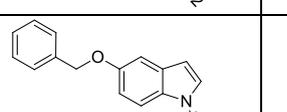
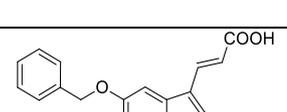
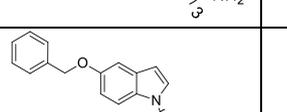
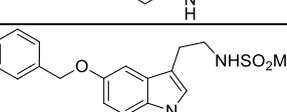
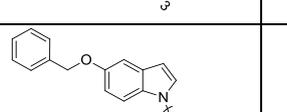
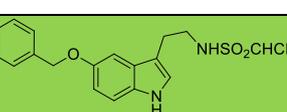
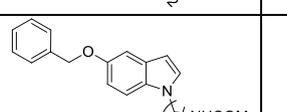
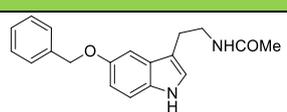
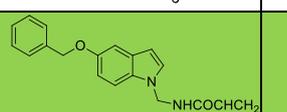
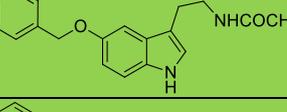
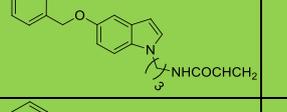
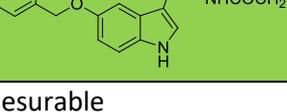
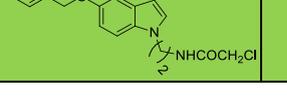


Figure 31: Courbes de TSA obtenus pour les composés alkylés en position 3

CHAPITRE III

Tableau 10: Résultats obtenus par TSA pour les composés alkylés en position 1 et 3

Nom	Structure	ΔT_{m1} (°C)	ΔT_{m2} (°C)	Nom	Structure	ΔT_{m1} (°C)	ΔT_{m2} (°C)
FT88		1,7	2,0	FT55		1,9	nm
FT103		2,1	2,9	FT50		2,1	3,0
FT112		3,9	/	FT53		2,9	/
FT95		/	3,0	FT54		2,9	3,1
FT90		/	1,2	MD16		2,6	2,5
FT-trp		1,0	1,1	FT258		3,0	2,8
FT327		1,9	2,1	FT260		nm	nm
FT265		nm	nm	FT261		nm	nm
FT238		nm	nm	FT269		3,9	3,7
FT249		/	3,1	FT270		nm	nm
FT268		4,9	/	FT273		nm	nm
FT271		/	2,3	FT274		nm	nm
FT275		/	3,2	FT276		/	2,6

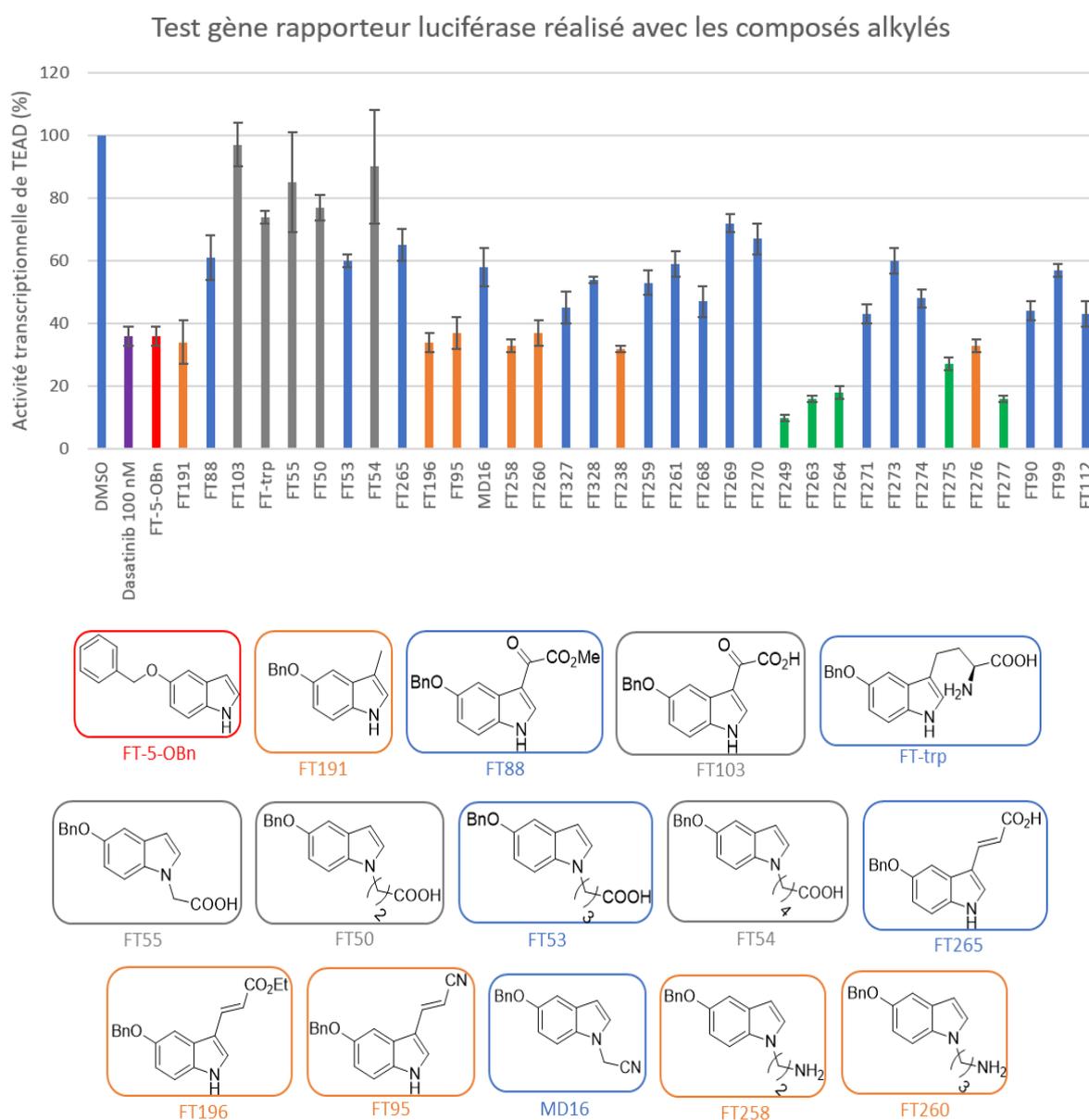
nm: non mesurable

CHAPITRE III

Les composés **FT99**, **FT191**, **FT196**, **FT259**, **FT263**, **FT264**, **FT277** et **FT328** n'ont pas donné de résultats concluants car les données obtenues sont incohérentes. Les autres composés montrent une interaction avec hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ avec des ΔT_m variables allant de +1,0 °C à +3,9 °C. L'ensemble des molécules potentiellement covalentes avec TEAD (en vert) ne semblent posséder qu'une seule température de dénaturation de même que les molécules **FT90**, **FT95** et **FT112**.

2. Evaluation cellulaire

Comme précédemment, les molécules synthétisées et les composés commerciaux ont été testés à une concentration de 10 μ M sur cellules HEK293T transfectées par le plasmide TEAD-luc reporter 8XGTIIC-luciférase et ces tests ont été réalisés en triplicat (Figure 32).



CHAPITRE III

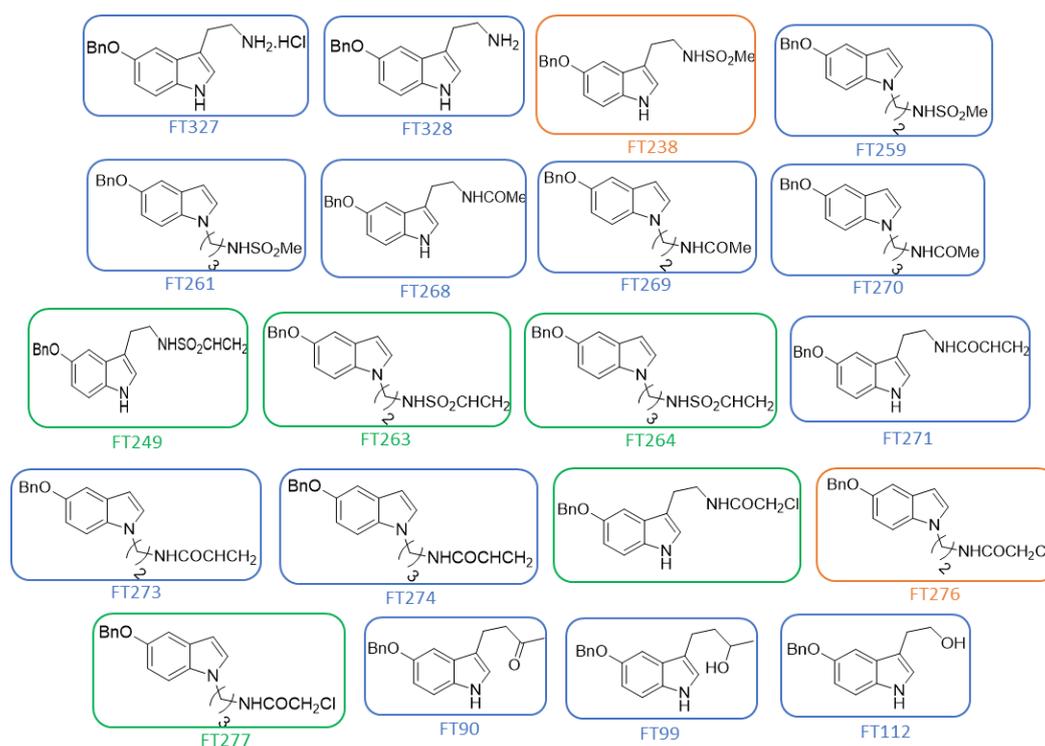


Figure 32: Résultats du test gène rapporteur à la luciférase réalisé sur les molécules fonctionnalisées en position 1 et 3 par des chaînes alkyles

Parmi les composés covalents, cinq composés (**FT249**, **FT263**, **FT264**, **FT275** et **FT277**, en vert) sont plus actifs que le 5-benzyloxyindole (en rouge) avec l'activité transcriptionnelle de TEAD diminuée à 10 - 18% soit plus de 80% d'inhibition. Aucun acrylamide (**FT271**, **FT273** et **FT274**) n'a montré une inhibition de plus de 50% de l'activité transcriptionnelle. Les composés les plus actifs sont les vinylsulfonamides suivis des chloroacétamides. Cet ordre de réactivité est conforme à ce qui a déjà été observé par Lodge et *al.* sur une cystéine du domaine de liaison KIX des coactivateurs p300/CBP.¹²³ Parmi les composés non covalents, l'acrylonitrile **FT95** et l'acrylate d'éthyle **FT196** (en orange) sont plus actifs que l'acide acrylique **FT265**. **FT258** et **FT260** (substitués en position 1 de l'indole par une chaîne éthyle ou propylamine, en orange) sont un peu plus actifs que les tryptamines **FT327** et **FT328**. D'autres composés comme **FT191** (le 3-méthyl-5-benzyloxyindole), **FT238** (non-covalents, en orange) et **FT276** (covalent, en orange) ont également une activité inhibitrice équivalente à celle du 5-benzyloxyindole. Finalement, les acides **FT103**, **FT-trp**, **FT55**, **FT50** et **FT54** (en gris) ont une très faible activité provenant vraisemblablement de leur faible capacité à passer les membranes cellulaires ou nucléaires.

Ce chapitre a permis de souligner le fort potentiel des vinylsulfonamides (**FT249**, **FT263** et **FT264**) et des chloroacétamides (**FT275**, **FT276** et **FT277**) covalents qui seront étudiées plus en détail par la suite. D'autres fonctions telles que les (Z)-acrylonitrile, acrylate d'éthyle et les indoles substitués en position 1 de l'indole par une chaîne alkylamine ont également montré des inhibitions non négligeables.

**CHAPITRE IV : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DES
MOLECULES DÉRIVÉES DE LA SUPERPOSITION DU 5-
BENZYL-OXYINDOLE ET DE L'ACIDE FLUFÉNAMIQUE**

CHAPITRE IV

I. Conception, synthèse et caractérisation des molécules fonctionnalisées en position 1 par un groupement aryle

1. Conception des molécules issues de la superposition entre le 5-benzyloxyindole et l'acide flufénamique

La deuxième stratégie pour optimiser la structure du 5-benzyloxyindole a été de superposer celui-ci à l'acide flufénamique, premier ligand (décrit dès 2015) ayant cristallisé dans la poche interne (code PDB : 5DQ8) (Figure 33).

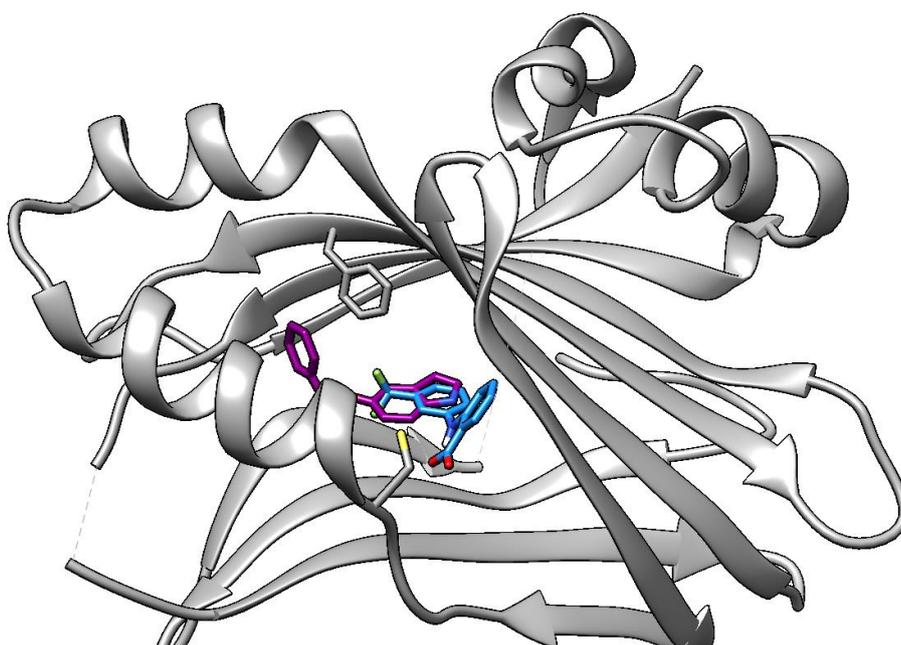
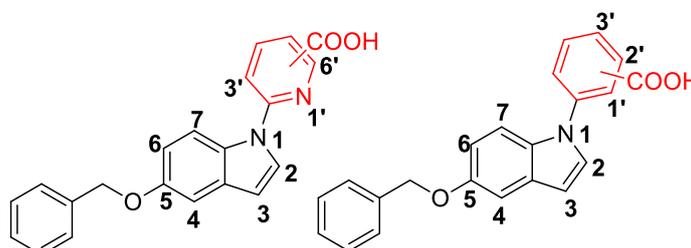


Figure 33: Superposition du 5-benzyloxyindole (en bleu) et de l'acide flufénamique (en rose) (code PDB : 5DQ8)

Ainsi nous avons entrepris la synthèse de 5-benzyloxyindoles substitués sur l'atome d'azote par un motif carboxyphényle ou carboxypyridinyle (Schéma 37).



X: CH ou N

Schéma 37: Familles de molécules visées à partir de la superposition du 5-benzyloxyindole et de l'acide flufénamique

CHAPITRE IV

2. Synthèse des composés arylés en position 1

Les motifs carboxyphényles et carboxypyridinyles ont été introduits sur l'atome d'azote de l'indole par une réaction d'Ullmann. Cette réaction, catalysée au cuivre, permet une substitution nucléophile aromatique d'un nucléophile quelconque sur un halogénure d'aryle. Le cycle catalytique de cette réaction est le suivant (Schéma 38).

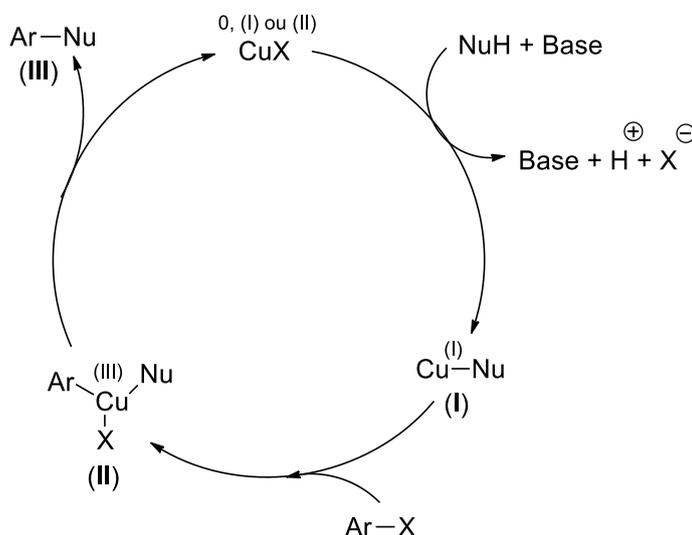


Schéma 38: Cycle catalytique d'Ullmann

Le cycle débute par l'addition du nucléophile (NuH) sur le cuivre, ce qui conduit à la formation d'un acide HX neutralisé par l'ajout d'une base et de l'intermédiaire (I). L'addition oxydante d'un halogénure d'aryle (ArX) sur le cuivre donne l'intermédiaire Cu^(III) (II) qui, suite à l'élimination réductrice du produit final (III), régénère le catalyseur au cuivre.

a. Synthèse des acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoïques

La réaction d'Ullmann réalisée avec le 5-benzyloxyindole a été testée avec l'acide 2-iodobenzoïque. Deux conditions réactionnelles ont été utilisées (Schéma 39 et Tableau 11).

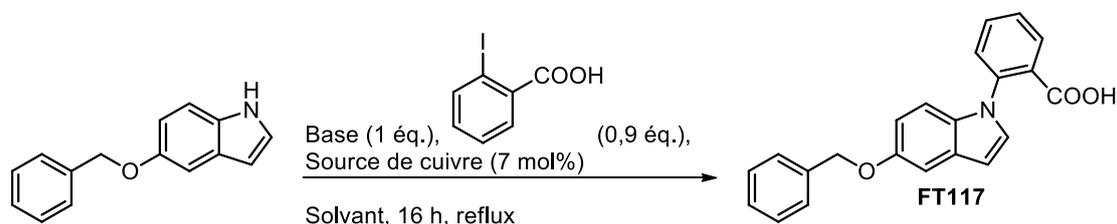


Schéma 39: Conditions réactionnelles générales de la réaction d'Ullmann réalisée avec l'acide 2-iodobenzoïque

CHAPITRE IV

Tableau 11 : Conditions et rendements des réactions d'Ullmann testées avec l'acide 2-iodobenzoïque

Entrée	Base (1 éq.)	Source de cuivre	Solvant	Rendement (%)
1	K ₂ CO ₃	CuO	Pyridine	31
2	K ₂ CO ₃	Cu	DMF	58

Les conditions de l'entrée 1 comprennent l'utilisation d'oxyde de cuivre (II) (CuO), d'un équivalent de carbonate de potassium comme base et de la pyridine comme solvant. Ces conditions ont donné lieu à un rendement de 31% du produit souhaité accompagné de nombreux produits secondaires non identifiés. De ce fait, le cuivre métallique ainsi que le DMF comme solvant ont ensuite été employés (Entrée 2) permettant non seulement d'augmenter le rendement (58%) mais aussi de travailler dans des conditions moins contraignantes. Ces nouvelles conditions ont par la suite été étendues aux dérivés *méta* et *para* (Schéma 40).

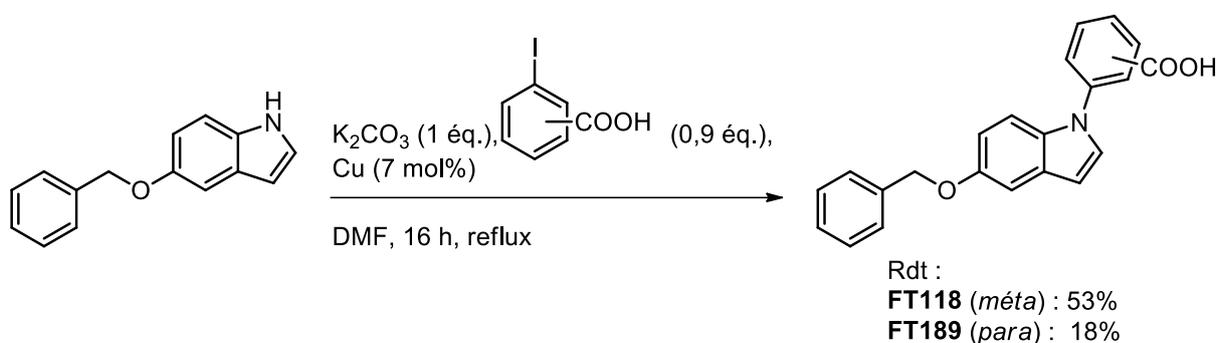


Schéma 40: Etendue de la réaction aux dérivés acides *méta* et *para* iodobenzoïques

Le dérivé *méta* a montré un rendement similaire au dérivé *ortho*. En revanche, le dérivé *para* fournit un rendement plus faible.

b. Synthèse des acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)nicotinique et picoliniques

Les acides (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)nicotinique et picolinique ont été synthétisés selon les conditions réactionnelles écrites précédemment (Schéma 41).

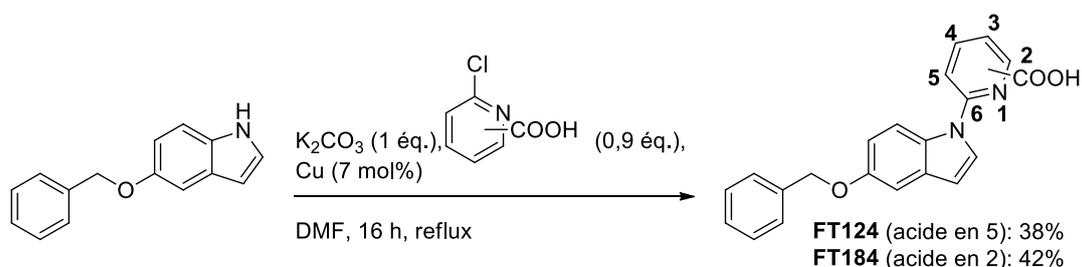
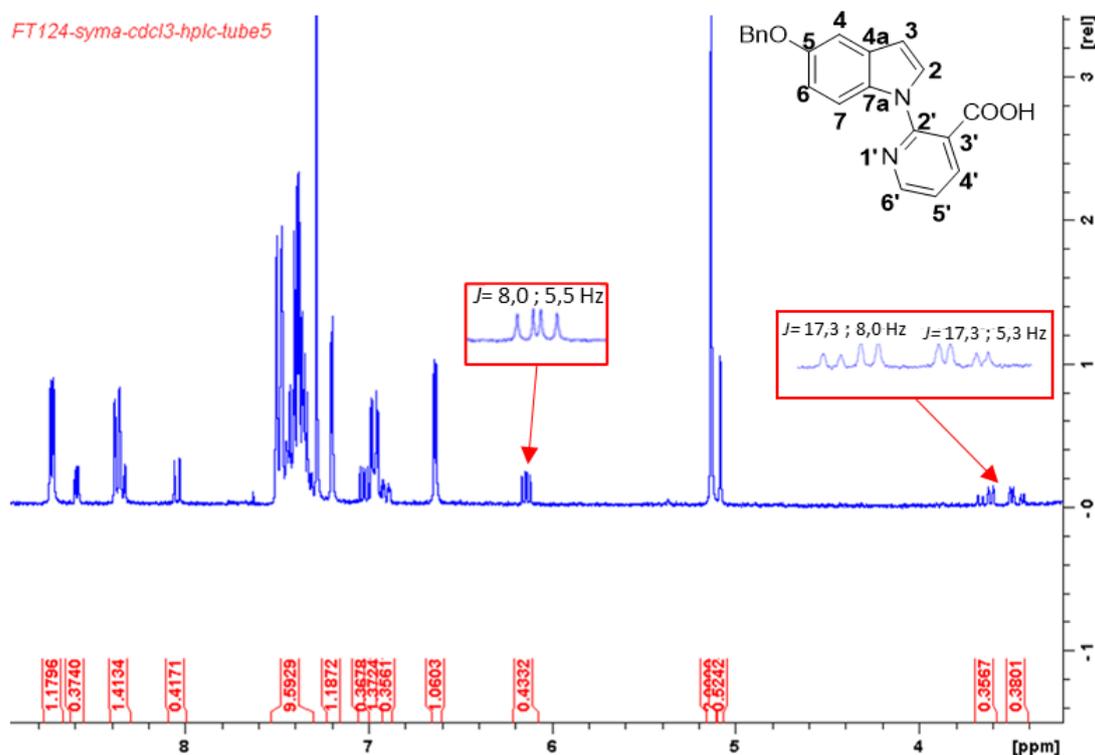


Schéma 41: Conditions réactionnelles générales de la réaction d'Ullmann réalisé avec les acides nicotinique et picolinique

CHAPITRE IV

Les conditions optimisées de la réaction d'Ullmann permettent d'obtenir les produits **FT124** et **FT184** avec des rendements de 38 et 42% respectivement. Dans le cas de **FT124**, le traitement basique (NaHCO_3 1N (pH 8)) suivi d'une acidification (HCl 1N jusqu'à pH 3) conduit à un mélange de deux produits dans un ratio 80 : 20 après purification par HPLC, comme l'atteste le spectre RMN ^1H de la Figure 34.



Le produit attendu est le produit majoritaire. Le deuxième produit observé présente les pics caractéristiques des protons de l'acide nicotinique, ceux de la partie « benzo » de l'indole et du groupement benzyloxy. Les protons en position 2 et 3 de l'hétérocycle indole sont absents et sont remplacés par trois doublets dédoublés aliphatiques. Nous proposons la structure suivante (Schéma 42).

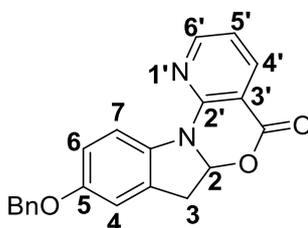


Schéma 42: Structure proposée pour le sous-produit de synthèse du produit **FT124**

Le mélange, se dégradant trop vite en solution, ne permet pas d'enregistrer un spectre de RMN ^{13}C exploitable. L'acidification du milieu réactionnel par ajout d'acide acétique permet d'obtenir la molécule **FT124** dans de meilleures conditions.

CHAPITRE IV

c. Synthèse des acides (4 ou 6-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoïques et picoliniques

Les molécules **FT118** (acide 3-benzoïque) et **FT184** (acide picolinique) ayant montré des résultats intéressants lors de leur évaluation (voir II. Evaluation), j'ai fait varier la position du groupement benzyloxy (Schéma 43 et Tableau 12).

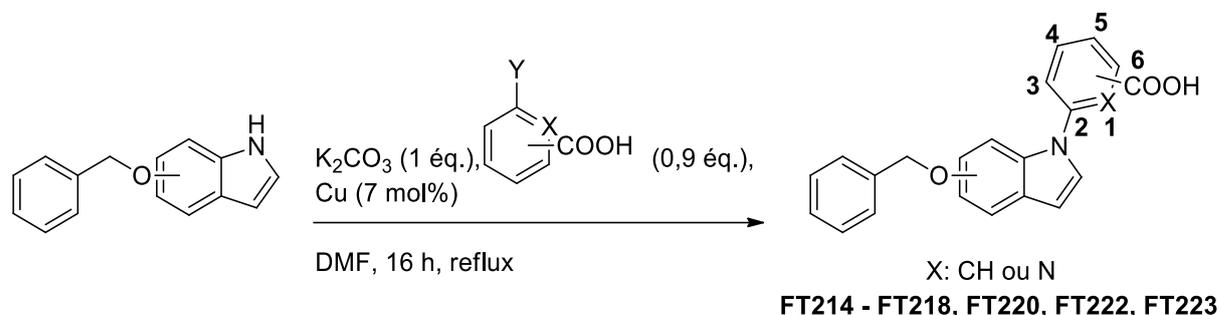


Schéma 43: Réaction d'Ullmann appliquées aux 4 et 6 benzyloxyindoles

Tableau 12: Rendements obtenus pour les molécules **FT214 – FT218, FT220, FT222 et FT223**

Molécule	Position du motif benzyloxy	X	Y	Position du groupe carboxy	Rendement (%)
FT218	4	CH	I	<i>ortho</i>	41
FT214	4	CH	I	<i>méta</i>	48
FT222	4	CH	I	<i>para</i>	25
FT215	4	N	Cl	6	34
FT220	6	CH	I	<i>ortho</i>	47
FT216	6	CH	I	<i>méta</i>	52
FT223	6	CH	I	<i>para</i>	38
FT217	6	N	Cl	6	39

Les rendements obtenus sont globalement similaires à ceux observés pour les dérivés du 5-benzyloxyindole. Les dérivés *ortho* et *méta* benzoïques donnent les meilleurs rendements (molécules **FT214**, **FT216**, **FT218** et **FT220**), suivis par les dérivés picoliniques (molécules **FT215** et **FT217**). Enfin, les dérivés *para* donnent des rendements légèrement supérieurs à celui obtenu avec le 5-benzyloxyindole.

d. Synthèse des esters (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoates et des (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzènes fonctionnalisés en méta

- *Synthèse des esters (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoates*

Comme il avait été observé que les esters d'acides aliphatiques pouvaient être plus actifs dans notre test luciférase, j'ai synthétisé les esters méthyliques et éthyliques des acides **FT117**, **FT118** et **FT189** (Schéma 44 et Tableau 13).

CHAPITRE IV

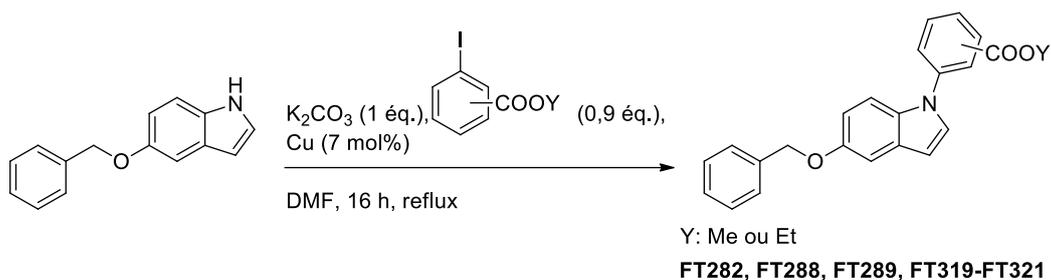


Schéma 44: Réaction d'Ullmann appliquées aux esters méthyliques et éthyliques

Tableau 13: Rendements obtenus pour les molécules **FT282**, **FT288**, **FT289** et **FT319-FT321**

Composé	Position de l'acide	Ester	Rendement (%)
FT288	<i>ortho</i>	Ethylique	71
FT321	<i>ortho</i>	Méthylique	84
FT282	<i>méta</i>	Ethylique	74
FT320	<i>méta</i>	Méthylique	78
FT289	<i>para</i>	Ethylique	69
FT319	<i>para</i>	Méthylique	52

Les esters attendus sont obtenus avec des rendements variant entre 52 et 84%.

- Synthèse des (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzènes fonctionnalisés en *méta*

Toujours aux vues des résultats biologiques de la molécule **FT118**, la variation de la fonction acide en d'autres fonctions a été envisagée. Le scope réalisé ainsi que les rendements de synthèse sont résumés dans le Schéma 45 et le Tableau 14.

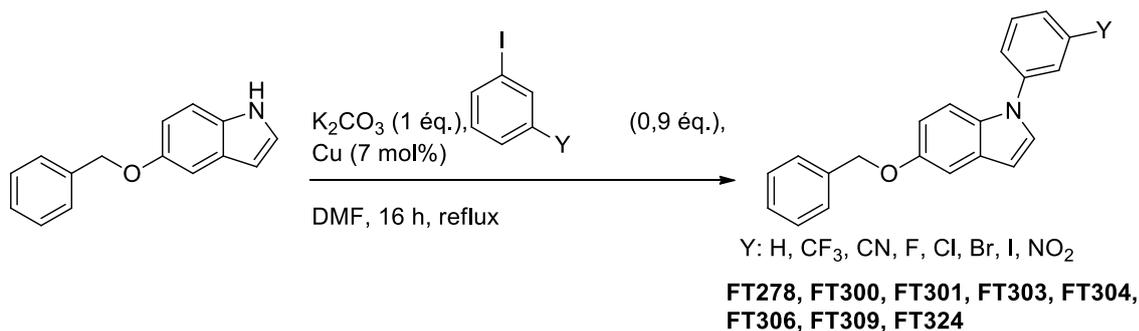


Schéma 45: Réaction d'Ullmann appliquée au scope remplaçant la fonction acide en position *méta* du composé **FT118**

CHAPITRE IV

Tableau 14: Rendements obtenus pour les molécules **FT276**, **FT300**, **FT301**, **FT303**, **FT304**, **FT306**, **FT309** et **FT324**

Composé	Fonction en <i>méta</i>	Rendement (%)
FT276	H	80
FT300	CF ₃	65
FT301	CN	59
FT303	F	75
FT304	Cl	49
FT306	Br	71
FT309	I	42
FT324	NO ₂	44

Les composés attendus sont obtenus avec des rendements corrects entre 42 et 80%. Les composés **FT304** et **FT309** conduisent à un mélange de mono et disubstitués (observables en LC-MS) d'où les rendements plus faibles (42 et 49%).

La réduction de la fonction nitro du composé **FT324** en présence de nickel de Raney et d'un excès d'hydrazine conduit quantitativement à **FT325** (Schéma 46).

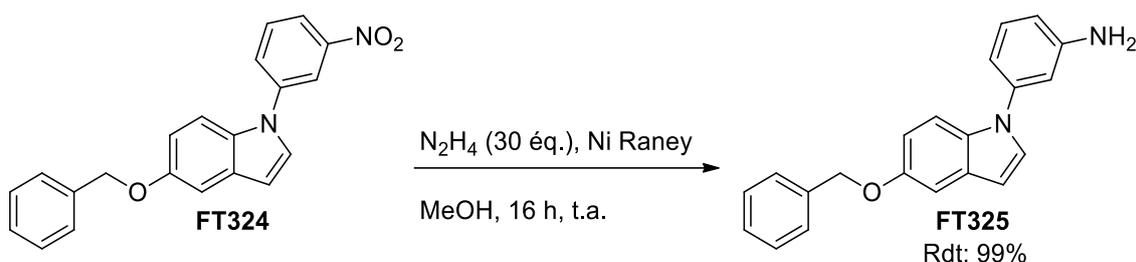


Schéma 46: Conditions de réduction du composé **FT324** pour l'obtention du composé **FT325**

Le phénol **FT312** a été synthétisé en trois étapes avec une protection de la fonction hydroxy par le groupement 2-tétrahydropyranyle (THP) (Schéma 47).

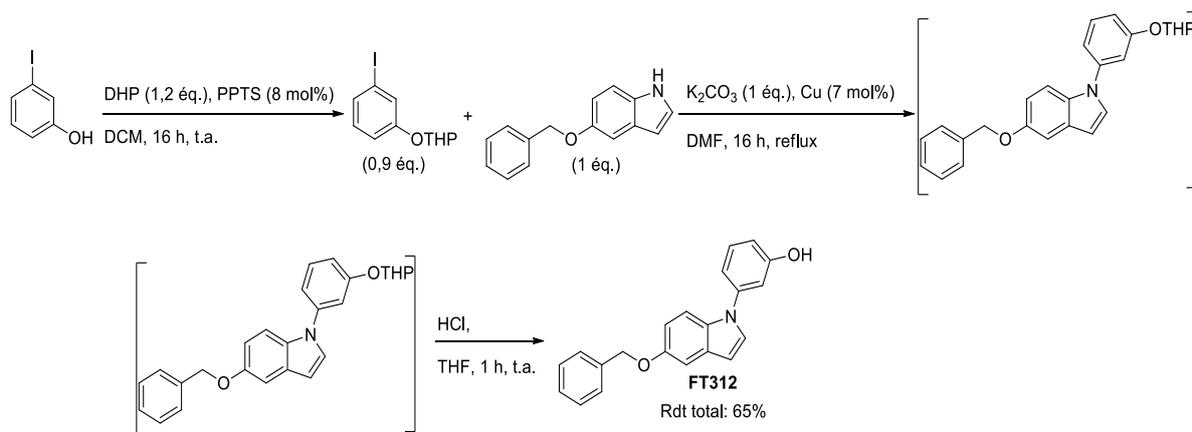


Schéma 47: Etapes de synthèse du produit **FT312**

CHAPITRE IV

e. Synthèse des composés trisubstitués

Afin d'augmenter l'activité de l'acide 3-carboxyphényle **FT118**, il a été envisagé d'associer deux substituants. Le premier substituant est l'acide 3-carboxyphényle en position 1 de l'indole et le second en position 3 provient des substituants du chapitre III présentant des résultats non négligeables : la butanone (**FT90**) et l'acrylonitrile (**FT95**). La synthèse des composés trisubstitués **FT231** et **FT232** a donc consisté en la réaction d'Ullmann directement sur **FT90** et **FT95** (Schéma 48).

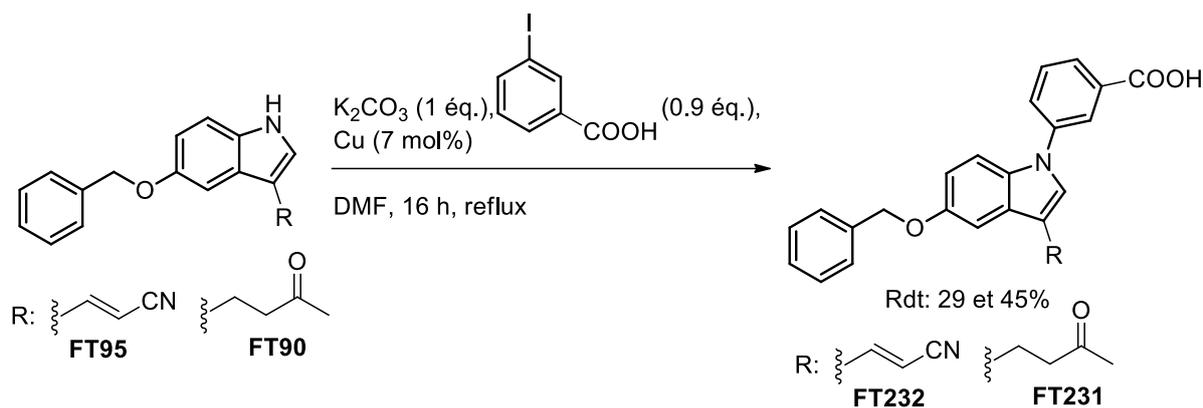


Schéma 48: Synthèse des composés trisubstitués **FT231** et **FT232**

Des rendements de 29 et 45% ont été obtenus respectivement pour les composés **FT231** et **FT232**.

CHAPITRE IV

II. Evaluations des composés arylés en position 1 de l'indole

1. Effet des composés sur la température de dénaturation de hTEAD₂₁₇₋₄₄₇

Seules les composés acides (**FT117**, **FT118**, **FT189**, **FT214-218**, **FT220**, **FT222** et **FT223**) ont été testés à une concentration de 500 μM en duplicat sur hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ et comparés avec les acides niflumique, flufénamique et fénamique. La Figure 35 montre les résultats obtenus pour les 5-benzyloxyindoles arylés (la figure pour les 4 et 6-benzyloxyindoles arylés est située en Annexe 4). L'exploitation des résultats est développée dans le Tableau 15.

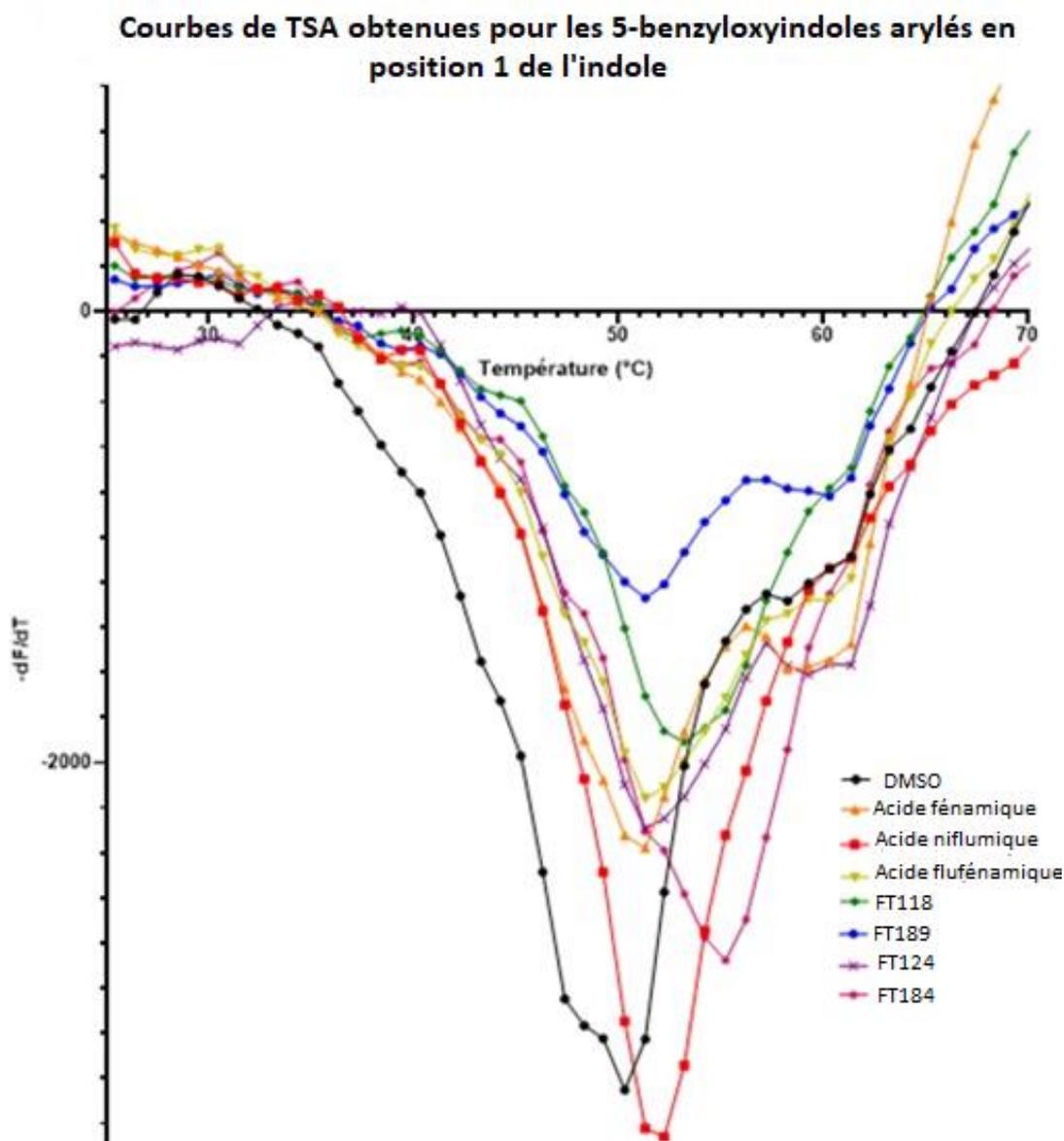


Figure 35: Courbes de TSA obtenus pour les 5-benzyloxyindoles arylés en position 1

CHAPITRE IV

Tableau 15: Résultats obtenus par TSA pour les composés arylés en position 1

Nom	Structure	ΔT_{m1} (°C)	ΔT_{m2} (°C)	Nom	Structure	ΔT_{m1} (°C)	ΔT_{m2} (°C)
Acide niflumique		1,9	/	FT184		4,5	/
Acide flufénamique		1,1	nm	FT216		4,4	/
Acide fénamique		0,8	1,1	FT217		2,5	/
FT118		3,9	/	FT218		nm	nm
FT189		1,9	1,6	FT222		2,7	/
FT124		1,7	1,3	FT223		/	3,0

nm : non mesurable

Les composés **FT117**, **FT214**, **FT215** et **FT220** n'ont pas donné de résultats reproductibles. Les acides fénamique, flufénamique et niflumique interagissent avec hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ avec des ΔT_m allant de +0,8 à +1,9 °C. Cependant, seul l'acide niflumique possède une seule température de dénaturation. Pobatti et *al.* ont observé, lors du trempage de hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ avec l'acide bromofénamique, un deuxième site d'interaction au niveau de l'interface 3 avec la présence d'une seconde densité électronique.⁹⁵ Il est possible que les dérivés d'acides flufénamiques testés présentent aussi un deuxième site d'interaction.

Nos composés interagissent avec hTEAD2 et montrent des ΔT_m très variables allant de +1,3 à +4,5 °C. La majorité des composés possédant une fonction acide en position *mé*ta (composés **FT118**, **FT184**, **FT216** et **FT217**) ainsi que les composés *para* **FT222** et **FT223** ne semblent avoir qu'une seule température de dénaturation.

CHAPITRE IV

2. Evaluation cellulaire

Les molécules synthétisées ont été testées à une concentration de 10 μM sur cellules HEK293T transfectées par le plasmide TEAD-luc reporter 8XGTIC-luciférase en triplicat (Figure 36).

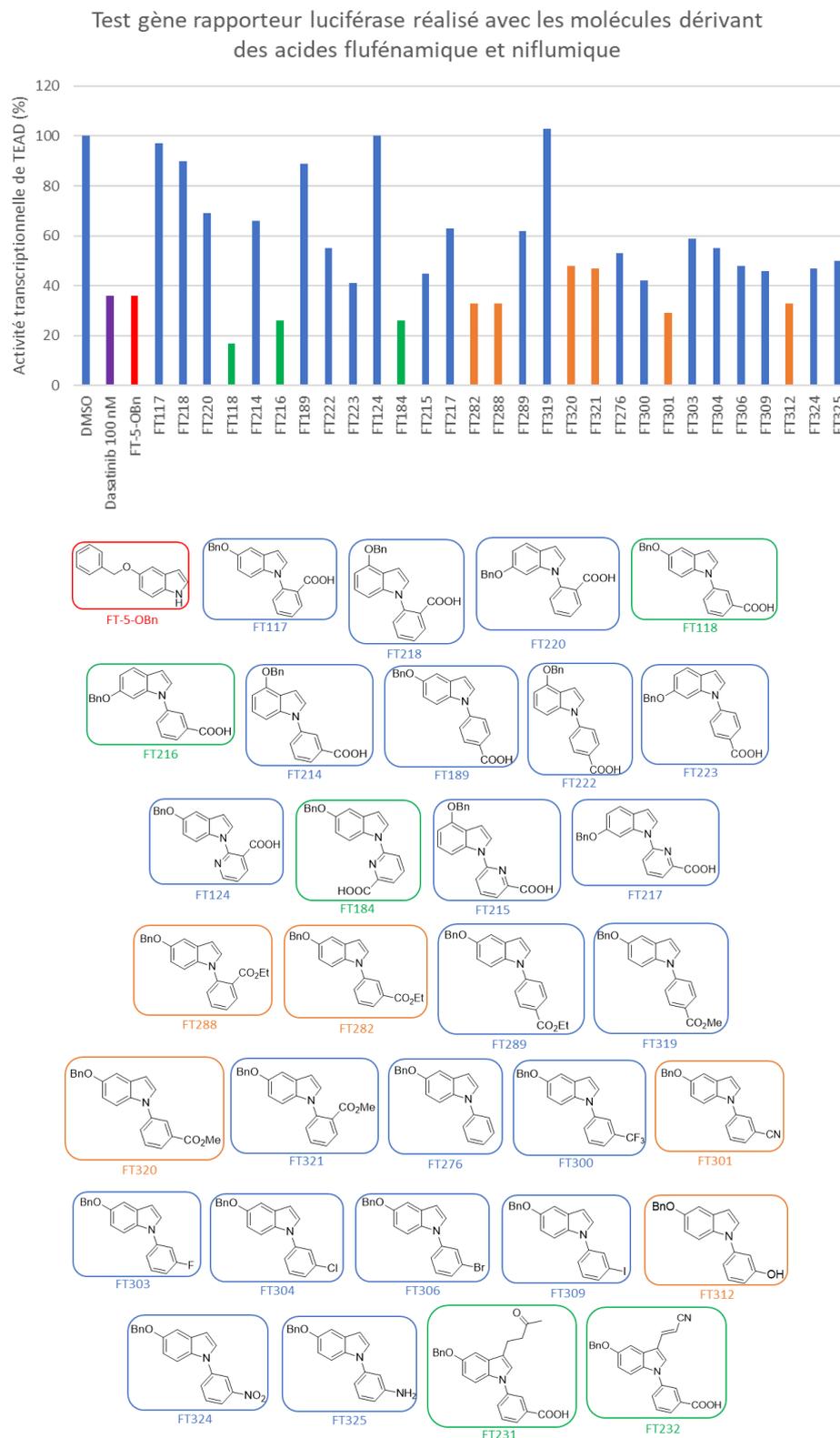


Figure 36: Résultats du test gène rapporteur à la luciférase réalisé sur les molécules arylées en position 1

CHAPITRE IV

FT118, **FT184** et **FT216** (possédant la fonction acide en position *mé*ta, en vert) se distinguent des autres en montrant une activité supérieure au 5-benzyloxyindole et en réduisant l'activité transcriptionnelle de TEAD à 17 et 26% respectivement. La modification de la fonction benzyle en position 6 sur le composé benzoïque (**FT216**) ne montre pas de perte de l'activité contrairement à la position 4 (**FT214**). Sur le composé picolinique, la modification sur les deux positions montre une réaugmentation de l'activité transcriptionnelle de TEAD à 45 et 63% (**FT215** et **FT217**).

Les résultats des esters éthyliques et méthyliques vont dans le même sens pour la position *mé*ta puisqu'une réduction de l'activité transcriptionnelle à 33 et 48% est observée avec les composés **FT282** et **FT320** (en orange). Cette inhibition est également du même ordre pour l'ester éthylique *ortho* **FT288** (en jaune).

La modulation de la fonction acide en position *mé*ta par d'autres motifs montre une perte d'activité sauf pour la fonction nitrile (**FT301**) et la fonction phénol (**FT312**) dont l'inhibition reste constante par rapport aux autres hits (29 et 33%).

Les composés trisubstitués **FT231** et **FT232** conservent une activité inhibitrice du même ordre que **FT118** avec l'activité transcriptionnelle de TEAD diminuée à 13 et 20% respectivement.

Ce quatrième chapitre a mis en lumière que les carboxyphényles et les carboxypyridinyles substitués en position *mé*ta **FT118**, **FT184** et **FT216**, leurs esters méthylique et éthyliques correspondants **FT282** et **FT320** ainsi que les composés trisubstitués **FT231** et **FT232** donnent les activités inhibitrices les plus importantes.

CHAPITRE V : EVALUATION BIOLOGIQUE DES MOLECULES LES PLUS ACTIVES

CHAPITRE V

Nous avons sélectionné les molécules les plus actives des chapitres 3 et 4 : **FT249** (substitué par un groupement vinylsulfonamide sur la position 3 de l'indole), **FT263** (son isomère en position 1 de l'indole), **FT264** (équivalent à **FT263** avec un carbone de plus sur la chaîne), **FT277** (chloroacétamide le plus actif), **FT118** (le 3-carboxyphényle le plus actif), **FT282** (son ester éthylique) et l'acide picolinique **FT184**.

Sur ces molécules, la concentration conduisant à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de TEAD de 50% a été mesurée dans le test gène rapporteur luciférase sur cellules HEK293T en prenant le 5-benzyloxyindole (**FT-5-OBn**) comme référence. Sur cellules MDA-MB-231, nous avons mesuré la capacité de nos molécules à ralentir la prolifération cellulaire et validé la cible (TEAD) en évaluant leur effet sur l'expression des protéines cibles (AXL, CYR61, CTGF et BIRC5).

Le gène AXL est impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire. Le gène BIRC5, également appelé Survivine, est un gène anti-apoptotique largement surexprimée dans les lignées cancéreuses notamment du sein et du poumon. Le gène CYR61 (CCN1) régule la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, la migration, et l'apoptose. Le gène CTGF (CCN2) régule, tout comme CYR61, l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération. Ces gènes sont des marqueurs critiques dans les cancers dans lesquels ils stimulent la survie, la migration, le caractère invasif, la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases.

I. Détermination des IC_{50} par test gène rapporteur luciférase

Des courbes dose-réponse de l'activité transcriptionnelle de TEAD sur cellules HEK293T ont été réalisées en triplicat technique (3 puits) de triplicat biologique (3 cultures cellulaires).

Le 5-benzyloxyindole présente une IC_{50} moyenne de 11,0 μ M. (Figure 37).

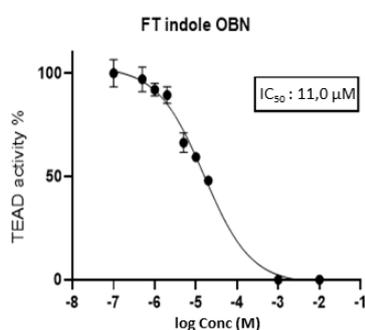


Figure 37: Courbes dose-réponse du 5-benzyloxyindole sur cellules HEK293T

Les vinylsulfonamides **FT249**, **FT263** et **FT264** présentent une courbe dose-réponse permettant de mesurer des DR_{50} (concentration de ligand nécessaire pour que 50% de la cible soit liée covalamment à ce ligand) nanomolaires. Peu de différences sont observées dues à la position ou à la longueur de chaîne. En revanche, la chloroacétamide **FT277** donne des sigmoïdes de faible amplitude

CHAPITRE V

ne permettant pas de mesurer avec précision une DR_{50} (Figure 38). A concentration élevée, un décrochement qui laisse à penser à d'autres événements cellulaires est visible sur l'ensemble des molécules (effet off-target).

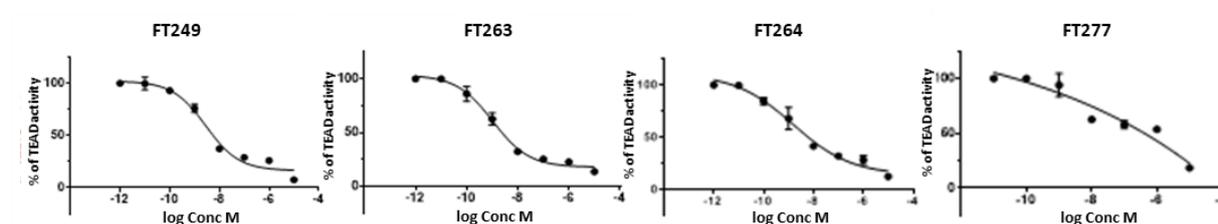


Figure 38: Dose-réponse avec le test gène rapporteur luciférase réalisé sur les composés **FT249**, **FT263**, **FT264** et **FT277**

La forte activité inhibitrice des vinyl sulfonamides est très encourageante car le seul composé possédant cette fonction et ayant été décrit, DC-TEAD02, diminue de 60% l'activité transcriptionnelle de TEAD à 10 μ M dans les mêmes conditions. L'acrylamide K-975 diminue de 70% l'activité du rapporteur CTGF à 10 μ M sur cellules cancéreuses NCI-2052.^{108,109} Quant au chloroacétamide, les résultats décrits par le groupe de Meroueh montrent que TED-347 inhibe de plus de 70% l'activité transcriptionnelle de TEAD4 à 5 μ M et d'environ 85% à 10 μ M sur cellules HEK293 bien que les conditions expérimentales diffèrent (Schéma 49).¹⁰⁵

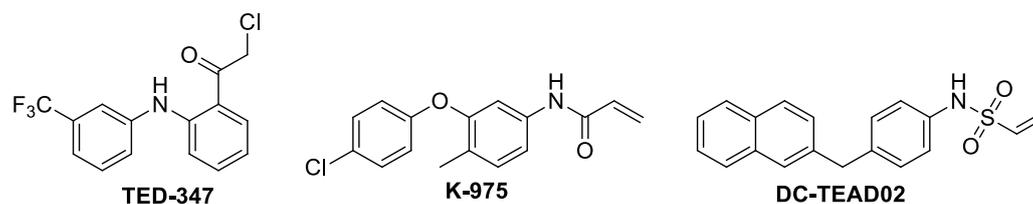


Schéma 49: Structures de TED-347, K-975 et DC-TEAD02

Les composés **FT118** et **FT184** présentent des courbes dose-réponse plus classiques qui permettent de mesurer des IC_{50} de 0,73 μ M et 1,01 μ M respectivement (Figure 39).

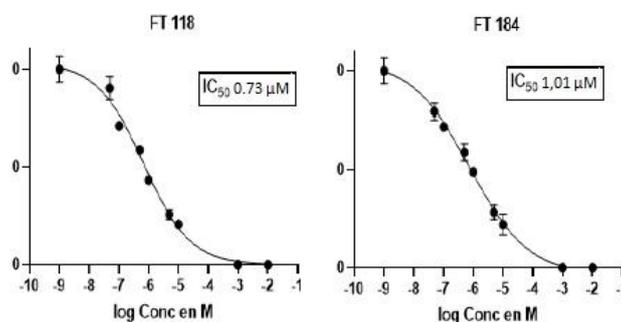


Figure 39: Dose-réponse avec le test gène rapporteur luciférase réalisé sur les composés **FT118** et **FT184**

Les molécules de référence, l'acide flufénamique et l'acide niflumique avaient été testées à une concentration de 150 μ M et avaient montré une inhibition de 50% et 90% respectivement.⁹⁵ Le LM98 décrit récemment par le groupe de Gagnon a quant à lui montré une inhibition de 25% à 10 μ M

CHAPITRE V

qui passe à 10% à 1 μM .⁹⁶ Aux vues de ces données, **FT118** et **FT184** sont donc largement compétitifs avec LM98.

Les composés trisubstitués **FT231** et **FT232** possèdent des IC_{50} proches de celles obtenues pour les composés **FT118** et **FT184** avec 1,1 μM et 1,8 μM respectivement (Figure 40).

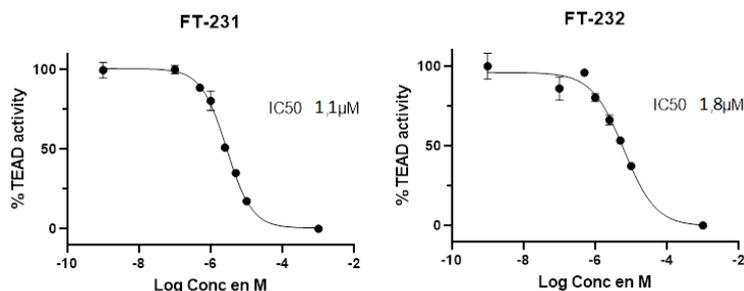


Figure 40: Dose-réponse avec le test gène rapporteur luciférase sur les composés FT231 et FT232

II. Tests sur cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231

1. Test de prolifération cellulaire

Les **5-benzyloxyindole**, **FT249**, **FT263**, **FT264**, **FT277** et **FT118** ont été testés à différentes concentrations sur cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 dans des conditions de croissance pendant 72 h en présence de 0,2% de sérum de veau fœtal (SVF). Les expériences ont été réalisées en triplicat technique (3 puits) de triplicat biologique (3 cultures cellulaires). L'évolution de la prolifération cellulaire suivie en temps réel est représentée sur les différents graphiques ci-dessous.

Le 5-benzyloxyindole a été testé à une gamme de concentration allant de 0,5 μM à 50 μM . Une diminution de la prolifération cellulaire est observée avec un effet dose jusqu'à 48 h. A 20 μM et 50 μM , des inhibitions de 45% et 67% respectivement sont mesurées. L' IC_{50} se situe donc entre ces deux concentrations (Figure 41).

CHAPITRE V

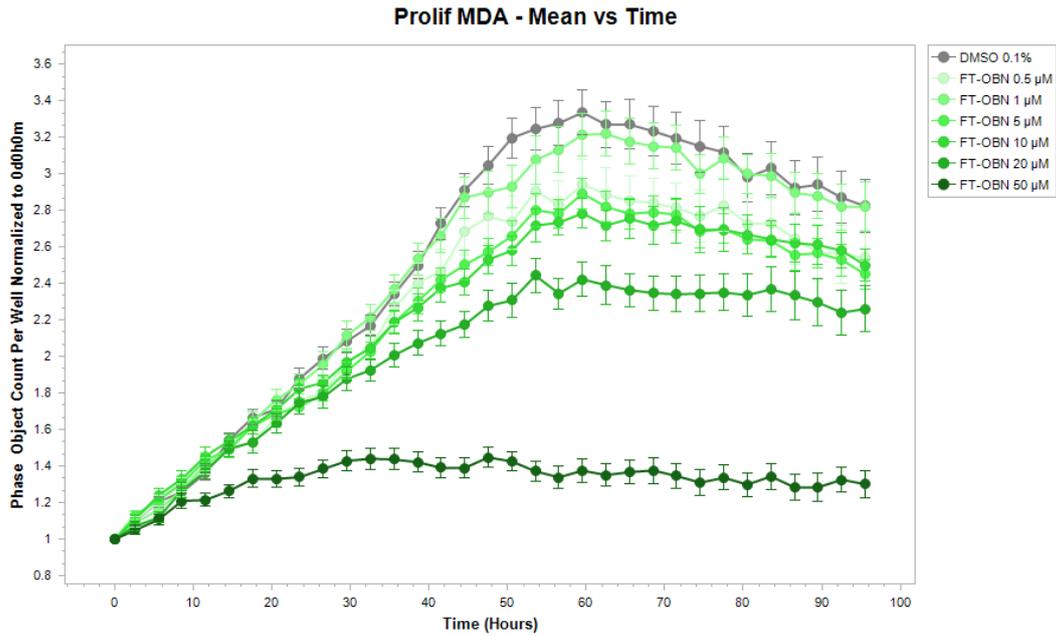
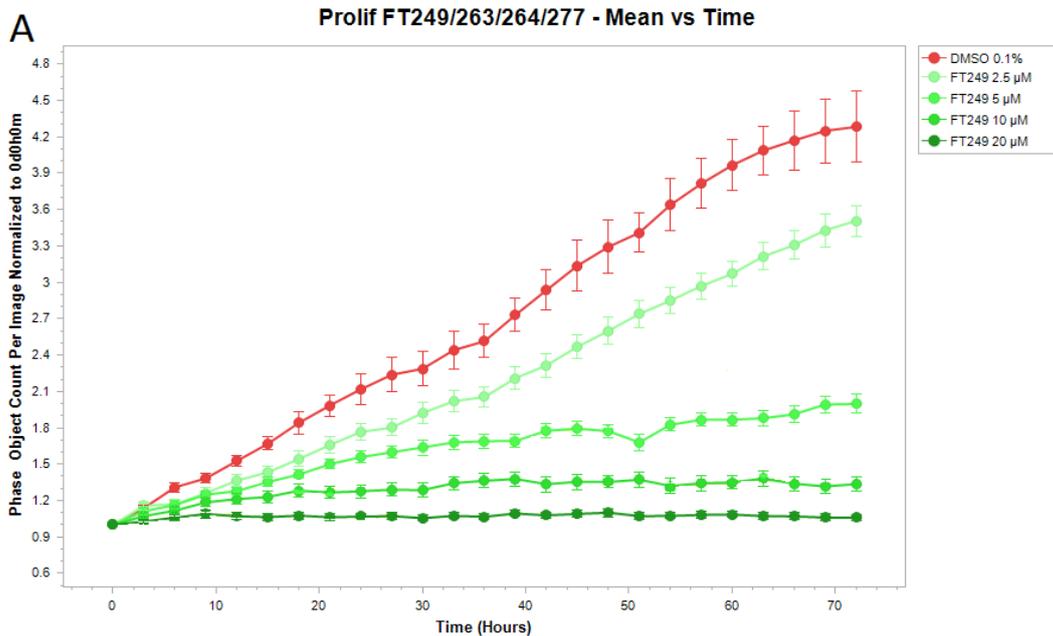
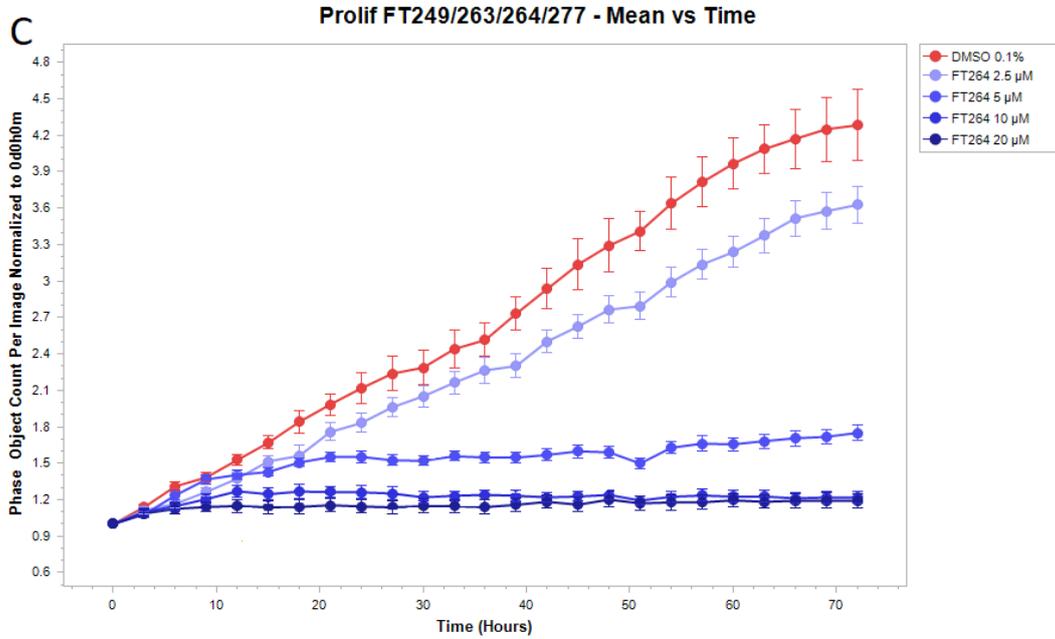
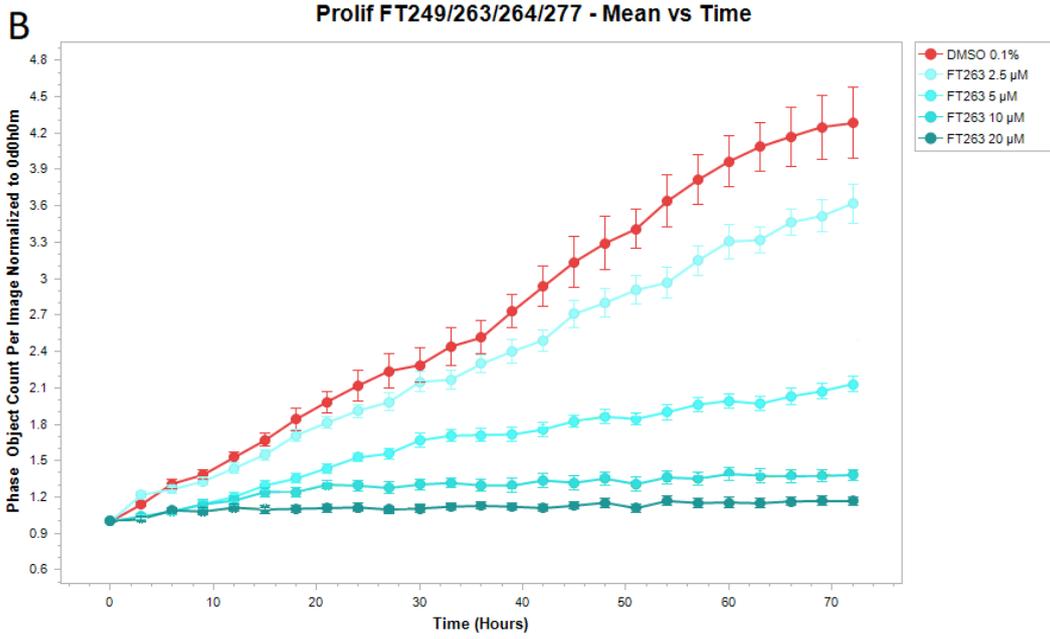


Figure 41: Evolution de la prolifération cellulaire sur cellules MDA-MB-231 en présence du 5-benzoyloxyindole

Les molécules **FT249**, **FT263**, **FT264** et **FT277** ont été testées en triplicat à des concentrations plus basses que le 5-benzoyloxyindole (2,5 ; 5 ; 10 et 20 µM). L'évolution de la prolifération cellulaire en présence des composés est représentée sur les Figure 42 **A**, **B**, **C** et **D**.



CHAPITRE V



CHAPITRE V

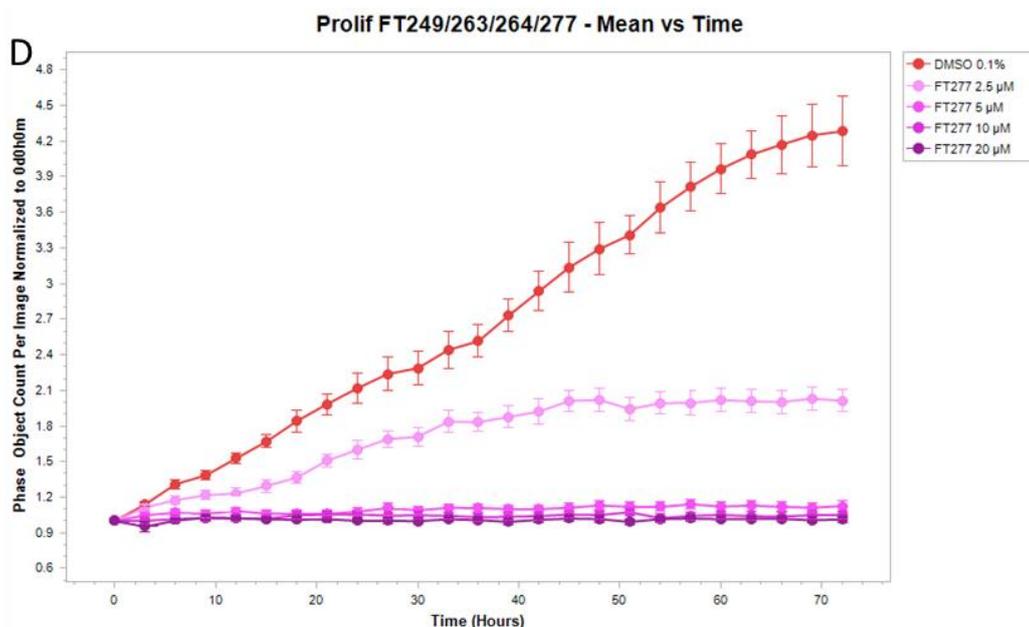


Figure 42: Evolution en temps réel de la prolifération de cellules MDA-MB-231 en conditions de croissance en présence des composés **FT249** (A), **FT263** (B), **FT264** (C) et **FT277** (D)

Comme précédemment avec le 5-benzyloxyindole, une diminution de la prolifération est observée en présence des quatre composés de manière dose-dépendante. Cependant, cette diminution est plus marquée. Une différence est notée avec le composé chloroacétamide **FT277** qui est plus toxique et qui est donc plus actif sur ce type cellulaire avec une DR_{50} proche de 2,5 μM (environ 50% d'inhibition à 48 h) contre une DR_{50} comprise entre 2,5 et 5 μM pour les vinyl sulfonamides.

La molécule **FT118** a été testée à différentes concentrations (2,5 ; 5 ; 10 ; 20 et 50 μM). L'évolution de la prolifération cellulaire suivie en temps réel a été représentée sur la Figure 43.

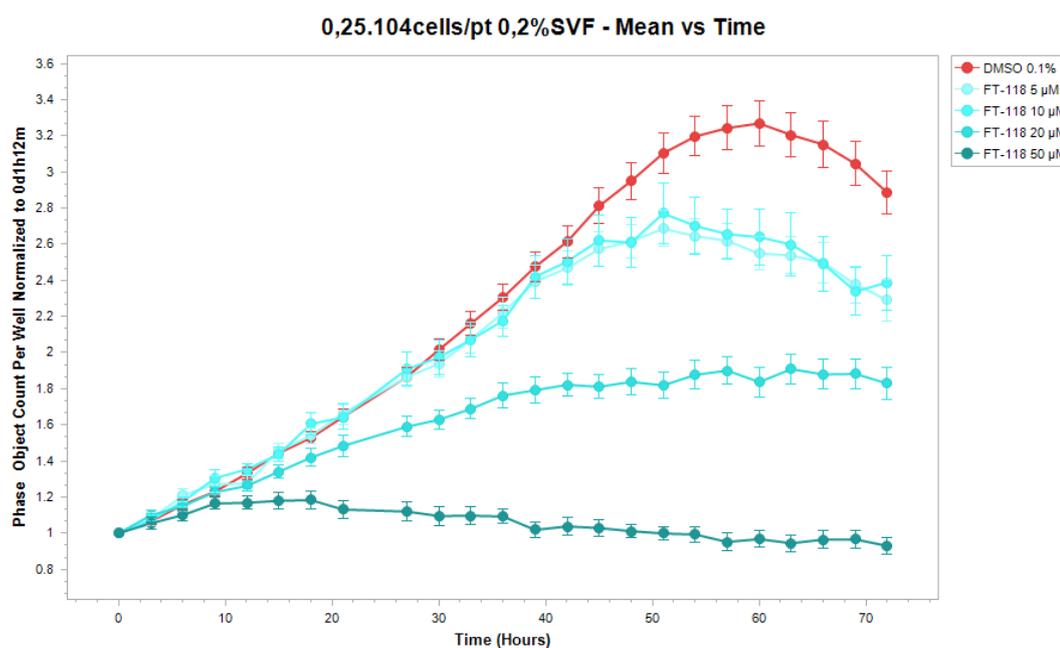


Figure 43: Evolution en temps réel de la prolifération de cellules MDA-MB-231 en conditions de croissance en présence du composé **FT118**

CHAPITRE V

Une diminution de la prolifération de manière dose-dépendante est également observée avec ce composé. Cependant, celui-ci montre une toxicité à 50 μM puisqu'il est clairement possible de voir une décroissance rapide de la courbe. La valeur de l' IC_{50} est proche de 20 μM avec 45% d'inhibition à 48 h.

2. Effet sur les gènes cibles

L'effet des composés à 10 μM (et parfois à 20 μM) sur l'expression protéique des gènes cibles AXL, CTGF, BIRC-5 et CYR61 a été mesurée sur cellules MDA-MB-231 par Western Blot à 48 h dans les mêmes conditions de croissance que précédemment (Figure 44 et Figure 45).

De manière attendue, le **5-benzyloxyindole** montre peu d'inhibition de l'expression des gènes cible AXL et CYR61 (18% et 6% respectivement) et même aucune inhibition du gène CTGF. L'effet le plus visible concerne le gène BIRC5 avec 40% d'inhibition.

FT263 inhibe significativement la production des deux CCN (CTGF et CYR61) mais a peu d'effet sur AXL et BIRC5 alors que **FT249** a un effet modéré sur les deux CCN et sur BIRC5. L'allongement de la chaîne (**FT264**) ne semble pas avoir d'effet sur la production des gènes cibles. Ces résultats sont à mettre en regard de l'inhibition nanomolaire de l'activité transcriptionnelle de TEAD de ces molécules. Ces molécules ont vraisemblablement un effet plus modeste sur l'activité transcriptionnelle de TEAD en cellules MDA-MB-231. En comparaison, DC-TEAD-02 inhibe de 20 et 30% respectivement l'expression des gènes cibles CTGF et CYR61 à 10 μM sur cellules de carcinomes du côlon (HCT-116).¹⁰⁸

FT277 à 10 μM , inhibe significativement AXL, CTGF et BIRC5. L'action conjuguée sur ces trois gènes aux fonctions différentes se traduit par une meilleure activité sur la prolifération cellulaire des cellules MDA-MB-231 que les composés **FT249**, **FT263** et **FT264**. Comparativement, TED-347 à la même concentration inhibe de 40% l'expression du gène CTGF sur cellules de gliomes humaines (GBM43).¹⁰⁵

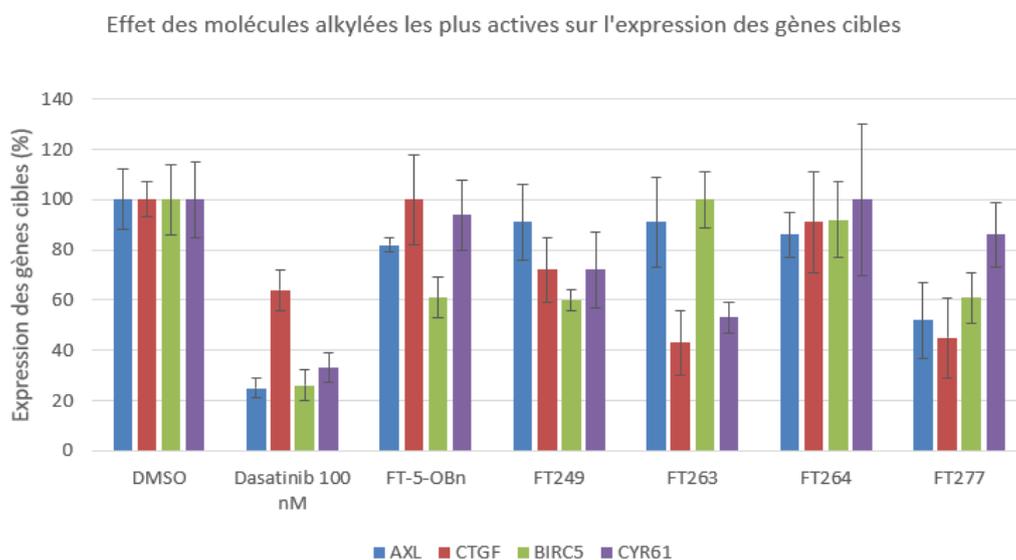


Figure 44: Effets des composés **FT-5-OBn**, **FT249**, **FT263** et **FT264** sur l'expression des gènes cibles

CHAPITRE V

FT118 ne diminue que l'expression de CYR61 de manière dose-dépendante alors que **FT282** a un effet sur les deux gènes CCN. Nous pouvons nous attendre à ce que **FT282** soit plus actif sur la prolifération cellulaire de MDA-MB-231 que **FT118**. LM98 développé par le groupe de Gagnon impacte, sur la même lignée cellulaire, de 60% et 40% respectivement l'expression des gènes cibles CTGF et CYR61 à 10 μ M.

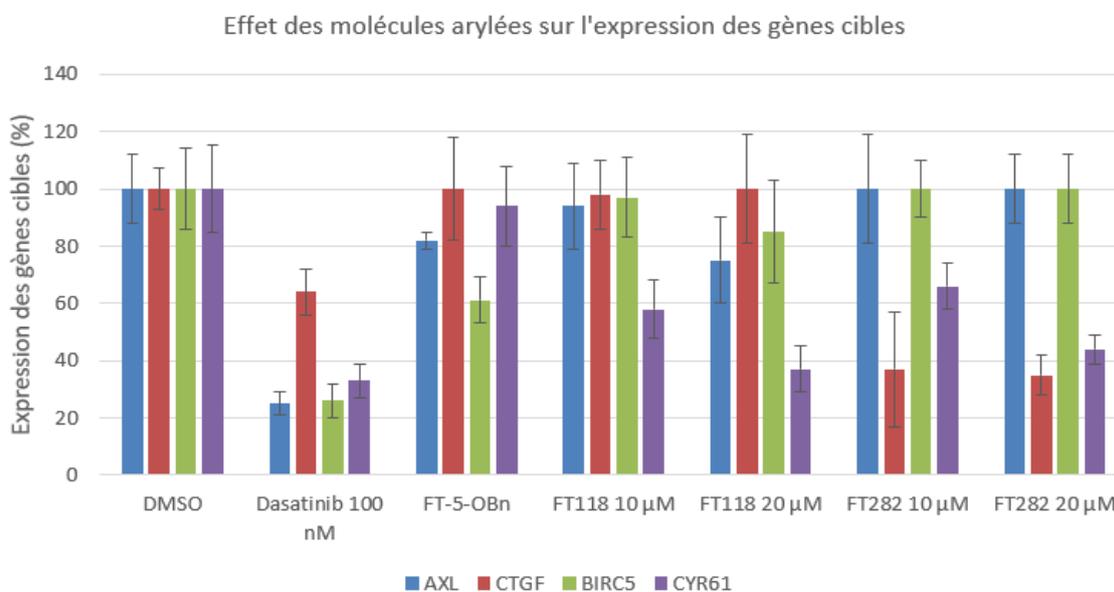


Figure 45: Effets des composés **FT-5-OBn**, **FT118** et **FT282** sur l'expression des gènes cibles

Pour ce chapitre, nous pouvons conclure que la diversité des résultats observés entre les différentes méthodes utilisées montre que la cible de nos molécules reste encore à confirmer. Pour les molécules covalentes **FT249** et **FT264**, une inhibition de l'activité transcriptionnelle de TEAD sur cellules HEK293T ainsi qu'une diminution de la prolifération sur cellules MDA-MB-231 nous a permis de déterminer des DR_{50} nanomolaires et entre 2,5 et 5 μ M respectivement. Cependant, peu d'effet sont observés sur l'expression des gènes cibles de TEAD. Les courbes dose-réponse de l'activité transcriptionnelle de TEAD en présence de l'ensemble des molécules menant à des liaisons covalentes (**FT249**, **FT263**, **FT264** et **FT277**) montrent également des incohérences avec des décrochages à forte concentration ne pouvant pas être pris en compte dans la mesure de la DR_{50} . Ces décrochages sont vraisemblablement dus à d'autres événements cellulaires ciblés indépendamment de la voie Hippo à l'instar de la molécule **FT277** dont la courbe dose-réponse montre une faible amplitude. **FT-OBn**, **FT118**, **FT184** et **FT282** ont montré des résultats cohérents avec des courbes dose-réponse au micromolaire et des effets médians sur la prolifération et l'expression des gènes cibles ce qui tend à penser que la cible de ces composés est bien TEAD.

CHAPITRE VI : TREMPAGE DES COMPOSES AVEC HTEAD2

CHAPITRE VI

Des cristaux de hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ préalablement formés ont été trempés avec l'ensemble des composés synthétisés. Neuf d'entre eux ont cristallisés avec la protéine avec des résolutions allant de 1,93 à 2,63 Å.

I. Structures cristallographiques

1. Structures cristallographiques des composés substitués en position 1 de l'indole

La molécule **FT53** s'insère dans la poche palmitate avec la chaîne acide tournée vers l'entrée de la poche (Figure 46 A). L'acide carboxylique forme une liaison hydrogène entre la fonction acide de **FT53** et l'atome d'hydrogène de la fonction thiol de C380 (distance = 2,46 Å). La fonction acide est également proche de la fonction amine de K357 et de la fonction alcool de S345 (3,41 Å et 4,13 Å de distance entre les 2 fonctions respectivement). Le benzyle, quant à lui, reste proche de F428 de la même manière que le 5-benzyloxyindole. La structure obtenue est parfaitement superposable à celles du 5-benzyloxyindole et de l'acide palmitique (Figure 46 B).

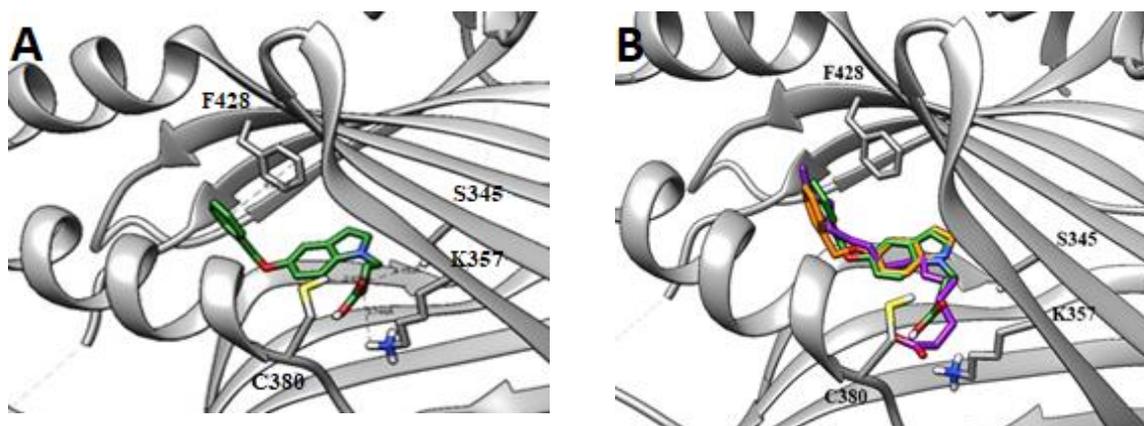


Figure 46: (A) Structure cristallographique du composé **FT53** avec hTEAD2 et (B) superposition de **FT53** (en vert) avec le 5-benzyloxyindole (en orange) et l'acide palmitique (en violet) (code PDB :5HGU)

Le **FT269** se positionne de la même manière que le **FT53** avec la chaîne alkyle tournée vers l'entrée de la poche (Figure 47). Parmi les interactions entre ce ligand et la protéine, une liaison hydrogène est visible entre l'atome d'oxygène de la fonction amide de **FT269** et l'atome d'hydrogène de la fonction thiol de C380 (distance = 1,586 Å). La fonction benzyle reste également proche de F428.

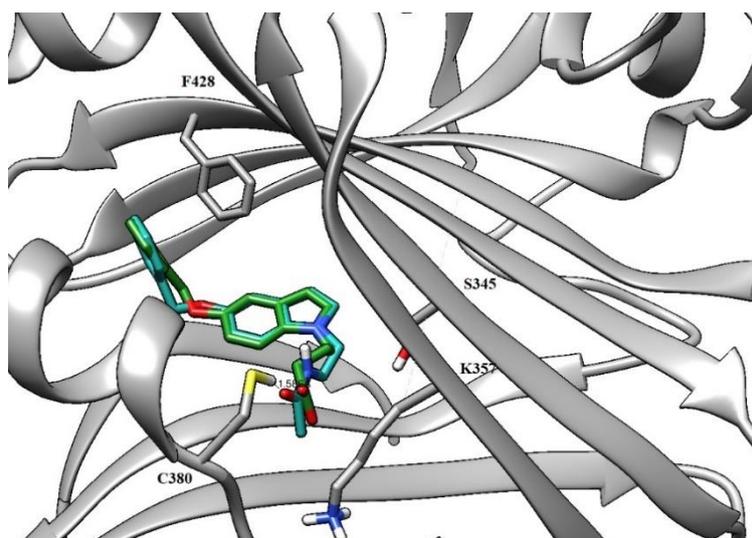
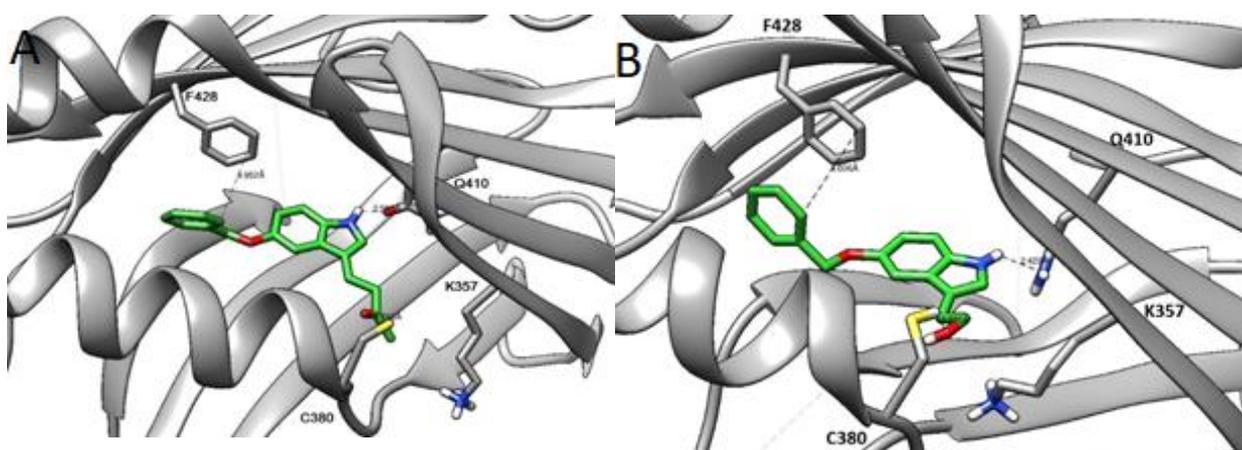


Figure 47: Superposition de la structure cristallographique de **FT53** (en vert) et **FT269** (en bleu)

2. Structures cristallographiques de composés non-covalents substitués en position 3 de l'indole

Un rapprochement entre l'hydrogène porté par l'azote libre de l'indole et Q410 (distance $\approx 2,5$ Å) est observé avec les composés (**FT90**, **FT112** et **FT196**) du fait de l'inversion du noyau indolique par rapport aux molécules précédentes. Cette inversion est due à la position 3 de la chaîne hydrophile qui s'oriente de manière à interagir avec les acides aminés à l'entrée de la poche. Des liaisons hydrogènes sont observés entre l'hydrogène de la fonction thiol de C380 et les oxygènes des fonctions cétone, alcool et ester des composés cités précédemment (distance $\approx 1,7$ Å) (Figure 48 **A**, **B** et **C**).



CHAPITRE VI

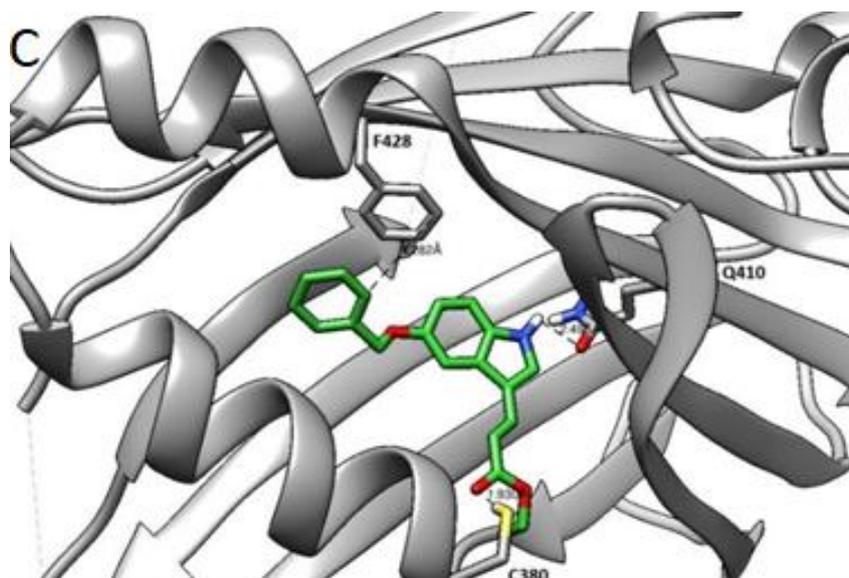


Figure 48: Structures cristallographiques des composés **FT90** (A), **FT112** (B) et **FT196** (C)

Pour le composé **FT238**, l'interaction avec Q410 n'est plus observée mais la fonction sulfonamide est, cette fois, proche de la fonction amine de K357 et de la fonction thiol de C380 (distance $\approx 2,8$ Å) (Figure 49).

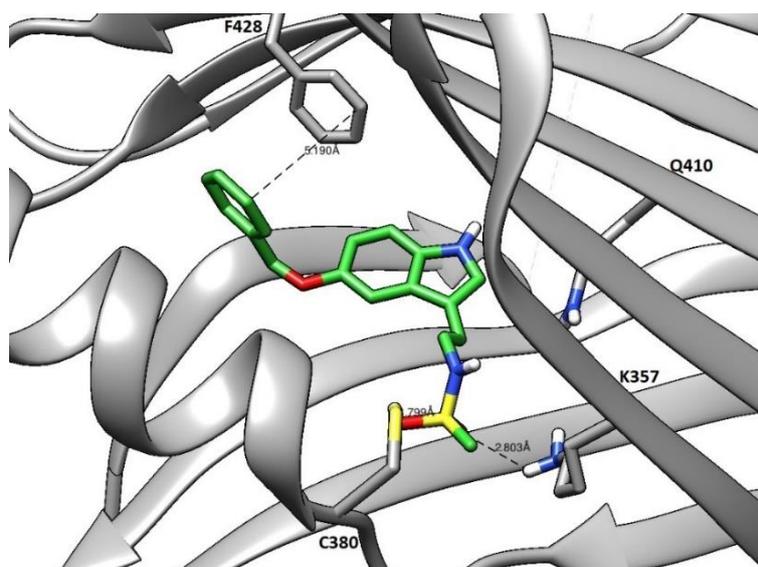


Figure 49: Structure cristallographique du composé **FT238**

Enfin, le composé **FT268** a lui aussi cristallisé en présence de la protéine hTEAD2. Cependant, son site d'interaction n'est pas la poche interne mais l'interface 3 (Figure 50 A et B).

CHAPITRE VI

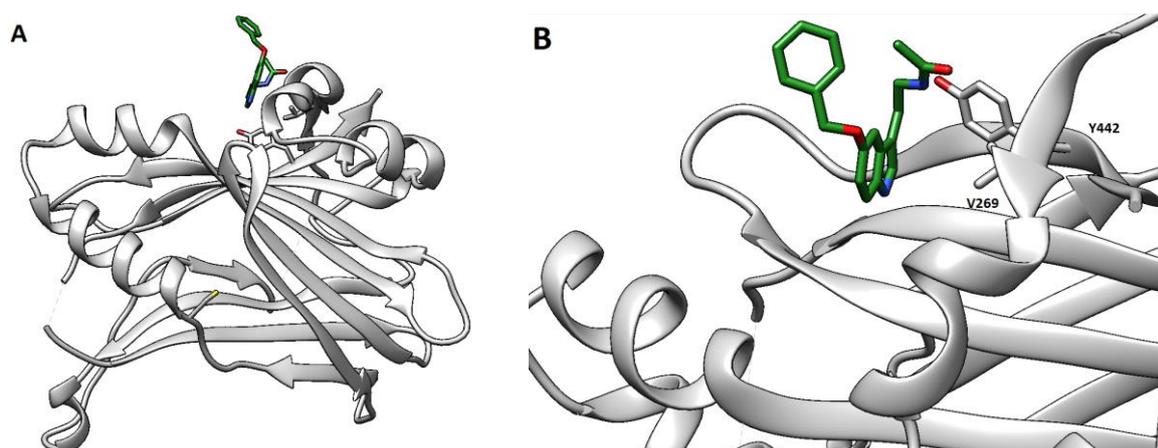


Figure 50: Structure cristallographique du composé **FT268**

Après le fragment F201 (identifié par l'équipe du Pr. Guichou durant le criblage qui a permis d'identifier le 5-benzyloxyindole), c'est la seconde structure cristallographique montrant l'interaction d'une petite molécule au niveau de l'interface 3 de TEAD. **FT268** semble interagir avec TEAD2 majoritairement de manière hydrophobe (avec les acides aminés V269 et Y442). Cette structure ne possède pas d'acide palmitique ou myristique à l'intérieur de la poche.

3. Structures cristallographiques de composés covalents substitués en position 3 de l'indole

Les structures cristallographiques des composés **FT271** et **FT275** montrent la formation d'une liaison covalente entre C380 et les fonctions acrylamide et chloroacétamide respectives (Figure 51).

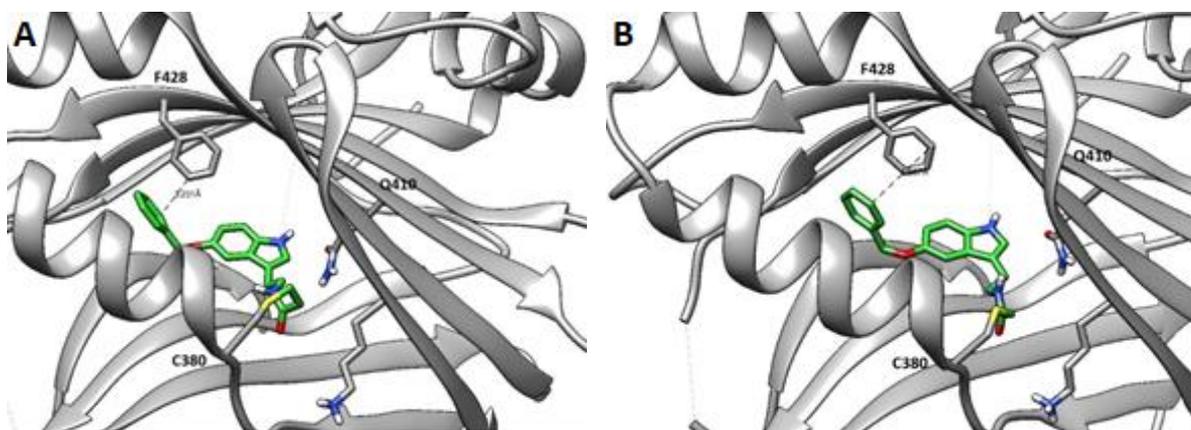


Figure 51: Structures cristallographiques des composés **FT271** et **FT275**

II. Docking

1. Docking des molécules cristallisées

Les molécules cristallisées ont été dockées dans hTEAD2 et les autres hTEAD puis comparées aux structures cristallographiques obtenues. Les scores de docking ainsi que la cible des composés sont décrits dans le Tableau 16.

CHAPITRE VI

Tableau 16: Scores de docking et cible des composés cristallisés avec hTEAD2

	TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4
FT53	-9,1/Poche interne	-9,4/Poche interne	-5,3/ Sous-interface 3	-9,3/Poche interne
FT90	-9,5/Poche interne	-9,5/Poche interne	-6,1/ Sous-interface 3	-9,3/Poche interne
FT112	-8,5/Poche interne	-8,8/Poche interne	-7,9/Poche interne	-8,6/Poche interne
FT196	-5,8/ Interface 2	-9,0/Poche interne	-6,3/ Sous-interface 2	-8,8/Poche interne
FT238	-7,2/Interface 3	-9,6/Poche interne	-6,7/ Sous-interface 2	-9,4/Poche interne
FT268	-5,9/ Interface 2	-9,1/Poche interne	-7,3/ Sous-interface 2	-9,1/Poche interne
FT269	-9,5/Poche interne	-9,6/Poche interne	-8,7/Poche interne	-8,9/Poche interne
FT271	-6,9/ Interface 3	-9,4/Poche interne	-6,8/ Interface 3	-8,8/Poche interne
FT275	-7,4/ Interface 3	-9,7/Poche interne	-5,5/ Interface 3	-9,3/Poche interne

L'ensemble des composés, y compris **FT268**, a abouti à une pose dans la poche de hTEAD2 avec d'excellents scores allant de -8,8 à -9,7. L'interaction au niveau de l'interface 3 pour ce composé était donc non prévisible. Les autres composés ont conduit à des poses dans la poche interne de hTEAD2 proches de celles obtenues dans les structures cristallographiques. Le docking dans les autres TEAD montre que la plupart de ces composés semblent également pouvoir cibler TEAD4 mais difficilement TEAD1 (pour la plupart des composés ayant l'azote de l'indole libre) et TEAD3 (dû à l'encombrement par Y230). Seules **FT112** et **FT269** semblent être *pan*-TEAD.

2. Docking des molécules les plus actives

Le docking non-covalent des hits **FT249**, **FT263**, **FT264**, **FT277**, **FT118**, **FT282** et **FT320** a été réalisé sur les modèles TEADx_GP. Le but de ce docking est de prévoir, d'anticiper ou d'expliquer une éventuelle sélectivité pour un ou plusieurs membres de la famille TEAD mesurée lors des résultats biologiques.

Les scores de docking ainsi que la cible des composés sont décrits dans le Tableau 17.

Tableau 17: Scores de docking et cible des composés les plus actifs

	TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4
FT249	-6,7/Interface2	-9,6/Poche interne	-6,0/Sous-interface3	-9,2/Poche interne
FT263	-8,7/Poche interne	-9,5/ Poche interne	-7,9/Poche interne	-9,6/ Poche interne
FT264	-9,5/Poche interne	-10,0/Poche interne	-6,2/Sous-interface 2	-9,4/Poche interne
FT277	-9,5/ Poche interne	-9,7/ Poche interne	-6,1/Sous-interface2	-9,4/Poche interne
FT118	-9,8/Poche interne	-10,3/ Poche interne	-9,6/ Poche interne	-11,2/ Poche interne
FT184	-10,9/Poche interne	-11,3/Poche interne	-9,6/Poche interne	-11,3/Poche interne
FT282	-10,9/Poche interne	-10,7/Poche interne	-8,2/Poche interne	-11,0/ Poche interne
FT320	-9,4/ Poche interne	-9,5/ Poche interne	-8,9/ Poche interne	-10,9/ Poche interne

CHAPITRE VI

Les résultats montrent que **FT249** se distingue des autres et pourrait être sélectif de TEAD2/4 alors que son isomère en position 3 **FT263** serait *pan*-TEAD. L'allongement de la chaîne paraît avoir son importance car les composés **FT264** et **FT277** possédant un carbone supplémentaire ferait perdre l'affinité avec TEAD3.

Les interactions observées entre les différentes molécules à l'intérieur de la poche interne des TEAD sont très proches (Figure 52, Figure 53 et Figure 54).

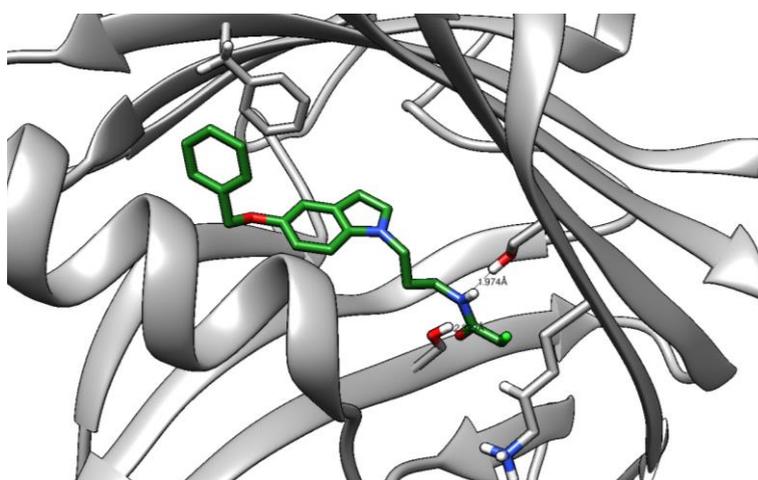


Figure 52: Docking de **FT277** dans le modèle TEAD2_GP

La molécule **FT277** dans la poche interne de TEAD2 montre des rapprochements entre la fonction chloroacétamide et S331 et S345. Cette fonction est également proche de K357. Le groupement benzyloxy conserve quant à lui le π -stacking avec la F428 (Figure 52).

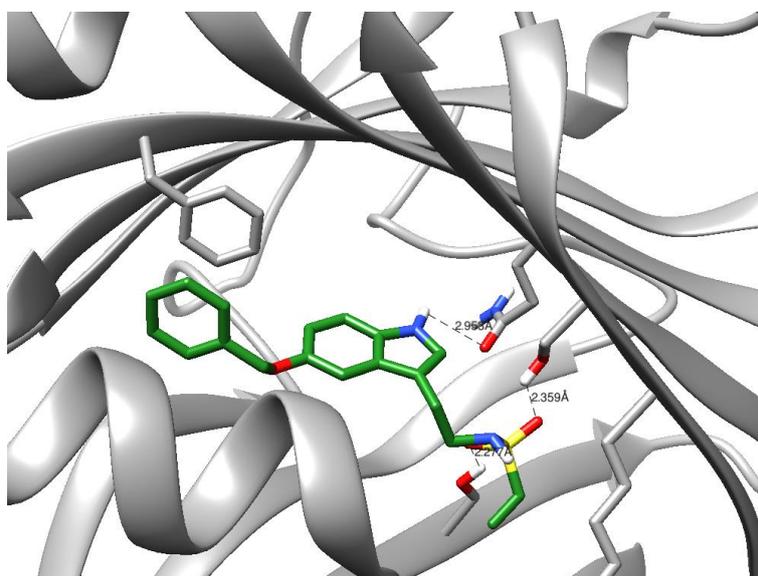


Figure 53: Docking de **FT249** dans TEAD2_GP

FT249 a la particularité d'être la seule molécule substituée en position 3 ; laissant ainsi l'hydrogène porté par l'azote de l'indole libre d'interagir avec Q410. L'absence de cet acide aminé dans

CHAPITRE VI

TEAD1 (remplacé par L389) et l'encombrement de la poche de TEAD3 par Y230 pourraient expliquer le fait que la molécule n'interagisse pas au niveau des poches internes de TEAD1 et TEAD3 (Figure 53).

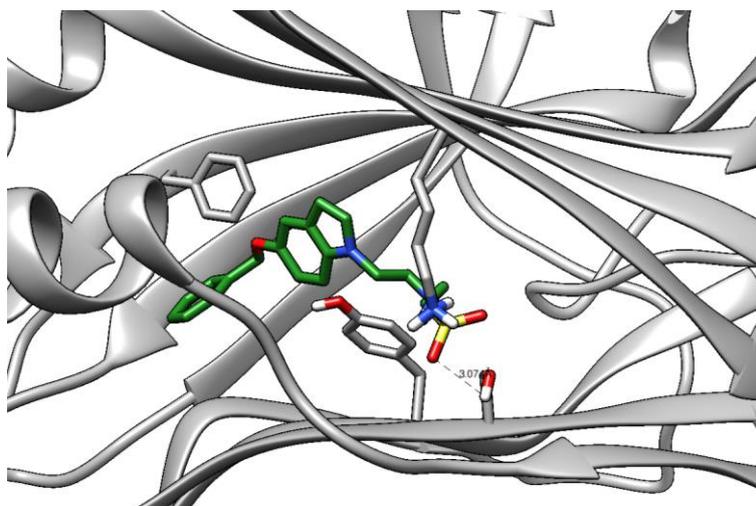


Figure 54: Docking de **FT263** dans *TEAD3_GP*

Enfin, **FT263** interagit au niveau de la poche interne des quatre TEAD y compris TEAD3 mais fournit un score plus faible que pour les autres TEAD. Ce score s'explique par l'encombrement de la Y230 qui provoque un déplacement du noyau indolique et la perte de plusieurs liaisons dont le π -stacking avec F416 et la liaison hydrogène avec T333 (F428 et S345 dans TEAD2) (Figure 54).

De manière générale, sur l'ensemble des docking présentés ci-dessus, il est constaté que la chaîne latérale polaire n'interagit pas vers la cystéine située à l'entrée de la poche mais interagit avec l'espace inoccupé de la sous-poche hydrophile.

Les molécules **FT118**, **FT184**, **FT282** et **FT320** montrent d'excellents scores. Contrairement aux molécules alkylées vues précédemment, cette famille de molécules possède une pose dans la poche palmitate de TEAD3. Ces molécules pourraient donc être *pan*-TEAD. L'aryle est tourné vers l'entrée de la poche avec la fonction ester ou acide proche de la cystéine et la lysine situés à l'entrée (Figure 55).

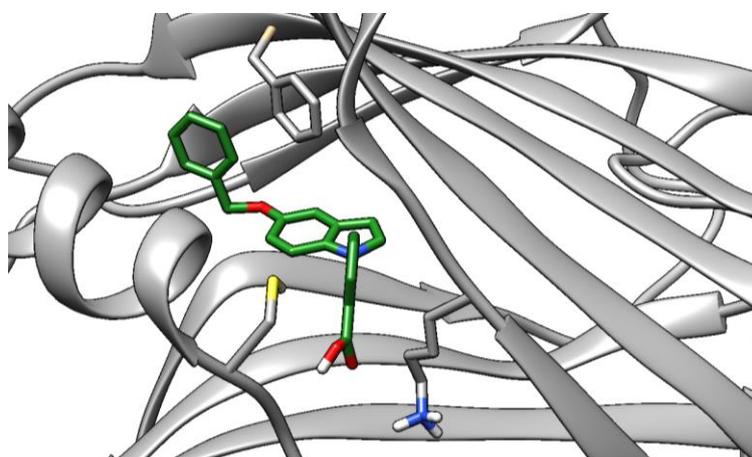


Figure 55: Docking de **FT118** dans le modèle *TEAD3_GP*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le premier chapitre, nous avons déterminé des différences structurales au sein de la poche interne des quatre TEAD ainsi qu'au niveau d'autres zones de la partie C-terminale. Au niveau de la poche interne, des différences notables d'acides aminés entre les quatre TEAD engendrent une modification de la forme de la poche et de son volume. Deux boucles flexibles A et B ont également attiré notre attention aux vues des différences d'acides aminés. La taille de la boucle A varie car elle comporte douze acides aminés de plus pour hTEAD2 et elle n'est résolue sur aucune structure cristallographique. Des modèles utilisables pour le docking de molécules volumineuses (TEADx_GP) et comportant ces boucles ont été construits et validés sur les molécules sélectives publiées récemment dans la littérature.

Dans un deuxième chapitre, nous avons fait varier le groupement benzyloxy afin d'étudier la profondeur de la sous-poche hydrophobe de la poche interne de TEAD. Douze composés présentant des groupements arylalkyles ou alkyles de taille variable ont été synthétisés à partir du 5-hydroxyindole soit par substitution nucléophile soit par réaction de Mitsunobu avec des rendements allant de 9 à 96%. Le test cellulaire gène rapporteur luciférase a permis de mettre en évidence que les 4- et 5-benzyloxyindoles possèdent les potentiels inhibiteurs les plus élevés avec l'activité transcriptionnelle de TEAD chutant à 34 et 35% respectivement.

Dans un troisième chapitre, nous nous sommes inspirés de la superposition du 5-benzyloxyindole et de l'acide palmitique afin d'imaginer des ligands palmitique-like. Au total, trente composés contenant une chaîne avec un groupement hydrophile terminal en position 1 et 3 du 5-benzyloxyindole ont été synthétisés avec des rendements allant de 2 à 93%. Les seules fonctions qui semblent améliorer l'activité cellulaire sont l'acrylonitrile et l'ester acrylique en position 3 ou les ω -aminoalkyles en position 1. La fonctionnalisation des 5-benzyloxyindoles en chloroacétamides (**FT275-FT277**) et en vinyl sulfonamides (**FT249, FT263 et FT264**) permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de TEAD de plus de 80%.

Dans un quatrième chapitre, nous avons développé la fonctionnalisation de la position 1 du 5-benzyloxyindole par réaction d'Ullmann pour la synthèse des dérivés carboxyphényles et carboxypyridinyles. Ces molécules proviennent de la superposition des structures cristallographiques du 5-benzyloxyindole et des acides niflumiques. Trente et un composés ont donc été synthétisés. Les composés 3-carboxyphényle (**FT118**) et acide 6-picolinique (**FT184**) réduisent considérablement l'activité transcriptionnelle de TEAD à 17 et 26%. Les esters méthyliques (**FT320**), éthyliques (**FT282**) ainsi que le benzonitrile (**FT301**) et le phénol (**FT312**) réduisent l'activité transcriptionnelle de TEAD de 70% environ. Les composés trisubstitués **FT231** et **FT232**, basés sur la fusion des meilleurs résultats

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

des chapitres 3 et 4, réduisent l'activité transcriptionnelle à 13 et 20% respectivement (du même ordre que **FT118**).

L'évaluation des composés les plus actifs a débuté par la détermination de la concentration conduisant à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de TEAD de 50% (IC_{50}/DR_{50}) dans le test gène rapporteur luciférase sur cellules HEK293T. **FT-5-OBn** présente une IC_{50} de 11 μ M et les inhibiteurs non-covalents sont environ dix fois plus actifs (**FT118**, **FT184**, **FT231** et **FT232**). Les composés interagissant covalamment (**FT249**, **FT263** et **FT264**) possèdent des DR_{50} largement supérieures situées entre 1 et 10 nM (sans la prise en considération d'un décrochage à haute concentration) à l'exception du chloroacétamide **FT277** dont la faible amplitude de la courbe ne permet pas de mesurer une DR_{50} . L'évaluation sur cellules MDA-MB-231 a permis de quantifier le ralentissement de la prolifération cellulaire en présence de nos molécules avec des IC_{50}/DR_{50} entre 2,5 μ M (pour **FT277**) et 50 μ M (**FT-5-OBn**). La mesure de l'expression des protéines cibles (AXL, CYR61, CTGF et BIRC5) sur cette même lignée cellulaire montre des résultats difficilement interprétables. Le **5-benzyloxyindole** montre peu d'effet avec 40% d'inhibition du gène BIRC5. Les trois vinyl sulfonamides ont des effets très différents avec **FT263** qui inhibe significativement CTGF et CYR61 alors que **FT249** a un effet modéré sur CTGF, CYR61 et BIRC5 et **FT264** perd presque totalement toute l'activité inhibitrice. Le chloroacétamide **FT277** inhibe quant à lui significativement AXL, CTGF et BIRC5. Enfin, **FT118** inhibe uniquement l'expression du gène CYR61 alors que son ester **FT282** a également un effet sur CTGF. Les différents tests biologiques réalisés semblent montrer que nos molécules n'agissent pas seulement sur TEAD.

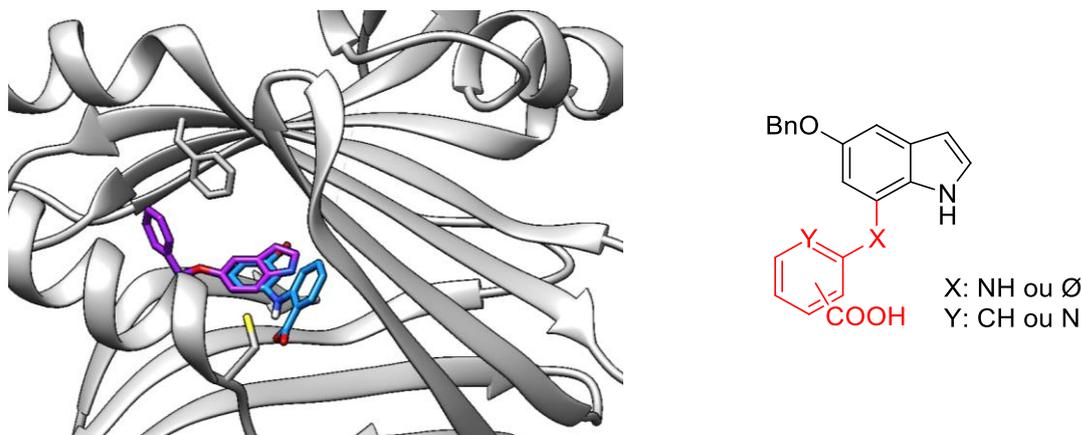
Le trempage de l'ensemble des composés avec des cristaux de hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ a permis l'obtention de neuf nouvelles structures cristallographiques. Parmi ces structures, deux composés interagissent de manière covalente avec la cystéine à l'entrée de la poche palmitate (**FT271** et **FT275**) et un composé (**FT268**) a cristallisé au niveau de l'interface 3 en interagissant par liaisons hydrophobes. Les huit molécules ayant cristallisé à l'intérieur de la poche interne ont toutes la chaîne greffée tournée vers l'entrée de la poche et proche de C380.

Le docking de ces composés dans les modèles TEAD2_GP a montré une bonne superposition par rapport aux structures cristallographiques à l'exception de **FT268** dont la cristallisation au niveau de l'interface 3 était non prévisible. Le docking dans les autres TEAD montre une potentielle sélectivité avec peu de molécules interagissant dans la poche de TEAD1 et TEAD3. Le docking des composés les plus actifs montre également une possible sélectivité de **FT249** pour TEAD2 et 4 et de **FT264** et **FT277** pour TEAD1, 2 et 4 alors que **FT263**, **FT118** et ses esters semblent être *pan*-TEAD.

La superposition du 5-benzyloxyindole avec l'acide bromofénamique (Figure 56) ouvre la voie à une nouvelle famille de 5-benzyloxyindoles substitués en position 7. La synthèse du 5-benzyloxy-7-

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

bromoindole ainsi que sa substitution par des acides (amino)benzoïques ou (amino)nicotiniques pourraient compléter le travail entamé sur la substitution en position 1 de l'indole.



L'initiation de la synthèse des ligands trisubstitués sera également poursuivie avec d'autres groupements. L'idée jusqu'à présent était de fonctionnaliser la position 1 de l'indole avec un groupement aryle et la position 3 avec une chaîne alkyle. A la vue du nombre de cystéine dans la poche interne de TEAD1, il serait donc pertinent pour augmenter l'activité, de greffer deux chaînes vinyl sulfonamides ou chloroacétamides en position 1 et 3 de manière à induire une sélectivité TEAD1 vs TEAD2/3/4 par exemple (Schéma 50).

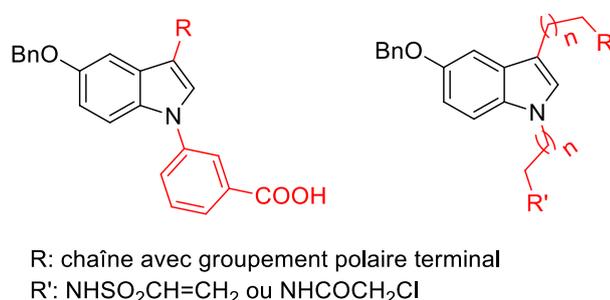


Schéma 50: Structure des molécules trisubstituées envisagées

Il serait également judicieux de changer l'hétérocycle indole par un benzofurane ou benzothiophène.

Le potentiel inhibiteur des molécules covalentes et notamment de **FT277** pourrait être testé sur d'autres lignées cancéreuses difficiles à traiter. La mise en place d'un test biophysique de polarisation de fluorescence en présence d'acide palmitique marqué pourrait aussi être primordial pour valider TEAD comme étant la cible de nos composés et plus particulièrement sa poche interne. Enfin, afin d'initier le projet de sélectivité des composés, le test gène rapporteur luciférase sur les quatre TEAD sera mis en place à partir de la transfection des cellules HEK293T par des constructions Gal4-TEADx.

ANNEXES

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

I. Material and instrumentation

All reagents and solvents were purchased from various suppliers (Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Fisher, TCI, Fluorochem, VWR, Carlo Erba) and used without further purification. Reactions were monitored by TLC performed on Macherey-Nagel Alugram® Sil 60/UV254 sheets (thickness 0.2 mm). TLC were revealed by UV ($\lambda = 254$ nm) and/or the appropriate stain.

All purifications were carried out by flash chromatography or preparative high pressure liquid chromatography (HPLC). Flash chromatography was performed on a Reveleris® Flash Chromatography System using Buchi FlashPure Silica gel (35-45 μm) and HPLC was performed on a Shimadzu LC-20AP using C18 Apollo (5 μM).

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer at 300 MHz (^1H), 75 MHz (^{13}C) and 282 MHz (^{19}F) and/or on a Bruker Avance 500 spectrometer at 500 MHz (^1H), 125 MHz (^{13}C) and 471 MHz (^{19}F). Chemical shifts are expressed in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) using the residual proton peaks of deuterated solvent as internal reference. Chemical shifts are reported as position (δ in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentuplet, m = multiplet, br = broad), coupling constant (J in Hz) and relative integral and assignment. The attributions of protons and carbons were achieved by analysis of 1D and 2D experiments (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC).

Mass spectra were recorded with an LC-MS (Waters Alliance Micromass ZQ 2000) using electrospray ionization (ESI) and a UV detector (diode array). LC-MS analysis was performed using a Waters XBridge C18 column (5 μm particle size column, dimensions 50 mm x 4.6 mm). A gradient starting from 98% H_2O /formate buffer 5 mM (pH 3.8) and reaching 100% CH_3CN /formate buffer 5 mM (pH 3.8) within 4 min at a flow rate of 2 mL/min was used followed by a return to the starting conditions within 1 min. The MassLynx™ software was used to determine the nominal mass of main pics of the spectrum.

The melting point analyses were performed on Barnstead Electrothermel Melting Point Series IA9200 and were not corrected.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

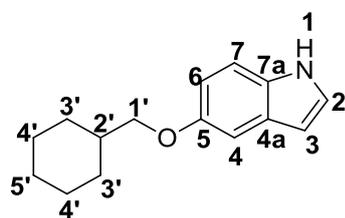
II. Synthesis procedure

5-aryl/alkyl-oxy-1H-indoles (FT142, FT143, FT152, FT153, FT155, FT161, FT162, MD19, FT322 and FT323)

General procedure of nucleophilic substitution: To a solution of 5-hydroxyindole (0.5 g, 1 eq., 1.88 mmol) and K_2CO_3 (1 eq.) in DMF (2.5 mL), alkyl or aryl bromide (1 eq.) was added. Reaction was stirred under reflux for 18 h. Solvent was removed under vacuum and residue was diluted in ethyl acetate and washed with water (three times). Organic phase was dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (5 : 95) as eluant.

General procedure of Mitsunobu reaction: To a solution of 5-hydroxyindole (0.5 g, 1 eq., 1.88 mmol) in THF (8.5 mL), di-*tert*-butyl azodicarboxylate (2.1 eq.), triphenylphosphine (2.1 eq.) and alcohol derivative (1.5 eq.) were added. The reaction was stirred at 50 °C for 18 h. Solvent was removed under vacuum and residue was diluted in ethyl acetate and washed with water (three times). Organic phase was dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with ethyl acetate: cyclohexane (10 : 90) as eluant.

5-(cyclohexylmethoxy)-1H-indole (FT142)



$C_{15}H_{19}NO$

MW = 229.32 g/mol

Mp = 63 – 65 °C

FT142 was synthesized through Mitsunobu reaction from cyclohexylmethanol (0.64 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 72%

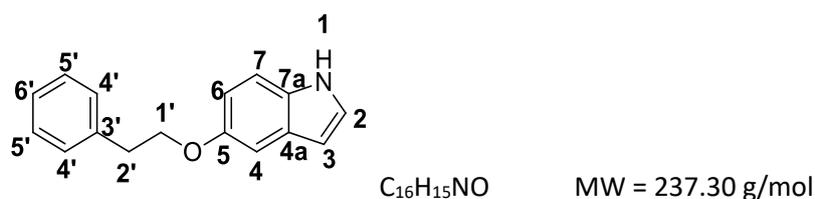
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.07 (brs, 1 H, H_1), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.20 - 7.17 (m, 2 H, $H_{2,4}$), 6.94 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, H_6), 6.52 (ddd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, $^5J = 1.0$ Hz, H_3), 4.11 (t, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $H_{1'}$), 1.88 - 1.00 (m, 11 H, $H_{2',3',4',5'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.7 (**5**), 131.0 (**7a**), 128.3 (**4a**), 124.9 (**2**), 113.0 (**6**), 111.7 (**7**), 103.5 (**4**), 102.3 (**3**), 66.9 (**1'**), 36.9 (**5'**), 34.7 (**2'**), 33.4 (**3'**), 26.4 (**4'**).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 229.2, Found: 230.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.6$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

5-phenethoxy-1H-indole (FT143)



FT143 was synthesized through nucleophilic substitution from (2-bromoethyl)benzene (0.51 mL) and was obtained as a white oil.

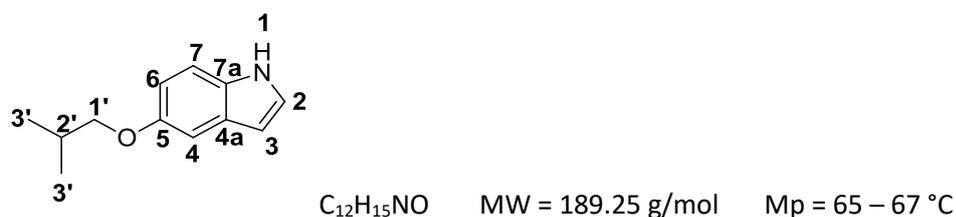
Yield: 78%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.06 (brs, 1 H, H_1), 7.39 - 7.14 (m, 6 H, $H_{7,3',4',5'}$), 7.20 (t, 1 H, $^3J = 2.9$ Hz, H_2), 7.15 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 6.90 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.49 (1 H, ddd, $^3J = 2.9$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 4.26 (t, 1 H, $^3J = 7.3$ Hz, $H_{1'}$), 3.16 (t, 1 H, $^3J = 7.3$ Hz, $H_{2'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.2 (5), 138.6 (3'), 131.1 (7a), 129.0 (5'), 128.5 (4'), 128.3 (4a), 126.4 (6'), 124.8 (2), 113.0 (6), 111.6 (7), 103.7 (4), 102.4 (3), 69.6 (1'), 36.0 (2').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 237.1, Found: 238.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.1$ min.

5-isobutoxy-1H-indole (FT152)



FT152 was synthesized through Mitsunobu reaction from isopropylmethanol (0.52 mL) and was obtained as a brown solid.

Yield: 83%

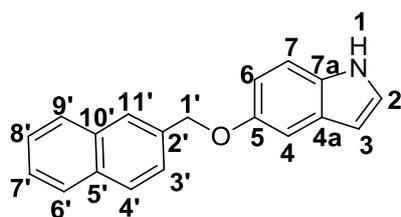
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.05 (brs, 1 H, H_1), 7.29 (d, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, H_7), 7.18 - 7.17 (m, 2 H, $H_{2,4}$), 6.93 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.52 (ddd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 3.83 (d, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $H_{1'}$), 2.17 (non, 1 H, $^3J = 6.7$ Hz, $H_{2'}$), 1.10 (d, 6 H, $^3J = 6.7$ Hz, $H_{3'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.8 (5), 131.0 (7a), 128.3 (4a), 124.8 (2), 113.0 (6), 111.6 (7), 103.6 (4), 102.3 (3), 75.5 (1'), 28.4 (2'), 19.4 (3').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 189.3, Found: 190.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.1$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

5-(naphthalen-2-ylmethoxy)-1H-indole (FT153)



C₁₉H₁₅NO

MW = 273.33 g/mol

Mp = 123 – 125 °C

FT153 was synthesized through nucleophilic substitution from 2-(bromomethyl)naphthalene (0.83 g) and was obtained as an orange solid.

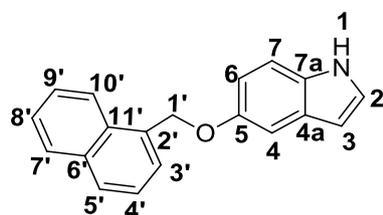
Yield: 78%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.06 (brs, 1 H, H₁), 7.97 (m, 1 H, H_{6'}), 7.93 - 7.88 (m, 3 H, H_{4',9',11'}), 7.63 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, H_{3'}), 7.54 - 7.50 (m, 2 H, H_{7',8'}), 7.32 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz, H₇), 7.28 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.20 (t, 1 H, ³J = 2.8 Hz, H₂), 7.03 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.52 (ddd, 1 H, ³J = 2.8 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, ⁵J = 0.9 Hz, H₃), 5.32 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153.5 (5), 135.3 (2'), 133.4 (10'), 133.1 (5'), 131.2 (7a), 128.3 (4a), 128.3 (3'), 128.0 (6'), 127.8 (9'), 126.3 (4'), 126.2 (11'), 125.9 (8'), 125.5 (7'), 124.9 (2), 113.1 (6), 111.7 (7), 104.2 (4), 102.5 (3), 71.1 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 273.1, Found: 274.1 [M+H]⁺, t_R = 3.3 min.

5-(naphthalen-1-ylmethoxy)-1H-indole (FT155)



C₁₉H₁₅NO

MW = 273.33 g/mol

FT155 was synthesized through nucleophilic substitution from 1-(bromomethyl)naphthalene (0.83 g) and was obtained as a green oil.

Yield: 75%

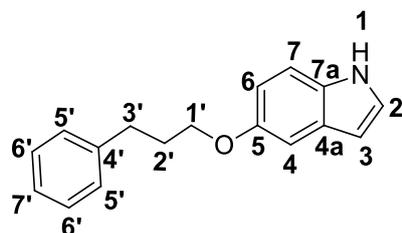
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.18 - 8.14 (m, 1 H, H_{10'}), 8.10 (brs, 1 H, H₁), 7.95 - 7.92 (m, 1 H, H_{7'}), 7.88 (d, 1 H, ³J = 8.3 Hz, H_{5'}), 7.68 (dd, 1 H, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, H_{3'}), 7.58 - 7.48 (m, 3 H, H_{4',8',9'}), 7.34 (d, 1 H, ³J = 8.8 Hz, H₇), 7.34 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.23 (t, 1 H, ³J = 2.8 Hz, H₂), 7.01 (dd, 1 H, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.53 (ddd, 1 H, ³J = 2.8 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, ⁵J = 0.9 Hz, H₃), 5.57 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 153.5 (5), 133.8 (2'), 133.0 (6'), 131.7 (11'), 131.2 (7a), 128.8 (7'), 128.6 (5'), 128.3 (4a), 126.5 (9'), 126.4 (8'), 125.8 (4'), 125.4 (3'), 124.9 (2), 123.9 (10'), 113.2 (6), 111.7 (7), 104.0 (4), 102.5 (3), 69.6 (1').

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 273.1, Found: 274.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.3$ min.

5-(3-phenylpropoxy)-1H-indole (FT161)



$C_{17}H_{17}NO$

MW = 251.32 g/mol Mp = 69 - 73 °C

FT161 was synthesized through nucleophilic substitution from (3-bromopropyl)benzene (0.57 g) and was obtained as a brown solid.

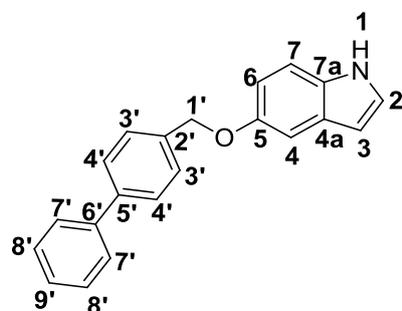
Yield: 81%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.03 (brs, 1 H, H_1), 7.47 - 7.28 (m, 6 H, $H_{7,5',6',7'}$), 7.21 - 7.19 (m, 2 H, $H_{2,4}$), 6.99 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, H_6), 6.56 (ddd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 4.11 (t, 2 H, $^3J = 6.3$ Hz, $H_{1'}$), 2.94 (t, 2 H, $^3J = 6.3$ Hz, H_3), 2.27 - 2.18 (m, 2 H, $H_{2'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.6 (5), 141.9 (4'), 131.1 (7a), 128.7 (6'), 128.5 (7'), 128.4 (4a), 126.0 (5'), 125.0 (2), 113.0 (6), 111.8 (7), 103.7 (4), 102.4 (3), 67.9 (1'), 32.4 (3'), 31.2 (2').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 251.1, Found: 252.0 $[M+H]^+$, $t_R = 3.3$ min.

5-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethoxy)-1H-indole (FT162)



$C_{21}H_{17}NO$

MW = 299.37 g/mol Mp = 155 - 157 °C

FT162 was synthesized through nucleophilic substitution from 4-(bromomethyl)-1,1'-biphenyl (0.93 g) and was obtained as a white solid.

Yield: 74%

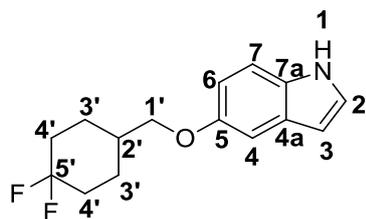
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.09 (brs, 1 H, H_1), 7.66 - 7.62 (m, 4 H, $H_{7,8'}$), 7.59 - 7.56 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.50 - 7.45 (m, 2 H, $H_{4'}$), 7.41 - 7.37 (m, 1 H, $H_{9'}$), 7.33 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.24 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.22 (t, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, H_2), 7.00 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.53 (ddd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 5.18 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.4 (5), 140.9 (6'), 140.7 (5'), 136.8 (2'), 131.2 (7a), 128.8 (4'), 128.3 (4a), 128.0 (3'), 127.3 (8'), 127.2 (9'), 127.1 (7'), 124.9 (2), 113.1 (6), 111.7 (7), 104.0 (4), 102.5 (3), 70.7 (1').

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 299.1, Found: 300.0 $[M+H]^+$, $t_R = 3.4$ min.

5-((4,4-difluorocyclohexyl)methoxy)-1H-indole (MD19)



$C_{15}H_{27}F_2NO$

MW = 281.39 g/mol

Mp = 117 - 119 °C

MD19 was synthesized through nucleophilic substitution from 4-(bromomethyl)-1,1-difluorocyclohexane (0.80 g) in distilled DMF under inert atmosphere and was obtained as a brown solid.

Yield: 50 %

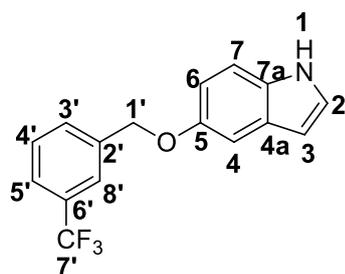
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.09 (brs, 1 H, H_1), 7.30 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.19 (t, 1 H, $^3J = 2.8$ Hz, H_2), 7.14 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, H_4), 6.90 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, H_6), 6.52 (ddd, 1 H, $^3J = 2.8$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 3.90 (d, 2 H, $^3J = 6.3$ Hz, $H_{1'}$), 2.21 – 1.47 (m, 9 H, $H_{2',3',4'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.5 (**5**), 131.1 (**7a**), 128.3 (**4a**), 125.0 (**2**), 123.8 (dd, $^1J_{C-Feq} = 241.6$ Hz, $^1J_{C-Fax} = 239.8$ Hz, **5'**), 112.8 (**6**), 111.8 (**7**), 103.6 (**4**), 102.3 (**3**), 72.8 (d, $^5J_{C-Feq} = 2.7$ Hz, **1'**), 36.0 (d, $^4J_{C-Feq} = 1.2$ Hz, **2'**), 33.2 (dd, $^2J_{C-Feq} = 25.2$ Hz, $^2J_{C-Fax} = 22.5$ Hz, **4'**), 26.0 (d, $^3J_{C-Feq} = 9.6$ Hz, **3'**).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$): -91.8 (d, $^1J = 235.3$ Hz), -102.3 (dt, $^1J = 235.3$ Hz, $^2J_{ax-ax} = 33.2$ Hz, $^2J_{ax-eq} = 9.2$ Hz).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 265.1, Found: 264.2 $[M+H]^-$, 266.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.1$ min.

5-((3-(trifluoromethyl)benzyl)oxy)-1H-indole (FT322)



$C_{16}H_{12}F_3NO$

MW: 291.27 g/mol

FT322 was synthesized through nucleophilic substitution from 1-(bromomethyl)-3-(trifluoromethyl)benzene (0.58 mL) in DMF and was obtained as a yellow oil.

Yield: 74 %

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.10 (brs, 1 H, H_1), 7.82 (m, 1 H, $H_{8'}$), 7.71 – 7.63 (m, 2 H, $H_{3',5'}$), 7.54 (t, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, $H_{4'}$), 7.32 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.25 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, H_4), 7.20 (t, 1 H, $^4J = 2.8$ Hz, H_2),

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

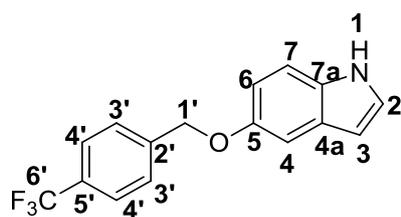
7.02 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, **H₆**), 6.55 (ddd, 1H, $^3J = 2.8$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, **H₃**), 5.19 (s, 2 H, **H_{1'}**).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 153.1 (**5**), 138.8 (**2'**), 131.4 (**7a**), 130.8 (q, $^2J = 32.3$ Hz, **6'**), 130.7 (**3'**), 129.0 (**4'**), 128.3 (**4a**), 126.5 (q, $^1J = 272.2$ Hz, **7'**), 125.2 (**2**), 124.6 (q, $^3J = 3.7$ Hz, **8'**), 124.1 (q, $^3J = 3.7$ Hz, **5'**), 113.0 (**6**), 111.8 (**7**), 104.1 (**4**), 102.5 (**3**), 70.2 (**1'**).

¹⁹F NMR (471 MHz, CDCl₃): - 63.1 (s).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 291.1, Found: 290.2 [M-H]⁻, 292.1 [M+H]⁺, *t_R* = 3.2 min.

5-((3-(trifluoromethyl)benzyl)oxy)-1H-indole (**FT323**)



C₁₆H₁₂F₃NO

MW: 291.27 g/mol

MP: 123 –

125°C

FT323 was synthesized through nucleophilic substitution from 1-(bromomethyl)-4-(trifluoromethyl)benzene (0.58 mL) in DMF and was obtained as a white solid.

Yield: 82 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (brs, 1H, **H₁**), 7.68 – 7.61 (m, 4 H, **H_{3',4'}**), 7.33 (d, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, **H₇**), 7.22 (t, 1 H, $^3J = 2.9$ Hz, **H₂**), 7.18 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, **H₄**), 6.97 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, **H₆**), 6.50 (ddd, 1H, $^3J = 2.9$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, **H₃**), 5.20 (s, 2 H, **H_{1'}**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 153.0 (**5**), 141.9 (**2'**), 131.3 (**7a**), 130.0 (q, $^2J = 32.1$ Hz, **5'**), 128.3 (**4a**), 127.4 (**3'**), 125.5 (q, $^3J = 3.7$ Hz, **4'**), 125.1 (**2**), 124.4 (q, $^1J = 272.1$ Hz, **6'**), 112.9 (**6**), 111.8 (**7**), 104.0 (**4**), 102.5 (**3**), 70.0 (**1'**).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): -63.1 (s).

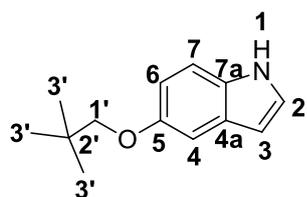
LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 291.1, Found: 290.2 [M-H]⁻, 292.1 [M+H]⁺, *t_R* = 3.2 min.

5-alkyloxy-1H-indole (**MDMPP2-MDMPP7**)

General procedure: To a solution of 5-hydroxyindole (0.2 g, 1 eq., 1.50 mmol) and Cs₂CO₃ (3 eq.) in NMP (10 mL), alkyl bromide (3 eq.) and NaI (2.4 eq) were added. Reaction was stirred 45 min at room temperature and then under reflux for 18 h. Solution was diluted with a large amount of water and was extracted with ethyl acetate. Organic phase was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (5 : 95) as eluant.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

5-(neopentyloxy)-1H-indole (MDMPP2)



$C_{13}H_{17}NO$

MW = 203.28 g/mol

Mp = 86 – 88 °C

MDMPP2 was synthesized from neopentyl bromide (0.20 g) and was obtained as a brown solid.

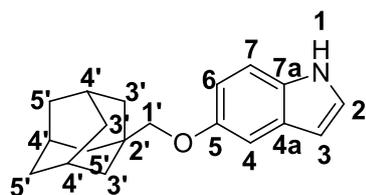
Yield: 9%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.01 (brs, 1 H, H_1), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.18 (t, 1 H, $^3J = 2.9$ Hz, H_2), 7.16 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 6.94 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.51 (ddd, 1 H, $^3J = 2.9$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 3.70 (s, 2 H, $H_{1'}$), 1.12 (s, 9 H, $H_{3'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 154.4 (5), 130.9 (7a), 128.3 (4a), 124.7 (2), 113.0 (6), 111.6 (7), 103.5 (4), 102.3 (3), 79.0 (1'), 32.0 (2'), 26.8 (3').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 203.3, Found: 204.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.3$ min.

5-(adamantan-1-ylmethoxy)-1H-indole (MDMPP7)



$C_{19}H_{23}NO$

MW = 265.30 g/mol

Mp = 117 - 119 °C

MDMPP7 was synthesized through nucleophilic substitution from 1-(bromomethyl)adamantane (0.41 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 17%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.04 (brs, 1 H, H_1), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.18 (t, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, H_2), 7.13 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, H_4), 6.90 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, H_6), 6.49 (ddd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 3.59 (s, 2 H, $H_{1'}$), 2.08 – 1.72 (m, 13 H, $H_{3',4',5'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 154.4 (5), 130.8 (7a), 128.3 (4a), 124.7 (2), 113.0 (6), 111.5 (7), 103.5 (4), 102.4 (3), 79.4 (1'), 39.6 (3'), 37.3 (4'), 34.0 (2'), 28.3 (5').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 281.4, Found: 282.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.9$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

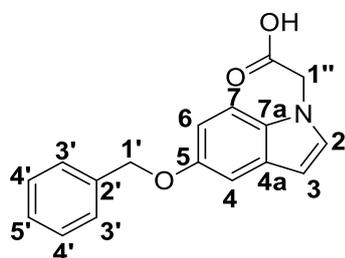
Synthesis of (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkyl acid (FT50, FT53, FT54, FT55), phthalimide (FT62) and nitrile (MD16)

General procedure: To a solution of 5-benzyloxyindole (0.50 g, 1 eq., 2.2 mmol) in DMF (5 mL), NaH (1.5 eq.) was added. Reaction was stirred at room temperature, under N₂ atmosphere for 1 h. Then, a solution of bromoalkylester, bromoalkylnitrile or bromoalkylphthalimide (1.5 eq.) in DMF (3 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 16 h.

Treatment for acids: Reaction was hydrolysed with HCl (6N, 5 mL) and stirred for another 3 h at 60 °C. Later, solvent was removed under vacuum and residue was dissolved in NaHCO₃ (1N) solution. Aqueous phase was extracted three times with diethyl ether and acidified with HCl (1N) to pH 1. Another extraction was completed with diethyl ether (three times). Combined organic phases was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum to afford the pure product.

Treatment for nitrile and phthalimide: Reaction was hydrolysed with water and solvent was removed under vacuum. Residue was dissolved in ethyl acetate and was extracted three times with water (3 x 10 mL). Organic phase was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with cyclohexane : ethyl acetate (50 : 50) as eluant and was obtained as a solid.

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)acetic acid (FT55)



C₁₇H₁₅NO₃ MW = 281.31 g/mol Mp = 102 – 104 °C

FT55 was synthesized from ethyl 2-bromoacetate (0.37 mL) and was obtained as a brown solid.

Yield: 55%

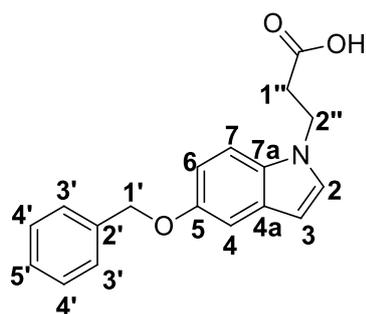
¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.50 - 7.48 (m, 2 H, H_{3'}), 7.44 - 7.32 (m, 3 H, H_{4',5'}), 7.19 - 7.16 (m, 2 H, H_{4,7}), 7.09 (d, 1 H, ⁴J = 3.2 Hz, H₂), 6.97 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.57 Hz, H₆), 6.49 (dd, 1 H, ³J = 3.2 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.12 (2 H, s, H_{1'}), 4.90 (s, 2 H, H_{1''}).

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ 173.1 (COO), 153.5 (5), 137.8 (2'), 131.9 (7a), 129.1 (4a), 129.1 (2), 128.4 (4'), 127.7 (5'), 127.5 (3'), 112.9 (6), 109.6 (4), 104.4 (7), 102.1 (3), 70.7 (1'), 47.3 (1'').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 281.1, Found: 280.2 [M-H]⁻, 282.2 [M+H]⁺, t_R = 2.6 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propanoic acid (FT50)



$C_{18}H_{17}NO_3$ MW = 295.33 g/mol Mp = 118 – 120 °C

FT50 was synthesized from ethyl 3-bromopropionate (0.38 mL) and was obtained as a pink solid.

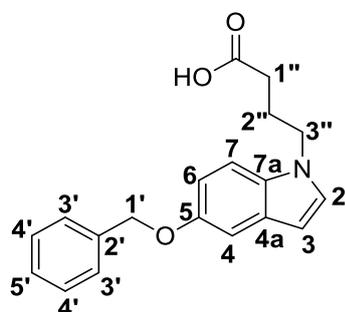
Yield: 44%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.51 - 7.48 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.44 - 7.34 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.29 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.16 - 7.15 (m, 2 H, $H_{2,4}$), 6.95 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.40 (dd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 5.11 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.44 (t, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $H_{2''}$), 2.89 (t, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $H_{1''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 174.3 (COO), 153.2 (5), 137.9 (2'), 131.1 (7a), 129.1 (4a), 128.5 (2), 128.4 (4'), 127.7 (5'), 127.5 (3'), 112.4 (6), 109.8 (4), 104.2 (7), 101.1 (3), 70.7 (1'), 41.7 (2''), 34.3 (1'').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 295.1, Found: 294.3 [M-H]⁻, 296.2 [M+H]⁺, $t_R = 2.8$ min.

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)butanoic acid (FT53)



$C_{19}H_{19}NO_3$

MW = 309.36 g/mol

Mp = 126 –

128 °C

FT53 was synthesized from ethyl 4-bromobutyrate (0.48 mL) and was obtained as a brown solid.

Yield: 2%

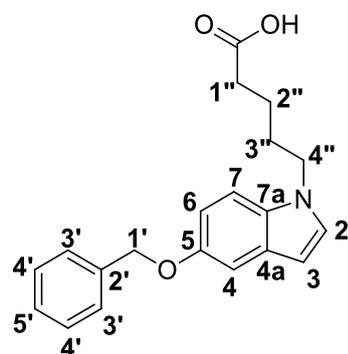
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.51 - 7.49 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.44 - 7.34 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.27 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.19 (d, 1 H, $^4J = 2.42$ Hz, H_4), 7.08 (d, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.43 (dd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^5J = 0.6$ Hz, H_3), 5.13 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.20 (t, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{3''}$), 2.36 (t, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{1''}$), 2.18 (quin, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{2''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 177.3 (COO), 153.2 (5), 137.7 (2'), 131.4 (7a), 129.0 (4a), 128.5 (2), 128.3 (4'), 127.7 (5'), 127.5 (3'), 112.7 (6), 110.0 (4), 104.3 (7), 101.0 (3), 70.9 (1'), 45.4 (3''), 30.7 (1''), 25.2 (2'').

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 309.1, Found: 308.3 $[M-H]^-$, 310.3 $[M+H]^+$, $t_R = 2.9$ min.

4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)pentanoic acid (FT54)



$C_{20}H_{21}NO_3$

MW = 323.39 g/mol

Mp = 139 –

141 °C

FT54 was synthesized from ethyl 5-bromopentanoate (0.53 mL) and was obtained as a brown solid.

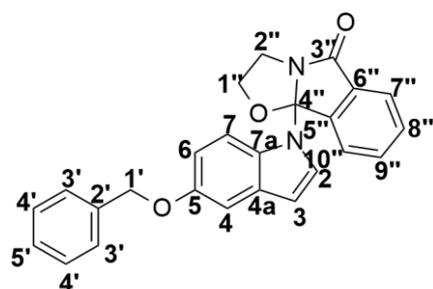
Yield: 20%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.50 - 7.48 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.43 - 7.34 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.27 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.17 - 7.11 (m, 2 H, $H_{2,4}$), 6.96 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, H_6), 6.40 (dd, 1 H, $^3J = 3.0$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz, H_3), 5.12 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.13 (t, 2 H, $^3J = 7.6$ Hz, $H_{4''}$), 2.37 (t, 2 H, $^3J = 7.6$ Hz, $H_{1''}$), 1.89 (quin, 2 H, $^3J = 7.6$ Hz, $H_{3''}$), 1.64 (quin, 2 H, $^3J = 7.6$ Hz, $H_{2''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 177.8 (COO), 153.0 (5), 137.9 (2'), 131.5 (7a), 128.9 (4a), 128.4 (2), 128.3 (4'), 127.7 (5'), 127.5 (3'), 112.2 (6), 110.0 (4), 104.0 (7), 100.5 (3), 70.7 (1'), 46.1 (1''), 33.1 (4''), 29.6 (3''), 22.1 (2'').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 323.2, Found: 322.3 $[M-H]^-$, 324.3 $[M+H]^+$, $t_R = 3.0$ min.

9b-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one (FT62)



$C_{20}H_{25}N_2O_3$

MW = 396.44 g/mol

Mp: 152 – 154 °C

FT62 was synthesized from N-(2-bromoethyl)phthalimide (0.63 g) and was obtained as a pink solid.

Yield: 25%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 7.85 (d, 1 H, $^3J = 7.4$ Hz, $H_{7''}$), 7.60 (d, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, H_7), 7.55 (dt, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, $H_{9''}$), 7.51 - 7.34 (m, 8 H, $H_{2,3',4',5',8'',10''}$), 7.15 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 6.93 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.50 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.11 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.62 (td, 1 H, $^2J = 8.3$

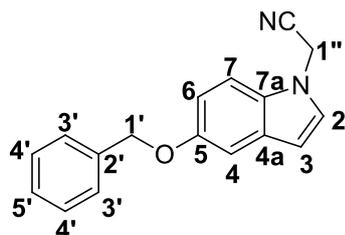
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $\mathbf{H}_{2''}$), 4.47 (td, 1 H, $^2J = 8.3$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, $\mathbf{H}_{2''}$), 4.23 (ddd, 1 H, $^2J = 11.0$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, $\mathbf{H}_{1''}$), 3.51 (ddd, 1 H, $^2J = 11.0$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $\mathbf{H}_{1''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171.9 ($\mathbf{3''}$), 153.9 ($\mathbf{5}$), 143.0 ($\mathbf{5''}$), 137.5 ($\mathbf{2'}$), 133.9 ($\mathbf{9''}$), 131.2 ($\mathbf{7a}$), 131.2 ($\mathbf{8''}$), 130.6 ($\mathbf{6''}$), 130.1 ($\mathbf{4a}$), 128.5 ($\mathbf{4'}$), 127.8 ($\mathbf{5'}$), 127.5 ($\mathbf{3'}$), 125.8 ($\mathbf{2}$), 124.3 ($\mathbf{10''}$), 122.1 ($\mathbf{7''}$), 113.3 ($\mathbf{7}$), 113.2 ($\mathbf{4}$), 106.6 ($\mathbf{4''}$), 104.2 ($\mathbf{7}$), 103.6 ($\mathbf{3}$), 71.4 ($\mathbf{1''}$), 70.6 ($\mathbf{1'}$), 41.4 ($\mathbf{2''}$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 396.4, Found: 395.3 $[\text{M-H}]^-$, 397.4 $[\text{M+H}]^+$, $t_R = 3.1$ min.

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)acetonitrile (MD16)



$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$

MW = 262.21 g/mol

Mp = 116 -

118°C

MD16 was synthesized from ethyl 2-bromoacetonitrile (0.23 mL) and was obtained as a white solid.

Yield: 32%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.45 – 7.38 (m, 5 H, $\mathbf{H}_{3',4',5'}$), 7.29 (d, 1 H, $^3J = 8.5$ Hz, \mathbf{H}_7), 7.22 (d, 1H, $^3J = 2.3$ Hz, \mathbf{H}_4), 7.10 – 7.06 (m, 2 H, $\mathbf{H}_{2,6}$), 6.54 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, \mathbf{H}_3), 5.15 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{1'}$), 4.96 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{1''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 154.1 ($\mathbf{5}$), 137.4 ($\mathbf{2'}$), 131.2 ($\mathbf{7a}$), 129.5 ($\mathbf{4a}$), 128.6 ($\mathbf{4'}$), 127.9 ($\mathbf{5'}$), 127.8 ($\mathbf{2}$), 127.5 ($\mathbf{3'}$), 114.4 (CN), 113.7 ($\mathbf{6}$), 109.6 ($\mathbf{4}$), 104.9 ($\mathbf{7}$), 103.9 ($\mathbf{3}$), 70.9 ($\mathbf{1'}$), 34.4 ($\mathbf{1''}$).

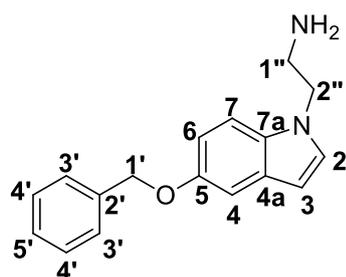
LC-MS (ESI): m/z Calculated: 262.1, Found: 263.2 $[\text{M+H}]^+$, $t_R = 2.9$ min.

Synthesis of 5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)alkyl amine (FT258 and FT260)

General procedure: To a solution of 5-benzyloxyindole (0.50 g, 1 eq., 2.2 mmol) in acetonitrile (8 mL), NaOH (5 eq.) and tetrabutylammonium hydrogen sulphate (0.2 eq.) were added. Reaction was stirred at room temperature during 1 h. Then, chloroalkylamine hydrochloride (1.2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at reflux for 16 h. Reaction was hydrolysed with water (15 mL) and extracted with dichloromethane (15 mL). Aqueous phase was washed with dichloromethane three times (3x 15 mL). Combined organic phases were dried over MgSO_4 and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with dichloromethane : methanol (90 : 10) as eluant and was obtained as a solid.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine (FT258)



$C_{17}H_{18}N_2O$

MW = 266.34 g/mol Mp = 125 - 127°C

FT258 was synthesized from 2-chloroethylamine hydrochloride (0.31 g) and was obtained as a yellow solid.

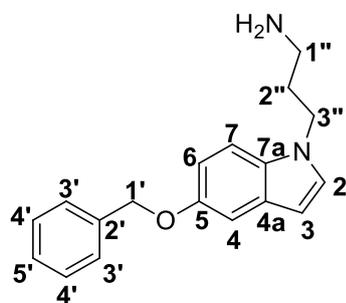
Yield: 88%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.52 – 7.34 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.29 (d, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, H_7), 7.21 (d, 1 H, $^3J = 2.4$ Hz, H_4), 7.14 (d, 1 H, $^4J = 3.1$ Hz, H_2), 6.99 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.45 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.13 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.18 (t, 1 H, $^3J = 5.9$ Hz, $H_{2''}$), 3.12 (t, 1 H, $^3J = 5.9$ Hz, $H_{1''}$), 1.42 (s, 3 H, NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.3 (5), 137.7 (2'), 131.6 (7a), 129.1 (4a), 128.7 (2), 128.5 (4'), 127.8 (5'), 127.5 (3'), 112.7 (6), 110.1 (7), 104.3 (4), 101.0 (3), 70.9 (1'), 49.7 (1''), 42.1 (2'').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 266.1, Found: 267.1 $[M+H]^+$, $t_R = 2.2$ min.

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine (FT260)



$C_{18}H_{20}N_2O$

MW = 280.36 g/mol

Mp = 129 - 131°C

FT260 was synthesized from 3-chloropropylamine hydrochloride (0.35 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 81%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.51 – 7.33 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.19 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.09 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, H_2), 6.97 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.42 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.12 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.20 (t, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $H_{3''}$), 2.72 (t, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $H_{1''}$), 1.98 (q, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $H_{2''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.1 (5), 137.8 (2'), 131.5 (7a), 128.9 (4a), 128.5 (4'), 128.3 (2), 127.7 (5'), 127.5 (3'), 112.6 (6), 110.0 (7), 104.2 (4), 100.7 (3), 70.9 (1'), 44.0 (3''), 39.4 (1''), 33.8 (2'').

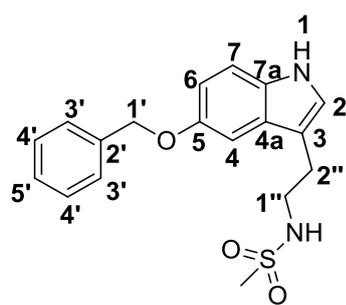
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 280.2, Found: 281.1 $[M+H]^+$, t_R = 2.2 min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)alkylamides or sulfonamides (FT238, FT249, FT259, FT261, FT263, FT264, FT268, FT269, FT270, FT271, FT273, FT274, FT275, FT276 and FT277)

General procedure: To a solution of 5-benzyloxytryptamine (0.10 g, 1 eq., 0.38 mmol), 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine (0.10 g, 1 eq., 0.38 mmol) or 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine (0.10 g, 1 eq., 0.36 mmol) in dichloromethane (4 mL), triethylamine (1 eq.) was added, followed by the the sulfonyl chloride or the acid chloride derivative (1 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 2 h. Water (10 mL) was added and the solution was extracted. Organic layer was washed with brine (10 mL) two times and was dried over $MgSO_4$. Solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with ethyl acetate : dichloromethane (50 : 50) as eluant.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)methanesulfonamide (FT238)



$C_{18}H_{20}N_2O_3S$

MW = 344.43 g/mol Mp = 275 – 277 °C

FT238 was synthesized from 5-benzyloxytryptamine **FT328** and methanesulfonylchloride (0.03 mL) and was obtained as a yellow solid.

Yield: 82%

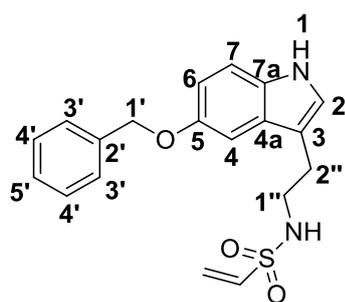
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.10 (brs, 1 H, H_1), 7.53 – 7.32 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.28 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 0.5$ Hz, H_7), 7.14 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, H_4), 7.03 (m, 1 H, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, H_6), 5.14 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.43 (brs, 1 H, **NH**), 3.42 (t, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{1''}$), 3.00 (t, 1H, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{2''}$), 2.80 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.3 (**5**), 137.6 (**2'**), 131.8 (**7a**), 128.6 (**4'**), 127.9 (**5'**), 127.6 (**3'**), 127.4 (**4a**), 123.5 (**2**), 113.2 (**6**), 112.2 (**7**), 111.4 (**3**), 102.2 (**4**), 71.0 (**1'**), 43.2 (**1''**), 40.2 (CH_3), 26.1 (**2''**).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 344.1, Found: 343.2 $[M-H]^-$, 345.1 $[M+H]^+$, t_R = 2.7 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)ethenesulfonamide (FT249)



$C_{19}H_{20}N_2O_3S$

MW = 356.44 g/mol

Mp = 259 – 261 °C

FT249 was synthesized from 5-benzyloxytryptamine **FT328** and ethenesulfonylchloride (0.05 g) and was obtained as a grey solid.

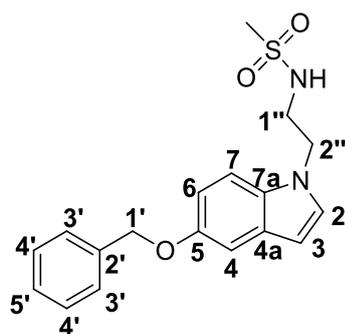
Yield: 74%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.10 (brs, 1 H, H_1), 7.53 – 7.32 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.12 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.03 (d, 1 H, $^3J = 2.2$ Hz, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.36 (dd, 1 H, $^3J = 16.6$ Hz, $^3J = 9.8$ Hz, $H_{SO_2CH=CH_2}$), 6.18 (d, 1 H, $^2J = 16.6$ Hz, $H_{SO_2CH=CH_2}$), 5.83 (d, 1 H, $^2J = 9.8$ Hz, $H_{SO_2CH=CH_2}$), 5.14 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.43 (s, 1 H, NH), 3.32 (q, 1 H, $H_{2''}$), 2.99 (t, 1 H, $H_{1''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.3 (5), 137.5 (2'), 135.7 ($SO_2CH=CH_2$), 131.8 (7a), 128.6 (4'), 127.9 (5'), 127.6 (3'), 127.4 (4a), 126.5 ($SO_2CH=CH_2$), 123.5 (2), 113.2 (6), 112.1 (7), 111.4 (3), 102.2 (4), 71.0 (1'), 42.9 (2''), 25.9 (1'').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 356.1, Found: 355.2 $[M-H]^-$, 357.1 $[M+H]^+$, $t_R = 2.9$ min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethyl)methanesulfonamide (FT259)



$C_{18}H_{20}N_2O_3S$

MW = 344.43 g/mol

Mp = 241 – 243

°C

FT259 was synthesized from 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine and methanesulfonylchloride (0.03 mL) and was obtained as a pink solid.

Yield: 38%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.51 - 7.34 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.19 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.12 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, H_2), 7.00 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.45 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$

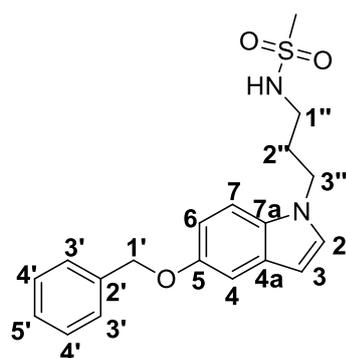
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

Hz, $^5J = 0.7$ Hz, \mathbf{H}_3), 5.12 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{1'}$), 4.41 (t, 1 H, $^3J = 6.7$ Hz, \mathbf{NH}), 4.30 (t, 2 H, $^3J = 5.7$ Hz, $\mathbf{H}_{2''}$), 3.52 (q, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\mathbf{H}_{1''}$), 2.71 (s, 3 H, \mathbf{CH}_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 153.5 ($\mathbf{5}$), 137.6 ($\mathbf{2'}$), 131.2 ($\mathbf{7a}$), 129.2 ($\mathbf{4a}$), 128.6 ($\mathbf{2}$), 128.5 ($\mathbf{4'}$), 127.8 ($\mathbf{5'}$), 127.5 ($\mathbf{3'}$), 113.1 ($\mathbf{6}$), 109.9 ($\mathbf{7}$), 104.5 ($\mathbf{4}$), 101.8 ($\mathbf{3}$), 70.9 ($\mathbf{1'}$), 47.0 ($\mathbf{2''}$), 43.2 ($\mathbf{1''}$), 40.4 (\mathbf{CH}_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 344.1, Found: 343.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 345.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2.9$ min.

N-(3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propyl)methanesulfonamide (FT261)



$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

MW = 358.45 g/mol

Mp = 245 – 247 °C

FT261 was synthesized from 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine and methanesulfonylchloride (0.03 mL) and was obtained as a red solid.

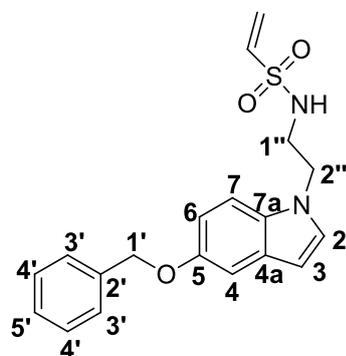
Yield: 39%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.52 – 7.35 (m, 5 H, $\mathbf{H}_{3',4',5'}$), 7.26 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, \mathbf{H}_7), 7.21 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, \mathbf{H}_4), 7.12 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, \mathbf{H}_2), 6.99 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, \mathbf{H}_6), 6.44 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, \mathbf{H}_3), 5.12 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{1'}$), 4.67 (t, 2 H, $^3J = 6.2$ Hz, \mathbf{NH}), 4.19 (t, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $\mathbf{H}_{3''}$), 3.04 (q, 2 H, $^3J = 6.5$ Hz, $\mathbf{H}_{1''}$), 2.83 (s, 3 H, \mathbf{CH}_3), 2.07 (quin, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $\mathbf{H}_{2''}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 153.3 ($\mathbf{5}$), 137.7 ($\mathbf{2'}$), 131.3 ($\mathbf{7a}$), 129.1 ($\mathbf{4a}$), 128.6 ($\mathbf{4'}$), 128.5 ($\mathbf{2}$), 127.8 ($\mathbf{5'}$), 127.6 ($\mathbf{3'}$), 112.8 ($\mathbf{6}$), 110.0 ($\mathbf{7}$), 104.4 ($\mathbf{4}$), 101.2 ($\mathbf{3}$), 70.9 ($\mathbf{1'}$), 43.4 ($\mathbf{3''}$), 40.6 ($\mathbf{1''}$), 39.8 (\mathbf{CH}_3), 30.4 ($\mathbf{2''}$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 358.1, Found: 357.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 359.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2.9$ min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethyl)ethenesulfonamide (FT263)



$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

MW = 356.44 g/mol

Mp = 236 – 238 °C

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

FT263 was synthesized from 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine and ethenesulfonylchloride (0.05 g) and was obtained as a pink solid.

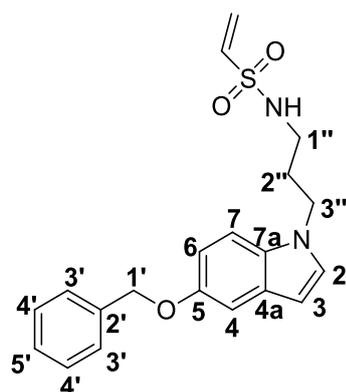
Yield: 65%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.51 - 7.34 (m, 5 H, **H**_{3',4',5'}), 7.26 (d, 1 H, ³J = 8.9 Hz, **H**₇), 7.19 (d, 1 H, ⁴J = 2.3 Hz, **H**₄), 7.11 (d, 1 H, ³J = 3.1 Hz, **H**₂), 6.99 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, **H**₆), 6.45 (dd, 1 H, ³J = 3.1 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, **H**₃), 6.29 (dd, ³J = 16.6 Hz, ³J = 9.3 Hz, **H**_{SO₂CH=CH₂}), 6.17 (d, 1 H, ³J = 16.6 Hz, **H**_{SO₂CH=CH₂}), 5.81 (d, 1 H, ³J = 9.3 Hz, **H**_{SO₂CH=CH₂}), 5.13 (s, 2 H, **H**_{1'}), 4.32 (t, 1 H, ³J = 6.7 Hz, **NH**), 4.30 (t, 2 H, ³J = 6.0 Hz, **H**_{2''}), 3.42 (q, 2 H, ³J = 6.3 Hz, **H**_{1''}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 153.5 (**5**), 137.6 (**2'**), 135.4 (**SO₂CH=CH₂**), 131.2 (**7a**), 129.2 (**4a**), 128.6 (**2**), 128.5 (**4'**), 127.8 (**5'**), 127.5 (**3'**), 127.0 (**SO₂CH=CH₂**), 113.1 (**6**), 109.9 (**7**), 104.5 (**4**), 101.8 (**3**), 70.9 (**1'**), 46.9 (**2''**), 42.8 (**1''**).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 356.1, Found: 355.1 [M-H]⁻, 357.0 [M+H]⁺, *t_R* = 3.0 min.

N-(3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propyl)ethenesulfonamide (FT264)



C₂₀H₂₂N₂O₃S

MW = 370.47 g/mol

Mp = 228 – 230 °C

FT264 was synthesized from 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine and ethenesulfonylchloride (0.05 g) and was obtained as a yellow solid.

Yield: 79%

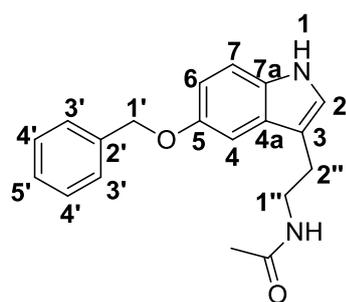
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52 – 7.35 (m, 5 H, **H**_{3',4',5'}), 7.25 (d, 1 H, ³J = 8.9 Hz, **H**₇), 7.20 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, **H**₄), 7.11 (d, 1 H, ³J = 3.1 Hz, **H**₂), 6.99 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, **H**₆), 6.44 (dd, 1 H, ³J = 3.1 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, **H**₃), 6.38 (dd, ³J = 16.6 Hz, ³J = 9.8 Hz, **H**_{SO₂CH=CH₂}), 6.18 (d, 1 H, ³J = 16.6 Hz, **H**_{SO₂CH=CH₂}), 5.89 (d, 1 H, ³J = 9.8 Hz, **H**_{SO₂CH=CH₂}), 5.13 (s, 2 H, **H**_{1'}), 4.53 (t, 1 H, ³J = 6.1 Hz, **NH**), 4.20 (t, 2 H, ³J = 6.6 Hz, **H**_{3''}), 2.95 (q, 2 H, ³J = 6.5 Hz, **H**_{1''}), 2.06 (q, 2 H, ³J = 6.5 Hz, **H**_{2''}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 153.3 (**5**), 137.7 (**2'**), 135.4 (**SO₂CH=CH₂**), 131.3 (**7a**), 129.1 (**4a**), 128.6 (**2**), 128.4 (**4'**), 127.8 (**5'**), 127.6 (**3'**), 127.2 (**SO₂CH=CH₂**), 112.8 (**6**), 110.0 (**7**), 104.4 (**4**), 101.2 (**3**), 70.9 (**1'**), 43.4 (**3''**), 40.4 (**1''**), 30.2 (**2''**).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 370.1, Found: 369.2 [M-H]⁻, 371.1 [M+H]⁺, *t_R* = 3.1 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamide (FT268)



$C_{19}H_{20}N_2O_2$

MW = 308.37 g/mol

Mp = 271 – 273 °C

FT268 was synthesized from 5-benzyloxytryptamine **FT328** and acetyl chloride (0.03 mL) and was obtained as a yellow solid.

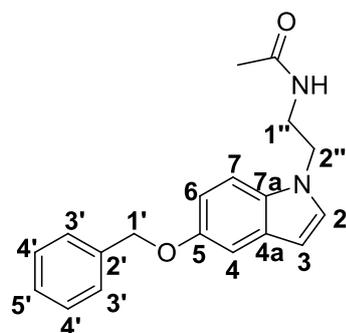
Yield: 88%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.64 (brs, 1 H, H_1), 7.51 – 7.34 (m, 5 H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.26 (d, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, H_7), 7.16 (d, 1 H, $^4J = 2.5$ Hz, H_4), 6.96 (d, 1 H, $^3J = 2.7$ Hz, H_2), 6.96 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, H_6), 5.86 (d, 1 H, $^3J = 5.6$ Hz, NH), 5.11 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 3.57 (q, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $\text{H}_{1''}$), 2.92 (t, 2 H, $^3J = 6.9$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 1.92 (s, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 170.5 (CO), 153.1 (5), 137.6 (2'), 131.9 (7a), 128.6 (4'), 127.9 (5'), 127.7 (4a), 127.7 (3'), 123.1 (2), 112.9 (6), 112.4 (3), 112.2 (7), 102.2 (4), 71.1 (1'), 39.8 (1''), 25.3 (2''), 23.3 (CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 308.2, Found: 309.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2.5$ min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamide (FT269)



$C_{19}H_{20}N_2O_2$

MW = 308.37 g/mol

Mp = 232 – 234 °C

FT269 was synthesized from 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine and acetyl chloride (0.03 mL) and was obtained as a yellow solid.

Yield: 85%

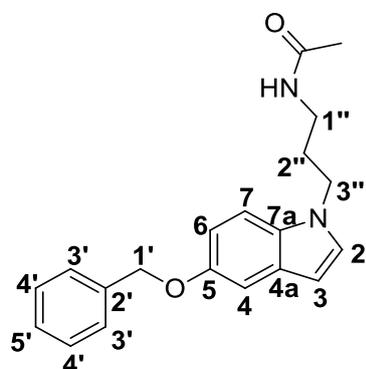
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.50 – 7.34 (m, 5 H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.25 (d, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, H_7), 7.20 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.04 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.45 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.86 (t, 1 H, $^3J = 6.1$ Hz, NH), 5.11 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 4.20 (t, 2 H, $^3J = 5.8$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 3.51 (q, 2 H, $^3J = 6.0$ Hz, $\text{H}_{1''}$), 1.85 (s, 3 H, CH_3).

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.8 (CO), 153.3 (5), 137.6 ($2'$), 131.6 (7a), 129.0 (4a), 128.6 ($4'$), 128.5 (2), 127.9 ($5'$), 127.6 ($3'$), 112.8 (6), 110.0 (7), 104.4 (4), 101.3 (3), 70.9 ($1'$), 45.6 ($2''$), 40.0 ($1''$), 23.0 (CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 308.2, Found: 309.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 2.7$ min.

N-(3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propyl)acetamide (FT270)



$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$

MW = 322.40 g/mol

Mp = 234 – 236 °C

FT270 was synthesized from 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine and acetyl chloride (0.03 mL) and was obtained as a white solid.

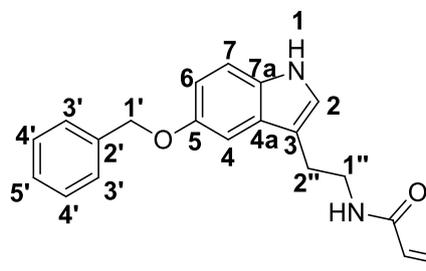
Yield: 79%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.52 – 7.35 (m, 5 H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.23 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.21 (d, 1 H, $^4J = 2.6$ Hz, H_4), 7.08 (d, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, H_2), 6.99 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, H_6), 6.44 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.87 (t, 1 H, $^3J = 5.7$ Hz, NH), 5.12 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 4.09 (t, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, $\text{H}_{3''}$), 3.17 (q, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\text{H}_{1''}$), 1.97 (quin, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 1.82 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.6 (CO), 153.2 (5), 137.7 ($2'$), 131.4 (7a), 129.1 (4a), 128.6 ($4'$), 128.5 (2), 127.9 ($5'$), 127.6 ($3'$), 112.7 (6), 110.1 (7), 104.4 (4), 101.0 (3), 70.9 ($1'$), 44.4 ($3''$), 37.4 ($1''$), 29.8 ($2''$), 23.0 (CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 322.2, Found: 323.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 2.8$ min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)acrylamide (FT271)



$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

MW = 320.38 g/mol

Mp = 275 – 277 °C

FT271 was synthesized from 5-benzyloxytryptamine FT328 and acryloyl chloride (0.03 mg) and was obtained as a white solid.

Yield: 69%

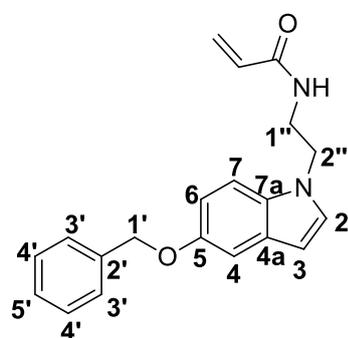
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.57 (brs, 1 H, H₁), 7.51 – 7.34 (m, 5 H, H_{3',4',5'}), 7.25 (d, 1 H, ³J = 8.9 Hz, H₇), 7.16 (d, 1 H, ⁴J = 2.3 Hz, H₄), 6.96 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, H₆), 6.94 (d, 1 H, ³J = 3.2 Hz, H₂), 6.29 (dd, 1 H, ³J = 16.9 Hz, ⁵J = 1.6 Hz, H_{COCH=CH₂}), 6.02 (dd, 1 H, ³J = 16.9 Hz, ³J = 10.3 Hz, H_{COCH=CH₂}), 5.99 (m, 1 H, NH), 5.60 (dd, 1 H, ³J = 10.3 Hz, ⁵J = 1.6 Hz, H_{COCH=CH₂}), 5.10 (s, 2 H, H_{1'}), 3.65 (q, 2 H, ³J = 6.9 Hz, H_{1''}), 2.96 (t, 2 H, ³J = 6.9 Hz, H_{2''}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 165.8 (CO), 153.1 (5), 137.6 (2'), 131.9 (7a), 131.0 (COCH=CH₂), 128.6 (4'), 127.9 (5'), 127.7 (3'), 127.7 (4a), 126.4 (COCH=CH₂), 123.2 (2), 113.0 (6), 112.4 (3), 112.2 (7), 102.3 (4), 71.0 (1'), 39.9 (1''), 25.2 (2'').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 320.2, Found: 321.1 [M+H]⁺, t_R = 2.7 min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethyl)acrylamide (FT273)



C₂₀H₂₀N₂O₂

MW = 320.38 g/mol

Mp = 266 – 268 °C

FT273 was synthesized from 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine and acryloyl chloride (0.03 mg) and was obtained as a yellow solid.

Yield: 71%

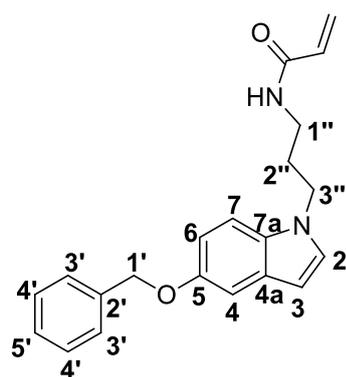
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.51 – 7.34 (m, 5 H, H_{3',4',5'}), 7.25 (d, 1 H, ³J = 8.9 Hz, H₇), 7.19 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.03 (d, 1 H, ³J = 3.2 Hz, H₂), 6.97 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.43 (dd, 1 H, ³J = 3.2 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, H₃), 6.25 (dd, 1 H, ³J = 17.0 Hz, ⁵J = 1.4 Hz, H_{COCH=CH₂}), 5.95 (dd, 1 H, ³J = 17.0 Hz, ³J = 10.4 Hz, H_{COCH=CH₂}), 5.86 (m, 1 H, NH), 5.60 (dd, 1 H, ³J = 10.4 Hz, ⁵J = 1.4 Hz, H_{COCH=CH₂}), 5.11 (s, 2 H, H_{1'}), 4.25 (t, 2 H, ³J = 5.7 Hz, H_{2''}), 3.62 (q, 2 H, ³J = 6.1 Hz, H_{1''}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 166.0 (CO), 153.3 (5), 137.6 (2'), 131.5 (7a), 130.4 (COCH=CH₂), 129.1 (4a), 128.6 (2), 128.6 (4'), 127.8 (5'), 127.6 (3'), 126.9 (COCH=CH₂), 112.9 (6), 110.1 (7), 104.4 (4), 101.3 (3), 70.9 (1'), 45.6 (2''), 40.0 (1'').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 320.2, Found: 321.1 [M+H]⁺, t_R = 2.8 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

N-(3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propyl)acrylamide (FT274)



$C_{21}H_{22}N_2O_2$

MW = 334.41 g/mol

FT274 was synthesized from 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine and acryloyl chloride (0.03 mg) and was obtained as a yellow oil.

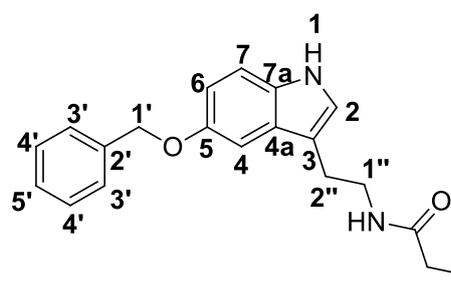
Yield: 74%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.51 – 7.34 (m, 5 H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.24 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.19 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, H_4), 7.10 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, H_6), 6.43 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 6.19 (dd, 1 H, $^3J = 17.0$ Hz, $^5J = 1.5$ Hz, $\text{H}_{\text{COCH}=\text{CH}_2}$), 5.91 (dd, 1 H, $^3J = 17.0$ Hz, $^3J = 10.3$ Hz, $\text{H}_{\text{COCH}=\text{CH}_2}$), 5.58 (dd, 1 H, $^3J = 10.3$ Hz, $^5J = 1.5$ Hz, $\text{H}_{\text{COCH}=\text{CH}_2}$), 5.54 (m, 1 H, **NH**), 5.12 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 4.16 (t, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\text{H}_{3''}$), 3.30 (q, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 2.06 (quin, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\text{H}_{1''}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 165.7 (**CO**), 153.3 (**5**), 137.7 (**2'**), 131.3 (**7a**), 130.6 (**COCHCH₂**), 129.0 (**4a**), 128.5 (**4'**), 128.4 (**2**), 127.8 (**5'**), 127.5 (**3'**), 126.4 (**COCHCH₂**), 112.8 (**6**), 110.0 (**7**), 104.4 (**4**), 101.1 (**3**), 70.9 (**1'**), 44.4 (**3''**), 37.4 (**1''**), 29.9 (**2''**).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 334.2, Found: 335.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2.9$ min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-chloroacetamide (FT275)



$C_{19}H_{19}ClN_2O_2$

MW = 342.82 g/mol

Mp = 244 – 246 °C

FT275 was synthesized from 5-benzyloxytryptamine **FT328** and 2-chloroacetyl chloride (0.03 mL) and was obtained as a brown solid.

Yield: 82%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.21 (brs, 1 H, H_1), 7.53 – 7.33 (m, 5 H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 7.17 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.03 (d, 1 H, $^3J = 2.3$ Hz, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6),

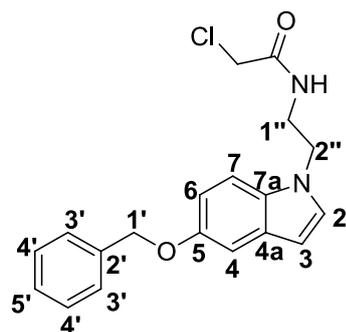
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

6.72 (m, 1 H, **NH**), 5.14 (s, 2 H, **H_{1'}**), 4.03 (s, 2 H, **CH₂Cl**), 3.64 (q, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, **H_{1''}**), 2.99 (t, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, **H_{2''}**).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 165.9 (**CO**), 153.3 (**5**), 137.6 (**2'**), 131.8 (**7a**), 128.6 (**4'**), 127.9 (**5'**), 127.7 (**3'**), 127.6 (**4a**), 123.0 (**2**), 113.1 (**6**), 112.1 (**3**), 112.1 (**7**), 102.2 (**4**), 71.0 (**1'**), 42.7 (**CH₂Cl**), 40.0 (**1''**), 25.1 (**2''**).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 342.1, Found: 343.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2.8$ min.

N-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethyl)-2-chloroacetamide (**FT276**)



$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$

MW = 342.82 g/mol

Mp = 232 – 234 °C

FT276 was synthesized from 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)ethanamine and 2-chloroacetyl chloride (0.03 mL) and was obtained as a brown solid.

Yield: 89%

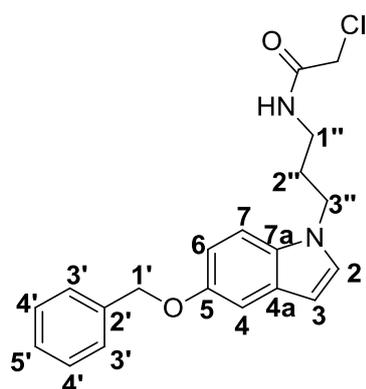
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.53 – 7.33 (m, 5 H, **H_{3',4',5'}**), 7.28 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, **H₇**), 7.22 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, **H₄**), 7.06 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, **H₂**), 7.01 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, **H₆**), 6.63 (m, 1 H, **NH**), 6.48 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, **H₃**), 5.14 (s, 2 H, **H_{1'}**), 4.27 (t, 2 H, $^3J = 5.8$ Hz, **H_{2''}**), 3.97 (s, 2 H, **CH₂Cl**), 3.66 (q, 2 H, $^3J = 5.8$ Hz, **H_{1''}**).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 166.5 (**CO**), 153.4 (**5**), 137.6 (**2'**), 131.4 (**7a**), 129.2 (**4a**), 128.6 (**4'**), 128.4 (**2**), 127.8 (**5'**), 127.6 (**3'**), 113.0 (**6**), 109.9 (**7**), 104.5 (**4**), 101.7 (**3**), 70.9 (**1'**), 45.4 (**2''**), 42.4 (**CH₂Cl**), 40.2 (**1''**).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 342.1, Found: 343.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 3.0$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

N-(3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propyl)-2-chloroacetamide (FT277)



$C_{20}H_{21}ClN_2O_2$

MW = 356.85 g/mol

Mp = 241 – 243 °C

FT277 was synthesized from 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)propan-1-amine and 2-chloroacetyl chloride (0.03 mL) and was obtained as a brown solid.

Yield: 75%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.53 – 7.32 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.25 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 7.21 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.10 (d, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, H_2), 7.01 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.37$ Hz, H_6), 6.46 (dd, 1 H, $^3J = 3.1$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 6.44 (m, 1 H, **NH**), 5.14 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.18 (t, 2 H, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{3''}$), 3.95 (s, 2 H, **CH₂Cl**), 3.29 (q, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $H_{1''}$), 2.10 (quin, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $H_{2''}$).

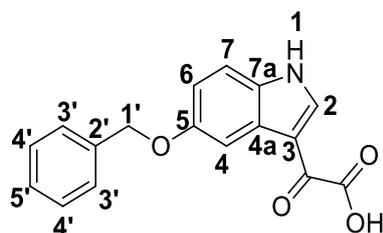
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 166.2 (**CO**), 153.3 (**5**), 137.7 (**2'**), 131.3 (**7a**), 129.1 (**4a**), 128.5 (**4'**), 128.2 (**2**), 127.8 (**5'**), 127.6 (**3'**), 112.9 (**6**), 109.9 (**7**), 104.5 (**4**), 101.3 (**3**), 70.9 (**1'**), 44.1 (**1''**), 42.5 (**CH₂Cl**), 37.6 (**3''**), 29.6 (**2''**).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 356.1, Found: 357.0 $[M+H]^+$, $t_R = 3.0$ min.

Synthesis of (5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate (FT88-FT103)

General procedure: To a solution of 5-benzyloxyindole (0.50 g, 1 eq., 2.2 mmol) in dry diethyl ether (8 mL), a solution of oxalyl chloride (1 eq.) in 2 mL of dry diethyl ether, was added dropwise at 0°C over 15 min. Reaction was allowed to warmup at room temperature and stirred for another 3 h. Then, a nucleophilic solution (2 mL) was added and the solution was stirred under reflux for 30 min. Mixture was cooled at room temperature and precipitate was filtrated and washed with water.

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetic acid (FT103)



$C_{17}H_{13}NO_4$

MW = 295.29 g/mol

Mp = 202 – 204 °C

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

FT103 was synthesized adding NaHCO_3 (1N) solution as nucleophilic solution and was obtained as an orange solid.

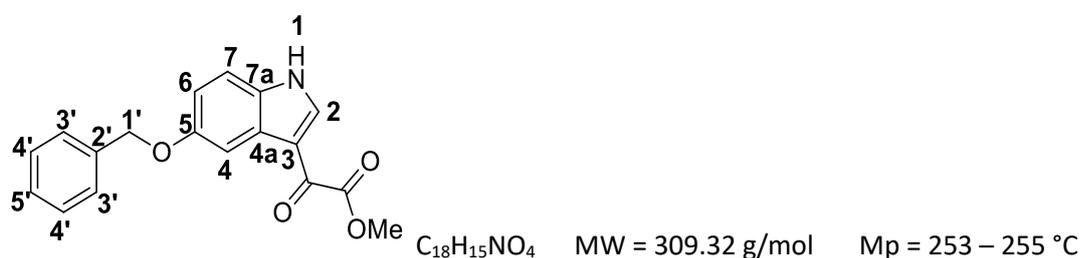
Yield: 78%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 12.33 (brs, 1 H, H_1), 8.33 (d, 1 H, $^3J = 3.4$ Hz, H_2), 7.76 (d, 1 H, $^4J = 2.5$ Hz, H_4), 7.49 - 7.32 (m, 6 H, $\text{H}_{7,3',4',5'}$), 6.99 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, H_6), 5.14 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 181.1 (CO), 165.7 (COO), 155.5 (5), 138.4 (2), 137.8 (13), 132.0 (7a), 128.9 (4a), 128.2 (4'), 128.1 (5'), 126.9 (3'), 114.3 (6), 114.0 (7), 112.6 (3), 105.1 (4), 70.1 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 295.2, Found: 294.2 $[\text{M-H}]^-$, 296.1 $[\text{M+H}]^+$, $t_R = 2.1$ min.

Methyl 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate (FT88)



FT88 was synthesized adding methanol as nucleophilic solution and was obtained as a brown solid.

Yield: 79%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 12.35 (brs, 1 H, H_1), 8.36 (d, 1 H, $^3J = 3.4$ Hz, H_2), 7.75 (d, 1 H, $^3J = 2.4$ Hz, H_4), 7.50 - 7.32 (m, 6 H, $\text{H}_{4,3',4',5'}$), 7.00 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 5.14 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 3.88 (s, 3H, CH_3).

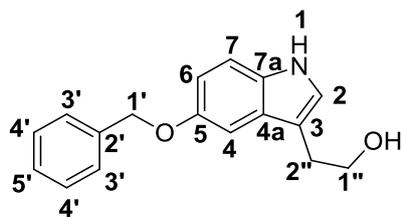
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 179.0 (CO), 164.5 (COO), 155.7 (5), 138.8 (2), 137.8 (2'), 132.0 (7a), 128.9 (4a), 128.2 (4'), 128.1 (5'), 126.8 (3'), 114.5 (6), 114.0 (7), 112.7 (3), 105.1 (4), 70.1 (1''), 53.0 (CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 309.1, Found: 308.2 $[\text{M-H}]^-$, 310.0 $[\text{M+H}]^+$, $t_R = 2.8$ min.

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)ethanol (FT112)

General procedure: To a solution of **FT88** (0.25 g, 1 eq., 0.81 mmol) in dry THF (7.5 mL), LiAlH_4 (15 eq.) was added slowly. Reaction was stirred under reflux for 5 h. Then, NaOH (1N) and water were added and formed precipitate was filtrated and washed with ethyl acetate. Both phases were separated and aqueous phase was washed three times with ethyl acetate. Aqueous phase was then acidified with HCl (1N) to pH 5 and extracted with ethyl acetate (three times). Combined organic phases were dried over MgSO_4 and solvent was removed under vacuum. **FT112** was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (60 : 40) as eluant and was obtained as a white solid.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART



$C_{17}H_{17}NO_2$ MW = 267.32 g/mol Mp = 100 – 102 °C

Yield: 69%

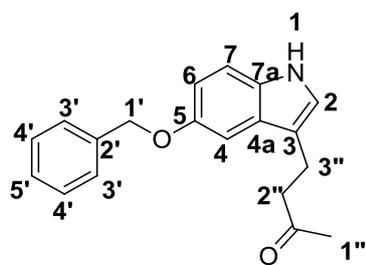
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.99 (brs, 1 H, H_1), 7.52 - 7.50 (m, 2 H, H_3), 7.44 - 7.28 (m, 4 H, $H_{7,4',5'}$), 7.18 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.08 (m, 1 H, H_2), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 5.14 (s, 2 H, $H_{1'}$), 3.91 (t, 2 H, $^3J = 6.0$ Hz, $H_{2''}$), 3.02 (t, 2 H, $^3J = 6.2$ Hz, $H_{1''}$), 1.60 (brs, 1H, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 153.3 (5), 137.6 ($2'$), 131.8 ($7a$), 128.5 ($4'$), 127.8 ($4a$), 127.8 ($5'$), 127.6 ($3'$), 123.3 (2), 113.1 (6), 112.1 (3), 111.9 (7), 102.5 (4), 71.0 ($1'$), 62.6 ($2''$), 28.8 ($1''$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 267.1, Found: 266.2 $[M+H]^-$, 268.1 $[M+H]^+$, $t_R = 2.6$ min.

4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)butan-2-one (FT90)

General procedure: To a solution of 5-benzyloxyindole (0.50 g, 1 eq., 2.2 mmol) in dichloromethane (5 mL), $InCl_3$ (10 mol%) and methyl vinyl ketone (1 eq.) were added. Mixture was stirred at room temperature for 3 h. Then, water was added and solution was extracted with dichloromethane (three times). Combined organic phases were washed with water and dried over $MgSO_4$. Solvent was removed under vacuum. Residue was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (50 : 50) as eluant and was obtained as a pale yellow solid.



$C_{19}H_{19}NO_2$ MW = 293.36 g/mol Mp = 83 – 85 °C

Yield: 70%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.84 (brs, 1 H, H_1), 7.52 - 7.49 (m, 2 H, H_3), 7.43 - 7.33 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.26 (d, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, H_7), 7.12 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 6.98 - 6.97 (m, 1 H, H_2), 6.95 (dd, 1 H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 5.13 (s, 2 H, $H_{1'}$), 3.04 - 2.99 (m, 2 H, $H_{2''}$), 2.85 - 2.80 (m, 2 H, $H_{3''}$), 2.15 (s, 3 H, $H_{1''}$).

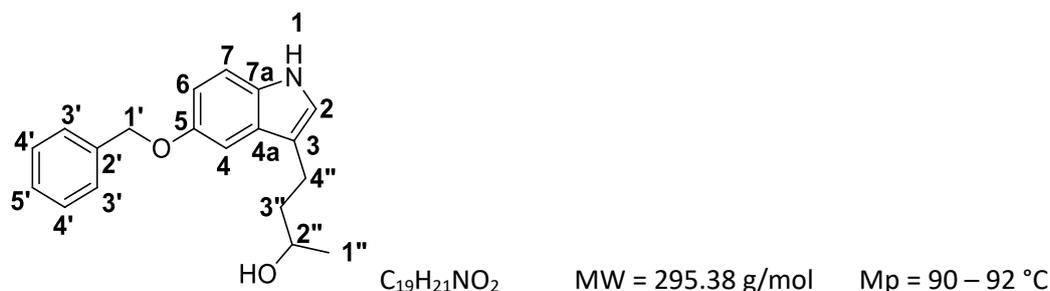
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 208.7 (CO), 153.1 (5), 137.7 ($2'$), 131.6 ($7a$), 128.5 ($4'$), 127.8 ($5'$), 127.6 ($4a$), 127.6 ($3'$), 122.3 (2), 112.9 (2), 115.0 (3), 111.8 (7), 102.4 (4), 71.0 ($1'$), 43.9 ($3''$), 30.1 ($2''$), 19.3 ($1''$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 293.1, Found: 294.1 $[M+H]^+$, $t_R = 2.8$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)butan-2-ol (FT99)

General procedure: To a solution of **FT90** (0.05 g, 1 eq., 0.17 mmol) in dry THF (2.5 mL), NaBH₄ (4 eq.) and few drops of methanol were slowly added. Mixture was stirred at room temperature for 2 h. Solvent was removed under vacuum and residue was diluted in ethyl acetate and washed with NaHCO₃ (1N). Aqueous phase was acidified and extracted with ethyl acetate (three times). Combined organic phases were dried over MgSO₄. Solvent was removed under vacuum and a white solid was obtained.



Yield: 93%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86 (brs, 1 H, H₁), 7.52 - 7.50 (m, 2 H, H_{3'}), 7.44 - 7.35 (m, 3 H, H_{4',5'}), 7.27 (d, 1 H, ³J = 8.8 Hz, H₇), 7.16 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.01 - 7.00 (m, 1 H, H₂), 6.96 (dd, 1 H, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 5.15 (s, 1 H, H_{1'}), 3.93 - 3.86 (m, 1 H, H_{2''}), 2.93 - 2.76 (m, 2 H, H_{3''}), 1.90 - 1.82 (m, 2H, H_{4''}), 1.36 (brd, 1 H, ³J = 4.3 Hz, OH), 1.26 (d, 3 H, ³J = 6.2 Hz, H_{1''}).

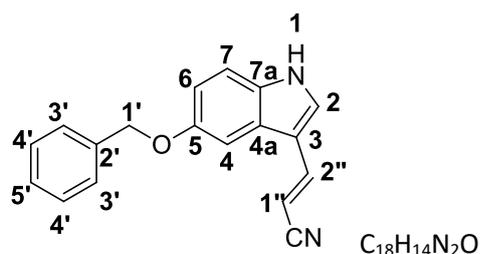
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 153.0 (5), 137.8 (2'), 131.7 (7a), 128.5 (4'), 127.9 (4a), 127.7 (5'), 127.6 (3'), 122.0 (2), 116.0 (3), 112.8 (6), 111.8 (7), 102.6 (4), 71.0 (1'), 67.8 (2''), 39.3 (3''), 23.7 (4''), 21.5 (1'').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 295.2, Found: 296.1 [M+H]⁺, t_R = 2.8 min.

(E)-3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)acrylonitrile (FT95)

General procedure: To a solution of cyanoacetic acid (1.7 eq.) in dioxane (4 mL), triethylamine (3.1 eq.) was added. Solution was stirred at room temperature for 30 min. Then, 5-(benzyloxy)-1H-indole-3-carbaldehyde (0.50 g, 1 eq., 1.99 mmol) and piperidine (2.2 eq.) were added and reaction mixture was stirred under reflux for 18 h. Solvent was removed under vacuum and residue was diluted in ethyl acetate and washed with water (three times). Organic phase was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (5 : 95) as eluant and was obtained as a pale yellow solid.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART



MW = 274.32 g/mol Mp = 89 – 91 °C

Yield: 65%

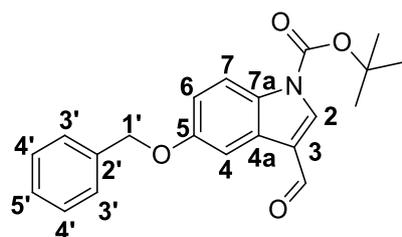
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.43 (brs, 1 H, H₁), 7.58 - 7.30 (m, 9 H, H_{2,4,7,3',3',4',5'}), 7.05 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 5.70 (d, 1 H, ³J = 16.5 Hz, H_{2''}), 5.17 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 154.9 (5), 143.7 (2''), 137.1 (2'), 132.0 (7a), 128.9 (2), 128.6 (4'), 128.0 (5'), 127.5 (3'), 125.3 (4a), 119.9 (CN), 114.2 (6), 113.3 (3), 112.6 (7), 104.0 (4), 90.2 (1''), 71.0 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 274.1, Found: 275.1 [M+H]⁺, t_R = 2.9 min.

Tert-butyl 5-(benzyloxy)-3-formyl-1H-indole-1-carboxylate (FT77)

General procedure: To a solution of 5-(benzyloxy)-1H-indole-3-carbaldehyde (0.50 g, 1 eq., 1.99 mmol), triethylamine (2 eq.) and DMAP (10 mol%) in dichloromethane (5 mL), Boc₂O (1.1 eq.) was slowly added at 0 °C. Mixture was allowed to warmup at room temperature and was stirred for 16 h. Then, reaction was quenched with NaHCO₃ (1N) and extracted with dichloromethane (three times). Combined organic phases were dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Product was purified by column chromatography ethyl acetate : cyclohexane (50 : 50) as eluant and was obtained as a brown solid.



C₂₁H₂₁NO₄

MW = 351.40 g/mol

Mp = 172 – 174 °C

Yield: 90%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.08 (s, 1 H, CHO), 8.20 (s, 1 H, H₂), 8.03 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz, H₇), 7.90 (d, 1 H, ⁴J = 2.6 Hz, H₄), 7.51 - 7.33 (m, 5 H, H_{3',4',5'}), 7.10 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, H₆), 5.16 (s, 2 H, H_{1'}), 1.71 (s, 9 H, OtBu).

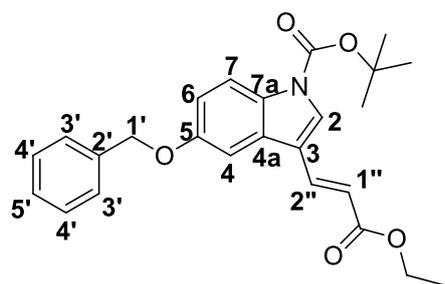
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 185.9 (CHO), 156.5 (5), 148.8 (COO), 137.0 (2'), 136.8 (2), 130.7 (7a), 128.6 (4'), 128.0 (5'), 127.7 (3'), 127.0 (4a), 121.4 (3), 116.2 (6), 116.0 (7), 105.2 (4), 85.6 (OtBu), 70.1 (1'), 28.1 (OtBu).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 351.4, Found: 350.4 [M-H]⁻; 352.4 [M+H]⁺, t_R = 3.67 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

(E)-tert-butyl 5-(benzyloxy)-3-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-1H-indole-1-carboxylate (FT86 and FT262)

General procedure: To a solution of (2-alkoxy-2-oxoethyl)triphenylphosphonium (1 eq.) in dry toluene (10 mL), NaHMDS (2 eq.) was added. Reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, **FT77** (0.50 g, 1 eq., 1.42 mmol) was added and mixture was stirred under reflux for 16 h. Solvent was removed under vacuum. Residue was diluted in ethyl acetate and washed three times with water. Organic phase was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Residue was purified by column chromatography with 100% dichloromethane as eluant and product was obtained as a yellow oil.



C₂₅H₂₇NO₅

MW = 421.49 g/mol

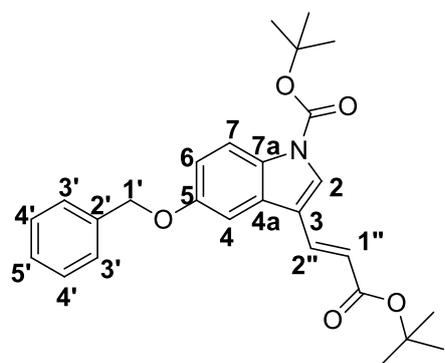
FT86 was synthesized from (2-ethoxy-2-oxoethyl)triphenylphosphonium bromide (0.60 g) and was obtained as a yellow oil.

Yield: 58%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz, H₇), 7.86 (s, 1 H, H₂), 7.83 (d, 1 H, ³J = 16.0 Hz, H_{2''}), 7.54 - 7.51 (m, 2 H, H_{3'}), 7.46 - 7.34 (m, 4 H, H_{4,4',5'}), 7.10 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.49 (d, 1 H, ³J = 16.5 Hz, H_{1''}), 5.17 (s, 1 H, H_{1'}), 4.32 (q, 2 H, ³J = 7.14 Hz, OCH₂CH₃), 1.70 (s, 9 H, OtBu), 1.40 (t, 3 H, ³J = 7.17 Hz, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 167.4 (COOCH₂CH₃), 155.7 (5), 149.1 (COOtBu), 137.1 (2'), 136.4 (2''), 131.0 (7a), 129.1 (2), 128.8 (4a), 128.6 (4'), 128.0 (5'), 127.6 (3'), 117.1 (1''), 116.5 (3), 116.2 (6), 114.3 (7), 104.8 (4), 84.5 (COOtBu), 70.8 (1'), 60.4 (OCH₂CH₃), 28.1 (COOtBu), 14.4 (OCH₂CH₃).

(E)-tert-butyl 5-(benzyloxy)-3-(3-(tert-butoxy)-3-oxoprop-1-en-1-yl)-1H-indole-1-carboxylate (FT262)



C₂₇H₃₁NO₅

MW = 449.54 g/mol

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

FT262 was synthesized from (2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)triphenylphosphonium bromide (0.65 g) and was obtained as a yellow oil.

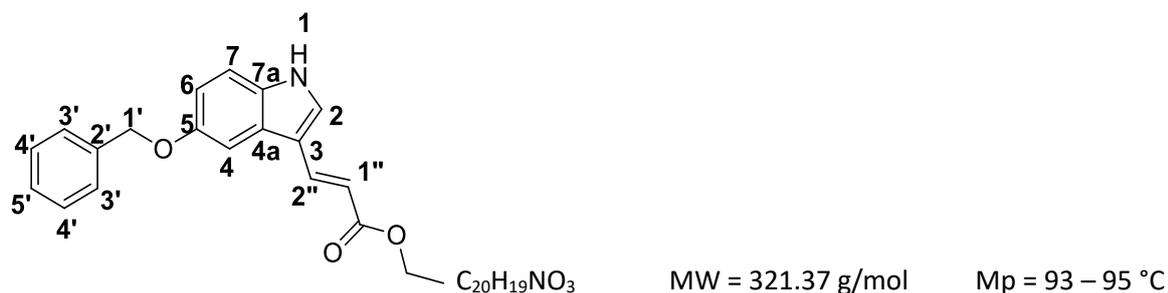
Yield: 68%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.12 (d, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, H_7), 7.84 (s, 1 H, H_2), 7.75 (d, 1 H, $^3J = 16.3$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 7.54 – 7.37 (m, 6 H, $\text{H}_{4,3',4',5'}$), 7.10 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.44 (d, 1 H, $^3J = 16.3$ Hz, $\text{H}_{1''}$), 5.17 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 1.71 (s, 9 H, OtBu), 1.61 (s, 9 H, OtBu).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 166.8 (COOtBu), 155.6 (5), 149.1 (COOtBu), 137.1 ($2'$), 135.3 ($2''$), 131.0 ($7a$), 128.9 ($4a$), 128.8 (2), 128.7 ($4'$), 128.0 ($5'$), 127.6 ($3'$), 119.1 ($1''$), 116.6 (3), 116.2 (7), 114.2 (6), 104.9 (4), 84.4 (COOtBu), 80.4 (COOtBu), 70.8 ($1'$), 28.3 (COOtBu), 28.2 (COOtBu).

(E)-ethyl 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)acrylate (FT196)

General procedure: To a solution of **FT86** (0.30 g, 1 eq., 0.71 mmol) in dichloromethane (2 mL), trifluoroacetic acid (5 eq.) was added. Mixture was stirred for 6 h and then quenched with 1N NaHCO_3 solution. Solution was extracted with dichloromethane (3 times) and the organic layer was dried over MgSO_4 and solvent was removed under vacuum. Product was obtained as a brown solid.



Yield: 99%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.80 (brs, 1 H, H_1), 7.91 (d, 1 H, $^3J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 7.54 - 7.51 (m, 2 H, $\text{H}_{3'}$), 7.46 - 7.33 (m, 4 H, $\text{H}_{7,4',5'}$), 7.28 - 7.22 (m, 2 H, $\text{H}_{2,4}$), 6.99 (dd, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, H_6), 6.37 (d, 1 H, $^3J = 16.2$ Hz, $\text{H}_{1''}$), 5.13 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$), 4.32 (q, 2 H, $^3J = 7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 1.40 (t, 3 H, $^3J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3).

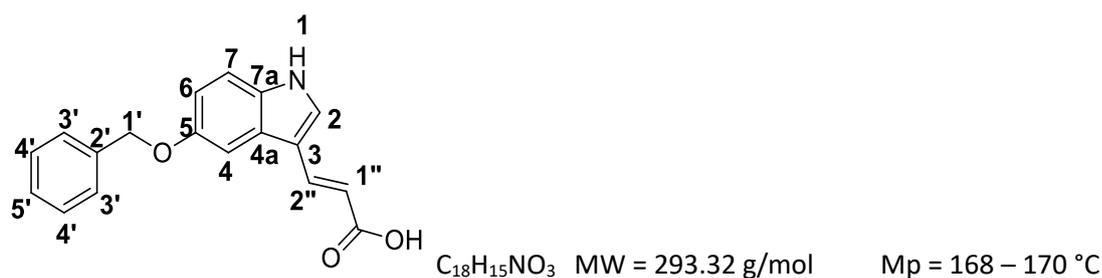
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 168.6 (CO), 154.6 (5), 138.5 ($2'$), 137.4 ($2''$), 132.3 ($7a$), 129.7 ($4a$), 128.9 (2), 128.6 ($4'$), 128.0 ($5'$), 127.7 ($3'$), 125.9 ($1''$), 113.7 (6), 113.2 (3), 112.6 (7), 104.3 (4), 71.0 ($1'$), 60.2 (OCH_2CH_3), 14.5 (OCH_2CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 321.1, Found: 320.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 322.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 3.1$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

(E)-3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)acrylic acid (FT265)

General procedure: To a solution of **FT262** (0.30 g, 1 eq., 0.85 mmol) in dichloromethane (7.5 mL), trifluoroacetic acid (15 eq.) was added. Mixture was stirred for 6 h and then quenched with 1N NaHCO₃ solution. Solution was extracted with dichloromethane (3 times). Aqueous solution was acidified with HCl 1N solution up to pH 3 and was extracted with dichloromethane (3 times). The organic layer was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Residue was purified by column chromatography dichloromethane : methanol (90 : 10) as eluant and product was obtained as a white solid.



Yield: 88%

¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*4): δ 7.92 (d, 1 H, ³J = 16.0 Hz, H_{2''}), 7.63(s, 1 H, H₂), 7.53 - 7.50 (m, 2 H, H_{3'}), 7.43 - 7.30 (m, 5 H, H_{4,7,4',5'}), 6.98 (dd, 1 H, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.29 (d, 1 H, ³J = 16.0 Hz, H_{1''}), 5.16 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*4): δ 170.9 (COO), 154.3 (5), 139.8 (2''), 137.8 (2'), 133.0 (7a), 130.8 (2), 128.1 (4'), 127.4 (5'), 127.3 (3'), 125.8 (4a), 113.0 (6), 112.4 (7), 112.2 (3), 110.6 (1''), 103.6 (4), 70.6 (1').

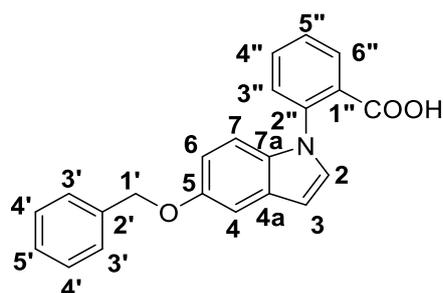
LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 293.1, Found: 292.1 [M-H]⁻; 294.0 [M+H]⁺, t_R = 2.6 min.

Synthesis of (x-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acids (FT117, FT118, FT189, FT214, FT216, FT218, FT220, FT222, FT223, FT231 et FT232)

General procedure: To a solution of x-benzyloxyindole derivative (1 eq.) in DMF (1 mL), K₂CO₃ (1 eq.), iodobenzoic acid (0.1 g, 0.9 eq., 0.40 mmol) and Cu (7 mol%) were added. Reaction was stirred under reflux for 18 h and was cooled at room temperature. Mixture was filtered through celite, quenched with NaHCO₃ (1N) and extracted three times with ethyl acetate. Aqueous phase was acidified with HCl solution (1N) and extracted with ethyl acetate (three times). Combined organic phases was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Residues were purified by HPLC (55 min, from 60% acetonitrile - 40% milli-Q water to 100% of acetonitrile).

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)- benzoic acid (FT117)



$C_{22}H_{17}NO_3$

MW = 343.38 g/mol

Mp = 110 – 112 °C

FT117 was synthesized from 2-iodobenzoic acid and 5-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a green solid.

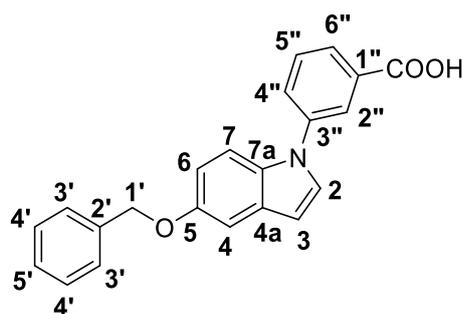
Yield: 55 %

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.07 (dd, 1 H, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, $H_{6''}$), 7.70 (td, 1 H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, $H_{4''}$), 7.53 - 7.47 (m, 4 H, $H_{3',3'',5''}$), 7.44 - 7.32 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.23 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.17 (d, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, H_2), 7.09 (d, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, H_7), 6.93 (dd, 1 H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.60 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.13 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 169.8 (COOH), 153.7 (5), 139.4 ($2''$), 137.7 ($2'$), 133.6 ($4''$), 132.6 ($7a$), 132.1 ($6''$), 129.6 ($5''$), 129.3 ($4a$), 128.7 (2), 128.5 ($4'$), 127.8 ($5'$), 127.5 ($3''$), 127.5 ($3'$), 127.3 ($1''$), 113.1 (6), 110.7 (7), 104.3 (4), 103.3 (3), 70.9 ($1'$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 343.1, Found: 342.3 $[M-H]^-$, 344.2 $[M+H]^+$, $t_R = 3.0$ min.

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)-*m*-benzoic acid (FT118)



$C_{22}H_{17}NO_3$

MW = 343.38 g/mol

Mp = 139 – 141 °C

FT118 was synthesized from 3-iodobenzoic acid and 5-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a pink solid.

Yield: 52%

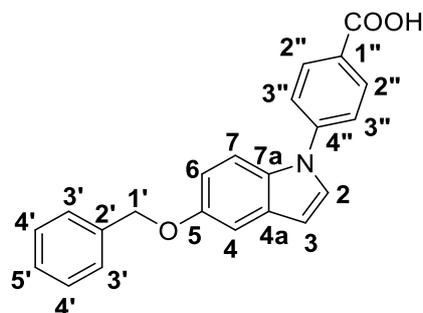
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.26 (t, 1 H, $^4J = 1.8$ Hz, $H_{2''}$), 8.10 (dt, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, $H_{6''}$), 7.79 (ddd, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, $H_{4''}$), 7.65 (t, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $H_{5''}$), 7.53 - 7.50 (m, 3 H, $H_{7,3'}$), 7.45 - 7.35 (m, 4 H, $H_{2,4',5'}$), 7.25 (d, 1 H, $^4J = 2.5$ Hz, H_4), 7.02 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, H_6), 6.66 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.17 (s, 2 H, $H_{1'}$).

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 169.7 (COOH), 154.0 (5), 140.3 (3''), 137.5 (2'), 131.0 (7a), 130.8 (1''), 130.1 (4a), 129.9 (5''), 128.9 (4''), 128.6 (4'), 128.1 (2), 127.8 (5'), 127.7 (6''), 127.5 (3'), 125.3 (2''), 113.5 (6), 111.1 (7), 104.6 (4), 104.1 (3), 70.9 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 343.1, Found: 342.3 [M-H]⁻, 344.2 [M+H]⁺, *t_R* = 3.1 min.

4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)-*p*-benzoic acid (FT189)



C₂₂H₁₇NO₃

MW = 343.38 g/mol

Mp = 162 –

164 °C

FT189 was synthesized from 4-iodobenzoic acid and 5-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

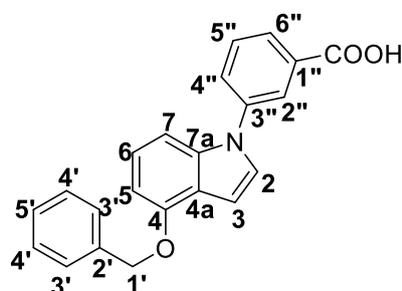
Yield: 18%

¹H NMR (300 MHz, CO(CD₃)₂): δ 8.23 (m, 2 H, H_{2''}), 7.75 (m, 2 H, H_{3''}), 7.65 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz, H₇), 7.62 (d, 1 H, ³J = 3.3 Hz, H₂), 7.54 - 7.33 (m, 5 H, H_{3', 4', 5'}), 7.29 (d, 1 H, ⁴J = 2.5 Hz, H₄), 7.00 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H₆), 6.67 (dd, 1 H, ³J = 3.3 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.18 (s, 2 H, H_{1''}).

¹³C NMR (75 MHz, CO(CD₃)₂): 169.3 (COOH), 154.1 (5), 143.7 (4''), 138.0 (2'), 131.3 (7a), 131.3 (2''), 130.8 (4a), 128.3 (2), 128.2 (4'), 127.6 (5'), 127.5 (1''), 127.5 (3'), 122.7 (3''), 113.2 (6), 111.4 (7), 104.6 (3), 104.5 (4), 70.1 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 343.1, Found: 342.1 [M-H]⁻, 344.1 [M+H]⁺, *t_R* = 3.1 min.

3-(4-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT214)



C₂₂H₁₇NO₃

MW = 343.38 g/mol

Mp = 137 – 139 °C

FT214 was synthesized from 3-iodobenzoic acid and 4-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 48%

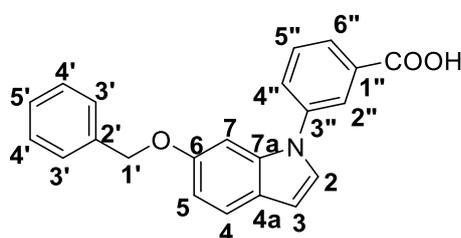
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.29 (t, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz, H_{2''}), 8.12 (dt, 1 H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, H_{6''}), 7.81 (ddd, 1 H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, H_{4''}), 7.66 (t, 1 H, ³J = 7.9 Hz, H_{5''}), 7.57 – 7.55 (m, 2 H, H_{3'}), 7.47 – 7.37 (m, 3 H, H_{4',5'}), 7.32 (d, 1 H, ³J = 3.3 Hz, H₂), 7.24 – 7.15 (m, 2 H, H_{5,6}), 6.93 (dd, 1 H, ³J = 3.3 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, H₃), 6.70 (dd, 1 H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, H₇), 5.30 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): 170.8 (COOH), 152.7 (4), 140.4 (3''), 137.5 (7a), 137.2 (2'), 130.8 (1''), 129.9 (5''), 129.4 (6''), 128.5 (4'), 128.0 (4''), 127.8 (5'), 127.3 (3'), 126.2 (2), 125.7 (2''), 123.6 (6), 120.4 (4a), 103.9 (5), 102.6 (7), 101.9 (3), 70.1 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 343.1, Found: 342.1 [M-H]⁻, 344.0 [M+H]⁺, t_R = 3.1 min.

3-(6-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT216)



C₂₂H₁₇NO₃ MW = 343.38 g/mol Mp = 134 – 136 °C

FT216 was synthesized from 3-iodobenzoic acid and 6-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 52%

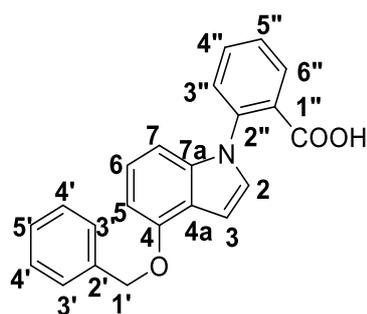
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.27 (t, 1 H, ⁴J = 2.2 Hz, H_{2''}), 8.14 (dt, 1 H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, H_{6''}), 7.74 (ddd, 1 H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, H_{4''}), 7.66 (t, 1 H, ³J = 8.0 Hz, H_{5''}), 7.61 (d, 1 H, ³J = 8.6 Hz, H₄), 7.50 – 7.47 (m, 2 H, H_{3'}), 7.44 – 7.35 (m, 3 H, H_{4',5'}), 7.29 (d, 1 H, ³J = 3.4 Hz, H₂), 7.16 (d, 1 H, ⁴J = 2.2 Hz, H₇), 6.99 (dd, 1 H, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, H₅), 6.69 (dd, 1 H, ³J = 3.4 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, H₃), 5.12 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 171.3 (COOH), 156.1 (6), 140.3 (3''), 137.3 (7a), 136.4 (2'), 131.0 (1''), 130.0 (5''), 129.2 (6''), 128.6 (4'), 127.9 (5'), 127.9 (4''), 127.6 (3'), 126.8 (2), 125.6 (2''), 123.9 (4a), 121.8 (4), 111.1 (5), 104.3 (3), 95.7 (7), 70.7 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 343.1, Found: 342.1 [M-H]⁻, 344.0 [M+H]⁺, t_R = 3.1 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

2-(4-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT218)



FT218 was synthesized from 2-iodobenzoic acid and 4-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

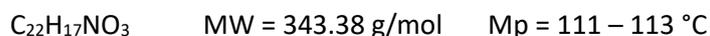
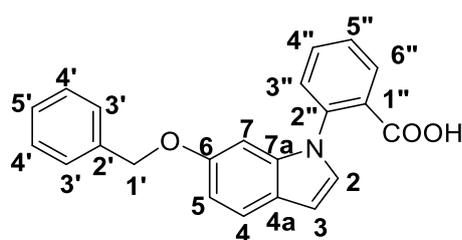
Yield: 41%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.08 (dd, 1 H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, $H_{6''}$), 7.70 (td, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, $H_{4''}$), 7.57 – 7.34 (m, 7 H, $H_{3',4',5',3'',5''}$), 7.12 (d, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, H_2), 7.08 (t, 1 H, $^3J = 8.2$ Hz, H_6), 6.86 (dd, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, $^5J = 0.6$ Hz, H_3), 6.81 (d, 1 H, $^3J = 8.2$ Hz, H_5), 6.65 (d, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, H_7), 5.27 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 170.2 (COOH), 152.5 (4), 139.4 (2''), 138.7 (7a), 137.6 (2'), 133.6 (4''), 132.1 (6''), 128.9 (1''), 128.5 (4'), 127.7 (5''), 127.7 (5'), 127.5 (2), 127.4 (3'), 127.4 (3''), 123.2 (6), 119.7 (4a), 103.6 (5), 101.8 (7), 101.1 (3), 70.0 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 343.1, Found: 342.1 $[M-H]^-$, 344.0 $[M+H]^+$, $t_R = 3.0$ min.

2-(6-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT220)



FT220 was synthesized from 2-iodobenzoic acid and 6-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 47%

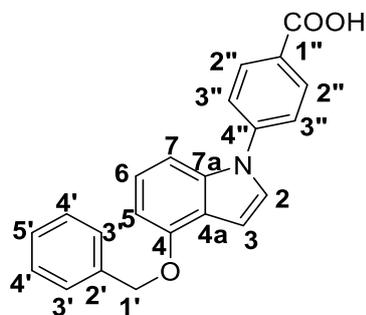
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 8.08 (dd, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, $H_{6''}$), 7.69 (td, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, $H_{4''}$), 7.57 (d, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, H_4), 7.51 (td, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, $H_{5''}$), 7.46 (dd, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, $H_{3''}$), 7.41 – 7.28 (m, 5 H, $H_{3',4',5'}$), 7.09 (d, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, H_2), 6.93 (dd, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, H_5), 6.77 (d, 1 H, $^4J = 2.0$ Hz, H_7), 6.61 (dd, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.01 (s, 2 H, $H_{1'}$).

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.7 (COOH), 155.9 (6), 139.3 (2''), 137.8 (7a), 137.3 (2'), 133.7 (4''), 132.1 (6''), 128.7 (3''), 128.5 (4'), 128.1 (2), 127.8 (5'), 127.7 (3'), 127.6 (5''), 127.6 (2), 127.3 (1''), 123.2 (4a), 121.6 (4), 110.8 (5), 103.5 (3), 95.1 (7), 70.6 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 343.1, Found: 342.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 344.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R = 3.0 min.

4-(4-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT222)



$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3$

MW = 343.38 g/mol

Mp = 162 – 164 °C

FT222 was synthesized from 4-iodobenzoic acid and 4-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

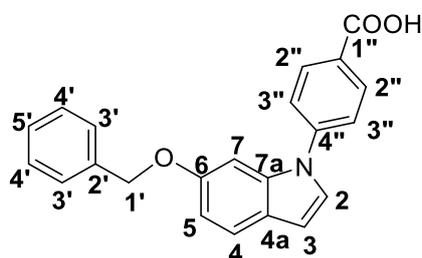
Yield: 25%

^1H NMR (300 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$): 8.26 – 8.23 (m, 2 H, $\text{H}_{2''}$), 7.77 – 7.74 (m, 2 H, $\text{H}_{3''}$), 7.58 (d, 1 H, $^3J = 7.3$ Hz, H_7), 7.55 (d, 1 H, $^3J = 3.4$ Hz, H_2), 7.43 – 7.30 (m, 5 H, $\text{H}_{3',4',5'}$), 7.17 (t, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, H_6), 6.86 (dd, 1 H, $^3J = 3.4$ Hz, $^5J = 0.6$ Hz, H_3), 6.78 (d, 1 H, $^3J = 7.8$ Hz, H_5), 5.31 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$): 166.1 (COOH), 152.6 (4), 143.6 (4''), 137.8 (7a), 136.8 (2'), 131.3 (2''), 128.4 (4'), 128.1 (1''), 127.7 (5'), 127.4 (3'), 126.3 (2), 123.7 (6), 123.2 (3''), 120.7 (4a), 104.0 (7), 102.4 (3), 102.0 (5), 69.6 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 343.1, Found: 342.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 344.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R = 3.1 min.

4-(6-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT223)



$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3$

MW = 343.38 g/mol

Mp = 161 – 163 °C

FT223 was synthesized from 4-iodobenzoic acid and 6-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 38%

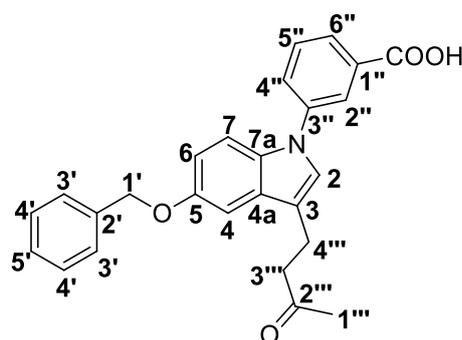
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.30 – 8.27 (m, 2 H, H_{2''}), 7.61 – 7.58 (m, 3 H, H_{4,3''}), 7.51 – 7.36 (m, 5 H, H_{3',4',5'}), 7.31 (d, 1 H, ³J = 3.3 Hz, H₂), 7.23 (d, 1 H, ⁴J = 2.2 Hz, H₇), 6.99 (dd, 1 H, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, H₅), 6.69 (dd, 1 H, ³J = 3.3 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.14 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 171.1 (COOH), 156.1 (6), 144.6 (4''), 137.2 (2'), 136.0 (7a), 132.0 (2''), 128.6 (4'), 128.0 (5'), 127.5 (3'), 126.5 (2), 126.3 (1''), 124.2 (4a), 123.1 (3''), 121.9 (4), 111.4 (5), 105.1 (3), 96.3 (7), 70.7 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 343.1, Found: 342.2 [M-H]⁻, 344.1 [M+H]⁺, t_R = 3.1 min.

3-(5-(benzyloxy)-3-(3-oxobutyl)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT231)



C₂₆H₂₃NO₄

MW = 413.47 g/mol

Mp = 132 - 134°C

The product **FT231** was synthesized from 3-iodobenzoic acid and 4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)butan-2-one (0.13 g) and was obtained as a grey solid.

Yield: 44 %

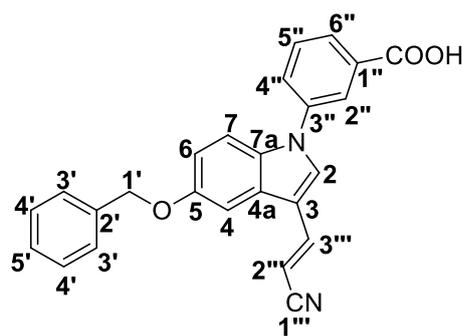
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (dd, 1 H, ⁴J = 2.19 Hz, ⁴J = 1.75 Hz, H_{2''}), 8.07 (ddd, 1 H, ³J = 7.74 Hz, ⁴J = 1.75 Hz, ⁴J = 1.11 Hz, H_{6''}), 7.74 (ddd, 1 H, ³J = 7.85 Hz, ⁴J = 2.19 Hz, ⁴J = 1.11 Hz, H_{4''}), 7.61 (dd, 1 H, ³J = 7.85 Hz, ³J = 7.74 Hz, H_{5''}), 7.55 – 7.36 (m, 6H, H_{7,3',4',5'}), 7.20 – 7.19 (m, 2H, H_{2,4}), 7.02 (dd, 1 H, ³J = 8.87 Hz, ⁴J = 2.37 Hz, H₆), 5.19 (s, 2 H, H_{1'}), 3.09 (t, 2 H, ³J = 7.24 Hz, H_{3'''}), 2.91 (t, 2 H, ³J = 7.24 Hz, H_{4'''}), 2.23 (s, 3 H, H_{1'''}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 209.1 (2'''), 170.9 (COOH), 153.7 (5), 140.2 (3''), 137.5 (2'), 131.2 (7a), 131.0 (1''), 129.9 (5''), 129.5 (4a), 128.6 (4'), 128.5 (4''), 127.9 (5'), 127.6 (3'), 127.4 (6''), 125.5 (2), 124.9 (2''), 116.7 (3), 113.4 (6), 111.3 (7), 102.9 (4), 71.0 (1'), 43.7 (3'''), 30.1 (1'''), 19.1 (4''').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 413.2, Found: 412.2 [M-H]⁻, 414.1 [M+H]⁺, t_R = 3.0 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

(E)-3-(5-(benzyloxy)-3-(2-cyanovinyl)-1H-indol-1-yl)benzoic acid (FT232)



$C_{25}H_{18}N_2O_3$

MW = 394.42 g/mol

Mp = 151 - 153°C

The product **FT232** was synthesized from 3-iodobenzoic acid and (E)-3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl)acrylonitrile (0.12 g) and was obtained as a green solid.

Yield: 45 %

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.23 (dd, 1 H, $^4J = 1.75$ Hz, $^4J = 1.59$ Hz, $H_{2''}$), 8.19 (ddd, 1 H, $^3J = 7.78$ Hz, $^4J = 1.75$ Hz, $^4J = 1.39$ Hz, $H_{6''}$), 7.77 (ddd, 1 H, $^3J = 8.01$ Hz, $^4J = 1.59$ Hz, $^4J = 1.39$ Hz, $H_{4''}$), 7.70 (dd, 1 H, $^3J = 8.01$ Hz, $^3J = 7.78$ Hz, $H_{5''}$), 7.60 (s, 1 H, H_2), 7.58 (d, 1 H, $^3J = 16.71$ Hz, $H_{1'''}$), 7.53 – 7.51 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.47 – 7.37 (m, 4 H, $H_{7,4',5'}$), 7.34 (d, 1 H, $^4J = 2.42$ Hz, H_4), 7.09 (dd, 1 H, $^3J = 9.04$ Hz, $^4J = 2.42$ Hz, H_6), 5.78 (d, 1 H, $^3J = 16.71$ Hz, $H_{2'''}$), 5.20 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 168.9 (COOH), 155.4 (5), 142.9 ($3'''$), 138.8 ($3''$), 137.0 ($2'$), 132.3 (7a), 131.0 ($1''$), 130.3 ($5''$), 129.3 (4a), 129.2 ($4''$), 128.7 ($4'$), 128.6 ($6''$), 128.1 ($5'$), 127.5 ($3'$), 126.9 ($2''$), 125.8 (2), 119.6 ($1'''$), 114.6 (6), 114.1 (3), 112.0 (7), 104.2 (4), 91.3 ($2'''$), 71.0 ($1'$).

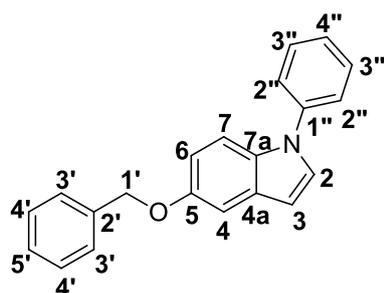
LC-MS (ESI): m/z Calculated: 394.1, Found: 393.1 [M-H]⁻, 395.0 [M+H]⁺, $t_R = 3.0$ min.

Synthesis of 5-(benzyloxy)-1-phenyl-1H-indole (FT278, FT282, FT288, FT289, FT300, FT301, FT303, FT304, FT306, FT309, FT319, FT320, FT321 and FT324)

General procedure: To a solution of 5-benzyloxyindole (1 eq.) in DMF (1 mL), K_2CO_3 (1 eq.), iodobenzene derivative (0.9 eq., 0.40 mmol) and Cu (7 mol%) were added. Reaction was stirred under reflux for 18 h and was cooled at room temperature. Mixture was filtered through celite, diluted in water (50 mL) and extracted three times with ethyl acetate. Combined organic phases was washed with brine (3 x 15 mL), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under vacuum. Residue was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (2 : 98) as eluant.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

5-(benzyloxy)-1-phenyl-1H-indole (FT278)



C₂₁H₁₇NO

MW = 299.37 g/mol

Mp = 99 - 101°C

FT278 was synthesized from iodobenzene (0.05 mL) and was obtained as an orange solid.

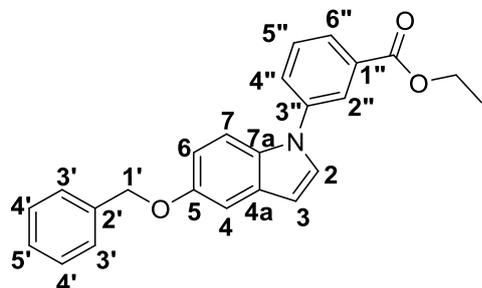
Yield: 80%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.57 – 7.39 (m, 10 H, H_{3',4',5',2'',3'',4''}), 7.39 (d, 1 H, ³J = 3.2 Hz, H₂), 7.31 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.06 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.68 (dd, 1 H, ³J = 3.2 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, H₃), 5.21 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 153.8 (5), 140.0 (1''), 137.7 (2'), 131.3 (7a), 129.9 (4a), 129.7 (3''), 128.6 (4'), 128.5 (2), 127.9 (5'), 127.6 (3'), 126.3 (4''), 124.1 (2''), 113.3 (6), 111.4 (7), 104.4 (4), 103.4 (3), 70.9 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 299.1, Found: 300.0 [M+H]⁺, t_R = 3.7 min.

Ethyl 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoate (FT282)



C₂₄H₂₁NO₃

MW = 371.43 g/mol

FT282 was synthesized from ethyl 3-iodobenzoate (0.07 mL) and was obtained as a green oil.

Yield: 74%

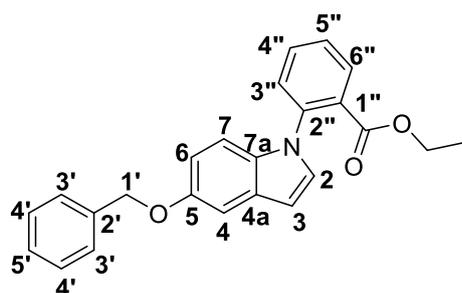
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (t, 1 H, ⁴J = 2.2 Hz, H_{2''}), 8.05 (dt, 1 H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, H_{6''}), 7.72 (ddd, 1 H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, H_{4''}), 7.61 (t, 1 H, ³J = 8.0 Hz, H_{5''}), 7.54 – 7.36 (m, 7 H, H_{2,7,3',4',5'}), 7.26 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.02 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.66 (dd, 1 H, ³J = 3.3 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.17 (s, 2 H, H_{1'}), 4.45 (q, 2 H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 1.45 (t, 3 H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 165.9 (COO), 153.9 (5), 140.1 (3''), 137.6 (2'), 132.2 (7a), 131.1 (1''), 130.0 (4a), 129.7 (5''), 128.6 (4'), 128.2 (5'), 128.1 (4''), 127.8 (2), 127.5 (3'), 127.2 (6''), 124.9 (2''), 113.5 (6), 111.1 (7), 104.5 (4), 103.9 (3), 70.8 (1'), 61.4 (OCH₂CH₃), 14.4 (OCH₂CH₃).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 371.2, Found: 372.0 [M+H]⁺, t_R = 3.8 min

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

Ethyl 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoate (FT288)



$C_{24}H_{21}NO_3$ MW = 371.43 g/mol

FT288 was synthesized from ethyl 2-iodobenzoate (0.11 g) and was obtained as a yellow oil.

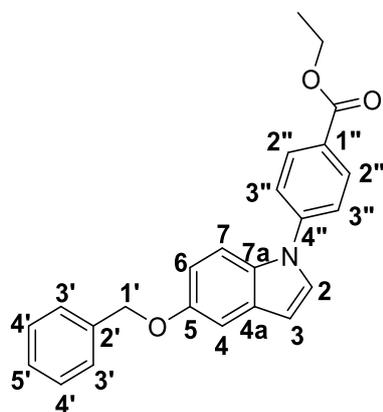
Yield: 71%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.03 (dd, 1 H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, $H_{6''}$), 7.67 (td, 1 H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, $H_{4''}$), 7.56 – 7.34 (m, 7 H, $H_{3',4',5',3'',5''}$), 7.27 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.24 (d, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, H_2), 7.11 (d, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, H_7), 6.97 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.65 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.18 (s, 2 H, $H_{1'}$), 3.99 (q, 2 H, $^3J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 0.83 (t, 3 H, $^3J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 166.6 (COO), 153.6 (5), 138.7 ($2''$), 137.7 ($2'$), 133.0 (7a), 132.7 ($4''$), 131.3 ($6''$), 129.6 ($1''$), 129.4 ($5''$), 129.1 (4a), 128.5 (2), 128.5 ($4'$), 127.8 ($5'$), 127.6 ($3''$), 127.6 ($3'$), 113.1 (6), 110.7 (7), 104.4 (4), 102.9 (3), 70.9 ($1'$), 61.4 (OCH_2CH_3), 13.5 (OCH_2CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 371.2, Found: 372.0 $[M+H]^+$, $t_R = 3.6$ min.

Ethyl 4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoate (FT289)



$C_{24}H_{21}NO_3$ MW = 371.43 g/mol

FT289 was synthesized from ethyl 4-iodobenzoate (0.07 mL) and was obtained as a green oil.

Yield: 69%

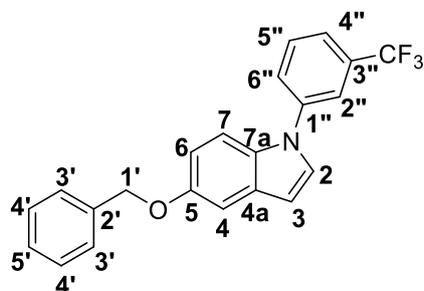
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.24 – 8.21 (m, 2 H, $H_{2''}$), 7.60 – 7.36 (m, 9 H, $H_{2,7,3',4',5',3''}$), 7.25 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.03 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.67 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.17 (s, 2 H, $H_{1'}$), 4.46 (q, 2 H, $^3J = 7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 0.83 (t, 3 H, $^3J = 7.0$ Hz, OCH_2CH_3).

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 166.0 (COO), 154.1 (5), 143.7 ($4''$), 137.5 ($2'$), 131.3 ($2''$), 130.7 (7a), 130.4 ($1''$), 128.6 ($4'$), 127.9 (2), 127.9 ($5'$), 127.8 (4a), 127.5 ($3'$), 122.8 ($3''$), 113.5 (6), 111.5 (7), 104.7 (4), 104.6 (3), 70.8 ($1'$), 61.2 (OCH_2CH_3), 14.4 (OCH_2CH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 371.2, Found: 372.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R = 3.8 min.

5-(benzyloxy)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-indole (FT300)



$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}$

MW = 367.36 g/mol

Mp = 112 -

114°C

FT300 was synthesized from 1-iodo-3-(trifluoromethyl)benzene (0.06 mL) and was obtained as an orange solid.

Yield: 65 %

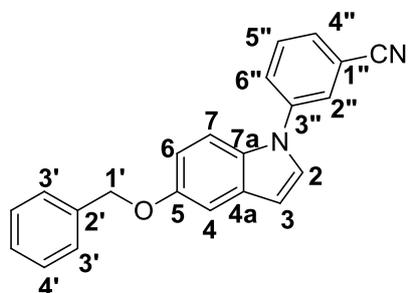
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.85 (m, 1 H, $\text{H}_{2''}$), 7.75 – 7.66 (m, 3 H, $\text{H}_{4'',5'',6''}$), 7.60 – 7.42 (m, 6 H, $\text{H}_{7,3',4',5'}$), 7.38 (d, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, H_2), 7.33 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.11 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.73 (dd, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.23 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 154.1 (5), 140.5 ($1''$), 137.6 ($2'$), 132.3 (q, $^2J = 32.6$ Hz, $3''$), 131.0 (7a), 130.4 ($5''$), 130.3 (4a), 128.6 ($4'$), 128.1 (2), 127.9 ($5'$), 127.6 ($3'$), 127.0 ($6''$), 123.9 (q, $^1J = 272.8$ Hz, CF_3), 122.8 (q, $^3J = 3.6$ Hz, $4''$), 120.6 (q, $^3J = 3.5$ Hz, $2''$), 113.7 (6), 111.1 (7), 104.7 (4), 104.5 (3), 70.8 ($1'$).

^{19}F NMR (282 Hz, CDCl_3): -63.2 (s).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 367.1, Found: 368.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R = 3.8 min.

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzonitrile (FT301)



$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$

MW = 324.38 g/mol

FT301 was synthesized from 3-iodo-benzonitrile (0.09 g) and was obtained as a yellow oil.

Yield: 59 %

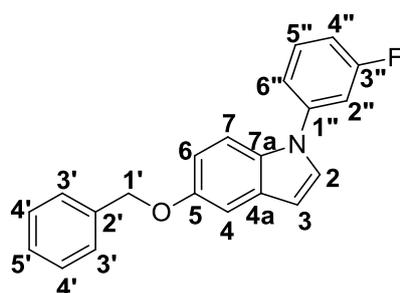
ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.79 – 7.73 (m, 2 H, $\text{H}_{4'',5''}$), 7.63 – 7.61 (m, 2 H, $\text{H}_{2'',6''}$), 7.55 – 7.38 (m, 6 H, $\text{H}_{7,3',4',5'}$), 7.30 (d, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, H_2), 7.27 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.04 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.69 (dd, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.17 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 154.2 (5), 140.7 (3''), 137.5 (2'), 130.7 (5''), 130.7 (7a), 130.4 (4a), 129.4 (4''), 128.6 (4'), 127.9 (2), 127.9 (6''), 127.8 (5'), 127.6 (3'), 126.8 (2''), 118.1 (CN), 113.9 (1''), 113.8 (6), 110.9 (7), 105.0 (4), 104.8 (3), 70.8 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 324.1, Found: 325.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 3.5$ min.

5-(benzyloxy)-1-(3-fluorophenyl)-1H-indole (FT303)



$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{FNO}$

MW = 317.36 g/mol

FT303 was synthesized from 1-iodo-3-fluorobenzene (0.05 mL) and was obtained as a brown oil.

Yield: 75 %

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.54 – 7.47 (m, 4 H, $\text{H}_{7,3',5'}$), 7.45 – 7.35 (m, 3 H, $\text{H}_{4',\text{H}_5'}$), 7.33 (d, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, H_2), 7.33 – 7.31 (m, 1 H, $\text{H}_{6''}$), 7.27 – 7.25 (m, 1 H, $\text{H}_{2''}$), 7.24 (d, 1 H, $^4J = 2.3$ Hz, H_4), 7.07 (m, 1 H, $\text{H}_{4''}$), 7.02 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, H_6), 6.64 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 5.17 (s, 2 H, $\text{H}_{1'}$).

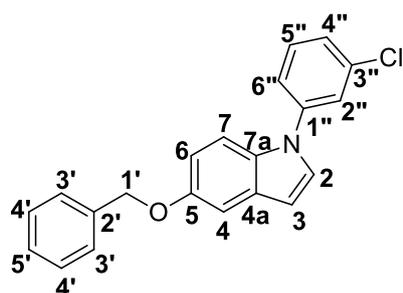
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): 163.3 (d, $^1J = 247.5$ Hz, 3''), 154.0 (5), 141.4 (d, $^3J = 10.0$ Hz, 1''), 137.6 (2'), 130.9 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 5''), 130.9 (7a), 130.1 (4a), 128.6 (4'), 128.1 (2), 127.9 (5'), 127.6 (3'), 119.4 (d, $^4J = 3.0$ Hz, 6''), 113.5 (6), 113.1 (d, $^2J = 20.9$ Hz, 4''), 111.3 (7), 111.1 (d, $^2J = 24.0$ Hz, 2''), 104.5 (4), 104.1 (3), 70.8 (1').

$^{19}\text{F NMR}$ (471 MHz, CDCl_3): - 110.81 (ddd, $^3J = 9.8$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 6.4$ Hz).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 317.1, Found: 318.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 3.7$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

5-(benzyloxy)-1-(3-chlorophenyl)-1H-indole (FT304)



C₂₁H₁₆ClNO

MW = 333.81 g/mol

FT304 was synthesized from 1-chloro-3-iodo-benzene (0.05 mL) and was obtained as a brown oil.

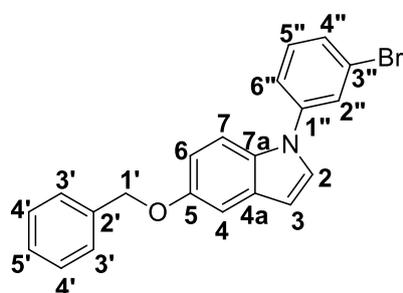
Yield: 49 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.57 – 7.53 (m, 4 H, H_{2'',4'',5'',6''}), 7.50 – 7.40 (m, 4 H, H_{7,4',5'}), 7.39 – 7.34 (m, 2 H, H_{3'}), 7.33 (d, 1 H, ³J = 3.3 Hz, H₂), 7.30 (d, 1 H, ⁴J = 2.5 Hz, H₄), 7.07 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H₆), 6.68 (dd, 1 H, ³J = 3.3 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, H₃), 5.21 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 154.0 (5), 141.1 (1''), 137.6 (2'), 135.3 (3''), 131.0 (7a), 130.7 (5''), 130.2 (4a), 128.6 (4'), 128.1 (2), 127.9 (5'), 127.6 (3'), 126.3 (4''), 124.0 (6''), 122.0 (2''), 113.6 (6), 111.3 (7), 104.6 (4), 104.2 (3), 70.8 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 333.1, Found: 334.0; 335.99 [M+H]⁺, t_R = 4.2 min.

5-(benzyloxy)-1-(3-bromophenyl)-1H-indole (FT306)



C₂₁H₁₆BrNO

MW = 378.26 g/mol

FT307 was synthesized from 3-bromo-1-iodo-benzene (0.05 mL) and was obtained as a yellow oil.

Yield: 71 %

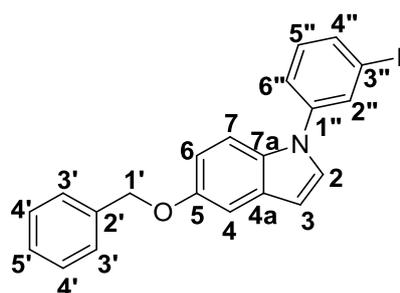
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.70 (t, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz, H_{2''}), 7.55 – 7.35 (m, 9 H, H_{7,3',4',5',4'',5'',6''}), 7.31 (d, 1 H, ³J = 3.3 Hz, H₂), 7.26 (d, 1 H, ⁴J = 2.5 Hz, H₄), 7.03 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H₆), 6.65 (dd, 1 H, ³J = 3.3 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, H₃), 5.17 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 154.0 (5), 141.2 (1''), 137.6 (2'), 131.0 (7a), 130.9 (5''), 130.1 (4a), 129.2 (4''), 128.6 (4'), 128.1 (2), 127.9 (5'), 127.6 (3'), 126.9 (2''), 123.1 (3''), 122.4 (6''), 113.5 (6), 111.2 (7), 104.5 (4), 104.1 (3), 70.8 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 377.0, Found: 377.9; 380.0 [M+H]⁺, t_R = 3.9 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

5-(benzyloxy)-1-(3-iodophenyl)-1H-indole (FT309)



$C_{21}H_{16}INO$

MW = 425.26 g/mol

FT309 was synthesized from 1,3-diiodobenzene (0.05 mL) and was obtained as a orange oil.

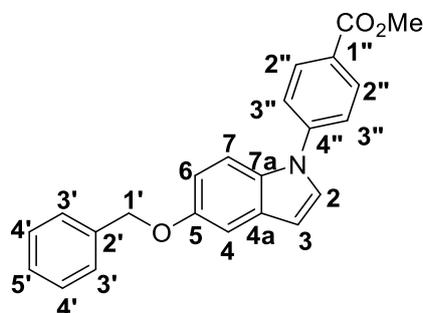
Yield: 42 %

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.88 (t, 1 H, $^4J = 1.9$ Hz, $H_{2''}$), 7.69 (ddd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, $^4J = 1.0$ Hz, $H_{4''}$), 7.53 – 7.33 (m, 7 H, $H_{7,3',4',5',6''}$), 7.30 (d, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, H_2), 7.25 – 7.22 (m, 2 H, $H_{4,5''}$), 7.01 (dd, 1 H, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, H_6), 6.63 (dd, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.16 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.9 (5), 141.0 ($1''$), 137.6 ($2'$), 135.2 ($4''$), 132.8 ($2''$), 131.0 ($5''$), 131.0 ($7a$), 130.0 ($4a$), 128.6 ($4'$), 128.1 (2), 127.8 ($5'$), 127.5 ($3'$), 123.2 ($6''$), 113.5 (6), 111.2 (7), 104.5 (4), 104.1 (3), 94.6 ($3''$), 70.8 ($1'$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 425.0, Found: 425.9 $[M+H]^+$, $t_R = 3.9$ min.

Methyl 4-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoate (FT319)



$C_{23}H_{19}NO_3$

MW = 357.40 g/mol MP: 122 – 124 °C

FT319 was synthesized from methyl 4-iodobenzoate (0.11 g) and was obtained as a white solid.

Yield: 68 %

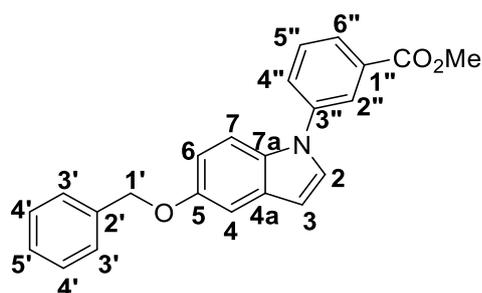
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.23 – 8.20 (m, 2 H, $H_{2''}$), 7.61 – 7.58 (m, 2 H, $H_{3''}$), 7.56 – 7.24 (m, 7 H, $H_{2,7,3',4',5'}$), 7.25 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 7.03 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.67 (dd, 1 H, $^3J = 3.3$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.17 (s, 2 H, $H_{1'}$), 3.99 (s, 3 H, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 166.5 (COO), 154.1 (5), 143.8 ($4''$), 137.5 ($2'$), 131.3 ($2''$), 130.7 ($1''$), 130.5 ($7a$), 128.6 ($4'$), 127.9 (2), 127.9 ($5'$), 127.5 ($3'$), 127.4 ($4a$), 122.8 ($3''$), 113.6 (6), 111.5 (7), 104.7 (4), 104.6 (3), 70.8 ($1'$), 52.3 (OCH_3).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 357.1, Found: 358.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.6$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

Methyl 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoate (FT320)



C₂₃H₁₉NO₃

MW = 357.40 g/mol

FT320 was synthesized from methyl 3-iodo benzoate (0.11 mg) and was obtained as a yellow oil.

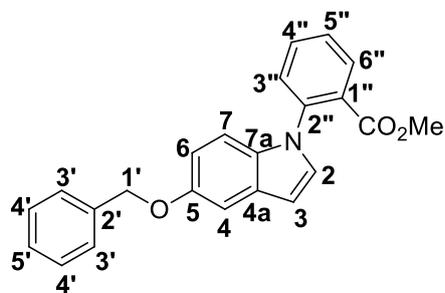
Yield: 60 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (t, 1 H, ⁴J = 2.2 Hz, H_{2''}), 8.04 (dt, 1H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, H_{6''}), 7.73 (ddd, 1 H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, H_{4''}), 7.61 (t, 1 H, ³J = 7.9 Hz, H_{5''}), 7.54 – 7.35 (m, 7 H, H_{2,7,3',4',5'}), 7.25 (d, 1 H, ⁴J = 2.5 Hz, H₄), 7.01 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H₆), 6.65 (dd, 1 H, ³J = 3.2 Hz, ⁵J = 0.8 Hz, H₃), 5.17 (s, 2 H, H_{1'}), 3.99 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 166.4 (COO), 153.9 (5), 140.2 (3''), 137.6 (2'), 131.8 (7a), 131.1 (1''), 130.0 (4a), 129.7 (5''), 128.6 (4'), 128.2 (2), 128.1 (5'), 127.8 (4''), 127.5 (3'), 127.2 (6''), 124.8 (2''), 113.5 (6), 111.1 (7), 104.5 (4), 104.0 (3), 70.8 (1'), 52.4 (OCH₃).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 357.1, Found: 358.1 [M+H]⁺, t_R = 3.6 min.

Methyl 2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)benzoate (FT321)



C₂₃H₁₉NO₃

MW = 357.40 g/mol

FT321 was synthesized from methyl 2-iodobenzoate (0.06 mL) and was obtained as a yellow oil.

Yield: 57 %

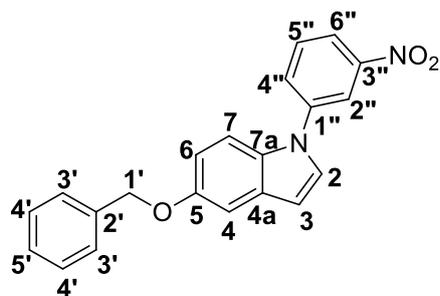
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (dd, 1 H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, H_{6''}), 7.68 (td, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, H_{4''}), 7.57 – 7.39 (m, 7 H, H_{3',4',5',5'',3''}), 7.30 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.25 (d, 1 H, ³J = 3.2 Hz, H₂), 7.14 (d, 1 H, ³J = 8.9 Hz, H₇), 7.00 (dd, 1 H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H₆), 6.68 (dd, 1 H, ³J = 3.2 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.19 (s, 2 H, H_{1'}), 3.55 (s, 3 H, OCH₃).

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 166.9 (COO), 153.7 (5), 138.9 (2''), 137.8 (2'), 132.8 (4''), 132.8 (7a), 131.3 (6''), 129.5 (2), 129.3 (4a), 128.9 (1''), 128.6 (4'), 128.4 (5''), 127.8 (5'), 127.6 (3'), 127.5 (3''), 113.2 (6), 110.6 (7), 104.4 (4), 103.1 (3), 70.9 (1'), 52.3 (OCH₃).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 357.1, Found: 358.2 [M+H]⁺, *t_R* = 3.5 min.

5-(benzyloxy)-1-(3-nitrophenyl)-1H-indole (FT324)



C₂₁H₁₆N₂O₃

MW = 344.36 g/mol MP = 122 – 124 °C

FT324 was synthesized from 1-iodo-3-nitrobenzene (0.10 g) and was obtained as a yellow solid.

Yield: 45 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.40 (t, 1 H, ⁴*J* = 2.2 Hz, H_{2''}), 8.20 (ddd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz, H_{6''}), 7.87 (ddd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz, H_{4''}), 7.71 (t, 1 H, ³*J* = 8.1 Hz, H_{5''}), 7.53 – 7.36 (m, 7 H, H_{2,7,3',4',5'}), 7.26 (d, 1 H, ³*J* = 2.5 Hz, H₄), 7.04 (dd, 1 H, ³*J* = 8.9 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, H₆), 6.69 (dd, 1 H, ³*J* = 3.3 Hz, ⁵*J* = 0.7 Hz, H₃), 5.17 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 154.2 (5), 149.2 (3''), 141.0 (1''), 137.4 (2'), 130.7 (7a), 130.6 (5''), 130.4 (4a), 129.2 (4''), 128.6 (4'), 127.9 (2), 127.7 (5'), 127.5 (3'), 120.6 (6''), 118.3 (2''), 113.9 (6), 110.9 (7), 105.2 (4), 104.8 (3), 70.8 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 344.1, Found: 345.1 [M+H]⁺, *t_R* = 3.6 min.

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)phenol (FT312)

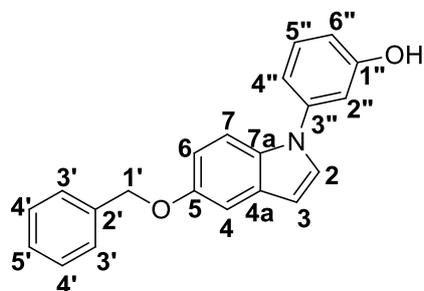
General procedure:

Synthesis of 2-(3-iodophenoxy)tetrahydro-2H-pyran: To a solution of 3-iodophenol (2.00 g, 10.91 mmol, 1 eq.) in dichloromethane (27 mL), DHP (1,2 eq.) and PPTS (8 mol%) were added. Reaction mixture was stirred for 8 h. Mixture was diluted in ethyl acetate and washed three times with K₂CO₃ solution (1N). Combined organic phases was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. Product was obtained as a yellow oil.

Synthesis of 3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)phenol: To a solution of 5-benzyloxyindole (1 eq.) in DMF (1 mL), K₂CO₃ (1 eq.), 2-(3-iodophenoxy)tetrahydro-2H-pyran (0.12 g, 0.9 eq., 0.40 mmol) and Cu (7 mol%) were added. Reaction mixture was stirred under reflux for 18 h and was cooled at room temperature. Mixture was filtered through celite, diluted in water (50 mL) and extracted three times with ethyl acetate. Combined organic phases was dried over MgSO₄ and solvent was removed under

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

vacuum. Residue was diluted in THF and heated to 50 °C. Then, HCl solution (37%) (0.2 mL) was added and the reaction was stirred at 50 °C for 1 h. Mixture was diluted in ethyl acetate and washed three times with K₂CO₃ solution (1N). Combined organic phases was dried over MgSO₄ and solvent was removed under vacuum. **FT312** was purified by column chromatography with ethyl acetate : cyclohexane (30 : 70) as eluant.



C₂₁H₁₇NO₂

MW = 315.37 g/mol

Mp = 123 - 125°C

FT312 was synthesized from 2-(3-iodophenoxy)tetrahydro-2H-pyran (0.09 g) and was obtained as a brown solid.

Yield: 71 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.54 – 7.49 (m, 3 H, H_{4',7}), 7.44 – 7.34 (m, 4 H, H_{3',5',5''}), 7.32 (d, 1 H, ³J = 3.2 Hz, H₂), 7.23 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H₄), 7.09 (ddd, 1 H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, H_{4''}), 7.00 – 6.96 (m, 2 H, H_{6,2''}), 6.81 (dd, 1 H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H_{6''}), 6.60 (dd, 1 H, ³J = 3.2 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.15 (s, 2 H, H_{1'}), 5.14 (brs, 1 H, OH).

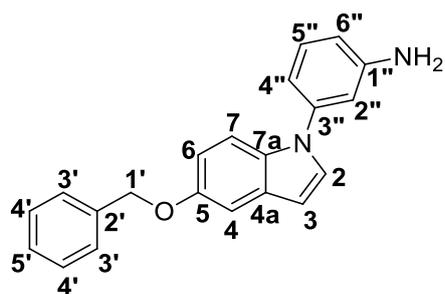
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 156.5 (1''), 153.7 (5), 141.2 (3''), 137.6 (2'), 131.1 (7a), 130.6 (5''), 129.9 (4a), 128.6 (4'), 128.3 (2), 127.8 (5'), 127.5 (3'), 116.3 (4''), 113.2 (6''), 113.2 (2''), 111.5 (6), 111.0 (7), 104.4 (4), 103.4 (3), 70.9 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 315.1, Found: 314.2 [M-H]⁻; 316.1 [M+H]⁺, t_R = 3.3 min.

3-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)aniline (FT325)

General procedure: To a solution of **FT324** (0.1 g, 0.29 mmol, 1 eq.) in methanol (35 mL), Ni (large excess) washed twice with methanol is added followed by hydrazine (30 eq.). Solution is stirred for 16 h. Solution is filtered through celite twice then the methanol is removed under vacuum. The residue diluted in dichloromethane (15 mL) and then washed 3 times with water (3x 20 mL). The organic phase is dried over MgSO₄ and then evaporated. **FT325** is obtained as a yellow oil without purification.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART



$C_{21}H_{18}N_2O$

MW = 314.38 g/mol

Yield: 99 %

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.55 – 7.26 (m, 8 H, $H_{2,7,3',4',5',5''}$), 7.23 (d, 1 H, $^4J = 2.4$ Hz, H_4), 6.98 (dd, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, H_6), 6.90 (dd, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, $H_{6''}$), 6.81 (t, 1 H, $^4J = 2.2$ Hz, $H_{2''}$), 6.67 (ddd, 1 H, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz, $H_{4''}$), 6.59 (dd, 1 H, $^3J = 3.2$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H_3), 5.16 (s, 2 H, $H_{1'}$), 3.84 (brs, 2 H, NH_2).

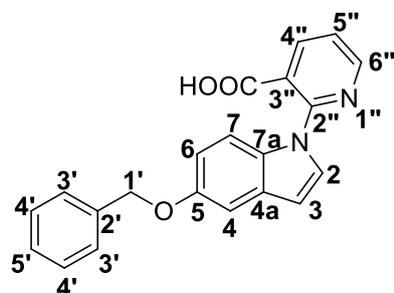
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 153.7 (5), 147.6 ($1''$), 140.9 ($3''$), 137.7 ($2'$), 131.2 (7a), 130.4 ($5''$), 129.8 (4a), 128.5 ($4'$), 128.4 (2), 127.8 ($5'$), 127.5 ($3'$), 114.1 ($6''$), 113.1 (6), 112.9 ($4''$), 111.6 (7), 110.4 ($2''$), 104.3 (4), 103.0 (3), 70.9 ($1'$).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 314.1, 315.1 $[M+H]^+$, $t_R = 3.3$ min.

Synthesis of (5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)nicotinic and picolinic acids (FT124 ,FT184 ,FT215 and FT217)

General procedure: To a solution of benzyloxyindole (1 eq.) in DMF (1 mL), K_2CO_3 (1 eq.), chloronicotinic or pinacolic acid (0.07 g, 0.40 mmol, 0.9 eq.) and Cu (7 mol%) was added. Reaction mixture was stirred under reflux for 18 h and was cooled at room temperature. Mixture was quenched with $NaHCO_3$ (1N) and extracted three times with ethyl acetate. Aqueous phase was acidified with acetic acid and extracted with ethyl acetate (three times). Combined organic phases was dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under vacuum. Residues were purified by HPLC (55 min, from 60% acetonitrile - 40% mili-Q water to 100% of acetonitrile).

2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)nicotinic acid (FT124)



$C_{21}H_{16}N_2O_3$

MW = 344.36 g/mol

Mp = 86 – 88 °C

FT124 was synthesized from 2-chloronicotinic acid and 5-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a pink solid.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

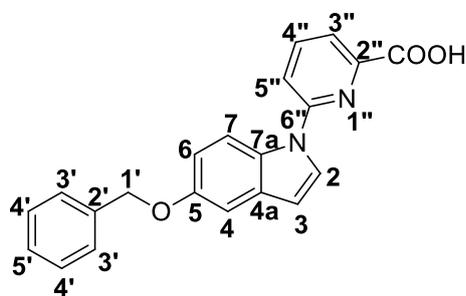
Yield: 38%

¹H NMR (300 MHz, CO(CD₃)₂): δ 8.73 (dd, 1 H, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, H_{6''}), 8.39 (dd, 1 H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, H_{5''}), 7.56 - 7.48 (m, 5 H, H_{2, 7, 4', 5''}), 7.43 - 7.38 (m, 2 H, H_{3'}), 7.35 - 7.30 (m, 1 H, H_{5'}), 7.24 (d, 1 H, ⁴J = 2.5 Hz, H₄), 6.93 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H₆), 6.60 (dd, 1 H, ³J = 3.4 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, H₃), 5.16 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CO(CD₃)₂): 166.3 (COO), 154.1 (5), 151.4 (6''), 150.1 (2''), 140.4 (4''), 138.1 (2'), 131.3 (7a), 130.5 (4a), 128.7 (5''), 128.3 (4'), 127.5 (5'), 127.5 (3'), 122.1 (3''), 121.4 (2), 112.7 (6), 112.3 (7), 104.3 (3), 104.2 (4), 70.1 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 344.1, Found: 343.3 [M-H]⁻, 345.3 [M+H]⁺, t_R = 2.3 min.

6-(5-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)picolinic acid (FT184)



C₂₁H₁₆N₂O₃ MW = 344.36 g/mol Mp = 178 – 180 °C

FT184 was synthesized from 6-chloropicolinic acid and 5-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a white solid.

Yield: 42%

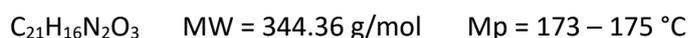
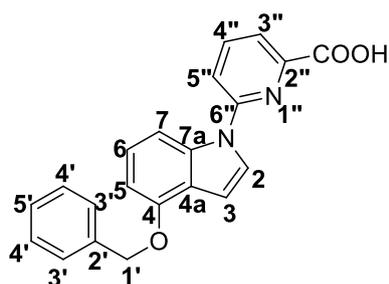
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.10 - 8.09 (m, 2 H, H_{3'', 4''}), 7.97 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz, H₇), 7.77 (m, 1 H, H_{5''}), 7.68 (d, 1 H, ³J = 3.6 Hz, H₂), 7.53 - 7.33 (m, 5 H, H_{3', 4', 5'}), 7.24 (d, 1 H, ⁴J = 2.5 Hz, H₄), 7.08 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H₆), 6.72 (dd, 1 H, ³J = 3.6 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, H₃), 5.17 (s, 2 H, H_{1'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 163.7 (COO), 154.7 (5), 151.3 (6''), 145.3 (2''), 141.0 (4''), 137.3 (2'), 131.5 (7a), 129.9 (4a), 128.6 (4'), 127.9 (5'), 127.5 (3'), 126.2 (2), 119.8 (3''), 118.7 (5''), 114.0 (6), 113.1 (7), 107.0 (3), 105.1 (4), 70.7 (1').

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 344.1, Found: 343.2 [M-H]⁻, 345.1 [M+H]⁺, t_R = 2.8 min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

3-(4-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)picolinic acid (FT215)



FT215 was synthesized from 6-chloropicolinic acid and 4-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a white solid.

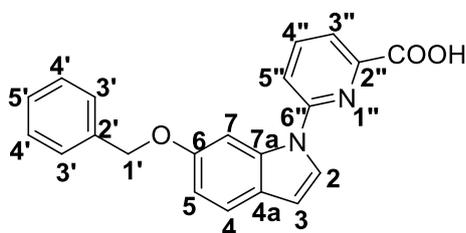
Yield: 34%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.15 – 8.08 (m, 2 H, $H_{3'',4''}$), 7.81 (dd, 1 H, $^3J = 6.6$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, $H_{5''}$), 7.65 – 7.61 (m, 2 H, $H_{2,7}$), 7.56 – 7.53 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.47 – 7.37 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.27 (dd, 1 H, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, H_6), 6.99 (dd, 1 H, $^3J = 3.6$ Hz, $^5J = 0.7$ Hz, H_3), 6.77 (d, 1 H, $^3J = 7.4$ Hz, H_5), 5.28 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 163.6 (COO), 152.7 (4), 151.4 (6''), 145.3 (2''), 141.0 (4''), 137.2 (2'), 136.2 (7a), 128.6 (4'), 127.9 (5'), 127.4 (3'), 124.8 (6), 124.3 (2), 121.5 (4a), 120.1 (3''), 119.3 (5''), 105.5 (5), 104.4 (3), 103.7 (7), 70.1 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 344.1, Found: 343.2 $[M-H]^-$, 345.0 $[M+H]^+$, $t_R = 2.9$ min.

6-(6-(benzyloxy)-1H-indol-1-yl)picolinic acid (FT217)



FT217 was synthesized from 6-chloropicolinic acid and 6-benzyloxyindole (0.10 g) and was obtained as a white solid.

Yield: 39%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.13 – 8.06 (m, 2 H, $H_{3'',4''}$), 7.73 – 7.69 (m, 2 H, $H_{7,5''}$), 7.60 – 7.57 (m, 2 H, $H_{2,4}$), 7.51 – 7.48 (m, 2 H, $H_{3'}$), 7.45 – 7.32 (m, 3 H, $H_{4',5'}$), 7.03 (dd, 1 H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, H_5), 6.73 (dd, 1 H, $^3J = 3.5$ Hz, $^5J = 0.6$ Hz, H_3), 5.17 (s, 2 H, $H_{1'}$).

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 163.8 (COO), 156.6 (6), 151.4 (6''), 145.4 (2''), 140.9 (4''), 137.1 (2'), 135.6 (7a), 128.6 (4'), 128.0 (5'), 127.5 (3'), 124.8 (4a), 124.7 (2), 122.0 (4), 120.0 (3''), 118.9 (5''), 112.1 (5), 107.0 (3), 98.2 (7), 70.7 (1').

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 344.1, Found: 343.1 $[M-H]^-$, 345.0 $[M+H]^+$, $t_R = 2.9$ min.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

III. Biological evaluation

1. Cell cultures

HEK293T cell line was purchased from the American Type Culture Collection and cultivated in DMEM media containing 10% of heat inactivated FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin.

MDA-MB-231 cell line was purchased from the American Type Culture Collection and cultivated in DMEM media containing 10% of heat inactivated FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin.

Cells were passaged every 3 days upon reaching confluence, and the absence of mycoplasma contamination was verified (MycoAlert™ Detection Kit, Lonza, Basel, Switzerland). Cell lines were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

2. Luciferase Reporter Assay

HEK293T cells were seeded at a density of 1×10^5 cells in 24 well plates coated with polyethylenimine (10 µg/mL). Cells were transfected with the TEAD luciferase reporter plasmid 8XGTIIC-Luciferase (Addgene reference 34615) and a control β-galactosidase plasmid CMV-βGal using the lipofectamine 2000 Reagent (Life Technologies, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Compounds were tested at different concentrations ranging from 0.25 to 20 µM in DMEM media containing 0,2% of heat inactivated FBS. After 24 h post transfection, cells were lysed in Reporter Lysis Buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and luciferase activity was measured on the Varioskan LUX Multimode Microplate Reader and normalized to β-galactosidase. We use beta-galactosidase protein as an unbiased standard for transfection efficiency. A significant decrease in this is linked to the cytotoxicity of the molecules.

3. Protein expression

MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells in 6 well plates. Compounds were tested at 10 µM in DMEM media containing 0,2% of heat inactivated FBS for 48h. Total extracts of cells were obtained with a RIPA based buffer containing protease inhibitors (Roche). Western blot were carried out using 10 µg of protein lysates.

The primary antibodies used included AXL (C44G1), CYR61 (D4H5D), CTGF (E2W5M) and Survivin (71G4B7) from Cell Signaling according to the manufacturer's instructions. Histone H3 07-690 (Millipore) was used as loading control for total extracts.

4. Proliferation of MDA-MB-231 cells

MDA-MB-231 cells were seeded at a density of $0,25 \times 10^4$ cells in 96 well plates. Compounds were tested at different concentrations in DMEM media containing 0,2% of heat inactivated FBS for 72h.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

Cell proliferation is monitored in real time with Incucyte® Live-Cell Analysis, Cell-by-Cell Analysis software module.

IV. Protein production and purification

The cDNA coding the human TEAD2 sequence (residue 217 to 447) was ordered to Integrated DNA Technologies. This target protein was cloned in frame into a pDBHis-MBP between NdeI and XhoI sites to give the pDBHis-MBP-TEAD2 plasmid. In this construct TEAD2 is fused with a (his)₆-MBP N-terminal tag. This N-terminal tag is followed by the HRV 3C (3C) protease recognition site (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro). Specific cleavage occurs between Gln and Gly, with Gly-Pro remaining at TEAD2 protein N terminus. The pDBHis-MBP-TEAD2 plasmid was transformed in *Escherichia coli* BL21λDE3 cells and grown on LB agar plate with 50 µg/mL kanamycin at 37°C overnight. Transformed cells were grown overnight at 37°C in LB media, supplemented with 50 µg/mL kanamycin, until 0.6 OD₂₈₀, then the culture temperature was decreased to 16°C and production was induced with 0.2mM of IPTG overnight. Cells were harvested by 20 min centrifugation at 6000 x g at 4°C. The pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 600 mM NaCl and 2 mM 2-mercaptoethanol (buffer A) and stored at -80°C. Cells were supplemented with a Complete® EDTA free tablet (Roche, Meylan, France) lysed by sonication, insoluble proteins and cell debris were sedimented by centrifugation at 40.000 x g at 4°C for 30 min. Supernatant was supplemented with imidazole to a 10 mM final concentration, filtered through 0.45µm filters and loaded onto an affinity column (1 mL His Trap FF, Dutscher, Brumath, France), equilibrated with buffer B (buffer A + 10 mM imidazole). Columns were washed with 20 column volumes of buffer B and proteins eluted with a linear 0–100% gradient of buffer C (buffer A + 300 mM imidazole). The peak fractions were analysed by SDS-PAGE. Fractions containing tagged TEAD2-MBP were pooled. These fractions were dialysed overnight at 4°C against a conservation buffer containing 20 mM Tris pH 7.5, 600 mM NaCl, 2 mM DTT (Buffer D) and at the same time the (his)₆-MBP tag was separated from TEAD2 by 3C cleavage (ratio proteine/protease 1000/1 w/w). Uncleaved protein, (his)₆-MBP tag and 3C protease were removed by binding onto gravity column containing 2.5 mL Ni-sepharose and 0.5 mL Glutathione sepharose (3C protease being GST-Tagged). Purified TEAD2 did not bind this column and was directly collected in the flow through. Purified protein was analysed by SDS-PAGE, concentrated and injected onto gel filtration column (Superdex 75 Hiload 16/60 GE Lifescience) equilibrated with buffer E (20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM TCEP and 5% glycerol). The peak fractions were analysed by SDS-PAGE and the fractions containing pure TEAD2 were pooled.

ANNEXE I: EXPERIMENTAL PART

V. Soaking with hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇

Crystals of hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ for ligand soaking were obtained by means of hanging drop vapour diffusion by mixing 1 mL of hTEAD2 5.8 mg/mL and 1 mL of Hepes 100 mM pH 7.2, formate 2.8 M at 20 °C, equilibrated over 500 µL of the same solution. Crystals formed in about five days. A 1 µL DMSO stock solution of compound was added to the growing drop for 2 hours (short time) or 24h (long time) before flash freezing and data collection. X-ray diffraction data were collected in The European Synchrotron. Data were integrated and processed using MOSFLM and SCALA of the CCP4 suite. The crystals belong to the space group C2 (A= 123.78 Å, B = 61.68 Å, C = 80.00 Å) with two monomer in the asymmetric unit. The structures were solved by molecular replacement using PDB entry 3L15 as the search model. Bound ligand was manually identified and fitted into F_o-F_c electron density using Coot. The structures were refined by rounds of rebuilding in Coot and refinement using Refmac of the CCP4 suite.

VI. TSA

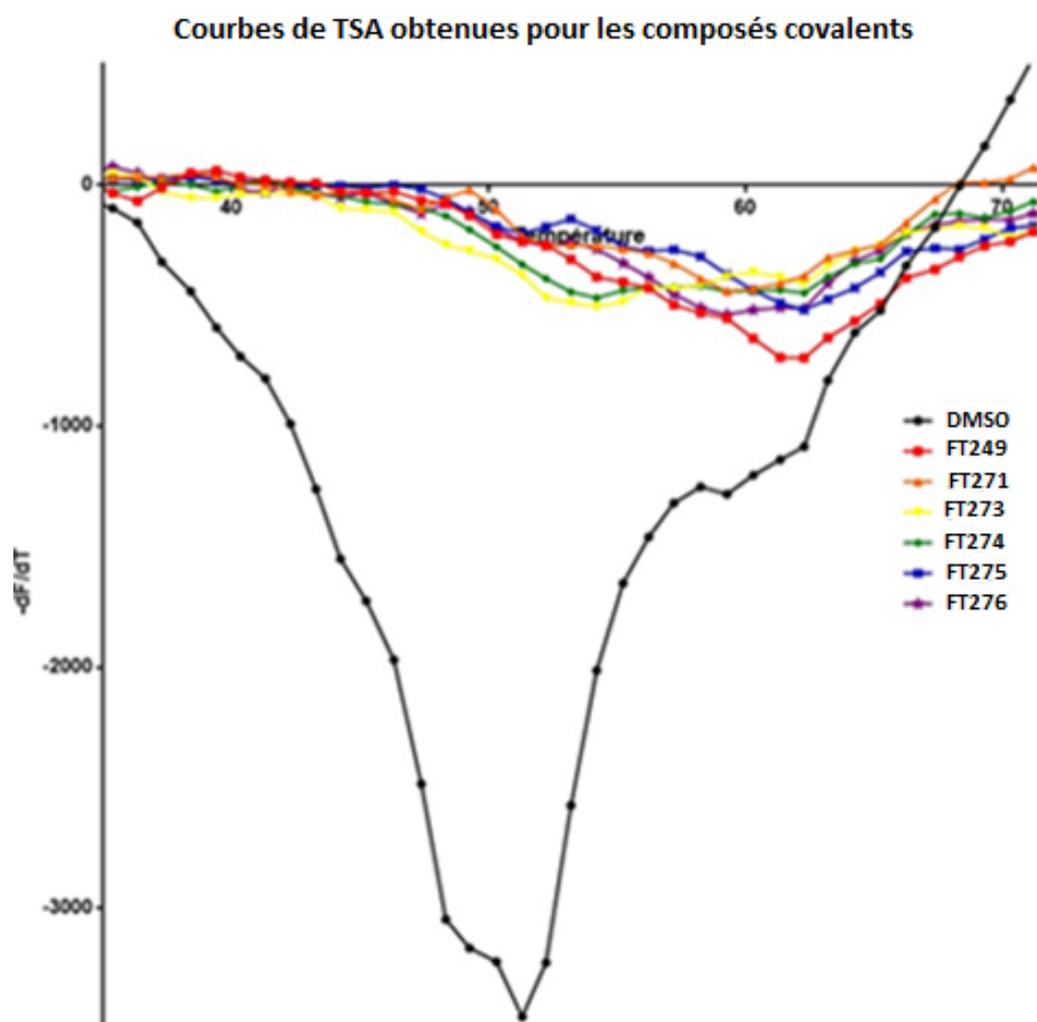
Thermal shift assay was performed on an ABI Prism 7900 HT, originally designed for real-time quantitative PCR, in a 96-well plate format. The gradient method contained 70 cycles and started at 25°C by rating the temperature of 1°C/cycle. All experiments were conducted with the hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ protein (20 µM) in the purification buffer [20 mM TRIS (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), 5% glycerol]. A dilution of the 5000x SYPRO[®] Orange commercial solution was first performed in the buffer to obtain a 10x SYPRO[®] Orange intermediate solution, which was diluted with hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ to obtain a 1–5 µM final protein concentration range. The total volume was kept constant (40 µL) to obtain samples containing constant concentration of SYPRO[®] orange and varied analyte/protein concentrations. Analyte solutions were prepared from stock solutions at 10 mM in DMSO and added to the mixture to reach a final DMSO concentration of 2.5% and a 50–250 µM compound concentration range. To determine the melting temperature T_m for the protein, a Boltzmann model was used to fit protein unfolding curves using the GraphPad Prism[®] (v5.02) software.

VII. Molecular docking

Experimentations were done in triplicate using AutoDock Vina to generate multiple binding poses with our molecules. The binding site was defined as a cuboid with a size which includes the entire model. No maximum number of poses was fixed and showed results correspond to the best score obtained for each molecule.

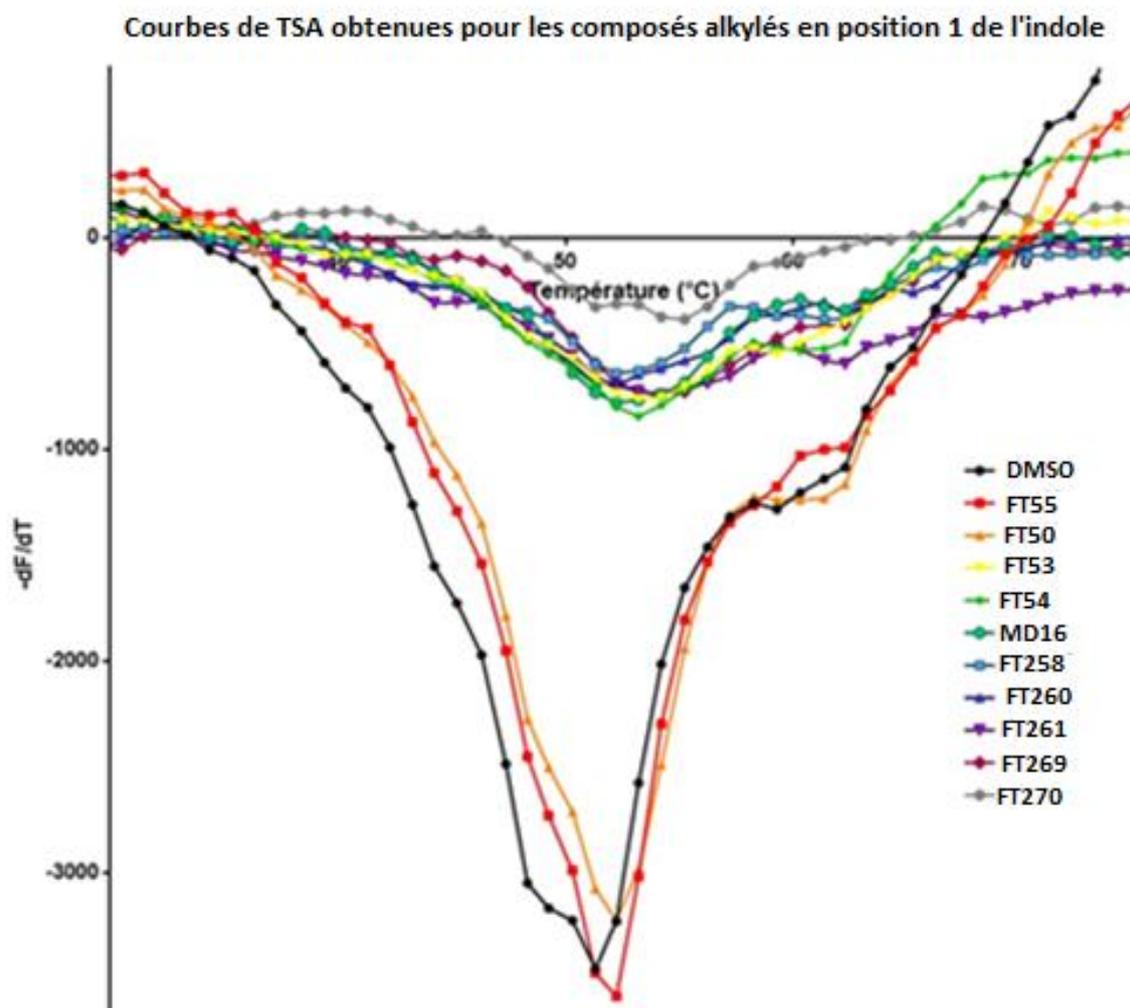
ANNEXE II : FIGURES

ANNEXE II: FIGURES



Annexe 2: Courbes de TSA pour les composés covalents

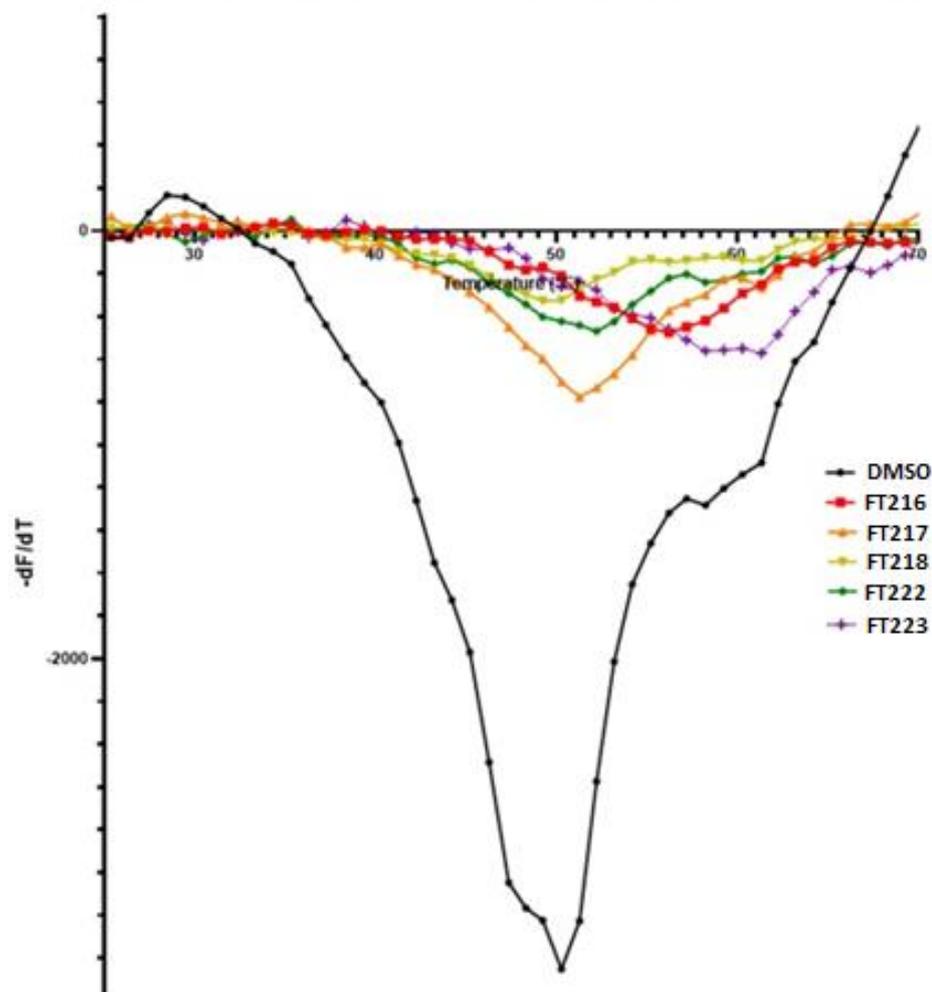
ANNEXE II: FIGURES



Annexe 3: Courbes de TSA pour les composés alkylés en position 1 de l'indole

ANNEXE II: FIGURES

Courbes de TSA obtenues pour les dérivés des 4- et 6- benzyloxyindoles arylés



Annexe 4: Courbes de TSA obtenues pour les dérivés des 4- et 6- benzyloxyindoles

BIBLIOGRAPHIE

1. Pan D. Hippo signaling in organ size control. *Genes & Development*. 15 avr 2007;21(8):886-97.
2. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*. 1 janv 2011;138(1):9-22.
3. Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*. 1 janv 2016;30(1):1-17.
4. Lin KC, Park HW, Guan K-L. Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends in Biochemical Sciences*. nov 2017;42(11):862-72.
5. Swistowski A, Zhang Q, Orcholski ME, Crippen D, Vitelli C, Kurakin A, et al. Novel Mediators of Amyloid Precursor Protein Signaling. *Journal of Neuroscience*. 16 déc 2009;29(50):15703-12.
6. Kim M-K, Jang J-W, Bae S-C. DNA binding partners of YAP/TAZ. *BMB Rep*. mars 2018;51(3):126-33.
7. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development*. 15 juill 2008;22(14):1962-71.
8. Wang Y, Xu X, Maglic D, Dill MT, Mojumdar K, Ng PK-S, et al. Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Reports*. oct 2018;25(5):1304-1317.e5.
9. Hong W, Guan K-L. The YAP and TAZ transcription co-activators: Key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. sept 2012;23(7):785-93.
10. Pobbati AV, Hong W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biology & Therapy*. mai 2013;14(5):390-8.
11. Pobbati AV, Chan SW, Lee I, Song H, Hong W. Structural and Functional Similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD Complexes. *Structure*. juill 2012;20(7):1135-40.
12. Gibault F, Sturbaut M, Bailly F, Melnyk P, Cotellet P. Targeting Transcriptional Enhanced Associate Domains (TEADs): Miniperspective. *J Med Chem*. 28 juin 2018;61(12):5057-72.
13. Jeffrey Holden, Christian Cunningham. Targeting the Hippo Pathway and Cancer through the TEAD Family of Transcription Factors. *Cancers*. 20 mars 2018;10(3):81.
14. Huh H, Kim D, Jeong H-S, Park H. Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells*. 17 juin 2019;8(6):600.
15. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiological Reviews*. 1 oct 2014;94(4):1287-312.
16. Kim W, Jho E-H. The history and regulatory mechanism of the Hippo pathway. *BMB Rep*. mars 2018;51(3):106-18.

17. Koo JH, Guan K-L. Interplay between YAP/TAZ and Metabolism. *Cell Metabolism*. 7 août 2018;28(2):196-206.
18. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 13 déc 2013;13(1):63-79.
19. Li Y, Liu S, Ng EY, Li R, Poulsen A, Hill J, et al. Structural and ligand-binding analysis of the YAP-binding domain of transcription factor TEAD4. *Biochem J*. 26 juin 2018;475(12):2043-55.
20. Noland CL, Gierke S, Schnier PD, Murray J, Sandoval WN, Sagolla M, et al. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure*. janv 2016;24(1):179-86.
21. Mesrouze Y, Meyerhofer M, Bokhovchuk F, Fontana P, Zimmermann C, Martin T, et al. Effect of the acylation of TEAD4 on its interaction with co-activators YAP and TAZ. *Protein Sci*. déc 2017;26(12):2399-409.
22. Yu F-X, Zhao B, Guan K-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*. nov 2015;163(4):811-28.
23. Wu Z, Guan K-L. Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. *Trends in Biochemical Sciences*. janv 2021;46(1):51-63.
24. Jacquemin P, Sapin V, Alsat E, Evain-Brion D, Dollé P, Davidson I. Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev Dyn*. juill 1998;212(3):423-36.
25. Chen Z, Friedrich GA, Soriano P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes & Development*. 1 oct 1994;8(19):2293-301.
26. Kaneko KJ, Cullinan EB, Latham KE, DePamphilis ML. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development*. mai 1997;124(10):1963-73.
27. Sawada A, Kiyonari H, Ukita K, Nishioka N, Imuta Y, Sasaki H. Redundant Roles of Tead1 and Tead2 in Notochord Development and the Regulation of Cell Proliferation and Survival. *Molecular and Cellular Biology*. 15 mai 2008;28(10):3177-89.
28. Lopez-Anido C, Poitelon Y, Gopinath C, Moran JJ, Ma KH, Law WD, et al. Tead1 regulates the expression of *Peripheral Myelin Protein 22* during Schwann cell development. *Hum Mol Genet*. 10 juin 2016;ddw158.
29. Tamm C, Bower N, Anneren C. Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *Journal of Cell Science*. 1 avr 2011;124(7):1136-44.
30. Osman I, He X, Liu J, Dong K, Wen T, Zhang F, et al. TEAD1 (TEA Domain Transcription Factor 1) Promotes Smooth Muscle Cell Proliferation Through Upregulating SLC1A5 (Solute Carrier Family 1 Member 5)-Mediated Glutamine Uptake. *Circ Res*. 26 avr 2019;124(9):1309-22.

31. Benhaddou A, Keime C, Ye T, Morlon A, Michel I, Jost B, et al. Transcription factor TEAD4 regulates expression of myogenin and the unfolded protein response genes during C2C12 cell differentiation. *Cell Death Differ.* févr 2012;19(2):220-31.
32. Li J, Tiwari M, Xu X, Chen Y, Tamayo P, Sen GL. TEAD1 and TEAD3 Play Redundant Roles in the Regulation of Human Epidermal Proliferation. *Journal of Investigative Dermatology.* oct 2020;140(10):2081-2084.e4.
33. Mammoto A, Muyleart M, Kadlec A, Gutterman D, Mammoto T. YAP1-TEAD1 signaling controls angiogenesis and mitochondrial biogenesis through PGC1 α . *Microvascular Research.* sept 2018;119:73-83.
34. Han Z, Yu Y, Cai B, Xu Z, Bao Z, Zhang Y, et al. YAP/TEAD3 signal mediates cardiac lineage commitment of human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol.* mars 2020;235(3):2753-60.
35. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* avr 2018;173(2):321-337.e10.
36. Dey A, Varelas X, Guan K-L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nat Rev Drug Discov.* juill 2020;19(7):480-94.
37. Calses PC, Crawford JJ, Lill JR, Dey A. Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities. *Trends Cancer.* mai 2019;5(5):297-307.
38. Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med.* déc 2019;17(1):116.
39. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell.* juin 2016;29(6):783-803.
40. Moroishi T, Hansen CG, Guan K-L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 16 janv 2015;15(2):73-9.
41. Yamaguchi N. Multiple Roles of Vestigial-Like Family Members in Tumor Development. *Front Oncol.* 24 juill 2020;10:1266.
42. Drexler R, Fahy R, K uchler M, Wagner KC, Reese T, Ehmke M, et al. Association of subcellular localization of TEAD transcription factors with outcome and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatol.* janv 2021;21(1):170-9.
43. Diepenbruck M, Waldmeier L, Ivanek R, Berninger P, Arnold P, van Nimwegen E, et al. Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Cell Science.* 1 avr 2014;127(7):1523-36.
44. Li N, Yu N, Wang J, Xi H, Lu W, Xu H, et al. miR-222/VGLL4/YAP-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Am J Cancer Res.* 2015;5(3):1158-68.
45. Sch utte U, Bisht S, Heukamp LC, Kepschull M, Florin A, Haarmann J, et al. Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. *Transl Oncol.* avr 2014;7(2):309-21.

46. Knight JF, Shepherd CJ, Rizzo S, Brewer D, Jhavar S, Dodson AR, et al. TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *Br J Cancer*. déc 2008;99(11):1849-58.
47. Zhou Y, Huang T, Cheng A, Yu J, Kang W, To K. The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 janv 2016;17(2):138.
48. Gujral TS, Kirschner MW. Hippo pathway mediates resistance to cytotoxic drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2 mai 2017;114(18):E3729-38.
49. Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, Dessein A-F, Vandomme J, Monte D, et al. Colon Cancer Cells Escape 5FU Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the c-Yes/YAP Axis. *Clinical Cancer Research*. 15 févr 2014;20(4):837-46.
50. Zhao Y, Khanal P, Savage P, She Y-M, Cyr TD, Yang X. YAP-Induced Resistance of Cancer Cells to Antitubulin Drugs Is Modulated by a Hippo-Independent Pathway. *Cancer Res*. 15 août 2014;74(16):4493-503.
51. Zeng R, Dong J. The Hippo Signaling Pathway in Drug Resistance in Cancer. *Cancers*. 16 janv 2021;13(2):318.
52. Gavini J, Dommann N, Jakob MO, Keogh A, Bouchez LC, Karkampouna S, et al. Verteporfin-induced lysosomal compartment dysregulation potentiates the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*. 3 oct 2019;10(10):749.
53. Fossdal R. A novel TEAD1 mutation is the causative allele in Sveinsson's chorioretinal atrophy (helicoid peripapillary chorioretinal degeneration). *Human Molecular Genetics*. 3 mars 2004;13(9):975-81.
54. Kitagawa M. A Sveinsson's chorioretinal atrophy-associated missense mutation in mouse Tead1 affects its interaction with the co-factors YAP and TAZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. oct 2007;361(4):1022-6.
55. Bokhovchuk F, Mesrouze Y, Izaac A, Meyerhofer M, Zimmermann C, Fontana P, et al. Molecular and structural characterization of a TEAD mutation at the origin of Sveinsson's chorioretinal atrophy. *FEBS J*. juin 2019;286(12):2381-98.
56. Hamon A, Masson C, Bitard J, Gieser L, Roger JE, Perron M. Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in Reactive Müller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 avr 2017;58(4):1941.
57. Mueller KA, Glajch KE, Huizenga MN, Wilson RA, Granucci EJ, Dios AM, et al. Hippo Signaling Pathway Dysregulation in Human Huntington's Disease Brain and Neuronal Stem Cells. *Sci Rep*. déc 2018;8(1):11355.
58. Yamanishi E, Hasegawa K, Fujita K, Ichinose S, Yagishita S, Murata M, et al. A novel form of necrosis, TRIAD, occurs in human Huntington's disease. *acta neuropathol commun*. déc 2017;5(1):19.
59. Mao Y, Chen X, Xu M, Fujita K, Motoki K, Sasabe T, et al. Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology. *Hum Mol Genet*. 12 sept 2016;ddw303.

60. Tanaka H, Homma H, Fujita K, Kondo K, Yamada S, Jin X, et al. YAP-dependent necrosis occurs in early stages of Alzheimer's disease and regulates mouse model pathology. *Nat Commun.* déc 2020;11(1):507.
61. Moya IM, Halder G. Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* avr 2019;20(4):211-26.
62. Wang Y, Yu A, Yu F-X. The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. *Protein Cell.* mai 2017;8(5):349-59.
63. Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong Z, Yang H, et al. Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes & Development.* 1 févr 2010;24(3):235-40.
64. Tian W, Yu J, Tomchick DR, Pan D, Luo X. Structural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 20 avr 2010;107(16):7293-8.
65. Chan P, Han X, Zheng B, DeRan M, Yu J, Jarugumilli GK, et al. Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nature Chemical Biology.* 22 févr 2016;12(4):282-9.
66. Zhou Z, Hu T, Xu Z, Lin Z, Zhang Z, Feng T, et al. Targeting Hippo pathway by specific interruption of YAP-TEAD interaction using cyclic YAP-like peptides. *The FASEB Journal.* févr 2015;29(2):724-32.
67. Mesrouze Y, Bokhovchuk F, Izaac A, Meyerhofer M, Zimmermann C, Fontana P, et al. Adaptation of the bound intrinsically disordered protein YAP to mutations at the YAP:TEAD interface: Mutations at the YAP:TEAD Interface. *Protein Science.* oct 2018;27(10):1810-20.
68. Furet P, Salem B, Mesrouze Y, Schmelzle T, Lewis I, Kallen J, et al. Structure-based design of potent linear peptide inhibitors of the YAP-TEAD protein-protein interaction derived from the YAP omega-loop sequence. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* août 2019;29(16):2316-9.
69. Chen L, Chan SW, Zhang X, Walsh M, Lim CJ, Hong W, et al. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the Hippo pathway. *Genes & Development.* 1 févr 2010;24(3):290-300.
70. Kaan HYK, Chan SW, Tan SKJ, Guo F, Lim CJ, Hong W, et al. Crystal structure of TAZ-TEAD complex reveals a distinct interaction mode from that of YAP-TEAD complex. *Sci Rep.* 17 mai 2017;7(1):2035.
71. Jiao S, Wang H, Shi Z, Dong A, Zhang W, Song X, et al. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell.* 10 févr 2014;25(2):166-80.
72. Marks M, Pennimpede T, Lange L, Grote P, Herrmann BG, Wittler L. Analysis of the Fam181 gene family during mouse development reveals distinct strain-specific expression patterns, suggesting a role in nervous system development and function. *Gene.* janv 2016;575(2):438-51.
73. Bokhovchuk F, Mesrouze Y, Delaunay C, Martin T, Villard F, Meyerhofer M, et al. Identification of FAM181A and FAM181B as new interactors with the TEAD transcription factors. *Protein Science.* févr 2020;29(2):509-20.

74. Hau JC, Erdmann D, Mesrouze Y, Furet P, Fontana P, Zimmermann C, et al. The TEAD4-YAP/TAZ Protein-Protein Interaction: Expected Similarities and Unexpected Differences. *ChemBioChem*. 8 juill 2013;14(10):1218-25.
75. Mesrouze Y, Hau JC, Erdmann D, Zimmermann C, Fontana P, Schmelzle T, et al. The Surprising Features of the TEAD4-Vgll1 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem*. 3 mars 2014;15(4):537-42.
76. Chan SW, Lim CJ, Loo LS, Chong YF, Huang C, Hong W. TEADs Mediate Nuclear Retention of TAZ to Promote Oncogenic Transformation. *Journal of Biological Chemistry*. mai 2009;284(21):14347-58.
77. Basu D, Lettan R, Damodaran K, Strellec S, Reyes-Mugica M, Rebbaa A. Identification, Mechanism of Action, and Antitumor Activity of a Small Molecule Inhibitor of Hippo, TGF- β , and Wnt Signaling Pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 juin 2014;13(6):1457-67.
78. Song S, Xie M, Scott AW, Jin J, Ma L, Dong X, et al. A Novel YAP1 Inhibitor Targets CSC-Enriched Radiation-Resistant Cells and Exerts Strong Antitumor Activity in Esophageal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. févr 2018;17(2):443-54.
79. Fan F, He Z, Kong L-L, Chen Q, Yuan Q, Zhang S, et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Sci Transl Med*. 17 août 2016;8(352):352ra108-352ra108.
80. Triastuti E, Nugroho AB, Zi M, Prehar S, Kohar YS, Bui TA, et al. Pharmacological inhibition of Hippo pathway, with the novel kinase inhibitor XMU-MP-1, protects the heart against adverse effects during pressure overload. *Br J Pharmacol*. oct 2019;176(20):3956-71.
81. Kastan N, Gnedeva K, Alisch T, Petelski AA, Huggins DJ, Chiaravalli J, et al. Small-molecule inhibition of Lats kinases promotes Yap-dependent proliferation in postmitotic mammalian tissues [Internet]. *Developmental Biology*; 2020 févr [cité 13 mai 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.02.11.944157>
82. Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, et al. Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury. *JACC Basic Transl Sci*. oct 2018;3(5):639-53.
83. Ito M, Hara H, Takeda N, Naito AT, Nomura S, Kondo M, et al. Characterization of a small molecule that promotes cell cycle activation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. mars 2019;128:90-5.
84. Pobbati AV, Hong W. A combat with the YAP/TAZ-TEAD oncoproteins for cancer therapy. *Theranostics*. 2020;10(8):3622-35.
85. Juan W, Hong W. Targeting the Hippo Signaling Pathway for Tissue Regeneration and Cancer Therapy. *Genes*. 30 août 2016;7(9):55.
86. Pobbati AV, Rubin BP. Protein-Protein Interaction Disruptors of the YAP/TAZ-TEAD Transcriptional Complex. *Molecules*. 18 déc 2020;25(24):6001.
87. Zhang Z, Lin Z, Zhou Z, Shen HC, Yan SF, Mayweg AV, et al. Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP-TEAD Protein-Protein Interaction. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 11 sept 2014;5(9):993-8.

88. Dominguez-Berrocal L, Cirri E, Zhang X, Andrini L, Marin GH, Lebel-Binay S, et al. New Therapeutic Approach for Targeting Hippo Signalling Pathway. *Sci Rep.* 18 mars 2019;9(1):4771.
89. Adihou H, Gopalakrishnan R, Förster T, Guéret SM, Gasper R, Geschwindner S, et al. A protein tertiary structure mimetic modulator of the Hippo signalling pathway. *Nat Commun.* déc 2020;11(1):5425.
90. Barth M, CONTAL S, MONTALBETTI C, SPITZER L. NEW COMPOUNDS INHIBITORS OF THE YAP/TAZ-TEAD INTERACTION AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF MALIGNANT MESOTHELIOMA. WO 2017/064277 A1.
91. Zhou W, Li Y, Song J, Li C. Fluorescence polarization assay for the identification and evaluation of inhibitors at YAP–TEAD protein–protein interface 3. *Analytical Biochemistry.* déc 2019;586:113413.
92. Smith SA, Sessions RB, Shoemark DK, Williams C, Ebrahimighaei R, McNeill MC, et al. Antiproliferative and Antimigratory Effects of a Novel YAP–TEAD Interaction Inhibitor Identified Using in Silico Molecular Docking. *J Med Chem.* 14 févr 2019;62(3):1291-305.
93. Kaan HYK, Sim AYL, Tan SKJ, Verma C, Song H. Targeting YAP/TAZ-TEAD protein-protein interactions using fragment-based and computational modeling approaches. *Ye S, éditeur. PLOS ONE.* 1 juin 2017;12(6):e0178381.
94. Sturbaut M, Bailly F, Coevoet M, Sileo P, Pugniere M, Liberelle M, et al. Discovery of a cryptic site at the interface 2 of TEAD – Towards a new family of YAP/TAZ-TEAD inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* déc 2021;226:113835.
95. Pobbati AV, Han X, Hung AW, Weiguang S, Huda N, Chen G-Y, et al. Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure.* nov 2015;23(11):2076-86.
96. Gagnon A, Mélin L, Abdullayev S, Fnaiche A, Vu V, Gonzalez Suarez N, et al. Development of LM98, a Small-Molecule TEAD Inhibitor Derived from Flufenamic Acid. *ChemMedChem.* 23 juin 2021;cmcd.202100432.
97. Wu X. Tead transcription factor autopalmitoylation inhibitors. WO2017053706A1, 2016.
98. Li Q, Sun Y, Jarugumilli GK, Liu S, Dang K, Cotton JL, et al. Lats1/2 Sustain Intestinal Stem Cells and Wnt Activation through TEAD-Dependent and Independent Transcription. *Cell Stem Cell.* mai 2020;26(5):675-692.e8.
99. Holden JK, Crawford JJ, Noland CL, Schmidt S, Zbieg JR, Lacap JA, et al. Small Molecule Dysregulation of TEAD Lipidation Induces a Dominant-Negative Inhibition of Hippo Pathway Signaling. *Cell Reports.* juin 2020;31(12):107809.
100. Cunningham CN, Beroza P, Crawford JJ, Lee W, Rene O, Zbieg JR, et al. CARBOXAMIDE AND SULFONAMIDE DERIVATIVES USEFUL AS TEAD MODULATORS. WO 2020/051099 A1.
101. Kunig VBK, Potowski M, Akbarzadeh M, Klika Škopić M, Santos Smith D, Arendt L, et al. TEAD–YAP Interaction Inhibitors and MDM2 Binders from DNA-Encoded Indole-Focused Ugi Peptidomimetics. *Angew Chem Int Ed.* 9 nov 2020;59(46):20338-42.

102. Tang TT, Konradi AW, Feng Y, Peng X, Ma M, Li J, et al. Small Molecule Inhibitors of TEAD Auto-palmitoylation Selectively Inhibit Proliferation and Tumor Growth of *NF2* -deficient Mesothelioma. *Mol Cancer Ther.* 13 avr 2021;1535-7163.MCT-20-0717.
103. Konradi AW, Yang X. BENZOSULFONYL COMPOUNDS. WO 2019/040380.
104. Konradi AW, KUZNETSOV A. BICYCLIC COMPOUNDS. WO 2020/097389 A1.
105. Bum-Erdene K, Zhou D, Gonzalez-Gutierrez G, Ghazayel MK, Si Y, Xu D, et al. Small-Molecule Covalent Modification of Conserved Cysteine Leads to Allosteric Inhibition of the TEAD-Yap Protein-Protein Interaction. *Cell Chemical Biology.* mars 2019;26(3):378-389.e13.
106. Kurppa KJ, Liu Y, To C, Zhang T, Fan M, Vajdi A, et al. Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway. *Cancer Cell.* janv 2020;37(1):104-122.e12.
107. Gray NS, Zhang T, Liu Y, Fan M, Gao Y. TRANSCRIPTIONAL ENHANCED ASSOCIATE DOMAIN (TEAD) TRANSCRIPTION FACTOR INHIBITORS AND USES THEREOF. WO 2020/081572 A1.
108. Lu W, Wang J, Li Y, Tao H, Xiong H, Lian F, et al. Discovery and biological evaluation of vinylsulfonamide derivatives as highly potent, covalent TEAD autopalmitoylation inhibitors. *Eur J Med Chem.* 15 déc 2019;184:111767.
109. Kaneda A, Seike T, Danjo T, Nakajima T, Otsubo N, Yamaguchi D, et al. The novel potent TEAD inhibitor, K-975, inhibits YAP1/TAZ-TEAD protein-protein interactions and exerts an anti-tumor effect on malignant pleural mesothelioma. *Am J Cancer Res.* 2020;10(12):4399-415.
110. Karatas H, Akbarzadeh M, Adihou H, Hahne G, Pobbati AV, Yihui Ng E, et al. Discovery of Covalent Inhibitors Targeting the Transcriptional Enhanced Associate Domain Central Pocket. *J Med Chem.* 22 oct 2020;63(20):11972-89.
111. Lu T, Li Y, Lu W, Spitters TWGM, Fang X, Wang J, et al. Discovery of a subtype-selective, covalent inhibitor against palmitoylation pocket of TEAD3. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* mai 2021;S2211383521001544.
112. Pobbati AV, Mejuch T, Chakraborty S, Karatas H, Bharath SR, Guéret SM, et al. Identification of Quinolinols as Activators of TEAD-Dependent Transcription. *ACS Chem Biol.* 20 déc 2019;14(12):2909-21.
113. BIOVIA, Dassault Systèmes. *Discovery Studio.* 2020;
114. Abraham RJ, Edgar M, Griffiths L, Powell RL. Substituent chemical shifts (SCS) in NMR. Part 5. Mono- and di-fluoro SCS in rigid molecules. *J Chem Soc, Perkin Trans 2.* 1995;(3):561.
115. Oku Y, Nishiya N, Shito T, Yamamoto R, Yamamoto Y, Oyama C, et al. Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. *FEBS Open Bio.* 1 janv 2015;5(1):542-9.
116. Grote CW, Kim DJ, Rapoport H. Stereocontrolled Synthesis of DTPA Analogs Branched in the Ethylene Unit. *J Org Chem.* oct 1995;60(21):6987-97.
117. Wharton CJ, Wrigglesworth R. Synthesis and reactions of 2,3-dihydro-oxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-ones. *J Chem Soc, Perkin Trans 1.* 1985;809.

118. Katritzky AR, Verma AK, He H-Y, Chandra R. Novel Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydropyrazino[1,2-*a*]indoles. *J Org Chem.* juin 2003;68(12):4938-40.
119. Han L, Liu C, Zhang W, Shi X-X, You S-L. Dearomatization of tryptophols via a vanadium-catalyzed asymmetric epoxidation and ring-opening cascade. *Chem Commun.* 2014;50(10):1231-3.
120. Petit S, Duroc Y, Larue V, Giglione C, Léon C, Soulama C, et al. Structure-Activity Relationship Analysis of the Peptide Deformylase Inhibitor 5-Bromo-1 *H*-indole-3-acetohydroxamic Acid. *ChemMedChem.* 13 févr 2009;4(2):261-75.
121. Yadav JS, Abraham S, Reddy BVS, Sabitha G. InCl₃-Catalysed Conjugate Addition of Indoles with Electron-Deficient Olefins. *Synthesis.* 2001;2001(14):2165-9.
122. Dolušić E, Larrieu P, Moineaux L, Stroobant V, Pilotte L, Colau D, et al. Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) Inhibitors. 3-(2-(Pyridyl)ethenyl)indoles as Potential Anticancer Immunomodulators. *J Med Chem.* 11 août 2011;54(15):5320-34.
123. Lodge JM, Majmudar CY, Clayton J, Mapp AK. Covalent Chemical Cochaperones of the p300/CBP GACKIX Domain. *ChemBioChem.* 17 sept 2018;19(18):1907-12.

Conception, synthèse et évaluation de modulateurs de l'interaction YAP(TAZ)-TEAD ciblant la poche interne

La voie de signalisation Hippo a un rôle fondamental dans le contrôle de la croissance des organes, la prolifération des cellules et le caractère cellule-souche. Elle contrôle la localisation cellulaire des co-facteurs de transcription YAP et TAZ. Nucléaires, YAP et TAZ interagissent avec les facteurs de transcription TEAD (Transcriptional Enhancer Associated Domain) pour stimuler leur activité transcriptionnelle. TEAD1-4, codées par 4 gènes différents, sont exprimés différemment selon le tissu et le niveau de développement. La régulation de cette voie trouve son importance aussi bien dans les cancers qu'en médecine régénérative ou dans les maladies neurodégénératives. Cibler le complexe YAP/TAZ-TEAD revient à cibler, sur la partie C-terminal, l'une des 3 interfaces de TEAD hautement conservées ou sa poche interne qui accueille un acide gras saturé.

Le criblage d'une petite chimiothèque par TSA (Thermal Shift Assay) puis par trempage de cristaux de hTEAD2 effectué au CBS de Montpellier a permis d'identifier un ligand de la poche interne de TEAD. Mon travail a été, dans un premier temps, de concevoir à partir de ce hit des modulateurs de TEAD capables de s'insérer dans la poche interne avec une bonne affinité en vue de développer des ligands sélectifs d'un ou plusieurs TEAD. L'analyse des données cristallographiques disponibles a permis d'identifier les différences structurales au niveau des poches des quatre membres de la famille TEAD et d'autres zones externes pouvant induire une sélectivité. Grâce aux outils de modélisation moléculaire, nous avons construit quatre modèles du domaine C-terminal des quatre TEAD en vue de docker les molécules susceptibles de présenter une sélectivité potentielle. Dans un deuxième temps, à partir de la superposition de structures cristallographiques de la littérature avec celle de notre hit, j'ai conçu une chimiothèque d'hétérocycles diversement substitués. Une première famille a permis de valider notre hit par modification et migration de son motif hydrophobe. Une deuxième famille découlant de la superposition des structures cristallographiques de TEAD avec notre hit et avec l'acide palmitique a donné lieu à la synthèse d'une trentaine de composés diversement alkylés en position 1 et 3 de l'hétérocycle. La dernière famille, composée d'une trentaine de molécules arylées en position 1 de l'hétérocycle, provient de la superposition de notre hit avec l'acide flufenamique, premier ligand ayant cristallisé à l'intérieur de la poche interne. Neuf nouvelles structures cristallographiques résultant du trempage de nos molécules avec hTEAD2 ont été résolues. L'effet sur l'activité transcriptionnelle de TEAD en cellules HEK293T a été évalué pour tous les composés et des relations structure-activité ont été établies. Pour les composés les plus actifs, l'effet sur les gènes cibles de l'interaction YAP/TAZ-TEAD et sur la prolifération cellulaire a été mesurée sur cellules de cancer du sein. Nous avons identifié de nouveaux ligands de TEAD qui inhibent avec une activité nanomolaire l'activité transcriptionnelle sur cellules HEK293T et avec une activité micromolaire la prolifération et l'expression des gènes cibles sur cellules cancéreuses. La sélectivité de ces composés envers un ou plusieurs TEAD sera testée par la suite sur des cellules HEK293T.

Mots-clés : Voie Hippo, inhibiteurs, poche interne, YAP/TAZ-TEAD, modélisation moléculaire

Design, synthesis and evaluation of modulators of the YAP(TAZ)-TEAD interaction targeting the internal pocket

The Hippo signaling pathway has a fundamental role controlling organ growth, cell proliferation and cell-stem characters. It controls the cellular localization of the YAP and TAZ transcription cofactors. In the nucleus, YAP and TAZ interact with TEAD (Transcriptional Enhancer Associated Domain) transcription factors to stimulate their transcriptional activity. TEAD1-4, encoded by 4 different genes, are expressed differently depending on the tissue and the level of development. The regulation of this pathway is important as well in cancers as in regenerative medicine or in neurodegenerative diseases. Targeting the YAP / TAZ-TEAD complex amounts to targeting, on the C-terminal part, one of the 3 highly conserved TEAD interfaces or its internal pocket that is occupied by a saturated fatty acid.

The screening by TSA (Thermal Shift Assay) of a small chemical library and then by soaking of hTEAD2 crystals carried out at CBS in Montpellier allowed us to identify a ligand of TEAD internal pocket. First of all my work was to design, from this hit, TEAD modulators capable of inserting into the internal pocket with good affinity in order to develop selective ligands for one or more TEADs. First, the analysis of the available crystallographic data allowed us to identify structural differences in the four members of the TEAD family pockets and other external areas that may induce selectivity. Using molecular modeling, we built four models of the C-terminal domain of the four TEADs to dock molecules that could present potential selectivity. Secondly, I designed a chemical library of variously substituted heterocycles from the superposition of published crystallographic structures and those of our hit. A first family made it possible to validate our hit by modification and migration of its hydrophobic motif. A second family resulting from the superposition with palmitic acid with our hit gave rise to the synthesis of about thirty compounds variously alkylated in position 1 and 3 of the heterocycle. The last family, made up of about thirty molecules substituted by an aryl motif at position 1 of the heterocycle, comes from the superposition of our hit with flufenamic acid, the first ligand that crystallized inside the internal pocket. Nine new crystallographic structures resulting from the soaking of our molecules with hTEAD2 have been resolved. Measurement of TEAD transcriptional activity on HEK293T cells allowed us to establish structure-activity relationships. For the most active compounds, the effect on target genes of the YAP/TAZ-TEAD interaction and on cell proliferation was measured on breast cancer cells. We identified novel TEAD ligands that inhibit the transcriptional activity with a nanomolar activity on HEK293T and the proliferation and expression of target genes with a micromolar activity on cancer cells. The selectivity of these compounds towards one or more TEADs will be tested subsequently on HEK293T cells.

Keywords: Hippo Pathway, inhibitors, internal pocket, YAP/TAZ-TEAD, molecular modelling