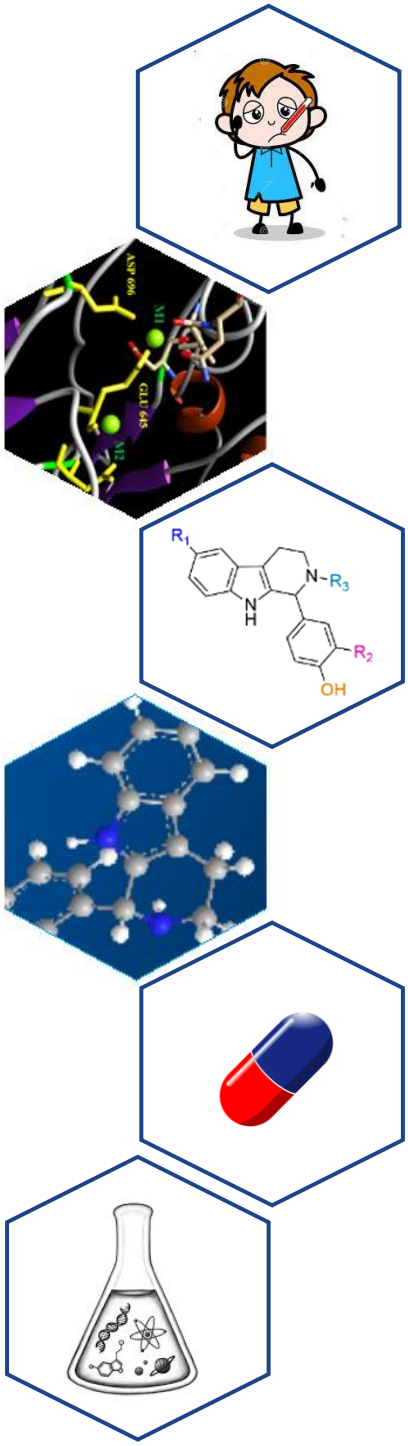


Université de Lille
École doctorale biologie santé de Lille (EDBSL)

THESE DE DOCTORAT
Pour l'obtention du grade de docteur en Biologie Santé
Discipline : Chimie médicinale

Présentée par **Justine Peters**
Le **8 octobre 2024**

Conception, synthèse et évaluations *in vitro* et *in vivo* de nouvelles tétrahydro-β-carbolines antipaludiques

Laboratoires d'accueil :
Équipe BAP « Biologie des parasites Apicomplexa », CIIL, Institut Pasteur de Lille & Équipe BBC « Brain Biology and Chemistry », Inserm UMR-S1172

Directeurs de thèse :
Pr. El-Moukhtar Aliouat & Pr. Nicolas Lebègue

Membres du jury :
Pr. Alexandra Dassonville-Klimpt, rapporteure, Laboratoire AGIR UR4294, Université de Picardie Jules Verne

Pr. Françoise Benoit-Vical, rapporteure, Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS - UPR8241, Inserm ERL 1289, Université de Toulouse

Pr. Sylvain Routier, président, Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA UMR7311)

Dr. Karin Séron, examinatrice, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, CNRS UMR 9017 INSERM U1019 Institut Pasteur de Lille

Résumé

Le paludisme est l'une des maladies infectieuses les plus répandues dans le monde du fait de ses taux élevés de morbidité et de mortalité chaque année. En 2022, elle a fait 249 millions de malades accompagnés de 608 000 décès. Malgré les nombreux traitements existants et les deux vaccins RTS,S/AS01 et R21/Matrix-M recommandés par l'OMS, le nombre de cas de multirésistance augmente, faisant du paludisme un problème de santé majeur. Chez *Plasmodium falciparum*, l'espèce pathogène causant la plus forte mortalité, les kinases et les phosphatases se sont révélées d'une importance cruciale pour sa survie. Ainsi, après caractérisations moléculaire et fonctionnelle d'une phosphatase sérine/thréonine métallo-dépendante (PPM), la PfPPM9, et construction de son modèle 3D *in silico* par une stratégie d'homologie comparative, un criblage virtuel par *docking* sur celui-ci a permis l'identification de trois hits. Suite à leur évaluation *in vitro* sur *P. falciparum* en culture, ces derniers ont montré des concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) proches du micromolaire, puis l'un d'eux, de structure tétrahydro-β-carboline, a fait l'objet d'optimisations afin d'améliorer l'activité antipaludique *in vitro*.

L'objectif de cette thèse était d'améliorer l'activité des molécules synthétisées vis-à-vis de *P. falciparum*, jusqu'à identification d'un candidat médicament potentiel. Tout d'abord, de nouveaux composés dérivés du squelette tétrahydro-β-carboline ont été synthétisés et testés *in vitro* pour déterminer leur CI_{50} contre *P. falciparum* (souche HB3 sensible à la chloroquine et souche Dd2 multirésistante), et pour leur cytotoxicité sur les cellules humaines HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*) et HepG2 (hépatocytes humain) afin de calculer leur index de sélectivité (IS). Les modulations chimiques et les relations structure-activité correspondantes ont contribué à améliorer l'inhibition de la survie du parasite. En parallèle, la phosphatase PfPPM9 a été produite et purifiée sous forme de protéine recombinante et son activité phosphatasique a été démontrée. Les meilleurs composés ont été évalués sur son activité enzymatique avec des CI_{50} supérieures à 100 µM. Par ailleurs, des études pharmacocinétiques *in vivo* chez la souris pour quatre molécules parmi les meilleures ont été entreprises et ont donné des paramètres pharmacocinétiques satisfaisants. Cela a permis d'évaluer les hits dans un modèle animal de paludisme, des souris CD1 infectées par *P. berghei*.

Finalement, une quarantaine de molécules ont été synthétisées et testées au cours de la thèse, parmi lesquelles dix ont une CI_{50} sur *P. falciparum* inférieure à 100 nM et un IS supérieur à 69. Notre meilleur composé à ce jour, le **T17**, présente des CI_{50} de 25 et 61 nM sur les souches PfHB3 et PfDd2 respectivement, avec des IS sur cellules HFF et HepG2 supérieurs à 400. Les études d'efficacité *in vivo* sur des souris infectées par *P. berghei* ont montré 100 % d'élimination du parasite à une dose de 30 mg/kg deux fois par jour par voie intrapéritonéale, et 64 % d'inhibition parasitaire à une dose de 30 mg/kg deux fois par jour par voie orale.

Mots-clés : Paludisme, *Plasmodium*, Drug design, Chimie hétérocyclique, Evaluations *in vitro*, Propriétés ADME, Pharmacocinétique, Efficacité *in vivo*

Abstract

Malaria is one of the most prevalent infectious diseases in the world, with high morbidity and mortality rates every year. In 2022, it caused 249 million illnesses and 608,000 deaths. Despite the many existing treatments and the two WHO-recommended vaccines RTS,S/AS01 and R21/Matrix-M, the number of cases of multi-drug resistance is increasing, making malaria a major health problem. In *Plasmodium falciparum*, the species causing the highest mortality, kinases and phosphatases have been shown to be of crucial importance for its survival. Thus, after molecular and functional characterization of a serine/threonine metal-dependent phosphatase (PPM), PfPPM9, and the construction of its 3D structure *in silico* using a comparative homology strategy, a virtual *docking* screening on it led to the identification of three hits. After their *in vitro* evaluation on *P. falciparum* in culture, these showed inhibitory concentrations at 50% (IC_{50}) close to the micromolar level, and one of them, with a tetrahydro-β-carboline structure, was optimized to improve its *in vitro* antimalarial activity.

The aim of this thesis was to improve the activity of the synthesized molecules against *P. falciparum*, with a view to identifying a potential drug candidate. Firstly, new compounds derived from the tetrahydro-β-carboline backbone were synthesized and tested *in vitro* to determine their IC_{50} against *P. falciparum* (chloroquine-sensitive HB3 strain and multidrug-resistant Dd2 strain), and for their cytotoxicity on human HFF (human foreskin fibroblasts) and HepG2 (liver hepatocellular carcinoma cells) cells in order to calculate their selectivity index (SI). Chemical modulations and corresponding structure-activity relationships contributed to enhance inhibition of parasite survival. In parallel, the phosphatase PfPPM9 was produced and purified as a recombinant protein, and its phosphatase activity was demonstrated. The best compounds were evaluated for their enzymatic activity, with IC_{50} values of more than 100 µM. In addition, *in vivo* pharmacokinetic studies in mice for four of the best molecules were undertaken, yielding satisfactory pharmacokinetic parameters. This made it possible to evaluate the hits in an animal model of malaria, CD1 mice infected with *P. berghei*.

Finally, about forty molecules have been synthesized and tested during the course of the thesis, ten of which have an IC_{50} on *P. falciparum* of less than 100 nM and an SI of more than 69. Our best compound to date, **T17**, displays an IC_{50} of 25 and 61 nM on PfHB3 and PfDd2 strains respectively, with IS on HFF and HepG2 cells greater than 400. *In vivo* efficacy studies on mice infected with *P. berghei* showed 100% parasite elimination at a dose of 30 mg/kg twice daily by intraperitoneal route, and 64% parasite inhibition at a dose of 30 mg/kg twice daily by oral route.

Keywords : Malaria, *Plasmodium*, Drug design, Heterocyclic chemistry, *In vitro* evaluations, ADME properties, Pharmacokinetics, *In vivo* efficacy

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier les institutions qui m'ont permises de réaliser ce travail de thèse, notamment l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille et l'Université de Lille pour son financement durant ces trois années, mais également les directeurs des centres de recherche Centre d'Infection et d'Immunité de Lille et Lille Neuroscience & Cognition, Jean Dubuisson et Luc Buée respectivement, pour m'avoir accueillie dans leur établissement de recherche.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon jury, Alexandra Dassonville-Klimpt et Françoise Benoit-Vical en tant que rapporteures, Sylvain Routier en tant que président et Karin Séron en tant qu'examinatrice. De même, je remercie Sylvain Routier et Alain Baulard pour leurs précieux conseils et leur réflexion scientifique au travers de mes CSI.

J'exprime aussi ma reconnaissance envers l'ensemble des personnes extérieures à mes équipes de recherche avec qui j'ai travaillé ou collaboré : Amaury Farce pour son travail et ses explications en modélisation moléculaire. Sophie Lecher pour sa formation et son aide concernant la purification de mes protéines. Hélène Bauderlique et Olivier Molendi-Coste du plateau BICEL pour leur enseignement et leur accompagnement quant à la cytométrie et l'utilisation de l'Attune. Vincent Ultre et Alexandre Rech pour leur expérience et leur aide autour de mes RMN. Et enfin, Nicolas Kambia, Amandine Descat, Jean-François Goossens et Mostafa Kouach pour leur accompagnement au cours de mes études pharmacocinétiques : d'une part Nicolas pour ses calculs et d'autre part Amandine, Jean-François et Mostafa pour leur accueil dans leur laboratoire, pour la formation qu'ils m'ont apportée en spectrométrie de masse, pour leur gentillesse et leur bonne humeur, ainsi que pour leur aide et leur réflexion suite aux différents problèmes que j'ai rencontré.

Mes remerciements vont également à Jamal Khalife et Patricia Melnyk, responsables respectifs des équipes Biologie des parasites Apicomplexa et Brain Biology & Chemistry, de m'avoir intégrée à leur équipe et de m'avoir fait confiance pour mes recherches.

Bien entendu je remercie sans réserve mes directeurs de thèse, les professeurs El Moukhtar Aliouat et Nicolas Lebègue, sans qui la réalisation et l'aboutissement de ces travaux n'auraient pu être possible. Merci de m'avoir guidée et accompagnée tout au long de ces trois années à travers vos nombreux conseils et explications qui ont toujours été très précieux. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en toute circonstance pour l'élaboration de cette thèse, du concours de l'école doctorale jusqu'à aujourd'hui. Merci pour le temps que vous m'avez consacré et pour votre réactivité, grâce à quoi vous m'apportiez rapidement des réponses ou suggestions qui m'ont amené à réfléchir dans la bonne direction. Merci d'avoir toujours continué à enfiler votre blouse pour m'aider ou m'avancer au laboratoire car « on est une équipe ». Merci d'avoir toujours été présents lorsque j'en avais besoin, que ce soit pour de simples interrogations ou lorsque je perdais confiance et je paniquais. Votre porte m'était toujours ouverte et j'en suis très touchée et reconnaissante. Merci pour votre remarquable patience, car je sais que je peux être têtue parfois ou qu'il m'arrive de poser plusieurs fois les mêmes questions. Merci de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi jusqu'à la fin.

J’exprime aussi mes remerciements chaleureux envers mes collègues des équipes Biologie des parasites Apicomplexa et Brain Biology & Chemistry, dont la présence est indispensable pour la vie quotidienne en laboratoire :

Dans la première, je remercie Véronique Peucelle et Camille Hagnere qui sont toujours prêtes à me rendre service dans le P3, tant pour cultiver le parasite que pour prendre le relai sur un test de molécule. Caroline Dewitte pour son investissement quant à la purification de mes protéines sur la fin de ma thèse. Jamal Khalife pour ses réguliers « Salut Justine, ça va ? » et pour l’attention qu’il portait à mon projet. Claudianne Lainé pour ses explications et pour nos nombreuses discutions, scientifiques ou non, dans notre bureau d’étudiants. Christine Pierrot pour sa bienveillance et sa gaieté chaque jour. Thomas Mouveaux pour l’ambiance qu’il met dans le laboratoire et pour ses innombrables blagues qui me font toujours sourire. Et bien sûr l’équipe dans son ensemble sans qui le laboratoire serait bien triste. Merci à vous tous pour votre accueil, pour votre bonne humeur, pour ces nombreux repas du midi accompagnés parfois de discussions farfelues, de partages et de rires, et pour ces afterworks durant lesquels je me suis toujours bien amusée.

Dans la seconde, je tiens à remercier Saïd Yous pour le démarrage de la collaboration entre nos deux équipes, essentielle pour le développement de la partie chimie du projet. Séverine Ravez pour sa gentillesse et pour son implication quant à la mesure de l’activité enzymatique de ma protéine et pour le temps qu’elle y a consacré. Stéphanie Delbaere pour son travail de RMN autour de notre composé en cyclodextrine. Jérôme Berthet pour sa sympathie et son aide sur l’élucidation de certains de mes spectres RMN. Sergio Hernandez pour ses conseils et ses essais quant à la production de mes protéines. Martin Fossart et Paul-Emmanuel Larchanche *alias* Paulo, pour leurs multiples interventions en informatique, allant de l’élucidation d’un simple problème de bureautique jusqu’au démontage et remontage de mon ordinateur (Vous m’avez sauvé la vie plusieurs fois !). Maxime Liberelle pour son aide sur différents logiciels. Alexandre Gobert pour son sourire toujours présent et pour m’avoir appris à utiliser Prism. Jamal El Bakali pour sa bonne humeur et pour ses propositions scientifiques. Tous les doctorants et post-doctorants pour leur convivialité et leurs échanges, mes stagiaires Zoé Weber et Paul Blanchart pour leur travail, et évidemment l’ensemble de l’équipe pour leur accueil, leur écoute et leurs conseils.

Immanquablement, mes remerciements se tournent aussi vers ces collègues qui sont devenus des amis, plus particulièrement Marie Stoup, Amélie Laversin et Tarak Saïed qui ont été mes meilleurs amis lillois. Merci pour nos discussions, pour nos rires, pour nos dérisions ironiques, nos repas partagés, nos sorties et nos voyages ensemble. Merci de m’avoir fait oublier la difficulté de la thèse durant nos entrevues, de m’avoir fait sourire, de m’avoir suivie dans mes idées de sorties « nulles » et mes soi-disant pèlerinages, de m’avoir fait prendre l’avion pour la première fois et de m’avoir soutenue et gardé auprès de vous quand je n’allais pas bien. Merci d’avoir cru en moi au cours de la réalisation de cette thèse. Merci à Amélie, ma sœur de doctorat, pour notre soutien mutuel qui a traversé toutes nos déceptions de manips, nos colères, nos tristesses et nos quelques joies les rares fois où la science a fonctionné comme on le souhaitait.

J'exprime également ma reconnaissance envers les personnes que j’ai rencontré et qui m’ont aidé dans ma vie personnelle durant ce doctorat. En commençant par mon coach, ami, confident, je

ne cite pas ton nom mais tu te reconnaitras. Tu m'as tendu ta main quand je voyais tout en noir et que la vie ne m'intéressait plus. Tu as été à l'origine de ma guérison et les mots ne sont pas assez puissants pour te dire à quel point je suis reconnaissante et touchée. Après toi, différentes rencontres m'ont aidé à avancer et me sentir mieux, jusqu'à la dernière : celle des westies lillois. Je remercie ces personnes formidables pour leur gaieté inconditionnelle, leur bienveillance, leur sourire constant, nos discussions et leurs compliments qui me redonnent petit à petit confiance en moi.

Incontestablement mes pensées se tournent aussi vers Emilie Barthier, toujours à mes côtés malgré la distance. Je te remercie pour ta patience et ton écoute qui ont été mis à rude épreuve durant ces trois longues années. Je te remercie de continuer à me supporter et de toujours me soutenir, de croire en moi et de me rassurer quand j'ai envie de baisser les bras. J'ai énormément de chance d'avoir une amie comme toi.

Pour finir, mes remerciements les plus chers s'adressent à ma famille pour m'avoir toujours soutenue et encouragée. Je remercie en particulier mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci pour l'éducation que vous m'avez transmise et pour l'apprentissage de toujours donner le meilleur de soi-même, qui font de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir donné toutes les chances pour que je réussisse et pour vos soutiens matériel et moral qui m'ont permis de suivre des études et d'en arriver où je suis aujourd'hui. Merci de toujours être présents à mes côtés, quelques qu'en soient les circonstances ou la distance, et de croire en moi constamment. Et le plus compliqué, merci de m'avoir supporté, particulièrement au cours de ces trois ans durant lesquels je sais que j'ai été difficile.

Table des matières

Résumé **2**
Remerciements 4
Liste des figures 9
Liste des schémas 12
Liste des tableaux 13
Abréviations 15

1. Introduction 18

1.1. Contexte historique et épidémiologie 18

1.2. L'agent pathogène : *Plasmodium* 20
1.2.1. Morphologie des Apicomplexa 20
1.2.2. Les cinq espèces infectant l'Homme 21
1.2.3. Cycle biologique de *P. falciparum* 23
1.2.4. Symptomatologie du paludisme à *P. falciparum* 27
1.2.5. Les méthodes de diagnostic 28

1.3. Les stratégies prophylactiques et thérapeutiques 30
1.3.1. Les méthodes de prophylaxie antipaludique 30
1.3.2. Les thérapies antipaludiques actuelles 35
1.3.3. Modes d'action des molécules antipaludiques actuelles 36

1.4. Résistances aux médicaments et recherche de nouvelles thérapies 38
1.4.1. Apparitions et mécanismes de résistances 38
1.4.2. Nouvelle génération de thérapies antipaludiques 40

1.5. Recherche et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique : PfPPM9 45
1.5.1. Les phosphatases de *P. falciparum* 45
1.5.2. La phosphatase PfPPM9 48

1.6. Recherche de premiers hits sur PfPPM9 50

1.7. Les β-carbolines antipaludiques 52

2. Objectifs de la thèse 64

3. Poursuite des relations structure-activité (RSA) 66

3.1. Pharmacomodulations envisagées 66

3.2. Stratégies générales 67
3.2.1. Synthèse des tryptamines 67
3.2.2. Synthèse des aldéhydes aromatiques 69
3.2.3. Synthèse des tétrahydro-β-carbolines (tryptolines) 71
3.2.4. Évaluations *in vitro* 73

3.3. Exploration des poches hydrophobes 74

3.4. Exploration de la substitution du phénol 77
3.4.1. Remplacement du phénol par des benzoxazolinones 77
3.4.2. Remplacement de l'hydroxynaphtalène par des hydroxyquinoléines 78
3.5. Exploration de la substitution de l'amine secondaire 79
3.6. Bilan des relations structure-activité (RSA) 81

4. Énantiosélectivité 83

4.1. Séparation des énantiomères 83
4.2. Alternative à la séparation des énantiomères 85

5. Étude de la cible PfPPM9 88

5.1. Production, purification et activité enzymatique de PfPPM9r 88
5.2. Effets des hits sur l'activité enzymatique de PfPPM9r 91

6. Études chez l'animal : administration par voie intrapéritonéale 94

6.1. Études pharmacocinétiques par voie intrapéritonéale 94
6.2. Étude de l'efficacité *in vivo* par voie intrapéritonéale 96
6.2.1. Sur souris « humanisées » infectées par *P. falciparum* 96
6.2.2. Sur souris CD1 infectées par *P. berghei* 98
6.3. Conception de prodrogues du T17 100
6.4. Étude de l'activité *in vitro* et de la stabilité des prodrogues 101

7. Études chez l'animal : administration par voie orale 104

7.1. Formulation des composés en β-cyclodextrine 104
7.2. Études pharmacocinétiques par voie orale 106
7.3. Étude de l'efficacité *in vivo* par voie orale 108

8. Conclusion 110

9. Perspectives 112

9.1. A la recherche de la cible 112
9.2. Poursuite des RSA 113
9.3. Développement de prodrogues 114

Références 115

Annexes 124

Annexe 1 : Figure annexes 125
Annexe 2 : Tableau de l'ensemble des molécules 127
Annexe 3 : Partie expérimentale (en anglais) 138

Liste des figures

Figure 1. Carte mondiale des pays ayant des cas autochtones de paludisme en 2000 et leur statut en 2022 19

Figure 2. Morphologie du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* au stade sanguin 20

Figure 3. Schéma du cycle de vie de *P. falciparum* 24

Figure 4. Schéma de l'invasion érythrocytaire par un mérozoïte 25

Figure 5. Frottis d'un patient infecté par *P. falciparum* 29

Figure 6. État de l'art des vaccins candidats contre *P. falciparum* en cours de développement clinique (2023) 34

Figure 7. Structures des dérivés de l'artémisinine responsables d'un stress oxydant chez *Plasmodium* 36

Figure 8. Structures des antipaludiques contenant un amino-alcool ou une quinoléine, impliqués dans l'inhibition de la détoxification de l'hème 37

Figure 9. Structures des dérivés antipaludiques impliqués dans l'inhibition de la voie de biosynthèse des folates 37

Figure 10. Structures des autres molécules antipaludiques actuelles 38

Figure 11. Frise chronologique de l'histoire des traitements antipaludiques : de leur découverte jusqu'à l'apparition de résistances 39

Figure 12. Les thérapies antipaludiques actuelles dans le contexte du cycle de vie de *Plasmodium* : classement en TCP et TPP 41

Figure 13. État de l'art des candidats médicaments et médicaments approuvés contre le paludisme (2023) : classement en TCP 44

Figure 14. Structures chimiques de différents exemples de molécules hybrides antipaludiques 45

Figure 15. Classification des familles phosphatases et de la sous-famille PSP chez *P. falciparum* 47

Figure 16. Représentation de la séquence protéique de PfPPM9 49

Figure 17. Mesure de l'activité phosphatasique de PfPPM9r par le test au vert de malachite 49

Figure 18. Modèle 3D du site catalytique de PfPPM9 et position des ions Mn^{2+} 50

Figure 19. Structures des meilleurs hits issus du criblage virtuel sur le site catalytique de PfPPM9 et leur CI_{50} sur *P. falciparum* HB3 51

Figure 20. Représentations du hit H1 et CI_{50} des meilleurs candidats issus des premières pharmacomodulations 51

Figure 21. Structures des β-carbolines 52

Figure 22. Structures de la manzamine A et de la 8-hydroxymanzamine A et leurs CI_{50} *in vitro* sur *P. falciparum* 53

Figure 23. Dérivés de la manzamine A par modulations de la partie pentacyclique et leurs CI_{50} sur *P. falciparum* 53

Figure 24. Structures d'alcaloïdes usambarines extraits de *Strychnos usambarensis* 54

Figure 25. Structures de la (+)-7-bromotrypargine et des opacalines A et B 55

Figure 26. Relations structure-activité de spiroindolones sur PfNF54 56

Figure 27. Mécanisme d'action de PfATP4 dans la membrane plasmatique de *P. falciparum* et des spiroindolones sur PfATP4 57

Figure 28. Mécanisme d'action de PfHsp90 et des dérives d'harmine sur PfHsp90 57

Figure 29. Résultats de relations structure-activité de composés dérivés d'harmine 58

Figure 30. Résultats de relations structure-activité de β-carbolines dérivées du tétrahydroharmane 58

Figure 31. Schéma de la voie du phosphate de méthylérythritol (MEP) engageant l'enzyme IspD 59

Figure 32. Résultats de relations structure-activité autour du hit MMV008138 60

Figure 33. Autres β-carbolines comportant un effet antipaludique et leur CI_{50} sur PfDd2 ou PfW2 61

Figure 34. Relations structure-activité autour des dérivés hybrides harmicènes 62

Figure 35. Relations structure-activité autour des dérivés hydribes harmiquines 63

Figure 36. Pharmacomodulations réalisées sur le squelette tryptoline pour l'exploration des poches hydrophobes et de la nature de l'amine secondaire 66

Figure 37. Pharmacomodulations réalisées sur le squelette tryptoline pour remplacer le phénol 67

Figure 38. Représentation des poses de docking des énantiomères de **T17** 82

Figure 39. Structure du sélecteur chiral employé dans l'absorbant chromatographique 83

Figure 40. Spectre du mélange des énantiomères **T1** en chromatographie chirale 83

Figure 41. Chromatogrammes en phase chirale de **T1** ou **T4** protégés par un Boc, Fmoc ou Cbz 85

Figure 42. Étude de PfPPM9r-83 après production en *E. coli* BL21 et purification par chromatographie d'affinité au Nickel 88

Figure 43. Western Blot anti-His de la protéine PfPPM9r-83 après production en *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) dans différentes conditions de culture. 89

Figure 44. Étude de PfPPM9r-83 après production en *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) et purification sur billes de Nickel 90

Figure 45. Structures de différents inhibiteurs de phosphatases 91

Figure 46. Effet de différents composés sur l'activité phosphatasique de PfPPM9r-83 en mélange 93

Figure 47. Structure du **AMT44** choisi comme étalon interne de quantification 94

Figure 48. Courbes pharmacocinétiques des quatre molécules **T16**, **T17**, **T20** et **T26** suite à leur injection en IP à une dose de 10 mg/kg 95

Figure 49. Schéma descriptif des différentes étapes d'une expérience d'efficacité *in vivo* chez des souris NOD-*scid IL-2Rγ*^{null} infectées par *P. falciparum* 97

Figure 50. Efficacité *in vivo* des composés **T17**, **T20** et **T26** sur *P. falciparum* 98

Figure 51. Schéma descriptif des différentes étapes d'une expérience d'efficacité *in vivo* chez des souris CD1 infectées par *P. berghei* selon le test de suppression de Peters 99

Figure 52. Efficacité *in vivo* du **T17** administré par voie IP dans un modèle de souris infectées par *P. berghei* 99

Figure 53. Chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour les composés **P1** et **T17** dans des solutions de **P1** à 0,2 µM 102

Figure 54. Les cyclodextrines 104

Figure 55. Étude du complexe **T17**-HPβCD en RMN 105

Figure 56. Courbes pharmacocinétiques obtenues suite à l'administration de **P2** par voie orale 106

Figure 57. Courbes pharmacocinétiques obtenues suite à l'administration de **T17** par voie orale 107

Figure 58. Efficacité *in vivo* du **T17** administré par voie orale dans un modèle de souris infectées par *P. berghei* 109

Figure 59. Bilan des RSA autour du squelette tétrahydro-β-carboline 110

Figure 60. Stratégie de travail MS-CETSA appliquée à notre projet pour la recherche de cibles médicamenteuses 113

Figure 61. Pharmacomodulations proposées pour le squelette tétrahydro-β-carboline 113

Figure 62. Structures des divers groupements envisagés pour la protection du phénol en vue de la synthèse de prodrogues 114

Figure 63. Résultats d'analyse en spectrométrie de masse des différentes bandes obtenues après production de PfPPM9r-83 en *E. coli* BL21 et purification par chromatographie d'affinité 125

Figure 64. Résultats d'analyse en spectrométrie de masse des différentes bandes obtenues après production de PfPPM9r-83 en *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) et purification sur billes de Nickel 125

Figure 65. Spectre RMN ^{1}H-^{1}H 2D-Roesy de **T17** + HPβCD (1:1) 126

Figure 66. Schematic description of the different stages of the production and purification of PfPPM9r-83 182

Liste des schémas

Schéma 1. Schéma rétrosynthétique pour la conception de tryptolines 67

Schéma 2. Schéma de synthèse des dérivés de tryptamine 68

Schéma 3. Schéma de synthèse des tryptamines avec R_1 = cyHexCH_2O ou Adm$(CH_2)_2O$ 68

Schéma 4. Schéma de synthèse du 4-hydroxy-3-phénylbenzaldéhyde (**9d**) 70

Schéma 5. Schémas de synthèse des aldéhydes benzoxazolinones **15a** et **15b** 70

Schéma 6. Schémas de synthèse des aldéhydes dérivés des hydroxyquinoléines **20b** et **20c** 71

Schéma 7. Schéma du mécanisme réactionnel de la réaction de Pictet-Spengler en milieu acide 71

Schéma 8. Mécanisme de la réaction de Pictet-Spengler dans les conditions ClMe_3Si, pyridine 73

Schéma 9. Schéma de synthèse pour l'acétylation de l'amine secondaire de la tryptoline 79

Schéma 10. Schémas de synthèse des dérivés tryptolines *N*-méthylées 79

Schéma 11. Schéma de séparation des énantiomères de **T1** ou **T4** après protection de l'atome d'azote de la tryptoline sous forme de carbamate (Boc, Fmoc, Cbz) puis racémisation après déprotection 84

Schéma 12. Schéma des différentes formes tautomères de la tryptoline 84

Schéma 13. Schéma de synthèse des dérivés dihydro-β-carbolines et 1-méthyltétrahydro-β-carbolines 86

Schéma 14. Schémas de synthèse des prodrogues de **T17** fonctionnalisées au niveau du phénol 101

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des principales drogues antipaludiques en développement et en essais cliniques et leur site d'action 44

Tableau 2. Tableau des différentes PP2C retrouvées chez *P. falciparum* et de leur essentialité au cours de son cycle de vie 48

Tableau 3. Dérivés de la manzamine A par modulations de la partie β-carboline et leurs CI_{50} sur *P. falciparum* 54

Tableau 4. Activités *in vitro* d'alcaloïdes extraits de *Strychnos* sur *P. falciparum* 55

Tableau 5. Activité inhibitrice de la croissance de *P. falciparum in vitro* et effet de la supplémentation en IPP des stéréoisomères du MMV08138 59

Tableau 6. Dérivés de tétrahydro-β-carbolines avec modulation en C_1 et leur CI_{50} *in vitro* sur *P. falciparum* 60

Tableau 7. Résultats de relations structure-activité sur les analogues de Tadalafil les plus efficaces 61

Tableau 8. Tableau des différentes conditions employées pour la réaction d'hydrogénolyse du benzyl sur la tryptamine **7k** 69

Tableau 9. Tableau regroupant les différentes conditions employées pour la réaction de Pictet-Spengler 72

Tableau 10. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour l'exploration des poches hydrophobes suite à l'homologation de chaîne en position R_1 74

Tableau 11. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* pour le remplacement du phénol par des benzoxazolinones 77

Tableau 12. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour le remplacement de l'hydroxynaphtalène par des hydroxyquinoléines 78

Tableau 13. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour l'exploration de la substitution de l'amine secondaire 80

Tableau 14. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour l'exploration de la substitution de l'amine secondaire par un méthyl 81

Tableau 15. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* pour les substitutions sur le carbone asymétrique 86

Tableau 16. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* pour la substitution sur le carbone asymétrique (R_4 = Ø) 87

Tableau 17. Résultats d'inhibition de l'activité phosphatasique de différentes PP2C par la sanguinarine, selon différents substrats employés 92

Tableau 18. Paramètres pharmacocinétiques des molécules **T16**, **T17**, **T20** et **T26** administrées par voie intrapéritonéale (IP) à 10 mg/kg 96

Tableau 19. Intensité des signaux de chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour les composés **P1** et **T17** dans des solutions de **P1** à 50 nM dans différentes conditions 103

Tableau 20. Paramètres pharmacocinétiques de la molécule **T17** administrée par voie orale (VO) à 30 mg/kg 108

Tableau 21. Résultats de l'ensemble des évaluations *in vitro* des molécules synthétisées issues de la pharmacomodulation des hits tétrahydro-β-carbolines **T1**, **T2**, **T3** et **T4** 124

Tableau 22. Conditions used to record ^{1}H NMR spectrums to determine the geometry of the complex **T17**-HPβCD 186

Tableau 23. Conditions used to track transitions in MRM mode 188

Abréviations

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion d'un composé dans l'organisme
AMA-1	*Apical Membrane Antigen-1* (Antigène-1 de la membrane apicale)
ATP	Adénosine triphosphate
ART	Artémisinine
AUC	*Area Under Curve* (aire sous la courbe)
CI_{50}	Concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire ou entraînant 50% de mort cellulaire
CQ	Chloroquine
CD81	*Tetraspanin*
CDP-ME	Cytidinediphosphate méthylerythritol
CETSA	CEllular Thermal Shift Assay
CL_T	Clairance plasmatique totale
CQ	Chloroquine
CSP	Protéine circumsporozoïte
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CTP	Cytidine triphosphate
CYP	Cytochromes P450
DHβC	3,4-dihydro-β-carbolines
DMAPP	Pyrophosphate de diméthylallyle
DDT	Dichloro-diphényl-trichloroéthane
DO	Densité optique
EBA175	*175 kD Erythrocyte Binding Antigen* (Antigène de liaison aux érythrocytes de 175 kD)
glyA	Glycophorine A
GTS	Programme mondial de lutte contre le paludisme de l'OMS
HepG2	*Liver hepatocellular carcinoma cells* (hépatocytes humains)
HFF	*Human Foreskin Fibroblasts*
HRP2	*Histidine Rich Protein-2* (protéine riche en histidine-2)
IP	Intrapéritonéal
IPP	Pyrophosphate d'isopenténylе
IspD	Enzyme 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidylyltransférase
K_a	Constante d'association
KC	Cellules de Kupffer
K_d	Constante de dissociation
K_i	Constante d'inhibition
LAMP	*Loop-mediated isothermal amplification* (amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle)

LSEC *Liver Sinusoidal Endothelial Cells* (cellules endothéliales sinusoïdales hépatocytaires)

MEP Phosphate de méthylérythritol

MII Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide

OMS Organisation Mondiale de la Santé

PBS *Phosphate buffer saline* (Tampon phosphate salin)

PD Pharmacodynamique

Pf *Plasmodium falciparum*

PfATP4 ATPase de Pf, de type P appartenant à la sous-classe 4

PfCARL *Pf cyclic amine resistance locus*

PfCRT *Pf chloroquine resistance transporter*

PfCSS *Pf cysteine-rich protective antigen* (petite protéine sécrétée riche en cystéine de Pf)

PfCyRPA *Pf cysteine-rich small secreted protein* (antigène protecteur riche en cystéine de Pf)

PfDHFR Dihydrofolate réductase de Pf

PfDHPS Dihydroptéroate synthase de Pf

PfeEF2 *P. falciparum translation elongation factor 2*

PfEMP1 *Pf Erythrocyte Membrane Protein 1*

PfHsp90 *Pf Heat shock protein 90* (protéine de choc thermique 90 de Pf)

PfMDR1 *Pf multidrug resistance protein 1*

PfMRP *Pf multidrug resistance-associated protein*

PfPI4K *Pf phosphatidylinositol 4 kinase* (kinase phosphatidylinositol 4 de Pf)

PfPTRAMP *Pf thrombospondin-related apical merozoite protein* (protéine apicale du mérozoïte liée à la thrombospondine de Pf)

PfRh5 *Pf Reticulocyte binding-like homologous protein 5* (protéine homologue de type réticulocyte 5 de Pf)

PfRipr *Pf Rh5-interacting protein* (protéine interagissant avec le Rh5 de Pf)

pLDH Lactate déshydrogénase parasitaire

PK Pharmacocinétique

PLP-1 *Perforin Like Protein-1* (protéine responsable de la rupture des membranes)

RON *Rhoptry Neck Proteins* (protéines du col)

ROP *Rhoptry Bulb Proteins* (protéines du bulbe)

ROS Radicaux libres de l'oxygène

SC Voie sous-cutanée

SR-B1 *Scavenger Receptor Class B Type 1*

$t_{1/2}$ Temps de demi-vie

TCP *Target Candidate Profiles* (profils des candidats cibles)

TDR Test de Diagnostic Rapide

THβC 1,2,3,4-tétrahydro-β-carbolines (tryptolines)

TRAP *Thrombospondin Related Anonymous Protein* (protéine engagée dans la motilité de glissement des sporozoïtes)

TPP *Target Product Profiles* (profils des produits cibles)

V_d Volume de distribution

VIT *Vacuolar Iron Transporters* (transporteurs de fer vacuolaires)

VO Voie orale

1. Introduction

1.1. Contexte historique et épidémiologie

Le paludisme est une maladie parasitaire transmise par la piqûre d'un moustique femelle appartenant au genre *Anopheles*.[1] Il s'agit de l'une des plus anciennes maladies existantes. Effectivement, les frissons et fièvres engendrées par le paludisme ont été décrit pour les premières fois durant l'antiquité dans des documents chinois (environ 2700 av JC), égyptiens (1570 av JC) et grecs (400 av JC).[2,3] Au sein de l'empire romain, il était affirmé que le paludisme était causé par le « mal aria », signifiant mauvais air, dû à la proximité des marécages. Les premiers traitements sont apparus au cours du XVIIème siècle avec l'utilisation de l'écorce de l'arbre de quinquina pour traiter divers maux, notamment la fièvre d'origine palustre. Puis, c'est en 1820 que la quinine a été isolée de l'écorce de quinquina, permettant une utilisation plus précise et contrôlée de cette substance.[4] Plus tard, dans les années 1880-1900, *Plasmodium* a été identifié comme le parasite transmettant le paludisme et a été découvert dans le sang des patients par A. Laveran,[5] et plus précisément dans leurs globules rouges. De plus, cette phase sanguine a été démontrée comme étant à l'origine des signes cliniques observées chez les patients.[4] Dans le même temps, R. Ross et B. Grassi ont découvert que les moustiques du genre *Anopheles* étaient les insectes vecteurs de la maladie.[6–8] Enfin, l'observation d'une rechute après une transmission du parasite par le moustique et l'absence de rechute lors d'une transmission par le sang a souligné l'existence d'une phase exo-érythrocytaire, phase asymptomatique ayant lieu dans le foie.[4] Cela a finalement permis de décrire le cycle de transmission de *Plasmodium* entre le moustique *Anopheles* et l'Homme.[2]

Depuis la découverte du paludisme, la lutte contre celui-ci a fait l'objet de nombreuses recherches. Comme énoncé précédemment, la quinine fut l'un des premiers traitements et elle est toujours employée aujourd'hui pour affronter l'accès palustre grave à *P. falciparum*. L'artémisinine a longtemps été utilisé comme remède en faisant infuser les feuilles et branches de la plante *Artemisia annua* dont il provient (168 av JC). Il a ensuite été isolé et purifié dans les années 1970 puis a finalement été reconnu comme « le plus grand espoir mondial contre le paludisme » par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2001.[9] Par ailleurs, le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) a largement été employé à partir des années 1940 pour ses propriétés insecticides. Il est devenu le principal moyen d'éradication du paludisme ciblant le vecteur avant d'être abandonné à cause de sa toxicité envers les animaux, en particulier les oiseaux, de sa bioaccumulation et de l'apparition d'une résistance chez les moustiques.[4] D'autres stratégies thérapeutiques telles que la méfloquine, la pyriméthamine, la sulfadoxine ou encore l'halofantrine ont été mises en place, néanmoins, de multiples foyers de résistances ont émergé de plus en plus fréquemment sur tout l'arsenal thérapeutique. Toutes les souches de *P. falciparum* sont aujourd'hui résistantes à la chloroquine, et une résistance à l'artémisinine est même observée depuis 2006. Ainsi, l'OMS recommande de prescrire des traitements en rotation ou des thérapies en combinaison double ou triple, telles que les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), incluant un dérivé de l'artémisinine et un antipaludique avec un mode d'action différent. Celles-ci permettent de lutter contre l'apparition de résistances en ayant une synergie d'action.[10,11] Cependant, ces combinaisons sont également menacées par l'apparition de souches multirésistantes.[12]

Par conséquent, cette parasitose demeure un problème majeur de santé publique à travers le monde. Pour réduire son incidence, l'organisation à but non lucratif *Medicines for Malaria Venture* (MMV) a été créée en 1999 afin d'élaborer des collaborations avec des partenaires industriels et universitaires pour le développement de nouvelles approches de lutte contre le paludisme.[13] Toutefois, alors que son incidence a diminué sur la période 2000-2019, une augmentation du nombre de victimes a été observée suite à la perturbation des services médicaux durant la pandémie de COVID-19. Selon l'OMS, 249 millions de cas ont été rapportés en 2022 dans 85 pays et territoires d'endémie, c'est-à-dire principalement dans les régions pauvres, tropicales et subtropicales. Cela représente une hausse de 5 millions par rapport à l'année précédente et 16 millions par rapport à 2015. Les populations les plus touchées sont les plus vulnérables, telles que les enfants de moins de cinq ans, mais aussi les voyageurs qui se rendent pour la première fois dans les zones d'endémie. Les régions d'Afrique concentrent actuellement 94% des cas, tandis que celles d'Europe sont exemptes du paludisme. Au total, douze pays ont totalement éliminé la maladie entre 2000 et 2022 et l'Azerbaïdjan, le Belize et le Tadjikistan ont été certifiés exempts en 2023 (*Figure 1*). De surcroît, la mortalité associée a diminué sur la même période 2000-2019, passant de 864 000 décès en 2000 à 576 000 en 2019, avant de réaugmenter à 608 000 décès en 2022.[12]

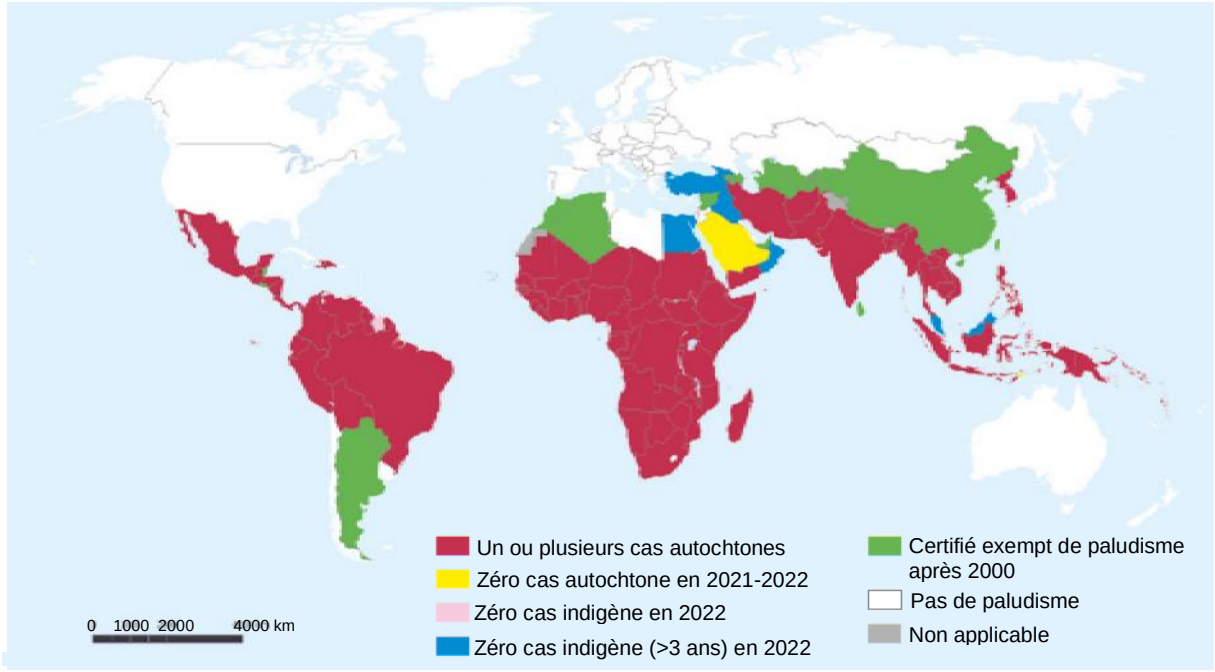


Figure 1. Carte mondiale des pays ayant des cas autochtones de paludisme en 2000 et leur statut en 2022. Les pays considérés exempts du paludisme n'ont enregistré aucun cas pendant au moins trois ans consécutifs. Issu de WHO 2023.[12]

Dans ce contexte, le programme mondial de lutte contre le paludisme de l'OMS (GTS) a pour objectif de réduire l'incidence du paludisme et la mortalité associée d'au moins 75% d'ici 2025 et 90% d'ici 2030, en se basant sur les données de référence de 2015. Pour cela, 9,3 milliards de dollars US sont estimés nécessaires comme fonds annuels d'ici 2025 et 10,3 milliards d'ici 2030. Les recommandations de l'OMS pour la période 2024-2030 sont l'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) associant un pyréthrinoïde et le chlorfénapyr pour prévenir le paludisme chez les habitants des zones où les moustiques ont développé une résistance à certains pyréthrinoïdes et

l'utilisation des vaccins antipaludiques (RTS,S/AS01 ou R21/Matrix-M) chez les enfants dans les régions d'endémie. De plus, la recherche et le développement pour la lutte contre le paludisme sont également mis en avant et 850 millions de dollars US y sont alloués chaque année depuis 2021.[12] La plus grande préoccupation sur le plan thérapeutique est de lutter contre les souches multi-résistantes du parasite, notamment aux CTA, ou à mettre en place un vaccin efficace contre *Plasmodium*.[14] Ainsi, la conception de nouveaux composés antipaludiques interagissant avec de nouvelles cibles thérapeutiques est primordiale. Au total, 4,1 milliards de dollars ont été investis en 2022 pour le contrôle et l'élimination du paludisme. Cependant, ces ressources financières demeurent insuffisantes pour parvenir aux échéances du GTS qui ne seront vraisemblablement pas atteintes pour 2025.[12]

1.2. L'agent pathogène : *Plasmodium*

1.2.1. Morphologie des Apicomplexa

L'agent pathogène du paludisme, *Plasmodium*, est un protiste appartenant à la famille des protozoaires, et plus particulièrement au phylum des Apicomplexa. Les Apicomplexa sont des parasites intracellulaires qui envahissent de façon active leurs cellules cibles. Leur nom, défini par N.D. Levine en 1970, fait référence à leur complexe apical constitué d'organites spécifiques qui sont impliqués dans cette étape d'invasion, cruciale pour leur survie.[15] Les Apicomplexa, dont les formes mobiles et invasives sont appelées « zoïtes », partagent tous la même morphologie allongée et apicale, associée à leur motilité par glissement qui est nécessaire pour leur internalisation (*Figure 2*).[16]

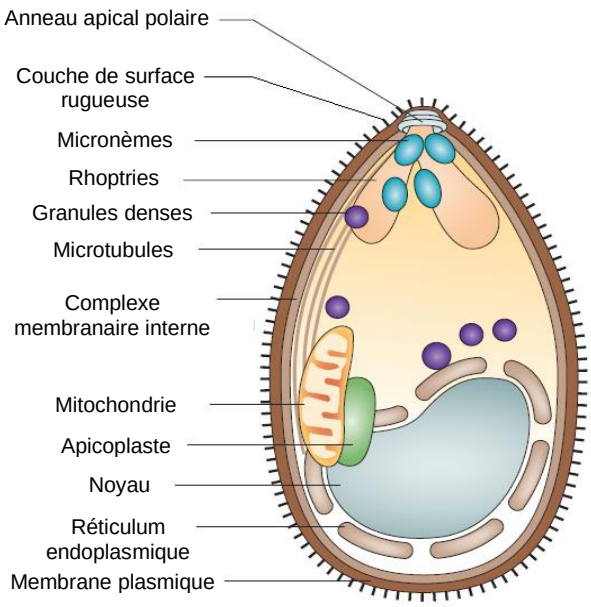


Figure 2. Morphologie du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* au stade sanguin. Sa taille est d'environ 1,5 µm. La structure caractéristique des apicomplexes comprend la pellicule constituée des membranes plasmique et interne et des microtubules ainsi que l'anneau apical polaire avec les micronèmes et les rhoptries. Schéma issu de Baum 2006.[16]

Tout d'abord, les apicomplexes comportent une pellicule constituée de trois membranes. En plus de leur membrane plasmique externe, ils possèdent un complexe membranaire interne composé de vésicules aplaties. Entre ces deux membranes se trouve le glidéosome, complexe moléculaire

actine-myosine impliqué dans la motilité. Il permet au parasite de se déplacer grâce à un mouvement de glissement avant l'invasion, mais aussi le passage au travers des barrières biologiques de l'hôte. Enfin, la rigidité de la pellicule est due aux microtubules du cytosquelette qui sont directement reliés à la membrane interne.[17,18] Ces microtubules sont organisés au sein d'un anneau polaire situé au niveau du pôle apical de l'apicomplexe. Le complexe apical sert également à libérer les organites sécrétoires micronèmes et rhoptries. Les micronèmes sont impliqués dans le stockage et le transport des ligands ciblant les récepteurs de la cellule hôte, les protéines MIC, qu'ils sécrètent suite à une augmentation en calcium dans le cytosol. Une fois libérées, les protéines MIC s'insèrent dans la membrane plasmique du parasite afin d'interagir avec les récepteurs de l'hôte et avec le glidéosome, permettant la réorientation et la motilité du parasite. Quant aux rhoptries, elles délivrent les protéines du col RON (*Rhoptry Neck Proteins*) et du bulbe ROP (*Rhoptry Bulb Proteins*) dans la vacuole parasitophore qui se forme durant la phase d'invasion. Ces deux types de protéines sont impliqués dans la formation d'une jonction mobile entre la membrane plasmique du parasite et celle de la cellule hôte.[17]

D'autre part, l'apicoplaste est à l'origine de la biosynthèse des isoprénoïdes essentiels pour la croissance du parasite, notamment par la voie métabolique du phosphate de méthylérythritol (MEP), et est impliqué dans les voies métaboliques des acides gras et de l'hème.[19] Il est indispensable pour la survie de l'apicomplexe et se situe toujours à proximité de la mitochondrie avec laquelle il communique au moyen de voies métaboliques. La mitochondrie joue un rôle fondamental dans la production de l'ATP et de divers cofacteurs métaboliques et dans les processus tels que la communication, la différenciation ou l'apoptose. Enfin, les granules denses sécrètent, après invasion, des protéines impliquées dans le remodelage de l'érythrocyte infecté.[20]

1.2.2. Les cinq espèces infectant l'Homme

Le groupe des Apicomplexa est constitué de divers organismes, dont différentes espèces de *Plasmodium* parmi lesquelles cinq espèces sont capables d'infecter l'Homme :

- *Plasmodium vivax* : Espèce la plus fréquente, retrouvée principalement en Asie du Sud-Est, en Amérique Centrale et du Sud, en Ethiopie, mais aussi dans les régions au climat tempéré. Elle infecte préférentiellement les personnes comportant l'antigène Duffy à la surface de leurs globules rouges. D'ailleurs, les populations d'Afrique de l'Ouest n'y sont pas infectées car elles sont Duffy négatif. La caractéristique unique de *P. vivax* est son stade hypnozoïte, à travers lequel il peut rester en dormance durant des mois voire des années dans les cellules hépatiques de son hôte. Au cours du temps, certaines formes dormantes peuvent s'activer et libérer des mérozoïtes. Ainsi, l'infection est relancée et la transmission maintenue, ce qui explique sa propagation dans des zones climatiquement défavorables et la survenue de la maladie, caractérisée par la fièvre, plusieurs mois ou années après l'exposition.[10,21,22]

- *Plasmodium ovale* : Espèce localisée en Afrique et en Asie du Sud-Est dont il existe deux sous-espèces distinctes : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*. Ces deux sous-espèces comportent des différences dans leur séquence génétique et dans leur période de latence, mais les mêmes symptômes cliniques. Comme *P. vivax*, elle est capable de produire des formes hypnozoïtes.[10,21]

- *Plasmodium malariae* : Espèce la plus bénine, détectée principalement en Afrique de l'Ouest. Elle cause des fièvres toutes les 72h chez les patients, appelées fièvres quarte. Ce temps correspond à la durée de son cycle érythrocytaire plus long que chez les autres espèces de *Plasmodium* (48h et fièvres tierces) et entraîne une réponse immunitaire plus robuste ainsi que la possibilité d'une infection chronique simple pouvant durer jusqu'à vingt ans après l'infection initiale. [21]

- *Plasmodium knowlesi* : Espèce infectant initialement les primates non-humains, retrouvée en Asie du Sud-Est, particulièrement à Bornéo, en Malaisie et en Indonésie. Elle peut être transmise à l'Homme seulement lorsque les moustiques se nourrissent auprès de macaques (macaque à longue queue *Macaca fascicularis* ou macaque à queue de cochon *Macaca nemestrina*) et une transmission interhumaine par le biais de moustiques est impossible. Sur le plan clinique, elle se manifeste par des fièvres, frissons et maux de tête mais peut également évoluer en complications sévères avec notamment l'apparition d'hypotension ou de détresse respiratoire. Dans 8% des cas un paludisme sévère est observé avec un taux de mortalité s'élevant à 3%.[21]

- *Plasmodium falciparum* : Espèce la plus dangereuse responsable de la quasi-totalité des cas de morbi-mortalité en Afrique sub-saharienne. Elle provoque le paludisme sévère et cause de multiples décès, spécialement chez les enfants de moins de cinq ans. Après infection des globules rouges, elle est capable de modifier leur surface pour la rendre adhérente. Ainsi, l'érythrocyte infecté peut se lier avec l'endothélium des vaisseaux sanguins, les plaquettes ou des érythrocytes non infectés. Cet état de cytoadhérence est atteint grâce à la protéine 1 de la membrane érythrocytaire du parasite, PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1), provenant de la transcription des gènes var. Cette protéine se lie également à des molécules placentaires telles que le sulfate de chondroïtine (CSA), induisant l'accumulation de globules rouges parasités dans le placenta. Cela est à l'origine de conséquences pathologiques lors de la grossesse tels que l'anémie maternelle, l'hypertension artérielle, la mortinatalité et le faible poids à la naissance. *P. falciparum* est aussi la cause du paludisme cérébral, ou neuropaludisme, lors de l'adhésion des érythrocytes infectés à l'endothélium. Ceci perturbe le flux sanguin dans les capillaires du cerveau, particulièrement chez les enfants de moins de cinq ans dans les régions d'endémie ou à tout âge dans les régions à faible endémie, pouvant amener rapidement à la mort du patient.[10,21,23]

En plus de ces infections uniques chez l'Homme, il existe aussi des co-infections, notamment à *P. falciparum* et *P. vivax* simultanément dans les régions où ces deux espèces sont prédominantes. Cependant, *P. falciparum* reste l'espèce la plus redoutable. Elle concentre la majorité des efforts engagés en recherche et développement et reste au cœur de toutes les préoccupations. C'est la raison pour laquelle mon projet de thèse s'articule autour de la conception de nouveaux composés antipaludiques contre *P. falciparum*. Toutefois, toutes les molécules actives sur *P. falciparum* le sont également sur les autres espèces plasmodiales.

1.2.3. Cycle biologique de *P. falciparum*

La phase hépatocytaire

Le cycle de vie de *P. falciparum*, très complexe, s'articule entre deux hôtes : le moustique *Anopheles* et l'Homme (*Figure 3*). L'infection humaine débute par une piqûre du moustique *Anopheles* femelle infecté par *P. falciparum*, qui stocke dans ses glandes salivaires des sporozoïtes, forme infectieuse et mobile de *Plasmodium*, ainsi que des substances anticoagulantes. Ainsi, durant un repas sanguin, il injecte aisément à l'Homme des sporozoïtes grâce aux anticoagulants fluidifiant le sang. Ces sporozoïtes traversent ensuite la peau et la circulation sanguine en franchissant différentes barrières cellulaires avant d'arriver dans les hépatocytes, notamment les fibroblastes dermiques, les cellules endothéliales, les cellules endothéliales sinusoïdales hépatocytaires (liver sinusoidal endothelial cells LSEC) et les cellules de Kupffer (KC), macrophages résidants dans le foie. Ils sont alors en mode « migratoire » durant leur traversée transcellulaire d'une durée de 30 à 60 minutes mais seule une minorité échappent aux effecteurs du système immunitaire rencontrés. En effet, certains restent bloqués dans les cellules de la peau, d'autres ne parviennent pas à franchir la barrière sinusoïdale du foie, d'autres encore sont phagocytés par les KC. Finalement, les sporozoïtes restants perforent les membranes plasmiques des hépatocytes pour y pénétrer, traversent ceux-ci puis en ressortent avant d'en infecter un dernier de manière active par l'intermédiaire d'une jonction mobile. Le rôle de la jonction mobile, au moment où les membranes de la cellule hôte et du parasite sont à proximité l'une de l'autre, est de propulser le parasite vers l'intérieur de la cellule grâce à son moteur actine-myosine, formant une vacuole parasitophore. La vacuole parasitophore est un compartiment membranaire spécialisé à l'intérieur duquel le parasite se développe et se multiplie jusqu'à former des schizontes contenant des mérozoïtes. Sa membrane provient de la membrane de la cellule hépatique ayant été remodelée par l'élimination sélective de protéines membranaires de l'hôte.[24,25]

L'ensemble de ces deux étapes, traversée transcellulaire et invasion active, est principalement dû aux diverses sécrétions des micronèmes du complexe apical dans le temps. Premièrement, les micronèmes libèrent des protéines engagées dans la motilité de glissement, telles que les TRAP (*Thrombospondin Related Anonymous Protein*), et de rupture des membranes comme la PLP-1. Ensuite, l'internalisation du sporozoïte est le résultat de la sécrétion de protéines 6-cys, P36 et P52, qui interagissent directement avec les récepteurs CD81 (Tetraspanin) et SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B Type 1*) de l'hôte. Cette interaction est responsable de l'activation des rhoptries qui délivrent à leur tour les protéines RON. Pour finir, celles-ci sont exportées au sein de la cellule hôte et s'assemblent avec les récepteurs AMA1 (*Apical Membrane Antigen-1*) du parasite, créant ainsi la jonction mobile puis la vacuole parasitophore. Cependant, la formation de cette dernière est un évènement asynchrone et rapide, d'une durée de quelques dizaines de secondes, et reste donc difficile à étudier.[1,24,25]

A l'intérieur de la vacuole parasitophore, le sporozoïte se développe et se multiplie jusqu'à donner des milliers de mérozoïtes contenus dans un schizonte. Chez *P. falciparum*, ce cycle de réplication dure 7 jours et est dit pré-érythrocytaire. Il est appelé schizogonie hépatique et est asexué et asymptomatique. Pour finir, la vacuole est lysée et relargue les mérozoïtes dans les sinusoïdes hépatiques qui atteignent rapidement la circulation générale.[1,24,25]

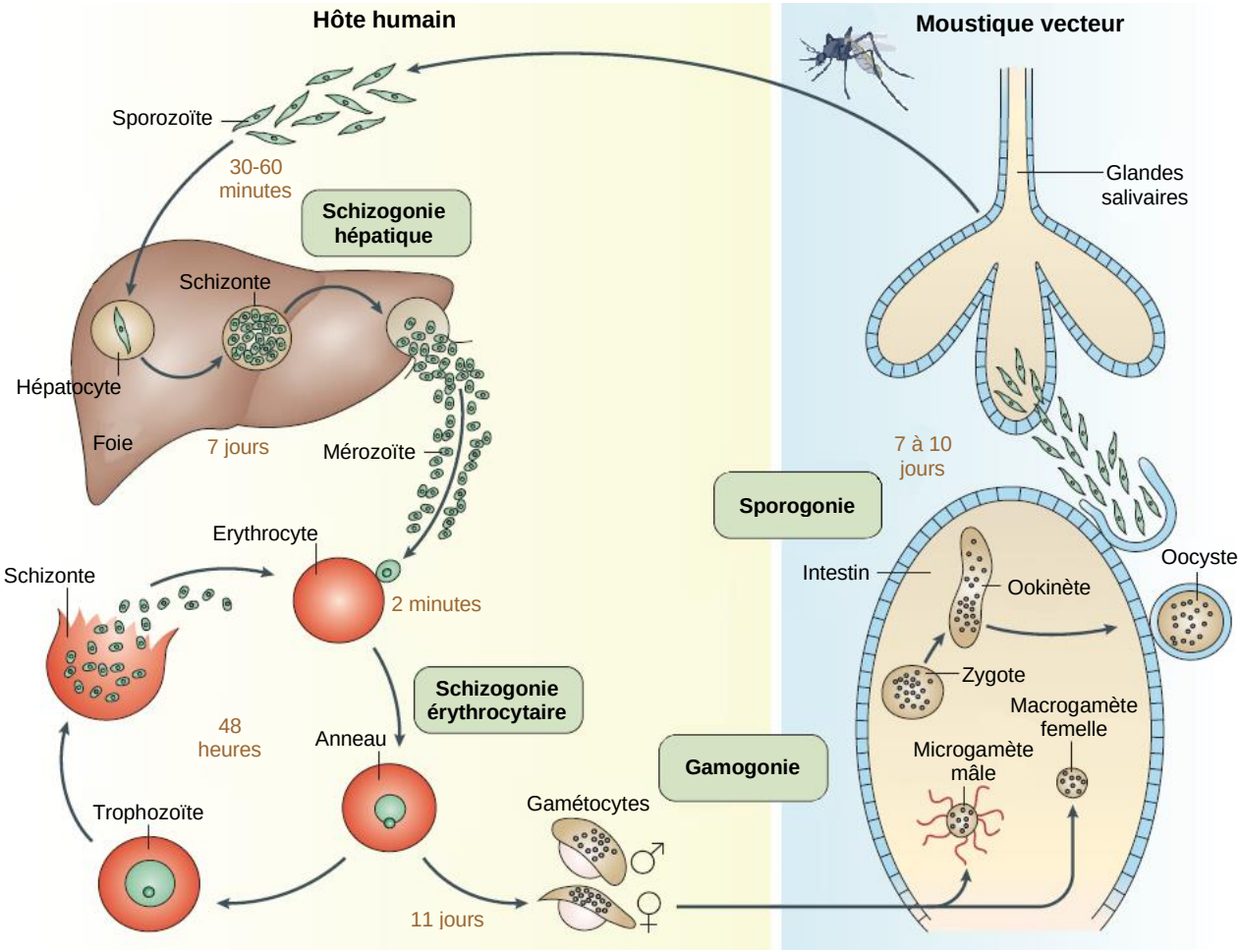


Figure 3. Schéma du cycle de vie de *P. falciparum*, adapté de Phillips 2017.[10]

Le cycle érythrocytaire

Une fois dans la circulation sanguine, les mérozoïtes pénètrent dans les érythrocytes et entament un cycle intraérythocytaire d'une durée totale de 48h (*Figure 3*). La première étape, l'étape d'invasion, est dépendante de la motilité du parasite et est caractérisée par la pré-invasion, l'invasion active et l'échinocytose. Il s'agit d'une étape rapide et dynamique de seulement deux minutes. Dans un premier temps, les mérozoïtes sont exposés à de faibles concentrations d'ions potassium dans le plasma sanguin, ce qui active la voie médiée par la phospholipase C (PLC) et produit une libération d'ions calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme (*Figure 4a*). Le calcium est un messager secondaire crucial impliqué dans diverses voies de signalisation. Ici, l'augmentation du taux de calcium cytosolique est à l'origine de la libération des protéines micronèmes telles que l'antigène-175 de liaison aux érythrocytes (EBA175) et l'antigène-1 de la membrane apicale (AMA-1) à la surface des mérozoïtes. Par la suite, l'EBA175 interagit avec son récepteur sur les érythrocytes, la glycophorine A (glyA), ce qui rétablit les niveaux basaux de calcium intracellulaire et déclenche la sécrétion des protéines rhoptries RON2, RON4, RON5 et RON8 sous forme de complexe (*Figure 4b*).[1,17,26] Dans le même temps, cette interaction renforce la proximité entre les membranes du mérozoïte et de l'érythrocyte, engendrant une déformation des deux partenaires. Cette déformation induit la motilité et la réorientation du mérozoïte qui, de ce fait, est en contact avec la membrane de l'érythrocyte par son extrémité apicale.[27]

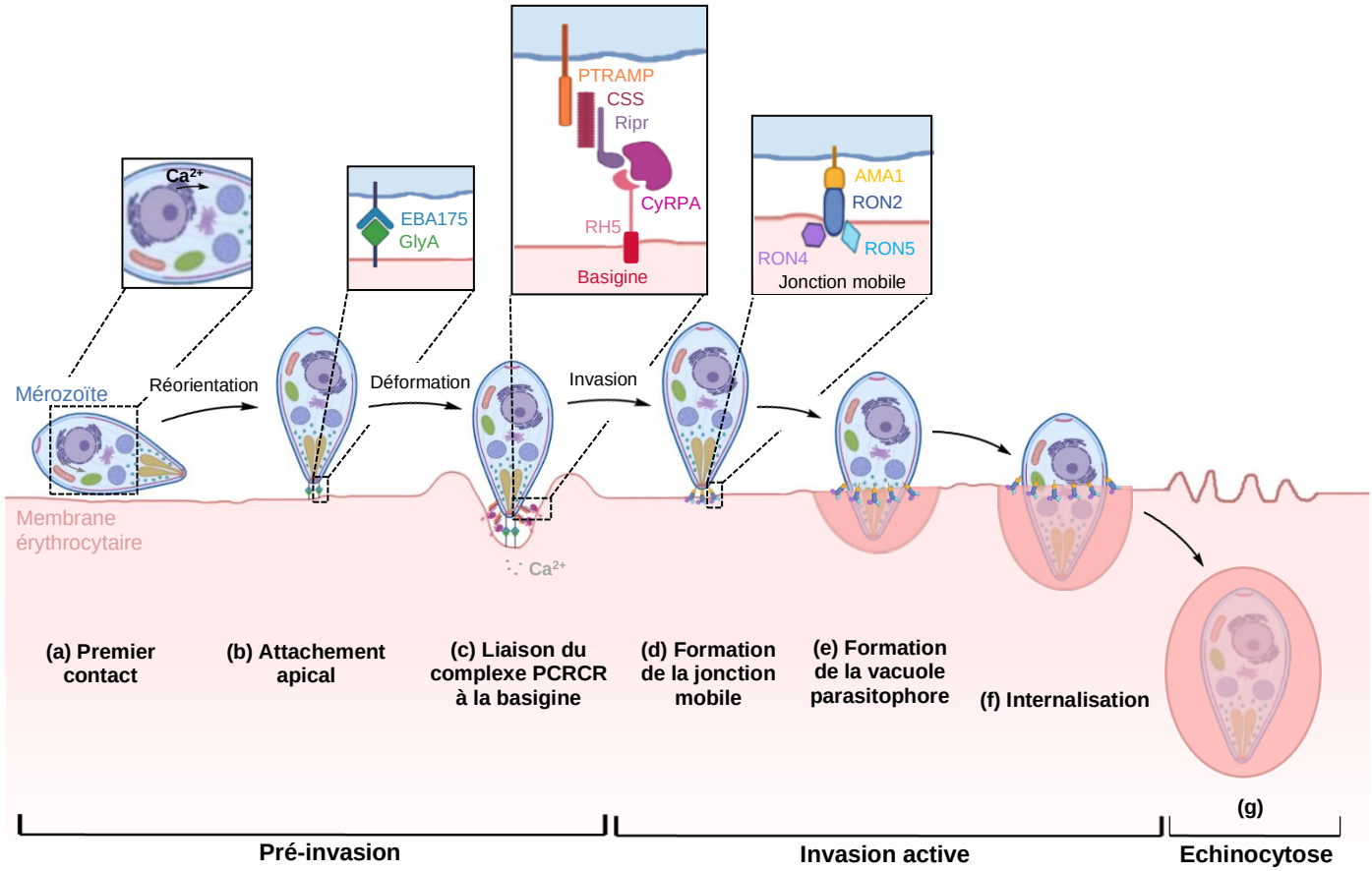


Figure 4. Schéma de l'invasion érythrocytaire par un mérozoïte, inspiré de Cowman 2016, Scally 2022, Volz 2016 et Frénal 2013.[1,17,27,29] (**a**) L'entrée des mérozoïtes dans la circulation générale déclenche une augmentation du taux de Ca^{2+} cytosolique qui entraîne la libération des protéines micronèmes EBA175 et AMA-1. (**b**) EBA175 interagit à la surface du mérozoïte avec la glycophorine A (glyA), son récepteur sur l'érythrocyte. Cela déclenche la sécrétion des protéines rhoptries RON, la réorientation du mérozoïte et une déformation des deux partenaires. (**c**) L'interaction irréversible entre le complexe PCRCR et la Basigine par l'intermédiaire de la liaison PfRh5-Basigine entraîne la formation d'un pore permettant l'entrée d'ions Ca^{2+} et des protéines RON dans la cellule hôte. (**d**) RON2 se lie AMA-1, créant la jonction mobile significative de l'invasion active. (**e**) Les membranes du mérozoïte et de l'érythrocyte se fusionnent, donnant naissance à la vacuole parasitophore à l'intérieur de laquelle (**f**) le mérozoïte est propulsé. (**g**) Finalement, une période d'échinocytose se produit avant que l'érythrocyte ne reprenne sa forme initiale.

A ce stade, une interaction irréversible se forme entre la protéine homologue de type réticulocyte 5 (PfRh5) du parasite et la Basigine, son récepteur chez l'hôte. PfRh5, initialement localisée dans les rhoptries avant sa sécrétion, est protégée au sein d'un complexe pentamérique stable permettant son ancrage à la surface du mérozoïte et facilitant son interaction avec la Basigine. En effet, PfRh5 ne comportant pas de domaine transmembranaire, se lie avec d'autres protéines parasitaires, PfRipr (protéine interagissant avec le Rh5) et PfCyRPA (antigène protecteur riche en cystéine) issues des micronèmes, mais également avec PfCSS (petite protéine sécrétée riche en cystéine) et PfPTRAMP (protéine apicale du mérozoïte liée à la thrombospondine). PfCSS est connue pour contribuer aux interactions protéine-protéine extracellulaires, tandis que PfPTRAMP comporte un domaine transmembranaire permettant l'ancrage du complexe final à la surface du parasite. PfCSS et PfPTRAMP forment ensemble un hétérodimère à l'intérieur du réticulum endoplasmique où elles sont localisées avant d'être acheminées vers les micronèmes. A l'intérieur de ceux-ci, elles interagissent avec PfRipr et PfCyRPA pour former un complexe tétramérique. Finalement, lors de la sécrétion des micronèmes puis des rhoptries, celui-ci rencontre PfRh5 et il en résulte la formation du complexe pentamérique PCRCR au niveau de la surface apicale du mérozoïte. Ainsi, la plateforme stable

établie par le complexe PCRCR permet l'interaction irréversible entre l'extrémité apicale du mérozoïte et l'érythrocyte par l'intermédiaire de la liaison PfRh5-Basigine (*Figure 4c*).[1,27–29] Ce point d'ancrage, liant les membranes entre elles de manière robuste, entraîne la formation d'un pore permettant l'entrée d'ions calcium et des protéines RON dans la cellule hôte. Il est à noter que la formation du pore est peu décrite et peut s'effectuer de manière directe ou indirecte suite à la liaison PfRh5-Basigine.[1,27,29]

Par conséquent, le complexe de protéines RON migre au sein de l'érythrocyte au-delà de sa membrane plasmique, puis, par le biais de RON2, se lie à AMA-1 restée insérée dans la membrane plasmique du mérozoïte. Cela crée la jonction mobile significative de l'invasion active (*Figure 4d*).[1,17] Ensuite, la fusion des membranes constitue la vacuole parasitophore et le mérozoïte est propulsé à l'intérieur grâce à son système actine-myosine (*Figure 4e et 4f*). Une période d'échinocytose se produit, provoquant un rétrécissement de l'érythrocyte et la formation d'aspérités en forme de pointes probablement dû à l'entrée de calcium lors de l'interaction PfRh5-Basigine (*Figure 4g*). Après cela, l'érythrocyte infecté reprend sa forme initiale.[1,29]

Au cours des 48h suivantes, *P. falciparum* se réplique au sein de la vacuole parasitophore de manière exponentielle en passant par les stades anneau, trophozoïte et schizonte. Cette réplication asexuée, appelée schizogonie érythrocytaire, est synchrone au niveau de tous les érythrocytes infectés et donne naissance à 16-32 nouveaux mérozoïtes contenus dans les schizontes. Ces derniers s'échappent rapidement, provoquant la lyse de la membrane érythrocytaire suivie de leur internalisation dans d'autres globules rouges sains.[1,18] La lyse des érythrocytes est en grande partie responsable de la symptomatologie de la maladie qui est due au relargage d'hémozoïne et d'ADN parasitaire dans la circulation sanguine. En effet, pour assurer ses fonctions vitales, le parasite digère l'hémoglobine de la cellule hôte au sein de sa vacuole digestive. La digestion libère, d'une part, les acides aminés nécessaires pour son développement et, d'autre part, l'hème. L'hème est oxydé en ferriprotoporphyrine IX (FPIX) ou hématine, résidu toxique qui est alors polymérisé en hémozoïne et stocké dans la vacuole digestive. L'hémozoïne, également appelée pigment malarique, est un cristal insoluble de couleur noire en microscopie optique caractéristique de *Plasmodium*. Lors de la lyse de la cellule hôte, elle est relarguée dans la circulation générale et cause l'apparition de la fièvre du fait de ses propriétés pyrogènes. En outre, *Plasmodium* nécessite également des nutriments indispensables pour sa survie dont il régule la concentration par le biais de transporteurs. Par exemple, le fer est essentiel mais peut devenir toxique s'il est libéré de manière excessive. Le taux de fer est alors régulé par les transporteurs de fer vacuolaires (VIT). En plus de cela, une ATPase de type P (PfATP4) permet le maintien de l'homéostasie du sodium suite à une accumulation néfaste de celui-ci lors de l'absorption des nutriments comme le fer. Enfin, de nombreuses protéines kinases sont impliquées lors du relargage des mérozoïtes, notamment la kinase phosphatidylinositol 4 (PfPI4K) qui permet le remodelage de la membrane plasmique pour former les membranes des mérozoïtes filles.[20]

Pour finir, une petite fraction des mérozoïtes ne suit pas ce schéma de phase asexuée et est séquestrée dans la moelle osseuse où démarre la gamétocytogénèse. Durant cette phase de onze jours, les mérozoïtes se différencient en gamétocytes mâles et femelles. Par la suite, ceux-ci se concentrent au niveau des capillaires de la peau et seront absorbés par un moustique *Anopheles* femelle sain au cours d'un nouveau repas sanguin (*Figure 3*).[1,20]

La dernière étape chez l'*Anopheles*

La différenciation en gamétocytes mâles et femelles, dont le régulateur principal est le facteur de transcription AP2-G, initie la gamogonie correspondant à la phase sexuée du cycle (*Figure 3*). En quittant les capillaires de la peau et en entrant dans l'intestin du moustique, les gamétocytes subissent des changements environnementaux comme la baisse de température d'environ 5°C, une augmentation du pH extracellulaire de 7,2 à 8 et la présence d'acide xanthurénique, sous-produit du métabolisme du tryptophane. L'acide xanthurénique est à l'origine de l'augmentation du taux de calcium cytosolique suivie d'une nouvelle différenciation.[30] Huit microgamètes sont produits après un phénomène d'exflagellation du gamétocyte mâle, tandis que le gamétocyte femelle se transforme en un macrogamète. Le microgamète mâle, flagellé et mobile, féconde le macrogamète femelle via une reproduction sexuée, aboutissant à la formation d'un ookinète. Cet œuf mobile se fixe à la paroi externe de l'estomac du moustique, où il se développe en oocyste qui, après plusieurs cycles de réplication, donne naissance à des milliers de sporozoïtes, étape appelée sporogonie. C'est lors de l'éclatement de l'oocyste que les sporozoïtes sont libérés et migrent de l'abdomen du moustique vers les glandes salivaires où ils pourront de nouveau être transmis à l'Homme lors d'un repas sanguin ultérieur. Cette dernière étape a une durée comprise entre 7 et 10 jours.[20]

1.2.4. Symptomatologie du paludisme à *P. falciparum*

Le paludisme peut se présenter sous différentes formes. Il peut être asymptomatique, c'est-à-dire que le patient comporte des parasites circulants mais pas de symptômes. Mais il peut également être non compliqué ou sévère. L'accès palustre simple, ou non compliqué, est la forme de paludisme la plus courante et la moins alarmante. Elle touche principalement les voyageurs au retour d'une zone d'endémie. Elle survient après 7 à 10 jours suite à la piqure du moustique anophèle, temps correspondant à la phase hépatocytaire asymptomatique, et se manifeste par un syndrome pseudo-grippal avec de la fièvre, des frissons et des sueurs. A ce stade, la fièvre est continue car la croissance des parasites dans les érythrocytes est asynchrone donc la lyse de ceux-ci, à l'origine de la fièvre, est aussi continue. Le patient peut facilement être soigné en prenant un traitement antipaludique adapté, généralement par voie orale. Cependant, sans traitement, la maladie peut évoluer vers une phase appelée phase d'état, caractérisée par une fièvre tierce. Cela signifie que l'apparition de la fièvre suit la schizogonie érythrocytaire de *P. falciparum* alors que la croissance des parasites est maintenant synchrone. Ainsi, toutes les 48h lors de la lyse des érythrocytes, elle peut atteindre 40 à 41°C tout en étant accompagnée de frissons. Ensuite, la température corporelle chute brusquement provoquant une transpiration abondante et une fatigue extrême. Le patient peut également subir des maux de tête, nausées ou vomissements. Cette forme de paludisme n'est pas inquiétante mais peut évoluer vers une forme grave ou même mortelle si le patient n'est pas pris en charge rapidement.[31,32] De plus, si les symptômes persistent malgré un traitement complet, cela traduit une résistance aux médicaments ou une nouvelle infection. Il est également intéressant de noter que des infections ultérieures peuvent apparaître dans les cas de paludisme à *P. vivax* et *P. ovale* du fait de la réactivation des hypnozoïtes sous forme dormante dans le foie.[1]

L'accès palustre sévère apparaît lorsque l'infection initiale est mal traitée ou non traitée à temps. Il est le plus souvent provoqué par *P. falciparum* et les premiers signes sont notamment la somnolence, la baisse de la vigilance ou une hypotension.[1,31] Différents critères de gravité établis par l'OMS y sont associés tels qu'une parasitémie supérieure à 4% et des défaillances neurologiques (obnubilation, confusion…), respiratoire, hépatique, cardiovasculaire, rénale ou encore hématologique. Ces difficultés varient en fonction de l'âge du patient et apparaissent souvent au cours d'une primo-infection. En effet, dans les zones d'endémie stables, les jeunes enfants sont plus enclins à la gravité et à la mortalité de la maladie, tandis que les adultes ont développé une immunité naturelle. Cette immunité, appelée état de prémunition, est acquise progressivement après 2 à 5 ans d'exposition à la maladie de manière fréquente et répétée, exposant les sujets à des taux très faibles de parasitémie sans symptômes majeurs. Mais elle disparaît en quelques mois si l'individu quitte la région d'endémie.[10,33] La mortalité engendrée par ce type d'accès palustre atteint avant tout les enfants de moins de cinq ans en Afrique et se caractérise par trois syndromes : une anémie grave, un paludisme cérébral et/ou une détresse respiratoire. Le paludisme cérébral, ou neuropaludisme, représente la complication majeure causée par l'obstruction des capillaires vascularisés du cerveau par les érythrocytes infectés et provoquant un coma. La détresse respiratoire provient souvent d'un œdème pulmonaire. Pour soigner ce type de paludisme, un traitement injecté par voie parentérale est le plus approprié.[1,20,34]

1.2.5. Les méthodes de diagnostic

Le diagnostic du paludisme est mis en place dès l'apparition de fièvre en raison de la gravité potentielle de l'infection et les résultats doivent être rendus impérativement dans un délai de 4h suivant le prélèvement. Pour cela, un protocole standard est établi permettant de détecter la présence ou non de *Plasmodium* dans les globules rouges, déterminer son espèce et évaluer le taux de parasitémie.[34]

La première étape est la réalisation d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse pour une observation au microscope. La goutte épaisse est une technique consistant à étaler sur une lame une goutte de 5 à 10 µL de sang, précédemment recueillie en présence d'un anticoagulant tel que l'EDTA. La lame est ensuite séchée puis les hématies sont lysées et colorées au Giemsa. Cette technique permet une concentration du sang total et l'observation de la lame met rapidement en évidence la présence ou l'absence de parasites, même dans les cas où la parasitémie est faible. Cependant, elle permet difficilement l'identification de l'espèce et c'est pour cette raison qu'elle est toujours accompagnée d'un frottis sanguin (*Figure 5*). Un frottis sanguin est un étalement d'une goutte de 2 à 3 µL de sang en présence d'un anticoagulant suivie d'une fixation et d'une coloration au méthanol-Giemsa. Son observation au microscope permet l'identification de l'espèce ou des espèces présentes et la détermination du pourcentage de parasitémie. Les sensibilités respectives de ces deux méthodes sont de 15 et 150 globules rouges parasités/µL de sang.[20,31]

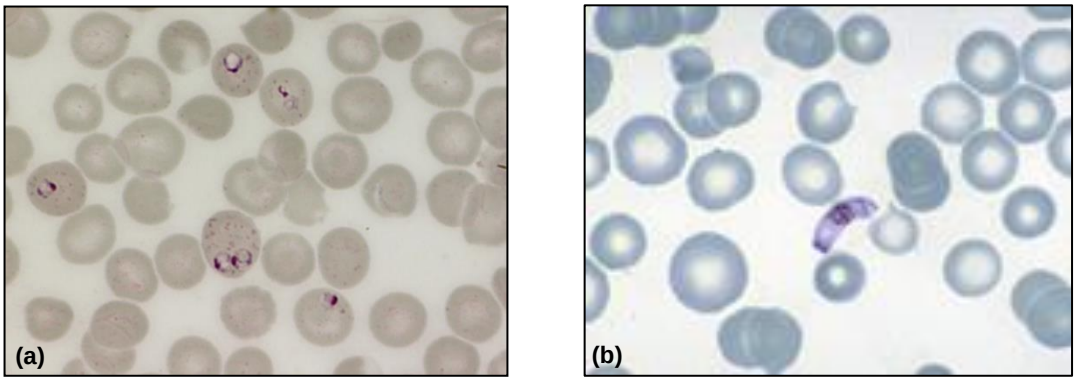


Figure 5. Frottis d'un patient infecté par *P. falciparum*. (**a**) Formes trophozoïtes jeunes et hématie polyparasitée (crédit : UFR3S-Pharmacie). (**b**) Gamétocyte caractéristique de *P. falciparum* en forme de croissant ou banane (site eAnofel, http://www.eanofel.fr). Grossissement x1000, coloration de May-Grünwald Giemsa.

Par ailleurs, une autre technique délivrant rapidement un résultat est le test de diagnostic rapide (TDR) révélant la présence d'antigènes parasitaires par immunochrommatographie en moins de 30 minutes, comme la protéine riche en histidine-2 (HRP2) spécifique de *P. falciparum* ou l'enzyme lactate déshydrogénase (pLDH) spécifique de *P. falciparum* ou de *P. vivax* par exemple. Ce test comporte de nombreux avantages tels que sa simplicité d'utilisation, sa spécificité, sa sensibilité (100 à 300 parasites/µl de sang) et sa rapidité, mais il doit toujours être accompagné d'un frottis sanguin pour confirmation et évaluation du taux de parasitémie. De plus, il peut donner lieu à de faux positifs du fait de la persistance de la protéine HRP2 jusqu'à un mois après la disparition de *P. falciparum*, ou de faux négatifs lorsque les parasites n'expriment plus l'antigène d'intérêt ou que HRP2 a muté. Ce dernier cas est de plus en plus courant, notamment en Afrique. Le TDR est utilisé seul uniquement dans les pays endémiques lorsque l'examen microscopique est impossible.[10,20,31]

Enfin, les méthodes de PCR, très sensibles (0,005 à 1 parasite/µL), sont employées pour détecter la présence parasitaire chez des patients asymptomatiques et également lors de difficultés à poser un diagnostic. Cependant, au vu de la sensibilité importante, de très faibles taux de parasitémie peuvent être détectés et cela peut donner lieu à de faux positifs. De plus, comme pour la technique précédente, l'ADN parasitaire peut persister jusqu'à un mois dans l'organisme, ce qui ne permet pas de suivre un patient et de contrôler l'efficacité de son traitement par exemple. A l'inverse, son avantage est sa valeur prédictive négative de 100%, c'est-à-dire qu'un résultat négatif est obligatoirement synonyme d'absence de parasites. En revanche, alors que certaines méthodes de PCR sont incompatibles pour un diagnostic rapide car trop lentes et couteuses, d'autres ont un délai d'exécution inférieur à 1h. C'est notamment le cas de la LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), une technique d'amplification de l'ADN permettant de mettre en évidence l'ADN plasmodial dans le sang, même avec un faible taux de parasitémie (0,12 parasite/µL pour *P. vivax* à 2 parasites/µL pour *P. falciparum*). Elle est rapide, peu couteuse et apporte un résultat en 40 minutes.[20,31]

1.3. Les stratégies prophylactiques et thérapeutiques

1.3.1. Les méthodes de prophylaxie antipaludique

Divers moyens sont mis en œuvre pour la prévention de l'infection à *P. falciparum* : la lutte antivectorielle, la chimioprophylaxie et la vaccination.

La lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle a pour objectif de limiter les risques de piqûres par les moustiques vecteurs *Anopheles* en empêchant leur approche. Elle est indispensable à mettre en place pour tous les habitants ou voyageurs se trouvant dans les régions concernées par la transmission du paludisme. La technique la plus efficace est l'usage de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) grâce à la barrière physique et la barrière chimique qu'elles procurent. Les moustiques *Anopheles* piquant généralement leurs hôtes en soirée et dans la nuit, elles sont à disposer au niveau du couchage durant le sommeil et pendant les heures d'éveil des nourrissons qui ne marchent pas encore. En 2022, 70% des ménages d'Afrique subsaharienne disposaient d'une MII et 56% des enfants de moins cinq ans dormaient sous l'une d'entre elles. Les MII recommandées sont celles à mailles fines mais robuste et qui sont résistantes au lavage. Grâce à ce type de protection, le moustique est attiré par son hôte localisé sous la moustiquaire, s'en approche, mais meurt rapidement sous l'effet de l'insecticide contenu sur celle-ci. Les insecticides couramment employés sont à base de pyréthrinoïdes, cependant, l'apparition de résistances chez l'*Anopheles* oblige l'usage de pyréthrinoïdes en association avec un autre principe actif, tel que le chlorfénapyr ou le pyriproxyfène (régulateur de croissance). De nouveaux insecticides ont également fait leur apparition, mais ils sont trop onéreux pour une application sur moustiquaires et l'alternative est alors de les commercialiser sous forme de sprays à pulvériser à l'intérieur des habitations. Deux tiers des cas de paludisme ont été évités grâce à l'usage des MII et des pulvérisations d'insecticides dans les domiciles en Afrique entre 2000 et 2015. L'efficacité des MII est estimée à 45% contre les accès palustres simples, 44% contre les accès palustres sévères et 17% contre la mortalité chez les enfants âgés de moins de cinq ans dans les zones où la transmission est importante. En revanche, un mauvais entretien, une utilisation inappropriée, par exemple comme filets de pêche, ou les changements de comportements des moustiques qui commencent à piquer en journée, amoindrissent l'efficacité de ces MII.[10,31,34–36]

Une deuxième méthode de lutte antivectorielle est l'emploi de répulsifs antimoustiques à appliquer sur les parties du corps non recouvertes par des vêtements. Les répulsifs au DEET (*N*,*N*-diéthyl-m-toluamide) et à l'IR3535 (*N*-acétyl-*N*-butyl-β-alaninate d'éthyle) comportent tous d'eux une autorisation de mise sur le marché pour cette indication. Bien que plus irritant, le DEET est le plus utilisé. En revanche, aucun des deux n'est recommandé chez la femme enceinte et ceux sont alors ceux à base d'icaridine qui sont employés au cours de la grossesse. Les répulsifs constituent finalement la technique la plus répandue du fait de leur simplicité d'utilisation et de leur faible coût. [31,36]

Enfin, des serpentins anti-moustiques à la citronnelle peuvent être apposés en extérieur pendant de courtes périodes dans le but d'éloigner les vecteurs, seulement en complément des autres méthodes. Il en est de même pour les diffuseurs d'insecticides intérieurs. En effet, leur efficacité n'a

pas été démontrée mais ils pourraient apporter une protection supplémentaire.[31] A l'inverse, les bracelets imbibés de répulsifs, les émetteurs d'ultrasons, les huiles essentielles, la vitaminothérapie et les remèdes homéopathiques sont fortement déconseillés dans les régions endémiques.

Sur le plan de la prophylaxie générale, les autres idées seraient de détruire les zones de reproduction des moustiques, par exemple en asséchant les marais, d'appliquer des larvicides sur les plans d'eau pour la destruction des larves d'*Anopheles*, ou alors d'administrer des endectocides.[10,36] Il s'agit de médicaments qui tuent ou réduisent la durée de vie des moustiques après leur repas sanguin chez l'individu traité. C'est par exemple le cas de l'ivermectine qui est encore à l'essai.[37] Le problème de cette dernière approche est qu'elle repose sur la prise d'un médicament par un individu chez qui il n'y a aucun avantage direct. Par ailleurs, des outils de génie génétique sont employés pour rendre les mâles stériles avant de les relâcher en grand nombre dans la nature afin de réduire la fécondation des femelles et donc les pontes, mais ces approches prometteuses sont encore à un stade précoce.[10,36]

La chimioprophylaxie

La chimioprophylaxie consiste à la prise temporaire d'un traitement de prévention pour diminuer le risque d'infection à *P. falciparum*. Elle est indiquée pour les voyageurs qui se rendent en zone endémique, dans le cas de campagnes de chimioprévention du paludisme saisonnier, ou de manière épisodique pour les enfants et femmes enceintes. L'ensemble des structures et modes d'actions des molécules employées sont décrits en paragraphe 1.3.3. Il est à noter qu'une prescription de chimioprophylaxie est nécessairement accompagnée d'un ou plusieurs moyens de luttes antivectorielle énumérés précédemment.[10,22,31]

Dans le cas des voyageurs, la prise du médicament a lieu durant toute la durée d'exposition au parasite seulement si le risque de contracter le paludisme est élevé. Elle est mise en place si la durée du voyage excède un mois, sauf pour l'Afrique sub-saharienne et le Yémen, ou lors de séjours courts mais fréquents, pour les pilotes ou stewards par exemple, et est soumise à une prescription médicale mais n'est pas remboursée par la sécurité sociale. Le choix du médicament, qui peut être une molécule seule ou une association de molécules, dépend de la zone de voyage, de la saison, de sa durée mais aussi du voyageur (âge, poids, antécédents, grossesse...) et du médicament lui-même (contrainte de prise, coût financier...). Il existe actuellement trois possibilités d'antipaludiques pour la chimioprévention. L'atovaquone-proguanil (de nom commercial Malarone® et autres génériques) est particulièrement adapté pour les séjours de courte durée. Sa posologie est quotidienne, débutant le premier jour du voyage et ce jusqu'à sept jours après le retour. Il a l'avantage de présenter peu d'effets indésirables. La doxycycline (Doxypalu®) est prise quotidiennement à partir du jour du départ jusqu'à quatre semaines après le retour de la région d'endémie. Il s'agit d'un composé photosensible donc toute exposition au soleil ou aux rayons UV est à éviter pendant la durée du traitement alors que les zones à risque sont le plus souvent fortement ensoleillées. L'utilisation d'une crème solaire et la prise en fin de journée limitent ces effets secondaires. Néanmoins, malgré ces contraintes, elle est moins onéreuse et est donc privilégiée pour les voyageurs disposant d'un budget limité. Pour finir, la méfloquine (Lariam®) est un médicament très efficace mais son utilisation est à limiter à cause des troubles neuropsychiatriques qu'elle engendre, principalement caractérisés par des hallucinations, de l'anxiété aigue, une dépression et une envie de suicide. Sa prise est donc restreinte dans le cas de

séjours prolongés du fait de sa posologie hebdomadaire débutant dix jours avant le départ et continuant jusqu'à trois semaines après le retour. Bien que présentant un effet indésirable notable, l'apparition de celui-ci est très faible et concerne moins de 12 cas parmi 10 000 traitements. Enfin, pour les femmes enceintes, il est fortement recommandé de reporter le voyage. Si cela est impossible, la prise de méfloquine ou d'atovaquone-proguanil peut être envisagée mais leurs effets sur la grossesse sont peu connus.[10,22,31]

La chimioprophylaxie fait également référence aux campagnes saisonnières de prévention du paludisme en région d'endémie, avant tout pour les enfants de moins de cinq ans. Par exemple, dans la région du Sahel située au sud du désert du Sahara, les pluies saisonnières sont propices à la prolifération des moustiques et représentent alors une menace récurrente de paludisme. L'administration de sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar® ou Paludar®) avec de l'amodiaquine une fois par mois durant 3 à 5 mois consécutifs a permis une réduction de 80% des cas de paludisme chez les enfants avec une diminution de 50% de la mortalité. Le traitement peut être prolongé jusqu'à un mois et demi après la fin des pluies. Cependant, une fois le traitement interrompu à cause de l'atteinte de la limite d'âge (5 ans), de difficultés économiques ou de l'apparition de souches résistantes par exemple, les enfants peuvent perdre leur immunité. L'OMS recommande donc d'employer en prophylaxie des médicaments différents de ceux administrés en première ligne, et, depuis 2022, préconise aussi les traitements préventifs aux enfants âgés de 5 à 15 ans et à ceux sortant d'une hospitalisation. Effectivement, les enfants admis à l'hôpital avec une anémie sévère présentent un risque élevé de paludisme grave ou de décès post-hospitalisation. Toutefois, la prise d'un traitement de chimioprévention pendant 4 semaines à 3 mois après la sortie de l'hôpital a montré une diminution de 77% de la mortalité et de 68% des réadmissions pour paludisme sévère. L'administration de sulfadoxine-pyriméthamine à intervalles réguliers est également conseillée pour la protection des femmes enceintes dans les régions d'endémie, pour lesquelles l'infection présente des risques à la fois pour elles-mêmes mais aussi pour le fœtus et le nouveau-né. L'objectif pour elles est de recevoir au moins trois doses au cours des seconds et troisièmes trimestres de grossesse.[4,10,22,31,34] Enfin, une possibilité alternative est l'injection intramusculaire de chimioprotecteurs à durée d'action longue. En effet, ils apporteraient une protection avec seulement 3 à 4 injections par an tout en évitant les oublis potentiels de la prise d'un traitement et ils surpasseraient ainsi les défis quant au développement de vaccins efficaces. La molécule ELQ-331 (prodrogue du ELQ-330) est un candidat actuellement au stade préclinique pour cette approche très récente, tout comme les nanoformulations injectables d'atovaquone.[38,39]

La vaccination

Comme vu précédemment, il est possible d'acquérir une immunité partielle contre le paludisme suite à une exposition fréquente et répétée à *Plasmodium*. Même si celle-ci est perdue progressivement lorsque l'individu quitte la zone de forte transmission, cela reste un espoir quant à la possibilité de vaccination. Actuellement, la stratégie principale pour le développement de vaccins est l'utilisation d'antigènes multiples provenant des différents stades du cycle de vie du parasite. Cibler le stade pré-érythrocytaire bloquerait l'établissement de l'infection au stade sanguin, cibler le stade sanguin asexué préviendrait la morbidité et la mortalité, tandis que cibler le stade sexuel empêcherait la transmission entre le moustique et l'Homme. Ce dernier type de vaccin viserait à protéger la

population sans établir d'effet direct sur la personne vaccinée. L'objectif de l'OMS est d'obtenir un vaccin ayant une efficacité durable d'au moins 75%, protégeant à la fois contre les espèces *P. falciparum* et *P. vivax*.[23,34]

Le premier vaccin antipaludique à avoir été autorisé par l'Agence européenne des médicaments a été le RTS,S/AS01 (Mosquirix®) en 2015, un vaccin antisporozoïte. Il a été développé par GlaxoSmithKline (GSK) et le programme « *Appropriate Technology in Health Malaria Vaccine Initiative* ». Il contient une protéine recombinante correspondant à deux parties de la protéine circumsporozoïte (CSP) de *P. falciparum*, associée à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HbS) et à un adjuvant breveté par GSK (AS01E). Ce dernier est composé d'une fraction de la plante *Quillaja saponaria* ainsi que de monophosphoryl-lipide A (MPL). Quant à la CSP, il s'agit d'un antigène majeur à la surface du sporozoïte, recouvrant celui-ci de manière uniforme et induisant des réponses humorale et cellulaire. Sa synthèse débute dans l'oocyste chez le moustique puis son expression continue tout au long de la schizogonie hépatique. Ainsi, la CSP est indispensable dans la phase pré-érythrocytaire puisqu'elle intervient dans le développement des sporozoïtes dans l'oocyste, dans leur mobilité puis pour leur invasion des glandes salivaires et enfin dans la reconnaissance et l'invasion des hépatocytes. La prise du vaccin provoque alors la production d'anticorps anti-CSP, bloquant l'entrée du parasite dans les hépatocytes. L'OMS recommande RTS,S depuis 2021 pour les enfants âgés de 5 à 17 mois habitant dans les régions de moyenne à haute endémicité. Il est administré par voie intramusculaire suivant une posologie d'injection en quatre doses (M0, M1, M2 et M12). Cela permet une diminution de moitié des cas de paludisme au sein de cette population au cours de la première année, puis l'efficacité décline au cours du temps. Finalement son efficacité est limitée à environ 30%, c'est-à-dire que seulement 30% des enfants vaccinés n'atteignent pas le stade sévère de la maladie. Ceci ne permet pas d'assurer une protection sur le long terme, toutefois, combiner ce vaccin à la chimioprévention apporte une protection supplémentaire de l'ordre de 57,7%.[1,10,23,34–36,40,41]

R21/Matrix-M est le second candidat vaccin le plus avancé, développé par l'université d'Oxford et produit par le *Serum Institute of India*. Il est composé de la même protéine que RTS,S mais cette fois associée à l'adjuvant Matrix-M. Celui-ci, breveté par le laboratoire Novavax, est composé de nanoparticules de saponines, de cholestérol et de phospholipides permettant de stimuler la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Ainsi, comme pour RTS,S, ce vaccin agit sur les sporozoïtes au niveau pré-érythrocytaire. Son schéma vaccinal comprend 3 injections (M0, M1, M2) par voie intramusculaire avant la saison de forte transmission pour les enfants âgés de 5 à 36 mois, puis un rappel un an plus tard. Les essais cliniques de phase IIb réalisés dans les sites où le paludisme est saisonnier ont démontré une protection de 77% à un an après l'administration des trois premières doses, puis la quatrième dose permet de maintenir l'efficacité du vaccin pendant au moins un an supplémentaire. En effet, cette dose permet de rétablir les concentrations élevées en anticorps qui avaient précédemment diminuées. Les premiers résultats de l'essai clinique de phase III vont également dans ce sens. Finalement, R21/Matrix-M, premier vaccin atteignant les contraintes fixées à 75% d'efficacité, a été approuvé par l'OMS en octobre 2023 et est déjà homologué dans trois pays d'Afrique de l'Ouest. Actuellement, son essai de phase III continue afin de collecter des données supplémentaires concernant son innocuité et son efficacité et une production de 100 à 200 millions de doses par an est prévue pour les années à venir, ce qui permettra de largement le distribuer dans les

pays endémiques. Par conséquent, l'antigène CSP s'est révélé prometteur et fait aujourd'hui l'objet d'études pour diverses approches vaccinales. [23,34,35,41–44]

En plus de ces vaccins antisporozoïtes, d'autres sont en cours de développement et/ou d'essais cliniques (*Figure 6*). Certains agissent également au niveau de la phase pré-érythrocytaire, comme les vaccins PfSPZ ou PfSPZ-CVac qui ciblent les hépatocytes infectés en empêchant les sporozoïtes de s'y développer. D'autres bloquent l'invasion des mérozoïtes dans les globules rouges en ciblant EBA175, PhRh5 ou AMA1-RON2. Cependant, une action sur la phase érythrocytaire est difficile à obtenir du fait du temps très court d'entrée des mérozoïtes dans les érythrocytes et de l'augmentation exponentielle du nombre de parasites, bien plus important que dans la phase hépatocytaire. Dans ce dernier cas, le vaccin le plus avancé est Rh5.1/AS01B développé par l'université d'Oxford. En outre, d'autres vaccins exercent leur action sur la phase sexuée du parasite en utilisant par exemple les antigènes Pfs230 et Pfs25, respectivement indispensables dans les phases de pré-fécondation et de post-fécondation. Ici, la vaccination ne protège pas l'individu mais empêche la transmission de la maladie par les moustiques. Cette approche est donc considérée comme une vaccination altruiste. Evidemment, ce type de vaccins ne sera pas prescrits aux voyageurs mais seulement aux habitants des zones à risque. Enfin, le vaccin Primvac® vise à protéger les femmes enceintes et leur fœtus en ciblant la protéine PfEMP1 responsable de l'adhérence des érythrocytes infectés au sulfate de chondroïtine (CSA) placentaire et en empêchant ainsi leur séquestration placentaire.[10,23,41,45]

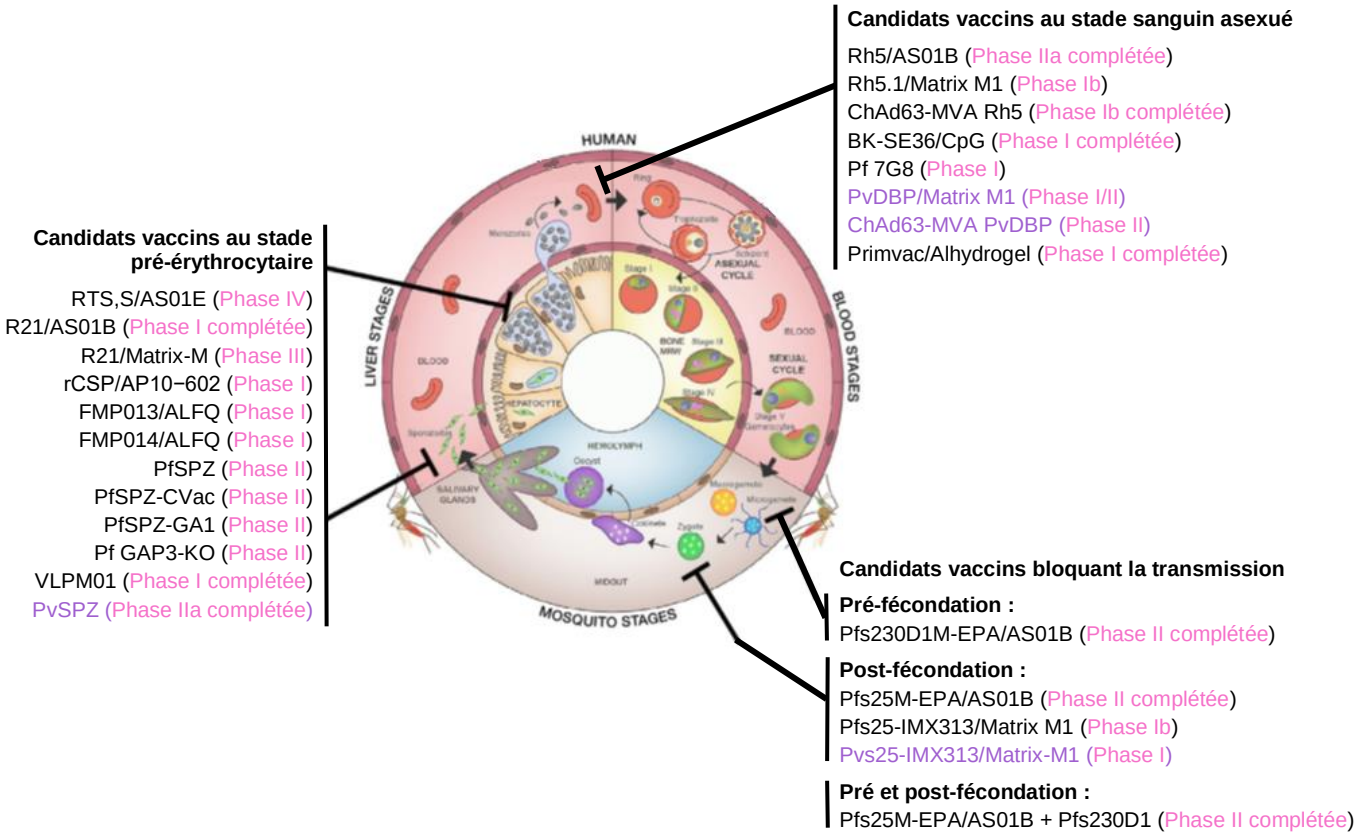


Figure 6. État de l'art des vaccins candidats contre *P. falciparum* en cours de développement clinique (2023). Les vaccins contre *P. vivax* sont colorés en violet. Schéma de Draper 2018 [45] mis à jour avec les données de Rajneesh 2023.[23]

1.3.2. Les thérapies antipaludiques actuelles

Le paludisme pouvant rapidement évoluer vers une forme grave et devenir mortel, les patients diagnostiqués infectés doivent urgemment recevoir un traitement dans le but d'éliminer complétement les parasites présents dans leur sang. Dans le cas de l'accès palustre non compliqué à *P. falciparum*, les thérapies principalement employées sont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA), incluant un dérivé de l'artémisinine et un antipaludique avec un mode d'action différent, qui permettent une élimination rapide des parasites. Elles sont administrées par voie orale en absence de nausées et vomissements. Les six combinaisons disponibles sur le marché et recommandées par l'OMS sont :

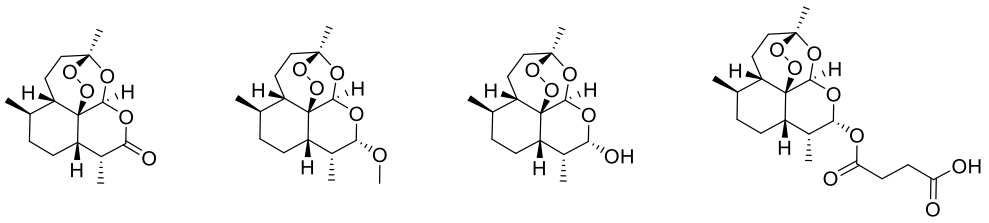
- Artéméther – Luméfantrine (Riamet®)
- Dihydroartémisinine – Pipéraquine (Eurartesim®)
- Artésunate – Amodiaquine (Coarsucam®)
- Artésunate – Méfloquine
- Artésunate – Sulfadoxine – Pyriméthamine
- Artéméther – Pyronaridine (Pyramax®), uniquement pour l'Afrique et l'Asie

Le traitement standard est l'artéméther – luméfantrine qui représente 75% du marché africain. L'artésunate – amodiaquine est utilisé comme choix de seconde intention et constitue 24% de part du marché.[46] En France, la dihydroartémisinine (ou arténimol) – pipéraquine est également employée en traitement de première intention et l'association de seconde ligne est l'atovaquone – proguanil (Malarone®). La méfloquine seule (Lariam®) n'est plus recommandée en raison de son mauvais profil de tolérance, en particulier à cause de ses effets indésirables neuropsychiatriques. Chez les femmes enceintes, les CTA sont déconseillées lors du premier trimestre de grossesse et ce sont donc la quinine (Quinimax® ou Lafran®) en combinaison avec l'antibiotique clindamycine (Dalacine®) qui sont administrées. Il en est de même pour les femmes qui allaitent. Dans tous les cas, une surveillance par frottis sanguin et goutte épaisse doit être réalisée après la prise du traitement aux jours 3, 7 et 28 pour vérifier la diminution puis la disparition totale de la parasitémie.[22,31,36,46]

Par ailleurs, la prise en charge de l'accès palustre sévère constitue une urgence absolue et nécessite une action rapide délivrée suite à une injection par voie intraveineuse au plus tard dans les deux heures suivant le diagnostic. L'artésunate (Malacef®) est le traitement de première ligne dans le monde entier, employé pour les adultes, enfants et femmes enceintes. Il apporte un bon profil de tolérance avec peu d'effets indésirables neurologiques et une clairance rapide. Il réduit également la cytoadhérence de plus de 50% après deux heures d'administration. Depuis 2011, l'artésunate est proposé au sein des hôpitaux français dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Cependant, des effets indésirables sont observables tels qu'une hémolyse retardée deux à trois semaines après le début du traitement ou la nécessité d'une transfusion. En outre, la quinine (Quinimax® ou Lafran®) est une alternative possible pour traiter le paludisme sévère lorsque l'artésunate est indisponible au moment du diagnostic, lors d'une allergie connue à l'artémisinine ou lorsque le voyageur malade revient d'une région où la résistance à l'artésunate est connue comme en Asie du Sud-est. Les deux traitements proposés sont généralement suivis par la prise d'une CTA par voie orale pendant trois jours minimum. [22,31,36,46]

1.3.3. Modes d'action des molécules antipaludiques actuelles

Concernant leur mécanisme d'action, l'artémisinine et ses dérivés (*Figure 7*) jouent un rôle sur le stress oxydant du parasite durant la phase érythrocytaire. En effet, ils inhibent les protéines PfTrx-Px1 (thiorédoxine peroxydase-1) et Pf1-CysPxn, deux protéines cytosoliques de *P. falciparum* impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dans la détoxification de l'hème respectivement. Ceux sont des peroxiredoxines, c'est-à-dire des peroxydases dépendantes de la cystéine qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes pour maintenir l'homéostasie redox intercellulaire. Suite à leur inhibition, l'hème n'est plus détoxifié et le fer qu'il contient clive alors le pont peroxyde de l'artémisinine, libérant des radicaux libres. Ces derniers et les ROS alkylent ensuite un grand nombre de protéines et de biomolécules du parasite, ce qui est à l'origine du choc oxydant amenant à sa mort.[22,47,48] De plus, il a également été démontré que cette famille de composés était capable de se lier à des protéines interférant avec le métabolisme des lipides, la synthèse d'ADN et la synthèse des protéines chez *P. falciparum*.[47,49]



Artémisinine | **Artéméther** | **Dihydroartémisinine ou arténimol** | **Artésunate**

Figure 7. Structures des dérivés de l'artémisinine responsables d'un stress oxydant chez *Plasmodium*

Les antipaludiques contenant un aminoalcool ou une quinoléine dans leur structure (*Figure 8*), telle que la chloroquine (Nivaquine®), la quinine ou la luméfantrine, agissent également sur l'inhibition de la détoxification de l'hème durant le stade sanguin asexué. En effet, au sein de la vacuole digestive du parasite, un compartiment de pH 4,8-5,2 dans lequel *Plasmodium* absorbe le cytosol de la cellule hôte, l'hémoglobine de l'hôte est dégradée par des protéases parasitaires. Cela libère des peptides et acides aminés et l'hème. L'hème, toxique pour le parasite, est oxydé en ferriprotoporphyrine IX ou hématine, elle-même polymérisée en hémozoïne (pigment malarique), un cristal de couleur noire non toxique pour le parasite. Les bases faibles et lipophiles comme la chloroquine diffusent passivement à travers les membranes de l'érythrocyte, de la vacuole parasitophore puis du parasite avant de rejoindre la vacuole digestive. Elles se concentrent à l'intérieur de celle-ci puis y élèvent le pH et bloquent ainsi l'action des enzymes parasitaires devenues incapables d'oxyder l'hème. De plus, quand bien même l'hème serait oxydé, la chloroquine interagit directement avec l'hématine, ce qui empêche sa polymérisation. *Plasmodium* est alors tuer avec ses propres déchets métaboliques.[22,48,50,51]

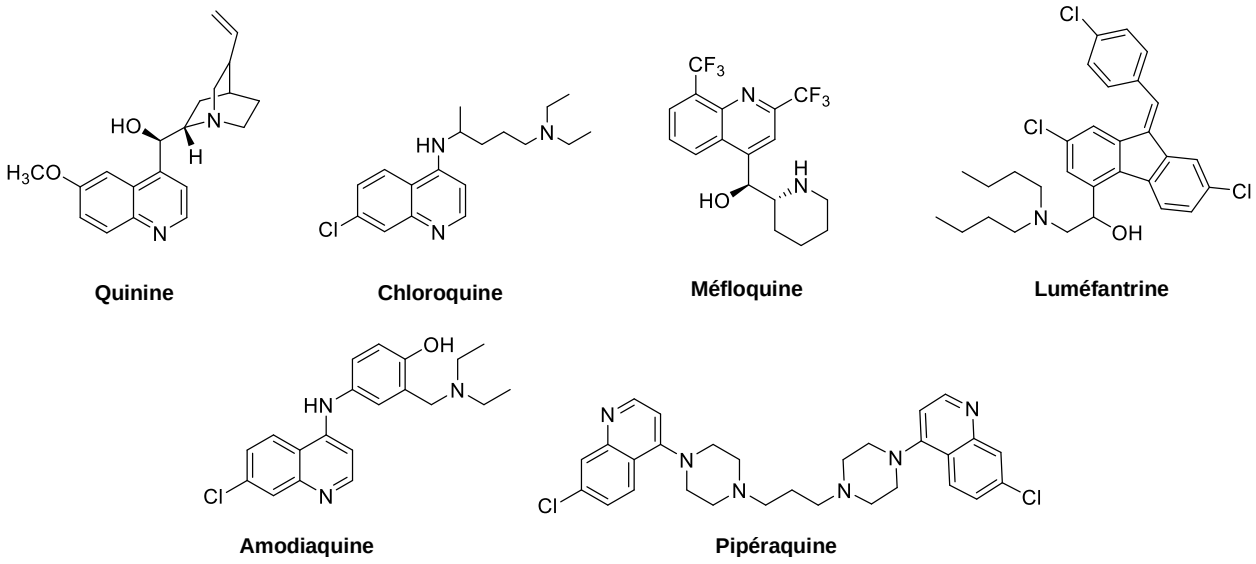


Figure 8. Structures des antipaludiques contenant un amino-alcool ou une quinoléine, impliqués dans l'inhibition de la détoxification de l'hème

Le proguanil, le cycloguanil, métabolite actif du proguanil,[22,48] et la pyriméthamine (*Figure 9*) sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (PfDHFR) de *P. falciparum*, tandis que la sulfadoxine inhibe la dihydroptéroate synthase (PfDHPS) de *P. falciparum*. Ces deux enzymes interviennent dans la voie de biotransformation des folates. Il s'agit de cofacteurs cellulaires impliqués dans la biosynthèse de nucléotides, des acides aminés glycine et méthionine et de protéines dans les mitochondries. Ils contribuent également au métabolisme des acides aminés histidine, acide glutamique et sérine. Par conséquent, ils sont indispensables pour la croissance du parasite et l'inhibition de leur voie de biosynthèse conduit à la mort de celui-ci. Il est à noter que la voie de biosynthèse des folates chez le parasite diffère de celle des mammifères, donc l'emploi de ces inhibiteurs ne présente pas de danger pour les cellules hôtes.[11,22]

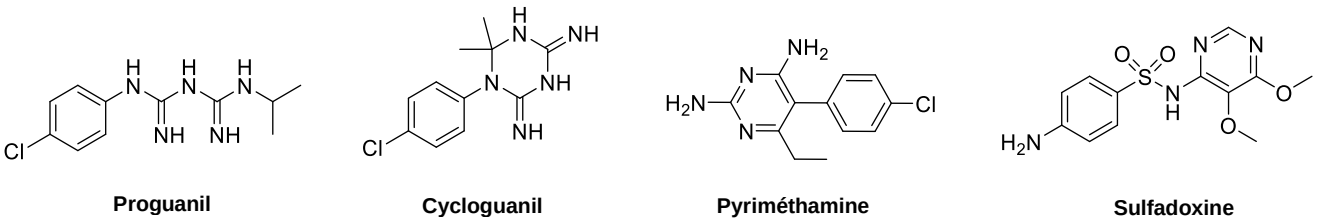
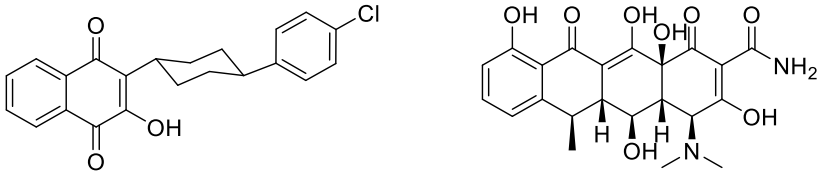


Figure 9. Structures des dérivés antipaludiques impliqués dans l'inhibition de la voie de biosynthèse des folates

En outre, l'atovaquone (*Figure 10*), une hydroxynaphthoquinone, se lie au cytochrome bc1 de *P. falciparum* (PfCytB), un complexe enzymatique catalysant le transfert d'électrons à travers la membrane mitochondriale. Cela produit un gradient électrochimique nécessaire pour les processus suscitant de l'énergie tel que la synthèse de l'ATP. Ainsi, inhiber PfCytB perturbe le potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale, ce qui est fatal pour *Plasmodium*.[11,22,48,52]



Atovaquone **Doxycycline**

Figure 10. Structures des autres molécules antipaludiques actuelles

Enfin, les cyclines, dont fait partie la doxycycline (*Figure 10*), sont une famille d'antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines bactériennes en se liant à la sous-unité ribosomique 30S. En effet, chez les bactéries, le ribosome constitué des sous-unités 30S et 50S est impliqué dans la formation et l'élongation des protéines cellulaires suite à la liaison d'un ARNt chargé d'un acide aminé. Ainsi, son rôle est de traduire l'ARMm en protéines fonctionnelles. Toutefois, lorsque la doxycycline se fixe à la sous-unité 30S, elle empêche la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site accepteur du complexe ARMm-ribosome, ce qui stoppe la phase d'élongation et empêche la cellule de se répliquer correctement.[53]

1.4. Résistances aux médicaments et recherche de nouvelles thérapies

1.4.1. Apparitions et mécanismes de résistances

Aujourd'hui, la plus grande préoccupation sur le plan thérapeutique est de lutter contre les multirésistances développées par *Plasmodium*. Elles concernent quasi exclusivement l'espèce *P. falciparum*. Une résistance se caractérise par la capacité d'une souche parasitaire à survivre et à se développer malgré l'absorption d'un médicament antipaludique. Lorsqu'elle se rapporte à deux composés ou plus appartenant à des classes chimiques différentes, on parle de multirésistance. Les premiers cas de résistances ont été signalés au début du XXème siècle pour la quinine puis ont touchés l'ensemble de l'arsenal thérapeutique jusqu'à l'apparition d'une résistance à l'artémisinine (ART) en 2006 et à certaines CTA à partir de 2008 (*Figure 11*).[22,46,48]

Les résistances sont la conséquence de mutations génétiques particulières chez le parasite. Par exemple, pour les 4-aminoquinoléines telles que la chloroquine, la résistance est médiée par une mutation au niveau du gène codant pour le transporteur métabolique PfCRT (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*) localisé au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite. Initialement, les 4-aminoquinoléines sont acheminées vers la vacuole digestive par l'intermédiaire de PfCRT. Cependant, la perte d'une charge positive lors de la mutation de la lysine en position 76 par une thréonine (K76T) entraîne un efflux de la chloroquine vers le cytoplasme, provoquant une acidification de la vacuole digestive et la résistance. Il est à noter que diverses autres mutations au niveau de ce transporteur (C72S, M74I, N75E, A220S, Q271E, N326S, I356T et R371I) ont été décrites mais confèrent une résistance seulement en présence de la mutation K76T.[11,48,51,52,54] En plus de celles-ci, des mutations ont été observées sur le gène Pfmdr1 codant pour la protéine 1 de résistance aux médicaments de *P. falciparum* (PfMDR1), une glycoprotéine P transmembranaire située sur la vacuole digestive. Son rôle est incertain mais il est supposé qu'il s'agisse d'un

transporteur. De ce fait, l'apparition de mutations (N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et 1246Y) engendre une diminution de la sensibilité à la chloroquine et la quinine en modifiant leur transport hors de la vacuole digestive, mais à l'inverse entraîne une augmentation de la sensibilité à la méfloquine et la luméfantrine. De même, les mutations N86Y et N1042D sont associées à la résistance à l'amodiaquine.[48,52] Le gène codant pour la protéine associée à la multirésistance aux médicaments de *P. falciparum* (PfMRP) subit également des mutations (Y191H et A437S) procurant des résistances pour ces mêmes composés. PfMRP est un transporteur retrouvé dans la membrane plasmique du parasite et contribue au transfert de substrats organiques anioniques tels que le glutathion oxydé, le glucuronate et les conjugués de sulfate, mais aussi de médicaments.[48,52]

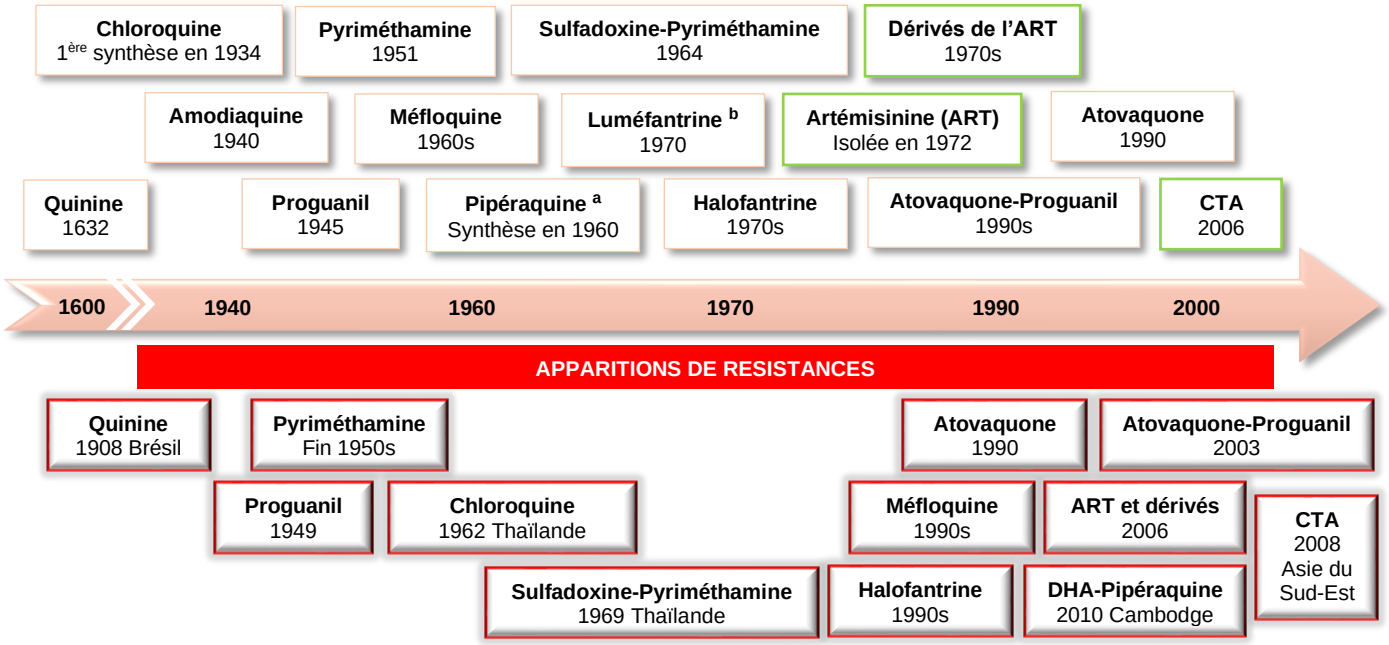


Figure 11. Frise chronologique de l'histoire des traitements antipaludiques : de leur découverte jusqu'à l'apparition de résistances. L'artémisinine (ART) et ses dérivés sont encadrés en vert. Les résistances aux différents composés sont encadrées en rouge avec leur date et lieu de première apparition. [a] La pipéraquine, synthétisée en 1960, est seulement utilisée depuis 1990, toujours en combinaison avec la dihydroartémisinine (DHA). [b] La luméfantrine est seulement employée en combinaison avec l'artéméther.[22,46,48]

D'autre part, les mutations principalement décrites à l'origine de la résistance à l'artémisinine et de ses dérivés sont celles portées par le gène PfKelch13 impliqué dans différentes fonctions cellulaires comme l'organisation et l'interaction avec d'autres protéines. Au cours du stade sanguin asexué de *Plasmodium*, la protéine PfK13 codée par le gène PfKelch13 est localisée dans la membrane plasmique du parasite où elle participe à la capture de l'hémoglobine puis à son transport jusqu'à la vacuole digestive. Toutefois, les mutations du gène PfKelch13 (F446I, N458Y, C469Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, P574L, C580Y, R622I, A675V) perturbe la capture et le transfert de l'hémoglobine et il en résulte une diminution de la concentration en hème, produit de dégradation de l'hémoglobine, au sein de la vacuole digestive. Ainsi, le pont peroxyde de l'artémisinine n'est pas clivé du fait de l'absence de fer provenant de l'hème, ce qui bloque l'effet antiparasitaire de celle-ci. D'autres mutations sur le gène 18 lié à l'autophagie (Pfatg18) codant pour la protéine PfAtp18 ont également été décrites comme responsables de résistance aux dérivés de l'artémisinine. Sur le plan clinique, le temps de clairance des parasites est augmenté chez les patients traités avec des CTA et ayant une mutation sur PfAtp18 (T38I) ou sur PfKelch13 (C580Y) avec des

parasites persistant jusqu'à 72h. Toutefois, cela n'a pas d'impact négatif si le médicament partenaire conserve son efficacité.[46,48,52]

De surcroît, la résistance à la sulfadoxine est conférée par des mutations sur la protéine PfDHPS (S436A/F, A437G, K540E, A581G et A613T/S) et celle au proguanil, cycloguanil et à la pyriméthamine par des mutations au sein de la protéine PfDHFR (S108N accompagnée de A16V, N51I, C59R et I164L). S108N est la mutation clé suite à l'introduction d'une asparagine avec une chaîne latérale plus large que la sérine de départ, interférant stériquement dans la liaison des inhibiteurs à PfDHFR.[48,52]

Pour finir, la résistance à l'atovaquone se développe très rapidement lorsque celle-ci est utilisée en monothérapie. Elle est le résultat de mutations sur le gène codant pour PfCytB (Y268S/C/N), plus particulièrement au niveau du site de liaison de l'ubiquinol sur lequel l'atovaquone se lie de manière compétitive. Les mutations bloquent ainsi la liaison de l'atovaquone à PfCytB.[11,48,52]

1.4.2. Nouvelle génération de thérapies antipaludiques

Au vu des nombreuses résistances existantes, il est évident que les traitements en rotation ou thérapies en combinaison double ou triple sont préconisées et que le développement de nouveaux composés antipaludiques ayant des modes d'action novateurs est d'une importance cruciale. Par conséquent, afin de faciliter la recherche et le développement de thérapies antipaludiques de nouvelle génération, la fondation *Medicines for Malaria Venture* (MMV), dont l'une des missions est de réduire le paludisme dans les régions endémiques en fournissant de nouveaux médicaments à des prix abordables, a défini et mis à jour les profils des candidats cibles (TCP pour « *Target Candidate Profiles* ») et des produits cibles (TPP pour « *Target Product Profiles* ») attendus. Ces profils indiquent les caractéristiques requises pour un médicament antipaludique idéal et en guident l'optimisation.[10,46]

Les TCP spécifient les attributs nécessaires à une molécule chimique individuelle pour qu'elle puisse être employée dans le traitement du paludisme. Ils sont divisés en cinq catégories en fonction du stade d'action de la molécule :

- Le TCP-1 (et TCP-2) regroupe les molécules agissant sur le stade sanguin asexué.
- Le TCP-3 rassemble les composés actifs contre les hypnozoïtes au stade hépatique chez *P. vivax*.
- Le TCP-4 centralise les molécules intervenant sur les schizontes hépatiques.
- Le TPC-5 réuni celles qui bloquent la transmission des parasites au moustique en inhibant les gamétocytes (composés gamétocytocides).
- Le TCP-6 concentre les composés qui bloquent la transmission en ciblant directement l'insecte vecteur (endectocides).

Le but des TCP est de fournir des composés qui, en plus de traiter les patients, perturbent le cycle de vie du parasite par leur activité biologique. Cela permet de rompre le cycle de transmission et ainsi de progresser vers l'élimination de la maladie. Les candidats répondant à ces critères se trouvent généralement en phase préclinique ou clinique.[10,46,55]

Finalement les TCP sont regroupés au sein de deux grands TPP. Ces derniers font références au produit final, c'est-à-dire à la combinaison de deux candidats actifs ou plus et à leur formulation. Le TPP-1 est axé sur les traitements pour la prise en charge du paludisme non compliqué en utilisant si possible une combinaison de deux molécules ou plus ayant des activités TCP-1, 3 ou 5. Pour le traitement du paludisme grave, une administration parentérale d'un seul TCP-1 à action rapide est plus appropriée. Quant au TPP-2, il se concentre sur la prévention dans les zones à forte transmission ou durant les épidémies et sur la chimioprophylaxie des voyageurs. Il confère une protection pour les infections émergentes par l'action de composés TCP-1, mais idéalement la prophylaxie est basée sur les TCP-4. Le classement des molécules antipaludiques actuelles en TCP et TPP est présenté en *Figure 12*.[10,46,55]

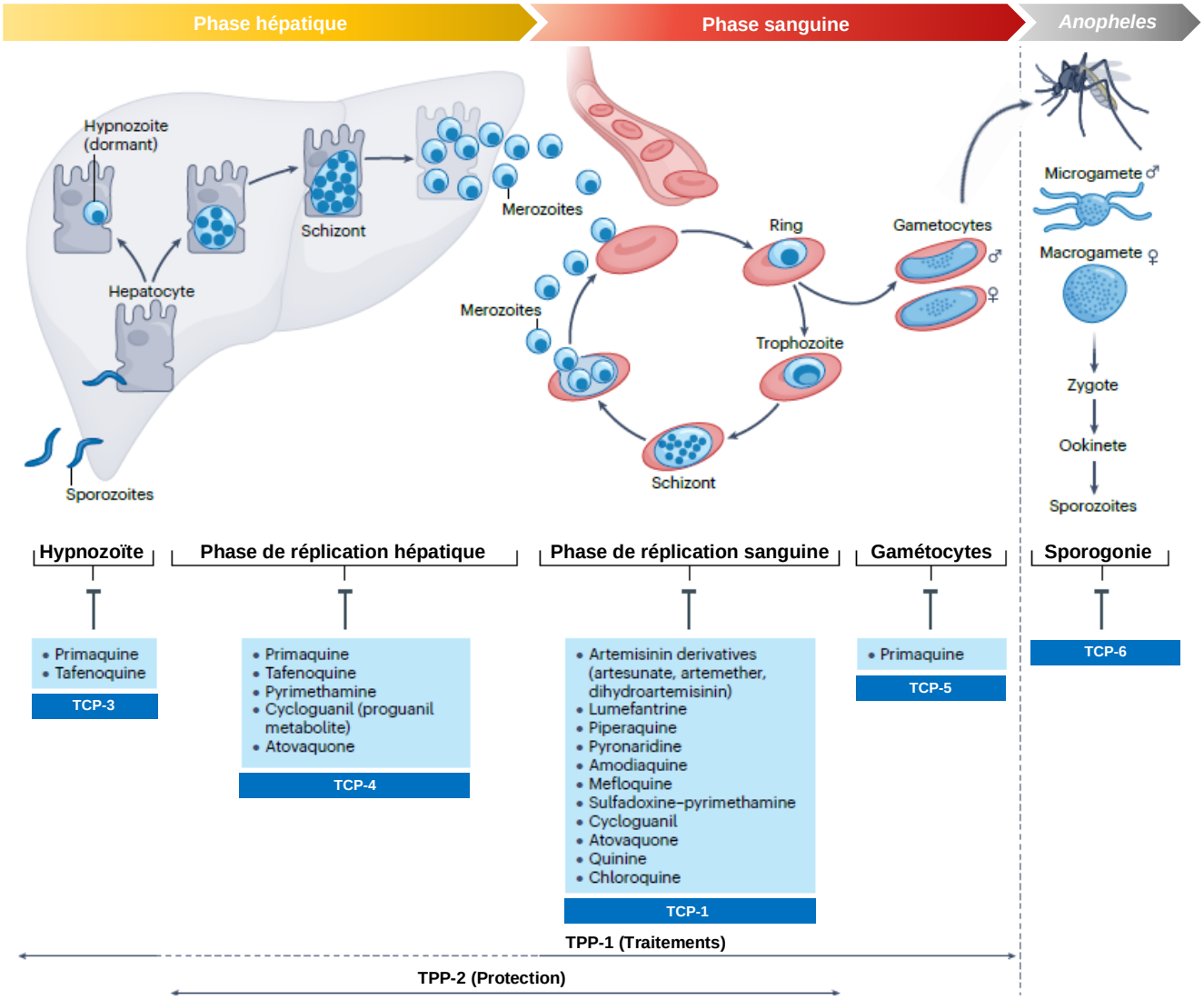


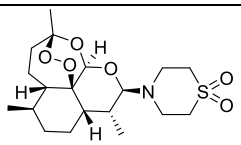
Figure 12. Les thérapies antipaludiques actuelles dans le contexte du cycle de vie de *Plasmodium* : classement en TCP et TPP. Schéma adapté de Siqueira-Neto 2023.[46]

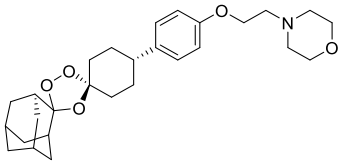
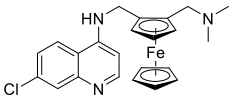
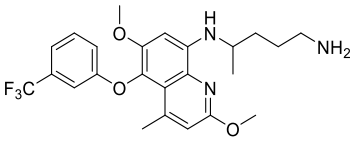
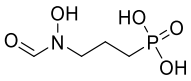
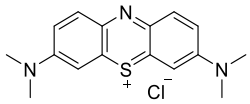
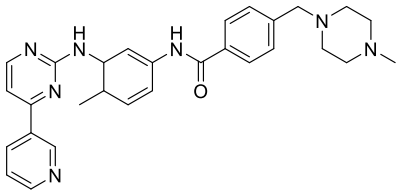
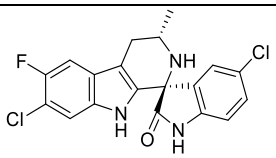
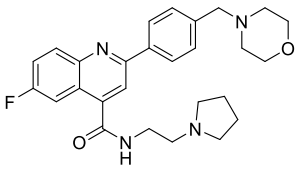
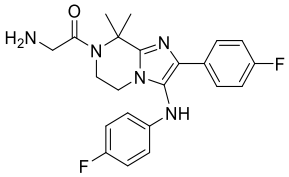
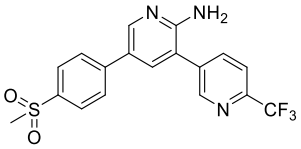
Dans le but de développer de nouveaux composés antipaludiques, diverses stratégies sont mises en place, entre autres la synthèse de dérivés de composés antipaludiques actuels, le repositionnement de molécules médicamenteuses existantes ou encore le criblage de petites molécules synthétiques de manière phénotypique ou vis-à-vis d'une cible choisie. Différents

composés issus de ces stratégies dont les cibles ont été identifiées ou non sont aujourd'hui en développement clinique et sont présentés en *Tableau 2*, mais de manière plus générale, l'ensemble des médicaments candidats en phases préclinique ou clinique ainsi que les médicaments approuvés sont répertoriés en *Figure 13*.[46,56]

Tout d'abord, les composés employés actuellement contre le paludisme donnent un bon point de départ chimique pour la synthèse de dérivés actifs. L'artémisinine a notamment été à l'origine de la découverte de l'artémisone, un dérivé de seconde génération, ou de l'artéfénomel qui diffère de l'artémisinine de par l'ozonide présent dans sa structure. De même, la ferroquine et la tafénoquine sont toutes deux inspirées de la chloroquine avec leur groupement aminoquinoléine.[10,13,56] De plus, le repositionnement de médicaments consiste à employer des médicaments déjà commercialisés pour le traitement d'une pathologie différente ou dont le développement a été interrompu. Tel est le cas de l'antibiotique fosmidomycine, du réactif de coloration bleu de méthylène, ou de l'inhibiteur de kinases (BCR-ABL, PDGFR et KIT) imatinib.[13,56]

Dans une approche de type phénotypique, des chimiothèques de petites molécules synthétiques sont criblées contre des cultures cellulaires de *Plasmodium* à un stade souhaité de son cycle de vie. De cette manière, le criblage est réalisé sur l'ensemble des cibles médicamenteuses et permet de déterminer l'activité *in vitro* de chaque molécule. De plus, il donne des indications sur la perméabilité cellulaire du composé, propriété essentielle pour le développement d'un candidat médicament. Actuellement, la plupart des composés antipaludiques en développement sont issus de ce type de criblage, puis leur cible a été identifiée par la suite. C'est le cas de la cipargamine, la cabamiquine, la ganaplacide ou le MMV048.[13,46,56–58] Néanmoins, améliorer la puissance des molécules issues de criblages phénotypiques à l'aide de relations structure-activité représente un défi du fait de l'ignorance de leur cible. C'est pourquoi, développer un criblage sur une cible prometteuse est une alternative intéressante puisqu'elle donne accès à des composés sélectifs dont la puissance peut être améliorée plus aisément à l'aide de relations structure-activité. Par exemple, un criblage réalisé sur la dihydrofolate réductase-thymidylate synthase (PfDHFR-TS), cible validée chimiquement et cliniquement chez *P. falciparum*, a amené à l'identification du candidat médicament P218 optimisé. De la même façon, le DSM265 est issu d'un criblage sur l'enzyme mitochondriale dihydroorotate déshydrogénase de *P. falciparum* (PfDHODH) puis d'optimisations chimiques.[13,46,56] En revanche, malgré les avantages apportés, le coût de ce type de criblage reste très élevé et limite la taille des chimiothèques testées. Une possibilité pour pallier ce problème peut être de réaliser un screening virtuel en amont ne nécessitant aucun réactif coûteux. Ce procédé a été utilisé vis-à-vis de diverses cibles virtuelles mais n'a pas encore permis d'obtenir de nouveaux points de départs chimiques dotés d'une activité cellulaire puissante.[46]

Nom	Structure	Classe chimique	Essais cliniques	Stade du cycle de vie de Pf	Cible et/ou mécanisme d'action
Dérivés synthétiques de composés existants					
Artémisone		Artémisinine	Phase III	Stade sanguin asexué et gamétocytes	Pas encore identifié

Artéfénomel (OZ439)		1,2,4-trioxolane	Phase III	Stade sanguin asexué de *Pf* (**TCP-1**) et gamétocytes de *Pv*	Perturbe la digestion de l'hémoglobine par le parasite
Ferroquine		Ferrocène	Phase II	Stade sanguin asexué (**TCP-1**)	Inhibe la formation d'hémozoïne et génère des espèces réactives de l'oxygène
Tafénoquine		8-amino quinoléine	Phase IV	Tous les stades	Prodrogue activée dans le foie par le CYP2D6. Cible moléculaire pas encore identifiée.
Repositionnement de médicaments					
Fosmidomycine		Acide phosphonique	Phase III	Stade sanguin asexué (schizontes) (**TCP-1**)	Inhibe la 1-désoxy-d-xylulose 5-phosphate réductoisomérase
Bleu de méthylène		Phénothiazine	Phase II	Gamétocytes (**TCP-5**)	Inhibe la dégradation de l'hème dépendante du glutathion
Imatinib		2-phényl-amino-pyrimidine	Phase II	Stade sanguin asexué (**TCP-1**)	Inhibe la phosphorylation de la tyrosine de la bande protéique 3
Criblage phénotypique puis optimisations chimiques					
Cipargamine (KAE609, NITD609)		Spiroindolone	Phase II	Stades sanguin asexué et sexué (**TPP-1**)	Inhibe PfATP4
Cabamiquine (M5717, DDD107498)		Quinoléine	Phase II	Tous les stades (sauf hypnozoïtes)	Inhibe la synthèse protéique de *Pf* en perturbant la fonction du facteur 2 d'élongation translationnelle eucaristique (PfeEF2)
Ganaplacide (KAF156)		Imidazolo-piperazine	Phase I	Tous les stades (sauf hypnozoïtes)	Inhibe le trafic des protéines de *Plasmodium*
MMV048 (MMV390048)		Amino-pyrimidine	Phase II	Tous les stades (sauf hypnozoïtes)	Inhibe PfPI4K (*Pf* phosphatidylinositol 4 kinase) dont le rôle est de phosphoryler les lipides pour réguler la signalisation et le trafic intracellulaire
Criblage sur une cible sélectionnée puis optimisations chimiques					

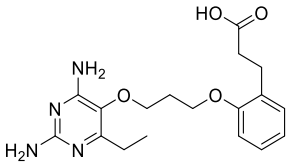
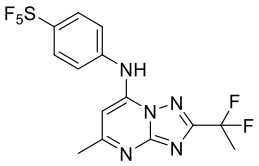
P218		2,4-diamino-pyrimidine	Phase I	Non renseigné	Inhibe la dihydrofolate réductase-thymidylate synthase de *Pf* (PfDHFR-TS)
DSM265		Triazolo-pyrimidine	Phase II	Tous les stades	Inhibe la dihydroorotate déshydrogénase de *Pf* (PfDHODH)

Tableau 2. Résumé des principales drogues antipaludiques en développement et en essais cliniques et leur site d'action. Adapté de Umumararungu 2023.[56]

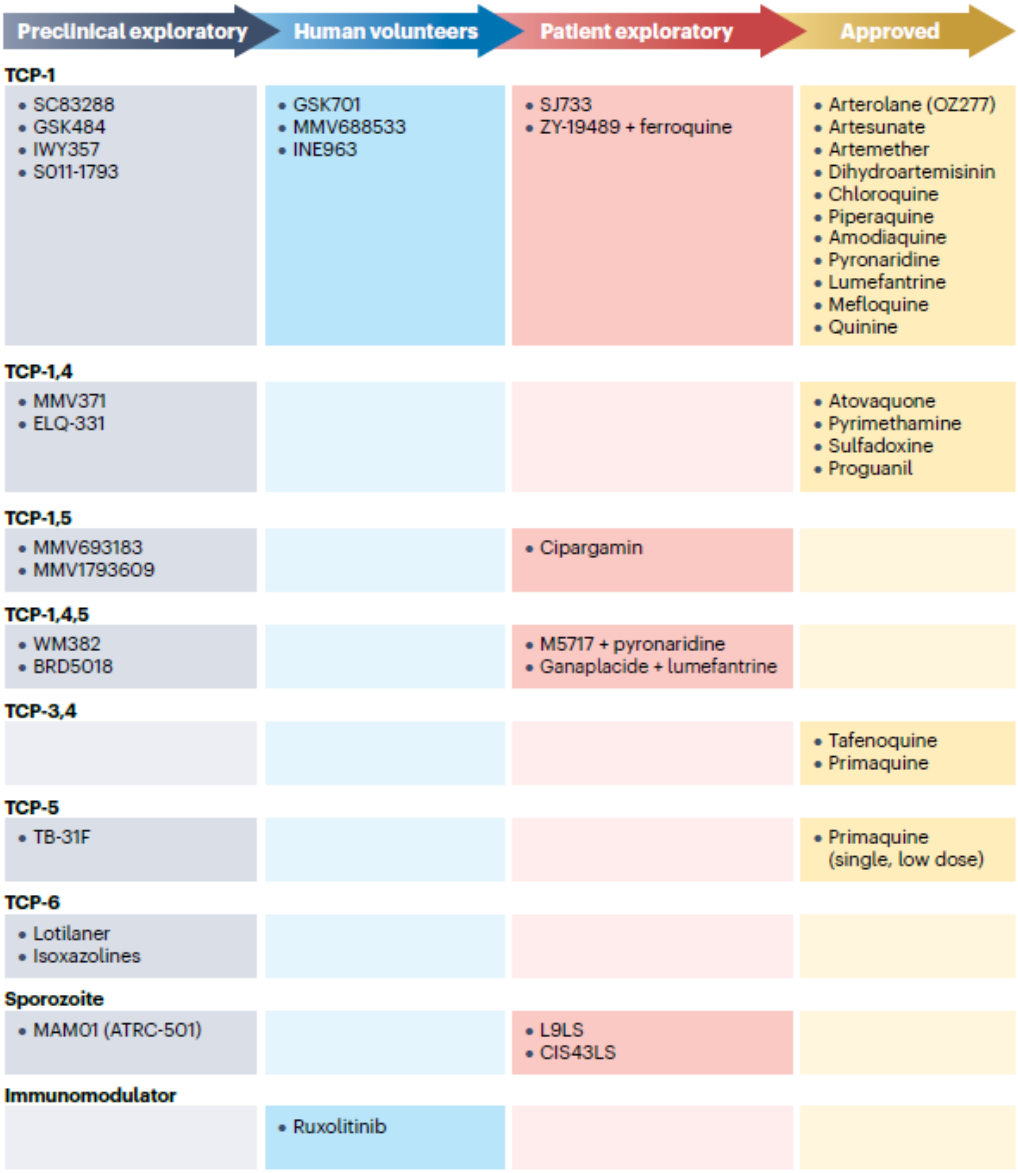


Figure 13. État de l'art des candidats médicaments et médicaments approuvés contre le paludisme (2023) : classement en TCP. Les anticorps monoclonaux MAM01 (ATRC-501), L9LS et CIS43LS bloquent l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes, tandis que le ruxolitinib est un immunomodulateur, testé en association avec un traitement antipaludique pour moduler la réponse immunitaire à long terme de l'hôte. Issu de Siqueira-Neto 2023.[46]

Une approche récente quant au développement de nouveaux composés antipaludiques est l'approche hybride. Elle consiste à lier de manière covalente deux molécules efficaces ayant des modes d'action différents. La molécule hybride obtenue, également appelée hybride multi-cible, agit alors simultanément sur plusieurs cibles d'intérêt et sa vulnérabilité face aux résistances est amoindrie. En effet, il est peu probable que des mutations apparaissent simultanément sur les différents gènes ciblés. De plus, cette approche représente d'autres avantages comme la possibilité de synergie des actions thérapeutiques des deux composés individuels une fois combinés, la réduction de la toxicité et des effets secondaires induits par les interactions médicamenteuses potentielles d'une thérapie combinée, et la facilité d'amélioration de la solubilité apportée par l'un des deux composants ou par un linker approprié entre les deux. Le plus souvent, les hybrides antipaludiques comportent une quinoléine ou un 1,2,4-trioxane dans leur structure chimique, respectivement caractéristiques de la chloroquine et de l'artémisinine. Nous pouvons en citer plusieurs exemples tels que le MEFAS, combinaison de la méfloquine à l'arténusate, les dérivés de ferroquines et hydroxyferroquines qui sont des hybrides organométalliques quinoléine-ferrocène, un hybride pyriméthamine avec une 4-aminoquinoléine, ou encore les trioxaquines et trioxolaquines, des hybrides quinoléine-trioxane. À ce jour, la trioxaquine SAR116242 est la plus prometteuse et fait l'objet d'études précliniques (*Figure 14*).[59]

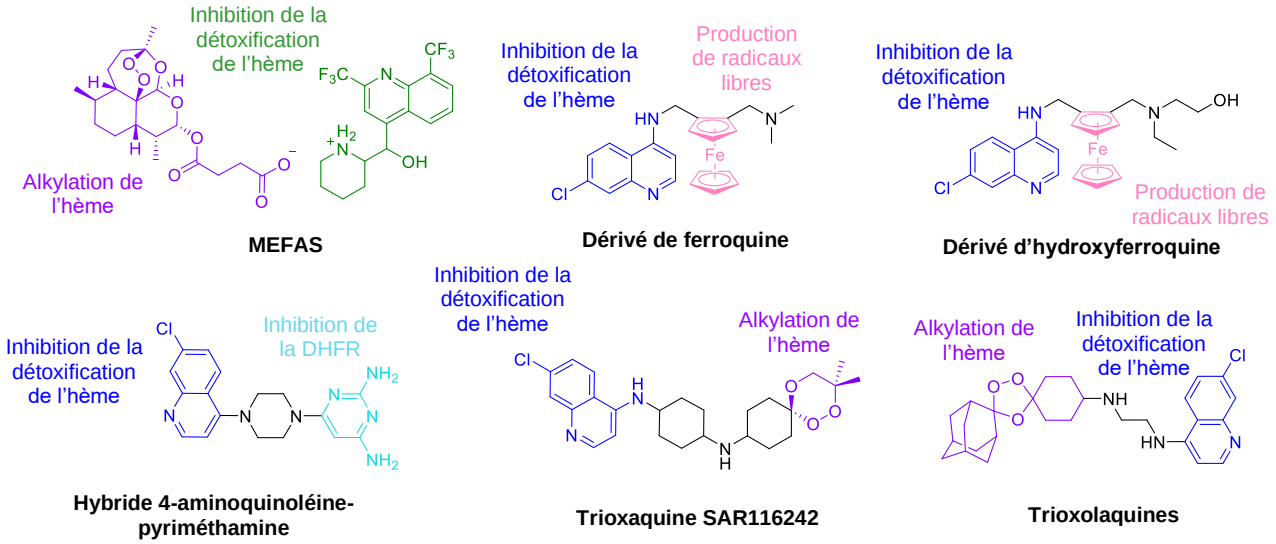


Figure 14. Structures chimiques de différents exemples de molécules hybrides antipaludiques

1.5. Recherche et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique : PfPPM9

1.5.1. Les phosphatases de *P. falciparum*

La recherche de cibles novatrices de *P. falciparum* en vue du développement de nouveaux composés antipaludiques passe avant tout par la compréhension du cycle de vie du parasite. Comme vu précédemment, celui-ci est très complexe et fait intervenir de nombreuses protéines nécessitant

une régulation fine et rigoureuse. Parmi les processus de régulation, les mécanismes de modifications post-traductionnels sont d'une importance cruciale car ils modifient la structure d'une protéine de manière réversible ou non suite à sa traduction. En effet, ces mécanismes provoquent l'ajout ou le retrait d'un groupement chimique sur un acide aminé au sein d'une protéine par des enzymes spécifiques, ce qui bouleverse les propriétés de la protéine. Chez *Plasmodium*, les groupements chimiques retrouvés le plus souvent lors de mécanismes post-traductionnels sont des phosphates, acétyles, méthyles ou encore des lipides, impliqués respectivement dans les mécanismes de phosphorylation, acétylation, méthylation et lipidation.[14]

Dans le but d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques chez *P. falciparum*, notre équipe « Biologie des parasites Apicomplexa » (Équipe BAP, CIIL, Institut Pasteur de Lille) s'est intéressée aux kinases et phosphatases qui, comme chez toutes les cellules eucaryotes, jouent un rôle majeur chez *P. falciparum*. Elles sont à l'origine des phénomènes de phosphorylation et déphosphorylation respectivement, processus post-traductionnels les plus courants. Tandis que les kinases transfèrent un groupement phosphate depuis une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou de GTP (Guanosine TriPhosphate) sur un résidu hydroxylé tel qu'une sérine, une thréonine ou une tyrosine, les phosphatases font l'inverse. Cela modifie certaines propriétés des protéines affectées comme leur repliement, leur localisation, leur activité enzymatique ou encore leur stabilité. L'équilibre entre ces deux phénomènes s'avère alors essentiel pour de nombreux processus biologiques et fonctions cellulaires, notamment la prolifération, la différenciation, la migration et l'homéostasie.[14] A présent, il est bien établi qu'ils représentent un mécanisme indispensable dans le contrôle du cycle de vie de *P. falciparum* ainsi que pour la survie cellulaire.[14,60] Par exemple, l'inhibition de l'activité phosphatasique parasitaire par des toxines naturelles comme l'acide okadaïque, la calyculine A ou la tautomycine affecte fortement la croissance et la division de *P. falciparum in vitro*. De plus, de nombreuses kinases et phosphatases sont uniques chez *Plasmodium*, tout comme leurs substrats, et représentent alors des cibles potentielles et originales dans le cadre de thérapies antipaludiques.[14] Néanmoins, alors que des études détaillées sur les kinases et leur essentialité ont permis d'intégrer celles-ci dans les stratégies de découverte de médicaments antiparasitaires, les phosphatases ont été peu explorées par le passé. Il est désormais intéressant de les considérer et de les exploiter comme l'un des systèmes majeurs nécessaires pour la survie du parasite.[60]

Le phosphatome de *P. falciparum* comporte seulement 67 enzymes dont 33 ne possèdent pas d'homologues chez l'Homme et 6 sont spécifiques au genre *Plasmodium*.[61] Ce nombre réduit, comparé à plus de 125 protéines dans le phosphatome humain, résulte de l'adaptation du parasite à un mode de vie simplifié puisqu'il vit grâce aux nutriments fournis par son hôte et ne nécessite donc pas de système de régulation métabolique complexe.[62] Parmi les protéines phosphatases chez *Plasmodium,* trois grandes catégories sont observées en fonction de l'acide aminé ciblé : les sérine/thréonine-phosphatases (PSP), les tyrosine-phosphatases (PTP) et les autres phosphatases capables de déphosphoryler ces 3 résidus. Cette dernière catégorie contient des histidine-phosphatases (HP) dont l'histidine est le résidu cible, des lipide-phosphatases (LP) et des nucléotide-phosphatases (NP).[63] Chez *Plasmodium*, comme chez l'homme, les sites de phosphorylation prédominants ciblent les résidus sérine (86,4%).[60,63,64] Les PSP sont alors au cœur des travaux de l'équipe. Elles sont subdivisées en 3 sous-familles : les phosphatases de type haloacides déshalogénases (HAD), les phosphoprotéines phosphatases (PPP) et enfin les métallo-phosphatases

dépendantes des ions magnésium et/ou manganèse (PPM) incluant presque exclusivement la famille des PP2C (*Figure 15*).

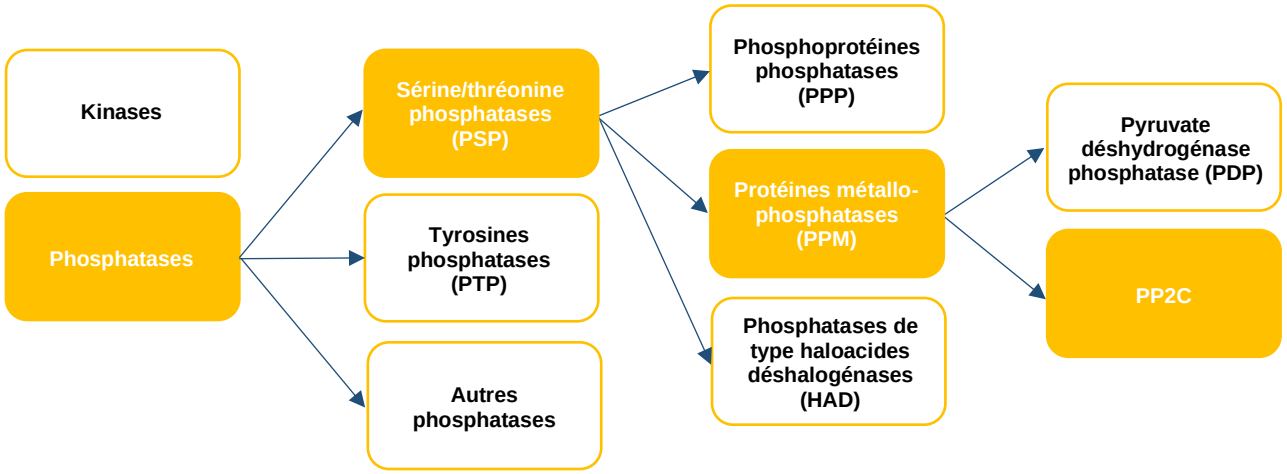


Figure 15. Classification des familles phosphatases et de la sous-famille PSP chez *P. falciparum*

Les PP2C, enzymes monomériques, sont nommées ainsi pour leur capacité à coordonner deux ions métalliques, manganèses Mn^{2+} ou magnésiums Mg^{2+}, au sein de leur site actif, essentiels pour leur activité enzymatique. La plupart d'entre elles conservent les domaines RxxxED, DGxxG, DGxWD et DN, impliqués dans la coordination de ces ions ainsi que dans la liaison des phosphates. De plus, leurs domaines catalytique et régulateur sont réunis au sein d'un même polypeptide, le plus souvent dans les extrémités C- ou N-terminales.[14,61,63] La fonction principale des PP2C semble être la régulation des cascades de signalisation du stress, mais elles sont aussi engagées dans la différenciation cellulaire, la croissance, la survie, l'apoptose, le métabolisme cellulaire ou encore la dégradation des protéines. Cependant, les mécanismes moléculaires sont encore peu connus, ce qui ne permet pas de savoir comment elles sont recrutées, activées ou inactivées durant les processus de transduction du signal.[63–66]

Chez *P. falciparum*, treize PP2C ont été recensées dont dix ne possèdent pas d'orthologue chez l'homme,[62,63] ce qui implique que leurs fonctions sont sûrement spécifiques au parasite.[62] Au sein de ces PP2C, dont l'essentialité de chacune est présente en *Tableau 3*, quatre sont dispensables pour le développement chez le moustique vecteur, PfPPM3, PfPPM6, PfPPM7 et PfPPM8, alors que trois autres sont justement impliquées dans le développement chez celui-ci, PfPPM1, PfPPM2 et PfPPM5. Effectivement, PfPPM1 est engagée dans la formation de gamétocytes mâles, PfPPM2 est essentielle pour l'attribution du sexe des gamétocytes et la différenciation des ookinètes et PfPPM5 est impliquée dans la régulation du développement des oocystes. Par ailleurs, PfPPM6, PfPPM8 et PfPPM9 sont spécifiques de *Plasmodium* et sont décrites comme essentielles pour le développement du parasite au stade sanguin.[62,63] Elles pourraient alors s'avérer être de nouvelles cibles thérapeutiques originales et intéressantes. C'est pourquoi, notre équipe a caractérisé l'une d'entre elle aux niveaux moléculaire et fonctionnel, PfPPM9, et tente actuellement de confirmer son essentialité au cours du cycle de vie de *P. falciparum*. En parallèle, les mêmes études sont réalisées sur PfPPM6.

Membres des PP2C chez *P. falciparum*		Essentialité au cours du cycle de vie de *P. falciparum*
Noms	**n° d'accession**	
PPM1	PF3D7_0410300	Non essentielle
PPM2 *	PF3D7_1138500	Medium
PPM3	PF3D7_1455000	Medium
PPM4	PF3D7_1249300	Non essentielle
PPM5	PF3D7_0810300	Non essentielle
PPM6	PF3D7_1309200	Essentielle au cours du stade sanguin
PPM7 *	PF3D7_0810500	Non essentielle
PPM8	PF3D7_1135100	Essentielle au cours du stade sanguin
PPM9	PF3D7_0520100	Essentielle au cours du stade sanguin
PPM10 *	PF3D7_1009600	Medium
PPM11	PF3D7_1208900	Non essentielle
PPM12	PF3D7_0704800	Non essentielle
PPM13	Aucune donnée sur PlasmoDB	

Tableau 3. Tableau des différentes PP2C retrouvées chez *P. falciparum* et de leur essentialité au cours de son cycle de vie. Celles supplémentées d'un astérisque (*) possèdent un orthologue chez l'Homme.

En outre, notre équipe a récemment effectué des expériences de génétique inverse chez *P. berghei* dans le but de générer des parasites KO par double recombinaison homologue du gène codant PPM9 (données non publiés). Ceci permettrait ainsi de démontrer l'essentialité ou non du gène dans la survie de *P. berghei*. Pour cela, la transfection du vecteur PbGEM-261356, correspondant au knock-out du gène de PbPPM9 (n° d'accession : PBANKA_1234900), a été réalisé au sein de la souche pG230 de *P. berghei*. Dans le vecteur PbGEM-261356, le gène de PbPPM9 a été délété et remplacé par une cassette de résistance à la pyriméthamine permettant de sélectionner les parasites transfectés ayant intégrés la construction. Après obtention d'une souche possédant l'intégration, une étape de clonage par dilution limite a été réalisée pour permettre l'étude d'un phénotype. Des cinétiques de croissances ont été réalisées avec 2 clones KO PbPPM9 et la souche sauvage. Les résultats ont montré une croissance similaire entre *P. berghei* KO PbPPM9 et la souche sauvage. Toutes ces données suggèrent que PbPPM9 est dispensable chez *P. berghei*. De plus, après coloration au Giemsa, aucune différence morphologique n'a été observée quel que soit le stade parasitaire, y compris sur la présence de gamétocytes.

1.5.2. La phosphatase PfPPM9

PfPPM9 (n° d'accession PF3D7_0520100) est une protéine issue d'un gène situé sur le chromosome 5 du génome de *P. falciparum* souche 3D7. Dans un premier temps, une analyse détaillée de sa séquence a été réalisée afin de la caractériser au niveau moléculaire. Cela a mis en évidence un nombre total d'acides aminés s'élevant à 706 ainsi que les quatre acides aminés interagissant avec les ions métalliques au sein du site actif : trois acides aspartiques (D) en position D499, D656 et D696 et un acide glutamique (E) en position E645. Les domaine RxxxED, DGxxG, DGxWD et DN conservés chez les PP2C ont également été décelés (*Figure 16*). Cette étude bio-informatique a par la suite été complétée par la réalisation d'alignements avec d'autres protéines d'Apicomplexa, marquant la présence de régions consensus caractéristiques du site catalytique de la famille des PP2C. De plus, cela a indiqué un pourcentage d'identité de seulement 27% avec la PP2C

humaine, affirmant la spécificité de PPM9 chez *P. falciparum* et confortant l'idée d'employer celle-ci comme cible thérapeutique.[20]

1 MSLLTNYRGKNNNETMITERSVNNVNESDKVNNIKEMNNVNDMNNINNAEKIIEYNSINDLKYC
65 KSIIDIVNYIITIGIWEMYTYEWVFNRKTFLYYHTLLEKYYFYDKNNNLTLFNEKSFFLYVCTFENN
132 EFVSDFFFQRNKKKKELKLTSYTKTMQGRRKKQEDRYLVITDLTKYIDSNDYKTLYFYKKNP
194 LYFYSIFDGHRGIKACEYCMSHIIKNIIYYFYNQNMEDDQSSTTINKLNSNDINISPDKRRKFDN
259 VKNEDIPLGDSTININNINDMCNINNNINKCNENFNDLHIEGDNTNDNNYCMNNKTEEERKENLFI
325 NTTSKNDYFLKNISSVNHISNDNILNNIHTNKKDIENNTPIKNKDKRLIDSSYLNTISDDVEYRKKR
392 KVEEMHIIKQNINNKNEYINLNISEECSNNIDQTHNNKKKKISDNSNSYEKLKFLDELTDEQIME
457 YIKLAFLKTDEQFLKVSKFPNHGCTIISLIIFRNKMFVANLGDCRAIGVVNISNTLKTEVLSND
521 HKPNDPKEKERIKKMGGDVICLQNVYRVKANARKNNKDKPSLLERLSMKEEVYLAVSRAI
581 GDKDFKFNNVISATPDVICKEIYSEKCNEKKEEKEITKRTNVIEKSDIDENYFKETDNLYYSA
644 HEVNYHYVVMACDGVWDTMSNKDIVKILQTYNNDPDKACSEIIKTAYAYGSQDNLTAMLL
704 KFY

Figure 16. Représentation de la séquence protéique de PfPPM9. En rose sont représentées les régions consensus caractéristiques de la famille des PP2C, en souligné bleu leurs domaines conservés et en violet les acides aminés interagissant avec les ions métalliques. Adapté de N'Guessan 2020.[20]

Subséquemment, PfPPM9, de masse 83,4 kDa, a été produite en bactéries *E. coli* BL21 sous forme de protéine recombinante portant un tag 6-His et purifiée sur colonne de Nickel. Son activité phosphatasique a été mesurée grâce au test au vert de malachite, dans lequel le substrat employé est l'α-caséine, un polypeptide possédant sept sérines phosphorylées. Les résultats obtenus suite aux différentes conditions explorées démontrent que l'activité enzymatique optimale est acquise en présence de $MnCl_2$ à la concentration de 2,5 mM, tandis que $MgCl_2$ est utile à l'activité mais non essentiel (*Figure 17a et b*). De plus, en absence d'ions métalliques, PfPPM9r est incapable de déphosphoryler son substrat, confirmant son appartenance à la famille des PPM (*Figure 17c*). Par ailleurs, la protéine recombinante tronquée de 45 kDa, située sur la partie C-terminale et correspondant au site catalytique de PfPPM9, a aussi été produite et conserve 56% de l'activité phosphatasique comparé à la protéine entière.[20]

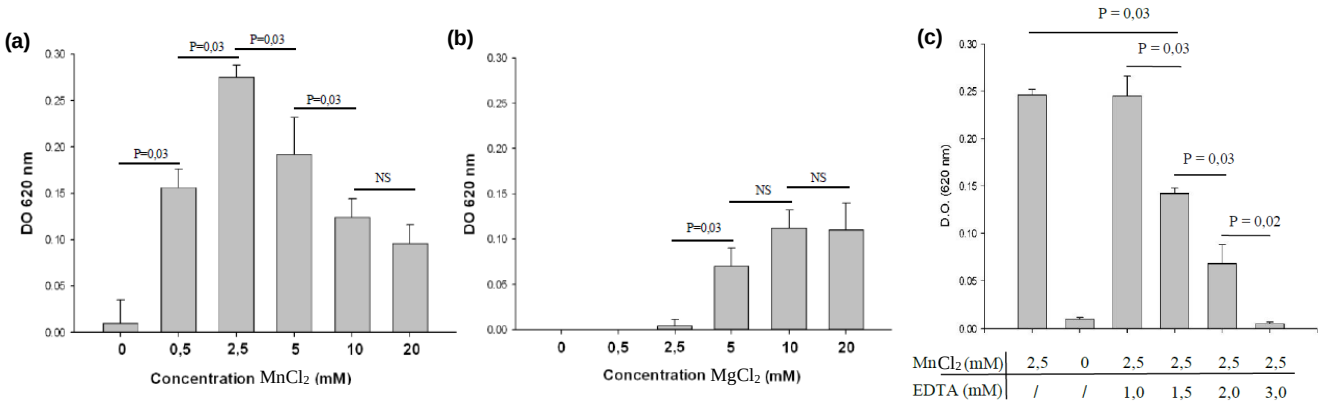


Figure 17. Mesure de l'activité phosphatasique de PfPPM9r par le test au vert de malachite. PfPPM9r (125 µg/mL, n=4) a été incubée avec des concentrations croissantes de (**a**) $MnCl_2$, (**b**) $MgCl_2$ et (**c**) EDTA, un chélateur d'ions métalliques, avec et sans $MnCl_2$ (2,5 mM). La DO est donnée après déduction des blancs. Une analyse statistique à l'aide du test de Wilcoxon-Mann Whitney a été effectuée et les valeurs P sont indiquées pour chaque comparaison par paires. Une valeur de P <0,05 est considérée comme significative. Issu de N'Guessan 2020.[20]

De surcroît, un *knock-in* (KI) du gène codant pour PfPPM9 chez *P. falciparum* a permis d'immunolocaliser par immunofluorescence en microscopie confocale la protéine au niveau du cytoplasme chez les trophozoïtes âgés ou les schizontes préférentiellement, justifiant que PfPPM9 est exprimée au cours du cycle érythrocytaire du parasite. Elle semble alors préparer la division cellulaire et/ou la sortie du globule rouge au cours de la schizogonie érythrocytaire. En parallèle, les premiers *knout-out* (KO) et *inducible knout-out* (iKO) réalisés dans le but de confirmer son essentialité n'ont pas fonctionné et cette dernière est toujours à l'étude actuellement.

Enfin, les processus de « drug discovery » étant souvent basés sur la structure 3D des cibles thérapeutiques, PfPPM9 entière (83 kDa) et sa région tronquée correspondant à son site catalytique (45 kDa) ont de nouveau été produites sous forme de protéines recombinantes. Cependant, ces protéines n'ont pas été obtenues suffisamment pures et en forte concentration pour pourvoir les soumettre à des essais de cristallisation et obtenir un modèle 3D expérimental. Un modèle 3D a donc été construit *in silico* par une stratégie d'homologie comparative, en prenant comme structure de référence une PP2C de *T. gondii* (2isn), un autre parasite Apicomplexa. Cela a été réalisé en collaboration avec le Dr Amaury Farce (INFINITE) et a abouti à l'identification d'une région très conservée de la famille des PP2C correspondant au site catalytique. Des études de mutagénèse dirigées de ses résidus (Asp, Glu) chélatant les manganèses a permis de valider le modèle d'homologie, mais également la position et le nombre d'ions au sein du site catalytique, confortant l'hypothèse d'un modèle à deux ions Mn^{2+} en positions M1 et M2 (*Figure 18*).

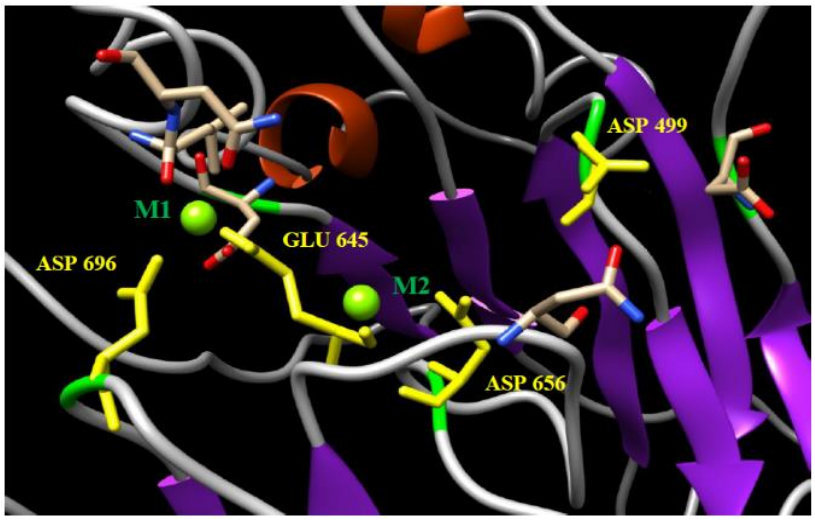
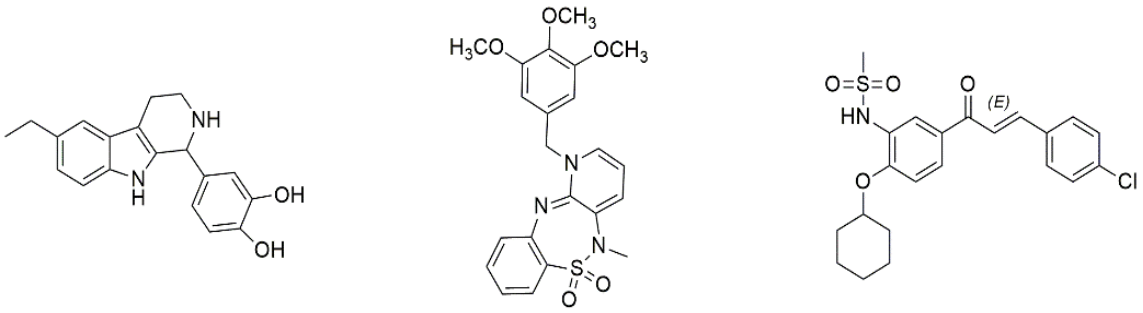


Figure 18. Modèle 3D du site catalytique de PfPPM9 et position des ions Mn^{2+} représentés par des sphères vertes

1.6. Recherche de premiers hits sur PfPPM9

Afin d'identifier des inhibiteurs potentiels de PfPPM9, un criblage virtuel par *docking* de la chimiothèque ICPAL-CTL (chimiothèque des équipes de Chimie de Lille), comptant environ 3 400 composés, a été effectué sur le modèle d'homologie du site catalytique de PfPPM9. Le but de cette étape était d'évaluer la possibilité de liaison entre les composés et le site actif de la phosphatase.

Puis, après une étape de *scoring*, les 56 hits virtuels issus de l'analyse ont été évalués *in vitro* sur la survie de la souche chloroquinosensible HB3 de *P. falciparum* en culture. Ainsi, trois hits avec des concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) proches du micromolaire ont été identifiés : **H1**, **H2** et **H3** (*Figure 19*). Rappelons que la CI_{50} est la concentration d'une molécule avec laquelle 50% de la croissance parasitaire est inhibée.



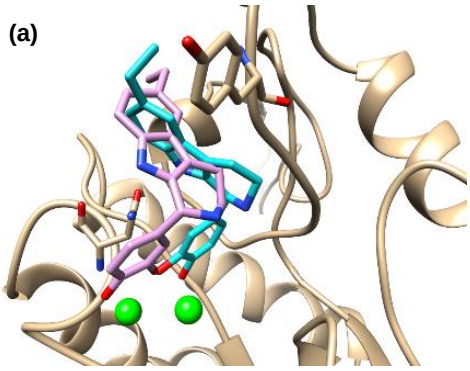
H1
1,85 ± 0,12 µM [HB3]

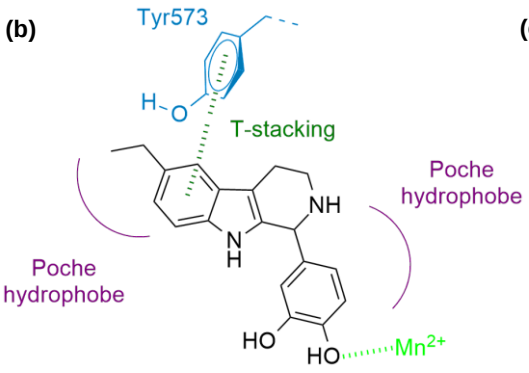
H2
2,64 ± 1,2 µM [HB3]

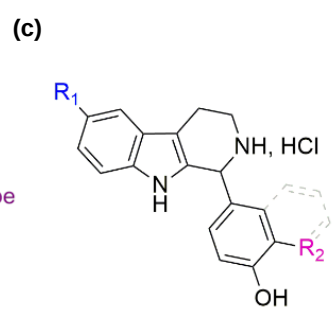
H3
3,29 ± 1,3 µM [HB3]

Figure 19. Structures des meilleurs hits issus du criblage virtuel sur le site catalytique de PfPPM9 et leur CI_{50} sur *P. falciparum* HB3, notée [HB3]

Les premières études se sont portées sur le hit **H1**, d'abord en mettant en évidence son mode d'interaction avec le site catalytique. À l'intérieur de celui-ci, une interaction T-stacking est observée entre le noyau indolique du hit **H1** et la tyrosine en position 573, ainsi que des interactions entre les ions manganèses et l'hydroxyle du cycle benzénique. De plus, deux poches à caractère hydrophobe sont observables de part et d'autre du hit (*Figure 20a et b*).







T1 : R_1 = H, R_2 = Br
570 ± 250 nM [HB3]

T2 : R_1 = CH_3CH_2, R_2 = Br
260 ± 120 nM [HB3]

T3 : R_1 = CH_3CH_2, R_2 = Cl
340 ± 150 nM [HB3]

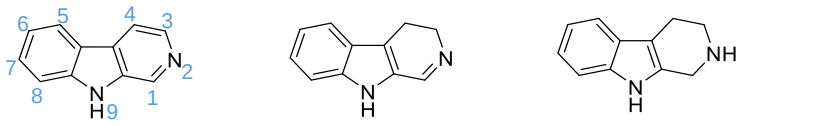
T4 : R_1 = H, R_2 = Naph
460 ± 204 nM [HB3]

Figure 20.
a. Représentation des poses de docking des énantiomères de **H1**, *R* en rose et *S* en bleu
b. Représentation 2D du mode d'interaction de **H1**
c. Meilleurs candidats issus des premières pharmacomodulations et leur CI_{50} sur PfHB3

D'autre part, les premiers éléments de relations structure-activité (RSA) ont démontré le caractère essentiel du para-phénol pour l'activité anti plasmodiale, dont l'hydroxyle est supposé chélater un ion manganèse au sein du site catalytique. Parmi toutes les modulations autour du phénol, les introductions d'un halogène (Cl, Br) ou d'un hydroxynaphtalène en positon R_2 et d'une petite

chaine carbonée (Et) en position R_1 se sont révélées les plus bénéfiques quant à l'activité, confirmant la présence de poches à caractère hydrophobe. Une seconde série de hits a ainsi été identifiée (**T1**, **T2**, **T3** et **T4**), présentant des CI_{50} améliorées comprises entre 260 et 570 nM (*Figure 20c*). De surcroît, ces molécules ont exprimé de très bons indices de sélectivité (> 100) à travers un test de cytotoxicité réalisé sur des cellules HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*). Les index de sélectivité correspondent au rapport entre la CI_{50} sur cellules HFF et la CI_{50} sur *P. falciparum* HB3.

A propos de leur structure chimique, ces hits comportent un squelette tétrahydro-β-carboline, également appelé tryptoline, et appartiennent plus globalement à la famille des β-carbolines. Il s'agit d'alcaloïdes dérivés du tryptophane largement retrouvés au sein de ressources naturelles. De structure indolique tricyclique, les β-carbolines sont différenciées en fonction de leur niveau de saturation : les β-carbolines insaturées, les 3,4-dihydro-β-carbolines (DHβC) partiellement saturées et les 1,2,3,4-tétrahydro-β-carbolines (THβC) ou tryptolines, chimiquement connues sous le nom 9H-1,2,3,4-tétrahydropyrido(3,4-β)-indoles, entièrement saturées (*Figure 21*). Les différentes positions de leur squelette tricyclique peuvent être substituées, ce qui leur confère une grande diversité chimique.[67] Déjà retrouvés dans divers médicaments commercialisés, ces composés présentent de multiples propriétés biologiques incluant des propriétés antitumorales, antiparasitaires, antioxydantes, antimicrobiennes ou encore antidiabétiques,[68] faisant de ces molécules une base prometteuse pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments, notamment antipaludiques. Par conséquent, dans un processus de brevetabilité de nos hits et de nos futures molécules dérivées, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances quant aux β-carbolines décrites dans la littérature, et plus particulièrement pour celles comportant une activité contre *P. falciparum*.



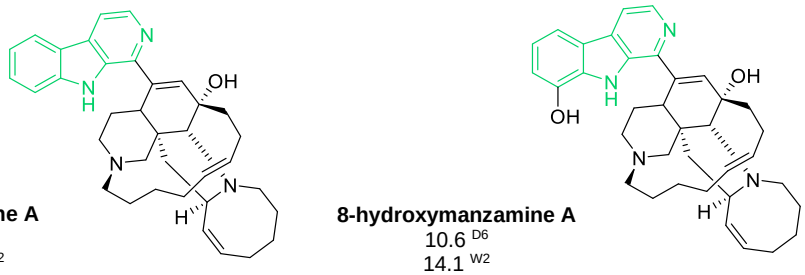
β-carbolines | **3,4-dihydro-β-carbolines (DHβC)** | **1,2,3,4-tétrahydro-β-carbolines (THβC) ou tryptolines**

Figure 21. Structures des β-carbolines

1.7. Les β-carbolines antipaludiques

Les structures β-carbolines comportant un effet antipaludique peuvent être classées en deux catégories : les β-carbolines naturelles et les β-carbolines synthétiques. Les β-carbolines naturelles, notamment extraites de plantes, bactéries, champignons ou organismes marins et présentant une activité antipaludique se sont révélées nombreuses. Parmi ces dernières, la manzamine A, isolée à partir de l'éponge marine d'*Okinawa* (*Haliclona* spp) en 1986, présente une structure complexe caractérisée par une β-carboline liée à un anneau diamine pentacyclique avec des cycles à huit et treize membres sur une structure pyrrolo[2,3-*i*]isoquinoline (*Figure 22*).[69–71] La manzamine A a été à l'origine de la découverte de plus de cent nouveaux alcaloïdes naturels appartenant à la famille des manzamines. Tous ont été isolés à partir de différentes espèces d'éponges marines provenant des océans Indien et Pacifique et beaucoup d'entre eux ont démontré une activité inhibitrice significative contre des souches de *P. falciparum* sensible (PfD6) et résistante (PfW2) à la chloroquine.[70,71] Les

deux composés les plus puissants, la manzamine A et la 8-hydroxymanzamine A (*Figure 22*), comportant des CI_{50} de 8 et 11 nM sur PfD6 et de 15 et 14 nM sur PfW2 respectivement, ont également fait l'objet d'études *in vivo* contre *P. berghei*. Après seulement une dose par voie intrapéritonéale à des souris infectées, 27,4 mg/kg pour la manzamine A et 56,5 mg/kg pour la 8-hydroxymanzamine A, une inhibition de plus de 90% des stades érythrocytaires asexués de *P. berghei* a été observée. De plus, le suivi du taux de mortalité au cours du temps a révélé une augmentation du nombre de jours de survie à plus de 10 jours pour les deux composés, comparé à seulement 2 jours pour l'artémisinine et 6 pour la chloroquine à 28,2 et 32 mg/kg respectivement. La manzamine A a également permis de réduire la parasitémie par voie orale à une dose de 55 mg/kg.[70,72]

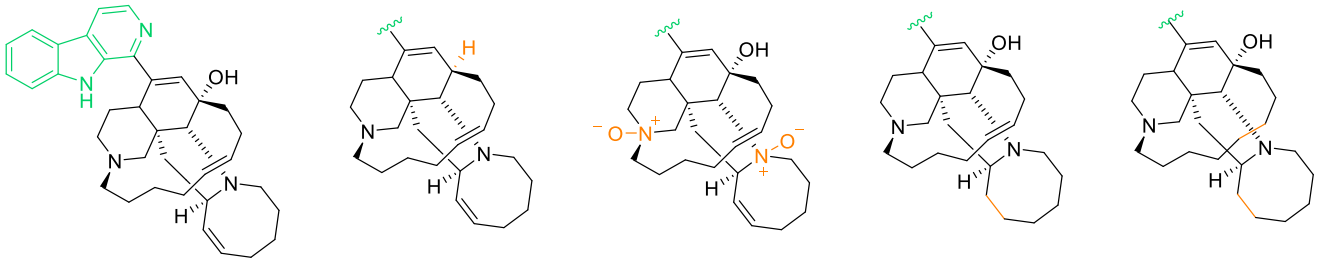


Manzamine A
8.2 ^{D6}
14.6 ^{W2}

8-hydroxymanzamine A
10.6 ^{D6}
14.1 ^{W2}

Figure 22. Structures de la manzamine A et de la 8-hydroxymanzamine A extraits d'éponges marines et leurs CI_{50} *in vitro* sur *P. falciparum* souche D6, notée ^{D6}, et souche W2, notée ^{W2}, exprimées en nM.

Ainsi, suite à la démonstration de l'activité antiparasitaire de ces alcaloïdes naturels, différents analogues de la manzamine A ont été synthétisés et testés *in vitro*. Les modulations effectuées concernent principalement la partie pentacyclique (*Figure 23*) et la partie β-carboline sur les positions C_3, C_6, C_8 et N_9 (*Tableau 4*). Cependant, aucune des modulations n'a permis d'améliorer l'inhibition de la croissance parasitaire de *P. falciparum*.[70,71]



Manzamine A

Dehydromanzamine A
225 ^{D6}
4128 ^{W2}

Dérivé *N,N*-oxyde
29 ^{D6}
115 ^{W2}

Réduction de l'insaturation en C_{32}
363 ^{D6}
3267 ^{W2}

Réduction des insaturations en C_{15} et C_{32}
148 ^{D6}
2713 ^{W2}

Figure 23. Dérivés de la manzamine A par modulations de la partie pentacyclique et leurs CI_{50} sur *P. falciparum* souches D6 et W2, exprimées en nM

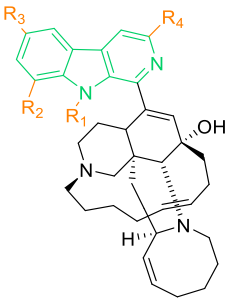
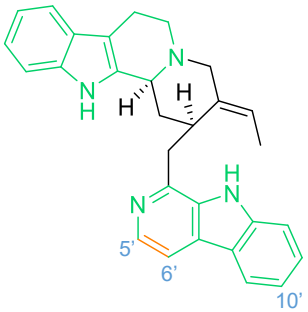
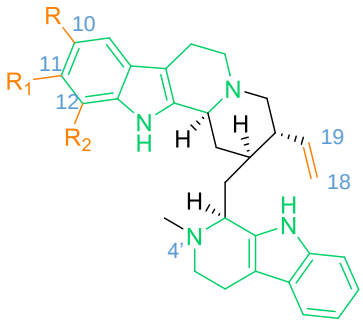
Composés manzamines synthétiques		R_1	R_2	R_3	R_4	CI_{50} sur *Pf* (nM)	
						Souche D6	Souche W2
	Manzamine A	H	H	H	H	8	15
	6-nitromanzamine A	H	H	NO_2	H	30	47
	6-methoxymanzamine A	H	H	OMe	H	48	100
	6-acetamidemanzamine A	H	H	NHCOMe	H	2128	3276
	6-propionamidemanzamide A	H	H	NHCOEt	H	1874	3129
	8-nitromanzamine A	H	NO_2	H	H	522	690
	8-methoxymanzamine A	H	OMe	H	H	64	81
	8-acetoxymanzamine A	H	OCOMe	H	H	48	49
	8-acetamidemanzamine A	H	NHCOMe	H	H	300	381
	8-propionamidemanzamide A	H	NHCOEt	H	H	198	140
	8-butyramidemanzamide A	H	NHCOPr	H	H	55	191
	8-pentanamidemanzamide A	H	NHCOBu	H	H	81	75
	9-*N*-methylmanzamine A	Me	H	H	H	3375	1776
	9-*N*-ethylmanzamine A	Et	H	H	H	243	815
	9-*N*-isobutylmanzamine A	iBu	H	H	H	66	132
	3-methylestermanzamine A	H	H	H	COOMe	17	24

Tableau 4. Dérivés de la manzamine A par modulations de la partie β-carboline et leurs CI_{50} sur *P. falciparum*

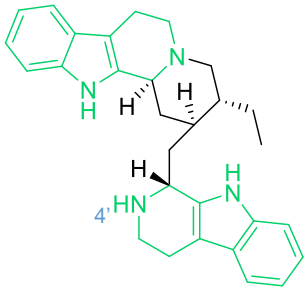
Comme pour les alcaloïdes manzamines, des alcaloïdes indoliques extraits de diverses espèces de *Strychnos* ont été évalués sur des souches de *P. falciparum in vitro*. Parmi eux, une famille d'usambarines a été isolée à partir des écorces, racines ou feuilles de *Strychnos usambarensis*.[73] Les usambarines sont des composés constitué d'un dimère de β-carbolines saturées ou insaturées (*Figure 24*). Elles présentent des activités puissantes contre *Plasmodium* avec des CI_{50} comprises entre 117-5045 nM et 32-3919 nM contre les souches chloroquinosensible PfFCA20 et chloroquino-résistante PfW2 respectivement. Les composés les plus actifs de la série sont caractérisés par un certain degré de basicité. Par exemple, l'ochrolifuanine A dont l'azote en position N'_4 est libre est plus active que l'usambarine dont ce même azote est méthylé. De surcroît, la strychnopentamine et son isomère isostrychnopentamine sont vingt fois plus puissantes que leur analogue usambarine grâce à la présence d'un azote basique supplémentaire au sein du cycle



Usambarensine
Dihydrousambarensine : 5',6' dihydro
10'-hydroxyusambarensine : 10' OH
Methylusambarensine : N_4 Methyl



Usambarine : R = R_1 = R_2 = H
Dihydrousambarine : 18,19 dihydro, R = R_1 = R_2 = H
10-hydroxyusambarine : R = OH, R_1 = R_2 = H
11-hydroxyusambarine : R_1 = OH, R = R_2 = H
10-hydroxydihydrousambarine : 18,19 dihydro, R = OH, R_1 = R_2 = H
11-hydroxydihydrousambarine : 18,19 dihydro, R_1 = OH, R = R_2 = H
Strychnopentamine : R_1 = OH, R = H,
R_2 =



Ochrolifuanine A

Isostrychnopentamine : R_1 = OH, R = H,
R_2 =

Figure 24. Structures d'alcaloïdes usambarines extraits de *Strychnos usambarensis*

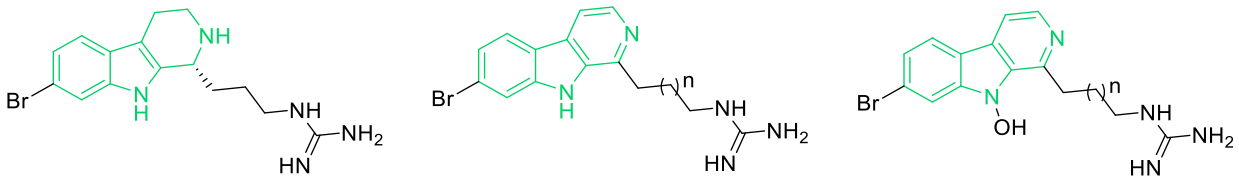
pyrrolidine sur la position C_{12} (*Tableau 5*).[73–75] Il est également intéressant de noter que la dihydrousambarensine inhibe de manière trente fois plus élevée la croissance de la souche résistante de *P. falciparum* (857 nM sur PfFCA20 vs. 32 nM sur PfW2). [75] Par ailleurs, la cytotoxicité des composés les plus actifs a été évaluée sur une lignée cellulaire humaine de cancer du côlon (HCT-116), démontrant la sélectivité de la famille vis-à-vis de *Plasmodium* avec des index de sélectivité allant de 14 à 375 (*Tableau 5*). [75,76]

Composés extraits de *Strychnos*	CI_{50} sur *P. falciparum* (nM)		Index de sélectivité	
	Souche FCA20	Souche W2	HCT-116/FCA20	HCT-116/W2
Usambarensine	1516	594	/	/
Dihydrousambarensine	857	32	14	375
10'-hydroxyusambarensine	1071	357	/	/
Méthylusambarensine	5045	3919	/	/
Usambarine	2501	2358	/	/
Dihydrousambarine	1247	1408	/	/
10-hydroxyusambarine	1134	1958	/	/
11-hydroxyusambarine	487	1538	/	/
10-hydroxydihydrousambarine	937	4699	/	/
11-hydroxydihydrousambarine	2864	5449	/	/
Strychnopentamine	117	145	/	/
Isostrychnopentamine	120	152	62	49
Ochrolifuanine A	118	492	136	33

Tableau 5. Activités *in vitro* d'alcaloïdes extraits de *Strychnos* sur *P. falciparum*

D'autre part, après isolement depuis l'espèce d'éponge marine *Ancorina* (Ancorinidae), une inhibition modérée de la croissance de *P. falciparum* par la (+)-7-bromotrypargine contre des souches sensible (Pf3D7) et résistante à la chloroquine (PfDd2) a été observée. La (+)-7-bromotrypargine, contenant une partie β-carboline avec une chaîne latérale guanidine (*Figure 25*), présente des CI_{50} de 3,5 µM (Pf3D7) et 5,4 µM (PfDd2). De plus, sa sélectivité vis-à-vis de *Plasmodium* a été démontrée suite à l'étude de sa toxicité sur une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293), sur laquelle ses index de sélectivité, toutefois assez faibles, sont de 23 (HEK293/Pf3D7) et de 15 (HEK293/PfDd2).[71,77]

Par la suite, les deux analogues opacalines A et B (*Figure 25*) ont été isolés de l'animal marin ascidie *Pseudodistoma opacum*. Leur évaluation biologique sur la souche K1 de *P. falciparum* résistante à la chloroquine a démontré une activité modérée de ces composés, avec des CI_{50} de 2,5 et 4,5 µM respectivement. De surcroit, de faibles cytotoxicités ont été mesurées sur une lignée cellulaire de myoblastes squelettiques de rat (L6), avec des concentrations entraînant 50% de mort cellulaire (CI_{50}) respectivement de 79 et 120 µM.[78]



(+)-7-bromotrypargine

Opacaline A
n = 2

Opacaline B
n = 2

Figure 25. Structures de la (+)-7-bromotrypargine et des opacalines A et B

Au vu des nombreuses β-carbolines antipaludiques trouvées dans la nature, ces structures ont été reproduites de manière synthétique et fonctionnalisées en incorporant différents groupements. C'est par exemple le cas des spiroindolones, composés synthétiques constitués d'une β-carboline reliée à une structure indole par un spiroatome central et comportant deux stéréocentres. La première spiroindolone, nommée ici Spiroindolone 1, a été identifiée par des méthodes de criblage phénotypique basées sur l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* au stade érythrocytaire, puis les relations structure-activité autour du racémique de celle-ci ont conduit à la Cipargamine (KAE609, NITD609). Elle comporte une CI_{50} de 0,9 nM contre la souche sauvage de *P. falciparum* PfNF54, soit une augmentation de l'activité antipaludique de plus de vingt fois par rapport au composé de départ Spiroindolone 1 (*Figure 26*). La puissance de la cipargamine est principalement due au remplacement du 5′-bromo par un 5′-chloro, à la formation d'un dérivé de tétrahydro-β-carboline suite à l'élimination d'un atome de carbone dans le cycle et à l'ajout d'halogènes sur le cycle indolique.[79,80] Il est à noter que cette dernière modulation a également permis d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de la molécule en protégeant son cycle indolique contre l'oxydation et ainsi diminuer sa clairance et améliorer sa demi-vie sur microsomes hépatiques.[79] De plus, les études de cytotoxicité réalisées sur différentes lignées de cellules mammaliennes n'ont démontré aucune toxicité de la cipargamine, ayant des CI_{50} toujours supérieures à 10 µM quelle que soit la lignée, soit des index de sélectivité supérieurs à 10 000.[79]

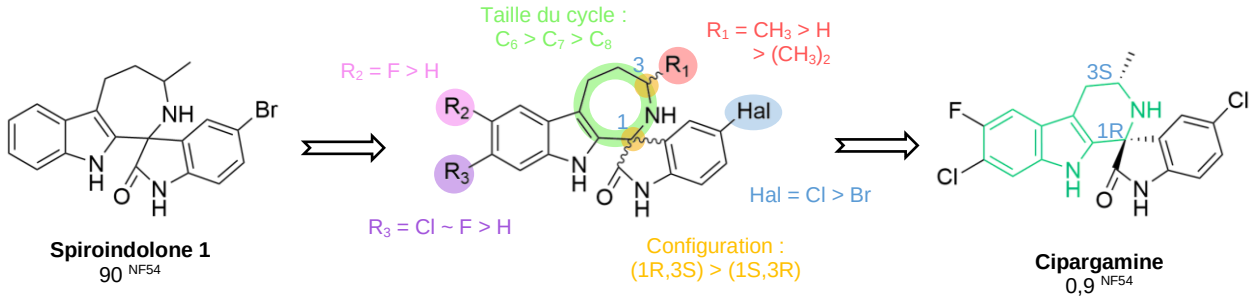


Figure 26. Relations structure-activité de spiroindolones sur PfNF54 (CI_{50} en nM)

La cipargamine, efficace oralement à une dose quotidienne de 30 mg/kg pendant trois jours chez des souris infectées par *P. berghei*, est aujourd'hui en essais cliniques de phase II.[80,81] Son mécanisme d'action est novateur : elle inhibe une ATPase de type P appartenant à la sous-classe 4, PfATP4, qui est spécifique aux organismes apicomplexes et absente chez les mammifères. PfATP4 agit comme une pompe à sodium en intervenant sur le transport d'ions Na^+ hors du parasite intra-érythrocytaire et d'ions H^+ en sens inverse pour maintenir les gradients électrochimiques à travers la membrane cellulaire (*Figure 27*). La cipargamine et les autres spiroindolones empêchent ainsi le pompage des ions sodium hors du parasite, ce qui perturbe l'homéostasie du sodium de *P. falciparum* (*Figure 27*).[67,79,82]

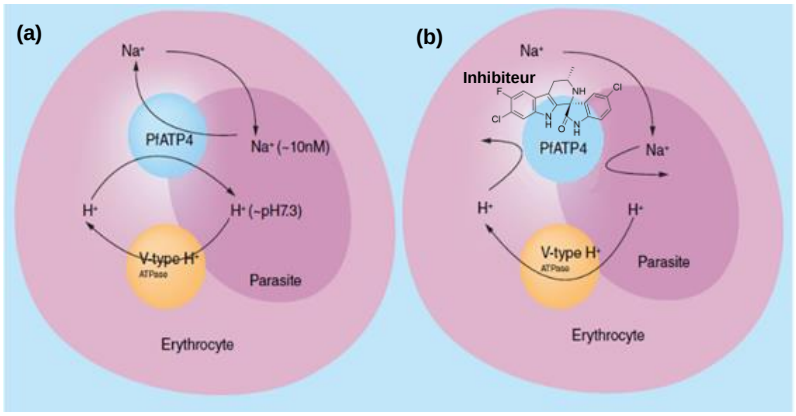


Figure 27. (**a**) Mécanisme d'action de PfATP4 dans la membrane plasmatique de *P. falciparum*. (**b**) Mécanisme d'action des spiroindolones (ici cipargamine) sur PfATP4. Adapté de Turner 2016.[79]

Une autre cible prometteuse pour le développement de composés antipaludiques est la protéine de choc thermique 90 de *P. falciparum* (*Heat shock protein 90*, PfHsp90) qui comporte des différences structurelles avec la Hsp90 humaine. Les protéines de choc thermiques, dont Hsp90 est l'une des plus abondantes chez les cellules eucaryotes, sont des protéines chaperonnes essentielles impliquées dans le repliement d'autres protéines, leur protection contre la dénaturation ou l'agrégation, la réparation de l'ADN ou encore l'expression des gènes. Ainsi, elles aident les protéines de *Plasmodium* à survivre aux changements soudains de température qui se produisent lors de la transmission de l'insecte vecteur aux mammifères, pouvant aller jusqu'à 10°C (*Figure 28a*).[67,83,84]

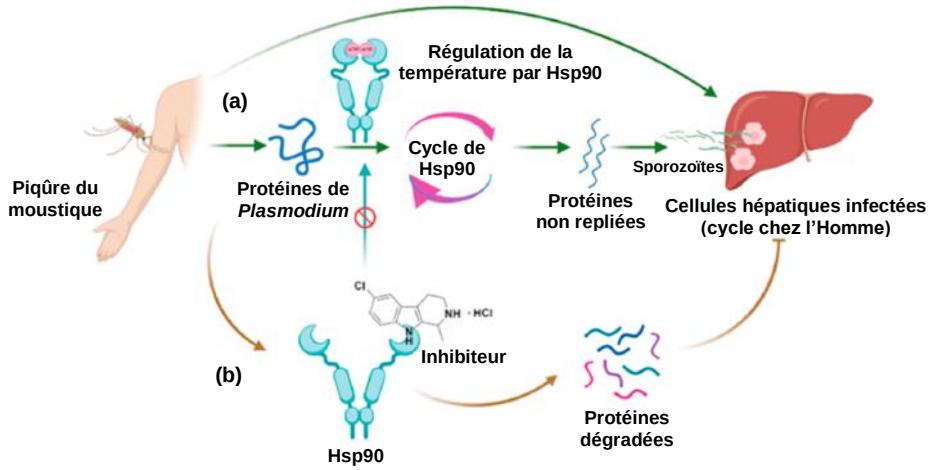


Figure 28. (**a**) Mécanisme d'action de PfHsp90 : régulation de la croissance et du développement des protéines de *Plasmodium* conduisant à l'infection hépatique. (**b**) Mécanismes d'action des dérives d'harmine : inhibition de PfHsp90 entrainant la dégradation des protéines de *Plasmodium* puis la destruction de son cycle de vie. Issu de Kushwaha 2023.[67]

L'harmine, un alcaloïde β-carboline isolé de *Peganum harmala*, est capable de se lier sélectivement au domaine de liaison de l'ATP de la PfHsp90 par rapport à l'orthologue Hsp90 humain avec une constante de dissociation (K_d) de 40 µM, tout en inhibant la fonction de la protéine (*Figure 28b*).[85] De plus, l'harmine inhibe la croissance de la souche 3D7 de *P. falciparum in vitro* avec une CI_{50} de 8,25 µM.[86] Afin d'améliorer les actions de l'inhibiteur sur PfHsp90, une première série de

composés dérivés de l'harmine a été synthétisée et a permis d'identifier le composé **Har1** ayant une affinité améliorée pour PfHsp90 (*Figure 29*).[83] Cependant, les modulations effectuées ont entraîné une diminution de l'inhibition de croissance de *P. falciparum in vitro*. Ainsi, une deuxième série de composés, supposés agir sur PfHsp90, a été synthétisée dans le but d'améliorer l'activité antipaludique de **Har1**. Ceci a conduit à la découverte du composé **Har2**, un inhibiteur trente-cinq fois plus puissant sur la souche Pf3D7 grâce à l'ajout d'un cycle aromatique en position C_1 ciblant une poche hydrophobe au sein du site de liaison de PfHsp90.[84,87] De surcroît, ce composé a montré une faible toxicité vis-à-vis d'une lignée cellulaire de fibroblastes humains (BJ) avec un index de sélectivité supérieur à 68 (*Figure 29*).[87]

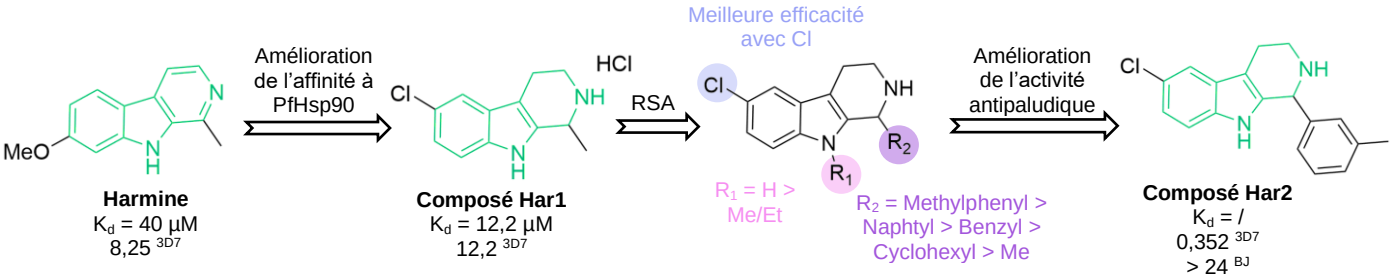


Figure 29. Résultats de relations structure-activité de composés dérivés d'harmine vis-à-vis de PfHsp90 (K_d) et de Pf3D7 (CI_{50} en µM) et de cytotoxicité sur cellules BJ (CI_{50} en µM)

L'importance du cycle aromatique en position C_1 a également été mis en évidence lors de relations structure-activité autour de dérivés de tétrahydroharmane. En effet, en présence de ce cycle aromatique, les dérivés étaient beaucoup plus actifs *in vitro*. De plus, l'étude des substitutions sur celui-ci par des groupements méthyls, halogènes ou nitro démontre que la monosubstitution en position para est préférable pour l'activité antiplasmodiale (*Figure 30*).[88]

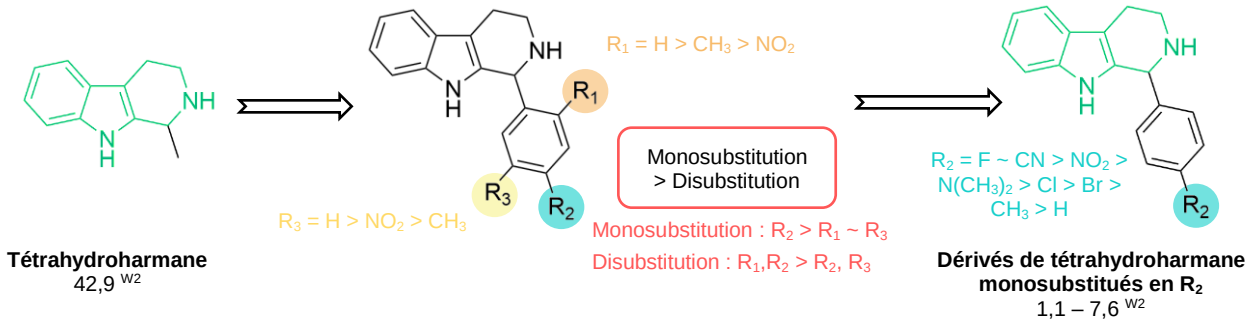


Figure 30. Résultats de relations structure-activité de β-carbolines dérivées du tétrahydroharmane et substituées par des aromatiques en position C_1 vis-vis de PfW2 (CI_{50} en µM)

Par ailleurs, une autre stratégie thérapeutique intéressante est de cibler la voie du phosphate de méthylérythritol (MEP) qui est absente chez l'homme mais qui est présente au sein de l'apicoplaste du parasite. Elle est responsable de la biosynthèse des isoprénoïdes chez *Plasmodium* : pyrophosphate d'isopenténylе (IPP) et pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP), qui sont essentiels pour sa croissance. Ainsi, un parasite dépourvu d'apicoplaste ne se développera pas, mais il peut être sauvé chimiquement par ajout d'IPP dans son milieu de croissance.[89,90]

Pour identifier des agents susceptibles d'inhiber la voie MEP, les composés de la Malaria Box ont été évalués *in vitro* sur la souche résistante Dd2 de *P. falciparum*, puis l'IPP a été ajouté pour vérifier le sauvetage ou non des parasites. La Malaria Box est l'ensemble des composés ayant une activité confirmée contre le stade sanguin de *P. falciparum*. Elle a été constituée par *Medecines for Malaria Venture* (MMV) jusqu'en 2014 dans l'objectif de favoriser la recherche et le développent de médicaments contre le paludisme.[91] Sur les 400 composés commercialisés qu'elle contient, seul le MMV008138 au squelette β-carboline qui avait une CI_{50} de 210 nM initialement, a permis le sauvetage des parasites après ajout d'IPP avec une CI_{50} largement augmentée dépassant les 50 µM.[89,90] Cet inhibiteur a donc été étudié plus précisément. Tout d'abord, une première étude a permis d'identifier sa cible : l'enzyme 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidylyltransférase (IspD).[89] La fonction de IspD, en présence de cytidine triphosphate (CTP), est de convertir le MEP en cytidinediphosphate méthylerythritol (CDP-ME) et en pyrophosphate (*Figure 31*), bloquant ainsi la biosynthèses d'isoprénoïdes lorsqu'elle est inhibée.

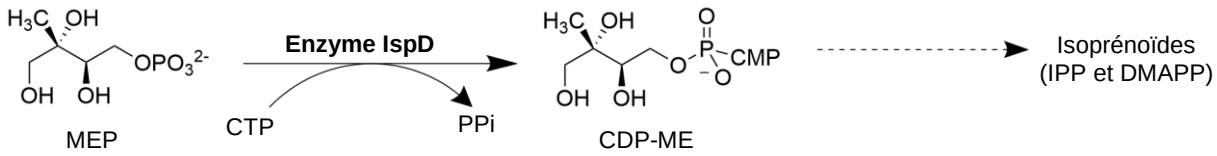


Figure 31. Schéma de la voie du phosphate de méthylérythritol (MEP) engageant l'enzyme IspD

Ensuite, les quatre diastéréoisoèmres de MMV008138 ont été synthétisés et testés *in vitro* comme précédemment, aboutissant à la caractérisation de l'isomère le plus actif de configuration *1R, 3S* (*Tableau 6*).[89,90] Enfin, l'étude des relations structure-activité autour de MMV008138 a notamment mis en évidence l'importance de la disubstitution en positions 2' et 4' du phényle D, l'importance de la jonction directe entre les deux cycles C et D et la perte de l'inhibition de croissance de *P. falciparum in vitro* suite à la méthylation des positions N_2, C_3 ou N_9 (*Figure 32*).[90,92,93]

MMV008138	CI_{50} sur *Pf* (nM)	% de sauvetage (+ 200 µM IPP)
	Souche Dd2	
Racémique	210	100 à 2,5 µM
(*1R,3S*)	250	100 à 2,5 µM
(*1S,3R*)	> 10 000	/
(*1S,3S*)	> 10 000	/
(*1R,3R*)	3 000	60 à 10 µM

Tableau 6. Activité inhibitrice de la croissance de *P. falciparum in vitro* et effet de la supplémentation en IPP des stéréoisomères du MMV08138 (composés à la concentration indiquée)

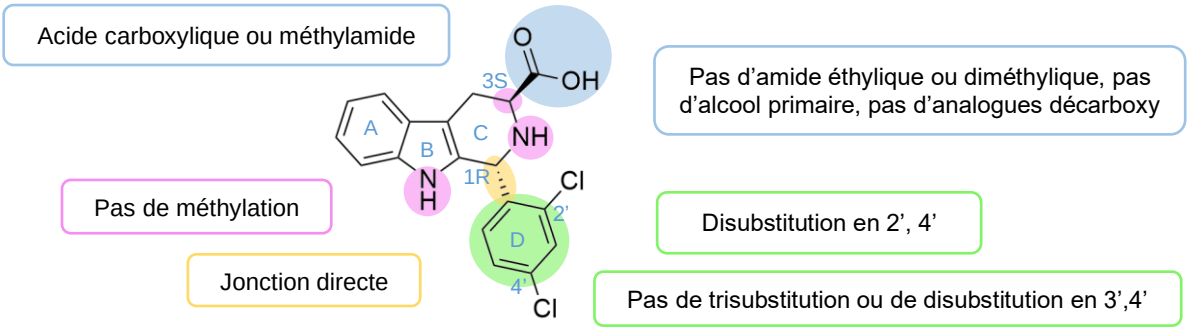


Figure 32. Résultats de relations structure-activité autour du hit MMV008138

En parallèle, une étude supplémentaire a confirmé l'importance de la stéréochimie *1R, 3S* et de la substitution aromatique en C_1. Effectivement, les dérivés substitués en position C_1 par des cycles aromatiques tels qu'une pyridine ou un benzo[1,3]dioxole ont conservé leur activité antipaludique, tandis que celui substitué par un n-octyle n'était plus actif *in vitro*. De surcroît, l'inhibition de croissance de *P. falciparum* était toujours meilleure avec les trans-diastéréoisomères *1R,3S* plutôt qu'avec les cis *1S,3S* (*Tableau 7*).[67,94,95]

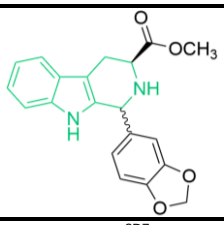
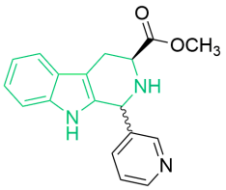
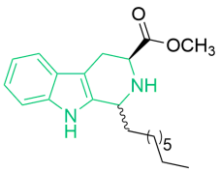
			
(*1R,3S*)	< 2,85 ^{3D7} < 2,85 $^{RKL-9}$	10,0 ^{3D7} 6,9 $^{RKL-9}$	25,7 ^{3D7} 28,6 $^{RKL-9}$
(*1S,3S*)	9,28 ^{3D7} 11,4 $^{RKL-9}$	15,7 ^{3D7} 17,0 $^{RKL-9}$	32,8 ^{3D7} 40,4 $^{RKL-9}$

Tableau 7. Dérivés de tétrahydro-β-carbolines avec modulation en C_1 et leur CI_{50} *in vitro* sur souches chloroquinosensible 3D7 et chloroquirésistante RKL-9 de *P. falciparum*, exprimées en µM

De la même façon, des analogues du tadalafil, un inhibiteur de la PDE5 humaine de squelette tétrahydro-β-carboline fusionné à une dicétopipérazine, ont été synthétisés dans le but d'inhiber les enzymes phosphodiestérases (PDE) chez *Plasmodium*. Ces enzymes, comportant des homologies de séquence avec la PDE5 humaine, catalysent l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), seconds messagers cellulaires essentiels pour la croissance et la différentiation des parasites.[67,96] Ainsi, en vue d'inhiber la croissance parasitaire, les analogues synthétiques du tadalafil ont été testés *in vitro* sur une souche chloroquinosensible de *P. falciparum* (PfGHA) et les relations structure-activité ont notamment démontré que la position N_2 pouvait être substituée par une benzylpipéridine (**2**) ou une benzylpyrrolidine (**3**) et que le composé le plus actif de la série était substitué sur cette même position par un *N*-(tert-butylethylcarbamate)pyrrolidine (**6**) (*Tableau 8*).[67,96]

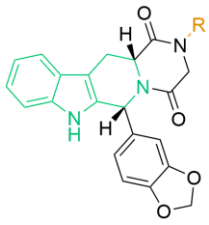
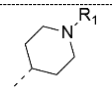
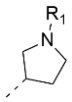
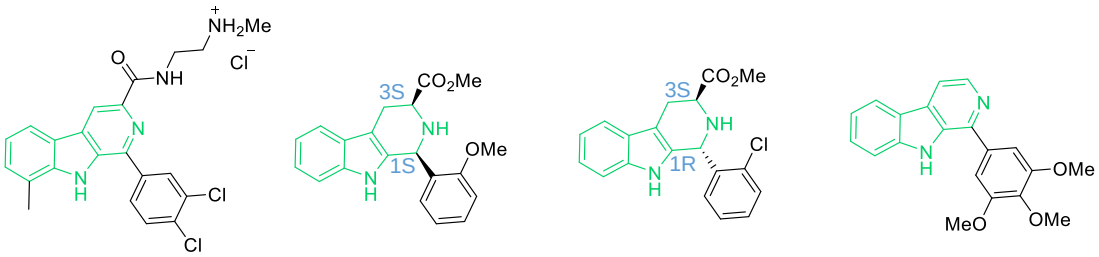
Composés dérivés du Tadalafil		R	R_1	CI_{50} sur *Pf* (nM)
				Souche GHA
	Tadalafil	Me	/	> 64 000
	Composé 1	H	/	> 64 000
	Composé 2		benzyl	1 000
	Composé 3		benzyl	500
	Composé 4		*N,N*-dimethylacetamide	2 000
	Composé 5		1,2-dimethyl-imidazole	800
	Composé 6		*tert*-butyl ethylcarbamate	220

Tableau 8. Résultats de relations structure-activité sur les analogues de Tadalafil les plus efficaces

Enfin, d'autres β-carbolines ont été identifiées avec un effet antipaludique et semblent prometteuses, telles que les composés **A**,[97] **B**, **C** et **D** par exemple (*Figure 33*).[98] Leurs cibles ne sont pas encore déterminées.



Composé A
108 nM ^{Dd2}

Composé B
710 nM ^{W2}

Composé C
607 nM ^{W2}

Composé D
501 nM ^{W2}

Figure 33. Autres β-carbolines comportant un effet antipaludique et leur CI_{50} sur PfDd2 ou PfW2

Pour finir, les β-carbolines sont également retrouvées au sein de molécules hybrides, liées chimiquement à un squelette d'antipaludique existant dans le but de former un seul agent antipaludique à double action. C'est par exemple le cas des harmicènes liant de manière covalente l'harmine vu précédemment avec le ferrocène, structure notamment retrouvée dans la ferroquine, par un triazole ou une liaison amide. L'activité *in vitro* des harmicènes, mesurée sur Pf3D7 et PfDd2, est de l'ordre du micromolaire et est plus prononcée que celle de l'harmine d'origine (*Figure 34*).[86] Le composé le plus actif de cette série (**Composé 102**) relie le C_7 de la β-carboline au ferrocène par un lien triazole et comporte des CI_{50} de 150 et 1020 nM sur Pf3D7 et PfDd2 respectivement. De plus, les harmicènes ont notamment été évalués sur la lignée cellulaire HepG2 et ont démontré une faible toxicité avec des CI_{50} allant de 5,5 µM à plus de 50 µM.[86]

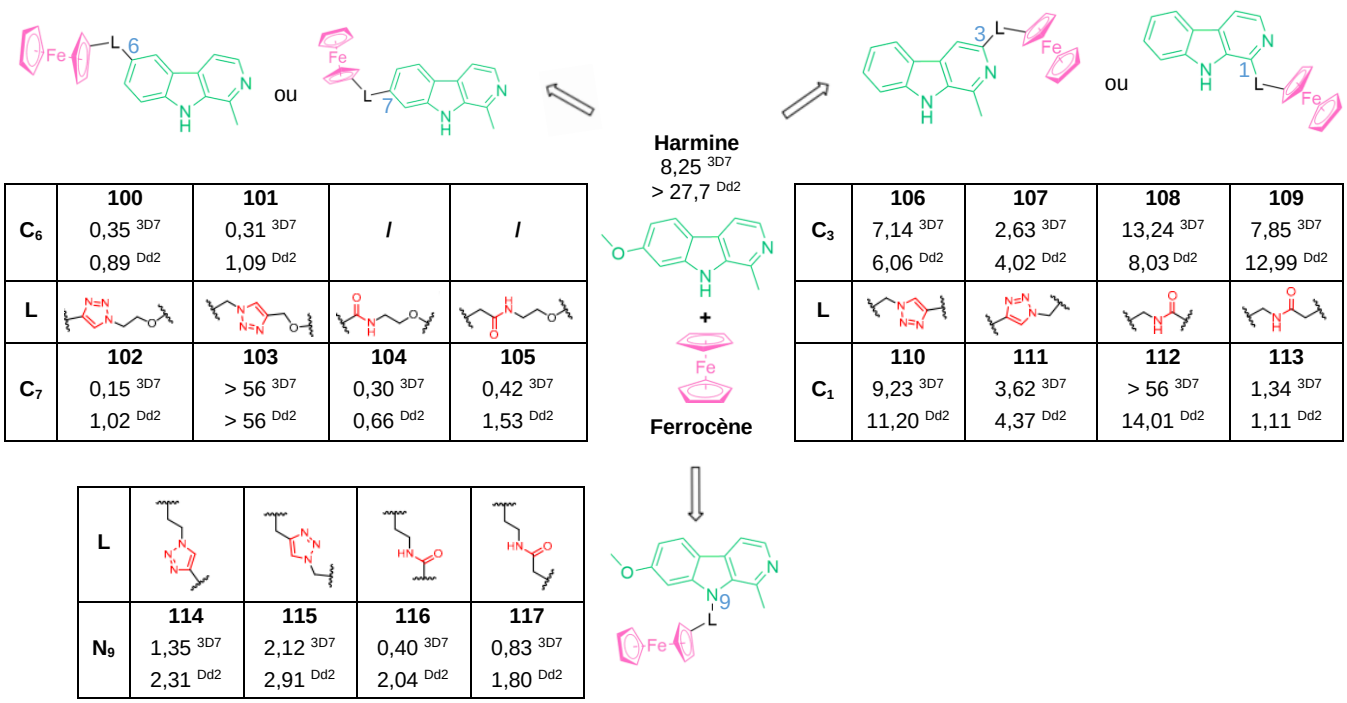
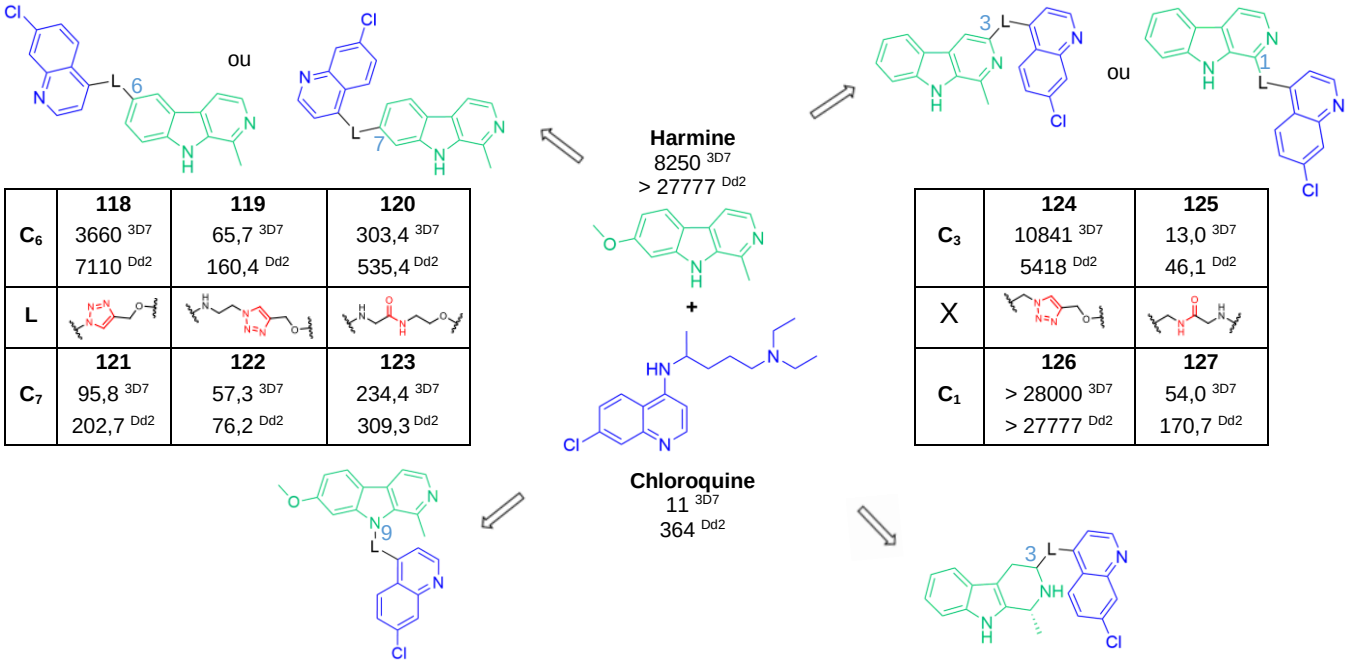


Figure 34. Relations structure-activité autour des dérivés hybrides harmicènes avec leurs CI_{50} sur Pf3D7 et PfDd2 exprimées en µM

Les harmiquines sont également des agents antiplasmodiaux à double action, liant l'harmine ou un dérivé d'harmine au noyau 7-chloroquinoléine de la chloroquine. Pour étudier les relations structure-activité de cette série, le noyau 7-chloroquinoléine a été incorporé sur différentes positions de la β-carboline via divers linkers : triazole, amide ou acyl-hydrazide. Le composé le plus actif (**Composé 132**), constitué d'un linker amide sur la position N_9 de la β-carboline, a montré une CI_{50} de 2 nM sur Pf3D7, soit 5,5 fois supérieure à celle de la chloroquine. Globalement, les meilleurs composés (CI_{50} < 20 nM sur Pf3D7) comportent tous un lien triazole ou amide en positions C_3 ou N_9 de la β-carboline (*Figure 35*).[99,100] De surcroît, après étude de leur cytotoxicité sur des cellules HepG2 confirmant des CI_{50} comprises entre 5 et 20 µM, ces composés ont montré une bonne sélectivité pour *Plasmodium*.[99]

Ainsi, au vu de l'ensemble des résultats de cette recherche bibliographique, les structures β-carbolines semblent prometteuses dans la lutte contre le paludisme. Cela nous conforte dans l'idée de continuer l'étude de notre hit **H1** et de ses dérivés **T1**, **T2**, **T3** et **T4**. D'ailleurs, le para-phénol substitué retrouvé dans la structure de ces derniers en position C_1 leur confère une originalité par rapport aux composés précédemment décrits. Dans le cadre d'un projet de dépôt de brevet, une nouveauté de la sorte est essentielle.



C_6	**118** 3660 3D7 7110 Dd2	**119** 65,7 3D7 160,4 Dd2	**120** 303,4 3D7 535,4 Dd2
L			
C_7	**121** 95,8 3D7 202,7 Dd2	**122** 57,3 3D7 76,2 Dd2	**123** 234,4 3D7 309,3 Dd2

C_3	**124** 10841 3D7 5418 Dd2	**125** 13,0 3D7 46,1 Dd2	
X			
C_1	**126** > 28000 3D7 > 27777 Dd2	**127** 54,0 3D7 170,7 Dd2	

L					
N_9	**128** 899,2 3D7 1816 Dd2	**129** 11,6 3D7 204,5 Dd2	**130** 19,0 3D7 54,8 Dd2	**131** 34,6 3D7 15,5 Dd2	**132** 2,0 3D7 16,2 Dd2

L					
n		n = 2	n = 3	n = 5	
C_3	**133** 5000 W2	**134** 2000 W2	**135** 3400 W2	**136** 1800 W2	**137** 1210 W2

Figure 35. Relations structure-activité autour des dérivés hydribes harmiquines avec leurs CI_{50} sur Pf3D7 et PfDd2 ou sur PfW2 exprimées en nM

2. Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse se situe dans un cadre rassemblant des équipes de biologistes (Équipe BAP, CIIL, Institut Pasteur de Lille) et de chimistes (Équipe BBC, Inserm UMR-S1172). L'objectif global est d'améliorer l'activité des molécules synthétisées vis-à-vis de *P. falciparum*, jusqu'à identification d'un candidat médicament potentiel. Pour cela, différentes tâches seront mises en œuvre comprenant :

- **La poursuite des relations structure-activité (RSA)**

  De nouveaux composés dérivants du squelette tétrahydro-β-carboline des hits **T1**, **T2**, **T3** et **T4** seront conçus et synthétisés puis seront évalués *in vitro*. D'une part, les concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) seront déterminées sur une souche de *P. falciparum* chloroquinosensible HB3 et sur la souche multirésistante Dd2. Subséquemment, l'effet cytotoxique des meilleurs composés (CI_{50} < 1 µM) sera évalué sur des cellules HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*) et HepG2 (*liver hepatocellular carcinoma cells*) dont la viabilité sera mesurée par la résazurine (Alamar Blue). Ces études nous permettront de calculer l'index de sélectivité et, ainsi, de sélectionner les molécules les plus actives et les moins cytotoxiques.

- **La séparation des énantiomères**

  Les tétrahydro-β-carbolines présentées, ou tryptolines, étant des composés asymétriques, leur synthèse donne accès à des mélanges racémiques. Ainsi, les racémiques présentant les meilleurs résultats lors des tests *in vitro* seront séparés par HPLC chirale préparative, puis, en cas de succès, chacun des énantiomères sera à nouveau évalué *in vitro*. Les résultats permettront de conclure sur une éventuelle énantiosélectivité vis-à-vis de l'activité antiplasmodiale. Enfin, en fonction des résultats, des méthodes de synthèses diastéréosélectives seront employées pour synthétiser directement l'énantiomère actif.

- **L'étude de la cible PfPPM9**

  La protéine recombinante de PfPPM9 entière (83 kDa) sera produite en bactéries *E. coli* BL21 et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel. L'inhibition de son activité enzymatique par les nouvelles molécules anti-plasmodiales synthétisées sera mesurée par le test au vert de Malachite et servira à valider ou non cette phosphatase comme étant la cible de nos hits.

- **Les études pharmacocinétiques**

  Dans le cadre d'un développement de médicaments, il est indispensable d'étudier le devenir des composés après leur administration dans l'organisme. Ainsi, les molécules les plus intéressantes seront analysées lors d'études pharmacocinétiques réalisées chez des souris CD1, ce qui permettra d'obtenir leurs paramètres pharmacocinétiques essentiels tels que leur demi-vie ($t_{1/2}$), leur volume de distribution (V_d) ou leur concentration maximale (C_{max}). Ces données indispensables, analysées en collaboration avec l'équipe GRITA (Groupe de Recherches sur les formes Injectables et les Technologies Associées, EA 7365), permettront de mettre en place des protocoles pour évaluer les molécules dans un modèle animal de paludisme comme la voie d'administration, la dose et la fréquence.

❖ **Les études d'efficacité *in vivo***

Finalement, l'objectif définitif de cette thèse est d'obtenir des composés suffisamment attrayants pour être évalués *in vivo* dans un modèle animal de paludisme. Pour ce faire, leur efficacité sera déterminée chez des souris « humanisées » NOD-*scid IL-2Rγ*^{null} greffées avec des érythrocytes humains et infectées par *P. falciparum*,[101] en employant la méthode de Peters.[102] Cela signifie que la parasitémie sera quantifiée suite à l'administration de la drogue durant quatre jours consécutifs, selon la voie, la dose et la fréquence définies à l'étape précédente. Ces expériences seront sous-traitées chez la société TAD (The Art of Discovery, Derio-Bilbao, Espagne).[103] De plus, l'efficacité des hits sera également évaluée au sein de notre laboratoire chez des souris CD1 infectées par *P. berghei* en suivant la même méthode.

3. Poursuite des relations structure-activité (RSA)

3.1. Pharmacomodulations envisagées

Le premier objectif de cette thèse consiste à poursuivre les études de relations structure-activité (RSA) initiées autour du squelette tétrahydro-β-carboline dans le but d'améliorer l'activité des molécules synthétisées vis-à-vis de *P. falciparum*. Pour cela, différentes pharmacomodulations du squelette ont été proposées. Tout d'abord, suite aux premières modulations déjà effectuées, l'exploration des poches hydrophobes du site catalytique a été poursuivie en homologuant la chaîne sur la position 5 du cycle indolique (R_1 = H, Me, Et, Pr, *i*Pr, *n*-Bu, *tert*-Bu, Pent, Hex), mais également en substituant cette position par des groupements plus volumineux et/ou oxygénés tels que des benzyl (Bn), benzyloxy (BnO), cyclohexylmethoxy (cyHexCH_2O), propyloxy (PrO) et adamantane-éthoxy (tricy$C_{10}H_{16}(CH_2)_2O$)(*Figure 36*). Pour des raisons de simplicité, l'adamantane-éthoxy sera noté Adm$(CH_2)_2O$. Tout cela a été effectué en gardant un brome, un chlore ou un naphtalène en position R_2 du cycle benzénique, modulations présentant les meilleurs résultats en termes d'activité antiplasmodiale. De même, un phényl (Ph), groupement plus volumineux, a été testé sur cette même position. L'ensemble des modulations sur R_1 et R_2 permettra d'examiner les effets de l'encombrement et/ou de l'aromatisation apportés au sein de ces cavités hydrophobes.

D'autre part, l'amine secondaire de la tryptoline a été substituée pour former un amide ou une amine tertiaire (R_3 = acétyle, méthyle) dans le but d'étudier si son caractère basique et donneur de liaisons Hydrogène était vraiment nécessaire à l'activité (*Figure 36*).

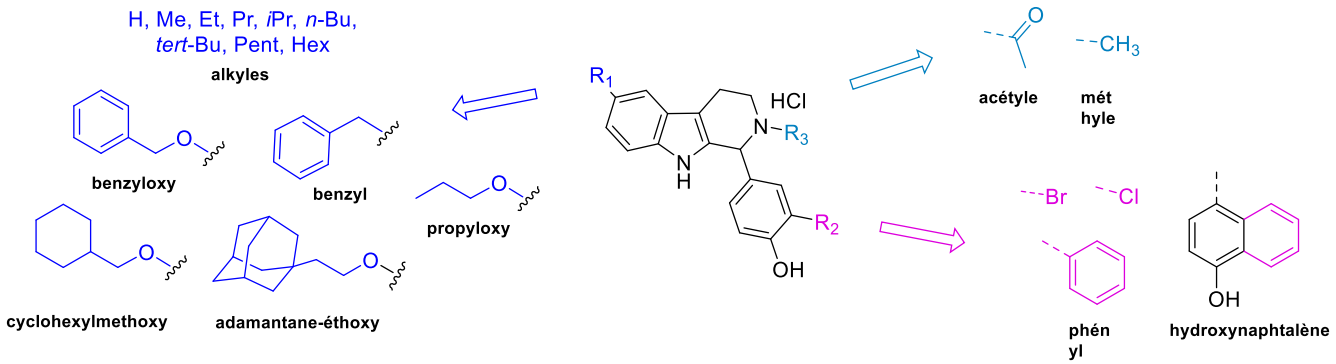


Figure 36. Pharmacomodulations réalisées sur le squelette tryptoline pour l'exploration des poches hydrophobes et de la nature de l'amine secondaire

Par ailleurs, la nature de la fonction phénol, supposée chélater un ion manganèse au sein du site catalytique, a été modifiée en introduisant des chélateurs dibendates tels que des hydroxyquinoléines (*Figure 37*). Cela permettrait d'améliorer la chélation et donc certainement l'activité antiplasmodiale. Par exemple, la 8-hydroxyquinoléine est connue pour ses propriétés antiseptiques, désinfectantes et pesticides,[104] tandis que les 2-hydroxyquinoléine et 1-hydroxyisoquinoléine sont connues pour limiter le métabolisme de phase II *in vivo*, tel que la glucuro-conjugaison des phénols grâce aux formes tautomères amide-iminol. Elles devraient ainsi améliorer

les propriétés pharmacocinétiques des molécules. Pour la même raison, le principe de bioisostérie a également été employé pour remplacer ce même motif phénol par un hétérocyclique de type benzoxazolinone (*Figure 37*). Celui-ci mime le pKa du phénol tout en limitant la formation de métabolites de phase II *in vivo*.

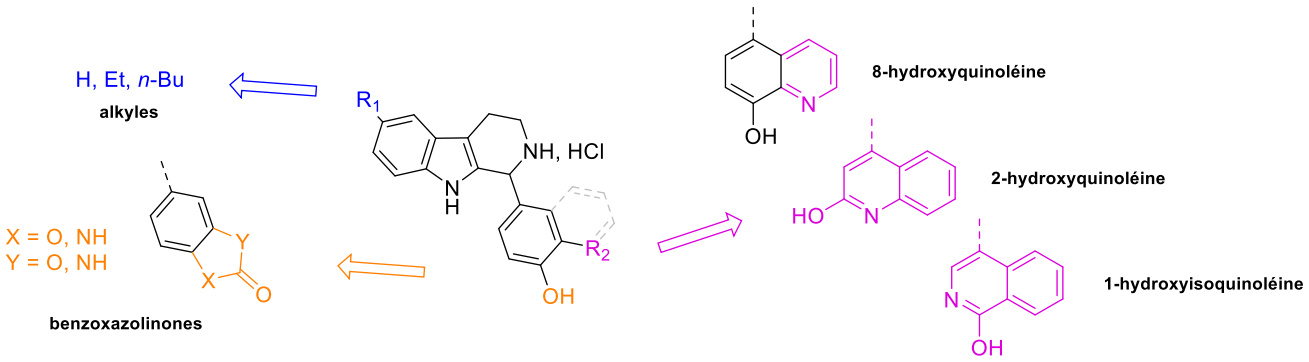


Figure 37. Pharmacomodulations réalisées sur le squelette tryptoline pour remplacer le phénol

3.2. Stratégies générales

La stratégie de synthèse employée pour ces composés tryptolines repose sur l'étape clé de la réaction de Pictet-Spengler, associant un dérivé de tryptamine et un aldéhyde aromatique correctement substitués (*Schéma 1*).[105,106]

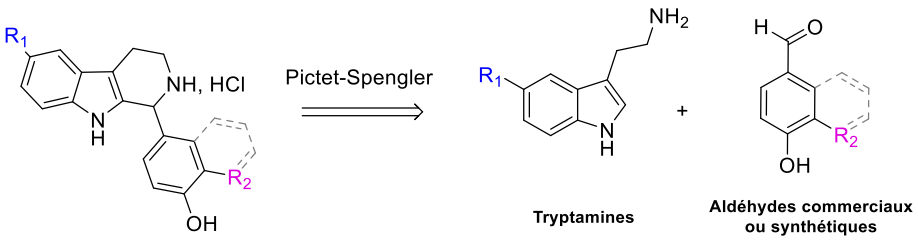


Schéma 1. Schéma rétrosynthétique pour la conception de tryptolines

3.2.1. Synthèse des tryptamines

Classiquement, les dérivés de tryptamine (**8a-l**) sont synthétisés en deux étapes suite à la réaction de Fischer entre les chlorhydrates de phénylhydrazine (**2a-l**) et l'aldéhyde butyrique protégé (**6**), suivie de l'hydrazinolyse du phtalimide régénérant l'amine primaire (*Schéma 2*).[106] Par une réaction de diazotation puis une réduction au chlorure d'étain, les anilines commerciales (**1a-l**) permettent d'aboutir aux chlorydrates de phénylhydrazines (**2a-l**). L'aldéhyde butyrique protégé provient du réactif commercial 4,4-diethoxybutylamine (**3**) sur lequel la protection de l'amine primaire est réalisée à l'aide d'anhydride phtalique (**4**) par distillation azéotropique d'eau dans le toluène au reflux en présence de triéthylamine. L'acétal (**5**) est ensuite déprotégé en présence d'acide chlorhydrique 1N permettant d'accéder à l'aldéhyde correspondant (**6**).

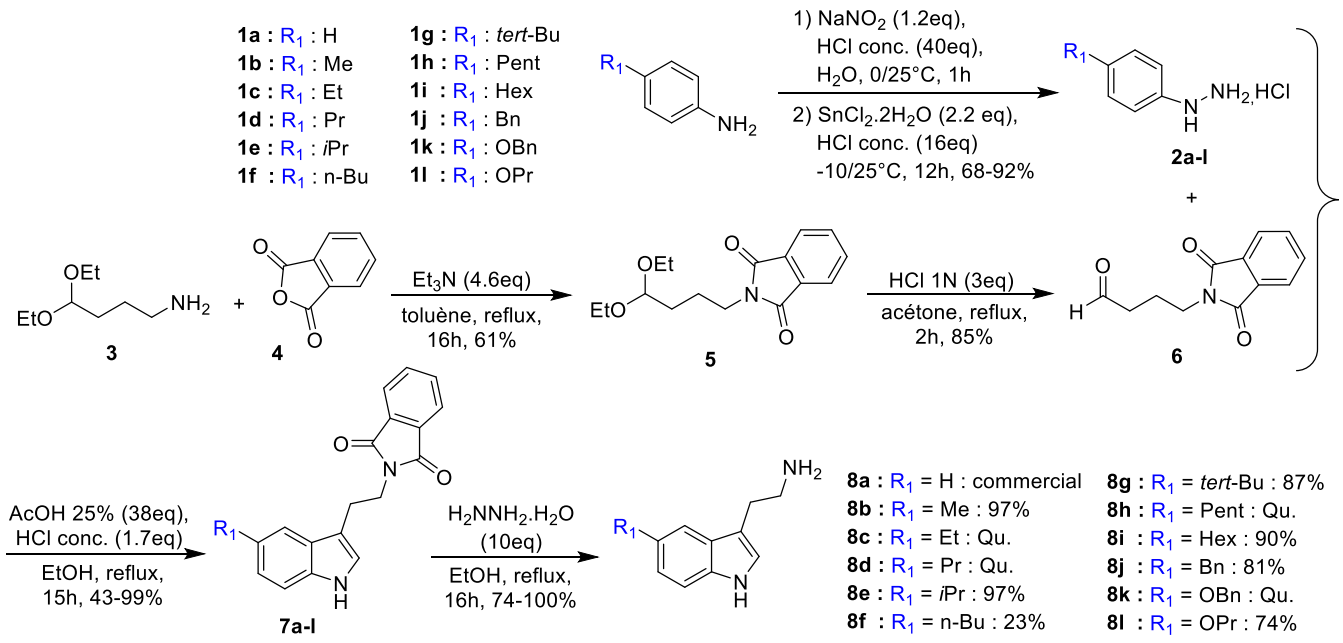


Schéma 2. Schéma de synthèse des dérivés de tryptamine

Par ailleurs, la synthèse de tryptamines comportant des cycloalkyles sur leur position 5 a nécessité deux étapes supplémentaires. En effet, les tryptamines protégées sous forme de phtalimide avec R_1 = cyHexCH_2O ou Adm$(CH_2)_2O$ se dégradent lors des purifications suite à la réaction de Fischer. De ce fait, la 5-benzyloxytryptamine précédente protégée par un phtalimide (**7k**) est employée, sur laquelle l'hydroxyle est d'abord déprotégé par une réaction d'hydrogénolyse, expérimentée dans différentes conditions (*Schéma 3* et *Tableau 9*).

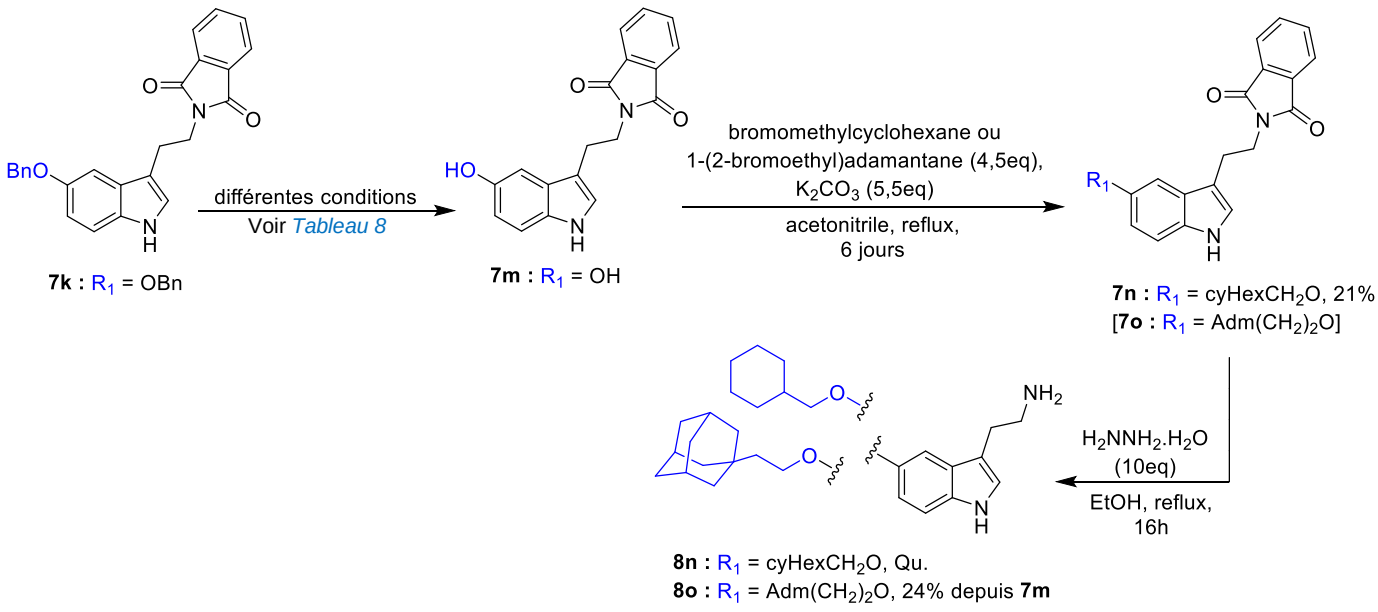


Schéma 3. Schéma de synthèse des tryptamines avec R_1 = cyHexCH_2O ou Adm$(CH_2)_2O$

Conditions	Réactif	Catalyseur	Solvant	Température	Temps	Rendements
1	H_2	0,02 eq Pd/C 5% 0,2 eq Pd/C 10%	THF/MeOH 1:1	TA	5h	0%
2	H_2	0,2 eq Pd/C 10%	EtOAc	TA	31h	0%
3	7 eq formiate d'ammonium	0,5 eq Pd/C 10%	MeOH	40°C	18h	Traces + déprotection phthalimide
4	7 eq formiate d'ammonium	0,02 eq Pd/C 5% 0,2 eq Pd/C 10%	THF/MeOH 1:1	45°C	25,5h	Traces
5	70 eq acide formique	0,4 eq Pd/C 10%	EtOH	45°C	28h	65%
6	42 eq acide formique	0,2 eq Pd/C 10%	EtOH	65°C	2h	83%

Tableau 9. Tableau des différentes conditions employées pour la réaction d'hydrogénolyse du benzyl sur la tryptamine **7k**

Étonnamment, l'hydrogénation catalytique avec du dihydrogène et du palladium sur charbon n'a pas fonctionné. D'autre part, l'emploi de formiate d'ammonium a provoqué la formation d'ammoniac nucléophile causant la déprotection indésirable du phtalimide, tandis que l'utilisation du THF comme solvant semble empêcher la réaction. Finalement, les meilleures conditions s'avèrent être de l'acide formique en présence de palladium sur charbon dans l'éthanol à 65°C (*Tableau 9*).

La suite de la synthèse consiste à alkyler convenablement la tryptamine hydroxylée en R_1 par une réaction de Williamson avec du bromométhylcyclohexane ou du 1-(2-bromoethyl)adamantane en milieu basique dans l'acétonitrile à reflux, puis l'hydrazinolyse du phtalimide reconstitue l'amine primaire (*Schéma 3*).[107] Il est à noter que la synthèse entière de la tryptamine comportant le cyclohexylmethoxy est le résultat du travail de Zoé Weber, stagiaire de niveau Master 2 sous mon encadrement. De même, la synthèse de la tryptamine avec R_1 = PrO présentée précédemment a été accomplie par Paul Blanchard, stagiaire de niveau Master 1 et quatrième année de pharmacie, également sous mon encadrement.

3.2.2. Synthèse des aldéhydes aromatiques

Quant aux aldéhydes aromatiques d'intérêt, ils peuvent être commerciaux, comme les 3-bromo- et 3-chloro-4-hydroxybenzaldéhyde (**9a** et **9b**) et le 4-hydroxy-1-naphtaldéhyde (**9c**), ou synthétisés pour les autres. D'une part, le 4-hydroxy-3-phénylbenzaldéhyde (**9d**) est obtenu suite à une réaction de Suzuki sur le 4-hydroxy-3-iodobenzaldehyde (**10**) en présence d'acide phénylboronique et d'un catalyseur au palladium dans un mélange de dioxane et eau à reflux (*Schéma 4*).

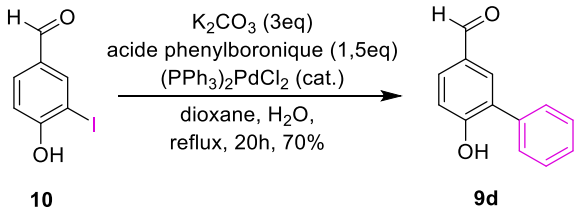


Schéma 4. Schéma de synthèse du 4-hydroxy-3-phénylbenzaldéhyde (**9d**, R_2 = Ph)

D'autre part, les aldéhydes benzoxazolinones sont le résultat de plusieurs étapes de synthèse. La benzoxazolinone comportant un aldéhyde en position 6 (2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carbaldehyde (**15a**)) est synthétisée à partir de l'acide 3-hydroxy-4-nitrobenzoïque commercial (**11**)(*Schéma 5a*),[108,109] dont l'acide est d'abord protégé par un ester (**12**) en présence de chlorure de thionyle et de méthanol. Ensuite, le groupement nitro est réduit par le formiate d'ammonium en présence de palladium sur charbon, puis la formation d'un carbamate sur l'amine correspondante est réalisée en présence de choroformiate d'éthyle et de triéthylamine, suivie par une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire du phénate dans le diméthylformamide au moyen de carbonate de potassium, menant à la cyclisation. Cette réaction est réalisée sans purification des intermédiaires de synthèse et conduit à la benzoxazolinone **13** avec un rendement de 82% sur les trois étapes. Enfin, l'ester méthylique est réduit en alcool (**14**) par un hydrure de lithium aluminium, permettant l'obtention de l'aldéhyde attendu (**15a**) après oxydation au périodinane de Dess-Martin.

De la même manière, la benzoxazolinone comportant l'aldéhyde en position 5 (2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-5-carbaldehyde (**15b**)) a été synthétisée à partir du 4-hydroxy-3-nitrobenzaldéhyde commercial (**16**) sur lequel l'aldéhyde est protégé par un acétal cyclique (**17**) à l'aide de 1,3-propanediol par distillation azéotropique d'eau dans le toluène au reflux en présence d'acide para-toluènesulfonique (*Schéma 5b*).[108] Les étapes de réduction et cyclisation sont similaires à la stratégie de synthèse de la benzoxazolinone **13**, puis la déprotection de l'acétal se produit *in situ* durant le traitement en milieu acide chlorhydrique (**15b**).

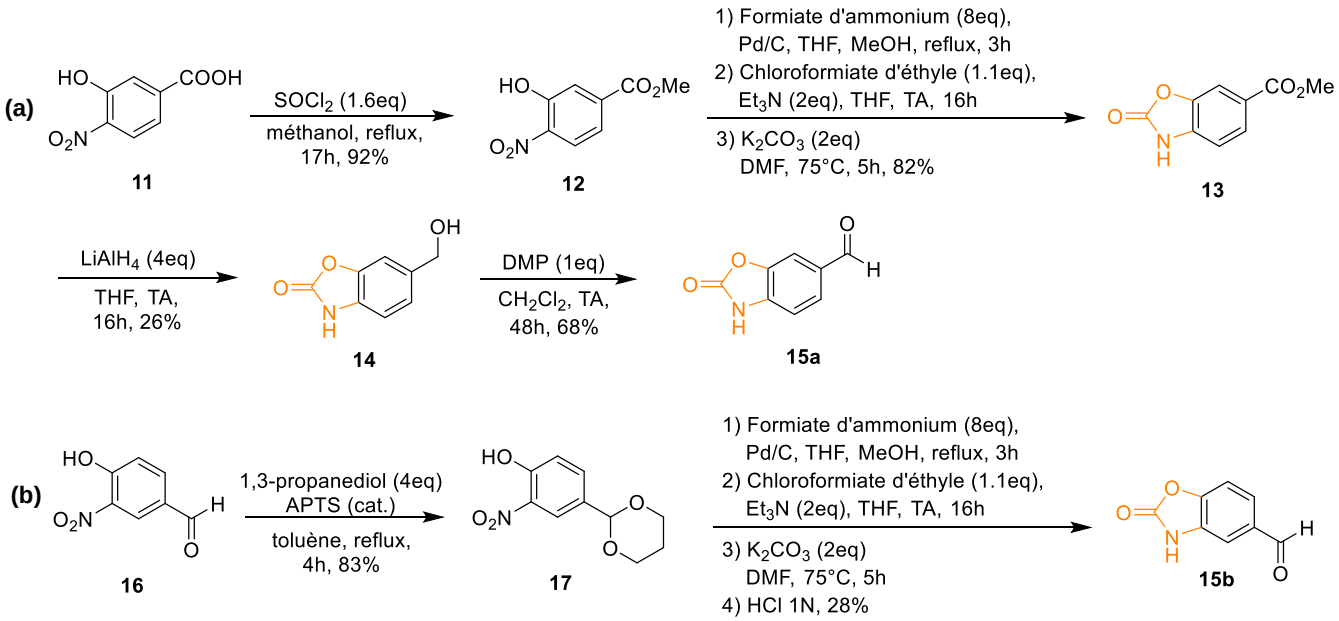


Schéma 5. Schémas de synthèse du (**a**) 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carbaldehyde (**15a**) et du (**b**) 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-5-carbaldehyde (**15b**)

Enfin, dans le cas des aldéhydes dérivés des hydroxyquinoléines, alors que la 8-hydroxyquinoline-5-carboxaldehyde (**20a**) est commerciale, les autres aldéhydes doivent également être synthétisés. L'aldéhyde **20b** est issu de la 1-hydroxyisoquinoléine (**18**) sur laquelle une addition de brome est réalisée en position 4 en présence de tribromure de pyridinium dans du dichlorométhane à température ambiante. Ensuite, après ajout de méthyllithium qui déprotone l'amide, puis de n-butyllithium permettant un échange métal-halogène, l'organo-lithien formé est piégé avec l'électrophile diméthylformamide, procurant l'aldéhyde attendu (*Schéma 6a*).[110] Quant à l'aldéhyde **20c**, il est synthétisé à partir de la 4-(bromomethyl)quinolin-2-one (**21**) sur laquelle une substitution nucléophile par l'acétate de sodium forme l'ester (**22**), hydrolysé en milieu basique pour produire l'alcool (**23**), lui-même oxydé par le dioxyde de manganèse (*Schéma 6b*).

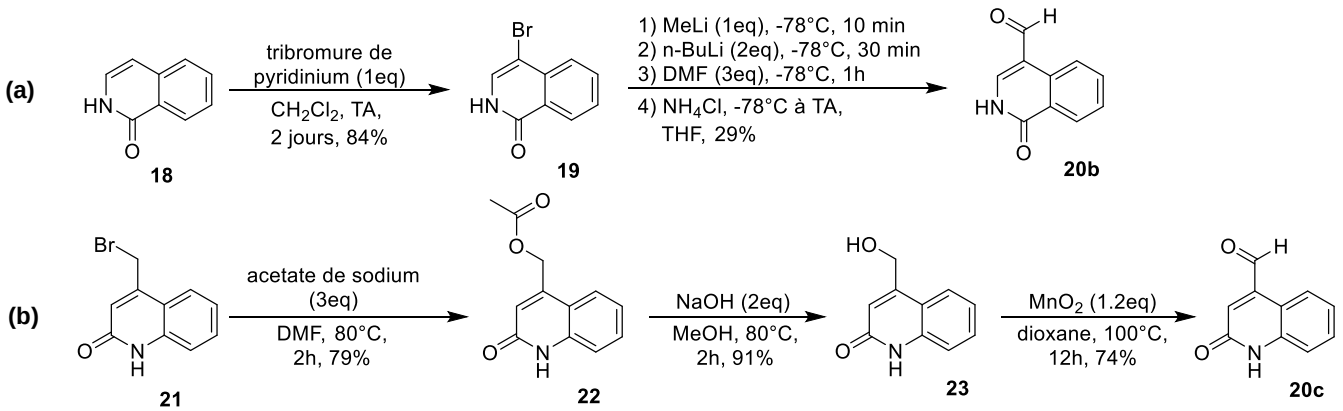


Schéma 6. Schémas de synthèse des aldéhydes dérivés des hydroxyquinoléines d'intérêts : (**a**) **20b** et (**b**) **20c**

3.2.3. Synthèse des tétrahydro-β-carbolines (tryptolines)

Pour finir, afin d'aboutir aux tryptolines souhaitées, le dérivé de tryptamine (**8**) et l'aldéhyde (**9**,**15**,**20**) sont liés par une réaction de Pictet-Spengler, nécessitant généralement un milieu acide. En effet, le mécanisme de la réaction de Pictet-Spengler (*Schéma 7*) passe dans un premier temps par la formation d'une imine suite à la condensation entre l'amine de la tryptamine et l'aldéhyde en milieu

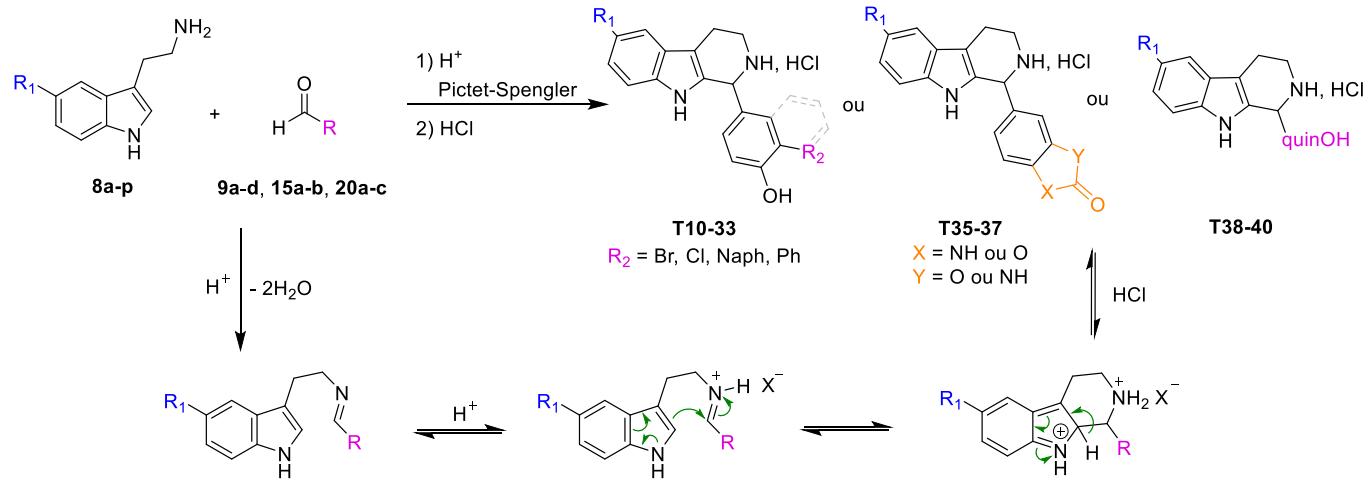
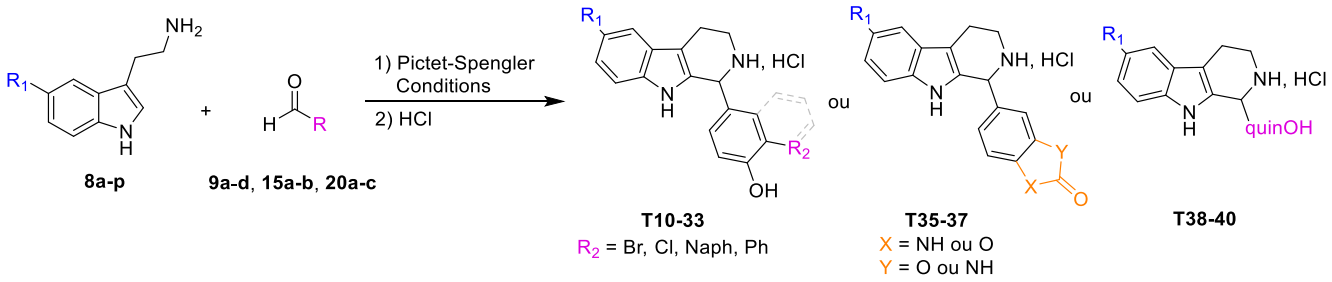


Schéma 7. Schéma du mécanisme réactionnel de la réaction de Pictet-Spengler en milieu acide

acide. Ensuite, après protonation et formation de l'ion iminium, un réarrangement permet une attaque nucléophile de la position 2 de l'indole sur le carbone électrophile de l'iminium puis la tryptoline désirée est finalement obtenue sous forme de sel (sel de trifluoroacétate, d'HFIP ou autre selon l'acide employé) après déprotonation. Ce sel est déplacé par ajout d'une solution d'éther saturé en acide chlorhydrique pour donner la tryptoline sous forme de sel de chlorhydrate.

Les premières conditions choisies furent acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane (*Tableau 10 entrée 1*), conditions les plus décrites dans la littérature [105,106,111,112] et permettant des traitements simplifiés du fait de la précipitation des tétrahydro-β-carbolines dans le milieu réactionnel. Malheureusement, ces conditions ne permettent pas une réaction totale et sont dépendantes des substrats. En effet, l'aldéhyde commercial 4-hydroxy-1-naphthaldehyde par exemple reste insoluble dans le dichlorométhane, ce qui a nécessité d'effectuer la réaction dans du chloroforme en présence de quelques gouttes de tétrahydrofurane. De plus, certaines tryptolines précipitent difficilement, compliquant leur traitement.



8a-p **9a-d, 15a-b, 20a-c** **T10-33** R_2 = Br, Cl, Naph, Ph **T35-37** X = NH ou O, Y = O ou NH **T38-40**

Conditions	Tryptamine	Dérivé carbonylé	Solvant	Acide	Température	Temps	Rendements
1	1 eq	1,1 eq	CH_2Cl_2	TFA	TA	5 jours	5-46 %
2	1 eq	1 eq	HFIP	/	60°C	16h	10-61 %
3	1 eq	1 eq	Pyridine	$ClSiMe_3$	60°C	24h	1-59 %

Tableau 10. Tableau regroupant les différentes conditions employées pour la réaction de Pictet-Spengler

D'autres conditions ont alors été envisagées, comme réaliser la réaction dans un tube scellé sous azote avec du 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)(*Tableau 10 entrée 2*),[113] qui joue à la fois le rôle de solvant et de catalyse acide. Effectivement, la faible acidité de l'HFIP permet de catalyser la formation de l'ion iminium suivit de sa cyclisation en tryptoline. Ces conditions se sont révélées très satisfaisantes dans le cas du substrat 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde, pour lequel les trypolines formées précipitent dans le milieu sous forme de sel d'HFIP et les rendements obtenus sont souvent supérieurs à 25%, contre seulement 15% avec les conditions précédentes.

En outre, la réaction de Pictet-Spengler a également été testée en présence de chlorotriméthylsilane dans la pyridine sous azote en tube scellé (*Tableau 10 entrée 3*). Le chlorotriméthylsilane réagit avec chaque hétéroatome dont le doublet non liant est disponible, augmentant ainsi le caractère électrophile de l'aldéhyde mais aussi le caractère nucléophile de l'amine primaire de la tryptamine. Comme explicité précédemment, suite à la formation de l'imine, un réarrangement électronique conduit à l'attaque nucléophile de la position 3 de l'indole sur le carbone électrophile, amenant à l'élimination de $(Me_3Si)_2O$ stable. L'intermédiaire spiranique formé est alors

réarrangé en tryptoline finale, tandis que la pyridine sert à capter l'acide chlorhydrique libéré (*Schéma 8*).[107] Finalement, ces conditions ont été les seules fonctionnelles à partir du substrat 4-hydroxy-1-naphthaldehyde et des aldéhydes hydroxyquinoléines et, même si les traitements sont laborieux, l'optimisation de ces derniers a permis d'atteindre des rendements allant jusqu'à 59%.

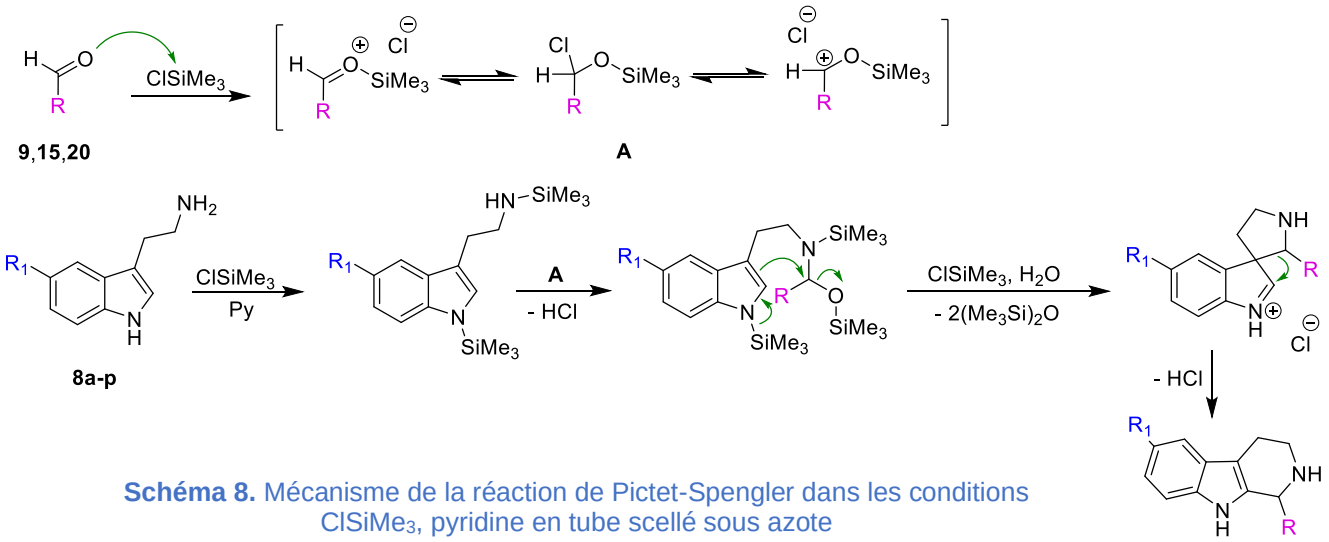


Schéma 8. Mécanisme de la réaction de Pictet-Spengler dans les conditions $ClSiMe_3$, pyridine en tube scellé sous azote

3.2.4. Évaluations *in vitro*

Les molécules synthétisées sont ensuite testées *in vitro*, en commençant par calculer les pourcentages d'inhibitions de croissance parasitaire à 10, 1 et 0,1 µM sur la souche de *P. falciparum* chloroquinosensible HB3. Pour celles présentant 100% d'inhibition à la concentration de 1 µM, les concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) sont déterminées sur cette même souche ainsi que sur la souche multi-résistante Dd2. Pour cela, l'inhibition de croissance parasitaire est évaluée grâce à la méthode au SYBR™ Green I.[114] Il s'agit d'une méthode rapide et non radioactive basée sur la mesure de fluorescence en une seule étape. Le SYBR Green est un intercalant de l'ADN qui devient fluorescent lorsqu'il interagit avec la double-hélice de l'ADN dans les noyaux. Il permet alors de détecter par fluorescence les noyaux de *Plasmodium* encore vivants et ainsi d'évaluer la parasitémie globale. Cette fluorescence est ensuite lue directement grâce à un échantillonneur automatique de cytomètre en flux (Attune Nxt). Finalement, une courbe de régression non linéaire dose-concentration est établie pour déterminer les concentrations inhibant 50% (CI_{50}) et 90% (CI_{90}) de la croissance parasitaire.

Ensuite, l'effet cytotoxique des meilleurs composés (CI_{50} < 1 µM) est évalué sur des cellules HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*) et HepG2 (*liver hepatocellular carcinoma cells*). La viabilité de ces cellules est quantifiée en mesurant leur activité mitochondriale par la résazurine (Alamar Blue™ HS). Il s'agit d'un composé non toxique, perméable aux cellules et de couleur bleue. Lorsqu'il est ajouté à des cellules vivantes, il est modifié par l'environnement de celles-ci. En effet, l'activité mitochondriale de la cellule réduit la résazurine en résorufine, composé de couleur rouge. Ce changement de couleur est détecté à l'aide d'un lecteur de plaque basé sur l'absorbance, dont la lecture s'effectue à 570 et 600 nm. Ces mesures indiquent le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue dans chaque puits, menant au pourcentage de viabilité cellulaire. Pour finir, une courbe de régression non linéaire dose-

concentration est établie comme précédemment, permettant de déterminer la concentration tuant 50% des cellules (CI_{50}). Finalement, les index de sélectivité, correspondant au rapport entre la CI_{50} sur cellules HFF ou HepG2 et la CI_{50} sur *P. falciparum* HB3 ou Dd2, sont calculés pour chaque composé, ce qui permet de sélectionner les molécules les plus actives et les moins cytotoxiques. L'ensemble des résultats est décrit dans le *Tableau 22* (*Annexe 2*).

3.3. Exploration des poches hydrophobes

Au vu des résultats préliminaires, les premières séries de pharmacomodulations ont montré que l'ajout d'un halogène ou d'un naphtalène (Cl, Br, Naph) en position R_2 sur le cycle benzénique augmentait l'activité antiparasitaire (**T5**, **T1**, **T4**)(*Tableau 11*). Ainsi, en gardant ces groupements, c'est la substitution de la position 6 de l'indole (R_1) qui a ensuite été modifiée, démontrant qu'une petite chaine carbonée, telle qu'un groupement éthyle était plus favorable (**T3**, **T2**, **T11**) en comparaison à la substitution par un chlore ou un méthoxy (**T6**, **T7**).

Dans le but d'améliorer l'activité antiparasitaire, l'objectif ici était d'explorer les poches hydrophobes en effectuant des homologations de chaînes carbonées (Me, Pr, *i*Pr, *n*-Bu, *tert*-Bu, Pent, Hex) en positon R_1, suite aux résultats satisfaisants obtenus avec l'éthyle. De plus, l'introduction de groupements plus volumineux sous forme d'un benzyl (Bn), benzyloxy (BnO), cyclohexylmethoxy ($cyHexCH_2O$) ou adamantane-éthoxy ($Adm(CH_2)_2O$) a aussi été envisagée afin d'explorer la profondeur de la poche ainsi que son caractère hydrophobe aromatique. De la même manière, l'ajout d'un phényl (Ph) en position R_2 a permis la poursuite de l'exploration de la seconde poche hydrophobe.

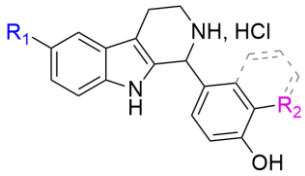


Tableau 11. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour l'exploration des poches hydrophobes suite à l'homologation de chaîne en position R_1

Composés			CI_{50} sur *P. falciparum* (nM)		CI_{50} sur cellules (µM)		IS 1	IS 2
Codes	R_1	R_2	Souche HB3	Souche Dd2	HFF	HepG2		
H1	Et	OH	1850 ± 120	1710 ± 960	42 ± 13	16 ± 2	22,9	8,9
T5	H	Cl	1470 ± 70	1223 ± 290	121 ± 16	74 ± 3	82,4	52,4
T1	H	Br	570 ± 250	530 ± 180	130 ± 32	67 ± 14	228,8	117,6
T4	H	Naph	460 ± 204	266 ± 65	47 ± 12	39 ± 2	102,2	84,0
T6	Cl	Br	500 ± 70	500 ± 140	84 ± 4	21 ± 1	168,2	42,3
T7	OMe	Br	1040 ± 410	506 ± 218	96 ± 6	55 ± 14	92,7	52,5
T8	Me	Cl	769 ± 238	470 ± 63	41 ± 4	36 ± 5	53,6	46,8
T9	Me	Br	749 ± 130	316 ± 44	37 ± 6	19 ± 1	49,8	25,5
T10	Me	Naph	315 ± 93	149 ± 14	17 ± 3	21 ± 2	54,7	65,4
T3	Et	Cl	340 ± 150	230 ± 50	44 ± 8	20 ± 1	128,8	59,9
T2	Et	Br	260 ± 120	140 ± 20	39 ± 3	17± 5	149,2	65,8
T11	Et	Naph	188 ± 6	75 ± 21	15 ± 2	16 ± 5	81,6	87,5

T12	Pr	Br	125 ± 23	102 ± 2	14 ± 4	5 ± 1	108,7	42,8
T13	Pr	Naph	72 ± 6	50 ± 12	18 ± 3	9 ± 1	243,3	117,7
T14	iPr	Br	151 ± 33	265 ± 45	10 ± 2	7 ± 3	62,9	47,7
T15	n-Bu	Cl	144 ± 98	75 ± 9	8 ± 1	7 ± 3	53,2	50,3
T16	*n*-Bu	Br	85 ± 26	92 ± 37	8 ± 3	7 ± 2	99,6	80,3
T17	*n*-Bu	Naph	25 ± 13	61 ± 25	10 ± 3	19 ± 3	407,3	765,9
T18	*tert*-Bu	Cl	94 ± 33	149 ± 12	8 ± 2	8 ± 3	89,1	83,9
T19	*tert*-Bu	Br	98 ± 20	76 ± 36	8 ± 1	7 ± 3	79,1	69,4
T20	*tert*-Bu	Naph	36 ± 8	33 ± 3	11 ± 2	10 ± 1	296,7	274,3
T21	Pent	Br	130 ± 50	83 ± 4	8 ± 1	4 ± 1	64,4	32,6
T22	Pent	Naph	28 ± 8	73 ± 14	7 ± 1	16 ± 3	262,2	569,9
T23	Hexyl	Br	30 ± 13	61 ± 7	8 ± 1	4 ± 1	252,8	146,3
T24	Hexyl	Naph	63 ± 12	159 ± 40	10 ± 2	36 ± 3	156,6	570,3
T25	Bn	Br	65 ± 16	64 ± 11	9 ± 2	17 ± 2	143,4	264,6
T26	Bn	Naph	39 ± 6	73 ± 14	7 ± 1	11 ± 1	174,5	284,1
T27	OBn	Br	83 ± 9	97 ± 11	23 ± 7	22 ± 3	274,5	262,1
T28	OBn	Naph	45 ± 12	104 ± 1	9 ± 1	21 ± 1	201,3	459,4
T29	cyHexCH_2O	Naph	133 ± 23	57 ± 8	8 ± 1	30 ± 7	60,1	228,6
T30	Adm$(CH_2)_2O$	Naph	43 ± 1	En cours	En cours	En cours	En cours	
T31	OPr	Br	199 ± 17	182 ± 4	21 ± 1	19 ± 4	106,4	94,7
T32	OPr	Naph	433 ± 38	/	64 ± 4	/	147,8	/
T33	*n*-Bu	Ph	10 ± 1	En cours	En cours	En cours	En cours	

Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse, **IS1 :** Index de sélectivité HFF/HB3, **IS2 :** Index de sélectivité HepG2/HB3

Les résultats obtenus pour les séries portant un atome de brome ou de chlore en position R_2 sont nettement améliorés lorsque la chaîne carbonée en position R_1 est plus allongée. Effectivement, les CI_{50} sont diminuées d'un facteur 25 en passant d'une chaîne méthylée (**T9**) à une chaîne hexyle (**T23**)(*Tableau 11*). Cela indique que la cavité hydrophobe est assez spacieuse pour recevoir de longues chaînes carbonées ou groupements hydrophobes plus encombrants. En outre, les composés bromés affichent dans tous les cas des CI_{50} équivalentes ou améliorées par rapport à leurs analogues chlorés.

Par ailleurs, l'ajout d'un naphtalène en position R_2 (**T4**) avait montré une augmentation de l'activité vis-à-vis de *P. falciparum*. En plus de cela, de la même façon que précédemment, l'ajout d'une chaîne carbonée plus longue en R_1 (**T10, T11**, **T13**, **T17**, **T20, T22, T24**) amène aussi à un accroissement de l'activité (*Tableau 11*). Néanmoins, les chaînes butyles et pentyle sont ici les plus optimales (**T17**, **T20, T22**) et une diminution de l'activité est observée avec l'ajout d'un sixième atome de carbone (**T24**). De plus, pour un même nombre de carbones, l'activité est moindre avec un *tert*-butyle (**T20**) qu'avec le *n*-butyle (**T17**), ainsi la flexibilité apportée par cette chaîne linéaire serait favorable à l'activité.

Suite à ces résultats très encourageants mettant en évidence des cavités spacieuses où peuvent se loger de longues chaînes carbonées en position R_1 ou un naphtalène en position R_2, une seconde série de pharmacomodulations comprenant des groupements hydrophobes volumineux, aromatiques ou cycloalkyles, a été entreprise dans le but de continuer à examiner l'étendue des poches hydrophobes. L'évaluation *in vitro* de ces nouveaux composés sur *P. falciparum* démontre que l'introduction de noyaux aromatiques sous la forme d'un benzyle (**T25**, **T26**) ou d'un benzyloxy (**T27**, **T28**) en position R_1 n'apporte pas d'amélioration de l'activité anti-plasmodiale par rapport aux composés butyles mais présente des activités similaires (*Tableau 11*). Cela atteste que la cavité hydrophobe tolère des noyaux aromatiques. De plus, comme précédemment, l'activité antiparasitaire est toujours meilleure en présence d'un groupement naphtalène sur le cycle benzénique (R_2) plutôt qu'en présence d'un brome. De ce fait, l'ajout des groupements cyclohexylmethoxy et adamantaneéthoxy n'a été réalisé que sur la tryptoline naphtalénique (**T29**, **T30**). Concernant celles-ci, **T29** exprime une activité diminuée sur PfHB3 par rapport à son analogue aromatique **T28** et à la molécule **T17**, tandis que **T30** présente une activité équivalente à ces derniers. Cela confirme que l'introduction d'un groupement hydrophobe encombré, qu'il soit aromatique ou saturé, est tolérée et bénéfique à l'activité.

En outre, l'insertion de groupements oxygénés tel qu'un BnO ou un Adm$(CH_2)_2$O ayant arboré des résultats favorables, les analogues oxygénés du **T16** et du **T17** ont été synthétisés en remplaçant la chaine *n*-butyle par son bioisostère oxygéné propyloxy (PrO) en position R_1. Cependant, l'efficacité de ces tryptolines (**T31, T32**) est largement diminuée par rapport à leur bioisostère butyle (*Tableau 11*). L'apport d'un oxygène dans une chaîne carbonée linéaire n'est donc pas avantageux pour l'étude de l'activité antiplasmodiale.

Enfin, l'exploration de la seconde poche hydrophobe par l'introduction d'un phényl en position R_2 du cycle benzénique (**T33**) représente une amélioration avec une CI_{50} diminuée d'environ 2,5 fois par rapport à son analogue naphatalénique (**T17**) sur la souche chloroquinosensible PfHB3 (*Tableau 11*). Cela certifie une fois de plus que la poche à caractère hydrophobe est assez spacieuse pour recevoir des groupements hydrophobes aromatiques et volumineux. Son efficacité contre la souche Dd2 restera à déterminer.

En ce qui concerne la cytotoxicité, les tétrahydro-β-carbolines ont été largement décrites dans la littérature et sont connues comme étant très peu toxiques.[115,116] Cela est confirmé lors de notre étude où tous les index de sélectivité calculés sur HepG2 et HFF sont supérieurs à 25,5 (IS1 compris entre 53,6 et 407,3, IS2 compris entre 25,5 et 765,9). Rappelons que, d'après Katsuno et ses collaborateurs, l'index de sélectivité entre la CI_{50} chez *P. falciparum* et la cytotoxicité sur des cellules humaines doit être au moins de 10 pour un hit et de 100 pour un lead.[117] Ces données sont indispensables pour continuer à travailler sur les composés, notamment lors d'études pharmacocinétiques et d'efficacité *in vivo*.

De plus, de la même manière que précédemment, les molécules comportant un naphtalène en position R_2 (**T4**, **T10**, **T11**, **T13**, **T17**, **T20**, **T22**, **T24**, **T26** et **T28**) présentent de meilleurs index de sélectivité que leurs analogues chlorés ou bromés, compris entre 54,7 et 765,9, quel que soit le groupement sur le cycle indolique (R_1)(*Tableau 11*).

Au total pour cette série de pharmacomodulations, dix molécules (**T13**, **T16**, **T17**, **T19**, **T20**, **T22**, **T23**, **T25**, **T26**, **T27**) présentent une CI_{50} inférieure à 100 nM sur les deux souches testées, seuil préconisé par l'OMS en termes d'activité antipaludique pour un lead.[117] De plus, deux composés supplémentaires semblent prometteurs, **T30** et **T33**, dont l'activité sur PfDd2 et la cytotoxicité restent encore à déterminer. A ce jour, le meilleur composé est le **T17** (CI_{50} = 25 ± 13 et 61 ± 25 nM sur PfHB3 et PfDd2 respectivement), conduisant à un gain d'activité de l'ordre de 75 par rapport au hit **H1** de départ, avec des index de sélectivité supérieurs à 400.

3.4. Exploration de la substitution du phénol

3.4.1. Remplacement du phénol par des benzoxazolinones

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la substitution du motif phénol. Dans un premier temps, l'objectif était d'utiliser le principe de bioisostérie afin de remplacer le motif phénol qui conduit souvent à des métabolites de phase II *in vivo* par un groupement mimant son pKa, tel qu'une benzoxazolinone (*Figure 37*). L'activité antipaludique serait en principe gardée et les propriétés pharmacocinétiques améliorées. De plus, l'hétéroatome supplémentaire dans la structure benzoxazolinone permettrait de chélater davantage les ions manganèses au sein du site catalytique. Il est à noter qu'ici les molécules synthétisées sont nues ou éthylées en position 6 du cycle indolique (R_1 = H, Et), substitutions qui présentaient les meilleurs résultats *in vitro* à l'époque de la synthèse.

Néanmoins, la série de tryptolines obtenues (**T35**, **T36**, **T37**) présente des résultats peu satisfaisants qui ne sont pas meilleurs que ceux des composés de structures proches synthétisés précédemment, **T34** et **H1** (R_2 = OH)(*Tableau 12*). De plus, quels que soit les isomères de position (**T35** *vs.* **T36**), la position relative des hétéroatomes du motif benxozazolinone conduit au même pourcentage d'inhibition de croissance parasitaire et ne permet pas de conclure sur l'intérêt de mimer le pKa du phénol. Par ailleurs, l'introduction d'une chaine carbonée éthylique en position 5 de l'indole (**H1**) avait permis d'améliorer l'activité antiparasitaire du composé **T34**, ce qui n'est pas le cas pour le composé **T37**. D'autres groupements bioisostères du phénol sont alors à expérimenter en vue de limiter le métabolisme de phase II.

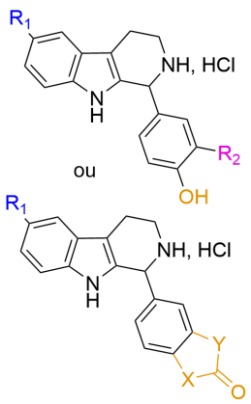


Tableau 12. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* pour le remplacement du phénol par des benzoxazolinones

Composés				CI_{50} sur PfHB3 (µM) ou % inhibition
Codes	**R_1**	**R_2**	**X, Y**	
T34	H	OH	-	11% à 10 µM
H1	Et	OH	-	1,85 ± 0,12
T35	H	-	X = O, Y = NH	62% à 10 µM
T36	H	-	X = NH, Y = O	68% à 10 µM
T37	Et	-	X = O, Y = NH	50% à 10 µM

Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse

3.4.2. Remplacement de l'hydroxynaphtalène par des hydroxyquinoléines

Toujours dans le but d'apporter des groupements bioisostères du phénol et d'améliorer la chélation des ions Mn^{2+} et possiblement l'activité antiplasmodiale, la nature de la fonction phénol a ensuite été modifiée en introduisant des chélateurs dibendates tels que des hydroxyquinoléines (*Figure 37*). Pour rappel, la 8-hydroxyquinoléine est connue pour ses propriétés antiseptiques, désinfectantes et pesticides,[104] tandis que les 2-hydroxyquinoléine et 1-hydroxyisoquinoléine sont connues pour limiter le métabolisme de phase II *in vivo*, tel que la glucuro-conjugaison des phénols grâce aux formes tautomères amide-iminol. Elles devraient ainsi améliorer les propriétés pharmacocinétiques des molécules.

Néanmoins, cette nouvelle série de molécules présente une fois de plus des résultats peu satisfaisants (*Tableau 13*). En effet, avec les 2-hydroxyquinoléine et 1-hydroxyisoquinoléine, les tryptolines n'atteignent pas les 100% d'inhibition de croissance parasitaire à 1 µM, quel que soit l'isomère de position (**T39**, **T40**). De la même manière, l'activité antiparasitaire de la tryptoline comportant la 8-hydroxyquinoléine (**T38**) est diminuée d'un facteur 30 par rapport à son analogue hydroxynaphtalène (**T17**). L'hypothèse d'employer des hétérocycles de ce type n'est donc pas fructueuse et cela laisse penser que l'hydroxyle du phénol ne chélate probablement pas d'ion manganèse mais qu'il interagisse d'une manière différente au sein du site catalytique.

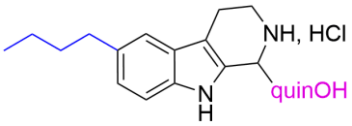
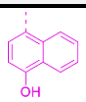
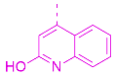


Tableau 13. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour le remplacement de l'hydroxynaphtalène par des hydroxyquinoléines

Composés		CI_{50} sur *P. falciparum* (nM) ou % d'inhibition		CI_{50} sur cellules (µM)		IS 1	IS 2
Codes	quinOH	Souche HB3	Souche Dd2	HFF	HepG2		
T17		25 ± 13	61 ± 25	10 ± 3	19 ± 3	407,3	765,9
T38		738 ± 233	293 ± 92	13 ± 2	23 ± 10	17,0	30,7
T39		33% d'inhibition à 10 µM	/	/	/	/	/
T40		2% d'inhibition à 1 µM	/	/	/	/	/

IS1 : Index de sélectivité HFF/HB3, **IS2 :** Index de sélectivité HepG2/HB3

3.5. Exploration de la substitution de l'amine secondaire

Dans cette dernière section, la nécessité des caractères basique et donneur de liaison Hydrogène de l'amine secondaire de la tétrahydro-β-carboline a été analysée. Dans ce sens, l'amine du hit de départ **T1** (R_1 = H, R_2 = Br) a été substituée par des groupements acétyle et méthyle (R_3 = $COCH_3$, Me) de sorte à former un amide ou une amine tertiaire. Dans le cas de l'acylation, qui s'effectue à l'aide de chlorure d'acétyle en présence de triéthylamine, l'amine secondaire et l'hydroxyle du cycle benzénique sont acétylés (**24**), puis une étape de saponification en conditions douces avec de l'hydroxyde de lithium permet de déprotéger cet hydroxyle (*Schéma 9*).[118]

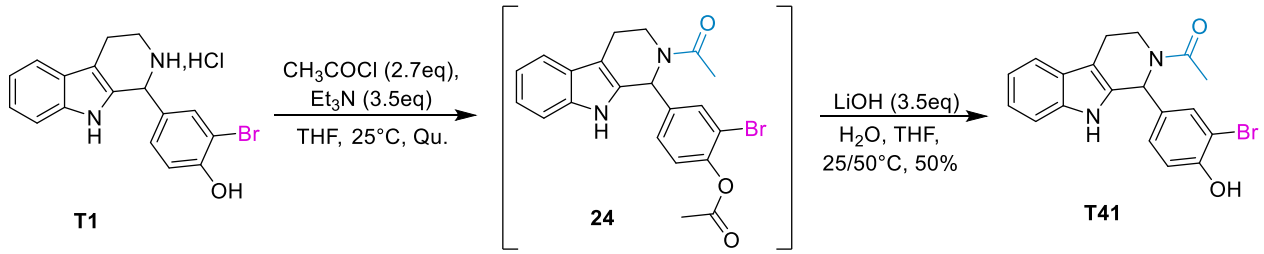


Schéma 9. Schéma de synthèse pour l'acétylation de l'amine secondaire de la tryptoline

Par ailleurs, pour la substitution par un méthyle, une amination réductrice est réalisée sur le même substrat **T1** à l'aide de formaldéhyde et de borohydrure de sodium conduisant à l'amine tertiaire **T42** avec un très faible rendement de 2% (*Schéma 10a*).[119]

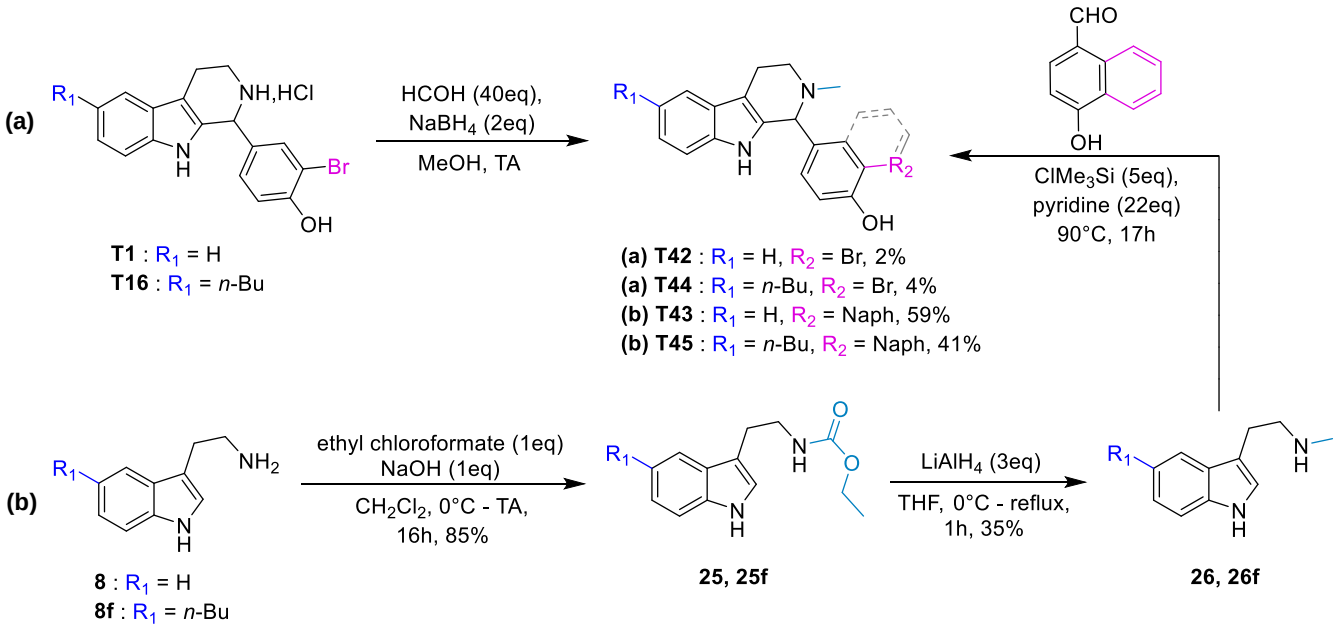


Schéma 10. Schémas de synthèse des dérivés tryptolines *N*-méthylées

Les activités mesurées suite à ces deux modulations en position R_3 sont dépendantes du type de substitution. Effectivement, lorsque l'amine est acétylée (**T41**), seulement 46% d'inhibition de croissance parasitaire sont observées à la concentration de 10 µM, indiquant que le caractère basique

de l'amine est indispensable pour l'activité. A l'opposé, dans le cas de la *N*-méthylation (**T42**), l'activité est légèrement améliorée par rapport à **T1**, démontrant que le caractère donneur de liaison Hydrogène de l'amine n'est pas obligatoire. En plus de cela, cette modulation diminue fortement la cytotoxicité de la molécule, améliorant ainsi ses index de sélectivité (*Tableau 14*).

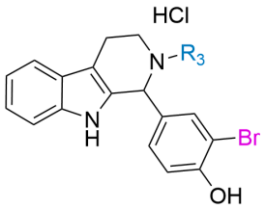


Tableau 14. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour l'exploration de la substitution de l'amine secondaire

Composés		CI_{50} sur PfHB3 (nM) ou % d'inhibition	CI_{50} sur cellules (µM)		IS 1	IS 2
Codes	R_3		HFF	HepG2		
T1	H	570 ± 250	130 ± 32	67 ± 14	228,8	117,6
T41	$COCH_3$	46% à 10 µM	/	/	/	/
T42	Me	433 ± 35	213 ± 9	360 ± 25	492,7	831,3

Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse, **IS1 :** Index de sélectivité HFF/HB3, **IS2 :** Index de sélectivité HepG2/HB3

Au vu de ces résultats, la *N*-méthylation a donc été reproduite sur les meilleures tryptolines comportant une chaîne butyle en positon R_1 et un brome ou naphtalène en position R_2. Comme précédemment, l'amination réductrice sur le composé **T16** aboutit à l'amine tertiaire **T44**, mais encore avec un très faible rendement de 4% (*Schéma 10a*).[119] Une méthode alternative a donc été mise au point par une réaction de Pictet-Spengler entre le 4-hydroxy-1-naphtaldéhyde (**9c**) et les *N*-méthyl-tryptamines **26** et **26f**. Celles-ci sont obtenues suite à la formation d'un carbamate d'éthyle (**25**,**25f**) sur l'amine primaire des tryptamines correctement substituées **8** et **8f**, en présence de chloroformiate d'éthyle et de soude, suivie de leur réduction par l'hydrure de lithium aluminium (*Schéma 10b*). Cette voie de synthèse a amené aux composés **T43** et **T45** avec des rendements globaux de 18 et 12% respectivement.

Cependant, sur ces tryptolines *N*-méthylées, en plus de la diminution de l'inhibition de la croissance parasitaire, aucune grande amélioration de cytotoxicité n'est observée (*Tableau 15*). En effet, en termes d'activité antiplasmodiale, l'addition d'un méthyle sur le **T4** (R_1 = H, R_2 = Naph) abaisse de plus de trois fois ses CI_{50} (**T4** *vs.* **T43**). Il en est de même pour les tryptolines comportant un groupement butyle en position R_1 pour lesquelles les CI_{50} sont diminuées d'un facteur 4 à 5 en présence d'un brome en R_2 (**T16** *vs.* **T44**) et les résultats sont encore plus mauvais avec un naphtalène en R_2, faisant diminuer les CI_{50} d'un facteur 11 à 27 (**T17** *vs.* **T45**). Quant aux cytotoxicités, les nouvelles molécules sont globalement moins toxiques sur cellules HFF et HepG2, mais leurs index de sélectivité sont largement affaiblis à cause de leurs CI_{50} élevées sur *P. falciparum*. La méthylation de l'amine secondaire des tryptolines ne représente donc pas une modulation favorable.

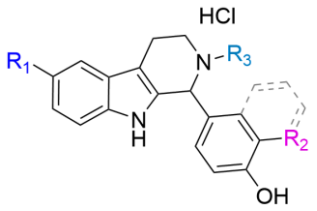


Tableau 15. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* et sur cellules humaines pour l'exploration de la substitution de l'amine secondaire par un méthyl

Composés				CI_{50} sur *P. falciparum* (nM)		CI_{50} sur cellules (µM)		IS 1	IS 2
Codes	R_1	R_2	R_3	Souche HB3	Souche Dd2	HFF	HepG2		
T1	H	Br	H	570 ± 250	530 ± 180	130 ± 32	67 ± 14	228,8	117,6
T42	H	Br	Me	433 ± 35	263 ± 84	213 ± 9	360 ± 25	492,7	831,3
T4	H	Naph	H	460 ± 204	266 ± 65	47 ± 12	39 ± 2	102,2	84,0
T43	H	Naph	Me	1540 ± 284	1340 ± 16	41 ± 8	61 ± 17	26,4	39,8
T16	Bu	Br	H	85 ± 26	92 ± 37	8 ± 3	7 ± 2	99,6	80,3
T44	Bu	Br	Me	439 ± 34	351 ± 51	31 ± 4	24 ± 9	70,5	55,0
T17	Bu	Naph	H	25 ± 13	61 ± 25	10 ± 3	19 ± 3	407,3	765,9
T45	Bu	Naph	Me	684 ± 126	689 ± 66	23 ± 3	71 ± 9	34,0	104,1

Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse, **IS1 :** Index de sélectivité HFF/HB3, **IS2 :** Index de sélectivité HepG2/HB3

3.6. Bilan des relations structure-activité (RSA)

L'ensemble des RSA menées sur le squelette tétrahydro-β-carboline permet de conclure que les cavités hydrophobes au sein du site catalytique sont spacieuses et tolèrent des groupements encombrants hydrophobes comme de longues chaînes linéaires carbonées, des noyaux aromatiques ou des cycloalkyles sur le cycle indolique (R_1) et un brome, un naphtalène ou un phényle sur le cycle benzénique (R_2). En revanche, la modulation propyloxy en position R_1 et les substitutions du phénol ou de l'hydroxynaphtalène par des groupements chélateurs d'ions manganèses tels que des benzoxazolinones ou hydroxyquinoléines ne sont pas bénéfiques pour l'activité antiplasmodiale. Il est donc probable que l'hydroxyle ne chélate finalement pas les ions manganèses au sein du site catalytique comme suggéré au départ. De plus, l'acylation et la méthylation de l'amine secondaire en R_3 ne sont pas non plus propices quant à l'inhibition de la croissance parasitaire.

Finalement, les dix meilleures molécules sont issues de l'exploration des poches hydrophobes, parmi lesquelles cinq comportent une CI_{50} inférieure à 50 nM sur la souche chloroquinosensible PfHB3 : **T17**, **T20**, **T22**, **T23**, **T26**. A celles-ci peuvent s'ajouter **T30** et **T33** dont leur efficacité sur PfDd2 et leurs cytotoxicités sont encore à déterminer. Le composé **T17** est actuellement le plus intéressant avec des CI_{50} de 25 ± 13 et 61 ± 25 nM sur PfHB3 et PfDd2 respectivement, conduisant à un gain d'activité de l'ordre de 75 par rapport au hit **H1** de départ, et des excellents index de sélectivité supérieurs à 400.

Il est à noter que, de par la présence d'un carbone asymétrique dans la structure de ces tétrahydro-β-carbolines, deux énantiomères coexistent, ce qui suppose une éventuelle

énantiosélectivité vis-à-vis du site catalytique de PfPPM9. Dans ce sens, une étude de docking au sein de la poche catalytique a été effectuée par Amaury Farce pour **T17** et a permis de mettre en évidence des positions complètement différentes pour les deux énantiomères (*Figure 38*). L'énantiomère *R* se décale vers la sortie de la poche, ce qui améliore le T-stacking avec la tyrosine 573. En effet, la chaîne butyle apporte plus de longueur et de souplesse, permettant d'occuper la poche tout en reculant le cycle naphtalénique vers l'extérieur, et augmente les possibilités d'interactions hydrophobes. De plus, les interactions entre l'hydroxyle et les ions manganèses semblent conservées, ce qui n'est pas le cas chez l'énantiomère *S* où l'hydroxyle a plutôt tendance à interagir avec l'acide aspartique en position 317. Rappelons que cette étude de docking est réalisée sur un modèle *in silico* du site catalytique putatif de PfPPM9, donc les positions des énantiomères au sein de la poche et leurs interactions ne sont que des hypothèses. D'ailleurs, les résultats de RSA obtenus ont déjà indiqué l'absence d'interaction de l'hydroxyle avec les ions manganèses.

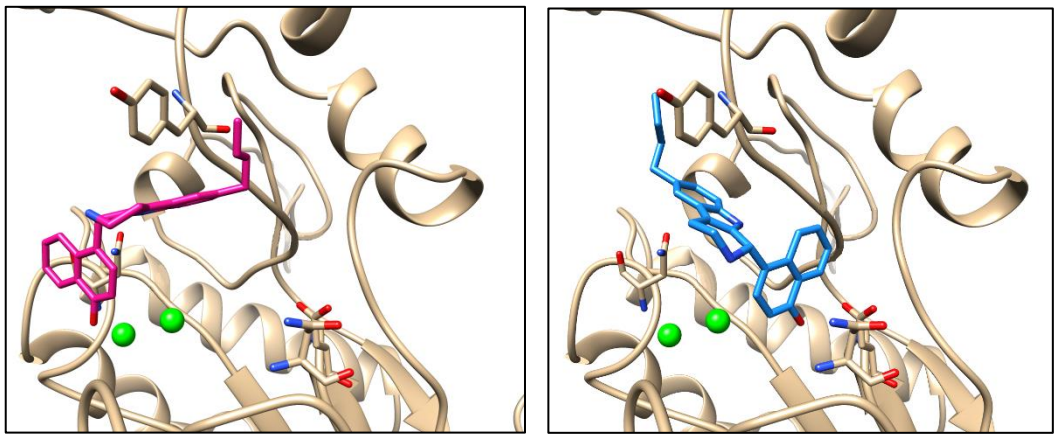


Figure 38. Représentation des poses de docking des énantiomères de **T17**, *R* en rose et *S* en bleu

4. Énantiosélectivité

4.1. Séparation des énantiomères

Les tryptolines présentées étant des composés asymétriques, leur synthèse donne accès à des mélanges racémiques. Ainsi, les racémiques présentant les meilleurs résultats lors des tests *in vitro* sont séparés par HPLC chirale préparative, puis, chacun des énantiomères doit à nouveau être évalué *in vitro*. Les résultats permettent de conclure sur une éventuelle énantiosélectivité vis-à-vis du site catalytique de PfPPM9.

La chromatographie chirale, également appelée chromatographie énantiosélective, est une technique de chromatographie consistant en la formation de liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et l'absorbant chromatographique chiral, amenant à des complexes diastéréoisomères. La différence des affinités de liaisons de ces derniers est à l'origine de la séparation des deux structures d'intérêt. Ici, l'absorbant chromatographique chiral est une silice greffée par un sélecteur chiral tel que des saccharides, plus précisément de l'amylose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) (CHIRALPAK® AD-H) (*Figure 39*).

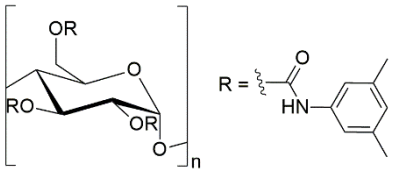


Figure 39. Structure du sélecteur chiral employé dans l'absorbant chromatographique

Un premier essai de séparation effectué sur le hit **T1** avait démontré la nécessité de protéger l'atome d'azote de la tryptoline sous forme de carbamate afin d'acquérir une meilleure résolution lors de la séparation. En effet, l'amine secondaire du cycle tryptoline étant très basique, elle effectue de nombreuses interactions électrostatiques avec la phase chirale, notamment des liaisons Hydrogène, empêchant ainsi une séparation convenable des deux énantiomères (*Figure 40*). Pour pallier ce problème, l'atome d'azote est protégé sous forme de carbamate afin de masquer son caractère basique.

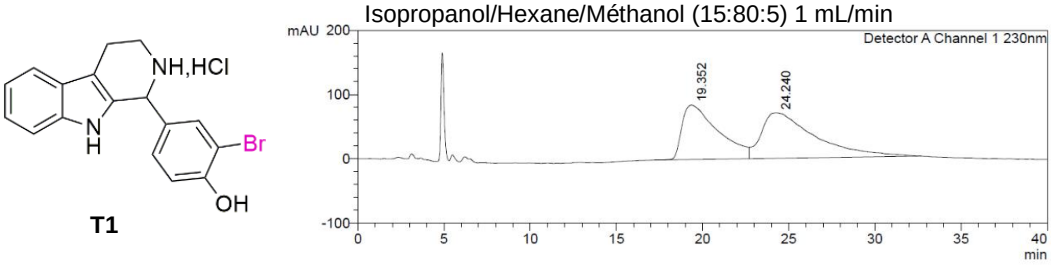


Figure 40. Spectre du mélange des énantiomères T1 en chromatographie chirale

Par conséquent, le mélange racémique de tryptolines **T1** a par la suite été protégé par deux groupements protecteurs différents, un *tert*-butoxycarbonyle (Boc)(**27a**) et un fluorénylméthoxy-carbonyle (Fmoc)(**27b**), respectivement au moyen de dicarbonate de di-*tert*-butyle ou de chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle en présence de triéthylmine (*Schéma 11*). Les conditions de déprotection

pour ces deux groupements sont différentes, acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane pour le Boc et piperidine dans du tétrahydrofurane pour le Fmoc. De même, le mélange racémique de **T4**, comportant un naphtalène à la place du brome, a été protégé par un groupement carboxybenzyle (Cbz)(**27c**) à l'aide de chloroformiate de benzyle et de triéthylamine dans du tétrahydrofurane. La déprotection de celui-ci a lieu par hydrogénation et ne peut être employé sur un substrat tel que **T1**, dont l'atome de brome du cycle benzénique y est sensible.

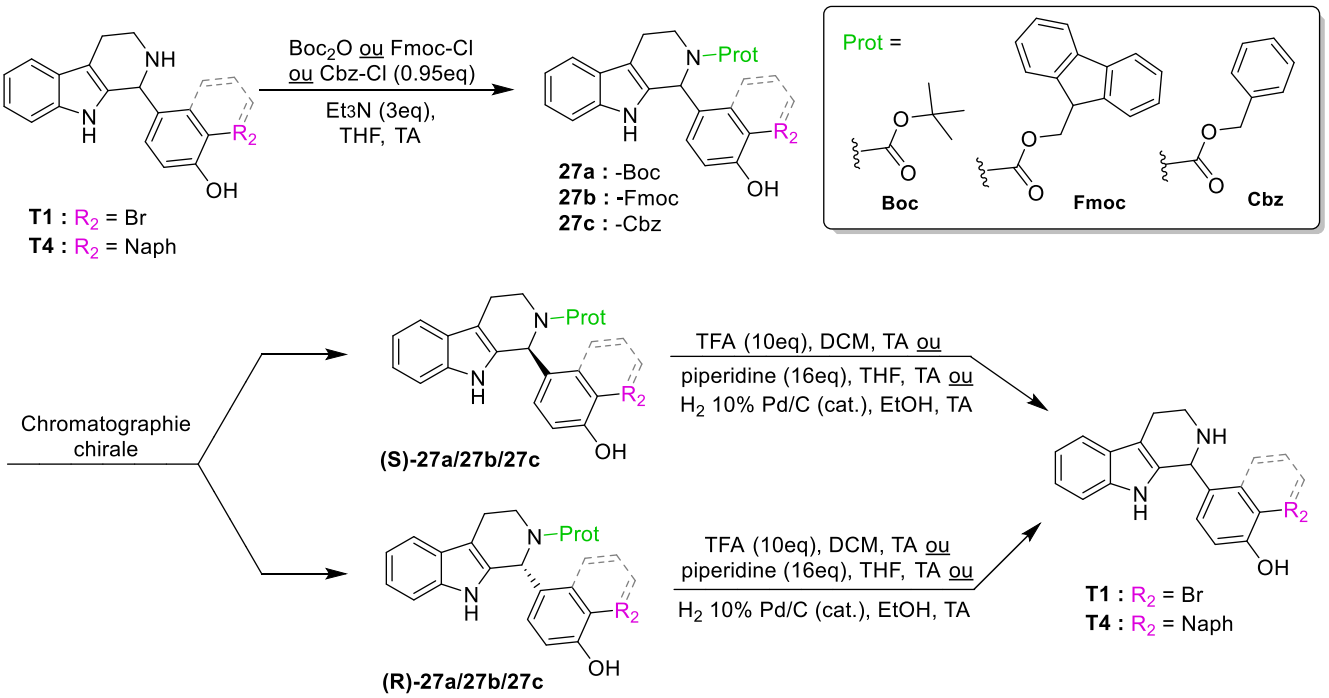


Schéma 11. Schéma de séparation des énantiomères de **T1** ou **T4** après protection de l'atome d'azote sous forme de carbamate (Boc, Fmoc, Cbz) puis racémisation après déprotection

Les trois conditions de déprotection présentées pour le Boc, le Fmoc et le Cbz sont décrites comme étant non-racémisantes dans la littérature pour des tryptolines substituées en position 1 par des chaînes alkyles et non aromatiques.[120,121] Néanmoins, après séparation par chromatographie chirale (*Figure 41*) et déprotection, les énantiomères se sont racémisés dans les trois cas (*Schéma 11*).

Pour expliquer la racémisation observée, nous supposons que le proton en position 1 de la tryptoline est très acide donc très labile. Ainsi, il y a un équilibre entre différentes formes tautomères, passant d'abord par la forme iminium comportant un carbone sp2, qui après équilibre régénère les deux énantiomères (*Schéma 12*).

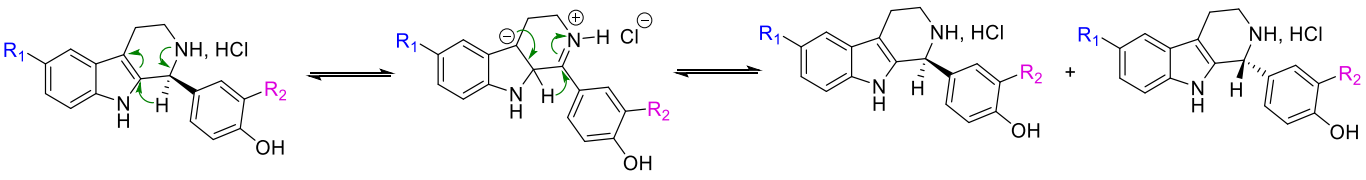


Schéma 12. Schéma des différentes formes tautomères de la tryptoline, amenant à sa racémisation

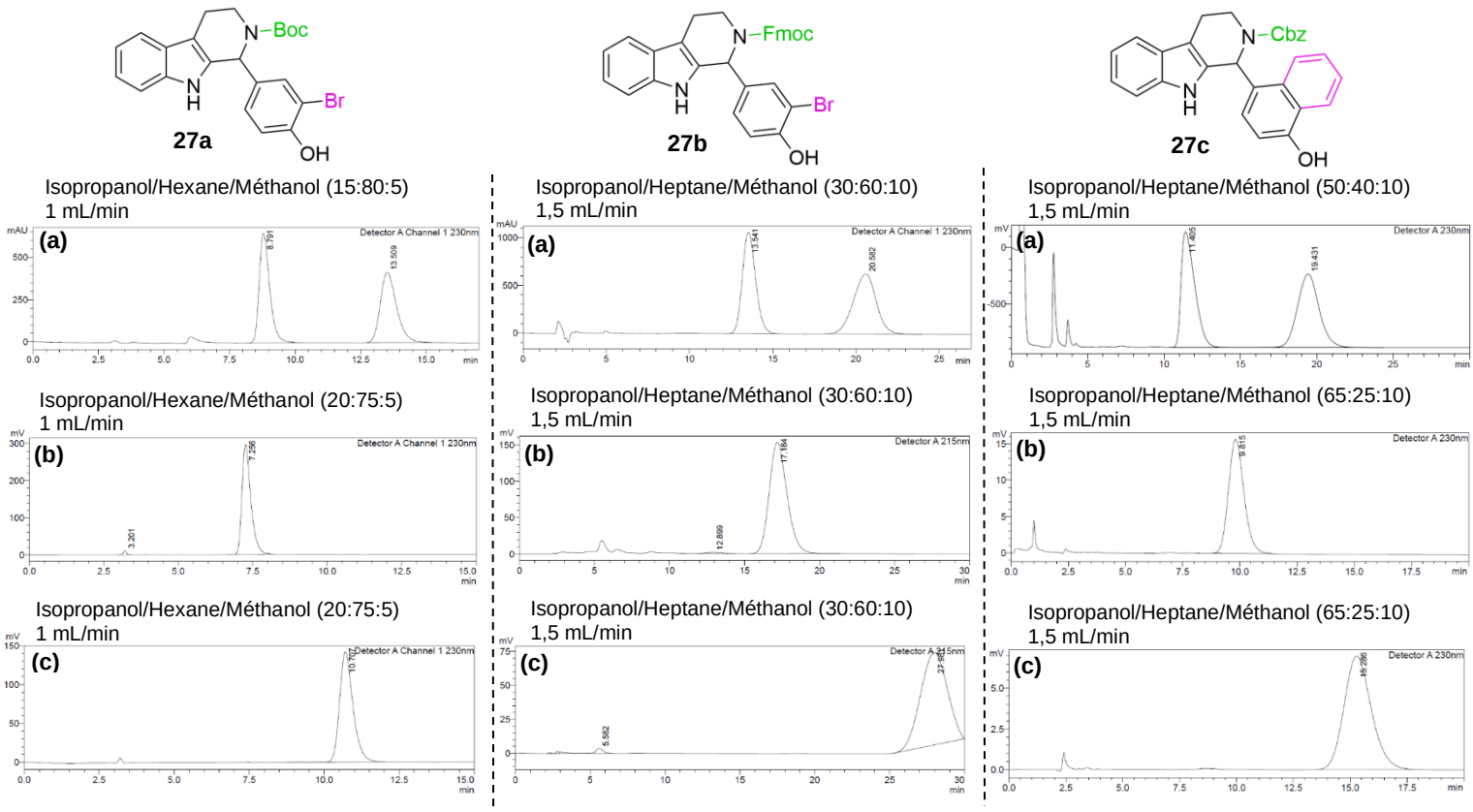


Figure 41. Chromatogrammes en phase chirale de **T1** protégé par un Boc (**27a**) à gauche ou un Fmoc (**27b**) au milieu et de **T4** protégé par un Cbz (**27c**) à droite. (**a**) mélange des énantiomères avant séparation, (**b**) et (**c**) l'un et l'autre énantiomère après séparation.

4.2. Alternative à la séparation des énantiomères

Pour pallier la racémisation après séparation des mélanges racémiques, le proton très acide a été remplacé par un méthyle afin de garder la structure tryptoline tout en empêchant la formation de formes tautomères. Ces tests ont été d'abord réalisés en présence d'un groupement méthoxy (OMe) en position R_2 du fait de la disponibilité au laboratoire de l'acétophénone correspondante (**9e**), et avec différents groupements en R_1 (H, Et, Pent).

Des essais de synthèse pour ces composés ont été réalisés par réaction de Pictet-Spengler dans du butanol à reflux par distillation azéotropique d'eau avec un excès de dérivé carbonylé. Il est à noter que dans ces conditions la tryptamine de départ est sous forme de sel de chlorhydrate donc aucun acide additionnel n'est nécessaire. Cependant, les tryptolines méthylées souhaitées n'ont pas été obtenues, mais cela a amené à la formation de dihydro-β-carbolines (*Schéma 13*). En effet, il est supposé que l'apport d'énergie suite au chauffage au reflux dans le butanol est suffisant pour oxyder la tryptoline en dihydro-β-carboline par élimination de méthane. Par conséquent, les tryptolines méthylées en position 1 ont finalement été synthétisées par la méthode classique à l'HFIP décrite précédemment, où la température employée est moins élevée (60°C) (*Schéma 13*).

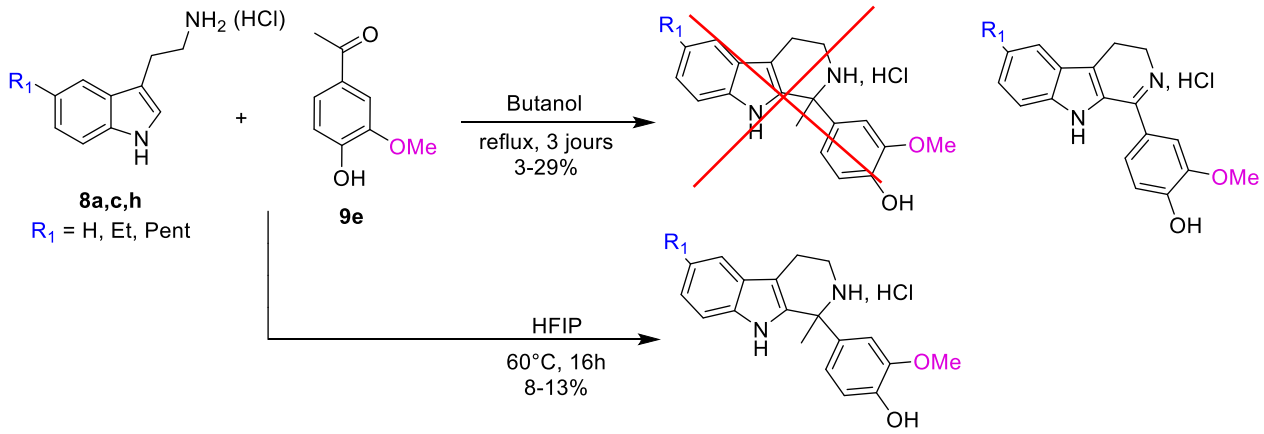
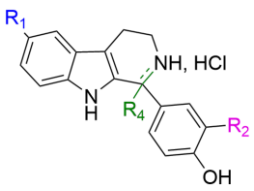


Schéma 13. Schéma de synthèse des dérivés dihydro-β-carbolines et 1-méthyltétrahydro-β-carbolines

Ainsi, deux dihydro-β-carbolines et trois tryptolines substituées sur le carbone asymétrique par un méthyle (position 1) ont été synthétisées par réaction de Pictet-Spengler et toutes ont été testées sur la survie de *P. falciparum* HB3 en culture (*Tableau 16*).

Tableau 16. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* pour les substitutions sur le carbone asymétrique

Composés					CI_{50} sur PfHB3 (nM) ou % d'inhibition
Structures	Codes	R_1	R_2	R_4	
	H1	Et	OH	H	1850 ± 120
	T46	H	OMe	H	49% à 10 µM
	T47	H	OMe	Ø	68% à 10 µM
	T48	H	OMe	Me	20% à 10 µM
	T49	Et	OMe	H	2670 ± 50
	T50	Et	OMe	Me	11% à 1 µM
	T51	Pent	OMe	H	514 ± 178
	T52	Pent	OMe	Ø	532 ± 85
	T53	Pent	OMe	Me	98% à 10 µM

Tétrahydro-β-carbolines : R_4 = H, Me
Dihydro-β-carbolines : R_4 = Ø

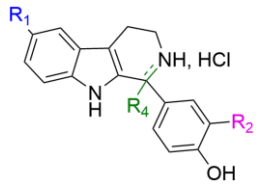
Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse

D'une part, l'introduction d'un méthyle en position 1 fait totalement perdre l'activité antiplasmodiale des composés et n'est donc pas favorable à l'étude de la séparation des énantiomères. D'autre part, les activités des dihydro-β-carbolines ne sont pas améliorées par rapport à leurs homologues tétrahydro quand R_1 est un hydrogène (**T46** *vs.* **T47**), mais sont équivalentes pour une chaine carbonée de type pentyle (**T51** *vs.* **T52**). Il est donc difficile de conclure quant à l'intérêt de ces composés sans avoir synthétisé l'homologue dihydro-β-carboline d'une de nos meilleures molécules.

Par conséquent, les mêmes composés ont été synthétisés avec un naphtalène en position R_2, tous deux correspondant à des produits secondaires issus de la réaction de Pictet-Spengler en

conditions chlorotriméthysilane et pyridine. Effectivement, plus celle-ci est réalisée à haute température (> 70°C), plus il y a d'oxydation en dihydro-β-carboline. L'évaluation de l'efficacité *in vitro* de ces dernières a démontré que l'oxydation réalisée (**T54**, **T55**) n'était pas favorable (*Tableau 17*). De plus, cette modulation altère la solubilité des molécules en milieu aqueux.

Tableau 17. Tableau de résultats d'évaluations *in vitro* de molécules sur *P. falciparum* pour la substitution sur le carbone asymétrique (R_4 = Ø)

Composés					CI_{50} sur PfHB3 (nM) ou % d'inhibition
Structures	Codes	R_1	R_2	R_4	
	H1	Et	OH	H	1850 ± 120
	T4	H	Naph	H	460 ± 204
	T54	H	Naph	Ø	25% à 1 µM
	T22	Pent	Naph	H	28 ± 8
Tétrahydro-β-carbolines : R_4 = H Dihydro-β-carbolines : R_4 = Ø	T55	Pent	Naph	Ø	116 ± 38

Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse

À ce stade, aucune autre stratégie permettant d'accéder aux composés énantiomériquement purs n'a été explorée.

5. Étude de la cible PfPPM9

5.1. Production, purification et activité enzymatique de PfPPM9r

En vue d'étudier la cible de nos hits, et plus particulièrement de valider ou non PfPPM9 comme cible, celle-ci a d'abord était produite sous forme de protéines recombinantes taguées 6-His du coté N-terminal, selon un protocole mis au point avant mon arrivée au laboratoire.[20] Pour cela, PfPPM9r (83 kDa) est produite en bactéries *E. coli* souche BL21 suite à une induction avec 0,5 mM d'IPTG final (O/N, 16°C, 200 rpm) en présence d'ions manganèse et magnésium et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel au cours de laquelle elle est éluée à l'aide d'un gradient d'imidazole. Celui-ci est ensuite éliminé en effectuant une dialyse puis, après concentration, une seconde dialyse sert à éliminer les ions Mg^{2+} et Mn^{2+}.

Malheureusement, une bande correspondante à une protéine contaminante apparait sur le gel coloré en bleu de Coomassie (entouré en rouge sur la *Figure 42a*) après le passage en chromatographie d'affinité. Celle-ci a alors été analysée en spectrométrie de masse par la plateforme P3M (Institut Pasteur de Lille), certifiant qu'il s'agit du contaminant bactérien ArnA (*Figure 63 en Annexe 1*). Ce contaminant comporte des séries d'histidines dans sa séquence, expliquant sa fixation à la colonne de Nickel lors de la purification. Pour s'en affranchir, l'emploi de volumes de lavage plus importants a été instauré dans l'espoir d'optimiser la purification en l'éluant durant la phase de lavage, mais la protéine contaminante persiste toujours. Par la suite, de nouvelles productions ont été réalisées avec un lot plus récent de souches BL21 fraichement transfectées, mais mènent toujours aux mêmes résultats.

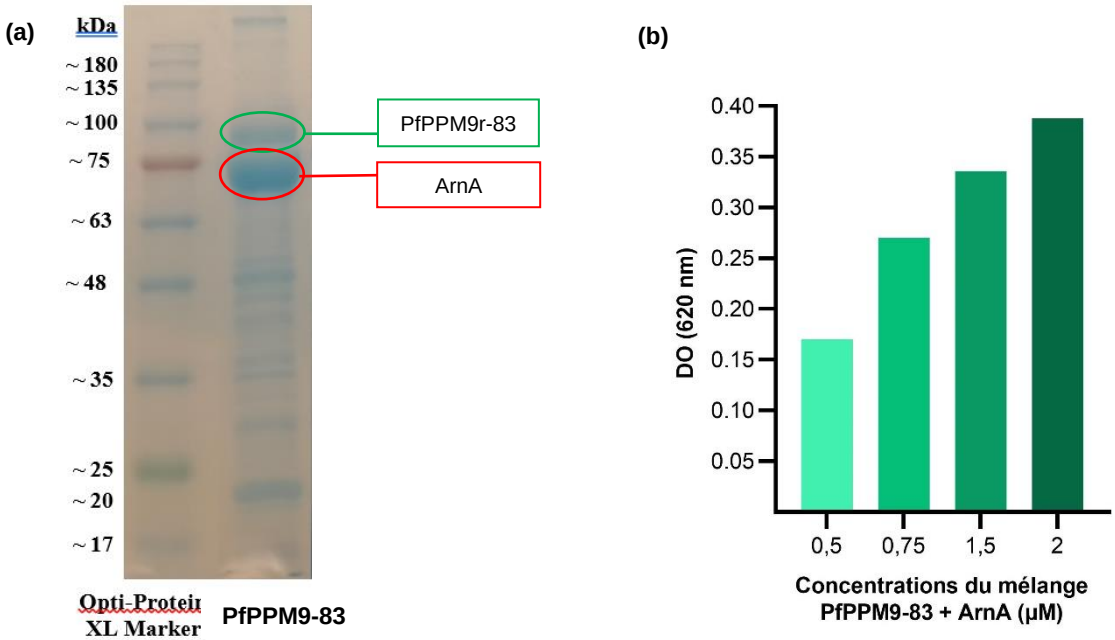


Figure 42. Étude de PfPPM9r-83 après production en *E. coli* BL21 et purification par chromatographie d'affinité au Nickel. (a) Gel coloré en bleu de Coomassie, **(b)** Mesure de son activité enzymatique par le test au vert de Malachite (substrat α-caséine à 125 µg/mL).

Malgré cela, l'activité enzymatique de la protéine PfPPM9r-83 a été mesurée par le test au vert de Malachite (*Malachite Green Phosphate Assay*, Sigma-Aldrich).[122] Dans ce test, le substrat utilisé est l'α-caséine, un polypeptide possédant 7 sérines phosphorylées. La déphosphorylation de ces dernières par une phosphatase libère dans le milieu des orthophosphates libres qui interagissent avec le Malachite. La couleur de celui-ci passe alors de jaune à bleu-verdâtre et cette modification colorimétrique est lue directement en plaques 96 puits après 1h d'incubation, par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm. Ce test a mis en évidence l'existence d'une activité phosphatasique chez PfPPM9r-83. Effectivement, la densité optique mesurée augmente proportionnellement avec la concentration en protéines (*Figure 42b*). ArnA n'étant pas une phosphatase, l'activité est issue de PfPPM9r-83, signifiant que celle-ci est active malgré sa présence.

Ultérieurement, une nouvelle stratégie a été employée pour tenter de se débarrasser totalement d'ArnA. Pour cela, le plasmide pETDuet contenant le gène codant pour PfPPM9r-83 a été transfecté dans une souche bactérienne n'exprimant pas cette protéine, la souche commerciale *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3). Il s'agit des mêmes bactéries *E. coli* souche BL21 que précédemment sur lesquelles le gène codant pour la protéine ArnA a été retiré.[123] Après vérification de la bonne production de PfPPM9r-83 à travers cette nouvelle souche bactérienne, les conditions d'induction optimales, 0,5 mM d'IPTG final, O/N, 16°C, 200 rpm, ont été sélectionnées parmi différents essais modifiant la température (37°C ou 16°C) et la durée d'incubation (1, 2, 3h ou O/N)(*Figure 43*). Ensuite, pour des raisons de simplicité, la purification a eu lieu sur billes de Nickel et non par chromatographie d'affinité comme dans les précédentes expériences. Dans ce cas, l'élution a lieu avec une concentration fixe en imidazole (600 mM), contrairement au gradient employé en chromatographie. Les tampons de dialyse ont également été modifiés. Dans le premier (Tris 20mM, NaCl 300mM, $MnCl_2$ 0,25mM, pH 7,5), les ions $MgCl_2$, non-essentiels pour la protéine, ont été retirés et la concentration de $MnCl_2$ a été diminuée à 0,25 mM (contre 1 mM antérieurement). Dans le second (Tris 20mM, NaCl 300mM, pH 7,5), la concentration en NaCl a été augmentée pour limiter la précipitation de la protéine. En effet, un léger précipité avait été observé avec le tampon précédent,

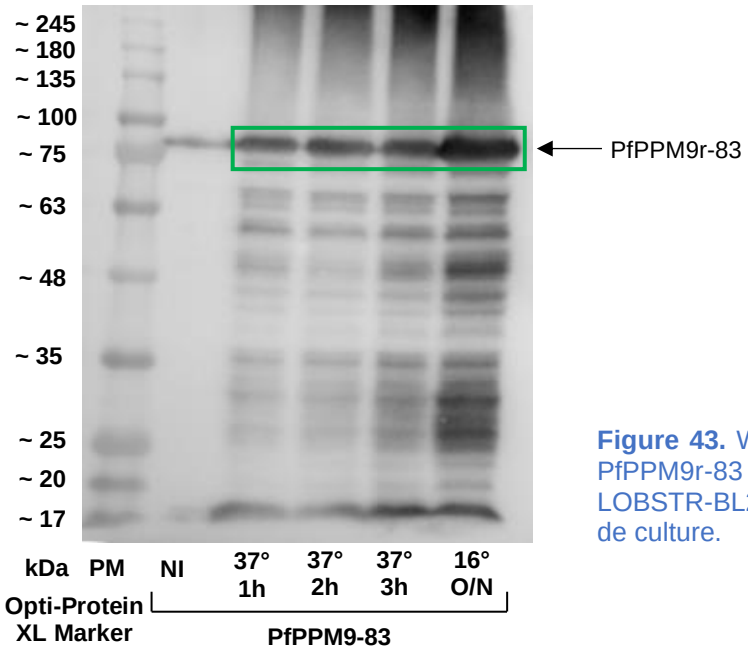


Figure 43. Western Blot anti-His de la protéine PfPPM9r-83 après production en *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) dans différentes conditions de culture.

mais n'est plus observé ici. Ces changements ont donc amené à une amélioration des conditions de tampons. Finalement, le rendement mesuré suite à cette production de 6L de culture bactérienne est de 1,88 mg/mL dans 3,5 mL de tampon final.

Cependant, une fois de plus, des bandes supplémentaires sont observables sur le gel coloré en bleu de Coomassie (entouré en rouge sur la *Figure 44a*), malgré la pureté observée sur le Western Blot (*Figure 44b*). Celles-ci, analysées en spectrométrie de masse par la plateforme P3M, correspondent aux contaminants bactériens ArnA et CH60 (*Figure 64 en Annexe 1*). ArnA, enzyme bifonctionnelle impliquée dans la modification des phosphates de lipides A par l'aminoarabinose, persiste toujours malgré l'emploi de la souche bactérienne *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) qui est pourtant connue pour ne pas l'exprimer. Il sera alors essentiel de prendre contact avec le fournisseur de cette souche (Kerafast distribué par CliniSciences) pour les avertir et discuter de ce problème. Quant à CH60, il s'agit d'une protéine chaperonne impliquée dans le repliement des protéines. Elle ne comporte qu'une seule histidine dans sa séquence et ne peut donc pas se fixer directement au nickel. Mais il est possible qu'elle soit associée à PfPPM9 et/ou ArnA afin de les stabiliser, ou bien qu'elle interagisse de manière non spécifique directement sur les billes. Dans le but de s'affranchir de ces deux contaminants, il serait intéressant de modifier les tampons de lavage employés lors de la purification ou de faire un essai de séparation par chromatographie d'exclusion stérique. De plus, il sera indispensable de repasser à la chromatographie pour la purification, qui présentait de meilleurs résultats que les billes de nickel.

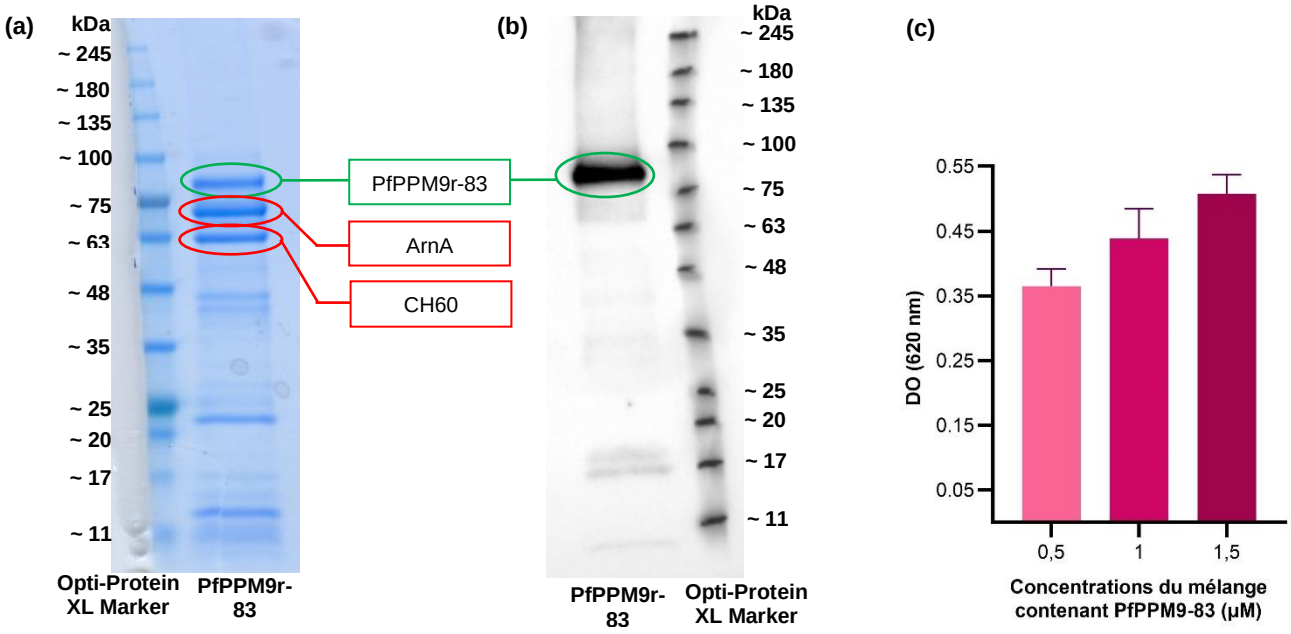


Figure 44. Étude de PfPPM9r-83 après production en *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) et purification sur billes de Nickel. **(a)** Gel coloré en bleu de Coomassie, **(b)** Western blot révélé avec l'anticorps anti-His, **(c)** Mesure de son activité enzymatique par le test au vert de Malachite (substrat α-caséine à 125 µg/mL)

Comme précédemment, l'activité enzymatique de PfPPM9r-83 a été mesurée par le test au vert de Malachite [122] à travers lequel la DO augmente proportionnellement avec la concentration en protéines (*Figure 44c*), démontrant l'activité phosphatasique de PfPPM9r-83. Malgré la présence des

contaminants, l'intensité de cette dernière est de meilleure qualité en comparaison à celle de la protéine précédente produite en *E. coli* BL21 (*Figure 42b* et *Figure 44a* aux concentrations 1,5 et 0,5 µM). Au vu de ces résultats, la nouvelle PfPPM9r-83 peut ainsi être exploitée pour explorer les effets de nos hits sur son activité enzymatique dans une démarche de validation de la cible.

5.2. Effets des hits sur l'activité enzymatique de PfPPM9r

Dans le but d'étudier l'impact de nos hits sur PfPPM9r-83, l'activité enzymatique de celle-ci a été mesurée en présence de divers composés par le test au vert de Malachite.[122] L'acide okadaïque et la tautomycine, inhibiteurs sélectifs des phosphatases PP1 et PP2A,[124] ont été employés comme contrôles négatifs et la sanguinarine, inhibiteur des PP2C avec une CI_{50} de 2,5 µM chez une PP2C recombinante de souris,[125] comme contrôle positif (*Figure 45*). Le hit **H1**, premier hit issu du criblage virtuel et ciblant théoriquement la phosphatase PfPPM9, a été testé ainsi que notre meilleur hit amélioré, le **T17**. De plus, le protocole a été optimisé en testant différents rapports enzyme/substrat pour diminuer la concentration d'enzyme tout en gardant une activité enzymatique suffisante pour évaluer les hits. Finalement, PfPPM9r a été utilisée à la concentration finale de 1 µM en présence de 62,5 ug/mL d'α-caséine (*Figure 46a*).

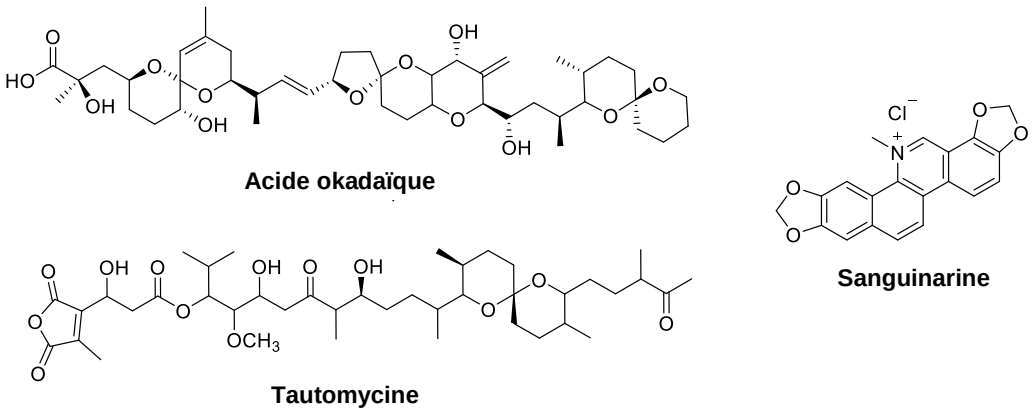


Figure 45. Structures de différents inhibiteurs de phosphatases : acide okadaïque et tautomycine, inhibiteurs connus de PP1 et PP2A, et sanguinarine, inhibiteur de PP2C

L'acide okadaïque et la tautomycine ont été incubés à une concentration finale de 100 µM et ne sont pas parvenu à inhiber significativement l'activité enzymatique de PfPPM9 à cette forte concentration (*Figure 46b*). Ce résultat les valide comme contrôles négatifs. Quant à la sanguinarine, pour laquelle une gamme de concentrations a été réalisée, une inhibition est observée avec une CI_{50} de 70,2 ± 9,8 µM (*Figure 46c*). Cette concentration est très élevée, peut-être à cause de la présence de contaminants bactériens avec lesquels l'inhibiteur pourrait également interagir, et ne permet donc pas d'affirmer que la sanguinarine inhibe totalement la PP2C de *P. falciparum* PfPPM9. Pourtant, elle inhibe fortement la PP2Cα murine recombinante avec une CI_{50} de 2,5 µM [125] ou la PP2C de *Leishmania major*, un autre protiste parasite, de manière dose dépendante avec une inhibition complète à 10 µM (*Tableau 18*).[126] Sur *Leishmania donovani*, elle entre en compétition avec le substrat pNPP avec une constante d'inhibition (K_i) de 0,63 µM,[127] comparé à un K_i de 0,68 µM sur la PP2Cα murine recombinante vis-à-vis du substrat α-caséine.[125] La sanguinarine s'est également

révélée active sur des cultures de Pf3D7 avec une CI_{50} de 5,7 µM (équipe BAP). Toutefois, sa cytotoxicité est assez élevée avec des CI_{50} sur cellules HL-60 de 0,37 µM,[125] soit un index de sélectivité inférieur à 1. Ainsi, il est possible que la sanguinarine ait une sélectivité moindre vis-à-vis des PP2C de *Plasmodium*, expliquant sa valeur élevée de CI_{50} sur PfPPM9r-83. Dans tous les cas, l'effet-dose observé atteste la possibilité d'utiliser la même méthode pour examiner l'impact de nos hits sur l'activité de PfPPM9.

PP2C	Substrat employé	CI_{50} (µM)	K_i (µM)	Références
PfPPM9r-83	α-caséine (vert de Malachite)	70,2 ± 9,8	/	/
PP2Cα murine	α-caséine (vert de Malachite)	2,5	0,68	125
PP2C de *L. major*	pNPP	Inhibition dose dépendante, complète à 10 µM	Non-renseigné	126
PP2C de *L. donovani*	pNPP	Non-renseigné	0,63	127

Tableau 18. Résultats d'inhibition de l'activité phosphatasique de différentes PP2C par la sanguinarine, selon différents substrats employés

Dans ce sens, des gammes de concentrations en **T17** et en **H1** ont été établies, amenant à un effet-dose sur l'activité de PfPPM9r-83 (*Figure 46d et e*). Cependant, leur CI_{50}, respectivement de 107,3 ± 8,9 µM et 271,3 ± 58,6 µM, sont très élevées comparées à leur CI_{50} *in vitro* sur PfHB3, respectivement de 25 ± 13 nM et 1850 ± 120 nM, soit des concentrations environ 4000 et 150 fois supérieures. Ainsi, cela ne permet pas de conclure quant à leur action sur PfPPM9 et laisse penser que ces composés agiraient sur une ou plusieurs autres cibles *in vitro*. Par ailleurs, au vu de la CI_{50} également élevée de la sanguinarine ne permettant pas d'avoir un réel contrôle positif, il n'est pas exclu qu'ils puissent inhiber PfPPM9 mais que le test au vert de Malachite ne soit pas adapté ou pas assez sensible pour le démontrer. Enfin, il est également envisageable que les deux contaminants puisent perturber les tests d'inhibition enzymatique.

Pour la suite, des mises au point seront à réaliser sur ce test enzymatique, notamment essayer un substrat différent comme le para-nitrophényl phosphate (pNPP), afin de conclure sur l'implication de PfPPM9 en tant que cible. De plus, la même démarche sera à effectuer sur le site catalytique de PfPPM9 (45 kDa) correspondant au modèle 3D. En effet, d'après nos données préliminaires, celui-ci conserve 56% de l'activité phosphatasique, ce qui est suffisant pour étudier l'effet des hits. Il est aussi suggéré que la protéine recombinante entière soit repliée différemment par rapport à la protéine native, lui permettant de déphosphoryler mais ne permettant pas à un inhibiteur de se loger correctement au cœur du site catalytique. Ainsi, le site catalytique sur la protéine tronquée serait plus accessible, dans le cas d'un inhibiteur compétitif.

De surcroit, d'autres tests enzymatiques pourraient être explorés comme le test Enzchek qui est une méthode de dosage spectrophotométrique rapide et sensible du phosphate inorganique libéré en solution. La quantification est basée sur la différence d'absorbance entre le réactif ribonucléoside 2-amino-6mercapto-7-méthylpurine et le produit de la réaction de celui-ci avec un phosphate libre. La différence d'absorbance est évaluée au cours du temps, ce qui permet de suivre la cinétique de la

libération de phosphate par les systèmes biologiques, ici, par notre phosphatase.[128] Ceci apporterait ainsi des informations quant à la cinétique d'action de nos hits sur la phosphatase, le cas échéant.

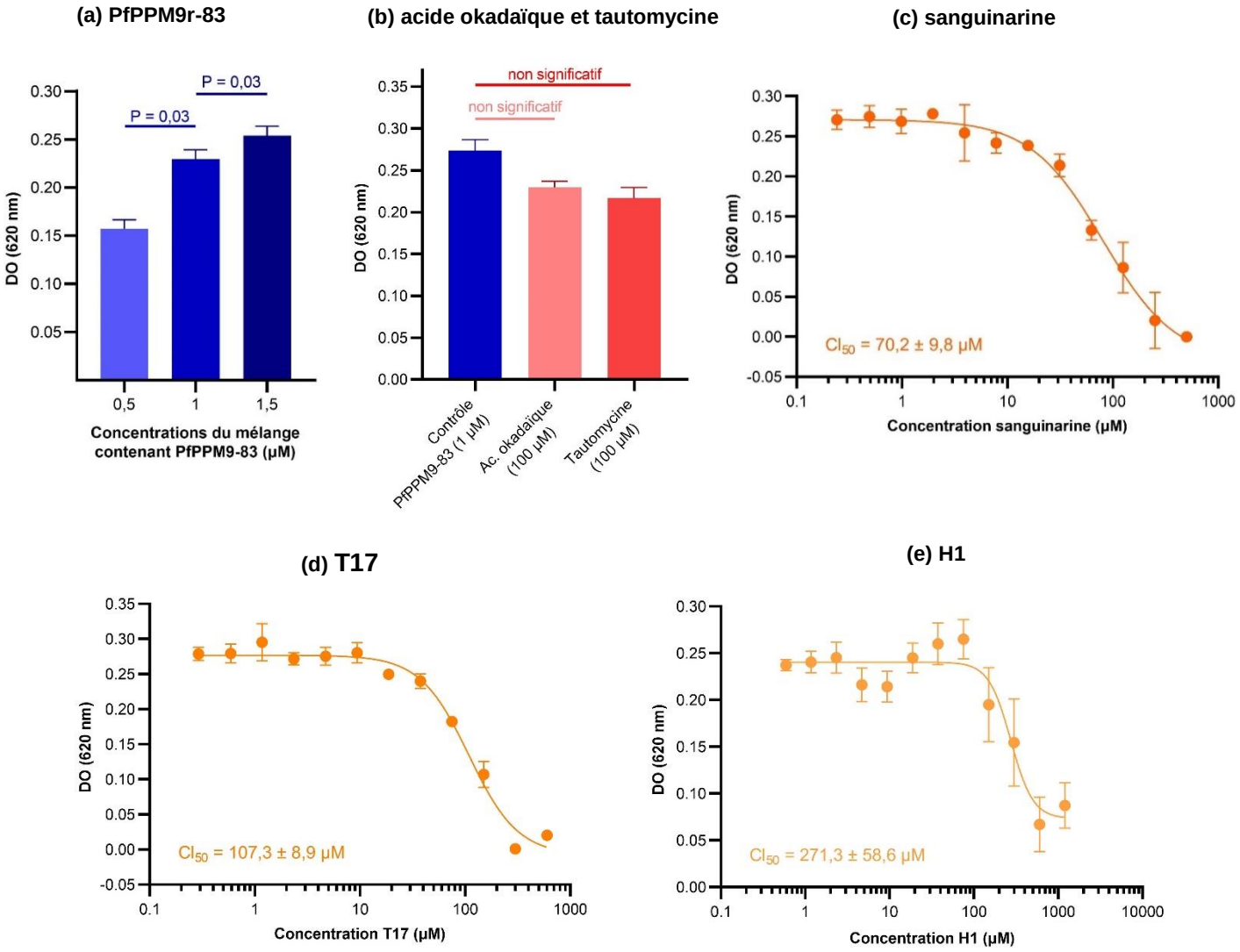


Figure 46. Effet de différents composés sur l'activité phosphatasique de PfPPM9r-83 en mélange (1 µM) **(a)** Activité enzymatique de PfPPM9r-83, **(b)** Acide okadaïque et tautomycine, inhibiteurs de PP1 et PP2A (contrôles négatifs), **(c)** Sanguinarine, inhibiteur de PP2C (contrôle positif), **(d) T17**, meilleur hit obtenu et **(e) H1**, premier hit issu du criblage virtuel. L'activité phosphatasique est mesurée avec le test au vert de Malachite, en présence du substrat α-caséine (62,5 µg/mL). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann Whitney. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

6. Études chez l'animal : administration par voie intrapéritonéale

6.1. Études pharmacocinétiques par voie intrapéritonéale

Dans le cadre d'un développement de médicaments, il est indispensable d'étudier le devenir des composés synthétisés dans l'organisme, de leur entrée dans celui-ci jusqu'à leur sortie. Dans ce sens, des études pharmacocinétiques (PK), financées par Inserm Transfert (décision du comité « preuve de concept » CoPoC, Inserm), ont été entreprises dans notre laboratoire sur quatre hits parmi nos meilleures molécules : **T16**, **T17**, **T20** et **T26**. Ces derniers comportent des structures chimiques diverses de par leurs groupements R_1 (*n*-Bu, *tert*-Bu ou Bn) et R_2 (Br ou Naph) et présentent tous une CI_{50} inférieure ou égale à 90 nM sur souches HB3 et Dd2, ainsi que des index de sélectivité supérieurs à 80 (*Tableau 11*).

Les études pharmacocinétiques sont l'analyse de l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion d'un composé (ADME) suite à l'examen de sa concentration dans l'organisme au cours du temps. Dans un premier temps, l'administration par voie intrapéritonéale (IP) ou sous-cutanée (SC) est à privilégier du fait de sa biodisponibilité presque complète et de son début d'action rapide grâce à l'évitement du tractus gastro-intestinal.[129] Dans un second temps, l'administration par voie orale est également à explorer. Les informations apportées sont nécessaires pour le choix du mode d'administration et l'adaptation des posologies dans le cadre de l'évaluation des composés dans un modèle animal de paludisme induit.

Par conséquent, lors des expérimentations animales auxquelles j'ai assisté, les molécules sont injectées par voie intrapéritonéale à des souris males CD1 à une dose de 10 mg/kg (3 souris par molécule). Des prélèvements de 50 µL de sang sont réalisés par voie retro-orbitale à l'aide de tubes capillaires à hématocrite héparinés aux temps 2', 5', 8', 20', 30', 1h, 2h, 6h, 8h et 10h. Le sang est immédiatement récolté dans des microtubes EDTA, centrifugé 10 min à 2000g à 4°C et les plasmas obtenus sont congelés à -20°C pour les dosages ultérieurs.

Le dosage des molécules, auquel j'ai été formé et que j'ai réalisé moi-même, a lieu au plateau PSM de l'équipe GRITA (Pr. Jean François Goossens, Dr. Mostafa Kouach, Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées ULR 7365 - GRITA et Plateau de Spectrométrie de Masse (I168ULD), UFR3S-Pharmacie de Lille). Dans une première étape, les molécules sont extraites à partir des échantillons plasmatiques par précipitation de protéines. Ensuite, après plusieurs étapes d'optimisation, elles sont séparées et quantifiées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) selon une gamme d'étalonnage avec la molécule **AMT44** comme étalon interne (*Figure 47*). Les résultats de dosages permettent de tracer des courbes pharmacocinétiques, c'est-à-dire des courbes représentant les concentrations plasmatiques en molécules en fonction du temps post-injection.

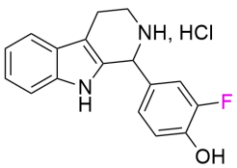


Figure 47. Structure du **AMT44** choisi comme étalon interne de quantification

D'après les courbes pharmacocinétiques obtenues, la concentration plasmatique des molécules **T17**, **T20** et **T26** reste toujours supérieure à leur CI_{50}, représentée par la ligne rouge, 10 heures après injection (*Figure 48*). Seule **T16** affiche une concentration plasmatique inférieure à sa CI_{50} dès 6h post-injection.

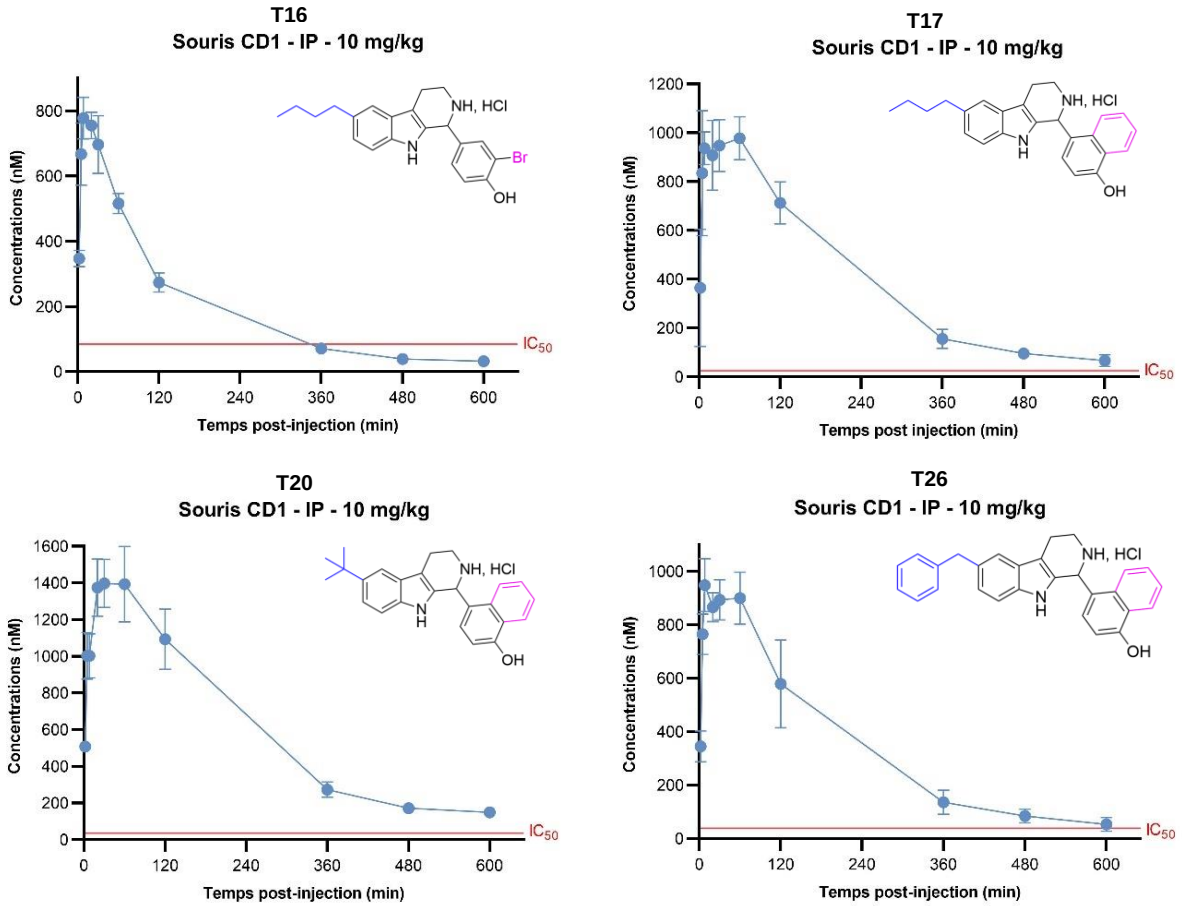


Figure 48. Courbes pharmacocinétiques des quatre molécules **T16**, **T17**, **T20** et **T26** suite à leur injection en IP à une dose de 10 mg/kg

Pour finir, les résultats bruts sont analysés par le Dr Nicolas Kambia (GRITA, faculté de Pharmacie de Lille) à l'aide du logiciel Pharmacokin (MathWorks®, USA) afin de calculer les paramètres pharmacocinétiques de chaque molécule.[130] Au total, six paramètres PK ont été calculés :

- le temps $\mathbf{t_{max}}$: temps auquel la concentration plasmatique totale ($\mathbf{C_{max}}$) est atteinte, reflétant la vitesse d'absorption de la molécule.
- le volume de distribution ($\mathbf{V_d}$) : quantité de molécule distribuée dans l'organisme.
- la clairance plasmatique totale ($\mathbf{CL_T}$) : volume de molécule totalement éliminé de l'organisme par unité de temps.
- le temps de demi-vie ($\mathbf{t_{1/2}}$) : temps au bout duquel la concentration maximale en molécule a diminué de moitié, caractérisant la vitesse d'élimination de la molécule et permettant de prévoir sa fréquence d'administration.
- l'**AUC** (*Area Under Curve*) : indice d'exposition de l'organisme aux effets du produit, permettant la mesure de la biodisponibilité d'un médicament.

Pour nos quatre molécules **T16**, **T17**, **T20** et **T26**, les paramètres pharmacocinétiques sont similaires (*Tableau 19*). En effet, elles expriment toutes une absorption rapide avec une concentration maximale très élevée, entre 8 et 40 fois supérieure aux CI_{50} des différents composés, atteinte entre 10 et 23 min. De même, elles se diffusent considérablement dans l'organisme, avec en moyenne un volume de distribution de 19,5 L/kg, et leur clairance plasmatique totale, en moyenne de 270 mL/h, est élevée. **T16** présente un AUC faible avec une clairance et un volume de distribution sensiblement plus importants que les trois autres, justifiant que sa concentration plasmatique se retrouve inférieure à sa CI_{50} dès 6h post-injection. L'ensemble de ces résultats s'explique à travers la lipophilie apportée à nos molécules, par la chaîne carbonée ou groupement aromatique en R_1 et le naphtalène ou brome en R_2. Effectivement, plus une molécule est lipophile, plus elle est distribuée et métabolisée, donc éliminée rapidement. Cela est confirmé avec les temps de demi-vie compris entre 2 et 2,75h, attestant d'une élimination rapide.

	CI_{50} PfHB3 (nM)	IS (HepG2 /HB3)	C_{max} (nM)	t_{max} (min)	$t_{1/2}$ (min)	V_d (L/kg)	AUC (h.ng/mL)	CL_T (L/h)
T16	85 ± 26	80,3	694 ± 38	10,4 ± 5	120 ± 1,5	27,9 ± 3	972 ± 53	0,45 ± 0,04
T17	25 ± 13	765,9	1016 ± 56	11,9 ± 5	142 ± 16	17,9 ± 1	1611 ± 47	0,24 ± 0,02
T20	36 ± 8	274,3	1398 ± 153	22,6 ± 6	167 ± 19	13,8 ± 2	2787 ± 72	0,16 ± 0,02
T26	39 ± 6	284,1	959 ± 100	13,2 ± 1	134 ± 20	18,5 ± 3	1458 ± 142	0,25 ± 0,06

Tableau 19. Paramètres pharmacocinétiques des molécules **T16**, **T17**, **T20** et **T26** administrées par voie intrapéritonéale (IP) à 10 mg/kg

En parallèle, la présence d'une glucuronoconjugaison chez les quatre molécules a été détectée rapidement. Il s'agit de la voie de conjugaison la plus courante chez les mammifères,[131] ayant lieu dans le foie. Elle se caractérise par la fixation d'un acide β-glucuronique à l'hydroxyle du phénol dans notre cas et se distingue par un signal caractéristique en LC-MS/MS, dès 2 min post-injection. Cela améliore l'hydrosolubilité des molécules et facilite leur élimination rénale, expliquant leur courte demi-vie. Ainsi, il serait intéressant de reproduire ces conjugués afin de les doser dans le plasma pour connaitre leurs proportions par rapport aux molécules actives.

6.2. Étude de l'efficacité *in vivo* par voie intrapéritonéale

6.2.1. Sur souris « humanisées » infectées par *P. falciparum*

Suite aux études pharmacocinétiques, l'étude de l'activité antipaludique des trois composés **T17**, **T20** et **T26**, présentant les meilleurs profils, a été réalisée dans un modèle animal de paludisme. La souris infectée par *P. berghei* est un modèle de référence, notamment pour tester les drogues *in vivo*.[132] Toutefois, comme expliqué auparavant, la non essentialité du gène codant PPM9 chez *P. berghei* a été démontrée par notre équipe. Par conséquent, si PPM9 était bien la cible principale, ce modèle animal ne serait pas adapté pour évaluer l'efficacité *in vivo* de nos hits, ce qui nous a incité à employer dans un premier temps le modèle de souris « humanisées » NOD-*scid IL-2Rγ*^{null} greffé avec des érythrocytes humains et infecté par *P. falciparum*. [101] D'ailleurs, ce modèle animal devient une

référence pour évaluer de nouveaux composés antipaludiques. Dans ce sens, ces expériences *in vivo*, financées par Inserm Transfert (décision du comité « preuve de concept » CoPoC, inserm ; janvier 2023), ont été réalisées par l'équipe du Dr Iñigo Angulo-Barturen de la société TAD (The Art of Discovery, Derio-Bilbao, Espagne)[103] qui développe notamment ce modèle.

Pour cela, des souris NOD-*scid IL-2Rɣ*^{null} sont greffées avec des érythrocytes humains (> 40 % des érythrocytes humains dans le sang périphérique) avant d'être infectées par voie intraveineuse avec des globules rouges parasités par *P. falciparum*, 72h avant la première administration de nos composés. Ces derniers sont ensuite injectés une fois par jour pendant quatre jours par voie intrapéritonéale (IP) à 10, 30 et 60 mg/kg (1 souris par molécule et par dose). Le nombre d'injections et les doses choisies pour cette première expérience de preuve de concept ont été décidés en lien avec les paramètres PK déterminés précédemment sur les souris CD1 et suite aux discussions avec Nicolas Kambia et TAD. Une souris est également injectée avec de la chloroquine (CQ) à 10 mg/kg par voie orale comme contrôle, une fois par jour durant deux jours. Chaque jour pendant le traitement, la parasitémie est évaluée en mesurant le pourcentage d'érythrocytes infectés dans le sang périphérique par frottis sanguin et par cytométrie en flux. Elle est également mesurée régulièrement jusqu'au soixantième jour après la première administration de molécules pour vérifier la guérison des individus ou la détection d'une recrudescence (*Figure 49*).

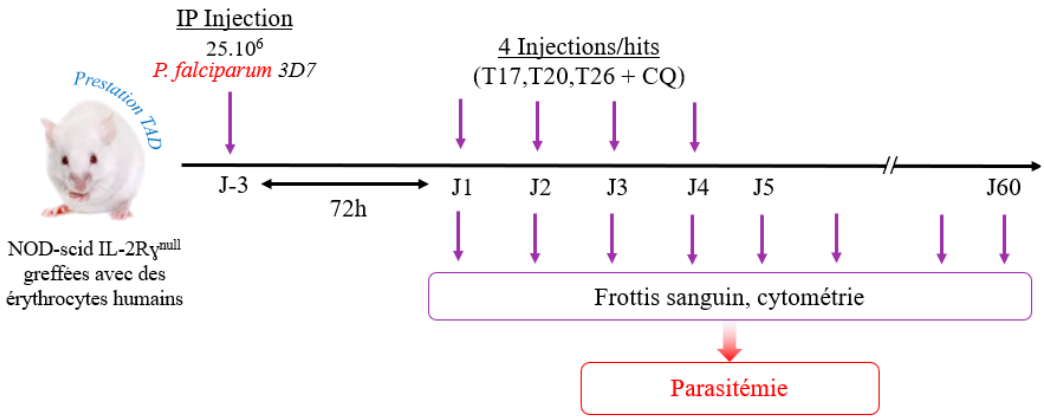


Figure 49. Schéma descriptif des différentes étapes d'une expérience d'efficacité *in vivo* chez des souris NOD-*scid IL-2Rɣ*^{null} infectées par *P. falciparum*

Les résultats obtenus suite aux quatre jours d'injection démontrent que la croissance de *P. falciparum* dans le sang des souris humanisées n'a pas été affectée quelle que soit la molécule ou la dose administrée (*Figure 50*). Cependant, selon l'équipe du Dr Iñigo Angulo-Barturen, l'absence d'effet antipaludique de nos molécules au cours de cette étude n'exclut pas qu'elles puissent inhiber la réplication du parasite *in vivo* dans ce modèle. En effet, ces résultats ne peuvent être interprétés seulement avec une connaissance solide de l'exposition des composés dans le sang de ces souris particulières. Chez celles-ci, l'hématocrite peut atteindre 75 à 80% du fait de l'injection d'érythrocytes humains, contre seulement 45% environ chez nos souris CD1, rendant impossible la comparaison entre les deux modèles. Ainsi, il serait préférable de réaliser une étude complète de pharmacocinétique et de pharmacodynamie (PK/PD) sur ces souris humanisées. Celles-ci n'ont pas eu lieu du fait de la contrainte financière mais seront à prévoir ultérieurement. C'est d'ailleurs ce qui a permis de régler le même problème pour une famille d'inhibiteurs de plasmepsines (protéases

aspartiques de *P. falciparum*) pour laquelle la démonstration de l'efficacité *in vivo* a échoué à plusieurs reprises. Mais, suite aux résultats de PK/PD obtenus sur ce modèle, notamment leur courte demi-vie de 53 min, les bonnes conditions d'administration ont été trouvées (3 fois par jour à 40 mg/kg par voie orale) et ont permis de démontrer l'efficacité *in vivo* de la famille.[133]

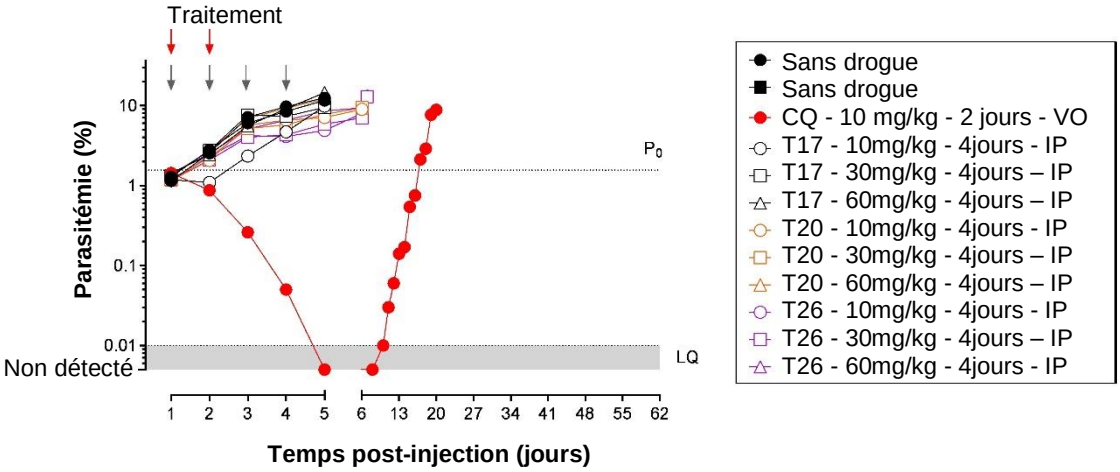


Figure 50. Efficacité *in vivo* des composés T17, T20 et T26 sur *P. falciparum*
Résultat du pourcentage d'érythrocytes humains infectés par *P. falciparum* par rapport au nombre d'érythrocytes circulants total (murins + humains) en fonction du temps post-injection des différents traitements

6.2.2. Sur souris CD1 infectées par *P. berghei*

Dans le but de démontrer un effet antipaludique de nos composés *in vivo*, une nouvelle expérience a été réalisée sur le modèle de souris infectées par *P. berghei*, qui est le modèle de référence pour tester les drogues *in vivo*.[132] En plus de cela, les résultats de l'effet de nos hits sur l'activité enzymatique de PfPPM9 présentés précédemment n'ont pas permis de conclure quant à leur efficacité à inhiber cette phosphatase, ce qui laisse envisager qu'ils exercent leur action sur une ou plusieurs autres cibles. De ce fait, la souris infectée par *P. berghei* devient un modèle exploitable et intéressant pour évaluer l'efficacité de nos molécules. Ici, seul le meilleur composé **T17** a été testé.

Le cycle de *P. berghei* ANKA étant maintenu par notre équipe, ces expériences ont lieu directement dans notre laboratoire. L'efficacité du composé **T17** est évaluée à l'aide du test de suppression de Peters sur quatre jours.[102] Pour cela, différents groupes d'animaux sont employés :

- 6 souris CD1 traitées par **T17** à 10 mg/kg par voie IP, 2 fois par jour pendant 4 jours
- 6 souris CD1 traitées par **T17** à 30 mg/kg par voie IP, 2 fois par jour pendant 4 jours
- 6 souris CD1 traitées avec 7% de DMSO et 1,25% de Tween 80 dans du PBS (même formulation que **T17**) par voie IP, 2 fois par jour pendant 4 jours (contrôle négatif)
- 5 souris CD1 traitées par la CQ à 10 mg/kg par voie IP, 1 fois par jour pendant 4 jours (contrôle positif)

Pour chaque groupe au jour 0 (J0), *P. berghei* est inoculé et la première dose de composé est administrée par voie IP. Les animaux sont ensuite traités durant trois autres jours (J1, J2 et J3) puis,

le quatrième jour (J4), un prélèvement de sang périphérique permet d'évaluer la parasitémie par examen microscopique de frottis sanguins colorés au Giemsa. Cette dernière est également contrôlée aux jours sept et neuf post-traitement (*Figure 51*). En outre, des prélèvements de 50 µL de sang ont été réalisés à J4 afin de récupérer le plasma et de doser la quantité de **T17** qu'il contenait.

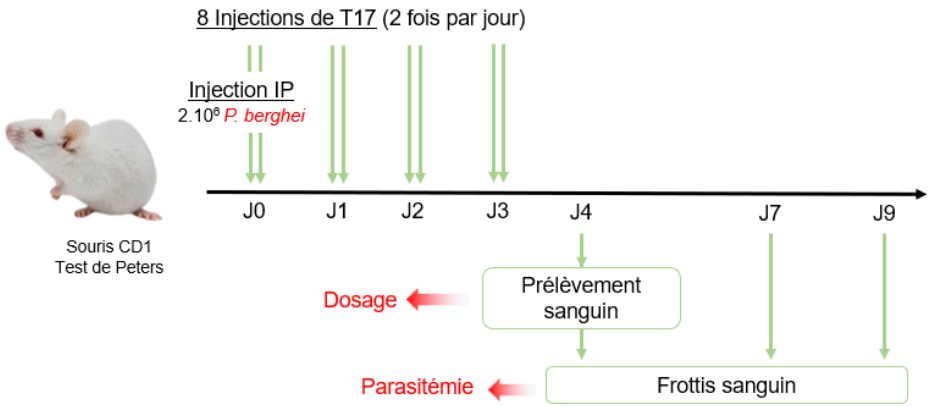


Figure 51. Schéma descriptif des différentes étapes d'une expérience d'efficacité *in vivo* chez des souris CD1 infectées par *P. berghei* selon le test de suppression de Peters (**Peters 1975**)

Les mesures de parasitémie attestent qu'un traitement par **T17** à 30 mg/kg deux fois par jour élimine en quatre jours les parasites qui sont non détectables sur frottis sanguin, tandis que le groupe témoin présente une parasitémie de 4,5 ± 0,3 % (*Figure 52a*). De plus, la concentration plasmatique de **T17** dans ce groupe s'élève à 163,6 ± 75,6 nM, soit une concentration 6,5 fois supérieure à sa CI_{50} (25 nM sur PfHB3) et 1,5 fois supérieure à sa CI_{90} (108 nM sur PfHB3). Par ailleurs, une inhibition significative de 64% de la croissance de *P. berghei* est observée avec **T17** à 10 mg/kg (parasitémie de 1,6 ± 1,0%) avec une concentration plasmatique de 38,4 ± 8,2 nM proche de la CI_{50}. Quant à la chloroquine, aucun parasite n'est détectable à J4 post-traitement, comme attendu (*Figure 52a*).

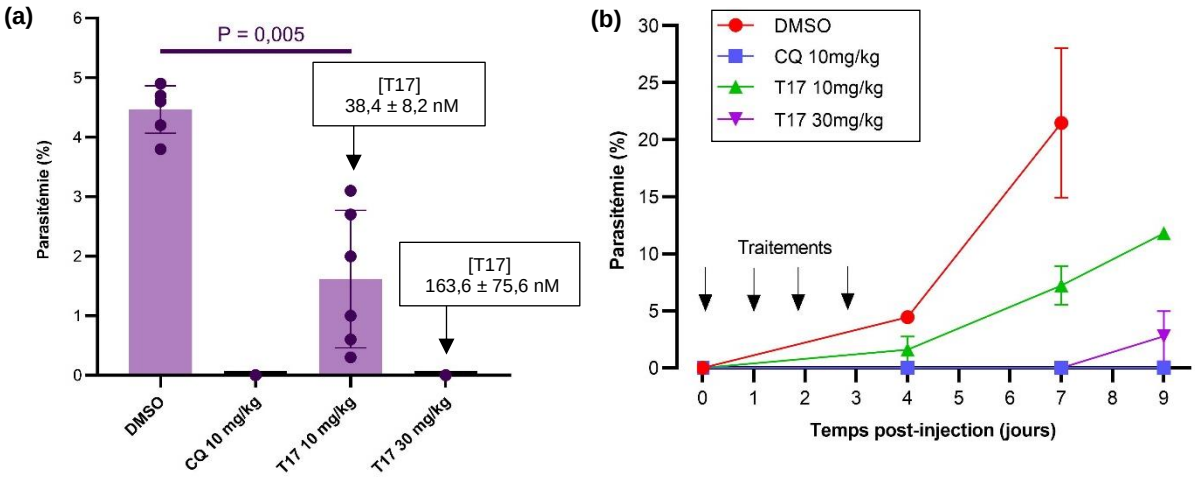


Figure 52. Efficacité *in vivo* du T17 administré par voie IP dans un modèle de souris infectées par *P. berghei*. (**a**) Pourcentage de parasitémie au jour 4 après traitement des différents groupes de souris en IP par : **DMSO** (contrôle négatif), **CQ** (contrôle positif) ou **T17** à 10 et 30 mg/kg, 2 fois/jour. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann Whitney. Une valeur de P < 0,05 est considérée comme significative. (**b**) Suivi de la parasitémie pour chaque groupe de souris à J4, J7 et J9 post-traitement.

De surcroît, le suivi de la parasitémie au cours du temps a montré que celle-ci continuait d'augmenter dans le groupe témoin (21,5 ± 4,9 % au jour 7) et dans le groupe recevant **T17** à 10 mg/kg (7,2 ± 1,4 % au jour 7), alors que les parasites sanguins sont restés indétectables chez les souris traitées par **T17** à 30 mg/kg au jour sept (*Figure 52b*). Puis, une reprise de la croissance parasitaire (2,8 ± 1,9 %) a été observée au jour 9 chez ce même groupe.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que le composé **T17** est efficace pour inhiber la croissance de *P. berghei in vivo* à une dose de 30 mg/kg par voie IP deux fois par jour. Cette preuve de concept est indispensable dans le cadre d'un dépôt de brevet pour des composés à visée antipaludique. Néanmoins, la dose employée reste une dose élevée du fait de l'élimination rapide du composé, dont la demi-vie est d'environ 2h20, et elle nécessite d'être améliorée. En effet, il a été expliqué précédemment que le motif phénol, indispensable à l'activité du **T17**, conduit souvent à des métabolites de phase II *in vivo*, plus précisément à des glucuronoconjugués, justifiant sa rapidité d'élimination.[131] Pour pallier ce problème, une stratégie de protection de cette fonction par l'intermédiaire de prodrogues a été envisagée.

6.3. Conception de prodrogues du T17

Une prodrogue est un précurseur inactif d'une molécule active, conçue pour être bio-activée suite à une réaction enzymatique ou chimique, une fois administrée *in vivo*. L'objectif de la conception de prodrogues est d'optimiser les propriétés pharmacocinétiques (ADME) de la molécule active en lui offrant une stabilité chimique dans le tractus gastro-intestinal et en augmentant ainsi sa durée d'action. La prodrogue agit alors comme une forme chimique à libération prolongée.[134]

Afin de concevoir une prodrogue de phénol, la stratégie la plus courante est de fonctionnaliser la molécule active avec un groupement qui sera clivé *in vivo*, comme des phosphates sensibles aux phosphatases, des esters sensibles aux estérases ou des carbamates ou amidines sensibles aux amidases.[131,134] Parmi les groupes fonctionnels, nous avons choisi de protéger le phénol du **T17** par un ester acétique, très sensible aux estérases, et un *N*,*N*-diméthylcarbamate plus stable.[131] Le groupe acétyle est aisément apporté par une réaction d'acétylation sur le 4-hydroxy-1-naphtaldéhyde (**9c**) en présence d'anhydride acétique et de triéthylamine dans le THF (**28**), suivie d'une réaction de Pictet Spengler classique sur la 5-butyltryptamine (**8f**)(*Schéma 14a*). Pour sa part, la fonctionnalisation par le *N*,*N*-diméthylcarbamate a lieu directement sur la tétrahydro-β-carboline **T17** (*Schéma 14b*). L'amine secondaire cyclique de celle-ci est d'abord protégée par un *tert*-buthoxycarbonyle (Boc) en conditions dicarbonate de di-*tert*-butyle et triéthylamine dans le THF (**29**), avant fonctionnalisation du phénol par le chlorure de diméthylcarbamoyle en milieu basique dans l'acétonitrile à reflux (**30**). Le Boc est ensuite clivé en milieu acide chlorhydrique dans du dichlorométhane à reflux en tube scellé.

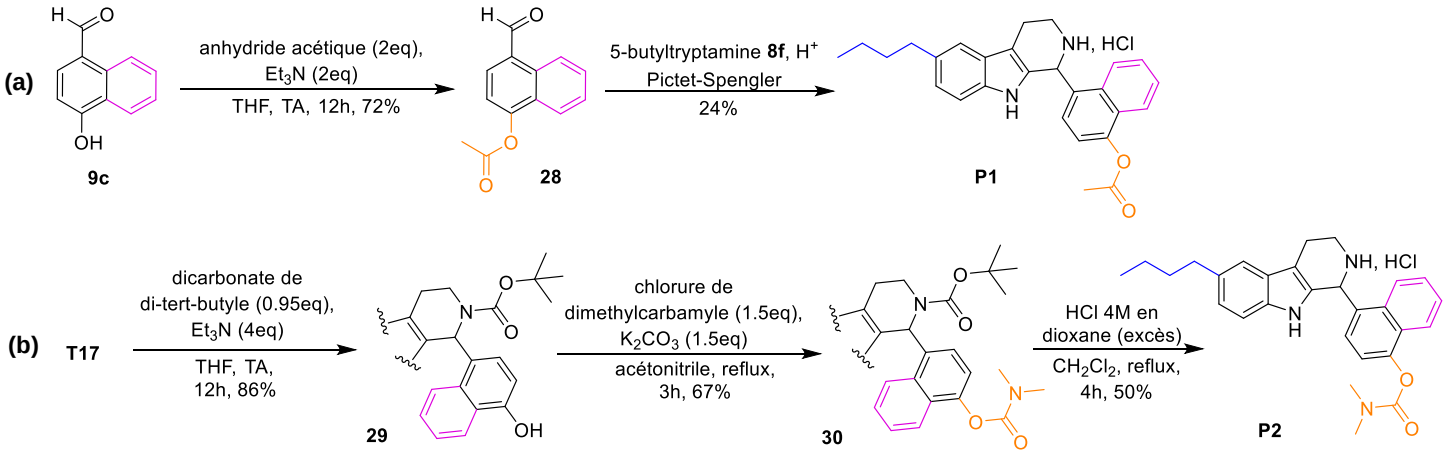


Schéma 14. Schémas de synthèse des prodrogues de T17 fonctionnalisées au niveau du phénol
(**a**) **P1** fonctionnalisée par un acétyle, (**b**) **P2** fonctionnalisée par un *N*,*N*-diméthylcarbamate.

6.4. Étude de l'activité *in vitro* et de la stabilité des prodrogues

L'activité des deux prodrogues a ensuite été évaluée *in vitro* sur une culture de PfHB3. Ordinairement, une prodrogue est inactive *in vitro* mais est bio-activée *in vivo* pour libérer la molécule active. Ainsi, vérifier l'absence d'activé antipaludique de **P1** et **P2** *in vitro* est une étape préliminaire primordiale avant de les étudier en pharmacocinétique *in vivo*.

Dans le cas de **P2**, la CI_{50} mesurée est de 1280 ± 585 nM, confirmant qu'elle n'inhibe pas la croissance de *P. falciparum in vitro* et que son groupement carbamate est stable. En revanche, **P1** affiche une CI_{50} de 51 ± 18 nM, soit du même ordre de grandeur que **T17**. Cela suggère que le milieu de culture dans lequel prolifèrent les parasites contient des estérases, donc son groupement ester est rapidement métabolisé pour libérer le **T17** actif. Afin de vérifier cette hypothèse, la stabilité de **P1** a été étudiée à travers diverses expériences en LC-MS/MS.

Tout d'abord, la comparaison des intensités des signaux obtenus en LC-MS/MS pour **P1** et **T17** entre une solution fraichement préparée de **P1** dans le méthanol (*Figure 53a*) et une solution de **P1** dans le méthanol conservée durant un mois à température ambiante (*Figure 53b*) a mis en évidence la dégradation de **P1** en **T17** dans le temps. En effet, après un mois à température ambiante, l'intensité du signal de **P1** diminue d'un facteur 1000, alors que celle de **T17** augmente, passant de $1{,}3 \times 10^5$ à $3{,}9 \times 10^6$.

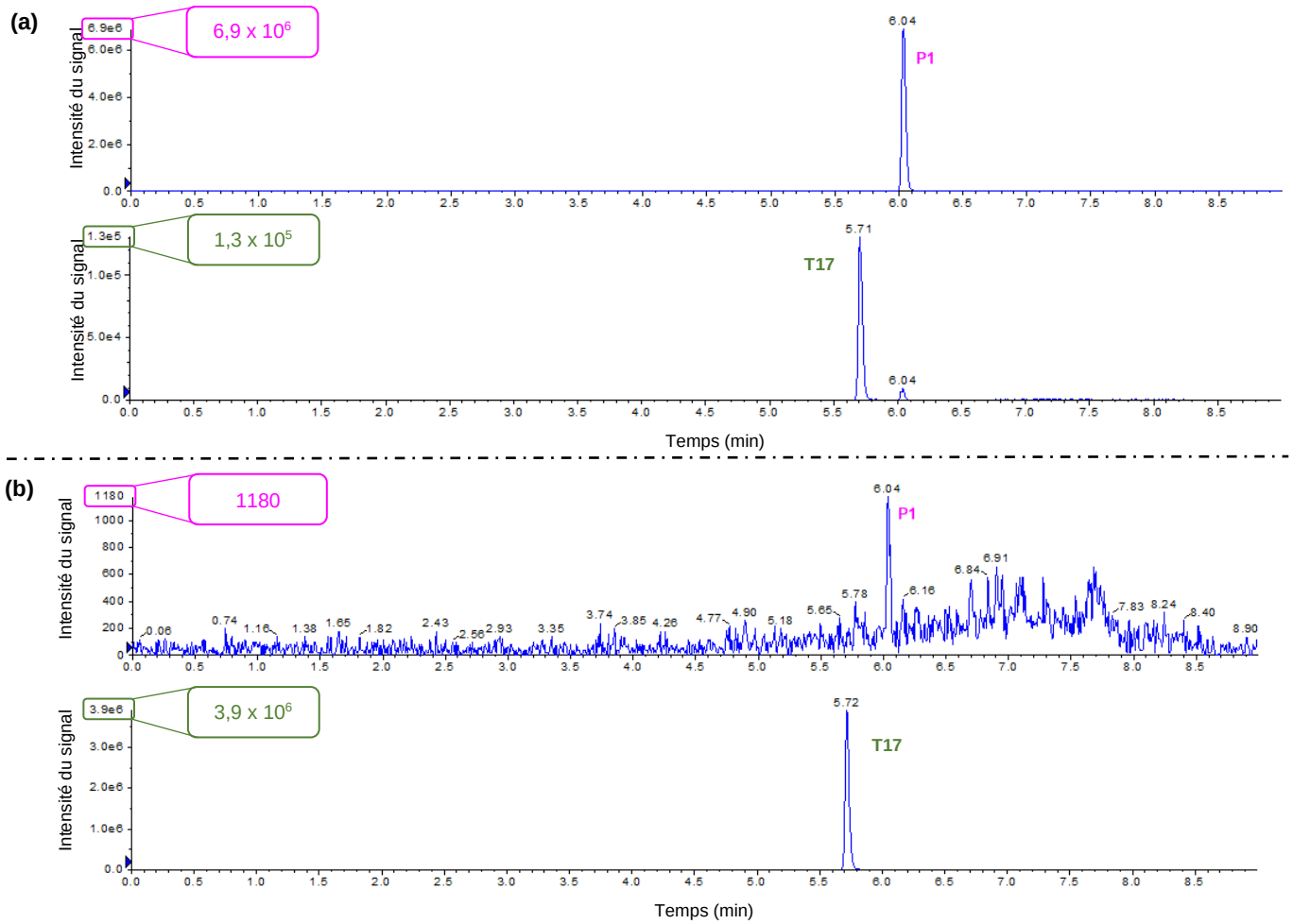


Figure 53. Chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour les composés **P1** (en rose) et **T17** (en vert) dans des solutions de **P1** à 0,2 µM (**a**) fraichement préparée dans du MeOH et (**b**) après un mois à température ambiante dans le MeOH.

De plus, la dégradation de **P1** a ensuite été évaluée en présence de plasma ou de méthanol, en suivant les étapes de préparation d'échantillons par précipitation de protéines employées lors des études pharmacocinétiques, toujours en comparaison avec une solution de **P1** fraichement préparée dans le méthanol. Les étapes de préparation d'échantillons comprennent une congélation à -20°C dans le méthanol et/ou le plasma, une centrifugation et une évaporation à 46°C. Les résultats obtenus attestent que, même en absence de plasma, **P1** n'est pas stable et se dégrade rapidement en **T17** suite aux étapes de précipitation de protéines, avec une intensité de signal diminuant d'un facteur 19 et un taux de **T17** augmentant d'un facteur 16 (*Tableau 20, entrées 1 et 2*). En présence de plasma, la dégradation est encore plus frappante avec une réduction d'un facteur 100 en **P1** et une hausse en **T17** d'un facteur 22 (*Tableau 20, entrées 1 et 3*). Par conséquent, l'instabilité chimique de **P1** et sa rapide métabolisation ne permettent pas de l'utiliser en tant que prodrogue lors d'études pharmacocinétiques *in vivo*.

De surcroît, nous n'avons pas jugé nécessaire d'appliquer les mêmes expériences sur la prodrogue **P2** pour laquelle la CI_{50} élevée (1280 nM sur PfHB3) atteste déjà de sa stabilité *in vitro*.

Entrées	Conditions	Intensité du signal de P1 (x 10^4)	Intensité du signal de T17 (x 10^4)
1	Solution fraiche en MeOH	540	8,6
2	Solution fraiche en MeOH + étapes d'extraction (précipitation de protéines)	29	140
3	Solution fraiche dans plasma + étapes d'extraction (précipitation de protéines)	5,3	190

Tableau 20. Intensité des signaux de chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour les composés **P1** et **T17** dans des solutions de **P1** à 50 nM dans différentes conditions

7. Études chez l'animal : administration par voie orale

Aujourd'hui, les voies d'administration parentérales sont évitées du fait des limitations quant à l'obtention d'un produit injectable de longue conservation.[135] De ce fait, l'administration par voie orale de composés en développement à visée antipaludique est une obligation. En effet, comme vu précédemment, le traitement du paludisme non compliqué a lieu le plus souvent par cette voie. Celle-ci offre à la fois une simplicité d'administration et une large acceptation pour les patients qui ingèrent directement le médicament sous forme solide (comprimés ou gélules) ou liquide (suspensions ou solutions) sans l'aide d'un professionnel de santé. Une fois ingéré, le médicament est absorbé par le tractus gastro-intestinal avant de se diriger dans le foie où il est métabolisé. Il passe ensuite dans la circulation sanguine afin d'être distribué aux divers tissus et organes sur lesquels il exerce ses effets. Ainsi, l'efficacité d'un traitement par voie orale dépend fortement des caractéristiques de la ou des molécule(s) qui le composent, notamment leur solubilité, leur métabolisme hépatique et leur concentration dans l'organisme. Afin d'améliorer ces propriétés, l'utilisation d'un système d'administration à base de cyclodextrines est très courant.[136]

7.1. Formulation des composés en β-cyclodextrine

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques dont la forme conique offre une cavité interne hydrophobe entourée d'une surface externe hydrophile (*Figure 54a et b*). Les plus courantes comportent six, sept ou huit unités de glucose, respectivement appelées les α-, β- et γ-cyclodextrines. Leur particularité est directement liée à leur cavité permettant l'entrée de molécules invitées. Cela forme des complexes d'inclusion qui améliorent de loin la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du composé invité en augmentant sa solubilité, sa stabilité notamment face à la lumière, la chaleur ou aux enzymes métaboliques, et sa biodisponibilité, tout en réduisant ses effets secondaires. Ainsi, l'efficacité de la molécule est augmentée. De nombreuses formulations à base de cyclodextrines ont été approuvées cliniquement et sont largement employées dans les produits pharmaceutiques, l'alimentation, les cosmétiques, l'industrie et l'agriculture.[136,137] Récemment, cette stratégie a été appliquée sur la méfloquine en vue d'optimiser son profil de solubilité à 10 mg/mL dans une solution orale buvable. L'emploi d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HPβCD) ou de β-cyclodextrine méthylée de façon aléatoire (RAMEB) a amené à une meilleure solubilité par la formation d'un complexe d'inclusion, ce qui impactera l'application de la méfloquine dans la prophylaxie et le traitement du paludisme non compliqué chez les enfants.[138]

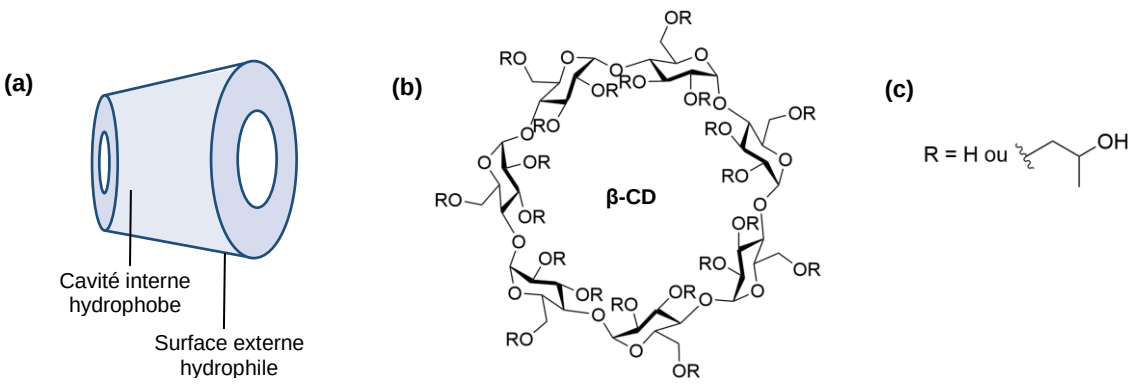


Figure 54. Les cyclodextrines. (**a**) Représentation d'une cyclodextrine en 3D, (**b**) Struture générale d'une β-cyclodextrine, (**c**) Structure de la 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine

Par conséquent, dans le but d'effectuer des études chez l'animal avec une administration par voie orale du composé **T17** et de sa prodrogue **P2**, des formulations de ces derniers en 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HPβCD) ont été entreprises (*Figure 54c*). Pour cela, la HPβCD solubilisée dans l'eau est ajoutée goutte à goutte à la solution de composé en DMSO, suivie d'une addition goutte à goutte de PBS. Puis, l'encapsulation du **T17** dans la HPβCD a été vérifiée à travers diverses expériences de RMN, réalisées par la Pr. Stéphanie Delbaere (Équipe BBC, Inserm UMR-S1172). Il est supposé que **P2**, appartenant à la même famille chimique que **T17**, s'encapsule de la même manière que ce dernier.

Tout d'abord, la comparaison entre les spectres RMN ^{1}H du **T17** libre (*Figure 55a*) et du **T17** en présence de la HPβCD (*Figure 55b*) démontre une variation significative du déplacement chimique du proton aromatique H_5, passant de 7,46 ppm à 7,32 ppm, et un léger déplacement du proton H_7, supposant une inclusion du **T17** dans la cavité de la HPβCD. De plus, l'expérience ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY*)[139] en deux dimensions a permis de caractériser la géométrie du complexe en mettant en évidence des interactions dipolaires intermoléculaires entre les protons aromatiques H_5 et H_7 du **T17** et les protons de la HPβCD (encadré en orange sur la *Figure 65 en Annexe 1*). Ainsi, le cycle aromatique de l'indole du **T17** est à l'origine de l'association des deux partenaires (*Figure 55c*).

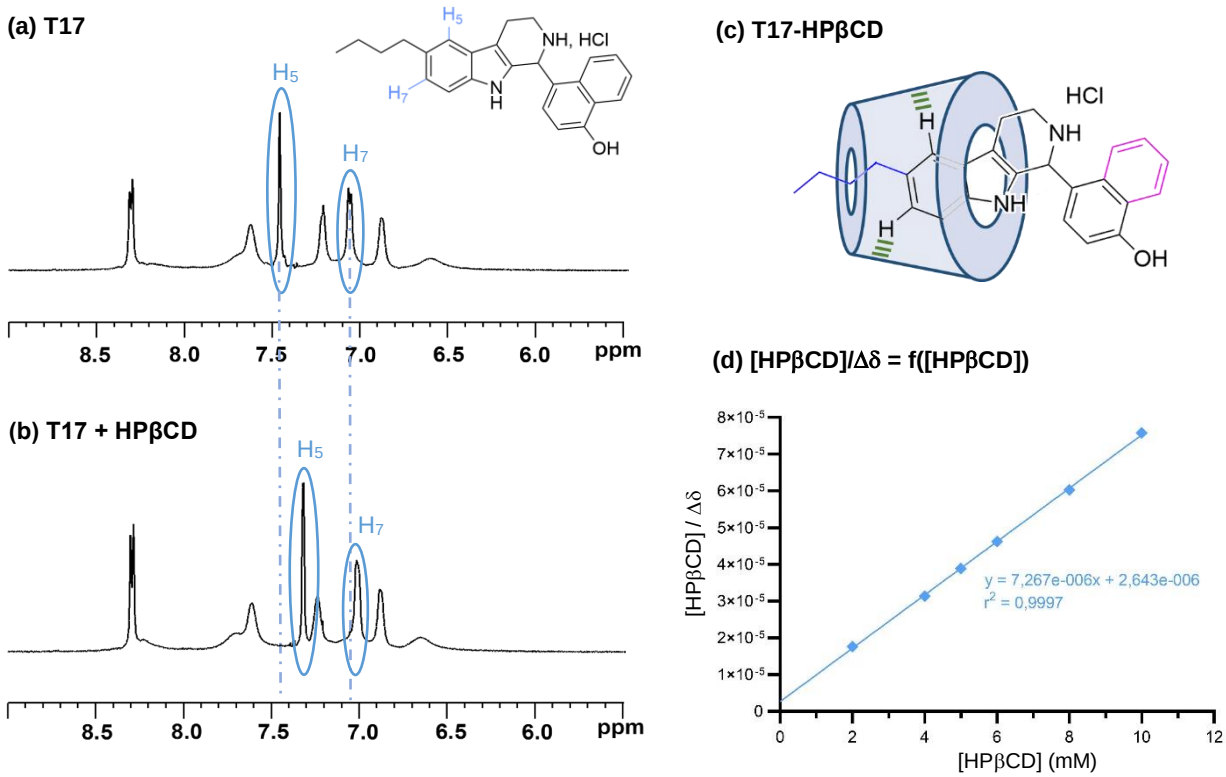


Figure 55. Étude du complexe T17-HPβCD en RMN
a. Spectre RMN ^{1}H du **T17** dans D_2O/DMSO (9:1)
b. Spectre RMN ^{1}H du **T17** + HPβCD (1:1) dans D_2O/DMSO (9:1)
c. Représentation de la géométrie du complexe **T17**-HPβCD
d. Courbe de Scott du complexe **T17**-HPβCD : [HPβCD]/Δδ = f([HPβCD])

Ensuite, par observation en RMN ^{1}H du déplacement chimique du proton H_5 du **T17** libre ou complexé et d'un proton de la HPβCD libre ou complexée en fonction des concentrations des deux partenaires, la stœchiométrie 1:1 du complexe a été caractérisée.[140,141] Cela signifie qu'une molécule de **T17** se lie à une molécule de HPβCD. Cette stœchiométrie est indispensable pour accéder à la constante d'association (K_a) du complexe. En effet, dans un complexe 1:1, K_a est déduite graphiquement suite à la mesure de la différence de déplacement chimique $\Delta\delta$ de H_5 en RMN ^{1}H en fonction de la concentration en HPβCD, avec une concentration fixe en **T17** (*Figure 55d*). Sa valeur est de 2700 $L.mol^{-1}$, admettant une association modérée entre les deux partenaires.[137,142]

Par conséquent, l'ensemble de ces données permet de conclure quant à la bonne inclusion de **T17** dans la HPβCD. De plus, il est supposé que **P2** s'associe de la même manière à la HPβCD du fait de son appartenance à la même famille chimique que **T17**.

7.2. Études pharmacocinétiques par voie orale

Une fois les composés **T17** et **P2** formulés en HPβCD, les formulations sont administrées par voie orale à des souris males CD1 à des doses de 10 et 30 mg/kg (3 souris par molécule et par dose). Comme lors des études pharmacocinétiques présentées précédemment, des prélèvements de 50 µL de sang sont réalisés aux temps 2', 5', 10', 30', 2h, 8h, 10h et 24h puis les molécules sont extraites des plasmas obtenus avant d'être séparées et quantifiées par LC-MS/MS. Précisons que **T17** est également dosé dans les échantillons de **P2**, qui est théoriquement métabolisé *in vivo*.

Concernant la prodrogue **P2** composée d'une fonction carbamate au niveau du phénol, elle est très stable et peu métabolisée, ce qui ne permet pas une libération assez importante de **T17** dans le plasma. En effet, à 30 mg/kg, les concentrations plasmatiques en **P2** atteignent 519 ± 350 nM alors que celles en **T17** ne dépassent pas 24 ± 11 nM. De plus, les concentrations plasmatiques en **T17** sont toujours inférieures à sa CI_{50} représentée par la ligne rouge (25 ± 13 nM sur PfHB3), ce qui ne permettrait aucune efficacité *in vivo* (*Figure 56*). A 10 mg/kg, les concentrations sont d'autant plus faibles, ne dépassant pas 86 ± 57 nM en **P2** et 13 ± 7 nM en **T17**.

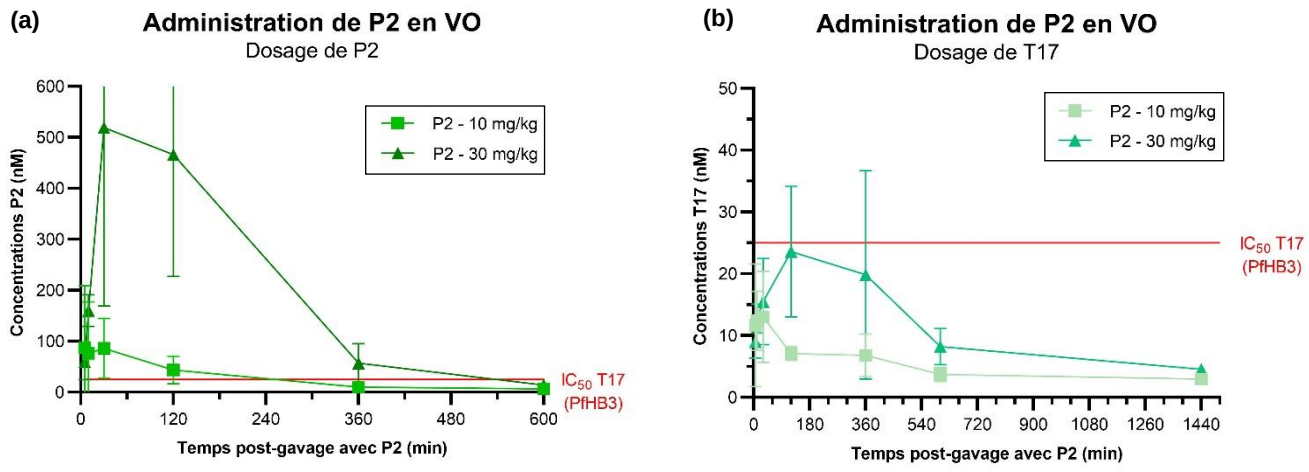


Figure 56. Courbes pharmacocinétiques obtenues suite à l'administration de P2 par voie orale (10 ou 30 mg/kg). (**a**) Dosage de **P2**, (**b**) Dosage de **T17**

Enfin, d'après les courbes pharmacocinétiques obtenues après administration du **T17** à 10 mg/kg, les concentrations plasmatiques de celui-ci restent toujours très faibles, 6,8 nM en moyenne, soit toujours inférieures à sa CI_{50} représentée par la ligne rouge (*Figure 57a*). De plus, l'absence de cinétique pour cette série n'a pas permis d'en calculer les paramètres PK et d'étudier de manière comparative voies IP et VO. La seule comparaison possible est la diminution des concentrations plasmatiques (C_{max}) d'un facteur de plus de 100 en passant de la voie IP à la voie orale.

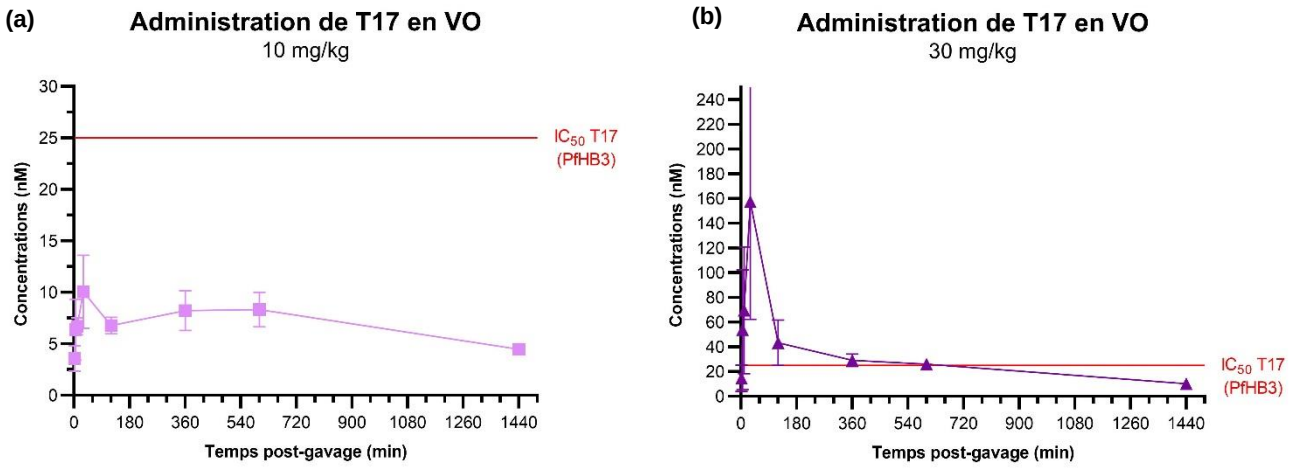


Figure 57. Courbes pharmacocinétiques obtenues suite à l'administration de **T17** par voie orale à (**a**) 10 mg/kg et (**b**) 30 mg/kg

Pour la dose de 30 mg/kg, les concentrations plasmatiques sont supérieures à la CI_{50} jusque 10h post-gavage avec une C_{max} moyenne de 86 nM (*Figure 57b*). Les paramètres PK calculés admettent une large distribution dans les tissus avec en moyenne un $\mathbf{V_d}$ de 353 L/kg et une **AUC** de 316,7 h.ng/mL, en adéquation avec une diffusion importante engendrée suite à l'administration par voie orale (*Tableau 21*). Cette dernière est également à l'origine d'une métabolisation considérable, engendrant une clairance élevée de 1,01 L/h en moyenne. De plus, **T17** est éliminé à 50% de la circulation en 3,6h, soit un temps de demi-vie moyen pour un antipaludique. Pour comparaison, la chloroquine a une demi-vie très longue de 1 à 2 mois[143,144] alors que les dérivés de l'artémisinine ont des très courtes demi-vies, comprises entre 30 min et 2h,[144,145] chacun d'eux après administration par voie orale. Par ailleurs, la demi-vie du **T17** est légèrement augmentée par rapport à celle obtenue par voie IP à 10 mg/kg (2h20). Enfin, malgré les concentrations plasmatiques bien plus faibles que celles à 10 mg/kg en IP, elles sont suffisantes pour envisager une étude d'efficacité *in vivo* par voie orale. Il est tout de même à noter que des différences inter-individuelles sont observables au sein de ce groupe, plus particulièrement pour la souris 3 pour laquelle les concentrations plasmatiques quantifiées sont très inférieures à celles des deux autres ($\mathbf{C_{max}}$ de 36,9 nM *vs.* 110,6 nM respectivement), engendrant des différences dans les paramètres PK calculés. Ces variabilités inter-individuelles sont courantes, notamment chez nos souris CD1 qui présentent une grande diversité génétique du fait de leur non-consanguinité.

	C_{max} (nM)	t_{max} (min)	$t_{1/2}$ (min)	V_d (L/kg)	AUC (h.ng/mL)	CL_T (L/h)
Souris 1	116,5	47,8	224	193	300,0	1,00
Souris 2	104,7	20,8	210	217	237,8	1,30
Souris 3	36,9	57,2	-	650	412,4	0,73
Moyenne	86,0 ± 43,0	41,9 ± 18,9	217 ± 10	353 ± 257	316,7 ± 63,8	1,01 ± 0,29

Tableau 21. Paramètres pharmacocinétiques de la molécule **T17** (CI_{50} = 25 ± 13 nM sur PfHB3, IS HepG2/HB3 = 765,9) administrée par voie orale (VO) à 30 mg/kg.

Finalement, au cours de cette étude, seul **T17** présente un profil suffisamment intéressant pour être évalué sur un modèle animal de paludisme. La prodrogue **P2** est trop stable, ce qui ne permet pas une libération contrôlée et prolongée de **T17** au cours du temps comme souhaité. Ainsi, de nouvelles prodrogues seront à explorer et leur métabolisme pourra être étudié par un test *in vitro* sur microsomes hépatiques ou sur culture *in vitro* d'hépatocytes afin de prédire leur clairance plus aisément.

7.3. Étude de l'efficacité *in vivo* par voie orale

Suite aux résultats pharmacocinétiques obtenus par voie orale, seul le composé **T17** a été engagé dans des études d'efficacité *in vivo* dans un modèle animal de paludisme. Comme pour la précédente étude, le modèle de souris CD1 infectées par *P. berghei* a de nouveau été employé et l'efficacité du composé a été évaluée à l'aide du test de suppression de Peters sur quatre jours,[102] employant différents groupes d'animaux :

- 6 souris CD1 traitées par **T17** à 30 mg/kg en VO, 1 fois par jour pendant 4 jours
- 6 souris CD1 traitées par **T17** à 30 mg/kg en VO, 2 fois par jour pendant 4 jours
- 6 souris CD1 traitées avec 7,8% de DMSO et cyclodextrine dans du PBS (même formulation que **T17**) en VO, 2 fois par jour pendant 4 jours (contrôle négatif)
- 6 souris CD1 traitées par la CQ à 10 mg/kg en VO, 1 fois par jour pendant 4 jours (contrôle positif)

Pour chaque groupe, les animaux sont traités par voie orale à J0, J1, J2 et J3, puis à J4, un prélèvement de sang périphérique au niveau de la queue permet d'évaluer la parasitémie par examen microscopique de frottis sanguins colorés au Giemsa.

Après les quatre jours d'administration, le traitement avec **T17** à 30 mg/kg 2 fois par jour admet une inhibition significative de la croissance parasitaire de *P. berghei* de 64% (parasitémie de 0,8 ± 0,4%) par rapport au groupe témoin ayant une parasitémie de 2,2 ± 0,5 % (*Figure 58*). Par ailleurs, le groupe ayant reçu 30 mg/kg 1 fois par jour présente une inhibition significative de 45% avec une parasitémie de 1,2 ± 0,5%. Malheureusement, aucune posologie n'a permis d'éliminer l'entièreté des parasites *in vivo* et le suivi de la parasitémie n'a donc pas était continué les jours suivants. En comparaison avec les précédentes études par voie IP, la molécule **T17** comporte la même efficacité *in*

vivo à 30 mg/kg 2 fois par jour en VO qu'à 10 mg/kg 2 fois par jour en IP. Enfin, la chloroquine a éliminé la totalité des parasites comme attendu.

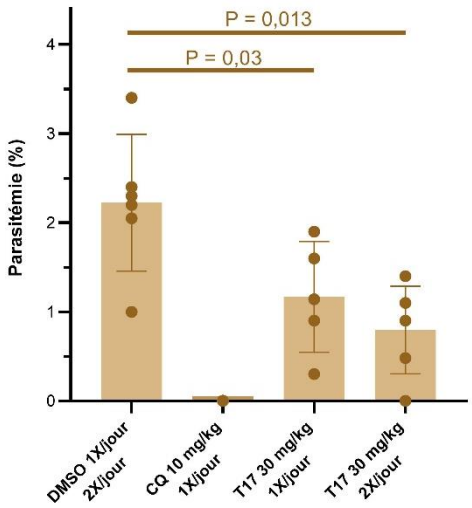


Figure 58. Efficacité *in vivo* du T17 administré par voie orale dans un modèle de souris infectées par *P. berghei*. Pourcentage de parasitémie au jour 4 après traitement des différents groupes en VO par **DMSO** (contrôle négatif), **CQ** (contrôle positif) et **T17** à 30 mg/kg, 1 et 2 fois/jour. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann Whitney. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

D'après Katsuno et ses collaborateurs, il est recommandé qu'un composé principal administré par voie orale à une dose inférieure à 50 mg/kg doit éradiquer 90% de l'agent pathogène ciblé, généralement après quatre doses en quatre jours, dans un modèle de souris atteinte de paludisme sévère.[117] Dans notre cas, le composé **T17** n'atteint pas une telle efficacité sur le modèle de souris infectées par *P. berghei*. Cela est probablement due à sa demi-vie de 3,6h et à ses faibles concentrations plasmatiques lorsqu'il est administré par voie orale. Ainsi ses paramètres PK seront de nouveau à optimiser par de nouvelles formulations, par la synthèse de composés plus puissants, ou par l'intermédiaire de nouvelles prodrogues. Afin de tester la stabilité et le métabolisme de celles-ci plus aisément, il sera indispensable d'adopter un test *in vitro* tel qu'un test sur microsomes hépatiques ou sur culture *in vitro* d'hépatocytes, comme indiqué auparavant.

8. Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse a permis dans un premier temps de poursuivre les études de relations structure-activité initiées autour du squelette tétrahydro-β-carboline. L'exploration de la nature des substituants en position 6 de la tryptoline (R_1) a mis en évidence la tolérance de groupements encombrants hydrophobes comme de longues chaînes carbonées, des noyaux aromatiques ou des cycloalkyles, parmi lesquels la chaine n-butyle présente les meilleures activités contre *P. falciparum* (*Figure 59*). De surcroît, la position 1 de la tryptoline doit être impérativement substituée par un cycle aromatique contenant un hydroxyle en para et dont la nature (R_2) peut varier avec un bromophényle, un naphtalène ou encore un biphényle, ce dernier présentant la meilleure activité anti-plasmodiale sur PfHB3. En revanche, la modulation propyloxy en position R_1 et le remplacement du phénol ou de l'hydroxynaphtalène par des bioisostères de type benzoxazolinones ou hydroxyquinoléines ne sont pas bénéfiques pour l'activité antipaludique. Cela suggère que l'hydroxyle ne chélate pas d'ions manganèses comme suggéré au départ et agit de manière différente au sein de la cible thérapeutique. D'autre part, l'acylation et la méthylation de l'amine secondaire en R_3 ne sont pas non plus propices quant à l'inhibition de la croissance parasitaire. Finalement, parmi l'ensemble des 91 modulations réalisées depuis le début du projet dont 43 durant ma thèse, 10 molécules présentent une CI_{50} inférieure à 100 nM sur les deux souches PfHB3 et PfDd2 (**T13**, **T16**, **T17**, **T19**, **T20**, **T22**, **T23**, **T25**, **T26**, **T27**). Le meilleur composé est le **T17** avec des CI_{50} de 25 ± 13 et 61 ± 25 nM sur PfHB3 et PfDd2 respectivement, conduisant à un gain d'activité de l'ordre de 75 par rapport au hit **H1** de départ, avec des index de sélectivité supérieurs à 400. De plus, le composé **T33** (CI_{50} de 10 ± 1 nM) semble prometteur et son activité sur PfDd2 ainsi que sa cytotoxicité seront à déterminer.

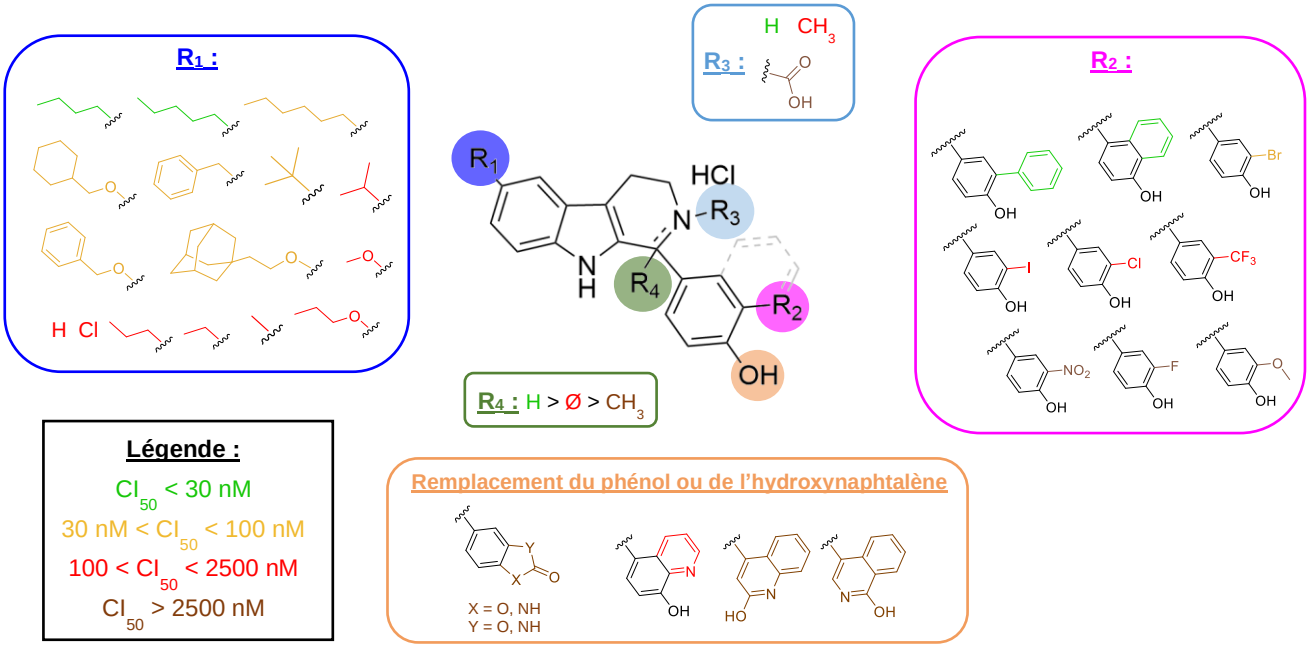


Figure 59. Bilan des RSA autour du squelette tétrahydro-β-carboline

En outre, la phosphatase PfPPM9 a été produite sous forme de protéine recombinante en bactéries *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) et purifiée sur billes de Nickel. Malgré la présence de contaminants, son activité phosphatasique a été démontrée. Certains composés ont alors été évalués sur celle-ci, montrant des CI_{50} supérieures à 100 µM. Ces valeurs élevées n'ont pas permis de conclure quant à leur action sur cette phosphatase.

De surcroit, suite à des études pharmacocinétiques sur quatre hits parmi nos meilleurs, les études d'efficacité *in vivo* sur des souris infectées par *P. berghei* ont montré que le composé **T17** est efficace à 100% à la dose de 30 mg/kg 2 fois par jour par voie IP et à 64% à la dose de 30 mg/kg 2 fois par jour par VO. Au vu de la non-essentialité de PPM9 chez *P. berghei*, l'efficacité de **T17** contre celui-ci suggère son action sur une ou plusieurs autres cibles, indispensables à la survie de ce parasite. Par conséquent, la recherche de la ou des cibles de **T17** ainsi que son mode d'action serait intéressant à réaliser. Par ailleurs, l'emploi de prodrogues protégeant la fonction phénol par un ester acétique ou un *N*,*N*-diméthylcarbamate n'a pas permis d'améliorer les paramètres PK et elles n'ont donc pas été évaluées *in vivo*.

Enfin, avec le soutien de l'Inserm Transfert et de la SATT Nord, l'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un dépôt de brevet (**EP24306259.3**). En effet, les nouvelles structures tétrahydro-β-carbolines, efficaces *in vitro* et *in vivo*, sont inventives par rapport à celles déjà décrites dans la littérature de par la présence d'un groupement phénol substitué ou hydroxynaphtalène sur la position 1 ainsi que des différents groupements apportés en position 6 (R_1).

9. Perspectives

9.1. A la recherche de la cible

L'objectif principal pour la suite du projet est la recherche de la cible de nos hits. Tout d'abord, il est indispensable de conclure quant à l'action de nos hits sur PfPPM9. Pour cela, le site catalytique de PfPPM9 (45 kDa) correspondant au modèle 3D sera produit et purifié sous forme de protéine recombinante et sera employé pour étudier l'effet des hits car, comme explicité auparavant, il sera probablement plus accessible pour des inhibiteurs compétitifs par rapport à la protéine entière. En parallèle, un test enzymatique plus affin tel que le test Enzchek pourra être exploré. Il permettra d'apporter des informations quant à la cinétique de déphosphorylation de la protéine, mais également quant à la cinétique d'inhibition par nos hits, le cas échéant. L'action de ces derniers sera aussi évaluée sur les autres PP2C suggérées essentielles chez *P. falciparum*, PfPPM6 et PfPPM8, afin de démontrer leur sélectivité d'action sur PfPPM9 si elle s'avère être la cible ou de vérifier si l'une d'entre elle est leur cible à la place de PfPPM9. Il est à noter que des travaux de production de PfPPM6 sont déjà en cours dans notre laboratoire. Dans le même but, l'inhibition de l'activité phosphatasique de PfPP1, phosphoprotéine phospatase, et d'une PP2c humaine recombinante vendue dans le commerce (PP2Cα, active GST-tagged, ref SRP5335, Sigma Aldrich) sera aussi analysée en présence des hits.

Par ailleurs, il est envisageable que nos hits ne ciblent pas une phosphatase. Dans ce sens, il sera intéressant d'identifier la ou les cibles par d'autres stratégies, telles que :

- La génération de mutants résistants sous pression médicamenteuse, dont notre laboratoire possède déjà l'expertise. Pour cela, la souche *P. falciparum* Dd2 DNA polymerase δ (PfDd2-Polδ) est préférentiellement utilisée car elle présente une sous-unité catalytique de l'ADN-polymérase δ génétiquement altérée, ayant pour conséquence une fidélité réduite dans la réplication de l'ADN et augmentant ainsi le niveau de mutations spontanées.[146] C'est pourquoi, il s'agira ici d'exposer PfDd2-Polδ *in vitro* à une dose élevée de **T17** (5 fois sa CI_{50}) afin qu'elle génère des résistances au composé. Son génome sera ensuite séquencé, ce qui permettra d'identifier, par comparaison à la souche native, les mutations susceptibles de conférer une résistance à **T17** et ainsi de déterminer la ou les cibles.

- Le cellular thermal shift assay (CETSA), qui est basé sur le principe biophysique de la stabilisation thermique des protéines cibles induite par les ligands. Effectivement, de manière générale, les protéines se dénaturent et précipitent sous l'effet de l'augmentation de la température. Lorsqu'un ligand se lie à sa protéine cible, il améliore sa stabilité thermique et la protéine est alors moins sensible à la dénaturation, ce qui permet d'évaluer directement l'engagement entre le ligand et la cible (*Figure 60*). L'avantage du CETSA est qu'il peut être réalisé au sein d'échantillons complexes de protéines ou dans des cellules vivantes.[147,148] Cette technique a par exemple été employée pour identifier les cibles médicamenteuses de l'artésunate.[47]

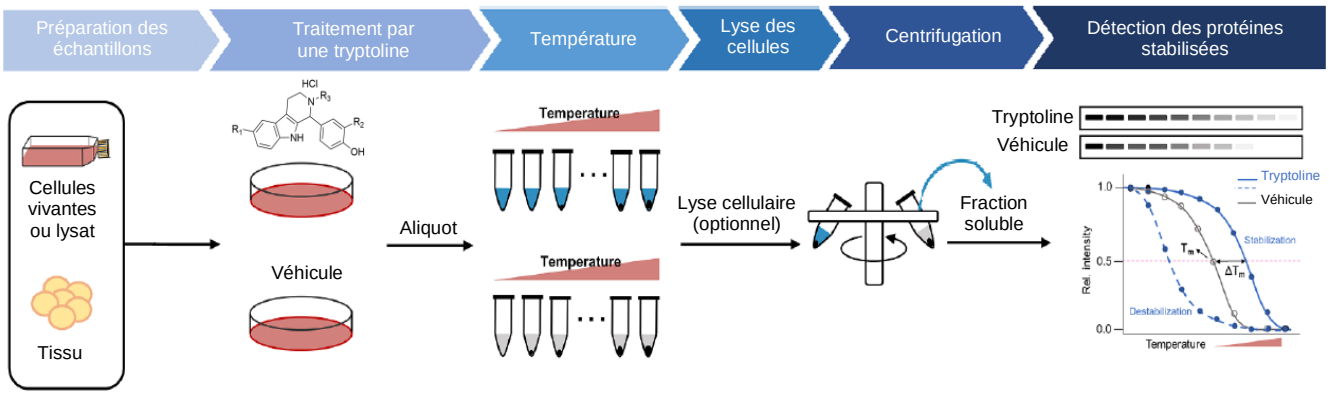


Figure 60. Stratégie de travail MS-CETSA appliquée à notre projet pour la recherche de cibles médicamenteuses. Des cellules vivantes, lysats cellulaires ou échantillons de tissus sont aliquotés et traités avec une tryptoline ou un véhicule, puis soumis à un traitement thermique de courte durée à différentes températures. Ensuite, les échantillons de cellules sont lysés et la fraction de protéines solubles est obtenue par centrifugation ou filtration. Les protéines solubles sont identifiées en LC-MS/MS et les courbes de fusion avec la valeur T_m des protéines cibles dans les échantillons traités par une tryptoline ou par un véhicule sont calculées. Le déplacement de la courbe de fusion et le changement de la valeur T_m (ΔT_m) pourraient refléter le changement de stabilité thermique de la protéine (stabilisation ou déstabilisation) par la liaison de la tryptoline. Schéma adapté de Tu 2023.[148]

9.2. Poursuite des RSA

Par ailleurs, de nouvelles pharmacomodulations autour du squelette tryptoline seront à envisager en vue de continuer l'exploration de la nature des substituants hydrophobes, d'accroître l'activité antiparasitaire et/ou d'améliorer les paramètres PK. Par exemple, les groupements actuels en position 6 (R_1) présentant les meilleurs résultats, chaine carbonée butyle, benzyl et benzyoxy, pourront être essayés en position 7 (R_1')(*Figure 61*). De la même façon, la position en méta du phénol (R_2') pourra être substituée par un phényl. De plus, au vu de la bonne activité obtenue avec un phényl en R_2, celui-ci pourra être substitué par des hétérocycles tels que des pyridine, pyrane, furane ou pyrrole ou encore par un phényl substitué avec un brome ou un chlore. En outre, il serait intéressant d'additionner un halogène en α du phénol (R_2''), tout en gardant un brome, un phényl ou naphtalène

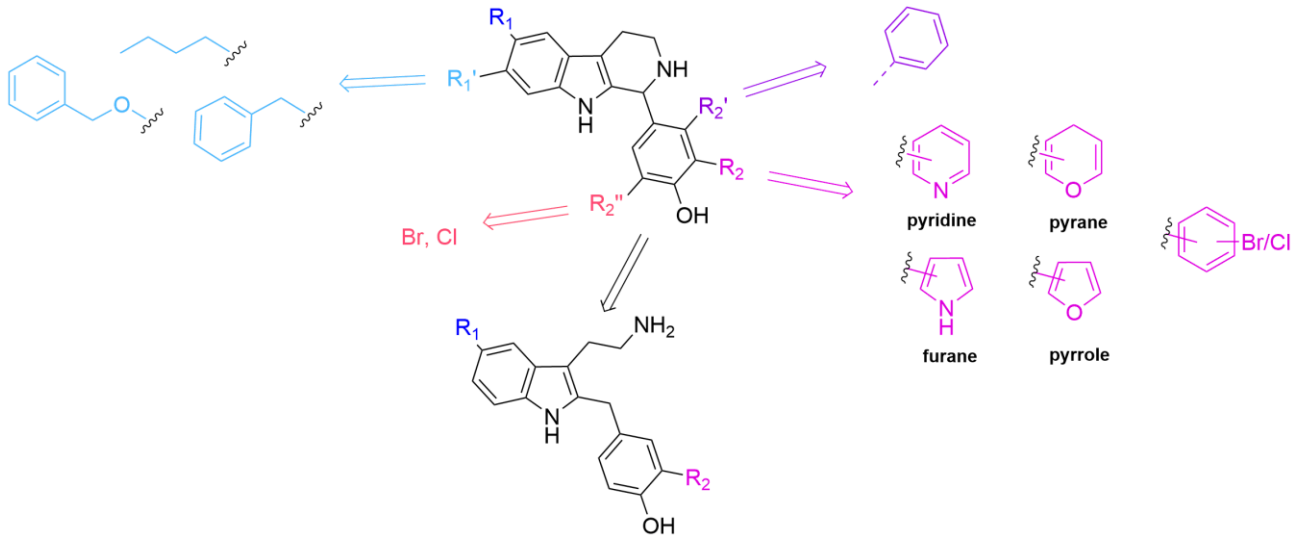


Figure 61. Pharmacomodulations proposées pour le squelette tétrahydro-β-carboline

en R_2. Une substitution de la sorte est connue pour limiter le métabolisme de phase II du phénol.[149] Enfin, la structure cyclique de la tétrahydro-β-carboline pourra être ouverte pour conduire aux 2-benzyltryptamines afin de s'affranchir de la présence du carbone asymétrique et donc des énantiomères.

9.3. Développement de prodrogues

Un dernier volet en perspective pour ce projet est l'amélioration de l'efficacité de nos tétrahydro-β-carbolines. En effet, nous avons montré pour notre meilleur composé **T17** une bonne activité antipaludique *in vitro* mais une activité *in vivo* nécessitant une forte dose. Toujours dans le but d'améliorer ses paramètres PK et ceux du **T33** ou des futures tryptolines synthétisées pour les administrer 1 fois par jour par voie orale, la synthèse de nouvelles prodrogues est alors envisageable. Dans un premier temps, le phénol pourra être protégé par d'autres groupements esters, plus encombrés et plus stables que l'ester acétique précédemment employé, tels qu'un ester propanoïque ou un ester anthranilique (*Figure 62*). De plus, l'ajout d'une ramification comme un méthyl sur ce dernier pourrait aussi être bénéfique car il protègera d'autant plus la liaison ester de l'hydrolyse par encombrement stérique. En parallèle, afin de diversifier les groupements et surtout les méthodes de bio-activation *in vivo*, des esters de phosphate, clivés par des phosphatases, sont une alternative.[131] Les prodrogues synthétisées devront ensuite être testées *in vitro*, d'une part pour évaluer leur stabilité en présence de plasma, et d'autre part pour analyser leur métabolisme en présence de microsomes hépatiques ou directement sur hépatocytes.

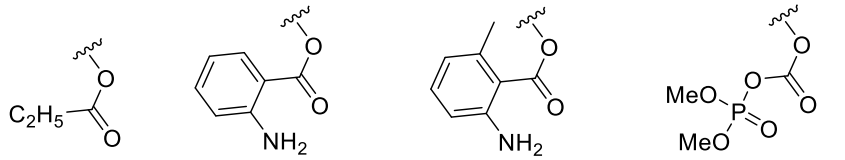


Figure 62. Structures des divers groupements envisagés pour la protection du phénol en vue de la synthèse de prodrogues

Toutes les nouvelles molécules synthétisées seront bien sûr évaluées *in vitro* sur les souches chloroquinosensible et multirésistante *de P. falciparum*, et il sera également intéressant d'évaluer les meilleurs composés en combinaison avec un dérivé de l'artémisinine et d'en comparer les effets sur *P. falciparum*. L'objectif ici sera de proposer à la communauté scientifique de nouvelles CTA aussi performantes que celles validées par l'OMS. En plus de cela, l'activité antiparasitaires des meilleurs hits obtenus pourra être évaluée chez d'autres parasites Apicomplexa comme *Toxoplasma gondii* ou *Cryptosporidium parvum*, deux modèles développés au sein de notre unité de recherche CIIL, ou sur *Leishmania* spp à travers une collaboration. Ces études permettront alors prendre connaissance du spectre d'action de nos dérivés tryptolines et d'élargir ou non leurs applications.

Pour finir, il sera nécessaire de démontrer une activité antipaludique *in vivo* de nos meilleurs composés sur un modèle de souris humanisées infectées par *P. falciparum*, tel que le modèle de la société TAD. Pour cela, les études complètes de pharmacocinétique et de pharmacodynamie seront à prévoir en amont sur ce modèle avec une administration par voie orale.

REFERENCES

(1) Cowman, A. F.; Healer, J.; Marapana, D.; Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **2016**, *167* (3), 610–624.
(2) Cox, F. E. History of the Discovery of the Malaria Parasites and Their Vectors. *Parasites & Vectors* **2010**, *3* (5).
(3) Mertens, J. E. A History of Malaria and Conflict. *Parasitol Res* **2024**, *123* (3), 165.
(4) Nosten, F.; Richard-Lenoble, D.; Danis, M. A Brief History of Malaria. *Presse Med* **2022**, *51* (3), 104130.
(5) Bruce-Chwatt, L. J. Alphonse Laveran's Discovery 100 Years Ago and Today's Global Fight against Malaria. *J R Soc Med* **1981**, *74* (7), 531–536.
(6) Manson, P. On the Nature and Significance of the Crescentic and Flagellated Bodies in Malarial Blood. *Br Med J.* **1894**, *2* (1771), 1306–1308.
(7) Ross, R. On Some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br Med J.* **1897**, *2* (1929), 1786–1788.
(8) Grassi, B.; Bignami, A.; Bastianelli, G. Medical Zoology. *Ind Med Gaz* **1899**, *34* (3), 104–107.
(9) Tu, Y. Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed* **2016**, *55* (35), 10210–10226.
(10) Phillips, M. A.; Burrows, J. N.; Manyando, C.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C.; Wells, T. N. C. Malaria. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3* (1), 1–24.
(11) Haldar, K.; Bhattacharjee, S.; Safeukui, I. Drug Resistance in Plasmodium. *Nat Rev Microbiol* **2018**, *16* (3), 156–170.
(12) World Health Organization. World malaria report 2022 https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022.
(13) Bhagavathula, A. S.; Elnour, A. A.; Shehab, A. Alternatives to Currently Used Antimalarial Drugs: In Search of a Magic Bullet. *Infectious Diseases of Poverty* **2016**, *5* (1), 103.
(14) Doerig, C.; Rayner, J. C.; Scherf, A.; Tobin, A. B. Post-Translational Protein Modifications in Malaria Parasites. *Nat Rev Microbiol* **2015**, *13* (3), 160–172.
(15) Levine, N. D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. *J. Protozool.* **1988**, *35* (4), 518–520.
(16) Baum, J.; Papenfuss, A. T.; Baum, B.; Speed, T. P.; Cowman, A. F. Regulation of Apicomplexan Actin-Based Motility. *Nat Rev Microbiol.* **2006**, *4* (8), 621–628.
(17) Frénal, K.; Soldati-Favre, D. Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes. *The glideosome, a unique machinery that assists the Apicomplexa in gliding into host cells* **2013**, *29* (5), 515–522.
(18) Pino, P.; Soldati-Favre, D. Invasion et réplication chez les Apicomplexes - Tous les chemins mènent à ROM. *Med Sci* **2011**, *27* (6–7), 576–578.
(19) Chakraborty, A. Understanding the Biology of the *Plasmodium Falciparum* Apicoplast; an Excellent Target for Antimalarial Drug Development. *Life Sciences* **2016**, *158*, 104–110.
(20) N'Guessan, C. La Phosphatase PPM9 de *Plasmodium* : Caractérisation Moléculaire et Fonctionnelle, Structure 3D Du Site Catalytique et Découverte de Nouvelles Molécules Antipaludiques. Thèse de doctorat, Université de Lille, 2020.
(21) Milner, D. A. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2018**, *8* (1), a025569.
(22) Gorobets, N. Yu.; Sedash, Y. V.; Singh, B. K.; . P.; Rathi, B. An Overview of Currently Available Antimalarials. *Current topics in medicinal chemistry* **2017**, *17*, 1–14.
(23) Rajneesh; Tiwari, R.; Singh, V. K.; Kumar, A.; Gupta, R. P.; Singh, A. K.; Gautam, V.; Kumar, R. Advancements and Challenges in Developing Malaria Vaccines: Targeting Multiple Stages of the Parasite Life Cycle. *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9* (10), 1795–1814.
(24) Loubens, M.; Vincensini, L.; Fernandes, P.; Briquet, S.; Marinach, C.; Silvie, O. Plasmodium Sporozoites on the Move: Switching from Cell Traversal to Productive Invasion of Hepatocytes. *Molecular Microbiology* **2021**, *115* (5), 870–881.
(25) Risco-Castillo, V.; Son, O.; Franetich, J.-F.; Rubinstein, E.; Mazier, D.; Silvie, O. Phase hépatique du paludisme : voies d'entrée des sporozoïtes de Plasmodium. *Biologie Aujourd'hui* **2013**, *207* (4), 219–229.
(26) Singh, S.; Alam, M. M.; Pal-Bhowmick, I.; Brzostowski, J. A.; Chitnis, C. E. Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *PLOS Pathogens* **2010**, *6* (2), e1000746.
(27) Scally, S. W.; Triglia, T.; Evelyn, C.; Seager, B. A.; Pasternak, M.; Lim, P. S.; Healer, J.; Geoghegan, N. D.; Adair, A.; Tham, W.-H.; Dagley, L. F.; Rogers, K. L.; Cowman, A. F. PCRCR

Complex Is Essential for Invasion of Human Erythrocytes by Plasmodium Falciparum. *Nat Microbiol* **2022**, *7* (12), 2039–2053.
(28) Reddy, K. S.; Amlabu, E.; Pandey, A. K.; Mitra, P.; Chauhan, V. S.; Gaur, D. Multiprotein Complex between the GPI-Anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr Is Crucial for Plasmodium Falciparum Erythrocyte Invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (4), 1179–1184.
(29) Volz, J. C.; Yap, A.; Sisquella, X.; Thompson, J. K.; Lim, N. T. Y.; Whitehead, L. W.; Chen, L.; Lampe, M.; Tham, W.-H.; Wilson, D.; Nebl, T.; Marapana, D.; Triglia, T.; Wong, W.; Rogers, K. L.; Cowman, A. F. Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium Falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell Host & Microbe* **2016**, *20* (1), 60–71.
(30) Singh, M.; Suryanshu; Kanika; Singh, G.; Dubey, A.; Chaitanya, R. K. *Plasmodium's* Journey through the *Anopheles* Mosquito: A Comprehensive Review. *Biochimie* **2021**, *181*, 176–190.
(31) Bouchaud, O.; Bruneel, F.; Caumes, E.; Houzé, S.; Imbert, P.; Pradines, B.; Rapp, C.; Strady, C. Management and Prevention of Imported Malaria. 2018 Update of the 2007 French Clinical Guidelines. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2020**, *50* (2), 161–193.
(32) SPILF. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française_Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* : recommandations pour la pratique clinique. **2007**.
(33) *Paludisme*; Danis, M., Mouchet, J., Ambroise-Thomas, P., Eds.; Universités francophones; Ellipses: Paris, 1991.
(34) World Health Organization. Malaria Vaccines: WHO Position Paper. *WER* **2024**, *99* (19), 225–248.
(35) World Health Organization. World malaria report 2023 https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023 (accessed Mar 12, 2024).
(36) World Health Organization. WHO Guidelines for Malaria, 16 October 2023. *WHO* **2023**, 1–451.
(37) Foy, B. D.; Some, A.; Magalhaes, T.; Gray, L.; Rao, S.; Sougue, E.; Jackson, C. L.; Kittelson, J.; Slater, H. C.; Bousema, T.; Da, O.; Coulidiaty, A. G. V.; Colt, M.; Wade, M.; Richards, K.; Some, A. F.; Dabire, R. K.; Parikh, S. Repeat Ivermectin Mass Drug Administrations for Malaria Control II: Protocol for a Double-Blind, Cluster-Randomized, Placebo-Controlled Trial for the Integrated Control of Malaria. *JMIR Research Protocols* **2023**, *12* (1), e41197.
(38) Karunakaran, D.; Mutyam, S. K.; Fu, M.; Chen, J.; Pham, K. H. N.; Pou, S.; Winter, R. W.; Nilsen, A.; Dodean, R. A.; Smilkstein, M. J.; Riscoe, M. K.; Shankar, G. Long-Acting Intramuscular Injections of ELQ-331, an Antimalarial Agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2024**, *198*, 106795.
(39) Bakshi, R. P.; Tatham, L. M.; Savage, A. C.; Tripathi, A. K.; Mlambo, G.; Ippolito, M. M.; Nenortas, E.; Rannard, S. P.; Owen, A.; Shapiro, T. A. Long-Acting Injectable Atovaquone Nanomedicines for Malaria Prophylaxis. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 315.
(40) Dicko, A.; Ouedraogo, J.-B.; Zongo, I.; Sagara, I.; Cairns, M.; Yerbanga, R. S.; Issiaka, D.; Zoungrana, C.; Sidibe, Y.; Tapily, A.; Nikièma, F.; Sompougdou, F.; Sanogo, K.; Kaya, M.; Yalcouye, H.; Dicko, O. M.; Diarra, M.; Diarra, K.; Thera, I.; Haro, A.; Sienou, A. A.; Traore, S.; Mahamar, A.; Dolo, A.; Kuepfer, I.; Snell, P.; Grant, J.; Webster, J.; Milligan, P.; Lee, C.; Ockenhouse, C. Seasonal Vaccination with RTS,S/AS01E Vaccine with or without Seasonal Malaria Chemoprevention in Children up to the Age of 5 Years in Burkina Faso and Mali: A Double-Blind, Randomised, Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Infect Dis* **2023**, *24* (1), 75–86.
(41) Mura, M. Vaccination contre le paludisme. *MTSI* **2023**, *3* (2).
(42) Datoo, M. S.; Natama, H. M.; Somé, A.; Bellamy, D.; Traoré, O.; Rouamba, T.; Tahita, M. C.; Ido, N. F. A.; Yameogo, P.; Valia, D.; Millogo, A.; Ouedraogo, F.; Soma, R.; Sawadogo, S.; Sorgho, F.; Derra, K.; Rouamba, E.; Ramos-Lopez, F.; Cairns, M.; Provstgaard-Morys, S.; Aboagye, J.; Lawrie, A.; Roberts, R.; Valéa, I.; Sorgho, H.; Williams, N.; Glenn, G.; Fries, L.; Reimer, J.; Ewer, K. J.; Shaligram, U.; Hill, A. V. S.; Tinto, H. Efficacy and Immunogenicity of R21/Matrix-M Vaccine against Clinical Malaria after 2 Years' Follow-up in Children in Burkina Faso: A Phase 1/2b Randomised Controlled Trial. *Lancet Infect Dis* **2022**, *22* (12), 1728–1736.
(43) Datoo, M. S.; Dicko, A.; Tinto, H.; Ouédraogo, J.-B.; Hamaluba, M.; Olotu, A.; Beaumont, E.; Lopez, F. R.; Natama, H. M.; Weston, S.; Chemba, M.; Compaore, Y. D.; Issiaka, D.; Salou, D.; Some, A. M.; Omenda, S.; Lawrie, A.; Bejon, P.; Rao, H.; Chandramohan, D.; Roberts, R.; Bharati, S.; Stockdale, L.; Gairola, S.; Greenwood, B. M.; Ewer, K. J.; Bradley, J.; Kulkarni, P. S.; Shaligram, U.; Hill, A. V. S. Safety and Efficacy of Malaria Vaccine Candidate R21/Matrix-M

in African Children: A Multicentre, Double-Blind, Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet* **2024**, *403* (10426), 533–544.
(44) Aderinto, N.; Olatunji, G.; Kokori, E.; Sikirullahi, S.; Aboje, J. E.; Ojabo, R. E. A Perspective on Oxford's R21/Matrix-M^{TM} Malaria Vaccine and the Future of Global Eradication Efforts. *Malaria Journal* **2024**, *23* (1), 16.
(45) Draper, S. J.; Sack, B. K.; King, C. R.; Nielsen, C. M.; Rayner, J. C.; Higgins, M. K.; Long, C. A.; Seder, R. A. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host & Microbe* **2018**, *24* (1), 43–56.
(46) Siqueira-Neto, J. L.; Wicht, K. J.; Chibale, K.; Burrows, J. N.; Fidock, D. A.; Winzeler, E. A. Antimalarial Drug Discovery: Progress and Approaches. *Nat Rev Drug Discov* **2023**, *22* (10), 807–826.
(47) Gao, P.; Wang, J.; Chen, J.; Gu, L.; Wang, C.; Xu, L.; Kwan Wong, Y.; Zhang, H.; Xu, C.; Dai, L.; Wang, J. Profiling the Antimalarial Mechanism of Artemisinin by Identifying Crucial Target Proteins. *Engineering* **2023**, *31*, 86–97.
(48) Capela, R.; Moreira, R.; Lopes, F. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (22), 5748.
(49) Ismail, H. M.; Barton, V.; Phanchana, M.; Charoensutthivarakul, S.; Wong, M. H. L.; Hemingway, J.; Biagini, G. A.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. Artemisinin Activity-Based Probes Identify Multiple Molecular Targets within the Asexual Stage of the Malaria Parasites *Plasmodium Falciparum* 3D7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113* (8), 2080–2085.
(50) Zhou, W.; Wang, H.; Yang, Y.; Chen, Z.-S.; Zou, C.; Zhang, J. Chloroquine against Malaria, Cancers and Viral Diseases. *Drug Discovery Today* **2020**, *25* (11), 2012–2022.
(51) Misbahi, H. Paludisme : Mode d'action de La Chloroquine et Mécanisme de La Chloroquinorésistance. *Journal de Pharmacie Clinique* **2013**, *32* (3), 143–153.
(52) Antony, H. A.; Parija, S. C. Antimalarial Drug Resistance: An Overview. *Trop Parasitol* **2016**, *6* (1), 30–41.
(53) Shutter, M. C.; Akhondi, H. Tetracycline. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
(54) Wellems, T. E.; Plowe, C. V. Chloroquine-Resistant Malaria. *The Journal of Infectious Diseases* **2001**, *184* (6), 770–776.
(55) Burrows, J. N.; Duparc, S.; Gutteridge, W. E.; Hooft van Huijsduijnen, R.; Kaszubska, W.; Macintyre, F.; Mazzuri, S.; Möhrle, J. J.; Wells, T. N. C. New Developments in Anti-Malarial Target Candidate and Product Profiles. *Malaria Journal* **2017**, *16* (1), 26–54.
(56) Umumararungu, T.; Nkuranga, J. B.; Habarurema, G.; Nyandwi, J. B.; Mukazayire, M. J.; Mukiza, J.; Muganga, R.; Hahirwa, I.; Mpenda, M.; Katembezi, A. N.; Olawode, E. O.; Kayitare, E.; Kayumba, P. C. Recent Developments in Antimalarial Drug Discovery. *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *88–89*, 117339.
(57) Baragaña, B.; Hallyburton, I.; Lee, M. C. S.; Norcross, N. R.; Grimaldi, R.; Otto, T. D.; Proto, W. R.; Blagborough, A. M.; Meister, S.; Wirjanata, G.; Ruecker, A.; Upton, L. M.; Abraham, T. S.; Almeida, M. J.; Pradhan, A.; Porzelle, A.; Martínez, M. S.; Bolscher, J. M.; Woodland, A.; Luksch, T.; Norval, S.; Zuccotto, F.; Thomas, J.; Simeons, F.; Stojanovski, L.; Osuna-Cabello, M.; Brock, P. M.; Churcher, T. S.; Sala, K. A.; Zakutansky, S. E.; Jiménez-Díaz, M. B.; Sanz, L. M.; Riley, J.; Basak, R.; Campbell, M.; Avery, V. M.; Sauerwein, R. W.; Dechering, K. J.; Noviyanti, R.; Campo, B.; Frearson, J. A.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer-Bazaga, S.; Gamo, F. J.; Wyatt, P. G.; Leroy, D.; Siegl, P.; Delves, M. J.; Kyle, D. E.; Wittlin, S.; Marfurt, J.; Price, R. N.; Sinden, R. E.; Winzeler, E. A.; Charman, S. A.; Bebrevska, L.; Gray, D. W.; Campbell, S.; Fairlamb, A. H.; Willis, P. A.; Rayner, J. C.; Fidock, D. A.; Read, K. D.; Gilbert, I. H. A Novel Multiple-Stage Antimalarial Agent That Inhibits Protein Synthesis. *Nature* **2015**, *522* (7556), 315–320.
(58) Yin, X.; Li, Y.; Bagchus, W.; Yalkinoglu, Ö.; Bezuidenhout, D.; Tappert, A.; McCarthy, J.; Marquart, L.; Oeuvray, C. Evaluation of a Multiphasic Parasite Clearance Profile after Treatment of Experimental Human Infection with the Investigational Anti-Malarial M5717 Using Segmented Mixed Effect Models. *Malaria Journal* **2023**, *22* (1), 199.
(59) Tibon, N. S.; Ng, C. H.; Cheong, S. L. Current Progress in Antimalarial Pharmacotherapy and Multi-Target Drug Discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *188*, 111983.

(60) Khalife, J.; Pierrot, C. Phosphatases Are Emerging as Novel Druggable Targets in Plasmodium. *Future Microbiology* **2016**, *11* (5), 603–606.
(61) Pandey, R.; Mohmmed, A.; Pierrot, C.; Khalife, J.; Malhotra, P.; Gupta, D. Genome Wide in Silico Analysis of Plasmodium Falciparum Phosphatome. *BMC Genomics* **2014**, *15* (1), 1024.
(62) Fréville, A.; Gnangnon, B.; Khelifa, A. S.; Gissot, M.; Khalife, J.; Pierrot, C. Deciphering the Role of Protein Phosphatases in Apicomplexa: The Future of Innovative Therapeutics? *Microorganisms* **2022**, *10* (3), 585.
(63) Yang, C.; Arrizabalaga, G. The Serine/Threonine Phosphatases of Apicomplexan Parasites. *Molecular Microbiology* **2017**, *106* (1), 1–21.
(64) Shi, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* **2009**, *139* (3), 468–484.
(65) Wilkes, J. M.; Doerig, C. The Protein-Phosphatome of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum. *BMC Genomics* **2008**, *9* (1), 412.
(66) Lu, G.; Wang, Y. Functional Diversity of Mammalian Type 2C Protein Phosphatase Isoforms: New Tales from an Old Family. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2008**, *35* (2), 107–112.
(67) Kushwaha, P.; Kumar, V.; Saha, B. Current Development of β-Carboline Derived Potential Antimalarial Scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *252*, 115247.
(68) Dai, J.; Dan, W.; Schneider, U.; Wang, J. β-Carboline Alkaloid Monomers and Dimers: Occurrence, Structural Diversity, and Biological Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *5* (157), 622–656.
(69) Sakai, Ryuichi.; Higa, Tatsuo.; Jefford, C. W.; Bernardinelli, Gerald. Manzamine A, a Novel Antitumor Alkaloid from a Sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (20), 6404–6405.
(70) Ashok, P.; Ganguly, S.; Murugesan, S. Manzamine Alkaloids: Isolation, Cytotoxicity, Antimalarial Activity and SAR Studies. *Drug Discov Today* **2014**, *19* (11), 1781–1791.
(71) Kamboj, A.; Sihag, B.; Brar, D. S.; Kaur, A.; Salunke, D. B. Structure Activity Relationship in β-Carboline Derived Anti-Malarial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *221*, 113536.
(72) Ang, K. K. H.; Holmes, M. J.; Higa, T.; Hamann, M. T.; Kara, U. A. K. In Vivo Antimalarial Activity of the Beta-Carboline Alkaloid Manzamine A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (6), 1645–1649.
(73) Frederich, M.; Hayette, M.-P.; Tits, M.; De Mol, P.; Angenot, L. In Vitro Activities of StrychnosAlkaloids and Extracts against Plasmodium Falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (9), 2328–2331.
(74) Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R. Antimalarials from Nature. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (9), 3229–3256.
(75) Frédérich, M.; Jacquier, M.-J.; Thépenier, P.; De Mol, P.; Tits, M.; Philippe, G.; Delaude, C.; Angenot, L.; Zèches-Hanrot, M. Antiplasmodial Activity of Alkaloids from Various Strychnos Species. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (10), 1381–1386.
(76) Frédérich, M.; Tits, M.; Goffin, E.; Philippe, G.; Grellier, P.; Mol, P. D.; Hayette, M.-P.; Angenot, L. In Vitro and in Vivo Antimalarial Properties of Isostrychnopentamine, an Indolomonoterpenic Alkaloid from Strychnos Usambarensis. *Planta Med* **2004**, *70* (06), 520–525.
(77) Davis, R. A.; Duffy, S.; Avery, V. M.; Camp, D.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. (+)-7-Bromotrypargine: An Antimalarial β-Carboline from the Australian Marine Sponge *Ancorina* Sp. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51* (4), 583–585.
(78) Chan, S. T. S.; Pearce, A. N.; Page, M. J.; Kaiser, M.; Copp, B. R. Antimalarial β-Carbolines from the New Zealand Ascidian Pseudodistoma Opacum. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (9), 1972–1979.
(79) Turner, H. Spiroindolone NITD609 Is a Novel Antimalarial Drug That Targets the P-Type ATPase PfATP4. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (2), 227–238.
(80) Yeung, B. K. S.; Zou, B.; Rottmann, M.; Lakshminarayana, S. B.; Ang, S. H.; Leong, S. Y.; Tan, J.; Wong, J.; Keller-Maerki, S.; Fischli, C.; Goh, A.; Schmitt, E. K.; Krastel, P.; Francotte, E.; Kuhen, K.; Plouffe, D.; Henson, K.; Wagner, T.; Winzeler, E. A.; Petersen, F.; Brun, R.; Dartois, V.; Diagana, T. T.; Keller, T. H. Spirotetrahydro β-Carbolines (Spiroindolones): A New Class of Potent and Orally Efficacious Compounds for the Treatment of Malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (14), 5155–5164.
(81) Bouwman, S. AM.; Zoleko-Manego, R.; Renner, K. C.; Schmitt, E. K.; Mombo-Ngoma, G.; Grobusch, M. P. The Early Preclinical and Clinical Development of Cipargamin (KAE609), a Novel Antimalarial Compound. *Travel Medicine and Infectious Disease* **2020**, *36*, 101765.

(82) Dennis, A. S. M.; Lehane, A. M.; Ridgway, M. C.; Holleran, J. P.; Kirk, K. Cell Swelling Induced by the Antimalarial KAE609 (Cipargamin) and Other PfATP4-Associated Antimalarials. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62* (6), e00087-18.
(83) Bayih, A. G.; Folefoc, A.; Mohon, A. N.; Eagon, S.; Anderson, M.; Pillai, D. R. In Vitro and in Vivo Anti-Malarial Activity of Novel Harmine-Analog Heat Shock Protein 90 Inhibitors: A Possible Partner for Artemisinin. *Malar J* **2016**, *15* (1), 579.
(84) Viswanathan, N. K.; Chirgwin, M. E.; Gibbs, J.; Kalaj, B. N.; Durham, S.; Tran, J.; Gomez, M.; Lazaro, H.; Chen, M.; Mansfield, C. R.; Derbyshire, E. R.; Eagon, S. Synthesis and Activity of β-Carboline Antimalarials Targeting the Plasmodium Falciparum Heat Shock 90 Protein. *Bioorg Med Chem Lett* **2023**, *92*, 129410.
(85) Shahinas, D.; MacMullin, G.; Benedict, C.; Crandall, I.; Pillai, D. R. Harmine Is a Potent Antimalarial Targeting Hsp90 and Synergizes with Chloroquine and Artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56* (8), 4207–4213.
(86) Poje, G.; Marinović, M.; Pavić, K.; Mioč, M.; Kralj, M.; de Carvalho, L. P.; Held, J.; Perković, I.; Rajić, Z. Harmicens, Novel Harmine and Ferrocene Hybrids: Design, Synthesis and Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (16), 9315.
(87) Eagon, S.; Hammill, J. T.; Bach, J.; Everson, N.; Sisley, T. A.; Walls, M. J.; Durham, S.; Pillai, D. R.; Falade, M. O.; Rice, A. L.; Kimball, J. J.; Lazaro, H.; DiBernardo, C.; Kiplin Guy, R. Antimalarial Activity of Tetrahydro-β-Carbolines Targeting the ATP Binding Pocket of the *Plasmodium Falciparum* Heat Shock 90 Protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (21), 127502.
(88) Gellis, A.; Dumètre, A.; Lanzada, G.; Hutter, S.; Ollivier, E.; Vanelle, P.; Azas, N. Preparation and Antiprotozoal Evaluation of Promising *β*-Carboline Alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2012**, *66* (5), 339–347.
(89) Wu, W.; Herrera, Z.; Ebert, D.; Baska, K.; Cho, S. H.; DeRisi, J. L.; Yeh, E. A Chemical Rescue Screen Identifies a Plasmodium Falciparum Apicoplast Inhibitor Targeting MEP Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59* (1), 356–364.
(90) Yao, Z.-K.; Krai, P. M.; Merino, E. F.; Simpson, M. E.; Slebodnick, C.; Cassera, M. B.; Carlier, P. R. Determination of the Active Stereoisomer of the MEP Pathway-Targeting Antimalarial Agent MMV008138, and Initial Structure–Activity Studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (7), 1515–1519.
(91) Medecines for Malaria Venture (MMV). About the Malaria Box https://www.mmv.org/mmv-open/malaria-box/about-malaria-box (accessed Jul 1, 2024).
(92) Ghavami, M.; Merino, E. F.; Yao, Z.-K.; Elahi, R.; Simpson, M. E.; Fernández-Murga, M. L.; Butler, J. H.; Casasanta, M. A.; Krai, P. M.; Totrov, M. M.; Slade, D. J.; Carlier, P. R.; Cassera, M. B. Biological Studies and Target Engagement of the 2-C-Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate Cytidylyltransferase (IspD)-Targeting Antimalarial Agent (1R,3S)-MMV008138 and Analogs. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4* (4), 549–559.
(93) Ding, S.; Ghavami, M.; Butler, J. H.; Merino, E. F.; Slebodnick, C.; Cassera, M. B.; Carlier, P. R. Probing the B- & C-Rings of the Antimalarial Tetrahydro-β-Carboline MMV008138 for Steric and Conformational Constraints. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30* (22), 127520.
(94) Gorki, V.; Singh, R.; Walter, N. S.; Bagai, U.; Salunke, D. B. Synthesis and Evaluation of Antiplasmodial Efficacy of β-Carboline Derivatives against Murine Malaria. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 13200–13210.
(95) Gorki, V.; Walter, N. S.; Singh, R.; Chauhan, M.; Dhingra, N.; Salunke, D. B.; Kaur, S. β-Carboline Derivatives Tackling Malaria: Biological Evaluation and Docking Analysis. *ACS Omega* **2020**, *5* (29), 17993–18006.
(96) Deprez-Poulain, R.; Flipo, M.; Piveteau, C.; Leroux, F.; Dassonneville, S.; Florent, I.; Maes, L.; Cos, P.; Deprez, B. Structure–Activity Relationships and Blood Distribution of Antiplasmodial Aminopeptidase-1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (24), 10909–10917.
(97) Mathew, J.; Ding, S.; Kunz, K. A.; Stacy, E. E.; Butler, J. H.; Haney, R. S.; Merino, E. F.; Butschek, G. J.; Rizopoulos, Z.; Totrov, M.; Cassera, M. B.; Carlier, P. R. Malaria Box-Inspired Discovery of N-Aminoalkyl-β-Carboline-3-Carboxamides, a Novel Orally Active Class of Antimalarials. *ACS Med Chem Lett* **2022**, *13* (3), 365–370.
(98) Alves, F. de M.; Bellei, J. C. B.; Barbosa, C. de S.; Duarte, C. L.; Fonseca, A. L. da; Pinto, A. C. de S.; Raimundo, F. O.; Carpinter, B. A.; Lemos, A. S. de O.; Coimbra, E. S.; Taranto, A. G.; Rocha, V. N.; de Pilla Varotti, F.; Ribeiro Viana, G. H.; Scopel, K. K. G. Rational-Based

Discovery of Novel β-Carboline Derivatives as Potential Antimalarials: From In Silico Identification of Novel Targets to Inhibition of Experimental Cerebral Malaria. *Pathogens* **2022**, *11* (12), 1529.
(99) Poje, G.; Pessanha de Carvalho, L.; Held, J.; Moita, D.; Prudêncio, M.; Perković, I.; Tandarić, T.; Vianello, R.; Rajić, Z. Design and Synthesis of Harmiquins, Harmine and Chloroquine Hybrids as Potent Antiplasmodial Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *238*, 114408.
(100) Sharma, B.; Kaur, S.; Legac, J.; Rosenthal, P. J.; Kumar, V. Synthesis, Anti-Plasmodial and Cytotoxic Evaluation of 1H-1,2,3-Triazole/Acyl Hydrazide Integrated Tetrahydro-β-Carboline-4-Aminoquinoline Conjugates. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30* (2), 126810.
(101) Angulo-Barturen, I.; Jiménez-Díaz, M. B.; Mulet, T.; Rullas, J.; Herreros, E.; Ferrer, S.; Jiménez, E.; Mendoza, A.; Regadera, J.; Rosenthal, P. J.; Bathurst, I.; Pompliano, D. L.; Heras, F. G. de las; Gargallo-Viola, D. A Murine Model of Falciparum-Malaria by In Vivo Selection of Competent Strains in Non-Myelodepleted Mice Engrafted with Human Erythrocytes. *PLOS ONE* **2008**, *3* (5), e2252.
(102) Peters, W.; Portus, J. H.; Robinson, B. L. The Chemotherapy of Rodent Malaria, XXII. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **1975**, *69* (2), 155–171.
(103) The Art Of Discovery | TAD, 2016.
(104) Phillips, J. P. The Reactions Of 8-Quinolinol. *Chem. Rev.* **1956**, *56* (2), 271–297.
(105) Hadjaz, F.; Yous, S.; Lebegue, N.; Berthelot, P.; Carato, P. A Mild and Efficient Route to 2-Benzyl Tryptamine Derivatives via Ring-Opening of β-Carbolines. *Tetrahedron* **2008**, *64* (42), 10004–10008.
(106) Hadjaz, F.; Besret, S.; Martin-Nizard, F.; Yous, S.; Dilly, S.; Lebegue, N.; Chavatte, P.; Duriez, P.; Berthelot, P.; Carato, P. Antioxydant Activity of β-Carboline Derivatives in the LDL Oxidation Model. *Eur J Med Chem* **2011**, *46* (6), 2575–2585.
(107) Ryabukhin, S. V.; Panov, D. M.; Plaskon, A. S.; Tolmachev, A. A.; Smaliy, R. V. Application of Chlorotrimethylsilane in Pictet–Spengler Reaction. *Monatsh Chem* **2012**, *143* (11), 1507–1517.
(108) Carato, P.; Mésangeau, C.; H. Poupaert, J.; Yous, S. Synthesis of 2(3H)-Benzoxazolone Derivatives as Potential Melatonin Receptor Ligands. *Heterocycles* **2003**, *60* (12), 2621–2630.
(109) Carato, P.; Yous, S.; Depreux, P. Synthesis of 6-Chloromethyl Benzothiazolin-2-One and of 6-Chloromethyl Benzoxazolin-2-One. *Organic Preparations and Procedures International* **2000**, *32* (1), 69–74.
(110) Sercel, A. D.; Sanchez, J. P.; Hollis Showalter, H. D. Simple Synthesis of 4-Substituted 1(2H)-Isoquinolinones via Electrophilic Trapping of Lithiated Mono- and Dianion Precursors. *Synthetic Communications* **2007**, *37* (23), 4199–4208.
(111) Sudžuković, N.; Schinnerl, J.; Brecker, L. Phytochemical Meanings of Tetrahydro-β-Carboline Moiety in Strictosidine Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *24* (4), 588–595.
(112) Spindler, A.; Stefan, K.; Wiese, M. Synthesis and Investigation of Tetrahydro-β-Carboline Derivatives as Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2016**.
(113) Wang, L.-N.; Shen, S.-L.; Qu, J. Simple and Efficient Synthesis of Tetrahydro-β-Carbolines via the Pictet–Spengler Reaction in 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol (HFIP). *RSC Adv.* **2014**, *4* (58), 30733–30741.
(114) Smilkstein, M.; Sriwilaijaroen, N.; Kelly, J. X.; Wilairat, P.; Riscoe, M. Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48* (5), 1803–1806.
(115) Gastaminza, P.; Whitten-Bauer, C.; Chisari, F. V. Unbiased Probing of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle Identifies Clinical Compounds That Target Multiple Aspects of the Infection. *Proc Natl Acad Sci* **2010**, *107* (1), 291–296.
(116) Wang, X.; Chen, J.; Wang, W.; Jaunarajs, A.; Wang, X. Tryptoline-Based Benzothiazoles Re-Sensitize MRSA to β-Lactam Antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27* (21), 115095–11106.
(117) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (11), 751–758.
(118) Ohmoto, K.; Kato, M.; Matsushita, T.; Katsumata, S.; Manako, J. Novel Tricyclic Heterocycle Compound. EP1637521 (A1), March 22, 2006.

(119) Kozikowski, A.; Butler, K. B.; Kalin, J. H. Hdac Inhibitors and Therapeutic Methods Using the Same. WO2011011186 (A2), January 27, 2011.
(120) Megyesi, R.; Forró, E.; Fülöp, F. Substrate Engineering: Effects of Different N-Protecting Groups in the CAL-B-Catalysed Asymmetric O-Acylation of 1-Hydroxymethyl-Tetrahydro-β-Carbolines. *Tetrahedron* **2018**, *74* (21), 2634–2640.
(121) Penning, T. D.; Zhu, G.-D.; Gong, J.; Thomas, S.; Gandhi, V. B.; Liu, X.; Shi, Y.; Klinghofer, V.; Johnson, E. F.; Park, C. H.; Fry, E. H.; Donawho, C. K.; Frost, D. J.; Buchanan, F. G.; Bukofzer, G. T.; Rodriguez, L. E.; Bontcheva-Diaz, V.; Bouska, J. J.; Osterling, D. J.; Olson, A. M.; Marsh, K. C.; Luo, Y.; Giranda, V. L. Optimization of Phenyl-Substituted Benzimidazole Carboxamide Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Identification of (S)-2-(2-Fluoro-4-(Pyrrolidin-2-Yl)Phenyl)-1H-Benzimidazole-4-Carboxamide (A-966492), a Highly Potent and Efficacious Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (8), 3142–3153.
(122) Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M. A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay. *Analytical Biochemistry* **1988**, *171* (2), 266–270.
(123) Andersen, K. R.; Leksa, N. C.; Schwartz, T. U. Optimized E. Coli Expression Strain LOBSTR Eliminates Common Contaminants from His-Tag Purification. *Proteins* **2013**, *81* (11), 1857–1861.
(124) Swingle, M.; Ni, L.; Honkanen, R. E. Small-Molecule Inhibitors of Ser/Thr Protein Phosphatases: Specificity, Use and Common Forms of Abuse. *Methods Mol Biol* **2007**, *365*, 23–38.
(125) Aburai, N.; Yoshida, M.; Ohnishi, M.; Kimura, K. Sanguinarine as a Potent and Specific Inhibitor of Protein Phosphatase 2C in Vitro and Induces Apoptosis via Phosphorylation of P38 in HL60 Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74* (3), 548–552.
(126) Escalona-Montaño, A. R.; Pérez-Montfort, R.; Cabrera, N.; Mondragón-Flores, R.; Vélez-Ramírez, D. E.; Gómez-Sandoval, J. N.; Gutiérrez-Kobeh, L.; Becker, I.; Aguirre-García, M. M. Protein Phosphatase PP2C in the Flagellum of *Leishmania Major*: Cloning and Characterization. *Parasitology Open* **2017**, *3*, e15.
(127) Jakkula, P.; Qureshi, R.; Iqbal, A.; Sagurthi, S. R.; Qureshi, I. A. *Leishmania Donovani* PP2C: Kinetics, Structural Attributes and *in Vitro* Immune Response. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2018**, *223*, 37–49.
(128) Webb, M. R. A Continuous Spectrophotometric Assay for Inorganic Phosphate and for Measuring Phosphate Release Kinetics in Biological Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (11), 4884–4887.
(129) Jain, K. K. An Overview of Drug Delivery Systems. In *Drug Delivery Systems*; Jain, K. K., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2020; Vol. 2059, pp 1–54.
(130) Benet, L. Z.; Zia-Amirhosseini, P. Basic Principles of Pharmacokinetics. *Toxicologic Pathology* **1995**, *23* (2), 115–123.
(131) Ferriz, J. M.; Vinsova, J. Prodrug Design of Phenolic Drugs. *Current Pharmaceutical Design* **2010**, *16* (18), 2033–2052.
(132) Matz, J. M.; Kooij, T. W. A. Towards Genome-Wide Experimental Genetics in the in Vivo Malaria Model Parasite Plasmodium Berghei. *Pathog Glob Health* **2015**, *109* (2), 46–60.
(133) Kovada, V.; Withers-Martinez, C.; Bobrovs, R.; Cērule, H.; Liepins, E.; Grinberga, S.; Hackett, F.; Collins, C. R.; Kreicberga, A.; Jiménez-Díaz, M. B.; Angulo-Barturen, I.; Rasina, D.; Suna, E.; Jaudzems, K.; Blackman, M. J.; Jirgensons, A. Macrocyclic Peptidomimetic Plasmepsin X Inhibitors with Potent In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (15), 10658–10680.
(134) Najjar, A.; Karaman, R. The Prodrug Approach in the Era of Drug Design. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2019**, *16* (1), 1–5.
(135) Gupta, A. K.; Eliasen, A. M.; Andahazy, W.; Zhou, F.; Henson, K.; Chi, V.; Woods, A. K.; Joseph, S. B.; Kuhen, K. L.; Wisler, J.; Ramachandruni, H.; Duffy, J.; Burrows, J. N.; Vadas, E.; Slade, A.; Schultz, P. G.; McNamara, C. W.; Chatterjee, A. K. A Prodrug Strategy to Reposition Atovaquone as a Long-Acting Injectable for Malaria Chemoprotection. *bioRxiv* **2024**.
(136) Liu, H.; Guo, S.; Wei, S.; Liu, J.; Tian, B. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cyclodextrin-Based Oral Drug Delivery Formulations for Disease Therapy. *Carbohydrate Polymers* **2024**, *329*, 121763.
(137) Carrier, R. L.; Miller, L. A.; Ahmed, I. The Utility of Cyclodextrins for Enhancing Oral Bioavailability. *Journal of Controlled Release* **2007**, *123* (2), 78–99.

(138) Durand, A.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Djedaini-Pilard, F.; Marçon, F. Rapid Study on Mefloquine Hydrochloride Complexation with Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin and Randomly Methylated β-Cyclodextrin: Phase Diagrams, Nuclear Magnetic Resonance Analysis, and Stability Assessment. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (12), 2794.
(139) Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (3), 811–813.
(140) Job, P. *Ann. Chim* **1928**, *9*, 113–203.
(141) Bratu, I.; Gavira-Vallejo, J. M.; Hernanz, A.; Bogdan, M.; Bora, Gh. Inclusion Complex of Fenbufen with β-Cyclodextrin. *Biopolymers* **2004**, *73* (4), 451–456.
(142) Scott, R. L. *Rec. Trav. Chem. Pays – Bas* **1956**, *75*, 787–789.
(143) Frisk-Holmberg, M.; Bergqvist, Y.; Termond, E.; Domeij-Nyberg, B. The Single Dose Kinetics of Chloroquine and Its Major Metabolite Desethylchloroquine in Healthy Subjects. *Eur J Clin Pharmacol* **1984**, *26* (4), 521–530.
(144) Jullien, V. Pharmacocinétique Des Antipaludiques. *La Lettre de l'Infectiologue* **2012**, *XXVII* (6), 239–243.
(145) Morris, C. A.; Duparc, S.; Borghini-Fuhrer, I.; Jung, D.; Shin, C.-S.; Fleckenstein, L. Review of the Clinical Pharmacokinetics of Artesunate and Its Active Metabolite Dihydroartemisinin Following Intravenous, Intramuscular, Oral or Rectal Administration. *Malaria Journal* **2011**, *10* (1), 263.
(146) Kümpornsin, K.; Kochakarn, T.; Yeo, T.; Okombo, J.; Luth, M. R.; Hoshizaki, J.; Rawat, M.; Pearson, R. D.; Schindler, K. A.; Mok, S.; Park, H.; Uhlemann, A.-C.; Jana, G. P.; Maity, B. C.; Laleu, B.; Chenu, E.; Duffy, J.; Moliner Cubel, S.; Franco, V.; Gomez-Lorenzo, M. G.; Gamo, F. J.; Winzeler, E. A.; Fidock, D. A.; Chookajorn, T.; Lee, M. C. S. Generation of a Mutator Parasite to Drive Resistome Discovery in Plasmodium Falciparum. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 3059.
(147) Molina, D. M.; Jafari, R.; Ignatushchenko, M.; Seki, T.; Larsson, E. A.; Dan, C.; Sreekumar, L.; Cao, Y.; Nordlund, P. Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science* **2013**, *341* (6141), 84–87.
(148) Tu, Y.; Tan, L.; Tao, H.; Li, Y.; Liu, H. CETSA and Thermal Proteome Profiling Strategies for Target Identification and Drug Discovery of Natural Products. *Phytomedicine* **2023**, *116*, 154862.
(149) Soffers, A. E. M. F.; Veeger, C.; Rietjens, I. M. C. M. Influence of the Type of Halogen Substituent on in Vivo and in Vitro Phase II Metabolism of 2-Fluoro-4-Halophenol Metabolites Formed from 3-Halo-Fluorobenzenes. *Xenobiotica* **1994**, *24* (8), 759–774.
(150) Jiménez-Díaz, M. B.; Mulet, T.; Viera, S.; Gómez, V.; Garuti, H.; Ibáñez, J.; Alvarez-Doval, A.; Shultz, L. D.; Martínez, A.; Gargallo-Viola, D.; Angulo-Barturen, I. Improved Murine Model of Malaria Using Plasmodium Falciparum Competent Strains and Non-Myelodepleted NOD-Scid IL2Rγnull Mice Engrafted with Human Erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53* (10), 4533–4536.

ANNEXES

Annexe 1 : Figures annexes

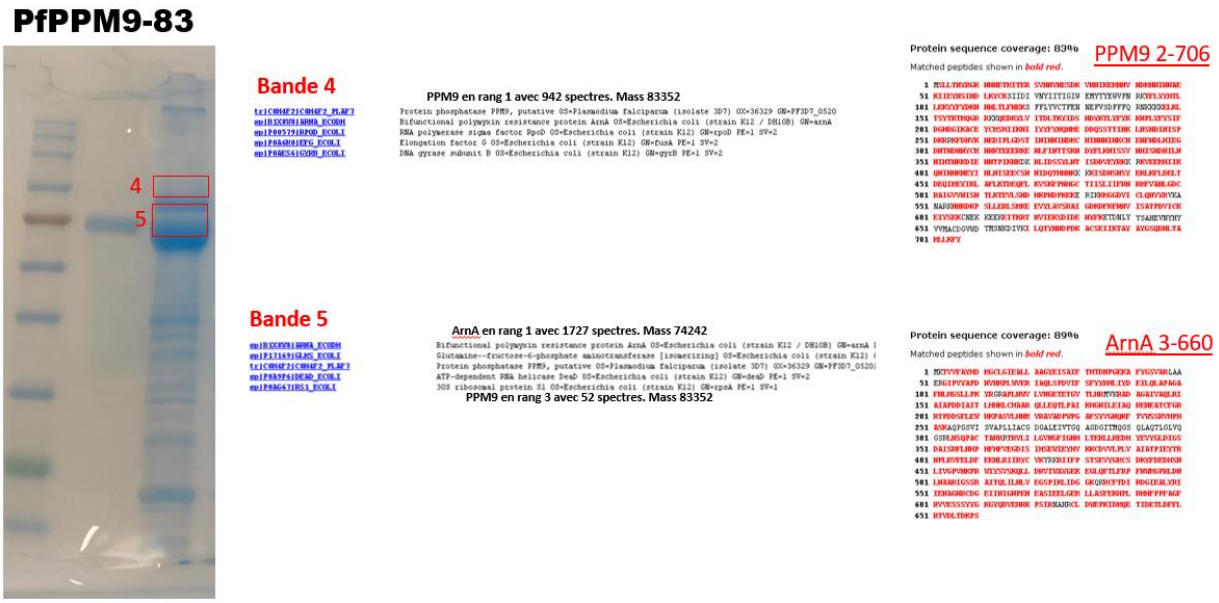


Figure 63. Résultats d'analyse en spectrométrie de masse des différentes bandes obtenues après production de PfPPM9r-83 en *E. coli* BL21 et purification par chromatographie d'affinité

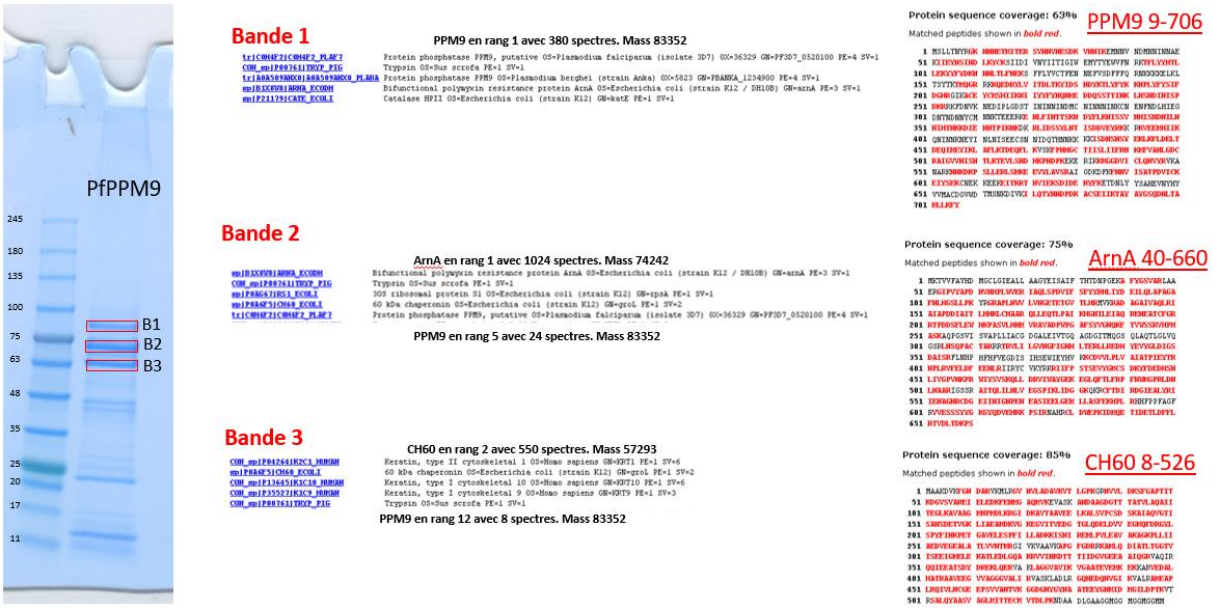


Figure 64. Résultats d'analyse en spectrométrie de masse des différentes bandes obtenues après production de PfPPM9r-83 en *E. coli* LOBSTR-BL21(DE3) et purification sur billes de Nickel

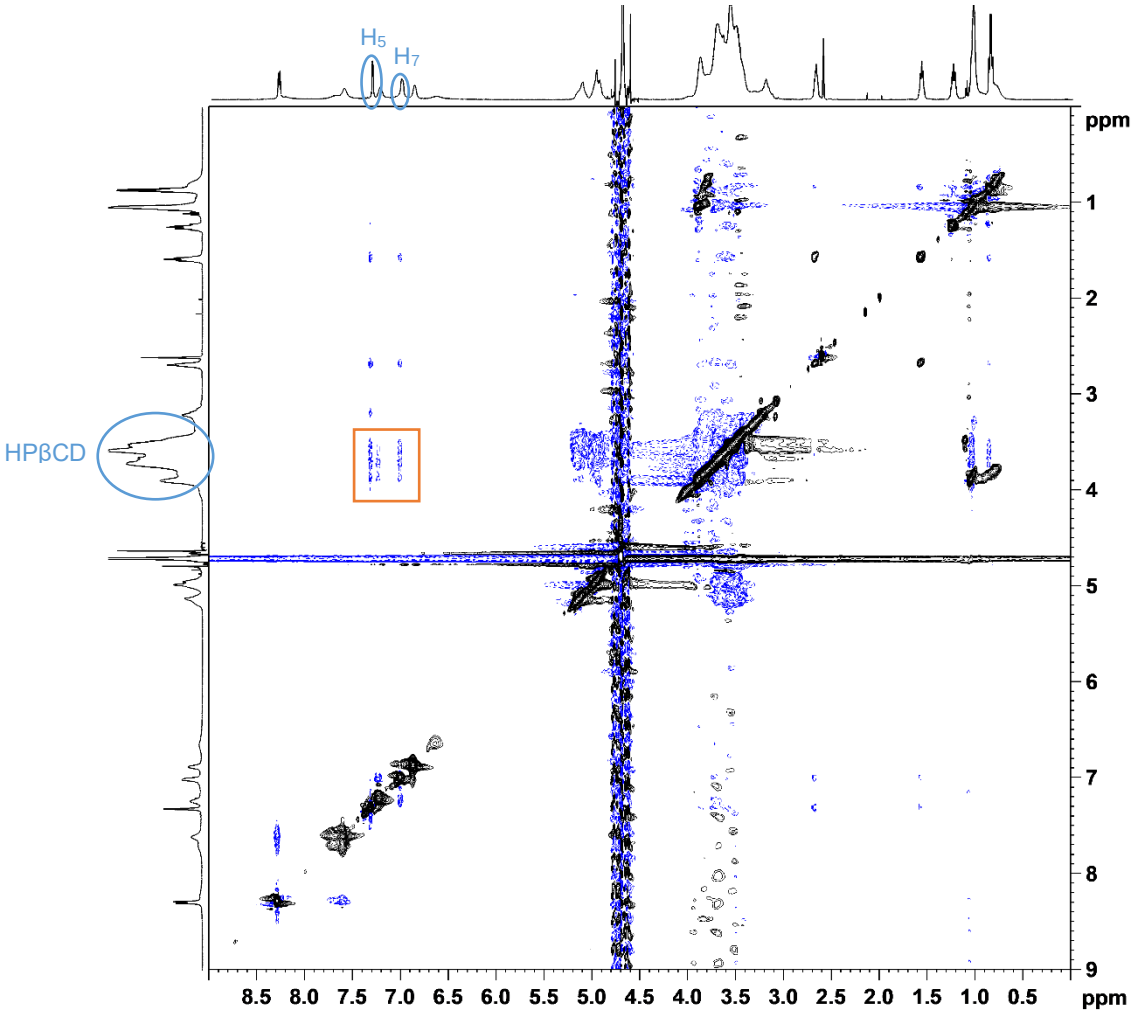
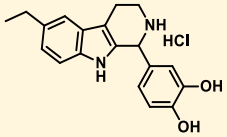
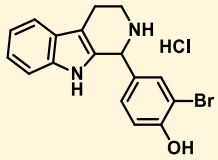
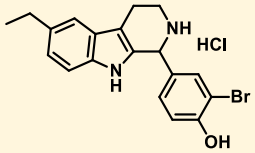
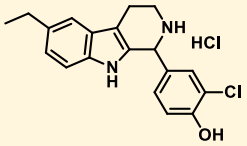
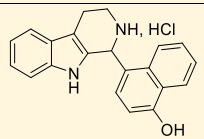
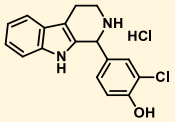
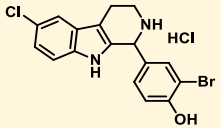
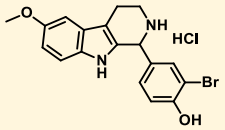
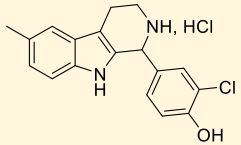
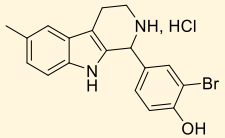
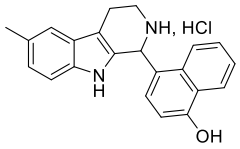
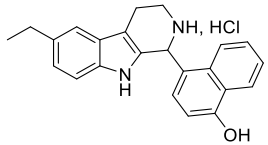


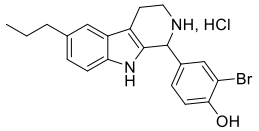
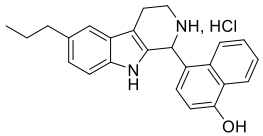
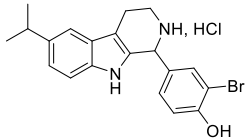
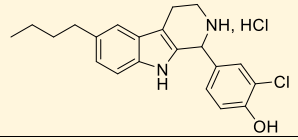
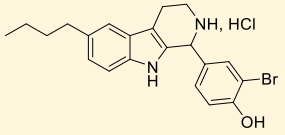
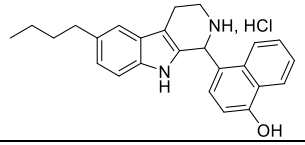
Figure 65. Spectre RMN ^{1}H-^{1}H 2D-Roesy de T17 + HPβCD (1:1)

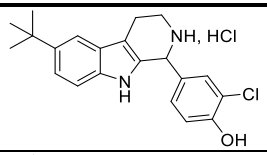
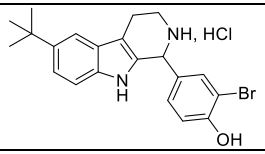
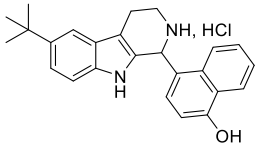
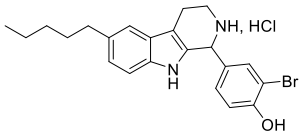
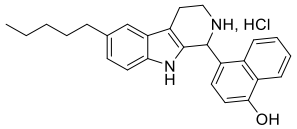
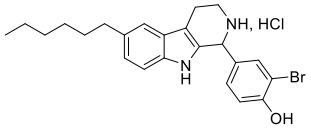
9.4. Annexe 2 : Tableau de l'ensemble des molécules

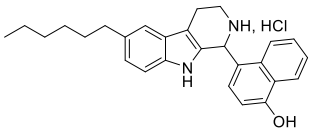
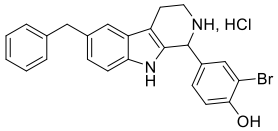
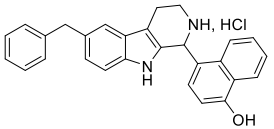
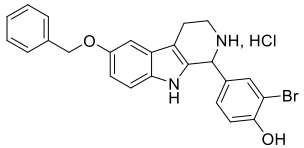
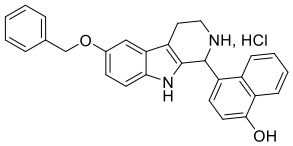
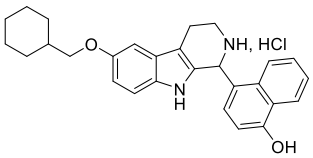
Tableau 22. Résultats de l'ensemble des évaluations *in vitro* des molécules synthétisées issues de la pharmacomodulation des hits tétrahydro-β-carbolines **T1**, **T2**, **T3** et **T4**

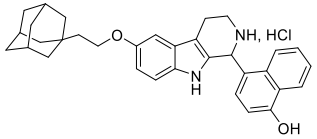
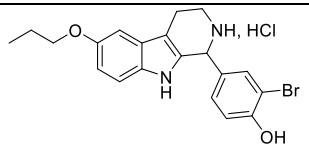
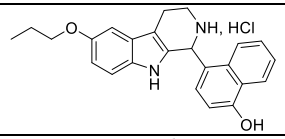
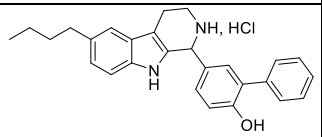
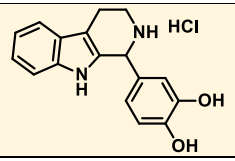
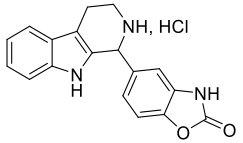
Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
H1 (M19)		$C_{19}H_{21}ClN_2O_2$ 344,84	100	0	0	1850 ± 100 (n=3)	3100 ± 200 (n=3)	1710 ± 960 (n=3)	28600 ± 12400 (n=3)	42,40 ± 13,4 (n=3)	16,43 ± 1,9 (n=2)	22,9	8,9
T1 (AMT27)		$C_{17}H_{16}BrClN_2O$ 379,68	100	100	0	570 ± 250 (n=3)	770 ± 250 (n=3)	530 ± 180 (n=3)	3300 ± 1080 (n=3)	130,40 ± 32,0 (n=3)	67,02 ± 13,8 (n=2)	228,8	117,6
T2 (AMT37)		$C_{19}H_{20}BrClN_2O$ 407,73	100	100	0	260 ± 120 (n=3)	600 ± 110 (n=3)	140 ± 20 (n=3)	600 ± 130 (n=3)	38,80 ± 3,5 (n=3)	17,11 ± 5,3 (n=2)	149,2	65,8
T3 (AMT47)		$C_{19}H_{20}Cl_2N_2O$ 363,28	100	100	0	340 ± 150 (n=3)	760 ± 140 (n=3)	230 ± 50 (n=3)	820 ± 210 (n=3)	43,80 ± 8,0 (n=3)	20,36 ± 1,1 (n=2)	128,8	59,9
T4 (JLA20)		$C_{21}H_{19}ClN_2O$ 350,85	100	94	7	460,45 ± 204,3 (n=3)	765,13 ± 428,1 (n=3)	265,75 ± 65,3 (n=2)	697,24 ± 142,1 (n=2)	47,07 ± 12,3 (n=2)	38,66 ± 1,6 (n=3)	102,2	84,0

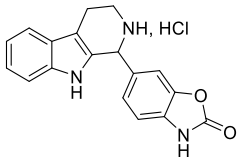
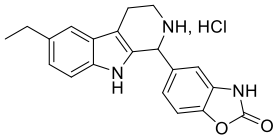
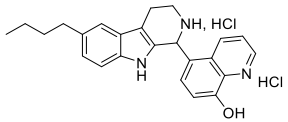
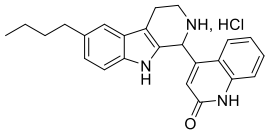
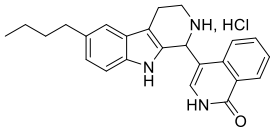
Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T5 (AMT40)		$C_{17}H_{16}Cl_2N_2O$ 335,23	100	0	0	1470 ± 70 (n=3)	1800 ± 80 (n=2)	1223,3 ± 290,3 (n=2)	4731,2 ± 1804,9 (n=2)	121,11 ± 15,5 (n=2)	74,13 ± 2,6 (n=2)	82,4	50,4
T6 (AMT43)		$C_{17}H_{15}BrCl_2N_2O$ 414,12	100	45	0	500 ± 70 (n=3)	880 ± 260 (n=3)	500 ± 140 (n=3)	4680 ± 1530 (n=3)	84,10 ± 4,0 (n=3)	21,16 ± 1,2 (n=2)	168,2	42,3
T7 (AMT41)		$C_{18}H_{18}BrClN_2O_2$ 409,70	100	44	0	1040 ± 410 (n=3)	1680 ± 70 (n=2)	506,40 ± 218,2 (n=2)	1682,04 ± 1101,1 (n=2)	96,45 ± 6,2 (n=2)	54,55 ± 14,3 (n=2)	92,7	52,5
T8 (JLA18)		$C_{18}H_{18}Cl_2N_2O$ 349,26	100	50	0	769,00 ± 237,5 (n=3)	1526,41 ± 147,4 (n=3)	470,25 ± 62,9 (n=2)	3207,65 ± 1506,0 (n=2)	41,25 ± 4,0 (n=2)	35,98 ± 4,9 (n=2)	53,6	46,8
T9 (JLA17)		$C_{18}H_{18}BrClN_2O$ 393,71	100	72	0	749,21 ± 129,7 (n=3)	1272,90 ± 131,0 (n=3)	316,18 ± 44,0 (n=2)	1892,08 ± 635,3 (n=2)	37,34 ± 5,9 (n=2)	19,10 ± 1,3 (n=2)	49,8	25,5
T10 (JPE42)		$C_{22}H_{21}ClN_2O$ 364,87	100	100	1	314,62 ± 92,9 (n=3)	716,92 ± 68,3 (n=3)	149,07 ± 14,3 (n=2)	413,30 ± 67,8 (n=2)	17,21 ± 3,0 (n=2)	20,58 ± 1,7 (n=2)	54,7	65,4
T11 (JPE25)		$C_{23}H_{23}ClN_2O$ 378,9	100	94	0	188,11 ± 6,2 (n=3)	334,58 ± 49,0 (n=3)	75,47 ± 21,0 (n=2)	207,89 ± 69,6 (n=2)	15,34 ± 2,0 (n=2)	16,45 ± 5,4 (n=2)	81,6	87,5

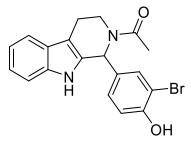
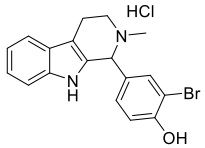
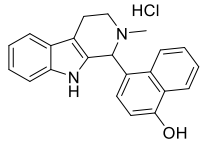
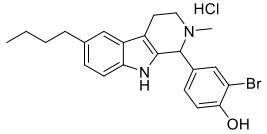
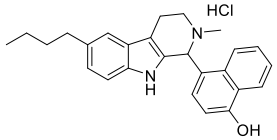
Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T12 (JPE45)		$C_{20}H_{22}BrClN_2O$ 421,76	100	100	54	124,70 ± 23,2 (n=3)	436,41 ± 37,7 (n=3)	101,73 ± 2,0 (n=2)	300,56 ± 159,3 (n=2)	13,56 ± 3,7 (n=2)	5,34 ± 1,1 (n=2)	108,7	42,8
T13 (JPE44)		$C_{24}H_{25}ClN_2O$ 392,93	100	100	53	72,23 ± 6,1 (n=3)	159,75 ± 20,9 (n=3)	50,31 ± 11,5 (n=2)	175,46 ± 45,3 (n=2)	17,57 ± 3,22 (n=2)	8,50 ± 0,5 (n=2)	243,3	117,7
T14 (JPE73)		$C_{20}H_{22}BrClN_2O$ 421,76	100	99	40	150,82 ± 32,8 (n=3)	480,91 ± 203,3 (n=3)	264,96 ± 44,6 (n=2)	658,20 ± 295,7 (n=2)	9,49 ± 1,7 (n=2)	7,19 ± 3,1 (n=2)	62,9	47,7
T15 (JLA26)		$C_{21}H_{24}Cl_2N_2O$ 391,34	100	98	2	144,26 ± 98,3 (n=3)	406,12 ± 126,0 (n=3)	75,15 ± 9,1 (n=2)	236,84 ± 124,2 (n=2)	7,68 ± 0,4 (n=2)	7,26 ± 2,6 (n=2)	53,2	50,3
T16 (JLA27)		$C_{21}H_{24}BrClN_2O$ 435,79	100	98	0	85,03 ± 25,6 (n=3)	313,54 ± 60,2 (n=3)	92,11 ± 37,4 (n=2)	298,09 ± 82,0 (n=2)	8,47 ± 2,5 (n=2)	6,83 ± 2,4 (n=2)	99,6	80,3
T17 (JPE29)		$C_{25}H_{27}ClN_2O$ 406,95	100	100	95	24,80 ± 13,1 (n=3)	107,86 ± 76,8 (n=3)	60,74 ± 25,4 (n=4)	180 ,09 ± 59,2 (n=4)	10,10 ± 2,7 (n=2)	18,92 ± 3,1 (n=2)	407,3	762,9

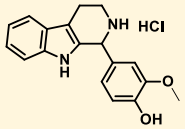
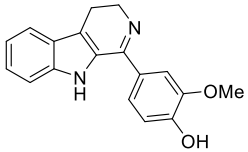
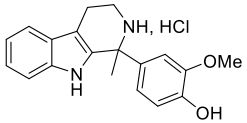
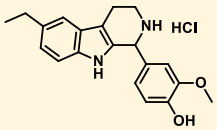
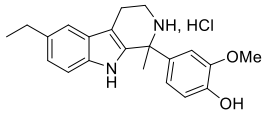
Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T18 (JPE35)		$C_{21}H_{24}Cl_2N_2O$ 391,34	100	100	7	93,84 ± 32,9 (n=3)	230,45 ± 111,5 (n=3)	149,16 ± 11,9 (n=2)	521,95 ± 87,2 (n=2)	8,36 ± 1,5 (n=2)	7,87 ± 3,3 (n=2)	89,1	83,9
T19 (JPE34)		$C_{21}H_{24}BrClN_2O$ 435,79	100	97	0	97,53 ± 20,0 (n=3)	221,43 ± 79,4 (n=3)	75,86 ± 36,3 (n=2)	484,47 ± 129,4 (n=2)	7,71 ± 1,4 (n=2)	6,77 ± 3,0 (n=2)	79,1	69,4
T20 (JPE41)		$C_{25}H_{27}ClN_2O$ 406,95	100	100	94	36,27 ± 8,4 (n=3)	95,42 ± 27,7 (n=3)	33,22 ± 2,5 (n=2)	151,90 ± 43,6 (n=2)	10,76 ± 2,2 (n=2)	9,95 ± 0,8 (n=2)	296,7	274,3
T21 (JPE65)		$C_{22}H_{26}BrClN_2O$ 449,82	100	98	42	130,21 ± 50,2 (n=3)	537,31 ± 114,0 (n=3)	82,85 ± 3,5 (n=2)	233,13 ± 60,2 (n=2)	8,39 ± 1,1 (n=2)	4,24 ± 0,7 (n=2)	64,4	32,6
T22 (JPE66)		$C_{26}H_{29}ClN_2O$ 420,98	100	100	95	28,41 ± 8,3 (n=3)	85,47 ± 57,9 (n=3)	72,52 ± 14,0 (n=2)	215,33 ± 26,1 (n=2)	7,45 ± 0,9 (n=2)	16,19 ± 3,1 (n=3)	262,2	569,9
T23 (JPE79)		$C_{23}H_{28}BrClN_2O$ 463,84	100	98	83	30,42 ± 12,5 (n=3)	267,31 ± 322,8 (n=3)	60,64 ± 6,6 (n=2)	193,09 ± 2,2 (n=2)	7,69 ± 0,4 (n=2)	4,45 ± 0,6 (n=2)	252,8	146,3

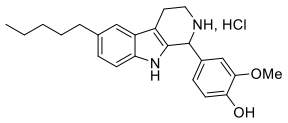
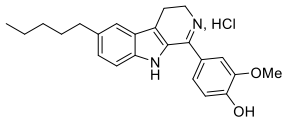
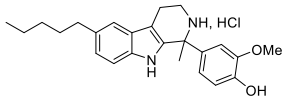
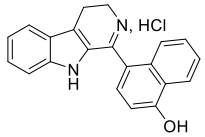
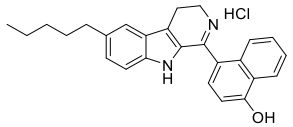
Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T24 (JPE89)		$C_{27}H_{31}ClN_2O$ 435,01	100	100	94	63,11 ± 12,2 (n=3)	347,85 ± 169,1 (n=3)	159,04 ± 40,3 (n=2)	326,86 ± 52,7 (n=2)	9,88 ± 1,6 (n=2)	35,99 ± 3,4 (n=2)	156,6	570,3
T25 (JPE80)		$C_{24}H_{22}BrClN_2O$ 469,81	100	98	44	64,77 ± 15,5 (n=3)	468,10 ± 523,0 (n=3)	64,01 ± 10,5 (n=2)	146,18 ± 5,1 (n=2)	9,29 ± 2,0 (n=2)	17,14 ± 1,7 (n=2)	143,4	264,6
T26 (JPE90)		$C_{28}H_{25}ClN_2O$ 440,97	100	100	93	38,61 ± 6,3 (n=3)	215,23 ± 168,7 (n=3)	73,12 ± 14,3 (n=3)	247,42 ± 65,7 (n=3)	6,74 ± 0,9 (n=2)	10,97 ± 1,1 (n=2)	174,5	284,1
T27 (JPE55)		$C_{24}H_{22}BrClN_2O_2$ 485,81	100	96	32	83,47 ± 8,8 (n=3)	171,26 ± 63,9 (n=3)	97,36 ± 11,3 (n=2)	160,86 ± 8,6 (n=2)	22,91 ± 6,6 (n=2)	21,88 ± 2,6 (n=2)	274,5	262,1
T28 (JPE54)		$C_{28}H_{25}ClN_2O_2$ 456,97	100	98	16	44,80 ± 12,4 (n=3)	110,20 ± 59,8 (n=3)	103,48 ± 1,2 (n=2)	329,75 ± 51,2 (n=2)	9,02 ± 1,0 (n=2)	20,58 ± 1,2 (n=2)	201,3	459,4
T29 (ZWE30)		$C_{28}H_{31}ClN_2O_2$ 463,02	100	97	6	132,69 ± 22,6 (n=3)	200,42 ± 4,1 (n=3)	57,36 ± 8,4 (n=2)	200,31 ± 20,7 (n=2)	7,98 ± 1,0 (n=2)	30,33 ± 7,4 (n=2)	60,14	228,6

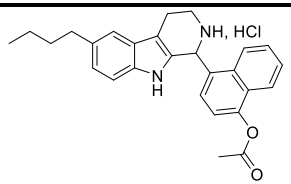
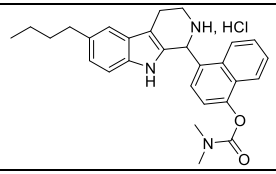
Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T30 (JPE112)		$C_{33}H_{37}ClN_2O_2$ 529,12	100	100	94	42,6 ± 0,7 (n=2)	162,94 ± 89,1 (n=2)	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours
T31 (PUB11)		$C_{20}H_{22}BrClN_2O_2$ 437,76	100	98	9	198,73 ± 16,5 (n=3)	397,88 ± 136,4 (n=3)	181,83 ± 3,5 (n=2)	402,05 ± 80,6 (n=2)	21,14 ± 0,7 (n=2)	18,81 ± 4,0 (n=2)	106,4	94,7
T32 (PUB12)		$C_{24}H_{25}ClN_2O_2$ 408,93	100	90	0	432,91 ± 37,5 (n=3)	1241,26 ± 594,0 (n=3)	/	/	63,97 ± 3,5 (n=2)	/	147,8	/
T33 (LEB301)		$C_{27}H_{29}ClN_2O$ 432,99	100	100	97	10,29 ± 0,8 (n=2)	26,85 ± 0,9 (n=2)	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours
T34 (YSP10)		$C_{17}H_{17}ClN_2O_2$ 316,78	11	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T35 (JPE14)		$C_{18}H_{16}ClN_3O_2$ 341,8	62	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/

Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T36 (JPE17)		$C_{18}H_{16}ClN_3O_2$ 341,8	68	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T37 (JPE18)		$C_{20}H_{20}ClN_3O_2$ 369,85	50	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T38 (JPE97)		$C_{24}H_{27}Cl_2N_3O$ 444,4	100	67	0	738,43 ± 232,5 (n=3)	1418,05 ± 482,4 (n=3)	292,99 ± 92,4 (n=2)	822,87 ± 120,4 (n=2)	12,52 ± 2,2 (n=2)	22,67 ± 10,0 (n=2)	17,0	30,7
T39 (JPE101)		$C_{24}H_{26}ClN_3O$ 407,94	33	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T40 (JPE108)		$C_{24}H_{26}ClN_3O$ 407,94	100	2	0	/	/	/	/	/	/	/	/

Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T41 (JPE22)		$C_{19}H_{17}BrN_2O_2$ 385,26	46	18	8,8	/	/	/	/	/	/	/	/
T42 (JPE30)		$C_{18}H_{17}BrN_2O$ 357,25	100	100	0	432,80 ± 35,1 (n=3)	691,50 ± 54,6 (n=3)	263,42 ± 84,3 (n=2)	598,20 ± 57,1 (n=2)	213,22 ± 8,7 (n=2)	359,8 ± 25,2 (n=2)	492,7	831,3
T43 (JPE85)		$C_{22}H_{21}ClN_2O$ 364,87	100	20	0	1540,13 ± 284,1 (n=3)	2694,89 ± 519,2 (n=3)	1340,46 ± 16,2 (n=2)	2007,02 ± 41,5 (n=2)	40,72 ± 7,9 (n=2)	61,29 ± 16,6 (n=3)	26,4	39,8
T44 (LEB279)		$C_{22}H_{26}BrClN_2O$ 449,82	100	94	8	439,13 ± 34,0 (n=3)	1082,98 ± 329,1 (n=3)	350,67 ± 50,8 (n=2)	814,54 ± 85,1 (n=2)	30,96 ± 3,9 (n=2)	24,14 ± 9,4 (n=2)	70,5	55,0
T45 (JPE102)		$C_{26}H_{29}ClN_2O$ 420,98	99	37	0	684,15 ± 126,1 (n=3)	1154,30 ± 216,2 (n=3)	688,82 ± 65,6 (n=2)	1670,36 ± 8,3 (n=2)	23,26 ± 2,6 (n=2)	71,23 ± 9,10 (n=2)	34,0	104,1

Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T46 (AMT14)		$C_{18}H_{19}ClN_2O_2$ 330,81	49	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T47 (JPE77)		$C_{18}H_{16}N_2O_2$ 292,34	68	4	1	/	/	/	/	/	/	/	/
T48 (JPE77-4)		$C_{19}H_{21}ClN_2O_2$ 344,84	20	1	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T49 (AMT23)		$C_{20}H_{23}ClN_2O_2$ 358,86	100	0	0	2670 ± 50 (n=3)	3280 (n=1)	1536,9 ± 224,5 (n=2)	5609,5 ± 810,1 (n=2)	45,75 ± 3.6 (n=2)	29,77 ± 10.2 (n=2)	17.1	11.2
T50 (JPE68)		$C_{21}H_{25}ClN_2O_2$ 372,89	100	11	3	/	/	/	/	/	/	/	/

Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
T51 (JPE84)		$C_{23}H_{29}ClN_2O_2$ 400,95	100	94	2	513,62 ± 177,7 (n=3)	1024,81 ± 545,7 (n=3)	411,13 ± 27,7 (n=2)	692,40 ± 146,1 (n=2)	13,15 ± 2,3 (n=2)	18,38 ± 0,2 (n=2)	25,6	35,8
T52 (JPE81)		$C_{23}H_{27}ClN_2O_2$ 398,93	100	85	0	532,05 ± 85,3 (n=3)	1286,15 ± 206,6 (n=3)	/	/	16,52 ± 1,4 (n=2)	23,81 ± 4,1 (n=1)	31,1	44,8
T53 (JPE83)		$C_{24}H_{31}ClN_2O_2$ 414,97	98	2	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T54 (JLA20 dihydro)		$C_{21}H_{17}ClN_2O$ 348,83	99	25	0	/	/	/	/	/	/	/	/
T55 (JPE66 dihydro)		$C_{26}H_{27}ClN_2O$ 418,97	100	96	77	115,61 ± 38,4 (n=3)	309,10 ± 109,5 (n=3)	244,36 ± 101,4 (n=2)	534,03 ± 99,8 (n=2)	8,30 ± 0,7 (n=2)	18,86 ± 1,1 (n=2)	71,8	163,1

Code	Structure	Formule brute & Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Activité *in vitro* sur *Pf* HB3 (% inhibition)			Activité *in vitro* sur *P. falciparum* HB3 (nM)		Activité *in vitro* sur *P. falciparum* Dd2 (nM)		Cytotoxicité sur cellules (µM)		Index de sélectivité	
			10 µM	1 µM	0,1 µM	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50} HFF	CI_{50} HepG2	HFF/ HB3	HepG2/ HB3
P1 (LEB298)		$C_{27}H_{29}ClN_2O_2$ 448,99	100	100	93	51,1 ± 18,0 (n=2)	154,4 ± 45,6 (n=2)	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours
P2 (LEB307)		$C_{28}H_{32}ClN_3O_2$ 478,03	100	0	0	1279,9 ± 584,5 (n=2)	6111,8 ± 803,5 (n=2)	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours	En cours

Cases jaunes : résultats obtenus avant le début de ma thèse

Partie expérimentale

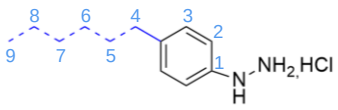
Experimental part

General informations

All reactions involving air-sensitive reagents were performed under nitrogen. Solvents and reagents were purchased from commercial sources and used without purification. Reactions were monitored by TLC performed on Macherey-Nagel Alugram® Sil 60/UV254 sheets (thickness 0.2 mm) and spots were visualized by UV. Purifications requiring column chromatography were performed using Reveleris® X2 Flash Chromatography System from BUCHI. Melting points were determined on a Buchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Nuclear magnetic resonance ^{1}H and $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz (^{1}H) or 75 MHz (^{13}C) at room temperature, or on a Bruker Avance 500 spectrometer operating at 500 MHz (^{1}H) or 125 MHz (^{13}C) at room temperature. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual proton signal in deuterated solvents. Data are reported as position (δ in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qt = quintuplet, sx = sextuplet, sp = septuplet m = multiplet, dd = double of doublet, br. s = broad signal), relative integration, attribution, coupling constant(s) (*J* in Hertz). Mass spectra were recorded with a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) on a Waters Alliance Micromass ZQ 2000 system. LC-MS analyses were performed using a Waters XBridge C_{18} column (5 µm particle size column, dimensions 50 mm x 4.6 mm) with an electrospray ionization (ESI) coupled to an UV detector (diode array). 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. Analytical chiral HPLC analyses were performed on a Shimadzu chromatograph with a variable detector at 215 nm and 230 nm using a chiral column CHIRALPAK® AD-H (250 x 4,6 mm). The eluents were : A) IPA, B) hexane, C) heptane, D) MeOH. Isocratic elution conditions involved a flow rate of 1 $mL.min^{-1}$ at 20°C with a total run time of 15 or 30 min. Preparative chiral HPLC analyses were performed on a LaPrep VWR system with a variable detector at 250 nm using a semi-preparative packed-column with CHIRALPAK® AD-H normal phase (200 x 50 mm). The eluents were: A) IPA, B) hexane, C) heptane, D) MeOH. Isocratic elution conditions involved a flow rate of 80 or 120 $mL.min^{-1}$ at 20°C with a total run time of 30 or 60 min.

Procedures for 5-alkyltryptamines and *N*-methyl-5-alkyltryptamines synthesis

(4-alkylphenyl)hydrazine hydrochlorides (2c-j, 2l)



4-alkylaniline **1b-l** (0.81 eq.) is added to concentrated HCl (32 eq.) and the mixture is cooled to 0°C. $NaNO_2$ (1 eq.) is dissolved in H_2O (40 eq.) and then introduced dropwise to the reaction mixture

while keeping the temperature at 0°C. The reaction mixture is stirred 2h30 at 0°C. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.8 eq.) is dissolved in concentrated HCl (16 eq.) and added dropwise to the mixture at 0°C. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature. The precipitate is filtered, washed with a minimum of cooled water and dried 3 days in the oven. (4-alkylphenyl)hydrazine hydrochloride is obtained as a brown solid.

(4-ethylphenyl)hydrazine hydrochloride **2c** (4.8 g, 27.92 mmol, 68%). $C_8H_{12}N_2ClH$. MW = 172.66 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.15 (s, 3H, NH_3^+), 8.10 (s, 1H, NH), 7.11 (d, 2H, H_3, ^3J = 8.6 Hz), 6.94 (d, 2H, H_2, ^3J = 8.6 Hz), 2.59-2.55 (m, 2H, H_4), 1.15 (t, 3H, H_5, ^3J = 6.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO) : D. Ma., *Chinese Journal of Chemistry*, 2018, 36, 11, 1003 - 1006.

(4-propylphenyl)hydrazine hydrochloride **2d** (6.0 g, 32.08 mmol, 87%). $C_9H_{14}N_2ClH$. MW = 186.68 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.10 (s, 3H, NH_{3+}), 8.09 (s, 1H, NH), 7.10 (d, 2H, H_3, ^3J = 7.2 Hz), 6.91 (d, 2H, H_2, ^3J = 6.3 Hz), 2.49-2.45 (m, 2H, H_4), 1.54 (sx, 2H, H_5, ^3J = 7.2 Hz), 0.86 (t, 3H, H_6, ^3J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO) : D. Ma., *Chinese Journal of Chemistry*, 2018, 36, 11, 1003 - 1006.

4-isopropylphenylhydrazine hydrochloride **2e** (5.48 g, 29.36 mmol, 79%). $C_9H_{14}N_2ClH$. MW = 186.68 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.03 (s, 3H, NH_3^+), 8.05 (s, 1H, NH), 7.16 (d, 2H, H_3, ^3J = 7.9 Hz), 6.91 (d, 2H, H_2, ^3J = 7.0 Hz), 2.82 (sp, 1H, H_4, ^3J = 6.9 Hz), 1.16 (d, 6H, H_5, ^3J = 6.9 Hz). ^{13}C NMR (DMSO) : D. Ma., *Chinese Journal of Chemistry*, 2018, 36, 11, 1003 - 1006.

(4-butylphenyl)hydrazine hydrochloride **2f** (4.82 g, 24.02 mmol, 72%). $C_{10}H_{16}N_2ClH$. MW = 200.71 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.15 (s, 3H, NH_3^+), 8.09 (s, 1H, NH), 7.09 (d, 2H, H_3, ^3J = 8.7 Hz), 6.94 (d, 2H, H_2, ^3J = 8.7 Hz), 2.48 (br. s, 2H, H_4), 1.51 (qt, 2H, H_5, ^3J = 7.1 Hz), 1.26 (sx, 2H, H_6, ^3J = 7.4 Hz), 0.88 (t, 3H, H_7, ^3J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 143.77, 136.09, 129.20, 115.25, 34.46, 33.79, 22.08, 14.23.

(4-*tert*-butylphenyl)hydrazine hydrochloride **2g** (7.3 g, 26.26 mmol, 78%). $C_{10}H_{16}N_2ClH$. MW = 200.71 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.13 (s, 3H, NH_3^+), 8.10 (s, 1H, NH), 7.30 (d, 2H, H_3, ^3J = 8.8 Hz), 6.93 (d, 2H, H_2, ^3J = 8.7 Hz), 1.24 (s, 9H, H_5, ^3J = 6.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO) : D. Ma., *Chinese Journal of Chemistry*, 2018, 36, 11, 1003 - 1006.

(4-pentylphenyl)hydrazine hydrochloride **2h** (5.18 g, 24.12 mmol, 79%). $C_{11}H_{18}N_2ClH$. MW = 214.73 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.05 (s, 3H, NH_{3+}), 8.07 (s, 1H, NH), 7.10 (d, 2H, H_3, ^3J = 8.4 Hz), 6.90 (d, 2H, H_2, ^3J = 8.4 Hz), 2.49-2.46 (m, 2H, H_4), 1.52 (qt, 2H, H_5, ^3J = 7.5 Hz), 1.32-1.18 (m, 4H, H_6 & H_7) 0.85 (t, 3H, H_8, ^3J = 6.9 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 143.77, 136.11, 129.60, 129.20, 124.11, 115.23, 34.75, 31.29, 31.23, 22.40, 14.41.

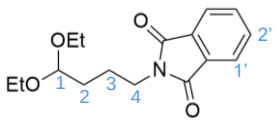
(4-hexylphenyl)hydrazine hydrochloride **2i** (5.4 g, 23.606 mmol, 92%). $C_{12}H_{20}N_2ClH$. MW = 228.77 $g.mol^{-1}$. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) =10.06 (s, 3H, NH_{3+}), 8.11 (s, 1H, NH), 7.09 (d, 2H, H_3, ^3J = 8.4 Hz), 6.91 (d, 2H, H_2, ^3J = 8.4 Hz), 2.49-2.46 (m, 2H, H_4), 1.50 (q, 2H, H_5, ^3J = 6.4 Hz), 1.25 (m,

6H, H_6 & H_7 & H_8), 0.84 (t, 3H, H_9, ^3J = 6.7 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 143.86, 135.93, 129.85, 129.12, 123.52, 115.26, 34.81, 31.60, 31.57, 28.69, 22.54, 14.42.

(4-benzylphenyl)hydrazine hydrochloride **2j** (6.55 g, 27.904 mmol, 100%). $C_{13}H_{14}N_2ClH$. MW = 234.72 g.mol^{-1}. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.08 (s, 3H, NH_3^+), 8.10 (s, 1H, NH), 7.29-7.14 (m, 7H, H_3 & H_5 & H_6 & H_7), 6.92-6.88 (m, 2H, H_2), 3.86 (s, 2H, H_4). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 144.15, 142.13, 135.00, 130.37, 129.68, 129.48, 129.14, 129.00, 128.85, 128.77, 126.34, 115.30, 112.97.

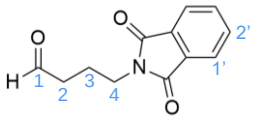
(4-propoxyphenyl)hydrazine hydrochloride **2l** (1.6 g, 7.89 mmol, 60%). $C_9H_{14}N_2OClH$. MW = 202.68 g.mol^{-1}. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.08 (s, 3H, NH_3^+), 6.99 (d, 2H, H_3, ^3J = 9.0 Hz), 6.87 (d, 2H, H_2, ^3J = 9.0 Hz), 3.86 (t, 2H, H_4, ^3J = 6.5 Hz), 1.69 (qt, 2H, H_5, ^3J = 6.0 Hz), 0.95 (t, 2H, H_6, ^3J = 7.4 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.60, 139.26, 124.94, 117.59, 115.74, 115.37, 69.65, 22.53, 10.89.

2-(4,4-diethoxybutyl)isoindoline-1,3-dione (5)



Phthalic anhydride **4** (1 eq., 9.2 g, 62.02 mmol) is solubilized in toluene (400 mL). 4,4-diethoxybutylamine **3** (1 eq., 10.0 g, 11 mL, 62.02 mmol) and triethylamine (4.64 eq., 29.1 g, 40 mL, 287.77 mmol) are added and the mixture is stirred overnight at reflux with a Dean Stark apparatus. Toluene is evaporated under reduced pressure, then the residue is taken up in ethyl acetate, washed with $NaHCO_3$, dried over sulfate sodium, filtered and concentrated under reduced pressure. 2-(4,4-diethoxybutyl)-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione (9.4 g, 32.20 mmol, 52%) is obtained as a brown oil. $C_{16}H_{21}NO_4$. MW = 291.35 g.mol^{-1}. Rf = 0.52 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.86-7.81 (m, 2H, $H_{1'}$), 7.73-7.67 (m, 2H, $H_{2'}$), 4.54-4.52 (m, 1H, H_1), 4.51-3.60 (m, 4H, H_2 et H_3), 3.52-3.45 (m, 2H, H_4), 1.78-1.67 (m, 4H, 2 CH_2 (Et)), 1.22-1.18 (m, 6H, 2 CH_3 (Et)). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) : W. Rolf, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2014, 12, 32, 6094 – 6104.

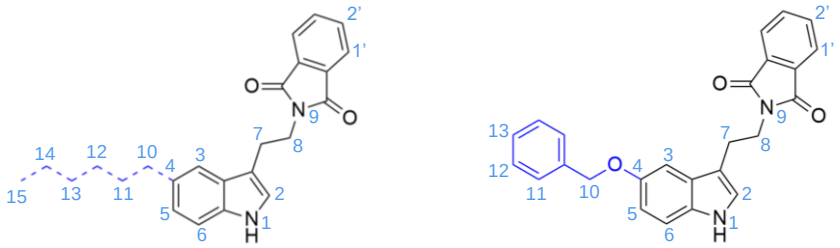
4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-*1H*-isoindol-2-yl)butanal (6)



2-(4,4-diethoxybutyl)-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **5** (1 eq., 13.5 g, 46.41 mmol) is solubilized in 1M aqueous HCl solution (158 mL) and acetone (158 mL). The reaction mixture is heated at reflux during 2h. Brine is added to the reaction mixture and the aqueous layer is extracted with EtOAc. The organic layer is dried, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue is

solubilized in hot cyclohexane which is evaporated under reduced pressure after cooling. 4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-*1H*-isoindol-2-yl)butanal (9.4 g, 43.27 mmol, 93%) is obtained as a light-colored solid. $C_{12}H_{11}NO_3$. MW = 217.22 g.mol^{-1}. Rf = 0.36 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 9.81 (s, 1H, CHO), 7.89 (dd, 2H, $H_{1'}$, ^{3}J = 5.4 Hz, ^{4}J = 3.0 Hz), 7.76 (dd, 2H, $H_{2'}$, ^{3}J = 5.4 Hz, ^{4}J = 3.0 Hz), , 3.78 (t, 2H, H_2, ^{3}J = 6.9 Hz), 2.58 (t, 2H, H_4, ^{3}J = 7,2 Hz), 2.06 (q, 2H, H_3, ^{3}J = 6.9 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) : C. Liu, *Angew. Chem.*, 2023, 135, 2.

2-(2-(5-alkyl-(*1H*-indol-3-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (7b-l)



(4-alkylphenyl)hydrazine hydrochloride **2b-l** (1 eq.) and a few drops of concentrated HCl (1.7 eq.) in 25 % aqueous acetic acid (38 eq.) is heated at 80°C in a two-necked balloon. Then, a solution of 4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-2-yl)butanal **6** (1 eq.) in EtOH (50 eq) is added dropwise. The reaction mixture is stirred at 95°C for 15h. The reaction mixture is diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer is washed with a saturated solution of K_2CO_3, then dried over sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. If necessary, the obtained oil is purified on chromatography column (gradient until Cyclohexane/Ethyl acetate 75:25) to give 2-(2-(5-alkyl-(*1H*-indol-3-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione as yellow solid or colored oil.

2-[2-(5-methyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-isoindole-1,3-dione **7b** (4.9 g, 16.20 mmol, 86%). $C_{19}H_{16}N_2O_2$. MW = 304.35 g.mol^{-1}. Rf = 0.38 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.68 (s, 1H, H_1), 7.87-7.80 (m, 4H, $H_{1'}$ et $H_{2'}$), 7.27 (s, 1H, H_2), 7.19 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.11 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.4 Hz), 6.86 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 3.82 (t, 2H, H_8, ^{3}J = 7.2 Hz), 2.99 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 7.2 Hz), 2.30 (s, 3H, H_{10}).

2-[2-(5-ethyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-isoindole-1,3-dione **7c** (1.7 g, 5.18 mmol, 89%). $C_{20}H_{18}N_2O_2$. MW = 318.38 g.mol^{-1}. Rf = 0.44 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.95 (s, 1H, H_1), 7.87 (dd, 2H, $H_{2'}$, ^{3}J = 5.4 Hz, ^{4}J = 3.0 Hz), 7.74 (dd, 2H, $H_{1'}$, ^{3}J = 5.4 Hz, ^{4}J = 3.0 Hz), 7.54 (d, 1H, H_2, $^3J_{H\text{-}NH}$ = 1,5 Hz), 7.30 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.12 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.07 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 4.05 (t, 2H, H_8, ^{3}J = 7.5 Hz), 3.18 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 8.1 Hz), 2.76 (q, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.8 Hz), 1.30 (t, 3H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.40, 135.52, 134.70, 133.85, 132.22, 127.62, 123.22, 123.16, 122.69, 122.16, 117.23, 116.45, 112.16, 110.88, 107.87, 38.65, 29.03, 24.45, 16.51.

2-[2-(5-propyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-isoindole-1,3-dione **7d** (5.2 g, 15.64 mmol, 97%) as a yellow solid. $C_{21}H_{20}N_2O_2$. MW = 332.40 g.mol^{-1}. Rf = 0.41 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.69 (s, 1H, H_1), 7.87-7.78 (m, 4H, $H_{1'}$ et $H_{2'}$), 7.26 (s, 1H, H_2), 7.21 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.4 Hz),

7.13 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.1 Hz), 6.87 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 3.83 (t, 2H, H_8, ^3J = 6.9 Hz), 3.00 (t, 2H, H_7, ^3J = 6.9 Hz), 2.55 (m, 2H, H_{10}), 1.51 (sx, 2H, H_{11}, ^3J = 7.5 Hz), 0.85 (t, 3H, H_{12}, ^3J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.31, 135.24, 134.80, 132.30, 132.11, 127.74, 123.48, 123.43, 122.43, 117.44, 111.58, 110.83, 38.14, 25.27, 24.31, 14.18.

2-{2-[5-(propan-2-yl)-*1H*-indol-3-yl]ethyl}-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **7e** (3.41 g, 10.26 mmol, 64%). $C_{21}H_{20}N_2O_2$. MW = 332.40 g.mol^{-1}. Rf = 0.45 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). JPE67 ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.69 (s, 1H, H_1), 7.87-7.80 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.31 (s, 1H, H_2), 7.22 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.3 Hz), 7.14 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.3 Hz), 6.93 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.6 Hz), 3.83 (t, 2H, H_8, ^3J = 7.1 Hz), 3.01 (t, 2H, H_7, ^3J = 7.5 Hz), 2.84 (s, 1H, H_{10}, ^3J = 6.9 Hz), 1.15 (d, 6H, H_{11}, ^3J = 6.9 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.32, 138.80, 135.25, 134.80, 132.11, 127.63, 123.47, 123.44, 120.56, 115.05, 111.67, 111.01, 43.24, 34.03, 25.03, 24.32.

2-[2-(5-butyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-isoindole-1,3-dione **7f** (3.1 g, 9.06 mmol, 99%). $C_{22}H_{22}N_2O_2$. MW = 346.43 g.mol^{-1}. Rf = 0.44 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.87 (dd, 2H, $H_{2'}$, ^3J = 5.4 Hz, ^4J = 3.0 Hz), 7.73 (dd, 2H, $H_{1'}$, ^3J = 5.4 Hz, ^4J = 3.0 Hz), 7.50 (d, 1H, H_2, $^3J_{H\text{-}NH}$ = 0.9 Hz), 7.28 (d, 1H, H_6, ^3J = 9.3 Hz), 7.10 (d, 1H, H_3, ^4J = 1.5 Hz), 7.04 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 4.04 (t, 2H, H_8, ^3J = 7.5 Hz), 3.18 (t, 2H, H_7, ^3J = 8.1 Hz), 2.71 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.8 Hz), 1.67-1.59 (m, 2H, H_{11}), 1.41 (sx, 2H, H_{12}, ^3J = 7.2 Hz), 0.97 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.2 Hz).

2-[2-(5-tert-butyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-isoindole-1,3-dione **7g** (1.7 g, 4.91 mmol, 43%). $C_{22}H_{22}N_2O_2$. MW = 346.43 g.mol^{-1}. Rf = 0.40 (Cyclehexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.95 (s, 1H, H_1), 7.87 (dd, 2H, $H_{2'}$, ^3J = 5.4 Hz, ^4J = 3.0 Hz), 7.73 (dd, 2H, $H_{1'}$, ^3J = 5.4 Hz, ^4J = 3.0 Hz), 7.32-7.31 (m, 3H, H_3, H_5 et H_6), 7.13 (s, 1H, H_2), 4.06 (t, 2H, H_8, ^3J = 7.5 Hz), 3.21 (t, 2H, H_7, ^3J = 8.1 Hz), 1.41 (s, 9H, H_{11}).

2-[2-(5-pentyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **7h** (5.63 g, 15.62 mmol, Qu.). $C_{23}H_{24}N_2O_2$. MW = 360.46 g.mol^{-1}. Rf = 0.51 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.69 (s, 1H, H_1), 7.85-7.82 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.26 (s, 1H, H_2), 7.20 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.3 Hz), 7.13 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.3 Hz), 6.87 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.6 Hz), 3.83 (t, 2H, H_8, ^3J = 7.0 Hz), 3.00 (t, 2H, H_7, ^3J = 7.5 Hz), 2.54 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.2 Hz), 1.50 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.5 Hz), 1.31-1.23 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.86 (t, 3H, H_{14}, ^3J = 7.0 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.31, 135.19, 134.81, 132.51, 132.10, 127.72, 123.47, 123.43, 122.38, 117.36, 111.59, 110.80, 60.21, 37.05, 35.93, 31.92, 31.45, 24.31, 22.46, 21.52, 14.55, 14.44, 10.61.

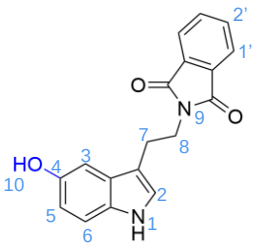
2-[2-(5-hexyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **7i** (2.95 g, 7.88 mmol, 60%). $C_{24}H_{26}N_2O_2$. MW = 374.48 g.mol^{-1}. Rf = 0.48 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.69 (s, 1H, H_1), 7.87-7.80 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.26 (s, 1H, H_2), 7.20 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.2 Hz), 7.13 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.3 Hz), 6.87 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 3.83 (t, 2H, H_8, ^3J = 7.1 Hz), 3.00 (t, 2H, H_7, ^3J = 7.1 Hz), 2.56-2.51 (m, 2H, H_{10}), 1.50 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.1 Hz), 1.26 (m, 6H, H_{12} & H_{13} & H_{14}), 0.86 (t, 3H, H_{15}, ^3J = 6.8 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.30, 135.20, 134.80, 132.52, 132.11, 127.72, 123.46, 123.43, 122.38, 117.37, 111.60, 110.81, 38.95, 35.97, 32.22, 31.64, 28.88, 24.32, 22.58, 14.44.

2-[2-(5-benzyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **7j** (2 g, 5.26 mmol, 41%). $C_{25}H_{20}N_2O_2$. MW = 380.45 g.mol^{-1}. Rf = 0.50 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.74 (s, 1H, H_1), 7.88-7.81 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.37 (s, 1H, H_2), 7.27-7.12 (m, 7H, H_3, H_6 & H_{11}, H_{12}, H_{13}), 6.88 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.3 Hz, ^{4}J = 1.6 Hz), 3.91 (s, 2H, H_{10}), 3.84 (t, 2H, H_8, ^{3}J = 7.8 Hz), 3.00 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 7.6 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.30, 142.93, 135.28, 134.82, 132.10, 131.45, 128.96, 128.71, 127.76, 126.09, 123.67, 123.45, 122.79, 118.15, 111.89, 110.97, 42.04, 38.83, 24.26, 10.66, 10.61.

2-{2-[5-(benzyloxy)-*1H*-indol-3-yl]ethyl}-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **7k** (3.52 g, 8.88 mmol, 96%). $C_{25}H_{20}N_2O_3$. MW = 396.45 g.mol^{-1}. Rf = 0.38 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.68 (s, 1H, H_1), 7.88-7.81 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.48-7.32 (m, 6H, H_2 & H_{11}, H_{12}, H_{13}), 7.14-7.12 (m, 2H, H_3 & H_6), 6.76 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 9.0 Hz, ^{4}J = 2.7 Hz), 4.99 (s, 2H, H_{10}), 3.84 (t, 2H, H_8, ^{3}J = 6.9 Hz), 2.98 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.31, 152.48, 138.13, 134.84, 132.11, 131.98, 128.81, 128.21, 128.11, 128.00, 127.88, 124.18, 123.47, 115.77, 113.93, 112.56, 112.11, 110.94, 101.95, 70.21, 38.70, 24.35.

2-[2-(5-propoxy-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione **7l** (800 mg, 2.3 mmol, 47%). $C_{21}H_{20}N_2O_3$. MW = 348.402 g.mol^{-1}. Rf = 0,3 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.63 (s, 1H, H_1), 7.87-7.81 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.19 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.7 Hz), 7.11 (d, 1H, H_2, $^3J_{H\text{-}NH}$ = 2.5 Hz), 6.98 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.3 Hz), 6.68 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.8 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz), 3.85-3.79 (m, 4H, H_7 & H_8), 2.98 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.5 Hz), 1.71 (sx, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.3 Hz), 0.98 (t, 3H, H_{12}, ^{3}J = 7.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 168.31, 152.78, 134.83, 132.10, 131.79, 127.90, 124.06, 123.46, 112.52, 112.06, 110.91, 101.24, 69.76, 38.80, 24.34, 22.73, 11.02.

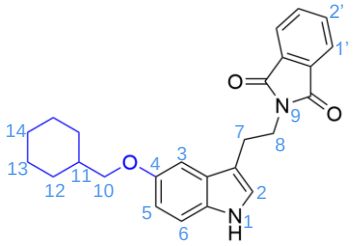
2-[2-(5-hydroxy-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione (7m)



To a stirred suspension of 2-{2-[5-(benzyloxy)-1H-indol-3-yl]ethyl}-2,3-dihydro-1H-isoindole-1,3-dione **7k** (1 eq., 2.5 g, 6.31 mmol) and 10% Pd on charcoal (0.2 eq., 1.5 g, 1.41 mmol) in ethanol (184 mL) is added formic acid (42 eq., 6.1 g, 5 mL, 132.54 mmol). The resulting mixture is stirred at 65°C for 2h. The catalyst is removed by filtration through a celite pad and the filtrate is evaporated under vacuum. The residue is taken up in water and extracted with ethyl acetate. The organic phase is washed with water and 25% $NaHCO_3$ in solution, then dried with sodium sulfate, filtered and evaporated under vacuum. Yield = 89% (1.72 g, 5.62 mmol). $C_{18}H_{14}N_2O_3$. MW = 306.32 g.mol^{-1}. Rf = 0.32 (Cyclohexane/AcOEt 6:4). LCMS : t_R = 1.76 min. $[M+H]^+$ = 307.09 Da. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.51 (s, 1H, H_1), 8.63 (s, 1H, H_{10}), 7.88-7.81 (m, 4H, $H_{1'}$ et $H_{2'}$), 7.11 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.7 Hz), 7.06 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 2.4 Hz), 6.88 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.4 Hz), 6.58 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J =

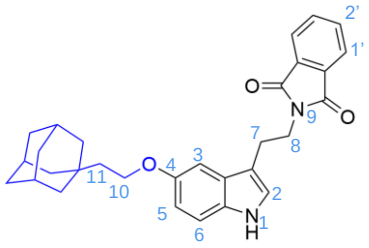
2.4 Hz), 3.80 (t, 2H, H_8, ^3J = 6.0 Hz), 2.92 (t, 2H, H_7, ^3J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : J. Jaray, *Journal of Organic Chemistry*, 2021, 86, 19, 13360 - 13370.

2-{2-[5-(cyclohexylmethoxy)-*1H*-indol-3-yl]ethyl}-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione (7n)



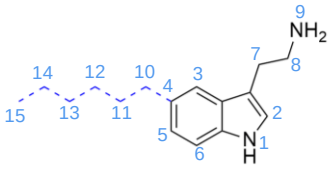
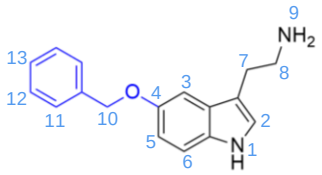
Cyclohexylmethylbromo (4.5 eq., 1.27 g, 1.0 mL, 7.25 mmol) and 2-[2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindole-1,3-dione **7m** (1 eq., 0.5 g, 1.63 mmol) were added to a solution of K_2CO_3 (5.5 eq., 1.23 g, 8.9 mmol) in acetonitrile (6 mL). The resulting mixture was heated at reflux for 6 days. The precipitate was filtered and washed with EtOAc and CH_3CN. The residue is dissolved in dichloromethane and washed with a solution of 1N NaOH and brine. The organic layer is dried over Na_2SO_4, filtered and the filtrate is vaporated under vacuum. The obtained brut product is suspended in cyclohexane, stirred for 30 min, filtered and recrystallized in MeOH. Finaly, it is puririfed on a silica pad with cyclohexane/EtOAc 6:4 as eluent to give a yellowish solid. Yield = 21% (140 mg, 0.35 mmol). $C_{25}H_{26}N_2O_3$. MW = 402.49 g.mol^{-1}. Rf = 0.62 (Cyclohexane/AcOEt 6:4). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.64 (s, 1H, H_1), 7.85-7.82 (m, 4H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 7.18 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.7 Hz), 7.12 (d, 1H, H_2, ^4J = 2.1 Hz), 6.96 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.4 Hz), 6.67 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.4 Hz), 3.82 (t, 2H, H_8, ^3J = 7.2 Hz), 3.65 (d, 2H, H_{10}, ^3J = 6.3 Hz), 2.98 (t, 2H, H_7, ^3J = 7.5 Hz), 1.84-1.65 (m, 6H, H_{cy}), 1.33-0.97 (m, 5H, H_{cy}).

2-(2-{5-[2-(adamantan-1-yl)ethoxy]-*1H*-indol-3-yl}ethyl)-2,3-dihydro-*1H*-isoindole-1,3-dione (7o)



Same procedure as for **7n** with 1-(2-bromoethyl)adamantane as starting material. The obtained crude oil is used in next step without further optimization. $C_{30}H_{32}N_2O_3$. MW = 468.6 g.mol^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.86-7.84 (m, 2H, $H_{2'}$), 7.74-7.71 (m, 4H, $H_{1'}$), 7.24 (d, 1H, H_6, ^3J = 9.0 Hz), 7.19 (d, 1H, H_2, ^4J = 2.1 Hz), 7.09 (d, 1H, H_3, ^4J = 1.8 Hz), 6.85 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.1 Hz), 4.13-4.01 (m, 4H, H_7 & H_8), 3.15 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 8.1 Hz), 2.01 (br. s, 2H, H_{11}), 1.73-1.66 (m, 15H, H_{adm}).

2-(5-alkyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine (8b-l)

2-(2-(5-alkyl-(*1H*-indol-3-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione **7b-l** (1 eq.) is solubilized in EtOH (149 eq.). The solution can be heated at reflux if needed in order to solubilize the substrate. Hydrazine hydrate (10 eq.) is added dropwise to the solution and the reaction mixture is stirred overnight at reflux. After cooling, the white phthalhydrazide precipitate is filtered on Buchner and washed with EtOH. The filtrate is evaporated under reduced pressure and the resulting residue is taken up in dichloromethane and filtered on Buchner in order to eliminate the residual phthalhydrazide. The filtrate is evaporated under reduce pressure to give 2-(5-alkyl-1H-indol-3-yl)ethan-1-amine as colored oil.

2-(5-methyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8b** (2.8 g, 15.78 mmol, 97%). $C_{11}H_{14}N_2$. MW = 174.25 g.mol^{-1}. Rf = 0.25 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.64 (s, 1H, H_1), 7.28 (s, 1H, H_2), 7.21 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.06 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 1.5 Hz), 6.87 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 2.83-2.78 (m, 2H, H_8), 2.74-2.69 (m, 2H, H_7), 2.37 (s, 3H, H_{10}). ^{13}C NMR (DMSO) : B. Grandberg, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1973, vol. 9, p. 196,199.

2-(5-ethyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8c** (2.4 g, 12.48 mmol, Qu.). $C_{12}H_{16}N_2$. MW = 188.27 g.mol^{-1}. Rf = 0.23 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 8.07 (s, 1H, H_1), 7.46 (d, 1H, H_2, $^3J_{H\text{-}NH}$ = 0.6 Hz), 7.32 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.10 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 7.05 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.4 Hz), 3.08 (t, 2H, H_8, ^{3}J = 7.8 Hz), 2.94 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 6.9 Hz), 2.80 (q, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.5 Hz), 1.78 (s, 2H, H_9), 1.34 (t, 3H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz).

2-(5-propyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8d** (3.4 g, 16.76 mmol, Qu.). $C_{13}H_{18}N_2$. MW = 202.30 g.mol^{-1}. Rf = 0.40 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.65 (s, 1H, H_1), 7.28 (s, 1H, H_2), 7.22 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.06 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.1 Hz), 6.89 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 2.83-2.78 (m, 2H, H_8), 2.74-2.69 (m, 2H, H_7), 2.60 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.5 Hz), 1.61 (sx, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz), 0.90 (t, 3H, H_{12}, ^{3}J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 135.32, 132.09, 127.88, 123.13, 122.31, 117.85, 112.38, 111.49, 42.91, 38.19, 29.52, 25.48, 14.23.

2-[5-(propan-2-yl)-*1H*-indol-3-yl]ethan-1-amine **8e** (2.01 g, 9.94 mmol, 97%). $C_{13}H_{18}N_2$. MW = 202.30 g.mol^{-1}. Rf = 0.34 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.63 (s, 1H, H_1), 7.32 (d, 1H, H_2, ^{3}J = 0.8 Hz), 7.23 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.07 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.2 Hz), 6.95 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.6 Hz), 2.94 (s, 1H, H_{10}, ^{3}J = 6.9 Hz), 2.83-2.78 (m, 2H, H_8), 2.75-2.70 (m, 2H, H_7), 1.24 (d, 6H, H_{11}, ^{3}J = 6.9 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 138.62, 135.38, 127.78, 123.13, 120.34, 115.51, 112.59, 111.56, 42.96, 34.11, 29.65, 25.21.

2-(5-butyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8f** (451 mg, 2.09 mmol, 23%). $C_{14}H_{20}N_2$. MW = 216.33 g.mol^{-1}. Rf = 0.25 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 8.07 (s, 1H, H_1), 7.44 (s, 1H, H_2), 7.31 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 7.2 Hz), 7.09 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.04

(d, 1H, H_3, ^4J = 1.2 Hz), 3.08 (t, 2H, H_8, ^3J = 6.3 Hz), 2.94 (t, 2H, H_7, ^3J = 6.6 Hz), 2.75 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.5 Hz), 1.71 - 1.64 (m, 2H, H_{11}), 1.42 (sx, 2H, H_{12}, ^3J = 7.5 Hz), 0.98 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 135.27, 132.30, 127.88, 123.11, 122.28, 117.77, 112.44, 111.50, 42.97, 35.70, 34.65, 29.62, 22.31, 14.35.

2-(5-tert-butyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8g** (928 mg, 4.29 mmol, 87%). $C_{14}H_{20}N_2$. MW = 216.33 g.mol^{-1}. Rf = 0.31 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.61 (s, 1H, H_1), 7.44 (d, 1H, H_2, $^3J_{H\text{-}NH}$ = 1.5 Hz), 7.24 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.4 Hz), 7.14 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 1.8 Hz), 7.06 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.1 Hz), 3.32 (s, 2H, H_9), 2.84-2.79 (m, 2H, H_8), 2.76-2.71 (m, 2H, H_7), 1.33 (s, 9H, H_{11}).). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 140.87, 134.92, 127.41, 123.13, 119.54, 114.16, 112.58, 111.31, 42.70, 34.68, 32.38, 29.10.

2-(5-pentyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8h** (3.66 g, 15.89 mmol, Qu.). $C_{15}H_{22}N_2$. MW = 230.35 g.mol^{-1}. Rf = 0.27 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.63 (s, 1H, H_1), 7.27 (s, 1H, H_2), 7.22 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.3 Hz), 7.06 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.1 Hz), 6.89 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.6 Hz), 2.82-2.77 (m, 2H, H_8), 2.74-2.69 (m, 2H, H_7), 2.62 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.5 Hz), 1.59 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.5 Hz), 1.35-2.26 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.86 (t, 3H, H_{14}, ^3J = 6.8 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 169.08, 135.28, 132.28, 127.90, 123.07, 122.23, 117.76, 112.51, 111.48, 43.06, 35.98, 34.81, 32.10, 31.47, 29.81, 22.49, 20.94, 14.43.

2-(5-hexyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8i** (1.73 g, 7.079 mmol, 90%). $C_{16}H_{24}N_2$. MW = 244.38 g.mol^{-1}. Rf = 0.38 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.65 (s, 1H, H_1), 7.28 (s, 1H, H_2), 7.22 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.3 Hz), 7.06 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.2 Hz), 6.89 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 2.83-2.78 (m, 2H, H_8), 2.74-2.69 (m, 2H, H_7), 2.63 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.4 Hz), 1.58 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.5 Hz), 1.28 (m, 6H, H_{12} & H_{13} & H_{14}), 0.85 (t, 3H, H_{15}, ^3J = 7.0 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 135.29, 132.26, 127.93, 123.05, 122.22, 117.78, 112.62, 111.47, 43.21, 36.03, 32.40, 31.68, 30.07, 28.89, 22.59, 14.43.

2-(5-benzyl-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8j** (1.06 g, 4.23 mmol, 81%). $C_{17}H_{18}N_2$. MW = 250.34 g.mol^{-1}. Rf = 0.29 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.69 (s, 1H, H_1), 7.37 (s, 1H, H_2), 7.27-7.24 (m, 5H, H_6 & H_{11}, H_{12}), 7.17-7.12 (m, 1H, H_{13}), 7.08 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.2 Hz), 6.91 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 3.98 (s, 2H, H_{10}), 2.82-2.77 (m, 2H, H_8), 2.73-2.68 (m, 2H, H_7). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 143.11, 135.35, 131.27, 129.00, 128.71, 127.96, 126.08, 123.31, 122.65, 118.45, 112.72, 111.73, 43.06, 42.02, 29.87.

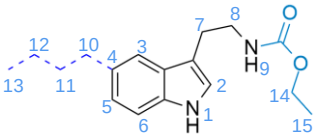
2-[5-(benzyloxy)-*1H*-indol-3-yl]ethan-1-amine **8k** (2.49 g, 9.35 mmol, Qu.). $C_{17}H_{18}N_2O$. MW = 266.34 g.mol^{-1}. Rf = 0.28 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.63 (s, 1H, H_1), 7.49-7.46 (m, 2H, H_{11}), 7.42-7.31 (m, 3H, H_{12} & H_2), 7.22 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.7 Hz), 7.10 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.4 Hz), 7.08 (d, 1H, H_{13}, ^4J = 2.7 Hz), 6.78 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.4 Hz), 5.08 (s, 2H, H_{10}), 2.81-2.76 (m, 2H, H_8), 2.72-2.69 (m, 2H, H_7). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) : P. Carato, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46, 6, 2575 - 2585.

2-(5-propoxy-*1H*-indol-3-yl)ethan-1-amine **8l** (350 mg, 1.60 mmol, 74%). $C_{13}H_{18}N_2O$. MW = 218.3 g.mol^{-1}. Rf = 0.29 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.57 (s, 1H, H_1), 7.20 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.8 Hz), 7.06 (d, 1H, H_2, ^{3}J = 2.2 Hz), 6.98 (d, 1H, H_3, ^{3}J = 2.3 Hz), 6.70 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.5 Hz), 3.91 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 6.6 Hz), 2.81-2.68 (m, 4H, H_8 & H_7), 1.75 (sx, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.2 Hz), 0.99 (t, 3H, H_{12}, ^{3}J = 7.4 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 152.65, 131.89, 128.12, 123.71, 112.34, 111.87, 101.74, 69.94, 43.09, 29.92, 25.15, 22.79, 11.03.

2-[5-(cyclohexylméthoxy)-*1H*-indol-3-yl-éthan-1-amine **8n** (160 mg, 0.59 mmol, Qu.). $C_{17}H_{24}N_2O$. MW = 272.39 g.mol^{-1}. Rf = 0.36 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.58 (s, 1H, H_1), 7.19 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.7 Hz), 7.06 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 2.1 Hz), 6.96 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.4 Hz), 6.68 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz), 3.75 (d, 2H, H_{10}, ^{3}J = 6.3 Hz), 2.80-2.75 (m, 2H, H_8), 2.71-2.66 (m, 2H, H_7), 1.86-1.68 (m, 6H, Hcy), 1.32-1.24 (m, 5H, Hcy).

2-{5-[2-(adamantan-1-yl)ethoxy]-*1H*-indol-3-yl}ethan-1-amine **8o** (130 mg, 0.38 mmol, 24% with the previous step). $C_{22}H_{30}N_2O$. MW = 338.5 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.89 (s, 1H, H_1), 7.26 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 9.0 Hz), 7.06 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 2.4 Hz), 7.04 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.1 Hz), 6.88 (dd, 1H, H_5, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz), 4.09 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.2 Hz), 3.06 (t, 2H, H_8, ^{3}J = 6.6 Hz), 2.91 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 6.3 Hz), 2.00 (br. s, 2H, H_{11}), 1.73-1.64 (m, 15H, H_{adm}).

Ethyl (2-(5-alkyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl)carbamate (25, 25f)



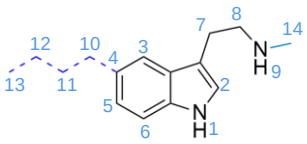
To a suspension of a tryptamine derivative **8, 8f** (1 eq.) in dichloromethane at 0°C is added slowly an aqueous solution of NaOH (1 eq.). After 5 min of stirring at 0°C, ethyl chloroformate (1 eq.) dissolved in dichloromethane is added dropwise. The resulting mixture is stirred for 5 min at 0°C and further stirred at room temperature. Completion of the reaction is monitored by TLC. The reaction mixture is acidified with 1N aqueous HCl solution and extracted twice with DCM. The organic layers are dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure providing a yellow oil.

Ethyl *N*-[2-(*1H*-indol-3-yl)ethyl]carbamate **25** (3.79 g, 16.32 mmol, 87%). $C_{13}H_{16}N_2O_2$. MW = 232.28 g.mol^{-1}. Rf = 0.81 (CH_2Cl_2/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.79 (s, 1H, H_1), 7.52 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 7.8 Hz), 7.33 (d, 1H, H_3, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.16 (t, 1H, H_9, ^{3}J = 5.7 Hz), 7.14 (d, 1H, H_2, ^{3}J = 2.4 Hz), 7.06 (td, 1H, H_5, ^{3}J = 6.9 Hz, ^{4}J = 0.9 Hz), 6.97 (td, 1H, H_4, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 3.99 (qt, 2H, H_{14}, ^{3}J = 6.9 Hz), 3.25 (qt, 2H, H_8, ^{3}J = 6.9 Hz), 2.81 (t, 2H, H_7, ^{3}J = 7.8 Hz), 1.15 (t, 3H, H_{15}, ^{3}J = 6.9 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) : Bhabatosh, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57, 22, 9658 - 9672.

Ethyl *N*-[2-(5-butyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]carbamate **25f** (1.01 g, 3.502 mmol, 85%). $C_{17}H_{24}N_2O_2$. MW = 288.39 g.mol^{-1}. Rf = 0.73 (CH_2Cl_2/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.66 (s, 1H, H_1), 7.28 (s, 1H, H_2), 7.22 (d, 1H, H_6, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.15 (t, 1H, H_9, ^{3}J = 5.4 Hz),

7.08 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.0 Hz), 6.90 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.4 Hz), 3.98 (qt, 2H, H_{14}, ^3J = 7.1 Hz), 3.22 (qt, 2H, H_8, ^3J = 6.8 Hz), 2.78 (t, 2H, H_7, ^3J = 7.9 Hz), 2.63 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.5 Hz), 1.58 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.0 Hz), 1.32 (sx, 2H, H_{12}, ^3J =7.4 Hz), 1.15 (t, 3H, H_{15}, ^3J = 7.1 Hz), 0.90 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 156.70, 135.22, 132.37, 127.84,123.11, 122.33, 117.64, 111.75, 111.51, 59.89, 41.62, 35.72, 34.64, 25.98, 22.32, 15.18, 14.34.

2-(5-alkyl-*1H*-indol-3-yl)-*N*-methylethanamine (26, 26f)

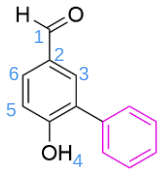


To a solution of ethyl *N*-[2-(5-alkyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl]carbamate **25, 25f** (1 eq.) in dry THF at 0°C is added portionwise $LiAlH_4$ (3 eq.). The temperature is controlled by a thermometer and must not exceed 10°C. After the addition is complete, the mixture is heated under reflux for 1h. The reaction is then cooled to 0°C and the excess of $LiAlH_4$ is hydrolysed by adding successively and very carefully ; water (5 mL), 15% aqueous solution of NaOH (5 mL) and water (3 x 5 mL). During these steps, it is necessary to add THF (25 mL) to avoid the mixture becoming very thick. The suspension is filtered and the white solid, made up of LiOH and $Al(OH)_3$, is washed with THF (10 mL). The organic layer is extracted with AcOEt and wahed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure to give a red oil. This oil is taken up in petroleum ether and the filtrate is decanted.

N-methyltryptamine **26**. $C_{11}H_{14}N_2$. MW = 174.25 g.mol^{-1}. ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.76 (s, 1H, H_1), 7.50 (d, 1H, H_6, ^3J = 7.8 Hz), 7.32 (d, 1H, H_3, ^3J = 8.0 Hz), 7.12 (d, 1H, H_2, ^4J = 2.3 Hz), 7.05 (ddd, 1H, H_4 ou H_5, ^3J = 8.1 Hz, ^3J = 7.0 Hz, ^4J = 1.1 Hz), 6.96 (ddd, 1H, H_4 ou H_5, ^3J = 7.9 Hz, ^3J = 6.8 Hz, ^4J = 1.1 Hz), 2.83-2.71 (m, 4H, H_7 & H_8), 2.31 (s, 3H, H_{14}). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 136.72, 127.54, 123.276, 121.39, 118.70, 118.69, 111.86, 111.79, 51,42, 35.13, 24.33.

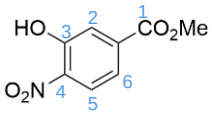
[2-(5-butyl-*1H*-indol-3-yl)ethyl](methyl)amine **26f** (280 mg, 1.22 mmol, 35%). $C_{15}H_{22}N_2$. MW = 230.36 g.mol^{-1}. Rf = 0.21 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia). ^1H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.67 (s, 1H, H_1), 7.29 (s, 1H, H_2), 7.23 (d, 1H, H_6, ^3J = 8.1 Hz), 7.08 (d, 1H, H_3, ^4J = 2.1 Hz), 6.90 (dd, 1H, H_5, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 2.80 (s, 4H, H_7 & H_8), 2.63 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.8 Hz), 2.35 (s, 3H, H_{14}), 1.58 (m, 2H, H_{11}), 1.33 (sx, 2H, H_{12}, ^3J =7.5 Hz), 0.90 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 135.26, 132.32, 127.80, 123.11, 122.30, 117.69, 112.16, 111.52, 52.33, 36.04, 35.69, 34.62, 25.20, 22.29, 14.34.

6-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyde (9d)



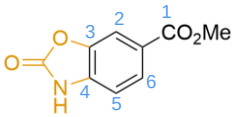
A mixture of substituted 4-hydroxy-3-iodobenzaldehyde (1 eq., 500 mg, 2.016 mmol), phenylboronic acid (1.5 eq., 368.71 mg, 3.024 mmol), dichlorobis(triphenylphosphine)palladium (0.05 eq., 70.75 mg, 0.1008 mmol) and K_2CO_3 (3 eq., 835.85 mg, 6.048 mmol) in dioxane/H_2O (9 mL/3 mL) is stirred at 100°C under nitrogen atmosphere in a sealed tube, until the starting material is consumed (typically 20h). HCl aqueous solution (10%, 6 mL) is added to acidify the solution with vigorous stirring. The mixture is then extracted with EtOAc (15 mL × 2), the organic layers are washed with 10% $Na_2S_2O_3$ solution, then with brine, and dried over Na_2SO_4. The concentrated crude product is purified by column chromatography (DCM) to afford a white solid (280 mg, 1.41 mmol, 70%). $C_{13}H_{10}O_2$. MW = 198.22 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10,80 (s, 1H, CHO), 9.87 (s, 1H, OH), 7.83 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 2.4 Hz), 7.77 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.60-7.36 (m, 5H, H_{Ph}), 7.13 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.4 Hz).

methyl 3-hydroxy-4-nitrobenzoate (12)



3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid **9** (1 eq., 2.4 g, 13.11 mmol) is dissolved in methanol (20 mL) and cooled to 0°C. $SOCl_2$ (1.57 eq., 2.5 g, 1.5 mL, 20.56 mmol) is slowly added and the reaction mixture is stirred under refluxing conditions for 17h. The crystallized residue is filtered on Buchner and washed with cyclohexane to give methyl 3-hydroxy-4-nitrobenzoate (2.37 g, 12.02 mmol, 92%) as yellow powder. $C_8H_7NO_5$. MW = 197.15 g.mol^{-1}. Rf = 0.54 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.54 (s, 1H, OH), 8.22 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 9.3 Hz), 7.87 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 1.8 Hz), 7.66 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 9.0 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz), 4.00 (s, 3H, CO_2Me). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) : Current Patent Assignee : HUNAN UNIVERSITY - CN112079744, 2020, A.

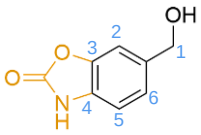
methyl 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carboxylate (13)



To a solution of methyl 3-hydroxy-4-nitrobenzoate **10** (1.07 eq., 2.4 g, 12.02 mmol) in THF (64 mL) and methanol (12 mL) is added ammonium formate (8 eq., 5.7 g, 89.78 mmol) and 10% Pd/C

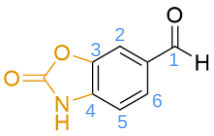
(0.53 eq., 0.6 g, 5.94 mmol) and the reaction mixture is stirred at 65°C for about 3h until starting material disappeared. The slurry is filtered on a silice pad and washed with THF (40 mL) and Et_3N (2 eq., 2.3 g, 3.1 mL, 22.45 mmol) is added to the filtrate. Ethyl chloroformate (1.1 eq., 1.3 g, 1.2 mL, 12.35 mmol) in THF (5 mL) is added dropwise to the reaction mixture and the solution is stirred overnight at room temperature. The solvent is evaporated and the residue is dissolved in DCM and washed with water. The organic layer is dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue is dissolved in DMF (7 mL) and K_2CO_3 (2 eq., 3.1 g, 22.45 mmol) is added. The reaction mixture is stirred 5h at 75°C, hydrolyzed with 1N HCl up to acid pH and water is added. The formed precipitate is filtered on Buchner, then dried in oven. Methyl 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carboxylate (1.9 g, 9.89 mmol, 82%) is obtained as brown powder. $C_9H_7NO_4$. MW = 193.16 g.mol^{-1}. Rf = 0.41 (Cyclohexane/AcOEt 5:5). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.08 (s, 1H, NH), 7.82 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz), 7.77 (d, 1H, H_2,^{4}J = 1.2 Hz), 7.20 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz), 3.84 (s, 3H, CO_2Me). ^{13}C NMR (DMSO) : Y. Sriram, *RSC Advances*, 2014, 4, 103, 59594 – 59602.

6-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (14)



$LiAlH_4$ (4 eq., 1.5 g, 39.55 mmol) in suspension in dry THF (10 mL) is cooled in an ice bath. A solution of methyl 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carboxylate **11** (1 eq., 1.9 g, 9.89 mmol) in dry THF (38 mL) is added dropwise and the reaction mixture is stirred overnight at room temperature. The reaction mixture is hydrolyzed by slowly adding of H_2O until disappearance of formed bubbles, acidified to pH 1 with conc. HCl and filtered on celite. The filtrate is taken up in brine and extracted with EtOAc. Organic layer is dried over sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure to give a solid residue, which upon recrystallization from toluene/MeOH, hot filtration and filtration on Buchner give 6-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (0.4 g, 2.54 mmol, 26%) of brown powder. $C_8H_7NO_3$. MW = 165.15 g.mol^{-1}. Rf = 0.24 (Cyclohexane/AcOEt 5:5). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.54 (s, 1H, NH), 7.21 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 1.5 Hz), 7.09 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 7.02 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz), 5.20 (t, 1H, OH, ^{3}J = 5.7 Hz), 4.48 (d, 2H, H_1, ^{3}J = 5.7 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.04, 143.81, 137.30, 129.38, 122.33, 109.64, 108.28, 63.19.

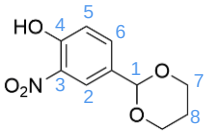
2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carbaldehyde (15a)



6-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one **12** (1 eq., 0.4 g, 2.24 mmol) is solubilized in DCM (50 mL), then DMP (1 eq., 1.0 g, 2.24 mmol) is added. The reaction mixture is stirred for 3 days at room temperature. Then, it is filtered on celite and washed with CH_2Cl_2. The filtrate is washed

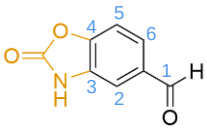
with water, dried over sodium sulfate and evaporated under vacuum. The residue is purified by flash chromatography with cyclohexane/acetone 5:5 as eluant. 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carbaldehyde (250 mg, 1.53 mmol, 68%) is obtained as white solid. $C_8H_5NO_3$. MW = 163.13 g.mol^{-1}. Rf = 0.27 (Cyclohexane/AcOEt 5:5). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.17 (s, 1H, CHO), 9.92 (s, 1H, NH), 7.78 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 7.75 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.29 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) : Current Patent Assignee : WAYNE STATE UNIVERSITY - US2014/309427, 2014, A1.

4-(1,3-dioxan-2-yl)-2-nitrophenol (17)



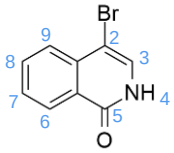
Catalytic amount of APTS and 1,3-propanediol (4.4 eq., 4.0 g, 3.8 mL, 52.57 mmol) are added to a mixture of 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde **16** (1 eq., 2.0 g, 11.97 mmol) in toluene (63 mL). The reaction mixture is refluxed for 4h with a Dean Stark apparatus. The reaction mixture is cooled, washed with distilled water, brine and extracted twice with ethyl acetate. Organic layers are gathered, dried over anhydrous sodium sulfate and then concentrated under reduced pressure. The residue is recrystallized in cyclohexane to obtain 4-(1,3-dioxan-2-yl)-2-nitrophenol (2.4 g, 10.65 mmol, 89%) as a yellow powder. $C_{10}H_{11}NO_5$. MW = 225.20 g.mol^{-1}. Rf = 0.57 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.65 (s, 1H, OH), 8.28 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 2.1), 7.75 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.19 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.7 Hz), 5.51 (s, 1H, H_1), 4.31 (m, 2H, H_7), 4.03 (m, 2H, H_7), 2.25 (m, 1H, H_8), 1.51 (m, 1H, H_8). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ (ppm) = 188.53, 155.18, 136.32, 135.37, 131.55, 122.99, 119.84, 99.61, 67.35, 25.56.

2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-5-carbaldehyde (15b)



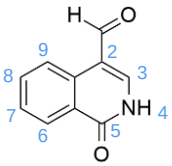
To a solution of 4-(1,3-dioxan-2-yl)-2-nitrophenol **17** (1 eq., 5.2 g, 22.96 mmol), the same procedure as for methyl 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-6-carboxylate (**15a**) is used. After hydrolysis with 1N HCl, the residue is extracted twice with AcOEt. The organic layers are dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product is precipitated in water, filtered and recrystallized from toluene/cyclohexane or from toluene/MeOH to give 2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-5-carbaldehyde (1.0 g, 6.38 mmol, 28%) as beige powder. $C_8H_5NO_3$. MW = 163.13 g.mol^{-1}. Rf = 0.43 (Cyclohexane/ AcOEt 7:3). Rf = 0.55 (DCM/acetone 85:15). ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.00 (s, 1H, CHO), 9.95 (s, 1H, NH), 7.73 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 7.53 (d, 1H, H_2, ^{4}J = 1.8 Hz), 7.51 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.1 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 192.86, 192.35, 126.85, 126.33, 110.87, 110.36, 109.93, 109.42.

4-bromo-1,2-dihydroisoquinolin-1-one (19)



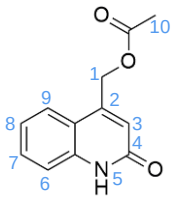
A stirred mixture of 1,2-dihydroisoquinolin-1-one **18** (1 eq., 3.44 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) at 25°C is treated with 90% pyridinium tribromide (1.024 eq., 3.53 mmol) during 2 days. The suspension is filtered and the solids are washed with CH_2Cl_2. The filtrate is diluted with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, which caused immediate precipitation of additional solids. The solids are filtered off and combined with the others to give **19** (650 mg, 2.90 mmol, 84%) as white solid. C_9H_6BrNO. MW = 224.06 g.mol^{-1}. Rf = 0.22 (Cyclohexane/AcOEt 5:5). LCMS : t_R = 1.65 min. $[M-H]^-$ = 223.0 Da. $[M+H]^+$ = 225.1 Da. JPE87 ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 8.23 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.0 Hz, ^{4}J = 0.8 Hz), 7.85 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 1.3 Hz), 7.76 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.6 Hz, ^{4}J = 0.6 Hz), 7.60 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.1 Hz), 7.57 (s, 1H, H_3). ^{13}C NMR (DMSO) : BG. Roy, *Green Chemistry*, 2021, 23, 14, 5049 – 5055.

1-oxo-1,2-dihydroisoquinoline-4-carbaldehyde (20b)



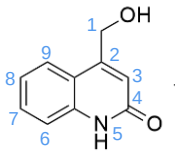
A 0°C suspension of 4-bromo-1,2-dihydroisoquinolin-1-one **19** (1 eq., 2.23 mmol) in anhydrous THF (20 mL) is charged with 1.4M MeLi in diethyl ether (1.13 eq., 2.52 mmol). The resultant solution is stirred for 10 min, cooled to -78°C, and treated with 1.6M n-BuLi in hexanes (2.042 eq., 4.56 mmol). After stirring for 30 min, the solution is treated with anhydrous DMF (2.89 eq., 6.46 mmol) and maintained at -78°C for 1h. The solution is then quenched with saturated aqueous NH_4Cl solution and slowly warmed to 25°C, diluted with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 (3 times). The combined extracts are washed with H_2O, dried on sodium sulfate and concentrated to a solid that was crystallized from CH_3CN to provide a mix of 1-oxo-1,2-dihydroisoquinoline-4-carbaldehyde (39%), 1,2-dihydroisoquinolin-1-one (38%) and 4-bromo-1,2-dihydroisoquinolin-1-one (23%), whose composition is determined by ^{1}H NMR and which it is used directly in the next step. Yield for 1-oxo-1,2-dihydroisoquinoline-4-carbaldehyde **20b** = 29% (111 mg, 0.64 mmol). $C_{10}H_7NO_2$. MW = 173.17 g.mol^{-1}. Rf = 0.64 (DCM/MeOH 95:5). LCMS : t_R = 1.45 min. $[M-H]^-$ = 172.0 Da. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) & ^{13}C NMR (DMSO) : Y. Liu, *Chemical Communications*, 2020, 56, 99, 15581 – 15584.

(2-oxo-1,2-dihydroquinolin-4-yl)methyl acetate (22)



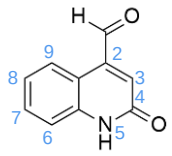
A solution of 4-(bromomethyl)-1,2-dihydroquinolin-2-one **21** (1 eq., 1.05 mmol) is heated at 80°C in DMF (4 mL) until solubilization. Sodium acetate (3 eq., 3.15 mmol) is added and the reaction mixture is heated at 80 °C for 2h. The reaction mixture is hydrolyzed and the resulting solid is filtered, washed with water and dried over oven. Yield = 79% (180 mg, 0.83 mmol). $C_{12}H_{11}NO_3$. MW = 217.22 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.79 (br. s, 1H, CHO), 7.68 (d, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.54 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.35 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.22 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 0.9 Hz), 6.50 (s, 1H, H_3), 5.36 (dd, 2H, H_1, ^{4}J = 0.9 Hz), 2.16 (s, 3H, H_{10}).

4-(hydroxymethyl)-1,2-dihydroquinolin-2-one (23)



A solution of (2-oxo-1,2-dihydroquinolin-4-yl)methyl acetate **22** (1 eq., 2.81 mmol) is heated at 80°C in MeOH (30 mL) until solubilization. NaOH (2 eq., 5.62 mmol) is added and the reaction mixture is heated at 80 °C for 2h, cooled and stirred at room temperature for 12h. The resulting precipitate is filtered and washed with methanol providing a first batch of the desired product. The filtrate is evaporated, hydrolyzed with 1N HCl aqueous solution and the precipitate is filtered and dried, providing the second batch of the desired product. Yield = 91% (450 mg, 2.57 mmol). $C_{10}H_9NO_2$. MW = 175.19 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) =11.64 (br. s, 1H, CHO), 10.19 (s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 7.8 Hz), 7.50 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.32 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 0.9 Hz), 7.17 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 6.55 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 1.3 Hz), 5.51 (t, 1H, OH, J = 5.7 Hz), 4.76 (dd, 2H, H_1, J = 5.4 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz). ^{13}C NMR (DMSO) : BG. Roy, *Green Chemistry*, 2021, 23, 14, 5049 – 5055.

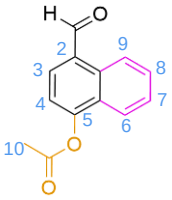
2-oxo-1,2-dihydroquinoline-4-carbaldehyde (20c)



A solution of 4-(hydroxymethyl)-1,2-dihydroquinolin-2-one **23** (1 eq., 2.57 mmol) and activated MnO_2 (1.2 eq., 3.082 mmol) is heated at 100 °C for 12h. The reaction mixture is filtered over a celite pad and the filtrate is evaporated under reduced pressure providing a light yellow solid which is used in next

step without further purification. Yield = 74% (330 mg, 1.91 mmol). $C_{10}H_7NO_2$. MW = 173.17 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.20 (br. s, 1H, CHO), 10.19 (s, 1H, NH), 8.58 (d, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.59 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 7.2 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.39 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 0.9 Hz), 7.30 (td, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.19 (d, 1H, H_3, ^{4}J = 1.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO) : LA. Shastri, *Synthetic Communications*, 2015, 45, 8, 1002 – 1008.

4-formylnaphthalen-1-yl acetate (28)



To a solution of 4-hydroxynaphthalene-1-carbaldehyde (1 eq., 1 g, 5.808 mmol) in THF (20 mL) at 0 ºC is added Et3N (2 eq., 1.18 g, 1.61 mL, 11.62 mmol) followed by acetic anhydride (2 eq., 1.19 g, 1.091 mL, 11.62 mmol). The reaction mixture is warmed to room temperature and stirred for 12h. The reaction mixture is evaporated and hydrolyzed with 1N HCl solution, followed by extraction with AcOEt (2X). The organic layer is washed with brine, dried on sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue is precipitated ix petroleum ether and filtered to give **28** as colorless powder (900 mg, 4.201 mmol, 72%). Rf = 0.96 (CH_2Cl_2/MeOH 85:15 + few drops of ammonia). $C_{13}H_{10}O_3$. MW = 214.22 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (CDCl3, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.40 (s, 1H, CHO), 9.37-9.34 (m, 1H, H_9), 8.07 (s, 1H, H_3), 8.04 (s, 1H, H_6), 7.80-7.75 (m, 1H, H_8), 7.70-7.65 (m, 1H, H_7), 7.50 (d, 1H, H_4, 3J = 7.8 Hz), 2.55 (s, 3H, H_{10}).

Procedures for tetra- and dihydro-*β*-carbolines synthesis

Four methods are used depending on the substrate :

Method 1 : 5-alkyltryptamine **8a-o** (1 eq.) and the corresponding aldehyde **9a-d** or **15a-b** (1.1 eq.) are solubilized in CH_2Cl_2 or $CHCl_3$ (220 eq.). A few drops of THF can be added to facilitate solubilization. TFA (3.5 eq.) is then added and the final mixture is stirred at room temperature for 2-5 days until precipitation. If the reaction does not progress, TFA (1 eq.) can be added again. The precipitate is filtered on Buchner and washed with DCM. The solid is suspended in HCl saturated diethyl ether solution during 30 min. The mixture is finally filtered on Buchner, washed with diethyl ether and dried on desiccator. The powder is recrystallized in acetonitrile/MeOH to give the desired tryptoline hydrochloride as colorless powder.

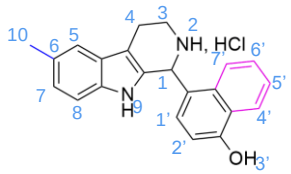
Method 2 : 5-alkyltryptamine **8a-o** (1 eq.) and the corresponding aldehyde **9a-b, 9e** (1 eq.) are added in a sealed tube under N_2, then HFIP (15.2 eq.) is added. After all is dissolved, the reaction mixture is refluxed for 22h in a silicone oil bath. The reaction mixture is cooled and isopropanol is added. The precipitate is filtered and washed with ethyl acetate. The resulting solid is suspended in HCl saturated diethyl ether solution and stirred during 30 min. The mixture is finally filtered, washed with diethyl ether

and dried on desiccator. The crude is suspended in acetonitrile, heated and hot filtered to give the desired tryptoline hydrochloride as colorless powder.

Method 3 : 5-alkyltryptamine **8a-o** or *N*-methyl-5-alkyltryptamine **26, 26f** (1 eq.) and the corresponding aldehyde **9c, 20a-c** (1 eq.) are added in a sealed tube under N_2, then anhydrous pyridine (30 eq.) is added. Finally, chlorotrimethylsilane (5 eq.) is added dropwise to the solution and the reaction mixture is heated at 60°C for 4h in a silicone oil bath. Th reaction is monitored by TLC. After cooling, the flask is opened (Caution! HCl overpressure inside) and triethylamine (5 eq) is added dropwise to the solution. Water is next added, the suspension formed is sonicated at 20°C for 1h30 and left overnight at 4°C. The precipitate formed is scratched, filtered and dried on desiccator. The crude is washed with Et_2O and purified by chromatography (isocratic eluent dichloromethane/1% ammoniac in methanol 90:10). Finally, the residue is suspended in HCl saturated diethyl ether solution, agitated and filtered to give the desired tryptoline hydrochloride as colorless powder.

Method 4 : 5-alkyltryptamine hydrochloride **8a, 8h** (1 eq.), the corresponding aldehyde **9e** (5.12 eq.) and butanol (107 eq.) are added to a 50 mL flask attached with Dean-Stark trap. Azeotropic removal of a butanol/H_2O mixture is conducted during a vigorous reflux period of few days. The reaction mixture is filtered and the powder is suspended in acetonitrile, heated and hot filtered. If necessary, the crude is purified by flash chromatography (gradient until dichloromethane/1% ammoniac in methanol 90:10). The resulting solid is suspended in HCl saturated diethyl ether solution and stirred during 30 min. The mixture is finally filtered, washed with diethyl ether and dried on desiccator to give the desired tryptoline hydrochloride as yellow powder.

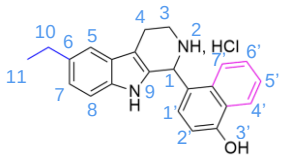
4-{6-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T10** (**JPE42**)



Method 3. **Yield** = 12% (45 mg, 0.12 mmol).
$C_{22}H_{21}ClN_2O$. **MW** = 364.87 g.mol^{-1}.
Rf = 0.43 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 209.5-210.8°C.
LCMS : t_R = 1.75 min. $[M-H]^-$ = 327.2 Da. $[M+H]^+$ = 329.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.72 (s, 1H, H_9), 10.69 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.95 (br. s, 1H, H_2), 9.17 (br. s, 1H, H_2), 8.35 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (d, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 8.4 Hz), 7.68 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.58 (t, 1H, $H_{5'}$, ^3J = 7.8 Hz), 7.33 (s, 1H, H_5), 7.14 (d, 1H, H_8, ^3J = 8.2 Hz), 7.06 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.94 (dd, 1H, H_7, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.2 Hz), 6.89 (s, 1H, $H_{2'}$), 6.66 (br. s, 1H, H_1), 3.53-3.42 (m, 2H, H_3), 3.17-3.01 (m, 2H, H_4), 2.40 (s, 3H, H_{10}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.54 ($C_{3'}$), 135.32 (C_{8a}), 132.99 (C_6), 130.48 ($C_{4''}$), 129.62 ($C_{1'}$), 127.98 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.70 ($C_{6'}$), 126.42 ($C_{7''}$), 125.48 ($C_{5'}$), 125.34 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.86 ($C_{7'}$), 123.49 ($C_{4'}$), 123.32 (C_7), 120.80 ($C_{1''}$), 118.19 (C_5), 111.66 (C_8), 107.87 ($C_{2'}$ & C_{5a}), 65.38 (C_1), 21.67 (C_{10}), 21.53 (C_3), 18.67 (C_4).

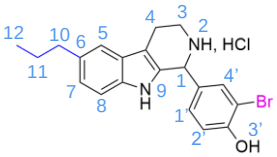
4-{6-ethyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T11** (**JPE25**)



Method 1. **Yield** = 9% (66 mg, 0.17 mmol).
$C_{23}H_{23}ClN_2O$. **MW** = 378.9 g.mol^{-1}.
Rf = 0.47 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 211-216 °C.
LCMS : t_R = 2.43 min. $[M-H]^-$ = 341.2 Da. $[M+H]^+$ = 343.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.71 (s, 2H, H_9 & $H_{3'}$), 10.12 (br. s, 1H, H_2), 9.23 (br. s, 1H, H_2), 8.38 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.68 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.58 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 7.7 Hz), 7.35 (s, 1H, H_5), 7.16 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.08 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.97 (d, 1H, H_7, ^{3}J = 8.3 Hz), 6.92 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.9 Hz), 6.65 (br. s, 1H, H_1), 3.49-3.43 (m, 2H, H_3), 3.19-3.02 (m, 2H, H_4), 2.70 (q, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.4 Hz), 1.24 (t, 3H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.52 ($C_{3'}$), 135.48 (C_{8a}), 134.80 (C_6), 132.97 ($C_{4''}$), 130.60 ($C_{1'}$), 129.66 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.66 ($C_{6'}$), 126.36 ($C_{7''}$), 125.43 ($C_{5'}$), 125.33 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.50 ($C_{7'}$), 123.30 ($C_{4'}$), 122.79 (C_7), 120.83 ($C_{1''}$), 118.55 (C_5), 116.95 (C_8), 111.72 ($C_{2'}$), 107.87 (C_{5a}), 51.25 (C_1), 28.93 (C_{10}), 18.68 (C_3), 17.13 (C_4), 1.62 (C_{11}).

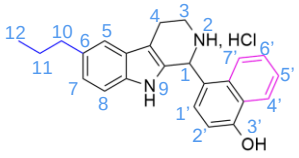
2-bromo-4-{6-propyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T12** (**JPE45**)



Method 2. **Yield** = 28% (98 mg, 0.23 mmol).
$C_{20}H_{22}BrClN_2O$. **MW** = 421.76 g.mol^{-1}.
Rf = 0.30 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 249.2-252.4 °C.
LCMS : t_R = 1.88 min. $[M-H]^-$ = 383.2 Da. $[M+H]^+$ = 385.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.75 (s, 2H, H_9 & $H_{3'}$), 9.93 (br. s, 1H, H_2), 9.24 (br. s, 1H, H_2), 7.54 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.30 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.19 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.18-7.15 (m, 1H, H_7), 7.04 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 6.96 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 5.83 (s, 1H, H_1), 3.46-3.32 (m, 2H, H_3), 3.13-2.97 (m, 2H, H_4), 2.63 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.2 Hz), 1.62 (sx, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz), 0.90 (t, 3H, H_{12}, ^{3}J = 7.2 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.88 ($C_{3'}$), 135.51 (C_{8a}), 134.74 (C_6), 133.13 ($C_{4''}$), 130.93 ($C_{1'}$), 129.05 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.00 ($C_{4'}$), 126.29 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.37 (C_7), 117.72 ($C_{1''}$), 116.77 (C_5), 111.68 (C_8), 109.75 ($C_{2'}$), 107.48 (C_{5a}), 55.14 (C_1), 40.80 (C_{10}), 38.06 (C_{11}), 25.40 (C_3), 18.55 (C_4), 14.21 (C_{12}).

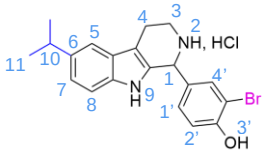
4-{6-propyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T13** (**JPE44**)



Method 1. **Yield** = 31% (180 mg, 0.46 mmol).
$C_{24}H_{25}ClN_2O$. **MW** = 392.93 g.mol^{-1}.
Rf = 0.54 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 209.2-211.9°C.
LCMS : t_R = 2.62 min. $[M-H]^-$ = 355.3 Da. $[M+H]^+$ = 357.1 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.72 (s, 1H, H_9), 10.69 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.03 (br. s, 1H, H_2), 9.19 (br. s, 1H, H_2), 8.37 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (d, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 8.3 Hz), 7.68 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.58 (t, 1H, $H_{5'}$, ^3J = 7.4 Hz), 7.33 (s, 1H, H_5), 7.16 (d, 1H, H_8, ^3J = 8.2 Hz), 7.07 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.95 (d, 1H, H_7, ^3J = 9.8 Hz), 6.91 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 7.9 Hz), 6.65 (br. s, 1H, H_1), 3.50-3.39 (m, 2H, H_3), 3.18-3.02 (m, 2H, H_4), 2.64 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.2 Hz), 1.64 (sx, 2H, H_{11}, ^3J = 7.3 Hz), 0.92 (t, 3H, H_{12}, ^3J = 7.3 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.52 ($C_{3'}$), 135.50 (C_{8a}), 133.08 (C_6), 132.98 ($C_{4''}$), 130.46 ($C_{1'}$), 129.61 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.69 ($C_{6'}$), 126.32 ($C_{7''}$), 125.46 ($C_{5'}$), 125.32 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.49 ($C_{7'}$), 123.37 ($C_{4'}$), 123.28 (C_7), 120.91 ($C_{1''}$), 117.64 (C_5), 111.62 (C_8), 107.86 ($C_{2'}$ & C_{5a}), 51.38 (C_1), 38.07 (C_{10}), 25.42 (C_{11}), 18.68 (C_3), 14.22 (C_4), 1.62 (C_{12}).

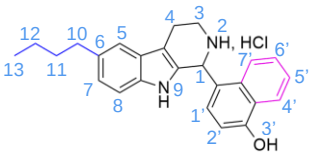
2-bromo-4-[6-(propan-2-yl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]phenol hydrochloride **T14** (**JPE73**)



Method 2. **Yield** = 10% (40 mg, 0.095 mmol).
$C_{20}H_{22}BrClN_2O$. **MW** = 421.76 g.mol^{-1}.
Rf = 0.34 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 273.6-315.4°C.
LCMS : t_R = 1.90 min. $[M-H]^-$ = 383.0 Da. $[M+H]^+$ = 385.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.79 (s, 1H, H_9), 10.73 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.15 (br. s, 1H, H_2), 9.36 (br. s, 1H, H_2), 7.53 (d, 1H, H_5, ^4J = 1.8 Hz), 7.34 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.20 (d, 1H, H_8, ^3J = .8.1 Hz), 7.17 (dd, 1H, H_7, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.8 Hz), 7.05 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.7 Hz), 7.02 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 1.2 Hz), 5.83 (br. s, 1H, H_1), 3.46-3.32 (m, 2H, H_3), 3.14-3.07 (m, 1H, H_{10}), 3.01-2.92 (m, 2H, H_4), 1.26 (s, 3H, H_{11}), 1.24 (s, 3H, H_{11}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.88 ($C_{3'}$), 139.69 (C_{8a}), 135.56 (C_6), 134.75 ($C_{4''}$), 130.94 ($C_{1'}$), 128.96 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.01 ($C_{4'}$), 126.18 (C_{4a} ou C_{9a}), 121.52 (C_7), 116.76 ($C_{1''}$), 115.44 (C_5), 111.77 (C_8), 109.77 ($C_{2'}$), 107.66 (C_{5a}), 55.08 (C_1), 34.08 (C_{10}), 25.15 (C_{11}), 25.10 (C_3), 18.56 (C_4).

4-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T17** (**JPE29**)

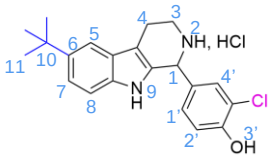


Method 1. **Yield** = 11% (74 mg, 0.18 mmol).
$C_{25}H_{27}ClN_2O$. **MW** = 406.95 g.mol^{-1}.
Rf = 0.44 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 222.5-227.5 °C.
LCMS : t_R = 2.71 min. $[M-H]^-$ = 369.2 Da. $[M+H]^+$ = 371.1 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.73 (s, 1H, H_9), 10.66 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.80 (br. s, 1H, H_2), 9.11 (br. s, 1H, H_2), 8.35 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.30 (d, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 8.4 Hz), 7.69 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.59 (t, 1H, $H_{5'}$, ^3J = 8.2 Hz), 7.34 (s, 1H, H_5), 7.16 (d, 1H, H_8, ^3J = 8.3 Hz), 7.05 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.95 (d, 1H, H_7, ^3J = 9.8 Hz), 6.90 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 7.9 Hz), 6.67 (br. s, 1H, H_1), 3.46 (m, 2H, H_3), 3.13-3.07 (m, 2H, H_4), 2.67 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.5 Hz), 1.61 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.2 Hz), 1.35 (sx, 2H, H_{12}, ^3J = 7.2 Hz), 0.92 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.2 Hz).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.5 ($C_{3'}$), 135.47 (C_{8a}), 133.26 (C_6), 132.98 ($C_{4''}$), 130.45 ($C_{1'}$), 129.63 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.67 ($C_{6'}$), 126.34 ($C_{7''}$), 125.45 ($C_{5'}$), 125.33 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.49 ($C_{7'}$), 123.29 ($C_{4'}$), 123.23 (C_7), 120.84 ($C_{1''}$), 117.56 (C_5), 111.64 (C_8), 107.86 ($C_{2'}$), 107.73 (C_{5a}), 51.52 (C_1), 35.59 (C_{10}), 34.57 (C_{11}), 22.29 (C_{12}), 18.68 (C_3 & C_4), 14.35 (C_{13}).

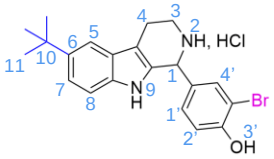
4-{6-tert-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-2-chlorophenol hydrochloride **T18** (**JPE35**)



Method 1. **Yield** = 20% (111 mg, 0.28 mmol).
$C_{21}H_{24}Cl_2N_2O$. **MW** = 391.34 g.mol^{-1}.
Rf = 0.29 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 256-258°C.
LCMS : t_R = 2.62 min. $[M-H]^-$ = 353.2 Da. $[M+H]^+$ = 355.1 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.72 (s, 1H, H_9), 10.71 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.20 (br. s, 1H, H_2), 9.40 (br. s, 1H, H_2), 7.46 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.37 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 2.0 Hz), 7.21 (s, 1H, H_8), 7.21 (s, 1H, H_7), 7.15 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.5 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.07 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 5.82 (br. s, 1H, H_1), 2.50 (br. s, 2H, H_3), 3.17-2.96 (m, 2H, H_4), 1.34 (s, 9H, H_{11}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.84 ($C_{3'}$), 141.92 (C_{8a}), 135.11 (C_6), 131.80 ($C_{4''}$), 130.27 ($C_{1'}$), 128.81 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.61 ($C_{4'}$), 125.85 (C_{4a} ou C_{9a}), 120.60 (C_7), 120.18 ($C_{1''}$), 117.08 (C_5), 114.25 (C_8), 111.48 ($C_{2'}$), 107.91 (C_{5a}), 55.16 (C_1), 34.74 (C_{10}), 32.28 (C_{11}), 18.55 (C_3), 1.61 (C_4).

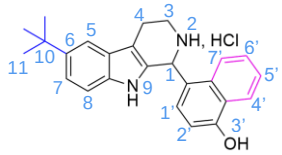
2-bromo-4-{6-tert-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T19** (**JPE34**)



Method 1. **Yield** = 16% (96 mg, 0.22 mmol).
$C_{21}H_{24}BrClN_2O$. **MW** = 435.79 g.mol^{-1}.
Rf = 0.31 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 261-264 °C.
LCMS : t_R = 2.65 min. $[M-H]^-$ = 399.1 Da. $[M+H]^+$ = 401.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.77 (s, 1H, H_9), 10.71 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.13 (br. s, 1H, H_2), 9.33 (br. s, 1H, H_2), 7.53 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 2.0 Hz), 7.46 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.21 (br. s, 2H, H_7 et H_8), 7.17 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.5 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.05 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 5.83 (br. s, 1H, H_1), 2.43 (br. s, 2H, H_3), 3.17-2.96 (m, 2H, H_4), 1.34 (s, 9H, H_{11}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.87 ($C_{3'}$), 141.93 (C_{8a}), 135.13 (C_6), 134.74 ($C_{4''}$), 130.93 ($C_{1'}$), 128.83 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.04 ($C_{4'}$), 125.86 (C_{4a} ou C_{9a}), 120.60 (C_7), 116.76 ($C_{1''}$), 114.25 (C_5), 111.49 (C_8), 109.80 ($C_{2'}$), 107.91 (C_{5a}), 55.07 (C_1), 34.75 (C_{10}), 32.29 (C_{11}), 18.57 (C_3), 1.62 (C_4).

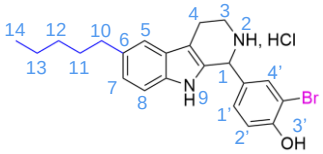
4-{6-tert-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T20** (**JPE41**)



Method 1. **Yield** = 8% (30 mg, 0.074 mmol).
$C_{25}H_{27}ClN_2O$. **MW** = 406.95 g.mol^{-1}.
Rf = 0.54 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 206.3-209.3°C.
LCMS : t_R = 2.60 min. $[M-H]^-$ = 369.3 Da. $[M+H]^+$ = 371.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.57 (s, 1H, H_9), 10.52 (s, 1H, $H_{3'}$), 8.32 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.26 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.6 Hz), 7.62 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.54 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 7.7 Hz), 7.47 (s, 1H, H_5), 7.16 (br. s, 2H, H_7 et H_8), 7.00 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.86 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.9 Hz), 6.38 (br. s, 1H, H_1), 3.34 (br. s, 2H, H_3), 3.03-3.00 (m, 2H, H_4), 1.35 (s, 9H, H_{11}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.91 ($C_{3'}$), 141.54 (C_{8a}), 134.94 (C_6), 133.01 ($C_{4''}$), 131.41 ($C_{1'}$), 129.85 (C_{4a} ou C_{9a}),127.30 ($C_{6'}$), 126.25 ($C_{7''}$), 125.41 ($C_{5'}$), 125.20 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.93 ($C_{4'}$ & $C_{7'}$), 123.16 (C_7), 120.01 ($C_{1''}$), 113.98 (C_5), 111.28 (C_8), 108.37 ($C_{2'}$), 107.68 (C_{5a}), 41.12 (C_1), 34.74 (C_{10}), 32.35 (C_{11}), 19.87 (C_3 & C_4).

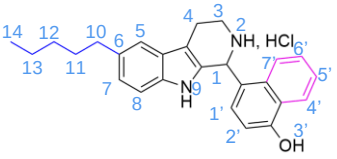
2-bromo-4-{6-pentyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T21** (**JPE65**)



Method 2. **Yield** = 26% (75 mg, 0.17 mmol).
$C_{22}H_{26}BrClN_2O$. **MW** = 449.82 g.mol^{-1}.
Rf = 0.43 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 246.0-246.8 °C.
LCMS : t_R = 2.18 min. $[M+H]^+$ = 413.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.77 (s, 1H, H_9), 10.74 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.07 (br. s, 1H, H_2), 9.32 (br. s, 1H, H_2), 7.54 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 1.8 Hz), 7.29 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.20-7.16 (m, 2H, H_7 & H_8), 7.05 (d, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 6.96 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.1 Hz), 5.83 (s, 1H, H_1), 3.46-3.32 (m, 2H, H_3), 3.34-2.93 (m, 2H, H_4), 2.64 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.2 Hz), 1.61 (t, 2H, H_{11}, ^{3}J = 6.9 Hz), 1.31-1.30 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.87 (t, 3H, H_{14}, ^{3}J = 6.6 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.89 ($C_{3'}$), 135.48 (C_{8a}), 134.75 (C_6), 133.38 ($C_{4''}$), 130.94 ($C_{1'}$), 128.98 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.96 ($C_{4'}$), 126.28 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.35 (C_7), 117.64 ($C_{1''}$), 116.76 (C_5), 111.70 (C_8), 109.76 ($C_{2'}$), 107.47 (C_{5a}), 55.13 (C_1), 35.88 (C_{10}), 32.04 (C_{11}), 31.44 (C_{12}), 25.50 (C_{13}), 18.54 (C_3 & C_4), 14.45 (C_{14}).

4-{6-pentyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T22** (**JPE66**)

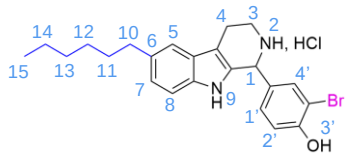


Method 3. **Yield** = 12% (40 mg, 0.095 mmol).
$C_{26}H_{29}ClN_2O$. **MW** = 420.98 g.mol^{-1}.
Rf = 0.48 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 192.3-194.2°C.
LCMS : t_R = 2.16 min. $[M-H]^-$ = 383.3 Da. $[M+H]^+$ = 385.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.73 (s, 1H, H_9), 10.68 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.90 (br. s, 1H, H_2), 9.16 (br. s, 1H, H_2), 8.37 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (d, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 8.5 Hz), 7.69 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.59 (t, 1H, $H_{5'}$, ^3J = 7.9 Hz), 7.33 (s, 1H, H_5), 7.15 (d, 1H, H_8, ^3J = 8.3 Hz), 7.07 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.95 (dd, 1H, H_7, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.4 Hz), 6.90 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 7.9 Hz), 6.66 (br. s, 1H, H_1), 3.62-3.57 (m, 2H, H_3), 3.19-3.02 (m, 2H, H_4), 2.66 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.4 Hz), 1.62 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.2 Hz), 1.35-1.28 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.88 (t, 3H, H_{14}, ^3J = 6.7 Hz).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.53 ($C_{3'}$), 135.49 (C_{8a}), 133.30 (C_6), 132.99 ($C_{4''}$), 130.50 ($C_{1'}$), 129.65 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.67 ($C_{6'}$), 126.35 ($C_{7''}$), 125.44 ($C_{5'}$), 125.34 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.50 ($C_{7'}$), 123.30 ($C_{4'}$), 123.22 (C_7), 120.85 ($C_{1''}$), 117.55 (C_5), 111.64 (C_8), 107.87 ($C_{2'}$ & C_{5a}), 65.39 (C_1), 35.90 (C_{10}), 32.06 (C_{11}), 31.47 (C_{12}), 22.51 (C_3), 18.68 (C_4), 15.64 (C_{13}), 14.46 (C_{14}).

2-bromo-4-{6-hexyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T23** (**JPE79**)

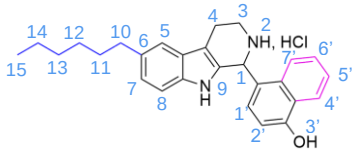


Method 2. **Yield** = 61% (230 mg, 0.5 mmol).
$C_{23}H_{28}BrClN_2O$. **MW** = 463.84 g.mol^{-1}.
Rf = 0.38 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 259.7-263.8°C.
LCMS : t_R = 2.27 min. $[M-H]^-$ = 425.3 Da. $[M+H]^+$ = 427.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.80 (s, 1H, H_9), 10.73 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.21 (br. s, 1H, H_2), 9.40 (br. s, 1H, H_2), 7.54 (s, 1H, H_5), 7.29 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.20-7.16 (m, 2H, H_7 & H_8), 7.07 (d, 1H, $H_{1'}$, ^3J = 8.4 Hz), 6.95 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.4 Hz), 5.82 (s, 1H, H_1), 3.46-3.32 (m, 2H, H_3), 3.34-2.93 (m, 2H, H_4), 2.64 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.2 Hz), 1.60 (t, 2H, H_{11}, ^3J = 7.2 Hz), 1.29 (br. s, 6H, H_{12} & H_{13} & H_{14}), 0.86 (t, 3H, H_{15}).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.88 ($C_{3'}$), 135.47 (C_{8a}), 134.76 (C_6), 133.39 ($C_{4''}$), 130.93 ($C_{1'}$), 128.95 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.97 ($C_{4'}$), 126.28 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.36 (C_7), 117.64 ($C_{1''}$), 116.76 (C_5), 111.70 (C_8), 109.77 ($C_{2'}$), 107.47 (C_{5a}), 55.13 (C_1), 35.92 (C_{10}), 32.34 (C_{11}), 31.67 (C_{12}), 28.89 (C_{13}), 22.58 (C_{14}), 18.55 (C_3 & C_4), 14.47 (C_{15}).

4-{6-hexyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T24** (**JPE89**)



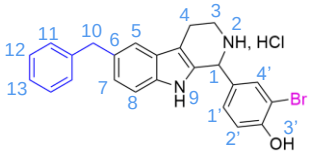
Method 3. **Yield** = 14% (50 mg, 0.11 mmol).
$C_{27}H_{31}ClN_2O$. **MW** = 435.01 g.mol^{-1}.
Rf = 0.30 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 197.9-201.9°C.
LCMS : t_R = 2.26 min. $[M-H]^-$ = 397.4 Da. $[M+H]^+$ = 399.4 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.72 (s, 1H, H_9), 10.69 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.98 (br. s, 1H, H_2), 9.18 (br. s, 1H, H_2), 8.35 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (dd, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.2 Hz), 7.69 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.58 (t, 1H, $H_{5'}$, ^3J = 7.8 Hz), 7.33 (s, 1H, H_5), 7.15 (d, 1H, H_8, ^3J = 8.4 Hz), 7.07 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.95 (dd, 1H, H_7, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 6.91 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.1 Hz), 6.65 (br. s, 1H, H_1), 3.49-3.44 (m,

2H, H_3), 3.18-3.02 (m, 2H, H_4), 2.66 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.2 Hz), 1.62 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 6.0 Hz), 1.30 (m, 6H, H_{12} & H_{13} & H_{14}), 0.87 (t, 3H, H_{15}, ^3J = 6.6 Hz).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.52 ($C_{3'}$), 135.47 (C_{8a}), 133.29 (C_6), 132.98 ($C_{4''}$), 130.48 ($C_{1'}$), 129.66 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.66 ($C_{6'}$), 126.34 ($C_{7''}$), 125.44 ($C_{5'}$), 125.32 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.51 ($C_{7'}$), 123.30 ($C_{4'}$), 123.21 (C_7), 120.87 ($C_{1''}$), 117.55 (C_5), 111.63 (C_8), 107.86 ($C_{2'}$ & C_{5a}), 65.39 (C_1), 35.94 (C_{10}), 32.36 (C_{11}), 31.68 (C_{12}), 28.91 (C_{13}), 22.59 (C_{14}), 18.68 (C_3), 15.64 (C_4), 14.47 (C_{15}).

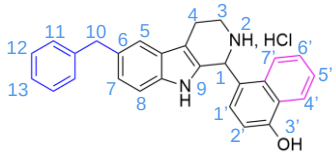
4-{6-benzyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-2-bromophenol hydrochloride **T25** (**JPE80**)



Method 2. **Yield** = 57% (160 mg, 0.34 mmol).
$C_{24}H_{22}BrClN_2O$. **MW** = 469.81 g.mol^{-1}.
Rf = 0.52 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 273.7-275.4°C.
LCMS : t_R = 1.98 min. $[M-H]^-$ = 431.2 Da. $[M+H]^+$ = 433.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.79 (s, 1H, H_9), 10.76 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.05 (br. s, 1H, H_2), 9.31 (br. s, 1H, H_2), 7.54 (d, 1H, H_5, ^4J = 2.1 Hz), 7.37 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.27-7.14 (m, 7H, H_7, H_8 & H_{11}, H_{12}, H_{13}), 7.04 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.4 Hz), 6.99 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.5 Hz), 5.83 (s, 1H, H_1), 4.00 (s, 2H, H_{10}), 3.39-3.37 (m, 2H, H_3), 3.10-2.92 (m, 2H, H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.89, 142.89, 135.57, 134.76, 132.36, 130.93, 129.24, 129.04, 128.76, 126.92, 126.34, 126.17, 123.78, 118.31, 116.76, 111.95, 109.76, 107.63, 55.09, 41.87, 18.54.

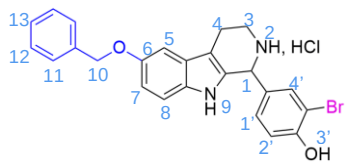
4-{6-benzyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T26** (**JPE90**)



Method 1. **Yield** = 46% (320 mg, 0.73 mmol).
$C_{28}H_{25}ClN_2O$. **MW** = 440.97 g.mol^{-1}.
Rf = 0.41 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 231.8-233.7°C.
LCMS : t_R = 1.97 min. $[M-H]^-$ = 403.2 Da. $[M+H]^+$ = 405.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.77 (s, 1H, H_9), 10.71 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.12 (br. s, 1H, H_2), 9.23 (br. s, 1H, H_2), 8.35 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (d, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 8.4 Hz), 7.68 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.58 (t, 1H,$H_{5'}$, ^3J = 7.8 Hz), 7.41 (s, 1H, H_5), 7.31-7.25 (m, 4H, H_{11} & H_{12},), 7.20-7.17 (m, 1H, H_8,), 7.17 (d, 1H, $H_{1'}$, ^3J = 8.1 Hz), 7.06 (br. s, 1H, H_{13}), 6.98 (dd, 1H, H_7, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 1.2 Hz), 6.91 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 7.8 Hz), 6.65 (s, 1H, H_1), 4.02 (s, 2H, H_{10}), 3.42 (m, 2H, H_3), 3.17-3.01 (m, 2H, H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.53, 142.95, 135.58, 132.98, 132.31, 130.54, 129.91, 129.05, 128.78, 127.68, 126.40, 126.18, 125.45, 125.33, 123.65, 123.50, 123.30, 120.82, 118.21, 111.89, 107.87, 65.38, 41.91, 18.68, 15.64

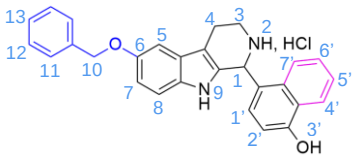
4-[6-(benzyloxy)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-2-bromophenol hydrochloride **T27** (**JPE55**)



Method 2. **Yield** = 25% (90 mg, 0.19 mmol).
$C_{24}H_{22}BrClN_2O_2$. **MW** = 485.81 g.mol^{-1}.
Rf = 0.39 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 196.6-198.1°C.
LCMS : t_R = 1.92 min. $[M-H]^-$ = 447.2 Da. $[M+H]^+$ = 449.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.78 (s, 1H, H_9), 10.72 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.07 (br. s, 1H, H_2), 9.34 (br. s, 1H, H_2), 7.54 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.49-7.32 (m, 5H, H_{11} & H_{12} & H_{13}), 7.21-7.17 (m, 2H, $H_{2'}$ & H_7), 7.13 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{4}J = 2.4 Hz), 7.05 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.4 Hz), 6.84 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz), 5.82 (s, 1H, H_1), 5.12 (s, 2H, H_{10}), 3.38 (br. s, 1H, H_3), 3.10-2.89 (m, 3H, H_3 & H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.89, 152.94, 148.59, 138.19, 134.77, 132.17, 130.92, 129.66, 128.84, 128.10, 128.05, 126.93, 126.47, 125.02, 116.78, 113.02, 112.70, 109.77, 107.65, 102.29, 70.30, 55.18, 18.61, 15.64.

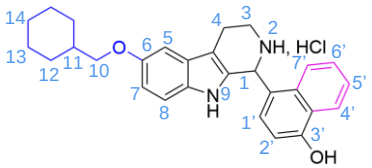
4-[6-(benzyloxy)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]naphthalen-1-ol hydrochloride **T28** (**JPE54**)



Method 1. **Yield** = 5% (38 mg, 0.083 mmol).
$C_{28}H_{25}ClN_2O_2$. **MW** = 456.97 g.mol^{-1}.
Rf = 0.40 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 205.1-215.2°C.
LCMS : t_R = 1.88 min. $[M-H]^-$ = 419.3 Da. $[M+H]^+$ = 421.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.70 (s, 2H, H_9 & $H_{3'}$), 10.01 (br. s, 1H, H_2), 9.20 (br. s, 1H, H_2), 8.35 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.29 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.68 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.58 (t, 1H,$H_{5'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.48-7.33 (m, 5H, H_{11} & H_{12} & H_{13}), 7.17-1.07 (m, 3H, H_5 & H_8 & $H_{1'}$), 6.91 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 6.84 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 6.65 (br. s, 1H, H_1), 5.13 (s, 2H, H_{10}), 3.47 (br. s, 2H, H_3), 3.16-3.00 (m, 2H, H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.53, 152.89, 138.22, 132.98, 132.17, 130.40, 128.85, 128.11, 128.06, 127.66, 126.53, 125.44, 125.32, 123.50, 123.30, 120.82, 112.83, 112.62, 107.89, 102.24, 70.30, 51.32, 18.74.

4-[6-(cyclohexylmethoxy)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]naphthalen-1-ol hydrochloride **T29** (**ZWE30**)

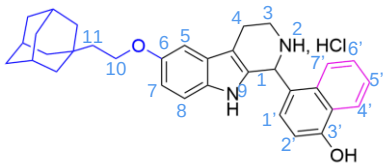


Method 3. **Yield** = 33% (70 mg, 0.15 mmol).
$C_{28}H_{31}ClN_2O_2$. **MW** = 463.02 g.mol^{-1}.
Rf = 0.44 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 209.1-212.1°C.
LCMS : t_R = 2.20 min. $[M-H]^-$ = 425.3 Da. $[M+H]^+$ = 427.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 10.74 (s, 1H, H_9), 10.66 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.24 (br. s, 1H, H_2), 9.13 (br. s, 1H, H_2), 8.32 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 4.5 Hz), 8.24 (d, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 4.7 Hz), 7.65 (t, 1H, $H_{6'}$, ^{3}J = 4.4 Hz), 7.57 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 4.6 Hz), 7.15-7.13 (m, 2H, H_8 & $H_{1'}$), 7.05 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 1.3 Hz), 6.94 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 4.8 Hz), 6.76 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 5.2 Hz, ^{4}J = 1.4 Hz), 6.57 (br. s, 1H, H_1), 3.81 (d, 2H, H_{10}, ^{3}J = 3.8 Hz), 3.50-3.48 (m, 2H, H_3), 3.17-3.01 (m, 2H, H_4), 1.88-1.85 (m, 2H, H_{12}), 1.75-1.73 (m, 2H, H_{14}), 1.69-1.67 (m, 1H, H_{11}), 1.24 (sxd, 4H, H_{13}, ^{3}J = 7.6 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz), 1.08 (qtd, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.3 Hz, ^{4}J = 1.4 Hz).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.64, 153.71, 133.05, 132.36, 130.55, 130.28, 127.58, 126.75, 125.60, 125.30, 123.39, 123.35, 120.91, 112.86, 112.54, 108.10, 107.94, 102.37, 74.46, 52.25, 40.77, 40.62, 40.46, 37.92, 29.95, 26.61, 25.80, 18.75.

4-{6-[2-(adamantan-1-yl)ethoxy]-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T30** (**JPE112**)

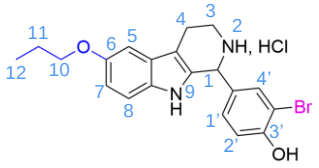


Method 3. **Yield** = 19% (30 mg, 0.06 mmol).
$C_{33}H_{37}ClN_2O_2$. **MW** = 529.12 g.mol^{-1}.
Rf = 0.45 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 205.7-208.2°C.
LCMS : t_R = 2.59 min. [M-H]$^-$ = 491.0 Da. [M+H]$^+$ = 493.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.56 (s, 1H, H_9 & $H_{3'}$), 8.33 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.27 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.64 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.55 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 7.11 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.7 Hz), 7.04 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 1.6 Hz), 7.01 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.87 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 6.70 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.8 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz), 6.45 (br. s, 1H, H_1), 4.03 (t, 2H, H_3, ^{3}J = 7.2 Hz), 3.17 (d, 1H, Had, ^{4}J = 2.4 Hz), 3.01 (t, 2H, H_4, ^{3}J = 6.0 Hz), 1.95 (br. s, 3H, Had), 1.72-1.53 (m, 15H, H_{10} & H_{11} & Had).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.19, 153.12, 133.01, 131.87, 127.51, 126.76, 125.39, 123.75, 123.25, 112.48, 107.77, 101.51, 64.33, 43.38, 42.59, 37.05, 31.94, 28.52.

2-bromo-4-{6-propoxy-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T31** (**PUB11**)

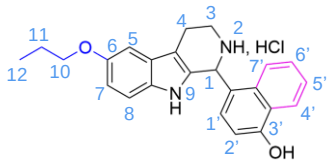


Method 2. **Yield** = 50% (150 mg, 0.34 mmol).
$C_{20}H_{22}BrClN_2O_2$. **MW** = 437.76 g.mol^{-1}.
Rf = 0.52 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 212.3-219.2°C.
LCMS : t_R = 1.81 min. [M-H]$^-$ = 399.2 Da. [M+H]$^+$ = 401.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.78 (s, 1H, H_9), 10.68 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.13 (br. s, 1H, H_2), 9.36 (br. s, 1H, H_2), 7.53 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.20-7.19 (m, 1H, $H_{2'}$), 7.17-7.16 (m, 1H, H_7), 7.06 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.01 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 2.1 Hz), 6.75 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 5.81 (s, 1H, H_1), 3.93 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 6.6 Hz), 3.44-3.35 (m, 2H, H_3), 3.12-2.89 (m, 2H, H_4), 1.74 (sx, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.2 Hz), 1.00 (t, 3H, H_{12}, ^{3}J = 7.5 Hz).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 155.9, 153.3, 134.8, 132.0, 130.9, 129.4, 127.0, 126.5, 116.8, 112.9, 112.6, 109.8, 107.6, 101.7, 79.7, 70.0, 55.2, 22.7, 18.6, 11.0.

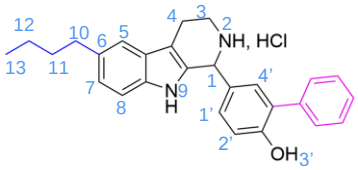
4-{6-propoxy-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T32** (**PUB12**)



Method 3. **Yield** = 4% (11 mg, 0.03 mmol).
$C_{24}H_{25}ClN_2O_2$. **MW** = 408.93 g.mol^{-1}.
Rf = 0.52 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
LCMS : t_R = 1.83 min. [M-H]$^-$ = 373.3 Da. [M+H]$^+$ = 371.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.67 (s, 2H, H_9 & $H_{3'}$), 9.87 (br. s, 1H, H_2), 9.15 (br. s, 1H, H_2), 8.38 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.30 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.69 (br. s, 1H, $H_{6'}$), 7.59 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.14 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.7 Hz), 7.05 (d, 1H, H_5, ^{4}J = 2.4 Hz), 6.91 (d, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 6.75 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz), 6.66 (br. s, 1H, $H_{2'}$), 5.52 (br. s, 1H, H_1), 3.95 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 6.6 Hz), 3.44-3.36 (m, 2H, H_3), 3.13-3.01 (m, 2H, H_4), 1.76 (s x, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz), 1.01 (t, 3H, H_{12}, ^{3}J = 7.5 Hz).

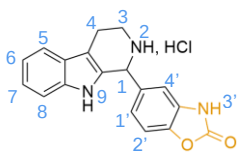
5-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-[1,1'-biphenyl]-2-ol hydrochloride **T33** (**LEB301**)



Method a. **Yield** = 8% (50 mg, 0.11 mmol).
$C_{27}H_{29}ClN_2O$. **MW** = 432.99 g.mol^{-1}.
mp = 221-223°C.
LC-MS : t_R = 2.25 min. [M+H]$^+$ = 397.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.79 (s, 1H, H_9), 10.07 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.98 (br. s, 1H, H_2), 9.27 (br. s, 1H, H_2), 7.57 (d, 2H, H_{ar}, ^{3}J = 7.2 Hz), 7.40 (t, 2H, H_{ar}, ^{3}J = 7.2 Hz), 7.33 (m, 3H, H_{ar}), 7.19 (d, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.14 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.35 Hz, ^{4}J = 2.10 Hz), 7.04 (d, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.3 Hz), 6.95 (dd, 1H, H_{ar}, ^{3}J = 8.5 Hz, ^{4}J = 1.35 Hz), 5.87 (br. s, 1H, H_1), 3.48 (m, 2H, H_3), 3.04 (m, 2H, H_4), 2.65 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.4 Hz), 1.59 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.8 Hz), 1.33 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.6 Hz), 0.91 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.3 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 156.1, 138.4, 135.5, 133.3, 132.7, 130.6, 129.5, 129.2, 128.5, 128.2, 127.3, 126.3, 125.7, 123.3, 117.6, 116.6, 111.7, 107.3, 55.9, 35.6, 34.5, 22.3, 18.6, 14.3.

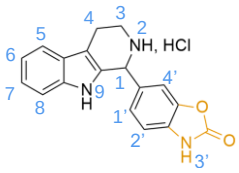
5-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one hydrochloride **T35** (**JPE14**)



Method 1. **Yield** = 16% (120 mg, 0.35 mmol).
$C_{18}H_{16}ClN_3O_2$. **MW** = 341.8 g.mol^{-1}.
Rf = 0.43 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 280-281 °C.
LCMS : t_R = 1.90 min. [M-H]$^-$ = 304.1 Da. [M+H]$^+$ = 306.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.91 (s, 1H, H_9), 10.87 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.32 (br. s, 1H, H_2), 9.53 (br. s, 1H, H_2), 7.53 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 7.7 Hz), 7.40 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.2 Hz), 7.29 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 7.9 Hz), 7.15 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.7 Hz), 7.13 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{4}J = 1.4 Hz), 7.10-7.02 (m, 2H, H_6 & H_7), 5.98 (s, 1H, H_1), 3.48-3.38 (m, 2H, H_3), 3.20-2.99 (m, 2H, H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.47 ($C_{3''}$), 144.27 (C_{5a} ou C_{8a}), 136.68 (C_{4a} ou C_{9a}), 130.80 ($C_{2''}$ ou $C_{4''}$), 130.52 ($C_{2''}$ ou $C_{4''}$), 128.71 ($C_{1''}$), 125.82 (C_{4a} ou C_{9a}), 124.22 ($C_{1'}$), 122.21 (C_6 ou C_7), 119.27 (C_6 ou C_7), 118.42 (C_5), 111.71 (C_8), 111.42 ($C_{4'}$), 109.81 ($C_{2'}$), 107.66 (C_{5a} ou C_{8a}), 55.64 (C_1), 40.40 (C_3),18.29 (C_4).

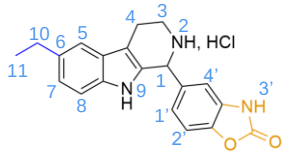
6-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one hydrochloride **T36** (**JPE17**)



Method 1. **Yield** = 9% (44 mg, 0.13 mmol).
$C_{18}H_{16}ClN_3O_2$. **MW** = 341.8 g.mol^{-1}.
Rf = 0.35 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 277.3-279.6 °C.
LCMS : t_R = 1.91 min. $[M-H]^-$ = 304.1 Da. $[M+H]^+$ = 306.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.93 (s, 1H, H_9), 10.88 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.01 (br. s, 1H, H_2), 9.34 (br. s, 1H, H_2), 7.54 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 7.7 Hz), 7.35 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.29 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 7.21 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 7.9 Hz), 7.17-7.07 (m, 2H, H_6 & H_7), 7.04 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 7.6 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 5.98 (s, 1H, H_1), 3.43 (m, 2H, H_3), 3.18-2.99 (m, 2H, H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.80 ($C_{3''}$), 143.67 (C_{5a} ou C_{8a}), 136.97 (C_{4a} ou C_{9a}), 133.08 ($C_{2''}$ ou $C_{4''}$), 128.86 ($C_{2''}$ ou $C_{4''}$), 128.78 ($C_{1''}$), 126.36 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.11 ($C_{1'}$), 122.52 (C_6 ou C_7), 119.55 (C_6 ou C_7), 118.72 (C_5), 112.00 (C_8), 111.46 ($C_{4'}$), 110.28 ($C_{2'}$), 107.92 (C_{5a} ou C_{8a}), 55.96 (C_1), 40.80 (C_3),18.59 (C_4).

5-{6-ethyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one hydrochloride **T37** (**JPE18**)

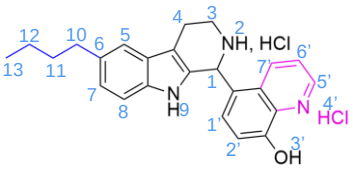


Method 1. **Yield** = 12% (84 mg, 0.23 mmol).
$C_{20}H_{20}ClN_3O_2$. **MW** = 369.85 g.mol^{-1}.
Rf = 0.28 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 302.4-304.4 °C.
LCMS : t_R = 2.26 min. $[M-H]^-$ = 302.2 Da. $[M+H]^+$ = 304.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.87 (s, 1H, H_9), 10.74 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.12 (br. s, 1H, H_2), 9.40 (br. s, 1H, H_2), 7.41 (d, 1H, H_5, ^{3}J = 8.2 Hz), 7.33 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.19 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.14 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.5 Hz, ^{4}J = 1.4 Hz), 7.09 (br. s, 1H, H_7), 6.99 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 9.2 Hz), 5.97 (s, 1H, H_1), 3.42 (m, 2H, H_3), 3.17-2.97 (m, 2H, H_4), 2.68 (q, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.5 Hz), 1.23 (t, 3H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz).

^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 154.76 ($C_{3''}$), 144.53 (C_{5a} ou C_{8a}), 135.48 (C_{4a} ou C_{9a}), 134.95 ($C_{2''}$ ou $C_{4''}$), 131.06 ($C_{2''}$ ou $C_{4''}$), 130.85 ($C_{1''}$), 128.97 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.27 ($C_{1'}$), 124.49 (C_6 ou C_7), 123.00 (C_6 ou C_7), 117.06 (C_5), 111.77 (C_8), 111.68 ($C_{4'}$), 110.07 ($C_{2'}$), 107.60 (C_{5a} ou C_{8a}), 55.93 (C_1), 40.68 (C_3), 28.90 (C_{10}),18.57 (C_4), 17.09 (C_{11}).

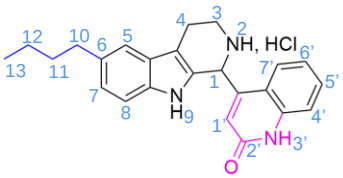
5-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}quinolin-8-ol dihydrochloride **T38** (**JPE97**)



Method 3. **Yield** = 14% (50 mg, 0.11 mmol).
$C_{24}H_{27}Cl_2N_3O$. **MW** = 444.4 g.mol^{-1}.
Rf = 0.46 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp > 400°C.
LCMS : t_R = 2.00 min. $[M+H]^+$ = 372.1 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 500 MHz, 60°C) : δ (ppm) = 10.55 (s, 1H, H_9), 10.49 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.71 (br. s, 1H, H_2), 9.22 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 9.08 (d, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 2.7 Hz), 7.96 (dd, 1H, $H_{6'}$, ^{3}J = 5.8 Hz, ^{3}J = 3.0 Hz), 7.48 (d, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 4.8 Hz), 7.38 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 4.8 Hz), 7.34 (s, 1H, H_5), 7.15 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 4.8 Hz), 6.96 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 4.8 Hz, ^{4}J = 0.6 Hz), 6.71 (br. s, 1H, H_1), 3.51 (br. s, 2H, H_3), 3.26-3.21 (m, 1H, H_4), 3.10-3.05 (m, 1H, H_4), 2.67 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 4.5 Hz), 1.62 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 4.2 Hz), 1.35 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 4.5 Hz), 0.92 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 4.2 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 60°C) : δ (ppm) = 152.75 ($C_{1''}$), 146.57 ($C_{5'}$), 138.80 ($C_{7'}$), 135.64 (C_{8a}), 134.07 ($C_{3''}$), 133.53 (C_6), 132.84 ($C_{1'}$), 129.13 (C_{9a}), 128.70 ($C_{7''}$), 126.45 (C_{5a}), 123.43 (C_7), 122.80 ($C_{6'}$), 121.59 ($C_{3'}$), 117.61 (C_5), 113.58 ($C_{2'}$), 111.67 (C_8), 108.07 (C_{4a}), 51.57 (C_1), 41.13 (C_3), 35.54 (C_{10}), 34.37 (C_{11}), 22.21 (C_{12}), 18.60 (C_4), 14.21 (C_{13}).

4-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-1,2-dihydroquinolin-2-one hydrochloride **T39** (**JPE101**)

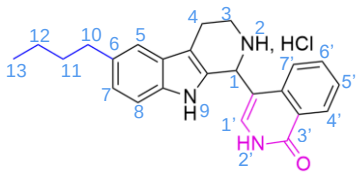


Method 3. **Yield** = (210 mg, 0.51 mmol, 63.64%).
$C_{24}H_{26}ClN_3O$. **MW** = 407.94 g.mol^{-1}.
Rf = 0.45 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 261.4-262.7°C.
LCMS : t_R = 1.94 min. $[M+H]^+$ = 372.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.11 (s, 1H, $H_{3'}$), 10.80 (s, 1H, H_9), 10.39 (br. s, 1H, H_2), 9.58 (br. s, 1H, H_2), 8.07 (br. s, 1H, $H_{4'}$), 7.64 (t, 1H, $H_{6'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.45 (d, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.34 (s, 1H, H_5), 7.32 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 7.2 Hz), 7.20 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.4 Hz), 6.98 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 6.53 (br. s, 1H, H_1), 6.28 (s, 1H, $H_{1'}$), 3.53 (br. s, 2H, H_3), 3.20-3.01 (m, 2H, H_4), 2.66 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.5 Hz), 1.60 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 6.9 Hz), 1.33 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.5 Hz), 0.91 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.2 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 161.37 ($C_{2'}$), 144.59 ($C_{3''}$), 139.81 ($C_{7''}$), 135.52 (C_{8a}), 133.50 (C_6), 131.61 ($C_{6'}$), 127.73 (C_{9a}), 126.15 (C_{5a}), 125.20 ($C_{1'}$),125.09 ($C_{4'}$), 123.62 (C_7), 122.55 ($C_{5'}$),

118.09 ($C_{1''}$), 117.74 (C_5), 116.39 ($C_{7'}$), 111.73 (C_8), 108.13 (C_{4a}), 50.96 (C_1), 41.37 (C_3), 35.57 (C_{10}), 34.50 (C_{11}), 22.29 (C_{12}), 18.50 (C_4), 14.34 (C_{13}).

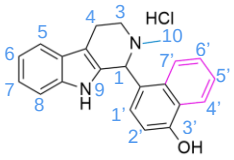
4-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-1,2-dihydroisoquinolin-1-one hydrochloride **T40** (**JPE108**)



Method 3. **Yield** = 52% (120 mg, 0.29 mmol).
$C_{24}H_{26}ClN_3O$. **MW** = 407.94 g.mol^{-1}.
Rf = 0.46 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 292.8-293.9°C.
LCMS : t_R = 1.90 min. $[M-H]^-$ = 370.3 Da. $[M+H]^+$ = 372.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 11.33 (s, 1H, $H_{2'}$), 10.67 (s, 1H, H_9), 10.28 (br. s, 1H, H_2), 9.32 (br. s, 1H, H_2),8.33 (d, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.91-7.88 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.78 (t, 1H, $H_{6'}$, ^{3}J = 6.6 Hz), 7.59 (t, 1H, $H_{5'}$, ^{3}J = 7.2 Hz), 7.33 (s, 1H, H_5), 7.19 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.1 Hz), 6.97 (d, 1H, H_7, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 6.99 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 6.28 (br. s, 1H, H_1), 3.51 (t, 2H, H_3, ^{3}J = 5.4 Hz), 3.09-3.01 (m, 2H, H_4), 2.69 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.2 Hz), 1.64 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.2 Hz), 1.37 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.2 Hz), 0.94 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.5 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 161.93 ($C_{3'}$), 136.29 (C_{8a}), 135.69 (C_6), 133.63 ($C_{4''}$), 133.56 ($C_{1'}$), 132.97 (C_{4a} ou C_{9a}), 128.43 ($C_{6'}$), 127.86 ($C_{7''}$), 127.19 ($C_{5'}$), 126.58 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.49 ($C_{7'}$), 123.45 ($C_{4'}$ & C_7), 117.57 ($C_{1''}$), 111.66 (C_5), 108.62 (C_8), 108.06 (C_{5a}), 51.29 (C_1), 35.53 (C_{10}), 34.26 (C_{11}), 22.19 (C_{12}), 18.61 (C_3 & C_4), 14.13 (C_{13}).

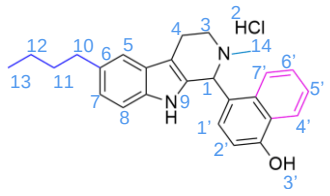
4-{2-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T43** (**JPE85**)



Method 3. **Yield** = 59% (185 mg, 0.51 mmol).
$C_{22}H_{21}ClN_2O$. **MW** = 364.87 g.mol^{-1}.
Rf = 0.65 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 243.6-246.1°C.
LCMS : t_R = 1.65 min. $[M- H]^-$ = 327.0 Da. $[M+H]^+$ = 329.1 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 10.87 (br. s, 1H, H_9), 10.47 (s, 1H, $H_{3'}$), 8.34 (d, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 8.34 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.68-7.63 (m, 1H, $H_{6'}$), 7.59-7.54 (m, 2H, H_5 & $H_{5'}$), 7.36 (br. s, 1H, H_8), 7.24 (dd, 1H, H_6, ^{3}J = 7.2 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 7.13-7.03 (m, 2H, $H_{1'}$ & H_7), 6.99 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.8 Hz), 6.61 (br. s, 1H, H_1), 3.46 (br. s, 2H, H_3), 3.14-3.09 (m, 2H, H_4), 2.81 (s, 3H, H_{10}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 155.98 ($C_{3'}$), 137.50 (C_{8a}), 134.16 (C_6), 131.28 ($C_{4''}$), 129.93 ($C_{1'}$), 127.82 ($C_{6'}$ & C_{4a} ou C_{9a}), 126.17 ($C_{7''}$), 125.52 ($C_{5'}$), 125.21 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.45 ($C_{7'}$), 122.30 ($C_{4'}$), 119.47 (C_7), 118.57 ($C_{1''}$), 112.03 (C_5), 108.43 (C_8), 107.18 ($C_{2'}$ & C_{5a}), 65.40 (C_1), 51.89 (C_{10}), 18.42 (C_3 & C_4).

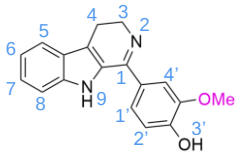
4-{6-butyl-2-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T45** (**JPE102**)



Method 3. **Yield** = 41% (130 mg, 0.31 mmol).
$C_{26}H_{29}ClN_2O$. **MW** = 420.98 g.mol^{-1}.
Rf = 0.80 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 229.5-231.2°C.
LCMS : t_R = 2.10 min. $[M-H]^-$ = 383.3 Da. $[M+H]^+$ = 385.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 10.56 (br. s, 1H, H_9), 10.33 (s, 1H, $H_{3'}$), 8.32 (d, 1H, $H_{7'}$, ^3J = 9.3 Hz), 8.32 (d, 1H, $H_{4'}$, ^3J = 9.3 Hz), 7.67-7.64 (m, 1H, $H_{6'}$), 7.59-7.54 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.33 (s, 1H, H_5), 7.28-7.25 (m, 1H, H_8), 7.13 (d, 1H, $H_{1'}$, ^3J = 8.1 Hz), 6.96 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.1 Hz), 6.94 (d, 1H, H_7, ^3J = 6.9 Hz), 6.53 (br. s, 1H, H_1), 3.69 (br. s, 2H, H_3), 3.13 (s, 3H, H_{14}), 2.80 (br. s, 2H, H_4), 2.68 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.2 Hz), 1.63 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 6.9 Hz), 1.37 (sx, 2H, H_{12}, ^3J = 7.2 Hz), 0.93 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.2 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 155.88 ($C_{3'}$), 136.00 (C_{8a}), 134.04 (C_6), 133.46 ($C_{4''}$), 131.28 ($C_{1'}$), 130.00 (C_{4a} ou C_{9a}), 127.79 ($C_{6'}$), 126.33 ($C_{7''}$), 125.53 ($C_{5'}$), 125.23 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.42 ($C_{7'}$), 123.24 (C_7 & $C_{4'}$), 117.53 (C_5 & $C_{1''}$), 111.71 (C_8), 108.35 ($C_{2'}$), 106.77 (C_{5a}), 50.36 (C_1), 35.53 (C_{14}), 34.29 (C_{10}), 30.95 (C_{11}), 22.18 (C_{12}), 18.42 (C_3 & C_4), 14.13 (C_{13}).

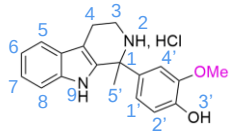
2-methoxy-4-{*3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol **T47** (**JPE77**)



Method 4. **Yield** = 29% (85 mg, 0.29 mmol).
$C_{18}H_{16}N_2O_2$. **MW** = 292.34 g.mol^{-1}.
Rf = 0.15 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
mp = 286.2-295.0°C.
LCMS : t_R = 1.56 min. $[M-H]^-$ = 291.1 Da. $[M+H]^+$ = 293.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.12 (s, 1H, H_9), 10.74 (br. s, 1H, $H_{3'}$), 7.83 (d, 1H, H_5, ^3J = 8.1 Hz), 7.57-7.42 (m, 4H, H_6, H_7, H_8 & $H_{4'}$), 7.24-7.14 (m, 2H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 3.97 (t, 2H, H_3, ^3J = 8.1 Hz), 3.93 (s, 3H, OMe), 3.28 (t, 2H, H_4, ^3J = 8.4 Hz). ^{1}H NMR (MeOH, 300 MHz) : δ (ppm) = 7.80 (d, 1H, H_5, ^3J = 8.1 Hz), 7.57-7.45 (m, 4H, H_6, H_7, H_8 & $H_{4'}$), 7.25 (t, 1H, $H_{1'}$), ^3J = 7.5 Hz), 7.12 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.7 Hz), 4.05 (t, 2H, H_3, ^3J = 8.4 Hz), 4.00 (s, 3H, OMe), 3.38 (t, 2H, H_4, ^3J = 8.1 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 148.07 ($C_{3'}$), 147.83 (C_{8a}), 136.72 (C_6), 133.13 ($C_{4''}$), 130.10 ($C_{1'}$), 126.05 (C_{4a} ou C_{9a}), 122.56 ($C_{4'}$), 121.72 (C_{4a} ou C_{9a}), 119.57 (C_7), 118.88 ($C_{1''}$), 115.33 (C_5), 111.93 (C_8), 106.85 ($C_{2'}$), 60.71 (C_{5a}), 56.33 (C_1), 38.32 (C_{OMe}), 25.62 (C_3), 18.76 (C_4).

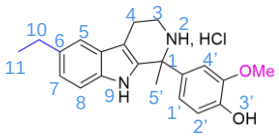
2-methoxy-4-{1-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T48** (**JPE77-4**)



Method 3. **Yield** = 13% (55 mg, 0.16 mmol).
$C_{19}H_{21}ClN_2O_2$. **MW** = 344.84 g.mol^{-1}.
Rf = 0.40 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 258.3-262.1°C.
LCMS : t_R = 1.54 min. $[M-H]^-$ = 307.1 Da. $[M+H]^+$ = 309.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.28 (s, 1H, H_9), 9.62 (br. s, 2H, H_2), 9.37 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.54 (d, 1H, H_5), ^{3}J = 7.8 Hz), 7.38 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.19-7.15 (m, 2H, H_7 & $H_{4'}$), 7.07 (t, 1H, H_6, ^{3}J = 7.2 Hz), 6.74 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.1 Hz), 6.37 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.44-3.38 (m, 1H, H_3), 3.06-2.95 (m, 3H, H_3 & H_4), 2.12 (s, 3H, $H_{5'}$).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 148.07, 147.82, 136.72, 133.15, 130.12, 126.06, 122.56, 121.72, 119.56, 118.87, 115.32, 111.92, 106.86, 60.70, 56.33, 38.32, 25.63, 18.77.

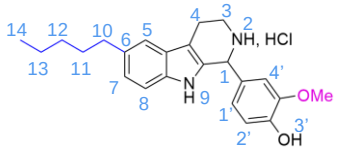
4-{6-ethyl-1-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}-2-methoxyphenol hydrochloride **T50** (**JPE68**)



Method 3. **Yield** = 8% (25 mg, 0.067 mmol).
$C_{21}H_{25}ClN_2O_2$. **MW** = 372.89 g.mol^{-1}.
Rf = 0.44 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 273.1-275.3 °C.
LCMS : t_R = 1.77 min. $[M+H]^+$ = 337.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.13 (s, 1H, H_9), 9.73 (br. s, 1H, $H_{3'}$), 9.40 (br. s, 2H, H_2), 7.33 (br. s, 1H, H_5), 7.27 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.10 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.02 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.3 Hz, ^{4}J = 1.5 Hz), 6.73 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.3 Hz), 6.36 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.3 Hz, ^{4}J = 2.2 Hz), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.41-3.35 (m, 1H, H_3), 3.06-2.89 (m, 3H, H_3 & H_4), 2.69 (q, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.2 Hz), 2.10 (s, 3H, $H_{5'}$), 1.23 (t, 3H, H_{11}, ^{3}J = 7.5 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 148.06 ($C_{3'}$), 147.90 (C_{8a}), 135.24 (C_6), 135.00 ($C_{4''}$), 132.98 ($C_{1'}$), 129.91 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.17 ($C_{4'}$), 123.11 (C_{4a} ou C_{9a}), 121.79 (C_7), 117.26 ($C_{1''}$), 115.36 (C_5), 111.90 (C_8), 111.71 ($C_{2'}$), 106.47 (C_{5a}), 60.77 ($C_{5'}$), 56.33 (C_1), 38.36 (C_{OMe}), 28.90 (C_{10}), 25.51 (C_{11}), 18.71 (C_3), 17.11 (C_4).

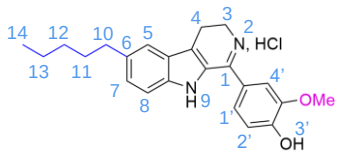
2-methoxy-4-{6-pentyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T51** (**JPE84**)



Method 3. **Yield** = 11% (40 mg, 0.1 mmol).
$C_{23}H_{29}ClN_2O_2$. **MW** = 400.95 g.mol^{-1}.
Rf = 0.34 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 219.9-227.3°C.
LCMS : t_R = 2.00 min. $[M-H]^-$ = 362.9 Da. $[M+H]^+$ = 365.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.71 (s, 1H, H_9), 9.95 (s, 1H, $H_{3'}$), 9.41 (br. s, 1H, H_2), 9.30 (br. s, 1H, H_2), 7.29 (br. s, 1H, H_5), 7.19 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.09 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{4}J = 1.7 Hz), 6.95 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 1.4 Hz), 6.84 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.1 Hz), 6.71 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz), 5.78 (s, 1H, H_1), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.42-3.40 (br. s, 2H, H_3), 3.12-2.89 (m, 2H, H_4), 2.64 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.4 Hz), 1.60 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.36-1.29 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.87 (t, 3H, H_{14}, ^{3}J = 6.6 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 148.40, 148.09, 135.47, 133.30, 129.37, 126.33, 125.57, 123.23, 123.07, 117.59, 115.80, 114.41, 111.70, 107.19, 56.22, 35.88, 32.04, 31.45, 22.49, 18.60, 14.44.

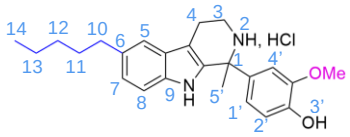
2-methoxy-4-{6-pentyl-*3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T52** (**JPE81**)



Method 4. **Yield** = 3% (10 mg, 0.025 mmol).
$C_{23}H_{27}ClN_2O_2$. **MW** = 398.93 g.mol^{-1}.
Rf = 0.18 (DCM/MeOH 9:1 + few drops of ammonia).
LCMS : t_R = 2.07 min. $[M-H]^-$ = 361.3 Da. $[M+H]^+$ = 363.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.98 (s, 1H, H_9), 11.64 (br. s, 1H, $H_{3'}$), 10.60 (s, 1H, H_2), 7.60 (br. s, 1H, H_5), 7.48-7.42 (m, 3H, H_7 & H_8 & $H_{4'}$), 7.32 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.8 Hz, ^{4}J = 1.6 Hz), 7.12 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.2 Hz), 3.99-3.94 (m, 2H, H_3), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.33-3.24 (m, 2H, H_4), 2.68-2.63 (m, 2H, H_{10}), 1.62 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.2 Hz), 1.35-1.28 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.87 (t, 3H, H_{14}, ^{3}J = 6.5 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz) : δ (ppm) = 162.05, 153.48, 148.44, 140.63, 136.03, 130.31, 126.12, 125.42, 125.13, 124.90, 120.36, 119.70, 116.49, 114.37, 113.89, 56.24, 42.09, 35.61, 31.44, 31.31, 22.46, 19.34, 14.43.

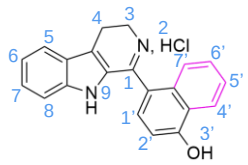
2-methoxy-4-{1-methyl-6-pentyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T53** (**JPE83**)



Method 3. **Yield** = 1% (2 mg, 0.0048 mmol).
$C_{24}H_{31}ClN_2O_2$. **MW** = 414.97 g.mol^{-1}.
Rf = 0.49 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
LCMS : t_R = 2.02 min. $[M+H]^+$ = 379.3 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 11.14 (s, 1H, H_9), 10.00 (br. s, 1H, $H_{3'}$), 9.78 (br. s, 1H, H_2), 9.34 (br. s, 1H, H_2), 7.29 (br. s, 1H, H_5), 7.26 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.3 Hz), 7.22 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{4}J = 2.1 Hz), 7.00 (dd, 1H, H_7, ^{3}J = 8.3 Hz, ^{4}J = 1.3 Hz), 6.71 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.3 Hz), 6.32 (dd, 1H, $H_{1'}$, ^{3}J = 8.3 Hz, ^{4}J = 2.1 Hz), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.39-3.37 (m, 1H, H_3), 3.04-2.89 (m, 3H, H_3 & H_4), 2.65 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.2 Hz), 2.11 (s, 3H, Me), 1.61 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 6.9 Hz), 1.36-1.29 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.87 (t, 3H, H_{14}, ^{3}J = 6.7 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz) : δ (ppm) = 148.07, 147.91, 135.26, 133.52, 132.98, 129.98, 126.20, 123.55, 121.81, 117.87, 115.35, 111.86, 111.64, 106.44, 60.75, 56.32, 38.36, 35.88, 32.05, 31.46, 25.52, 22.50, 18.72, 14.46.

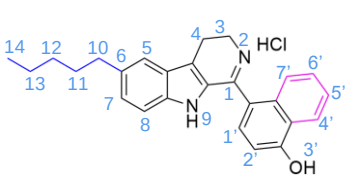
4-{*3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T54** (**JLA20 dih**)



Method 3. **Yield** = 3% (15 mg, 0.043 mmol).
$C_{21}H_{17}ClN_2O$. **MW** = 348.83 g.mol^{-1}.
Rf = 0.30 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp > 400°C.
LCMS : t_R = 1.75 min. $[M-H]^-$ = 311.2 Da. $[M+H]^+$ = 313.2 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.34 (s, 1H, H_9), 11.78 (s, 1H, $H_{3'}$), 11.61 (s, 1H, H_2), 8.34 (dd, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 6.3 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz), 7.86 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.4 Hz), 7.80 (d, 1H, $H_{6'}$, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.68-7.56 (m, 3H, $H_{5'}$ & H_5 & H_8), 7.44-7.36 (m, 2H, H_6 & H_7), 7.24-7.19 (m, 2H, $H_{1'}$ & $H_{2'}$), 4.15 (br. s, 2H, H_3), 2.54 (s, 2H, H_4).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 163.83, 159.06, 141.64, 132.49, 132.27, 128.93, 128.76, 126.94, 126.35, 125.17, 125.12, 124.94, 124.70, 123.32, 122.39, 121.88, 117.37, 113.94, 108.19, 42.78, 19.25.

4-{6-pentyl-*3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T55** (**JPE66 dihydro**)



Method 3. **Yield** = 5% (15 mg, 0.036 mmol).
$C_{26}H_{27}ClN_2O$. **MW** = 418.97 g.mol^{-1}.
Rf = 0.26 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 261.2-262.3°C.
LCMS : t_R = 2.30 min. $[M-H]^-$ = 381.3 Da. $[M+H]^+$ = 383.3 Da.

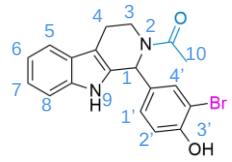
^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 12.18 (s, 1H, H_9), 11.68 (s, 1H, $H_{3'}$), 11.54 (s, 1H, H_2), 8.33 (dd, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 7.3 Hz, ^{4}J = 2.0 Hz), 7.78 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.0 Hz), 7.68-7.56 (m, 4H, $H_{5'}$, $H_{6'}$, H_5 & H_8), 7.28 (br. s, 2H, $H_{1'}$ & H_7), 7.17 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.0 Hz), 4.14 (br. s, 2H, H_3), 3.44-3.35 (m, 2H, H_4), 2.68 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.63 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.0 Hz), 1.36-1.28 (m, 4H, H_{12} & H_{13}), 0.88 (t, 3H, H_{14}, ^{3}J = 6.7 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 163.67 ($C_{3'}$), 158.96 (C_{8a}), 140.63 (C_6), 136.07 ($C_{4''}$), 132.41 ($C_{1'}$), 132.28 (C_{4a} ou C_{9a}), 130.69 ($C_{6'}$), 128.77 ($C_{7''}$), 126.97 ($C_{5'}$), 126.37 (C_{4a} ou C_{9a}), 125.10 ($C_{7'}$), 124.90 ($C_{4'}$), 124.83 (C_7), 123.31 ($C_{1''}$), 120.58 (C_5), 117.41 (C_8), 113.74 ($C_{2'}$ ou C_{5a}), 108.16 ($C_{2'}$ ou C_{5a}), 42.73 (C_1), 35.61 (C_{10}), 31.41 (C_{11}), 31.34 (C_{12}), 31.17 (C_3), 22.46 (C_4), 19.29 (C_{13}), 14.43 (C_{14}).

Procedures for amino substitution of tryptolines

1-[1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-2-yl]ethan-1-one **T41** (**JPE22**)

To a suspension of 2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T1** (1 eq., 400 mg, 1.05 mmol) in THF (10 mL) is added Et_3N (3.5 eq., 373 mg, 0.5 mL, 3.69 mmol). Then, at 0°C, acetyl chloride (2.2 eq., 181.94 mg, 0.17 mL, 2.32 mmol) diluted in THF (10 mL) is added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature. 1N hydrochloric acid, then brine are added to the reaction mixture. Product is extracted in AcOEt, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give an oil of **24**, which is used in next step without further purification.

To a solution of **24** in THF (9 mL) is added H_2O (3 mL). After solubilization, LiOH (4.5 eq., 125 mg, 5.22 mmol) is added and the reaction mixture is heated at 50°C until starting material has disappeared. The reaction mixture is diluted with water and brine and extracted twice with ethyl acetate. The organics layers are dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue is suspended in diethyl ether and filtered on Buchner in order to obtain a powder, which is recrystallized in methanol to give a white powder of 1-[1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-2-yl]ethan-1-one.

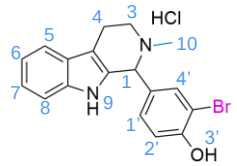


Yield = 50% (221 mg, 0.57 mmol).
$C_{19}H_{17}BrN_2O_2$. **MW** = 385.26 g.mol^{-1}.
Rf = 0.67 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 249.8-250.8 °C.
LCMS : t_R = 2.68 min. $[M-H]^-$ = 385.0 Da. $[M+H]^+$ = 386.9 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.93 (s, 1H, H_9), 10.30 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.46 (d, 1H, H_5, ^3J = 7.5 Hz), 7.29 (d, 1H, H_8, ^3J = 7.8 Hz), 7.26 (d, 1H, $H_{4'}$, ^4J = 1.8 Hz), 7.11-7.06 (m, 1H, $H_{1'}$), 7.04-6.99 (m, 2H, H_6 & H_7), 6.91 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.4 Hz), 6.72 (s, 1H, H_1), 3.97-3.92 (m, 1H, H_3), 3.27-3.16 (m, 1H, H_3), 2.86-2.82 (m, 2H, H_4), 2.14 (s, 3H, H_{10}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 169.12 (C_{10}), 154.12 ($C_{3'}$), 136.65 (C_{8a}), 133.34 (C_6), 132.74 ($C_{4''}$), 132.28 ($C_{1'}$), 128.87 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.65 ($C_{4'}$), 121.75 (C_{4a} ou C_{9a}), 119.10 (C_7), 118.39 ($C_{1''}$), 116.63 (C_5), 111.70 (C_8), 109.53 ($C_{2'}$), 108.92 (C_{5a}), 55.42 (C_1), 31.14 (C_3 & C_4), 21.97 ($C_{10''}$).

2-bromo-4-{2-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T42** (**JPE30**)

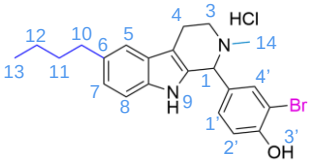
2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol **T1** (1 eq., 0.5 g, 1.46 mmol) and NaBH4 (2 eq., 0.11 g, 2.91 mmol) are added to a round bottomed flask, dissolved in MeOH (17.58 mL), and treated with 27% formaldehyde solution (40.17 eq., 1.76 g, 1.62 mL, 58.52 mmol) in water. After 4 days of stirring, the reaction mixture is hydrolyzed with water, extracted with AcOEt, dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue is recrystallized in acetonitrile to give 2-bromo-4-{2-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol.



Yield = 2% (9 mg, 0.03 mmol).
$C_{18}H_{18}BrClN_2O$. **MW** = 393.71 g.mol^{-1}.
Rf = 0.47 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 243.8-245.6°C.
LCMS : t_R = 2.13 min. $[M-H]^-$ = 355.1 Da. $[M+H]^+$ = 357.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.19 (s, 1H, H_9), 10.16 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.39 (d, 1H, H_5, ^3J = 7.3 Hz), 7.34 (d, 1H, $H_{4'}$, ^4J = 1.8 Hz), 7.18 (d, 1H, H_8, ^3J = 7.5 Hz), 7.09 (d, 1H, $H_{1'}$, ^3J = 7.3 Hz), 6.98-6.90 (m, 3H, H_6 & H_7 & $H_{2'}$), 4.28 (s, 1H, H_1), 3.09-3.05 (m, 2H, H_3), 2.89-2.83 (m, 2H, H_4), 2.20 (s, 3H, H_{10}).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 137.36 ($C_{3'}$), 134.83 (C_{8a}), 134.37 (C_6), 130.91 ($C_{4''}$), 126.42 ($C_{1'}$), 122.01 (C_{4a} ou C_{9a}), 119.26 ($C_{4'}$), 118.44 (C_{4a} ou C_{9a}), 117.50 (C_7), 116.99 ($C_{1''}$), 114.06 (C_5), 111.90 (C_8), 109.96 ($C_{2'}$), 107.24 (C_{5a}), 64.34 (C_1), 53.85 (C_{10}), 51.10 (C_3), 19.45 (C_4).

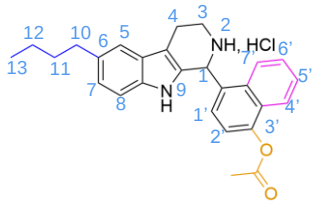
2-bromo-4-{6-butyl-2-methyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T44** (**LEB279**)



Same procedure as for **T42**. **Yield** = 4% (100 mg, 0.22 mmol)
$C_{22}H_{26}BrClN_2O$. **MW** = 449.82 g.mol^{-1}.
Rf = 0.53 (DCM/MeOH + few drops of ammonia).
mp = 268.9-270.5°C.
LCMS : t_R = 2.19 min. $[M-H]^-$ = 411.0 Da. $[M+H]^+$ = 413.0 Da.

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.64 (br. s, 1H, H_2), 10.53 (s, 1H, H_9), 10.41 (s, 1H, $H_{3'}$), 7.62 (d, 1H, H_5, ^4J = 1.9 Hz), 7.31 (s, 1H, $H_{4'}$), 7.22 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 7.19 (d, 1H, H_8, ^3J = 8.3 Hz), 7.06 (d, 1H, $H_{2'}$, ^3J = 8.3 Hz), 6.97 (dd, 1H, H_7, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.4 Hz), 5.69 (s, 1H, H_1), 3.72-3.49 (m, 2H, H_3), 3.09 (s, 3H, H_{14}), 2.83 (br. s, 2H, H_4), 2.68 (t, 2H, H_{10}, ^3J = 7.5 Hz), 1.63 (qt, 2H, H_{11}, ^3J = 7.0 Hz), 1.36 (sx, 2H, H_{12}, ^3J = 7.4 Hz), 0.93 (t, 3H, H_{13}, ^3J = 7.3 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz) : δ (ppm) = 156.20 ($C_{3'}$), 135.79 (C_{8a}), 135.26 (C_6), 133.47 ($C_{4''}$), 131.47 ($C_{1'}$), 128.75 (C_{4a} ou C_{9a}), 126.04 ($C_{4'}$), 125.38 (C_{4a} ou C_{9a}), 123.49 (C_7), 117.76 ($C_{1''}$), 116.88 (C_5), 111.77 (C_8), 110.02 ($C_{2'}$), 106.59 (C_{5a}), 64.74 (C_1), 60.53 (C_{14}), 51.44 (C_3), 35.55 (C_{10}), 34.53 (C_{11}), 22.26 (C_{12}), 18.22 (C_4), 14.33 (C_{13}).

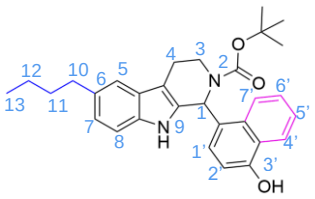
4-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-yl acetate hydrochloride **P1** (**LEB298**)



Method 3 with **8f** and **28**. **Yield** = 24% (170 mg, 0.38 mmol).
$C_{27}H_{29}ClN_2O_2$. **MW** = 448.99 g.mol^{-1}.
mp = 220-222°C.
LC-MS : t_R = 2.25 min. $[M+H]^+$ = 413.0 Da.

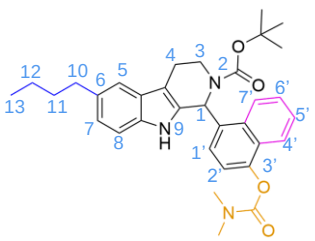
^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.80 (s, 1H, H_9), 10.32 (br. s, 1H, H_2), 9.50 (br. s, 1H, H_2), 8.54 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.10 (dd, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.1 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz), 7.79-7.71 (m, 2H, $H_{5'}$ & $H_{6'}$), 7.38-7.32 (m, 3H, H_5 & H_8 & $H_{1'}$), 7.17 (d, 1H, H_7, ^{3}J = 8.3 Hz), 6.97 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.3 Hz), 6.81 (br. s, 1H, H_1), 3.51-3.43 (m, 2H, H_3), 3.43 (s, 3H, Ac), 3.54-3.06 (m, 2H, H_4), 2.67 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.65 Hz), 1.61 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.65 Hz), 1.36 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.5 Hz), 0.93 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.5 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 169.9, 148.3, 135.5, 133.3, 132.8, 129.6, 129.3, 129.0, 128.1, 127.6, 127.4, 126.3, 124.4, 123.4, 122.6, 118.6, 117.6, 111.7, 108.1, 65.4, 35.6, 34.5, 22.3, 21.2, 18.6, 15.6, 14.3.

tert-butyl 6-butyl-1-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate (**29**)



Same procedure as for **27a** with **T17** starting substrate. Yield = 86% (150 mg, 0.32 mmol). $C_{30}H_{34}N_2O_3$. MW = 470.61 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.77 (s, 1H, H_9), 10.25 (br. s, 1H, $H_{3'}$), 8.52 (d, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 8.0 Hz), 8.22 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.5 Hz), 7.60-7.49 (m, 2H, $H_{5'}$ & $H_{6'}$), 7.28 (s, 1H, H_5), 7.17 (d, 1H, H_8, ^{3}J = 8.1 Hz), 6.95-6.92 (m, 2H, H_1 & $H_{1'}$), 6.72 (d, 1H, H_7, ^{3}J = 8.0 Hz), 6.61 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 3.90 (br. s, 1H, H_3), 3.03-2.98 (m, 1H, H_3), 2.89-2.73 (m, 2H, H_4), 2.67 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.65-1.54 (m, 2H, H_{11}), 1.48 (s, 9H, *t*Bu), 1.43-1.29 (m, 2H, H_{12}), 0.93 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 153.86, 135.03, 133.44, 133.07, 132.81, 128.59, 127.03, 126.67, 125.45, 125.04, 124.18, 123.12, 122.51, 117.34, 111.33, 108.98, 107.10, 67.42, 51.34, 35.65, 34.68, 31.78, 28.50, 27.67, 26.81, 22.32, 14.37.

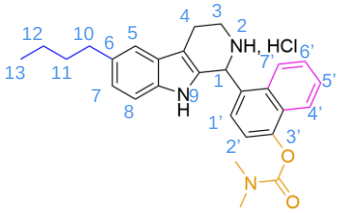
tert-butyl 6-butyl-1-{4-[(dimethylcarbamoyl)oxy]naphthalen-1-yl}-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate (**30**)



A mixture of **29** (1 eq., 130 mg, 0.28 mmol), dimethylcarbamyl chloride (1.5 eq., 44.56 mg, 0.038 mL, 0.41 mmol) and K_2CO_3 (1.5 eq., 57.27 mg, 0.41 mmol) is refluxed in acetonitrile (8.67 mL) for 3h. After cooling, the reaction mixture is hydrolyzed with NaCl saturated aqueous solution and extracted twice with ethyl acetate. The organic layers are washed with 1N KOH aqueous solution and dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue is purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 85/15) to provide **30** as a pale pink solid (100 mg, 0.18 mmol, 67%). $C_{33}H_{39}N_3O_4$. MW = 541.69 g.mol^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO, 500 MHz) : δ (ppm) = 10.82 (s, 1H, H_9), 8.66 (d, 1H, $H_{7'}$, ^{3}J = 8.0 Hz), 7.96 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.5 Hz), 7.69-7.64 (m, 2H, $H_{5'}$ & $H_{6'}$), 7.29 (s, 1H, H_5), 7.20-7.15 (m, 2H, H_8 & $H_{1'}$), 7.07 (br. s, 1H, H_1), 6.94 (d, 1H, H_7, ^{3}J = 8.0 Hz), 6.80 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 7.5 Hz), 3.93 (br. s, 1H, H_3), 3.20 (s, 3H, NCH_3), 3.00-2.96 (m, 1H, H_3), 2.96 (s, 3H, NCH_3), 2.89-2.83 (m, 1H, H_4), 2.76-2.72 (m, 1H, H_4), 2.66 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.61 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.47 (s, 9H, *t*Bu), 1.37 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.3 Hz), 0.94 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.3 Hz). ^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 154.41, 147.61, 135.09, 133.95, 132.94, 132.76, 132.68, 127.93, 127.70, 127.42, 126.98, 124.67, 122.72, 122.35, 117.98, 117.44, 111.41, 109.29, 51.32, 36.96, 36.75, 35.65, 34.65, 28.46, 22.32, 14.37.

4-{6-butyl-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-yl *N,N*-dimethylcarbamate hydrochloride **P2** (**LEB307**)

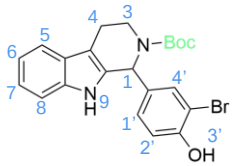
In a tube, a 4M HCl solution in dioxane (73 eq., 3.032 mL, 12.13 mmol) is added to a solution of **30** (1 eq., 90 mg, 0.17 mmol) in DCM (5 mL). The tube is sealed and heated at 60°C under stirring for 4h. The reaction mixture is concentrated under reduced pressure and diethyl ether is added until precipitation of the hydrochloride salt. The solid is filtered, washed with diethyl ether and dried under vacuum.



Yield = 50% (40 mg, 0.085 mmol).
$C_{28}H_{32}ClN_3O_2$. **MW** = 478.03 g.mol^{-1}.
mp = 190-192°C.
LC-MS : t_R = 2.23 min. $[M+H]^+$ = 442.0 Da.

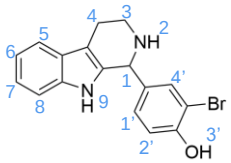
^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) : δ (ppm) = 10.80 (s, 1H, H_9), 10.19 (br. s, 1H, H_2), 9.41 (br. s, 1H, H_2), 8.53 (br. s, 1H, $H_{7'}$), 8.07 (d, 1H, $H_{4'}$, ^{3}J = 8.1 Hz), 7.79-7.71 (m, 2H, $H_{5'}$ & $H_{6'}$), 7.36-7.34 (m, 2H, H_5 & H_8), 7.29 (br. s, 1H, $H_{1'}$), 7.17 (d, 1H, H_7, ^{3}J = 8.1 Hz), 6.97 (d, 1H, $H_{2'}$, ^{3}J = 8.2 Hz), 6.81 (br. s, 1H, H_1), 3.59-3.44 (m, 2H, H_3), 3.23 (s, 3H, NCH_3), 3.23-2.98 (m, 2H, H_4), 2.98 (s, 3H, NCH_3), 2.67 (t, 2H, H_{10}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.61 (qt, 2H, H_{11}, ^{3}J = 7.3 Hz), 1.35 (sx, 2H, H_{12}, ^{3}J = 7.3 Hz), 0.93 (t, 3H, H_{13}, ^{3}J = 7.3 Hz).
^{13}C NMR (DMSO, 75 MHz, 80°C) : δ (ppm) = 154.2, 148.9, 135.5, 133.4, 132.7, 129.4, 129.0, 128.4, 128.0, 127.9, 127.4, 126.3, 124.2, 123.4, 122.5, 118.5, 117.7, 111.7, 37.0, 36.8, 35.6, 34.5, 22.3, 18.7, 14.3.

tert-butyl 1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate (**27a, R and S**) : Protection of **T1** with a Boc and enantiomers separation



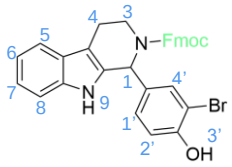
2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T1** is first washed with an aqueous 5% K_2CO_3 solution in order to remove the hydrochloride salt. To a solution of the basic tryptolin (1 eq., 420 mg, 1.22 mmol) and triethylamine (1.2 eq., 149 mg, 0.2 mL, 1.47 mmol) in THF (10 mL) is added dropwise Boc_2O (0.95 eq., 254 mg, 0.25 mL, 1.16 mmol) solubilized in THF (5 mL). The reaction mixture is stirred one night at room temperature. Brine is added to the mixture and the organic layer is extracted with EtOAc, dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The oil is precipitated in petroleum ether, filtered on Buchner and washed with petroleum ether. The residue is finally recrystallized in cyclohexane/toluene, filtered and washed with cyclohexane to give tert-butyl 1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate (387 mg, 0.87 mmol, 75%). $C_{22}H_{23}BrN_2O_3$. MW = 443.34 g.mol^{-1}. LCMS : t_R = 3.32 min. $[M-H]^-$ = 443.0 Da. $[M+H]^+$ = 444.9 Da. The two enantiomers are separated following the preparative chiral HPLC method : flow rate = 80 mL.min^{-1}, eluents = A/B/D 15:85:5, t_R (enant1) = 12 min, t_R (enant2) = 19 min. Analytical chiral HPLC method : flow rate = 1.0 mLmin^{-1}, eluents = A/B/D 20:75:5, t_R (enant1) = 7.26 min, t_R (enant2) = 10.71 min.

2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol (**T1**) : Deprotection of Boc on **27a** and racemization



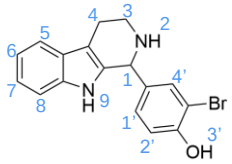
tert-butyl 1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate **9a** (1 eq., 50 mg, 0.11 mmol) is dissolved in DCM (5 mL), then TFA (10 eq., 129 mg, 0.1 mL, 1.13 mmol) is added. The reaction mixture is stirred at room temperature until the starting material disappears. Dichloromethane is evaporated under reduced pressure and the residue is suspended in HCl saturated diethyl ether solution. The mixture is filtered on Buchner to give 2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride (32 mg, 0.09 mmol, 75%). The product is analyzed by chiral analytic HPLC which reveals the presence of the two enantiomers.

(9H-fluoren-9-yl)methyl-1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2 carboxylate (**27b, R and S**) : Protection of **T1** with a Fmoc and enantiomers separation



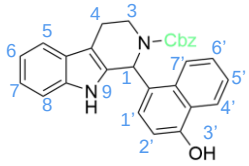
2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol hydrochloride **T1** is first washed with an aqueous 5% K_2CO_3 solution in order to remove the hydrochloride salt. To a solution of the basic tryptolin (1 eq., 185 mg, 0.54 mmol) in THF (5 mL) is added triethylamine (1.2 eq., 65 mg, 0.1 mL, 0.65 mmol). Finally, fmoc chloride (0.95 eq., 132 mg, 0.51 mmol) dissolved in THF (5 mL) is added dropwise and the reaction mixture is stirred at room temperature for 24h. Brine is added to hydrolyze the reaction mixture and 1N HCl is added dropwise until pH 4-5 in order to remove the excess of triethylamine. After extraction with AcOEt, the organic phase is dried over sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The obtained oil is purified by flash chromatography with a gradient Cyclohexane/AcOEt 8:2 to 7:3, to give racemic (9H-fluoren-9-yl)methyl-1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate (222mg, 0.39 mmol, 73%). $C_{32}H_{25}BrN_2O_3$. MW = 565.47 g.mol^{-1}. Rf = 0.78 (DCM/MeOH + few drops of ammonia). LCMS : t_R = 3.60 min. $[M-H]^-$ = 563.2 Da. $[M+H]^+$ = 565.1 Da. The two enantiomers are separated following the preparative chiral HPLC method : flow rate = 120 mL.min^{-1}, eluents = A/C/D 30:60:10, t_R (enant1) = 20 min, t_R (enant2) = 45 min. Analytical chiral HPLC method : flow rate = 1.5 mLmin^{-1}, eluents = A/C/D 30:60:10, t_R (enant1) = 17.18 min, t_R (enant2) = 27.98 min.

2-bromo-4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}phenol (**T1**) : Deprotection of Fmoc on **27b** and racemization



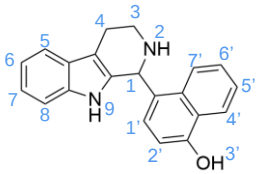
(9H- fluoren -9 -yl) methyl -1- (3 - bromo - 4 - hydroxyphenyl) - *1H, 2H, 3H, 4H, 9H* - pyrido [3,4-b] indole - 2 carboxylate **9b** (1 eq., 35 mg, 0.06 mmol) is dissolved in THF (3 mL) and then piperidine (16.4 eq., 86 mg, 0.1 mL, 1.01 mmol) is added. The reaction mixture is stirred at room temperature for 8h. The reaction mixture is washed with water, filtered on Buchner in order to eliminate the precipitate which is fluorene derivative with piperidine. Brine is added to the filtrate, which is extracted with ethyl acetate. Rf = 0.29 (DCM/MeOH + few drops of ammonia). The product is analyzed by chiral analytic HPLC which reveals the presence of the two enantiomers.

benzyl 1-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate (**27c, R and S**) : Protection of **T4** with a Cbz and enantiomers separation



4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol hydrochloride **T4** (0.9 eq., 200 mg, 0.57 mmol) is put in suspension in THF (14 mL) at 0°C and triethylamine (3 eq., 193.12 mg, 0.27 mL, 1.908 mmol) is added. Finally, benzyl chloroformate (0.95 eq., 128.87 mg, 0.107 mL, 0.604 mmol) dissolved in THF (8 mL) is added dropwise. The reaction mixture is allowed to warm to ambient temperature and stirred at room temperature for 2 days. The reaction mixture is diluted in dichloromethane, water is added to hydrolise and 1N HCl is added dropwise until pH 4-5 in order to remove the excess of trimethylamine. After extraction with dichloromethane, the organic phase is dried over sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude is purified by flash chromatography (gradient until Cyclohexane/Acetone 85:15) to give racemic benzyl 1-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate **10** (210 mg, 0.47 mmol, 82%) as an brown oil. $C_{29}H_{24}N_2O_3$. MW = 448.52 g.mol^{-1}. Rf = 0.51 (Cyclohexane/AcOEt 7:3). LCMS : t_R = 2.36 min. $[M-H]^-$ = 447.3 Da. $[M+H]^+$ = 449.3 Da. The two enantiomers are separated following the preparative chiral HPLC method : flow rate = 120 mL.min^{-1}, eluents = A/C/D 50:40:10, t_R (enant1) = 11.41 min, t_R (enant2) = 19.43 min. Analytical chiral HPLC method : flow rate = 1.5 mLmin^{-1}, eluents = A/C/D 65:25:10, t_R (enant1) = 9.82 min, t_R (enant2) = 15.29 min.

4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol (**T4**) : Deprotection of Cbz on **27c** and racemization



benzyl 1-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)-*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indole-2-carboxylate **10** (1 eq., 36 mg, 0.0803 mmol) is solubilized in EtOH (10 mL) and a spatule of 10% Pd/C is added. The reaction mixture is hydrogenated during a night at room temperature. The reaction mixture is filtered on celite and the filtrate is evaporated to give 4-{*1H,2H,3H,4H,9H*-pyrido[3,4-b]indol-1-yl}naphthalen-1-ol (20 mg, 0.064 mmol, 79.26%). The product is analyzed by chiral analytic HPLC which reveals the presence of the two enantiomers.

In vitro activity and cytotoxicity of synthesized compounds

In vitro antiplasmodial activity against *P. falciparum* HB3 or Dd2 strains

P. falciparum strains (PfHB3 and PfDd2) are cultured with RPMI 1640 supplemented with albumax 0.4%, Hepes 25 mM, gentamycin 20 µg/mL, hypoxanthine 0.2 mM and O+ red blood cells group from EFS (Etablissement Français du Sang), at 37 °C, 5% CO_2.

The compounds are tested on ring-enriched cultures of *P. falciparum* chloroquino-susceptible strain HB3 or resistant strain Dd2 at a starting parasitemia of 0.5% and a hematocrit of 0.6%. Several controls are used : healthy red blood cells as a positive control, parasitized red blood cells as negative control, chloroquine at 500 nM as a positive inhibition control and DMSO diluted at 1/40 as negative inhibition control. Concerning the compounds, which are initially diluted in 2 mM DMSO solution, a first screening is performed at concentrations of 10, 1 and 0.1 µM. The IC_{50} is only determined for compounds inhibiting 100% of parasite growth at 1 µM. A range of one-half dilutions of the compound is performed, generally starting from the initial concentration of 20 µM to the final concentration of 9.77 nM, in duplicate wells. The compounds and parasitized red blood cells are still incubated for 48h at 37°C under 5% CO_2 atmosphere. Then SYBR ™ Green I 10 000X (Invitrogen) diluted in 20 mM Tris and 138 nM NaCl at pH8.8 is added to each well to reach the final concentration of 1X. Incubation is performed in the dark for 30 min at room temperature and fixation is performed with 5% *paraformaldehyde* (PFA), to have a final concentration of PFA at 1% in each well, at 4°C in the dark until flow cytometry analysis. Finally, the fluorescence is read directly in 96-well plates using the Attune Nxt (Invitrogen) flow cytometer autosampler, and a non-linear dose-concentration regression curve with 12 concentrations is established to determine the IC_{50} of the compound using log-linear interpolation (www.antimalarial-icestimator.net) and the mean values (± SD) were calculated based on results from at least three independent experiments.

Cytotoxicity on human foreskin fibroblasts (HFF) or human liver cells (HepG2) cell lines

HFF (human foreskin fibroblasts) and HepG2 (liver hepatocellular carcinoma cells) cells are incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 5 mM glutamine, without antibiotics. For HepG2 cell line, culture plates are coated with porcine gelatine (Sigma-Aldrich) at 0,1% for 20 min at room temperature before cell seeding. Then, cells are seeded in a 96-well cell culture plate to reach a sub-confluent culture. Several controls are used: a chloroquine dilution range contained in the culture medium from 400 µM to 3.125 µM (positive control), a dilution range of DMSO generally from 0.8% to 0.006% performed in the same way as for the tested compounds (negative control), medium alone without cells in the presence of Alamar blue and medium alone without cells and without Alamar blue.

Regarding the compounds, a range of one-half dilutions of the compound is performed, generally starting from the initial concentration of 400 µM to the final concentration of 3.125 µM, in triplicate. The compounds and cells are still incubated for 72h at 37°C under 5% CO_2 atmosphere. Then Alamar blue ™ HS 10X (Invitrogen) is added to each well, except those in columns corresponding to the control without Alamar blue, to reach the final concentration of 1X. Incubation is performed for 24 hours at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere. The living cells change the color of the reagent from blue (resazurin) to red (resofurin). Finally, the absorbance is read directly in 96-well plates with the Spark autosampler (Tecan) at 570 and 600 nm, and a non-linear dose-concentration regression curve with 8 concentrations is established to determine the IC_{50} of the compound, using log-linear interpolation (https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator) with mean values (± SD) determined over at least two independent experiments. Then, the ratio between the IC_{50} on human cells and the IC_{50} on *P. falciparum* is calculated for each molecule, corresponding to the selectivity index.

Production of recombinant protein PfPPM9r-83

The 6-His tagged PfPPM9-83 protein is produced in *E. coli* BL21 or *E. Coli* LOBSTR-BL21(DE3) bacteria. Firstly, competent bacteria that have incorporated the plasmid (pETDuet-1) containing the gene encoding PfPPM9 are precultured in LB medium (Lysogeny broth) in which the antibiotic ampicillin (100 µg/mL final) and manganese and magnesium ions (1 mM final) are added, at 37°C under agitation at 200 rpm overnight (O/N)(*Figure 66*). This is then diluted to 1/10, a ratio allowing optimal oxygenation, then, after shaking at 200 rpm at 37°C until the optical density (OD) rises between 0.8 and 1, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 0.5 mM final) is added to induce production, taking place O/N at 16°C, 200 rpm. Finally, the cultures were centrifuged twice (15 min, 3 900 rpm, 4°C), yielding dry pellets stored at -80°C. Production is verified by Western blot with non-induced and induced samples.

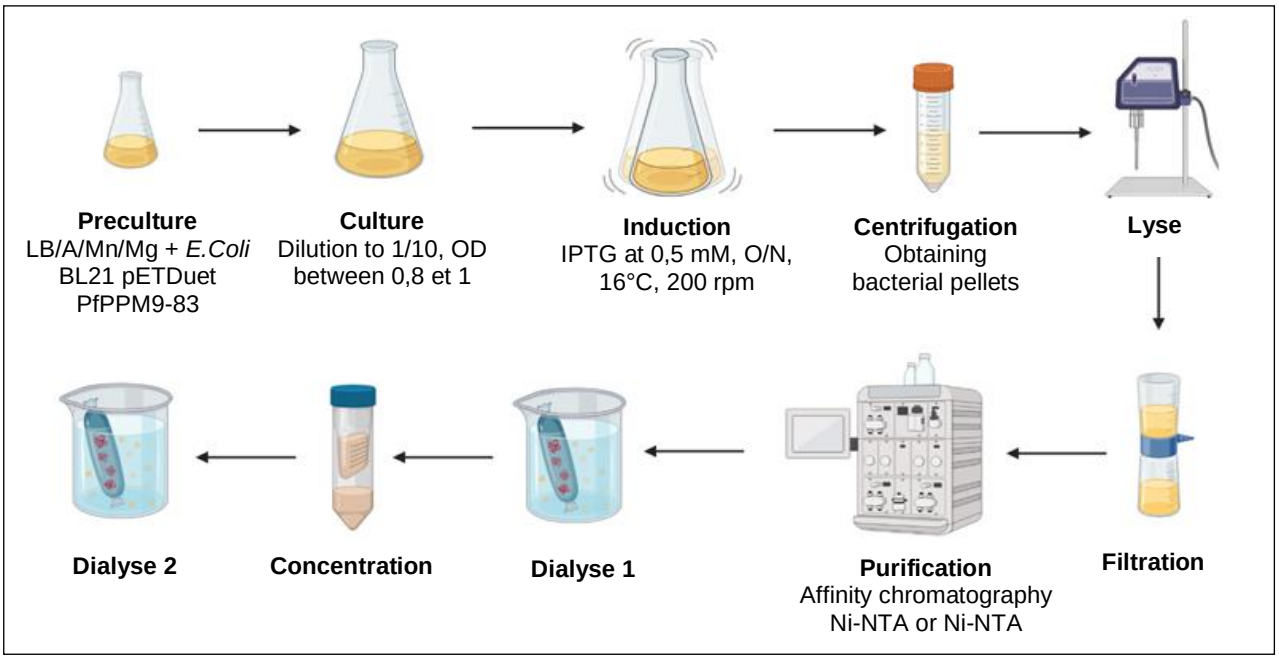


Figure 66. Schematic description of the different stages of the production and purification of PfPPM9r-83

Purification of recombinant protein PfPPM9r-83

After thawing the bacterial pellets on ice at 4°C O/N, they are suspended in lysis buffer for 1h (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1%Triton, DNAse: 15 µL per 150 mL of buffer, 3 protease inhibitor pellets (cOmplete™ EDTA-free, Roche, ref : 05056489001) per 150 mL of buffer, 26.7 mg/mL lysosyme, pH 7. 5) before being mechanically fragmented by sonication

(Branson Digital Sonifier, 3 min 20, 200 W)(*Figure 66*). The filtrate obtained after centrifugation (18'000 rpm, 30 min, 4°C) is filtered through 0.45 µm and purified. Two purification methods are used here: affinity chromatography or beads, which have the same principle of purification with nickel ions.

Affinity chromatography on a nickel column (Protino Ni^{2+}-NTA, Machery Nagel) uses an NTA ligand (nickel-nitrilotriacetic acid) pre-loaded with nickel ions capables of interacting with the polyhistidine tag (6-His) of the recombinant proteins. Once the proteins have been fixed, a washing step is carried out to remove all other proteins (20 mM Tris, 150 mM Nacl, 20 mM Imidazole, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.5), followed by an elution step to remove the protein of interest (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 600 mM Imidazole, 1 mM $MnCl_2$,1 mM $MgCl_2$, pH 7.5). Finally, after checking with Coomassie blue, the fractions containing the protein with the expected molecular weight are dialysed (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.5), concentrated on a 30 kDa centricon and dialysed a second time in a less concentrated buffer without ions (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5).

The beads also contain an NTA ligand loaded with nickel ions. In the first step, the beads are equilibrated with wash buffer, the same as used in chromatography, by 3 rounds of reversal and centrifugation (2'000 rpm, 3 min, 4°C). They are then placed in contact with the filtered solution of proteins O/N at 4°C and centrifuged (4'300 rpm, 3 min, 4°C). Unbound proteins are removed by a series of 10 washes in the same buffer by reversal and centrifugation (4'300 rpm, 3 min, 4°C). The protein of interest is then eluted with the same elution buffer as before, for 1h at 4°C, and centrifuged (4'300 rpm, 15 min, 4°C). Finally, the proteins collected are dialysed (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0.25 mM $MnCl_2$, pH 7.5), concentrated and dialysed a second time (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5). Finally, in both cases, the proteins are quantified by the BCA method.

Enzymatic activity measurement of PfPPM9r-83

The phosphatase activity of PfPPM9r-83 produced is quantified by the Malachite Green assay (MAK307, Sigma-Aldrich).[122] With this colorimetric assay, the concentration of free orthophosphates in aqueous medium is measured after complexation with molybdate and malachite green. It is highly sensitive, simple and fast, including a single addition step to determine the phosphate level. Bovine α-casein (Sigma-Aldrich), a polypeptide with 7 phosphorylated serines, is used as substrate.

In a 96-well flat-bottom plate, PfPPM9r-83 phosphatase at different final concentrations is incubated for 1h at 37°C with the presence of α-casein (125 µg/mL final) in a total volume of 80 µL of buffer (100 mM Tris, 2.5 mM $MnCl_2$, pH 7.4). Two negative controls are run to validate the plate: one containing only buffer to rule out contamination from an external phosphate source, and the other containing buffer and substrate, used as a blank. Finally, 20 µL of Working Reagent containing malachite is added to all the wells and the plate is incubated for 30 min at 20°C. Optical density, directly correlated to the level of phosphates released, is measured for each well on the Spark™ microplate reader at 620 nm.

Inhibition measurement of enzymatic activity of PfPPM9r-83

The search for phosphatase inhibition by **H1** and **T17** hits is carried out as before using the Malachite Green assay.[122] For both compounds, a range of one-half dilutions of is performed, starting from the initial concentration of 600 to 0.3 µM for **T17** and 1'200 to 1.2 µM for **H1**. PfPPM9r-83 is first pre-incubated for 10 min at 37°C in the presence of the different concentrations of each of the molecules, then α-casein (62.5 µg/mL final) is added to initiate enzymatic activity. The plate is then treated in the same way as before: incubation for 1h at 37°C, addition of 20 µL of Working Reagent, incubation for 30 min at 20°C and measurement of the OD of each well at 620 nm. The blank corresponds to the wells containing buffer, α-casein substrate and each molecule concentration. The presented OD results correspond to the difference between the OD of the well containing all the reagents (enzyme, molecule and substrate) and that of the blank without enzyme. Sanguinarine, a known PP2C inhibitor,[125] is used as a positive control (600 - 0.3 µM range) and okadaic acid and tautomycin, inhibitors of PP1 and PP2A[124] phosphatases, as negative controls (100 µM final). Dose-effect curves are plotted using GraphPad Prism 8.3.0 software on a semi-logarithmic scale and IC_{50} are determined for each molecule on the AAT Bioquest - IC calculator website (https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator). All the experiments were carried out in triplicate.

Pharmacokinetic experiments

Ethics statement for animal experimentation

All laboratory animal work is carried out in accordance with European Directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by local animal welfare ethics review bodies. Experiments are generally conducted in pathogen-free 6-8 weeks old male CD1 mice, maintained in filter cages. Animal welfare is assessed daily, and animals are humanely killed upon reaching scientific or clinical endpoints (Project licences: Mice experiments: CEEA-75 Comité d'Ethique en Expérimentation Animale, Nord -Pas de Calais, France: APAFIS#18905-2019020111166978v2).

Experimental studies in mouse

For intraperitoneal (IP) administration, **T16**, **T17**, **T20** et **T26** molecules, each in 50 mM DMSO solution, are first diluted in phosphate buffer saline (PBS) with 1,25% Tween 80 to avoid precipitate formation. They are then injected by IP route (injected volume: 0.25 mL) into CD1 male mice (35-45 g) at a dose of 10 mg/kg (3 mice per molecule). Blood samples of 50 µL were taken retro-orbitally using capillary tubes with heparin haematocrit at times 2', 5', 8', 20', 30', 1h, 2h, 6h, 8h and 10h. The blood is immediately collected in EDTA microtubes and centrifuged for 10 min at 2000 G at 4°C. The plasmas obtained are then frozen at -20°C for no more than 2 days.

For oral administration, **T17** and **P2** molecules are first formulated in hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) complex. Beforehand, a 50% solution of HPβCD is prepared by diluting 10g of HPβCD in 10 mL of water on a slow-motion shaker. Then, the day before the experiment, the solution is added dropwise under slow shaking to the **T17** and **P2** molecules, each in 100 mM DMSO solution, to give a final concentration of 25%. PBS is then added dropwise and the pH of the resulting solution, which should be between 6 and 8, is measured. The formulations are administered by oral route (gavage, administered volume: 0.30 mL) to male CD1 mice (30-35 g) at doses of 10 and 30 mg/kg (3 mice per molecule per dose). As before, samples of 50 µL of blood are taken at 2', 5', 10', 30', 2h, 8h, 10h and 24h, the blood is centrifuged for 10 min at 2000 G at 4°C and the plasmas are frozen at -20°C for no more than 2 days.

Verification of compound encapsulation in HPβCD by NMR and measure of K_a

The entire NMR study is realized and analyzed by the Pr. Stéphanie Delbaere (Équipe BBC, Inserm UMR-S1172). To verify the formation of the complex **T17**-HPβCD, ^{1}H NMR spectrums of **T17** at 18 mM in D_2O/DMSO (9:1), of HPβCD at 18 mM in D_2O and of **T17**-HPβCD (1:1) are recorded and chemical shift of protons on free and complexed **T17** spectrums are compared. Then, a 2-dimensional ROESY experiment between **T17** and HPβCD is recorded in D_2O/DMSO to determine the complex geometry by observation of correlation spots.

The complex stoichiometry is determined by the Job method, consisting of recording ^{1}H NMR spectra by varying **T17** and HPβCD concentrations under 2 conditions: equal initial concentrations and constant volume mixing. Here, seven ^{1}H NMR spectrums are recorded with molar fractions (r) presented in *Table 22*. From these spectrums, the difference in chemical shift $\Delta\delta_{obs}$ between a free **T17** or HPβCD proton and the same proton in complexed form, which is proportional to the formation of the complex **T17**-HPβCD, therefore to r, is deduced and the curves of $\Delta\delta_{obs}$.[**T17**] = f(r) and $\Delta\delta_{obs}$.[HPβCD] = f(r) are plotted. A maximum of r = 0,5 means that the complex has a 1:1 stoichiometry.

Concentrations (mM)		**Corresponding molar fractions r**	
[**T17**]	[HPβCD]	**T17**	HPβCD
5	0	1	0
4	1	0,8	0,2
3	2	0,6	0,4
2,5	2,5	0,5	0,5
2	3	0,4	0,6
1	4	0,2	0,8
0	5	0	1

Table 23. Conditions used to record ^{1}H NMR spectrums to determine the geometry of the complex **T17**-HPβCD

In the same way, Scott method is applied to a **T17** proton. This method is used to graphically determine K_a in the case of a complex with a 1:1 stoichiometry. Seven ^{1}H NMR spectrums are recorded with constant concentration of 0,575 mM of **T17** and increasing concentrations of HPβCD from 0 to 10 mM. The difference in chemical shift $\Delta\delta_{obs}$ between a free **T17** proton and the same proton in complexed form is deduced and reported according to [HPβCD] / $\Delta\delta_{obs}$ = f([HPβCD]). The equation of the straight line obtained is used to determine K_a thanks to: $\frac{[HP\beta CD]}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{[HP\beta CD]}{\Delta\delta_c} + \frac{1}{K_a.\Delta\delta_c}$ with $\Delta\delta_c$ the maximum observable variation in chemical shift.

Quantification of molecules in plasma samples by LC-MS/MS

Samples preparation

At the PSM platform of the GRITA team (Pr. Jean François Goossens, Dr. Mostafa Kouach; Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées ULR 7365 - GRITA and Plateau de Spectrométrie de Masse (I168ULD), UFR3S - Pharmacie de Lille), molecules in each sample are extracted from the plasma by protein precipitation, before being quantified. In the first extraction step, proteins from the plasma (5 µL), to which an internal standard solution is added (**AMT44**, 50 nM, 50 µL), are precipitated using cold methanol (945 µL) and a 10 min freeze at -20°C, then removed after centrifugation for 10 min at 4000 G at 4°C. The methanol is evaporated and molecules are recovered in 40 µL of methanol and then quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In parallel, a calibration range is prepared in the same way in healthy plasma (10 µL), containing the different molecules from 1 to 400 nM and the internal standard **AMT44** at 50 nM, as well as a double blank without molecule and without internal standard and a blank without molecule and with internal standard (50 nM).

Samples quantification

LC-MS/MS analysis is performed on a UFLC-XR device (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo VTM ion source. Instrument control, data acquisition and processing are performed using Analyst 1.7.2 software.

Before quantification, optimisation is necessary and takes place in three stages:

- Direct introduction (without using HPLC) to determine the pseudomolecular ions and the mass/charge ratios of the specific fragments (quantifying ions and qualifying ions).
- Continuous flow injection analysis (FIA) to optimise mass spectrometer parameters.
- HPLC-MS/MS coupling for chromatographic separation of molecules and their mass determination using Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode.

The Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC) separation is carried out on a Kinetex Biphenyl column (100 x 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å) with guard cartridge from Phenomenex (Le Pecq, France). The injection volume is 2 µL. The oven temperature is set at 50 °C. Elution is performed at a flow rate of 400 µL/min with water - 0.1% formic acid as eluent A and methanol - 0.1% formic acid as eluent B, employing a 1 min plateau with 20% B and a linear gradient from 20% B to 90% B in 5 min, followed by a 1 min plateau with 90% B, 1 min linear gradient from 90% to 20% B and 1 min at 20% B to recondition the column. The injection duty cycle is 9 min.

MS analysis is carried out in positive ionization mode. The ion source parameters were optimized and set as follows: ion spray voltage: 5500 V. Nebulizer gas (air) and curtain gas (nitrogen) flows: 55 and 25 psi respectively. Source temperature: 600 °C with the auxiliary gas flow (air) set at 55 psi. Declustering Potential (DP): 60 V. Entrance potentiel (EP): 10 V. Collision Cell Exit Potential

(CXP): 25 V. Needle position: vertical 3, horizontal 7. The mass spectrometer is operated at a unit resolution for both Q1 and Q3 with a dwell time of 50 ms in each transition.
Each molecule is identified by its retention time and by the mass of its corresponding pseudomolecular ion $[M+H]^+$ as well as the mass of two specific fragments (quantifying ion and qualifying ion). The presence of each intact molecules and fragments were tracked by multiple reaction monitoring (MRM) transitions with the presented conditions in *Table 23*.

Compounds	Q1 (MW + 1)	Q3 (fragments)	Corresponding ions	CE (eV)
AMT44 (internal standard)	283	254	quantifying	21
		240	qualifying	21
T16	399	370	quantifying	30
		291	qualifying	30
T17	371	342	quantifying	23
		215	qualifying	23
T20	371	342	quantifying	21
		286	qualifying	37
T26	405	376	quantifying	27
		249	qualifying	21
P2	442	324	quantifying	35
		399	qualifying	25

Table 24. Conditions used to track transitions in MRM mode for **T16**, **T17**, **T20**, **T26** and **P2** compounds

The analytical method developed in this way allows the quantification of **T16**, **T17**, **T20** et **T26** and **P2** within the range of 1 to 400 nM. **AMT 44** is used as an internal standard at 50 nM. Concentration = f(time post-injection) curves are plotted using GraphPad Prism 8.3.0 software.

Determination of PK parameters

Pharmacokinetic parameters for each molecule studied are determined by Dr. Nicolas Kambia (GRITA, Faculte de Pharmacie de Lille) using "PharmacoKin, version 2014" software (MathWorksR, USA) such as: the maximum plasma concentration ($\mathbf{C_{max}}$), the time to $\mathbf{C_{max}}$ ($\mathbf{t_{max}}$), the half-life ($\mathbf{t_{1/2}}$), the area under the plasma concentration-time curve (AUC from time zero to infinity, calculated by the trapezoidal rule) as well as the volume of distribution ($\mathbf{V_d}$), and the total plasmatic clearance ($\mathbf{Cl_T}$) following extravascular administration.

In vivo antimalarial activity in *P. faciparum* infected humanized mice

Preparation of *P. falciparum* infected mice

The entire study is outsourced and realized by the team of Dr. Iñigo Angulo-Barturen from TAD society (The Art of Discovery, Derio-Bilbao, Espagne).[101,150] The used *P. falciparum* strain is Pf3D70087/N9 and it is exclusively maintained *in vivo* to avoid the loss of competence to grow in humanized mice after short term *in vitro* culture.

Immunodeficient female NOD-scid IL-2Rγ^{null} mice (22-28 g) are engrafted with human erythrocytes to have a minimum of 40 % of human erythrocytes circulating in peripheral blood during the whole experiment. Each mouse is inoculated by IP route with a 50% hematocrit erythrocyte suspension (1 mL)(Basque Center of Transfusion and Human Tissues, Galdakao, Spain, Centro de Transfusiones de la Comunidad de Castilla y León, Valladolid, Spain and Bank of Blood and Tissues, Barcelona, Spain) in RPMI1640 medium, 25% (vol/vol) decomplemented human serum, 3.1 mM hypoxanthine, daily from about 10-12 days before infection until day 5 of assay. When they reach at least 40% human erythrocyte in peripheral blood, they are infected once by inoculation of *P. falciparum* infected-erythrocyte suspension (0.3 mL) by the lateral vein of the tail.

In vivo antimalarial activity by intraperitoneal route

Drug treatment started at Day 1 of the study when infected mice had ~1-2% patent parasitemia (denoted as P0). Before drug administration, each infected mouse is randomly assigned to its corresponding treatment. The treatment, **T17** at 10, 30 or 60 mg/kg, is administered by IP route once time per day for four days (10 mL/kg bodyweight).

The study includes three biological controls:

- Parasite density estimate at treatment inception: distribution of parasitemia at day 1 of the study for all individuals tested in the study compared to parasitemia distributions in previous experiments.
- Parasite growth during two cycles of asexual erythrocytic replication in untreated HuMice: Evaluation of parasite growth in untreated and/or vehicle-treated individuals from day 1 to day 5 of the Study
- Antimalarial response: Measurement of the parasite burden from day 1 to day 5 of the study in individuals treated with a known dose of a standard antimalarial.

The rate of clearance of *P. falciparum* from peripheral blood of mice, assessed as the Parasite Reduction Ratio after one parasite cycle of drug exposure, is calculated as the ratio between parasitemia at Day n+2 divided by parasitemia at Day n for each individual of the study. Parasitemia is measured by flow cytometry (Attune NxT Acoustic Focusing Flow Cytometer, InvitroGen) from 2 µL

samples of tail blood. It is expressed as the % of parasitized erythrocytes with respect to the total erythrocytes in circulation and/or as the absolute concentration of circulating parasitized erythrocytes. Multivariate linear regression, logistic regression and descriptive statistics are carried out using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Probability values $P < 0.05$ are considered significant.

In vivo antimalarial activity in *P. berghei* infected mice

Preparation of *P. berghei* infected mice

The cycle of *P. berghei* ANKA is maintained at the Pasteur Institute of Lille. Cryopreserved wild-type parasites are injected intraperitoneally into male CD1 mice (22-24 g, Charles River Laboratories). Parasitemia of the mice is daily monitored by performing rapid Giemsa stained blood smears (RAL Diff-QuikTM, RAL Diagnostics), by taking a drop of blood from the tail. The cycle is maintained by IP injection of infected blood cells from parasitized mice to naive mice.

To begin, *P. berghei* ANKA parasites conserved in liquid nitrogen are thawed and injected intraperitoneally into 2-3 mice (10^6 infected red blood cells (RBC) / mouse). When parasitemia reached 3-5%, mice are exsanguinated and groups of 6 male CD1 mice are infected with $1{,}5x10^6$ *P. berghei* ANKA parasites (day 0).

In vivo antimalarial activity by intraperitoneal route

The efficacy of the **T17** compound is evaluated using the Peters 4-day suppressive test [102] by IP route at 10 and 30 mg/kg. Mice are treated twice a day on days 0, 1, 2 and 3 (injected volume: 0,30 mL). As a positive control, five mice receive chloroquine (CQ, IP route) at 10 mg/kg, once a day, for four days. As a negative control, 6 mice receive 7% DMSO, 1,25% Tween 80 in PBS, twice a day, for four days. On day 4 post-infection, the peripheral blood parasitemia is assessed in all mice by microscopic examination of Giemsa-stained thin blood smears. Parasitemia is also monitored at day 7 and 9 post-infection and the percentage of parasitemia depending of the time post-injection curves are plotted using GraphPad Prism 8.3.0 software. Blood samples of 50 µL are also taken retro-orbitally on day four using capillary tubes with heparin haematocrit for **T17** dosing. The blood is immediately collected in EDTA microtubes and centrifuged for 10 min at 2000 g at 4°C. The obtained plasmas are then frozen at -20°C. **T17** is quantified by LC-MS/MS with the same procedure as in the pharmacokinetic studies. The animal experimental groups are organized as follows:

- 6 CD1 mice treated by **T17** at 10 mg/kg by IP route, twice a day for 4 days
- 6 CD1 mice treated by **T17** at 30 mg/kg by IP route, twice a day for 4 days
- 6 CD1 mice treated by **DMSO** (same formulation as compound) by IP route, twice a day for 4 days
- 5 CD1 mice treated by **CQ** at 10 mg/kg by IP route, once a day for 4 days

In vivo antimalarial activity by oral route

The efficacy of the **T17** compound is evaluated using the Peters 4-day suppressive test [102] by oral route at 30 mg/kg. Mice are treated once or twice a day on days 0, 1, 2 and 3 (injected volume: 0,30 mL). As a positive control, five mice receive chloroquine (CQ, oral route, injected volume: 0,20 mL) at 10 mg/kg, once a day, for four days. As a negative control, 6 mice receive 7,8% DMSO and

25% cyclodextrine in PBS, twice a day, for four days. On day 4 post-infection, the peripheral blood parasitemia is assessed in all mice by microscopic examination of Giemsa-stained thin blood smears. The animal experimental groups are organized as follows:

- 6 CD1 mice treated by **T17** at 30 mg/kg by oral route, once a day for 4 days
- 6 CD1 mice treated by **T17** at 30 mg/kg by oral route, twice a day for 4 days
- 6 CD1 mice treated by **DMSO** (same formulation as compound) by oral route, twice a day for 4 days
- 6 CD1 mice treated by **CQ** at 10 mg/kg by oral route, once a day for 4 days