

UNIVERSITÉ DE LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
JPArC INSERM UMR S-1172

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

*Spécialité : Sciences du médicament*

*Présentée et soutenue le 13 Octobre 2017*

*Par*

**Floriane GIBAUT**

**Conception, synthèse et évaluation  
d'inhibiteurs du complexe protéique  
YAP-TEAD à visée anticancéreuse**

*Membres du Jury*

Rapporteurs : **Pr. Sandrine Onger**, Professeur, Université de Paris-Sud  
**Pr. Anne-Sophie Voisin-Chiret**, Professeur, Université de Caen

Examineurs : **Pr. Sylviane Giorgi-Renault**, Professeur, Université Paris Descartes  
**Pr. Jean-François Guichou**, Professeur, Université de Montpellier

Directeur de thèse : **Pr Philippe Cotelle**, Professeur, ENSC Lille

Co-encadrant : **Dr Fabrice Bailly**, Maître de Conférences, Université de Lille

# REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent au Pr Philippe Cotelle, mon directeur de thèse (dit « Chef ») pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur cette thèse dans le GRAND NORD. Merci pour votre disponibilité, votre confiance et tous les tiramisus spéculos que vous m'avez apporté qui ont contribué fortement au bon déroulement de cette thèse. Je tiens à remercier profondément le Dr Fabrice Bailly, mon co-encadrant (dit « co-Chef »). Merci pour ton soutien infaillible durant ces trois ans, de ton encadrement et aide au sein du labo, de m'avoir fait découvrir tes secrets de la chimie (parfois dangereux), et pour toutes nos discussions chimiques (ou non). Ce fut un réel plaisir de travail avec vous deux et je crois bien que je vais « braire » en partant !

Je souhaite remercier le Professeur Patricia Melnyk, directrice du laboratoire "Onco et Neurochimie" pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Merci pour vos conseils et votre suivi tout au long de cette thèse.

Je remercie sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et notamment le Pr Anne-Sophie Voisin-Chiret et le Pr Sandrine Onger, rapporteurs de cette thèse, pour le regard critique et avisé envers ce manuscrit et le temps consacré à sa lecture. Je remercie également le Pr Sylviane Gorgi-Renault et le Pr Jean-François Guichou d'avoir accepté de rôle d'examineur.

Je remercie du fond du cœur tous les membres de l'équipe « Onco et Neurochimie » qui ont chacun apporté leur petite touche personnelle dans cette thèse. Je commencerai par le Dr Laurence Agouridas. Je pourrais en dire très long mais simplement merci de ton soutien sans faille, de ta gentillesse, de nos potins et de m'avoir initiée aux mots fléchés ! J'inclus également le Dr Séverine Ravez pour sa joie de vivre au quotidien, le Dr Jamal El Bakali pour son « Bye » tous les soirs, son éloquence qui m'étonnera toujours et les moments kébabs. Merci à Polo pour toutes les petites attentions que tu as pu avoir et nos moments d'égarements au labo, et à Maxime, génie de la modélisation à la biologie, pour ton aide précieuse et ta sérénité que j'admire. Un grand merci au Dr Nicolas Lebègue et au Dr Said Yous, les rois de la chimie. Merci de m'avoir fait partager vos recettes de chimie mais surtout de m'avoir fait aimer la bière grâce aux rituels KBP et Badau.

Comment ne pas dire un mot sur toi, Manon. Merci d'avoir donné vie à ce bureau, d'être là dans les bons comme les mauvais moments, de m'avoir fait découvrir le Ch'ti et d'avoir partager mes histoires les plus folles avec toi. Je ne te remercierai jamais assez de ton amitié qui m'a été indispensable.

Merci également à mes autres partenaires de bureau, Florian et Raphaël, pour nos moments de décompression. Une pensée forcément pour mon ancienne camarade de bureau, le Dr Marion Gay, qui m'a légué le fameux Révéleris (et tous ses problèmes) mais également pour son soutien et sa bonne humeur au quotidien.

Je souhaite également remercier le Dr Catherine Baud et Mme Mathilde Coevoet pour leur temps passé à m'expliquer la biologie et leur implication dans le projet.

Cette thèse m'a permis de collaborer avec de nombreuses équipes pluridisciplinaires. Je remercie le Docteur Catherine Foulon et Madame Anne-Sophie Drucbert pour m'avoir initiée aux techniques biophysiques. Je tiens aussi à remercier le Dr Matthieu Corvaisier et le Pr Guillemette Huet pour leur participation aux résultats biologiques.

Je souhaite également remercier les personnes en charge de la RMN et plus particulièrement le Docteur Stéphanie Delbaere pour toutes les études nOe qu'elle a pu faire pour résoudre les structures des composés.

Un merci également aux modélisateurs, le Dr Amaury Farce pour son temps passé sur le criblage virtuel et sur la découverte de « THE » molécule. Sans oublier, le Dr Nicolas Renault qui m'a grandement aidé dans la compréhension de la modélisation moléculaire, sa contribution dans le projet mais également pour les barbecues et un Euro mémorable !

Mes remerciements vont également au Docteur Xavier Thuru pour sa contribution non officielle dans le projet. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer les interactions moléculaires et d'avoir apporté des idées neuves. J'associe également son bras droit Mr Romain Magnez, à la base mon collègue de derrière en MDD et maintenant un partenaire aussi bien dans le travail que dans les sorties. Merci à tous les deux pour votre aide et votre accueil chaleureux dans le bureau.

J'adresse une énorme merci au Pr Jean-François Guichou et au Dr Frédéric Allemand pour avoir apporté le soleil dans ma thèse. Merci de m'avoir accueilli à plusieurs reprises dans le sud avec votre accent chantant, d'avoir accepté le challenge de la fameuse protéine. Merci de m'avoir fait découvrir la cristallographie et la biologie moléculaire, et de m'avoir montré ce qu'est une nuit au Synchrotron et un vrai barbecue !

J'ai également été très heureuse de pouvoir rencontrer le Dr Vangelis Agouridas qui m'a offert l'opportunité de faire du monitorat. J'inclus également le Dr Marine Cargoët, binôme de monitorat mais surtout amie essentielle sans qui Lille n'aurait jamais été pareil.

Je souhaite également remercier la ville de Lille pour m'avoir fait découvrir la bière mais surtout de m'avoir fait vivre toutes les histoires les plus extraordinaires qui soient qui ont bien rythmées ma thèse et la vie du labo.

Pour finir, je remercie profondément mes ami(e)s et ma famille de m'avoir toujours soutenue et d'avoir toujours été là pour moi. Merci de m'accompagner aux quatre coins du Monde et aux merveilleux petits plats cuisinés par Mamie qui m'ont fait me sentir comme à la maison. Si j'en suis là c'est grâce à vous et je ne vous dirai jamais assez que «je vous aime tous très fort».

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## ***Publications***

Gibault F., Sturbaut M., Bailly F., Melnyk P., Cotelle P. Targeting TEAD's interactome, *J. Med. Chem.* **2017**, en révision.

Gibault F., Bailly F., Corvaisier M., Coevoet, M., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway, *ChemMedChem.* **2017**, *12*, 954-961.

Gibault F., Corvaisier M., Bailly F., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Non-photoinduced biological properties of Verteporfin, *Curr Med Chem.* **2016**, *23*, 1171-1184.

## ***Communications orales***

Gibault F., Farce A., Bailly F., Corvaisier M., Renault N., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. From virtual screening to biological evaluation of triazole derivatives as YAP-TEAD complex inhibitors for anticancer treatments, Protein-Protein Interactions, (Londres, Royaume-Uni, 5-6/12/2016)

Gibault F., Corvaisier M., Bailly F., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Design and synthesis of YAP-TEAD complex inhibitors as new anticancer drugs, 30<sup>ème</sup> journées franco-belges de pharmacochimie (Amboise, France, 25-27/05/2016)

Gibault F., Farce A., Bailly F., Corvaisier M., Renault N., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Design and synthesis of YAP-TEAD complex inhibitors as new anticancer drugs, 7<sup>th</sup> PhD Student Day (Lille, France, 19/04/2016)

Gibault F., Corvaisier M., Bailly F., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Conception et synthèse d'inhibiteurs du complexe protéique YAP-TEAD à visée anticancéreuse, 16<sup>ème</sup> Rencontres de Chimie Biologiques (Aussois, France, 13-17/03/2016)



### ***Communications par affiche***

Gibault F., Farce A., Bailly F., Corvaisier M., Renault N., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Design and conception of triazole derivatives as YAP-TEAD complex inhibitors for anticancer treatments, OncoLille Days (Lille, France, 30/11-01/12/2016)

Gibault F., Corvaisier M., Bailly F., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Design and synthesis of YAP-TEAD complex inhibitors as new anticancer drugs, 52<sup>nd</sup> International Conference on Medicinal Chemistry (Caen, France, 6-8/07/2016)

Gibault F., Corvaisier M., Bailly F., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Design and synthesis of YAP-TEAD complex inhibitors as new anticancer drugs, 30<sup>ème</sup> journées franco-belges de pharmacochimie (Amboise, France, 25-27/05/2016)

Gibault F., Corvaisier M., Huet G., Drucbert A-S., Bailly F., Melnyk P., Cotelle P. Design and synthesis of YAP-TEAD complex inhibitors as new anticancer drugs, 23<sup>ème</sup> Journée des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique (SCT) (Lille, 15-17/02/2016)

Gibault F., Corvaisier M., Bailly F., Huet G., Melnyk P., Cotelle P. Design and synthesis of YAP-TEAD complex inhibitors as new anticancer drugs, 6<sup>th</sup> PhD Student Day (Lille, France, 28/01/2015)

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>10</b>
<b>TABLE DES SCHEMAS .....</b>	<b>13</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>16</b>
<b>LISTE DES ACIDES AMINES .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>20</b>
<b>CHAPITRE 1 : LE CANCER .....</b>	<b>21</b>
I. Généralités sur le cancer .....	22
A. Définition.....	22
B. Typologie du cancer .....	22
C. Prévention, Dépistage .....	23
II. Le développement du cancer .....	24
A. Processus de cancérisation .....	24
B. Caractéristiques des cellules cancéreuses .....	26
III. Traitements anticancéreux .....	29
A. Chirurgie.....	29
B. Radiothérapie.....	29
C. Chimiothérapie.....	30
<b>CHAPITRE 2 : LA VOIE HIPPO .....</b>	<b>34</b>
I. La voie Hippo.....	35
A. Mécanisme de la voie Hippo .....	35

B.	Les effecteurs de la voie Hippo .....	38
C.	Régulation de la voie Hippo .....	45
II.	Les complexes YAP/TAZ/VGLL-TEAD .....	49
A.	Le complexe YAP-TEAD .....	49
B.	Le complexe TAZ-TEAD.....	54
C.	Le complexe VGLL-TEAD.....	56
III.	Dérégulation de la voie Hippo.....	59
A.	La voie Hippo et le cancer .....	59
B.	La voie Hippo : une nouvelle cible thérapeutique .....	62
<b>CHAPITRE 3 : LES INTERACTIONS MOLECULAIRES .....</b>		<b>68</b>
I.	Etudes des interactions moléculaires .....	69
A.	Les différents types d'interactions.....	69
B.	Approches mathématiques de l'interaction moléculaire.....	69
C.	Les techniques d'analyses .....	70
II.	Développement de différents tests.....	76
A.	Développement d'un test TSA .....	76
B.	Développement d'un test SPR.....	78
C.	Développement d'un test MST .....	82
D.	Développement d'un test FRET.....	84
<b>CHAPITRE 4 : CIBLER LA PROTEINE YAP.....</b>		<b>88</b>
I.	La Vertéporfine (VP).....	89
A.	VP : agent photosensibilisant pour la thérapie photodynamique .....	89
B.	VP : inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD .....	90
II.	Synthèse des dipyrroles.....	92
A.	Objectif et analyse retrosynthétique .....	92
B.	Synthèse de la dipyrrole 31.....	95
C.	Synthèse du composé 32 par réaction de Diels Alder.....	110
D.	Synthèse de nouvelles dipyrroles .....	113

III.	Evaluation.....	115
A.	Résultats physico-chimiques.....	115
B.	Résultats biologiques.....	116
<b>CHAPITRE 5 : CIBLER LA PROTEINE TEAD.....</b>		<b>120</b>
I.	Conception par modélisation moléculaire.....	121
II.	Validation du hit.....	124
III.	Conception des ligands de TEAD.....	126
A.	Positionnement de la molécule II dans la poche de TEAD.....	126
B.	Etude bibliographique.....	127
C.	Objectifs de travail et analyse rétrosynthétique.....	130
IV.	Synthèse des ligands de TEAD.....	131
A.	Analyse rétrosynthétique.....	131
B.	Synthèse des composés triazoliques.....	132
B.	Ajout de fonctions salifiables.....	147
C.	Fragmentation de la molécule 101.....	153
V.	Evaluation.....	156
A.	Validation du motif aminophényle.....	156
B.	Evaluation de derives commerciaux.....	157
C.	Evaluation des composés.....	159
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>162</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>		<b>169</b>
I.	Chemical synthesis.....	170
A.	Material and instrumentation.....	170
B.	Synthesis of dipyrin compounds.....	170
A.	Synthesis of triazole compounds.....	191
II.	Molecular modeling.....	279
III.	Binding tests.....	279
A.	Thermal Shift Assay.....	279

B.	Surface Plasmon Resonance.....	280
C.	MicroScale Thermophoresis.....	280
D.	Time-resolved FRET assay .....	281
IV.	Biology .....	281
A.	Cell cultures.....	281
B.	Western blot.....	281
C.	Luciferase Reporter Assay .....	282
D.	Real-time PCR.....	282
E.	Cytotoxicity assay .....	282
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>283</b>

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Processus de cancérisation.....	25
Figure 2 : Mécanisme d'action des anticancéreux .....	31
Figure 3 : Structure du Cisplatine .....	31
Figure 4 : Structures de la Doxorubicine et de l'Irinotécan.....	32
Figure 5 : Structure du 5-Fluorouracile .....	32
Figure 6 : Structure de la Vinblastine et du Paclitaxel.....	32
Figure 7 : Schématisation de la voie Hippo chez la drosophile et le mammifère .....	35
Figure 8 : Alignement des séquences hYAP1-2 $\delta$ et hTAZ.....	39
Figure 9 : Analogie entre YAP et TAZ <sup>17</sup> .....	40
Figure 10 : Différentes interactions avec YAP/TAZ <sup>95</sup> .....	41
Figure 11 : Alignements des séquences TEADs .....	42
Figure 12 : Représentation schématique des protéines TEADs <sup>17</sup> .....	42
Figure 13 : Alignement des séquences VGLLs .....	44
Figure 14 : Représentation schématique des protéines VGLLs <sup>47</sup> .....	44
Figure 15 : Structure cristallographique de hTEAD2 <sub>217-447</sub> avec l'acide palmitique (PDB 5EMV) <sup>55</sup> .....	45
Figure 16 : Voies de signalisation régulant la voie Hippo <sup>21</sup> .....	48
Figure 17 : Structure du complexe hYAP <sub>50-171</sub> -hTEAD1 <sub>209-426</sub> (PDB 3KYS) <sup>66</sup> .....	50
Figure 18 : Les trois interfaces du complexe hYAP <sub>50-171</sub> -hTEAD1 <sub>209-426</sub> (PDB 3KYS) <sup>66</sup> .....	51
Figure 19 : Structures primaires de hTEAD1-4 et mTEAD4, et, du domaine de liaison à TEAD de hYAP1-2 $\delta$ et mYAP <sup>66</sup> .....	52
Figure 20 : Effet des mutations de hYAP (A) et de hTEAD1 (B) sur l'interaction YAP-TEAD <sup>66</sup> .....	54
Figure 21 : Représentation du complexe mTAZ <sub>25-57</sub> -mTEAD4 <sub>210-427</sub> (PDB 5GN0) <sup>72</sup> .....	55
Figure 22 : Deuxième mode de liaison de mTAZ <sub>25-57</sub> à mTEAD4 <sub>210-427</sub> (PDB 5GN0) <sup>72</sup> .....	56
Figure 23 : Représentation du complexe mVGLL1 <sub>20-56</sub> -mTEAD4 <sub>210-427</sub> (PDB 4EAZ) <sup>73</sup> .....	57
Figure 24 : Représentation du mode de liaison de mVGLL4 (PDB 4LN0) <sup>74</sup> .....	58
Figure 25 : Phénotypes de la Drosophile <sup>14</sup> .....	60
Figure 26 : Foies de souris lorsque la kinase MST1/2 est éteinte <sup>14</sup> .....	61
Figure 27 : Différentes stratégies pour inhiber la voie Hippo <sup>94</sup> .....	62
Figure 28 : Structures de la VP et du C19 .....	63
Figure 29 : Structures des deux inhibiteurs de kinases .....	64
Figure 30 : Structure du peptide cyclique 1 .....	65
Figure 31 : Structure générale des inhibiteurs.....	66

Figure 32 : Structures de l'acide niflumique et flufénamique et co-cristallisation de l'acide flufénamique avec hTEAD2 <sub>217-447</sub> (PDB 5DQ8) <sup>106</sup> .....	66
Figure 33 : Structure du MGH-CP1 .....	67
Figure 34 : Structure et co-cristallisation du fragment A (PDB 5XJD) <sup>108</sup> .....	67
Figure 35 : Schéma du principe du TSA .....	71
Figure 36 : Schéma du principe du FRET .....	72
Figure 37 : Schéma du principe de la SPR .....	73
Figure 38 : Schéma du principe de la MST .....	74
Figure 39 : Suivi de fluorescence en fonction de la concentration du ligand et détermination du K <sub>d</sub> .....	75
Figure 40 : Schéma de principe de l'ITC et détermination du K <sub>d</sub> .....	76
Figure 41 : Représentation des courbes de fluorescence fonction de la concentration en acide niflumique .....	77
Figure 42 : Représentation des courbes de fluorescence en fonction de la concentration en hTEAD2 <sub>217-447</sub> .....	78
Figure 43 : Variation du taux d'immobilisation de YAP <sub>50-102</sub> en fonction du pH.....	80
Figure 44 : (A) Sensorgrammes ; (B) Isotherme de liaison .....	80
Figure 45 : Variation du taux d'immobilisation de hTEAD4 <sub>1-434</sub> en fonction du pH.....	81
Figure 46 : Isotherme de liaison obtenue par titration de hTEAD4 <sub>1-434</sub> par YAP <sub>50-102</sub> * .....	83
Figure 47 : Isotherme de liaison obtenue par titration de YAP <sub>50-102</sub> par GFP-hTEAD2 <sub>217-447</sub> .....	84
Figure 48 : Représentation du FRET pour le complexe YAP-TEAD .....	85
Figure 49 : Variation de la fluorescence en fonction de la concentration en YAP <sub>50-102</sub> .....	86
Figure 50 : Variation de la fluorescence en fonction de la concentration en hTEAD4 <sub>1-434</sub> .....	87
Figure 51 : Structure des 4 isomères constituant la Vertéporphine .....	90
Figure 52 : Structures de la protoporphyrine IX et de l'hématoporphyrine .....	91
Figure 53 : Mesure de fluorescence de la VP .....	116
Figure 54 : Inhibition de l'interaction YAP/TAZ-TEAD par les porphyrines et dipyrines.....	117
Figure 55 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de YAP et des gènes cibles de TEAD sur cellules MDA-MB-231 traitées sur 24h.....	118
Figure 56 : Analyse de l'expression des protéines par Western Blot.....	119
Figure 57 : Cavités dites "druggable" de TEAD.....	121
Figure 58 : Représentation de l'interface 3 <sup>66</sup> .....	122
Figure 59 : Structures des 4 molécules sélectionnées .....	124
Figure 60 : Courbes de réponses de la molécule II.....	125
Figure 61 : Pourcentage d'activation du complexe YAP-TEAD induit par les molécules I-IV .....	125
Figure 62 : Résultats biologiques de la molécule II sur cellules HCT-116.....	126

Figure 63 : Représentation du positionnement de la molécule II dans la poche de TEAD .....	127
Figure 64 : Remplacement du cycle 1,2,5-oxadiazole en position 1 .....	129
Figure 65 : Représentation des diverses modifications envisagées du hit 101 .....	130
Figure 66 : Etude nOe de la molécule 55 .....	137
Figure 67 : Etude nOe de la molécule 101 .....	144
Figure 68 : Affinités du composé 101 mesurées par SPR et MST.....	156
Figure 69 : Pourcentage d'inhibition du complexe YAP-TEAD induit par la molécule 101 .....	157
Figure 70 : Structures des molécules commerciales.....	158
Figure 71 : Pourcentage d'activation du complexe YAP-TEAD induit par les molécules U-Z.....	158
Figure 72 : Pourcentage d'activation du complexe YAP-TEAD induit par les composés.....	159
Figure 73 : Structures des composés issus du TSA.....	160
Figure 74 : Etude de l'influence de la concentration des composés 151 et 154.....	161
Figure 75 : Représentation de la molécule 31.....	163
Figure 76 : Représentation des modifications apportées .....	165
Figure 77 : Représentation des modulations futures.....	166
Figure 78 : Représentation schématique du FRET <i>in cellulo</i> .....	167
Figure 79 : Photo des cellules CHO après 3 h d'incubation en présence de la molécule 103.....	168



# TABLE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des dipyrrines 31 et 32 .....	93
Schéma 2 : Différentes voies rétrosynthétiques du composé 31 .....	94
Schéma 3 : Analyse rétrosynthétique de la voie 1 .....	95
Schéma 4 : Synthèse du composé 2 .....	95
Schéma 5 : Mécanisme proposé pour la synthèse du pyrrole 2 .....	96
Schéma 6 : Synthèse du composé 4 .....	97
Schéma 7 : Essais de synthèse du composé 31 par la voie 1 .....	98
Schéma 8 : Schéma rétrosynthétique de la voie 2 .....	99
Schéma 9 : Essais de synthèse du composé 12 à partir de 5 .....	99
Schéma 10 : Synthèse du composé 11 à partir de 5 .....	100
Schéma 11 : Essais de déprotection du composé 11 .....	101
Schéma 12 : Synthèse du composé 14 et essais de déshydratation .....	102
Schéma 13 : Schéma rétrosynthétique avec réaction de Stille .....	103
Schéma 14 : Synthèse du composé 18 .....	104
Schéma 15 : Essai de condensation des précurseurs 4 et 18 .....	105
Schéma 16 : Synthèse du composé 21 par réaction de Stille .....	105
Schéma 17 : Essai de synthèse du composé 31 par couplage des précurseurs 4 et 21 .....	106
Schéma 18 : Essai de synthèse du composé 31 par réaction de Stille finale .....	107
Schéma 19 : Analyse rétrosynthétique de la voie 4 .....	107
Schéma 20 : Synthèse du tricarbonylé 25 .....	108
Schéma 21 : Synthèse de l'oxime 26 .....	108
Schéma 22 : Synthèse du composé 29 .....	109
Schéma 23 : Synthèse du composé 31 par déshydroiodation finale .....	110
Schéma 24 : Essais de synthèse du composé 32 par réaction de Diels Alder .....	111
Schéma 25 : Essai de synthèse du composé 32 par la stratégie BODIPY .....	112
Schéma 26 : Synthèse du composé 35 .....	113
Schéma 27 : Synthèse du composé 36 .....	114
Schéma 28 : Synthèse du composé 38 .....	114
Schéma 29 : Synthèse du composé 39 .....	115
Schéma 30 : Schéma récapitulatif des étapes du criblage virtuel .....	123
Schéma 31 : Schéma rétrosynthétique des analogues contenant l'hétérocycle 1,2,5-oxadiazole .....	128
Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique des analogues contenant l'hétérocycle 1,2,5-oxadiazole .....	129

Schéma 33 : Analyse rétrosynthétique des triazoles cibles .....	132
Schéma 34 : Synthèse générale des azotures 40-45 .....	133
Schéma 35 : Synthèse du composé 47 .....	133
Schéma 36 : Synthèse générale des $\beta$ -cétoesters 48-54 .....	134
Schéma 37 : Synthèse générale des triazoles 55-74 .....	135
Schéma 38 : Mécanisme de formation du triazole-4-carboxylate .....	138
Schéma 39 : Synthèse générale des carbohydrazides 75-85 .....	139
Schéma 40 : Voies de synthèse du carbohydrazide 75 .....	140
Schéma 41 : Synthèse des carbohydrazides 92-95 .....	141
Schéma 42 : Synthèse des carbohydrazides 96-100 .....	141
Schéma 43 : Synthèse des composés cibles 101-120 .....	142
Schéma 44 : Synthèse du composé 122 .....	145
Schéma 45 : Synthèse des composés cibles 123-131 .....	145
Schéma 46 : Synthèse du composé 134 .....	147
Schéma 47 : Synthèse des composés cibles 135-139 .....	148
Schéma 48 : Synthèse des composés cibles 140-142 .....	149
Schéma 49 : Synthèse du triazole 145 par la voie 1 .....	150
Schéma 50 : Synthèse du triazole 145 par la voie 2 .....	151
Schéma 51 : Synthèse du composé 148 .....	151
Schéma 52 : Synthèse des composés cibles 151, 152 et 154, 155 .....	152
Schéma 53 : Synthèse du composé 156 .....	153
Schéma 54 : Synthèse du composé 159 par la voie 1 .....	154
Schéma 55 : Synthèse du composé cible 163 .....	155
Schéma 56 : Synthèse du composé 164 .....	156

# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principaux composants de la voie Hippo <sup>14</sup> .....	36
Tableau 2 : Affinités des peptides hYAP sur hTEAD4 <sub>217-434</sub> mesurées par SPR <sup>69</sup> .....	51
Tableau 3 : Affinités des différents peptides de YAP envers hTEAD2 <sub>217-447</sub> <sup>68</sup> .....	53
Tableau 4 : Essais de déprotection du composé 11 .....	101
Tableau 5 : Conditions de formation du vinylpyrrole 15.....	102
Tableau 6 : Conditions de la réaction de Diels Alder.....	111
Tableau 7 : Dipyrroles testées .....	117
Tableau 8 : Récapitulatif des azotures 40-45 synthétisés .....	133
Tableau 9 : Récapitulatif des $\beta$ -cétoesters 48-54 synthétisés.....	134
Tableau 10 : $\beta$ -cétoesters commerciaux .....	134
Tableau 11 : Récapitulatif des esters 55-74 synthétisés .....	136
Tableau 12 : Récapitulatif des carbohydrazides 75-85 synthétisés par la voie 1.....	139
Tableau 13 : Récapitulatif des carbohydrazides 92-95 synthétisés par la voie 2.....	141
Tableau 14 : Récapitulatif des carbohydrazides 96-100 synthétisés par la voie 3.....	142
Tableau 15 : Récapitulatif des composés cibles 101-120.....	143
Tableau 16 : Récapitulatif des composés cibles 123-131.....	146
Tableau 17 : Récapitulatif des composés cibles 135-139.....	148
Tableau 18 : Solubilité des composés II, 101 et 135-139 .....	148
Tableau 19 : Cytotoxicité des composés II, U-Z et 101 .....	159

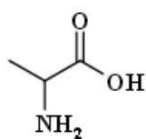
# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AcOEt</b>	Acétate d'éthyle
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>AcOH</b>	Acide acétique
<b>AcONa</b>	Acétate de sodium
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>Apaf</b>	Apoptotic peptidase activating factor
<b>APTS</b>	Acide paratoluène sulfonique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BD</b>	Binding Domain
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
<b>BODIPY</b>	Boron DIPYrométhène
<b>CBP</b>	CREB binding protein
<b>CDI</b>	<i>N,N'</i> -carbonyldiimidazole
<b>CTGF</b>	Connective Tissue Growth factor
<b>Cyr61</b>	Cysteine-rich angiogenic protein 61
<b>DBU</b>	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMAD</b>	Acétylènedicarboxylate de méthyle
<b>DMAP</b>	Diméthylacétamide
<b>DMF</b>	Diméthylformamide
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer

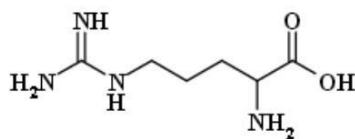
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GGPP</b>	Geranylgeranyl pyrophosphate
<b>HER</b>	Human Epidermal growth factor Receptor
<b>HIF</b>	Hypoxia Inducible Factor
<b>HMG-CoA</b>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazole
<b>HP</b>	Hématoporphyrine
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single quantum coherence
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice médiane
<b>ITC</b>	Calorimétrie par titration isotherme
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante d'association
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de dissociation
<b>LATS</b>	Large Tumor Suppressor kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MCAT</b>	Muscle CAT
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MST1/2</b>	Mammalian Ste20-like Protein Kinase
<b>MST</b>	Microscale thermophoresis / Thermophorèse à micro-échelle
<b>NCS</b>	<i>N</i> -Chlorosuccinimide
<b>nOe</b>	nuclear Overhauser effect
<b>P atm</b>	Pression atmosphérique
<b>PDB</b>	Protein data bank
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PPIX</b>	Protoporphyrine IX
<b>ppm</b>	Parts per million
<b>RASSF1A</b>	Ras Association Domain Family 1 isoform A
<b>Rb</b>	Protéine du rétinoblastome
<b>RBM4</b>	RNA binding motif protein

<b>RCPG</b>	Récepteur couplé aux protéines G
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>RMSD</b>	Root-Mean-Square Deviation
<b>RSA</b>	Relation structure-activité
<b>RT-qPCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>RUNX</b>	Runt-related transcription factor
<b>SAV</b>	Scaffold protein salvador
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse
<b>SPR</b>	Surface plasmon resonance / Résonance plasmonique de surface
<b>TAZ</b>	Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
<b>TBAF</b>	Fluorure de tétra-n-butylammonium
<b>TEAD</b>	Transcriptional Enhancer Associated Domain
<b>TEF</b>	Transcriptional Enhancer Factor
<b>TEM</b>	Transition épithélio-mésenchymateuse
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>Tm</b>	Température de dénaturation
<b>TMSOTf</b>	Triflate de triméthylsilyle
<b>TNF</b>	Tumor Growth Factor
<b>Ts</b>	Tosyle
<b>TSA</b>	Thermal shift assay
<b>TsCl</b>	Chlorure de 4-toluènesulfonyle
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>Vg</b>	Vestigial
<b>VGLL</b>	Vestigial-like
<b>VHL</b>	Von Hippel Lindau
<b>VP</b>	Vertéporfine
<b>YAP</b>	Yes-Associated-Protein

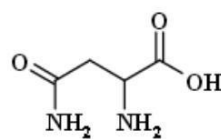
# LISTE DES ACIDES AMINES



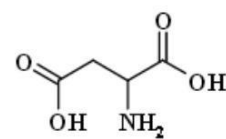
Alanine  
Ala/A



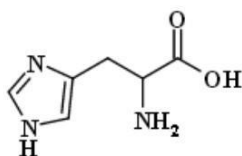
Arginine  
Arg/R



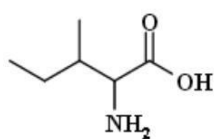
Asparagine  
Asn/N



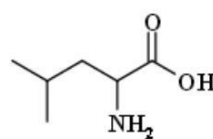
Acide Aspartique  
Asp/D



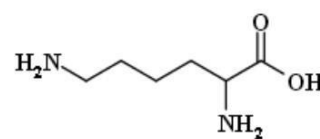
Histidine  
His/H



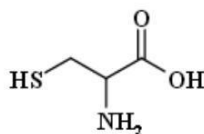
Isoleucine  
Ile/I



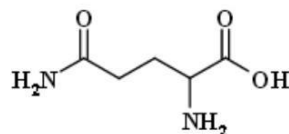
Leucine  
Leu/L



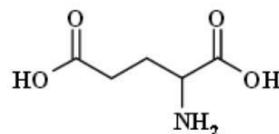
Lysine  
Lys/K



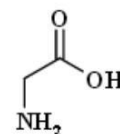
Cystéine  
Cys/C



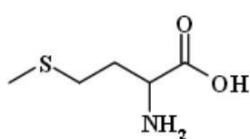
Glutamine  
Gln/Q



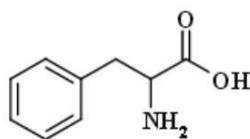
Acide Glutamique  
Glu/E



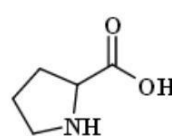
Glycine  
Gly/G



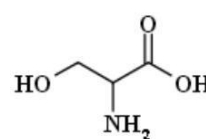
Méthionine  
Met/M



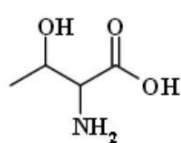
Phénylalanine  
Phe/F



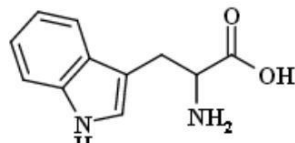
Proline  
Pro/P



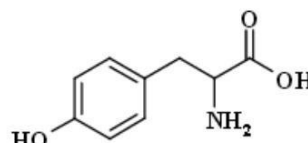
Sérine  
Ser/S



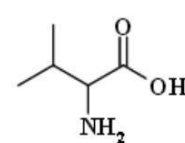
Thréonine  
Thr/T



Tryptophane  
Trp/W



Tyrosine  
Tyr/Y



Valine  
Val/V

# INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité en France avec près de 150 000 décès en 2015. Cette maladie multi-causale résulte en la prolifération anarchique de cellules anormales qui conduisent à une tumeur maligne. Bien qu'il existe de nombreux traitements anticancéreux, qui permettent de ralentir efficacement la croissance tumorale et d'améliorer la survie des patients, leur efficacité est souvent limitée par l'apparition de phénomènes de résistance et/ou de récurrence ainsi que de nombreux effets secondaires. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers représente aujourd'hui un enjeu majeur pour la recherche et le développement.

A partir de récentes études effectuées dans la compréhension des mécanismes cellulaires, la voie Hippo a été identifiée comme acteur majeur dans le contrôle de la taille des organes en régulant l'activité de la protéine YAP (Yes-Associated-Protein) et de son paralogue TAZ (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif). Ces deux co-activateurs transcriptionnels sont des oncogènes surexprimés dans de nombreux cancers. Leur activité est liée à leur interaction nucléaire avec les facteurs de transcription de la famille TEAD (Transcriptional Enhancer Associated Domain) qui induit la prolifération cellulaire et l'apparition de métastases.

L'inhibition du complexe protéique YAP/TAZ-TEAD constitue une approche thérapeutique prometteuse pour ralentir le développement du cancer. Dans cet objectif, deux stratégies ont été entreprises durant mes trois années de thèse. Tout d'abord, nous avons cherché à cibler la protéine cytoplasmique YAP en synthétisant des dipyrroles, dérivées de la Vertéporfine afin de mieux comprendre son mode d'action. Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisés sur le facteur de transcription TEAD en déterminant par modélisation moléculaire des ligands potentiels capables de se lier à la protéine au niveau d'une poche hydrophobe caractéristique.

Après une introduction générale sur le cancer, nous positionnerons le rôle de la voie Hippo et du complexe YAP/TAZ-TEAD dans le contrôle de la taille des organes. Dans une troisième partie, nous nous intéresserons plus particulièrement à la Vertéporfine et à la synthèse de dipyrroles. Pour finir, nous étudierons la synthèse de dérivés triazoliques dans le but de cibler TEAD.



# **CHAPITRE 1 : LE CANCER**

Le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité en France devant les maladies cardiovasculaires. Différents types de cancer existent mais tous prennent naissance à la suite de la prolifération anarchique et incontrôlée d'une seule cellule, ayant échappée aux mécanismes normaux de contrôle de régulation et de différenciation, aboutissant à la mort de l'organisme. De nombreux traitements anticancéreux existent mais la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est en constante évolution pour améliorer la qualité de vie du patient et tendre vers une thérapie personnalisée.

## ***I. Généralités sur le cancer<sup>1</sup>***

### **A. Définition**

Dérivé du mot grec *καρκίνος* (karkinos), Hippocrate désigne les masses tumorales sous l'appellation « cancer », signifiant crabe ou écrevisse en latin, par comparaison entre la forme des tumeurs observées sur le sein et la morphologie de l'animal. Cette maladie multi-causale est caractérisée par la prolifération anormale et incontrôlée d'une cellule, au sein d'un tissu ou d'un organe, qui se répand progressivement à travers le corps par métastases aboutissant à la mort de l'organisme. Le cancer est une maladie qui se développe le plus fréquemment à long terme résultant d'une exposition prolongée et répétée à un agent carcinogène.

Même si l'incidence a fortement augmenté depuis 1980, le taux de mortalité des cancers a toutefois diminué grâce aux diagnostics précoces et aux progrès médicaux. On peut affirmer qu'aujourd'hui plus d'une personne sur deux guérit d'un cancer. En 2015, on estime à plus de 380 000 le nombre de nouveaux cas de cancers (incidence) et à près de 150 000 le nombre de décès (mortalité) en France. Plus de 25 types de cancers sont recensés mais les cancers du sein, de la prostate, des poumons et le cancer colorectal représentent à eux seuls la moitié des décès et nouveaux cas décelés.

### **B. Typologie du cancer**

Le cancer est une maladie très complexe et il est souvent dit qu'il n'y a pas un mais des cancers. Chaque cancer est classé suivant sa localisation au sein du tissu affecté :

- Les **carcinomes** se développent à partir d'un tissu épithélial. Lorsque les carcinomes se développent dans le tissu d'une glande ou au niveau de l'épiderme, on parle respectivement d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes.

---

<sup>1</sup>Cancer, L. I. c. I., Cancer, chiffres et définition. <http://www.e-cancer.fr/> (le 5 août 2017)

- Les **sarcomes** se forment sur des tissus conjonctifs tels que les os (ostéosarcome), les muscles (rhabdomyosarcome) ou les tissus adipeux (liposarcome).
- Les cancers **hémolymphatiques** touchent le sang ou les organes tels que les ganglions, les amygdales ou la rate. Ces types de cancers peuvent avoir un développement très rapide et d'une grande amplitude.
- Les **gliomes** se développent au niveau du cerveau à partir d'un tissu de soutien ou glie. Bien que cette pathologie soit très rare, elle représente néanmoins la seconde incidence par cancer chez l'enfant.

Les cancers sont aussi classés suivant la partie affectée de l'organisme :

- Selon l'**organe**: cancer du poumon, du côlon, du foie, du sein, de la prostate...
- Selon le **liquide biologique**: le liquide lymphatique (lymphome) ou le sang (leucémie)

### C. Prévention, Dépistage<sup>2</sup>

Plus de 40% des décès pourraient être évités grâce à des changements comportementaux individuels et collectifs. Dans le cadre de la prévention et du dépistage du cancer, un nouveau plan cancer 2014-2019 a été mis en place basé sur quatre objectifs principaux<sup>3</sup> :



1. Diminuer la mortalité
2. Préserver la continuité et la qualité de vie
3. Investir dans la prévention et la recherche
4. Optimiser le pilotage et les organisations de la lutte contre le cancer

L'objectif principal de ce nouveau plan cancer est de guérir davantage de personnes malades, en garantissant l'accès pour tous à des traitements appropriés et en augmentant les diagnostics précoces et la prévention. Un cancer est diagnostiqué chez près de 355 000 personnes chaque année (200 000 hommes et 155 000 femmes). Même si ces chiffres ont doublé ces 30 dernières années, ils restent néanmoins insuffisants. Pour la majorité des cancers, un diagnostic précoce permet un traitement plus efficace, et augmente ainsi les chances de guérison.

Le tabac, responsable à lui seul de 30% des décès, est désigné comme étant le premier facteur de risque évitable de cancers. C'est pourquoi, le Plan 2014-2019 a choisi de lancer en parallèle un

<sup>2</sup>Cancer, L. I. c. I., Le dépistage des cancers. <http://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/brochures/depistage-cancers.pdf> (le 7 août 2017)

<sup>3</sup>Cancer, I. N. d., Plan Cancer 2014-2019. <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs> (le 5 août 2017)

programme national de réduction du tabagisme. La suppression du tabac, une consommation modérée d'alcool, une alimentation variée et équilibrée, une protection adaptée contre les rayons du soleil, associée à un exercice physique régulier, permettraient de diminuer de près de 50% l'apparition d'un cancer. Plus de 2 millions de salariés sont exposés chaque jour à des produits cancérigènes sur leur lieu de travail. Il est donc important de renforcer la sécurité et de prévenir les utilisateurs pour éviter toute apparition de cancer.

De nouvelles approches de diagnostic vont être prochainement analysées et validées notamment pour les cancers les plus fréquents et/ou les plus graves. Par exemple, le cancer du poumon pourra être diagnostiqué par scanner à faible dose, le dépistage du cancer colorectal se fera par des tests sanguins, et la télédermatologie servira pour la détection précoce des cancers de la peau.

## ***II. Le développement du cancer***

### **A. Processus de cancérisation<sup>4</sup>**

L'individu est constitué « d'unités cellulaires » morphologiquement individualisées mais intégrées dans un ensemble « pluridisciplinaire dynamique » : l'organisme. Ce dernier résulte de l'agencement des cellules en tissus, des tissus en organes et d'organes en systèmes qui réagissent de manière complexe mais ordonnée pour maintenir une quantité constante de cellules : l'homéostasie.

Toute cellule de l'organisme est capable de maintenir, adapter, renouveler, supprimer, de manière programmée, tout ou une partie de ses constituants, dans le but de réguler et de coordonner ses métabolismes et métabolites en les adaptant aux besoins de l'organisme. Le déclenchement et l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'entrée dans un processus de différenciation ou dans un programme de mort cellulaire (apoptose) résultent de signaux externes provenant de multiples boucles de régulations enchevêtrées inscrites dans le génome de chaque cellule. Cependant, suite à l'agression de facteurs environnementaux tels que tabac, rayons ionisants, agents chimiques ou physiques ou encore virus, le génome humain subit constamment des lésions appelées « mutations ». Chaque cellule possède la capacité de reconnaître ces mutations et peut soit se détruire d'elle-même par apoptose, soit les réparer avant qu'elles ne soient transmises à de nouvelles cellules par division cellulaire. Cependant, cette capacité de réparation est parfois défectueuse et la cellule conserve certaines altérations qui touchent les systèmes de régulation de la prolifération. Ces mutations génétiques peuvent alors provoquer un dérèglement de certains gènes de la cellule et entraîner son dysfonctionnement.

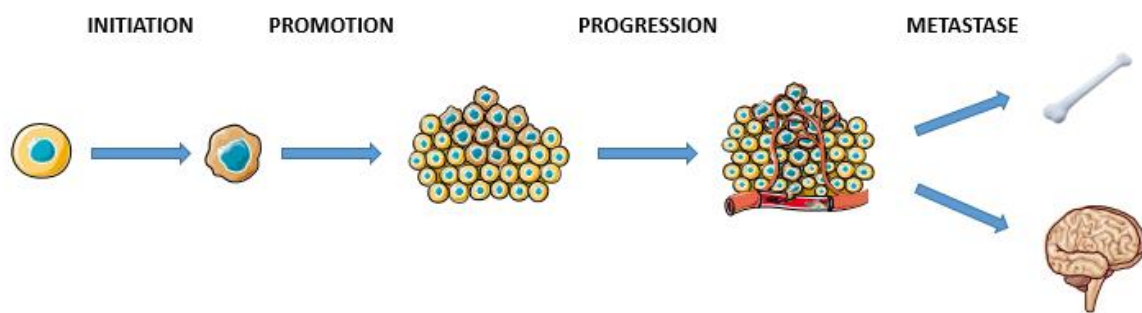
---

<sup>4</sup>PasseportSante, Comprendre les différentes phases du cancer.  
<http://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=vrais-boucliers-contre-le-cancer> (le 7 août 2017)

Le mécanisme de la carcinogénèse implique trois types de gènes :

- Les **oncogènes** : l'expression des oncogènes augmente la survenue de cancers. Ils codent pour des protéines (oncoprotéines) impliquées dans le processus de prolifération cellulaire.
- Les **gènes suppresseurs de tumeur** : Ils régulent négativement la prolifération cellulaire. Lors du processus tumoral, ces gènes perdent leur fonction et favorisent la division cellulaire.
- Les **gènes de réparation** : Les mécanismes de réparation de l'ADN sont capables de détecter et réparer les anomalies de l'ADN afin de garantir la stabilité du génome.

L'évolution de la maladie peut être décrite selon quatre stades (Figure 1): Initiation, Promotion, Progression, Métastase.<sup>5</sup>



**Figure 1 : Processus de cancérisation**

a) ***Initiation***

Le processus de cancérisation débute par une lésion rapide et irréversible de l'ADN d'une cellule normale, suite à une exposition ponctuelle à un agent carcinogène. Dans la plupart des cas, cette lésion entraîne la formation d'un adduit sur l'ADN et rend ainsi la cellule apte au développement d'un cancer. La cellule est alors initiée et entre dans le processus de cancérisation. A ce stade, la cellule n'est pas encore une cellule tumorale.

b) ***Promotion***

Echappant au système de réparation, la cellule mutée se multiplie par division cellulaire et forme ainsi un groupe de cellules transformées identiques que l'on appelle tumeur bénigne.

<sup>5</sup>InfoCancer, Les étapes de la cancérisation. <http://www.arcagy.org/infocancer/en-savoir-plus/cancer/qu-est-ce-que-le-cancer/les-etapes-de-la-cancerisation.html> (le 6 août 2015)

L'étape de promotion correspond à une exposition prolongée répétée ou continue à une substance cancérigène qui entretient et stabilise la lésion formée lors de l'initiation et permet ainsi l'apparition d'une cellule cancéreuse résultant d'une accumulation d'anomalies de l'ADN.

c) ***Progression***

La transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long, qui peut durer des dizaines d'années. Une cellule devient cancéreuse lorsque ses gènes de prolifération, de réparation de l'ADN et d'apoptose ont mutés un à un et permettent à la cellule d'acquérir des fonctions non contrôlées telles que l'immortalité et l'autonomie. Cette nouvelle cellule modifiée se multiplie et se divise à son tour, aboutissant donc à la formation d'une tumeur maligne, c'est-à-dire à un amas de cellules cancéreuses. Afin de s'alimenter et ainsi de se propager, la tumeur se vascularise en créant de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux proches préexistants : c'est le phénomène d'angiogenèse.<sup>6</sup>

d) ***Métastase***

Les cellules malades possèdent la capacité de se détacher de la tumeur et de migrer *via* ses nouveaux vaisseaux sanguins pour envahir d'autres organes, formant ainsi des métastases. Au stade métastatique, le cancer est le plus agressif et le plus menaçant pour la vie de l'individu.

**B. Caractéristiques des cellules cancéreuses<sup>7</sup>**

En 2011, *Hanahan* et *Weinberg* ont proposé une définition globale des propriétés des cellules cancéreuses.<sup>8</sup>

a) ***Autosuffisance en facteurs de croissance***

Une cellule normale nécessite qu'on lui ordonne de se dupliquer et de proliférer *via* des signaux extérieurs appelés « facteurs de croissance »<sup>9</sup> tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Les cellules cancéreuses sont désormais insensibles et n'attendent plus ces signaux pour entrer dans un état de prolifération continu. Cette indépendance peut provenir d'un mécanisme de stimulation autocrine. La cellule synthétise elle-même son facteur de croissance comme c'est le cas du TGF- $\alpha$  (Tumor Growth Factor- $\alpha$ ), ce qui perturbe le mécanisme d'homéostasie.

---

<sup>6</sup>Inserm, Angiogenèse. <http://www.inserm.fr/dossiers-d-information/angiogenese> (le 7 août 2017)

<sup>7</sup>Hanahan, D. and Weinberg, R. A., The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **2000**, 100, 57-70.

<sup>8</sup>Hanahan, D. and Weinberg, Robert A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **2011**, 144, 646-674.

<sup>9</sup>Goustin, A. S.; Leof, E. B.; Shipley, G. D. and Moses, H. L., Growth Factors and Cancer. *Cancer Res.*, **1986**, 46, 1015-1029.

b) ***Potentiel répliatif illimité***

Sans doute un des traits les plus fondamentaux des cellules cancéreuses implique leur capacité à maintenir une prolifération chronique. Elles peuvent se multiplier en 1 à 4 semaines contrairement aux cellules normales qui ont une croissance plus lente de 2 à 6 mois. Cette capacité est normalement limitée par deux phénomènes « barrières »: la sénescence, fin de la capacité répliative des cellules qui conduit à un état stable non-prolifératif, et l'apoptose qui conduit à une mort naturelle programmée des cellules.

Généralement, une cellule ne peut subir plus de cinquante cycles de croissance et de divisions cellulaires avant que son ADN soit endommagé. Plusieurs éléments ont prouvé que les télomères, qui permettent de protéger les extrémités des chromosomes, sont impliqués dans cette répliatation infinie. En effet, une forte quantité de télomérase, enzyme responsable de la fixation des télomères, a été remarquée chez les cellules cancéreuses, alors qu'elle est presque inexistante chez les cellules saines. Cette protéine permet ainsi de maintenir l'ADN télomérique aux longueurs suffisantes pour éviter le déclenchement de l'apoptose ou de la sénescence.

c) ***Insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs***

En parallèle de maintenir positivement une croissance cellulaire, les cellules cancéreuses contournent les programmes puissants qui régulent négativement la prolifération cellulaire. Ces mécanismes d'inhibition dépendent des actions des gènes suppresseurs de tumeurs, comme la protéine du rétinoblastome (Rb) et p53, opérant en tant que point de contrôle lors du cycle cellulaire et décident d'activer la prolifération, ou alternativement la sénescence ou l'apoptose. La protéine Rb reçoit les signaux provenant de diverses sources extracellulaires et décide ou non de faire entrer une cellule en phase G1. La protéine p53 permet de mettre un frein au cycle cellulaire au niveau de la mitose mais également de faire rentrer la cellule en apoptose.

d) ***Insensibilité à l'apoptose***

Les cellules cancéreuses acquièrent la faculté de devenir immortelles. En effet, elles ne sont plus capables d'initier leur propre mort cellulaire. En état normal, lorsque la cellule détecte une anomalie génétique ou qu'elle reçoit des signaux extérieurs comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), elle active la voie des caspases qui lui permet d'entrer en apoptose. Ce déclenchement entraîne l'homodimérisation de Bax/Bak qui se fixe à la membrane mitochondriale. Cette fixation provoque une perforation de la membrane mitochondriale et un relargage de cytochrome c dans le cytosol. Ce dernier se lie à Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor) et à la caspase 9 pour former un complexe nommé apoptosome responsable du phénomène d'apoptose. La résistance aux signaux apoptotiques des cellules cancéreuses proviendrait de la surexpression des protéines de la famille

Bcl-2, localisée dans la membrane mitochondriale. En effet, en se fixant à Bax, elle empêche la formation du dimère et donc inhibe tout le processus de la mort cellulaire.

#### e) **Angiogenèse**

L'angiogenèse est un phénomène physiologiquement normal dans le développement de l'embryon ou dans la cicatrisation d'une plaie. Cependant, cette caractéristique présente chez les cellules cancéreuses assure la croissance et la survie de la tumeur. En effet, ce processus permet la création de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants pour lui assurer un apport constant en oxygène et en nutriments nécessaires à son développement. Ce phénomène débute lorsque les cellules présentes au centre de la tumeur sont en état d'hypoxie (manque d'oxygène).

Le facteur HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) induit par l'hypoxie est un complexe protéique de deux sous unités responsable de la formation du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).<sup>10</sup> Très instable en présence d'oxygène, la sous-unité alpha du facteur HIF subit une hydroxylation par la prolyl-4-hydroxylase, et se lie avec la protéine VHL (Von Hippel Lindau), avant d'être dégradée par le protéasome cytoplasmique. En hypoxie, la prolyl-4-hydroxylase devient inactive et ne peut plus dégrader la sous-unité alpha. Cette dernière ne présentant pas de groupement hydroxyle ne peut plus se lier à la protéine VHL. Elle peut alors migrer dans le noyau et se lier à la sous-unité bêta, permettant ainsi la synthèse du VEGF. Ce facteur de croissance, responsable de l'angiogenèse, assure la formation de nouveaux vaisseaux sanguins poreux pour alimenter la tumeur. On parle alors de tumeur vascularisée. Ce nouveau réseau de vaisseaux sanguins est très fragile et cause de nombreuses hémorragies.

#### f) **Invasion et métastase**

Les cellules saines développent à leur surface la glycoprotéine E-cadhérine, protéine essentielle pour l'adhérence. Cette protéine, activée par les ions calcium, reconnaît une autre E-cadhérine présente sur une cellule voisine et qui leur permet de s'attacher entre elles. Les cellules cancéreuses ayant un déficit en E-cadhérine, ont une surface modifiée qui ne leur confèrent plus une adhésion optimale aux cellules voisines et à la matrice extra-cellulaire de la tumeur. Cette perte d'adhérence est responsable du détachement des cellules cancéreuses, de leur migration dans les tissus sains *via* les nouveaux vaisseaux formés par angiogenèse, et donc de la formation des métastases dans l'organisme.

#### g) **Caractéristiques physiques**

Morphologiquement, les cellules cancéreuses possèdent une taille supérieure à la normale. L'aspect du cytoplasme est réduit et leur noyau est souvent plus volumineux, irrégulier et bosselé. La tumeur

---

<sup>10</sup>CEA, Hypoxie et Angiogenèse. [http://irtsv.cea.fr/dsv/irtsv/Pages/Actualites/Resultats-scientifiques/L26\\_NCherradi.aspx](http://irtsv.cea.fr/dsv/irtsv/Pages/Actualites/Resultats-scientifiques/L26_NCherradi.aspx) (le 7 août 2017)



dépasse rarement 2 à 3mm<sup>3</sup> et peut contenir plusieurs millions de cellules malades. Leur environnement est différent de celui des cellules saines. En effet, leur pH intracellulaire varie entre 5.5 et 6.5 contrairement à celui des cellules saines qui est au environ de 7.4.

Les cellules cancéreuses possèdent de nombreux marqueurs biologiques qui nous permettent de les différencier. Dans le cas du cancer du sein, les cellules tumorales surexpriment par exemple le récepteur HER2 à leur surface. Cette caractéristique a permis de développer de nouveaux traitements anticancéreux avec la thérapie ciblée.

### **III. Traitements anticancéreux<sup>11</sup>**

Puisqu' il n'existe pas une seule forme de cancer mais bien plusieurs cancers aux caractéristiques différentes, il n'existe pas de traitement universel mais différentes thérapies propres à chaque cancer et à chaque individu.

Le traitement d'un cancer vise à faire disparaître totalement la tumeur (traitement curatif). Néanmoins si la guérison est impossible, le traitement cherche à ralentir la progression de la maladie pour assurer au patient une meilleure autonomie et qualité de vie en atténuant les symptômes et la douleur (traitement palliatif).

#### **A. Chirurgie**

La chirurgie est l'alternative de première intention pour guérir une tumeur solide. Ce traitement local a pour but de retirer la tumeur et les ganglions voisins afin de ne laisser aucune cellule cancéreuse et d'éviter toute récurrence. La chirurgie est pratiquée sur des formes de cancers bien localisées dans l'organisme à des stades précoces c'est-à-dire ne présentant pas de métastases. Cependant, elle n'empêche pas leur formation à distance si ces derniers se sont développés avant l'opération. Quand la tumeur est trop importante, la chirurgie est précédée de traitements néo-adjuvants tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie dont l'objectif est de réduire la masse tumorale afin de faciliter l'ablation.

#### **B. Radiothérapie**

Actuellement, plus de la moitié des personnes atteintes d'un cancer sont traitées par radiothérapie seule ou en association avec d'autres traitements, pour vaincre la maladie. Cette technique repose

---

<sup>11</sup>Cancer, L. I. c. I., Les traitements du cancer. <https://www.ligue-cancer.net/shared/brochures/traitements-cancers.pdf> (le 7 août 2017)

sur l'utilisation de rayonnements de haute énergie ou de rayonnements gamma délivrés par des sources radioactives au niveau des cellules tumorales. Cette ionisation crée des espèces radicalaires réactives qui vont interagir avec les molécules d'ADN, produisant ainsi un grand nombre de lésions et entraînant la destruction des cellules cancéreuses et/ou de leur système de réplication.

L'inconvénient majeur de cette thérapie est que les rayons touchent également les tissus sains provoquant ainsi de nombreux effets secondaires. C'est pourquoi, afin de limiter ce phénomène, on utilise parfois la curiethérapie. Cette méthode repose sur le même principe que la radiothérapie mais implante les fils radioactifs directement dans le tissu tumoral assurant une délivrance des rayons bien limitée à la tumeur, respectant ainsi les cellules voisines saines.

## C. **Chimiothérapie**

### a) ***Hormonothérapie***

L'hormonothérapie permet de traiter les cancers dits hormono-dépendants tels que les cancers du sein et de la prostate. Elle vise à inhiber les hormones responsables de la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses et donc du développement de la maladie. Dans le cas du cancer du sein, le traitement cherche à bloquer l'action des œstrogènes et de la progestérone, principalement par antagonisme des récepteurs concernés. Pour le cancer de la prostate, l'hormonothérapie permet de bloquer la sécrétion de la testostérone, empêchant ainsi la croissance du cancer.

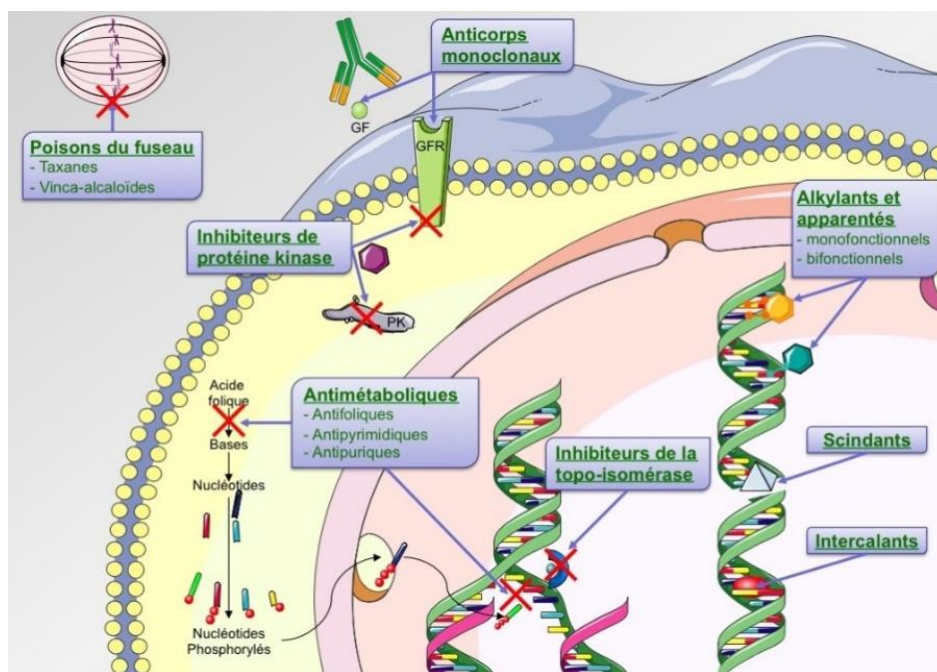
### b) ***Immunothérapie***

Le but de ce traitement est de stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Le principe de cette technique repose sur l'identification d'antigènes présents à la surface des cellules de la tumeur pouvant être la cible spécifique d'une attaque par le système immunitaire tel que les anticorps.

Malheureusement l'application de ce traitement reste limitée puisqu'un trop grand nombre de cellules tumorales bloquent les mécanismes immunitaires. C'est pourquoi, l'immunothérapie est principalement utilisée en complément d'une chimiothérapie.

### c) **Chimiothérapie conventionnelle**

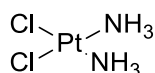
La chirurgie et la radiothérapie sont des thérapies très efficaces mais restent cependant des traitements locaux ou loco-régionaux. La chimiothérapie est parfois utilisée en amont de ces techniques afin de réduire la masse tumorale. Elle permet également de s'attaquer aux cellules disséminées dans l'organisme comme les métastases pour éviter les récives. Le principe de cette technique repose sur l'administration de substances chimiques visant à inhiber la division cellulaire (cytostatiques), et/ou à provoquer l'apoptose des cellules tumorales (cytotoxiques) (Figure 2).



**Figure 2 : Mécanisme d'action des anticancéreux<sup>12</sup>**

Les anticancéreux sont regroupés en quatre grandes classes suivant leur mécanisme d'action :

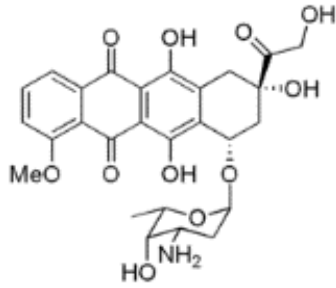
- les **agents alkylants** qui forment des adduits de façon covalente avec l'ADN (Cisplatine, *Cisplatine*®) (Figure 3) :



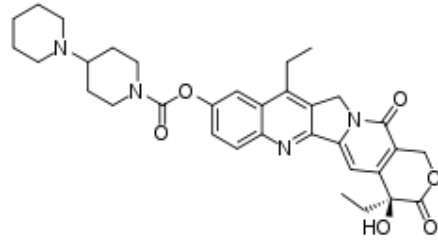
**Figure 3 : Structure du Cisplatine**

- les **intercalants ou inhibiteurs de topo isomérase I et II** qui induisent ou stabilisent des coupures de l'ADN, empêchant ainsi le dénouement de l'ADN lors de sa réplication (*Doxorubicine, Adriblastine*®; *Irinotécan, Campto*®) (Figure 4) :

<sup>12</sup>Pharmacomedicale.org, Anticancéreux : les points essentiels. <http://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticancereux-les-points-essentiels> (le 5 août 2017)



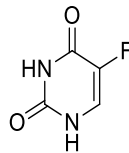
Doxorubicine



Irinotécan

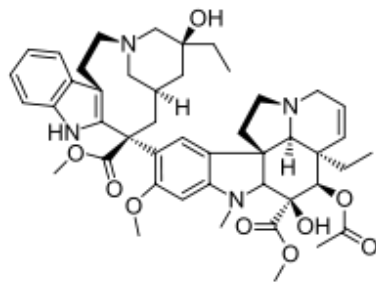
**Figure 4 : Structures de la Doxorubicine et de l'Irinotécan**

- les **antimétabolites**, analogues de l'acide folique, des bases purines ou pyrimidiques, qui interfèrent dans la synthèse de l'ADN (5-Fluorouracile, *5-FU*<sup>®</sup>) (Figure 5) :

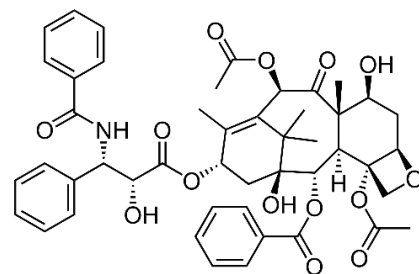


**Figure 5 : Structure du 5-Fluorouracile**

- les **poisons du fuseau mitotique** qui agissent au niveau de la polymérisation (Vinblastine, *Velbe*<sup>®</sup>, Vincristine, *Oncovin*<sup>®</sup>) et de la dépolymérisation (Paclitaxel, *Taxol*<sup>®</sup>) de la tubuline pendant la mitose (Figure 6) :



Vinblastine



Paclitaxel

**Figure 6 : Structure de la Vinblastine et du Paclitaxel**

Bien que ces médicaments soient très efficaces en touchant principalement les cellules cancéreuses dues à leur reproduction rapide, ils atteignent également les cellules saines provoquant

ainsi une forte toxicité et engendrant d'importants effets secondaires (nausées, vomissements, fatigue, chute temporaire des cheveux...). Ce manque de sélectivité a amené la recherche à se diriger vers des thérapies dites ciblées, utilisant essentiellement des anticorps monoclonaux.

#### d) ***Vers les thérapies ciblées***

Diriger l'agent thérapeutique uniquement vers les cellules cancéreuses évite une toxicité vis-à-vis des cellules saines et diminue les effets secondaires dus à une chimiothérapie conventionnelle. On parle alors de « thérapie ciblée ». Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance et/ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses. Ces anomalies moléculaires correspondent à une surexpression ou à une sous-expression de certaines biomolécules dans un tissu cancéreux par rapport au tissu sain.

Ce concept permet de réduire les doses employées, tout en s'assurant de la biodisponibilité et de l'efficacité du principe actif administré, mais également de contrôler la libération de la molécule active dans le temps et dans l'espace. Afin d'assurer une sélectivité envers les cellules cancéreuses, cette approche nécessite des connaissances approfondies de la cellule tumorale et de sa physiopathologie d'un point de vue moléculaire et fonctionnel.

Par exemple, dans le cancer du sein, il a été démontré que le récepteur HER2 était largement surexprimé à la surface des cellules tumorales. Ce signe distinctif a permis de développer de nouveaux traitements comme le trastuzumab (*Herceptin*<sup>®</sup>), un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le récepteur HER2, réduisant ainsi fortement les effets indésirables. Ce récepteur permet une pénétration plus importante dans la cellule cancéreuse que dans la cellule saine. Le phénomène d'angiogenèse, permettant la croissance de la tumeur est également une autre particularité de la maladie. Ce processus a fait l'objet de nombreuses recherches dans le but d'arrêter la prolifération cellulaire. Le mécanisme d'action des traitements anti-angiogéniques est principalement une inhibition de la voie du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Le bevacizumab (*Avastin*<sup>®</sup>), anticorps monoclonal dirigé directement contre le VEGF, est le traitement de référence utilisé contre l'angiogenèse.

# **CHAPITRE 2 : LA VOIE HIPPO**

L'équilibre entre prolifération et mort cellulaire est essentiel pour maintenir l'homéostasie et veiller au bon fonctionnement du corps humain lors de son développement mais aussi durant la vie post natale. Récemment, il a été montré que la voie Hippo joue un rôle crucial dans le contrôle de la taille des organes en alternant division cellulaire et apoptose. La fonction principale de cette voie consiste à réguler la phosphorylation des co-activateurs transcriptionnels YAP/TAZ, afin de maîtriser leur import nucléaire et leur interaction avec de nombreux partenaires nucléaires, en particulier les facteurs de transcription de la famille TEAD1-4.

## I. La voie Hippo

### A. Mécanisme de la voie Hippo

La taille d'un organe est définie par deux paramètres importants : le nombre et la taille des cellules qui le compose.<sup>13</sup> Pour assurer le bon fonctionnement d'un organe, il existe un équilibre entre la division cellulaire et l'apoptose assurant ainsi un nombre constant de cellules. La voie Hippo, initialement décrite chez la *Drosophila melanogaster* et hautement conservée chez les mammifères, a été identifiée comme le régulateur clé de la croissance tissulaire (Tableau 1) (Figure 7).<sup>14</sup>

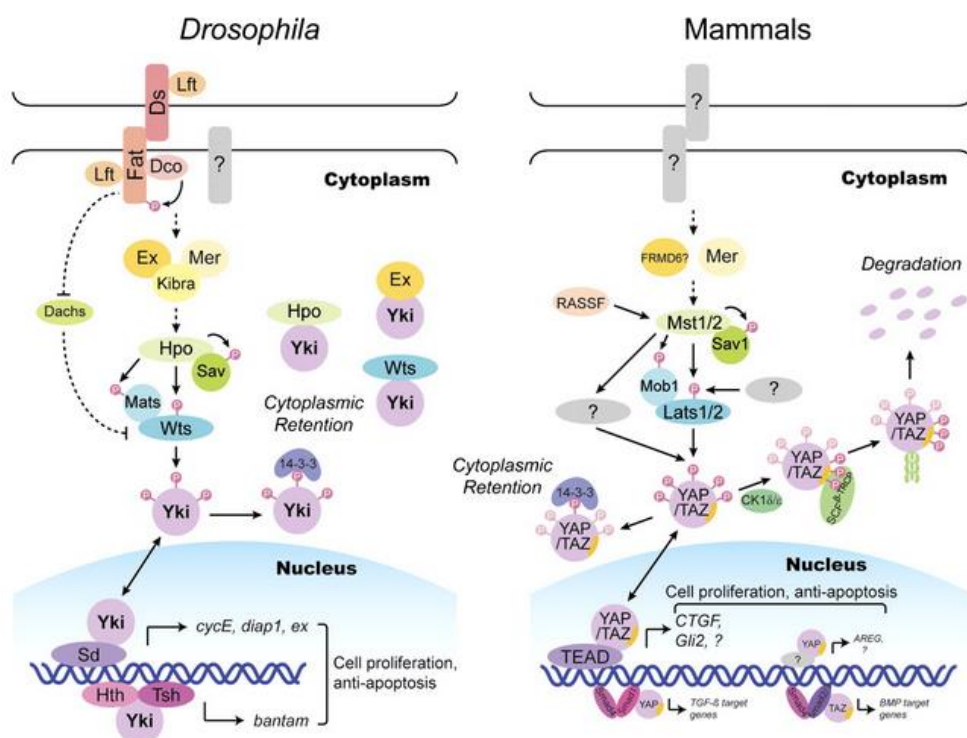


Figure 7 : Schématisation de la voie Hippo chez la drosophile et le mammifère

<sup>13</sup>Bardet, P. L., Developmental control of organ growth by the Hippo pathway. *Med. Sci. (Paris)*.**2009**, 25, 253-257.

<sup>14</sup>Johnson, R. and Halder, G., The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.***2014**, 13, 63-79.

Protéines Humain	Protéines <i>D. melanogaster</i>	Fonction	Localisation
<i>Composants</i>			
MST1, MST2	Hpo	Kinase Ser/Thr, famille STE20	Domaine kinase, domaine SARAH
SAV1 (ou WW45)	Sav	Protéine Adaptatrice	Domaine de liaison à FERM2, domaine SARAH
LATS1, LATS2	Wts	Kinase Ser/Thr, famille NDR	Domaine kinase
MOB1A, MOB1B	Mats	Co-facteur	Domaine MOB
YAP, TAZ	Yki	Co-activateur transcriptionnel	2 Domaines WW, domaine de liaison à 14-3-3, domaine de liaison à TEAD, motif de liaison à PDZ
TEAD1–TEAD4	Sd	Facteur transcriptionnel	Domaine de liaison à l'ADN de TEAD, domaine de liaison à Vestigiale
<i>Modulateurs</i>			
CRB1–CRB3	Crb	Récepteur Transmembranaire	Domaine EGF, 4 domaines laminine AG, domaine transmembranaire
PATJ, MUPP1	Patj	Protéine Adaptatrice	Domaine ribosomal de L27, 8 domaines PDZ
MPP5 (ou PALS1)	Sdt	Protéine Adaptatrice	Domaine ribosomal de L27, domaine PDZ, domaine SH3, domaine GUK
AMOT, AMOTL1, AMOTL2	-	Protéine Adaptatrice	Domaine en spirale, motif PDZ
Merlin	Mer	Protéine Adaptatrice	Domaine FERM
KIBRA	Kibra	Protéine Adaptatrice	2 Domaines WW, domaine C2
FRMD6 (ou EX1)	Ex	Protéine Adaptatrice	Domaine FERM
TAO1–TAO3	Tao	Kinase Ser/Thr	Domaine kinase
MARK1–MARK4	Par -1	Kinase Ser/Thr	Domaine kinase
E-cadhérine	E-cadhérine	Récepteur transmembranaire	5 Domaines cadhérine, domaine transmembranaire
$\alpha$ -caténine	$\alpha$ -caténine	Protéine Adaptatrice	Domaines VH1–VH3
Ajuba, LIMD1, WTIP	Jub	Protéine Adaptatrice	3 Domaines LIM
ZYX, LPP, TRIP6	Zyx	Protéine Adaptatrice	3 Domaines LIM
RASSF1–RASSF6	Rassf	Protéine Adaptatrice	Domaine d'association RAS, domaine SARAH
PP2A	STRIPAK–PP2A complex (dSTRIPAK)	Phosphatase	Domaine phosphatase
SCRIB	Scrib	Protéine Adaptatrice	16 Domaines LRR, 4 Domaines PDZ
LGL1, LGL2	Lgl	Protéine Adaptatrice	4 Domaines WD40
DLG1–DLG4	Dlg	Protéine Adaptatrice	3 Domaines PDZ, domaine SH3, Domaine GUK
PTPN14	Pez	Phosphatase	Domaine FERM, domaine phosphatase
CSNK1	Dco	Kinase Ser/Thr	Domaine kinase
$\beta$ -TRCP	Slimb	Ligase SCF-type E3 ubiquitine	F-box Domaine, domaine $\beta$ -TRCP, domaine WD40
HIPK	Hipk	Kinase Ser/Thr	Domaine kinase
MASK1, MASK2	Mask	Protéine Adaptatrice	Domaines ankyrine, domaine KH
WBP2	Wbp2	Co-facteur	Domaine GRAM
VGLL	Tgi	Co-facteur	Domaines Vg

**Tableau 1 : Les principaux composants et modulateurs de la voie Hippo<sup>14</sup>**



Lorsque les cellules sont en confluence, les signaux transmembranaires externes déclenchent la cascade de phosphorylation de la voie Hippo.<sup>15</sup> Les protéines des jonctions adhérentes telles que Merlin ou FRMD6<sup>16</sup> commencent par phosphoryler les kinases MST1/2 (Mammalian Ste20-like Protein Kinase) (Hippo chez la drosophile) au niveau de la Thr<sub>183</sub> pour MST1 et Thr<sub>180</sub> pour MST2 qui permet d'activer leur protéine adaptatrice SAV1 (SAV) avec laquelle elles forment un hétérodimère. Le complexe protéique ainsi formé phosphoryle à son tour les kinases LATS1/2 (Large Tumor Suppressor kinase) (Mts), au niveau des Thr<sub>1079</sub> et Thr<sub>1041</sub> respectivement, ainsi que leur co-activateur MOB (Mats). LATS/MOB (Mts/Mats) active par la suite le co-activateur transcriptionnel cytoplasmique YAP (Yes-Associated Protein) (Yki) ou son paralogue TAZ, au niveau des motifs consensus HXRXXS. La phosphorylation de la sérine Ser<sub>127</sub> de YAP (Ser<sub>89</sub> de TAZ) engendre la création d'un site de liaison à la protéine 14-3-3, responsable de sa séquestration cytoplasmique et donc à son inactivation. La phosphorylation des résidus Ser<sub>381</sub> de YAP (Ser<sub>314</sub> de TAZ) permet son ubiquitinylation et donc sa dégradation par le protéasome.<sup>17</sup> Les facteurs de transcription de la famille TEAD (Transcriptional Enhanced Associate Domain) (Sd), présents dans le noyau, se lient alors à la famille des protéines VGLL (Vestigial-like), un co-répresseur transcriptionnel (Figure 7).<sup>18</sup> Cette interaction réprime la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose, arrêtant la croissance des organes.<sup>19</sup>

Inversement, lorsque la voie Hippo est inactive, c'est-à-dire lorsque que les protéines YAP/TAZ (Yki) ne sont pas phosphorylées par les kinases, celles-ci peuvent passer la membrane nucléaire et déplacer le co-répresseur VGLL pour interagir avec le facteur de transcription TEAD (Sd) provoquant la transcription des gènes cibles tels que *Axl*,<sup>20</sup> *CTGF* (Connective Tissue Growth factor),<sup>21</sup> EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)<sup>14</sup> ou encore *Cyr61* (Cysteine-rich angiogenic protein 61)<sup>22</sup> et augmente la taille de l'organe.<sup>19,23</sup> Parallèlement au mécanisme précédent, lorsque la protéine Yki se lie à Sd dans le noyau chez la drosophile, cela induit la transcription de gènes révélateurs de l'interaction comme *CycE*, *diap1* ou *bantam*.<sup>21</sup> Des essais sur cellules transfectées par des plasmides

<sup>15</sup> Meng, Z., Moroishi, T. and Guan, K.-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*.**2016**, 30(1), 1–17.

<sup>16</sup>Genevet, A.; Wehr, M. C.; Brain, R.; Thompson, B. J.; Tapon, N. Kibra Is a Regulator of the Salvador/Warts/Hippo Signaling Network. *Dev. Cell*.**2010**, 18 (2–3), 300–308.

<sup>17</sup>Piccolo, S.; Dupont, S. and Cordenonsi, M., The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiol. Rev*.**2014**, 94, 1287-1312.

<sup>18</sup>Ota, M. and Sasaki, H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*.**2008**, 135, 4059–4069.

<sup>19</sup>Zhao, B.; Ye, X.; Yu, J.; Li, L.; Li, W.; Li, S.; Yu, J.; Lin, J. D.; Wang, C.-Y.; Chinnaiyan, A. M.; Lai, Z.-C.; Guan, K.-L. TEAD Mediates YAP-Dependent Gene Induction and Growth Control. *Genes De.*,**2008**, 22 (14), 1962–1971.

<sup>20</sup>Xu, M. Z.; Chan, S. W.; Liu, A. M.; Wong, K. F. *et al.*, AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. **2010**, 30, 1229-1240.

<sup>21</sup>Zhao, B.; Li, L.; Lei, Q.; Guan, K. L. The Hippo-YAP Pathway in Organ Size Control and Tumorigenesis: An Updated Version. *Genes Dev*.**2010**, 24 (9), 862–874.

<sup>22</sup>Santucci, M.; Vignudelli, T.; Ferrari, S.; Mor, M.; Scalvini, L.; Bolognesi, M. L.; Uliassi, E.; Costi, M. P. The Hippo Pathway and YAP/TAZ–TEAD Protein–Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment: Miniperspective. *J. Med. Chem*.**2015**, 58 (12), 4857–4873.

<sup>23</sup>Zhang, L.; Ren, F.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Wang, B.; Jiang, J. The TEAD/TEF Family of Transcription Factor Scalloped Mediates Hippo Signaling in Organ Size Control. *Dev. Cell*.**2008**, 14 (3), 377–387.

codant pour la TEAD-luciférase ont montré que la formation du complexe est requise pour la transcription de ces gènes cibles.

Certains aspects de la voie Hippo sont encore en suspens. Par exemple, le gène suppresseur de tumeurs *RASSF1A* (Ras Association Domain Family 1 isoform A) participe également à l'activation de la voie Hippo.<sup>24</sup> La protéine est décrite comme interagissant avec les protéines kinases MST1/2 et ralentissent l'inactivation de la voie sans connaître le mode d'action. Les mécanismes de transmission des signaux pour déclencher la voie Hippo sont également mal élucidés mais il semblerait qu'il existe un lien entre les protéines G et la voie Hippo. Des agonistes, tels que les phospholipides (LPA) ou sphingolipides (S1P), viennent se fixer aux récepteurs couplés aux protéines G12/G13 activant les Rho GTPases (Rho) qui à leur tour vont activer la protéine YAP.<sup>25</sup> A l'inverse, l'utilisation d'autres ligands de RCPG (tel que le glucagon) entraîne une augmentation de la phosphorylation de YAP via la protéine Gs.

## B. Les effecteurs de la voie Hippo

Plus de 30 éléments ont été identifiés comme intervenant dans la voie Hippo (Tableau 1). Cependant, nous nous intéresserons essentiellement aux effecteurs terminaux de la voie qui jouent un rôle prépondérant dans le développement des embryons et l'organogenèse.<sup>26</sup>

### a) *Les protéines YAP/TAZ*

La protéine YAP a été découverte chez le poulet par *Sudol* et ses collaborateurs en 1995 comme interagissant avec la protéine c-Yes qui fait partie de la famille des protéines Src kinase, *via* son domaine SH3 riche en proline, d'où son acronyme.<sup>27</sup> Le gène humain YAP1, situé sur le chromosome 11 (11q22), se décline en 8 isoformes qui sont différenciés par la localisation des exons dans le domaine d'activation transcriptionnelle.<sup>28,29</sup> On distingue 4 isoformes de YAP avec un domaine WW (YAP1-1( $\alpha$ - $\delta$ )) et 4 isoformes de YAP avec deux domaines WW (YAP1-2( $\alpha$ - $\delta$ )). Tous possèdent environ 500 résidus et ont une similitude entre les acides aminés comprise entre 53 et 96%.

---

<sup>24</sup>Guo, C.; Tommasi, S.; Liu, L.; Yee, J.-K.; Dammann, R.; Pfeifer, G. P. *RASSF1A* Is Part of a Complex Similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats Tumor-Suppressor Network. *Curr. Biol.* **2007**, *17* (8), 700–705.

<sup>25</sup>Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J. L.; Lian, I.; Wang, L. H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; Fu, X.-D.; Mills, G. B.; Guan, K.-L. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein Coupled Receptor Signaling. *Cell.* **2012**, *150* (4), 780–791.

<sup>26</sup>Sawada, A.; Kiyonari, H.; Ukita, K.; Nishioka, N.; Imuta, Y., & Sasaki, H. Redundant Roles of *Tead1* and *Tead2* in Notochord Development and the Regulation of Cell Proliferation and Survival. *Molecular and Cellular Biology.* **2008**, *28*(10), 3177–3189.

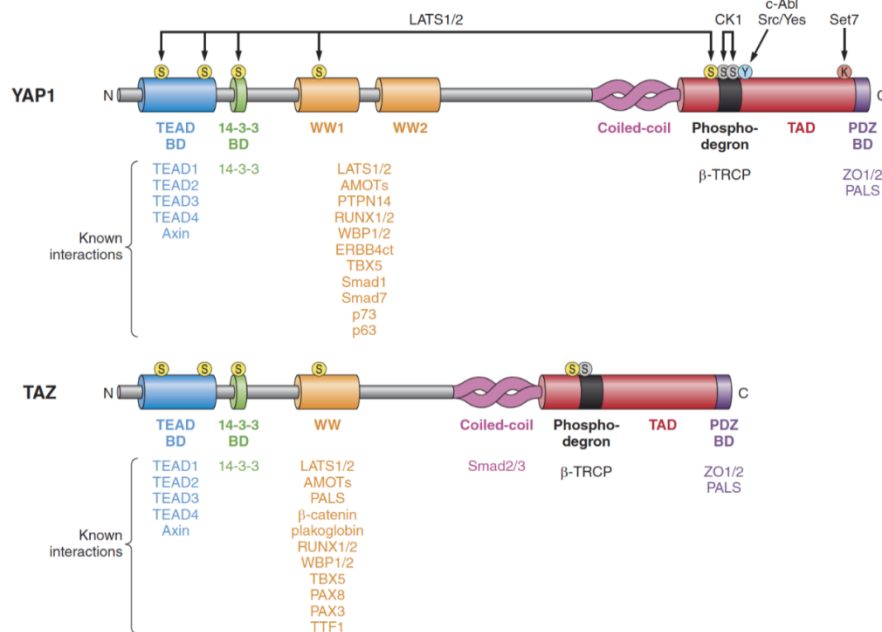
<sup>27</sup>Sudol, M.; Bork, P.; Einbond, A.; Kastury, K.; Druck, T.; Negrini, M.; Huebner, K.; Lehman, D. Characterization of the Mammalian YAP (Yes-Associated Protein) Gene and Its Role in Defining a Novel Protein Module, the WW Domain. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (24), 14733–14741.

<sup>28</sup>Sudol, M. YAP1 Oncogene and Its Eight Isoforms. *Oncogene.* **2013**, *32* (33), 3922–3922.

<sup>29</sup>Gaffney, C. J.; Oka, T.; Mazack, V.; Hilman, D.; Gat, U.; Muramatsu, T.; Inazawa, J.; Golden, A.; Carey, D. J.; Farooq, A.; Tromp, G.; Sudol, M. Identification, Basic Characterization and Evolutionary Analysis of Differentially Spliced MRNA Isoforms of Human YAP1 Gene. *Gene.* **2012**, *509* (2), 215–222.



La région C-terminale possède un domaine en spirale, un domaine d'activation et un motif PDZ (FLTWL) important pour la translocation nucléaire.



**Figure 9 : Analogie entre YAP et TAZ<sup>17</sup>**

Différentes études ont été menées pour identifier les protéines interagissant avec YAP/TAZ. Elles ont permis de démontrer 143 interactions chez la drosophile<sup>34</sup> et plus de 300 chez les mammifères<sup>35,36</sup> (Figure 10). En rose, sont représentés les protéines communes à YAP et TAZ et en vert clair les protéines spécifiques à chacune d'elle, qui interagissent *via* le motif WW. Les facteurs de transcription sont définis en rouge pour ceux communs aux deux protéines et en vert foncé pour ceux propre à chaque protéine. On peut distinguer d'autres facteurs de transcription (en rouge et vert foncé) comme par exemple Smad1, Smad2/3, RUNX, ErbB4 et p73 pour YAP ou encore RUNX, PPAR  $\gamma$ , Pax3, TBX5 et TTF-1 pour TAZ qui interagissent via leur motif PPXY que ne présente pas TEAD. D'autres protéines interagissent avec YAP/TAZ *via* leur domaine WW (en rose et vert clair).

<sup>34</sup>Kwon, Y.; Vinayagam, A.; Sun, X.; Dephore, N.; Gygi, S. P.; Hong, P.; Perrimon, N. The Hippo Signaling Pathway Interactome. *Science*.**2013**, *342* (6159), 737–740.

<sup>35</sup>Couzens, A. L.; Knight, J. D. R.; Kean, M. J.; Teo, G.; Weiss, A.; Dunham, W. H.; Lin, Z.-Y.; Bagshaw, R. D.; Sicheri, F.; Pawson, T.; Wrana, J. L.; Choi, H.; Gingras, A.-C. Protein Interaction Network of the Mammalian Hippo Pathway Reveals Mechanisms of Kinase-Phosphatase Interactions. *Sci. Signal*.**2013**, *6* (302), rs15.

<sup>36</sup>Wang, W.; Li, X.; Huang, J.; Feng, L.; Dolinta, K. G.; Chen, J. Defining the Protein–Protein Interaction Network of the Human Hippo Pathway. *Mol. Cell. Proteomics MCP*.**2014**, *13* (1), 119–131.

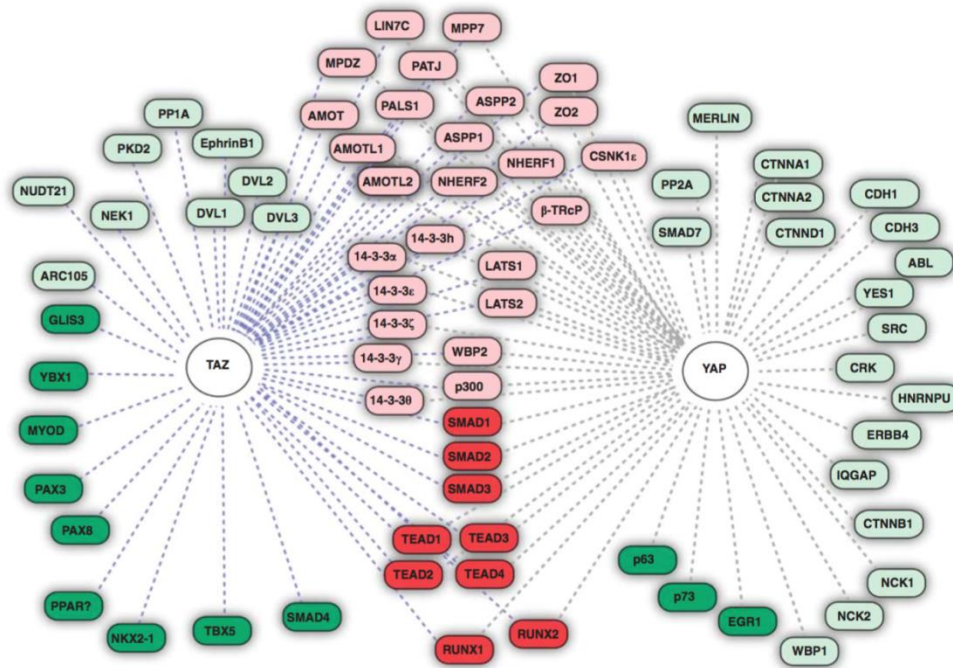


Figure 10 : Différentes interactions avec YAP/TAZ<sup>94</sup>

Des expériences de GST-pull down ont confirmé que YAP interagit avec les quatre protéines TEAD et qu'ils constituent leur partenaire majeur lors des mécanismes d'induction transcriptionnelle des gènes impliqués dans les processus de croissance cellulaire et de transition épithéliomésenchymateuse.<sup>37,38</sup>

### b) *Le facteur de transcription TEAD*

La famille des facteurs de transcription TEAD, découverte par Xiao et ses collaborateurs en 1987, comprend 4 membres chez les mammifères (TEAD1-4) identifiées avec une homologie comprise entre 61 et 73% (Figure 11).<sup>22,39</sup>

<sup>37</sup>Vassilev, A.; Kaneko, K. J.; Shu, H.; Zhao, Y.; DePamphilis, M. L. TEAD/TEF Transcription Factors Utilize the Activation Domain of YAP65, a Src/Yes-Associated Protein Localized in the Cytoplasm. *Genes Dev.* **2001**, *15* (10), 1229–1241.

<sup>38</sup>Zhou, Y.; Huang, T.; Cheng, A.; Yu, J.; Kang, W.; To, K. The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 138.

<sup>39</sup>Xiao, J. H.; Davidson, I.; Matthes, H.; Garnier, J.-M.; Chambon, P. Cloning, Expression, and Transcriptional Properties of the Human Enhancer Factor TEF-1. *Cell.* **1987**, *65* (4), 551–568.



Figure 11 : Alignements des séquences TEADs

La protéine TEAD est divisée en deux domaines principaux : le domaine TEA, qui permet de reconnaître les éléments de l'ADN en particulier la séquence consensus 5'-GGAATG-3' présente dans le promoteur des gènes cibles, et le domaine de liaison à YAP/TAZ (Figure 12).

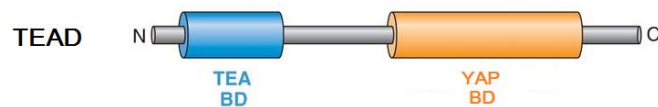


Figure 12 : Représentation schématique des protéines TEADs<sup>17</sup>

La protéine TEAD1 (TEF-1) est responsable du développement des muscles cardiaques lisses et squelettiques.<sup>40</sup> Elle se lie sur une séquence consensus de type 5'-CATTCT-3' appelé MCAT (Muscle CAT) initialement décrite dans le promoteur du gène troponine T cardiaque.<sup>41</sup> TEAD2 (TEF-4) est impliqué dans la formation du tube neural.<sup>42,43</sup> Dans les cellules mammifères, 75% de la protéine TEAD2 est associé avec YAP.<sup>21</sup> Tout comme TEAD1, TEAD3 (TEF-5) semble avoir un rôle dans la

<sup>40</sup>Chen, Z.; Friedrich, G. A.; Soriano, P. Transcriptional Enhancer Factor 1 Disruption by a Retroviral Gene Trap Leads to Heart Defects and Embryonic Lethality in Mice. *Genes Dev.* **1994**, *8* (19), 2293–2301.

<sup>41</sup>Mar, J. H.; Ordahl, C. P. M-CAT Binding Factor, a Novel Trans-Acting Factor Governing Muscle-Specific Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10* (8), 4271–4283.

<sup>42</sup>Yasunami, M.; Suzuki, K.; Ohkubo, H. A Novel Family of TEA Domain-Containing Transcription Factors with Distinct Spatiotemporal Expression Patterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *228* (2), 365–370.

<sup>43</sup>Jacquemin, P.; Depetris, D.; Mattei, M.G.; Martial, J.A.; Davidson, I. Localization of human transcription factor TEF-4 and TEF-5 (TEAD2, TEAD3) genes to chromosomes 19q13.3 and 6p21.2 using fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid analysis. *Genomics.* **1999**, *55*, 127-129.

régulation des gènes musculaires lors du développement musculaire.<sup>44,45</sup> TEAD4 (TEF-3) est essentiel au développement embryonnaire.<sup>46</sup>

Différents co-activateurs autres que YAP/TAZ ont été identifiés comme interagissant avec les protéines TEAD.<sup>47</sup> On peut distinguer les cofacteurs se liant à l'ADN et ceux à activité transcriptionnelle. Les cofacteurs impliqués dans la conformation de la chromatine tels que les protéines SRC (Steroid Receptor Coactivator) possèdent des domaines conservés responsables d'interaction avec des effecteurs comme les histones acétyltransférases et méthyltransférases. SRC1 par exemple interagit avec TEAD1 et TEAD2 *via* leur domaine bHLH/PAS.<sup>48</sup> Les protéines PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) sont des protéines associées à la chromatine capable de réaliser des modifications transcriptionnelles en ajoutant une chaîne polyA. Elles possèdent un rôle dans la réparation, la réplication et la différenciation des cellules en interagissant avec TEAD1 et TEAD4.<sup>49</sup> Parmi les cofacteurs se liant à l'ADN, on peut citer les protéines SRF (Serum Responsive Factor) qui appartiennent à la super famille des facteurs de transcription à boîte MADS (Mcm1, AGAMOUS DEFICIENS, SRF). Leur interaction se fait *via* les domaines MADS et TEA et permet d'activer de manière coopérative le gène  $\alpha$ -actine squelettique dans les cellules cardiaques. La protéine MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) a un rôle central dans l'activation des programmes génétiques qui contrôlent la différenciation et la prolifération cellulaire.<sup>50</sup> La protéine MAX est une phosphoprotéine qui possède un domaine hélice-boucle-hélice et un domaine leucine (bHLH-Z) qui interagit avec la protéine TEAD pour réguler la transcription du gène codant la chaîne lourde de la myosine cardiaque ( $\alpha$ -MHC).<sup>51</sup>

### c) ***Le co-répresseur VGLL***

Les protéines de la famille VGLL sont des co-activateurs transcriptionnels homologues de la protéine Vestigial (Vg) présente chez la drosophile interagissant avec le facteur de transcription TEAD. Il existe 4 co-facteurs transcriptionnels (VGLL1-4) se rapprochant structurellement de la

---

<sup>44</sup>Maeda, T.; Chapman, D. L.; Stewart, A. F. R. Mammalian Vestigial-like 2, a Cofactor of TEF-1 and MEF2 Transcription Factors That Promotes Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (50), 48889–48898.

<sup>45</sup>Azaki, A.; Fineman, J. R.; He, Y. Myocardial Transcription Factors Are Modulated during Pathologic Cardiac Hypertrophy in Vivo. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1996**, 132 (6), 1262–1271.

<sup>46</sup>Jacquemin, P.; Hwang, J.-J.; Martial, J. A.; Dollé, P.; Davidson, I. A Novel Family of Developmentally Regulated Mammalian Transcription Factors Containing the TEA/ATTS DNA Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (36), 21775–21785.

<sup>47</sup>Pobbati, A.V.; Hong, W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biology and Therapy.* **2013**, 14, 390-398

<sup>48</sup>Belandia, B.; Parker, M. G. Functional Interaction between the P160 Coactivator Proteins and the Transcriptional Enhancer Factor Family of Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (40), 30801–30805.

<sup>49</sup>Butler, A. J.; Ordahl, C. P. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Binds with Transcription Enhancer Factor 1 to MCAT1 Elements To Regulate Muscle-Specific Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19 (1), 296–306.

<sup>50</sup>Potthoff, M. J.; Olson, E. N. MEF2: A Central Regulator of Diverse Developmental Programs. *Development.* **2007**, 134 (23), 4131.

<sup>51</sup>Gupta, M. P.; Amin, C. S.; Gupta, M.; Hay, N.; Zak, R. Transcription Enhancer Factor 1 Interacts with a Basic Helix-Loop-Helix Zipper Protein, Max, for Positive Regulation of Cardiac Alpha-Myosin Heavy-Chain Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17 (7), 3924–3936.



protéine YAP1 avec une délétion des acides aminés présents en région C-terminal (environ 100 acides aminés) (Figure 13). VGLL4 se distingue des trois autres VGLL par la présence de deux domaines Vg en position C-terminal (Figure 14).

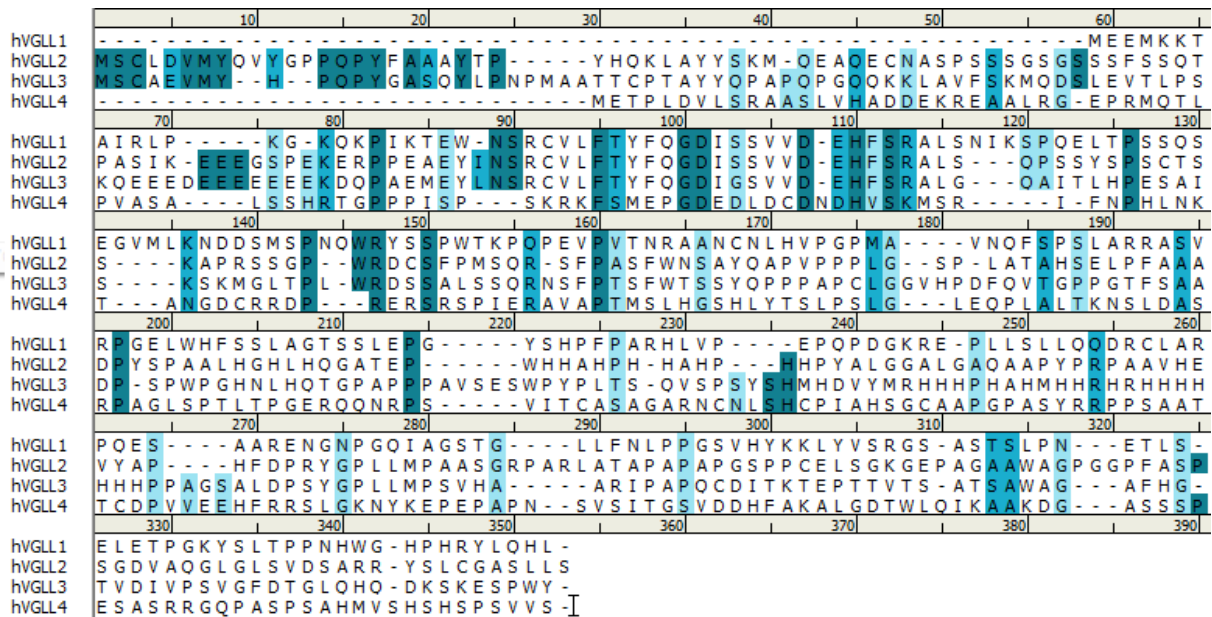


Figure 13 : Alignement des séquences VGLLs

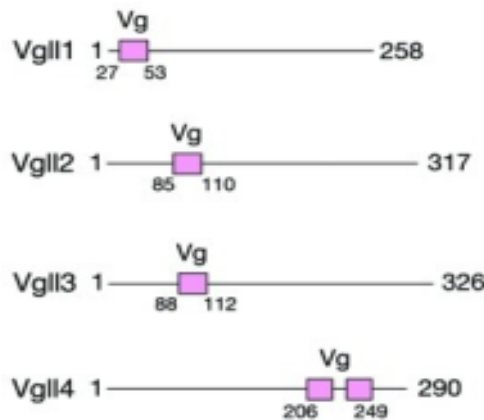


Figure 14 : Représentation schématique des protéines VGLLs<sup>47</sup>

Les interactions entre les protéines TEADs et VGLLs sont encore mal connues. Si la protéine VGLL1 semble avoir un effet positif sur la prolifération cellulaire des 4 formes de TEAD, VGLL4 est décrite comme suppresseur de tumeurs dans de nombreux cancers.<sup>52</sup> VGLL4 s'oppose à la transcription des

<sup>52</sup>Li, H.; Wang, Z.; Zhang, W.; Qian, K.; Liao, G.; Xu, W.; Zhang, S. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *Med Oncol.* **2015**, 32-83.

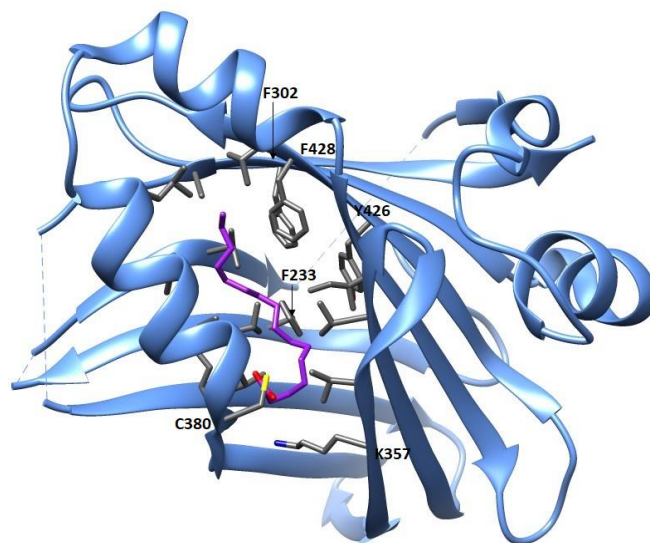


gènes cibles des complexe YAP/TAZ-TEAD et joue un rôle dans la régulation de l'apoptose. La fonction de VGLL3 est pour le moment mal comprise puisqu'une étude stipule que VGLL3 favorise la progression des sarcomes des tissus mous et le développement des sarcomes fibroblastiques myxoinflammatoires<sup>53</sup> alors qu'une autre revendique son caractère suppresseur de tumeurs dans le cancer ovarien.<sup>54</sup>

## C. Régulation de la voie Hippo

### a) *La palmitoylation*

La structure de la protéine hTEAD3<sub>219-435</sub> a récemment été publiée simultanément par deux équipes s'appuyant sur des démarches scientifiques très différentes.<sup>55,56</sup> En se penchant sur les données cristallographiques, *Noland* et ses collaborateurs ont remarqué une densité électronique surprenante ressemblant à un acide aliphatique lié à la Cys<sub>380</sub> au sein d'une poche hydrophobe.<sup>55</sup> Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier la présence de l'acide palmitique correspondant à un acide gras à 16 chainons au sein des protéines hTEAD3<sub>219-435</sub> et hTEAD2<sub>217-447</sub> (Figure 15).



**Figure 15 : Structure cristallographique de hTEAD2<sub>217-447</sub> avec l'acide palmitique (PDB 5EMV)<sup>55</sup>**

<sup>53</sup>Hallor, K.H. *et al.* Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J. Pathol.* **2009**, *217*, 716-727.

<sup>54</sup>Cody, N. A. L.; Ouellet, V.; Manderson, E. N.; Quinn, M. C. J.; Filali-Mouhim, A.; Tellis, P.; Zietarska, M.; Provencher, D. M.; Mes-Masson, A.-M.; Chevrette, M.; Tonin, P. N. Transfer of Chromosome 3 Fragments Suppresses Tumorigenicity of an Ovarian Cancer Cell Line Monoallelic for Chromosome 3p. *Oncogene.* **2006**, *26* (4), 618-632.

<sup>55</sup>Noland, C.L.; Gierke, S.; Schnier, P.D.; Murray, J.; Sandoval, W.N.; Sagolla, M.; Dey, A.; Hannoush, R.N.; Fairbrother, W.J.; Cunningham, C.N. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure.* **2016**, *24*, 179-186.

<sup>56</sup>Chan, P.; Han, X.; Zheng, B.; De Ran, M.; Yu, J.; Jarugumilli, G.K.; Deng, H.; Pan, D.; Luo, X.; Wu, X. Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 282-289.

Cette présence de palmitate est inhabituelle puisque les protéines TEAD sont généralement exprimées dans des cellules bactériennes telles qu'*E.Coli* n'exprimant pas de palmitoyltransférases (PATs).

*Chan et ses collaborateurs* ont identifié plus de 300 protéines autopalmitoylées dont les protéines hTEAD1 et hTEAD3.<sup>56</sup> Cette modification est très conservée dans les organismes eucaryotes et consiste en l'attachement d'un acide gras à un résidu cystéine par une liaison thioester réversible.<sup>57,58</sup> Le palmitate peut être inséré au sein des protéines soit de façon spontanée soit de manière enzymatique *via* la famille des palmitoyltransférases, possédant un motif DHHC (Asp-His-His-Cys), présentes au nombre de 23 dans le génome humain. Dans le cas de la S-palmitoylation, les cystéines possèdent dans leurs alentours des résidus basiques et une poche hydrophobe capable de stabiliser l'acide gras. Cette modification structurale est encore mal décrite mais elle peut affecter l'activité, la stabilité, la circulation au sein de la cellule mais également augmenter l'affinité de la protéine pour les membranes. On peut également citer la O-palmitoylation pour les protéines Wnt<sup>59</sup> et la N-palmitoylation pour les protéines Hedgehog.<sup>60</sup>

En alignant les séquences des protéines, il apparaît que 3 cystéines sont entièrement conservées chez les facteurs de transcription TEADs. Des mutations au niveau des Cys<sub>53</sub>, Cys<sub>327</sub> et Cys<sub>359</sub> de hTEAD1 ont permis de confirmer que les 3 cystéines peuvent être S-palmitoylées et que la Cys<sub>359</sub> représente le site le plus important et le plus stable.

Le manque d'activité transcriptionnelle des mutants hTEAD1 permet de valider l'importance de la présence de palmitate au sein de la protéine. Cependant, une interaction a été constatée avec VGLL4, prouvant que la conformation de la protéine reste indemne et que cette partie du domaine de liaison n'est pas affectée. Le palmitate ne se liant pas directement à YAP, semble réguler allostériquement l'interaction YAP-TEAD. De plus, un traitement avec l'hydroxylamine, un puissant agent réducteur des liaisons thioesters, a permis de démontrer l'importance de cette S-palmitoylation dans la stabilité de la protéine TEAD ( $\Delta T_m > 12^\circ\text{C}$ ).

Bien que la palmitoylation joue un rôle dans l'activité transcriptionnelle de TEAD, elle ne semble pas affecter sa localisation ni son passage membranaire.

Depuis la découverte de cet acide palmitique au sein des protéines hTEAD3 et hTEAD2, les anciennes données cristallographiques PDB ont été revisitées et ont permis de confirmer la présence

---

<sup>57</sup>Chamberlain, L. H.; Shipston, M. J. The Physiology of Protein S-Acylation. *Physiol. Rev.* **2015**, *95* (2), 341–376.

<sup>58</sup>Hannoush, R. N.; Arenas-Ramirez, N. Imaging the Lipidome:  $\omega$ -Alkynyl Fatty Acids for Detection and Cellular Visualization of Lipid-Modified Proteins. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (7), 581–587.

<sup>59</sup>Gao, X.; Arenas-Ramirez, N.; Scales, S. J.; Hannoush, R. N. Membrane Targeting of Palmitoylated Wnt and Hedgehog Revealed by Chemical Probes. *FEBS Lett.* **2011**, *585* (15), 2501–2506.

<sup>60</sup>Buglino, J. A.; Resh, M. D. Palmitoylation of Hedgehog Proteins. *Vitam. Horm.* **2012**, *88*, 229–252.

de palmitate dans toutes les structures cristallographiques de TEAD publiées. Les 4 isoformes de TEAD sont donc autopalmitoylées au niveau des résidus Cys<sub>359</sub> pour TEAD1, Cys<sub>380</sub> pour TEAD2, Cys<sub>368</sub> pour TEAD3 et Cys<sub>367</sub> pour TEAD4.

#### b) *La forme tronquée de TEAD4*

Un mécanisme de régulation de la voie Hippo a récemment été décrit impliquant une forme tronquée de TEAD4 (hTEAD4<sub>130-434</sub>).<sup>61</sup> Cet isoforme TEAD4-S ne possède pas de domaine d'interaction à l'ADN situé en N-terminal mais garde un domaine d'interaction à YAP intacte. Il est le fruit d'un épissage original du gène TEAD4 où l'exon 3 a été éliminé. Cet exon ressemble au site de liaison à la protéine RBM4 (CGGCCGG) qui a été démontrée comme suppresseur de tumeurs dans de nombreux cancers.

TEAD4-S existe sous forme canonique dans tous les organes et se situe aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau de la cellule. Sa surexpression inhibe l'activité du complexe YAP-TEAD conduisant à l'inhibition de la prolifération et de l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. Néanmoins, l'expression de TEAD-S est fortement réduite dans de nombreux types de cancer.

#### c) *Autres voies de signalisations*

D'autres voies de signalisation jouent un rôle dans la régulation de la voie Hippo en interagissant avec les cofacteurs YAP/TAZ, comme par exemple les voies EGFR/MAPK, Smad, Notch et Wnt (Figure 16).<sup>21</sup>

Bien que leurs mécanismes biologiques restent à ce jour mal élucidés, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine semble être la voie de signalisation la plus importante dans la régulation de la voie Hippo puisqu'elle joue également un rôle dans le développement embryonnaire et l'homéostasie chez l'adulte.<sup>62</sup> Elle consiste à réguler la protéine nucléaire  $\beta$ -caténine par dégradation d'un complexe cytoplasmique formé autour d'une protéine centrale Axin. En absence de ligands, la destruction du complexe entraîne la dégradation de la  $\beta$ -caténine et de toutes les protéines partenaires. A l'inverse, la présence de ligand inactive la destruction du complexe, résultant en une accumulation de la  $\beta$ -caténine mais également à la libération de YAP/TAZ, composants du complexe.<sup>17</sup>

---

<sup>61</sup>Qi, Y.; Yu, J.; Han, W.; Fan, X.; Qian, H.; Wei, H.; Tsai, Y. S.; Zhao, J.; Zhang, W.; Liu, Q.; Meng, S.; Wang, Y.; Wang, Z. A Splicing Isoform of TEAD4 Attenuates the Hippo–YAP Signalling to Inhibit Tumour Proliferation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, ncomms11840.

<sup>62</sup>Imajo, M.; Miyatake, K.; Iimura, A.; Miyamoto, A.; Nishida, E. A Molecular Mechanism That Links Hippo Signalling to the Inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling. *EMBO J.* **2012**, *31* (5), 1109–1122.

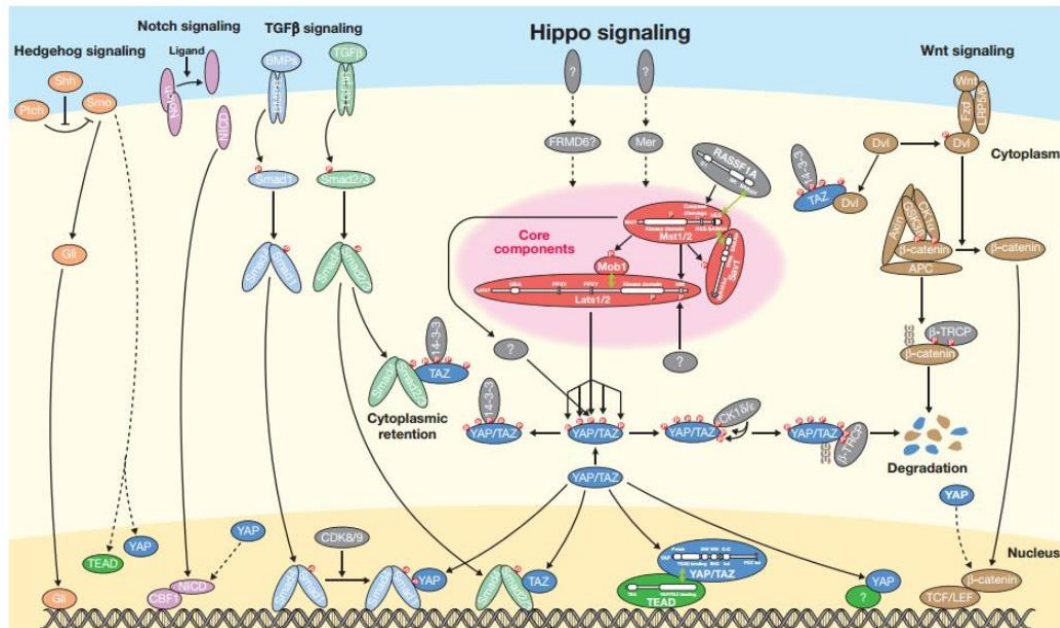


Figure 16 : Voies de signalisation régulant la voie Hippo<sup>21</sup>

#### d) *Les modifications post-traductionnelles*

La localisation, la fonction et la dégradation des protéines sont dépendantes des modifications post-traductionnelles pouvant être apportées ou enlevées par différentes enzymes.

Les effecteurs YAP/TAZ/VGLL peuvent également subir des modifications post-traductionnelles autres que la phosphorylation qui vont conduire à l'activation ou l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des co-activateurs. Par exemple, la méthylation de Lys<sub>494</sub> de YAP par l'histone méthyltransférase Set7 entraine sa séquestration cytoplasmique.<sup>63</sup> A l'inverse, son acétylation par le complexe CBP/p300 augmente son activité transcriptionnelle. Une phosphorylation activatrice peut être apportée sur la tyrosine en position Tyr<sub>357</sub> de YAP (Tyr<sub>316</sub> de TAZ) par la Src kinase YES1 ou la tyrosine kinase Abl, qui favorise son interaction avec le facteur de transcription p73 conduisant à l'augmentation de la transcription des gènes pro-apoptotiques (Bax).<sup>64</sup> La formation de pont disulfure entre la fonction thiol du glutathion et les 3 résidus cystéines de TAZ (Cys<sub>261</sub>, Cys<sub>315</sub>, Cys<sub>368</sub>) induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle de TEAD.

<sup>63</sup>Mao, B.; Hu, F.; Cheng, J.; Wang, P.; Xu, M.; Yuan, F.; Meng, S.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Bi, W. SIRT1 Regulates YAP2-Mediated Cell Proliferation and Chemoresistance in Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene*. **2014**, *33* (11), 1468.

<sup>64</sup>Rosenbluh, J.; Nijhawan, D.; Cox, A. G.; Li, X.; Neal, J. T.; Schafer, E. J.; Zack, T. I.; Wang, X.; Tsherniak, A.; Schinzel, A. C.; Shao, D. D.; Schumacher, S. E.; Weir, B. A.; Vazquez, F.; Cowley, G. S.; Root, D. E.; Mesirov, J. P.; Beroukhim, R.; Kuo, C. J.; Goessling, W.; Hahn, W. C. β-Catenin Driven Cancers Require a YAP1 Transcriptional Complex for Survival and Tumorigenesis. *Cell*. **2012**, *151* (7), 1457–1473.

Pour finir, il a été montré chez le nouveau-né murin, que l'activité cardiaque de VGLL4 est régulée par son interaction avec p300 qui acétyle Lys<sub>225</sub> de hVGLL4. La mutation de cette lysine en arginine empêche l'acétylation et permet l'interaction TEAD1-VGLL4.<sup>65</sup>

## **II. Les complexes YAP/TAZ/VGLL-TEAD**

### **A. Le complexe YAP-TEAD**

YAP et TEAD forment un hétérodimère avec une structure globulaire d'environ 50 x 60 x 40 Å, laissant apparaître trois interfaces.<sup>66</sup> La structure du complexe YAP-TEAD a été identifiée par cristallographie aux rayons X et des études de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer l'importance relative des acides aminés impliqués dans l'interaction entre ces deux protéines.

#### **a) Structure cristallographique du complexe**

Deux structures cristallographiques de l'interaction YAP-TEAD sont disponibles à ce jour. Elles correspondent au complexe entre le fragment hYAP<sub>50-171</sub> et le fragment hTEAD<sub>1209-426</sub> (PDB 3KYS) et au complexe formé entre mYAP<sub>35-92</sub> et mTEAD<sub>4210-427</sub> (PDB 3JUA).<sup>67</sup>

La superposition des spectres <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-HSQC de hYAP<sub>2-268</sub> et du complexe hYAP<sub>2-268</sub>-hTEAD<sub>2217-447</sub> montre que le domaine de liaison à TEAD présent chez YAP (environ 40 acides aminés) est nativement non structuré à l'exception des domaines WW<sup>68</sup> et s'enroule autour de la protéine TEAD en créant trois interfaces : un feuillet β (52-58), une hélice α (61-73) et une boucle Ω (86-100), reliées par un linker (74-85)(Figure 17).<sup>66</sup>

Le domaine d'interaction entre les protéines hYAP<sub>50-171</sub> et hTEAD<sub>1209-426</sub> implique au total 4 hélices α et 12 feuillets β chez TEAD, et, une hélice α, un feuillet β et une région en spirale, appelée boucle Ω chez YAP (Figure 17). Dans la structure de TEAD, les deux feuillets β sont compactés l'un contre l'autre formant un β-sandwich, encerclés par les quatre hélices α. Le premier feuillet β est constitué des feuillets β1, β2, β5, β8 et β9, et le second est composé des feuillets β3, β4, β6, β7, β10,

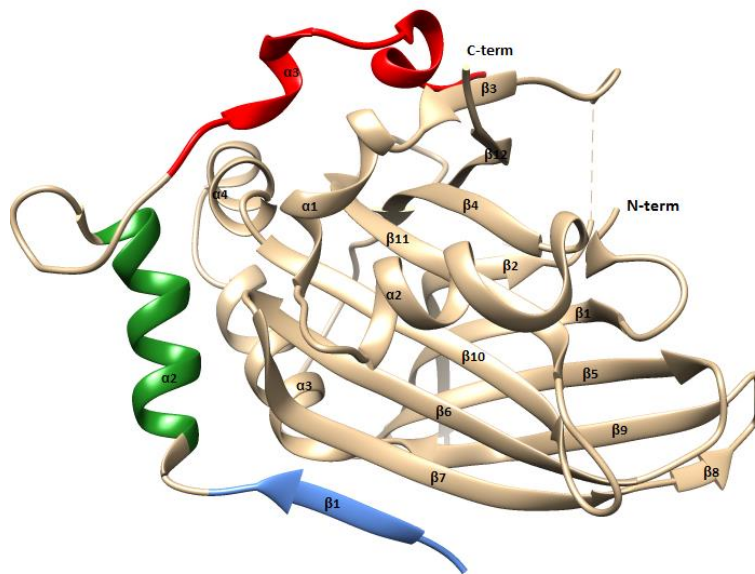
<sup>65</sup>Hata, S.; Hirayama, J.; Kajihito, H.; Nakagawa, K.; Hata, Y.; Katada, T.; Furutani-Seiki, M.; Nishina, H. A Novel Acetylation Cycle of Transcription Co-Activator Yes-Associated Protein That Is Downstream of Hippo Pathway Is Triggered in Response to S<sub>N</sub>2 Alkylating Agents. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (26), 22089–22098.

<sup>66</sup>Li, Z.; Zhao, B.; Wang, P.; Chen, F.; Dong, Z.; Yang, H.; Guan, K.-L.; Xu, Y. Structural Insights into the YAP and TEAD Complex. *Genes Dev.* **2010**, *24* (3), 235–240.

<sup>67</sup>Chen, L.; Chan, S. W.; Zhang, X.; Walsh, M.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. Structural Basis of YAP Recognition by TEAD4 in the Hippo Pathway. *Genes Dev.* **2010**, *24* (3), 290–300.

<sup>68</sup>Tian, W.; Yu, J.; Tomchick, D. R.; Pan, D.; Luo, X. Structural and Functional Analysis of the YAP-Binding Domain of Human TEAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (16), 7293–7298.

$\beta$ 11, et  $\beta$ 12. Les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 permettent de connecter les feuillets  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4 et d'envelopper le  $\beta$ -sandwich sur un côté. Les hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4, qui relient les feuillets  $\beta$ 9 et  $\beta$ 10, servent à stabiliser le cœur du  $\beta$ -sandwich en fermant l'autre extrémité entre les deux feuillets  $\beta$ .



**Figure 17 : Structure du complexe hYAP<sub>50-171</sub>-hTEAD1<sub>209-426</sub> (PDB 3KYS)<sup>66</sup>**

L'interface 1 est caractérisée par 7 liaisons hydrogène entre les acides aminés 52 à 58 de YAP et le feuillet  $\beta$ 7 (333-339) de TEAD, formant ainsi un feuillet  $\beta$  antiparallèle (Figure 18A).

La seconde interface met en jeu l'hélice  $\alpha$ 1 de YAP (61-73) avec les hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4 de TEAD (360-384). Elle est représentée par 3 interactions hydrophobes : Leu<sub>65</sub> de YAP se lie avec Tyr<sub>361</sub>, Phe<sub>365</sub> et Lys<sub>368</sub> de TEAD ; Leu<sub>68</sub> avec Phe<sub>329</sub>, Phe<sub>365</sub> et Phe<sub>385</sub> ; et Phe<sub>69</sub> avec Phe<sub>365</sub>, Lys<sub>368</sub>, Leu<sub>372</sub> et Val<sub>381</sub> (Figure 18B).

La troisième interface fait référence à l'interaction de la boucle  $\Omega$  de YAP (86-100) avec TEAD grâce aux chaînes latérales de la poche hydrophobe centrée sur la Lys<sub>304</sub> de TEAD1, formée par  $\beta$ 4,  $\beta$ 11,  $\beta$ 12,  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 4 de TEAD (Figure 18C). La chaîne hydrophobe composée des acides aminés Met<sub>86</sub>, Leu<sub>91</sub>, Phe<sub>95</sub> et Phe<sub>96</sub> de YAP engage des interactions de Van der Waals avec les résidus Val<sub>257</sub>, Ile<sub>262</sub>, Leu<sub>287</sub>, Val<sub>406</sub> et Tyr<sub>421</sub> de TEAD. Cette interface est amplifiée par 3 liaisons hydrogène entre les motifs guanidinium Arg<sub>89</sub> et Arg<sub>87</sub> de YAP et les carboxylate Asp<sub>264</sub> et Glu<sub>408</sub> de TEAD respectivement, et la fonction alcool de Ser<sub>94</sub> de YAP avec les fonctions phénol de Tyr<sub>421</sub> et acide de Glu<sub>255</sub> de TEAD.

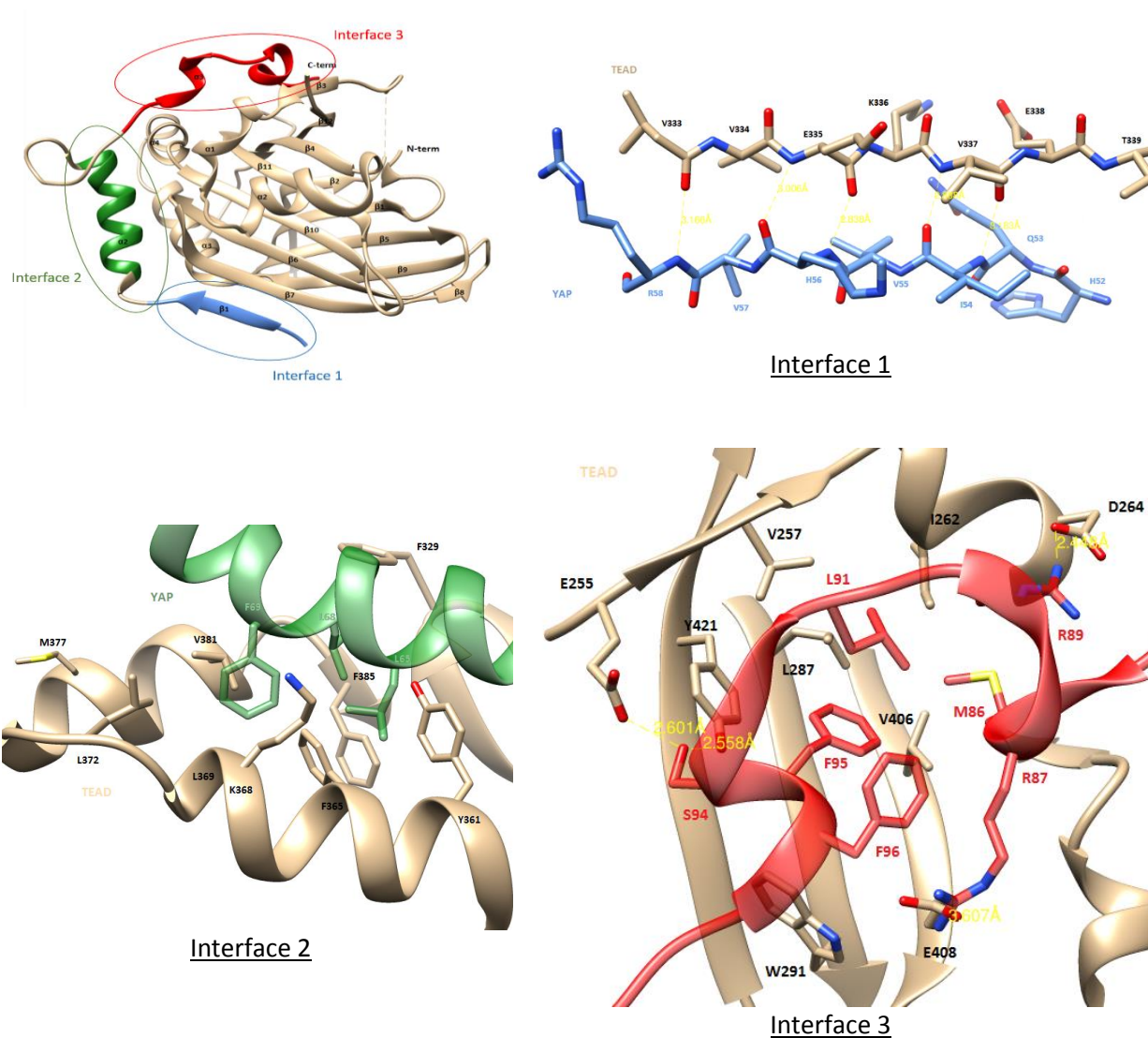


Figure 18 : Les trois interfaces du complexe hYAP<sub>50-171</sub>-hTEAD<sub>1209-426</sub> (PDB 3KYS)<sup>66</sup>

b) **Mesures de l'interaction YAP-TEAD**

La contribution de chaque interface a été évaluée pour déterminer le motif minimum de YAP nécessaire à la formation du complexe. Différents peptides de petites tailles, représentant divers fragments de la protéine hYAP, ont été synthétisés pour déterminer les régions importantes de l'interaction avec hTEAD<sub>4217-434</sub> (Tableau 2).<sup>69</sup>

Fragments de protéines	K <sub>d</sub>
hYAP <sub>50-171</sub>	3 ± 1 nM
hYAP <sub>50-99</sub>	11 ± 1 nM
hYAP <sub>61-99</sub>	29 ± 7 nM

Tableau 2 : Affinités des peptides hYAP sur hTEAD<sub>4217-434</sub> mesurées par SPR<sup>69</sup>

<sup>69</sup>Hau, J. C.; Erdmann, D.; Mesrouze, Y.; Furet, P.; Fontana, P.; Zimmermann, C.; Schmelzle, T.; Hofmann, F.; Chène, P. The TEAD4-YAP/TAZ Protein-Protein Interaction: Expected Similarities and Unexpected Differences. *ChemBioChem*. 2013, 14 (10), 1218–1225.





Figure 19 : Structures primaires de hTEAD1-4 et mTEAD4, et, du domaine de liaison à TEAD de hYAP1-2δ et mYAP<sup>66</sup>



L'affinité du peptide hYAP<sub>50-171</sub>, représentant la globalité du domaine d'interaction à TEAD, reste du même ordre de grandeur que celles des fragments hYAP<sub>50-99</sub> et hYAP<sub>61-99</sub>. La délétion des acides aminés hYAP<sub>50-60</sub> et hYAP<sub>100-171</sub> chez YAP semble peu affecter l'interaction entre les deux protéines et concentre le site principal de liaison à TEAD à hYAP<sub>61-99</sub>.

Cette observation a également été confirmée par Tian et ses collaborateurs.<sup>68</sup> Les analyses ITC montrent que le peptide hYAP<sub>61-99</sub> se lie à hTEAD2<sub>217-447</sub> avec une constante d'affinité ( $K_d$ ) de 96 nM, à peine trois fois supérieure à celle du peptide hYAP<sub>2-268</sub> qui a été déterminé à 33 nM.

Les concentrations qui inhibent l'interaction YAP-TEAD de 50% ( $IC_{50}$ ) de différents fragments de la protéine hYAP ont été mesurées sur le complexe hYAP-hTEAD2<sub>217-447</sub> (Tableau 3)<sup>69</sup> et ont permis de préciser que la boucle  $\Omega$ , correspondant aux acides aminés 85-99 chez YAP, représente l'interface la plus importante dans l'interaction avec TEAD. Bien que l' $IC_{50}$  de la boucle  $\Omega$  de YAP seule soit nettement supérieure à celle de l'hélice  $\alpha$  seule, elle est cependant mille fois moins affine pour TEAD que lorsqu'elle est liée à l'hélice  $\alpha$ .

	Hélice $\alpha$	Linker	Boucle $\Omega$	$IC_{50}$	$K_d$
YAP <sub>61-99</sub>	SETDLEALFNAVM	NPKTANVPQTV	PMRLRKL PDSFFKPP	56 ± 8 nM	96 nM
YAP <sub>63-73</sub>	SETDLEALFNAVM	-	-	>150 $\mu$ M	
YAP <sub>85-99</sub>	-	-	PMRLRKL PDSFFKPP	70 ± 4 $\mu$ M	
YAP <sub>2-258</sub>					33 nM

Tableau 3 : Affinités des différents peptides de YAP envers hTEAD2<sub>217-447</sub><sup>68</sup>

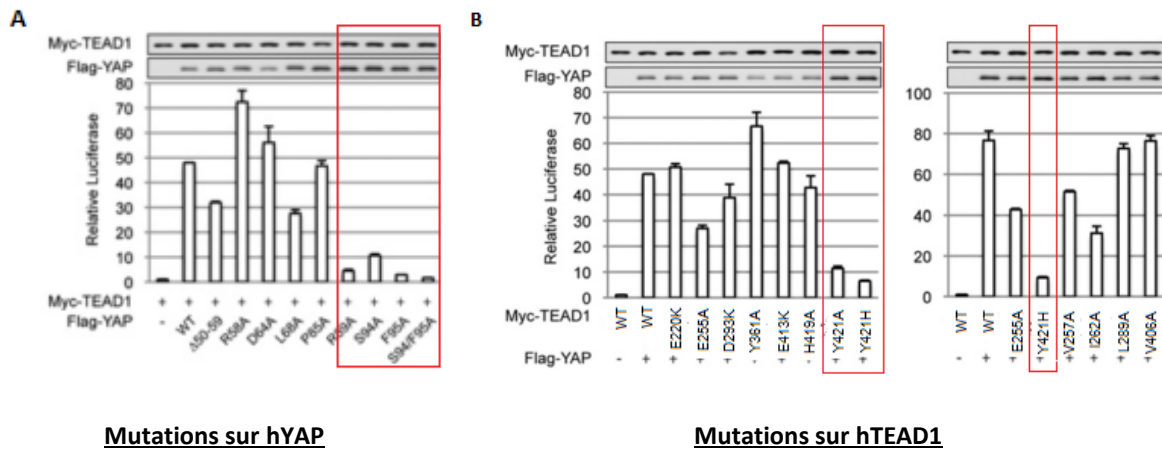
### c) *AlaScan et mutagenèse dirigée*

Différentes études de mutagenèse dirigée et AlaScan sur chacune des protéines ont été réalisées afin de valider l'importance de chaque interface dans la formation du complexe YAP-TEAD (Figure 20).<sup>66,70</sup>

La délétion du feuillet  $\beta$ 1 (50-59) de YAP ou encore la mutation des résidus Arg<sub>58</sub>, Asp<sub>61</sub>, Leu<sub>68</sub>Ala et Phe<sub>69</sub>Ala, impliqués dans le motif LXXLF de l'interface 2 n'a pas d'effet conséquent sur l'interaction avec hTEAD1 (Figure 20A). En revanche, les mutations réalisées sur les acides aminés Ser<sub>94</sub> et Phe<sub>96</sub> réduisent significativement l'affinité avec TEADs et l'expression du gène cible *CTGF*. L'interaction est sévèrement diminuée lorsqu'on mute également les acides aminés Arg<sub>89</sub>, Leu<sub>91</sub>, Ser<sub>94</sub> et Phe<sub>95</sub>. De la même façon, 15 mutations ont été réalisées sur la protéine hTEAD1 mais seule la mutation Tyr<sub>421</sub>Ala ou His a montré une diminution de l'interaction entre les deux protéines car elle abolit la liaison avec Ser<sub>94</sub> de YAP (Figure 20B). Ces acides aminés, tous présents au niveau de l'interface 3, valident cette

<sup>70</sup>Mesrouze, Y.; Bokhovchuk, F.; Meyerhofer, M.; Fontana, P.; Zimmermann, C.; Martin, T.; Delaunay, C.; Erdmann, D.; Schmelzle, T.; Chene, P. Dissection of the Interaction between the Intrinsically Disordered YAP Protein and the Transcription Factor TEAD. *eLife*. **2017**, *6*, e25068.

interaction comme essentielle à la formation et l'activité du complexe YAP-TEAD. D'autres études ont également été réalisées sur hTEAD4 et hTEAD2 et mènent à la même conclusion.



**Figure 20 : Effet des mutations de hYAP (A) et de hTEAD1 (B) sur l'interaction YAP-TEAD<sup>66</sup>**

Des études d'alanine scan (synthèse de fragments de YAP dont un résidu est remplacé par un résidu alanine) et de protéines tronquées ont permis de déterminer la séquence minimale de la boucle  $\Omega$  de YAP interagissant avec TEAD et de confirmer les résidus essentiels à cette interaction.<sup>71</sup> Si la délétion des acides aminés Pro<sub>81</sub>, Gln<sub>82</sub>, Thr<sub>83</sub> n'affecte pas le pourcentage d'inhibition du complexe, la suppression des acides aminés Val<sub>84</sub>, Pro<sub>85</sub>, Met<sub>86</sub> de YAP induit une perte de l'inhibition indiquant leur rôle primordial dans l'interaction avec TEAD. La séquence interagissant avec TEAD démarre donc à l'acide aminé Val<sub>84</sub> de YAP. De même, il a été effectué différentes troncatures pour déterminer la fin de la séquence. La suppression de l'acide aminé Glu<sub>100</sub> a un léger effet sur l'interaction alors que la délétion de Pro<sub>99</sub> et Pro<sub>98</sub> est très dommageable pour l'activité. En conclusion, la séquence d'interaction de la boucle  $\Omega$  de YAP avec TEAD se situe donc de l'acide aminé Val<sub>84</sub> à Pro<sub>99</sub>, confirmant globalement les résultats obtenus précédemment.

## B. Le complexe TAZ-TEAD

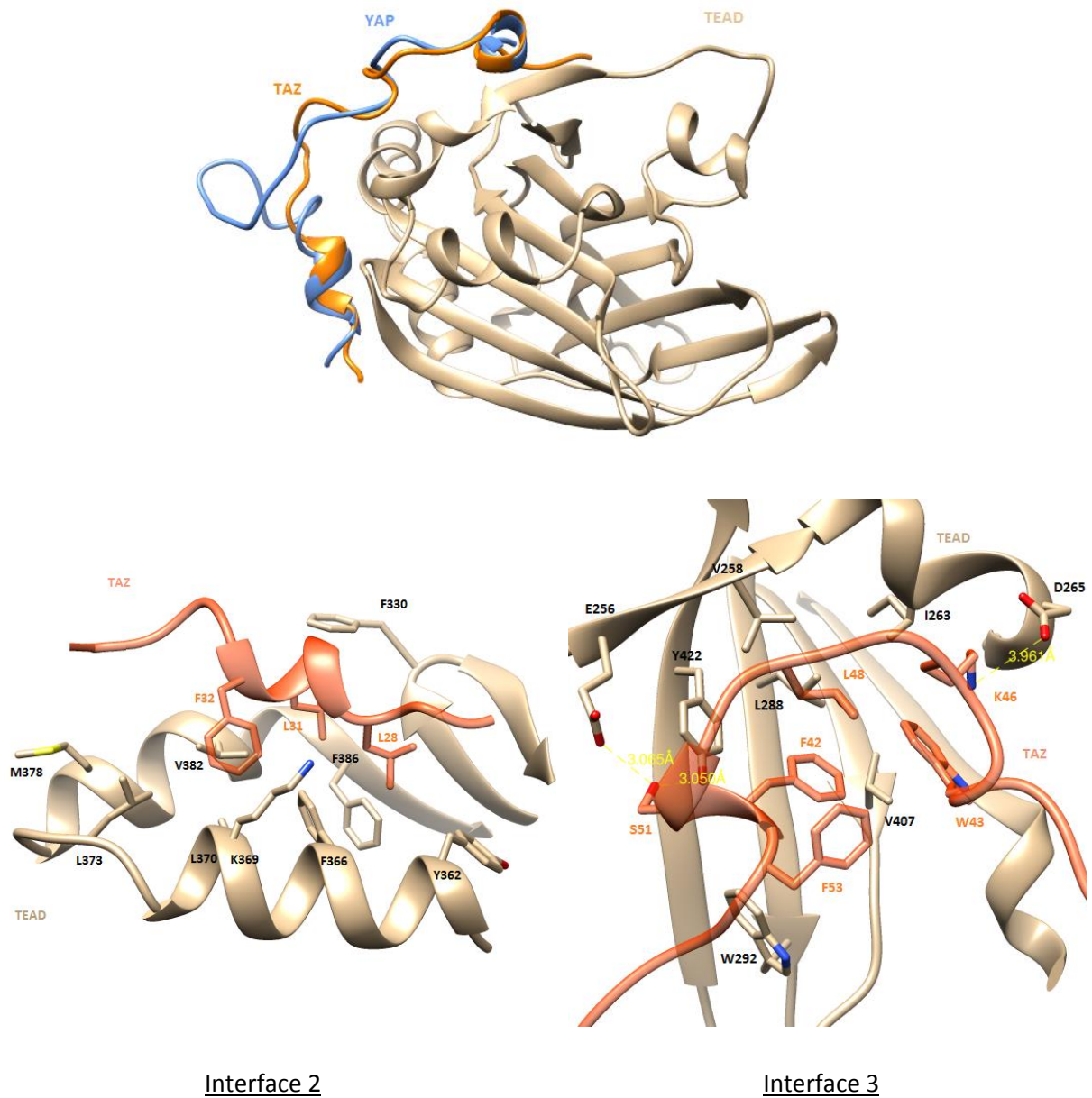
La structure du complexe mTAZ<sub>25-57</sub>-mTEAD4<sub>210-427</sub> (PDB 5GN0) a récemment été résolue par Kaan et ses collaborateurs.<sup>72</sup> Les auteurs ont décrits deux modes de liaison bien distincts. Le premier est similaire à celui décrit par l'interaction YAP-TEAD avec un complexe 1:1 alors que le second

<sup>71</sup>Zhang, Z.; Lin, Z.; Zhou, Z.; Shen, H. C.; Yan, S. F.; Mayweg, A. V.; Xu, Z.; Qin, N.; Wong, J. C.; Zhang, Z.; Rong, Y.; Fry, D. C.; Hu, T. Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP-TEAD Protein-Protein Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (9), 993-998.

<sup>72</sup>Kaan, H. Y. K.; Chan, S. W.; Tan, S. K. J.; Guo, F.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. Crystal Structure of TAZ-TEAD Complex Reveals a Distinct Interaction Mode from That of YAP-TEAD Complex. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 453-468.

forme un complexe hétérotétramérique 2:2 où deux molécules de TAZ interagissent avec deux molécules de TEAD.

La comparaison des complexes mYAP<sub>35-92</sub>-mTEAD<sub>4210-427</sub> (PDB 3JUA) et mTAZ<sub>25-57</sub>-mTEAD<sub>4210-427</sub> (PDB 5GN0) montrent une superposition parfaite des interfaces 2 et 3 (Figure 21).

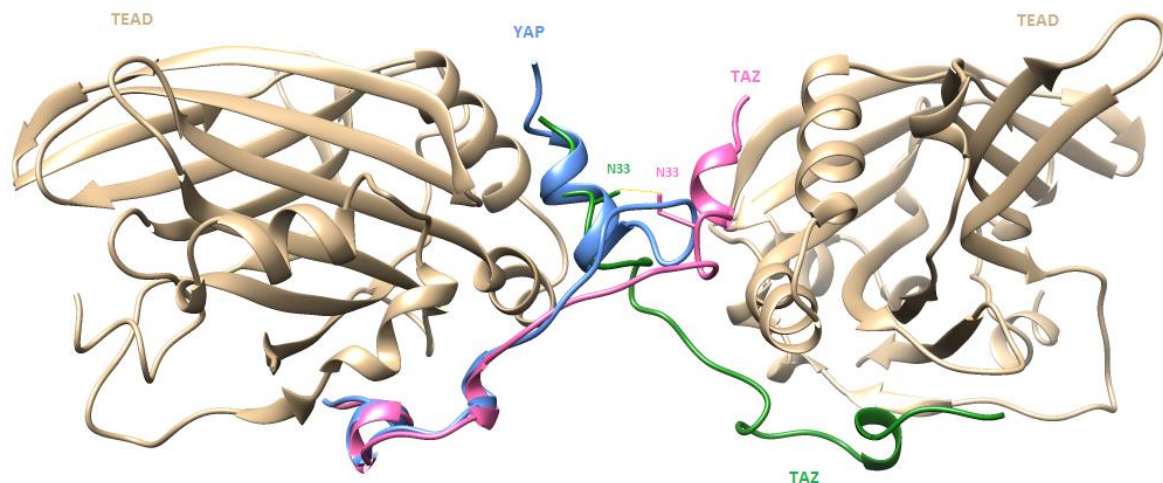


**Figure 21 : Représentation du complexe mTAZ<sub>25-57</sub>-mTEAD<sub>4210-427</sub>(PDB 5GN0)<sup>72</sup>**

L'hélice  $\alpha_1$  de TAZ (résidus Leu<sub>28</sub>, Leu<sub>31</sub>, Phe<sub>32</sub>, Val<sub>35</sub>, Met<sub>36</sub>) interagit avec une poche hydrophobe formée par les feuillets  $\beta_6$ - $\beta_7$  (Tyr<sub>362</sub>, Phe<sub>366</sub>, Lys<sub>369</sub>, Leu<sub>370</sub>, Leu<sub>373</sub>, Met<sub>378</sub>, Val<sub>382</sub>, Phe<sub>386</sub>) de TEAD. Dans la seconde interface, les résidus Phe<sub>52</sub>, Leu<sub>48</sub>, Trp<sub>43</sub>, Phe<sub>53</sub> de la boucle  $\Omega$  de TAZ établissent des

interactions hydrophobes avec Leu<sub>288</sub>, Lys<sub>290</sub>, Trp<sub>292</sub> et Val<sub>407</sub> de TEAD. Deux interactions de Van der Waals sont également à noter entre Phe<sub>52</sub>-Lys<sub>290</sub> et Pro<sub>56</sub>-Gln<sub>418</sub>. Pour finir, l'interface 3 engage des liaisons hydrogène entre Ser<sub>51</sub> de TAZ avec Tyr<sub>422</sub> et Glu<sub>256</sub> et Lys<sub>46</sub> avec Asp<sub>265</sub> de TEAD.

La différence majeure entre ces deux protéines réside dans le linker reliant l'hélice  $\alpha$  à la boucle  $\Omega$ , puisque celui de TAZ ne comporte que 13 résidus contrairement aux 19 résidus de YAP. *Hau* et ses collaborateurs avaient précédemment supposé que l'absence du motif  $_{81}PXX\Phi P_{85}$ , essentiel à l'interaction YAP-TEAD, résulterait en un complexe TAZ-TEAD 2:1 où deux molécules de TAZ interagiraient avec une seule molécule de TEAD.<sup>69</sup> Cependant, bien que TAZ ne présente pas de motif PXX $\Phi$ P, elle présente une affinité similaire à YAP (5 nM) pour la protéine TEAD et induit la transcription des différents gènes cibles. Ce maintien d'interaction pourrait être dû au second mode de liaison de mTAZ<sub>25-57</sub> avec mTEAD4<sub>210-427</sub> formant un complexe 2:2 qui laisse entrevoir l'apparition d'un pont entre chaque Asn<sub>33</sub> de chaque protéine TAZ (Figure 22).



**Figure 22 : Deuxième mode de liaison de mTAZ<sub>25-57</sub> à mTEAD4<sub>210-427</sub> (PDB 5GN0)<sup>72</sup>**

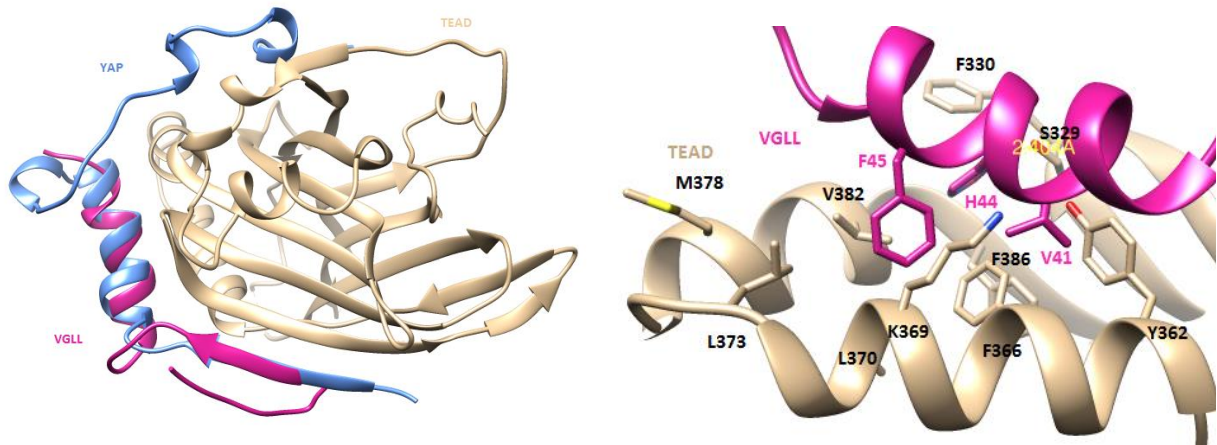
De même que pour la protéine YAP, la boucle  $\Omega$  hTAZ<sub>24-56</sub> a été identifiée comme l'élément essentiel de l'interaction avec TEAD avec une IC<sub>50</sub> de 13  $\mu$ M et une affinité de 48 nM pour hTEAD4.<sup>69</sup>

### C. Le complexe VGLL-TEAD

Les structures cristallographiques de deux complexes VGLL-TEAD sont disponibles à ce jour : mVGLL1<sub>20-56</sub>-mTEAD4<sub>210-427</sub> (PDB 4EAZ)<sup>73</sup> et mVGLL4<sub>203-256</sub>-mTEAD4<sub>210-427</sub> (PDB 4LN0).<sup>74</sup>

<sup>73</sup>Pobbati, A. V.; Chan, S. W.; Lee, I.; Song, H.; Hong, W. Structural and Functional Similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD Complexes. *Structure*.**2012**, *20* (7), 1135–1140.

La superposition de hYAP<sub>150-171</sub>-hTEAD<sub>1209-426</sub> (PDB 3KYS) et de mVGLL<sub>120-56</sub>-mTEAD<sub>4210-427</sub> (PDB 4EAZ) montre l'alignement parfait des interfaces 1 et 2 et l'absence de la boucle  $\Omega$  au sein de la protéine pour établir la troisième interface (Figure 23).



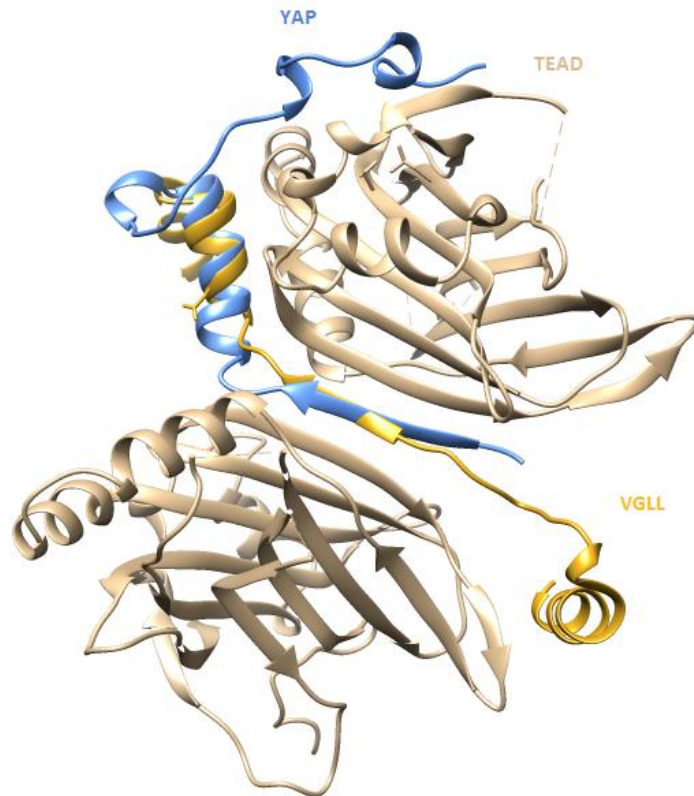
**Figure 23 : Représentation du complexe mVGLL<sub>120-56</sub>-mTEAD<sub>4210-427</sub>(PDB 4EAZ)<sup>73</sup>**

L'interface 1 met en jeu des liaisons hydrogène entre les acides aminés 28-32 de VGLL1 (feuillet  $\beta$ 2) et les acides aminés 334-338 (feuillet  $\beta$ 7) de TEAD4 (Figure 23A) alors que l'interface 2 résulte en l'interaction de l'hélice  $\alpha$  de VGLL1 avec les hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4 de TEAD (Figure 23B). Le motif  ${}_{41}\text{VXXHF}_{45}$  de VGLL1 est une variante de  ${}_{65}\text{LXXLF}_{69}$  présent chez YAP. Phe<sub>45</sub> interagit avec Phe<sub>366</sub>, Lys<sub>369</sub>, Leu<sub>370</sub>, Leu<sub>373</sub> et Val<sub>382</sub> de TEAD4 (similaire à Phe<sub>69</sub> de YAP). Val<sub>41</sub> interagit avec Tyr<sub>362</sub>, Phe<sub>366</sub>, Lys<sub>369</sub> de TEAD (similaire à Leu<sub>65</sub> de YAP). His<sub>44</sub> interagit avec Phe<sub>330</sub>, Phe<sub>366</sub>, Phe<sub>386</sub> de TEAD4 comme Leu<sub>68</sub> de YAP mais établit également deux liaisons hydrogène avec Val<sub>382</sub> et Ser<sub>329</sub>. La double mutation His<sub>44</sub>Ala et Phe<sub>45</sub>Ala montre une réduction significative de l'interaction VGLL1-TEAD, relevant l'importance de ces deux acides aminés.<sup>66</sup>

Un second complexe a été décrit par *Jiao* et ses collaborateurs en 2014.<sup>74</sup> mVGLL<sub>4203-256</sub> forme un complexe 1:2 avec mTEAD<sub>4210-427</sub> (PDB 4LN0) où chaque motif Vg de VGLL4 interagit avec un TEAD différent (Figure 24).

<sup>74</sup>Jiao, S.; Wang, H.; Shi, Z.; Dong, A.; Zhang, W.; Song, X.; He, F.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wang, W.; Wang, X.; Guo, T.; Li, P.; Zhao, Y.; Ji, H.; Zhang, L.; Zhou, Z. A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell*.**2014**, *25* (2), 166–180.





**Figure 24 : Représentation du mode de liaison de mVGLL4 (PDB 4LN0)<sup>74</sup>**

La région C-terminal (acides aminés 233-244) se lie à un TEAD au niveau de l'interface 2 alors que le feuillet  $\beta_1$  de VGLL4 est antiparallèle aux deux  $\beta_7$  de deux TEAD. Pour finir, la partie N-terminal (204-214) forme une nouvelle interface avec une autre molécule TEAD. Le complexe mVGLL4-mTEAD4 met en jeu des interactions hydrophobes entre Val<sub>206</sub>, His<sub>209</sub>, Phe<sub>210</sub>, Arg<sub>212</sub> et Leu<sub>214</sub> de mVGLL4 avec Phe<sub>330</sub>, Tyr<sub>362</sub>, Phe<sub>366</sub>, Lys<sub>369</sub>, Leu<sub>370</sub>, Leu<sub>373</sub>, Met<sub>378</sub> et Val<sub>382</sub> de mTEAD4. Une autre interaction est observée entre Val<sub>235</sub>, His<sub>237</sub>, Phe<sub>238</sub>, Lys<sub>240</sub> et Leu<sub>242</sub> de mVGLL4 avec mTEAD4. Les mutations des acides aminés Val<sub>209</sub>Ala, His<sub>212</sub>Ala, Phe<sub>213</sub>Ala, Arg<sub>215</sub>Ala, Leu<sub>217</sub>Ala ne semblent pas affecter l'interaction entre les deux protéines. En revanche, les mutations de His<sub>240</sub>Ala, His<sub>240</sub>Ala/Phe<sub>241</sub>Ala et His<sub>212</sub>Ala/Phe<sub>213</sub>Ala décroissent littéralement la formation du complexe. La délétion du domaine Vg (domaine de liaison à TEAD) annule l'effet inhibiteur de la prolifération, affirmant son importance dans la formation du complexe.

L'absence d'interface 3 au sein du complexe VGLL-TEAD, pourtant essentielle à la formation du complexe YAP-TEAD, laisserait présager une diminution de son affinité pour TEAD comparée à celles de YAP ou TAZ. Pourtant, le groupe de *Jiao* a mesuré une constante d'affinité entre VGLL4-TEAD4 de

6.8 nM, du même ordre de grandeur que celle obtenue pour hYAP1-TEAD4 de 2.1 nM, remettant alors en question le rôle de l'interface 3. Cette observation a également été validée par Mesrouze et ses collaborateurs qui ont montré une affinité de mVGLL1<sub>27-51</sub> pour TEAD4 comparable à celle de hYAP<sub>61-99</sub> et hTAZ<sub>24-56</sub>.<sup>75</sup>

### III. Dérégulation de la voie Hippo

La dérégulation de la voie Hippo et/ou la surexpression de certains acteurs ont été identifiées dans de nombreux cancers.<sup>76</sup>

La simple mutation de Tyr<sub>421</sub> de TEAD1 conduit à une maladie rare appelée maladie de Sveinsson ou dégénérescence chorio-rétinienne péripapillaire hélicoïdale due à la suite d'une perte d'interaction de TEAD1 avec YAP (et probablement TAZ). C'est une mutation causale décrite dans 100% des cas de la pathologie.<sup>77</sup>

#### A. La voie Hippo et le cancer

Les protéines YAP et TAZ sont clairement reconnues comme des oncogènes.<sup>78,79</sup> Leur concentration élevée au sein de la cellule et principalement au niveau du noyau a été relevée dans différents types de cancer tels que le foie, les poumons, la peau, le colon ou encore les ovaires.<sup>80</sup> YAP et TAZ ont été caractérisées comme des acteurs modulant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) conduisant les cellules à se détacher les unes des autres.<sup>81,82</sup> Leur activation/surexpression entraîne la perte d'expression des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et l'augmentation des marqueurs mésenchymateux tels que la Vimentine.<sup>83</sup>

---

<sup>75</sup>Mesrouze, Y.; Hau, J. C.; Erdmann, D.; Zimmermann, C.; Fontana, P.; Schmelzle, T.; Chène, P. The Surprising Features of the TEAD4-Vgll1 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem*.**2014**, *15* (4), 537–542.

<sup>76</sup>Harvey, K. F.; Zhang, X.; Thomas, D. M. The Hippo Pathway and Human Cancer. *Nat. Rev. Cancer***2013**, *13* (4), 246–257.

<sup>77</sup>Fossdal, R. A Novel TEAD1 Mutation Is the Causative Allele in Sveinsson's Chorioretinal Atrophy (Helicoid Peripapillary Chorioretinal Degeneration). *Hum. Mol. Genet.***2004**, *13* (9), 975–981.

<sup>78</sup>Moroishi, T.; Hansen, C. G.; Guan, K.-L. The Emerging Roles of YAP and TAZ in Cancer. *Nat. Rev. Cancer***2015**, *15* (2), 73–79.

<sup>79</sup>Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Dev. Cell***2010**, *19* (4), 491–505.

<sup>80</sup>Zhang, K.; Qi, H.-X.; Hu, Z.-M.; Chang, Y.-N.; Shi, Z.-M.; Han, X.-H.; Han, Y.-W.; Zhang, R.-X.; Zhang, Z.; Chen, T.; Hong, W. YAP and TAZ Keep Center Stage in Cancer. *Biochemistry (Mosc.)***2015**, *54* (43), 6555–6566.

<sup>81</sup>Lamar, J. M.; Stern, P.; Liu, H.; Schindler, J. W.; Jiang, Z.-G.; Hynes, R. O. The Hippo Pathway Target, YAP, Promotes Metastasis through Its TEAD-Interaction Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2012**, *109* (37), E2441–E2450.

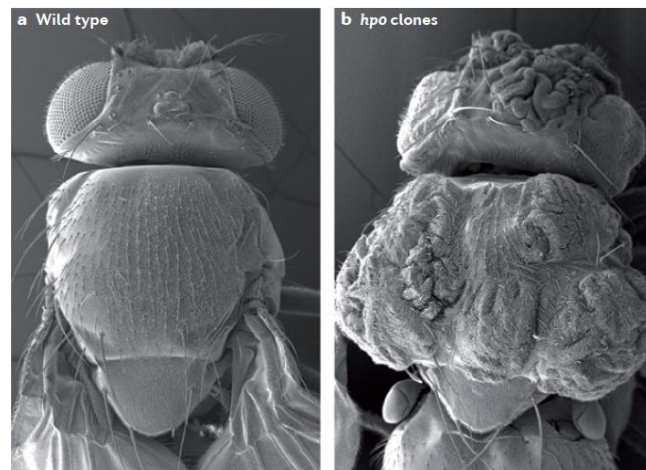
<sup>82</sup>Overholtzer, M.; Zhang, J.; Smolen, G. A.; Muir, B.; Li, W.; Sgroi, D. C.; Deng, C.-X.; Brugge, J. S.; Haber, D. A. Transforming Properties of YAP, a Candidate Oncogene on the Chromosome 11q22 Amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2006**, *103* (33), 12405–12410.

<sup>83</sup>Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A. R.; Poletti, A.; Daidone, M. G.; Dupont, S.; Basso, G.; Biciato, S.; Piccolo, S. The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell***2011**, *147* (4), 759–772.

Dans environ 15% des cancers ovariens, le niveau d'expression de la protéine YAP est supérieur à celui du tissu sain et cette observation est corrélée avec un pronostic vital diminué chez les patients.<sup>84</sup> Ce phénomène est également présent dans le cas du cancer du poumon, des carcinomes oesophagiens<sup>85</sup> et la progression du cancer colorectal.<sup>86,87</sup>

La protéine TAZ a été montrée comme étant un stimulateur de cancer puisqu'elle est surexprimée dans plus de 85% des cancers du poumon et 20% des cancers du sein.<sup>21</sup> Elle joue un rôle dans la migration, l'invasion et la malignité des cellules.<sup>88</sup>

L'activation ou la surexpression de YAP/TAZ au sein du noyau favorise leur interaction avec les facteurs de transcription TEADs et par conséquent la prolifération cellulaire. La perturbation de l'équilibre entre les deux formes se traduit par une hyperplasie conduisant à des croissances démesurées observées chez la drosophile adulte (Figure 25) et des organes.<sup>14,22</sup>



**Figure 25 : Phénotypes de la Drosophile<sup>14</sup>**

Cette surexpression induit également une croissance excessive pouvant conduire à des tumeurs dans les foies de souris (Figure 26). Lorsque la kinase MST1/2 est éteinte, YAP n'est plus phosphorylée et entre en continu dans le noyau. Après 2 mois, la taille du foie de la souris a considérablement augmenté et au bout de 6 mois, il y a apparition de tumeurs hépatiques.<sup>14</sup>

<sup>84</sup>Zhang, X.; George, J.; Deb, S.; Degoutin, J. L.; Takano, E. A.; Fox, S. B.; Bowtell, D. D. L.; Harvey, K. F. The Hippo Pathway Transcriptional Co-Activator, YAP, Is an Ovarian Cancer Oncogene. *Oncogene*.**2011**, *30* (25), 2810.

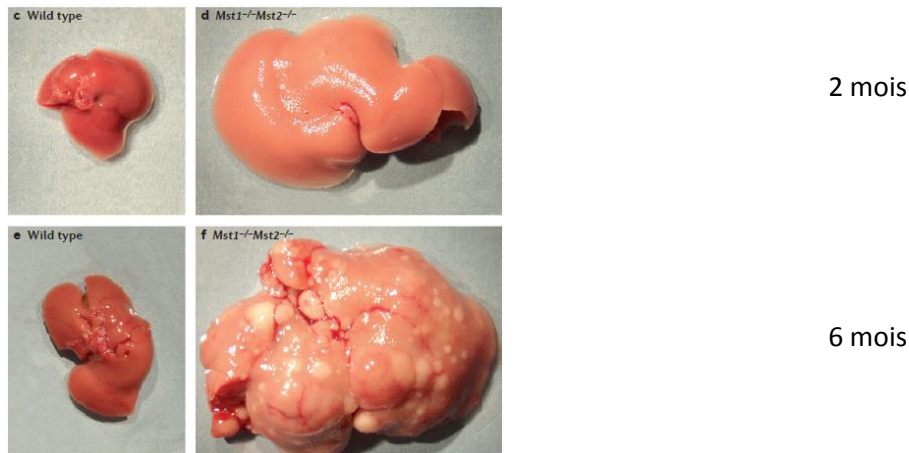
<sup>85</sup>Muramatsu, T.; Imoto, I.; Matsui, T.; Kozaki, K.; Haruki, S.; Sudol, M.; Shimada, Y.; Tsuda, H.; Kawano, T.; Inazawa, J. YAP Is a Candidate Oncogene for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Carcinogenesis*.**2011**, *32* (3), 389–398.

<sup>86</sup>Camargo, F. D.; Gokhale, S.; Johnnidis, J. B.; Fu, D.; Bell, G. W.; Jaenisch, R.; Brummelkamp, T. R. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Curr. Biol*.**2007**, *17* (23), 2054–2060.

<sup>87</sup>Avruch, J.; Zhou, D.; Bardeesy, N. YAP Oncogene Overexpression Supercharges Colon Cancer Proliferation. *Cell Cycle*. **2012**, *11* (6), 1090–1096.

<sup>88</sup>Lei, Q.-Y.; Zhang, H.; Zhao, B.; Zha, Z.-Y.; Bai, F.; Pei, X.-H.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Guan, K.-L. TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Mol. Cell. Biol*.**2008**, *28* (7), 2426–2436.





**Figure 26 : Foies de souris lorsque la kinase MST1/2 est éteinte<sup>14</sup>**

VGLL est également un cofacteur surexprimé dans de nombreux cancers puisqu'il a été démontré que l'interaction TEAD-VGLL1 stimule la prolifération cellulaire dans le cancer de la prostate.<sup>73</sup> VGLL3 semble également jouer un rôle dans la progression des sarcomes fibroblastiques inflammatoires acraux<sup>89,90</sup> alors que l'expression de VGLL4 est régulée négativement dans le cancer colorectal et associée à un meilleur pronostic chez les patients.<sup>91</sup>

La présence excessive de TEAD au sein des cellules cancéreuses a été récemment mise en évidence dans le cancer des ovaires (Tableau 3) et favorise la transcription de gènes tels que *CTGF*, *Cyr61* et *Myc*,<sup>38</sup> impliqués dans la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. La surexpression de TEAD1 a été rapportée dans la presque totalité des carcinomes du canal pancréatique en stimulant l'expression du gène de la mésothéline<sup>92</sup> et est un outil essentiel comme biomarqueur pronostic du cancer gastrique et de la prostate.<sup>93</sup>

<sup>89</sup>Hélias-Rodzewicz, Z.; Pérot, G.; Chibon, F.; Ferreira, C.; Lagarde, P.; Terrier, P.; Coindre, J.M.; Aurias, A. YAP1 and VGLL3, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. **2010**, *49*, 1161-1171.

<sup>90</sup>Hallor, K.H.; Sciot, R.; Staaf, J.; Heidenblad, M.; Rydholm, A.; Bauer, H.C.; Aström, K.; Domanski, H.A.; Meis, J.M.; Kindblom, L.G.; Panagopoulos, I.; Mandahl, N.; Mertens, F. Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J. Pathol.* **2009**, *217*, 716-727.

<sup>91</sup>Jiao, S.; Li, C.; Hao, Q.; Miao, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zhou, Z. VGLL4 targets a TCF4-TEAD4 complex to coregulate Wnt and Hippo signaling in colorectal cancer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14058.

<sup>92</sup>Hucl, T.; Brody, J. R.; Gallmeier, E.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Farrance, I. K.; Kern, S. E. High Cancer-Specific Expression of Mesothelin (MSLN) Is Attributable to an Upstream Enhancer Containing a Transcription Enhancer Factor-dependent MCAT Motif. *Cancer Res.* **2007**, *67* (19), 9055-9065.

<sup>93</sup>Knight, J. F.; Shepherd, C. J.; Rizzo, S.; Brewer, D.; Jhavar, S.; Dodson, A. R.; Cooper, C. S.; Eeles, R.; Falconer, A.; Kovacs, G.; Garrett, M. D.; Norman, A. R.; Shipley, J.; Hudson, D. L. TEAD1 and C-Cbl Are Novel Prostate Basal Cell Markers That Correlate with Poor Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Br. J. Cancer.* **2008**, *99* (11), 1849-1858.

## B. La voie Hippo : une nouvelle cible thérapeutique

La voie Hippo est aujourd'hui considérée comme l'une des nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses permettant de réduire la prolifération cellulaire et donc la propagation du cancer.<sup>78</sup>

Depuis l'identification de la voie Hippo comme acteur dans la prolifération et le développement des cancers, la recherche de molécules capables d'inhiber ces protéines est en pleine expansion (Figure 27).<sup>94</sup> Deux grandes stratégies peuvent être employées pour inhiber la formation du complexe YAP-TEAD et éviter la prolifération de cellules cancéreuses : inhiber l'import nucléaire de YAP ou de TAZ ou inhiber l'interaction nucléaire entre YAP ou TAZ et les facteurs de transcription nucléaire TEADs.

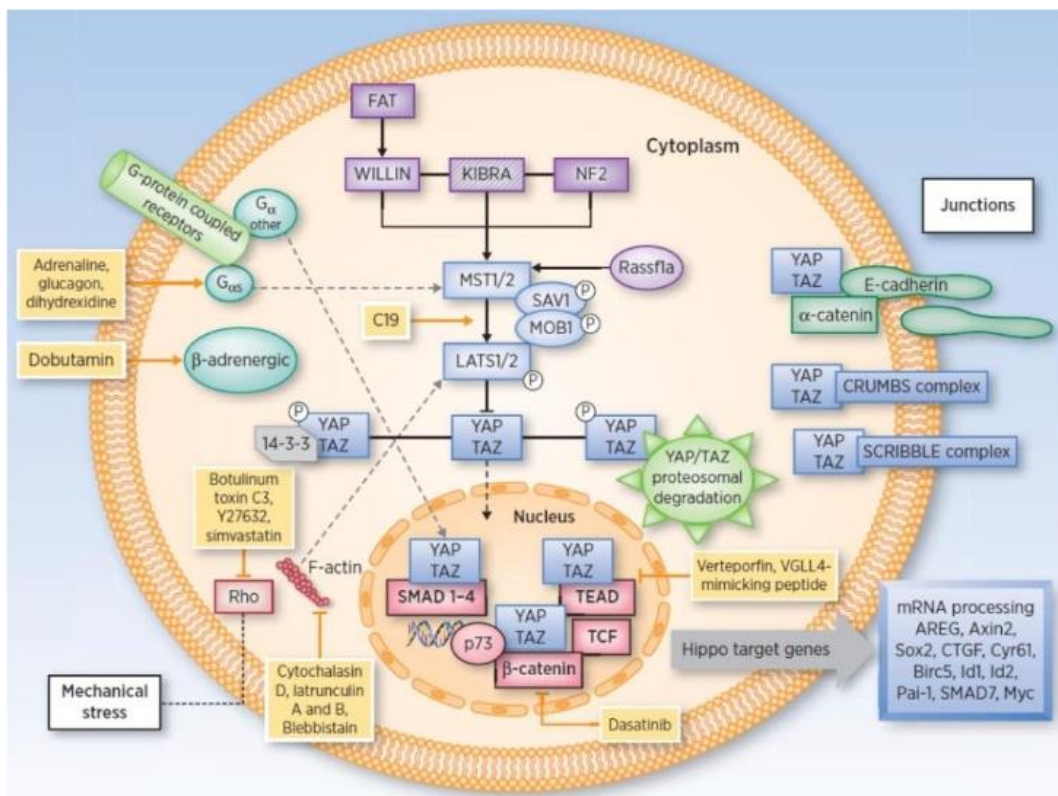


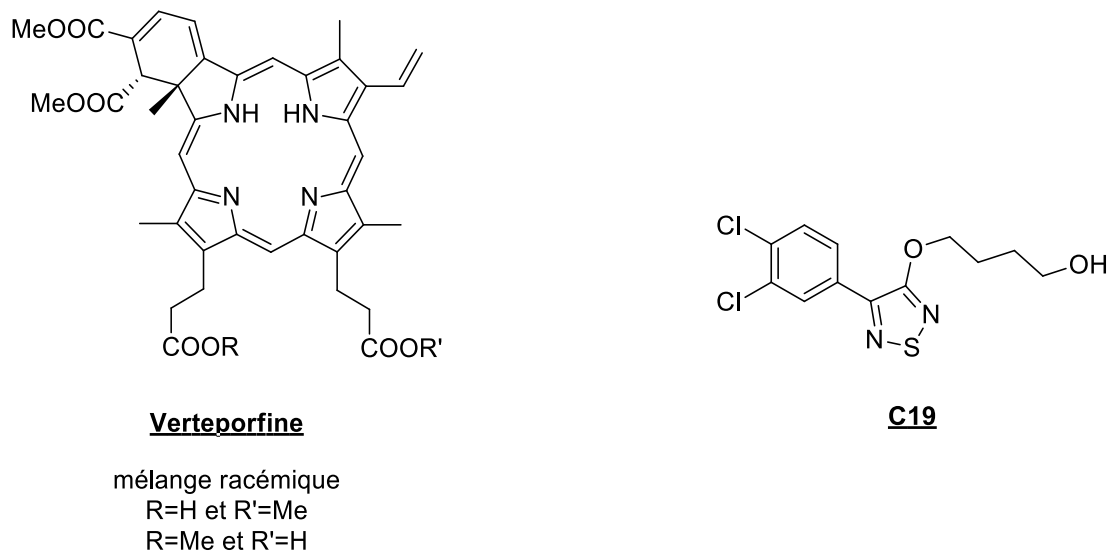
Figure 27 : Différentes stratégies pour inhiber la voie Hippo<sup>94</sup>

### a) Cibler la protéine YAP

La Vertéporfine (Figure 28) est la première molécule découverte ciblant la voie Hippo. Liu-Chittenden et de ses collaborateurs ont identifié cette porphyrine comme inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD en criblant la chimiothèque John Hopkins (3300 composés) sur cellules HEK293 exprimant

<sup>94</sup>Sebio, A.; Lenz, H.-J. Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2015**, *21* (22), 5002–5007.

Gal4-TEAD4/YAP/UAS-Luc.<sup>95</sup> Son mécanisme d'action reste pour le moment inconnu mais elle semble réguler positivement la protéine 14-3-3, responsable de la séquestration cytoplasmique de YAP.<sup>96</sup>



**Figure 28 : Structures de la VP et du C19**

A partir d'un criblage de molécules synthétisées dans leur laboratoire, l'équipe de *Basu* a identifié le composé C19 (Figure 28) comme inhibiteur de la voie Hippo mais également des voies de signalisation Wnt et TGF- $\beta$ . Mécanistiquement, C19 active les kinases MST1 et LATS1 induisant une dégradation de YAP/TAZ dans de nombreuses lignées cancéreuses.<sup>97</sup>

Plusieurs molécules agissant sur les récepteurs couplés aux protéines G sont capables de moduler l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ-TEAD *via* l'activation des kinases de la voie Hippo. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les agonistes des récepteurs à l'adrénaline comme le glucagon qui vont activer indirectement les kinases LATS1/2 et conduire à la phosphorylation de YAP/TAZ.<sup>98,99</sup>

Le Dasatinib et le Pazopanib, deux inhibiteurs de tyrosine kinases ont récemment été décrits comme induisant la phosphorylation de YAP/TAZ et par conséquent conduit à leur dégradation protéosomale

<sup>95</sup>Liu-Chittenden, Y.; Huang, B.; Shim, J. S.; Chen, Q.; Lee, S.-J.; Anders, R. A.; Liu, J. O.; Pan, D. Genetic and Pharmacological Disruption of the TEAD–YAP Complex Suppresses the Oncogenic Activity of YAP. *Genes Dev.* **2012**, *26* (12), 1300–1305.

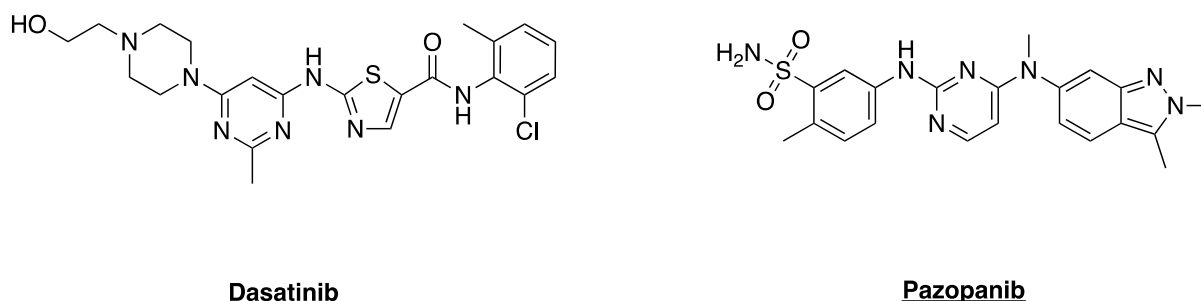
<sup>96</sup>Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B. Verteporfin Inhibits YAP Function through Up-Regulating 14-3-3 $\sigma$  Sequestering YAP in the Cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6* (1), 27.

<sup>97</sup>Basu, D.; Lettan, R.; Damodaran, K.; Strellec, S.; Reyes-Mugica, M.; Rebbaa, A. Identification, Mechanism of Action, and Antitumor Activity of a Small Molecule Inhibitor of Hippo, TGF- $\beta$ , and Wnt Signaling Pathways. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13* (6), 1457–1467.

<sup>98</sup>Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J. L.; Lian, I.; Wang, L. H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; Fu, X.-D.; Mills, G. B.; Guan, K.-L. Regulation of the Hippo–YAP Pathway by G-Protein Coupled Receptor Signaling. *Cell.* **2012**, *150* (4), 780–791.

<sup>99</sup>Yu, F.-X.; Zhang, Y.; Park, H. W.; Jewell, J. L.; Chen, Q.; Deng, Y.; Pan, D.; Taylor, S. S.; Lai, Z.-C.; Guan, K.-L. Protein Kinase A Activates the Hippo Pathway to Modulate Cell Proliferation and Differentiation. *Genes Dev.* **2013**, *27* (11), 1223–1232.

dans de nombreuses lignées cancéreuses (Figure 29).<sup>100,101</sup> Le mode d'action du Dasatinib semble mettre en jeu la tyrosine kinase Yes-1, membre des SRC kinases, protéine connue comme activant YAP par phosphorylation sur Tyr<sub>357</sub> et impliquée dans la formation des complexes entre YAP et la  $\beta$ -Caténine.



**Figure 29 : Structures des deux inhibiteurs de kinases**

La famille des statines a été identifiée comme inhibant la localisation nucléaire de YAP et de TAZ *via* l'inhibition de la 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase, (HMG-CoA).<sup>102,103</sup> Cette enzyme de la voie du mévalonate et de la biosynthèse du cholestérol réduit la geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), requise pour l'activation des RHO GTPases, responsable de l'accumulation nucléaire de YAP/TAZ. La Cérivastatine, inhibiteur de l'enzyme HMG-CoA réductase utilisé chez les patients d'hypercholestérolémie, est capable également de séquestrer YAP et TAZ dans le cytoplasme. Cependant, compte tenu de sa forte toxicité, elle a été retirée du marché mais un autre essai clinique italien de phase II (TRINACRIA, numéro d'essai clinique NCT02416427) est en cours sur l'utilisation de l'Atorvastatine comme inhibiteur de TAZ pour des patientes atteintes de cancer du sein de stades I ou II.

### b) ***Cibler la protéine TEAD***

La synthèse de peptides mimant la protéine YAP a été la première stratégie développée dans le but de cibler la protéine TEAD (Figure 14).<sup>71,104</sup> Basé sur le fragment YAP<sub>84-100</sub> qui s'est révélée être le fragment minimal de la boucle  $\Omega$  de YAP inhibant faiblement la formation du complexe YAP-TEAD (IC<sub>50</sub> = 37  $\mu$ M), le peptide cyclique 1 présentant diverses modifications (Met<sub>86</sub>/3-chlorophenylalanine,

<sup>100</sup>Oku, Y.; Nishiya, N.; Shito, T.; Yamamoto, R.; Yamamoto, Y.; Oyama, C.; Uehara, Y. Small Molecules Inhibiting the Nuclear Localization of YAP/TAZ for Chemotherapeutics and Chemosensitizers against Breast Cancers. *FEBS Open Bio*.**2015**, 5 (1), 542–549.

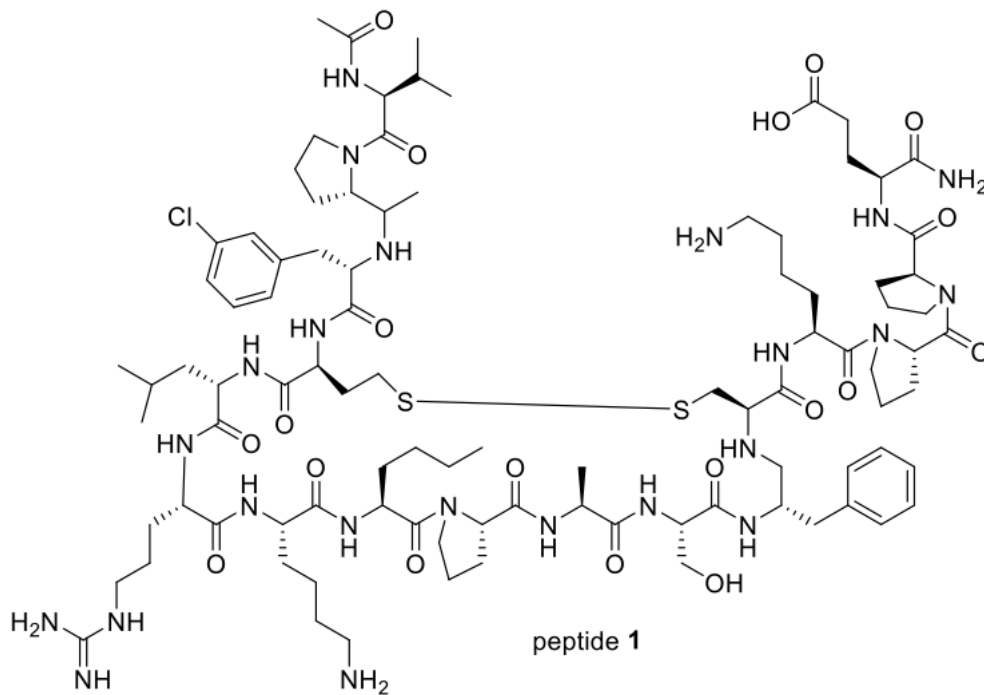
<sup>101</sup>Taccioli, C.; Sorrentino, G.; Zannini, A.; Caroli, J.; Beneventano, D.; Anderlucci, L.; Lolli, M.; Bicciato, S.; Del Sal, G. MDP, a Database Linking Drug Response Data to Genomic Information, Identifies Dasatinib and Statins as a Combinatorial Strategy to Inhibit YAP/TAZ in Cancer Cells. *Oncotarget*.**2015**, 6 (36), 38854.

<sup>102</sup>Sorrentino, G.; Ruggeri, N.; Specchia, V.; Cordenonsi, M.; Mano, M.; Dupont, S.; Manfrin, A.; Ingallina, E.; Sommaggio, R.; Piazza, S.; Rosato, A.; Piccolo, S.; Del Sal, G. Metabolic Control of YAP and TAZ by the Mevalonate Pathway. *Nat. Cell Biol*.**2014**, 16 (4), 357–366.

<sup>103</sup>Wang, W.; Li, X.; Huang, J.; Feng, L.; Dolinta, K. G.; Chen, J. Defining the Protein–Protein Interaction Network of the Human Hippo Pathway. *Mol. Cell. Proteomics MCP*. **2014**, 13 (1), 119–131.

<sup>104</sup>Zhou, Z.; Hu, T.; Xu, Z.; Lin, Z.; Zhang, Z.; Feng, T.; Zhu, L.; Rong, Y.; Shen, H.; Luk, J. M.; Zhang, X.; Qin, N. Targeting Hippo Pathway by Specific Interruption of YAP-TEAD Interaction Using Cyclic YAP-like Peptides. *FASEB J*.**2015**, 29 (2), 724–732.

Arg<sub>87</sub>/Homocysteine, Leu<sub>91</sub>/Norleucine et Phe<sub>95</sub>Cys) et un pont disulfure pour rigidifier la structure, a été synthétisé. Avec une affinité de 15 nM à GST-TEAD<sub>1209-426</sub> et une IC<sub>50</sub> de 25 nM, ce cyclopeptide a été reporté comme le premier inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD ciblant la protéine TEAD. Cependant les auteurs craignent une dégradation rapide par les peptidases qui diminuerait son efficacité.

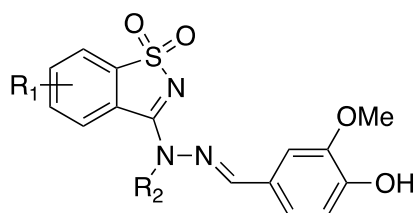


**Figure 30 : Structure du peptide cyclique 1**

Dans la même logique, un peptide dérivé de VGLL4 (nommé SUPER TDU) a été synthétisé.<sup>74</sup> Ce nouveau pentadecapeptide (SVDDHFAKSLGDTWLQIGGSGNPKTANVPQTVPMRLRKLPSFFKPPE) est en réalité un hybride entre le domaine de liaison à TEAD de VGLL4 au niveau de l'interface 2 (acides aminés 236-252) et la boucle  $\Omega$  de YAP interagissant avec TEAD au niveau de l'interface 3 (acides aminés 74-99). Il a été démontré que SUPER TDU entre en compétition avec YAP et entraîne la rupture du complexe YAP-TEAD dans un modèle de cancers gastriques.

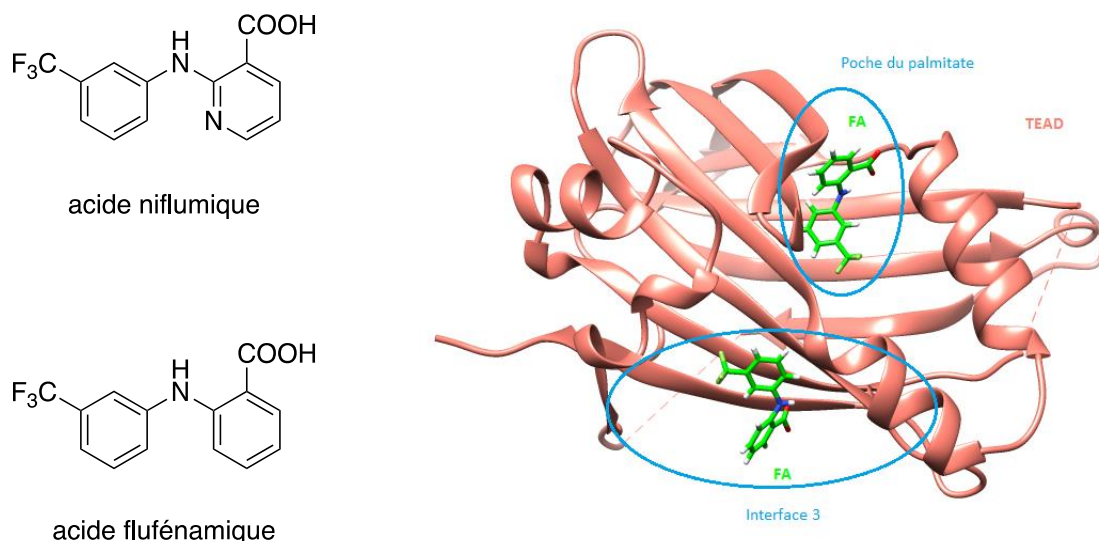
Concernant les inhibiteurs non peptidiques, Inventiva a récemment identifié une famille de molécules avec un motif central 3-(2-benzylidenehydrazinyl)benzo[d]isothiazole-1,1-dioxides ciblant l'interface 3 de TEAD dans le traitement des mésothéliomes (Figure 31). Bien que ces composés montent une inhibition *in vitro* du complexe entre YAP<sub>50-114</sub> et GST-TEAD<sub>1209-426</sub> avec des IC<sub>50</sub>

comprises entre 0.083  $\mu\text{M}$  à 11.623  $\mu\text{M}$ , aucun effet n'a pour le moment été observé sur les lignées SW620.<sup>105</sup>



**Figure 31 : Structure générale des inhibiteurs**

Plusieurs mois avant de découvrir la présence du palmitate au sein de la poche hydrophobe de TEAD, Pobbati et ses collaborateurs ont identifié les acides niflumique et flufénamique comme ligands de TEAD avec une affinité mesurée par ITC de 28 et 33  $\mu\text{M}$  respectivement (Figure 32).<sup>106</sup> La structure du complexe formé entre hTEAD<sub>217-447</sub> et l'acide flufénamique révèle que le composé occupe deux positions distinctes : une au sein de la poche du palmitate et une au niveau de l'interface 3 du complexe YAP-TEAD. Bien que ces deux acides montrent une réduction de l'activité de TEAD *in cellulo* à une concentration de 150  $\mu\text{M}$ , ils ne semblent pas affecter l'interaction YAP-TEAD, supposant qu'ils ne modifient pas la conformation du domaine de liaison à YAP de la protéine TEAD.

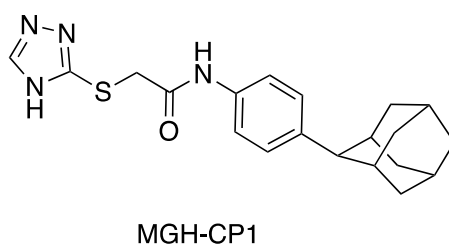


**Figure 32 : Structures de l'acide niflumique et flufénamique et co-cristallisation de l'acide flufénamique avec hTEAD<sub>217-447</sub> (PDB 5DQ8)<sup>106</sup>**

<sup>105</sup>Barth, M.; Contal, S.; Montalbetti, C.; Spitzer, L. Preparation of new 4-(1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-yl)hydrazono]methyl]-2-methoxyphenols as inhibitors of the YAP/TAZ-TEAD interaction and their use in the treatment of malignant mesothelioma, PCT Int. Appl., WO 2017064277 A1 20170420, 2017.

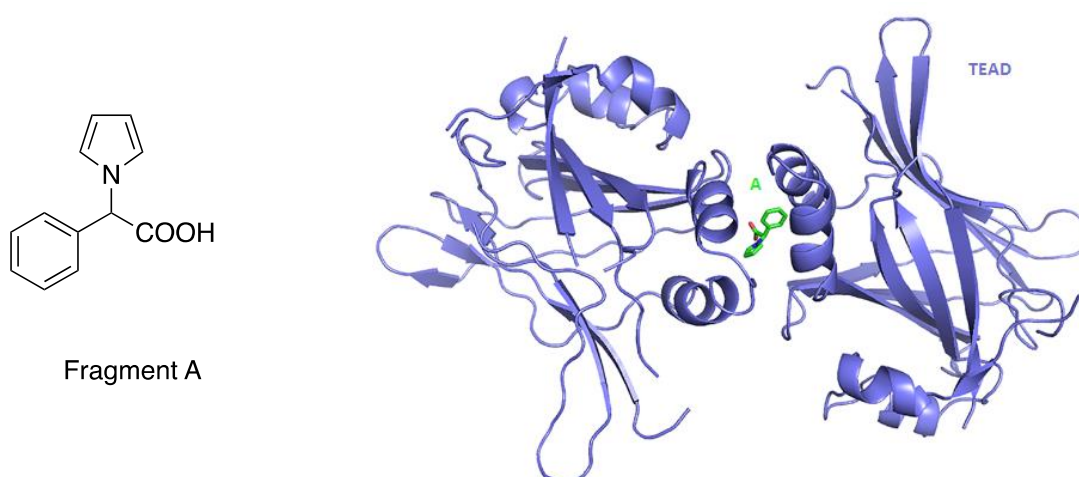
<sup>106</sup>Pobbati, A. V.; Han, X.; Hung, A. W.; Weiguang, S.; Huda, N.; Chen, G.-Y.; Kang, C.; Chia, C. S. B.; Luo, X.; Hong, W.; Poulsen, A. Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure*. 2015, 23 (11), 2076–2086.

Le composé MGH-CP1 a été identifié par criblage d'une petite chimiothèque de 50 000 molécules (origine non précisée dans le brevet) et a montré plus de 50% d'inhibition de l'activité de TEAD sur cellules transfectées avec le gène rapporteur à la luciférase (Figure 33).<sup>107</sup> Il inhibe le complexe YAP-TEAD avec une IC<sub>50</sub> de 83 nM et l'expression de *CTGF* et *Cyr61* dans diverses lignées cellulaires (HeLa, JHH7, HuH7). La co-cristallisation de ce composé avec TEAD montre qu'il occupe la poche hydrophobe du palmitate (les données cristallographiques n'ont pas été déposées à la PDB).



**Figure 33 : Structure du MGH-CP1**

*Kaan* et ses collaborateurs ont identifié un fragment hit A en criblant plus de 1 000 molécules issues de la bibliothèque de Maybridge Ro3 par Thermal Shift Assay (TSA).<sup>108</sup> La co-cristallisation de ce composé avec mTEAD<sub>4210-427</sub> a montré une surface d'interaction au niveau de l'interface 2 du complexe YAP-TEAD (Figure 34). Le fragment A interagit avec TEAD avec une faible affinité (300 µM) et réduit l'activité transcriptionnelle de TEAD de 33% à 750 µM au sein des cellules HEK293.



**Figure 34 : Structure et co-cristallisation du fragment A (PDB 5XJD)<sup>108</sup>**

<sup>107</sup>Xu, W. TEAD transcription factor autopalmitylation inhibitors, PCT Int. Appl. WO 2017053706 A1 20170330, 2017.

<sup>108</sup>Kaan, H.Y.K.; Sim, A.Y.L.; Tan, S.K.J.; Verma, C.; Song, H. Targeting YAP/TAZ-TEAD protein-protein interactions using fragment-based and computational modeling approaches. *PLoS One*. 2017, 12, e0178381.

**CHAPITRE 3 :**  
**LES INTERACTIONS**  
**MOLECULAIRES**



## I. *Etudes des interactions moléculaires*

Dans le domaine de la recherche en chimie médicinale, il est crucial de comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent les processus biologiques afin d'élaborer des stratégies thérapeutiques. Les études d'interactions moléculaires peuvent aider à la compréhension de la fonction biologique mise en jeu mais également à l'identification de ligands pouvant moduler l'activité d'une cible.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin de mettre en évidence les interactions protéine/protéine, protéine/ADN ou protéine/ligand.

### A. **Les différents types d'interactions**

Il existe quatre types d'interactions non-covalentes admises :

- Les **interactions ioniques** : interactions fortes qui se forment quand des ions de charges opposées s'attirent mutuellement. L'interaction la plus souvent rencontrée en met en jeu une fonction carboxylate-COO<sup>-</sup> et un motif ammonium -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.
- Les **forces de Van der Waals** : interactions faibles qui se forment quand des molécules neutres s'attirent entre elles.
- Les **liaisons hydrogène** : interactions faibles essentiellement électrostatique qui se forment entre un atome d'hydrogène et un atome possédant un doublet électronique non liant (oxygène, azote ou halogène).
- L'**effet hydrophobe** : ensemble de facteurs qui permettent aux substances non polaires de s'agréger afin de minimiser leur contact avec l'eau.

### B. **Approches mathématiques de l'interaction moléculaire**

La constante d'équilibre de dissociation ( $K_D$ ) et la constante d'inhibition ( $K_i$ ) sont parmi les paramètres les plus couramment calculés pour évaluer l'interaction entre un ligand et sa cible.

#### a) **Les constantes thermodynamiques**

L'équation décrivant la formation réversible d'un complexe à deux entités est la suivante :



L'équilibre est atteint lorsque la vitesse d'association du complexe est égale à sa vitesse de dissociation.  $K_a$  est la constante thermodynamique d'association qui exprime indirectement l'affinité d'un ligand pour une protéine. Elle s'exprime dans la dimension d'une concentration molaire.

$$K_a = \frac{k_A}{k_D}$$

$K_d$ , correspondant à la constante thermodynamique de dissociation du complexe, peut également être calculée puisqu'elle est inversement proportionnelle à  $K_a$ .

#### b) **La constanced'inhibition $K_i$**

La constante d'inhibition  $K_i$  est déterminée à partir d'une  $IC_{50}$  afin de standardiser les données à partir de l'équation de Cha. L' $IC_{50}$  est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber à 50% une fonction biologique ou moléculaire.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{k_D + \frac{[A]}{KM}}$$

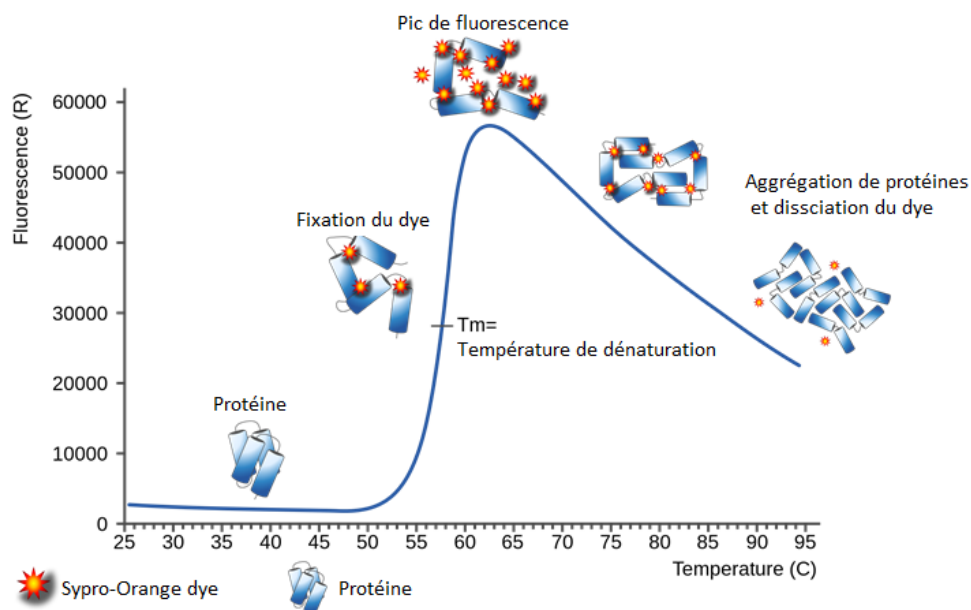
### C. **Les techniques d'analyses**

Les technologies basées sur l'étude de l'affinité sont devenues des outils pertinents pour détecter et caractériser les interactions moléculaires lors du processus de recherche de médicament. Le choix de la technique appropriée est une étape clé dans le processus puisque chacune d'elles permet d'obtenir des informations parfois différentes. Outre les avantages de ces différentes techniques, elles affichent naturellement quelques restrictions liées au système cible exploité mais également à la solubilité et à l'affinité des ligands. A l'heure actuelle, il existe un panel de méthodes biophysiques qui permettent de caractériser l'affinité potentielle d'un ligand pour une cible. Une liste non exhaustive des méthodes instrumentales envisagées pour caractériser l'interaction entre deux partenaires est développée ci-dessous.

#### a) **Thermal Shift Assay**

Le TSA ou Thermofluor est la technique d'interaction moléculaire la plus utilisée pour effectuer le criblage de ligands sur une protéine.<sup>109</sup> Elle consiste à mesurer la température de dénaturation ( $T_m$ ) de la protéine en présence ou non d'un ligand, en fonction de l'émission de fluorescence d'un fluorophore (généralement le SyprOrange) interagissant de manière non sélective avec la protéine d'intérêt (Figure 35).

<sup>109</sup>Cimpmperman, P.; Baranauskienė, L.; Jachimovičiūtė, S.; Jachno, J.; Torresan, J.; Michailovienė, V.; Matulienė, J.; Sereikaitė, J.; Bumelis, V.; Matulis, D. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. *Biophys. J.* **2008**, *95* (7), 3222–3231.



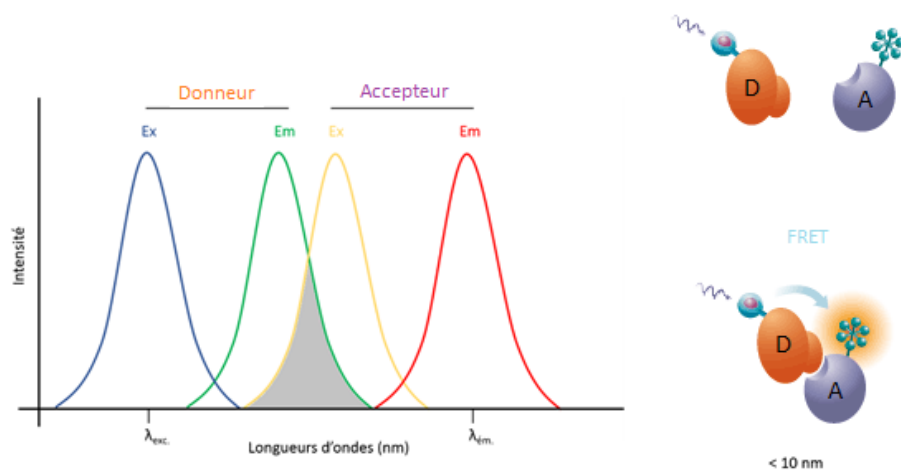
**Figure35 : Schéma du principe du TSA**

En augmentant la température, la protéine commence à se déstructurer exposant ainsi ses régions hydrophobes sur lesquelles l'agent dénaturant vient interagir, augmentant ainsi l'intensité de fluorescence. L'analyse des variations de cette fluorescence en fonction de la température permet d'obtenir une sigmoïde dont le point d'inflexion permet de définir la température de dénaturation de la protéine ( $T_m$ ), c'est-à-dire la température pour laquelle 50% de la protéine existe à l'état dénaturé. Lorsqu'un ligand interagit avec la protéine, ce dernier stabilise sa conformation et permet ainsi d'augmenter sa température de dénaturation. Un  $\Delta T_m$  est alors mesuré pour chaque ligand et permet d'établir un ordre d'affinité. Cependant, bien que cette technique soit efficace et rapide à mettre en œuvre, elle n'est pas quantitative.

#### b) **Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes**

Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET=Fluorescence Resonance Energy Transfert) est une technique basée sur le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes : un donneur et un accepteur (Figure 36).<sup>110</sup> L'entité « donneur » porte un fluorochrome dont la longueur d'onde d'émission correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome de l'entité « accepteur ».

<sup>110</sup>Trugnan, G.; Fontanges, P.; Delautier, D.; Ait-Slimane, T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De Nouvelles Techniques Pour Voir La Vie En Couleur ! *médecine/sciences*.2004, 20 (11), 1027–1034.



**Figure 36 : Schéma du principe du FRET**

Lorsque les deux unités interagissent (distance < 10 nm), les deux fluorochromes sont à une distance permettant l'excitation de l'accepteur et le transfert de fluorescence, est ainsi mesuré. Cette technique permet de réaliser des interactions directes ou par compétition et de déterminer des constantes d'inhibitions.

### c) **Résonance magnétique nucléaire**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique souvent utilisée pour mettre en évidence les interactions protéine/ligand.<sup>111</sup> Elle est basée sur l'interaction entre un champ magnétique et les spins nucléaires et reflète l'environnement des noyaux étudiés. Les variations des déplacements chimiques des protons de la protéine, induits par l'interaction avec le ligand, sont le plus souvent observées et peuvent conduire à l'identification du site de liaison du ligand et à la détermination d'une affinité. Cependant, cette technique nécessite un marquage isotopique (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C) et une quantité élevée de protéine.

L'étude des protons du ligand est néanmoins plus simple à mettre en œuvre et moins coûteuse. Après irradiation à faible puissance d'une zone du domaine spectral <sup>1</sup>H d'un mélange protéine-ligand ne correspondant qu'à des protons de la protéine, le transfert de magnétisation sur le ligand est observé par une diminution du signal par rapport à un spectre off-irradiation (Saturation-Transfer Difference (STD)). Cependant de faux positifs peuvent être observés dus à l'agrégation des composés ou à des liaisons non spécifiques.<sup>112</sup>

<sup>111</sup>Fielding.L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, 3, 39-53.

<sup>112</sup>Ciulli, A. Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **2013**, 1008, 357-388.

#### d) *Spectrométrie de masse*

L'utilisation de la spectrométrie de masse (SM) comme technique de caractérisation d'interaction s'est largement développée ces dernières années avec l'apparition du mode electrospray (ESI). Cette ionisation douce a pour objectif de garder intact les liaisons non covalentes établies entre les deux partenaires lors du transfert en phase gaz. Elle repose sur la détection des ions appartenant à la protéine liée par rapport à ceux appartenant à la protéine non liée, qui se distinguent par leur changement de masse caractéristique correspondant à la liaison non covalente avec le ligand. La valeur du  $K_d$  peut alors être calculée à partir du rapport des intensités du signal de l'ion correspondant à la protéine liée sur celui de la protéine non liée en fonction de la concentration du ligand mis en solution. Cette technique fournit des informations sur la stœchiométrie, la spécificité et l'affinité du complexe formé.

#### e) *Résonance plasmonique de surface*

La résonance plasmonique de surface (SPR) permet de mesurer l'interaction entre un analyte en solution et un récepteur cible, le plus souvent une protéine, immobilisé à la surface d'une lame recouverte d'une couche métallique (généralement de l'or).<sup>113</sup> Cette technique est basée sur la mesure de l'angle de résonance à l'interface lorsque l'analyte se fixe aux récepteurs (Figure 37).<sup>114</sup>

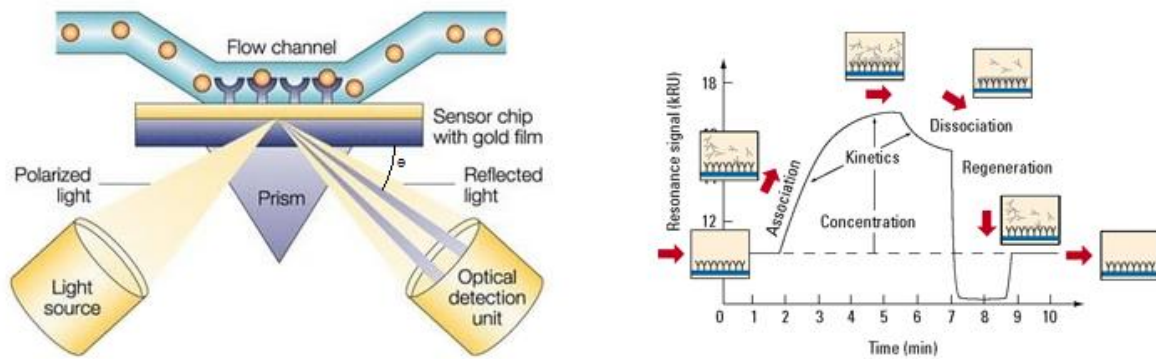


Figure 37 : Schéma du principe de la SPR

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie est réfractée à travers la surface. Dans les conditions de réflexion totale, la lumière est totalement réfléchi et permet de déterminer l'angle de résonance  $\theta$ . Cet angle de résonance est étroitement lié à la densité du milieu puisque les modifications de densité changent directement

<sup>113</sup>Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1 (7), 515–528.

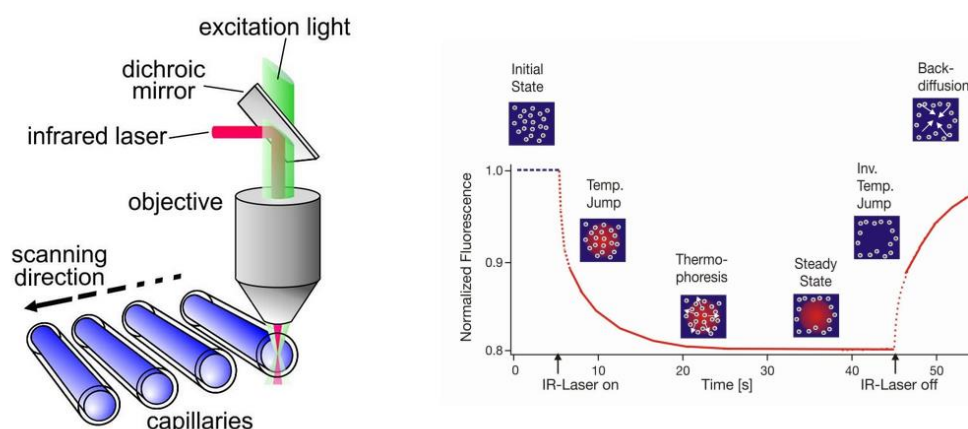
<sup>114</sup>Kodoyianni, V. Label-Free Analysis of Biomolecular Interactions Using SPR Imaging. *BioTechniques*. 2011, 50 (1), 32–40.

l'indice de réfraction du milieu du champ évanescent qui fait varier à son tour l'angle de résonance. A cet angle d'incidence, la lumière excite les plasmons de surface : les photons du faisceau incident interagissent avec les électrons libres de la couche métallique. Ce phénomène se traduit par l'apparition d'une onde évanescente. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance, qui est directement proportionnelle à la masse d'analyte interagissant sur la surface, permet de suivre en temps réel la fixation des molécules sur la protéine. Le signal observé permet de déterminer l'affinité de l'analyte pour le récepteur, la stœchiométrie les paramètres cinétiques.

#### f) **Thermophorèse à micro-échelle**

La thermophorèse à micro-échelle (MST) est basée sur le mouvement d'entités fluorescentes en solution soumises à un gradient de température (Figure 38).<sup>115,116</sup> Ce mouvement est étroitement lié à la charge, la taille et à la solvatation des molécules. Si l'un des deux partenaires n'est pas fluorescent, il doit préalablement être marqué par des fluorochromes pour le suivi de la manipulation.<sup>117</sup>

Lorsque le capillaire contenant l'échantillon fluorescent est irradié par un laser ( $\Delta T = 2-3^\circ\text{C}$ ), les molécules vont se déplacer du chaud vers le froid (vers l'extérieur du capillaire) engendrant une diminution de fluorescence au centre du gradient. En présence d'un ligand, lorsque le capillaire est irradié par le laser, le mouvement des molécules fluorescentes est modifié et conduit à une nouvelle courbe de fluorescence. Cette étude est réalisée à différentes concentrations de ligands et permet de tracer l'évolution de la fluorescence normalisée mesurée à l'équilibre thermodynamique en fonction de la concentration pour ainsi calculer le  $K_d$  du ligand (Figure 39).

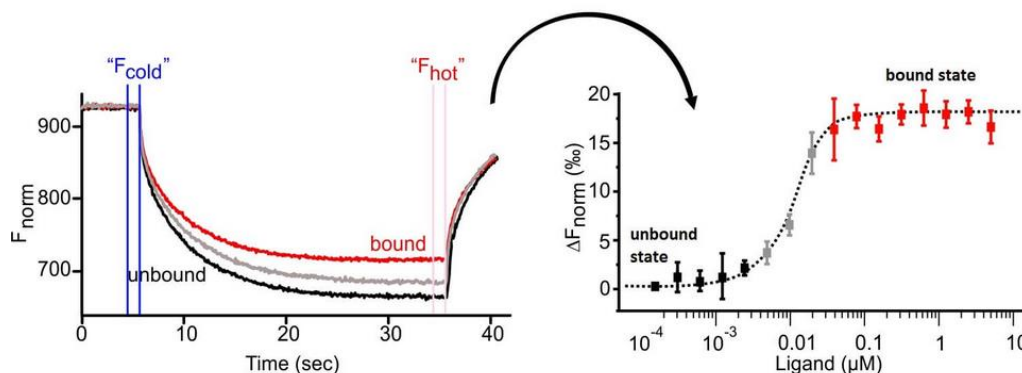


**Figure 38 :Schéma du principe de laMST**

<sup>115</sup>Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2011**, 9 (4), 342–353.

<sup>116</sup>Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1077, 101–113.

<sup>117</sup>Khavrutskii, L.; Yeh, J.; Timofeeva, O.; Tarasov, S. G.; Pritt, S.; Stefanisko, K.; Tarasova, N. Protein Purification-Free Method of Binding Affinity Determination by Microscale Thermophoresis. *J. Vis. Exp.* **2013**, No. 78.



**Figure 39 : Suivi de la fluorescence en fonction de la concentration du ligand et détermination du  $K_a$**

Cette technique est applicable à des échantillons en solution, dans des tampons classiques ou à des échantillons biologiques comme le sang ou les lysats cellulaires. Elle permet de détecter tout type d'interaction, avec une large gamme d'affinité et un volume à l'échelle du microlitre. Cependant, le marquage nécessaire peut affecter l'interaction entre les deux partenaires.

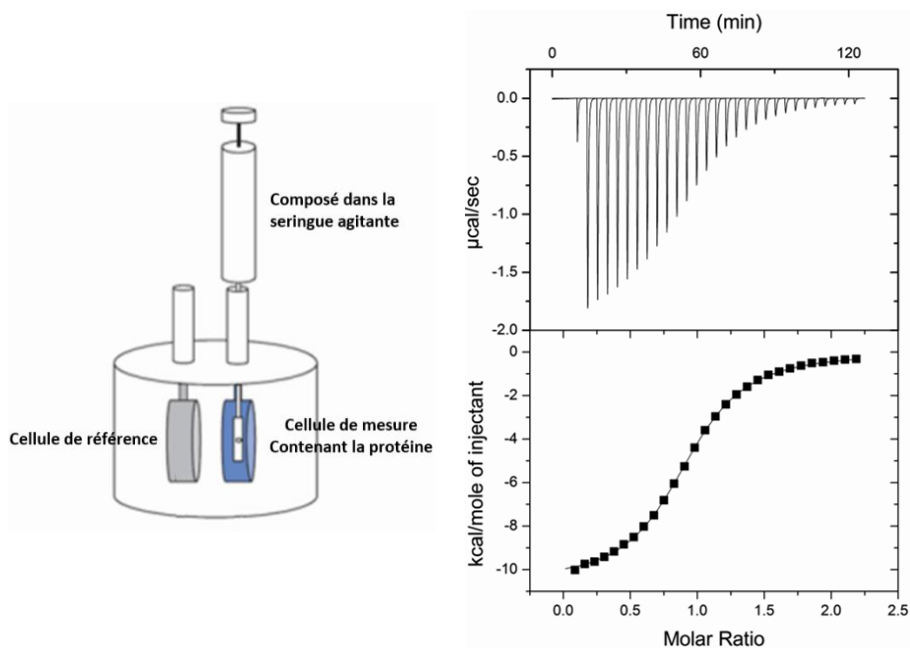
### g) **Calorimétrie de titration isotherme**

La calorimétrie par titration isotherme (ITC) est considérée comme la méthode « en or » pour la mesure d'affinité entre deux partenaires car elle ne nécessite pas de modification structurale qui pourrait affecter l'interaction étudiée (Figure 40).<sup>118,119</sup> Cette technique permet non seulement de déterminer la constante d'association du complexe mais également les changements d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'entropie ( $\Delta S$ ) engendrés par la liaison.

Deux cellules sont placées dans une enceinte adiabatique. La cellule de référence est remplie de la solution tampon et la cellule de mesure contient la macromolécule d'intérêt. Après équilibration du système à la température souhaitée, l'analyte étudié est injecté par petites quantités successives *via* une seringue dans la cellule de mesure. Chaque ajout engendre un échange thermique dû à l'interaction protéine-analyte, qui est calculé à partir de l'énergie nécessaire à fournir pour maintenir une température identique dans les deux cellules.

<sup>118</sup>Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Biophys. Tools Biol. Vol. One Vitro Tech.* **2008**, *84*, 79–113.

<sup>119</sup>Velazquez-Campoy, A.; Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry to Determine Association Constants for High-Affinity Ligands. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 186–191.



**Figure 40 : Schéma de principe de l'ITC et détermination du  $K_a$**

Suite à l'intégration des pics de variation d'énergie (Figure 6), l'évolution de la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) est obtenue en fonction du rapport molaire analyte/macromolécule. Cet isotherme d'interaction permet d'accéder à la constante d'association ( $K_a$ ) et à la stœchiométrie de la réaction.

## **II. Développement de différents tests**

Différentes méthodes permettant de mesurer les interactions entre YAP et TEAD sont proposées dans la littérature. Parmi les techniques présentées précédemment, certaines ont été développées pour déterminer l'interaction entre les protéines YAP, TEAD et leurs ligands. Les techniques de RMN, SM et ITC nécessitent une quantité de protéine trop importante pour qu'elles puissent être utilisées actuellement dans le projet.

Afin de développer les tests nécessaires aux études d'interaction, les diverses protéines YAP et TEAD ont été achetées ou synthétisées. La protéine YAP<sub>50-102</sub> a été synthétisée chimiquement par la société Xprochem ; la protéine hTEAD<sub>1-434</sub> est commercialisée par Cusabio ; la protéine hTEAD<sub>2217-447</sub> a été produite et purifiée au Centre de Biologie Structurale de Montpellier.

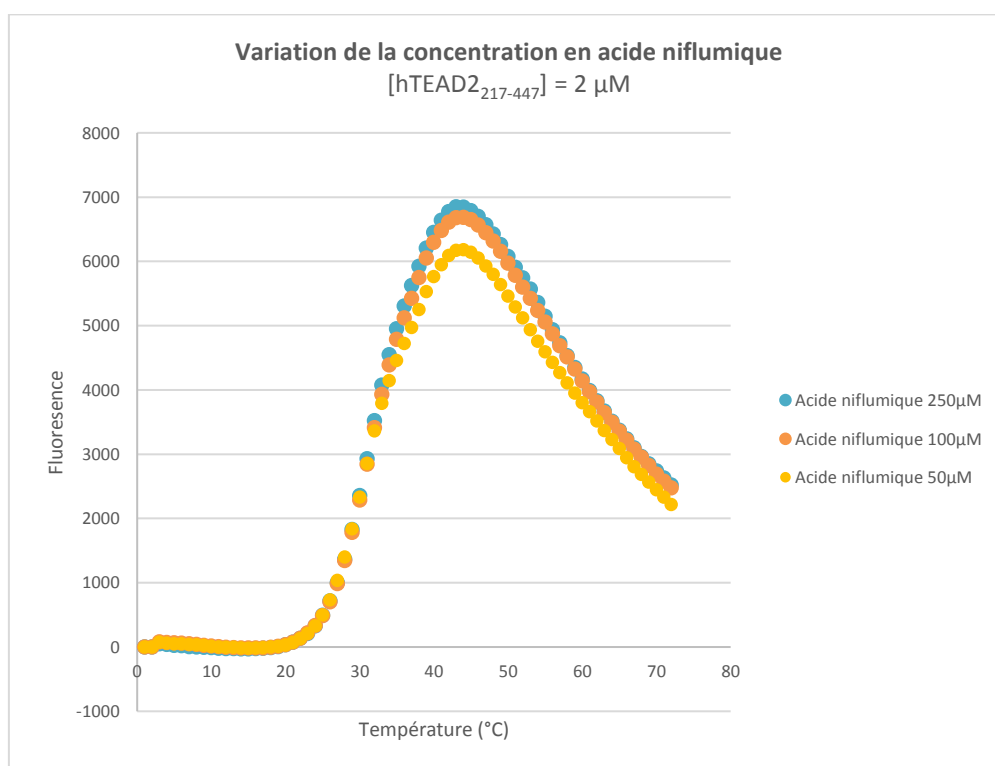
### **A. Développement d'un test TSA**

Le test TSA a été développé au sein du Centre de Biologie Structurale de Montpellier en collaboration avec le Professeur Jean-François GUICHOU et le Docteur Frédéric ALLEMAND. L'optimisation du test a consisté en une étude de fluorescence faisant varier la concentration en ligand et en protéine



hTEAD2<sub>217-447</sub> dans un tampon TRIS 20 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, TCEP 1 mM, Glycérol 5%, Sypro Orange 5x, DMSO 2.5% comme décrit dans la publication de *Pobatti* et ses collaborateurs.<sup>106</sup>

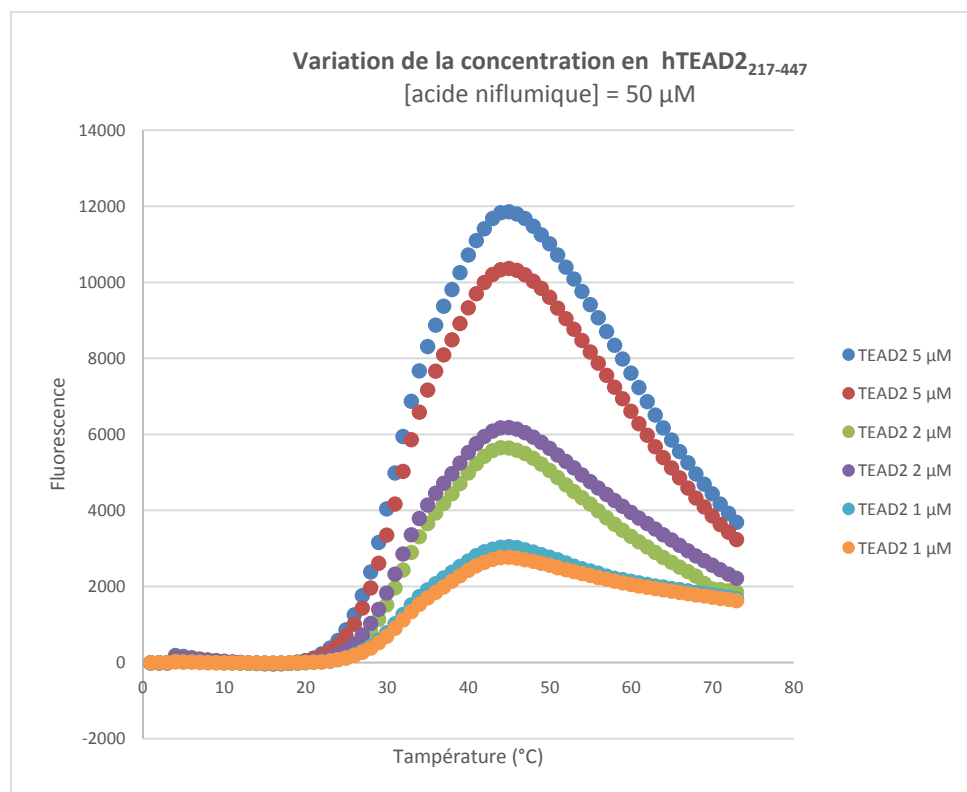
Dans un premier temps, l'influence de la concentration en ligand a été étudiée (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M) en fixant la concentration de hTEAD2<sub>217-447</sub> à 2  $\mu$ M (Figure 41). L'acide niflumique, précédemment décrit par *Pobatti* et ses collaborateurs ( $\Delta T_m = 3.5$  °C) a été choisi comme contrôle positif pour valider les manipulations.<sup>106</sup> Les trois concentrations en acide niflumique permettent d'obtenir un signal de fluorescence suffisant pour exploiter les résultats. En revanche, une légère augmentation de la fluorescence est observée pour les concentrations de 100  $\mu$ M et 150  $\mu$ M pouvant provenir d'une émission de fluorescence du composé. C'est pourquoi, la concentration de 50  $\mu$ M a été retenue pour l'étude des interactions ligand/hTEAD2<sub>217-447</sub> de nos molécules tout en vérifiant qu'elles ne fluorescent pas dans ces conditions.



Conditions : tampon TRIS 20 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, TCEP 1 mM, Glycérol 5%, Sypro Orange 5x, DMSO 2.5% ; [hTEAD2] = 2  $\mu$ M ; [NA] = 50, 100, 250  $\mu$ M.

**Figure 41 : Représentation des courbes de fluorescence fonction de la concentration en acide niflumique**

Dans un second temps, l'influence de la concentration en protéine hTEAD2<sub>217-447</sub> a été étudiée (1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$ ) en fixant la concentration en acide niflumique à 50  $\mu\text{M}$  (Figure 42). La température de dénaturation mesurée semble constante et indépendante de la concentration en protéine. Dans le cas d'une concentration finale à 1  $\mu\text{M}$ , les variations de l'émission de fluorescence se sont révélées trop faibles pour permettre la mesure de la température de dénaturation de la protéine. Néanmoins, une concentration de 2  $\mu\text{M}$  en hTEAD2<sub>217-447</sub> est largement suffisante pour obtenir un signal exploitable et de plus permet une consommation moins importante en protéine que l'utilisation de hTEAD2<sub>217-447</sub> à 5  $\mu\text{M}$ .



Conditions : tampon TRIS 20 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, TCEP 1 mM, Glycérol 5%, Sypro Orange 5x, DMSO 2.5% ; [acide niflumique] = 50  $\mu\text{M}$ ; [hTEAD2<sub>217-447</sub>] = 1, 2, 5  $\mu\text{M}$ .

**Figure 42 : Représentation des courbes de fluorescence en fonction de la concentration en hTEAD2<sub>217-447</sub>**

## B. Développement d'un test SPR

Le développement du test SPR s'est déroulé en collaboration avec le Docteur Catherine Foulon et Mme Anne-Sophie Drucbert à l'Université de Lille sur un appareil Biacore® 3000 de la société GE

Healthcare. La SPR nécessite d'immobiliser un des partenaires sur une lame pour étudier l'interaction. La société Biacore® commercialise diverses lames :

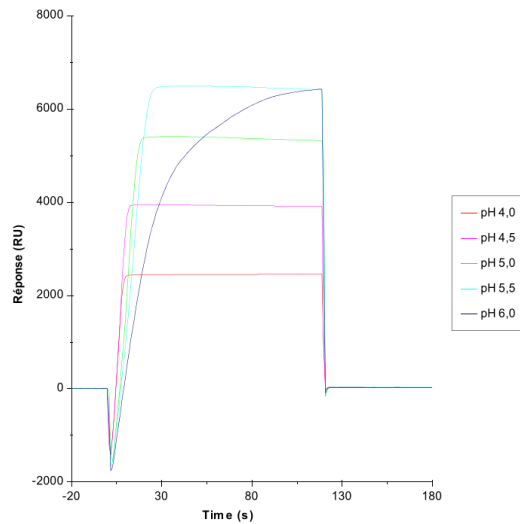
- D'or (lame Au)
- D'or recouvert de dextran carboxyméthylé fixé de manière covalente à la surface d'or (lame CM5). Couplage peptidique entre la fonction amine de la molécule à immobiliser à un groupement carboxylique du dextran de la lame.
- D'or recouverte de dextran carboxyméthylé greffé par :
  - De la streptavidine (lame SA), permettant l'immobilisation irréversible de partenaires biotinylés.
  - De l'acide nitrilotriacétique (lame NTA), permettant la capture de molécules « taggées » Histidine *via* une chélation par les ions métalliques.

La réponse enregistrée, exprimé en RU, correspond à l'angle de résonance qui est proportionnel à la quantité de complexe analyte/ligand formée à la surface de la lame.

a) ***Par immobilisation de YAP<sub>50-102</sub>***

La protéine YAP<sub>50-102</sub> a été immobilisée sur lame CM5 dans un tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, TCEP 0.25 mM et P20 0.05%.<sup>69</sup> Afin d'optimiser le taux d'immobilisation, l'influence du pH a été étudiée en fixant le débit à 15  $\mu$ L/min (Figure 43). Le pH doit être que la surface réactive présente un nombre de fonctions carboxylate maximum et que les fonctions amine primaire de la protéine soient protonnées afin de favoriser les interactions électrostatiques entre la surface réactive et la protéine.

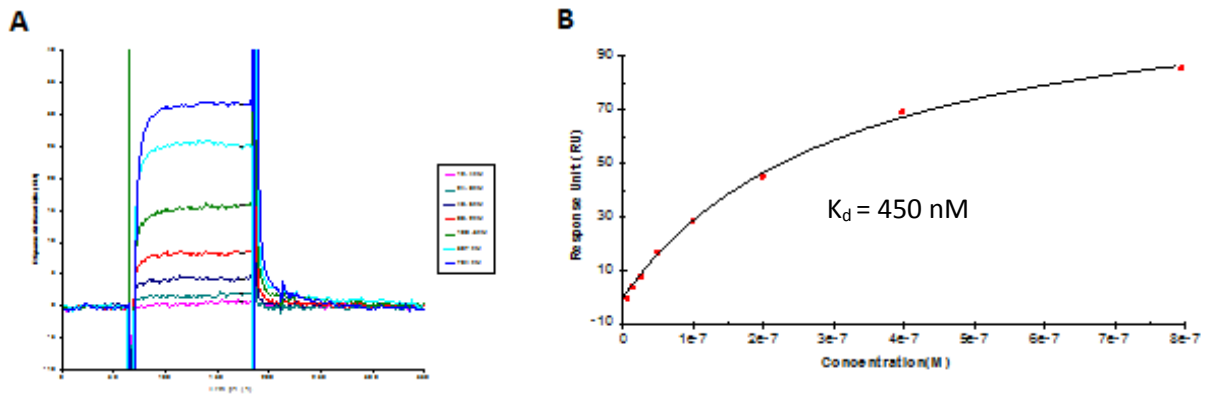
Une augmentation de la réponse est observée avec le pH. Bien qu'à pH 6 la réponse soit maximale, l'équilibre n'est pas atteint. C'est pourquoi un pH de 5.5 a été choisi pour réaliser l'immobilisation de YAP<sub>50-102</sub>.



Conditions : tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, TCEP 0.25 mM et P20 0.05% ; [YAP<sub>50-102</sub>] = 10 µg/mL ; débit = 15 µL/min ; temps injection = 2 min.

**Figure 43 : Variation du taux d'immobilisation de YAP<sub>50-102</sub> en fonction du pH**

Une gamme de concentrations de hTEAD4<sub>1-434</sub> a été préparée et injectée dans le but de détecter une interaction YAP-TEAD.



Conditions : tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, TCEP 0.25 mM et P20 0.05% ; [hTEAD4<sub>1-434</sub>] = 12.4 – 794 nM ; débit = 50 µL/min.

**Figure 44 : (A) Sensorgrammes ; (B) Isotherme de liaison**

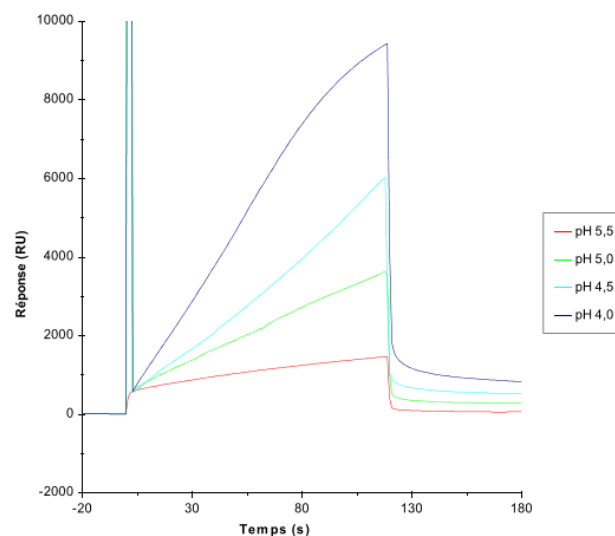
Une augmentation du signal est observée par injection de solution à concentrations croissantes de TEAD4 traduisant l'association entre les deux partenaires jusqu'à l'obtention d'une réponse constante qui montre l'équilibre (Figure 44). Il aurait certes été intéressant d'injecter des

concentrations plus élevées en hTEAD4<sub>1-434</sub> pour atteindre la saturation de la surface mais les quantités fournies ne pouvaient le permettre. Une constante de dissociation du complexe YAP<sub>50-102</sub> - hTEAD4<sub>1-434</sub> a été mesurée à 450 nM. Cette valeur supérieure à celle décrite dans la littérature peut être liée à une immobilisation aléatoire de la protéine YAP qui affecterait l'interaction avec TEAD.

#### b) *Par immobilisation de hTEAD4<sub>1-434</sub>*

L'immobilisation aléatoire de YAP<sub>50-102</sub> amène à reconsidérer la lame à utiliser. La protéine hTEAD4<sub>1-434</sub> a été donc immobilisée sur lame NTA dans les mêmes conditions que décrites précédemment, afin d'orienter la protéine. De la même manière, l'influence du pH a été étudiée afin d'améliorer le taux d'immobilisation (Figure 45).

A l'inverse de YAP<sub>50-102</sub>, une diminution de la réponse est observée lorsque le pH augmente pour hTEAD4<sub>1-434</sub> à 50 µg/mL. Cette observation peut s'expliquer par leur différence de point isoélectrique  $PI_{YAP} = 8,4$  et  $PI_{TEAD} = 6$ .



Conditions : tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, TCEP 0.25 mM et P20 0.05% ; [hTEAD4<sub>1-434</sub>] = 50 µg/mL ; débit = 5 µL/min ; temps injection = 2 min.

**Figure 45 : Variation du taux d'immobilisation de hTEAD4<sub>1-434</sub> en fonction du pH**

En revanche, après immobilisation de hTEAD4<sub>1-434</sub>, aucune interaction avec YAP<sub>50-102</sub> n'a été constatée pour valider le protocole. Un essai sur lame SA avait également été envisagé. Cependant, la protéine hTEAD4 commerciale avait été biotinylée aléatoirement et non en partie N-terminal pour orienter la protéine lors de l'immobilisation.

### C. Développement d'un test MST

Les mesures de thermophorèse ont été enregistrées à l'aide d'un appareil de type Monolith NT.115 équipé de deux LED permettant l'excitation de fluorochromes qui émettent soit dans le rouge ( $\lambda_{em} = 680$  nm) soit dans le bleu ( $\lambda_{em} = 520$  nm).

#### a) *Par marquage de protéine*

Le test MST par marquage de protéine a été développé en collaboration avec l'équipe du Docteur Catherine Foulon à l'Université de Lille. L'optimisation a consisté en une étude des protéines fluorescentes YAP\* et TEAD\* dans un tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, P20 0.05%, TCEP 0.25 mM, BSA 5 mg/mL.

Si certaines molécules possèdent une fluorescence intrinsèque, il est souvent nécessaire de marquer l'un des partenaires. La société Nanotemper® commercialise des kits permettant la préparation de molécules fluorescentes compatibles avec leur appareil. Ces kits peuvent se distinguer par :

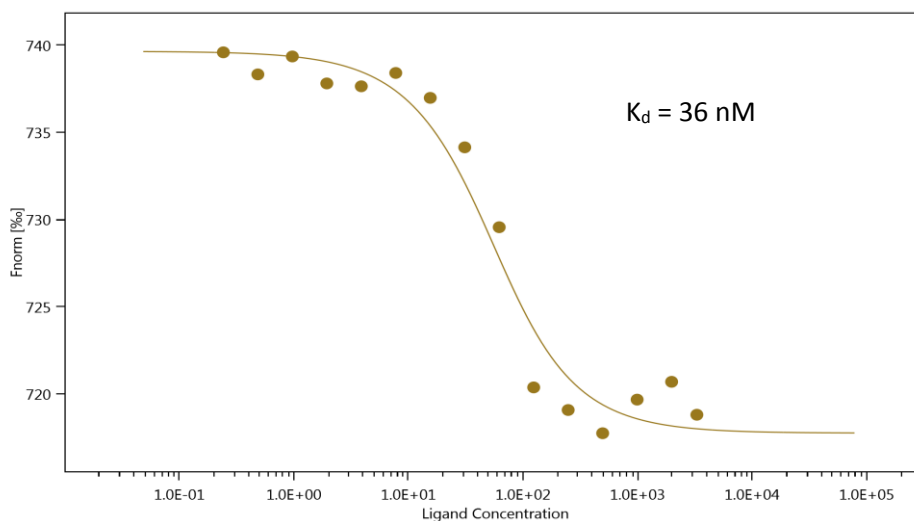
- La nature des acides aminés impliqués dans le marquage :
  - Sur les amines primaires, à savoir sur les résidus lysine ou sur la fonction amine de la partie N-terminal : kit de type *N*-Hydroxysuccinimide.
  - Sur les groupements sulfhydryles présents au niveau des résidus cystéine : kit de type Maléimide.
- La nature de la sonde fluorescente
  - Sonde émettant dans le rouge ( $\lambda_{ex} = 625$  nm ;  $\lambda_{em} = 680$  nm) : kit RED
  - Sonde émettant dans le bleu ( $\lambda_{ex} = 470$  nm ;  $\lambda_{em} = 520$  nm) : kit BLUE

La concentration en molécule marquée joue un rôle important lors des manipulations. D'une part, elle doit être égale ou inférieure à la constante thermodynamique de dissociation  $K_d$  du complexe étudié, et d'autre part elle doit permettre d'obtenir une fluorescence suffisante pour exploiter les résultats. En effet, il est recommandé par le constructeur de travailler dans des conditions telles que la fluorescence mesurée soit comprise entre 200 et 1500 UF.

#### i. Par marquage de YAP<sub>50-102</sub>

Etant donné l'absence de résidus cystéine sur la protéine YAP<sub>50-102</sub>, cette dernière a été marquée sur ses 4 résidus lysines par couplage peptidique. Une constante de dissociation de 36 nM a

ainsi pu être mesurée pour le complexe YAP<sub>50-102</sub>\*-hTEAD4<sub>1-434</sub>, en accord avec la littérature<sup>68,69</sup> permettant de valider ce test d'interaction pour les manipulations ultérieures (Figure 46).



Conditions : tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, P20 0.05%, TCEP 0.25 mM, BSA 5 mg/mL ; [YAP<sub>50-102</sub>\*] = 33 nM ; [hTEAD4<sub>1-434</sub>] = 0.06 – 1985 nM ; LED = 40% ; MST = 60%.

**Figure 46 : Isotherme de liaison obtenu par titration de hTEAD4<sub>1-434</sub> par YAP<sub>50-102</sub>\***

ii. Par marquage de hTEAD4<sub>1-434</sub>

Un premier essai de marquage sur la protéine hTEAD4<sub>1-434</sub> a été réalisé sur les résidus cystéine. Cependant, compte tenu du faible nombre de cet acide aminé au sein de la protéine (5 cystéines), la fluorescence de la solution mère obtenue était insuffisante pour avoir des résultats exploitables. Un second essai a donc été entrepris en marquant les lysines (26 lysines). Une fluorescence acceptable (250 UF) a été observée pour une concentration minimale en hTEAD4<sub>1-434</sub> de 133 nM. Néanmoins, aucune interaction avec YAP<sub>50-102</sub> n'a été observée pour valider le test. Ce manque d'interaction est peut-être dû à une concentration en hTEAD4<sub>1-434</sub> marquée trois fois supérieure à la constante de dissociation du complexe YAP-TEAD. De plus, des agrégats de la protéine hTEAD4<sub>1-434</sub> marquée ont été observés lors des expériences rendant les courbes de thermophorèse inexploitable. Une centrifugation des échantillons de la gamme est donc nécessaire avant toute manipulation.

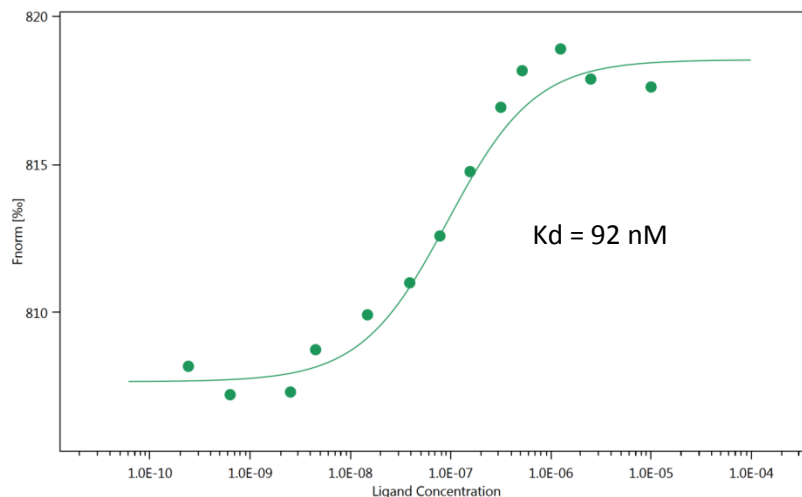
b) ***Par production de protéine fluorescente***

Bien que la méthode décrite précédemment soit rapide et efficace, elle est bien évidemment marquage-dépendante. En effet, il est impossible de reproduire de façon certaine la même

manipulation et de vérifier le taux de marquage et les lysines marquées. De plus, il a été démontré que certaines lysines ou cystéines sont essentielles dans l'interaction avec la protéine YAP. Un marquage sur ces résidus pourrait mettre en péril l'interaction entre les deux protéines.

C'est pourquoi, une nouvelle technique est actuellement en développement en collaboration avec le Docteur Xavier Thuru et Mr Romain Magnez au sein de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille. Elle consiste à produire les protéines TEAD couplées à la protéine fluorescente verte (« Green Fluorescent Protein » = GFP) ( $\lambda_{ex} = 475 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 504 \text{ nm}$ ). Cette méthode permettra à la fois de connaître la concentration exacte de la protéine marquée et d'assurer une reproductibilité des expériences, mais également de ne pas interférer dans les différentes interactions avec TEAD.

Un premier essai a récemment été réalisé directement sur lysat cellulaire<sup>120</sup> après production de la protéine hTEAD2<sub>217-447</sub> en cellule CHO, et a permis de déterminer une constante d'affinité avec la protéine YAP<sub>50-102</sub> de 92 nM, similaire à celle mesurée par *Tian* et ses collaborateurs (YAP<sub>60-10</sub> – hTEAD2<sub>217-447</sub> = 96 nM par ITC) (Figure 47).<sup>68</sup>



Conditions : tampon HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, P20 0.05%, TCEP 0.25 mM, BSA 5 mg/mL ; [YAP<sub>50-102</sub>] = 1 – 10 000 nM ; [GFP-hTEAD2<sub>217-447</sub>] = 30 nM ; LED = 40% ; MST = 60%.

**Figure 47 : Isotherme de liaison obtenu par titration de YAP<sub>50-102</sub> par GFP-hTEAD2<sub>217-447</sub>**

#### D. Développement d'un test FRET

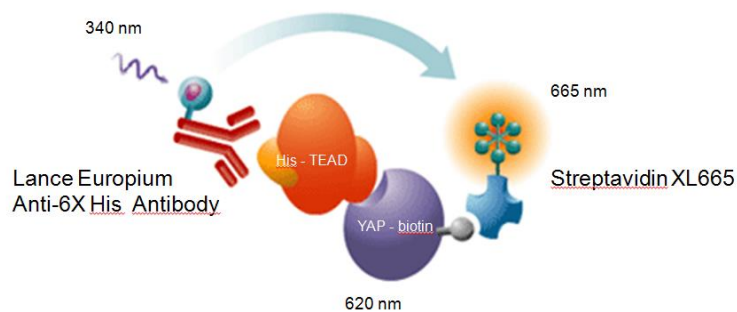
Le test FRET a été développé au sein de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille en collaboration avec le Docteur Xavier Thuru et Monsieur Romain Magnez à l'aide d'un Spectramax i3. La mise au point a été effectuée dans un tampon HEPES 50 mM (pH 7.4), KCl 100 mM, Tween-20

<sup>120</sup>Cho, H.; Kozasa, T.; Bondjers, C.; Betsholtz, C.; Kehrl, J. H. Pericyte-Specific Expression of Rgs5: Implications for PDGF and EDG Receptor Signaling during Vascular Maturation. *FASEB J.* **2003**.



0.05%, TCEP 0.25 mM, EDTA 1 mM, BSA 0.05%, Anticorps Lance Europium anti-6X His (0.125 nM, PerkinElmer), Streptavidine XL665 (10 nM, Cisbio), comme décrit par *Hau* et ses collaborateurs.<sup>69</sup>

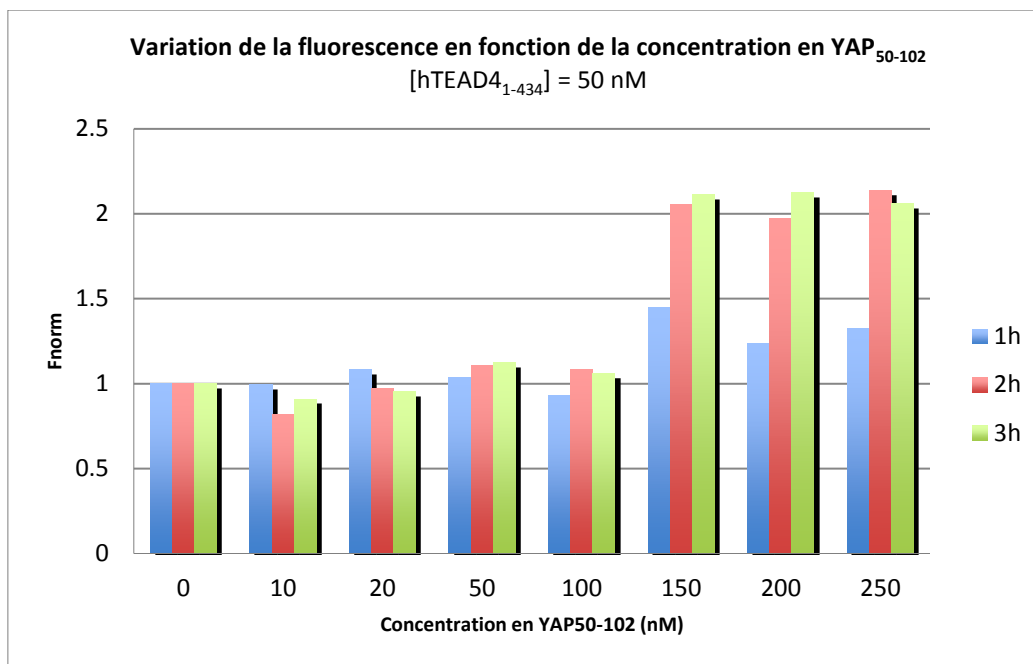
Pour transposer le principe du FRET au complexe YAP-TEAD, le modèle utilise un anticorps anti-His marqué avec un donneur de fluorescence (Europium) qui reconnaît spécifiquement hTEAD4<sub>1-434</sub>, taggé histidine, et la streptavidine, marquée par un accepteur de fluorescence (XL665) qui reconnaît la protéine YAP<sub>50-102</sub> biotinylée (Figure 48). Lorsque l'Europium est excité à 340 nm, celui-ci émet une fluorescence à 620 nm, correspondant à la longueur d'onde d'excitation de la streptavidine. Si les deux partenaires YAP et TEAD sont suffisamment proche (<10 nm), ce transfert d'énergie conduit à une émission de fluorescence à 665 nm.



**Figure 48 : Représentation du FRET pour le complexe YAP-TEAD**

Un premier essai a été effectué dans les conditions décrites par *Hau* utilisant YAP<sub>50-102</sub> (10 nM) et hTEAD4<sub>1-434</sub> (5 nM) mais aucune fluorescence n'a été détectée. Afin de déterminer les conditions optimales de fluorescence, une étude sur les concentrations en protéines et le temps d'incubation a été réalisée. Les ratios de fluorescence 665/620 ont été calculés et représentés par les histogrammes ci-dessous.

Dans un premier temps, l'influence de la concentration en YAP<sub>50-102</sub> a été étudiée (0, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 nM) en fixant la concentration de hTEAD4<sub>1-434</sub> à 50 nM (Figure 49). La fluorescence ne semble pas être affectée par des concentrations croissantes en YAP<sub>50-102</sub> pour un temps d'incubation égal à une heure. En revanche, une augmentation de la fluorescence est observée après deux et trois heures d'incubation pour des concentrations en YAP<sub>50-102</sub> supérieures à 150 nM. Il semble donc nécessaire d'avoir une concentration en YAP trois fois plus élevée que celle de TEAD.



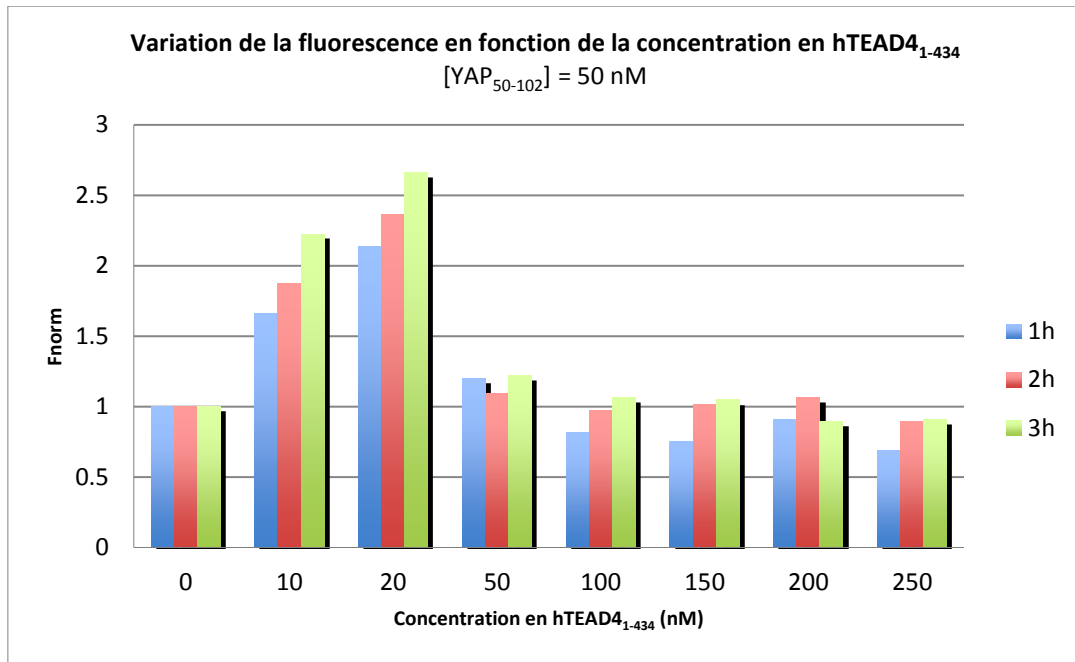
Conditions : tampon HEPES 50 mM (pH 7.4), KCl 100 mM, Tween-20 0.05%, TCEP 0.25 mM, EDTA 1 mM, BSA 0.05%, Anticorps Lance Europium anti-6X His (0.125 nM, PerkinElmer), Streptavidine XL665 (10 nM, Cisbio) ; [hTEAD<sub>41-434</sub>] = 50 μM ; [YAP<sub>50-102</sub>] = 0, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 nM.

**Figure 49 : Variation de la fluorescence en fonction de la concentration en YAP<sub>50-102</sub>**

Dans un second temps, l'influence de la concentration en hTEAD<sub>41-434</sub> a été (0, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 nM) en fixant la concentration de YAP<sub>50-102</sub> à 50 nM (Figure 50). La fluorescence semble proportionnelle à la concentration en hTEAD<sub>41-434</sub> indépendamment du temps d'incubation jusqu'à une concentration de 20 nM, soit environ trois fois inférieure à la concentration de YAP. Cette analyse vient confirmer la manipulation inverse et le résultat obtenu précédemment. Cependant, une chute brutale caractéristique d'aucune interaction entre les deux partenaires est à relever pour des concentrations supérieures à 20 nM, pouvant provenir d'un phénomène d'agrégation des protéines.

Les mesures de fluorescence seront donc réalisées après 2 ou 3 heures d'incubation à des concentrations en YAP<sub>50-102</sub> et hTEAD<sub>41-434</sub> de 150 et 50 nM, respectivement.

*Hau* et ses collaborateurs ont utilisé un ratio YAP/TEAD 2 :1 dans le développement de leur test FRET.<sup>69</sup>



Conditions : tampon HEPES 50 mM (pH 7.4), KCl 100 mM, Tween-20 0.05%, TCEP 0.25 mM, EDTA 1 mM, BSA 0.05%, Anticorps Lance Europium anti-6X His (0.125 nM, PerkinElmer), Streptavidine XL665 (10 nM, Cisbio) ; [YAP<sub>50-102</sub>] = 50  $\mu$ M ; [hTEAD4<sub>1-434</sub>] = 0, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 nM.

**Figure 50 : Variation de la fluorescence en fonction de la concentration en hTEAD4<sub>1-434</sub>**

# **CHAPITRE 4 :**

## **CIBLER LA PROTEINE YAP**

La stratégie d'inhibition la plus attractive et engendrant le moins d'effets secondaires consiste à cibler les effecteurs en aval de la voie Hippo. Dans ce but, de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer ont récemment été décrites visant à réduire ou supprimer la fonction oncogène de YAP et/ou TAZ.<sup>121</sup> Cependant, cibler ces protéines est un challenge puisqu'elles ne possèdent pas d'activité catalytique et que les domaines engagés dans les interactions avec les kinases sont peu connus.

Des porphyrines et plus particulièrement la Vertéporfine, principalement utilisées pour la photothérapie<sup>122</sup> ont été identifiées comme inhibiteurs de l'interaction YAP-TEAD ciblant YAP.<sup>69</sup>

## **I. La Vertéporfine (VP)**

### **A. VP : agent photosensibilisant pour la thérapie photodynamique**

La VP a tout d'abord été conçue comme agent photosensibilisant pour le traitement des cancers due à sa forte cytotoxicité sous photoactivation.<sup>123</sup> Cependant, sa faible sélectivité envers les cellules cancéreuses entraînant une toxicité chez les cellules saines, n'ont pas permis son développement comme agent anticancéreux.

Rapidement, la VP a été repositionnée dans le domaine de l'ophtalmologie et est actuellement utilisée en thérapie photodynamique de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.<sup>124</sup> Commercialisée sous le nom de Visudyne® par Novartis, elle génère par activation laser (photoactivation à 692 nm) une espèce réactive de l'oxygène qui détruit les vaisseaux sanguins anormaux. En effet, la VP photoactivée produit de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) avec un rendement quantique de 0,84<sup>125</sup> nettement plus élevé que celui d'autres porphyrines telles que la Protoporphyrine IX (0,56) ou encore son dérivé ester diméthylque (0,57).<sup>126</sup> Plus récemment, la VP a également montré de nouvelles propriétés biologiques sans photoactivation.<sup>127</sup>

---

<sup>121</sup>Stanger, B. Z., Quit your YAPing: a new target for cancer therapy. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1263-1267.

<sup>122</sup>Huang, H. ; Song, W. ; Rieffel, J. ; Lovell, J. F. Emerging applications of porphyrines in photomedicine. *Front. Phys.* **2015**, *3*, 3-23.

<sup>123</sup>Richter, A.M.; Waterfield, E.; Jain, A.K.; Allison, B.; Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Levy, J.G., Photosensitising potency of structural analogues of benzoporphyrin derivative (BPD) in a mouse tumour model. *Br. J. Cancer.* **1991**, *63*, 87-93.

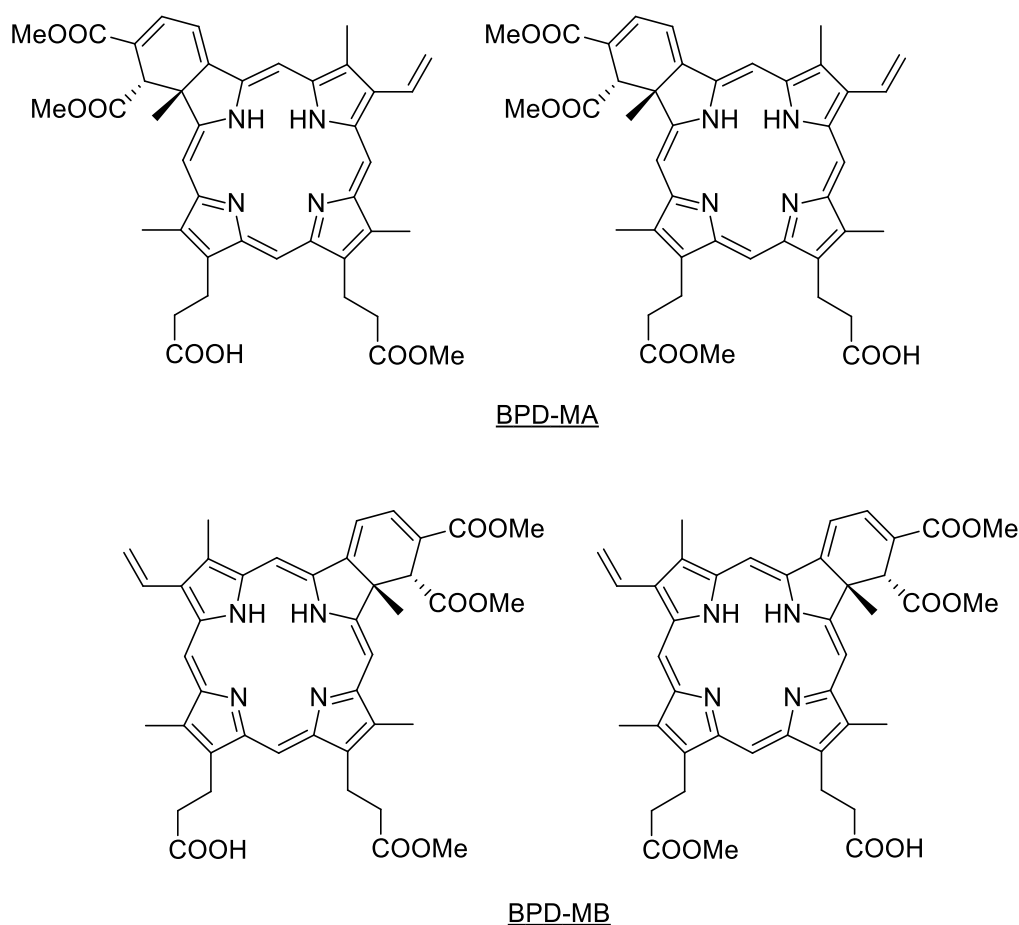
<sup>124</sup>Mellish, K. J. and Borwn, S. B., Verteporfin : a milestone in ophthalmology and photodynamic therapy. *Exp. Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 351-361.

<sup>125</sup>Fernandez, J. M.; Bilgin, M. D.; Grossweiner, L. I., Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J. Photochem. Photobiol. B.* **1997**, *37*, 131-140.

<sup>126</sup>Keene, J. P.; Kessel, D.; Land, E. J.; Redmond, R. W. *et al.*, Direct detection of singlet oxygen sensitized by hematoporphyrin and related compounds. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *43*, 117-120.

<sup>127</sup>Gibault, F. ; Corvaisier, M. ; Bailly, F. ; Huet, G. ; Melnyk, P. ; Cotellet, P. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1171-1184.)

La VP est constituée d'un mélange équimolaire de deux régioisomères BPD-MA et BPD-MB (Figure 51), chacun étant présent sous forme racémique. Les différents énantiomères ont été isolés et présentent des activités pharmacologiques similaires.<sup>128</sup>

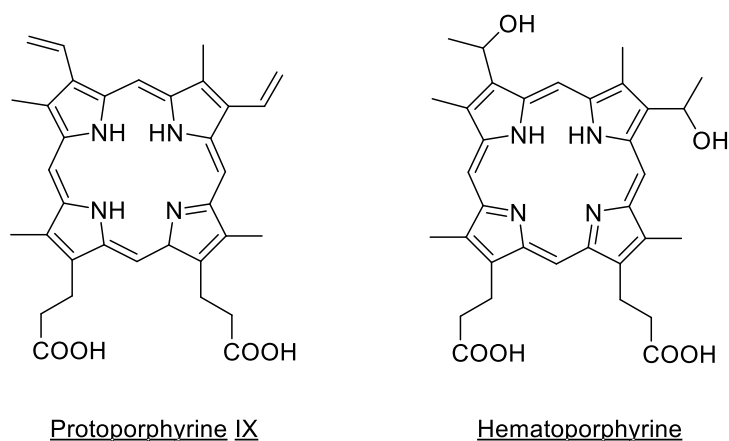


**Figure 51 : Structure des 4 isomères constituant la Vertéporfine**

## B. VP : inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD

*Liu-Chittenden* et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer qu'il était possible d'inhiber l'interaction YAP-TEAD en vue d'une nouvelle stratégie anticancéreuse.<sup>95</sup> Un criblage de la chimiothèque John Hopkins (3300 composés approuvés par la FDA ou ses équivalents européens ou japonais ou en phase clinique II) a été effectué grâce au test rapporteur à la luciférase et a permis d'identifier trois composés de la famille des porphyrines : l'Hématoporphyrine (HP), la Protoporphyrine IX (PPIX) et la Vertéporfine (VP) comme inhibiteurs de l'interaction YAP-TEAD (Figure 52).

<sup>128</sup>Richter, A. M.; Yip, S.; Meadows, H.; Jain, A. K. *et al.*, Photosensitizing potencies of the structural analogues of benzoporphyrin derivative in different biological test systems. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1996**, *14*, 335-341.



**Figure 52 : Structures de la protoporphyrine IX et de l'hématoporphyrine**

Des cellules humaines de l'épithélium rénal embryonnaire (HEK293), exprimant GAL4-TEAD et HA-YAP, ont été traitées par ces trois porphyrines à des concentrations de l'ordre du micromolaire. La VP apparaît alors comme le composé le plus actif pour inhiber l'interaction YAP-TEAD avec une  $IC_{50}$  de 2,5  $\mu$ M.

La VP (15  $\mu$ M) a ensuite été incubée à température ambiante pendant 15 min en présence de YAP (5  $\mu$ M) d'un côté et de TEAD (5  $\mu$ M) dans un autre essai en parallèle. Les deux précédents mélanges ont été fractionnés sur colonne d'exclusion stérique et il apparaît une coélution de la fluorescence de la VP avec l'absorbance de YAP et non avec TEAD, permettant ainsi de positionner le VP comme ligand préférentiel de YAP.

La capacité d'inhibition de l'activité oncogénique de YAP par la VP a ensuite été examinée *in vivo* sur des modèles de souris transgéniques surexprimant YAP ou inactivant le gène Nf2/Merlin (souris knockout Nf2/Merlin). L'administration de cette molécule par voie intrapéritonéale à 100 mg/kg tous les deux jours en complément de la Doxycycline (agent anticancéreux) sur une durée de 8 jours inhibe l'augmentation de la taille des foies de souris induite par la surexpression de YAP ou l'inactivation du gène Nf2/Merlin, confirmant les résultats obtenus *in vitro*. Cette dose correspond à une concentration hépatique de 625  $\mu$ g/g après une journée.<sup>129</sup>

Depuis cette découverte, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont révélé le potentiel de la VP dans différents cancers (ovaires, prostate, œsophage, vessie, rein, pancréas, rétine, foie).<sup>78,130,131</sup>

<sup>129</sup>Martin, P.; Mueller, M.; Flubacher, D.; Boudier, A.; Blaser, H. U.; Spielvogel, D., *Organic Process Research & Development*. **2010**, *14*, 799-804.

<sup>130</sup>Kong, D.; Zhao, Y.; Men, T. and Teng, C. B., Hippo signaling pathway in liver and pancreas: the potential drug target for tumor therapy. *J. Drug Target*.**2015**, *23*, 125-133.

Néanmoins son utilisation reste problématique dans le cadre d'études menées sur cellules. Elle présente une concentration nécessaire pour tuer 50% des cellules (IC<sub>50</sub>) entre 8 et 227 nM, dépendante des lignées cellulaires utilisées. Son mode d'administration se rapproche essentiellement de celui décrit par *Liu-Chittenden*, et une fois injectée, la molécule est localisée dans les mitochondries.<sup>132,133,134</sup>

Bien que la VP soit considérée comme le seul inhibiteur efficace du complexe YAP-TEAD, connu à ce jour, il n'existe aucune donnée expérimentale pouvant expliquer son mode d'action *in vitro* et/ou *in vivo*. Néanmoins, récemment il a été montré que la VP active la protéine 14-3-3 (protéine responsable de la séquestration cytoplasmique de YAP).<sup>135</sup>

L'utilisation de VP comme inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD peut engendrer quelques inconvénients : (i) VP est un agent photosensibilisant et présente une forte toxicité; (ii) VP a été identifiée comme inhibiteur de l'autophagie en produisant de l'oxygène singulet<sup>136</sup>; (iii) VP induit l'oligomérisation de plus de 250 protéines, dont notamment 80 protéines mitochondriales.<sup>137</sup>

Ces problèmes de photosensibilité sont clairement mentionnés par *Donohue* et ses collaborateurs qui recommandent d'éviter au maximum l'exposition à la lumière des cellules traitées à la VP.

## **II. Synthèse des dipyrines**

### **A. Objectif et analyse retrosynthétique**

La VP ayant démontré une inhibition de l'interaction YAP-TEAD, la synthèse de dipyrines représentant différents fragments de porphyrines a été envisagée. Cette approche est destinée à déterminer la structure minimale de VP nécessaire au ciblage de la protéine YAP et à l'inhibition du complexe protéique tout en essayant de garder l'activité biologique de VP.

---

<sup>131</sup>Ma, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Wei, Q. *et al.*, Hippo-YAP signaling pathway: a new paradigm for cancer therapy. *Int. J. Cancer.* **2015**, *137*, 2275-2286.

<sup>132</sup>Chiou, J. F.; Wang, Y. H.; Jou, M. J.; Liu, T. Z. *et al.*, Verteporfin-photoinduced apoptosis in HepG2 cells mediated by reactive oxygen and nitrogen species intermediates. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 155-170.

<sup>133</sup>Peng, T. I.; Chang, C. J.; Guo, M. J.; Wang, Y. H. *et al.*, Mitochondrion-targeted photosensitizer enhances the photodynamic effect-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1042*, 419-428.

<sup>134</sup>Belzacq, A. S.; Jacotot, E.; Vieira, H. L. A.; Mistro, D. *et al.*, Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin. Identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1260-1264.

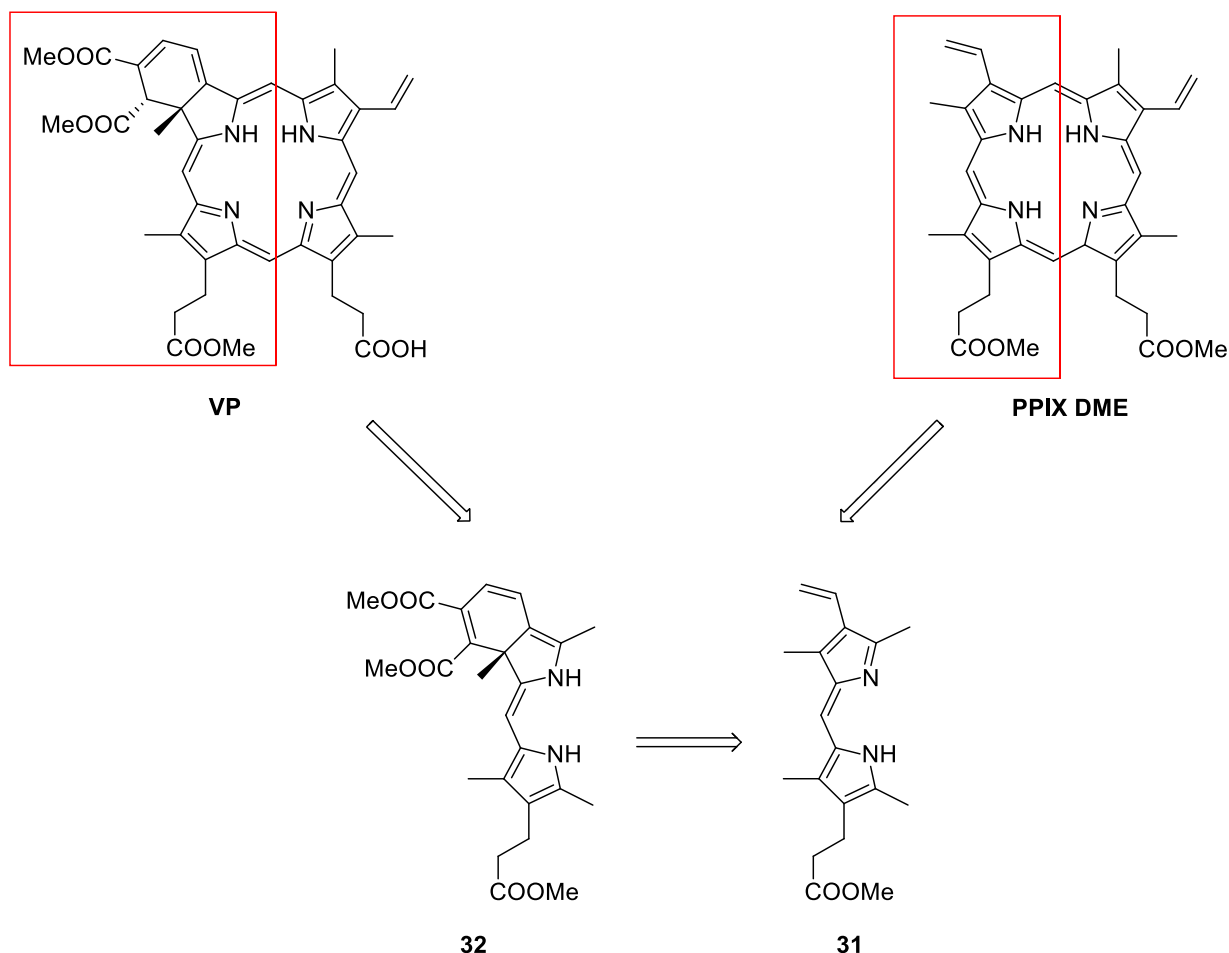
<sup>135</sup>Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B., *Amer. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 27-37.

<sup>136</sup>Donohue, E.; Balgi, A. D.; Komatsu, M.; Roberge, M., *PLoS One.* **2014**, *9*, e114964.

<sup>137</sup>Zhang, H.; Ramakrishnan, S. K.; Triner, D.; Centofanti, B.; Maitra, D.; Gyorffy, B.; Sebolt-Leopold, J. S.; Dame, M. K.; Varani, J.; Brenner, D. E.; Fearon, E. R.; Omary, M. B.; Shah, Y. M., *Science Signaling.* **2015**, *8*, RA98.



Pour démarrer le projet de recherche, le fragment qui nous a paru le plus intéressant est le composé **32** représentant la partie « ouest » de la VP. D'après l'analyse rétrosynthétique, celui-ci pourrait être obtenu par une réaction de Diels Alder à partir de la vinyldipyrriane **31**, correspondant à la partie « ouest » de l'ester diméthylé de la Protoporphyrine IX (PPIX DME) (Schéma 1).



**Schéma 1 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des dipyrriines 31 et 32**

Quatre voies de synthèse ont été envisagées afin d'obtenir l'intermédiaire clé **31** (Schéma 2). La voie 1 permet d'accéder au composé **31** à partir de la dipyrriane acétylée **6**, elle-même issue de la condensation entre le 3-acétyl-2,4-diméthylpyrrole **5** et le 2-formylpyrrole **4**. La voie 2 propose l'obtention de notre molécule cible **31** directement par condensation entre le 3-vinyl-2,4-diméthylpyrrole **12** et le 2-formylpyrrole **4**. La voie 3 permet de former le composé désiré **31** à partir de la dipyrriane iodée **19** par réaction de Stille. Cette dipyrriane **19** sera issue de la condensation entre le 2-formylpyrrole **4** et l'acide 4-iodo-3,5-diméthylpyrrole **18**. La dernière voie de synthèse, voie 4, forme le composé **31** à partir de la iodoéthylidipyrriane **30**, issue de la condensation entre le 2-formylpyrrole **4** et le 3-(2-iodoéthyl)-2,4-diméthylpyrrole **29**.

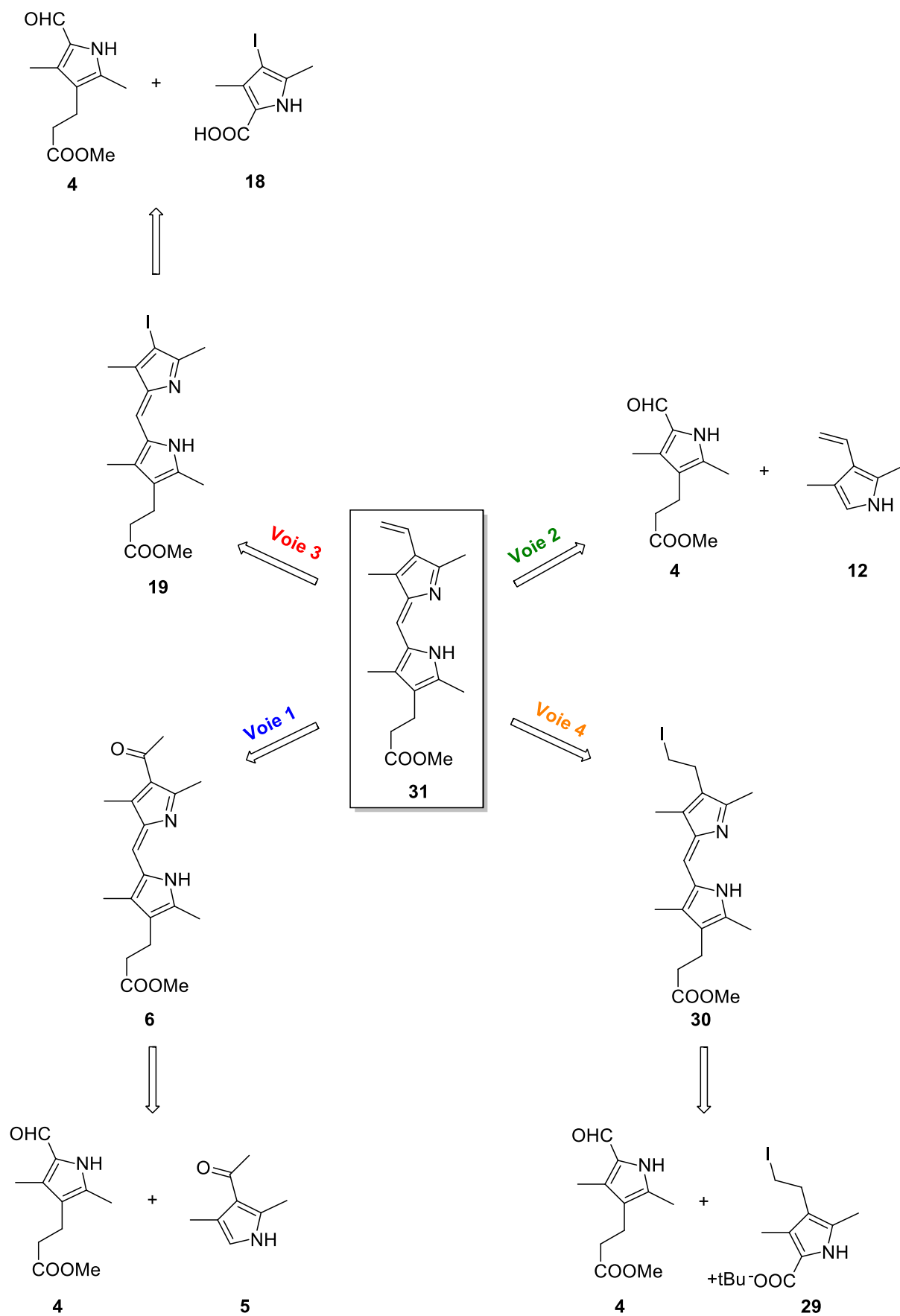


Schéma 2 : Différentes voies rétrosynthétiques du composé **31**

## B. Synthèse de la dipyrriine 31

### a) Voie de synthèse 1

La première voie explorée permet d'obtenir le motif vinyle après réduction et déshydratation du groupement acétyle. La dipyrriine acétylée **6**, précurseur de **31**, est obtenue par condensation entre le 3-(5-formyl-2,4-diméthyl-1*H*-pyrrol-3-yl)propanoate de méthyle **4** et le dérivé 3-acétyl-2,4-diméthylpyrrole **5** (Schéma 3).

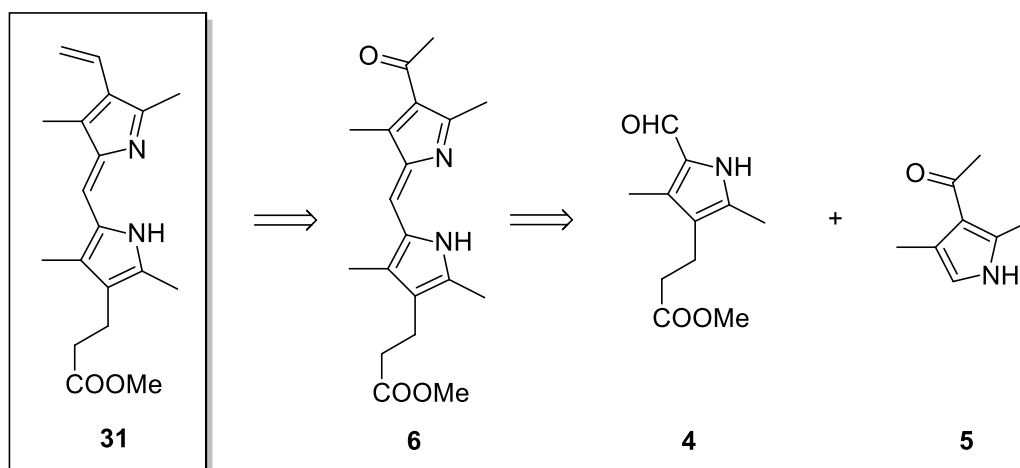
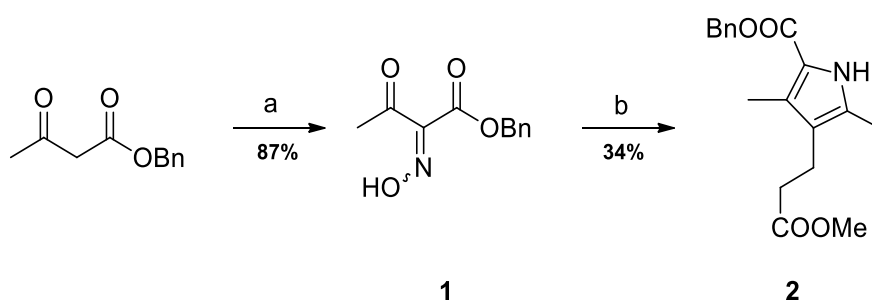


Schéma 3 : Analyse rétrosynthétique de la voie 1

#### i. Synthèse du dérivé pyrrole formylé 4

La synthèse du précurseur **4** débute par la formation de l'oxime **1** à partir de l'acétoacétate de benzyle commercial traité par le nitrite de sodium dans l'acide acétique (Schéma 4).<sup>138,139</sup>



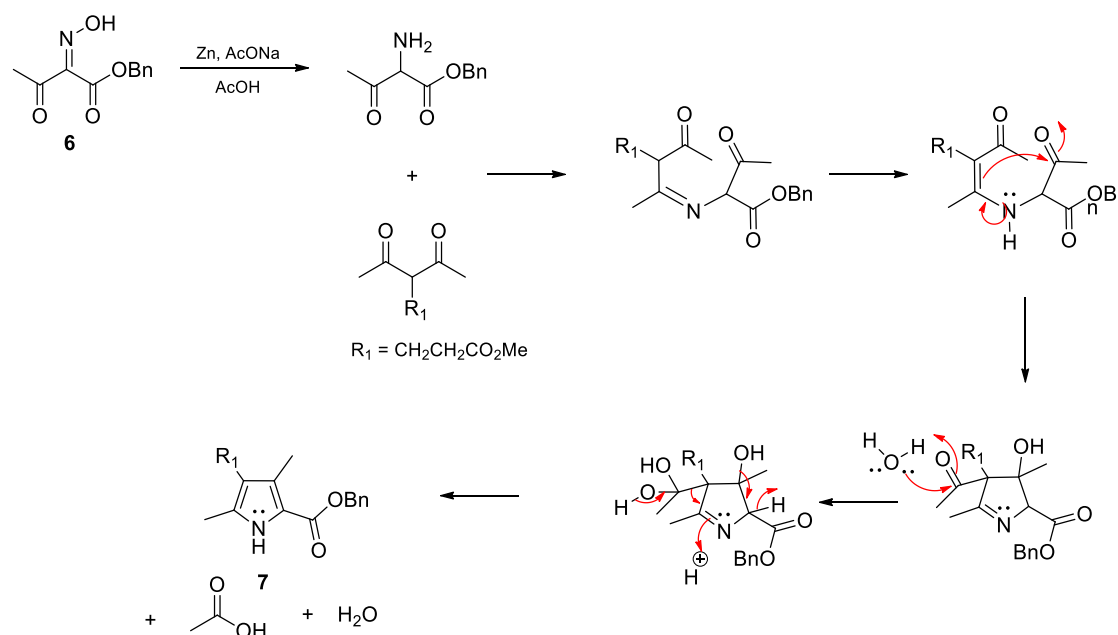
Réactifs et conditions : (a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (1,6 éq.),  $\text{AcOH}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min, 87%; (b) 4-Acétyle-5-oxohexanoate de méthyle (1 éq.),  $\text{Zn}$  (6 éq.),  $\text{AcONa}$  (1,5 éq.),  $\text{AcOH}$ ,  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 h, 34%.

Schéma 4 : Synthèse du composé 2

<sup>138</sup>Shiner, C. M. and Lash, T. D., Porphyrins with exocyclic rings. Part 21: Influence of pyrrolic and carbocyclic ring alkyl substituents on the synthesis of porphyrins bearing six-membered exocyclic rings. *Tetrahedron*, .2005, 61, 11628-11640.

<sup>139</sup> Sanz-Cervera, J. F.; Blasco, R.; Piera, J.; Cynamon, M. *et al.*, Solution versus fluoros versus solid-phase synthesis of 2,5-disubstituted 1,3-azoles. Preliminary antibacterial activity studies. *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 8988-8996.

L'oxime **1**, est ensuite mise en réaction avec le 4-acétyl-5-oxohexanoate de méthyle en présence d'acétate de sodium et de zinc pour obtenir le pyrrole **2** avec un faible rendement de 34% suivant le mécanisme proposé ci-dessous (Schéma 5, réaction de Kleinspehn).<sup>140</sup>



**Schéma 5 : Mécanisme proposé pour la synthèse du pyrrole 2**

En vue d'améliorer le rendement de formation du pyrrole **2**, différentes températures ont été testées et les résultats montrent qu'il est nécessaire de chauffer au-dessus de 50 °C pour initier la réaction, d'ajouter ensuite le zinc à cette température et de ne pas chauffer au-dessus de 100 °C pour ne pas dégrader le produit formé.

Une réaction « one-pot » a également été testée sans isoler l'oxime **1**, ainsi qu'une synthèse en absence d'acétate de sodium mais les rendements obtenus sont restés inférieurs à 25%.<sup>141,142</sup> C'est pourquoi, les conditions de synthèse choisies restent celles utilisées dans la littérature. Le rendement, certes faible (34%), est en parfait accord avec les données bibliographiques.

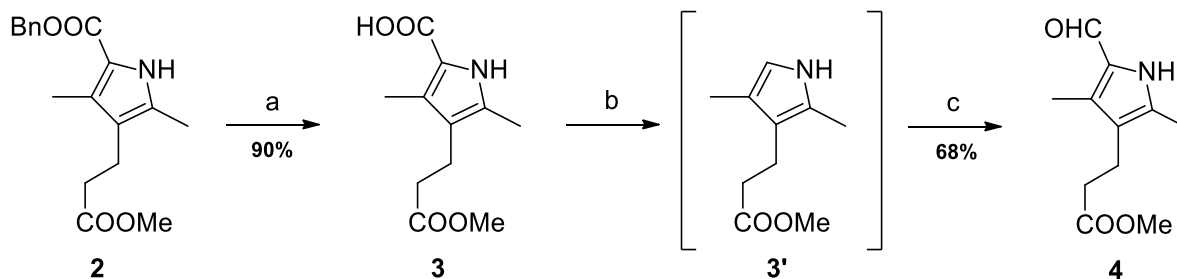
Une fois le pyrrole **2** formé, le groupement protecteur benzyle est clivé par hydrogénation catalytique sur charbon palladié (Schéma 6). L'acide **3**, obtenu avec 90% de rendement, est ensuite décarboxylé à l'aide d'acide trifluoroacétique et le pyrrole obtenu **3'** est formylé *in situ* par

<sup>140</sup>Paine, J. B. and Dolphin, D., Pyrrole chemistry. An improved synthesis of ethyl pyrrole-2-carboxylate esters from diethyl aminomalonate. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5598-5604.

<sup>141</sup>Johnson, A. W.; Markham, E.; Price, R. and Shaw, K. B., The synthesis of tri- and tetra-alkylpyrroles. *J. Chem. Soc.* **1958**, 4254-4257.

<sup>142</sup>Schmuck, C.; Rupprecht, D.; Urban, C. and Walden, N., Synthesis of orthogonally protected pyrrole tricarboxylic acid derivatives: versatile building blocks for pyrrole-containing compounds. *Synthesis*. **2006**, 89-96.

l'orthoformiate de triméthyle pour donner le dérivé pyrrole formylé **4** avec un rendement de 68% sur les deux dernières étapes.<sup>143</sup>



Réactifs et conditions : (a) H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), THF, 25 °C, 20 h, 90% ; (b) TFA (20 éq.), 25 °C, 40 min ; (c) HC(OMe)<sub>3</sub> (1,2 éq.), 0 °C, 5 h, 68%.

### Schéma 6 : Synthèse du composé 4

#### ii. Synthèse de la vinyl dipyrrole 31

La deuxième unité pyrrolique **5** est obtenu avec un rendement de 90% par décarboxylation de l'acide 4-acétyl-3,5-diméthylpyrrole-2-carboxylique (composé commercial) en présence d'acide trifluoroacétique à 40 °C pendant une heure.<sup>144,145</sup> Ce dernier est ensuite condensé au composé **4** à l'aide d'une solution d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique, dans le méthanol, pendant une heure à température ambiante. Le sel de dipyrrole **6** est obtenu sous forme de poudre orange avec un rendement de 89% (Schéma 7).<sup>146,147</sup>

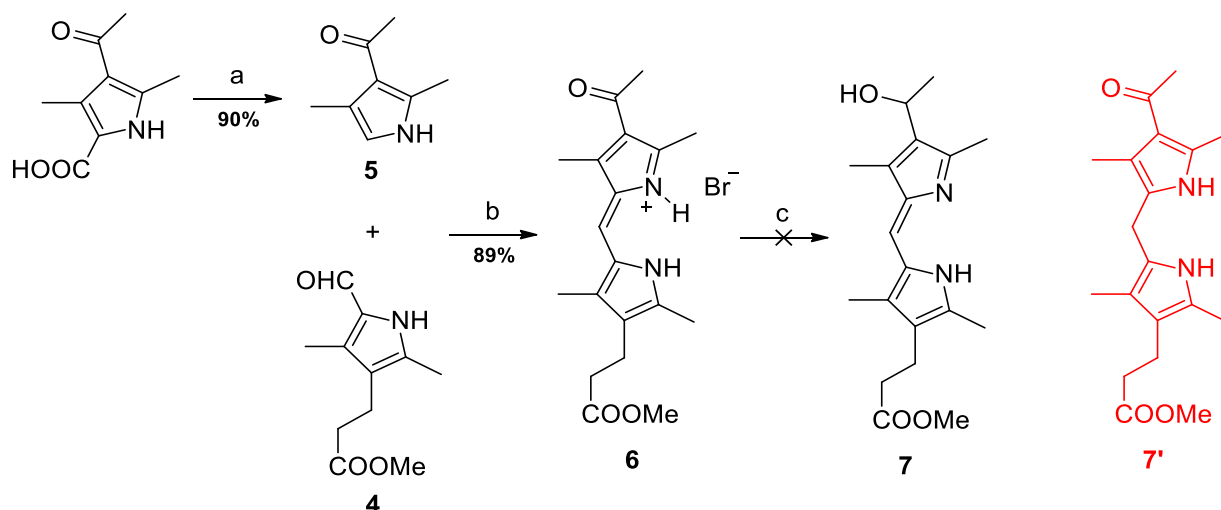
<sup>143</sup>Martin, P.; Mueller, M.; Flubacher, D.; Boudier, A. *et al.*, Total synthesis of hematoporphyrin and protoporphyrin: a conceptually new approach. *Organic Process Research & Development*. **2010**, *14*, 799-804.

<sup>144</sup>Schlabach, M.; Limbach, H. H.; Bunnenberg, E.; Shu, A. Y. L. *et al.*, NMR study of kinetic HH/HD/DH/DD isotope effects on the tautomerism of acetylporphyrin: evidence for a stepwise double proton transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4554-4565.

<sup>145</sup>Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H. *et al.*, Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore. Rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3357-3367.

<sup>146</sup>May, D. A. and Lash, T. D., Porphyrins with exocyclic rings. 2. Synthesis of geochemically significant tetrahydrobenzoporphyrins from 4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindoles. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4820-4828.

<sup>147</sup>Paine, J. B. and Dolphin, D., 5-Unsubstituted 2-pyrrolecarboxaldehydes for porphyrin synthesis and the cyanovinyl protecting group. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2787-2795.



Réactifs et conditions : (a) TFA (20 équ.), 40 °C, 1 h, 90% ; (b) HBr 33% dans l'acide acétique (8 équ.), MeOH, 1 h, 25 °C, 89% ; (c) CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 équ.), NaBH<sub>4</sub> (2 équ.), dioxane/propan-2-ol, 100 °C, 20 h, 75%.

### Schéma 7 : Essais de synthèse du composé 31 par la voie 1

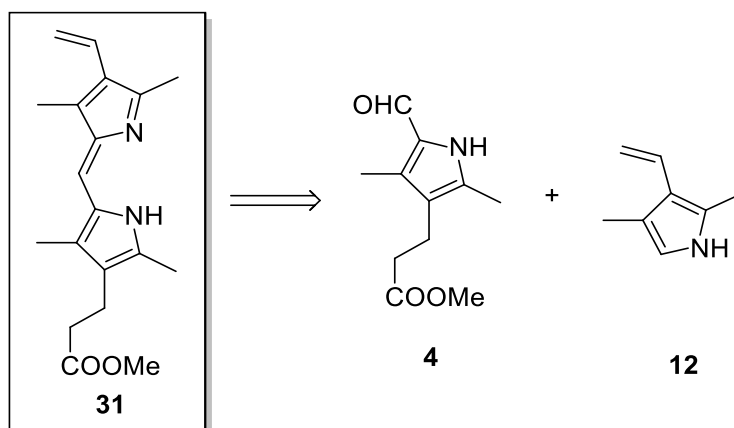
Pour obtenir la vinyl-dipyrrole **31**, une réduction du groupement acétyle en alcool, suivie d'une déshydratation a été envisagée. Des essais avec du borohydrure de sodium NaBH<sub>4</sub>, seul ou en présence de chlorure de cérium, CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O<sup>148</sup> dans un mélange 50/50 dioxane/propan-2-ol à 100 °C pendant 20 heures ont été infructueux et ont conduit à la réduction de la double liaison entre les deux hétérocycles et à la formation du dipyrrométhane **7'** sans aucune modification de l'acétyle.<sup>149</sup>

#### b) Voie de synthèse 2

La voie de synthèse 2 permet d'accéder à l'intermédiaire **31** par condensation directe entre le pyrrole formylé **4** et le dérivé 2,4-diméthyl-3-vinylpyrrole **12** (Schéma 8). Le nouveau challenge consiste donc à synthétiser le 2,4-diméthyl-3-vinylpyrrole **12**.

<sup>148</sup>Jacquet, O.; Bergholz, T.; Magnier-Bouvier, C.; Mellah, M. *et al.*, Palladium-catalyzed and samarium-promoted coupling of stereochemically-biased allylic acetates with carbonyl compounds. *Tetrahedron*.**2010**, *66*, 222-226.

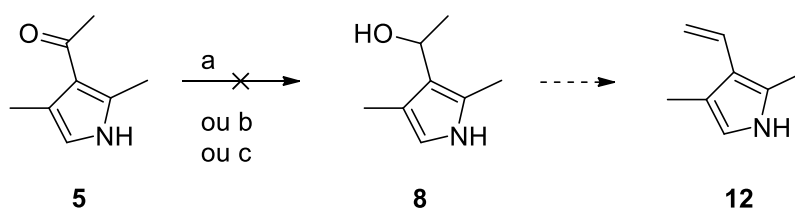
<sup>149</sup>Settambolo, R.; Lazzaroni, R.; Messeri, T.; Mazzetti, M. *et al.*, Synthesis of 3-vinylpyrrole. *J. Org. Chem.***1993**, *58*, 7899-7902.



**Schéma 8 : Schéma rétrosynthétique de la voie 2**

i. Synthèse du pyrrole 12 à partir de 5

Il est possible d'obtenir le pyrrole **12** à partir du composé **5**, synthétisé précédemment (Schéma 9). Pour cela une réduction similaire du groupement acétyle en présence de NaBH<sub>4</sub> et de CeCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O dans un mélange 50/50 dioxane/propan-2-ol à 100 °C pendant 20 heures a été testée, mais a de nouveau échoué. L'hydrogénation catalytique à température et pression ambiantes sur charbon palladié a été infructueuse et l'utilisation d'un réducteur plus puissant comme l'hydrure de lithium aluminium, LiAlH<sub>4</sub>, a conduit par ailleurs à la réduction du groupe acétyle en groupe éthyle comme décrit précédemment.<sup>150</sup>



Réactifs et conditions : (a) NaBH<sub>4</sub> (2 éq.), MeOH, 25 °C, 20 h ; ou (b) CeCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O (1 éq.), NaBH<sub>4</sub> (2 éq.), dioxane/propan-2-ol, 100 °C, 20 h ; ou (c) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C (0,1 éq.), 25 °C, P atm, 20 h.

**Schéma 9 : Essais de synthèse du composé 12 à partir de 5**

Ces essais de réduction du groupement acétyle étant inefficaces, nous avons émis l'hypothèse que le caractère II-excédentaire du pyrrole diminuait fortement l'électrophilie du carbonyle exocyclique

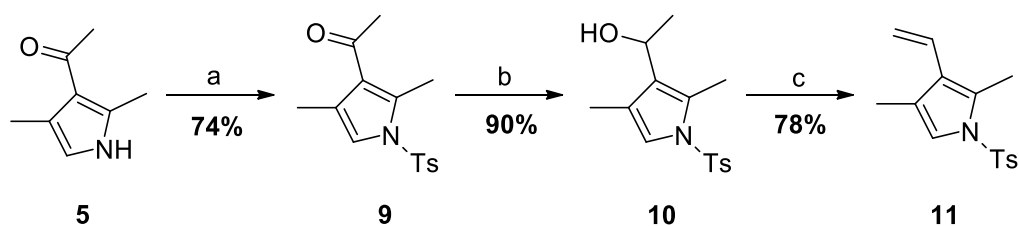
<sup>150</sup>Mula, S.; Ray, A. K.; Banerjee, M.; Chaudhuri, T. *et al.*, Design and development of a new pyrromethene dye with improved photostability and lasing Efficiency: theoretical rationalization of photophysical and photochemical properties. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2146-2154.

conjugué, rendant sa réduction difficile. C'est pourquoi, une stratégie de protection du noyau pyrrolique et de synthèse du 2,4-diméthyl-3-vinylpyrrole *N*-protégé a été entreprise.

ii. Synthèse du pyrrole **12** à partir du pyrrole **5** protégé par le groupement tosyle

Dans un premier temps, le groupement protecteur tosyle, couramment utilisé pour la protection des pyrroles, a été choisi (Schéma 10).

A partir du composé **5** synthétisé précédemment, le pyrrole **9**, protégé par le groupement tosyle, est formé en utilisant de l'hydrure de sodium et du chlorure de tosyle dans le tétrahydrofurane à température ambiante pendant 4 heures, avec un rendement de 74%.<sup>151</sup> La réduction du groupe acétyle est ensuite effectuée aisément à l'aide de NaBH<sub>4</sub>, dans un mélange tétrahydrofurane/éthanol pour donner l'alcool **10** correspondant avec un rendement de 90%.



Réactifs et conditions : (a) NaH 60% (1,3 éq.), TsCl (1,2 éq.), THF, 25 °C, 4 h, 74% ; (b) NaBH<sub>4</sub> (3 éq.), THF/EtOH, 25 °C, 20 h, 90% ; (c) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc (1 éq.), THF, 70 °C, 4 h, 78% ou DMF, 100 °C, 20 h, 30%.

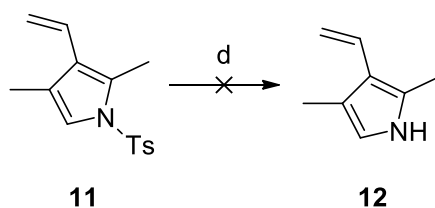
**Schéma 10 : Synthèse du composé 11 à partir de 5**

Deux essais ont été menés pour la déshydratation conduisant à la formation du groupe vinylique. Les conditions optimales trouvées sont l'utilisation de l'acide sulfurique concentré dans le THF à 70 °C pendant 4 h. Le composé **11** est obtenu avec un rendement de 78%.

La dernière étape pour obtenir le précurseur désiré **12** est la déprotection de l'atome d'azote du pyrrole (Schéma 11).

<sup>151</sup>Rokach, J.; Hamel, P.; Kakushima, M. and Smith, G. M., A simple and efficient route to  $\beta$ -substituted pyrroles. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 4901-4904.





Réactifs et conditions : (d) voir Tableau 4.

**Schéma 11 : Essais de déprotection du composé 11**

De nombreux essais ont été réalisés pour ôter le groupement tosyle (Tableau 4) mais, de façon surprenante, aucun ne s'est avéré concluant. La quantité de pyrrole déprotégé s'est toujours révélée être minoritaire dans le milieu réactionnel.

Expérience	Conditions
1	Aq sat Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeOH, 90°C, 20 h. <sup>152</sup>
2	TBAF.3H <sub>2</sub> O, THF, 70 °C, 24 h. <sup>153</sup>
3	HOBt.H <sub>2</sub> O, THF, 25 °C, 24 h. <sup>154</sup>
4	NaOH 6M, dioxane, 25 °C, 24 h. <sup>151</sup>
5	Ac <sub>2</sub> O/Pyridine, THF, 25 °C, 24 h. <sup>155</sup>
6	Mg, MeOH/THF, 25 °C, 24 h. <sup>152</sup>
7	NaOH, propan-2-ol, 25 °C, 24 h. <sup>149</sup>
8	KOH, EtOH, 100 °C, 24 h
9	NaOH 6N, MeOH, 70 °C, 5 h

**Tableau 4 : Essais de déprotection du composé 11**

iii. Synthèse du pyrrole 12 à partir du pyrrole 5 protégé par le groupement boc

La stratégie de protection par le groupement tosyle n'ayant pas fonctionné, une autre stratégie a été essayée en utilisant le groupe protecteur Boc (Schéma 12).

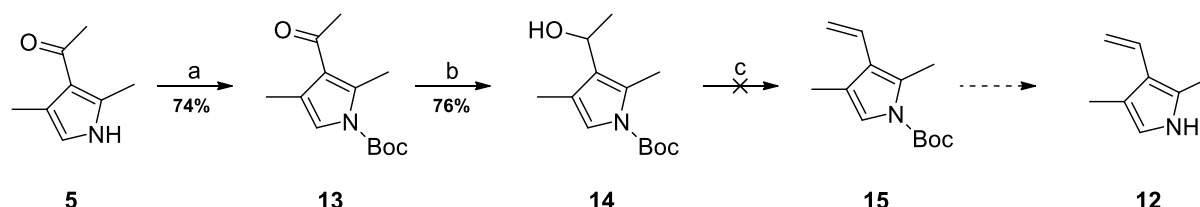
<sup>152</sup>Noland, W. E. and Lanzatella, N. P., Access to indoles via Diels-Alder reactions of 3-vinylpyrroles. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46*, 1285-1295.

<sup>153</sup>Yasuhara, A. and Sakamoto, T., Deprotection of N-sulfonyl nitrogen-heteroaromatics with tetrabutylammonium fluoride. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 595-596.

<sup>154</sup>Kusunoki, M.; Nakagawa, S.; Seo, K.; Hamana, T. *et al.*, A side reaction in solid phase synthesis. Insertion of glycine residues into peptide chains via N<sup>im</sup> → N<sup>a</sup> transfer. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 381-386.

<sup>155</sup>Van der Eijk, J. M.; Nolte, R. J. M. and Zwikker, J. W., A simple and mild method for the removal of the NIm-tosyl protecting group. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 547-548.

A partir de l'intermédiaire **5** obtenu précédemment, l'azote est protégé par le groupement Boc à l'aide d'anhydride de tertibutyloxycarbonyle et de 4-diméthylaminopyridine pour conduire au composé **13**.<sup>156</sup> Le groupement acétyle est ensuite réduit en présence de NaBH<sub>4</sub> pour obtenir l'alcool correspondant **14** avec un rendement de 76%.



Réactifs et conditions : (a) Boc<sub>2</sub>O (1,2 éq.), DMAP (0,2 éq.), ACN, 25 °C, 6 h, 74% ; (b) NaBH<sub>4</sub> (4 éq.), THF/EtOH, 25 °C, 8h, 76% ; (c) voir tableau.

### Schéma 12 : Synthèse du composé 14 et essais de déshydratation

De nombreuses méthodes pour l'étape de déshydratation de l'alcool ont été testées (Tableau 5) mais aucune ne s'est révélée efficace. Il était également plausible d'envisager une déshydratation de l'alcool et une déprotection de l'atome d'azote du pyrrole de manière simultanée en milieu acide.

Expérience	Conditions
<b>1</b>	TFA, DCM, 25 °C, 20 h. <sup>157,158</sup>
<b>2</b>	APTS.H <sub>2</sub> O, THF, 70 °C, 20 h. <sup>159,160</sup>
<b>3</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%, MeOH, 25 °C, 20 h. <sup>161</sup>

**Tableau 5 : Conditions de formation du vinyloxy-pyrrole 15**

<sup>156</sup>Willumstad, T. P.; Haze, O.; Mak, X. Y.; Lam, T. Y. *et al.*, Batch and flow photochemical benzannulations based on the reaction of ynamides and diazo ketones. Application to the synthesis of polycyclic aromatic and heteroaromatic compounds. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11450-11469.

<sup>157</sup>Yang, R. and Qiu, F. G., General entry to aspidosperma alkaloids: enantioselective total synthesis of (-)-aspidophytine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6015-6018.

<sup>158</sup>Grehn, L. and Ragnarsson, U., Novel efficient total synthesis of antiviral antibiotic distamycin A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3492-3497.

<sup>159</sup>Brinkman, H. R.; Landi, J. J.; Paterson, J. B. and Stone, P. J., The Use of p-toluenesulfonic acid for removal of the N-t-butoxy-carbonyl protecting group in solid phase peptide synthesis. *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 459-465.

<sup>160</sup>Sundberg, R. J.; Amat, M. and Fernando, A. M., Analogs of the iboga alkaloids. Synthesis and reactions of (+-)-15-oxo-20-deethylcoronaridine derivatives. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3151-3159.

<sup>161</sup>Houghten, R. A.; Beckman, A. and Ostresh, J. M., Use of 10% sulfuric acid/dioxane for removal of Na-tertiary-butyloxycarbonyl group during solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 653-658.

L'ensemble de ces essais montre que le milieu acide n'est pas adéquat pour cette étape de déshydratation/déprotection. Certains auteurs ont démontré le caractère instable des vinylpyrroles,<sup>162,163</sup> contrairement à d'autres.<sup>149</sup> La formation du composé **12** étant inaccessible par cette voie, la stratégie des groupements protecteurs qui, de plus, ajoute des étapes supplémentaires risquant de dégrader les intermédiaires, a été abandonnée.

### c) *Voie de synthèse 3*

Les nombreux échecs rencontrés précédemment ont montré la difficulté pour isoler une entité monopyrrolique ou une dipyrriine avec le groupement vinyle désiré. Il est donc nécessaire d'introduire ce groupement vinyle d'une autre manière et, pour cela, la réaction de Stille, déjà décrite dans le cadre de synthèse de porphyrines<sup>164</sup>, des indoles<sup>165</sup> et des pyrroles<sup>166</sup> a été envisagée. Une voie de synthèse possible a donc été imaginée utilisant la réaction de Stille comme étape ultime (Schéma 13). Dans cette optique, il est nécessaire de synthétiser la dipyrriine iodée **19**, qui est issue du couplage entre le pyrrole formylé **4** et l'acide 4-iodo-3,5-diméthylpyrrole **18**.

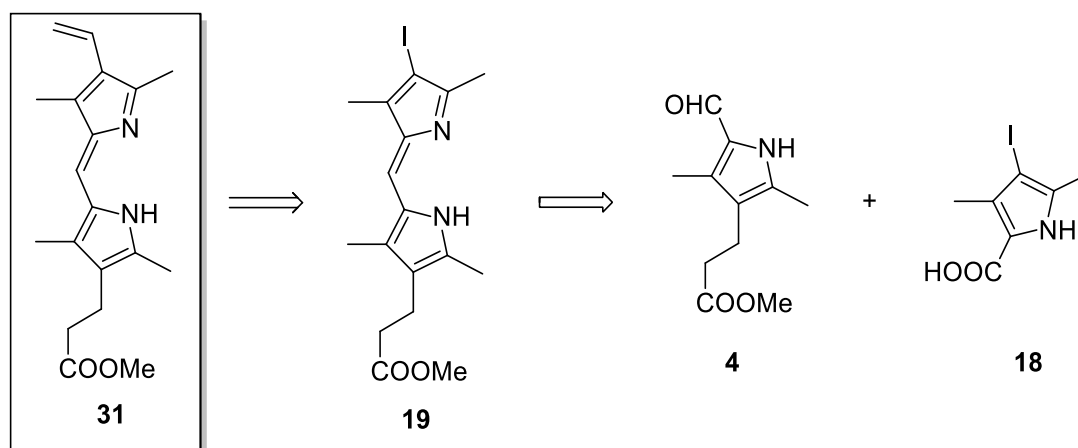


Schéma 13 : Schéma rétrosynthétique avec réaction de Stille

Le nouveau précurseur avant couplage est donc l'acide 4-iodo-3,5-diméthylpyrrole **18**. Pour l'obtenir, la pentane-2,4-dione est mise en réaction tout d'abord avec l'aminomalonate d'éthyle (Schéma 14)

<sup>162</sup>Hosmane, R. S.; Hiremath, S. P. and Schneller, S. W., Synthesis of indoles and carbazoles: Diels-Alder reactions of nitrovinyl-pyrroles and -benzindoles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1973**, 2450-2453.

<sup>163</sup>Jones, R. A.; Marriott, M. T. P.; Rosenthal, W. P. and Sepulveda Arques, J., Pyrrole studies. 22. [4.p. + 2.p.] Cycloaddition reactions with vinylpyrroles. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4515-4519.

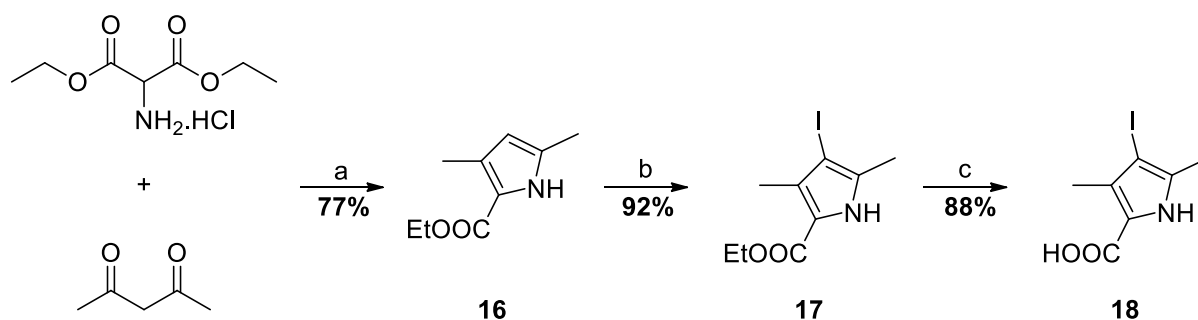
<sup>164</sup>Okabe, T.; Kuzuhara, D.; Suzuki, M.; Aratani, N. *et al.*, Synthesis and electrochemical properties of porphycene-diketopyrrolopyrrole conjugates. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3508-3511.

<sup>165</sup>Malapel-Andrieu, B. and Mérour, J.-Y., Synthesis and reactivity of substituted 3-((Trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-1H-indole-2-carboxylate in palladium-catalyzed reactions. *Tetrahedron.* **1998**, *54*, 11079-11094.

<sup>166</sup>Wang, J. and Scott, A. I., An efficient synthesis of 3-vinylpyrroles by Stille coupling reaction of 3-iodopyrroles with vinyltributyltin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7043-7046.

pour former le 3,5-diméthylpyrrole-2-carboxylate d'éthyle **16** avec 77% de rendement.<sup>167</sup> L'iodation de la position 4 résiduelle est ensuite effectuée avec du *N*-chlorosuccinimide (NCS) et de l'iodure de sodium dans le DMF pendant 6 heures à température ambiante.<sup>168</sup> Le composé iodé **17** est obtenu avec un rendement de 92%. Un essai avait également été entrepris pour la formation du composé **17** en présence de peroxyde d'hydrogène et d'iodure de potassium dans un mélange éthanol/eau à reflux, mais sans succès.<sup>169</sup>

La saponification de l'ester est ensuite effectuée avec de la lithine dans un mélange 50/50 EtOH/H<sub>2</sub>O à 90 °C pendant 6 h pour former le composé **18** avec un rendement de 88%.



Réactifs et conditions : (a) AcONa (1,2 éq.), AcOH, 110 °C, 2 h, 77% ; (b) NCS (1,2 éq.), NaI (1,2 éq.), DMF, 25 °C, 6 h, 92% ; (c) LiOH (8 éq.), EtOH/H<sub>2</sub>O, 90 °C, 6 h, 88%.

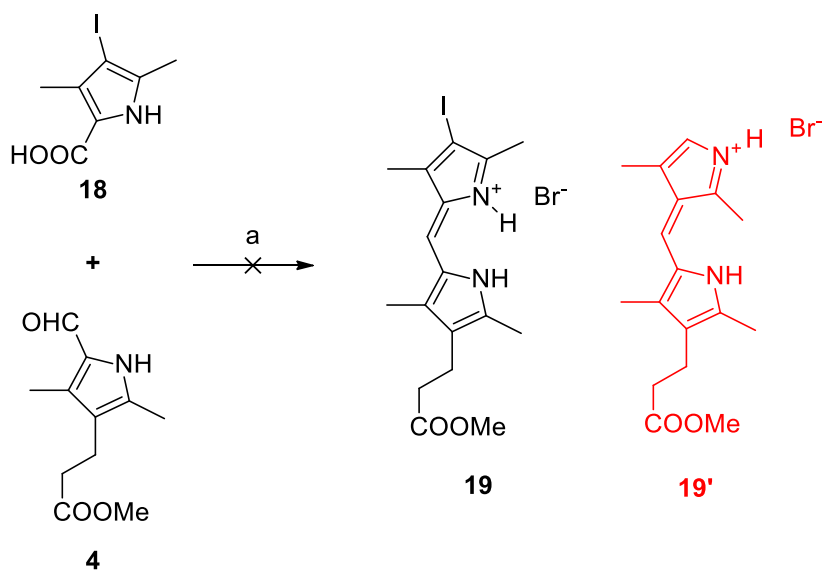
#### Schéma 14 : Synthèse du composé **18**

Le couplage entre le pyrrole formylé **4** et le dérivé iodé **18** n'a pas donné lieu à la formation du composé attendu **19** mais à celle de la dipyrrole **19'** par couplage *via* l'atome d'iode (Schéma 15).

<sup>167</sup>Boiadjev, S. E. and Lightner, D. A., Atropisomerism in monopyrroles. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2002**, *13*, 1721-1732.

<sup>168</sup>Poriel, C.; Lachia, M.; Wilson, C.; Davies, J. R. *et al.*, Oxidative rearrangement of indoles: a new approach to the EFHG-tetracyclic core of diazonamide A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2978-2987.

<sup>169</sup>Boiadjev, S. E. and Lightner, D. A., Novel benzoic acid congeners of bilirubin. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7591-7604.

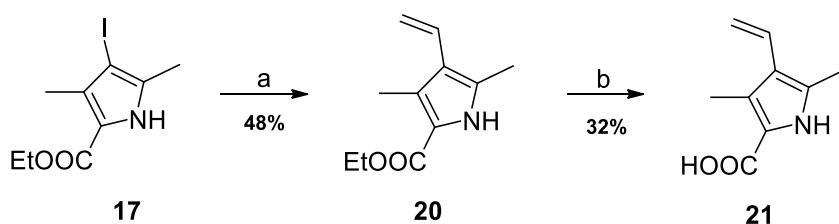


Réactifs et conditions : (a) HBr 33% dans l'acide acétique (8 éq.), MeOH, 1 h, 25 °C, 30%.

**Schéma 15 : Essai de condensation des précurseurs 4 et 18**

Suite à ce nouvel échec, la réaction de Stille a été effectuée avant le couplage entre les deux pyrroles pour obtenir le précurseur vinylnpyrrole **21** (Schéma 16).

A partir du composé iodé **17**, la réaction de Stille a été effectuée en présence de vinyltributylétain et de Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub> dans le toluène à 110 °C pendant 2 heures.<sup>166</sup> Le vinylnpyrrole **20** est obtenu avec un rendement de 48%. La saponification de l'ester est réalisée comme précédemment avec de la lithine pour donner le composé désiré **21** avec un rendement faible de 32%.



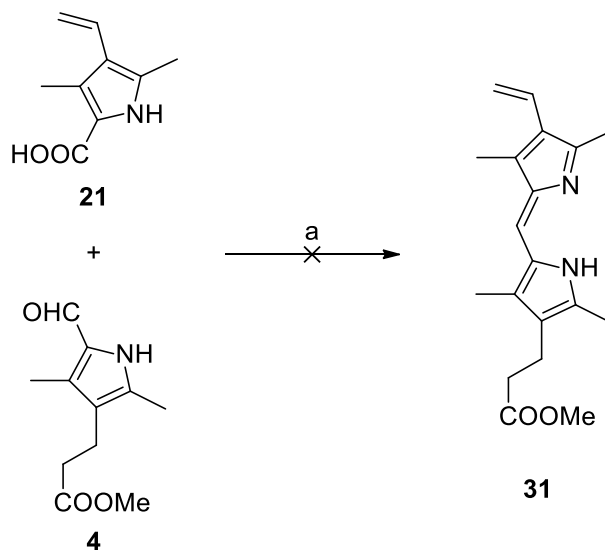
Réactifs et conditions : (a) Vinyltributylétain (2 éq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,05 éq.), toluène, 110 °C, 2 h, 48% ; (b) LiOH (8 éq.), EtOH/H<sub>2</sub>O, 1 h, 90 °C, 32%.

**Schéma 16 : Synthèse du composé 21 par réaction de Stille**

Lors du traitement de la saponification, il est impératif de ne pas acidifier la solution en dessous de pH 5. En effet, à pH fortement acide, la solution devient rouge et une dégradation totale du produit

est observée. Ceci montre une nouvelle fois le problème de stabilité des vinylpyrroles en milieu acide.

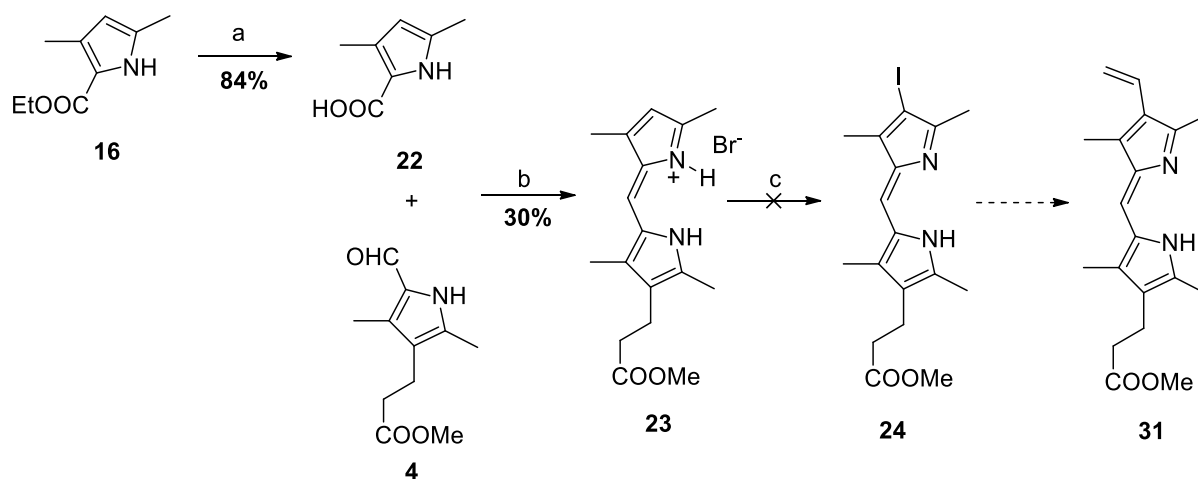
Le couplage des précurseurs **4** et **21** a ensuite été réalisé dans les conditions standard de formation des dipyrroles, mais une fois de plus sans succès due à la dégradation du vinylpyrrole **21** (Schéma 17).



Réactifs et conditions : (a) HBr 33% dans l'acide acétique (8 éq.), MeOH, 1 h, 25 °C.

#### Schéma 17 : Essai de synthèse du composé **31** par couplage des précurseurs **4** et **21**

Cette instabilité nous a amené à envisager l'introduction du motif vinyle en fin de synthèse pour éviter toute dégradation (Schéma 18). L'acide **22** est obtenu par hydrolyse de l'ester **16** en présence de lithine avec un rendement de 84% (Schéma 18). Ce dernier est ensuite mis en réaction avec le composé **4** dans les conditions standards de formation des dipyrroles pour former le composé **23**. La tentative d'iodation de la position 3 résiduelle en présence de NCS/Nal a été un échec et ne nous a pas permis de poursuivre cette voie de synthèse.

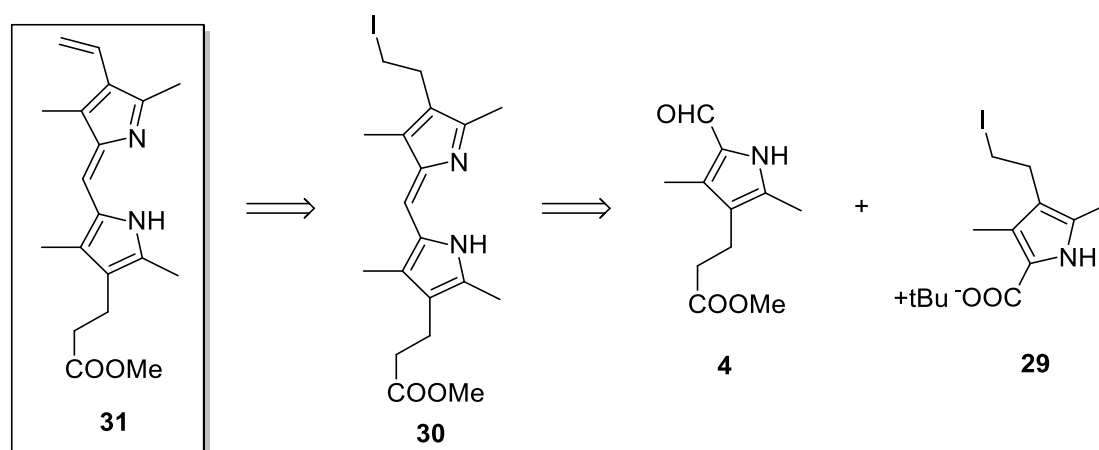


Réactifs et conditions : (a) LiOH (8 éq.), EtOH/H<sub>2</sub>O, 90 °C, 84% ; (b) HBr 33% dans l'acide acétique (8 éq.), MeOH, 1 h, 25 °C, 30% ; (c) NCS (1,2 éq.), NaI (1,2 éq.), DMF, 25 °C, 6 h.

**Schéma 18 : Essai de synthèse du composé 31 par réaction de Stille finale**

d) **Voie de synthèse 4**

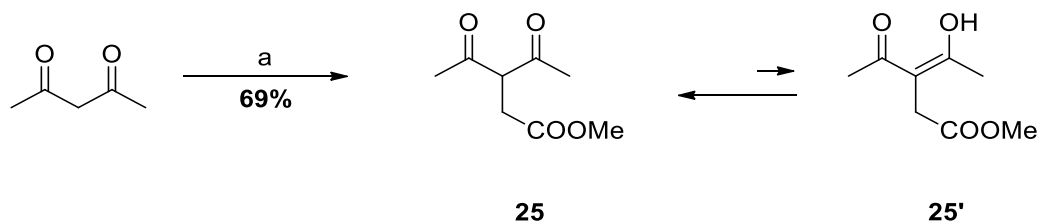
La dernière voie de synthèse repose sur l'élaboration finale du groupement vinyloxy par déshydroiodation de la dipyrrole **30**, issue du couplage entre le pyrrole formylé **4** et le 3-(2-iodoéthyl)-2,4-diméthylpyrrole **29** (Schéma 19).



**Schéma 19: Analyse rétrosynthétique de la voie 4**

Afin de synthétiser le dérivé iodé **30**, il est nécessaire de former les deux précurseurs du pyrrole, **25** (Schéma 20) et **26** (Schéma 21). La pentanedione commerciale est mise en réaction avec le bromoacétate de méthyle en présence d'hydruide de sodium dans le tétrahydrofurane, pendant 20 heures à température ambiante, pour donner le dérivé tricarbonylé **25** avec un rendement de

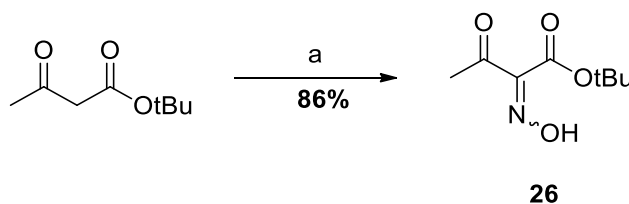
69%.<sup>170</sup> Ce composé est en équilibre avec la forme cétoénolique **25'** avec un ratio **25/25'** de 70:30 en solution dans le chloroforme.



Réactifs et conditions : (a) Bromoacétate de méthyle (1,2 éq.), NaH (1,2 éq.), THF, 25 °C, 20 h, 69%.

### Schéma 20 : Synthèse du tricarboxylé **25**

En parallèle, l'oxime **26** est synthétisée à partir de l'acétoacétate de tertibutyle avec un rendement de 86% (Schéma 21).<sup>171</sup>



Réactifs et conditions : (a) NaNO<sub>2</sub> (1,6 éq.), AcOH, 5 °C, 3 h, 86%.

### Schéma 21 : Synthèse de l'oxime **26**

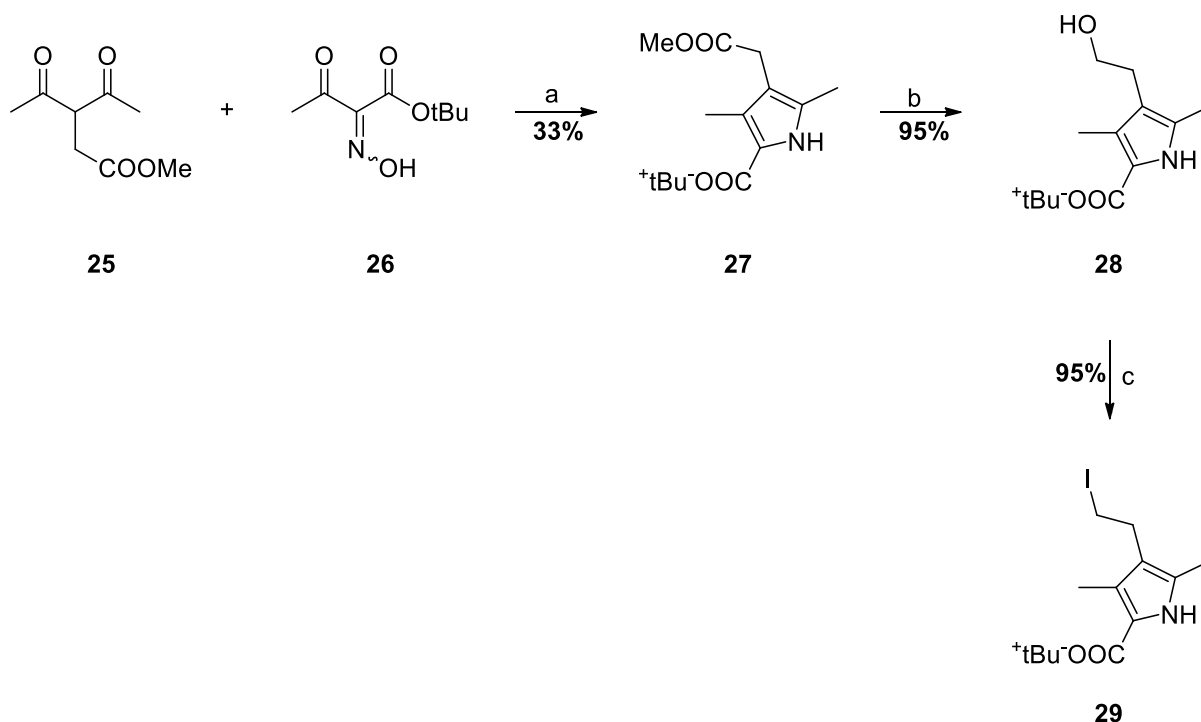
Ces deux précurseurs **25** et **26** sont alors engagés dans une réaction de Kleinspehn pour former le pyrrole **27** (Schéma 22). L'ester méthylique du composé **27** est ensuite réduit avec un complexe de borane dans le tétrahydrofurane à température ambiante pendant 20 heures pour donner l'alcool **28** correspondant avec un rendement de 95%. Finalement, ce dernier est transformé en dérivé iodé **29** en présence de triphénylphosphine, d'imidazole et d'iode dans le dichlorométhane pendant 20 heures, avec 95% de rendement.<sup>172</sup>

<sup>170</sup> Masakazu Tanaka, M.; Takahashi, M.; Sakamoto, E.; Imai, M.; Matsui, A.; Fujio, M.; Funakoshi, K.; Sakai, K. and Suemune, H. Enantio- and diastereoselective construction of 4,9-dimethylspiro[4.4]nonane-2,7-dione using Rh-catalyzed asymmetric cyclization. *Tetrahedron*. **2001**, *57*, 1197-1204.

<sup>171</sup> Wang, J-Q; Kathy D. Miller, K.D.; Sledge, G.W. and Zheng, Q.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4380-4384.

<sup>172</sup> Smith, S. M. and Takacs, J. M., Amide-directed catalytic asymmetric hydroboration of trisubstituted alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1740-1741.





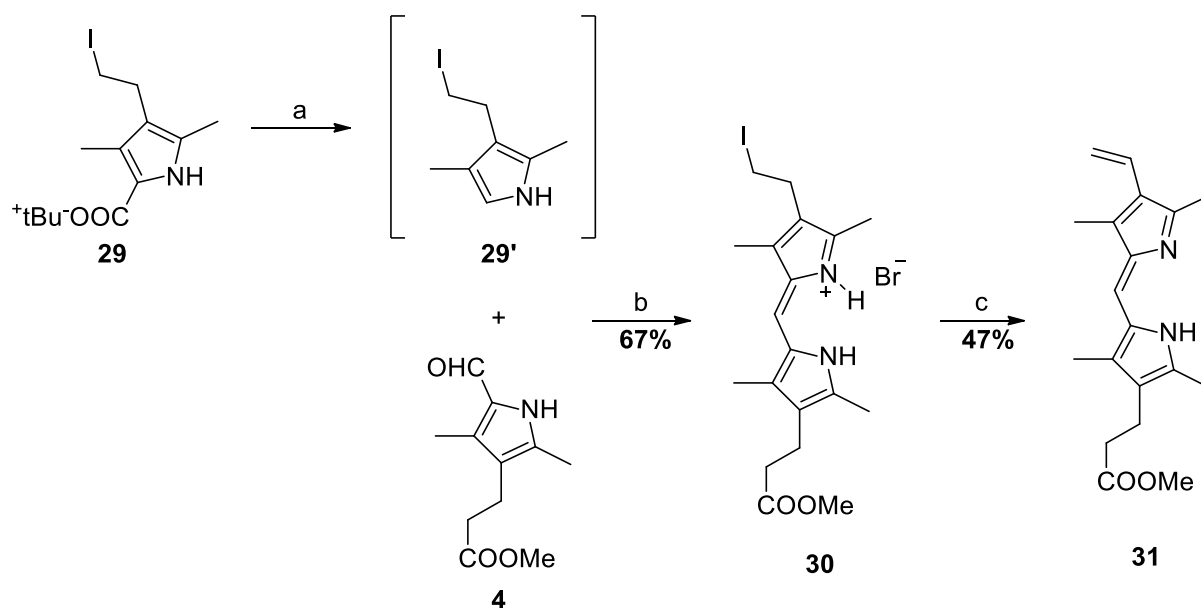
Réactifs et conditions : (a) acétate de sodium (2,5 éq.), Zn (6 éq.), AcOH, 50 °C, 3 h, 33% ; (b) BH<sub>3</sub>.THF (6 éq.), THF, 25 °C, 20 h, 95% ; (c) PPh<sub>3</sub> (2 éq.), Imidazole (2 éq.), I<sub>2</sub> (2 éq.), DCM, 25 °C, 20 h, 95%.

### Schéma 22 : Synthèse du composé 29

Pour effectuer le couplage des précurseurs, le composé **29** est premièrement mis en solution dans l'acide trifluoroacétique pour déprotéger le groupement acide et obtenir le composé décarboxylé correspondant **29'** *in situ* (Schéma 23). Le pyrrole formylé **4**, dissous dans le méthanol, est ensuite ajouté suivi d'une solution d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique.<sup>173</sup> Le bromhydrate de la dipyrrole iodée **30** est obtenue sous forme d'un solide orange avec un rendement de 63%. Le composé désiré **31** est enfin synthétisé avec un rendement de 47% à partir du composé **30** par déshydroiodation à l'aide de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU).<sup>174</sup>

<sup>173</sup>Lash, T. D.; Mani, U. N.; Keck, A.-S. I. M. and Jones, M. A., Normal and abnormal heme biosynthesis. 6. Synthesis and metabolism of a series of monovinylporphyrinogens related to harderoporphyrinogen. Further insights into the oxidative decarboxylation of porphyrinogen substrates by coproporphyrinogen oxidase. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3183-3192.

<sup>174</sup>Barco, A.; Baricordi, N.; Benetti, S.; De Risi, C. *et al.*, A new enantiodivergent synthesis of the Geissman–Waiss lactone. *Tetrahedron.* **2007**, *63*, 4278-4283.



Réactifs et conditions : (a) TFA (44 éq.), 25 °C, 30 min ; (b) HBr 33% dans l'acide acétique (8 éq.), MeOH, 25 °C, 1 h, 67% ; (c) DBU (2,5 éq.), DCM, 25 °C, 20 h, 47%.

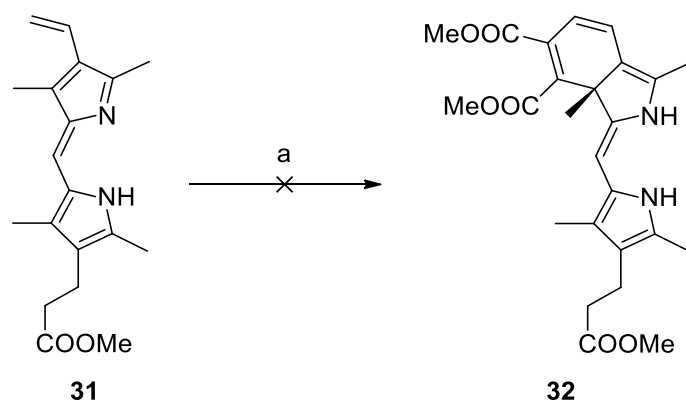
### Schéma 23 : Synthèse du composé 31 par déshydroiodation finale

#### C. Synthèse du composé 32 par réaction de Diels Alder

L'étape permettant d'obtenir le composé 32, correspondant à la partie « ouest » de la Vertéporfine, est une réaction de Diels Alder sur le composé 31.

Le premier essai pour cette réaction a été réalisé dans des conditions standard avec de l'acétylènedicarboxylate de méthyle (DMAD) dans le toluène à 110 °C pendant une heure (Schéma 24).<sup>175</sup> Cependant, une dégradation totale du produit a été observée (Tableau 6, expérience 1).

<sup>175</sup>Li, G.; Graham, A.; Chen, Y.; Dobhal, M. P. et al., Synthesis, comparative photosensitizing efficacy, human serum albumin (site II) binding ability, and intracellular localization characteristics of novel benzobacteriochlorins derived from vic-dihydroxybacteriochlorins. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5349-5359.



Réactifs et conditions : (a) DMAD (10 éq.), toluène, 110 °C, 1 h.

#### Schéma 24 : Essais de synthèse du composé 32 par réaction de Diels Alder

Le point d'ébullition du toluène étant certainement trop haut et provoquant la dégradation de la dipyrrole, la même réaction a été testée dans le dichlorométhane. Cependant, une dégradation partielle au bout de 30 minutes et une dégradation totale, sans formation du produit, après une heure ont été observées.

Diminuer le nombre d'équivalents de DMAD, la température ou le temps de réaction n'ont pas permis d'obtenir le produit attendu.

Expérience	Conditions	Observations
1	DMAD (10 éq.), toluène, 110°C, 1h	Dégradation observée au bout de 1h
2	DMAD (10 éq.), DCM, 50°C, 1h	Dégradation observée au bout de 30 min
3	DMAD (1,2 éq.), DCM, 50 °C, 1 h	Dégradation observée au bout de 1h
4	DMAD (1,2 éq.), DCM, 25 °C, 20 h	Aucun changement
5	DMAD (1,2 éq.), DCM, 30 °C, 3 h	Dégradation observée au bout de 3h

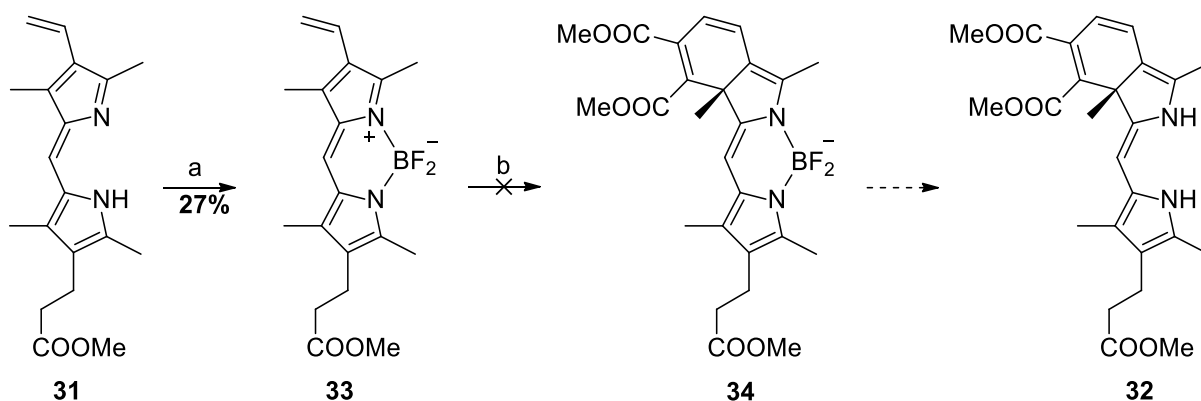
**Tableau 6 : Conditions de la réaction de Diels Alder**

Ces différents tests montrent que le composé **31** est trop fragile pour subir une réaction de Diels Alder, nécessitant une température élevée.

a) **Stratégie BODIPY**

La dipyrriane **31** étant instable à températures élevées, nous avons opté pour une stratégie BODIPY permettant de faire un pontage entre les deux azotes pour stabiliser la molécule (Schéma 25). Les dérivés BODIPY (pour BOron DIPYrrométhène) sont des dérivés du 4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène.

Le composé **31** est mis en solution en présence de triéthylamine et de  $\text{BF}_3$  étherate dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 3 heures.<sup>176</sup> Le composé BODIPY **33** est obtenu avec un rendement faible de 27%. La réaction de Diels Alder a ensuite été testée tout d'abord dans le dichlorométhane à température ambiante puis à 50 °C mais aucune dégradation ni formation du produit désiré n'a été observée. C'est pourquoi, un nouvel essai dans le toluène à 110 °C a été effectué. Aucune dégradation n'a été constatée mais aucune formation de la molécule cible non plus. Le dérivé BODIPY **33** est maintenant trop inerte (même à chaud) vis-à-vis du diméthylacétylènedicarboxylate de méthyle pour former le composé souhaité **32**.



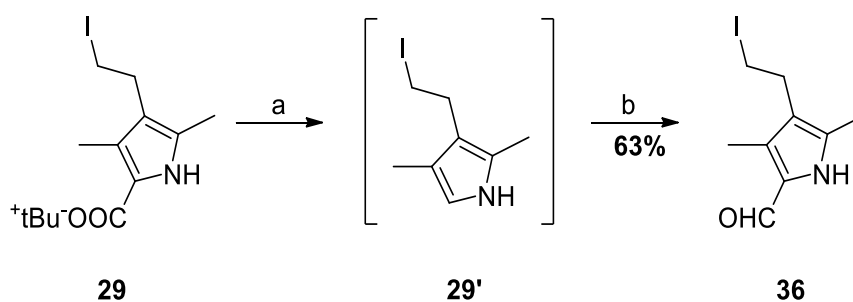
Réactifs et conditions : (a)  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  (10 éq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (10 éq.), DCM, 25 °C, 3 h, 27% ; (b) DMAD (1.2 éq.), toluène, 110 °C, 1 h.

**Schéma 25 : Essai de synthèse du composé 32 par la stratégie BODIPY**

Etant donné les difficultés nombreuses rencontrées et le temps passé sur la synthèse du composé **32**, nous avons alors décidé de stopper nos efforts, quant à l'obtention de cette benzodipyrriane et ceci d'autant plus que les tests biologiques n'avaient pas montré de différences significatives entre la Vertéporfine et le diester méthylique de la Protoporphyrine IX.

<sup>176</sup>Loudet, A. and Burgess, K., BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

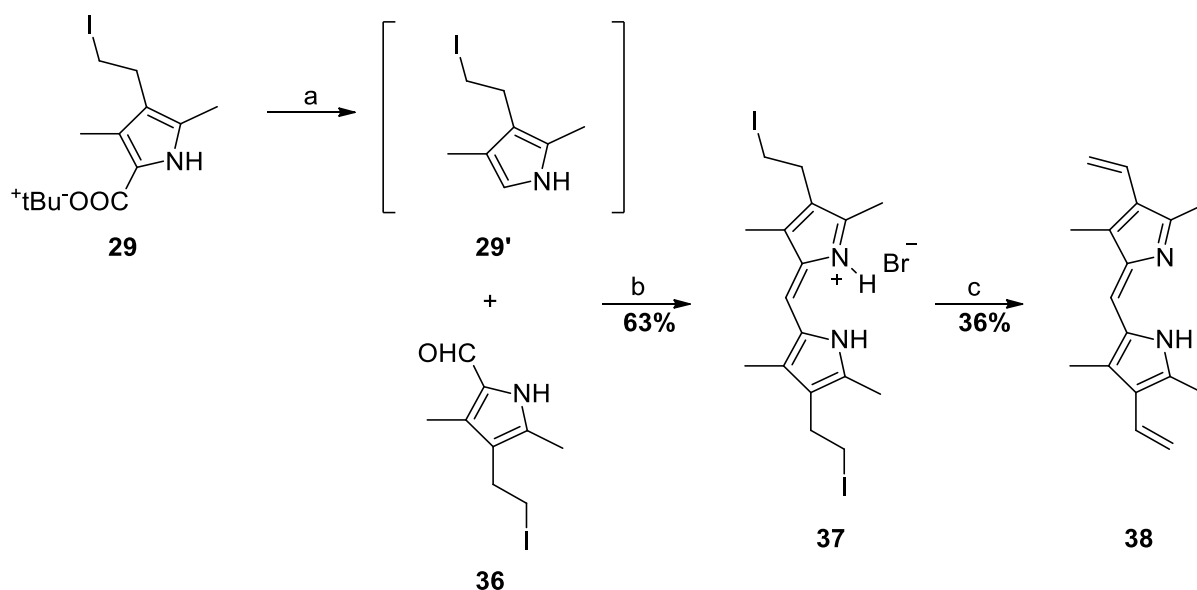




Réactifs et conditions : (a) TFA (9 éq.), DCM, 40°C, 30 min ; (b) HC(OMe)<sub>3</sub> (5 éq.), DCM, 0 °C, 5 h, 63%.

**Schéma 27 : Synthèse du composé 36**

Les deux pyrroles **29** et **36** sont alors couplés en présence de HBr 33% dans l'acide acétique. La dipyrrole diiodée formée **37** est ensuite mise en réaction avec le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène pour aboutir à la divinylodipyrrole **38** avec un rendement de 36% (Schéma 28).

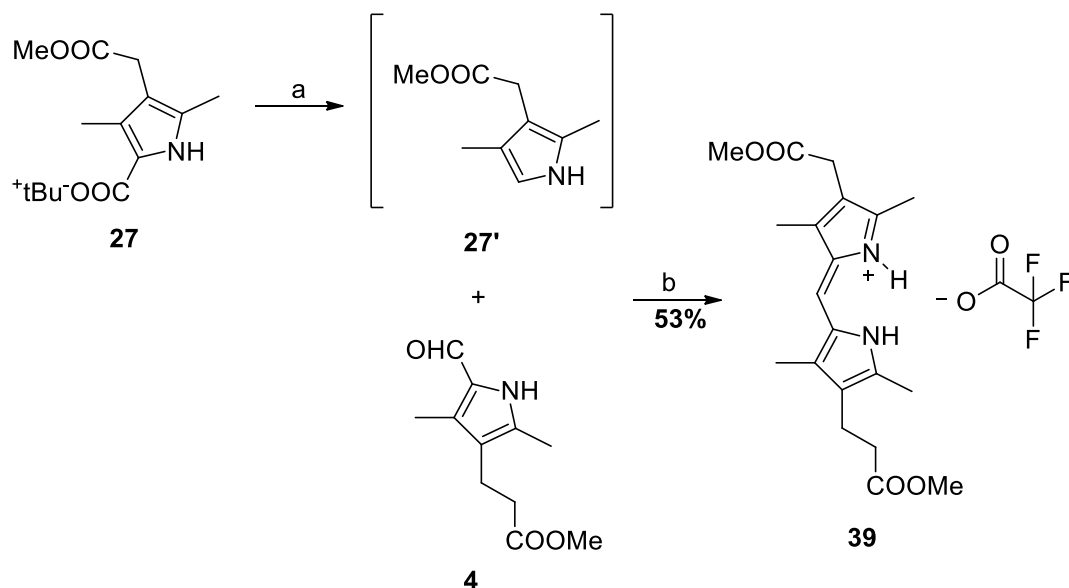


Réactifs et conditions : (a) TFA (44 éq.), 25 °C, 30 min ; (b) HBr 33% dans l'acide acétique (8 éq.), MeOH, 1 h, 25 °C, 63% ; (c) DBU (4 éq.), DCM, 20 h, 25 °C, 36%.

**Schéma 28 : Synthèse du composé 38**

Une dipyrrole dissymétrique **39** a enfin été élaborée (Schéma 29). Les conditions habituelles de couplage, c'est-à-dire avec ajout de HBr 33% dans l'acide acétique, n'ont pas permis d'isoler la molécule **39** sous forme de bromhydrate. L'acide bromhydrique est alors remplacé par de l'acide

trifluoroacétique et le composé **27**, décarboxylé en présence de TFA est mis en réaction avec le composé **4** dans le méthanol pendant une heure à température ambiante. Le sel de TFA **39** est obtenu avec un rendement de 53% après purification.



Réactifs et conditions : (a) TFA (44 éq.), MeOH, 25 °C, 1 h ; (b) MeOH, 1 h, 25 °C, 53%.

**Schéma 29 : Synthèse du composé 39**

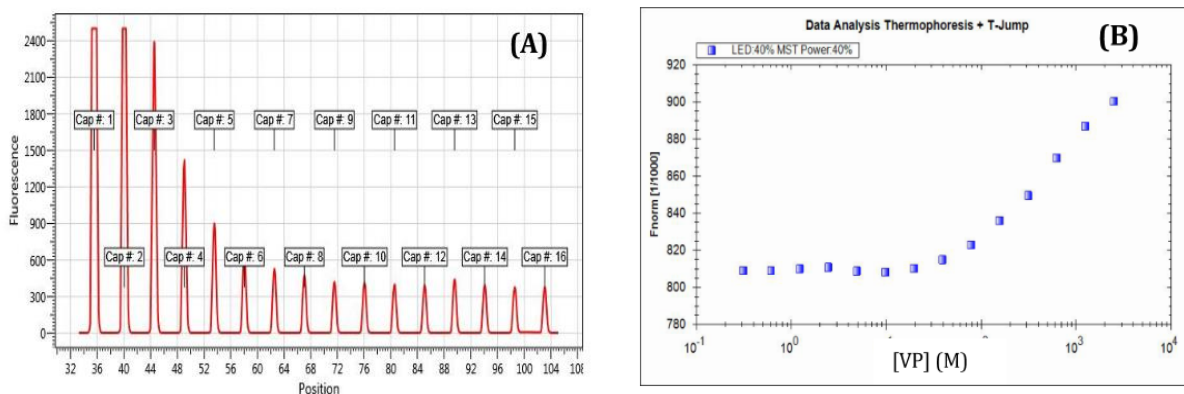
### III. Evaluation

#### A. Résultats physico-chimiques

*Liu-Chittenden* et ses collaborateurs ont caractérisé la Vertéporfine comme ligand préférentiel de la protéine YAP capable d'inhiber son interaction avec hTEAD4<sub>1-434</sub>. Cependant, à ce jour, aucune interaction entre YAP et VP n'a été mesurée.

En SPR, après avoir immobilisé la protéine YAP<sub>50-102</sub> sur lame CM5, une gamme de concentrations de VP a été injectée. Cependant, compte tenu de sa solubilité dans le tampon utilisé, les concentrations élevées n'ont pas pu être atteintes (> 50 μM) et n'ont pas permis de déterminer une affinité.

En MST, la protéine YAP<sub>50-102</sub> a été marquée et une gamme de concentrations en VP a été évaluée.



**Figure 53 : Mesure de fluorescence de la VP**

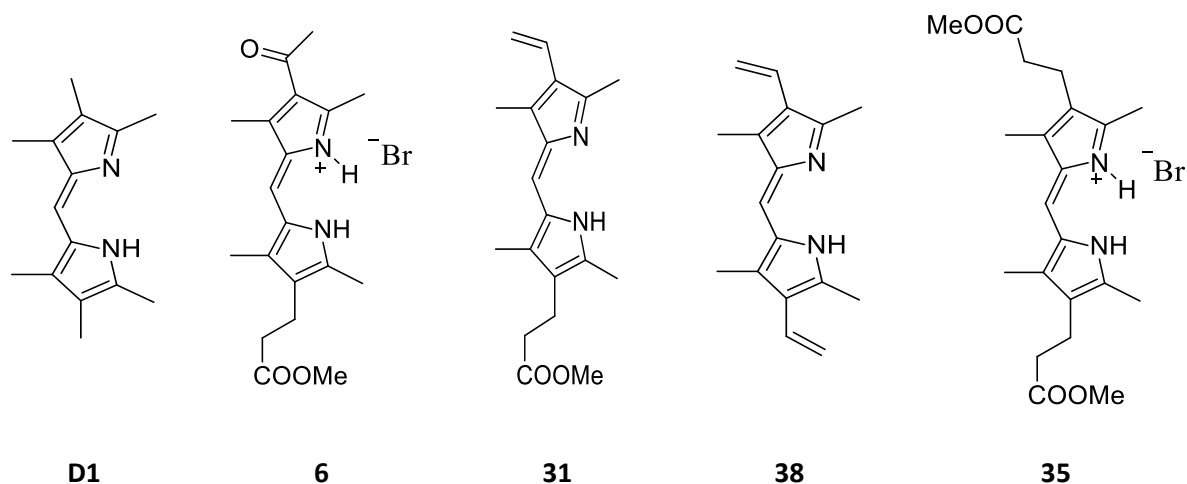
Cependant la fluorescence intrinsèque de la VP rend les courbes de thermophorèse inexploitable (Figure 53). Afin de mettre à profit cette fluorescence naturelle, une étude d'interaction YAP-VP a été effectuée en utilisant la VP comme molécule fluorescente afin de suivre l'interaction. Cependant, la fluorescence de VP n'était pas suffisante pour avoir un signal utilisable.

## B. Résultats biologiques

Les propriétés biologiques des différentes porphyrines (VP, PPIX et PPIX DME) et dipyrroles (Tableau 7), ont ensuite été évaluées sur des cellules MDA-MB-231 du cancer du sein. Nous avons inclus dans cette étude la dipyrrole commerciale hexaméthylée **D1** à titre de comparaison. Cette lignée cancéreuse MDA-MB-231 a été sélectionnée pour les tests car elle exprime de manière similaire les protéines YAP et TAZ, et présente une forte activité transcriptionnelle de TEAD.<sup>17</sup> L'évaluation biologique se déroule en 2 tests distincts :

- la mesure de l'activité transcriptionnelle de TEAD grâce au gène rapporteur de la luciférase.
- la mesure de l'expression des gènes cibles (*Cyr61*, *Axl*, *CTGF*) de l'interaction YAP (ou TAZ)/TEAD (quantification des ARNs correspondants par RT-qPCR ou des protéines correspondantes par Western Blot).

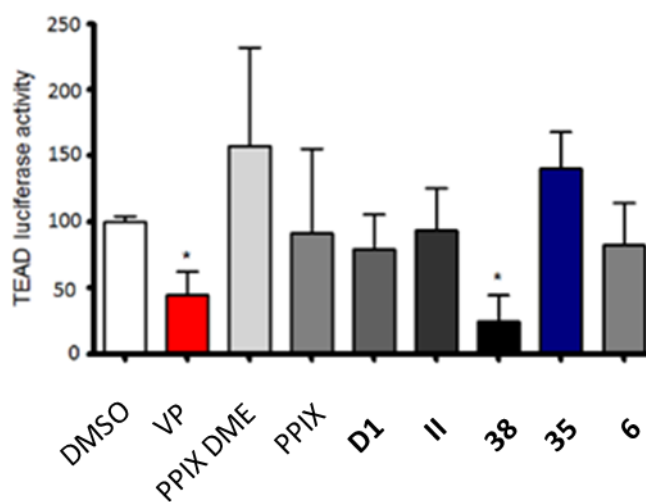




**Tableau 7 : Dipyrrines testées**

Le test TEAD luciférase permet de mesurer la capacité de la Vertéporfine, des protoporphyrines et des dipyrrines synthétisées à inhiber l'activité TEAD (Figure 54). A une concentration de 10  $\mu$ M, la VP inhibe l'activité TEAD de 50% alors que les protoporphyrines et dipyrrines n'ont pas d'effet significatif excepté la dipyrrine **38** qui diminue l'activité TEAD avec une activité biologique similaire à VP.

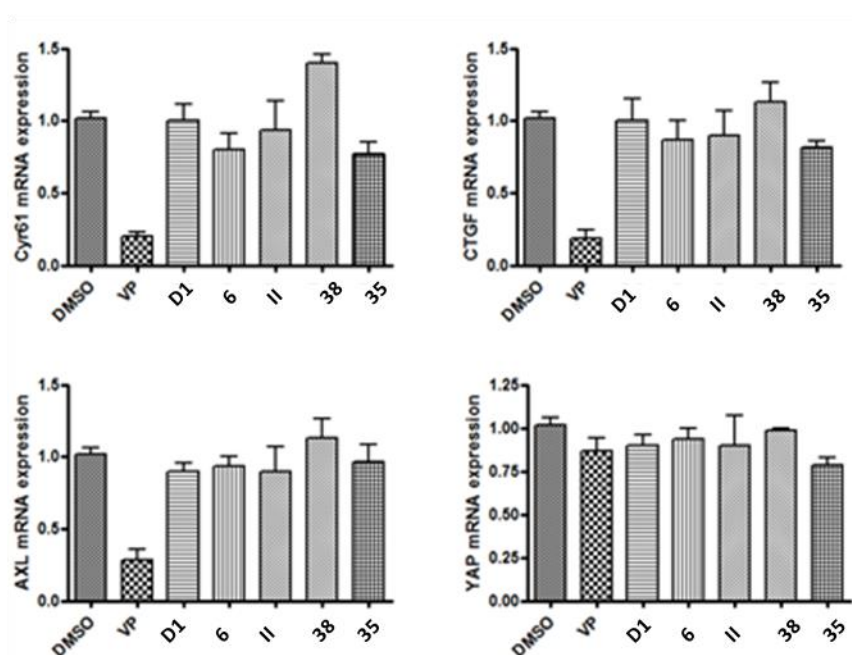
Comparativement aux résultats de *Liu-Chittenden*<sup>95</sup> obtenus sur cellules HEK293, nous ne retrouvons pas l'activité inhibitrice de la Protoporphyrine IX. Ce résultat pourrait être dû à des différences dans les lignées cellulaires ou aux protocoles expérimentaux (délai entre transfection et incubation avec le composé, temps d'incubation, concentration en sérum de veau fœtal...).



**Figure 54 : Inhibition de l'interaction YAP/TAZ-TEAD par les porphyrines et dipyrrines**

L'effet inhibiteur de toutes les molécules a ensuite été évalué sur l'expression des différents gènes cibles des complexes YAP(TAZ)/TEAD (Figure 55). Nous avons mesuré les ARNm des gènes par RT-qPCR et les protéines par Western blot.

La Vertéporfine affecte significativement l'expression des ARNm des différents gènes cibles contrairement aux dipyrroles étudiées sans diminuer l'expression de YAP.



**Figure 55 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de YAP et des gènes cibles de TEAD sur cellules MDA-MB-231 traitées sur 24h**

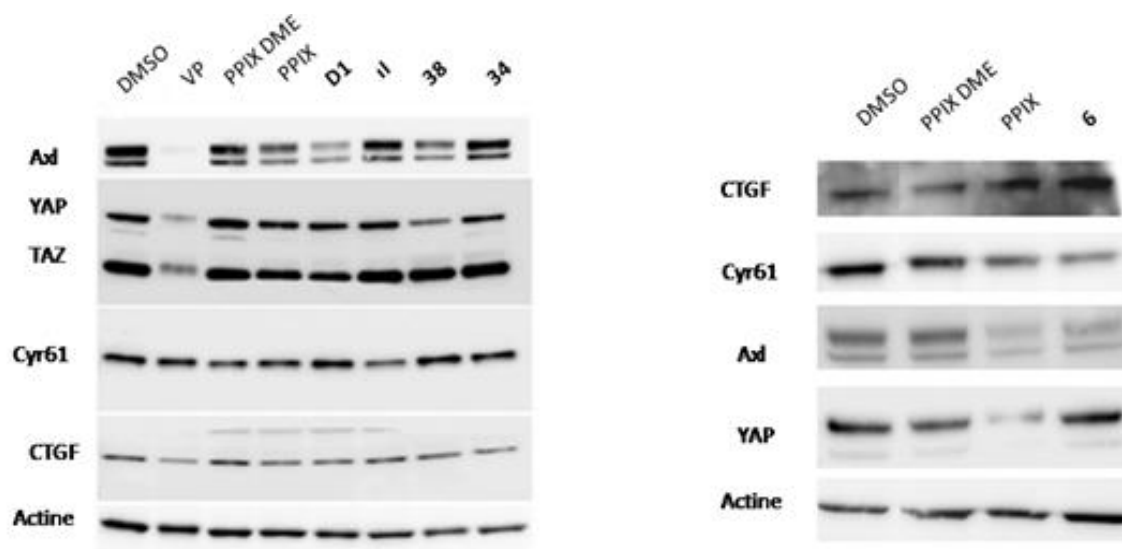
En western blot (Figure 56), l'expression des protéines *CTGF* et *Axl* est particulièrement affectée par la VP ainsi que YAP et TAZ, ce qui peut être dû à la photosensibilité de la VP induisant une protéotoxicité.<sup>177,137</sup>

Les porphyrines PPIX et PPIX DME confirment l'absence d'activité sur l'interaction YAP/TEAD par une faible inhibition de l'expression des protéines cibles. Ce résultat peut être corrélé avec leur faible protéotoxicité.

Parmi les différentes dipyrroles, seule la dipyrrole **38** inhibe modestement mais sélectivement l'expression l'un des gènes cibles du complexe YAP(TAZ)/TEAD, la tyrosine kinase *Axl*. Cependant, une diminution est également à noter au niveau de l'expression de la protéine YAP (sélectivité par rapport à TAZ), traduisant ainsi un mécanisme différent. En effet, cette observation montre que

<sup>177</sup>Donohue, E.; Tovey, A.; Vogl, A.W.; Arns, S.; Sternberg, E.; Young, R.N.; Roberge, M. Inhibition of autophagosome formation by the benzoporphyrin derivative verteporfin. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7290-7300.

l'inhibition de l'interaction YAP-TEAD n'est pas liée au fait que la dipyrriane **38** soit un ligand de YAP, mais bien qu'elle joue un rôle sur une voie de signalisation exprimant la protéine YAP.



**Figure 56 : Analyse de l'expression des protéines par Western Blot**

Pour conclure, aucune relation structure-activité n'a pu être déterminée afin de comprendre le mode d'action de la VP. Cependant en comparant les résultats obtenus pour VP et PPIX, il apparaît que le cycle cyclohexadiénique de la VP est un élément majeur dans l'activité biologique des porphyrines. L'activité sur la voie Hippo de la Vertéporfine ne semble pas liée à sa capacité à cibler le complexe YAP(TAZ)-TEAD comme initialement décrit par *Liu-Chittenden*. Il a été clairement démontré que la Vertéporfine se concentrait dans la mitochondrie de la cellule<sup>132,178,179</sup> qu'elle présentait un caractère protéotoxique prononcée<sup>177,137</sup> et plus récemment qu'elle induisait la séquestration cytoplasmique de YAP en induisant l'augmentation de la concentration de la protéine 14-3-3.<sup>180</sup>

<sup>178</sup>Peng, T.I.; Chang, C.J.; Guo, M.J.; Wang, Y.H.; Yu, J.S.; Wu, H.Y.; Jou, M.J. Mitochondrion-targeted photosensitizer enhances the photodynamic effect-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2005**, *1042*, 419-428.

<sup>179</sup>Belzacq, A.S.; Jacotot, E.; Vieira, H.L.A.; Mistro, D.; Granville, D.J.; Xie, Z.; Reed, J.C.; Kroemer, G.; Brenner, C. Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin: identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1260–1264.

<sup>180</sup>Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 $\sigma$  sequestering YAP in the cytoplasm. Wang, C. ; Zhu, X.; Feng, W. ; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B. *Am. J. Cancer Res.*, **2015**, *6*, 27-37.

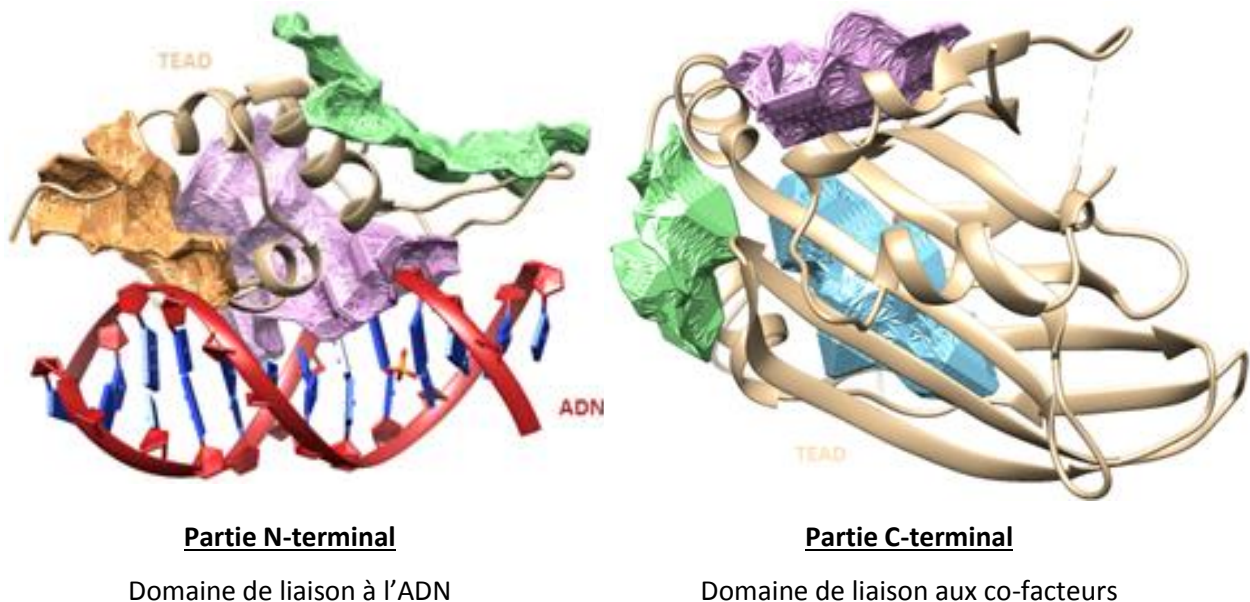
# **CHAPITRE 5 :**

## **CIBLER LA PROTEINE TEAD**

La seconde stratégie d'inhibition de la voie Hippo envisagée à consister à cibler le facteur de transcription TEAD. A la différence de la protéine YAP, les protéines TEADs présentent un caractère fortement structuré, qui rend la conception d'inhibiteurs pertinente et laisse présager de bonnes sélectivités de liaison et d'activités.

### ***I. Conception par modélisation moléculaire***

La conception d'inhibiteurs nécessite de bien connaître la structure et les interactions mises en jeu dans le complexe étudié. Dans cette optique, une analyse détaillée a été faite sur la protéine TEAD visant à prédire les poches susceptibles d'accueillir une molécule capable d'établir un maximum d'interaction (Figure 57). Les cavités dites « druggable » ont été déterminées par modélisation moléculaire grâce au logiciel Cavity® en se basant sur la structure de la protéine TEAD issue du complexe hYAP<sub>50-171</sub>-hTEAD<sub>1209-426</sub> (PBD 3KYS).<sup>66</sup>



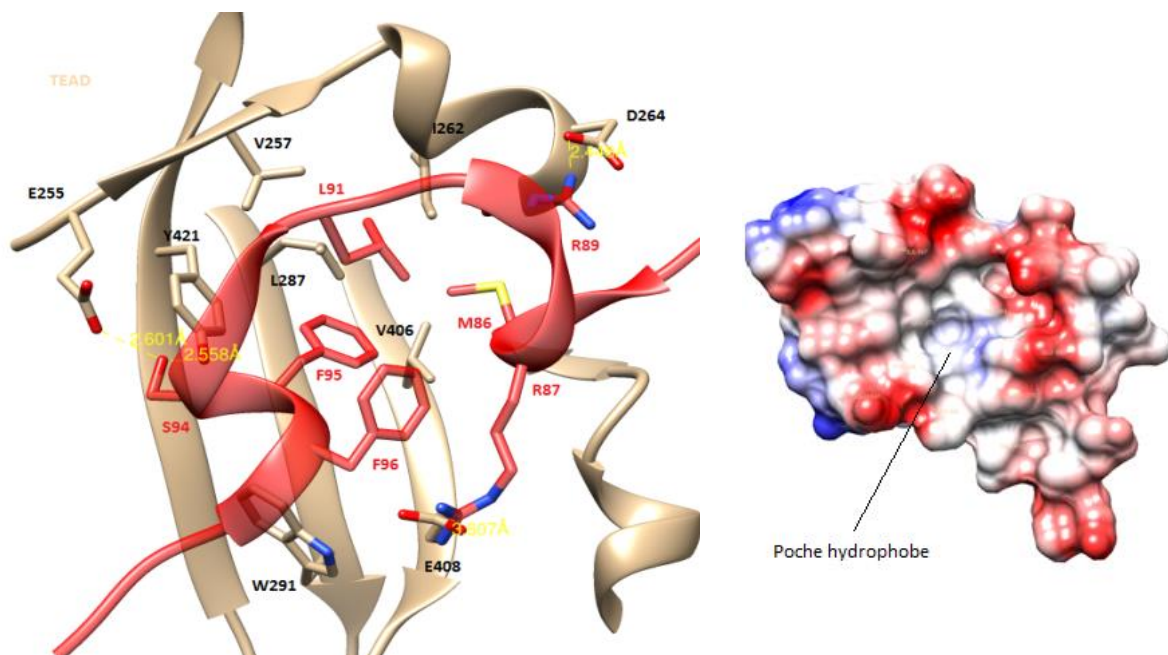
**Figure 57 : Cavités dites "druggable" de TEAD**

Du côté N-terminal, c'est-à-dire au niveau du domaine de liaison à l'ADN, 3 poches ont été détectées avec une forte probabilité pour celle qui entre en contact avec l'ADN (Figure 57A). Bien que cette approche soit intéressante pour développer des inhibiteurs du complexe YAP-TEAD, elle n'a pas été exploitée dans le cadre du projet. En effet, au démarrage de cette thèse, les données cristallographiques concernant la partie N-terminal et son interaction avec un fragment d'ADN n'étaient pas connues. Cette piste pourrait cependant être approfondie dans le futur.

L'analyse de la partie C-terminal de TEAD, définie comme le domaine de liaison aux co-facteurs, met en évidence 3 cavités représentant les interfaces 2 (vert) et 3 (violet) des complexes

YAP/TAZ-TEAD étudiés précédemment, ainsi que la poche occupée par l'acide palmitique (bleu) (Figure 57B). Bien que cette dernière poche s'avère être la plus prometteuse, le palmitate est considéré comme favorisant le repliement et l'activité de la protéine TEAD.<sup>56</sup> La découverte de cette cavité date de 2016, soit après le démarrage de notre projet mais laisse la possibilité de développer des agonistes et antagonistes de l'interaction YAP-TEAD. De plus, les récentes approches thérapeutiques apparues dans la littérature visant ces 3 cavités permettent de confirmer le modèle obtenu par ordinateur. Enfin, si les acides aminés de TEAD impliqués dans les interfaces 2 et 3 sont hautement conservés, il existe des différences structurales dans la poche palmitate qui laisse présager la possibilité de cibler sélectivement TEAD1, TEAD3 et TEAD2/4.

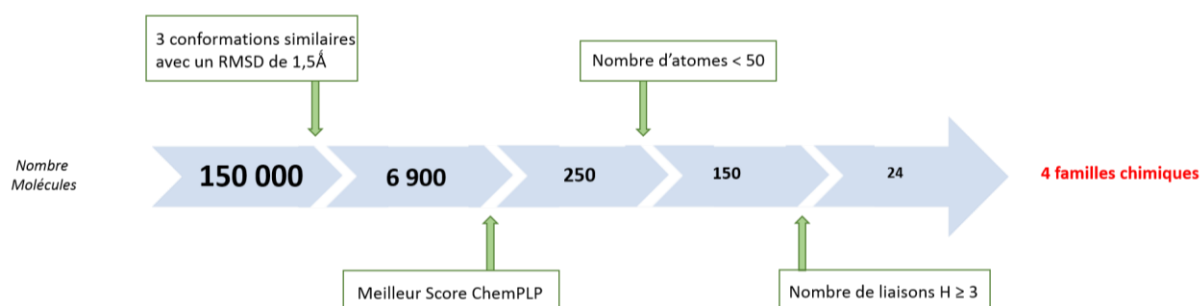
Bien qu'il existe plus de 15 structures cristallographiques de la protéine TEAD, toutes présentent la même superposition de la partie C-terminal et laissent entrevoir 3 interfaces de liaison avec la protéine YAP. La structure cristallographique de hTEAD1<sub>194-411</sub>-hYAP1<sub>50-171</sub> (PDB 3KYS) a été sélectionnée pour effectuer un criblage virtuel de molécules visant à cibler la protéine TEAD. L'interface 3, essentielle dans l'interaction YAP-TEAD, a été choisie pour identifier des inhibiteurs potentiels du complexe protéique ciblant spécifiquement la poche hydrophobe occupée par la boucle  $\Omega$  de YAP (Figure 58).



**Figure 58 : Représentation de l'interface 3<sup>66</sup>**

Pour le criblage virtuel, le site de liaison préférentiel a été défini comme une sphère centrée sur la Lys<sub>289</sub> de TEAD4 au niveau de l'interface 3. Son rayon a été fixé à 12Å afin d'inclure les acides

aminés clé de l'interaction identifiés par mutagenèse dirigée.<sup>66</sup> Un sous-ensemble de la base de données ZINC rassemblant environ 750 000 composés choisis pour leur non toxicité et leur plausibilité « inhibiteurs d'interaction protéine-protéine »<sup>181</sup> a été sélectionné. Un premier criblage virtuel de 150 000 composés a été effectué par le Dr Amaury Farce (U995, Université de Lille) (Schéma 30). Les différents composés ont été « dockés » dans la poche hydrophobe de TEAD à l'aide du logiciel GOLD®, avec un nombre maximal de 100 000 opérations par composé et de 10 poses finales, mais avec une terminaison anticipée arrêtant le calcul si 3 poses étaient générées avec un facteur RMSD (Root-Mean-Square Deviation) de 1,5Å.



**Schéma 30 : Schéma récapitulatif des étapes du criblage virtuel**

Le premier filtre consistait à rejeter tout composé n'ayant pas convergé sur le critère de terminaison anticipée établi précédemment. Par la suite, le meilleur score ChemPLP de chaque molécule a été retenu. Un ensemble de 250 composés a été choisi parmi les 6 900 passant par le seuil de terminaison précoce, en utilisant les différents critères individuellement.

Troisièmement, le nombre de liaisons hydrogène formé avec les résidus du site de liaison ( $\geq 3$ ) et la taille des molécules (maximum 50 atomes) ont été pris en compte. Pour finir, une inspection visuelle comme sélection ultime a permis d'éliminer les molécules pour lesquelles l'ajustement avec la cavité ou la structure chimique était moins intéressants pour des modulations structurales ultérieures. Parmi les 24 molécules satisfaisants tous les critères de sélection, certaines furent rejetées par manque d'originalité ou pour risque de toxicité et les autres furent répertoriées en 4 familles chimiques différentes.

<sup>181</sup>Labbé, C. M.; Laconde, G.; Kuenemann, M. A.; Villoutreix, B. O.; Sperandio, O. IPPI-DB: A Manually Curated and Interactive Database of Small Non-Peptide Inhibitors of Protein-protein Interactions. *Drug Discov. Today*. **2013**, *18* (19–20), 958–968.

## II. Validation du hit

Un composé représentant chaque famille a été sélectionné dans le but d'évaluer les paramètres biophysiques et cellulaires et déterminer le type de molécules susceptibles de proposer un inhibiteur du complexe YAP-TEAD, ligand de TEAD (Figure 59).

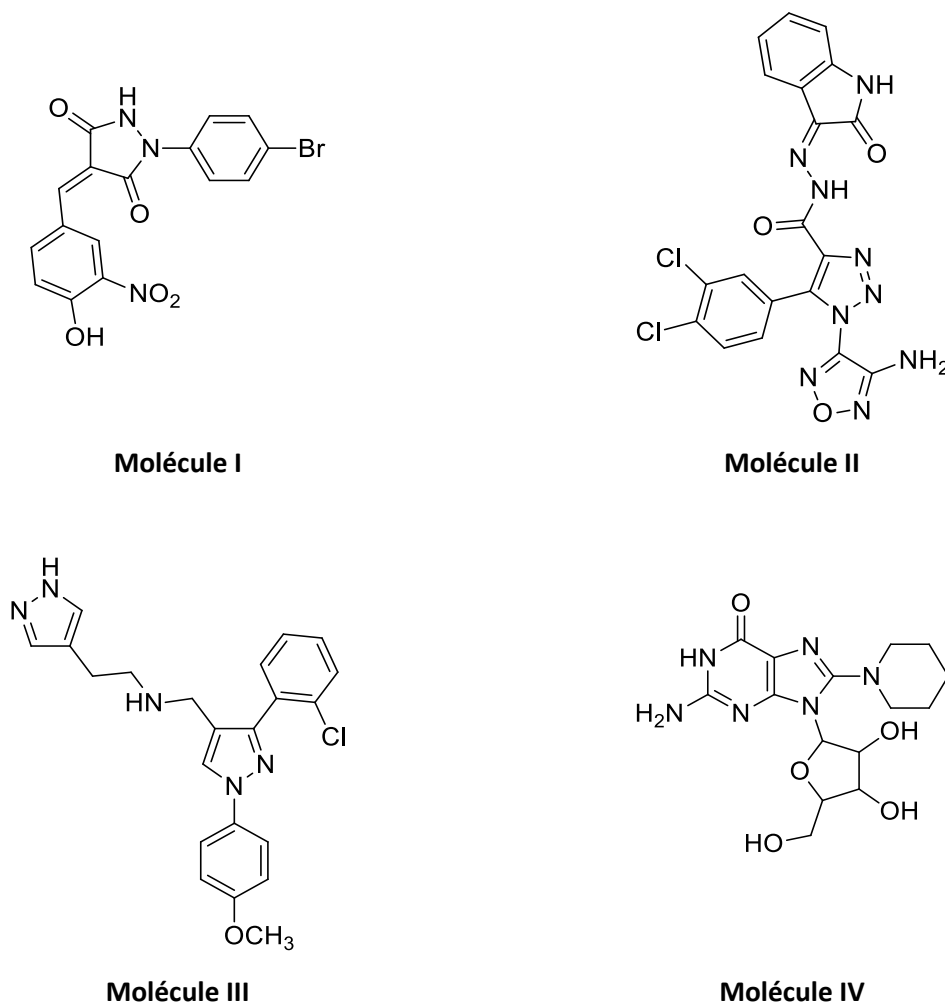
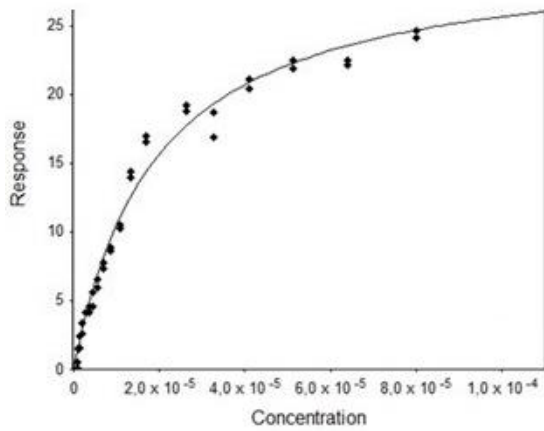


Figure 59 : Structures des 4 molécules sélectionnées

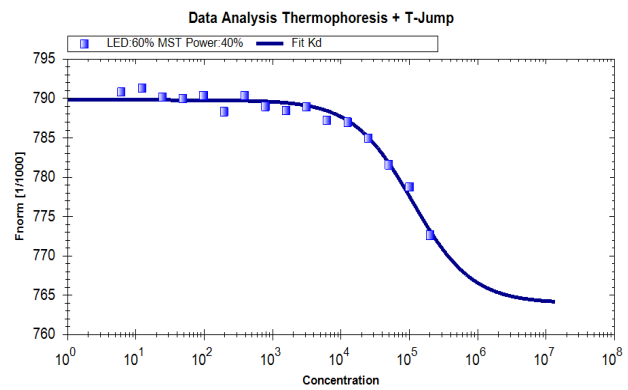
Dans un premier temps, l'affinité des 4 composés envers la protéine hTEAD4<sub>1-434</sub> a été mesurée par SPR et MST (Figure 60). En SPR, alors que les composés I, III et IV ne parviennent pas à saturer la surface de la lame même à haute concentration, la molécule II interagit avec la protéine d'intérêt avec une constante de dissociation de 3,4  $\mu\text{M}$ . En revanche en MST, l'affinité mesurée est de 247  $\mu\text{M}$ , soit 100 fois supérieure à celle obtenue par SPR. La présence d'aggrégats de la protéine hTEAD4<sub>1-434</sub> oblige la centrifugation des échantillons de la gamme ce qui crée un culot où se retrouve la fraction de composé insoluble, faussant ainsi la concentration initiale. Ce problème de solubilité



rend difficile l'accès aux hautes concentrations pour atteindre le second palier pour les deux méthodes.



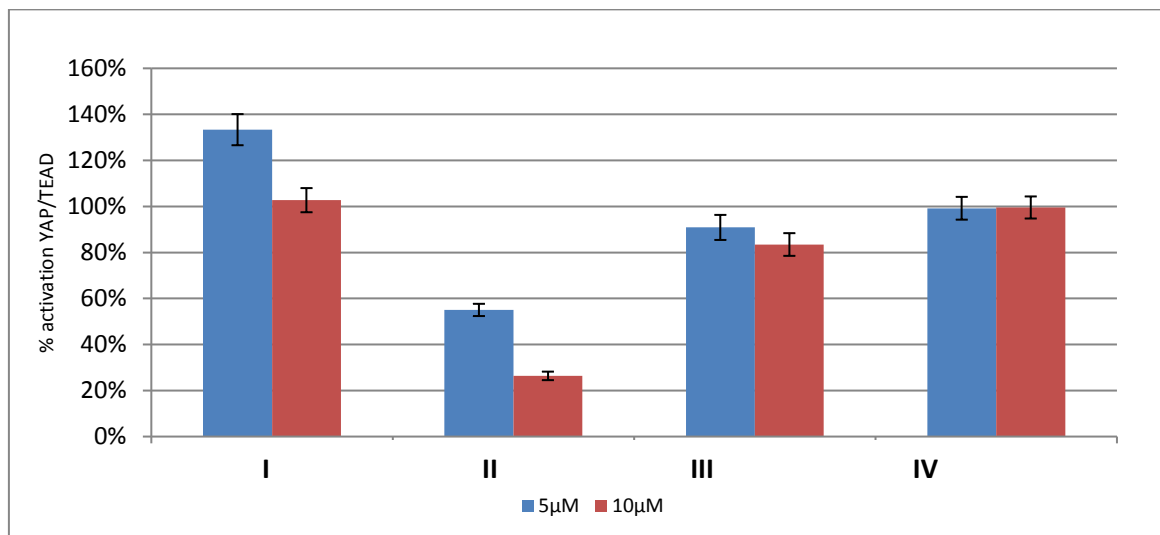
Courbe de réponse obtenue par SPR



Courbe de réponse obtenue par MST

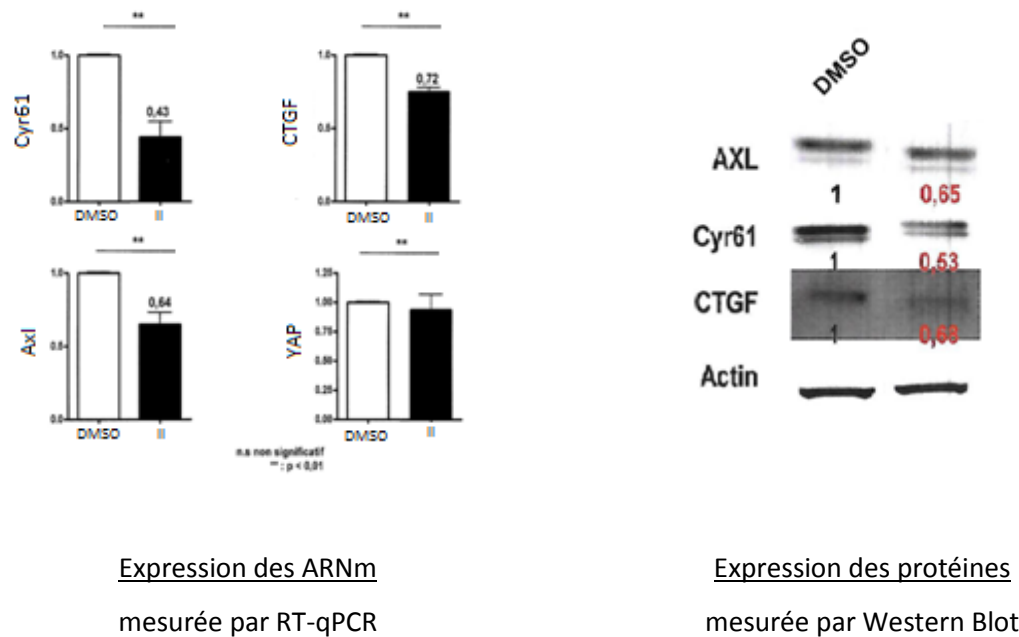
**Figure 60 : Courbes de réponses de la molécule II**

En parallèle, la capacité des molécules à activer le complexe YAP-TEAD a été mesurée sur cellule HEK293 grâce au gène rapporteur de la luciférase (Figure 61). Alors que la molécule I semble renforcer l'interaction entre les deux protéines, l'effet des molécules III et IV reste insignifiant. En revanche, avec une activation de 55% à 5  $\mu$ M, nettement diminuée à 26% à 10  $\mu$ M, la molécule II apparait comme un inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD et vient confirmer les résultats obtenus précédemment.



**Figure 61 : Pourcentage d'activation du complexe YAP-TEAD induit par les molécules I-IV**

Des études plus approfondies ont alors été faites sur la molécule II visant à mesurer son activité sur la lignée cancéreuse HCT-116 (cancer du côlon). Avec une diminution de l'expression des protéines cibles du complexe YAP-TEAD (*CTGF*, *Cyr61*, *Axl*) (Figure 62B) d'environ 40%, la molécule II confirme son statut d'inhibiteur de l'interaction. Ce résultat est également validé par la réduction de l'expression des ARNm des mêmes gènes cibles sans affecter pour autant la protéine YAP (Figure 62A).



**Figure 62 : Résultats biologiques de la molécule II sur cellules HCT-116**

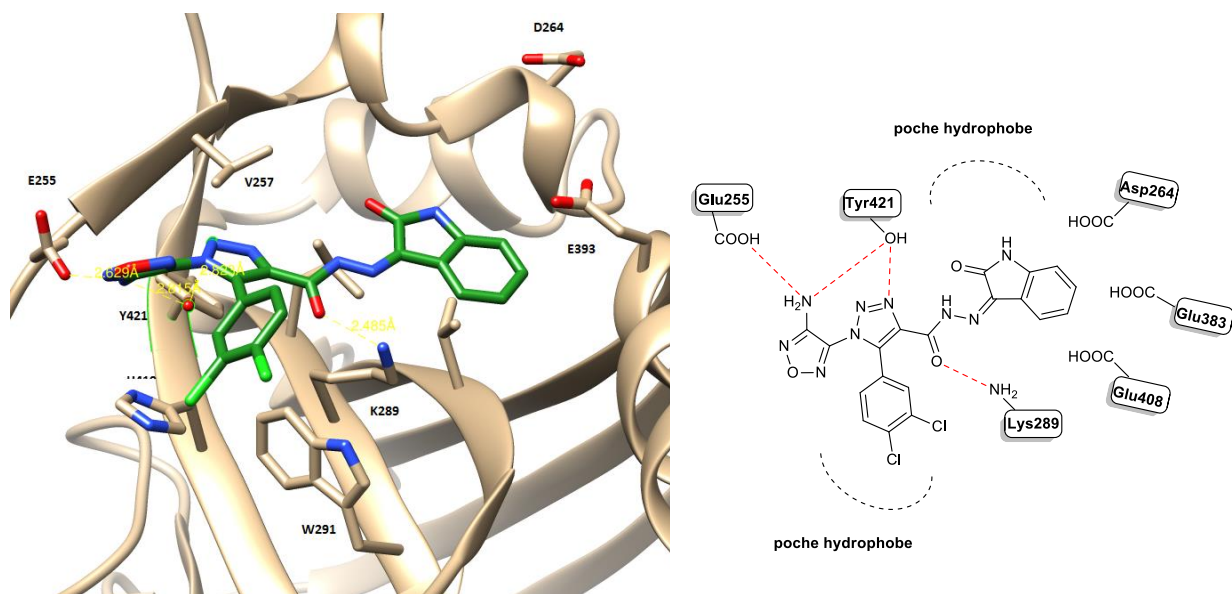
Notre travail de recherche s'est donc porté sur la molécule II qui, d'une part, présente un effet inhibiteur prometteur, et d'autre part, offre une possibilité de diversité structurale intéressante.

### III. Conception des ligands de TEAD

#### A. Positionnement de la molécule II dans la poche de TEAD

Afin d'éclaircir le mode d'action de la molécule II et estimer les interactions mises en jeu avec la protéine, son positionnement au sein de l'interface 3 a été examiné.

La molécule **II** s'insère au sein de la poche hydrophobe de TEAD par le biais de 4 liaisons hydrogène (Figure 63). L'interaction principale entre les deux partenaires repose sur une liaison hydrogène à double empreinte entre Tyr<sub>421</sub> avec un atome d'azote du triazole et l'amine primaire de l'oxadiazole de la molécule. Cette dernière semble également interagir avec Glu<sub>255</sub>. Une dernière liaison hydrogène est à noter entre la fonction carbonyle et Lys<sub>289</sub>. Bien que ce ne soit clairement pas la force motrice de l'interaction, une interaction moindre et difficile à prédire peut résulter d'une interaction hydrophobe de type « stacking » entre le dichlorobenzène et les acides aminés His<sub>419</sub> et Trp<sub>291</sub>. Cependant, cette cage hydrophobe oriente certainement le positionnement de la molécule dans la poche.



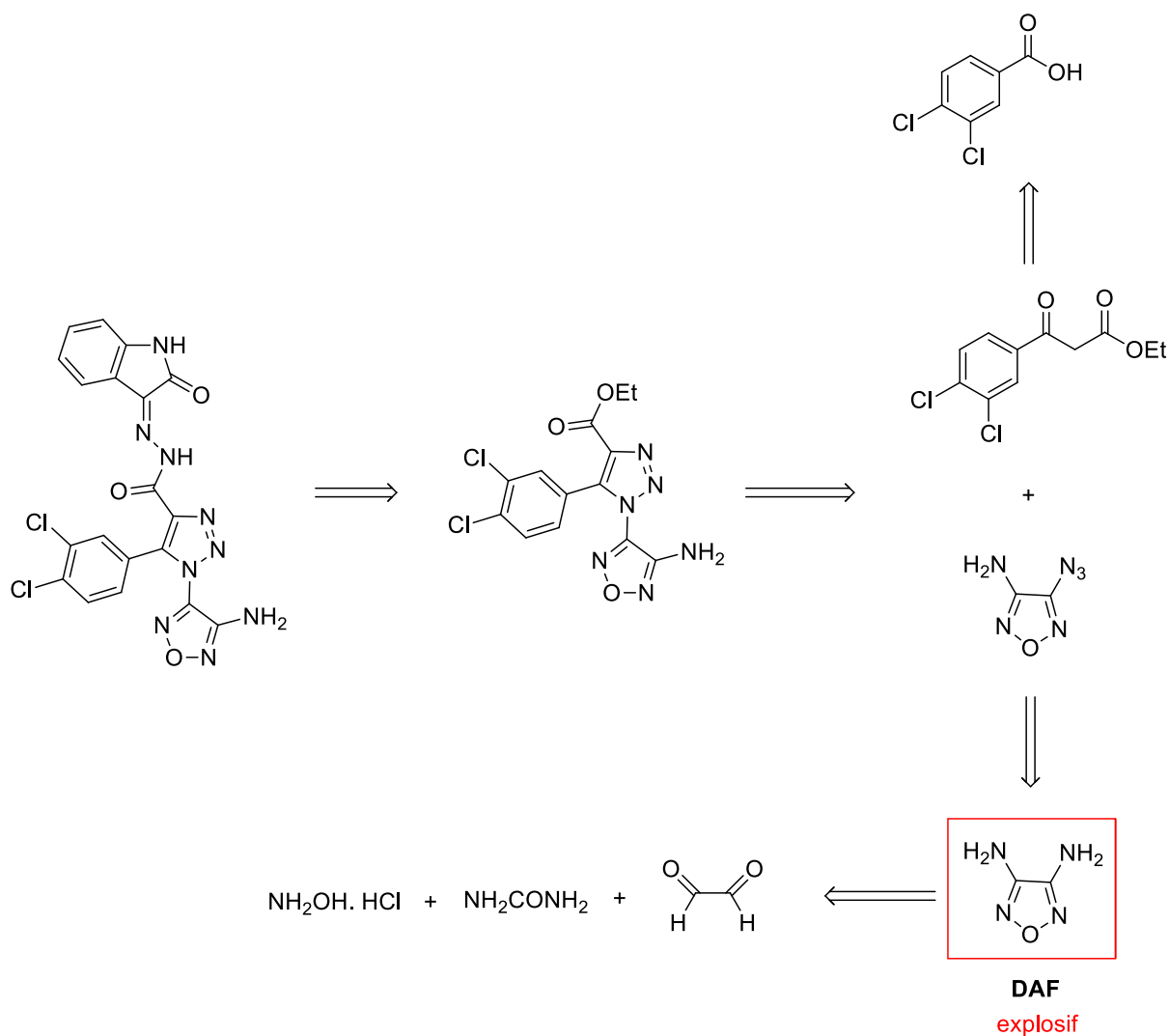
**Figure 63 : Représentation du positionnement de la molécule II dans la poche de TEAD**

La molécule **II** semble donc être un bon point de départ pour démarrer un programme de recherche visant à développer des inhibiteurs du complexe YAP-TEAD, autrement dit des ligands de TEAD.

## B. Etude bibliographique

Compte tenu de la structure originale de la molécule **II**, un vaste programme de pharmacomodulation et d'optimisation autour de ce composé a été envisagé. Une première synthèse d'analogues, contenant l'hétérocycle 1,2,5-oxadiazole en position 1 du triazole, pourrait être effectuée en utilisant comme précurseur le 3,4-diamino-1,2,5-oxadiazole (aussi nommé diaminofurazan (DAF)), connu pour son caractère hautement explosif (Schéma 31).<sup>182,183,184</sup>

<sup>182</sup>Zhang, J.; Shreeve, J. M., 3,3'-Dinitroamino-4,4'-azoxyfurazan and its derivatives: an assembly of diverse N-O building blocks for high-performance energetic materials. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 4437-4445.



**Schéma 31 : Schéma rétrosynthétique des analogues contenant l'hétérocycle 1,2,5-oxadiazole par la voie 1**

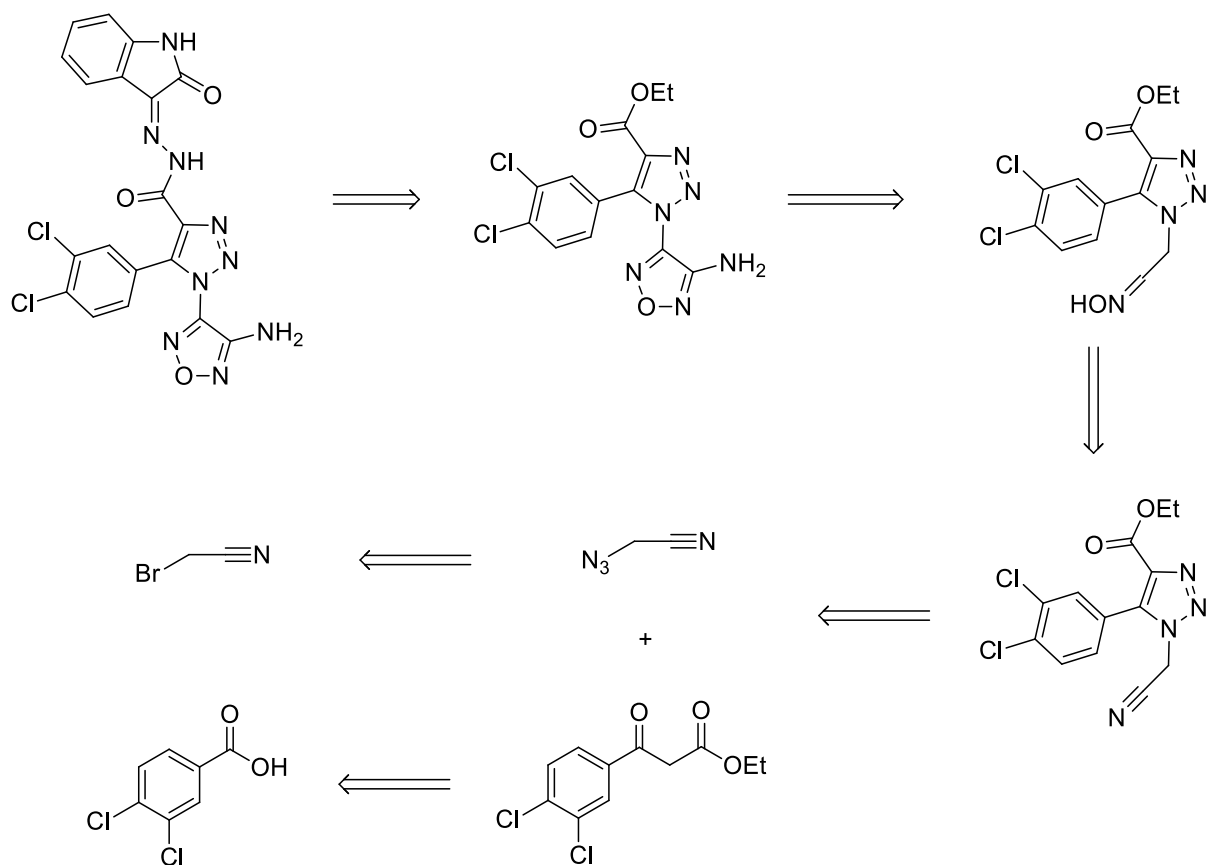
Une seconde voie de synthèse est également possible, utilisant le 1-cyanoéthyltriazole (Schéma 32). Bien que cette dernière voie de synthèse ne présente pas de risque particulier de manipulation, le nombre d'étapes pour la construction du motif 1,2,5-oxadiazole pourrait être un facteur limitant limitant en raison du faible rendement de cyclisation de cet hétérocycle.<sup>185,186</sup>

<sup>183</sup>Ren, H.-P.; Liu, Z.-W.; Lu, J.; Liu, Z.-T., The [Bmim]4W10O23 catalyzed oxidation of 3,4-diaminofurazan to 3,4-dinitrofurazan in hydrogen peroxide. *J. Indus. & Engin. Chem. Res.*, **2011**, *50*, 6615-6619.

<sup>184</sup>Batog, L. V.; Rozhkov, V. Y.; Struchkovan M. L., Azido-1,2,5-oxadiazoles in reaction with 1,3-dicarbonyl compounds. *Mendeleev Commun.*, **2002**, *12*, 159-161.

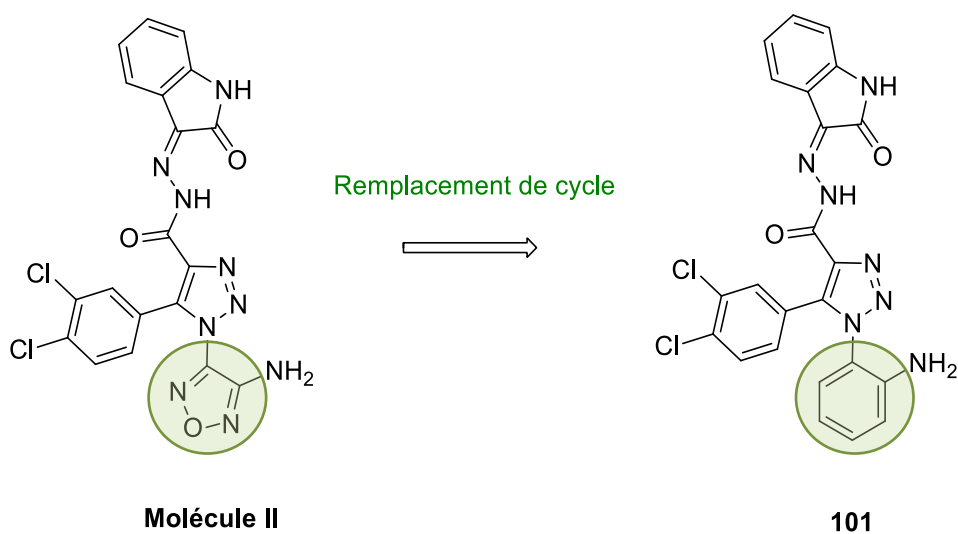
<sup>185</sup>Olesen, P. H.; Sorensen, A. R.; Urso, B.; Kurtzhals, P.; Bowler, A. N.; Ehrbar, U.; Hansen, B. F., Synthesis and in vitro characterization of 1-(4-aminofurazan-3-yl)-5-dialkylaminomethyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid derivatives. A new class of selective GSK-3 inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3333-3341.

<sup>186</sup>Lampe, J. W. *et al.*, Cytoskeletal active Rho kinase inhibitor compounds, composition and use. WO 2008/077057, 89-90.



**Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique des analogues contenant l'hétérocycle 1,2,5-oxadiazole par la voie 2**

Ces deux arguments nous ont amené à reconsidérer la structure centrale des analogues et à remplacer le motif 4-amino-1,2,5-oxadiazole par une aniline pour donner le composé **101** (Figure 64).



**Figure 64 : Remplacement du cycle 1,2,5-oxadiazole en position 1**



formation du complexe YAP-TEAD.<sup>66</sup> Afin de valider cette interaction, divers analogues présentant une modification en position 1 ont été envisagés. La fonction amine a donc dans un premier temps été placée en position méta, para ou remplacée par un groupe méthylamine avant d'être remplacée par d'autres motifs présentant des effets électroniques différents.

Le motif isatinique quant à lui ne semble pas se lier directement avec la protéine TEAD. Différents dérivés ont alors été synthétisés en jouant sur les effets électroniques et en modifiant le système bicyclique en vue de mieux comprendre l'importance de cette partie de la molécule.

Pour finir, un composé a été synthétisé en modulant le bras espaceur dans le but d'interagir avec des acides aminés plus profonds dans la poche.

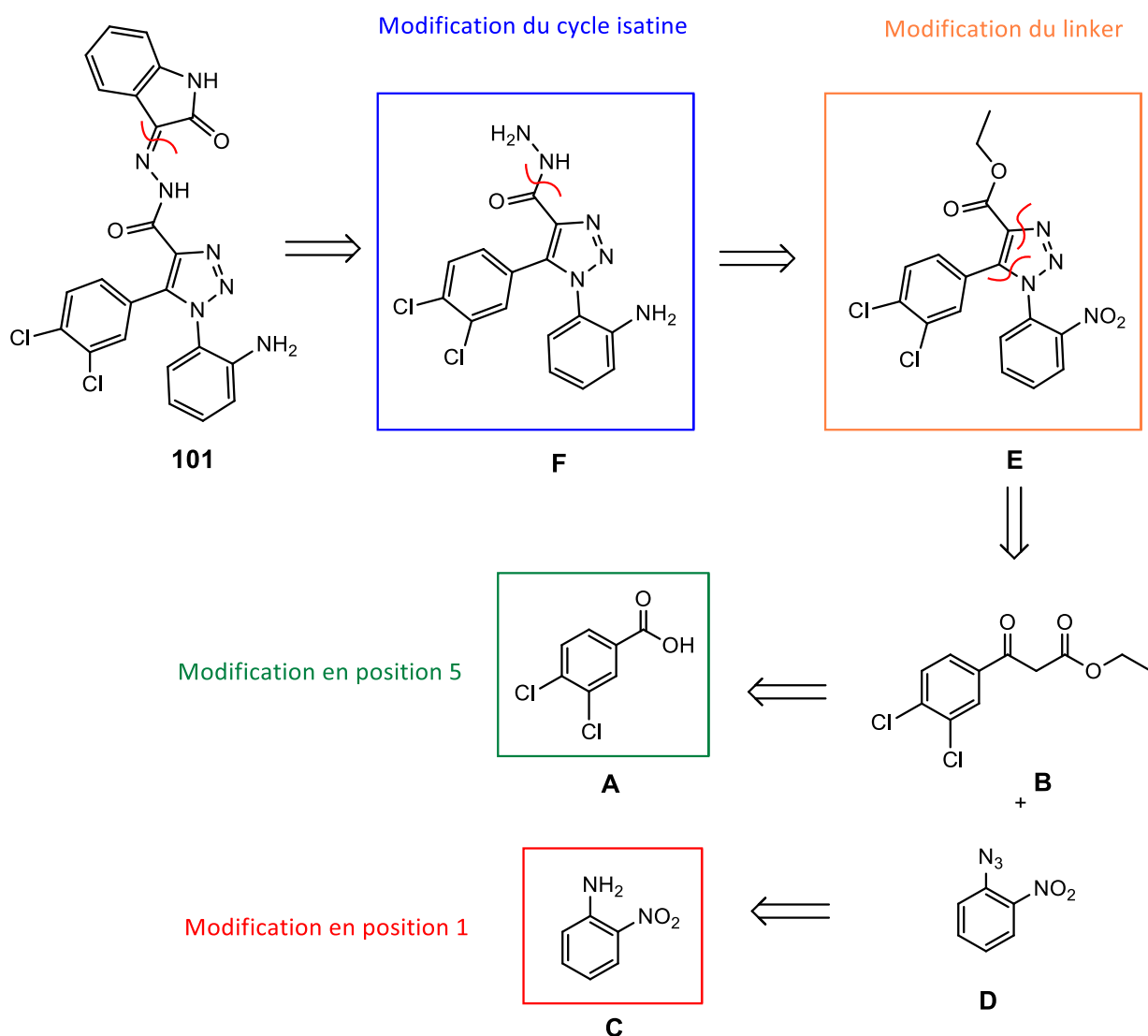
## **IV. Synthèse des ligands de TEAD**

### **A. Analyse rétrosynthétique**

L'analyse rétrosynthétique des composés triazoliques trisubstitués cibles est représentée sur l'exemple du composé **101** et permet de mettre en évidence les différents intermédiaires de synthèse nécessaires (Schéma 33).

Le composé cible **101** est obtenu par condensation de l'isatine et du carbohydrazide (**F**). Ce dernier est facilement synthétisé à partir de l'ester précurseur correspondant (**E**) par substitution nucléophile et par réduction de la fonction nitro. L'hétérocycle triazolique est formé au préalable à partir du 1-azido-2-nitrobenzène (**D**), synthétisé à partir de l'*o*-nitroaniline (**C**), et du  $\beta$ -cétoester (**B**), lui-même obtenu à partir de l'acide benzoïque substitué (**A**).

Cette synthèse convergente permet l'introduction de modifications à différentes étapes de synthèse. Le remplacement de l'acide benzoïque de départ (**A**) engendre la modification en position 5, tandis que la position 1 est modulée à partir de l'aniline désirée (**C**). Le cycle représenté par l'isatine est remplacé en dernière étape par condensation de divers composés carbonylés sur le carbohydrazide (**F**). Enfin, le bras espaceur est modifiable à partir des esters correspondants (**E**).



**Schéma 33 : Analyse rétrosynthétique des triazoles cibles**

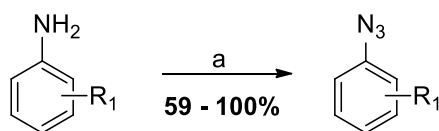
## B. Synthèse des composés triazoliques

### a) Synthèse des précurseurs azidobenzènes

Dans le but de modifier la position 1 du triazole, divers azidobenzènes ont dû être synthétisés. Les anilines sont mises en solution dans l'eau avec de l'acide paratoluène sulfonique monohydraté et du nitrite de sodium pour former *in situ* le sel de diazonium qui réagit par la suite avec l'azoture de sodium pour obtenir les composés attendus **40-45** avec des rendements compris entre 59 et 98% (Schéma 34 et Tableau 8).<sup>187</sup>

<sup>187</sup>Karimi Zarchi, M. A.; Nabaei, R.; Barani, S. Diazotization-Azidation of Amines in Water by Using Crosslinked Poly(4-Vinylpyridine)-Supported Azide Ion. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *123* (2), 788–795.





**40-45**

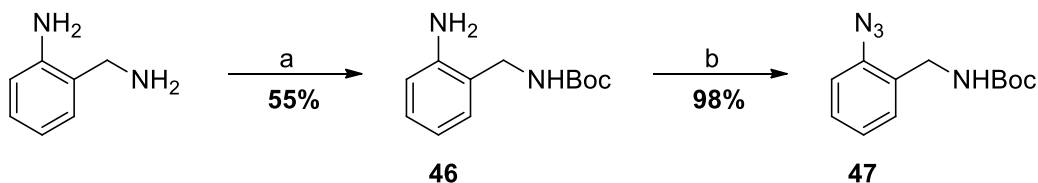
Réactifs et conditions : (a) APTS.H<sub>2</sub>O (5 éq.), NaNO<sub>2</sub> (5 éq.), NaN<sub>3</sub> (1,5 éq.), H<sub>2</sub>O, 25 °C, 20 h.

**Schéma 34 : Synthèse générale des azotures 40-45**

Composé	R <sub>1</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>1</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>1</sub>	Rdt (%)
<b>40</b>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	100	<b>42</b>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	83	<b>44</b>	<i>o</i> -OH	59
<b>41</b>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	100	<b>43</b>	<i>o</i> -CN	90	<b>45</b>	<i>o</i> -OMe	98

**Tableau 8 : Récapitulatif des azotures 40-45 synthétisés**

Pour obtenir le composé **47**, la protection par un groupe *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) de la chaîne aminométhyle de la 2-aminobenzylamine s'effectue en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle dans le dichlorométhane pour conduire au composé **46** avec un rendement de 55% (Schéma 35). Ce dernier est ensuite transformé en dérivé azidépar l'action du nitrite de sodium et de l'azoture de sodium avec un rendement de 98%.



Réactifs et conditions : (a) Boc<sub>2</sub>O (1 éq.), DCM, 25 °C, 20 h, 55% ; (b) NaNO<sub>2</sub> (2 éq.), NaN<sub>3</sub> (2 éq.), AcOH/H<sub>2</sub>O, 25 °C, 1 h, 98%.

**Schéma 35 : Synthèse du composé 47**

Par ailleurs, l'azidobenzène utilisé dans la suite de la synthèse est disponible commercialement.

### b) Synthèse des précurseurs β-cétoesters

Afin d'explorer au mieux la poche occupée par le motif 3,4-dichlorophényle de la molécule **II** et comprendre le rôle de ce motif, divers β-cétoesters ont été synthétisés. Les acides carboxyliques sont mis en réaction avec le 3-éthoxy-3-oxopropanoate de potassium en présence de

carbonyldiimidazole, de chlorure de magnésium et de triéthylamine pour former les  $\beta$ -cétosters **48-54** avec des rendements compris entre 28 et 99% (Schéma 36 et Tableau 9).<sup>188</sup>



Réactifs et conditions : (a) CDI (1,2 éq.), MgCl<sub>2</sub> (1,2 éq.), Et<sub>3</sub>N (1,2 éq.), THF, ACN, 25 °C, 20 h.

Schéma 36 : Synthèse générale des  $\beta$ -cétosters 48-54

Composé	R <sub>2</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>2</sub>	Rdt (%)
48		85	52		68
49		56	53		28
50		34	54		99
51		63			

Tableau 9 : Récapitulatif des  $\beta$ -cétosters 48-54 synthétisés

Les  $\beta$ -cétosters suivants, disponibles commercialement, ont été utilisé pour la suite de la synthèse (Tableau 10).

R <sub>2</sub>						
----------------	--	--	--	--	--	--

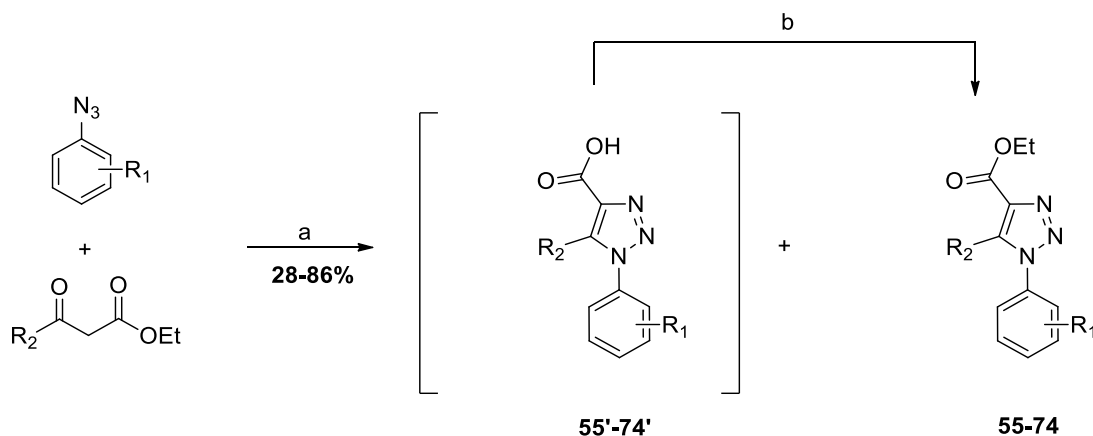
Tableau 10 :  $\beta$ -cétosters commerciaux

### c) Synthèse des précurseurs 1-aryl-5-aryl(ou alkyl)-1,2,3-triazole-4-carboxylate d'éthyle

Les azotures et  $\beta$ -cétosters disponibles sont engagés dans la formation des dérivés triazoliques trisubstitués. Après déprotonation du  $\beta$ -cétostere par une solution d'éthanolate de sodium dans

<sup>188</sup> McCall, J.; Kelly Robert, C.; Romero Donna, L., Heterocyclic compounds for the inhibition of pask. WO2014/66795. 2014.

l'éthanol, l'azidobenzène est ajouté à 0°C. Puis la solution est agitée à température ambiante pendant une nuit pour former l'hétérocycle triazolique correspondant (Schéma 37 et Tableau 11).<sup>189</sup> Le produit est obtenu sous forme d'un mélange acide/ester avec, la plupart du temps, une majorité d'acide carboxylique. La fraction d'acide est directement estérifiée, sans être isolée, en présence de chlorure de thionyle dans l'éthanol pour conduire aux composés **55-74** avec un rendement global compris entre 28 et 86% sur les deux étapes.



Réactifs et conditions : (a) EtONa (1,2 éq.), EtOH, 25 °C, 20 h ; (b) SOCl<sub>2</sub> (5 éq.), EtOH, 90 °C, 8 h.

### Schéma 37 : Synthèse générale des triazoles 55-74

Cette voie de synthèse présente l'avantage d'obtenir régiosélectivement des triazoles 4-carboxylate contrairement aux méthodes « classiques » métallocatalysées. Une série d'expérience nOe (nuclear Overhauser effect) a permis de valider la structure de la molécule obtenue sur l'exemple du composé **55** (Figure 66).

En bleu foncé, est représenté le spectre « off-resonance » (spectre 1) duquel sont soustraits les spectres « on-resonance ». En dessus, se retrouve les résultats des soustractions de spectres [« off-resonance » - « on-resonance »].

<sup>189</sup>Merck Serono Quattropiani, A. C., C.; Sebille, E.; Schwarz, M.; Marin, D., Triazole oxadiazoles derivatives. WO2009/080663 A1. 2009.

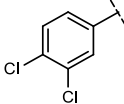
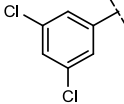
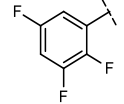
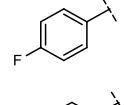
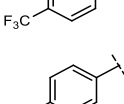
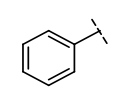
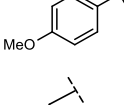
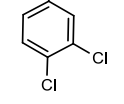
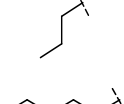
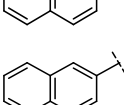
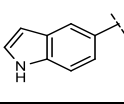
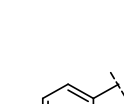
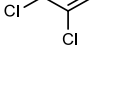

Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rdt (%)
55			86
56			84
57			46
58			41
59			92
60			23
61	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>		80
62			60
63			16
64			54
65			60
66			41
67			33
68	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>		81
69	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>		54
70	<i>o</i> -OH		24
71	<i>o</i> -OMe		46
72	<i>o</i> -CN		25
73	H		34
74	<i>o</i> -CH <sub>2</sub> NHBoc		28

Tableau 11 : Récapitulatif des esters 55-74 synthétisés

L'irradiation du proton H1 présent sur le motif *o*-aminophényle n'affecte pas les intégrations des autres protons du motif 3,4-dichlorophényle mais uniquement celle du proton adjacent (spectre mauve). Lorsque les protons du motif dichlorophényle sont irradiés, aucun signal n'est détecté sur les autres protons de la molécule (spectres rouge et jaune). En revanche, en irradiant les protons du groupe méthylène de la fonction ester (spectre vert), un effet Overhauser est observé sur les protons H6 et H7 du 3,4-dichlorophényle. Ces résultats permettent de confirmer la conformation du triazole-4-carboxylate synthétisé.

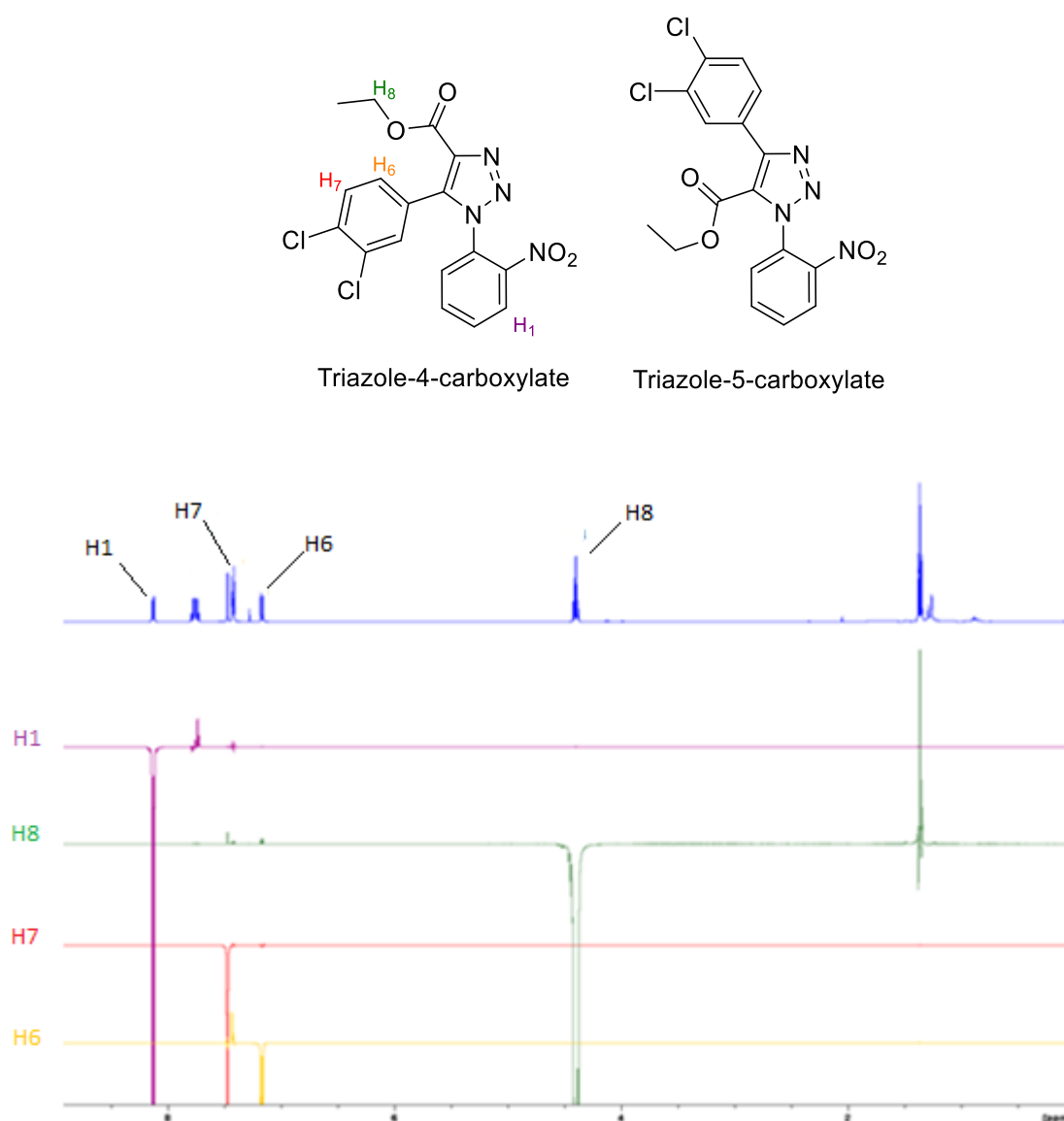


Figure 66 : Etude nOe de la molécule 55

Cette régiosélectivité peut s'expliquer grâce au mécanisme détaillé ci-dessous (Schéma 38).

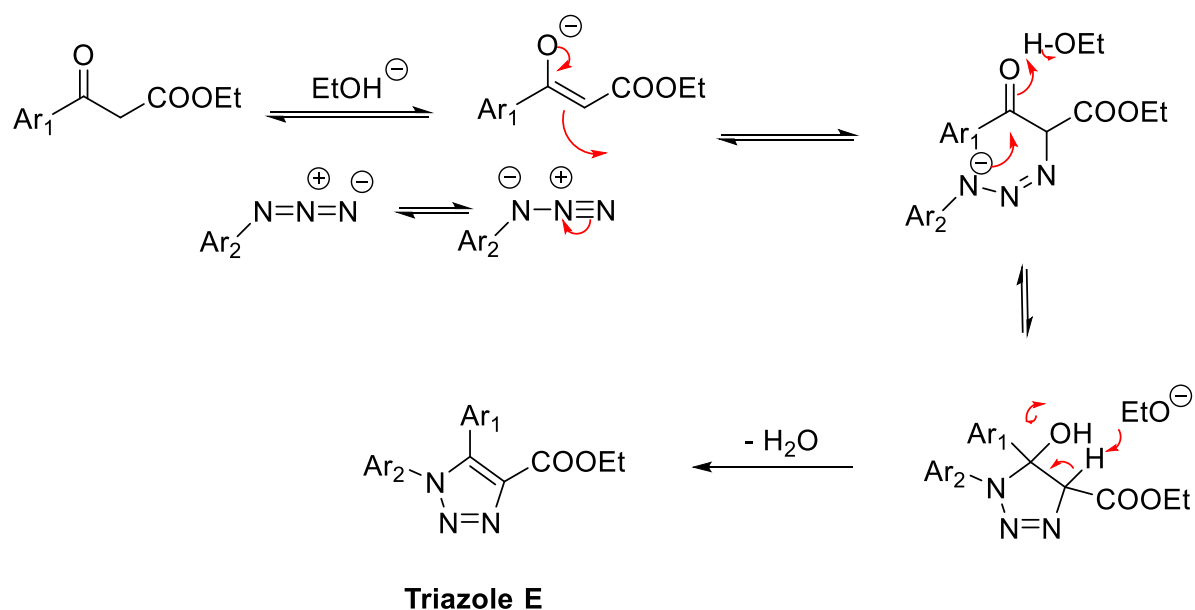


Schéma 38 : Mécanisme de formation du triazole-4-carboxylate

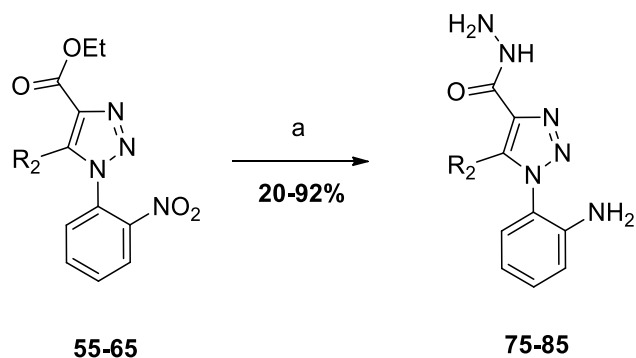
d) *Synthèse des précurseurs 1-(aminophényl)-5-(aryl(alkyl)-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide*

La synthèse des carbohydrazides s'est avérée être dépendante des substituants présents sur les molécules. C'est pourquoi, 3 voies de synthèse ont été réalisées.<sup>190,191</sup>

Dans un premier temps, les précurseurs **55-65** obtenus précédemment sont mis en réaction avec l'hydrazinemonohydrate en présence de charbon palladié pendant une heure à 90°C pour conduire aux carbohydrazides **75-85** avec un rendement compris entre 20 et 92% (Schéma 39 et Tableau 12). Cette technique présente l'avantage de former l'hydrazide et de réduire la fonction nitro en une seule étape.

<sup>190</sup>Abdel-Aziz, H. A.; Elsamani, T.; Al-Dhfyani, A.; Attia, M. I.; Al-Rashood, K. A.; Al-Obaid, A.-R. M. Synthesis and Anticancer Potential of Certain Novel 2-Oxo-N'-(2-Oxoindolin-3-ylidene)-2H-Chromene-3-Carbohydrazides. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 358–363.

<sup>191</sup>He, J.-B.; Feng, L.-L.; Li, J.; Tao, R.-J.; Ren, Y.-L.; Wan, J.; He, H.-W. Design, Synthesis and Molecular Modeling of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Pyruvate Dehydrogenase Complex E1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (1), 89–94.



Réactifs et conditions : (a) Pd/C (10%), NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (20 éq.), EtOH, 90 °C, 1 h.

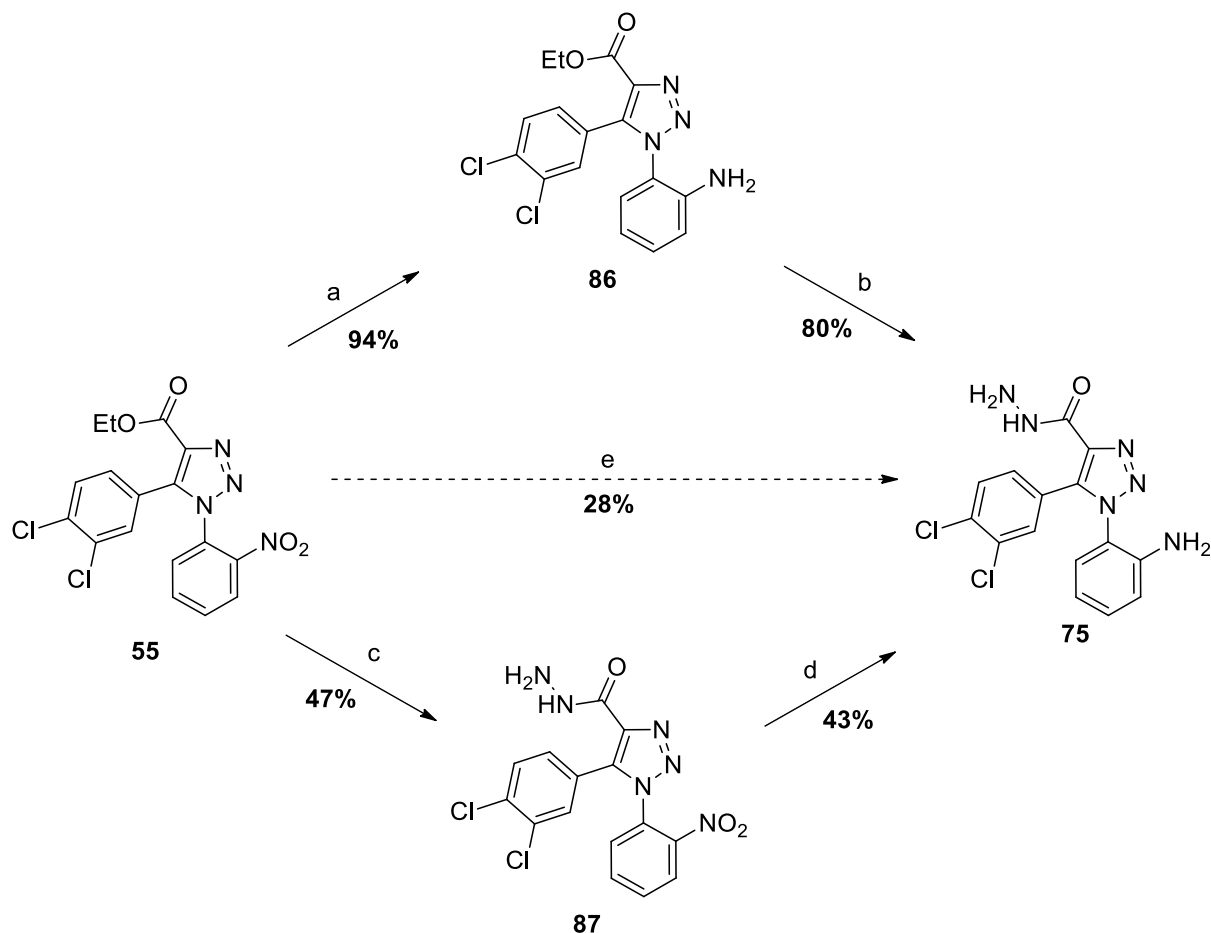
**Schéma 39 : Synthèse générale des carbohydrazides 75-85**

Composé	R <sub>2</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>2</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>2</sub>	Rdt (%)
<b>75</b>		28	<b>78</b>		46	<b>81</b>		79
<b>76</b>		90	<b>79</b>		79	<b>82</b>		69
<b>77</b>		20	<b>80</b>		77	<b>83</b>		27
<b>84</b>		92	<b>85</b>		60			

**Tableau 12 : Récapitulatif des carbohydrazides 75-85 synthétisés par la voie 1**

Néanmoins, bien que cette méthode soit rapide et efficace, les rendements montrent globalement qu'elle n'est pas optimale pour certains composés tels que les composés halogénés. En effet, la deshalogénéation du noyau dichlorophényle en position 5 a parfois été observée après une heure de réaction formant ainsi le composé **81**. Cette deshalogénéation est couramment rencontrée quand on effectue une hydrogénation catalytique de composés aromatiques chlorés, ou bromés mais pas fluorés. C'est pourquoi, une seconde voie de synthèse a été développée pour ce type de molécule, qui certes ajoute une étape supplémentaire mais permet de garantir la production du composé final (Schéma 40). Elle consiste à réduire successivement la fonction nitro puis effectuer la réaction de l'hydrazine sur la fonction ester. Testée sur le composé **55**, la fonction nitro est réduite dans un premier temps par l'action du dithionite de sodium en présence de carbonate de potassium pour

former l'intermédiaire **86**.<sup>192</sup> Dans un deuxième temps, l'hydrazide **75** est obtenu par réaction avec l'hydrazine monohydrate avec un rendement global de 75% sur les deux étapes. Un essai a été également effectué en inversant les deux étapes pour former dans un premier temps l'hydrazide **87** suivi d'une réduction de la fonction nitro pour conduire au composé **75** mais le rendement global est nettement moins avantageux.



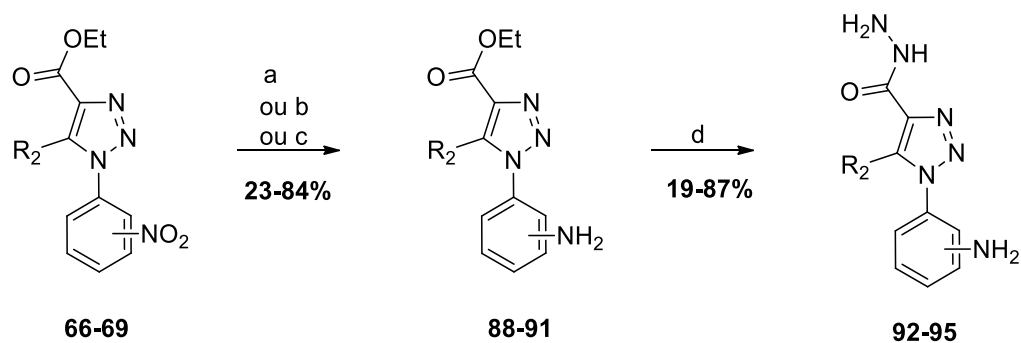
Réactifs et conditions : (a)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (10 éq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 éq.), THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , 25°C, 20 h, 94% ; (b)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, reflux, 20 h, 80% ; (c)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, reflux, 20 h, 47% ; (d)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (10 éq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ (10 éq.), THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , 25°C, 20 h, 43% ; (e) Pd/C (10%),  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , reflux, 1 h, 28%.

#### Schéma 40 : Voies de synthèse du carbohydrazide **75**

Cette voie de synthèse a été utilisée pour les composés **66-69** présentant une modification de la position de l'aniline mais également pour les composés possédant un système bicyclique en position 5 (Schéma 41 et Tableau 13).

<sup>192</sup>Yan, Y.; Liu, Z.; Zhang, J.; Xu, R.; Hu, X.; Liu, G. A Reverse Method for Diversity Introduction of Benzimidazole to Synthesize H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP Enzyme Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (14), 4189–4192.





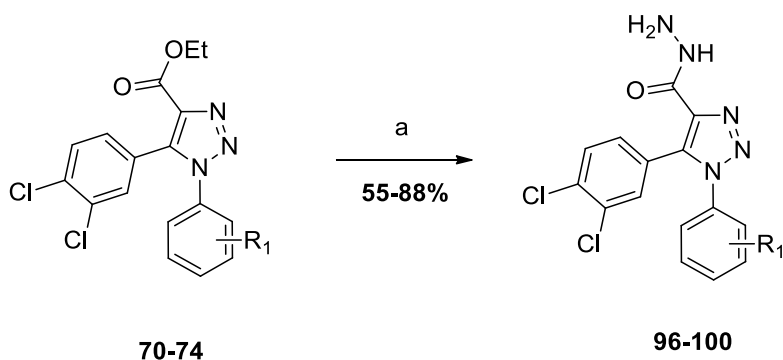
Réactifs et conditions : (a)  $K_2CO_3$  (10 éq.),  $Na_2S_2O_4$  (20 éq.), THF/ $H_2O$ , 25 °C, 20 h ; (b)  $Na_2S_2O_4$  (10 éq.), 35% aq.  $NH_3$  (10 éq.), 25 °C, 20 h ; (c)  $HCO_2NH_4$ , (7 éq.), Pd/C (10%), 50 °C, 2 h ; (d)  $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ , EtOH, reflux, 20 h.

**Schéma 41 : Synthèse des carbohydrazides 92-95**

Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rdt (%) (étape d)
92	<i>o</i> -NH <sub>2</sub>		19
93	<i>o</i> -NH <sub>2</sub>		87
94	<i>m</i> -NH <sub>2</sub>		79
95	<i>p</i> -NH <sub>2</sub>		63

**Tableau 13 : Récapitulatif des carbohydrazides 92-95 synthétisés par la voie 2**

Pour les composés présentant un substituant en position 1 ne nécessitant pas de réduction, les esters **70-74** sont directement transformés en dérivés hydrazides **96-100** en présence d'hydrazine monohydratée (Schéma 42 et Tableau 14).



Réactifs et conditions : (a)  $NH_2NH_2 \cdot H_2O$  (20 éq.), reflux, 20 h.

**Schéma 42 : Synthèse des carbohydrazides 96-100**

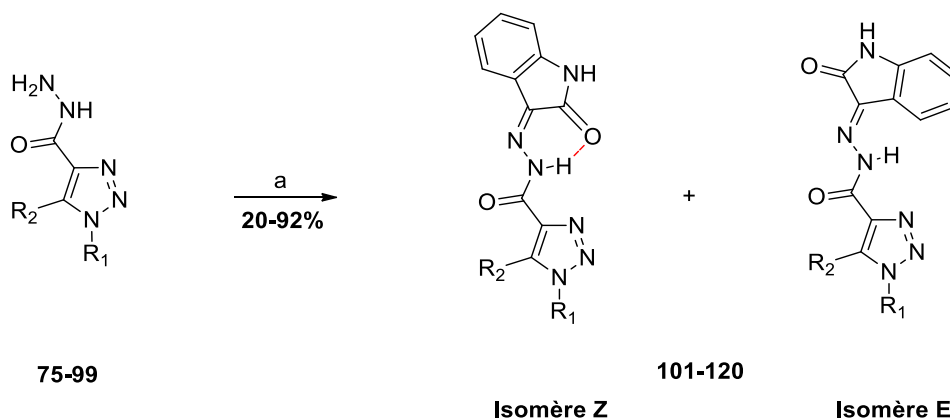
Composé	R <sub>1</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>1</sub>	Rdt (%)	Composé	R <sub>1</sub>	Rdt (%)
96	<i>o</i> -OMe	88	98	<i>o</i> -CN	65	100	<i>o</i> -CH <sub>2</sub> NHBoc	55
97	<i>H</i>	60	99	<i>o</i> -OH	78			

Tableau 14 : Récapitulatif des carbohydrazides 96-100 synthétisés par la voie 3

e) *Synthèse des composés cibles*

i. Par condensation à l'isatine

La condensation de dérivés carbonylés tels que l'isatine avec les carbohydrazides **75-99** en présence d'acide acétique (en quantité catalytique) a conduit à la formation des composés **101-120** (Schéma 43). Insolubles dans l'alcool, les molécules cibles ont été isolées par filtration sous forme d'un mélange de deux isomères. Dans la majorité des cas, l'isomère Z a été obtenu majoritairement par rapport à l'isomère E. Cette prédominance s'explique par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le carbonyle résiduel de l'isatine et le proton de l'hydrazide qui stabilise la forme Z.<sup>193</sup>



Réactifs et conditions : (a) Isatine (0,9 éq.), AcOH (qq gouttes), EtOH, 70 °C, 16 h.

Schéma 43 : Synthèse des composés cibles 101-120

Dans le cas du composé **101**, un ratio Z/E de 70:30 a été déterminé par RMN (Figure 67). En absence de toute justification expérimentale, il semble nécessaire de confirmer la structure de chaque isomère par une série d'expériences NOE sur le mélange. Les quatre atomes d'hydrogène liés aux atomes d'azote du bras espaceur et de l'isatine sont fortement déblindés et résonnent entre 10.8 et

<sup>193</sup>Adibi, H.; Khodaei, M. M.; Pakravan, P.; Abiri, R. Synthesis, Characterization, and in Vitro Antimicrobial Evaluation of Hydrazone and Bishydrazone Derivatives of Isatin. *Pharm. Chem. J.* **2010**, *44* (4), 219–227.

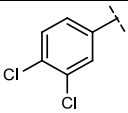
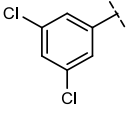
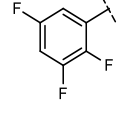
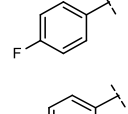
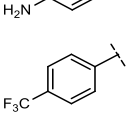
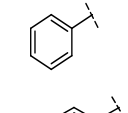
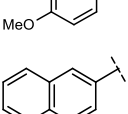
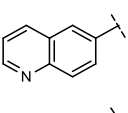
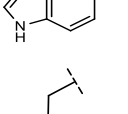
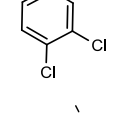
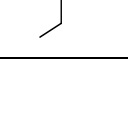
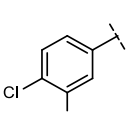

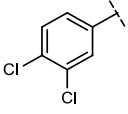
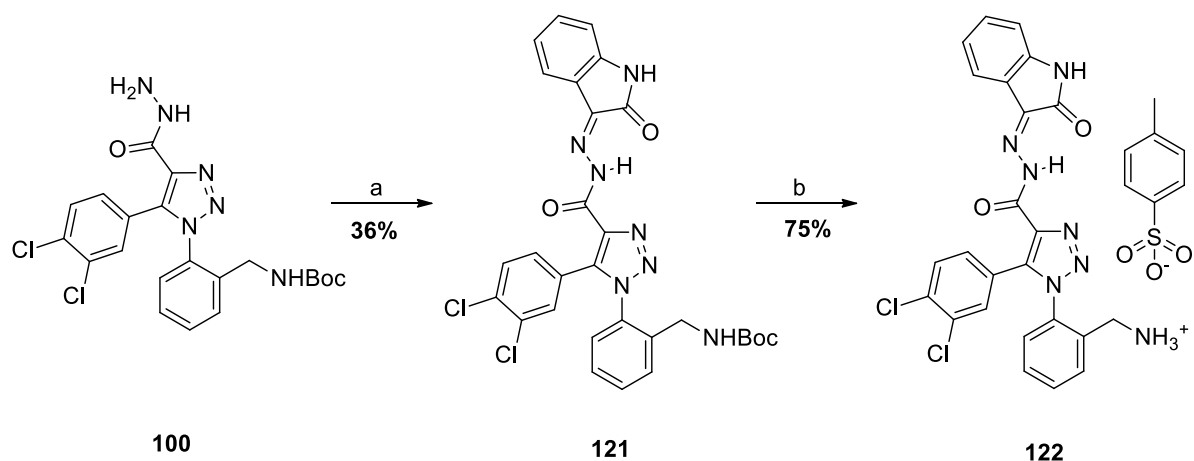
Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Ratio Z/E	Rdt (%)
101			70/30	92
102			100/0	44
103			100/0	36
104			100/0	61
105			100/0	57
106			100/0	35
107	<i>o</i> -NH <sub>2</sub>		100/0	57
108			100/0	66
109			100/0	45
110			100/0	20
111			100/0	28
112			38/62	79
113			100/0	23
114	<i>m</i> -NH <sub>2</sub>			30
115	<i>p</i> -NH <sub>2</sub>			47
116	<i>o</i> -OH			46
117	<i>o</i> -OMe		100/0	73
118	<i>o</i> -CN			39
119	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>			51
120	H			63

Tableau 15 : Récapitulatif des composés cibles 101-120



Dans le cas du composé **122** présentant un groupe 2-(aminométhyl)phényle en position 1, le carbohydrazide correspondant **100** est dans un premier temps condensé à l'isatine dans les conditions standard pour conduire au composé **121**, puis l'amine est déprotégée en présence d'acide paratoluènesulfonique pour obtenir la molécule cible **122** avec un rendement de 75% (Schéma 44).

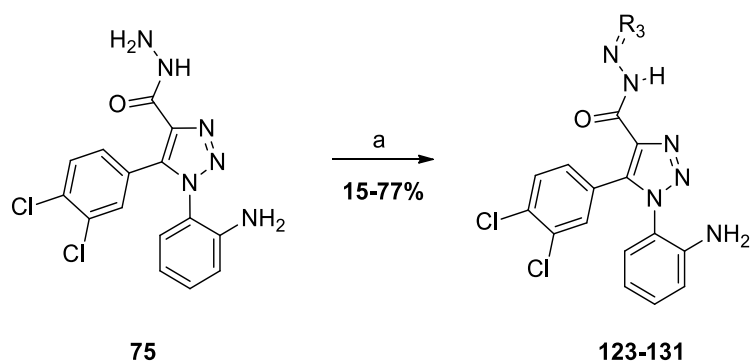


Réactifs et conditions : (a) Isatine (0,9 éq.), AcOH (qq gouttes), EtOH, 70 °C, 16 h, 36% ; (b) APTS.H<sub>2</sub>O (3 éq.), EtOH, 90 °C, 20 h, 75%.

Schéma 44 : Synthèse du composé **122**

#### ii. Par condensation à divers dérivés carbonylés

Afin d'explorer au mieux la poche hydrophobe de TEAD, divers composés carbonylés ont été condensés à l'hydrazide **75** dans les mêmes conditions que précédemment pour conduire aux composés cibles **123-131** avec des rendements compris entre 15 et 77% (Schéma 45 et Tableau 16).



Réactifs et conditions : (a) Isatine (0,9 éq.), AcOH (qq gouttes), EtOH, 70 °C, 16 h.

Schéma 45 : Synthèse des composés cibles **123-131**

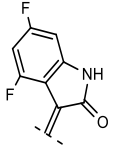
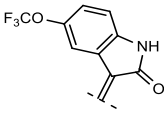
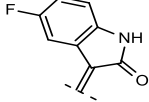
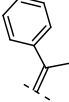
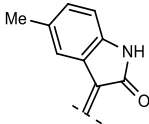

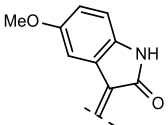

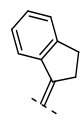
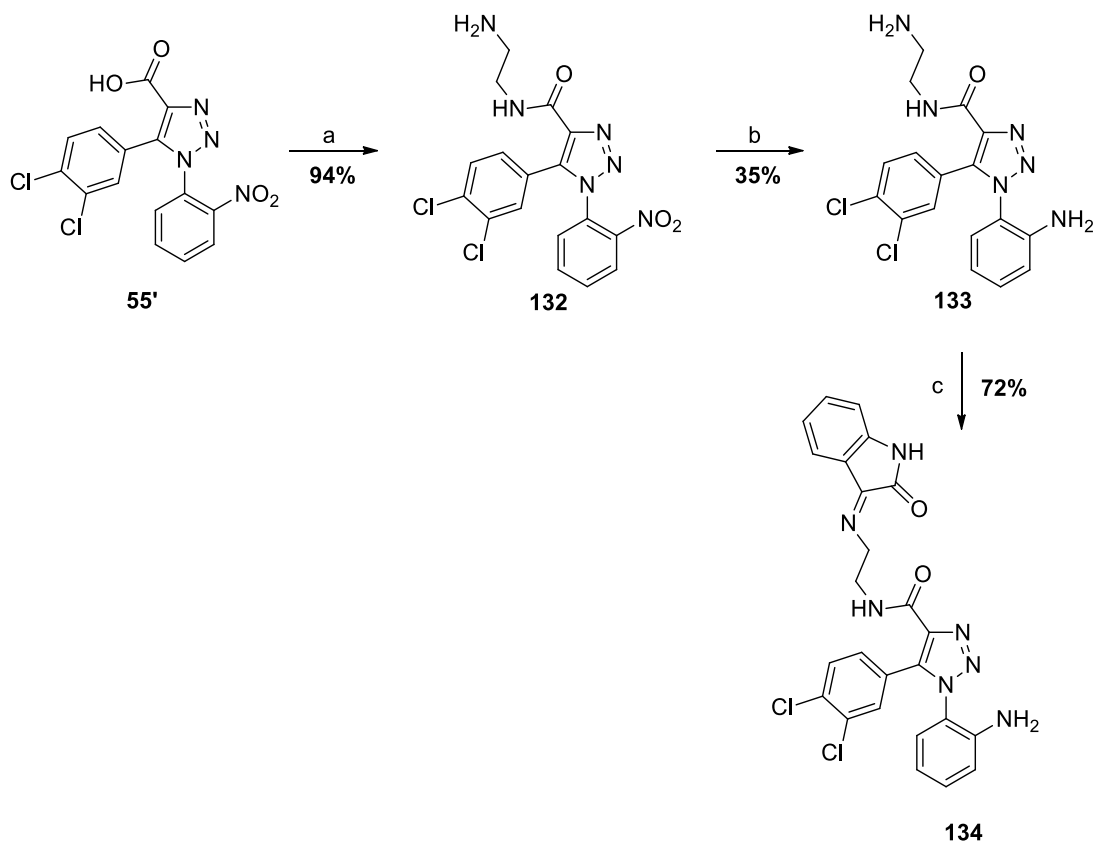
Composé	R <sub>3</sub>	Ratio Z/E	Rdt (%)	Composé	R <sub>3</sub>	Ratio Z/E	Rdt (%)
123		71/29	50	128		100/0	60
124		75/25	54	129		100/0	77
125		63/37	42	130		-	15
126		55/45	70	131		-	15
127							

Tableau 16 : Récapitulatif des composés cibles 123-131

f) **Modulation du bras espaceur entre le triazole et l'isatine.**

Dans le but d'interagir avec des acides aminés plus profonds dans la poche hydrophobe de TEAD, l'allongement du bras espaceur entre le cycle triazolique et le motif isatinique par insertion d'une chaîne éthyle a été envisagé.

Le composé **132** est obtenu par l'amidation du composé **55'** en présence d'éthylène diamine à reflux avec un rendement de 94% (Schéma 46). La fonction nitro est par la suite réduite avec un mélange de dithionite de sodium et d'ammoniaque aqueux 35% pour conduire au composé **133** qui est pour finir condensé à l'isatine pour former le composé cible **134** avec un rendement de 72%.



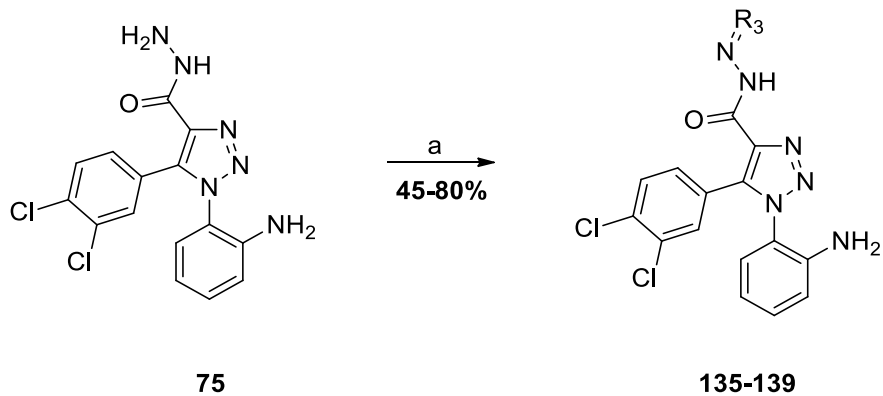
Réactifs et conditions: (a) éthylène diamine (10éq.), MeOH, 90 °C, 15 h, 94% ; (b) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10 éq.), NH<sub>3</sub>aq (10éq.), THF/H<sub>2</sub>O, 25 °C, 20 h, 35% ; (c) Isatine (0,9 éq.), AcOH (qq gouttes), EtOH, 90 °C, 24 h, 72%.

**Schéma 46 : Synthèse du composé 134**

## B. Ajout de fonctions salifiables

Les premiers tests biophysiques autour des composés dérivés de la molécule **101** ont montré qu'ils présentent une faible solubilité en phase aqueuse, limitant l'accès aux fortes concentrations. Afin d'augmenter la solubilité de cette famille de composés, deux modifications ont été envisagées. La première consiste en l'introduction d'une fonction protonable de type acide carboxylique, acide sulfonique ou amine sur l'isatine et la seconde en ajoutant des chaînes éthylamines au niveau de la position 1.

Le carbohydrazide **75** a été condensé dans les conditions standard décrites précédemment à diverses isatines monosubstituées par des chaînes protonables disponibles commercialement (Schéma 47 et Tableau 17).



Réactifs et conditions: Isatine (0.9 éq.), qq gouttes d'AcOH, EtOH, 90 °C, 16 h.

**Schéma 47 : Synthèse des composés cibles 135-139**

Composé	R <sub>3</sub>	Ratio Z/E	Rdt (%)	Composé	R <sub>3</sub>	Ratio Z/E	Rdt (%)
<b>135</b>		100/0	70	<b>138</b>		100/0	79
<b>136</b>		100/0	53	<b>139</b>		100/0	45
<b>137</b>		32/68	80				

**Tableau 17 : Récapitulatif des composés cibles 135-139**

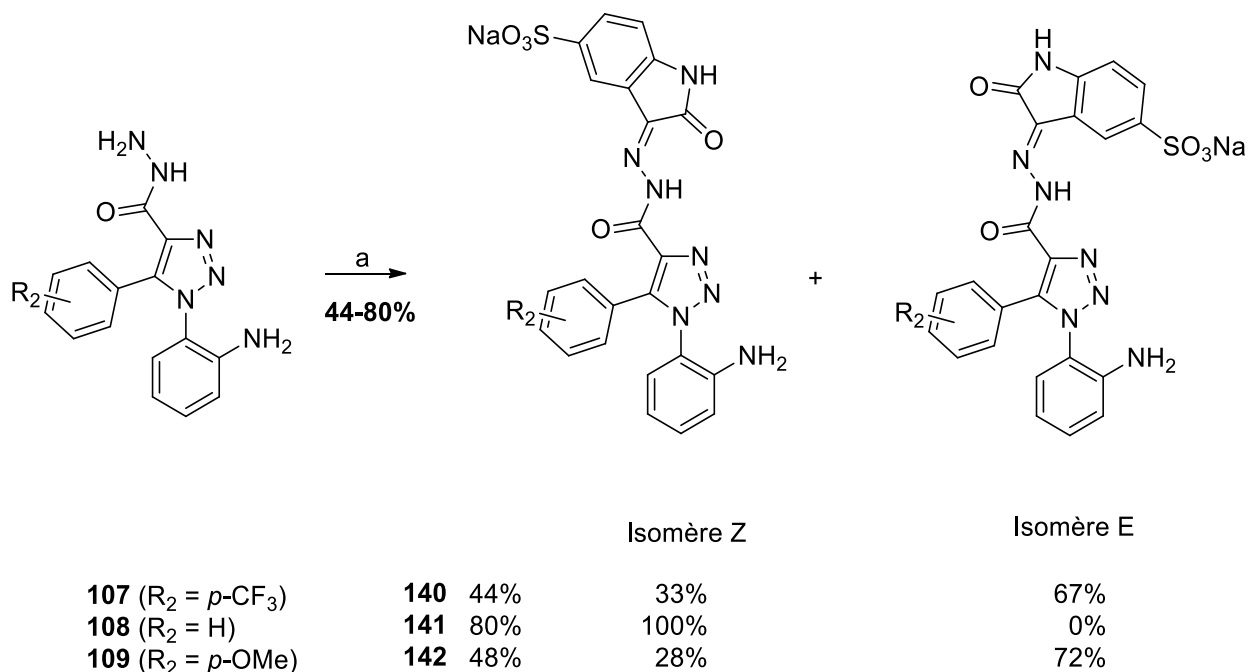
Un test de solubilité a été effectué pour chaque molécule afin de déterminer la fraction soluble dans le tampon utilisé pour les manipulations biophysiques : HBS-N 1x (pH 7.4), TCEP 0.25 mM, P20 10%, DMSO 10% (Tableau 18). Basée sur une concentration à 200 µM, deux échantillons sont préparés : un dans le tampon et un dans le méthanol où notre composé est totalement soluble, et agités à 25 °C pendant 24 heures. Les aires sous les courbes obtenues par LC-MS permettent de déterminer la fraction soluble du composé par comparaison à sa solubilité dans le méthanol (soit 200 µM).

Composé	II	101	135	136	137	138	139
<b>Solubilité (µM)</b>	21	9	36	18	184	51	15

**Tableau 18 : Solubilité des composés II, 101 et 135-139**



Avec une solubilité de 184  $\mu\text{M}$ , une fonction sulfonate sur le cycle isatine semble être la meilleure alternative pour tendre vers des composés plus solubles. La synthèse de composés présentant des modifications en position 5 est actuellement en cours. A ce stade, seules les molécules **140-142** ont été obtenues par condensation entre les carbohydrazides **107-109** correspondant et le 2,3-dioxoindoline-5-sulfonate de sodium (Schéma 48).



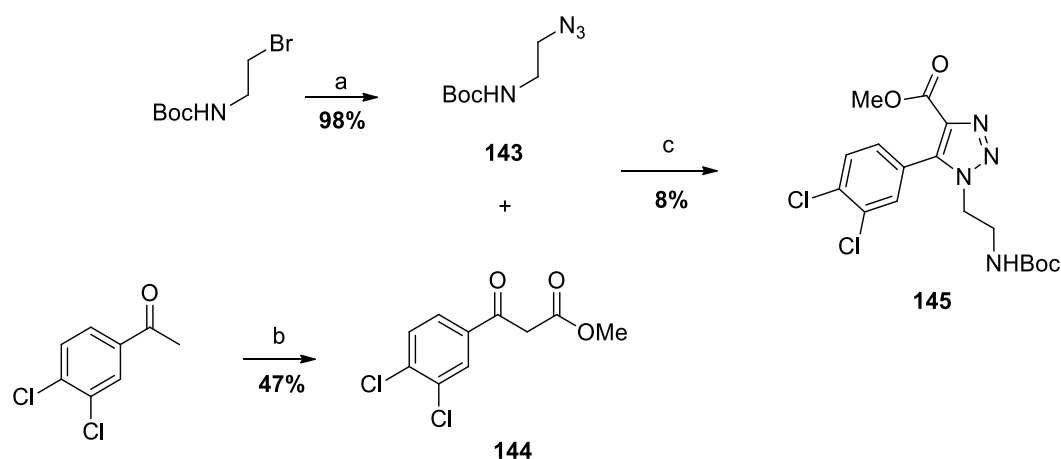
Réactifs et conditions: Isatine (0,9 éq), AcOH (qq gouttes), EtOH, 90 °C, 16 h.

**Schéma 48 : Synthèse des composés cibles 140-142**

L'ajout de chaînes aminoéthyle en position 1 du cycle triazolique (pour remplacer le motif *o*-aminophényle) par substitution nucléophile sur l'isatine et/ou le triazole a été jugée intéressante dans le cadre du projet. Cette démarche permet d'une part d'envisager l'augmentation de la solubilité aqueuse des composés et d'autre part, d'interagir avec d'éventuels acides aminés de la poche de TEAD pour améliorer l'affinité. En effet, pour rappel, le positionnement du composé hit **101** montre la présence proche de nombreux résidus acides et phénoliques : Asp<sub>255</sub> et Tyr<sub>421</sub> à proximité de l'aniline, et Asp<sub>264</sub>, Glu<sub>383</sub> et Glu<sub>408</sub> à proximité de l'isatine.

Une première approche a été tentée basée sur l'utilisation de la 2-azidoéthylamine, dont la fonction amine est protégée par un groupement Boc, pour la formation du triazole selon la voie des azotures utilisée précédemment (Schéma 49). Bien que le schéma de synthèse semble plausible pour

l'obtention du triazole **145** à partir des molécules **143**<sup>195</sup> et **144**<sup>196</sup>, les rendements obtenus restent inférieurs à 10%, rendant la suite de la synthèse problématique.



Réactifs et conditions : (a)  $\text{NaN}_3$  (1,1 éq.), DMF,  $80^\circ\text{C}$ , 4 h, 98%; (b)  $\text{NaH}$  (3 éq.), carbonate de diméthyle (18 éq.), THF,  $25^\circ\text{C}$ , 3 h, 47% ; (c)  $\text{EtONa}$  (1,2 éq.), MeOH,  $25^\circ\text{C}$ , 20 h, 8%.

#### Schéma 49 : Synthèse du triazole **145** par la voie 1

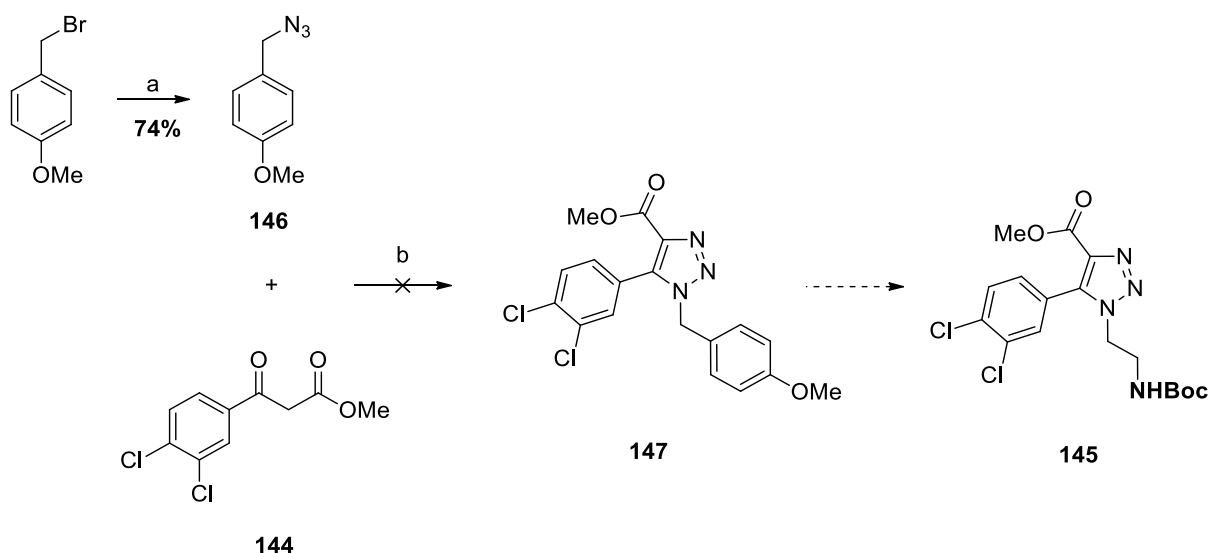
Une stratégie de synthèse visant à substituer la position 1 du triazole par un groupement temporaire *p*-méthoxybenzyle a été imaginée afin d'obtenir après déprotection à l'acide trifluoroacétique le composé **148**, libérant ainsi l'atome d'azote capable de réagir avec la chaîne aminée pour former le composé **145**.<sup>197</sup>

Le bromure de *p*-méthoxybenzyle a bien été converti en azoture **146** avec un rendement de 74%, cependant la cyclisation catalysée par l'éthanolate de sodium a été un échec (Schéma 50).

<sup>195</sup> Lynch, S. M. Preparation of substituted triazole and imidazole compounds as LMP7 inhibitors. WO 2014086663 A1. 2014.

<sup>196</sup>Yang, P.; Xu, H.; Zhou, J. S. Nickel-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Olefins for the Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (45), 12210–12213.

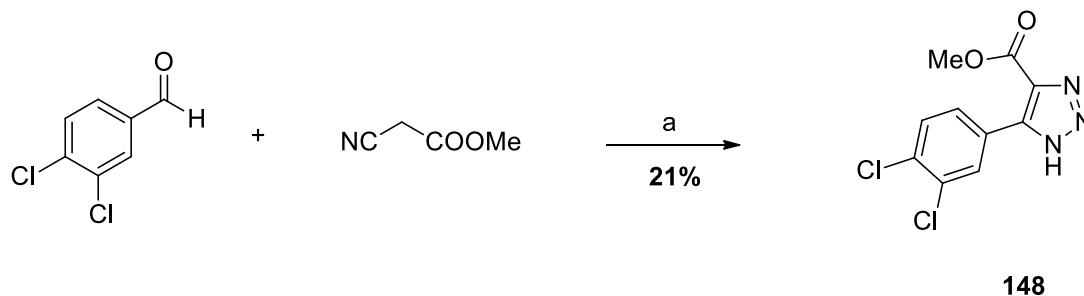
<sup>197</sup>Buckle, D. R.; Rockel, C. J. M., Studies on *v*-triazoles. Part 4. The 4-methoxybenzyl group, a versatile *N*-protecting group for the synthesis of *N*-unsubstituted *v*-triazoles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* **1982**, 627-630.



Réactifs et conditions : (a)  $\text{NaN}_3$  (1,1 éq.),  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 3 h, 74% ; (b)  $\text{EtONa}$  (1,2 éq.),  $\text{MeOH}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 20 h.

**Schéma 50 : Essai de synthèse du triazole 145 par la voie 2**

Une deuxième voie de synthèse a été envisagée visant dans un premier temps à synthétiser l'intermédiaire réactionnel **148**, par réaction directe entre 3,4-dichlorobenzaldéhyde et le cyanoacétate de méthyle en présence d'azoture de sodium (Schéma 51). Le composé est obtenu avec un faible rendement de 21% en accord avec la littérature.<sup>198</sup>

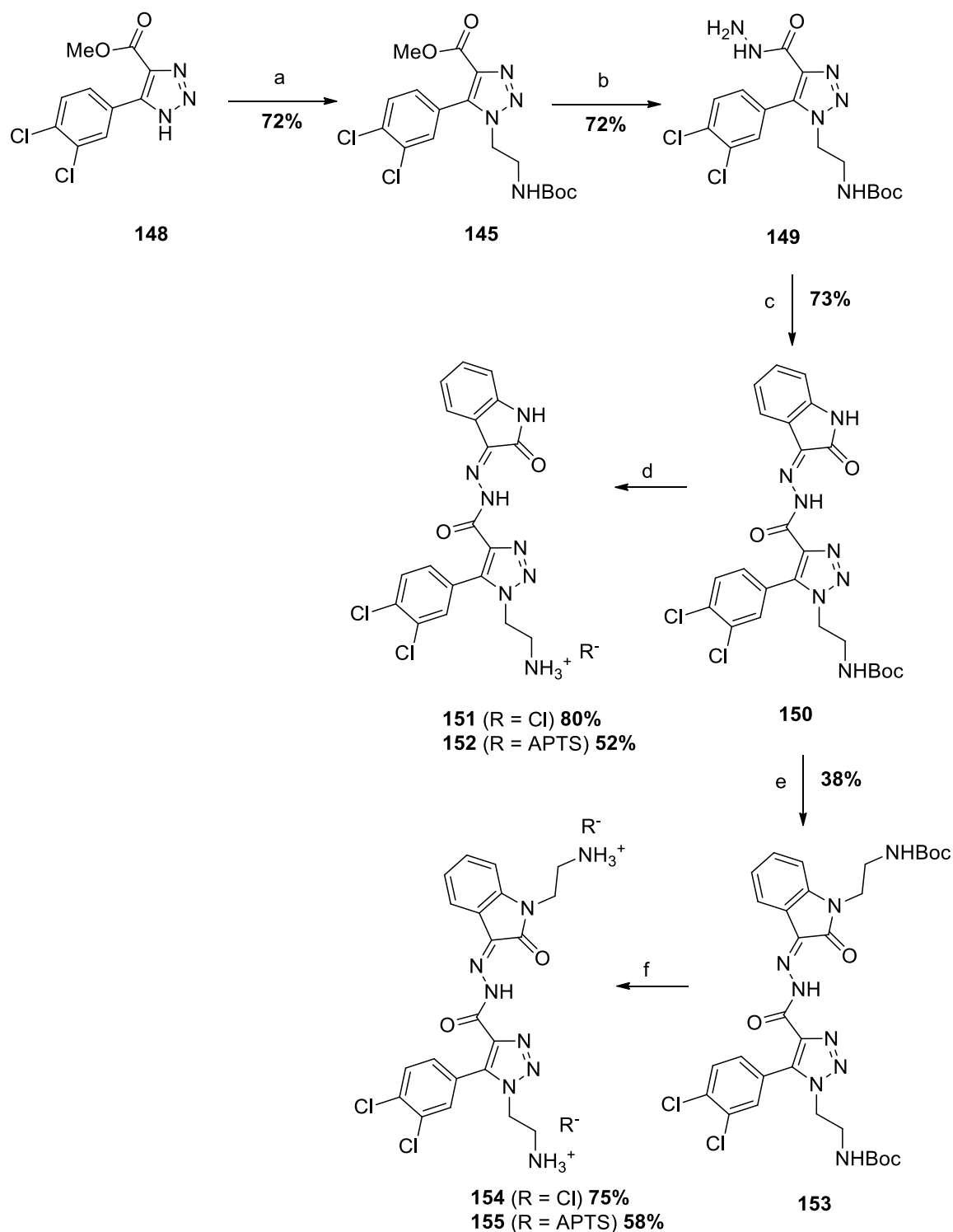


Réactifs et conditions : (a)  $\text{Et}_3\text{N}$  (2éq.),  $\text{NaN}_3$  (3éq.),  $\text{DMF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 2 h, 21%.

**Schéma 51 : Synthèse du composé 148**

Le composé **148** est ensuite alkylé par une chaîne aminoéthyle protégée par un groupement Boc pour donner le composé **145** (Schéma 52). En utilisant la stratégie de synthèse précédente, le composé **145** est transformé en carbohydrazide **149** puis condensé sur l'isatine pour former le composé **150** avec un rendement de 73%. Ce dernier peut être substitué de nouveau par une chaîne aminée protégée pour conduire au composé **153**. Enfin les 2 précurseurs **150** et **153**, porteurs de groupements Boc, sont déprotégés soit en présence de  $\text{HCl}$  4 M, soit avec de l'acide paratoluène

<sup>198</sup> Buckman, B. O.; Nicholas, J. B.; Emayan, K.; Seiwert, S. D., Lysophosphatidic acid receptor antagonists. US 2014/0200215 A1, 2014.



Réactifs et conditions : (a) BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl (1,3 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), NaI (6 éq.), ACN, reflux, 16 h, 72% ; (b) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (15 éq.), EtOH, reflux, 3 h, 72% ; (c) Isatine (0,9 éq.), AcOH (qq gouttes), EtOH, reflux, 16 h, 73% ; (d) HCl 4 M (15 éq.), dioxane, 25 °C, 4 h, 52-80% ; (e) BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 éq.), ACN/DMF, 85 °C, 16 h, 38% ; (f) HCl 4 M (15 éq.), dioxane, 25 °C, 4 h, 58-75%.

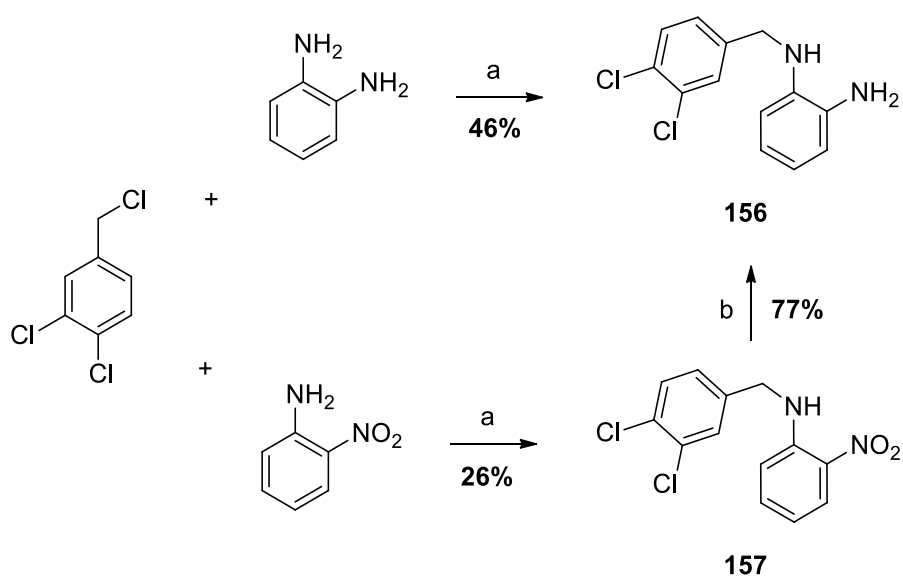
**Schéma 52 : Synthèse des composés cibles 151, 152 et 154, 155**

sulfonique afin d'obtenir les chlorures et les paratoluènesulfonates d'ammonium **151**, **152** et **154**, **155** et étudier l'influence du contre-ion.

### C. Fragmentation de la molécule **101**

Une démarche a également été abordée à la fin de ce projet visant à synthétiser des fragments de la molécule cible **101**. Les principaux avantages à utiliser des fragments comme molécules de départ repose sur leur petite taille et leur faible poids moléculaire (MW <300 g/mol) qui présentent souvent de meilleures propriétés physico-chimiques et pourrait palier aux problèmes de solubilité rencontrés.

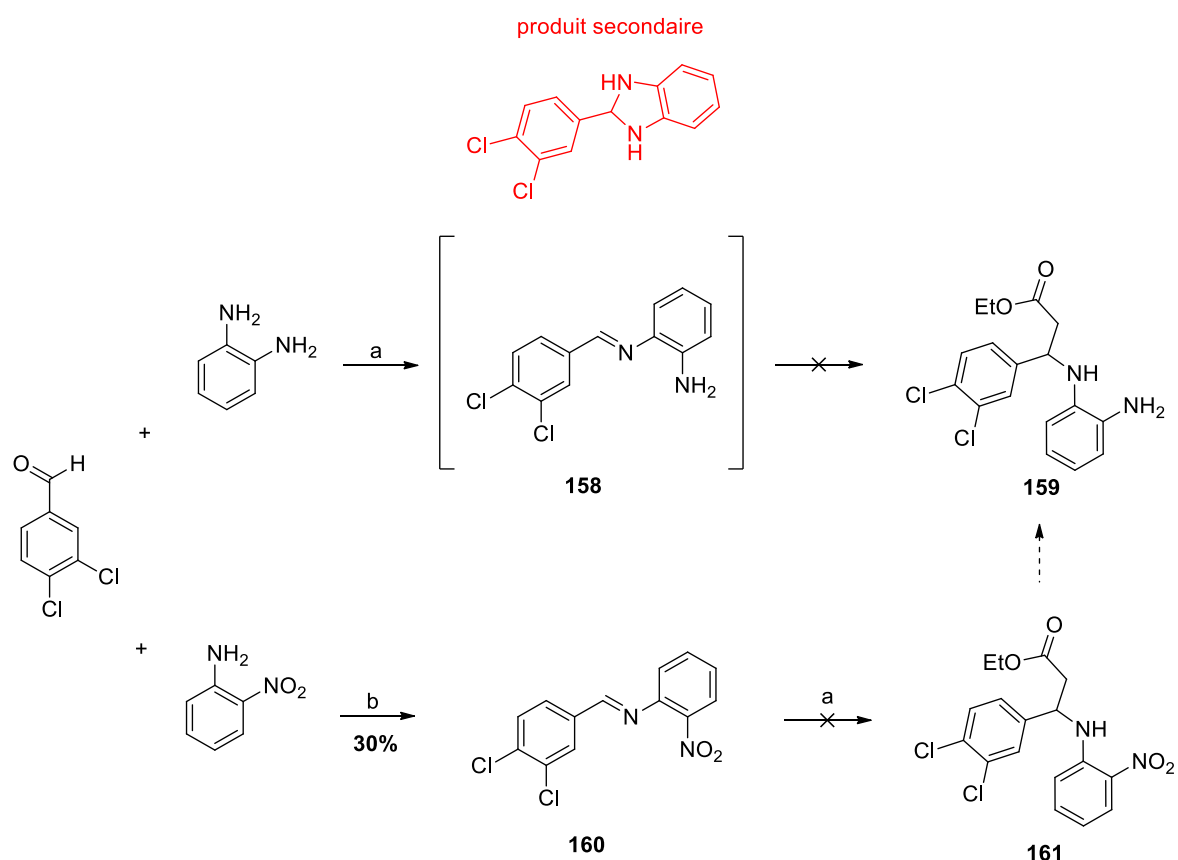
Le composé **156** est obtenu directement par substitution nucléophile de la 2-phenyldiamine sur le chlorure de 3,4-dichlorobenzène dans le méthanol avec un rendement de 46% (Schéma 53). Compte tenu du faible rendement obtenu causé par l'obtention d'un sous produit correspondant à une double substitution, une seconde voie a été envisagée. Dans un premier temps, la substitution est réalisée dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais cette fois avec l'*o*-nitroaniline pour conduire à l'intermédiaire **157**. Dans un deuxième temps, la réduction de la fonction nitro est réalisée en présence de dithionite de sodium et d'ammoniaque aqueuse pour obtenir le composé cible **156** avec un rendement de 20% sur les deux étapes. La première voie de synthèse reste néanmoins la plus intéressante. En effet, la fonction nitro en position ortho réduit fortement le caractère nucléophile de la fonction amine de l'aniline et la rend moins réactive vis-à-vis du dérivé chloré.



Réactifs et conditions : (a)  $K_2CO_3$  (1,5 éq.), MeOH, 25 °C, 4 h ; (b)  $Na_2S_2O_4$  (10 éq.),  $NH_{3aq}$  (10 éq.), THF/ $H_2O$ , 25 °C, 20 h, 77%.

Schéma 53 : Synthèse du composé **156**

Enfin, la synthèse d'un analogue du composé **101** a été envisagée visant à supprimer l'hétérocycle triazolique central et à ne substituer que l'atome d'azote lié au groupe 2-aminophényle. Nous avons tout d'abord tenté de synthétiser cette molécule cible par une réaction de type Mannich utilisant un aldéhyde, une amine et un ester.<sup>199</sup> Le 3,4-dichlorobenzaldéhyde est mis en réaction avec la 2-aminoaniline pour former l'imine correspondante **158** (Schéma 54). Cependant, cette dernière étant fortement réactive, un produit secondaire a été détecté résultant d'une réaction intramoléculaire et non avec l'acétate d'éthyle pour donner le composé **159**. Une seconde voie de synthèse a donc été entreprise en isolant pour commencer l'imine **160** nitré obtenue à partir de la 3,4-dichlorobenzaldéhyde et de l'*o*-nitroaniline.<sup>200</sup> Cependant, le caractère électroattracteur de la fonction s'avère une nouvelle fois être un problème pour la synthèse de l'intermédiaire **161**.



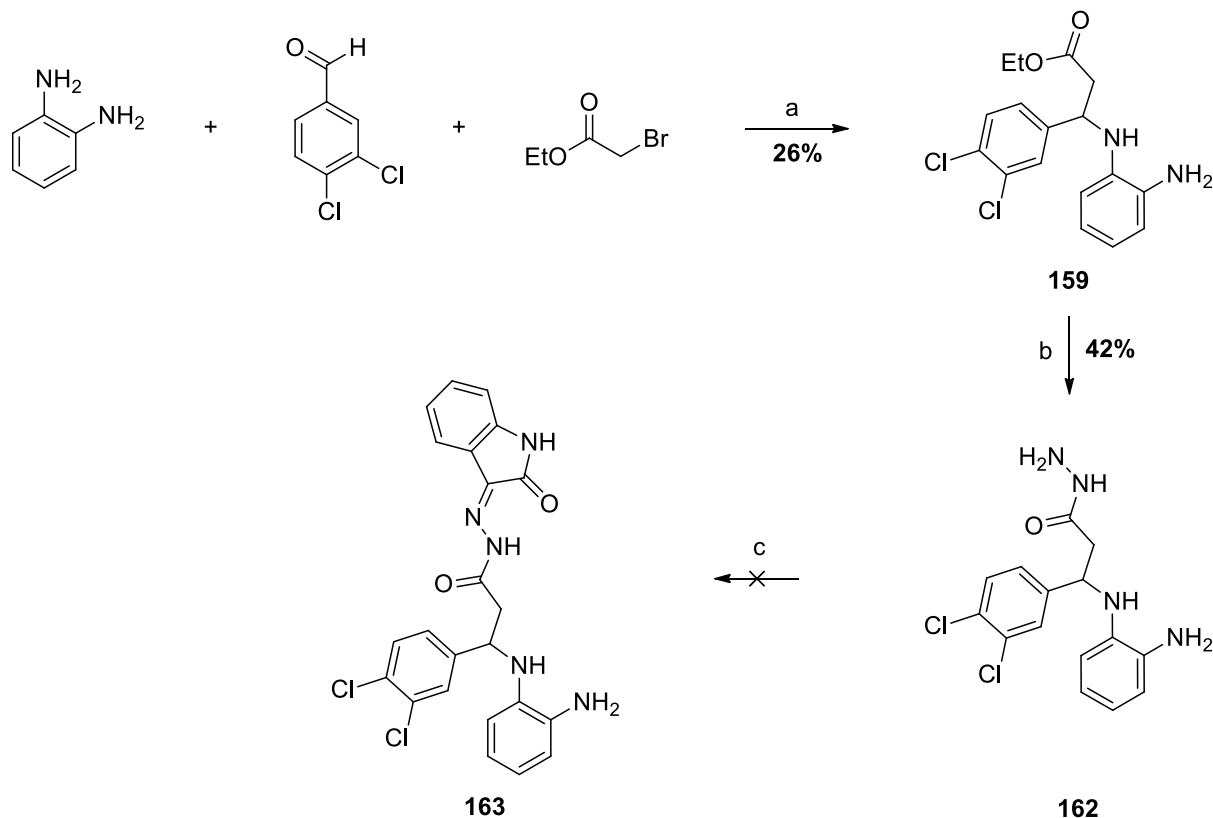
Réactifs et conditions : (a) AcOEt (1.3 éq.), TMSOTf (1.3 éq.), Et<sub>3</sub>N (1.2 éq.), DCM, 25 °C, 8 h ; (b) Toluène, reflux, 20 h, 30%.

**Schéma 54 : Synthèse du composé 159 par la voie 1**

<sup>199</sup>Wade Downey, C.; Ingersoll, J. A.; Glist, H. M.; Dombrowski, C. M.; Barnett, A. T. One-Pot Silyl Ketene Acetal-Formation Mukaiyama-Mannich Additions to Imines Mediated by Trimethylsilyl Trifluoro-methanesulfonate: One-Pot Mukaiyama-Mannich Addition Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015 (33), 7287–7291.

<sup>200</sup>Patil, C. J.; Patil, M. C.; Patil, M. C. Studies on Synthesis of Aromatic Schiff Bases: Part-II. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Ketimines from Benzophenone with Substituted-Anilines. *JCBPS.* **2016**, 6, 241-247.

Finalement, un nouvel essai utilisant la réaction de Reformatsky a été envisagé faisant intervenir un dérivé organozincique. La 2-aminoaniline, la 3,4-dichlorobenzaldéhyde et le bromoacétate d'éthyle sont engagés dans une réaction multi-composante pour conduire au composé **159** avec un rendement faible de 26% (Schéma 55).<sup>201</sup> Ce dernier est transformé en carbohydrazide **162** par l'action de l'hydrazide monohydrate. Cependant, une dégradation du composé a été observée lors de la condensation à l'isatine dans les conditions standard pour donner le composé cible **163**.

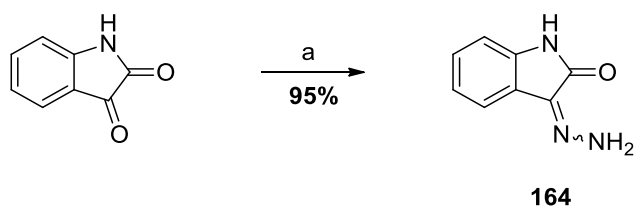


Réactifs et conditions : (a) Zn (4 éq.), ACN, 25 °C, 1 h, 26% ; (b) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (20 éq.), EtOH, reflux, 20 h, 42% ; (c) Isatine (0,9 éq.), AcOH (qq gouttes), EtOH, reflux, 24 h.

**Schéma 55 : Synthèse du composé cible 163**

Pour finir avec cette approche, le fragment **164** a été obtenu par condensation de l'hydrazine monohydrate sur l'isatine avec un rendement de 95% (Schéma 56).

<sup>201</sup>Sengmany, S. and Le Gall, E. An Expedient Three-Component Approach to the Synthesis of  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amines under Barbier-like Conditions. *Synlett*. **2008**, 7, 1031-1035.



Réactifs et conditions : (a)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1 éq.), MeOH, reflux, 3 h, 95%.

**Schéma 56 : Synthèse du composé 164**

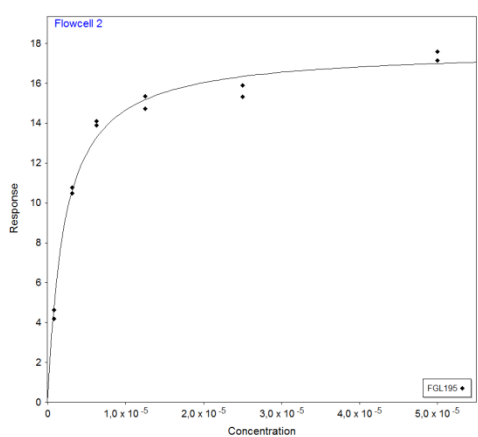
## V. Evaluation

Bien que les résultats obtenus aujourd'hui soient insuffisants pour établir des relations structure-activité, certains paramètres ont pu être évalués grâce au développement des méthodes biophysiques et au travail des biologistes impliqués dans ce projet.

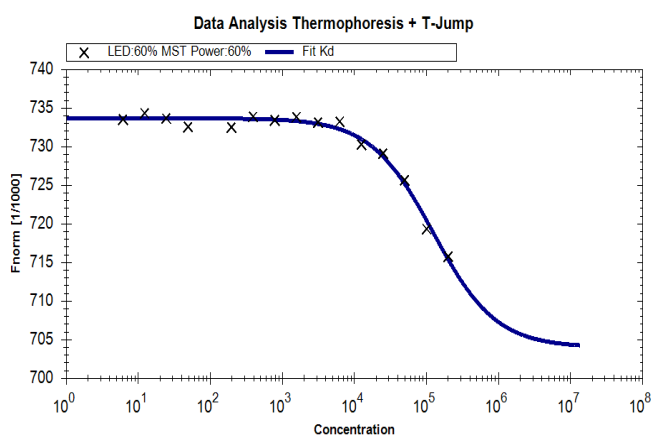
### A. Validation du motif aminophényle

Après validation du composé **II** issu de l'étape initiale de docking comme inhibiteur du complexe YAP-TEAD, nous avons voulu nous assurer rapidement que le remplacement du motif l'aminooxadiazole par l'*o*-aminophényle n'avait pas un impact important sur l'activité biologique.

Dans un premier temps, le composé **101** a été soumis à des études d'interactions moléculaires (Figure 68). En SPR, une interaction est mesurée vis-à-vis de la protéine hTEAD4<sub>1-434</sub> avec une affinité de 1,7  $\mu\text{M}$ , soit du même ordre de grandeur que celle obtenue pour la molécule **II** (3,4  $\mu\text{M}$ ). En revanche en MST, le problème de solubilité a perduré puisque l'affinité mesurée est de 111  $\mu\text{M}$ , soit 100 fois supérieure à celle obtenue par SPR.



Courbe de réponse obtenue par SPR

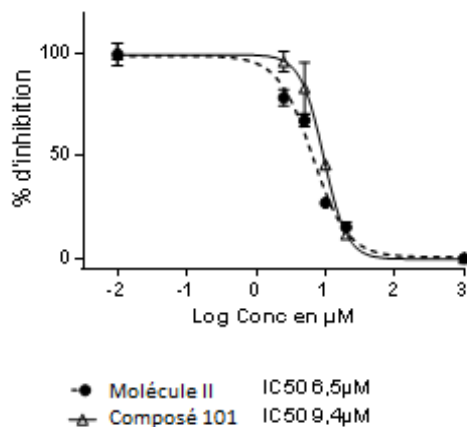


Courbe de réponse obtenue par MST

**Figure 68 : Affinités du composé 101 mesurées par SPR et MST**



En parallèle, l'activité biologique du composé **101** a été mesurée sur des cellules HEK293 grâce au gène rapporteur à la luciférase et montre un effet inhibiteur légèrement moins important que celui de la molécule de référence **II** (Figure 69).

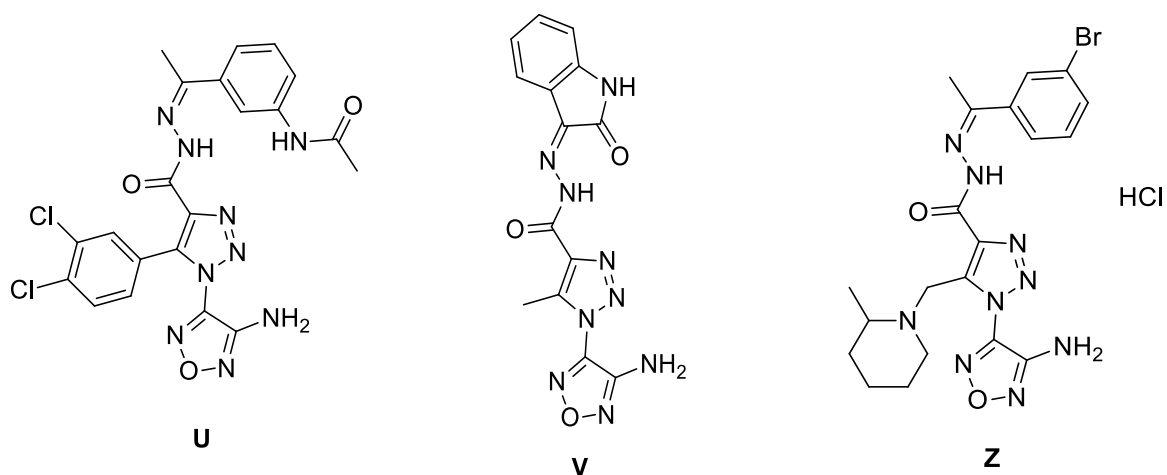


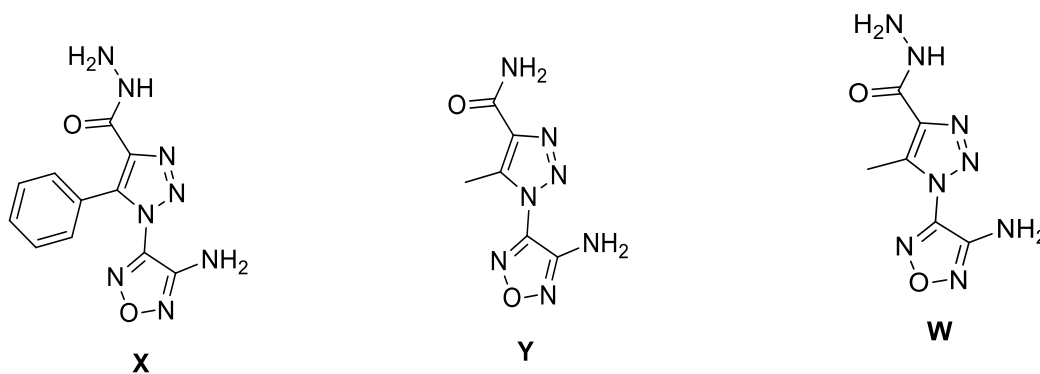
**Figure 69 : Pourcentage d'inhibition du complexe YAP-TEAD induit par la molécule 101**

Ces résultats ont permis de valider le motif aminophényle au remplacement de l'aminooxadiazole et continuer le programme de recherche autour de ce nouveau hit.

## B. Evaluation de derives commerciaux

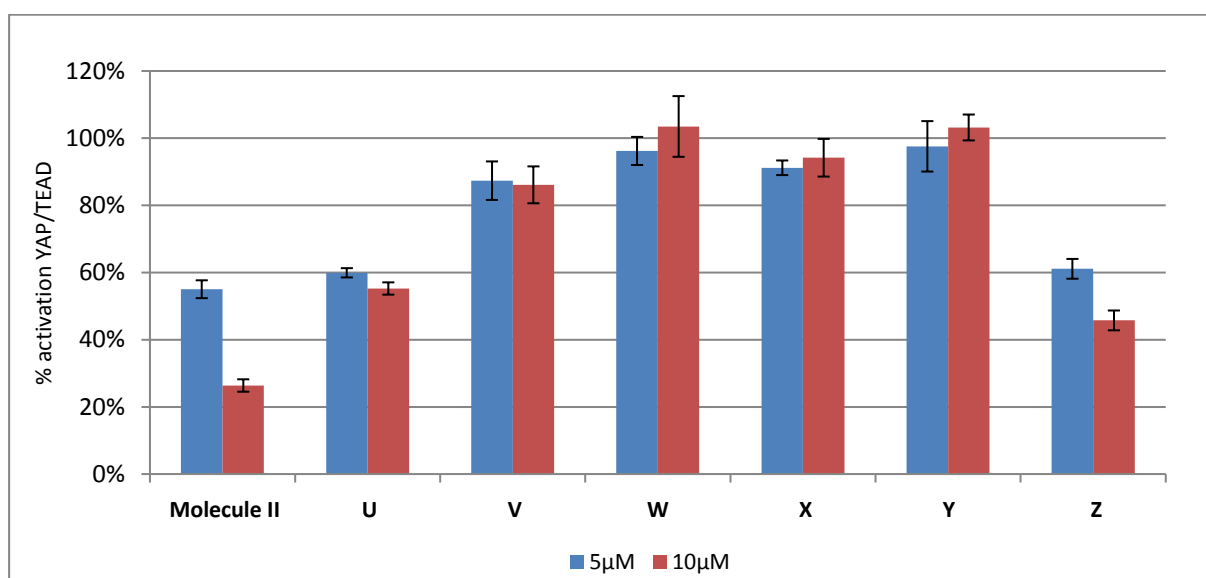
6 molécules commerciales représentant les fragments du composé **II** ont été achetées et testées pour compléter le panel d'analogues (Figure 70).





**Figure 70 : Structures des molécules commerciales**

Par comparaison à la molécule de référence **II**, le manque d'activité du composé **V** permet de confirmer l'importance de la partie dichlorophényle (Figure 71). L'activité négligeable des composés **X-W** valide l'observation précédente mais également le rôle essentiel de l'isatine. L'activité surprenante de la molécule **Z** pourrait provenir de la pipéridine en position 5 et laisse entrevoir la possibilité d'une piste de pharmacomodulation future. Bien que la molécule **U** se rapproche structurellement du composé cible, son effet inhibiteur reste néanmoins moins puissant.



**Figure 71 : Pourcentage d'activation du complexe YAP-TEAD induit par les molécules U-Z**

En parallèle, la cytotoxicité des molécules a été mesurée sur cellules SY5Y et semble être corrélée avec avec l'activité biologique (Tableau 19).

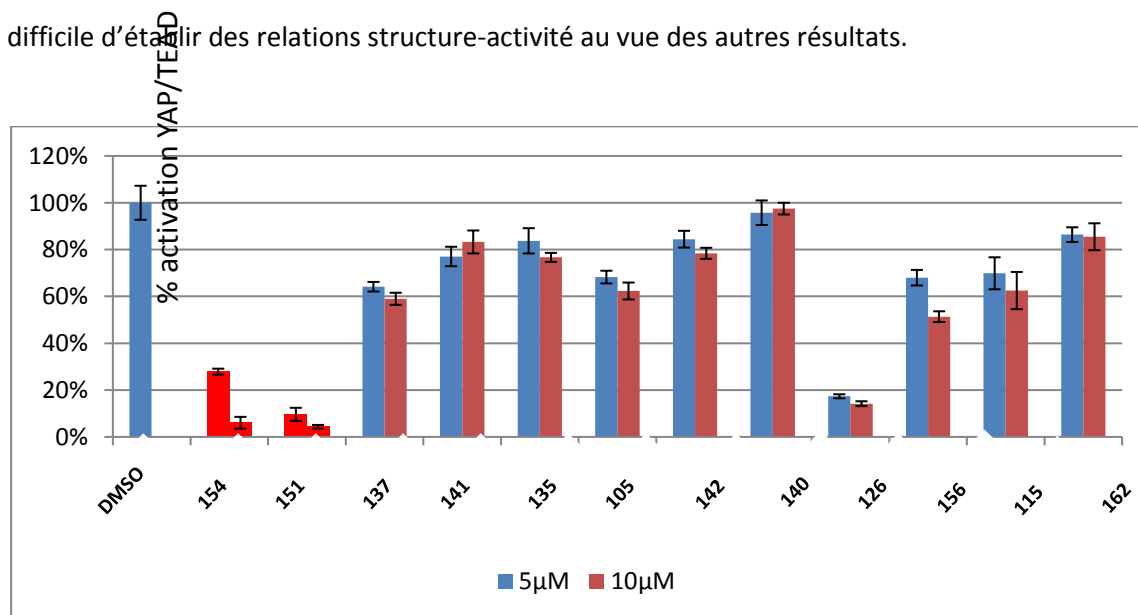
Composé	Cytotoxicité*	Composé	Cytotoxicité*	Composé	Cytotoxicité*
U	96%	W	26%	Y	13%
V	58%	X	23%	Z	35%
II	95%	101	93%		

\*La cytotoxicité est mesurée en pourcentage de cellules SY5Y mortes après 24 de traitement à 10  $\mu$ M.

**Tableau 19 : Cytotoxicité des composés II, U-Z et 101**

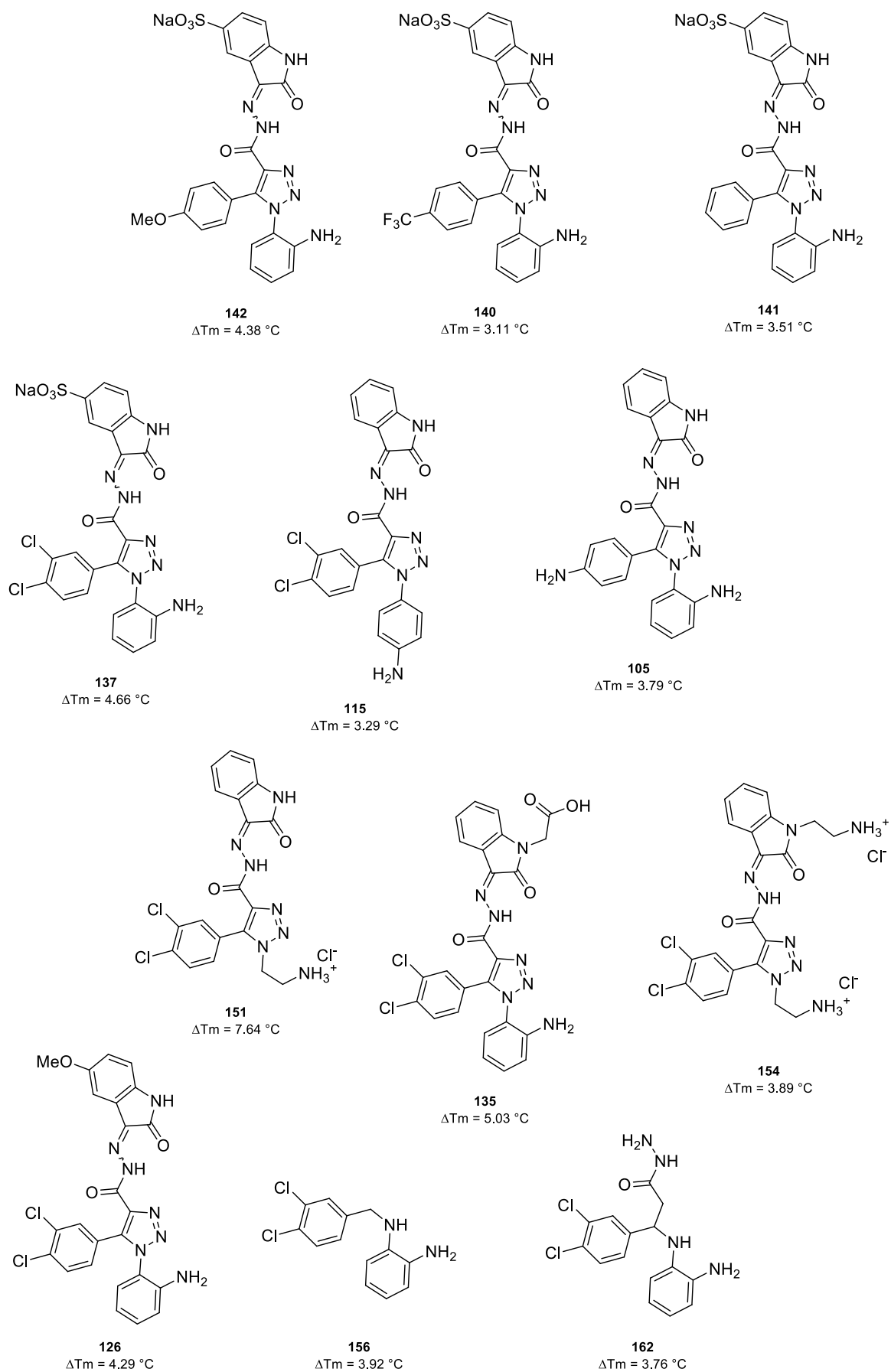
### C. Evaluation des composés

Dans un premier temps, toutes les molécules cibles présentées précédemment ont été soumises au test TSA afin de ne se focaliser que sur les plus actives. 12 molécules ont ainsi pu être identifiées avec un  $\Delta T_m$  supérieur à 3 degrés (Figure 73) avec une majorité de composés présentant une fonction protonable. Les paramètres biologiques de ces molécules ont par la suite été évalués grâce au gène rapporteur à la luciférase sur cellules HEK293 (Figure 72). Avec seulement 20% d'activation du complexe pour le composé **126** et à peine 10% pour les composés **151** et **154** à 10  $\mu$ M, ces trois molécules semblent prometteuses mais nécessitent des analyses complémentaires. Il est tout même difficile d'établir des relations structure-activité au vue des autres résultats.



**Figure 72 : Pourcentage d'activation du complexe YAP-TEAD induit par les composés**

Bien que les molécules **151** et **154** semblent inhiber la formation du complexe YAP-TEAD, elles se sont avérées toxiques sur les cellules. Une étude de concentrations a donc été réalisée afin de déterminer la concentration maximale à utiliser pour avoir des résultats exploitables (Figure 74).



**Figure 73 : Structures des composés issus du TSA**

Même si pour une concentration maximale de 1  $\mu\text{M}$  la toxicité n'est pas présente, l'activité inhibitrice des molécules est nettement réduite.

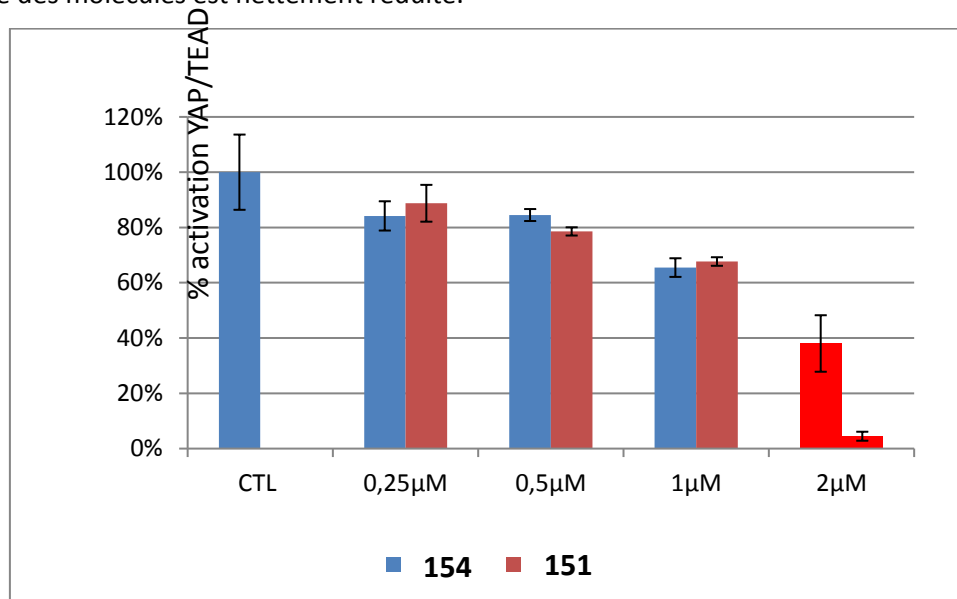


Figure 74 : Etude de l'influence de la concentration des composés 151 et 154

Nous avons émis l'hypothèse que cette toxicité pouvait provenir du contre-ion. Dans cette optique, les composés **154** et **155**, issus de la déprotection du groupement Boc par l'acide paratoluène sulfonique, ont été synthétisés puis testés mais les résultats cellulaires obtenus sont similaires. La toxicité n'est donc pas dépendante de la nature du contre-ion.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La voie Hippo est une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des cancers et attire de nombreux laboratoires académiques et privés. Les travaux réalisés durant ces 3 années de thèse ont porté sur la conception, la synthèse et l'évaluation d'inhibiteurs du complexe protéique YAP-TEAD à visée anticancéreuse. Dans cette optique, des molécules originales non peptidiques ont été synthétisées ciblant d'une part la protéine cytoplasmique YAP et d'autre part le facteur de transcription nucléaire TEAD.

- Cibler la protéine YAP

Découvertes par *Liu-Chittenden* et ses collaborateurs, la Vertéporfine et la Protoporphyrine IX ont été identifiées comme des inhibiteurs de l'interaction YAP-TEAD. Cependant leur mode d'action étant toujours méconnu, nous avons souhaité rechercher le motif structural minimal gardant l'activité biologique et ainsi tenter de réduire la phototoxicité induite par ce type de molécules. Dans ce but, un premier travail de recherche a permis de synthétiser 6 dipyrines hexasubstituées dont la molécule **31**, représentant la partie ouest du diester méthylique de la Protoporphyrine IX (Figure 75).

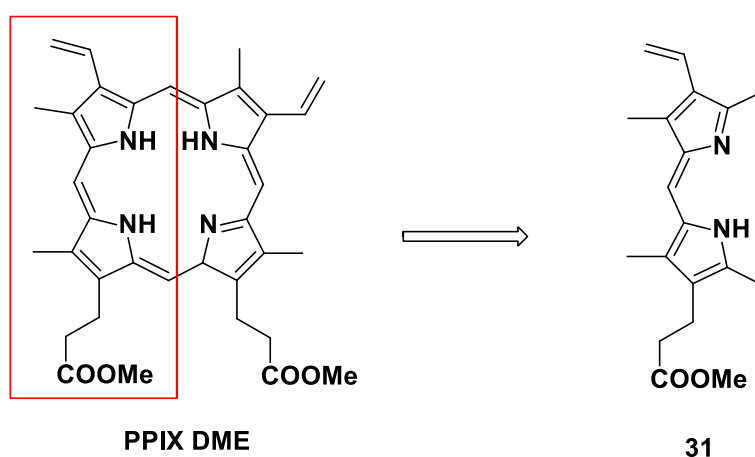


Figure 75 : Représentation de la molécule 31

La difficulté de synthèse de ce composé réside dans l'introduction du motif sensible vinylique. Après de nombreuses voies de synthèses incluant des essais de déshydratation et de réaction de Stille, la molécule cible a été obtenue après une étape ultime de déshydroiodation. Bien que la dipyrine **38** substituée par deux groupements vinyle, montre une diminution de l'activité transcriptionnelle du complexe YAP-TEAD, elle semble également inhiber l'expression de la protéine YAP qui traduit une légère protéotoxicité. Les autres molécules ne présentent pas une inhibition de l'expression des différents gènes cibles aussi intéressante que celle liée à la Vertéporfine. De plus, les porphyrines et dipyrines ayant une fluorescence intrinsèque, elles n'ont pu être évaluées avec les techniques biophysiques mises au point basées sur la fluorescence.

Malgré les nombreux échecs rencontrés, cette première partie de thèse m'a permis de contribuer à la rédaction d'une revue (CurrMedChem) et a donné lieu à une publication (ChemMedChem).

#### - Cibler la protéine TEAD

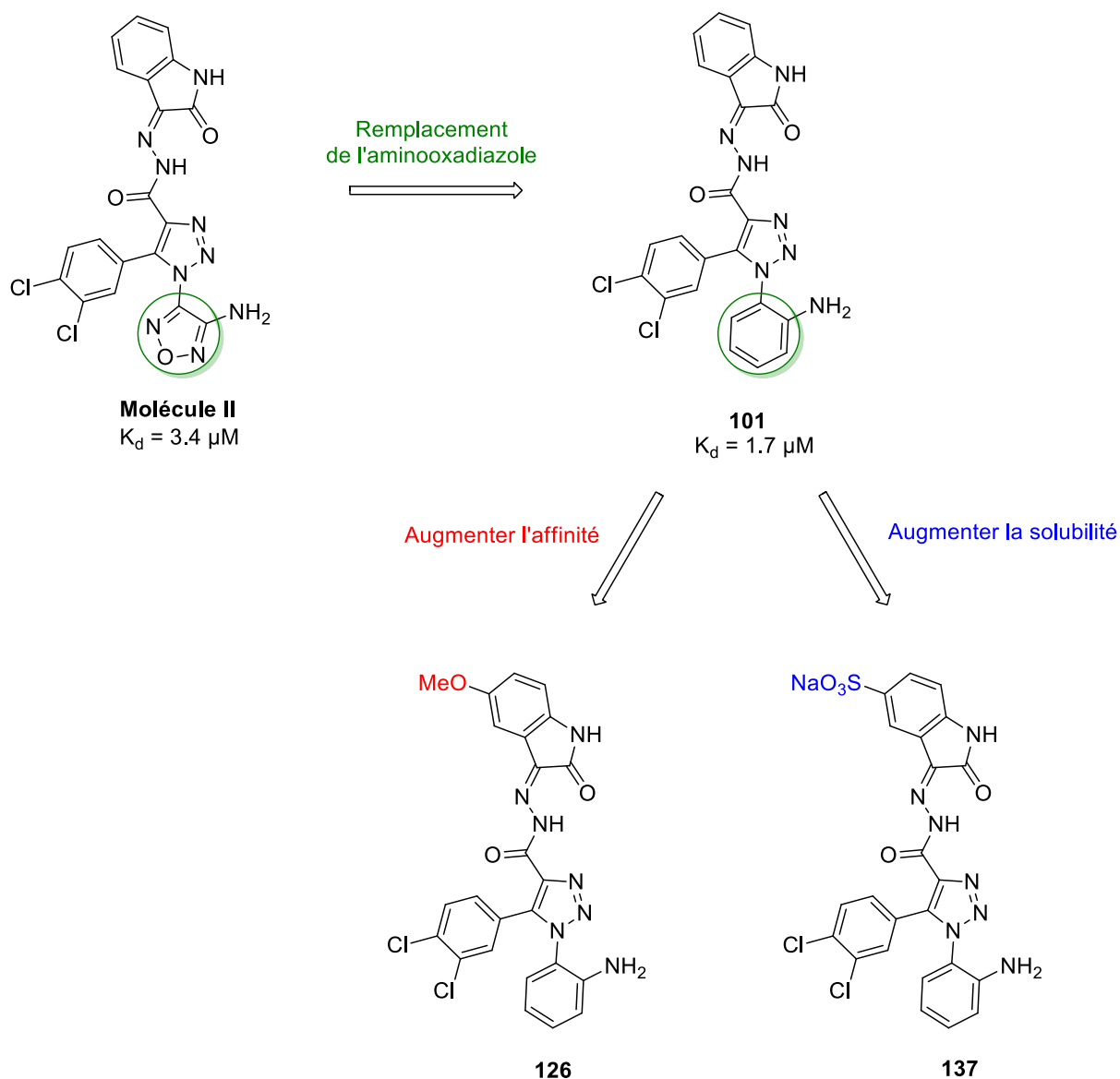
La protéine TEAD étant naturellement structurée, la conception d'inhibiteurs du complexe YAP-TEAD, ligands de TEAD est une approche plus pertinente. Dans cette optique, un criblage virtuel au niveau de la poche hydrophobe de TEAD correspondant à l'interface 3 a été effectué et a permis d'identifier la molécule **II** comme hit prometteur. En effet avec une affinité de 3,4  $\mu\text{M}$  pour la protéine hTEAD<sub>41-434</sub> et une inhibition de l'expression des différents gènes cibles de la voie Hippo, la molécule **II** est un bon point de départ pour un programme de recherche en chimie médicinale.

Compte tenu de sa structure originale, un vaste programme d'optimisation a été entrepris. Dans un premier temps pour des raisons essentiellement de sécurité, l'aminooxadiazolyle présent en position 1 sur la molécule a été remplacé par le motif aminophényle pour conduire au composé **101**. Ce hit de départ montrant des affinités et activités biologiques similaires, de nombreuses modulations ont pu être envisagées au niveau des positions 1 et 5 de l'hétérocycle central triazolique, du bras espaceur entre le triazole central et l'isatine, et au niveau du motif isatinique lui-même (Figure 76).

Diverses modulations ont également été apportées afin d'améliorer la solubilité aqueuse qui s'est avérée être un problème pour l'évaluation biophysique des molécules. L'ajout de chaînes protonables sur l'isatine et/ou en position 1 du triazole s'est révélé efficace puisqu'avec une solubilité de 184  $\mu\text{M}$ , la fonction sulfonate semble être la meilleure alternative pour tendre vers des composés solubles en milieu physiologique.

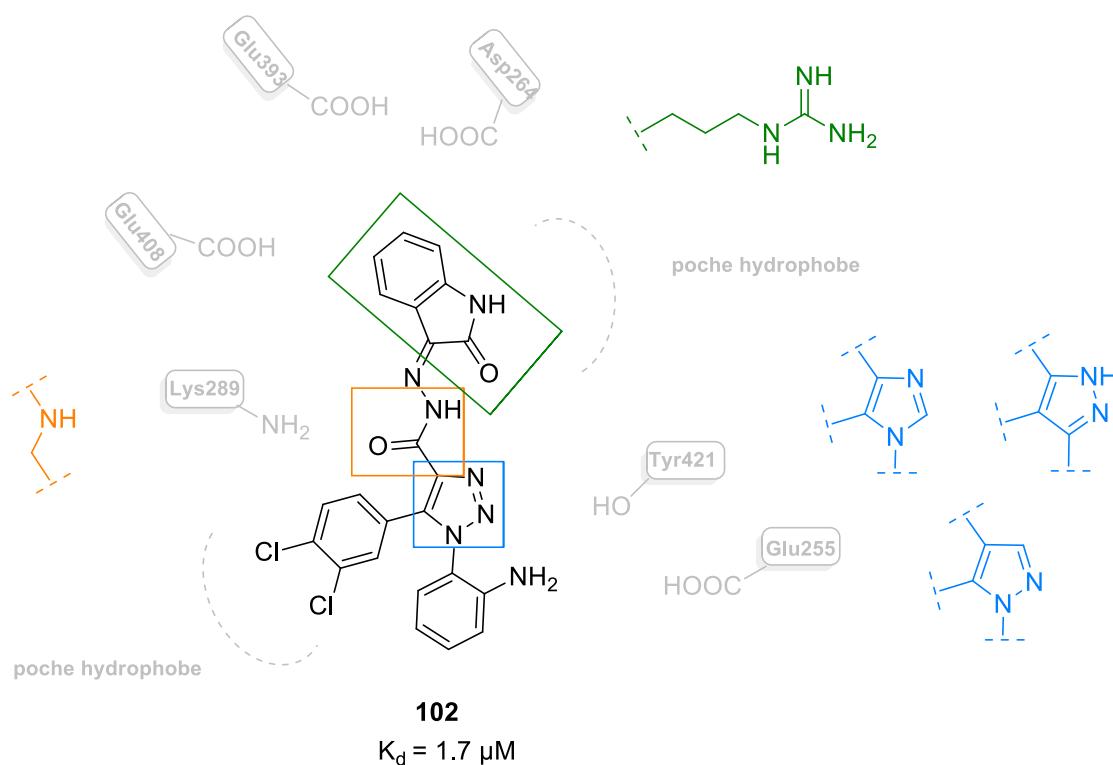
Une première sélection de molécules a été faite par le biais du test TSA et a permis d'identifier 12 molécules ( $\Delta T_m > 3,5$  °C) dont les propriétés biologiques ont par la suite été évaluées sur cellules HEK293 grâce au gène rapporteur à la luciférase. Malgré une forte toxicité présente chez certains composés, le composé **126** est ressorti avec un résultat très prometteur et sera évalué sur différentes lignées cancéreuses en vue de mesurer les différents paramètres liés à l'apoptose et à la possibilité de former des métastases. Compte tenu du faible nombre de molécules testées à ce jour, il nous est impossible d'établir des relations structure-activité et déterminer un motif central caractéristique d'un ligand de TEAD.





**Figure 76 : Représentation des modifications apportées**

Néanmoins, la structure de la molécule **101** ouvre des perspectives très intéressantes pour des travaux futurs (Figure 77). D'une part, le triazole central sera modifié par des diazoles dans le but de valider l'interaction avec Tyr<sub>421</sub> et de déterminer l'influence réelle des différents atomes d'azote du triazole. L'isatine pourrait par la suite être remplacée par un bras portant un groupe guanidinium afin d'établir des liaisons ioniques potentielles avec les 3 résidus acide en profondeur. Enfin, le carbonyle du bras espaceur pourrait être supprimé pour confirmer son interaction avec Lys<sub>289</sub>.

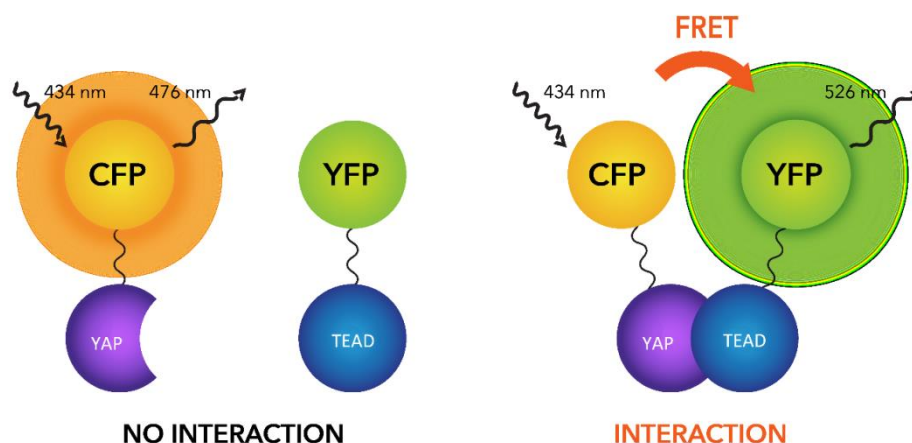


**Figure 77 : Représentation des modulations futures**

Au cours de ces trois années de thèse, diverses techniques biophysiques et cellulaires ont été développés dans le but de tester les molécules et établir des relations structure-activité. Dans un premier temps, la SPR a été choisie pour démarrer le projet car elle nécessite une faible quantité protéine. Bien qu'elle nous ait permis de mesurer les affinités des deux hits principaux, elle n'a pu être utilisée pour la suite à cause de la solubilité insuffisante de beaucoup de nos composés. Nous nous sommes donc orientés vers une technique plus récente : la MST. Malgré la facilité d'utilisation de cette technique, elle requiert un marquage de la protéine à étudier parfois contraignant. En effet, dans notre cas, il s'est avéré que l'affinité de nos ligands est dépendante du marquage effectué et conduit à une non reproductibilité des résultats. C'est pourquoi, une nouvelle méthode utilisant la MST a été envisagée en produisant une protéine de fusion GFP-TEAD afin de s'affranchir du marquage difficilement reproductible. Le développement de ce test est actuellement en cours et nous a déjà permis de mesurer une interaction hYAP<sub>50-102</sub>-hTEAD<sub>217-447</sub> de 92 nM en accord avec la littérature et ainsi de valider le protocole utilisé.

Un test FRET a également été mis au point dans le but de faire des études de compétition peptide/ligand. Bien que les conditions optimales aient été déterminées, nous n'avons pu évaluer les composés à cause d'une dégradation de la protéine commerciale à deux reprises. Dans l'attente d'une production et purification « maison » des protéines TEAD pour palier à ce problème, nous

avons reconsidéré la technique à utiliser et décidé de se lancer dans un test FRET *in cellulo* (Figure 78). Le modèle utilisera une protéine CFP, greffée à YAP, qui une fois excitée transfèrera son énergie à la protéine YFP, reliée à TEAD. En présence de ligand, la fluorescence devrait diminuer et nous permettra de mesurer les IC<sub>50</sub> associées au complexe YAP-TEAD.

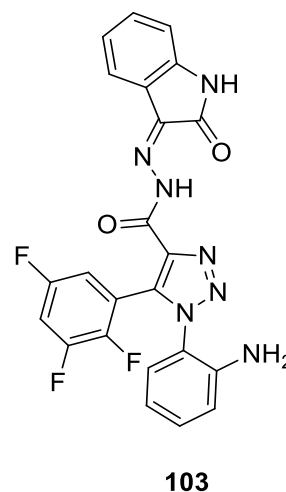
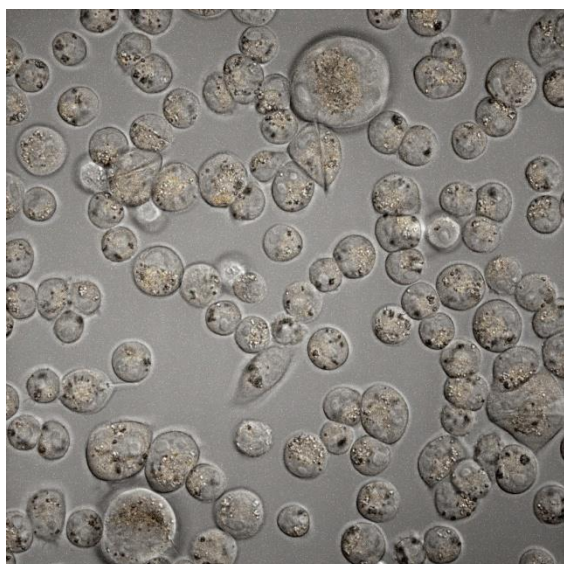


**Figure 78 : Représentation schématique du FRET *in cellulo***

Désormais, le cheminement de l'évaluation des composés se déroulera comme suit. Les molécules issues d'une première sélection au TSA seront évaluées grâce au gène rapporteur à la luciférase sur des cellules HEK293. Par la suite, les propriétés physicochimiques des meilleures molécules seront mesurées en MST et en FRET. Les hits présentant des résultats satisfaisants feront ensuite l'objet d'études biologiques sur des lignées cancéreuses telles que HCT-116 (cancer du côlon) et MDA-MB-231 (cancer du sein) et autres types de cancer où les effecteurs finaux de la voie hippo sont surexprimés. Pour finir, les paramètres cellulaires des molécules les plus prometteuses seront évalués sur des modèles résistant au 5-FU avant de tendre vers des études *in vivo*.

Une collaboration avec l'équipe du Professeur Jean-François GUICHOU vient de démarrer dans le but de cristalliser la protéine hTEAD<sub>217-447</sub> en présence de nos ligands. Cette approche permettrait de valider le mode d'action des molécules et d'anticiper les modifications à venir. A ce stade, bien que la protéine cristallise idéalement dans les conditions décrites par la littérature, aucun composé n'a pour le moment réussi à co-cristalliser. Cet échec est sûrement dû à la solubilité des molécules et à leurs poids moléculaires trop élevés. C'est pourquoi, les petits fragments synthétisés serviront prochainement à cette approche.

Le suivi de molécules au sein de la cellule est une démarche récemment entreprise en collaboration avec le Dr Xavier Thuru et M. Romain Magnez. Bien que ce soit le premier essai, nous pouvons observer que la molécule **103** traverse la membrane nucléaire pour se concentrer au niveau du noyau après 3 h d'incubation dans une cellule CHO à 37 °C (Figure 79). Cependant, le bruit de fond étant relativement important, un nouveau composé sera synthétisé en greffant la spermine sur le composé pour améliorer la fluorescence.



**Figure 79 : Photo des cellules CHO après 3 h d'incubation en présence de la molécule 103**

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## I. **Chemical synthesis**

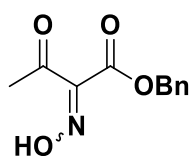
### A. **Material and instrumentation**

Chemicals and solvents were purchased from various suppliers (Sigma–Aldrich, Alfa Aesar, Fisher, VWR) and used without purification. Reaction monitoring was performed by thin layer chromatography (TLC) on Macherey-Nagel Alugram Sil 60/UV254 (thickness=0.2 mm). TLC was revealed by UV ( $\lambda=254$  nm) and/or the appropriate stain. Purification of compounds was carried out using column chromatography (flash or manual). Manual chromatography was performed using Macherey-Nagel silica gel (particle size=0.04–0.063 mm). Flash chromatography was performed on a Reveleris Flash Chromatography System using Büchi flash RS columns. NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$  and 75 MHz for  $^{13}\text{C}$ . Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS) or to residual proton signal in deuterated solvents. Chemical shifts are reported as position ( $\delta$  in ppm), multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=massif, br s=broadened singlet), coupling constant ( $J$ , in Hz), relative integral, and assignment. Attributions of protons and carbons were achieved by analysis of 1D and 2D experiments ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, and HMBC). Mass spectra were performed on a Water XBridge C18 column (5  $\mu\text{m}$  particule size, dimensions 50 mm x 46 mm), using electrospray ionization and a UV detector (diode array). A gradient starting from 98%  $\text{H}_2\text{O}$ /formate buffer 5 mM (pH 3.8) and reaching 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$ /formate buffer 5 mM (pH 3.8) within 4 min at a flow rate of 2 mL/min was used followed by a return to the starting conditions within 1 min. The purity of final compounds was verified by high pressure liquid chromatography (HPLC) column: C18 Interchrom UPTISPHERE. Analytical HPLC was performed on a Shimadzu LC-2010AHT system equipped with a UV detector set at 254 nm and 215 nm. The following eluent systems were used: buffer A ( $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, 100:0.1) and buffer B ( $\text{CH}_3\text{CN}$ / $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, 80:20:0.1). HPLC retention times (HPLC  $t_{\text{R}}$ ) were obtained at a flow rate of 0.2 mL/min for 35 min using the following conditions: a gradient run from 100% of buffer A over 1 min, then to 100% of buffer B over the next 30 min. Melting point analyses were performed on Barnstead Electrothermel Melting Point Series IA9200.

### B. **Synthesis of dipyrin compounds**

**General Procedure for Dipyrin Synthesis.** TFA (45 eq.) was added dropwise to a solution of corresponding carboxylate compound (1 eq.) at room temperature under a nitrogen atmosphere. The solution was stirred for 30 min. Then, a solution of corresponding formyl compound (1 eq.) in MeOH (3 mL) was added dropwise, followed by 33% HBr solution in AcOH (9 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and the product was collected by filtration.

### Benzyl 2-(hydroxyimino)-3-oxobutanoate (1)



C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>  
Mw: 221.21 g/mol

Benzyl 3-oxobutanoate (1 eq., 4 g, 20.8 mmol) dissolved in AcOH (7 mL) was cooled to 5-10 °C in an ice-bath. A solution of NaNO<sub>2</sub> (1.6 eq., 2.30 g, 33.3 mmol) in water (7 mL) was added dropwise to the stirring solution, maintaining the reaction temperature below 10 °C throughout. After stirring for 1 h at room temperature, the mixture was extracted with DCM (3 x 20 mL). Combined organic layers were washed with water (2 x 30 mL), aqueous 10% NaHCO<sub>3</sub> solution (2x 30 mL) and water (2 x 30 mL) before being dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (4.02 g, 18.1 mmol, 87%) was obtained as a light brown solid.

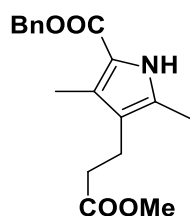
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 10.67 (br s, 1 H, OH), 7.34-7.39 (m, 5 H, H<sub>ar</sub>), 5.35 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.39 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 193.6 (CO), 161.4 (CO), 150.9 (C<sub>quat</sub>), 134.5 (C<sub>quat</sub>), 128.61 (2 CH), 128.56 (2 CH), 128.3(CH), 67.8 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 221.07, Found: 219.97; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 2.51 min.

Melting point: 80-83°C.

### Benzyl 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (2)



C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>  
Mw: 315.36 g/mol

Sodium acetate (1.5 eq., 0.64 g, 7.8 mmol) and methyl 4-acetyl-5-oxohexanoate (**1**) (1 eq., 0.97 g, 5.2 mmol) were dissolved in glacial AcOH (7 mL) and the solution was heated up to 70 °C. A solution of (*E*)-benzyl 2-(hydroxyimino)-3-oxobutanoate (1 eq., 1.15 g, 5.2 mmol) dissolved in AcOH (3 mL) was added dropwise to the solution, while simultaneously adding zinc dust (5.7 eq., 1.94 g, 30.0 mmol) by maintaining the temperature at 75-80 °C. After complete addition, the mixture was heated at 90 °C for 1 h. The mixture was cooled to room temperature and poured into ice/water bath (15 mL) before being extracted with EtOAc (3 x 30 mL). Organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (80:20, v/v).

The title compound (550 mg, 1.76 mmol, 34%) was obtained as a white solid.

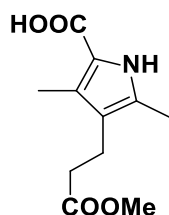
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 9.18 (br s, 1 H, NH), 7.35-7.41 (m, 5 H, H<sub>ar</sub>), 5.32 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.73 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.21 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 173.7 (CO), 161.5 (CO), 136.7 (C<sub>quat</sub>), 130.7 (C<sub>quat</sub>), 128.54 (2 CH), 128.52 (C<sub>quat</sub>), 128.02 (CH), 127.99 (2 CH), 120.2 (C<sub>quat</sub>), 116.7 (C<sub>quat</sub>), 65.6 (CH<sub>2</sub>), 51.6 (OCH<sub>3</sub>), 35.1 (CH<sub>2</sub>), 19.7 (CH<sub>2</sub>), 11.3 (CH<sub>3</sub>), 10.7 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 315.15, Found: 314.11; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 3.07 min.

Melting point: 98-100°C.

#### 4-(3-Methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (3)



C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>  
Mw: 225.24 g/mol

Benzyl 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**2**) (1 eq., 5.6 g, 17.8 mmol) was dissolved in THF (75 mL). Pd/C (10%, 0.4 g, 0.38 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature overnight under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through celite and the solvent was removed by evaporation. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (4.2 g, 17.8 mmol, 100%) was obtained as a purple solid.

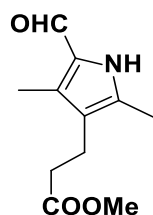
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 11.61 (br s, 1 H, OH), 10.95 (br s, 1 H, NH), 3.56 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.15 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 173.7 (CO), 161.5 (CO), 130.2 (C<sub>quat</sub>), 125.7 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 117.1 (C<sub>quat</sub>), 51.6 (OCH<sub>3</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>), 19.7 (CH<sub>2</sub>), 11.2 (CH<sub>3</sub>), 10.7 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 225.10, Found: 224.03; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 2.13 min.

Melting point: 130-132°C.

#### Methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (4)



C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>  
Mw: 209.24 g/mol

TFA (11 eq., 2.78 g, 1.8 mL, 24.4 mmol) was added dropwise to a solution of 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (**3**) (1 eq., 0.50 g, 2.2 mmol) in DCM (4 mL) at 0 °C under a nitrogen atmosphere. Trimethyl orthoformate (5 eq., 1.18 g, 1.2 mL, 11.1 mmol) was added dropwise and the reaction was stirred under nitrogen atmosphere for 20 min at 0 °C. The solution was warmed to room temperature and stirred for 30 min. The mixture was neutralized carefully with aqueous 10% NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with DCM (3 x 20 mL). Combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (80:20, v/v).



The title compound (315 mg, 1.5 mmol, 68%) was obtained as a brown solid.

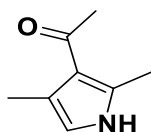
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 9.46 (s, 1 H, CHO), 8.09 (br s, 1H, NH), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.69 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.27 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 175.7 (CHO), 173.5 (CO), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 132.9 (C<sub>quat</sub>), 128.2 (C<sub>quat</sub>), 121.0 (C<sub>quat</sub>), 51.6 (CH<sub>3</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>), 19.1 (CH<sub>2</sub>), 11.4 (CH<sub>3</sub>), 8.8 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 209.11, Found: 210.10; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.13 min.

**Melting point:** 126-129°C.

### 1-(2,4-Dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)ethanone (5)



C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO

Mw: 137.18 g/mol

4-Acetyl-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (1.0 eq., 300 mg, 1.7 mmol) was dissolved progressively in TFA (8.7 eq., 1.7 mL, 14.4 mmol) under nitrogen atmosphere. After complete addition, the solution was heated at 40 °C for 30 min. Water (50 mL) was added to the reaction mixture and the crude mixture was then extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The aqueous phase was neutralized with solid Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). Combined organic phases were washed with an aqueous 10% NaHCO<sub>3</sub> solution (2 x 10 mL) and water (2 x 10 mL). Organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (210 mg, 1.5 mmol, 92%) was obtained as a purple solid.

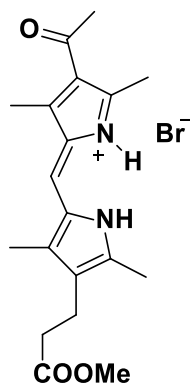
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.12 (br s, 1 H, NH). 6.37 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1 H, CH), 2.51 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.43 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.28 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 195.5 (CO), 135.6 (C<sub>quat</sub>), 120.9 (C<sub>quat</sub>), 120.6 (C<sub>quat</sub>), 114.7 (CH), 30.9 (CH<sub>3</sub>), 15.2 (CH<sub>3</sub>), 13.6 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 137.08, Found: 137.95; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 1.88 min.

**Melting point:** 137-139°C.

**(Z)-4-Acetyl-2-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrolium bromide (6)**



C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 409.32 g/mol

This compound was prepared from 33% HBr in AcOH (2.7 eq., 497 mg, 0.3 mL, 2.9 mmol), methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (**4**) (1 eq., 228 mg, 1.1 mmol) and 3-acetyl-2,4-dimethylpyrrole (**5**) (1 eq., 150 mg, 1.1 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrin Synthesis*.

The title compound (400 mg, 0.97 mmol, 89%) was obtained as an orange solid.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 13.69 (br s, 1 H, NH), 13.22 (br s, 1 H, NH), 7.26 (s, 1 H, CH), 3.68 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.98 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.77-2.82 (m, 5 H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 2.59 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.48-2.53 (m, 5 H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 2.37 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

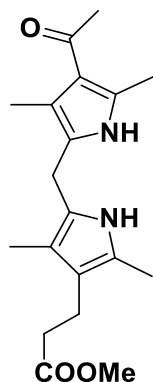
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 203.5 (CO), 172.5 (CO), 160.5 (C<sub>quat</sub>), 154.3 (C<sub>quat</sub>), 144.8 (C<sub>quat</sub>), 143.4 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (C<sub>quat</sub>), 129.4 (C<sub>quat</sub>), 127.8 (C<sub>quat</sub>), 126.8 (C<sub>quat</sub>), 120.6 (CH), 51.9 (OCH<sub>3</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>3</sub>), 19.2 (CH<sub>2</sub>), 15.8 (CH<sub>3</sub>), 13.5 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>), 10.4 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 408.10, Found: 329.16; [M-HBr+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.15 min.

HPLC: C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 22.59 min, purity > 99%.

Melting point: 190-193 °C.

**Methyl 3-(5-((4-acetyl-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (7')**



C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 330.42 g/mol

(Z)-4-acetyl-2-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrolium bromide(**6**) (1eq., 0.19 g, 0.46 mmol) was dissolved in a mixture of dioxane (20 mL)/propan-2-ol (7 mL). NaBH<sub>4</sub> (5.0 eq., 88 mg, 2.30 mmol) was added in one portion and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the solution was washed with saturated aqueous

bicarbonate solution (2 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (115 mg, 0.35 mmol, 75%) was obtained as an orange solid.

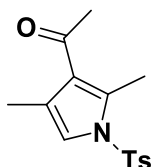
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.95 (br s, 1 H, NH), 8.05 (br s, 1 H, NH), 3.75 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.70 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.46 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.43 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.41 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 196.5 (CO), 174.5 (CO), 135.0 (C<sub>quat</sub>), 125.3 (C<sub>quat</sub>), 122.8 (C<sub>quat</sub>), 122.5 (C<sub>quat</sub>), 121.6 (C<sub>quat</sub>), 117.0 (C<sub>quat</sub>), 115.7 (C<sub>quat</sub>), 113.8 (C<sub>quat</sub>), 51.9 (OCH<sub>3</sub>), 35.9 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>3</sub>), 22.0 (CH<sub>2</sub>), 20.6 (CH<sub>2</sub>), 15.5 (CH<sub>3</sub>), 12.3 (CH<sub>3</sub>), 11.3 (CH<sub>3</sub>), 9.5 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 330.19, Found: 331.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=2.07 min.

**Melting point:** 193-195 °C.

### 1-(2,4-Dimethyl-1-tosyl-1H-pyrrol-3-yl)ethanone (9)



C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>  
Mw: 291.37 g/mol

To a solution of 3-acetyl-2,4-dimethylpyrrole (**5**) (1 eq., 300 mg, 2.2 mmol) in THF (30 mL), NaH (1.3 eq., 68 mg, 2.8 mmol) was added at 0 °C. The solution was stirred for 20 min before adding tosyl chloride (1.2 eq., 500 mg, 2.6 mmol). The solution was warmed to room temperature and stirred for 4 h. Water (30 mL) was added to the solution and the product was extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (472 mg, 1.6 mmol, 74%) was obtained as a white solid.

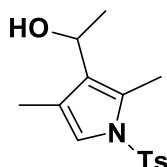
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, 2 CH<sub>Ar</sub>), 7.32 (d, *J* = 10.8 Hz, 2 H, 2 CH<sub>Ar</sub>), 7.09 (s, 1 H, CH), 2.53 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.43 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.39 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.21 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 196.8 (CO), 145.5 (C<sub>quat</sub>), 141.7 (C<sub>quat</sub>), 135.7 (C<sub>quat</sub>), 130.4 (2 CH), 127.2 (2 CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 120.6 (C<sub>quat</sub>), 119.7 (CH), 31.6 (CH<sub>3</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>), 13.3 (CH<sub>3</sub>), 12.8 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 291.09, Found: 292.08; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.05 min.

**Melting point:** 105-110°C.

### 1-(2,4-Dimethyl-1-tosyl-1H-pyrrol-3-yl)ethanol (10)



C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>  
Mw: 293.38 g/mol

To a solution of 1-(2,4-Dimethyl-1-tosyl-1H-pyrrol-3-yl)ethanone (**9**) (1 eq., 0.60 g, 2.1 mmol) in THF (6 mL)/EtOH (18 mL), was added NaBH<sub>4</sub> (3 eq., 0.23 g, 6.2 mmol). The reaction was stirred at room

temperature overnight. Water (30 mL) was added dropwise followed by aqueous 5.0 M NH<sub>4</sub>Cl solution (9 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). Combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (80:20, v/v).

The title compound (541 mg, 1.8 mmol, 90%) was obtained as a white solid.

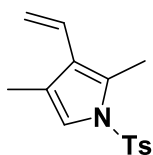
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, 2 CH<sub>Ar</sub>), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, 2 CH<sub>Ar</sub>), 7.00 (s, 1 H, CH), 4.82 (q, *J* = 6.6 Hz, 1 H, CH), 2.39 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 144.6 (C<sub>quat</sub>), 136.5 (C<sub>quat</sub>), 129.9 (2 CH), 128.4 (C<sub>quat</sub>), 126.6 (C<sub>quat</sub>), 126.8 (2 CH), 120.6 (C<sub>quat</sub>), 119.1 (CH), 67.0 (CH), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>), 11.3 (CH<sub>3</sub>), 11.1 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 293.11, Found: 294.09; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.86 min.

**Melting point:** 66-68°C.

### 2,4-Dimethyl-1-tosyl-3-vinyl-1H-pyrrole (11)



C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>S  
Mw: 275.37 g/mol

To a solution of 1-(2,4-Dimethyl-1-tosyl-1H-pyrrol-3-yl)ethanol (**10**) (1 eq., 600 mg, 2.1 mmol) in THF (12 mL), was added concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 eq., 0.15 mL, 2.1 mmol). The solution was stirred at reflux for 4 h. The mixture was diluted with water (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 30 mL). Combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (442 mg, 1.6 mmol, 78%) was obtained as a white solid.

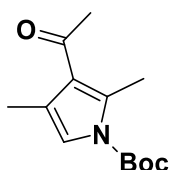
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, 2 CH<sub>Ar</sub>), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, 2 CH<sub>Ar</sub>), 7.05 (s, 1 H, CH), 6.47 (dd, *J*<sub>cis</sub> = 11.6 Hz, *J*<sub>trans</sub> = 17.8 Hz, 1 H, CH), 5.34 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J*<sub>trans</sub> = 17.8 Hz, 1 H, CH), 5.19 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J*<sub>cis</sub> = 11.6 Hz, 1 H, CH), 2.41 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 144.7 (C<sub>quat</sub>), 136.5 (C<sub>quat</sub>), 130.0 (2 CH), 128.7 (CH), 128.3 (C<sub>quat</sub>), 126.9 (2 CH), 124.0 (C<sub>quat</sub>), 121.1 (C<sub>quat</sub>), 119.1 (CH), 114.9 (CH<sub>2</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>), 12.3 (CH<sub>3</sub>), 11.5 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 275.10, Found: 276.06; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.86 min.

**Melting point:** 81-83°C.

### Tert-butyl 3-acetyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-1-carboxylate (13)



C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>  
Mw: 237.29 g/mol

4-Dimethylaminopyridine (**5**) (0.1 eq, 0.18 mg, 1.5 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (1.2 eq., 3.81 g, 17.5 mmol) were added to a stirred solution of 3-acetyl-2,4-dimethylpyrrole (1 eq., 2.00 g, 14.6 mmol) in ACN (20 mL)

at room temperature. DCM (35 mL) was added and the crude mixture was washed with portions of water (2 x 10 mL), aqueous 1.0 M NaHCO<sub>3</sub> solution (3 X 10 mL), and brine (2 X 10 mL). The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was dissolved in DCM (20 mL) and *N,N*-diethylethylenediamine (0.5 eq, 0.85 g, 1.1 mL, 7.3 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 1 h. The organic phase was washed with aqueous 1.0 M HCl solution (10 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (2.56 g, 10.8 mmol, 74%) was obtained as a white solid.

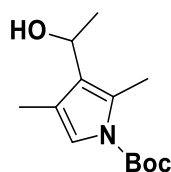
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.91 (d, *J* = 1.0 Hz, 1 H, CH), 2.68 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.43 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.18 (d, *J* = 1.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.58 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 197.0 (CO), 149.1 (CO), 137.4 (C<sub>quat</sub>), 126.1 (C<sub>quat</sub>), 120.01 (C<sub>quat</sub>), 119.98 (CH), 84.3 (C<sub>quat</sub>) 31.7 (CH<sub>3</sub>), 28.0 (3 CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>), 13.3 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 237.14, Found: 180.07; [M-tBu+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.51 min.

**Melting point:** 122-124°C.

#### **Tert-butyl 3-(1-hydroxyethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-1-carboxylate (14)**



C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>  
Mw: 239.31 g/mol

To a solution of *tert*-butyl 3-acetyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-1-carboxylate (**13**) (1 eq., 535 mg, 2.2 mmol) in THF (6 mL)/EtOH (18 mL), was added NaBH<sub>4</sub> (4 eq., 340 mg, 9 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight. Water (30 mL) was added dropwise followed by aqueous 5.0 M NH<sub>4</sub>Cl solution (9 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). Combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (469 g, 1.6 mmol, 75%) was obtained as a white solid.

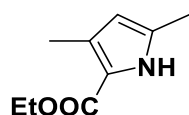
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.91 (s, 1 H, CH), 4.94 (q, *J* = 6.2 Hz, 1 H, CH), 2.41 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.10 (d, *J* = 3.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.57 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>), 1.47 (d, *J* = 9.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 149.6 (CO), 127.7 (C<sub>quat</sub>), 127.1 (C<sub>quat</sub>), 119.5 (C<sub>quat</sub>), 118.1 (CH), 83.0 (C<sub>quat</sub>), 64.0 (CH), 28.1 (3 CH<sub>3</sub>), 23.2 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>), 11.4 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 239.15, Found: 183.08; [M-tBu+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.23 min.

**Melting point:** 112-115°C

#### **Ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (16)**



C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>  
Mw: 167.21 g/mol

A solution of pentane-2,4-dione (1 eq., 0.95 g, 0.97 mL, 9.4 mmol) and sodium acetate (1.2 eq., 0.93 g, 11.3 mmol) in AcOH (30 mL) was heated at 50 °C. Then, diethyl aminomalonate hydrochloride (1 eq., 2.00 g, 9.4 mmol) diluted in AcOH was added dropwise at 50 °C. The reaction was stirred at 110 °C for 2 h. The hot mixture was poured into crushed ice and the precipitate was collected by filtration. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (1.21 g, 7.3 mmol, 77%) was obtained as a white solid.

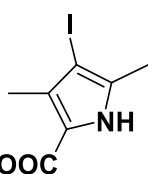
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.62 (br s, 1 H, NH), 5.56 - 5.79 (m, 1 H, CH), 4.28 (q, *J* = 1.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (t, *J* = 1.7 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.6 (CO), 132.2 (C<sub>quat</sub>), 129.0 (C<sub>quat</sub>), 117.8 (C<sub>quat</sub>), 111.3 (CH), 59.7 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 13.0 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 167.09, Found: 168.04; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.67 min.

**Melting point:** 122-124°C.

#### **Ethyl 4-iodo-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (17)**



C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>INO<sub>2</sub>  
Mw: 293.10 g/mol

To a solution of NCS (1.2 eq., 0.96 g, 7.2 mmol) in DMF (20 mL) was added NaI (1.2 eq., 1.08 g, 0.29 mL, 7.2 mmol) in small portions. The resulting brown solution was stirred at room temperature for 1 h before the slow addition at 0 °C of ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**16**) (1 eq., 1.00 g, 6.0 mmol) in DMF (20 mL). The reaction was stirred at room temperature for 1 h. Aqueous 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (20 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h. The solid was collected by filtration. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (1.61 g, 5.5 mmol, 92%) was obtained as a white solid.

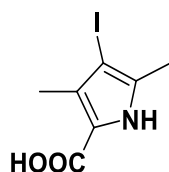
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.96 (br s, 1 H, NH), 4.33 (q, *J* = 1.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.29 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, *J* = 1.7 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.4 (CO), 134.6 (C<sub>quat</sub>), 130.7 (C<sub>quat</sub>), 118.3 (C<sub>quat</sub>), 72.0 (C<sub>quat</sub>), 60.3 (CH<sub>2</sub>), 14.7 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 292.99, Found: 291.99; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 3.14 min.

**Melting point:** 140-142°C.

#### **4-iodo-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (18)**



C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>INO<sub>2</sub>  
Mw: 265.05 g/mol

Ethyl 4-iodo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate (**17**) (1 eq., 500 mg, 1.7 mmol) and LiOH (8 eq., 326 mg, 13.6 mmol) were dissolved in EtOH (5 mL)/H<sub>2</sub>O (5 mL). The solution was heated at 90 °C for 1 h. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was taken up in EtOAc (50 mL)/H<sub>2</sub>O (50 mL). The aqueous layer was acidified to pH 5.0 with H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 5.1) or few drops of concentrate H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> before being extracted with EtOAc. Organics layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (399 mg, 1.5 mmol, 88%) was obtained as a dark pink solid.

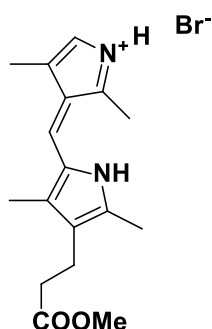
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.62 (br s, 1 H, NH), 2.27 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.25 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 161.0 (CO), 134.3 (C<sub>quat</sub>), 134.3 (C<sub>quat</sub>), 129.7 (C<sub>quat</sub>), 70.8 (C<sub>quat</sub>), 13.7 (CH<sub>3</sub>), 13.1 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 264.96, Found: 263.92; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 2.50 min.

Melting point: 110-112 °C.

**(Z)-3-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)methylene)-2,4-dimethyl-3*H*-pyrrol-1-ium bromide (19')**



C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 367.28 g/mol

This compound was prepared from methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-yl)propanoate (**4**) (1 eq., 0.12 g, 0.6 mmol), 4-iodo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid (**18**) (1 eq., 0.16 g, 0.6 mmol) and 33% HBr solution in AcOH (2.7 eq., 0.18 mL, 1.6 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrin Synthesis*.

The title compound (65 mg, 0.2 mmol, 30%) was obtained as a dark brown solid.

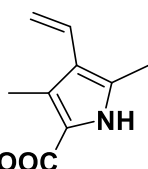
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 13.58 (br s, 1 H, NH), 13.00 (br s, 1 H, NH), 7.01 (s, 1 H, CH), 6.08 (s, 1 H, CH), 3.60 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.68 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.58 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.38 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.25 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.6 (CO), 154.7 (C<sub>quat</sub>), 154.5 (C<sub>quat</sub>), 145.6 (C<sub>quat</sub>), 142.7 (C<sub>quat</sub>), 127.0 (C<sub>quat</sub>), 126.7 (C<sub>quat</sub>), 126.2 (C<sub>quat</sub>), 119.6 (CH), 117.2 (CH), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>2</sub>), 12.8 (CH<sub>3</sub>), 12.1 (CH<sub>3</sub>), 10.2 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 366.09, Found: 286.04; [M-HBr+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.23 min.

Melting point: 207-210 °C.

**Ethyl 3,5-dimethyl-4-vinyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate (20)**



C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>  
Mw: 193.24 g/mol

EtOOC

A mixture of ethyl 4-iodo-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**17**) (1 eq., 1.00 g, 3.4 mmol), vinyltributyltin (2 eq., 2.16 g, 2.0 mL, 6.8 mmol) and bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (5 %, 0.12 g, 0.17 mmol) in toluene (50 mL) was refluxed for 2 h under a nitrogen atmosphere. During the course of the reaction, the color changed from yellow to black as Pd<sup>0</sup> was formed. The reaction was cooled to room temperature and DCM (50 mL) was added. The resulting solution was washed with brine (2 x 30 mL) and water (2 x 30 mL). The organic phase was separated, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (317 mg, 1.6 mmol, 48%) was obtained as a dark brown solid.

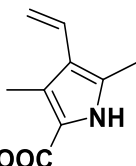
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.62 (br s, 1 H, NH), 6.59 (dd, *J*<sub>trans</sub> = 17.9 Hz, *J*<sub>cis</sub> = 11.6 Hz, 1 H, CH), 5.28 (dd, *J* = 1.7 Hz, *J*<sub>trans</sub> = 17.9 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>), 5.17 (dd, *J* = 1.7 Hz, *J*<sub>cis</sub> = 11.6 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>), 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.39 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 161.6 (CO), 139.3 (C<sub>quat</sub>), 133.6 (C<sub>quat</sub>), 129.0 (C<sub>quat</sub>), 128.2 (C<sub>quat</sub>), 125.3 (CH), 112.7 (CH<sub>2</sub>), 59.8 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 12.8 (CH<sub>3</sub>), 11.2 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 193.11, Found: 192.02; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 2.71 min.

Melting point: 109-111°C.

### 3,5-Dimethyl-4-vinyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (21)



C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>  
Mw: 165.19 g/mol

HOOC

Ethyl 3,5-dimethyl-4-vinyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**20**) (1 eq., 158 mg, 0.82 mmol) and LiOH (8 eq., 156 mg, 6.5 mmol) were dissolved in EtOH (5 mL)/H<sub>2</sub>O (5 mL) and the solution was heated at 90 °C for 1 h. The solvent was evaporated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was acidified to pH 5.0 with H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 5.1) or few drops of concentrate H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> before being extracted with EtOAc (3 x 20 mL). Organics layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (43 mg, 0.3 mmol, 32%) was obtained as a dark brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>): 10.24 (br s, 1 H, NH), 6.61 (dd, *J*<sub>trans</sub> = 17.9 Hz, *J*<sub>cis</sub> = 11.6 Hz, 1 H, CH), 5.25 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J*<sub>trans</sub> = 17.9 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>), 5.07 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J*<sub>cis</sub> = 11.6 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>), 2.36 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

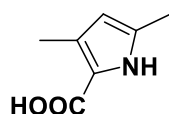
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>): 164.1 (CO), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 129.4 (CH), 126.0 (C<sub>quat</sub>), 117.7 (C<sub>quat</sub>), 111.0 (CH<sub>2</sub>), 11.5 (CH<sub>3</sub>), 10.5 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 165.08, Found: 163.90; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 2.35 min.



**Melting point:** 101-102 °C.

**3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (22)**



C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>  
Mw: 139.15 g/mol

Ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**16**) (1 eq., 135 mg, 0.81 mmol) and LiOH (8 eq., 154 mg, 6.46 mmol) were dissolved in EtOH (5 mL)/H<sub>2</sub>O (5 mL) and the solution was heated at 90 °C for 1 h. The solvent was evaporated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc (50 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was acidified to pH 5.0 with H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 5.1) or few drops of concentrate H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> before being extracted with EtOAc. Organics layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (94 mg, 0.68 mmol, 84%) was obtained as a white solid.

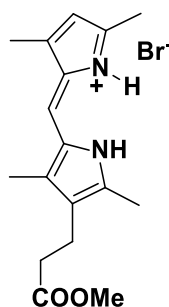
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>):** 10.20 (br s, 1H, NH), 5.76 (s, 1H, CH), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>):** 162.2 (CO), 132.9 (C<sub>quat</sub>), 128.7 (C<sub>quat</sub>), 117.6 (C<sub>quat</sub>), 111.2 (CH), 12.4 (CH<sub>3</sub>), 12.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 139.06, Found: 137.87; [M-H]<sup>-</sup>; Rt=2.06 min.

**Melting point:** 134-136 °C.

**(Z)-2-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrol-1-ium bromide (23)**



C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>Br N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 367.29 g/mol

This compound was prepared from methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (**4**) (1 eq., 127 mg, 0.61 mmol), 4-iodo-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (**22**) (1 eq., 162 mg, 0.61 mmol) and 33% HBr solution in AcOH (9 eq., 1.35 g, 0.92 mL, 5.5 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrin Synthesis*.

The title compound (74 mg, 0.20 mmol, 33%) was obtained as a brown solid.

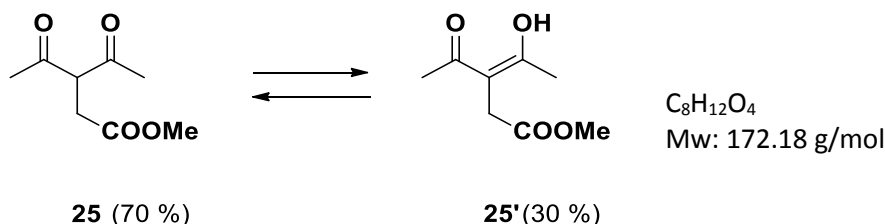
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 13.56 (br s, 1 H, NH), 13.07 (br s, 1 H, NH), 7.06 (br s, 1 H, CH), 6.16 (s, 1 H, CH), 3.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.69 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.6 (CO), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 142.5 (C<sub>quat</sub>), 141.8 (C<sub>quat</sub>), 127.1 (C<sub>quat</sub>), 126.8 (CH), 119.4 (C<sub>quat</sub>), 117.4 (C<sub>quat</sub>), 117.2 (C<sub>quat</sub>), 111.8 (CH), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 19.3 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 13.0 (CH<sub>3</sub>), 12.0 (CH<sub>3</sub>), 10.1 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 366.09, Found: 286.04; [M-HBr+H]<sup>+</sup>, Rt=2.27 min.

Melting point: 210-212 °C.

### Methyl 3-acetyl-4-oxopentanoate (25)



To a solution of NaH (1.2 eq., 86 mg, 3.6 mmol) in dry THF (5.0 mL) cooled to 0 °C, was added pentane-2,4-dione (1.0 eq., 0.30 g, 0.31 mL, 3.0 mmol) in dry THF (5.0 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then methyl bromoacetate (1.2 eq., 0.55 g, 0.34 mL, 3.6 mmol) in dry THF (5.0 mL) was added dropwise. After 30 min at 0 °C, the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution (15 mL) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). Combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (356 mg, 2.1 mmol, 69 %) was obtained as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 4.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H, CH), 3.71 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.26 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.89 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.27 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 203.2 (CO), 202.4 (CO), 191.8 (CO), 171.9 (CO), 171.7 (CO), 171.5 (CO), 104.2 (C<sub>quat</sub>), 63.2 (CH), 52.1 (OCH<sub>3</sub>), 52.0 (OCH<sub>3</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (2 CH<sub>3</sub>), 23.4 (2 CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 172.07, Found: 170.98; [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 1.66 min and 2.10 min.

### Tert-butyl 2-(hydroxyimino)-3-oxobutanoate (26)



Tert-butyl acetoacetate (1.0 eq., 15.0 g, 15.5 mL, 94.8 mmol) dissolved in AcOH (7 mL) was cooled to 5-10 °C in an ice-bath. A solution of NaNO<sub>2</sub> (1.6 eq., 10.5 g, 151.0 mmol) in water (7 mL) was added dropwise to the stirring solution, maintaining the reaction temperature below 10 °C throughout. After stirring for 1 h at room temperature, the mixture was extracted with DCM (3 x 20 mL). Combined organic layers were washed with water (2 x 30 mL), aqueous 10% NaHCO<sub>3</sub> solution (2x 30 mL) and water (2 x 30 mL) before being dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was used without further purification in the next step.

The title compound (15.33 g, 81.9 mmol, 86%) was obtained as a light brown solid.

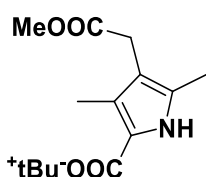
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 9.47 (br s, 1 H, OH), 2.38 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.55 (s, 9 H, 3  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 193.8 (CO), 161.0 (CO), 151.9 (C=N), 85.1 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 28.5 ( $\text{CH}_3$ ), 25.8 (3 $\text{CH}_3$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 187.02, Found: 185.96;  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ;  $R_t = 2.37$  min.

Melting point: 67-69°C.

#### Tert-butyl 4-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (27)



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4$   
Mw: 267.32 g/mol

Methyl 3-acetyl-4-oxopentanoate (**25**) (1 eq., 0.40 g, 2.3 mmol), *tert*-butyl (2Z)-2-(hydroxyimino)-3-oxobutanoate (**26**) (1 eq., 0.43 g, 2.3 mmol) and sodium acetate (2.5 eq., 0.48 g, 5.8 mmol) were dissolved in AcOH (6 mL) and the solution was heated at 50 °C. Zinc (6.0 eq., 0.91 g, 13.9 mmol) was added portionwise below 50 °C. After complete addition, the mixture was stirred at 50 °C for 4 h. Then, the mixture was poured into scratched ice and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). Organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (204 mg, 0.8 mmol, 33%) was obtained as a white solid.

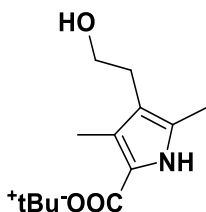
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.64 (br s, 1 H, NH), 3.67 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.38 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.25 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.23 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.56 (s, 9 H, 3  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 172.3 (CO), 161.1 (CO), 129.9 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 126.6 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 118.4 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 114.2 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 80.3 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 51.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 30.0 ( $\text{CH}_2$ ), 28.5 (3  $\text{CH}_3$ ), 11.5 ( $\text{CH}_3$ ), 10.6 ( $\text{CH}_3$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 267.15, Found: 212.06  $[\text{M}-\text{tBu}+\text{H}]^+$ ,  $R_t = 2.91$  min.

Melting point: 128-129°C.

#### Tert-butyl 4-(2-hydroxyethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (28)



$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$   
Mw: 239.31 g/mol

Borane tetrahydrofuran complex (7.43 eq., 1.0 M solution in THF, 20 mL, 20.0 mmol) was added dropwise to a solution of *tert*-butyl 4-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**27**) (1 eq., 720 mg, 2.7 mmol) in dry THF (8 mL) under a nitrogen atmosphere at 0 °C. Then, the solution was stirred overnight at room temperature. The excess borane was quenched with dropwise addition of MeOH (10 mL). The solution was evaporated to dryness and the residue was taken up in a mixture of EtOAc (5 mL)/ $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL). Organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under

vacuum. The residue was purified by flash column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (615 mg, 2.6 mmol, 95%) was obtained as a white solid.

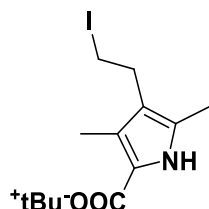
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.64 (br s, 1 H, NH), 3.66 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.65 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.26 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.23 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.56 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.2 (CO), 129.8 (C<sub>quat</sub>), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 118.5 (C<sub>quat</sub>), 117.2 (C<sub>quat</sub>), 80.3 (C<sub>quat</sub>), 62.7 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (3 CH<sub>3</sub>), 27.5 (CH<sub>2</sub>), 11.6 (CH<sub>3</sub>), 10.7 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 239.15, Found: 240.12; [M+H]<sup>+</sup>; 184.07 [M-tBu+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.50 min.

**Melting point:** 119-121°C.

### **Tert-butyl 4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (29)**



C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>INO<sub>2</sub>  
Mw: 349.21 g/mol

Tert-butyl 4-(2-hydroxyethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**28**) (1 eq., 100 mg, 0.42 mmol), imidazole (2 eq., 57 mg, 0.84 mmol) and triphenylphosphine (2 eq., 219 mg, 0.84 mmol) were dissolved in DCM (5 mL) under a nitrogen atmosphere at room temperature. After complete dissolution, iodine (2 eq., 212 mg, 0.84 mmol) was added portionwise at 0 °C. The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with aqueous 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 10 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (138 mg, 0.4 mmol, 95%) was obtained as a white solid.

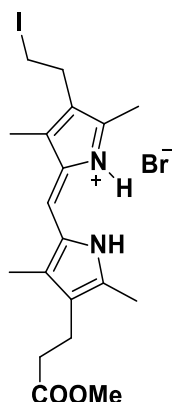
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.64 (br s, 1 H, NH), 3.14 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.95 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.24 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.22 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.56 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.1 (CO), 129.1 (C<sub>quat</sub>), 125.7 (C<sub>quat</sub>), 121.0 (C<sub>quat</sub>), 118.5 (C<sub>quat</sub>), 80.4 (C<sub>quat</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (3 CH<sub>3</sub>), 11.6 (CH<sub>3</sub>), 10.6 (CH<sub>3</sub>), 5.6 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 349.05, Found: 295.07; [M-tBu+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.39 min.

**Melting point:** 130-131°C.

**(Z)-4-(2-Iodoethyl)-2-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrolium bromide (30)**



C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>BrIN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 521.23 g/mol

This compound was prepared from TFA (44.4 eq., 1.2 mL, 25.5 mmol), *tert*-butyl 4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate (**29**) (1 eq., 200 mg, 0.6 mmol), methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-yl)propanoate (**4**) (1 eq., 119 mg, 0.6 mmol) and 33% HBr in AcOH (9.0 eq., 1.26 g, 0.9 mL, 5.1 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrin Synthesis*.

The title compound (200 mg, 0.38 mmol, 67%) was obtained as an orange solid.

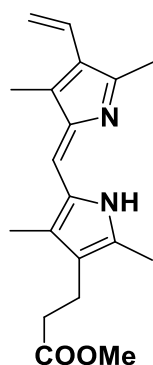
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 13.56 (br s, 1 H, NH), 13.11 (br s, 1 H, NH), 7.08 (s, 1 H, CH), 3.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.19 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.02 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.71 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.6 (CO), 155.0 (C<sub>quat</sub>), 153.4 (C<sub>quat</sub>), 142.9 (C<sub>quat</sub>), 142.1 (C<sub>quat</sub>), 127.4 (C<sub>quat</sub>), 127.3 (C<sub>quat</sub>), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 126.0 (C<sub>quat</sub>), 119.4 (CH), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (CH<sub>2</sub>), 19.3 (CH<sub>2</sub>), 13.0 (2 CH<sub>3</sub>), 10.4 (CH<sub>3</sub>), 10.2 (CH<sub>3</sub>), 3.4 (CH<sub>2</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 520.02, Found: 441.03; [M-HBr+H]<sup>+</sup>, *Rt* = 2.73 min.

Melting point: 191-193°C.

**(Z)-Methyl 3-(5-((3,5-dimethyl-4-vinyl-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (31)**



C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 312.41 g/mol

(*Z*)-4-(2-Iodoethyl)-2-[[4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl]methylidene]-3,5-dimethyl-2*H*-pyrrol-1-ium bromide (**30**) (1 eq., 510 mg, 0.98 mmol) was dissolved in dry DCM (10 mL) under nitrogen atmosphere. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (2.5 eq., 0.36 mL, 2.4 mmol) was added dropwise at room temperature and the mixture was heated at 50 °C. After complete

reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (143 mg, 0.45 mmol, 47%) was obtained as a dark brown solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 12.92 (br s, 1 H, NH), 7.12 (s, 1 H, CH), 6.54 (dd,  $J_{cis}$  = 11.6 Hz,  $J_{trans}$  = 17.9 Hz, 1 H, CH), 5.45 (dd,  $J$  = 1.1 Hz,  $J_{trans}$  = 14.1 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>), 5.40 (dd,  $J$  = 1.1 Hz,  $J_{cis}$  = 7.7 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.80 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.76 (t,  $J$  = 1.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.72 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.47 (t,  $J$  = 1.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.37 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

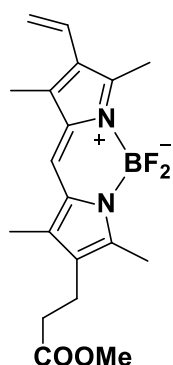
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 172.6 (CO), 155.1 (C<sub>quat</sub>), 154.0 (C<sub>quat</sub>), 142.9 (C<sub>quat</sub>), 141.0 (C<sub>quat</sub>), 127.4 (CH), 126.7 (C<sub>quat</sub>), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 126.1 (C<sub>quat</sub>), 125.8 (C<sub>quat</sub>), 119.4 (CH), 117.4 (CH<sub>2</sub>), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 19.3 (CH<sub>2</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>), 13.0 (CH<sub>3</sub>), 11.0 (CH<sub>3</sub>), 10.3 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 312.18, Found: 313.14; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=2.65 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>= 25.81 min, purity > 99%.

**Melting point:** >300 °C.

**5-Fluoro-8-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3,7,9-tetramethyl-2-vinyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium fluoride (33)**



C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 360.21 g/mol

Et<sub>3</sub>N (10 eq., 0.53 mL, 3.8 mmol) was added to the solution of methyl 3-(5-[[[(2Z)-4-ethenyl-3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene]methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl]propanoate (**31**) (1 eq., 120 mg, 0.38 mmol) in DCM (8 mL). Boron trifluoride etherate (10 eq., 0.49 mL, 3.8 mmol) was added immediately to the mixture and the reaction was stirred at room temperature for 3 h. The solution was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (37.3 mg, 0.1 mmol, 27%) was obtained as a pink solid.

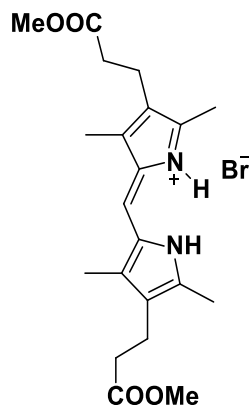
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.04 (s, 1H, CH), 6.56 (dd,  $J_{cis}$  = 11.6 Hz,  $J_{trans}$  = 17.9 Hz, 1H, CH), 5.41 (dd,  $J$  = 1.4 Hz,  $J_{trans}$  = 17.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 5.30 (dd,  $J$  = 1.4 Hz,  $J_{cis}$  = 11.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.73 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.46 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 173.1 (CO), 156.0 (C<sub>quat</sub>), 155.1 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 136.5 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (C<sub>quat</sub>), 128.4 (C<sub>quat</sub>), 127.8 (CH), 127.0 (C<sub>quat</sub>), 119.5 (CH), 115.5 (CH<sub>2</sub>), 51.7 (OCH<sub>3</sub>), 34.1 (CH<sub>2</sub>), 19.5 (CH<sub>2</sub>), 13.5 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>), 10.8 (CH<sub>3</sub>), 9.6 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 360.18, Found: 359.12; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 3.44 min.

**Melting point:** > 300 °C.

**(Z)-4-(3-Methoxy-3-oxopropyl)-2-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrolium bromide (35)**



C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 453.37 g/mol

This compound was prepared from TFA (44 eq., 1.56 mL, 21.1 mmol), 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (**3**) (1 eq., 0.11 g, 0.5 mmol), methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (**4**) (1 eq., 0.10 g, 0.5 mmol) and 33% HBr solution in AcOH (8.6 eq., 1.13 g, 0.81 mL, 4.63 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrrin Synthesis*.

The title compound (192 mg, 0.4 mmol, 63%) was obtained as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 13.58 (br s, 1 H, NH), 13.05 (br s, 1 H, NH), 7.05 (s, 1 H, CH), 3.69 (s, 6 H, 2 OCH<sub>3</sub>), 2.76 (t, J = 7.7 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 2.69 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.47 (t, J = 7.4 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>).

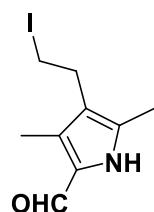
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 172.7 (2 CO), 154.2 (2 C<sub>quat</sub>), 142.3 (2 C<sub>quat</sub>), 126.9 (2 C<sub>quat</sub>), 126.1 (2 C<sub>quat</sub>), 119.2 (CH), 51.8 (2 OCH<sub>3</sub>), 33.8 (2 CH<sub>2</sub>), 19.3 (2 CH<sub>2</sub>), 12.9 (2 CH<sub>3</sub>), 10.2 (2 CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 452.13, Found: 373.19; [M-HBr+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.52 min.

HPLC: C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 25.22 min, purity > 99%.

**Melting point:** 209-211 °C.

**4-(2-Iodoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde (36)**



C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>INO  
Mw: 277.10 g/mol

TFA (9 eq., 0.59 mL, 7.7 mmol) was added dropwise to a solution of *tert*-butyl 4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**29**) (1 eq., 0.3 g, 0.9 mmol) in DCM (4 mL) at 0 °C under a nitrogen atmosphere. Trimethyl orthoformate (5 eq., 0.47 mL, 4.3 mmol) was added dropwise and the reaction was stirred under nitrogen atmosphere for 20 min at 0 °C. The solution was warmed to room temperature and stirred for 30 min. The mixture was neutralized carefully with aqueous 10% NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with DCM (3 x 20 mL). Combined organic layers were dried over

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (80:20, v/v).

The title compound (150 mg, 0.5 mmol, 63 %) was obtained as light brown solid.

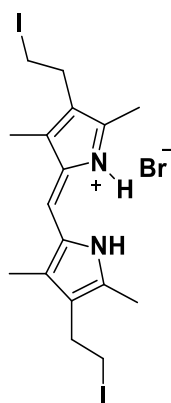
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.25 (br s, 1 H, NH), 9.47 (s, 1 H, CHO), 3.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.97 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.29 (s, 3 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 176.3 (CHO), 139.5 (C<sub>quat</sub>), 128.0 (C<sub>quat</sub>), 122.0 (C<sub>quat</sub>), 117.6 (C<sub>quat</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>), 9.1 (CH<sub>3</sub>), 4.9 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 277.00, Found: 278.02; [M+H]<sup>+</sup>; Rt = 2.26 min.

**Melting point:** 112-114 °C.

**(Z)-4-(2-Iodoethyl)-2-((4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrolium bromide (37)**



C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>BrI<sub>2</sub>N<sub>2</sub>  
Mw: 589.09 g/mol

This compound was prepared from TFA (27 eq., 1.1 mL, 14.5 mmol), *tert*-butyl 4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate (**29**) (1 eq., 0.19 g, 0.5 mmol), 4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde (**36**) (1 eq., 0.15 g, 0.5 mmol) and 33% HBr solution in AcOH (8.6 eq., 0.81 mL, 4.6 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrrin Synthesis*.

The title compound (0.2 g, 0.3 mmol, 63%) was obtained as a dark red solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 13.68 (br s, 1 H, NH), 13.12 (br s, 1 H, NH), 7.10 (s, 1 H, CH), 3.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 3.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 2.70 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>).

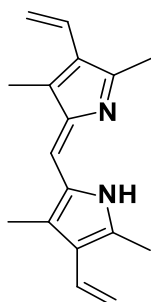
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.3 (2 C<sub>quat</sub>), 142.6 (2 C<sub>quat</sub>), 127.7 (2 C<sub>quat</sub>), 126.3 (2 C<sub>quat</sub>), 119.7 (CH), 28.3 (2 CH<sub>2</sub>), 13.1 (2 CH<sub>3</sub>), 10.5 (2 CH<sub>3</sub>), 3.3 (2 CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 587.91, Found: 508.97; [M-HBr+H]<sup>+</sup>; Rt = 3.32 min.

**Melting point:** 214-216°C.



**(Z)-2-((3,5-Dimethyl-4-vinyl-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl)-3,5-dimethyl-4-vinyl-1H-pyrrole (38)**



C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>  
Mw: 252.35 g/mol

(Z)-4-(2-Iodoethyl)-2-[[4-(2-iodoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl]methylidene]-3,5-dimethyl-2H-pyrrol-1-ium bromide (**37**) (1 eq., 170 mg, 0.3 mmol) was dissolved in dry DCM (10 mL) under nitrogen atmosphere. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (4 eq., 0.17 mL, 1.2 mmol) was added dropwise at room temperature and the mixture was heated at 50 °C. After complete reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (26 mg, 0.1 mmol, 36%) was obtained as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 12.66 (br s, 1 H, NH), 7.19 (s, 1 H, CH), 6.53 (dd, *J*<sub>cis</sub> = 11.9 Hz, *J*<sub>trans</sub> = 17.6 Hz, 2 H, 2 CH), 5.36-5.49 (m, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 2.83 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.40 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>).

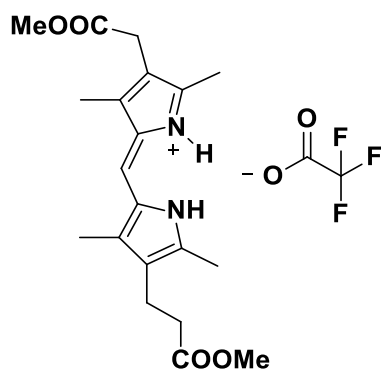
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 154.9 (2 C<sub>quat</sub>), 154.0 (2 C<sub>quat</sub>), 141.8 (2 C<sub>quat</sub>), 137.5 (2 C<sub>quat</sub>), 126.5 (2 CH), 119.7 (CH), 117.8 (2 CH<sub>2</sub>), 14.2 (2 CH<sub>3</sub>), 11.1 (2 CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 252.16, Found: 253.14, [M+H]<sup>+</sup>, Rt=3.31 min.

HPLC: C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 26.62 min, purity > 99%.

Melting point: > 300°C.

**(Z)-4-(2-Methoxy-2-oxoethyl)-2-((4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-3,5-dimethyl-2H-pyrrol-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate (39)**



C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>  
Mw: 472.45 g/mol

This compound was prepared from TFA (44.4 eq., 1.15 mL, 15.8 mmol), *tert*-butyl 4-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (**27**) (1 eq., 95 mg, 0.36 mmol) and methyl 3-(5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)propanoate (**4**) (1 eq., 74 mg, 0.36 mmol) as described in the *General Procedure for Dipyrrin Synthesis*. This procedure did not use 33% HBr solution in AcOH to avoid a product degradation

The title compound (89 mg, 0.2 mmol, 53%) was obtained as a brown solid after flash chromatography with DCM /MeOH (90:10, v/v).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 13.36-13.17 (m, 2 H, 2 NH), 7.10 (t,  $J$ =3 Hz, 1 H, CH), 3.70 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.12 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.77 (t,  $J$ =1.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.54 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.52 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.48 (t,  $J$ =1.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 172.7 (CO), 170.6 (CO), 161.8 (CO), 154.9 (C<sub>quat</sub>), 153.7 (C<sub>quat</sub>), 143.2 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 127.2 (C<sub>quat</sub>), 127.8 (C<sub>quat</sub>), 126.6 (C<sub>quat</sub>), 120.9 (C<sub>quat</sub>), 119.8 (CH), 117.3 (C<sub>quat</sub>), 52.3 (OCH<sub>3</sub>), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 33.8 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 19.4 (CH<sub>2</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>), 12.6 (CH<sub>3</sub>), 10.4 (CH<sub>3</sub>), 10.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 472.18, Found: 359.13; [M-HBr+H]<sup>+</sup>, Rt=2.47 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>= 24.15 min, purity > 99%.

**Melting point:** 127-130°C.

## A. Synthesis of triazole compounds

**General Procedure for Azide Synthesis.** Aniline derivative (1 eq.) was added to a solution of *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq.) in H<sub>2</sub>O (50 mL). After stirring for 5 min, anhydrous NaNO<sub>2</sub> (5 eq.) was added gradually during 5 min. The resulting solution was then stirred for 1 h until complete disappearance of the starting material as monitored by TLC. Then anhydrous NaN<sub>3</sub> (1.6 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was used directly without further purification in the next step.

**General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis.** CDI (3.7 eq.) was added to a solution of corresponding benzoic acid (1 eq.) in THF (50 mL). The resulting solution was stirred for 4 h at room temperature. Separately, to a solution of ethyl potassium malonate (3 eq.) in ACN (25 mL) was added MgCl<sub>2</sub> (4.5 eq.) and Et<sub>3</sub>N (3 eq.). The two solutions were combined and stirred for 20 h at room temperature. The resulting mixture was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in water (100 mL) and the solution was acidified to pH 5.0 with aq. 1.0 M HCl solution. The resulting solution was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude compound was purified by flash chromatography with Cyclohexane/DCM (50:50, v/v).

**General Procedure for Triazole Synthesis.** A solution of sodium ethoxide (2 eq.) in absolute EtOH (30 mL) was cooled to 0 °C. The corresponding  $\beta$ -keto ester compound (1 eq.) dissolved in absolute EtOH (1 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at 0 °C for 1 h before adding the corresponding azide compound (1 eq.). The solution was stirred for 2 h at 0 °C and overnight at room temperature. After concentration under vacuum, the residue was taken up in DCM (10 mL), washed with water (2 x 10 mL). The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give a first ester fraction F1. The aqueous phase was acidified with aq. 6.0 M HCl solution and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give an acid fraction used directly in the next esterification step. Next, to a cooled solution of the crude corresponding acid fraction (1 eq.) in absolute EtOH (50 mL), was added SOCl<sub>2</sub> (5 eq.). The solution was stirred at 0 °C for 30 min and then heated overnight at reflux. The mixture was concentrated under vacuum and the residue was taken up in EtOAc (10 mL), washed with aq. 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (2 x 10 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give a second ester fraction F2. Both gathered ester fractions (F1 and F2) were purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

**General Procedures for Reduction of Nitro Function.** Procedure **A**: Corresponding ester compound (1 eq.) was dissolved in a mixture of THF (20 mL) and EtOH (20 mL).  $K_2CO_3$  (10 eq.) and  $Na_2S_2O_4$  (20 eq.) were added to the solution. Water (10 mL) was added dropwise with vigorous stirring at 50 °C. The solution was continuously stirred at 50 °C for 2 h. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 10 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The crude compound was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

Procedure **B**: To a solution of corresponding ester compound (1 eq.) in  $H_2O$  (10 mL)/THF (10 mL) were added  $Na_2S_2O_4$  (10 eq.) and 35% aq. ammonia (10 eq.) successively. The solution was stirred at room temperature overnight and diluted with EtOAc (20 mL). After separation of both phases, the aqueous one was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). Combined organics layers were dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

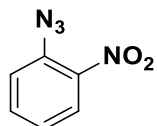
Procedure **C**: A solution of corresponding ester compound (1 eq.), ammonium formate (7 eq.) and Pd/C (10%, 0.1 eq.) in MeOH (10 mL) was stirred at 50 °C for 2 h under a nitrogen atmosphere. The mixture was filtered on celite and concentrated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc (10 mL) and washed with water (2 x 10 mL). The organic layer was separated, dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

**General Procedures for Hydrazone Synthesis.** Procedure **A**: Hydrazine hydrate (20 eq.) was added to a solution of corresponding 1-(nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole derivative (1 eq.) and Pd/C (10%) in THF (20 mL). The mixture was stirred at reflux for 1 h. The solution was filtered on celite and concentrated under vacuum. The residue was taken up in DCM (10 mL), washed with water (2 x 10 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

Procedure **B**: Hydrazine hydrate (20 eq.) was added to a solution of corresponding (1H-1,2,3-triazol-1-yl)aniline derivative (1 eq.) in THF (20 mL). The mixture was stirred at reflux overnight. The solution was filtered on celite and concentrated under vacuum. The residue was taken up in DCM (10 mL), washed with water (2 x 10 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

**General Procedure for Isatin Condensation.** To a solution of corresponding hydrazide (1.1 eq.) and isatin (1 eq.) was added three drops of glacial acetic acid. The solution was refluxed in absolute EtOH (5 mL) for 16 h. The product was collected by filtration.

#### 1-azido-2-nitrobenzene (40)



C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 164.12 g/mol

This compound was prepared from *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq., 34.40 g, 180.0 mmol), *o*-nitroaniline (1 eq., 5.00 g, 36.2 mmol), NaNO<sub>2</sub> (5 eq., 12.50 g, 180.0 mmol) and NaN<sub>3</sub> (1.6 eq., 3.80 g, 57.9 mmol) as described in the *General Procedure for Azide Synthesis*.

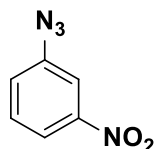
The title compound (5.90 g, 36.2 mmol, 100%) was obtained as a brown powder.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.96 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1 H), 7.65 (ddd, *J* = 8.9, 7.4, 1.5 Hz, 1 H), 7.36 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1 H), 7.29 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.2 Hz, 1 H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 140.9 (C<sub>quat</sub>), 134.8 (C<sub>quat</sub>), 133.9 (CH), 126.1 (CH), 124.9 (CH), 120.8 (CH).

**Melting point:** 52-55 °C.

#### 1-azido-3-nitrobenzene (41)



C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 164.12 g/mol

This compound was prepared from *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq., 3.44 g, 18.1 mmol), *m*-nitroaniline (1 eq., 0.50 g, 3.6 mmol), NaNO<sub>2</sub> (5 eq., 1.25 g, 18.1 mmol) and NaN<sub>3</sub> (1.6 eq., 0.38 g, 5.8 mmol) as described in the *General Procedure for Azide Synthesis*.

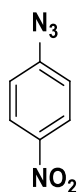
The title compound (0.59 g, 3.62 mmol, 100%) was obtained as a brown powder.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.02 (ddd, *J* = 8.2, 2.1, 0.9 Hz, 1 H), 7.91 (t, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 7.56 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.37 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 0.9 Hz, 1 H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 149.3 (C<sub>quat</sub>), 141.9 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 124.9 (CH), 119.68 (CH), 114.1 (CH).

**Melting point:** 54-57 °C.

### 1-azido-4-nitrobenzene (42)



$C_6H_4N_4O_2$   
Mw: 164.12 g/mol

This compound was prepared from *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq., 6.89 g, 36.2 mmol), *p*-nitroaniline (1 eq., 1.00 g, 7.2 mmol),  $NaNO_2$  (5 eq., 2.50 g, 36.2 mmol) and  $NaN_3$  (1.6 eq., 0.75 g, 11.6 mmol) as described in the *General Procedure for Azide Synthesis*.

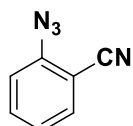
The title compound (0.99 g, 6.01 mmol, 83%) was obtained as a brown powder.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 8.25-8.20 (m, 2 H), 7.15-7.11 (m, 2 H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 147.0 ( $C_{quat}$ ), 144.8 ( $C_{quat}$ ), 125.7 (2 CH), 119.5 (2 CH).

Melting point: 71-75 °C.

### 2-azidobenzonitrile (43)



$C_7H_4N_4$   
Mw: 144.14 g/mol

This compound was prepared from *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq., 8.05 g, 42.3 mmol), anthranilonitrile (1 eq., 1.00 g, 8.5 mmol),  $NaNO_2$  (5 eq., 2.92 g, 42.3 mmol) and  $NaN_3$  (1.6 eq., 0.88 g, 13.5 mmol) as described in the *General Procedure for Azide Synthesis*.

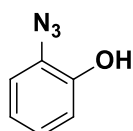
The title compound (1.10 g, 7.63 mmol, 90%) was obtained as a brown powder.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $DMSO-d_6$ ): 7.85 (ddd,  $J = 7.7, 1.5, 0.4$  Hz, 1 H), 7.77 (ddd,  $J = 8.3, 7.5, 1.6$  Hz, 1 H), 7.56 (ddd,  $J = 8.2, 0.9, 0.4$  Hz, 1 H), 7.34 (td,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, 1 H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $DMSO-d_6$ ): 143.8 ( $C_{quat}$ ), 135.6 (CH), 134.7 (CH), 126.2 (CH), 120.7 (CH), 116.6 ( $C_{quat}$ ), 103.3 (CN).

Melting point: 56-58 °C.

### 2-azidophenol (44)



$C_6H_5N_3O$   
Mw: 135.12 g/mol

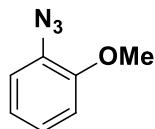
This compound was prepared from *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq., 4.36 g, 22.9 mmol), 2-aminophenol (1 eq., 0.50 g, 4.6 mmol),  $NaNO_2$  (5 eq., 1.58 g, 22.9 mmol) and  $NaN_3$  (1.6 eq., 0.48 g, 7.3 mmol) as described in the *General Procedure for Azide Synthesis*.

The title compound (0.36 g, 2.77 mmol, 59%) was obtained as a brown oil.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 7.10-7.03 (m, 2 H), 6.97-6.87 (m, 2 H), 5.34 (br s, 1 H, OH).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 147.6 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 126.4 (CH), 126.3 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 121.5 (CH), 118.6 (CH), 116.3 (CH).

#### 2-azido-1-methoxybenzene (45)



$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$   
Mw: 149.15 g/mol

This compound was prepared from *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (5 eq., 0.84 g, 44.3 mmol), *o*-anisidine (1 eq., 1.09 g, 1 mL, 8.9 mmol),  $\text{NaNO}_2$  (5 eq., 3.06 g, 44.3 mmol) and  $\text{NaN}_3$  (1.6 eq., 0.92 g, 14.2 mmol) as described in the *General Procedure for Azide Synthesis*.

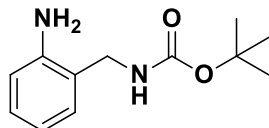
The title compound (1.3 g, 8.7 mmol, 98%) was obtained as a brown powder.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.12 (ddd,  $J = 8.1, 7.3, 1.8$  Hz, 1 H), 7.03 (dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, 1 H), 6.96 (dd,  $J = 7.3, 1.4$  Hz, 1 H), 6.91 (ddd,  $J = 8.3, 7.4, 1.7$  Hz, 1 H), 3.89 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 151.8 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 128.3 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 125.6 (CH), 121.3 (CH), 120.2 (CH), 112.1 (CH), 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ).

**Melting point:** 81-84 °C.

#### Tert-butyl 1-aminobenzylcarbamate (46)



$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$   
Mw: 222.28 g/mol

2-(Aminomethyl)aniline (1 eq., 0.50 g, 4.1 mmol) was dissolved in DCM (20 mL) under a nitrogen atmosphere. A solution of  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1 eq., 0.89 g, 0.88 mL, 4.1 mmol) in DCM (1 mL), was added dropwise at 0 °C. The solution was warmed to room temperature and stirred overnight. The organic phase was washed with brine (2 x 10 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude compound was purified by flash chromatography with Cyclohexane/ $\text{EtOAc}$  (70:30, v/v).

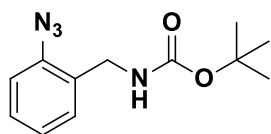
The title compound (0.50 g, 2.25 mmol, 55%) was obtained as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.11 (td,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1 H), 7.04 (dd,  $J = 7.7, 1.4$  Hz, 1 H), 6.80-6.57 (m, 2 H), 4.78 (br s, 1 H, NH), 4.27 (br s, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 4.25 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.46 (s, 9 H, 3  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 156.4 (CO), 145.5 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 130.2 (CH), 129.0 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 122.5 (CH), 117.8 (CH), 115.7 (CH), 79.7 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 42.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.4 (3  $\text{CH}_3$ ).

**Melting point:** 90-94 °C.

### Tert-butyl 1-azidobenzylcarbamate (47)



$C_{12}H_{16}N_4O_2$   
Mw: 248.28 g/mol

A solution of  $NaNO_2$  (2 eq., 74.5 mg, 1.1 mmol) in water (1 mL) was added dropwise at 0 °C to a solution of *tert*-butyl N-[(2-aminophenyl)methyl]carbamate (1 eq., 0.12 g, 0.5 mmol) in acetic acid (3 mL) and water (30 mL) and stirred for 30 min at the same temperature.  $NaN_3$  (2 eq., 70.2 mg, 1.1 mmol) was added and, after 30 min stirring (when the reaction was complete), the reaction mixture was quenched by dropwise addition of aq. 10 N NaOH (5.0 mL). The crude compound was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). Organic layers were separated, washed with brine (2 x 10 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The residue was used directly without further purification in the next step.

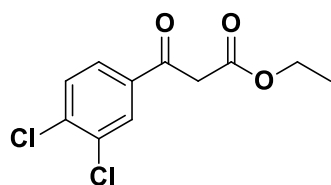
The title compound (0.13 g, 0.54 mmol, 99%) was obtained as a white powder.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 7.38-7.29 (m, 2 H), 7.19-7.06 (m, 2 H), 4.99 (br s, 1 H, NH), 4.26 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 1.45 (s, 9 H, 3  $CH_3$ ).

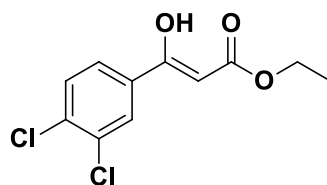
$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 155.7 (CO), 138.1 ( $C_{quat}$ ), 130.0 ( $C_{quat}$ ), 129.9 (CH), 128.8 (CH), 124.9 (CH), 118.0 (CH), 79.5 ( $C_{quat}$ ), 40.6 ( $CH_2$ ), 28.4 (3  $CH_3$ ).

**Melting point:** 72-75 °C.

### Ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (48)



**A (60 %)**



**B (40 %)**

$C_{11}H_{10}Cl_2O_3$   
Mw: 261.10 g/mol

This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 1.57 g, 9.7 mmol), 3,4-dichlorobenzoic acid (1 eq., 0.50 g, 2.6 mmol), potassium malonate (3 eq., 1.34 g, 7.9 mmol),  $MgCl_2$  (4.5 eq., 1.12 g, 11.8 mmol) and  $Et_3N$  (3 eq., 0.80 g, 1.09 mL, 7.8 mmol) as described in the *General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis*.

The title compound (0.58 g, 2.24 mmol, 85%) was obtained as a colorless oil.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): *keto form A*: 8.04 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H), 7.78 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 1 H), 7.58 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 3.96 (s, 2 H,  $CH_2$ ), 1.27 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

*enol form B*: 12.56 (br s, 1H, OH), 7.88 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H), 7.60 (dd,  $J = 8.5, 2.1$  Hz, 1 H), 7.50 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H), 5.65 (s, 1H, CH), 4.28 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

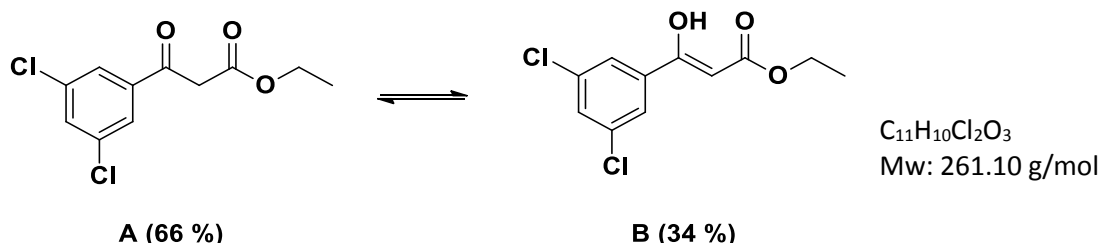
$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): *ketoform A*: 190.3 (CO), 166.8 (CO), 138.4 ( $C_{quat}$ ), 135.5 ( $C_{quat}$ ), 133.6 ( $C_{quat}$ ), 130.9 (CH), 130.6 (CH), 127.5 (CH), 61.7 ( $CH_2$ ), 45.9 ( $CH_2$ ), 14.0 ( $CH_3$ ).



*enol form B*: 172.8 (CO), 168.7 (CO), 135.3 (C<sub>quat</sub>), 133.4 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 130.5 (CH), 128.0 (CH), 125.1 (CH), 88.4 (CH), 60.6 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 260.00, Found: 258.95; [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 3.08 min and 3.73 min.

#### **Ethyl 3-(3,5-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (49)**



This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 0.63 g, 3.9 mmol), 3,5-dichlorobenzoic acid (1 eq., 0.20 g, 1.05 mmol), ethyl potassium malonate (3 eq., 0.53 g, 3.1 mmol), MgCl<sub>2</sub> (4.5 eq., 0.45 g, 4.7 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 0.32 g, 0.44 mL, 3.1 mmol) as described in the *General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis*.

The title compound (0.15 g, 0.66 mmol, 56%) was obtained as a colorless oil.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** *keto form A*: 7.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 2 H), 7.59 (t, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 4.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.95 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

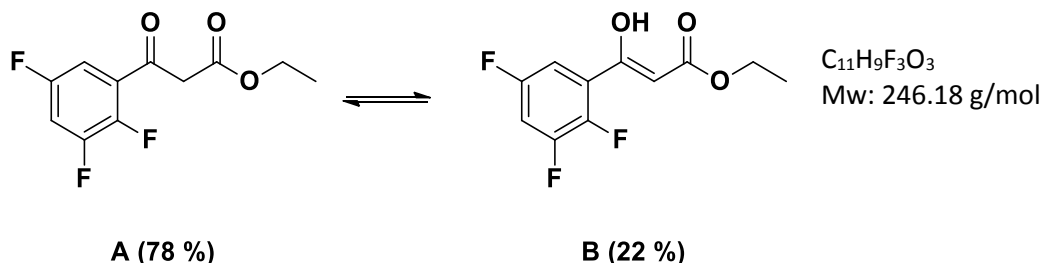
*enol form B*: 12.53 (br s, 1 H, OH), 7.65 (d, *J* = 1.9 Hz, 2 H), 7.45 (t, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 5.65 (s, 1 H, CH), 4.29 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** *keto form A*: 190.1 (CO), 166.7 (CO), 138.4 (C<sub>quat</sub>), 135.9 (2 C<sub>quat</sub>), 133.4 (CH), 126.9 (2 CH), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 45.9 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

*enol form B*: 172.7 (CO), 168.2 (CO), 136.4 (C<sub>quat</sub>), 135.4 (2 C<sub>quat</sub>), 130.8 (CH), 124.5 (2 CH), 89.1 (CH), 60.7 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 260.00, Found: 258.95; [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 3.13 min and 3.83 min.

#### **Ethyl 3-oxo-3-(2,3,5-trifluorophenyl)propanoate (50)**



This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 1.70 g, 10.5 mmol), 2,3,5-trifluorobenzoic acid (1 eq., 0.50 g, 2.8 mmol), ethyl potassium malonate (3 eq., 1.45 g, 8.5 mmol), MgCl<sub>2</sub> (4.5 eq., 1.22 g, 12.8 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 0.86 g, 1.2 mL, 8.5 mmol) as described in the *General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis*.

The title compound (0.24 g, 0.96 mmol, 34%) was obtained as a colorless oil.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** *keto form A*: 7.77-7.69 (m, 1 H), 7.15-7.10 (m, 1 H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.98 (d, *J* = 3.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

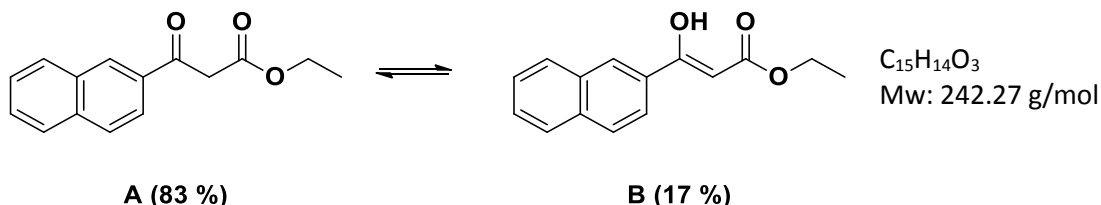
*enol form B*: 12.67 (br s, 1 H, OH), 7.38-7.31 (m, 1 H), 7.01-6.96 (m, 1 H), 5.86 (s, 1 H, CH), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** *keto form A*: 194.2 (CO), 166.5 (CO), 156.9 (ddd, *J* = 248.6, 10.2, 3.0 Hz, C<sub>quat</sub>), 156.4 (ddd, *J* = 248.6, 10.2, 3.0 Hz, C<sub>quat</sub>), 142.2 (ddd, *J* = 249.9, 13.9, 4.4 Hz, C<sub>quat</sub>), 128.8 (dd, *J* = 11.3, 7.6 Hz, C<sub>quat</sub>), 112.0 (dd, *J* = 24.9, 3.5 Hz, CH), 108.4 (dd, *J* = 27.6, 21.1 Hz, CH), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 48.2 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

*enol form B*: 184.5 (CO), 168.1 (CO), 156.8 (ddd, *J* = 247.6, 10.2, 3.0 Hz, C<sub>quat</sub>), 156.3 (ddd, *J* = 247.6, 10.2, 3.0 Hz, C<sub>quat</sub>), 139.8 (ddd, *J* = 253.4, 14.3, 4.2 Hz, C<sub>quat</sub>), 125.1 (dd, *J* = 13.2, 10.7 Hz, C<sub>quat</sub>), 110.7 (dd, *J* = 25.3, 3.9 Hz, CH), 105.5 (dd, *J* = 27.2, 20.8 Hz, CH), 82.3 (CH), 61.4 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 246.05, Found: 246.98; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.87 min and 3.66 min.

### Ethyl 3-(naphthalen-2-yl)-3-oxopropanoate (51)



This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 1.74 g, 10.7 mmol), 2-naphtoic acid (1 eq., 0.50 g, 2.9 mmol), ethyl potassium malonate (3 eq., 1.48 g, 8.7 mmol), MgCl<sub>2</sub> (4.5 eq., 1.24 g, 13.0 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 0.88 g, 1.2 mL, 8.7 mmol) as described in the *General Procedure for β-Keto Ester Synthesis*.

The title compound (0.44 g, 1.82 mmol, 63%) was obtained as a colorless oil.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** *keto form A*: 8.46 (d, *J* = 1.4 Hz, 1 H), 8.02 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1 H), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.93-7.87 (m, 2 H), 7.67-7.56 (m, 2 H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.13 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

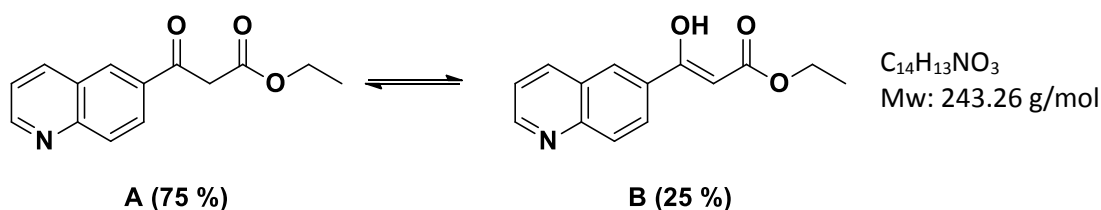
*enol form B*: 12.71 (br s, 1 H, OH), 7.90-7.83 (m, 4 H), 7.79 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1 H), 7.57-7.52 (m, 2 H), 5.83 (s, 1 H, CH), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** *keto form A*: 192.3 (CO), 167.4 (CO), 135.5 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (C<sub>quat</sub>), 130.4 (CH), 129.5 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.6 (CH), 126.8 (CH), 123.6 (CH), 61.3 (CH<sub>2</sub>), 45.8 (CH<sub>2</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>).

*enol form B*: 173.1 (CO), 171.0 (CO), 134.5 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (C<sub>quat</sub>), 128.9 (CH), 128.1 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 126.5 (CH), 125.4 (CH), 122.3 (CH), 87.7 (CH), 60.2 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 242.09, Found: 243.06; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=3.02 min and 3.73 min.

### Ethyl 3-oxo-3-(quinolin-6-yl)propanoate(52)



This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 2.94 g, 18.1 mmol), quinoline-6-carboxylic acid (1 eq., 0.85 g, 4.9 mmol), ethyl potassium malonate (3 eq., 2.50 g, 14.7 mmol),  $MgCl_2$  (4.5 eq., 2.10 g, 22.0 mmol) and  $Et_3N$  (3 eq., 1.49 g, 2.0 mL, 14.7 mmol) as described in the *General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis*.

The title compound (0.81 g, 3.33 mmol, 68%) was obtained as a white solid.

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** keto form **A**: 9.03 (dd,  $J = 4.3, 1.7$  Hz, 1 H), 8.45 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1 H), 8.29 (dd,  $J = 8.4, 1.3$  Hz, 1 H), 8.23 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 8.17 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H), 7.50 (dd,  $J = 8.3, 4.3$  Hz, 1 H), 4.22 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 4.12 (s, 2 H,  $CH_2$ ), 1.26 (q,  $J = 7.1$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

enol form **B**: 12.67 (br s, 1 H, OH), 8.96 (dd,  $J = 4.2, 1.7$  Hz, 1 H), 8.34 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 8.26 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 8.11 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H), 8.00 (dd,  $J = 8.9, 2.0$  Hz, 1 H), 7.45 (dd,  $J = 8.3, 4.3$  Hz, 1 H), 5.82 (s, 1 H, CH), 4.30 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

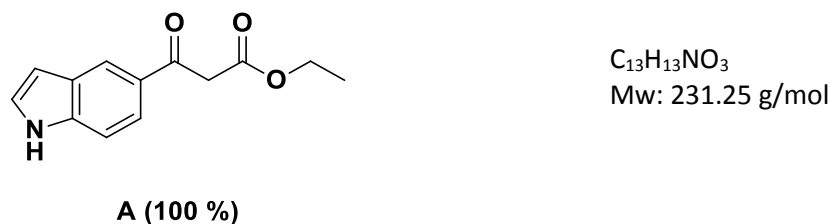
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** keto form **A**: 191.8 (CO), 169.9 (CO), 152.8 (CH), 150.0 ( $C_{quat}$ ), 137.4 (CH), 133.6 ( $C_{quat}$ ), 130.2 ( $C_{quat}$ ), 129.5 (CH), 127.3 (CH), 126.3 (CH), 121.9 (CH), 60.3 ( $CH_2$ ), 45.9 ( $CH_2$ ), 13.9 ( $CH_3$ ).

enol form **B**: 172.8 (CO), 167.2 (CO), 151.5 (CH), 149.1 ( $C_{quat}$ ), 136.7 (CH), 131.1 ( $C_{quat}$ ), 130.1 ( $C_{quat}$ ), 127.6 (CH), 127.2 (CH), 125.9 (CH), 121.6 (CH), 88.4 (CH), 61.4 ( $CH_2$ ), 14.1 ( $CH_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 243.09, Found: 244.04;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 2.25$  min and 3.04 min..

**Melting point:** 170-172 °C.

### Ethyl 3-(1H-indol-5-yl)-3-oxopropanoate (53)



This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 9.27 g, 57.2 mmol), indole-5-carboxylic acid (1 eq., 2.49 g, 15.5 mmol), ethyl potassium malonate (3 eq., 7.89 g, 46.4 mmol),  $MgCl_2$  (4.5 eq., 6.62 g, 69.5 mmol) and  $Et_3N$  (3 eq., 4.69 g, 6.4 mL, 46.4 mmol) as described in the *General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis*.

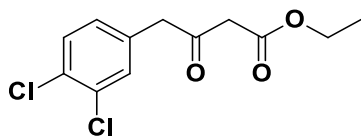
The title compound (1.00 g, 4.33 mmol, 28%) was obtained as a brown oil.

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.89 (br s, 1 H, NH), 8.41-8.14 (m, 1 H), 7.84 (dd,  $J = 8.7, 1.7$  Hz, 1 H), 7.42 (ddd,  $J = 6.9, 3.8, 3.1$  Hz, 1 H), 7.30 (dd,  $J = 3.2, 2.4$  Hz, 1 H), 6.72-6.61 (m, 1 H), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 4.09 (s, 2 H,  $CH_2$ ), 1.26 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 193.2 (CO), 168.5 (CO), 139.1 (C<sub>quat</sub>), 128.2 (C<sub>quat</sub>), 127.5 (C<sub>quat</sub>), 126.6 (CH), 123.3 (CH), 121.9 (CH), 111.6 (CH), 103.9 (CH), 61.4 (CH<sub>2</sub>), 45.9 (CH<sub>2</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) $m/z$  Calculated:** 231.09, Found: 232.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=3.05 min.

#### **Ethyl 4-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxobutanoate (54)**



C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 275.13 g/mol

**A (100 %)**

This compound was prepared from CDI (3.7 eq., 5.85 g, 36.1 mmol), 3,4-dichlorophenylacetic acid (1 eq., 2.00 g, 9.7 mmol), ethyl potassium malonate (3 eq., 4.98 g, 29.3 mmol), MgCl<sub>2</sub> (4.5 eq., 4.18 g, 43.9 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3 eq., 2.96 g, 4.1 mL, 29.3 mmol) as described in the *General Procedure for  $\beta$ -Keto Ester Synthesis*.

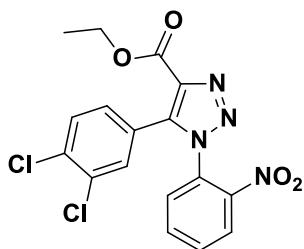
The title compound (2.66 g, 9.77 mmol, 99%) was obtained as a colorless oil.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.41 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H), 7.31 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1 H), 7.05 (dd,  $J$  = 8.2, 1.7 Hz, 1 H), 4.20 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.49 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.29 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 199.2 (CO), 166.6 (CO), 133.4 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (CH), 130.2 (CH), 129.1 (CH), 61.2 (CH<sub>2</sub>), 48.6 (CH<sub>2</sub>), 48.3 (CH<sub>2</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) $m/z$  Calculated:** 274.02, Found: 274.98; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.75 min.

#### **Ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (55)**



C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 407.21 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 705 mg, 4.3 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 1122 mg, 4.3 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 585 mg, 0.674 mL, 8.6 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 2.56 g, 1.65 mL, 21.5 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (1.50 g, 3.68 mmol, 86%) was obtained as a white powder.

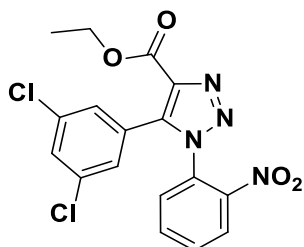
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.15 (dd,  $J$  = 7.3, 2.8 Hz, 1 H), 7.75-7.70 (m, 2 H), 7.48-7.42 (m, 3 H), 7.18 (dd,  $J$  = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 4.43 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.39 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.4 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 135.1 (C<sub>quat</sub>), 134.3 (CH), 133.0 (C<sub>quat</sub>), 131.9 (CH), 131.9 (CH), 130.6 (CH), 129.6 (CH), 129.3 (CH), 128.7 (C<sub>quat</sub>), 126.1 (CH), 124.5 (C<sub>quat</sub>), 61.7 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 406.02, Found: 407.00;  $[M+H]^+$ ,  $R_t$  = 3.18 min.

**Melting point:** 145-148 °C.

**Ethyl 5-(3,5-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (56)**



$C_{17}H_{12}Cl_2N_4O_4$

Mw: 407.21 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 0.433 g, 2.64 mmol) ethyl 3-(3,5-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**49**) (1 eq., 0.689 g, 2.64 mmol) ethanolate sodium (2 eq., 0.359 g, 0.414 mL, 5.28 mmol) and  $SOCl_2$  (5 eq., 1.57 g, 0.96 mL, 13.2 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.90 g, 2.22 mmol, 84%) was obtained as a white powder.

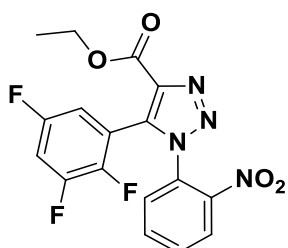
**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.16 (dd,  $J$  = 7.1 Hz, 2.2 Hz, 1 H), 7.78-7.72 (m, 2 H), 7.45-7.39 (m, 2 H), 7.23 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2 H), 4.40 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 1.37 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 160.2 (CO), 145.1 ( $C_{quat}$ ), 139.7 ( $C_{quat}$ ), 137.2 ( $C_{quat}$ ), 135.2 (2  $C_{quat}$ ), 134.4 (CH), 132.0 (CH), 130.5 (CH), 129.6 (CH), 128.5 ( $C_{quat}$ ), 128.4 (2 CH), 127.7 ( $C_{quat}$ ), 126.1 (CH), 61.7 ( $CH_2$ ), 14.1 ( $CH_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 406.02, Found: 407.00;  $[M+H]^+$ ,  $R_t$  = 3.22 min.

**Melting point:** 154-156 °C.

**Ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(2,3,5-trifluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (57)**



$C_{17}H_{11}F_3N_4O_4$

Mw: 392.29 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 226 mg, 1.38 mmol), ethyl 3-oxo-3-(2,3,5-trifluorophenyl)propanoate (**50**) (1 eq., 339 mg, 1.38 mmol), sodium ethanolate (2 eq., 187 mg, 0.216 mL, 2.76 mmol) and  $SOCl_2$  (5 eq., 0.82 g, 0.55 mL, 6.9 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

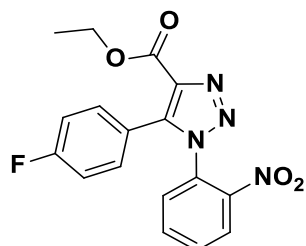
The title compound (0.25 g, 0.63 mmol, 46%) was obtained as an orange oil.

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.15 (dd,  $J$  = 7.8, 1.9 Hz, 1 H), 7.82-7.77 (m, 2 H), 7.55-7.52 (m, 1 H), 7.10-7.04 (m, 1 H), 6.88-6.80 (m, 1 H), 4.40 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 1.35 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 159.8 (CO), 157.2 (ddd,  $J_{C-F} = 248.6, 10.2, 3.0$  Hz, C<sub>quat</sub>), 150.3 (ddd,  $J_{C-F} = 252.8, 13.8, 12.7$  Hz, C<sub>quat</sub>), 144.9 (ddd,  $J_{C-F} = 249.9, 13.9, 4.4$  Hz, C<sub>quat</sub>), 144.7 (C<sub>quat</sub>), 138.5 (C<sub>quat</sub>), 134.6 (C<sub>quat</sub>), 134.5 (CH), 132.3 (CH), 129.5 (CH), 128.3 (C<sub>quat</sub>), 126.0 (CH), 115.9 (dt,  $J_{C-F} = 13.2, 10.7$  Hz, C<sub>quat</sub>), 113.2 (dd,  $J_{C-F} = 25.3, 3.9$  Hz, CH), 108.3 (dd,  $J_{C-F} = 27.2, 20.8$  Hz, CH), 61.7 (CH<sub>2</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 392.07, Found: 393.00; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.99 min.

#### **Ethyl 5-(4-fluorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (58)**



C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 356.31 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 98.5 mg, 0.6 mmol), methyl 4-fluorobenzoylacetate (1 eq., 117 mg, 0.6 mmol), methanolate de sodium (2 eq., 64.8 mg, 1.2 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.36 g, 0.22 mL, 3.0 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.90 g, 0.25 mmol, 41%) was obtained as a white powder.

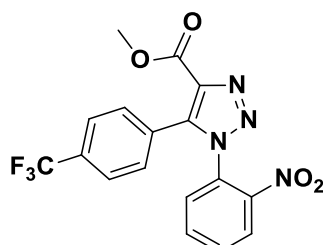
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.08 (dd,  $J = 7.7, 2.2$  Hz, 1 H), 7.74-7.65 (m, 2 H), 7.41 (dd,  $J = 7.3, 1.9$  Hz, 1 H), 7.33-7.26 (m, 2 H), 7.08-7.03 (m, 2 H), 4.40 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 163.6 (d,  $J_{C-F} = 250.0$  Hz, C<sub>quat</sub>), 160.6 (CO), 145.0 (C<sub>quat</sub>), 141.6 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 134.2 (CH), 132.2 (d,  $J_{C-F} = 8.6$  Hz, 2 CH), 131.6 (CH), 129.7 (CH), 129.0 (C<sub>quat</sub>), 126.0 (CH), 120.5 (d,  $J_{C-F} = 3.8$  Hz, C<sub>quat</sub>), 115.9 (d,  $J_{C-F} = 20.0$  Hz, 2 CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 356.09, Found: 357.13; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.87 min.

**Melting point:** 145-147 °C.

#### **Methyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (59)**



C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 392.29 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 1.33 g, 8.1 mmol), methyl 4-(trifluoromethyl)benzoylacetate (1 eq., 1.99 g, 8.1 mmol) and methanolate de sodium (2 eq., 0.875 g, 1.94 mL, 16.2 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (2.93 g, 7.47 mmol, 92%) was obtained as a white powder.

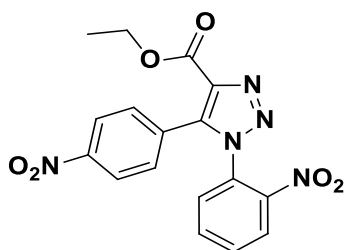
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.12-8.08 (m, 1 H), 7.78-7.72 (m, 2 H), 7.62 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H), 7.48 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H), 7.43-7.39 (m, 1 H), 3.96 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.9 (CO), 145.0 (C<sub>quat</sub>), 141.2 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 134.3 (CH), 132.3 (q,  $J_{C-F}$  = 33.2 Hz, C<sub>quat</sub>), 131.9 (CH), 130.6 (2 CH), 129.7 (CH), 128.7 (C<sub>quat</sub>), 128.3 (C<sub>quat</sub>), 126.0 (CH), 125.5 (q,  $J_{C-F}$  = 3.8 Hz, 2 CH), 123.5 (q,  $J_{C-F}$  = 271.9 Hz, CF<sub>3</sub>), 52.4 (OCH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 392.07, Found: 393.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.97 min.

**Melting point:** 71-74 °C.

#### **Ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (60)**



C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>  
Mw: 383.32 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 459 mg, 2.8 mmol), ethyl (4-nitrobenzoyl)acetate (1 eq., 664 mg, 2.8 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 381 mg, 0.439 mL, 5.6 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 1.67 g, 1.02 mL, 14.1 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.25 g, 0.65 mmol, 23%) was obtained as a white powder.

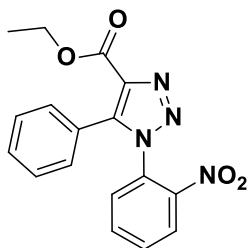
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.27-8.19 (m, 2 H), 8.18-8.11 (m, 1 H), 7.83-7.71 (m, 2 H), 7.61-7.53 (m, 2 H), 7.48-7.41 (m, 1 H), 4.43 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.39 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.7 (CO), 149.1 (C<sub>quat</sub>), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 140.7 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 134.7 (CH), 132.4 (CH), 131.7 (2 CH), 131.6 (C<sub>quat</sub>), 130.0 (CH), 129.0 (C<sub>quat</sub>), 126.5 (CH), 123.9 (2 CH), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 383.09, Found: 384.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.84 min.

**Melting point:** 148-150 °C.

#### **Ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (61)**



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 338.32 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 633 mg, 3.86 mmol), ethyl 3-oxo-3-phenylpropanoate (1 eq., 741 mg, 3.86 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 525 mg, 0.605 mL, 7.72 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 2.30 g, 1.40 mL, 19.3 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (1.05 g, 3.11 mmol, 80%) was obtained as a white powder.

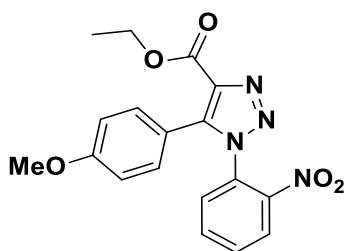
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.12-8.02 (m, 1 H), 7.78-7.60 (m, 2 H), 7.48-7.24 (m, 6 H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.0 (CO), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 134.4 (CH), 131.7 (CH), 130.6 (CH), 130.4 (2 CH), 130.1 (CH), 129.3 (C<sub>quat</sub>), 128.8 (2 CH), 126.1 (CH), 124.9 (C<sub>quat</sub>), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 338.10, Found: 339.06; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.81 min.

**Melting point:** 139-141 °C.

#### Ethyl 5-(4-methoxyphenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (62)



C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>  
Mw: 368.34 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 0.837 g, 5.1 mmol), ethyl 3-(4-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate (1 eq., 1.13 g, 5.1 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 0.694 g, 0.8 mL, 10.2 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 3.06 g, 1.99 mL, 25.7 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (1.13 g, 3.07 mmol, 60%) was obtained as a white powder.

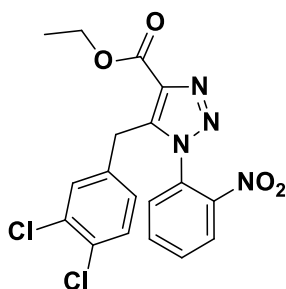
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.08 (dd, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1 H), 7.77-7.70 (m, 2 H), 7.45 (dd, *J* = 7.4, 1.9 Hz, 1 H), 7.25 (d, *J* = 9.0 Hz, 2 H), 6.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 2 H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.9 (CO), 160.8 (CO), 144.9 (C<sub>quat</sub>), 142.4 (C<sub>quat</sub>), 136.3 (C<sub>quat</sub>), 134.0 (CH), 131.6 (2 CH), 131.2 (CH), 129.7 (CH), 129.4 (C<sub>quat</sub>), 125.7 (CH), 116.2 (C<sub>quat</sub>), 113.9 (2 CH), 61.3 (CH<sub>2</sub>), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 368.11, Found: 369.06 [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.83 min.

**Melting point:** 180-182 °C.

#### Ethyl 5-(3,4-dichlorobenzyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (63)



C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 421.23 g/mol



This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 150 mg, 0.914 mmol), ethyl 4-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxobutanoate (**54**) (1 eq., 251 mg, 0.914 mmol) and ethanolate sodium (2 eq., 124 mg, 0.143 mL, 1.83 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (61 mg, 0.15 mmol, 16%) was obtained as a white powder.

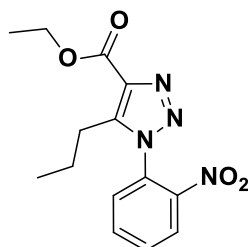
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 8.30 (dd, *J* = 7.5, 1.8 Hz, 1 H), 7.96-7.94 (m, 2 H), 7.79 (dd, *J* = 7.6, 1.9 Hz, 1 H), 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.08 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 6.89 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1 H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.32 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** The product is instable in solution so that a convenient carbon spectrum could not be obtained after a large number of scans.

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 420.04, Found: 421.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.17 min.

**Melting point:** 126-128 °C.

#### **Ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-propyl-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**64**)**



C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 304.30 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 173 mg, 1.06 mmol), methyl 3-oxohexanoate (1 eq., 152 mg, 1.06 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 144 mg, 0.166 mL, 2.12 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 630 mg, 0.384 mL, 5.3 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.17 g, 0.57 mmol, 54%) was obtained as a white powder.

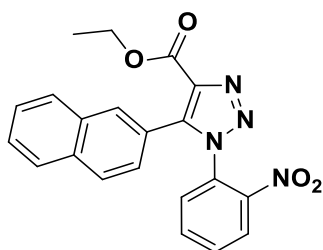
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.27 (dd, *J* = 7.6, 2.0 Hz, 1 H), 7.96- 7.75 (m, 2 H), 7.52 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1 H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.97-2.79 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.61-1.50 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.3 (CO), 145.3 (C<sub>quat</sub>), 144.6 (C<sub>quat</sub>), 136.4 (C<sub>quat</sub>), 134.2 (CH), 132.0 (CH), 129.8 (CH), 128.9 (C<sub>quat</sub>), 126.1 (CH), 61.2 (CH<sub>2</sub>), 25.3 (CH<sub>2</sub>), 21.7 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 304.12, Found: 305.08; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.82 min.

**Melting point:** 116-118 °C.

### Ethyl 5-(naphthalen-2-yl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (65)



C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 388.38 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 196 mg, 1.2 mmol), ethyl 3-(naphthalen-2-yl)-3-oxopropanoate (**51**) (1 eq., 291 mg, 1.2 mmol) sodium ethoxide (2 eq., 163 mg, 0.188 mL, 2.4 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.71 g, 0.43 mL, 6.0 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.28 g, 0.72 mmol, 60%) was obtained as a brown powder.

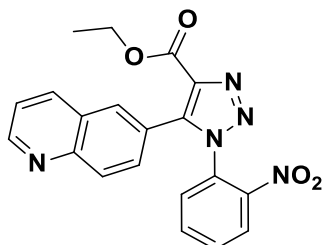
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.05 (dd, *J* = 7.3, 2.2 Hz, 1 H), 7.82-7.77 (m, 3 H), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.65-7.58 (m, 2 H), 7.52-7.48 (m, 2 H), 7.43 (dd, *J* = 7.0, 2.2 Hz, 1 H), 7.38 (dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 1 H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 160.7 (CO), 145.0 (C<sub>quat</sub>), 142.4 (C<sub>quat</sub>), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 134.1 (CH), 133.5 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (CH), 130.5 (CH), 129.7 (CH), 129.1 (C<sub>quat</sub>), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 127.4 (CH), 126.8 (CH), 126.3 (CH), 125.7 (CH), 121.8 (C<sub>quat</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 388.12, Found: 389.08; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.08 min.

Melting point: 168-170 °C.

### Ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(quinolin-6-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (66)



C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 389.36 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 124 mg, 0.76 mmol), 2-[[3-oxo-3-(quinolin-6-yl)propanoyl]oxy]ethylum (**52**) (1 eq., 184 mg, 0.763 mmol) sodium ethoxide (2 eq., 103 mg, 0.119 mL, 1.52 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.45 g, 0.33 mL, 3.8 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.12 g, 0.31 mmol, 41%) was obtained as a beige powder.

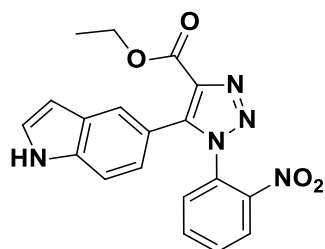
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.97 (dd, *J* = 4.2, 1.6 Hz, 1 H), 8.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 8.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.89 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.72-7.61 (m, 2 H), 7.58 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1 H), 7.46 (d, *J* = 4.4 Hz, 1 H), 7.44-7.41 (m, 1 H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 160.7 (CO), 152.3 (CH), 148.3 (C<sub>quat</sub>), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 141.9 (C<sub>quat</sub>), 137.2 (C<sub>quat</sub>), 136.6 (CH), 134.3 (CH), 131.7 (CH), 130.8 (CH), 130.1 (CH), 130.0 (CH), 129.8 (CH), 129.1 (C<sub>quat</sub>), 127.7 (C<sub>quat</sub>), 126.0 (CH), 122.9 (C<sub>quat</sub>), 122.2 (CH), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 389.11, Found: 390.06; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.51 min.

**Melting point:** 156-158 °C.

**Ethyl 5-(1H-indol-5-yl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (67)**



C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 377.35 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-nitrobenzene (**40**) (1 eq., 0.141 g, 0.86 mmol), ethyl 3-(1H-indol-5-yl)-3-oxopropanoate (**53**) (1 eq., 0.199 g, 0.86 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 0.117 g, 0.135 mL, 1.72 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.51 g, 0.31 mL, 4.3 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.11 g, 0.28 mmol, 33%) was obtained as a white powder.

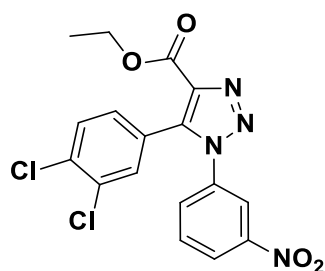
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.46 (s, 1 H), 8.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 7.73-7.56 (m, 3 H), 7.43 d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.24-7.21 (m, 1 H), 7.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 6.51 (s, 1 H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.2 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 144.1 (C<sub>quat</sub>), 136.5 (C<sub>quat</sub>), 136.4 (C<sub>quat</sub>), 134.0 (CH), 131.6 (CH), 129.8 (CH), 129.5 (C<sub>quat</sub>), 127.6 (C<sub>quat</sub>), 125.9 (CH), 125.7 (CH), 123.3 (CH), 123.2 (CH), 115.0 (C<sub>quat</sub>), 111.5 (CH), 102.9 (CH), 61.3 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 377.11, **Found:** 378.09; [M+H]<sup>+</sup>, *R*<sub>t</sub> = 2.65 min.

**Melting point:** 147-149 °C.

**Ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (68)**



C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 407.21 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-3-nitrobenzene (**41**) (1 eq., 300 mg, 1.83 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 477 mg, 1.83 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 248 mg, 0.287 mL, 3.66 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 1.09 g, 0.66 mL, 9.1 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.60 g, 1.47 mmol, 81%) was obtained as a white powder.

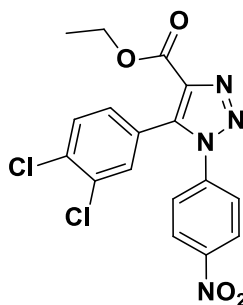
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.19-8.12 (m, 1 H), 7.83-7.70 (m, 2 H), 7.47 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.46-7.40 (m, 2 H), 7.18 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 160.3 (CO), 148.6 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (C<sub>quat</sub>), 135.4 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 130.9 (CH), 130.7 (CH), 130.4 (CH), 129.3 (CH), 124.8 (C<sub>quat</sub>), 124.6 (CH), 120.6 (CH), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 406.02, Found: 406.93; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.19 min.

Melting point: 147-149 °C.

**Ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (69)**



C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 407.21 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-4-nitrobenzene (**42**) (1 eq., 229 mg, 1.4 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 365 mg, 1.4 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 190 mg, 0.22 mL, 2.8 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.84 g, 0.51 mL, 7.0 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.31 g, 0.76 mmol, 54%) was obtained as a white powder.

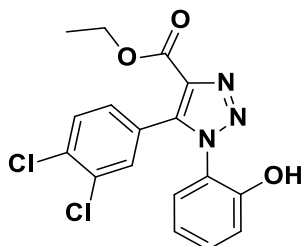
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.43-8.28 (m, 2 H), 7.62-7.46 (m, 4 H), 7.12 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 160.2 (CO), 148.0 (C<sub>quat</sub>), 139.9 (C<sub>quat</sub>), 138.5 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 135.5 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 130.9 (CH), 129.3 (CH), 125.6 (2 CH), 125.2 (2 CH), 124.9 (C<sub>quat</sub>), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 406.02, Found: 406.97; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.57 min.

Melting point: 172-174 °C.

**Ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (70)**



C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 378.21 g/mol

This compound was prepared from 2-azidophenol (**44**) (1 eq., 159 mg, 1.18 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 308 mg, 1.18 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 160 mg, 0.185 mL, 2.36 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.70 g, 0.43 mL, 5.9 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.11 g, 0.28 mmol, 24%) was obtained as a white powder.

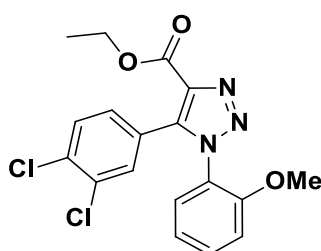
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.54 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.41-7.33 (m, 1 H), 7.14 (td, *J* = 8.2, 4.6 Hz, 2 H), 6.95-6.89 (m, 2 H), 6.83 (s, 1 H, OH), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.5 (CO), 150.7 (C<sub>quat</sub>), 139.5 (C<sub>quat</sub>), 137.0 (C<sub>quat</sub>), 134.7 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 131.8 (CH), 130.4 (CH), 129.2 (CH), 126.5 (CH), 125.4 (C<sub>quat</sub>), 122.4 (C<sub>quat</sub>), 120.9 (CH), 118.5 (CH), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 377.03, Found: 377.99; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.95 min.

**Melting point:** 225-227 °C.

### **Ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (71)**



C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 392.24 g/mol

This compound was prepared from 1-azido-2-methoxybenzene (**45**) (1 eq., 82 mg, 0.55 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 143 mg, 0.55 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 74.9 mg, 0.0862 mL, 1.1 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.33 g, 0.20 mL, 2.75 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (99 mg, 0.25 mmol, 46%) was obtained as a white powder.

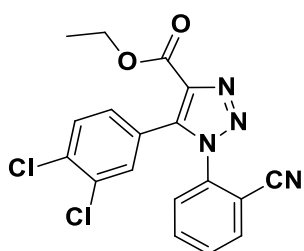
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.51-7.35 (m, 4 H), 7.16-7.03 (m, 2 H), 6.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.58 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.3 (CO), 153.8 (C<sub>quat</sub>), 140.8 (C<sub>quat</sub>), 136.7 (C<sub>quat</sub>), 134.5 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.0 (CH), 130.3 (CH), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 124.5 (C<sub>quat</sub>), 121.5 (CH), 112.6 (CH), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 391.05, Found: 392.01; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.25 min.

**Melting point:** 140-144 °C.

### **Ethyl 1-(2-cyanophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (72)**



C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 387.22 g/mol

This compound was prepared from 2-azidobenzonitrile (**43**) (1 eq., 89.4 mg, 0.62 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 161 mg, 0.62 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 84.4 mg,

0.0972 mL, 1.24 mmol) ) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.37 g, 0.23 mL, 3.13 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (60 mg, 0.15 mmol, 25%) was obtained as a white powder.

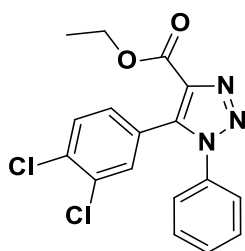
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.86-7.76 (m, 2 H), 7.73-7.65 (m, 1 H), 7.60-7.53 (m, 1 H), 7.49-7.41 (m, 2 H), 7.19 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 4.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.3 (CO), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 137.2 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 135.2 (C<sub>quat</sub>), 134.2 (CH), 134.1 (CH), 132.9 (C<sub>quat</sub>), 132.3 (CH), 131.2 (CH), 130.5 (CH), 129.6 (CH), 128.6 (CH), 124.4 (C<sub>quat</sub>), 114.4 (CN), 111.4 (C<sub>quat</sub>), 61.7 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 386.03, Found: 386.98; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.12 min.

**Melting point:** 160-162 °C.

### Ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-phenyl-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (73)



C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 362.21 g/mol

This compound was prepared from azidobenzene (1 eq., 0.5 M, 1.92 mL, 0.96 mmol), ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 0.251 g, 0.96 mmol), sodium ethoxide (2 eq., 0.131 g, 0.151 mL, 1.92 mmol) and SOCl<sub>2</sub> (5 eq., 0.57 g, 0.35 mL, 4.83 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (0.12 g, 0.33 mmol, 34%) was obtained as a white powder.

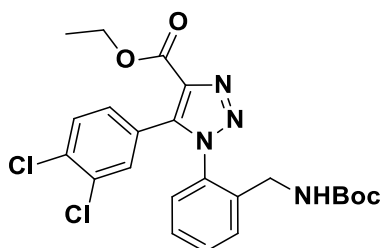
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.53-7.39 (m, 5 H), 7.35-7.24 (m, 2 H), 7.10 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.7 (CO), 138.5 (C<sub>quat</sub>), 137.2 (C<sub>quat</sub>), 135.3 (C<sub>quat</sub>), 134.6 (C<sub>quat</sub>), 132.8 (C<sub>quat</sub>), 132.3 (CH), 130.5 (CH), 130.0 (CH), 129.6 (2 CH), 129.5 (CH), 125.6 (C<sub>quat</sub>), 125.3 (2 CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 361.04, Found: 362.03; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.28 min.

**Melting point:** 140-143 °C.

**Ethyl 1-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (74)**



C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 491.37 g/mol

This compound was prepared from ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (**48**) (1 eq., 0.32 g, 1.24 mmol), *tert*-butyl *N*-[(2-azidophenyl)methyl]carbamate (**47**) (1 eq., 0.31 g, 1.24 mmol) and sodium ethoxide (2 eq., 0.17 g, 2.47 mmol) as described in the *General Procedure for Triazole Synthesis*.

The title compound (169 mg, 0.344 mmol, 28%) was obtained as white powder.

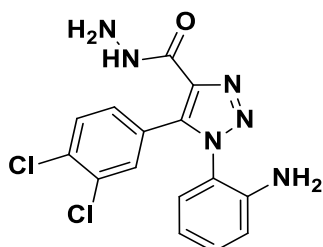
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.59 (dd, *J* = 7.5, 0.6 Hz, 1 H), 7.55-7.45 (m, 2 H), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.31 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1 H), 7.13 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1 H), 6.97 (dd, *J* = 8.8, 1.2 Hz, 1 H), 4.98 (br s, 1 H, NH), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.10 (d, *J* = 0.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.41 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.6 (CO), 155.6 (CO), 139.7 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (C<sub>quat</sub>), 134.7 (C<sub>quat</sub>), 133.6 (C<sub>quat</sub>), 132.8 (CH), 132.3 (CH), 131.0 (CH), 130.6 (C<sub>quat</sub>), 130.4 (CH), 129.5 (CH), 128.5 (CH), 127.3 (CH), 125.0 (C<sub>quat</sub>), 79.9 (C<sub>quat</sub>), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (3 CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 490.12, Found: 491.12; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.47 min.

**Melting point:** 185-187 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (75)**



C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 363.20 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**86**) (1 eq., 0.31 g, 0.82 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 1.26 g, 1.23 mL, 16.40 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (0.24 g, 0.65 mmol, 80%) was obtained as a white powder.

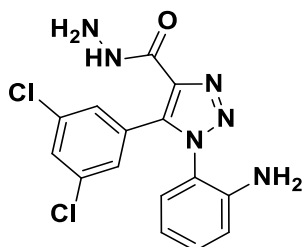
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.84 (br s, 1 H, NH), 7.73 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.29 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.16 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 1.6 Hz, 1 H), 7.08 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1 H), 6.55 (ddd, *J* = 7.9, 7.3, 1.3 Hz, 1 H), 5.27 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.48 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.7 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (CH), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 131.7 (CH), 130.7 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.3 (CH), 129.1 (CH), 127.3 (C<sub>quat</sub>), 119.8 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 362.04, **Found:** 363.04;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 2.51$  min.

**Melting point:** 180-182 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,5-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (76)**



$C_{15}H_{12}Cl_2N_6O$   
Mw: 363.20 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,5-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**56**) (1 eq., 0.15 g, 0.37 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.57 g, 0.55 mL, 7.37 mmol) and Pd/C (10%, 3.9 mg, 0.037 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (0.12 g, 0.33 mmol, 90%) was obtained as a white powder.

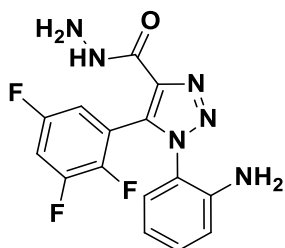
**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ):** 9.86 (br s, 1 H, NH), 7.61 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1 H), 7.46 (d,  $J = 1.9$  Hz, 2 H), 7.17-7.12 (m, 1 H), 7.10 (dd,  $J = 7.9, 1.5$  Hz, 1 H), 6.74 (dd,  $J = 8.3, 1.2$  Hz, 1 H), 6.53-6.48 (m, 1 H), 5.26 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.49 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ):** 159.6 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 138.8 (C<sub>quat</sub>), 137.4 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (CH), 131.8 (CH), 130.2 (C<sub>quat</sub>), 129.3 (2 CH), 129.2 (CH), 129.1 (2 C<sub>quat</sub>), 119.7 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 362.04, **Found:** 363.04;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 2.58$  min.

**Melting point:** 180-182 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(2,3,5-trifluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (77)**



$C_{15}H_{11}F_3N_6O$   
Mw: 348.28 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(2,3,5-trifluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**57**) (1 eq., 0.23 g, 0.59 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.90 g, 11.70 mmol) and Pd/C (10%, 6.2 mg, 0.006 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (40.8 mg, 0.12 mmol, 20%) was obtained as a white powder.

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ):** 8.41 (br s, 1 H, NH), 7.26-7.23 (m, 1 H), 6.99-6.93 (m, 1 H), 6.83-6.78 (m, 3 H), 6.72-6.69 (m, 1 H), 4.07 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.92 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

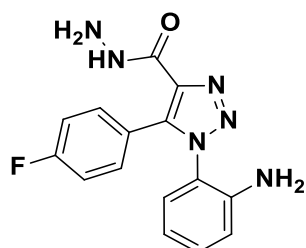


**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 160.3 (CO), 156.8 (ddd,  $J_{C-F}$  = 248.6, 10.2, 3.1 Hz, C<sub>quat</sub>), 150.0 (ddd,  $J_{C-F}$  = 252.8, 13.8, 12.7 Hz, C<sub>quat</sub>), 145.0 (ddd,  $J_{C-F}$  = 249.9, 13.9, 4.4 Hz, C<sub>quat</sub>), 142.5 (C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (C<sub>quat</sub>), 128.4 (CH), 121.1 (CH), 120.8 (C<sub>quat</sub>), 118.9 (CH), 117.4 (CH), 116.3 (td,  $J_{C-F}$  = 13.2, 10.7 Hz, C<sub>quat</sub>), 113.4 (dd,  $J_{C-F}$  = 25.3, 3.9 Hz, CH), 108.5 (dd,  $J_{C-F}$  = 27.2, 20.8 Hz, CH).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 348.09, Found: 349.03; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.28 min.

**Melting point:** 201-203 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (78)



C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>6</sub>O  
Mw: 312.30 g/mol

This compound was prepared from methyl 5-(4-fluorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**58**) (1 eq., 0.21 mg, 0.61 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.94 g, 0.92 mL, 12.30 mmol) and Pd/C (10%, 6.5 mg, 0.061 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (88.1 mg, 0.28 mmol, 46%) was obtained as a white powder.

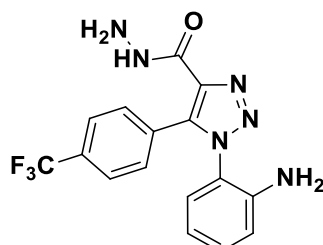
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.48 (br s, 1 H, NH), 7.40-7.35 (m, 2 H), 7.21-7.16 (m, 1 H), 7.03 (t,  $J$  = 8.8 Hz, 2 H), 6.87 (dd,  $J$  = 7.9, 1.5 Hz, 1 H), 6.79 (dd,  $J$  = 8.1 Hz, 1.1 Hz, 1 H), 6.70 (m, 1 H), 4.05 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.93 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 163.5 (d,  $J_{C-F}$  = 251.9 Hz, C<sub>quat</sub>), 161.1 (CO), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 139.4 (C<sub>quat</sub>), 137.0 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (d,  $J_{C-F}$  = 8.8 Hz, 2 CH), 131.3 (CH), 127.7 (CH), 121.5 (C<sub>quat</sub>), 120.9 (d,  $J_{C-F}$  = 3.4 Hz, C<sub>quat</sub>), 118.6 (CH), 117.2 (CH), 115.5 (d,  $J_{C-F}$  = 20.0 Hz, 2 CH).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 312.11, Found: 313.06; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.42 min.

**Melting point:** 178-180 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (79)



C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 362.31 g/mol

This compound was prepared from methyl 1-(2-nitrophenyl)-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**59**) (1 eq., 1.00 g, 2.55 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 3.93 g, 3.80 mL, 51.0 mmol) and Pd/C (10%, 27.1 mg, 0.25 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (0.73 g, 2.01 mmol, 79%) was obtained as a white powder.

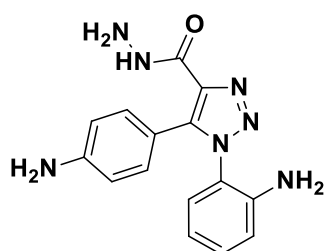
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.60 (br s, 1 H, NH), 7.56-7.48 (m, 4 H), 7.25-7.21 (m, 1 H), 6.86-6.83 (m, 1 H), 6.77-6.74 (m, 1 H), 6.69-6.63 (m, 1 H), 4.08 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.95 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.8 (CO), 142.9 (C<sub>quat</sub>), 138.9 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 131.7 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 33.2 Hz, C<sub>quat</sub>), 131.5 (CH), 130.7 (2 CH), 128.7 (C<sub>quat</sub>), 127.6 (CH), 125.1 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 3.8 Hz, 2 CH), 123.6 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 273.7 Hz, CF<sub>3</sub>), 121.2 (C<sub>quat</sub>), 118.7 (CH), 117.3 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 362.11, Found: 363.04 [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.45 min.

**Melting point:** 164-167 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(4-aminophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (80)



C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O  
Mw: 309.33 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**60**) (1 eq., 0.13 g, 0.34 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.52 g, 0.51 mL, 6.78 mmol) and Pd/C (10%, 3.6 mg, 0.034 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (81.0 mg, 0.26 mmol, 77%) was obtained as a white powder.

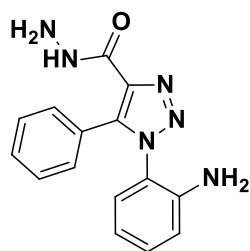
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.53 (br s, 1 H, NH), 7.21-7.11 (m, 1 H), 7.06-6.97 (m, 2 H), 6.84 (ddd, *J* = 25.1, 8.0, 1.3 Hz, 2 H), 6.59-6.49 (m, 1 H), 6.45-6.35 (m, 2 H), 5.37 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.09 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.44 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 161.1 (CO), 150.5 (C<sub>quat</sub>), 145.6 (C<sub>quat</sub>), 140.6 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 131.6 (2 CH), 131.5 (CH), 129.2 (CH), 121.6 (C<sub>quat</sub>), 116.7 (CH), 116.5 (CH), 113.5 (2 CH), 112.7 (C<sub>quat</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 309.13, Found: 310.10; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 1.81 min.

**Melting point:** 176-178 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-phenyl-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (81)



C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 294.31 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-phenyl-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**61**) (1 eq., 0.16 g, 0.47 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.73 g, 0.71 mL, 9.46 mmol) and Pd/C (10%, 5.1 mg, 0.047 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (0.11 g, 0.37 mmol, 79%) was obtained as a white powder.

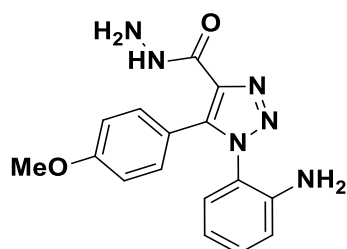
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.71 (br s, 1 H, NH), 7.52-7.21 (m, 5 H), 7.14 (td, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1 H), 6.95 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1 H), 6.76 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1 H), 6.51 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1 H), 5.21 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.50 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 160.1 (CO), 148.0 (C<sub>quat</sub>), 139.7 (C<sub>quat</sub>), 138.2 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (2 CH), 129.6 (CH), 128.6 (CH), 128.1 (2 CH), 126.4 (CH), 120.5 (CH), 119.1 (CH), 114.6 (C<sub>quat</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 294.12, Found: 295.10; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.08 min.

**Melting point:** 187-189 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**82**)



C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 324.34 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(4-methoxyphenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**62**) (1 eq., 0.10 g, 0.27 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.42 mg, 0.40 mL, 5.43 mmol) and Pd/C (10%, 2.9 mg, 0.027 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (61.0 mg, 0.19 mmol, 69%) was obtained as a white powder.

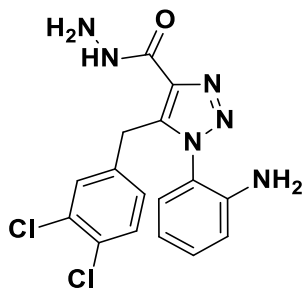
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.44 (s, 1 H, NH), 7.42-7.31 (m, *J* = 9.0 Hz, 2 H), 7.24 (ddd, *J* = 8.1, 7.3, 1.6 Hz, 1 H), 6.91-6.78 (m, 4 H), 6.70 (ddd, *J* = 7.9, 7.3, 1.3 Hz, 1 H), 4.08 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.93 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.4 (CO), 160.7 (C<sub>quat</sub>), 142.7 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 136.6 (C<sub>quat</sub>), 131.7 (2 CH), 131.1 (CH), 127.8 (CH), 121.8 (C<sub>quat</sub>), 118.6 (CH), 117.1 (CH), 116.8 (C<sub>quat</sub>), 113.7 (2 CH), 55.2 (OCH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 324.13, Found: 325.13; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.14 min.

**Melting point:** 177-179 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (83)**



C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 377.23 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-[(3,4-dichlorophenyl)methyl]-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**63**) (1 eq., 0.13 g, 0.31 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.48 g, 0.46 mL, 6.17 mmol) and Pd/C (10%, 3.3 mg, 0.0301 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (31.4 mg, 0.083 mmol, 27%) was obtained as a white powder.

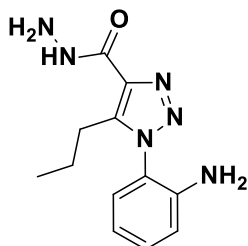
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 9.85 (br s, 1 H, NH), 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.04 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.83-6.78 (m, 3 H), 6.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 5.19 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.54 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.24 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 160.5 (CO), 144.7 (C<sub>quat</sub>), 139.0 (C<sub>quat</sub>), 138.2 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 131.8 (C<sub>quat</sub>), 131.1 (CH), 130.8 (CH), 130.7 (CH), 129.6 (C<sub>quat</sub>), 129.1 (CH), 128.5 (CH), 119.7 (C<sub>quat</sub>), 116.6 (CH), 116.1 (CH), 27.8 (CH<sub>2</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 376.06, Found: 376.98; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.65 min.

Melting point: 205-207 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-propyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (84)**



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 260.30 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-propyl-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**64**) (1 eq., 0.11 mg, 0.42 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.64 g, 0.63 mL, 8.38 mmol) and Pd/C (10%, 3.8 mg, 0.0309 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (0.10 g, 0.38 mmol, 92%) was obtained as a white powder.

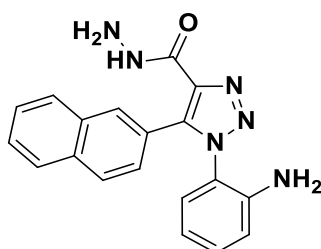
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 9.64 (br s, 1 H, NH), 7.26 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.6 Hz, 1 H), 7.06 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1 H), 6.88 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1 H), 6.67 (ddd, *J* = 7.8, 7.3, 1.3 Hz, 1 H), 5.13 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.47 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 2.87-2.65 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.51-1.28 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 0.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 160.7 (CO), 144.9 (C<sub>quat</sub>), 141.4 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 131.6 (CH), 128.5 (CH), 120.1 (C<sub>quat</sub>), 116.6 (CH), 116.3 (CH), 24.7 (CH<sub>2</sub>), 21.5 (CH<sub>2</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 260.14, Found: 261.12; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.06 min.

Melting point: 170-172 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(naphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (85)



C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 344.37 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(naphthalen-2-yl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**67**) (1 eq., 0.21 g, 0.55 mmol), hydrazine hydrate (20 eq., 0.85 mg, 0.83 mL, 11.10 mmol) and Pd/C (10%, 20.0 mg, 0.019 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure A*.

The title compound (0.11 g, 0.33 mmol, 60%) was obtained as a white powder.

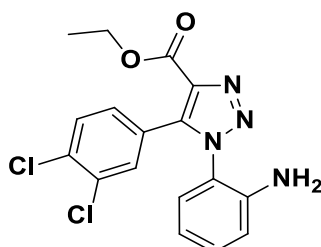
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>): 8.94 (br s, 1 H, NH), 8.09 (s, 1 H), 7.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 7.55 (dd, *J* = 4.0, 1.6 Hz, 1 H), 7.52-7.48 (m, 1 H), 7.49 (dd, *J* = 6.9, 1.8 Hz, 1 H), 7.15 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.04 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 6.56 (td, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1 H), 4.93 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.32 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>): 156.1 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 141.0 (C<sub>quat</sub>), 138.4 (C<sub>quat</sub>), 133.8 (C<sub>quat</sub>), 132.9 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (CH), 130.9 (CH), 128.7 (2 CH), 127.9 (CH), 127.5 (3 CH), 126.7 (CH), 123.7 (C<sub>quat</sub>), 121.4 (C<sub>quat</sub>), 116.8 (CH), 116.7 (CH).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 344.14, Found: 345.12; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.45 min.

Melting point: 196-198 °C.

### Ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (86)



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 377.22 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**55**) (1 eq., 0.65 g, 1.6 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 eq., 2.2 g, 16.0 mmol) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10 eq., 2.78 g, 16.0 mmol) as described in the *General Procedure for Reduction of Nitro Function: procedure A*.

The title compound (0.57 g, 1.51 mmol, 94%) was obtained as a white powder.

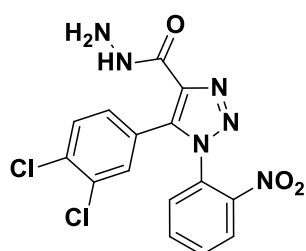
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.26 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.7 Hz, 1 H), 7.15 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 6.87 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1 H), 6.79 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1 H), 6.71 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.7 Hz, 1 H), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.94 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.7 (CO), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 139.7 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 134.5 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 131.6 (CH), 130.2 (CH), 129.2 (CH), 127.5 (CH), 125.2 (C<sub>quat</sub>), 121.2 (C<sub>quat</sub>), 118.8 (CH), 117.3 (CH), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 376.05, Found: 377.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.13 min.

**Melting point:** 185-187 °C.

### **5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (87)**



C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 393.18 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**85**) (1 eq., 0.10 g, 0.25 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.38 g, 0.37 mL, 4.91 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (45.0 mg, 0.11 mmol, 47%) was obtained as a white powder.

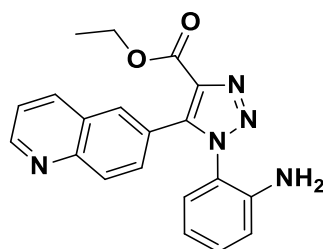
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 10.05 (br s, 1 H, NH), 8.23 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1 H), 7.99-7.79 (m, 3 H), 7.71 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.23 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 4.53 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.0 (CO), 145.3 (C<sub>quat</sub>), 138.9 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 135.5 (CH), 133.3 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (CH), 132.9 (CH), 131.4 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (CH), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 128.1 (C<sub>quat</sub>), 126.4 (CH), 125.9 (C<sub>quat</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 392.02, Found: 393.00; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.58 min.

**Melting point:** 153-155 °C.

### **Ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(quinolin-6-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (88)**



C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 359.38 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-nitrophenyl)-5-(quinolin-6-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**66**) (1 eq., 0.31 g, 0.80 mmol), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10 eq., 1.39 g, 8.00 mmol) and 35% aq.

ammonia (10 eq., 0.4 mL) as described in the *General Procedure for Reduction of Nitro Function: procedure B*.

The title compound (66 mg, 0.18 mmol, 23%) was obtained as a brown powder.

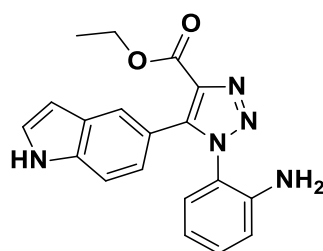
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.95 (dd,  $J$  = 4.2, 1.7 Hz, 1 H), 8.11 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 8.05 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1 H), 7.92 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1 H), 7.61 (dd,  $J$  = 8.8, 2.0 Hz, 1 H), 7.42 (dd,  $J$  = 8.3, 4.2 Hz, 1 H), 7.18 (td,  $J$  = 8.3, 1.5 Hz, 1 H), 6.85 (dd,  $J$  = 8.2, 1.1 Hz, 1 H), 6.78 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1 H), 6.58 (td,  $J$  = 7.9, 1.2 Hz, 1 H), 4.40 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.03 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 1.34 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.0 (CO), 152.0 (CH), 148.4 (C<sub>quat</sub>), 143.0 (C<sub>quat</sub>), 141.5 (C<sub>quat</sub>), 137.0 (C<sub>quat</sub>), 136.6 (CH), 131.5 (CH), 130.6 (CH), 130.4 (CH), 129.6 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (C<sub>quat</sub>), 123.7 (C<sub>quat</sub>), 121.9 (CH), 121.6 (C<sub>quat</sub>), 118.8 (CH), 117.4 (CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 359.14, Found: 360.10; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.38 min.

**Melting point:** 267-270 °C.

### **Ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(1H-indol-5-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (89)**



C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 347.37 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(1H-indol-5-yl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**67**) (1 eq., 0.10 g, 0.26 mmol), ammonium formate (7 eq., 117 mg, 1.86 mmol) and 10% Pd/C (0.1 eq., 29 mg) as described in the *General Procedure for Reduction of Nitro Function: procedure C*

The title compound (77 mg, 0.22 mmol, 84%) was obtained as a white powder.

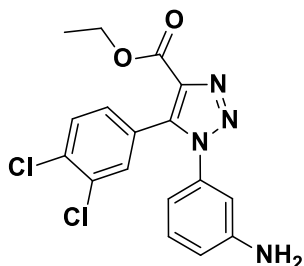
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.41 (br s, 1 H, NH), 7.74-7.72 (m, 1 H), 7.40-7.31 (m, 2 H), 7.15 (dd,  $J$  = 8.4, 1.5 Hz, 1 H), 7.12 (dd,  $J$  = 7.4, 1.5 Hz, 1 H), 6.97 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1 H), 6.87 (dd,  $J$  = 8.2, 1.0 Hz, 1 H), 6.55 (td,  $J$  = 7.9, 1.3 Hz, 1 H), 6.48 – 6.44 (m, 1 H), 4.87 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.24 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.20 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 161.9 (CO), 145.5 (C<sub>quat</sub>), 144.6 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 131.6 (CH), 129.2 (CH), 128.4 (C<sub>quat</sub>), 126.7 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.9 (CH), 123.7 (CH), 122.4 (C<sub>quat</sub>), 117.3 (CH), 117.1 (CH), 111.6 (CH), 102.8 (CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 347.14, Found: 348.13; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.52 min.

**Melting point:** 252-255 °C.

**Ethyl 1-(3-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (90)**



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 377.22 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**68**) (1 eq., 0.11 g, 0.27 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 eq., 0.37 g, 2.70 mmol) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (20 eq., 0.94 g, 5.40 mmol) as described in the *General Procedure for Reduction of Nitro Function: procedure A*.

The title compound (70 mg, 0.19 mmol, 69%) was obtained as a white solid.

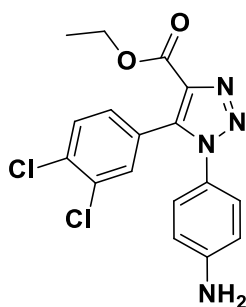
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.18-7.09 (m, 2 H), 6.77-6.66 (m, 2 H), 6.47 (ddd, *J* = 7.9, 2.0, 0.9 Hz, 1 H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.88 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 160.7 (CO), 147.7 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (C<sub>quat</sub>), 134.5 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (CH), 130.3 (CH), 130.2 (CH), 129.5 (CH), 125.7 (C<sub>quat</sub>), 116.2 (CH), 114.8 (CH), 111.4 (CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 376.05, Found: 376.97; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.01 min.

**Melting point:** 155-157 °C.

**Ethyl 1-(4-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate(91)**



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 377.22 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**69**) (1 eq., 0.30 g, 0.74 mmol), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10 eq., 1.28 g, 7.40 mmol) and 35% aq. ammonia (10 eq., 0.4 mL, 7.40 mmol) as described in the *General Procedure for Reduction of Nitro Function: procedure B*.

The title compound (0.21 g, 0.55 mmol, 75%) was obtained as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.20-7.14 (m, 2 H), 7.09 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 7.05-6.97 (m, 2 H), 5.44 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

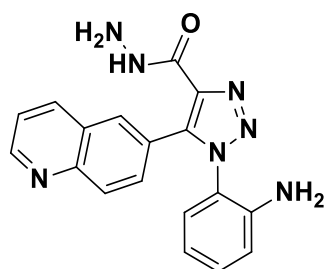


<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 160.7 (CO), 151.2 (C<sub>quat</sub>), 138.4 (C<sub>quat</sub>), 134.5 (C<sub>quat</sub>), 132.8 (C<sub>quat</sub>), 132.3 (CH), 130.4 (CH), 129.5 (CH), 128.9 (C<sub>quat</sub>), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 126.1 (2 CH), 125.7 (C<sub>quat</sub>), 114.4 (2 CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 376.05, Found: 377.01; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.89 min.

Melting point: 180-182 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(quinolin-6-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (92)



C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O  
Mw: 345.36 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(quinolin-6-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**88**) (1 eq., 0.14 g, 0.40 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.62 g, 0.60 mL, 8.1 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

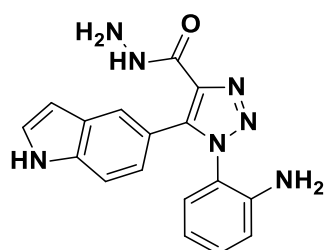
The title compound (26.5 mg, 0.077 mmol, 19%) was obtained as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>): 8.92 (dd,  $J$  = 4.1, 1.7 Hz, 1 H), 8.24 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H), 8.14 (br s, 1 H, NH), 7.95-7.83 (m, 2 H), 7.78 (dd,  $J$  = 8.7, 1.8 Hz, 1 H), 7.51 (dd,  $J$  = 8.3, 4.2 Hz, 1 H), 7.18 (td,  $J$  = 7.5, 1.5 Hz, 1 H), 7.08 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1 H), 6.90 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H), 6.59 (td,  $J$  = 7.9, 1.3 Hz, 1 H), 4.98 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.35 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 345.13, Found: 346.10; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 1.91 min.

Melting point: 179-182 °C.

### 1-(2-Aminophenyl)-5-(1H-indol-5-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (93)



C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O  
Mw: 333.35 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(1H-indol-5-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**89**) (1 eq., 0.14 g, 0.41 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.63 g, 0.61 mL, 8.23 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (0.12 g, 0.36 mmol, 87%) was obtained as a beige powder.

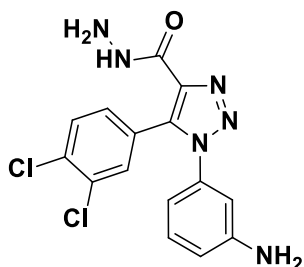
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>): 10.48 (br s, 1 H, NH), 9.89 (br s, 1 H, NH), 7.78 (s, 1 H), 7.37-7.33 (m, 2 H), 7.23-7.10 (m, 2 H), 6.98 (dd,  $J$  = 7.9, 1.3 Hz, 1 H), 6.90 (dd,  $J$  = 8.2, 1.0 Hz, 1 H), 6.57 (td,  $J$  = 7.8, 1.3 Hz, 1 H), 6.45-6.40 (m, 1 H), 4.85 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.28 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, Acetone-*d*<sub>6</sub>):** 157.2 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 142.9 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 137.4 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (CH), 128.9 (CH), 128.2 (C<sub>quat</sub>), 126.5 (CH), 123.8 (CH), 123.3 (CH), 122.2 (C<sub>quat</sub>), 117.1 (CH), 116.9 (CH), 116.5 (C<sub>quat</sub>), 112.0 (CH), 102.5 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 333.13, Found: 334.13; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.04 min.

**Melting point:** 166-170 °C.

#### **1-(3-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (94)**



C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 363.20 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(3-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**90**) (1 eq., 46 mg, 0.12 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.19 g, 0.18 mL, 2.44 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (35 mg, 0.096 mmol, 79%) was obtained as a white powder.

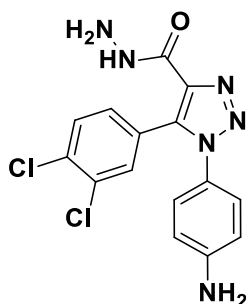
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.88 (br s, 1 H, NH), 7.73 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.07 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.64 (ddd, *J* = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1 H), 6.57 (t, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 6.38 (ddd, *J* = 7.8, 2.0, 0.9 Hz, 1 H), 5.51 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.48 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.9 (CO), 150.6 (C<sub>quat</sub>), 139.4 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 136.4 (C<sub>quat</sub>), 133.3 (CH), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 131.5 (C<sub>quat</sub>), 131.3 (CH), 130.9 (CH), 130.5 (CH), 127.7 (C<sub>quat</sub>), 115.8 (CH), 113.3 (CH), 111.3 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 362.04, Found: 362.97; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.34 min.

**Melting point:** 147-150 °C.

#### **1-(4-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (95)**



C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 363.20 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(4-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**91**) (1 eq., 0.20 g, 0.53 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.82 g, 0.79 mL, 10.60 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (0.12 g, 0.33 mmol, 63%) was obtained as a white powder.

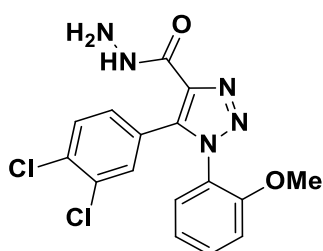
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.85 (br s, 1 H, NH), 7.71 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.09-6.96 (m, 2 H), 6.64-6.46 (m, 2 H), 5.57 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.47 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.7 (CO), 150.6 (C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 136.3 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (CH), 132.5 (C<sub>quat</sub>), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (CH), 130.5 (CH), 127.5 (C<sub>quat</sub>), 127.3 (2 CH), 123.7 (C<sub>quat</sub>), 113.8 (2 CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 362.04, Found: 363.01; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.26 min.

**Melting point:** 140-142 °C.

#### **5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (96)**



C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 378,21 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**71**) (1 eq., 0.25 g, 0.64 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.98 g, 0.95 mL, 12.70 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (0.21 g, 0.56 mmol, 88%) was obtained as a white powder.

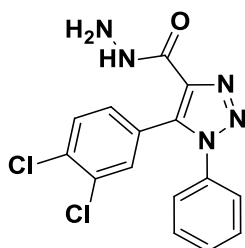
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.91 (br s, 1 H, NH), 7.64-7.45 (m, 4 H), 7.25-7.00 (m, 3H), 4.48 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.54 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.6 (CO), 153.7 (CO), 138.4 (C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 132.8 (CH), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (CH), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.5 (CH), 130.2 (CH), 129.3 (CH), 127.3 (C<sub>quat</sub>), 124.2 (C<sub>quat</sub>), 121.3 (CH), 113.2 (CH), 56.1 (OCH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 377.04, Found: 378.00; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.65 min.

**Melting point:** 176-178°C.

#### **5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (97)**



C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O  
Mw: 348,19 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**73**) (1 eq., 0.18 g, 0.50 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.78 g, 0.75 mL, 10.10 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (0.11 mg, 0.30 mmol, 60%) was obtained as a white powder.

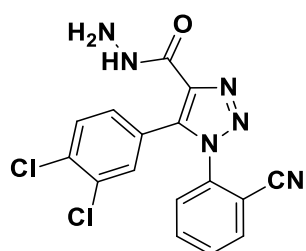
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ): 9.94 (br s, 1 H, NH), 7.76 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 7.56-7.48 (m, 3 H), 7.48-7.39 (m, 2 H), 7.27 (dd,  $J = 8.4, 2.0$  Hz, 1 H), 4.50 (br s, 2 H, NH $_2$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ): 159.5 (CO), 139.1 (C $_{\text{quat}}$ ), 136.5 (C $_{\text{quat}}$ ), 135.7 (C $_{\text{quat}}$ ), 133.2 (CH), 132.8 (C $_{\text{quat}}$ ), 131.1 (CH), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 130.0 (2 CH), 129.9 (C $_{\text{quat}}$ ), 127.1 (C $_{\text{quat}}$ ), 126.5 (2 CH).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 347.03, Found: 348.03;  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $R_t = 2.67$  min.

Melting point: 211-214 °C.

### 1-(2-Cyanophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (98)



C $_{16}$ H $_{10}$ Cl $_2$ N $_6$ O  
Mw: 373,20 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-(2-cyanophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**72**) (1 eq., 0.11 g, 0.27 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.42 g, 0.41 mL, 5.47 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis: procedure B*.

The title compound (66 mg, 0.18 mmol, 65%) was obtained as a white powder.

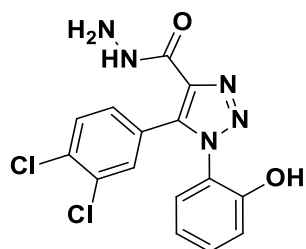
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ): 10.08 (br s, 1 H, NH), 8.09 (dd,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1 H), 7.98-7.75 (m, 3 H), 7.73 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.64 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 7.23 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 1 H), 4.58 (br s, 2 H, NH $_2$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ): 159.0 (CO), 138.9 (C $_{\text{quat}}$ ), 137.7 (C $_{\text{quat}}$ ), 136.9 (C $_{\text{quat}}$ ), 135.3 (CH), 134.7 (CH), 133.4 (C $_{\text{quat}}$ ), 133.0 (CH), 132.1 (CH), 131.3 (C $_{\text{quat}}$ ), 130.8 (CH), 130.8 (CH), 129.6 (CH), 125.8 (C $_{\text{quat}}$ ), 115.4 (CN), 110.4 (C $_{\text{quat}}$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 372.03, Found: 372.98;  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $R_t = 2.50$  min.

Melting point: 212-215 °C.

### 5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (99)



C $_{15}$ H $_{11}$ Cl $_2$ N $_5$ O $_2$   
Mw: 364.19 g/mol

This compound was prepared from ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**70**) (1 eq., 0.10 g, 0.26 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.41 g, 0.40 mL, 5.29 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazone Synthesis: procedure B*.

The title compound (75 mg, 0.21 mmol, 78%) was obtained as a white powder.

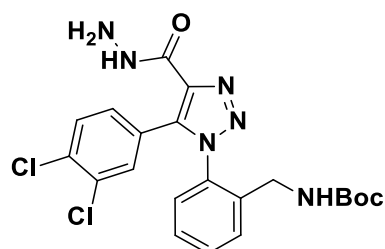
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.89 (br s, 1 H, NH), 8.91 (br s, 1 H, OH), 7.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.45 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1 H), 7.34 (td, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1 H), 7.25 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 6.97-6.85 (m, 2 H), 4.48 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.7 (CO), 152.8 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (C<sub>quat</sub>), 132.3 (CH), 130.8 (C<sub>quat</sub>), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 129.3 (CH), 127.5 (CH), 123.1 (C<sub>quat</sub>), 119.6 (CH), 117.1 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 363.03, Found: 363.98; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.39 min.

**Melting point:** 175-177 °C.

**tert-Butyl 2-(5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(hydrazinecarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)benzylcarbamate (100)**



C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 477.34 g/mol

This compound was prepared from ethyl 1-[2-({[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino}methyl)phenyl]-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**74**) (1 eq., 0.16 g, 0.34 mmol) and hydrazine hydrate (20 eq., 0.52 g, 0.50 mL, 6.72 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazone Synthesis: procedure B*.

The title compound (88 mg, 0.18 mmol, 55%) was obtained as a white powder.

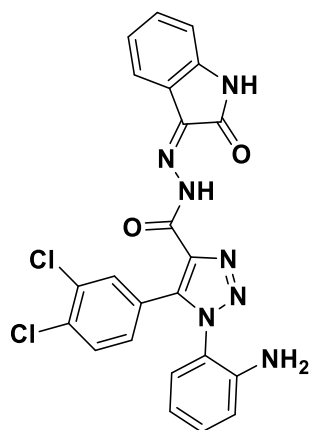
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.94 (br s, 1 H, NH), 8.03 (br s, 1 H, NH), 7.76 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.64-7.28 (m, 6 H), 4.51 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.5 (CO), 156.0 (CO), 138.8 (C<sub>quat</sub>), 137.4 (C<sub>quat</sub>), 137.3 (C<sub>quat</sub>), 133.4 (C<sub>quat</sub>), 132.9 (CH), 132.8 (CH), 131.2 (CH), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 131.0 (CH), 130.4 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (C<sub>quat</sub>), 128.2 (CH), 126.7 (C<sub>quat</sub>), 78.6 (C<sub>quat</sub>), 55.0 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (3 CH<sub>3</sub>).

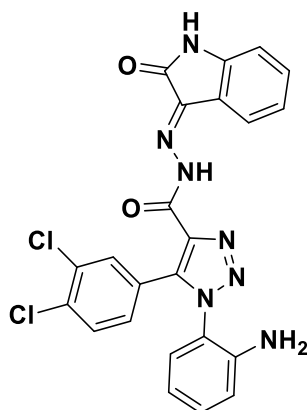
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 476.11, Found: 477.10; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.89 min.

**Melting point:** 198-200 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (101)**



**Z (70 %)**



**E (30 %)**

C<sub>23</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 492.32 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 0.11 g, 0.317 mmol) and isatin (1 eq., 46.6 mg, 0.317 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (0.143 mg, 0.29 mmol, 92%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** *E form*: 11.66 (br s, 1 H, NH), 10.90 (br s, 1 H, NH), 7.79 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.78-7.74 (m, 1 H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.39 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1 H), 7.14-7.10 (m, 3 H), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 5.38 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

***Z form***: 14.38 (br s, 1 H, NH), 11.35 (br s, 1 H, NH), 7.80 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.39-7.33 (m, 2 H), 7.14-7.03 (m, 3 H), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 5.38 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** *E form*: 164.9 (CO), 158.8 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 144.5 (C<sub>quat</sub>), 141.9 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 136.4 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.5 (CH), 131.9 (CH), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.7 (CH), 130.5 (CH), 129.0 (CH), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 122.6 (CH), 120.6 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 119.1 (CH), 116.4 (CH), 116.0 (CH), 111.6 (CH).

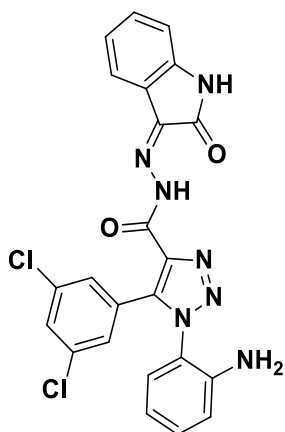
***Z form***: 163.2 (CO), 157.1 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.4 (CH), 132.0 (CH), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.4 (CH), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 119.4 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 111.7 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 491.07, Found: 492.07; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=2.91 min (E) and 3.13 min (Z).

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 32.13 min (E) and 33.08 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,5-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (102)**



C<sub>23</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 492.32 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,5-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**76**) (1.1 eq., 50.0 mg, 0.15 mmol) and isatin (1 eq., 20.3 mg, 0.14 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (30.0 mg, 0.06 mmol, 44%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.37 (br s, 1 H, NH), 11.35 (br s, 1 H, NH), 7.69 (t, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.55 (m, 3 H), 7.40-7.34 (m, 1 H), 7.16-7.07 (m, 3 H), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

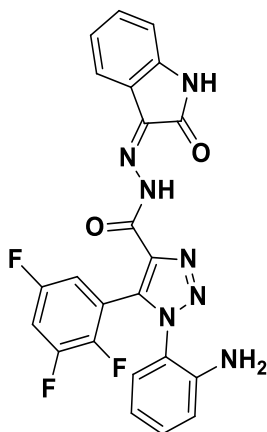
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 157.0 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 139.7 (C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 133.8 (2 C<sub>quat</sub>), 132.4 (CH), 132.0 (CH), 129.8 (CH), 129.3 (C<sub>quat</sub>), 129.2 (CH), 129.1 (2 CH), 123.2 (CH), 121.4 (CH), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 119.2 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 111.7 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 491.07, Found: 492.00; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.13 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 32.19 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-5-(2,3,5-trifluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (103)**



C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 447.40 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(2,3,5-trifluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**77**) (1.1 eq., 40.0 mg, 0.13 mmol) and isatin (1 eq., 16.9 mg, 0.11 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (20.0 mg, 0.04 mmol, 36%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.38 (br s, 1 H, NH), 11.35 (br s, 1 H, NH), 7.74-7.70 (m, 1 H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.41 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.16-7.10 (m, 4 H), 6.96 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 6.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 1 H), 5.41 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 156.5 (CO), 156.4 (d, *J* = 248.4 Hz, C<sub>quat</sub>), 151.3 (dd, *J* = 250.1, 13.2 Hz, C<sub>quat</sub>), 146.6 (dd, *J* = 250.3, 13.4 Hz, C<sub>quat</sub>), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 143.20 (C<sub>quat</sub>), 138.9 (C<sub>quat</sub>), 135.6 (C<sub>quat</sub>), 134.4 (C<sub>quat</sub>), 132.5 (CH), 132.1 (CH), 128.5 (CH), 123.2 (CH), 121.5 (CH), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 119.1 (C<sub>quat</sub>), 117.0 (d, *J* = 13.2 Hz, C<sub>quat</sub>), 116.5 (CH), 115.9 (CH), 113.9 (dd, *J* = 3.7, 24.7 Hz, CH), 111.7 (CH), 108.5 (d, *J* = 28.5 Hz, CH).

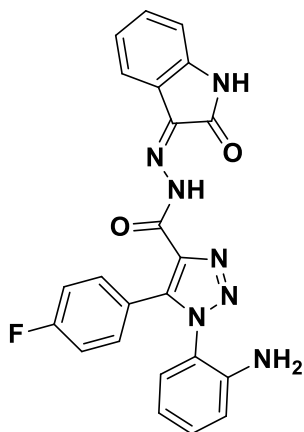
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 477.12, Found: 478.06; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.89 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 30.10 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.



**1-(2-Aminophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-N'-(2-oxindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (104)**



C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 441.44 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**78**) (1.1 eq., 90.0 mg, 0.32 mmol) and isatin (1 eq., 42.4 mg, 0.29 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (78.0 mg, 0.18 mmol, 61%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.36 (br s, 1 H, NH), 11.33 (br s, 1 H, NH), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.50 (t, *J* = 8.7 Hz, 2 H), 7.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.16 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 7.11 (t, *J* = 9.3 Hz, 1 H), 7.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.73 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 6.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 1 H) 5.36 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

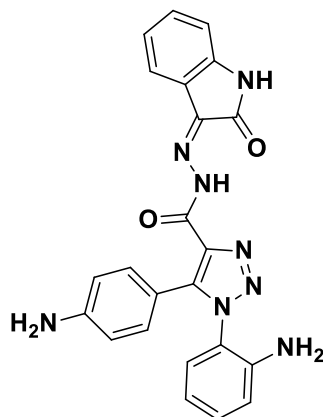
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.3 (C<sub>quat</sub>, *J*<sub>C-F</sub> = 245.2 Hz), 163.1 (CO), 157.2 (CO), 145.4 (CH), 143.0 (C<sub>quat</sub>), 141.5 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 137.3 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (2 CH, *J*<sub>C-F</sub> = 8.9 Hz), 132.3 (CH), 131.7 (CH), 129.1 (CH), 123.1 (CH), 122.2 (C<sub>quat</sub>, *J*<sub>C-F</sub> = 3.3 Hz), 121.4 (CH), 120.4 (C<sub>quat</sub>), 119.7 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.7 (C<sub>quat</sub>), 115.3 (2 CH, *J*<sub>C-F</sub> = 22.0 Hz), 111.6 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 441.13, Found: 442.08; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.73 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 29.84 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(4-aminophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (105)**



C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 438.44 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(4-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**80**) (1.1 eq., 68.0 mg, 0.22 mmol) and isatin (1 eq., 29.4 mg, 0.20 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (55.0 mg, 0.12 mmol, 57%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.34 (br s, 1 H, NH), 11.31 (br s, 1 H, NH), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.40 (td, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1 H), 7.18 (td, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1 H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 7.15-7.09 (m, 1 H), 7.00-6.92 (m, 2 H), 6.80 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1 H), 6.55 (td, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1 H), 6.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 5.49 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.27 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

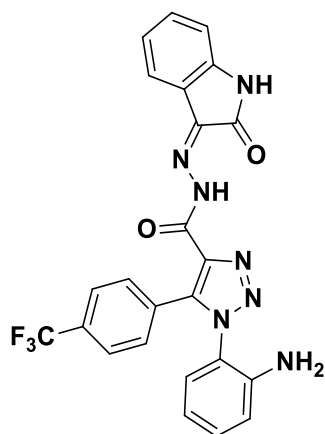
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 157.5 (CO), 150.6 (C<sub>quat</sub>), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 143.2 (C<sub>quat</sub>), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 135.8 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 131.5 (2 CH), 131.4 (CH), 128.9 (CH), 123.1 (CH), 121.2 (CH), 120.7 (C<sub>quat</sub>), 120.5 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 113.1 (2 CH), 111.6 (CH), 111.4 (C<sub>quat</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 438.16, Found: 439.25; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.50 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 23.49 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (106)**



C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 491.45 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**79**) (1.1 eq., 0.38 g, 1.16 mmol) and isatin (1 eq., 0.15 g, 1.05 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (0.180 g, 0.37 mmol, 35%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.38 (br s, 1 H, NH), 11.34 (br s, 1 H, NH), 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.40 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.13-7.09 (m, 3 H), 6.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.73 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 6.54 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

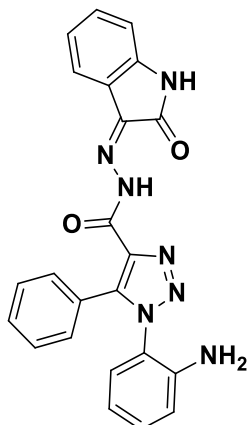
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 157.1 (CO), 145.3 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 141.0 (C<sub>quat</sub>), 138.5 (C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 132.3 (CH), 131.9 (CH), 131.4 (2 CH), 130.3 (C<sub>quat</sub>, *J*<sub>C-F</sub> = 30.0 Hz), 130.2 (C<sub>quat</sub>), 129.11 (CH), 125.2 (2 CH, *J*<sub>C-F</sub> = 3.0 Hz), 124.3 (CF<sub>3</sub>, *J* = 270.0 Hz), 123.2 (CH), 121.4 (CH), 120.4 (C<sub>quat</sub>), 119.5 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.8 (CH), 111.7 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 491.13, Found: 492.07; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.10 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 31.32 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-5-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (107)**



C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 423.43 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**81**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.24 mmol) and isatin (1 eq., 31.8 mg, 0.22 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (57.0 mg, 0.13 mmol, 57%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.29 (br s, 1 H, NH), 11.34 (br s, 1 H, NH), 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.47 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2 H), 7.42-7.33 (m, 4 H), 7.20-7.07 (m, 2 H), 7.04 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.76 (dd, *J* = 8.2, 0.8 Hz, 1 H), 6.52 (td, *J* = 7.0, 0.9 Hz, 1 H), 5.37 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

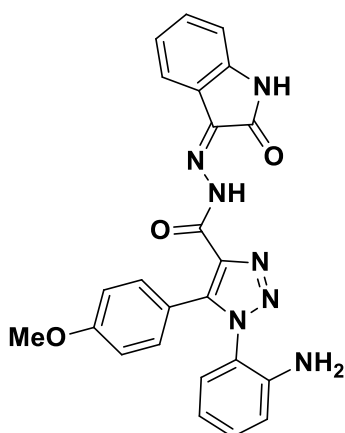
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 157.2 (CO), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 143.0 (C<sub>quat</sub>), 142.4 (C<sub>quat</sub>), 138.2 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (CH), 131.6 (CH), 130.4 (2 CH), 130.1 (C<sub>quat</sub>), 129.1 (CH), 128.2 (2 CH), 125.7 (CH), 123.1 (CH), 121.3 (CH), 120.4 (C<sub>quat</sub>), 119.9 (C<sub>quat</sub>), 116.2 (CH), 115.7 (CH), 111.6 (CH).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 423.14, Found: 424.16; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.78 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 29.06 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-N'-(2-oxindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (108)**



C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 453.45 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**82**) (1.1 eq., 31.0 mg, 0.096 mmol) and isatin (1 eq., 12.8 mg, 0.087 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (28.6 mg, 0.063 mmol, 66%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.37 (br s, 1 H, NH), 11.33 (br s, 1 H, NH), 7.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H), 7.47-7.36 (m, 1 H), 7.18 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.12 (td, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1 H), 7.04 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H), 6.78 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1 H), 6.55 (td, *J* = 6.9, 1.2 Hz, 1 H), 5.34 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.76 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

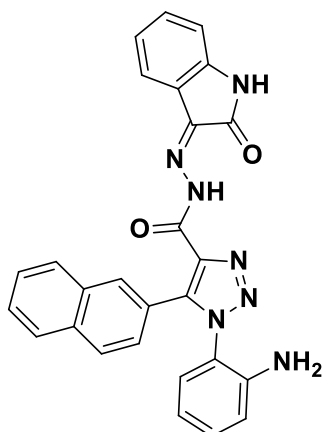
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 160.6 (C<sub>quat</sub>), 157.3 (CO), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 142.9 (C<sub>quat</sub>), 142.2 (C<sub>quat</sub>), 138.0 (C<sub>quat</sub>), 136.7 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 132.0 (2 CH), 131.5 (CH), 129.1 (CH), 123.1 (CH), 121.3 (CH), 120.5 (C<sub>quat</sub>), 120.1 (C<sub>quat</sub>), 117.5 (C<sub>quat</sub>), 116.2 (CH), 115.8 (CH), 113.7 (2 CH), 111.6 (CH), 55.6 (OCH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 453.15, Found: 454.12; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.80 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 28.82 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(naphthalen-2-yl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (109)**



C<sub>27</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 473.49 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(naphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**85**) (1.1 eq., 97.1 mg, 0.31 mmol) and isatin (1 eq., 41.5 mg, 0.28 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (60.0 mg, 0.13 mmol, 45%) was obtained as yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.42 (br s, 1 H, NH), 11.35 (br s, 1 H, NH), 8.05 (s, 1 H), 7.96-7.75 (m, 3 H), 7.64-7.47 (m, 4 H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.18-7.06 (m, 3 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 5.41 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

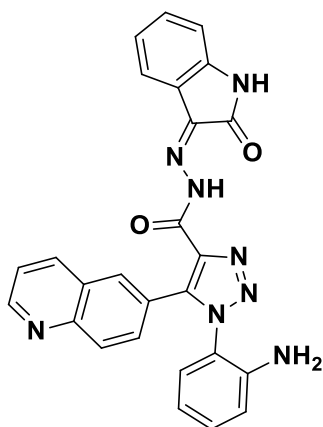
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 162.7 (CO), 156.8 (CO), 144.9 (C<sub>quat</sub>), 142.6 (C<sub>quat</sub>), 141.9 (C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (C<sub>quat</sub>), 131.8 (C<sub>quat</sub>), 131.7 (CH), 131.2 (CH), 130.2 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 127.6 (CH), 127.3 (CH), 127.1 (CH), 126.7 (CH), 126.6 (CH), 122.7 (C<sub>quat</sub>), 122.6 (CH), 120.9 (CH), 119.9 (C<sub>quat</sub>), 119.5 (C<sub>quat</sub>), 115.8 (CH), 115.3 (CH), 111.1 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 473.16, Found: 474.07; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.00 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 30.99 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-5-(quinolin-6-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (110)**



C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 474.47 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(quinolin-6-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**92**) (1.1 eq., 18.0 mg, 0.057 mmol) and isatin (1 eq., 7.7 mg, 0.052 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (5.0 mg, 0.011 mmol, 20%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.42 (br s, 1 H, NH), 11.35 (br s, 1 H, NH), 9.00-8.85 (m, 1 H), 8.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 8.14-8.17 (m, 1 H), 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 7.76 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1 H), 7.57 (t, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 7.55 (s, 1 H), 7.40 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.21-7.03 (m, 3 H), 6.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 6.73 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 6.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 5.41 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

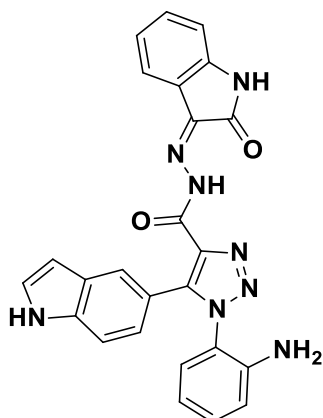
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 162.7 (CO), 156.8 (CO), 151.9 (CH), 147.6 (C<sub>quat</sub>), 144.9 (C<sub>quat</sub>), 142.6 (C<sub>quat</sub>), 141.3 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 136.4 (CH), 131.8 (CH), 131.3 (CH), 130.6 (CH), 130.4 (CH), 128.7 (CH), 128.3 (CH), 126.9 (C<sub>quat</sub>), 123.5 (C<sub>quat</sub>), 122.7 (CH), 122.2 (CH), 120.9 (CH), 119.9 (C<sub>quat</sub>), 119.9 (C<sub>quat</sub>), 115.8 (CH), 115.4 (CH), 111.2 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 474.16, **Found:** 475.12; [M+H]<sup>+</sup>, *R*<sub>t</sub> = 2.54 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: *t*<sub>r</sub> = 23.37 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(1*H*-indol-5-yl)-*N'*-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (111)**



C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 462.46 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(1*H*-indol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**93**) (1.1 eq., 120 mg, 0.40 mmol) and isatin (1 eq., 53 mg, 0.36 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (46 mg, 0.10 mmol, 28%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.37 (br s, 1 H, NH), 11.32 (br s, 1 H, NH), 11.26 (br s, 1 H, NH), 7.72 (s, 1 H), 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.43-7.35 (m, 2 H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.13-7.08 (m, 3 H), 7.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.41 (s, 1 H), 5.32 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 162.6 (CO), 156.9 (CO), 145.0 (C<sub>quat</sub>), 143.6 (C<sub>quat</sub>), 142.5 (C<sub>quat</sub>), 137.4 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (C<sub>quat</sub>), 136.1 (C<sub>quat</sub>), 131.6 (CH), 130.9 (CH), 128.6 (CH), 126.9 (C<sub>quat</sub>), 126.3 (CH), 122.6 (3 CH), 120.8 (CH), 120.1 (C<sub>quat</sub>), 120.0 (C<sub>quat</sub>), 115.8 (CH), 115.3 (CH), 115.2 (C<sub>quat</sub>), 111.1 (CH), 110.8 (CH), 101.6 (CH).

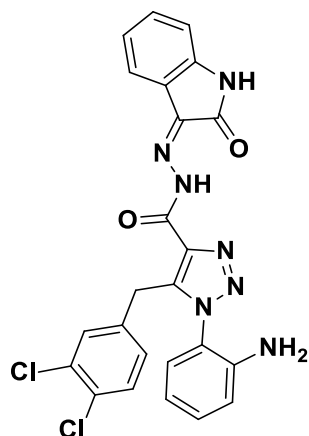
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 462.16, Found: 463.08; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.63 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 27.92 min, purity > 99%.

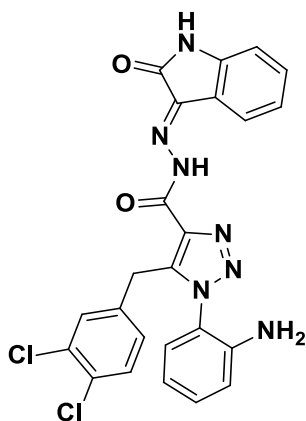
**Melting point:** > 300 °C.



**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorobenzyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (112)**



**Z (38 %)**



**E (62 %)**

C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 506.34 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-[(3,4-dichlorophenyl)methyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**83**) (1.1 eq., 50.0 mg, 0.15 mmol) and isatin (1 eq., 19.5 mg, 0.13 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (53.0 mg, 0.11 mmol, 79%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.38 (br s, 0.38H, NH (Z)), 11.66 (br s, 0.62H, NH (E)), 11.33 (br s, 0.38H, NH (Z)), 10.90 (br s, 0.62H, NH (E)), 7.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.62 H (E)), 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.38 H (Z)), 7.44-7.30 (m, 2 H), 7.27-7.18 (m, 2 H), 7.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.98-6.89 (m, 4 H), 6.59-6.52 (m, 1 H), 5.33 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.30 (br s, 2 H, CH<sub>2</sub>).

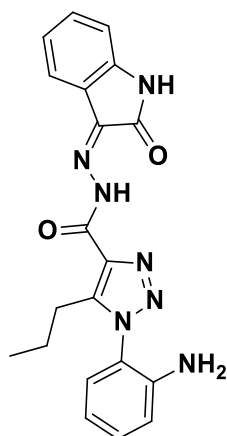
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** instable in DMSO

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 505.08, Found: 506.18; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=3.10 min (E) and 3.30 min (Z).

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>= 31.43 min (E) and 32.56 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-5-propyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (113)**



C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 389.41 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-propyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**84**) (1.1 eq., 85.0 mg, 0.33mmol) and isatin (1 eq., 43.7 mg, 0.30 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (29.0 mg, 0.07 mmol, 23%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.26 (br s, 1 H), 11.32 (br s, 1 H), 7.61 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 7.41 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1 H), 7.30 (ddd, *J* = 8.6, 7.3, 1.5 Hz, 1 H), 7.19-7.09 (m, *J* = 7.6, 5.6, 1.2 Hz, 2 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.90 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1 H), 6.69 (ddd, *J* = 8.6, 7.6, 1.3 Hz, 1 H), 5.30 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 2.83 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.64-1.37 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 0.77 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

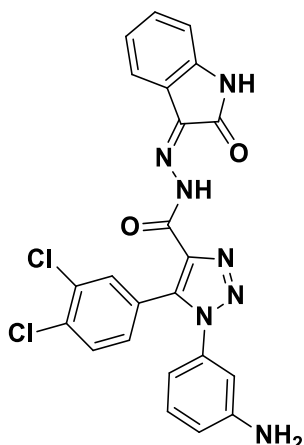
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 157.9 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 144.2 (C<sub>quat</sub>), 143.0 (C<sub>quat</sub>), 138.1 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (CH), 131.9 (CH), 128.6 (CH), 123.1 (CH), 121.3 (CH), 120.5 (C<sub>quat</sub>), 119.5 (C<sub>quat</sub>), 116.59 (CH), 116.1 (CH), 111.6 (CH), 24.9 (CH<sub>2</sub>), 21.3 (CH<sub>2</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 389.16, Found: 390.13; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.86 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 30.42 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(3-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (114)**



C<sub>23</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 492.32 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(3-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**94**) (1.1 eq., 45.0 mg, 0.12 mmol) and isatin (1 eq., 16.6 mg, 0.11 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (18.0 mg, 0.037 mmol, 30%) was obtained as a brown powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.33 (br s, 1 H, NH), 11.35 (br s, 1 H, NH), 7.86 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.57 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.41 (td, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1 H), 7.36 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.11 (td, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 2 H), 6.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 6.68 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1 H), 6.62 (t, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 6.44 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1 H), 5.57 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

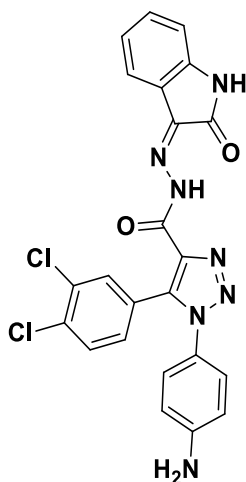
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 156.9 (CO), 150.3 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 138.4 (C<sub>quat</sub>), 137.72 (C<sub>quat</sub>), 136.19 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (CH), 132.3 (CH), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (CH), 130.7 (CH), 130.2 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.1 (CH), 121.4 (CH), 120.5 (C<sub>quat</sub>), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 115.6 (CH), 113.0 (CH), 111.6 (CH), 110.8 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 491.07, Found: 492.07; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.98 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>=29.23 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C

**1-(4-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (115)**



C<sub>23</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 492.32 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(4-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**95**) (1.1 eq., 50.0 mg, 0.1438 mmol) and isatin (1 eq., 26.2 mg, 0.12 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (32.0 mg, 0.06 mmol, 47%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.31 (br s, 1 H, NH) 11.34 (br s, 1 H, NH), 7.82 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.40 (td, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1 H), 7.34 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.11 (td, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1 H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 6.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 5.63 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

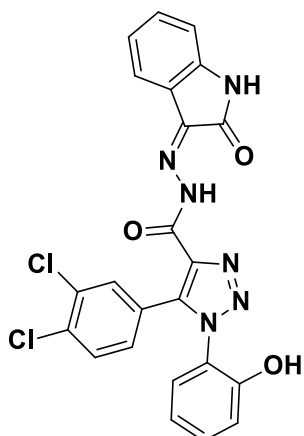
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 157.0 (CO), 150.9 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 138.5 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (CH), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (CH), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 131.1 (CH), 130.7 (CH), 127.4 (2 CH), 126.8 (C<sub>quat</sub>), 123.3 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.4 (CH), 120.4 (C<sub>quat</sub>), 113.8 (2 CH), 111.6 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 491.07, Found: 492.17; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.99 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 29.23 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (116)**



C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 493.30 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**99**) (1.1 eq., 53.0 mg, 0.15 mmol) and isatin (1 eq., 27.7 mg, 0.13 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (33.0 mg, 0.067 mmol, 46%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.35 (br s, 1 H, NH), 11.32 (br s, 1 H, NH), 7.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.60-7.49 (m, 3 H), 7.42-7.31 (m, 4 H), 7.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 5.78 (br s, 1 H, OH).

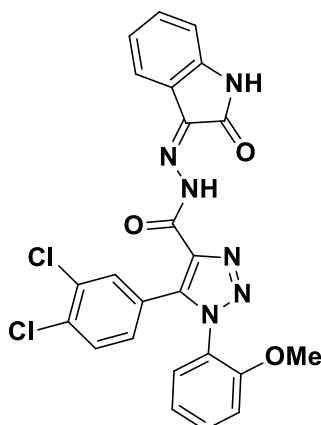
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 162.9 (CO), 156.9 (CO), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 142.7 (C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.1 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (CH), 132.4 (CH), 132.3 (CH), 131.8 (CH), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 129.3 (CH), 126.6 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 122.8 (C<sub>quat</sub>), 121.4 (CH), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 119.7 (CH), 117.2 (CH), 111.5 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 492.05, Found: 493.15; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.00 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>=30.80 min, purity = 95%.

**Melting point:** > 300 °C.

**5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-methoxyphenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (117)**



C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 507.33 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**96**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.18 mmol) and isatin (1 eq., 35.3 mg, 0.17 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (69.0 mg, 0.14 mmol, 73%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.36 (br s, 1 H, NH), 11.36 (br s, 1 H, NH), 7.74 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.62-7.54 (m, 2 H), 7.41 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1 H), 7.32 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.22-7.08 (m, 3 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

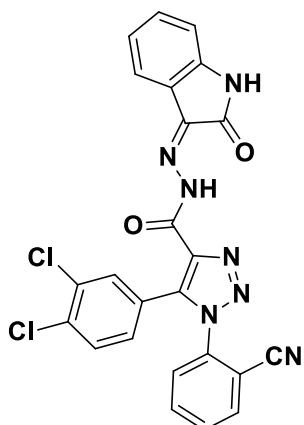
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 156.8 (CO), 153.6 (C<sub>quat</sub>), 143.2 (C<sub>quat</sub>), 140.2 (C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 137.2 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (CH), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (CH), 132.3 (CH), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 130.7 (CH), 130.2 (CH), 129.4 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.8 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.4 (2 CH), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 113.3 (CH), 111.7 (CH), 56.2 (OCH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 506.07, Found: 507.23; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.25 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 33.20 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Cyanophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (118)**



C<sub>24</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 502.31 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-cyanophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**98**) (1.1 eq., 53.0 mg, 0.14 mmol) and isatin (1 eq., 27.1 mg, 0.13 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (28.0 mg, 0.056 mmol, 39%) was obtained as an orange powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.42 (br s, 1H, NH), 11.39 (br s, 1H, NH), 8.15 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 8.02-7.93 (m, 1H), 7.92-7.79 (m, 3H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.42 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H).

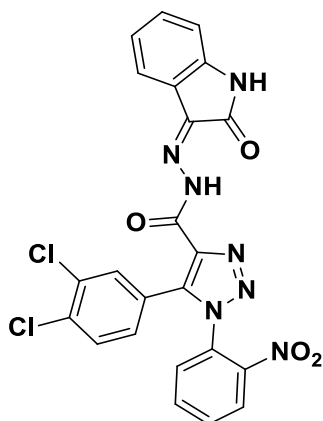
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.6 (CO), 156.8 (CO), 143.6 (C<sub>quat</sub>), 140.4 (C<sub>quat</sub>), 139.5 (C<sub>quat</sub>), 138.2 (C<sub>quat</sub>), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 135.8 (CH), 135.3 (CH), 134.3 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (CH), 132.9 (CH), 132.7 (CH), 131.9 (C<sub>quat</sub>), 131.5 (CH), 131.3 (CH), 130.0 (CH), 125.5 (C<sub>quat</sub>), 123.6 (CH), 121.9 (CH), 120.6 (C<sub>quat</sub>), 115.7 (C<sub>quat</sub>), 112.1 (CH), 110.7 (CN).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 501.05, Found: 502.12; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.10 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 33.05 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**5-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (119)**



C<sub>23</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 522.30 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**87**) (1.1 eq., 34.0 mg, 0.086 mmol) and isatin (1 eq., 11.6 mg, 0.079 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (23 mg, 0.044 mmol, 51%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.39 (br s, 1 H, NH), 11.38 (br s, 1 H, NH), 8.29 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 7.98-7.92 (m, 3 H), 7.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.33 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 156.5 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 143.2 (C<sub>quat</sub>), 139.9 (C<sub>quat</sub>), 139.1 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 135.6 (CH), 133.9 (C<sub>quat</sub>), 133.3 (CH), 132.9 (CH), 132.5 (CH), 131.6 (C<sub>quat</sub>), 131.2 (CH), 130.6 (CH), 130.6 (CH), 127.7 (C<sub>quat</sub>), 126.6 (CH), 125.1 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.5 (CH), 120.2 (C<sub>quat</sub>), 111.7 (CH).

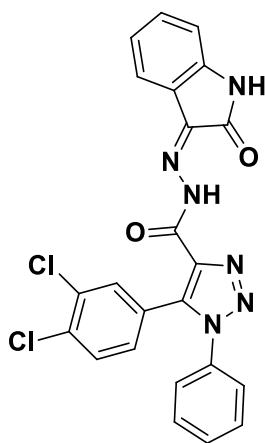
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 521.04, Found: 522.03; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.12 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 30.14 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.



**5-(3,4-Dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (120)**



C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 477.30 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**97**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.20 mmol) and isatin (1 eq., 38.3 mg, 0.18 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (60.0 mg, 0.13 mmol, 63%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.36 (br s, 1 H, NH), 11.36 (br s, 1 H, NH), 7.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.61-7.53 (m, 4 H), 7.53-7.46 (m, 2 H), 7.41 (td, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1 H), 7.37 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H).

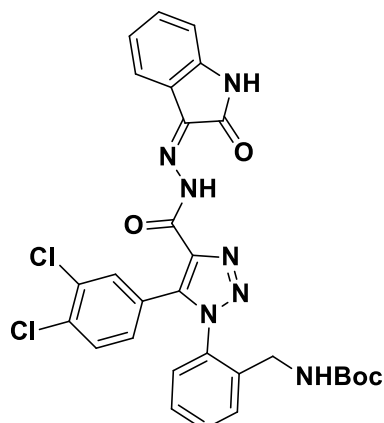
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.5 (CO), 157.2 (CO), 143.5 (C<sub>quat</sub>), 139.3 (C<sub>quat</sub>), 139.1 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 135.8 (C<sub>quat</sub>), 133.7 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (CH), 132.8 (CH), 131.7 (C<sub>quat</sub>), 131.5 (CH), 131.2 (2 CH), 130.4 (2 CH), 126.9 (2 CH), 126.7 (C<sub>quat</sub>), 123.5 (CH), 121.8 (CH), 120.7 (C<sub>quat</sub>), 112.1 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 476.06, Found: 477.08; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=3.05 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>= 32.67 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**Tert-Butyl-2-(5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(2-(2-oxoindolin-3-ylidene)hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzylcarbamate (121)**



C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 606.46 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from *tert*-butyl *N*-({2-[5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]phenyl}methyl)carbamate (**100**) (1.1 eq., 83.0 mg, 0.17 mmol) and isatin (1 eq., 33.1 mg, 0.16 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (38.0 mg, 0.06 mmol, 36%) was obtained as a brown powder.

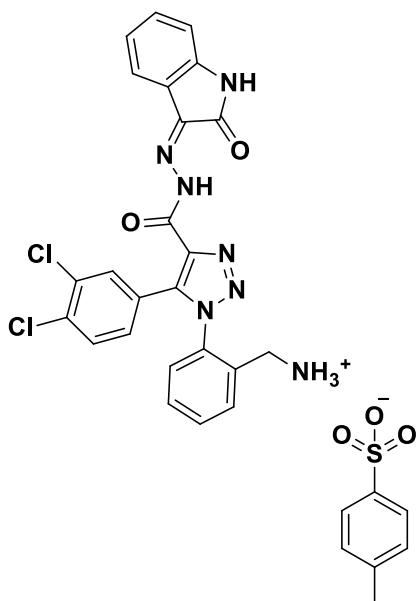
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.38 (br s, 1 H, NH), 11.36 (br s, 1H, NH), 7.83 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.61-7.53 (m, 2 H), 7.51-7.31 (m, 6 H, NH + 5 H<sub>ar</sub>), 7.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 3.87 (d, *J* = 5.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.32 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 156.9 (CO), 155.9 (CO), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 139.6 (C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 137.3 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (C<sub>quat</sub>), 133.4 (C<sub>quat</sub>), 132.9 (CH), 132.4 (C<sub>quat</sub>), 131.5 (CH), 131.3 (CH), 131.0 (CH), 130.6 (CH), 129.6 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 126.0 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.4 (C<sub>quat</sub>), 120.3 (CH), 111.7 (CH), 78.6 (C<sub>quat</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (3 CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 605.13, **Found:** 606.23 [M+H]<sup>+</sup>, *R*<sub>t</sub> = 3.38 min.

**Melting point:** > 300 °C.

**(2-(5-(3,4-Dichlorophenyl)-4-(2-(2-oxoindolin-3-ylidene)hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)methanaminium 4-methylbenzenesulfonate (122)**



C<sub>31</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S  
Mw: 678.55 g/mol

**Z (100 %)**

A mixture of *tert*-butyl *N*-({2-[5-(3,4-dichlorophenyl)-4-{*N'*-[(3*Z*)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-ylidene]hydrazinecarbonyl}-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]phenyl)methyl}carbamate (**121**) (1 eq., 25.0 mg, 0.041 mmol) in EtOH (4 mL) was refluxed overnight in presence of *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (3 eq., 23.5 mg, 0.12 mmol). The product was collected by filtration.

The title compound (21.0 mg, 0.031 mmol, 75%) was obtained as a brown powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.41 (br s, 1 H, NH), 11.36 (br s, 1 H, NH), 8.24 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.77-7.62 (m, 3 H), 7.62-7.50 (m, 2 H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 7.43-7.30 (m, 4 H), 7.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 3.94 (d, *J* = 5.6 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

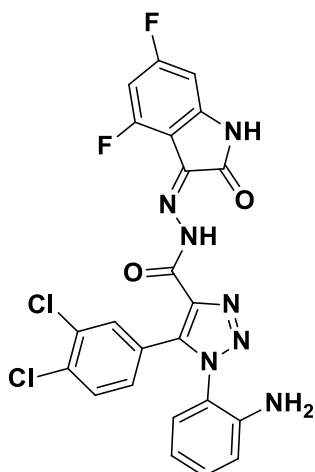
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 156.7 (CO), 146.2 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 138.9 (C<sub>quat</sub>), 138.0 (C<sub>quat</sub>), 137.3 (C<sub>quat</sub>), 133.9 (C<sub>quat</sub>), 133.6 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (CH), 132.5 (CH), 131.5 (CH), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 131.1 (CH), 130.8 (CH), 130.4 (CH), 130.1 (CH), 128.5 (3 CH), 125.9 (2 CH), 125.8 (C<sub>quat</sub>), 124.7 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.5 (CH), 120.2 (C<sub>quat</sub>), 111.7 (CH), 38.26 (CH<sub>2</sub>), 21.24 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 677.10, Found: 506.18; [M-OTs+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.53 min.

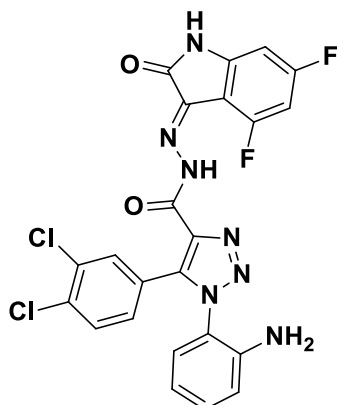
**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 26.52 min, purity = 97%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(4,6-difluoro-2-oxoindolin-3-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (123)**



**Z (71 %)**



**E (29 %)**

$C_{23}H_{13}Cl_2F_2N_7O_2$   
Mw: 528.30 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.19 mmol) and 4,6-difluoro-1*H*-indole-2,3-dione (1 eq., 32.1 mg, 0.17 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (51.0 mg, 0.096 mmol, 50%) was obtained as a yellow powder.

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.35 (br s, 0.71 H, NH (Z)), 11.74 (br s, 0.29 H, NH (E)), 11.70 (br s, 0.71 H, NH (Z)), 11.35 (br s, 0.29 H, NH (E)), 7.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1 H), 7.40 (dt, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 7.26-7.13 (m, 2 H), 7.00 (td, *J* = 10.2, 1.9 Hz, 1 H), 6.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 6.74-6.67 (m, 1 H), 6.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 5.40 (s, 2 H, 2NH<sub>2</sub>).

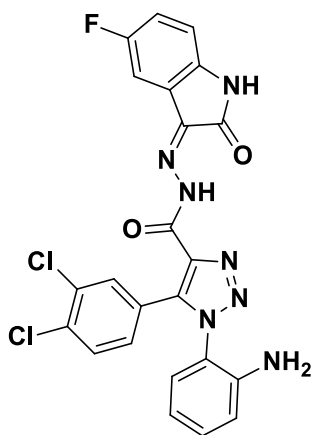
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** **Z form:** 162.9 (CO), 161.9.2 (C<sub>quat</sub>, *J*<sub>C-F</sub> = 245.3 Hz), 160.0 (C<sub>quat</sub>, *J*<sub>C-F</sub> = 244.8 Hz), 156.9 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 136.0 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 131.9 (CH), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.64 (CH), 130.53 (CH), 130.53 (CH), 129.1 (CH), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 98.3 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 527.05, Found: 528.16; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.06 min (E) and 3.26 min (Z).

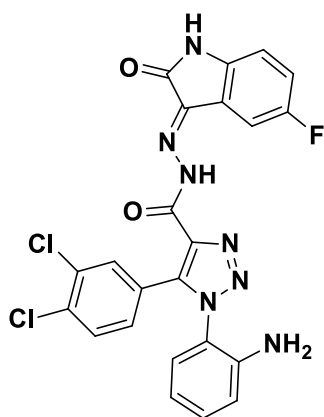
**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 31.42 min (E) and 33.06 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(6-fluoro-2-oxoindolin-3-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (124)**



**Z (75 %)**



**E (25 %)**

C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 510.31 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 61.0 mg, 0.17 mmol) and 5-fluoroisatin (1 eq., 25.2 mg, 0.15 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (46.0 mg, 0.09 mmol, 54%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.39 (br s, 0.75 H, NH (Z)), 11.84 (br s, 0.25 H, NH (E)), 11.38 (br s, 0.75 H, NH (Z)), 10.91 (br s, 0.25 H, NH (E)), 7.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 0.75 H (Z)), 7.78 (d, *J* = 1.6 Hz, 0.25 H (E)), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 0.75 H (Z)), 7.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 0.25 H (E)), 7.60-7.12 (m, 5 H), 6.99-6.86 (m, 1 H), 6.77-6.72 (m, 1 H), 6.59-6.52 (m, 1 H), 5.40 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>).

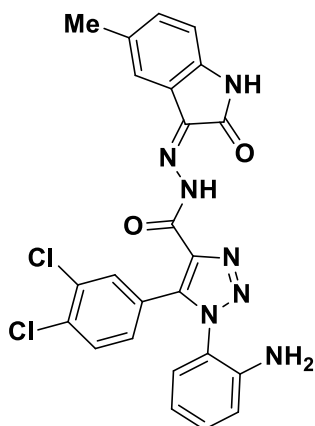
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** **Z form:** 163.3 (CO), 160.4 (C<sub>quat</sub>, *J*<sub>C-F</sub> = 245.2 Hz, CF), 157.1 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 139.3 (C<sub>quat</sub>), 138.2 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 131.9 (CH), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.4 (CH), 121.7 (C<sub>quat</sub>), 121.5 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 118.8 (CH, *J*<sub>C-F</sub> = 28.3 Hz), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 112.8 (CH, *J*<sub>C-F</sub> = 3.5 Hz), 108.6 (CH, *J*<sub>C-F</sub> = 25.4 Hz).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 509.06, Found: 510.17; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=2.95 min (E) and 3.22 min (Z).

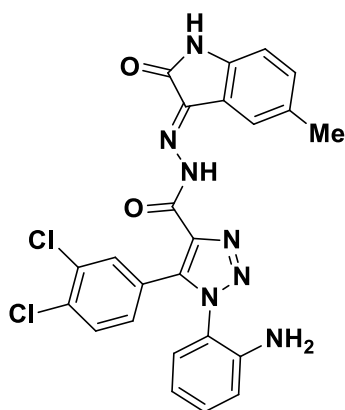
**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 30.83 min (E) and 32.81 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(5-methyl-2-oxoindolin-3-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (125)**



**Z (63 %)**



**E (37 %)**

C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 506.34 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.19 mmol) and 5-methylisatin (1 eq., 28.2 mg, 0.17 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (41.0 mg, 0.08 mmol, 42%) was obtained as a brown powder.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 14.39 (br s, 0.63 H, NH (Z)), 11.70 (br s, 0.37 H, NH (E)), 11.25 (br s, 0.63 H, NH (Z)), 10.79 (br s, 0.37 H, NH (E)), 7.81 (dd, *J* = 6.5, 1.9 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.40 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1 H), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.26-7.12 (m, 3 H), 6.87 (dd, *J* = 8.0, 2.8 Hz, 1 H), 6.77 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 6.65-6.54 (m, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 1.9 H, CH<sub>3</sub>(E)), 2.32 (s, 1.1 H, CH<sub>3</sub>(Z)).

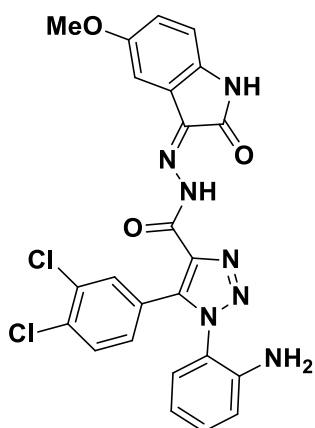
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): **Z form**: 163.6 (CO), 157.4 (CO), 145.5 (C<sub>quat</sub>), 141.2 (C<sub>quat</sub>), 139.0 (C<sub>quat</sub>), 138.1 (C<sub>quat</sub>), 133.5 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (CH), 132.8 (CH), 132.6 (C<sub>quat</sub>), 132.3 (CH), 131.6 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (2 CH), 129.5 (CH), 126.9 (C<sub>quat</sub>), 122.2 (CH), 120.7 (C<sub>quat</sub>), 119.7 (C<sub>quat</sub>), 116.7 (CH), 116.3 (CH), 111.8 (CH), 21.4 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)** *m/z* Calculated: 505.08, Found: 506.25; [M+H]<sup>+</sup>, Rt=3.02 min (E) and 3.27 min (Z).

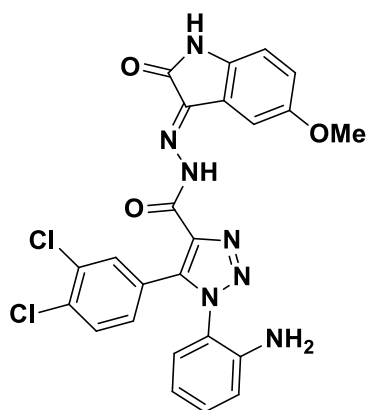
**HPLC**: C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>= 31.54 min (E) and 33.41 min (Z), purity > 99%.

**Melting point**: > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(5-methoxy-2-oxindolin-3-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (126)**



**Z (55 %)**



**E (45 %)**

C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 522.34 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.19 mmol) and 5-methoxyisatin (1 eq., 31.0 mg, 0.17 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (70.0 mg, 0.13 mmol, 70%) was obtained as an orange powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.41 (br s, 0.55 H, NH (Z)), 11.72 (br s, 0.45 H, NH (E)), 11.17 (br s, 0.55 H, NH (Z)), 10.71 (br s, 0.45 H, NH (E)), 7.81 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.50 (d, *J* = 1.8 Hz, 0.5 H), 7.40 (m, 1.5 H), 7.28-7.05 (m, 2.5 H), 7.00 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 0.5 H), 6.90 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1 H), 6.77 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 6.67-6.50 (m, 1 H), 5.39 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 1.35 H, OCH<sub>3</sub> (E)), 3.78 (s, 1.65 H, OCH<sub>3</sub> (Z)).

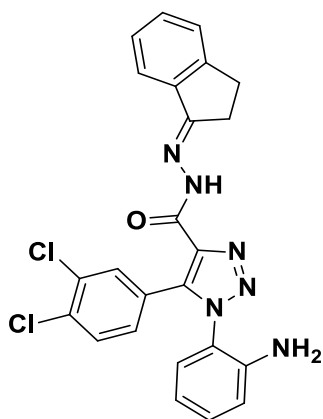
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 164.9 (CO), 163.2 (CO), 157.1 (CO), 155.8 (C<sub>quat</sub>), 154.9 (CO), 145.2 (3 C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 139.6 (C<sub>quat</sub>), 138.8 (C<sub>quat</sub>), 138.1 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 136.7 (C<sub>quat</sub>), 134.0 (C<sub>quat</sub>), 133.9 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.4 (CH), 132.0 (CH), 131.9 (CH), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.7 (CH), 130.6 (CH), 130.5 (2 CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 126.3 (C<sub>quat</sub>), 121.0 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (2 C<sub>quat</sub>), 118.6 (CH), 118.3 (CH), 116.4 (CH), 116.3 (CH), 116.0 (CH), 115.9 (CH), 112.9 (CH), 112.5 (CH), 106.2 (2 CH), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 521.08, Found: 522.21; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.97 min (E) and 3.17 min (Z).

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 30.88 min (E) and 32.35 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-1-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (127)**



C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 477.35 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 57.0 mg, 0.16 mmol) and indanone (1 eq., 18.9 mg, 0.017 mL, 0.14 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (58.0 mg, 0.12 mmol, 77%) was obtained as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 10.55 (br s, 1 H, NH), 7.80 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 7.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.51-7.40 (m, 2 H), 7.37 (d, *J* = 7.1 Hz, 2 H), 7.26-7.16 (m, 1 H), 7.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 6.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 5.32 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.22-3.08 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.07-2.94 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 164.8 (CO), 156.8 (C<sub>quat</sub>), 149.9 (C<sub>quat</sub>), 145.5 (2 C<sub>quat</sub>), 139.0 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 133.3 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (CH), 132.2 (CH), 131.8 (CH), 131.3 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (2 CH), 129.5 (CH), 128.0 (CH), 127.3 (C<sub>quat</sub>), 126.7 (CH), 122.4 (CH), 120.0 (C<sub>quat</sub>), 116.7 (CH), 116.4 (CH), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>).

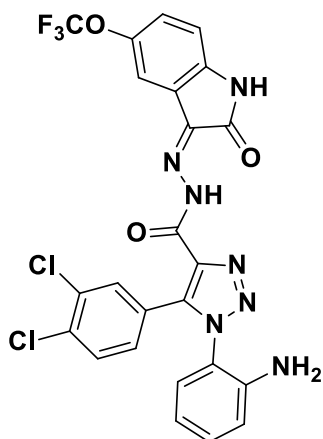
**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 476.09, **Found:** 477.19; [M+H]<sup>+</sup>, *R*<sub>t</sub> = 3.19 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: *t*<sub>r</sub> = 32.04 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(2-oxo-5-(trifluoromethoxy)indolin-3-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (128)**





C<sub>24</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 576.31 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 65.0 mg, 0.18 mmol) and 5-(trifluoromethoxy)-1*H*-indole-2,3-dione (1 eq., 37.6 mg, 0.16 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (62.0 mg, 0.11 mmol, 60%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.35 (br s, 1 H, NH), 11.53 (br s, 1 H, NH), 7.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.51 (s, 1 H), 7.48-7.36 (m, 2 H), 7.25-7.13 (m, 2 H), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 6.76 (dd, *J* = 8.1, 0.7 Hz, 1 H), 6.59 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

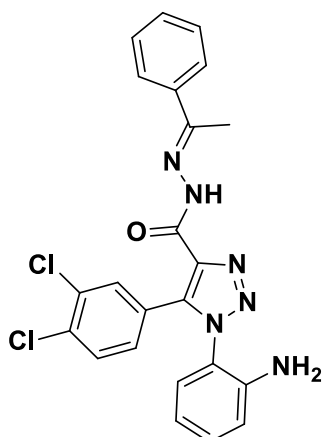
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 157.1 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 144.1 (C<sub>quat</sub>), 142.0 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 131.9 (CH), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 125.3 (CH), 121.7 (C<sub>quat</sub>), 120.3 (q, *J*<sub>C-F</sub> = 254.0 Hz, OCF<sub>3</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 114.5 (CH), 112.8 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 575.05 Found: 576.02; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.47 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 34.95 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(1-phenylethylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (129)**



$C_{23}H_{18}Cl_2N_6O_2$   
Mw: 465.33 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.19 mmol) and acetophenone (1 eq., 21.1 mg, 20.5  $\mu$ L, 0.17 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (63.0 mg, 0.13 mmol, 70%) was obtained as a yellow powder.

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ):** 10.80 (br s, 1 H, NH), 7.94-7.76 (m, 3 H), 7.66 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1 H), 7.52-7.41 (m, 3 H), 7.37 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1 H), 7.20 (td,  $J$  = 7.7, 1.4 Hz, 1 H), 7.13 (dd,  $J$  = 7.9, 1.2 Hz, 1 H), 6.77 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1 H), 6.59 (td,  $J$  = 7.8, 0.9 Hz, 1 H), 5.34 (br s, 2 H), 2.40 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

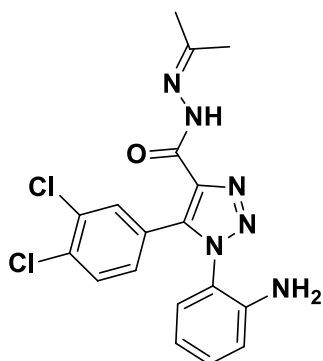
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ):** 156.7 (CO), 155.5 (C<sub>quat</sub>), 145.1 (3 C<sub>quat</sub>), 144.3 (C<sub>quat</sub>), 138.2 (C<sub>quat</sub>), 132.9 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 131.8 (CH), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.58 (CH), 130.53 (CH), 130.1 (CH), 129.1 (CH), 128.8 (2 CH), 126.9 (2 CH), 119.6 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 116.0 (CH), 14.4 (CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 464.09, Found: 465.22; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.25 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 25.12 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N'*-(propan-2-ylidene)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (130)**



C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 403.27 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 60.0 mg, 0.16 mmol) and acetone (1 eq., 8.7 mg, 0.15 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (50.0 mg, 0.12 mmol, 75%) was obtained as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.49 (br s, 1 H, NH), 7.75 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.33 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1 H), 7.18 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1 H), 7.11 (dd, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1 H), 6.75 (dd, *J* = 7.7, 0.6 Hz, 1 H), 6.57 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 5.32 (br s, 2 H), 2.01 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

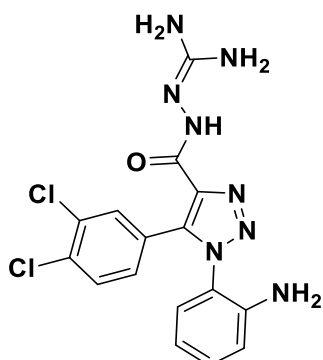
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 160.2 (CO), 156.2 (C<sub>quat</sub>), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 145.1 (2 C<sub>quat</sub>), 138.7 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 131.7 (CH), 130.8 (C<sub>quat</sub>), 130.5 (CH), 130.4 (CH), 129.1 (CH), 127.0 (C<sub>quat</sub>), 119.6 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 25.5 (CH<sub>3</sub>), 17.9 (CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 402.08, Found: 403.05; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.10 min.

HPLC: C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 24.29 min, purity > 99%.

Melting point: > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-4-[(diaminomethylene)carbonohydroneoyl]-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole (131)**



C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 405.24 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (1.1 eq., 60.0 mg, 0.16 mmol) and urea (1 eq., 9.0 mg, 0.15 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (10.0 mg, 0.025 mmol, 15%) was obtained as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.85 (br s, 1 H, NH), 7.75 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.31 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.17 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1 H), 7.09 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1 H), 6.74 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1 H), 6.56 (td, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1 H), 5.28 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.50 (br s, 4 H, 2 NH<sub>2</sub>).

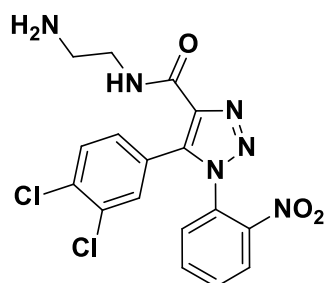
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.7 (CO), 145.1 (2 C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (CH), 132.5 (C<sub>quat</sub>), 131.6 (CH), 130.7 (C<sub>quat</sub>), 130.5 (CH), 130.3 (CH), 129.1 (CH), 127.3 (C<sub>quat</sub>), 119.8 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 404.07 Found: 405.01; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.87 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 24.89 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

***N*-(2-Aminoethyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (132)**



C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 421.24 g/mol

To a solution of ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**55'**) (1 eq., 0.15 g, 0.37 mmol) in MeOH (50 mL) was added ethylene diamine (10 eq., 0.22 g, 0.25 mL, 3.68 mmol). The mixture was heated at reflux for 15 h. After complete reaction, the solution was diluted with EtOAc (100mL) and washed with water (3 × 50mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (0.15 g, 0.35 mmol, 94%) was obtained as a white powder.

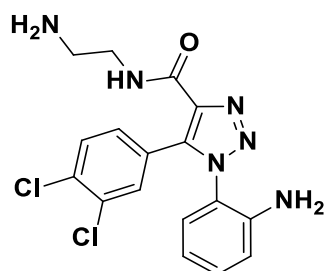
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 8.75 (t, *J* = 5.9 Hz, 1 H, NH), 8.23 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1 H), 7.88 (m, 3 H), 7.70 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 3.28-3.22 (m, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.26-3.20 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.68 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 159.7 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 141.2 (C<sub>quat</sub>), 139.5 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 135.4 (CH), 133.3 (C<sub>quat</sub>), 132.9 (CH), 131.3 (C<sub>quat</sub>), 130.8 (CH), 130.7 (CH), 130.5 (CH), 128.1 (C<sub>quat</sub>), 126.4 (CH), 125.9 (CH), 42.5 (CH<sub>2</sub>), 41.6 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 420.05, Found: 421.00; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.31 min.

**Melting point:** 158-160 °C.

**N-(2-Aminoethyl)-1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (133)**



C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 477.34 g/mol

This compound was prepared from *N*-(2-aminoethyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (**132**) (1 eq., 0.15 g, 0.35 mmol), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10 eq., 0.60 g, 3.50 mmol) and 35% aq. ammonia (10 eq., 0.2 mL) as described in the *General Procedure for Reduction of Nitro Function: procedure B*.

The title compound (48 mg, 0.12 mmol, 35%) was obtained as a white powder.

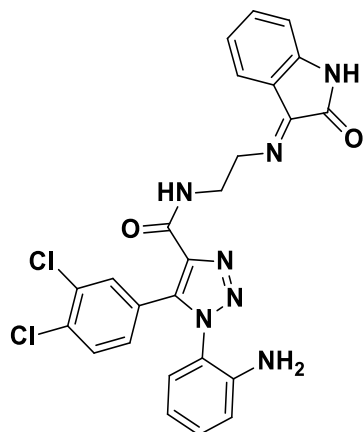
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H, NH), 7.74 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.32 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.17 (ddd, *J* = 8.2, 7.3, 1.6 Hz, 1 H), 7.08 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1 H), 6.74 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1 H), 6.55 (ddd, *J* = 7.9, 7.3, 1.3 Hz, 1 H), 5.30 (bs, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.45-3.40(m, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.31-3.17 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.69 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 160.3 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 139.3 (C<sub>quat</sub>), 137.9 (C<sub>quat</sub>), 132.7 (C<sub>quat</sub>), 132.5 (C<sub>quat</sub>), 131.6 (CH), 130.7 (CH), 130.6 (CH), 130.2 (CH), 129.1 (CH), 127.4 (C<sub>quat</sub>), 119.8 (CH), 116.2 (CH), 115.8 (C<sub>quat</sub>), 42.1 (CH<sub>2</sub>), 41.6 (CH<sub>2</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 390.05, Found: 391.04; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.31 min.

Melting point: 135-137 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-(2-((2-oxoindolin-3-ylidene)amino)ethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (134)**



C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 520.37 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from *N*-(2-aminoethyl)-1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (**133**) (1.1 eq., 103.0 mg, 0.26 mmol) and isatin (1 eq., 39.5 mg, 0.24 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (99.0 mg, 0.19 mmol, 72%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 11.12 (br s, 1 H, NH), 8.03 (br s, 1 H, NH), 7.80 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.40 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1 H), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.16-7.07 (m, 3 H), 6.91 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1 H), 6.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 5.38 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.82 (t, *J* = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.32-3.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>).

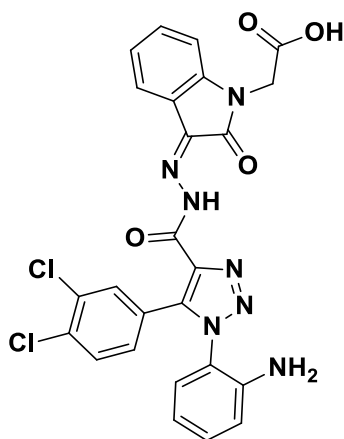
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 164.0 (CO), 159.1 (CO), 145.3 (C<sub>quat</sub>), 142.9 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 133.4 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.5 (CH), 132.0 (CH), 131.0 (CH), 130.7 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 129.0 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.2 (CH), 121.5 (CH), 120.4 (C<sub>quat</sub>), 119.4 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 111.8 (CH), 47.6 (CH<sub>2</sub>), 43.2 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 519.10, Found: 520.25; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.30 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 28.48 min, purity = 95%.

**Melting point:** > 300°C.

**2-(3-(2-(1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbonyl)hydrazono)-2-oxoindolin-1-yl)acetic acid (135)**



C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 550.35 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.19 mmol) and (2,3-dioxo-2,3-dihydro-indol-1-yl)-acetic acid (1 eq., 35.9 mg, 0.17 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (74.0 mg, 0.13 mmol, 70%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.29 (br s, 1 H, NH), 12.36 (br s, 1 H, OH), 7.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.72-7.61 (m, 2 H), 7.49 (td, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1 H), 7.41 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.26-7.11 (m, 4 H), 6.76 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1 H), 6.58 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.59 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>).

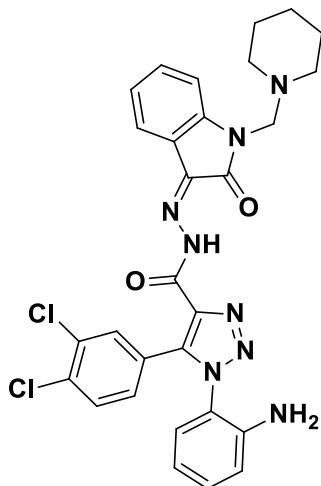
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 169.2 (CO), 161.3 (CO), 157.1 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.7 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 137.3 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.3 (CH), 131.9 (CH), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 123.8 (CH), 121.2 (CH), 119.4 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 110.8 (CH), 41.7 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 549.07, Found: 550.22; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.75 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 31.49 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxo-1-(piperidin-1-ylmethyl)indolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (136)**



C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 589.48 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 74.3 mg, 0.20 mmol) and 1-(piperidinomethyl)isatin (1 eq., 45.5 mg, 0.19 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (63.9 mg, 0.11 mmol, 53%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.38 (br s, 1 H, NH), 7.88 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H), 7.40 (dd, *J* = 8.7, 1.5 Hz, 2 H), 7.24-7.13 (m, 3 H), 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 6.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 6.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.53 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.48 (t, *J* = 7.1 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 1.59-1.53 (m, 6 H, 3 CH<sub>2</sub>).

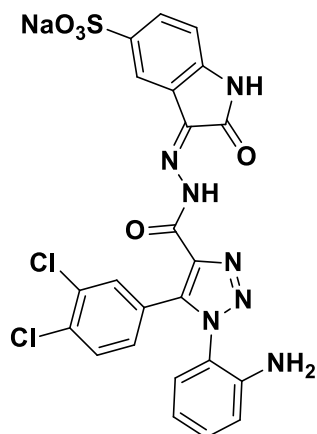
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (CO), 157.1 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.4 (CH), 131.9 (CH), 131.0 (CH), 130.6 (C<sub>quat</sub>), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.1 (CH), 121.4 (CH), 120.2 (C<sub>quat</sub>), 119.4 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 111.6 (CH), 68.4 (CH<sub>2</sub>), 52.6 (2 CH<sub>2</sub>), 25.0 (2 CH<sub>2</sub>), 24.2 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 588.16, Found: 492.17; [M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, Rt = 3.16 min.

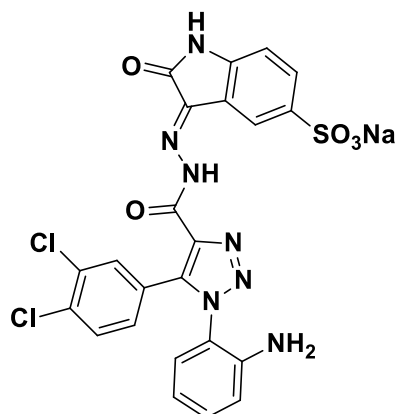
**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 31.97 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**3-(2-(1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbonyl)hydrazono)-2-oxindoline-5-sulfonic acid (137)**



**Z (32 %)**



**E (68 %)**

C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>5</sub>S  
Mw: 594.36 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 60.0 mg, 0.16 mmol) and isatin-5-sulfonic acid sodium dihydrate (1 eq., 42.8 mg, 0.15 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (76.0 mg, 0.13 mmol, 80%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.33 (br s, 0.32 H, NH (Z)), 11.82 (br s, 0.68 H, NH (E)), 11.41 (s, 0.32 H, NH (Z)), 10.95 (br s, 0.68 H, NH (E)), 8.19 (s, 1 H), 7.80 (td, *J* = 6.1, 1.6 Hz, 1 H), 7.75-7.60 (m, 2 H), 7.42 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1 H), 7.26-7.10 (m, 2 H), 6.91 (dd, *J* = 8.1, 4.1 Hz, 1 H), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 6.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 5.43 (br s, 1.36 H, NH<sub>2</sub> (E)), 5.40 (br s, 0.64 H, NH<sub>2</sub> (Z)).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** *E* form: 165.2 (CO), 157.6 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.9 (C<sub>quat</sub>), 143.4 (C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 138.5 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 131.9 (CH), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 129.1 (CH), 126.7 (C<sub>quat</sub>), 123.6 (CH), 121.8 (CH), 119.5 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (CH), 116.3 (CH), 115.8 (CH), 115.3 (C<sub>quat</sub>), 110.5 (CH).

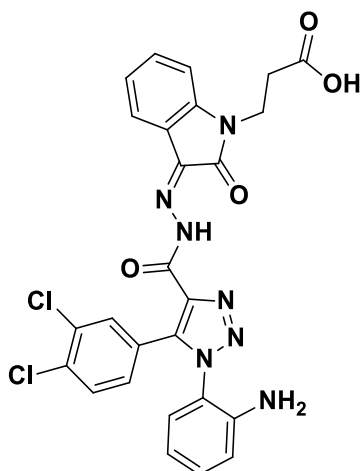
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 593.02, Found: 572.06; [M-Na+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.32 min (E) and 2.42 min (Z).

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 25.90 min (E) and 27.02 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.



**3-(3-(2-(1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbonyl)hydrazono)-2-oxoindolin-1-yl)propanoic acid (138)**



C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 564.38 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 65.0 mg, 0.18 mmol) and 3-(2,3-dioxo-2,3-dihydro-indol-1-yl)-propionic acid (1 eq., 35.7 mg, 0.16 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (80.0 mg, 0.14 mmol, 79%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.35 (br s, 1 H, NH), 12.34 (br s, 1 H, OH), 7.82 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.49 (td, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1 H), 7.40 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 7.23-7.13 (m, 3 H), 6.75 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1 H), 6.59 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1 H), 5.41 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.03 (t, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>).

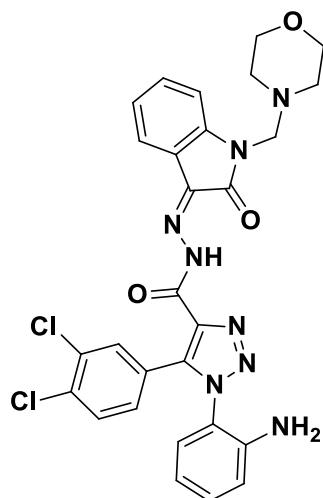
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 172.8 (CO), 161.2 (CO), 157.1 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.4 (C<sub>quat</sub>), 140.1 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 137.6 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.3 (CH), 131.9 (CH), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.4 (C<sub>quat</sub>), 123.6 (CH), 121.2 (CH), 119.7 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.8 (CH), 110.8 (CH), 36.1 (CH<sub>2</sub>), 32.3 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 563.09, Found: 564.22; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.06 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 31.79 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**1-(2-Aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(1-(morpholinomethyl)-2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (139)**



C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 591.45 g/mol

**Z (100 %)**

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**75**) (1.1 eq., 70.0 mg, 0.19 mmol) and 1-(morpholinomethyl)isatin (1 eq., 43.1 mg, 0.175 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (51.0 mg, 0.09 mmol, 45%) was obtained as a brown powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.38 (br s, 1 H, NH), 7.82 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H), 7.40 (dd, *J* = 8.7, 1.5 Hz, 2 H), 7.27 – 7.07 (m, 3 H), 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 6.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 6.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 5.40 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.57 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.57 (t, *J* = 7.1 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>), 2.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 4 H, 2 CH<sub>2</sub>).

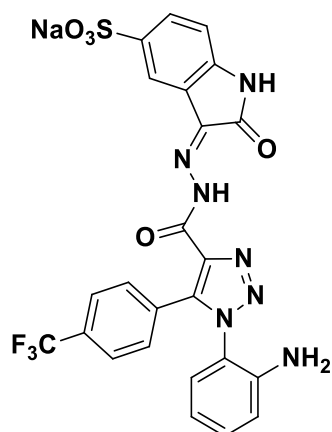
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.1 (CO), 157.0 (CO), 145.2 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 140.0 (C<sub>quat</sub>), 138.56 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 132.6 (CH), 132.3 (CH), 131.9 (CH), 130.9 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 126.5 (C<sub>quat</sub>), 123.1 (CH), 121.4 (CH), 120.3 (C<sub>quat</sub>), 119.3 (C<sub>quat</sub>), 116.3 (CH), 115.9 (CH), 111.6 (CH), 66.5 (2 CH<sub>2</sub>), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 51.0 (2 CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 590.13, Found: 492.17; [M-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.16 min.

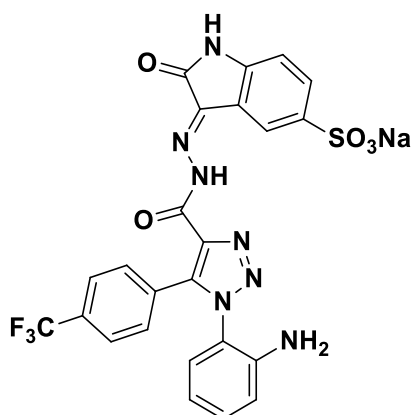
**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 32.03 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**Sodium 3-([1-(2-aminophenyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]hydrazido)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonate (140)**



**Z (33%)**



**E (67%)**

C<sub>24</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>5</sub>S  
Mw: 593.47 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**79**) (1 eq., 93 mg, 0.26 mmol) and sodium 2,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonate (1 eq., 64 mg, 0.26 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (66.5 mg, 0.11 mmol, 44%) was obtained as an orange solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.34 (br s, 0.33 H, NH (Z)), 11.83 (br s, 0.67 H, NH (E)), 11.42 (br s, 0.33 H, NH (Z)), 10.95 (br s, 0.67 H, NH (E)), 8.20 (s, 0.67H), 7.90-7.66 (m, 5.33H), 7.19 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 1 H), 6.93-6.89 (m, 1 H), 6.75 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 6.56 (t, *J* = 7.6 Hz 1H), 5.44 (br s, 1.33 H, NH<sub>2</sub>(E)), 5.42 (br s, 0.67 H, NH<sub>2</sub>(Z)).

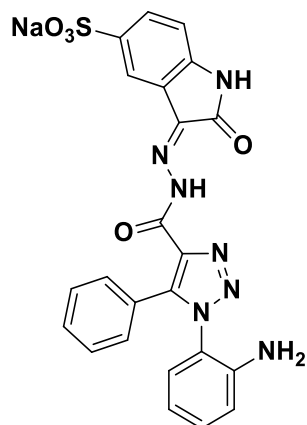
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** the spectrum was too complex to do a complete attribution. This was particularly the case in the aromatic region 130-110 ppm, where we observed superimpositions of quadruplets (coupling with fluorine) of carbon peaks from both isomers.

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 571.1, Found: 572.1; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.32 min and 2.43 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 25.57 min (E) and 26.67 min (Z), purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**3-{{1-(2-aminophenyl)-5-(4-phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl}hydrazido}-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonate (141)**



**Z (100%)**

C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>5</sub>S  
Mw: 525.47 g/mol

This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**81**) (1 eq., 60 mg, 0.20 mmol) and sodium 2,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonate dihydrate (1 eq., 58 mg, 0.20 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (86 mg, 0.16 mmol, 80%) was obtained as a yellow solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.32 (br s, 1 H, NH), 11.40 (br s, 1 H, NH), 7.79 (s, 1 H), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.43-7.39 (m, 5 H), 7.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 6.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 6.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 6.53 (t, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 5.37 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>).

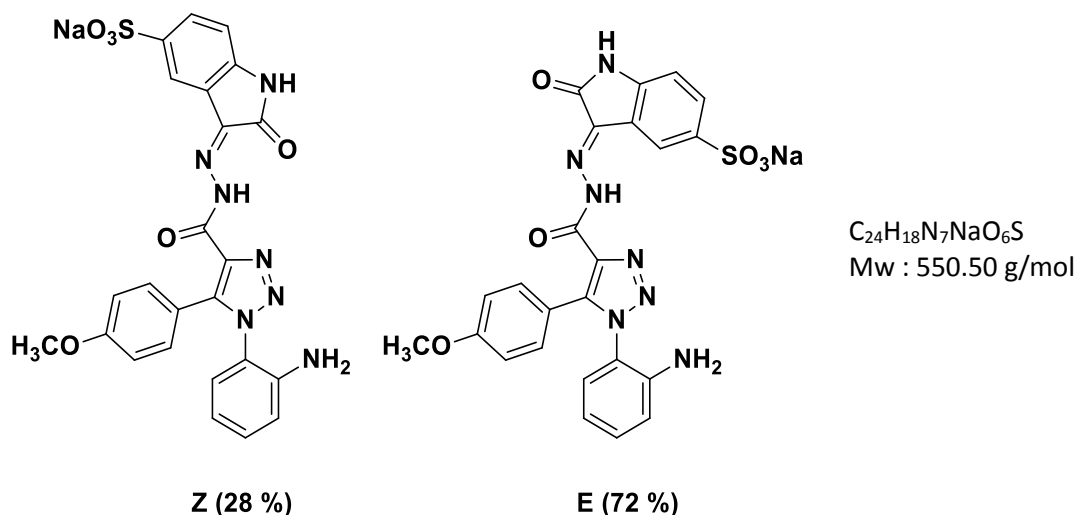
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.0 (CO), 156.9 (CO), 145.1 (C<sub>quat</sub>), 143.1 (C<sub>quat</sub>), 142.7 (C<sub>quat</sub>), 142.1 (C<sub>quat</sub>), 137.7 (C<sub>quat</sub>), 136.7 (C<sub>quat</sub>), 131.3 (CH), 130.1 (2 CH), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 128.7 (CH), 127.9 (2 CH), 125.3 (C<sub>quat</sub>), 119.6 (C<sub>quat</sub>), 119.2 (C<sub>quat</sub>), 118.3 (CH), 115.9 (CH), 115.5 (CH), 110.4 (CH).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 503.1, Found: 504.1; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.23 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 24.08 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**Sodium 3-{[1-(2-aminophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]hydrazido}-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonate (142)**



This compound was prepared from 1-(2-aminophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide (**82**) (1 eq., 82 mg, 0.25 mmol) and sodium 2,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonate dihydrate (1 eq., 72 mg, 0.25 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (67 mg, 0.12 mmol, 48%) was obtained as a brown solid.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ): 14.31 (br s, 0.28 H, NH (Z)), 11.71 (br s, 0.72 H, NH (E)), 11.40 (br s, 0.28 H, NH (Z)), 10.96 (br s, 0.72 H, NH (E)), 8.19 (s, 0.72 H (E)), 7.78 (s, 0.28 H (Z)), 7.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.72 H (E)), 7.65 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.28 H (Z)), 7.41-7.35 (m, 2 H), 7.18 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 7.05 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 6.96-6.86 (m, 3 H), 6.78 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H), 6.55 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1 H), 5.37 (br s, 1.44 H, NH<sub>2</sub> (E)), 5.34 (br s, 0.56 H, NH<sub>2</sub>(Z)), 3.77 (s, 0.84 H, OCH<sub>3</sub>(Z)), 3.75 (s, 2.16 H, OCH<sub>3</sub>(E)).

$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, DMSO- $d_6$ ): 164.9 (CO), 163.0 (CO), 158.0 (CO), 157.0 (CO), 150.6 (C<sub>quat</sub>), 145.0 (C<sub>quat</sub>), 144.0 (C<sub>quat</sub>), 143.32 (C<sub>quat</sub>), 143.25 (C<sub>quat</sub>), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 142.5 (C<sub>quat</sub>), 141.9 (C<sub>quat</sub>), 141.8 (C<sub>quat</sub>), 140.4 (C<sub>quat</sub>), 137.5 (C<sub>quat</sub>), 136.5 (C<sub>quat</sub>), 135.5 (CH), 131.6 (2 CH), 131.5 (2 CH), 131.2 (CH), 130.6 (CH), 129.2 (CH), 128.7 (CH), 123.0 (CH), 121.5 (CH), 119.7 (CH), 119.2 (2 C<sub>quat</sub>), 118.2 (CH), 117.1 (C<sub>quat</sub>), 117.0 (C<sub>quat</sub>), 115.9 (CH), 115.4 (2 CH), 114.8 (2 C<sub>quat</sub>), 113.4 (2 CH), 113.38 (2 CH), 111.5 (2 C<sub>quat</sub>), 110.3 (CH), 110.1 (CH), 55.24 (OCH<sub>3</sub>), 55.21 (OCH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 571.0, Found: 534.1;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 1.97$  min (E) and 2.15 min (Z).

HPLC: C<sub>18</sub> column:  $t_r = 22.91$  min (E) and 24.50 min (Z), purity > 99%.

Melting point: > 300 °C.

**Tert-butyl (2-azidoethyl)carbamate (143)**



Tert-Butyl (2-bromoethyl)carbamate obtained above (1 eq., 2.2mmol, 500 mg,) was dissolved in DMF (5 mL). To this solution, NaN<sub>3</sub> (1.1 eq., 2.4 mmol, 157 mg) was added, and the mixture was stirred at

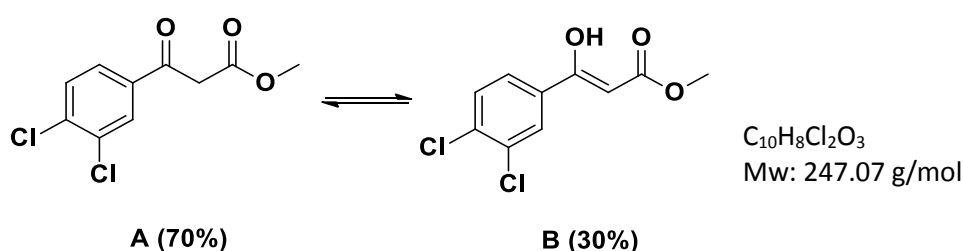
80°C for 4 h. The mixture was evaporated under vacuum and the residue was taken up in water (5 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was used directly without further purification in the next step.

The title compound (399 mg, 2.1 mmol, 98%) was obtained as a brown oil.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 3.41-3.39 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.32-3.26 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.45 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 155.7 (C<sub>quat</sub>), 79.9 (C<sub>quat</sub>), 51.2(CH<sub>2</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (3 CH<sub>3</sub>).

#### **Methyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (144)**



Dimethyl carbonate (18 eq., 4.28 g, 4.0 mL, 47.5 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of NaH (60% dispersion in mineral oil, 3 eq., 0.32 g, 7.9 mmol) and 3,4-dichloroacetophenone (1 eq., 0.50 g, 2.6 mmol) in THF (12 mL). The mixture was stirred at 0°C for 1 h and then 3 h at room temperature, before being quenched by the addition of water/ice (40 mL). The resulting aqueous solution was extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude compound was purified by flash chromatography with Cyclohexane/DCM (50:50, v/v).

The title compound (0.30 g, 1.24 mmol, 47%) was obtained as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): *keto form A*: 8.04 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 7.77 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1 H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 3.97 (s, 2 H), 3.77 (s, 3 H).

*enol form B*: 12.48 (br s, 1H, OH), 7.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1 H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 5.66 (s, 1 H), 3.82 (s, 3H).

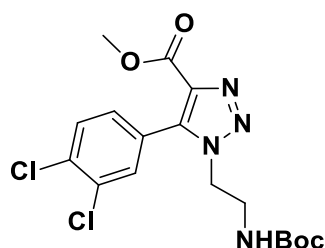
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): *keto form A*: 190.2 (CO), 167.3 (CO), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 135.4 (C<sub>quat</sub>), 133.6 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (CH), 130.5 (CH), 127.5 (CH), 52.7 (OCH<sub>3</sub>), 45.6 (CH<sub>2</sub>).

*enol form B*: 173.2 (CO), 168.8 (CO), 135.4 (C<sub>quat</sub>), 133.3 (C<sub>quat</sub>), 133.1 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 128.1 (CH), 125.1 (CH), 88.1 (CH), 51.7 (OCH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 245.99, Found: 247.01; [M+H]<sup>+</sup>; Rt=2.89 min and 3.55 min.

**Melting point:** 70-73°C.

**Methyl 1-(2-(((tert-butoxy)carbonyl)amino)ethyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (145)**



C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 415.27 g/mol

A mixture of ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**148**) (1 eq., 91.0 mg, 0.32 mmol), potassium carbonate (1.3 eq., 60.7 mg, 0.44 mmol), in dry acetonitrile (4 mL) was refluxed under a nitrogen atmosphere for 1 h. During this time, a solution of *tert*-butyl *N*-(2-chloroethyl)carbamate (1.3 eq., 78.3 mg, 0.44 mmol) and sodium iodide (2.6 eq., 130.0 mg, 0.88 mmol) in dry acetonitrile (7 mL) was stirred at 50 °C. Both mixtures were gathered and heated overnight at 85 °C. The solution was concentrated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc (20 mL) and washed twice with water (20 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (98:2, v/v).

The title compound (98.0 mg, 0.23 mmol, 72%) was obtained as a beige powder.

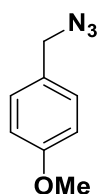
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.05 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.79 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.88 (br s, 1 H, NH), 4.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.96 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.88-3.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 161.0 (CO), 155.7 (CO), 147.8 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (C<sub>quat</sub>), 133.4 (C<sub>quat</sub>), 132.4 (C<sub>quat</sub>), 131.1 (CH), 130.2 (CH), 129.4 (C<sub>quat</sub>), 128.6 (CH), 80.0 (C<sub>quat</sub>), 55.7 (CH<sub>2</sub>), 52.5 (CH<sub>3</sub>), 39.9 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (3 CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 414.09, Found: 414.99; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.36 min.

Melting point: 97-100 °C.

**1-(azidomethyl)-4-methoxybenzene (146)**



C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O  
Mw: 163.18 g/mol

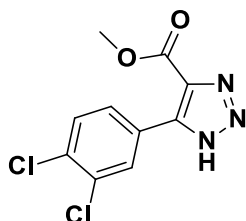
NaN<sub>3</sub> (2.0 eq., 4.8 mmol, 312 mg) in H<sub>2</sub>O (1 mL) was added to a stirred solution of the 1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene (1.0 eq., 2.4 mmol, 500 mg) in THF (10 mL). The resulting suspension was stirred at 80 °C for 3 h. The mixture was extracted with DCM (3 x 10 mL) and washed with water and brine (2 x 10 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was used directly without further purification in the next step.

The title compound (289 mg, 1.7 mmol, 74%) was obtained as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.28-7.24 (m, 2 H), 6.94-6.92 (m, 2 H), 4.28 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ): 159.8 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 129.9 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 127.6 (2 CH), 114.3 (2 CH), 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 54.5 ( $\text{CH}_2$ ).

**Methyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (148)**



$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$   
Mw: 272.09 g/mol

To a stirred solution of 3,4-dichlorobenzaldehyde (1 eq., 5.00 g, 28.6 mmol) in anhydrous dimethylformamide (40 mL) was added triethylamine (2 eq., 5.82 g, 8.0 mL, 57.6 mmol), sodium azide (3.1 eq., 5.9 g, 90.8 mmol) and methyl cyanoacetate (1 eq., 2.83 g, 28.6 mmol). The mixture was stirred at 50 °C for 2 h. The mixture was diluted in a large volume of water (100 mL) and extracted with EtOAc. The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (1.63 g, 6.0 mmol, 21%) was obtained as a white powder.

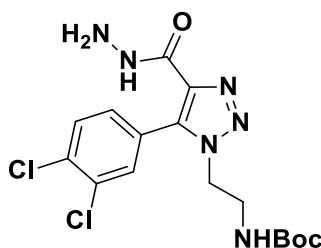
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, Acetone- $d_6$ ): 8.21 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.94 (dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, 1 H), 7.70 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 3.92 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, Acetone- $d_6$ ): 162.0 (CO), 146.0 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 133.4 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 132.5 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 131.7 (CH), 131.2 (CH), 131.2 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 131.0 ( $\text{C}_{\text{quat}}$ ), 129.8 (CH), 52.5 ( $\text{CH}_3$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 270.99, Found: 271.97;  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $R_t = 2.71$  min.

Melting point: 208-210 °C.

**Tert-butyl N-(2-[5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl)carbamate (149)**



$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_3$   
Mw: 415.27 g/mol

A solution of ethyl 1-(2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino)ethyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate (**145**) (1 eq., 0.33 g, 0.78 mmol) and 65% aq. hydrazine hydrate (15 eq., 0.91 g, 0.88 mL, 11.7 mmol) in ethanol (8 mL) was heated at 65 °C for 3 h. The solution was concentrated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc (30 mL) and washed twice with water (30 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (98:2, v/v).

The title compound (0.20 g, 0.56 mmol, 72%) was obtained as a white powder.



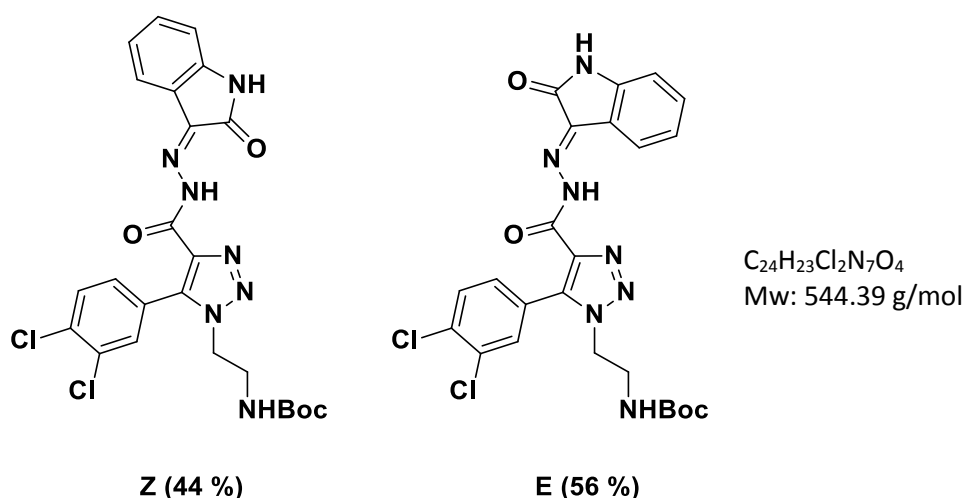
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 8.09 (br s, 1 H, NH), 7.98 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1 H), 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.98 (br s, 1 H, NH), 4.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.07 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.74 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 161.2 (CO), 155.8 (CO), 145.9 (C<sub>quat</sub>), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 130.0 (CH), 129.2 (C<sub>quat</sub>), 128.1 (CH), 79.9 (C<sub>quat</sub>), 55.3 (CH<sub>2</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>), 28.2 (3 CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 414.10, Found: 415.05; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.80 min.

Melting point: 118-120 °C.

**Tert-butyl (2-(5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(2-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene)hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)carbamate (150)**



This compound was prepared from *tert*-butyl *N*-{2-[5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl}carbamate (**149**) (1 eq., 100 mg, 0.24 mmol) and isatin (1 eq., 35.5 mg, 0.24 mmol) as described in the *General Procedure for Isatin Condensation*.

The title compound (95.5 mg, 0.17 mmol, 73%) was obtained as a beige powder.

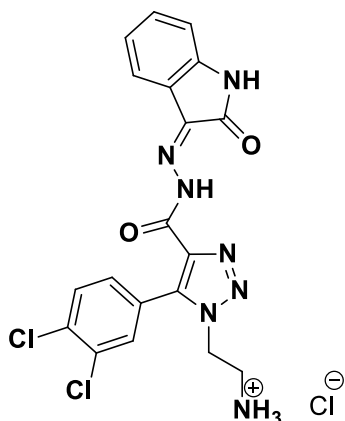
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 14.08 (br s, 0.44 H, NH (Z)), 11.55 (br s, 0.56 H, NH (E)), 11.32 (br s, 0.44 H, NH (Z)), 10.88 (br s, 0.56 H, NH (E)), 8.33 (br s, 0.44 H, NH (Z)), 8.27 (br s, 0.56 H, NH (E)), 7.99-7.95 (m, 1 H), 7.80-7.74 (m, 1.5 H), 7.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.5 H), 7.43-7.38 (m, 1.5 H), 7.09-7.03 (m, 1.5 H), 6.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 4.65-4.63 (m, 1.12 H, CH<sub>2</sub>(E)), 4.61-4.58 (m, 0.88 H, CH<sub>2</sub>(Z)), 3.59-3.57 (m, 1.12 H, CH<sub>2</sub>(E)), 3.52-3.49 (m, 0.88 H, CH<sub>2</sub>(Z)), 1.30 (s, 3.96H, 3 CH<sub>3</sub>(Z)), 1.29 (s, 5.04 H, 3 CH<sub>3</sub>(E)).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 164.4 (CO), 162.5 (CO), 156.8 (2 CO), 155.5 (2 CO), 146.2 (C<sub>quat</sub>), 145.4 (C<sub>quat</sub>), 144.1 (C<sub>quat</sub>), 142.7 (C<sub>quat</sub>), 141.7 (C<sub>quat</sub>), 138.3 (C<sub>quat</sub>), 137.0 (C<sub>quat</sub>), 136.5 (C<sub>quat</sub>), 133.2 (2 CH), 131.9 (C<sub>quat</sub>), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 131.0 (C<sub>quat</sub>), 130.8 (CH), 130.5 (2 CH), 130.1 (CH), 129.7 (C<sub>quat</sub>), 128.8 (CH), 128.5 (CH), 125.9 (CH), 122.7 (CH), 122.0 (CH), 121.0 (CH), 119.7 (2 C<sub>quat</sub>), 115.4 (2 C<sub>quat</sub>), 111.2 (CH), 111.0 (CH), 78.0 (2 C<sub>quat</sub>), 55.31 (CH<sub>2</sub>), 55.29 (CH<sub>2</sub>), 38.0 (2 CH<sub>2</sub>), 28.1 (6 CH<sub>3</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 543.12, Found: 542.13; [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 3.10 min (E) and 3.40 min (Z).

Melting point: > 300 °C.

**2-(5-(3,4-Dichlorophenyl)-4-(2-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene)hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethan-1-aminium chloride (151)**



C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 480.74 g/mol

**Z (100 %)**

A mixture of *tert*-Butyl (2-(5-(3,4-dichlorophenyl)-4-(2-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene)hydrazinecarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)carbamate (**150**) (1 eq., 105 mg, 0.19 mmol) in dioxane (1 mL) was stirred for 3 h at room temperature in presence of aq. 4 M HCl solution (15 eq., 0.72 mL, 2.89 mmol). The precipitate was filtered, dissolved in a mixture MeOH / H<sub>2</sub>O (1:9, v/v) and lyophilized.

The title compound (74.0 mg, 0.15 mmol, 80%) was obtained as an orangepowder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.10 (br s, 1 H, NH), 11.43 (br s, 1 H, NH), 8.50 - 8.30 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.37 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 4.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.51 (t, *J* = 5.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 162.6 (CO), 156.7 (CO), 146.5 (C<sub>quat</sub>), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 138.6 (C<sub>quat</sub>), 137.0 (C<sub>quat</sub>), 132.11 (CH), 131.9 (C<sub>quat</sub>), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (2 CH), 129.5 (C<sub>quat</sub>), 129.0 (CH), 122.7 (CH), 121.1 (CH), 119.7 (C<sub>quat</sub>), 111.3 (CH), 52.7 (CH<sub>2</sub>), 38.0 (CH<sub>2</sub>).

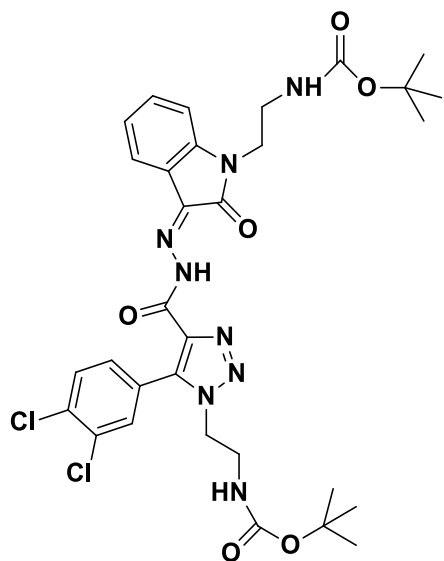
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 443.07, Found: 442.05; [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 2.50 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 26.55 min, purity > 99%.

**Melting point:** 288 - 290 °C.



**Tert-butyl N-[2-(4-{N'-[(3Z)-1-(2-{{tert-butoxy}carbonyl}amino)ethyl]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene]hydrazinecarbonyl}-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl]carbamate (153)**



C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>  
Mw: 687.57 g/mol

**Z (100 %)**

A mixture of *tert*-butyl *N*-{2-[5-(3,4-dichlorophenyl)-4-{*N'*-[(3*Z*)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-ylidene]hydrazinecarbonyl}-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl}carbamate (**150**) (1 eq., 120 mg, 0.22 mmol) and *tert*-butyl *N*-(2-chloroethyl)carbamate (1.2 eq., 48 mg, 0.27 mmol) in ACN (4 mL)/DMF (5 mL) was heated overnight at 85 °C for 6.5 h in presence of potassium carbonate (3 eq., 92 mg, 0.67 mmol). The mixture was concentrated under vacuum, the residue was taken in DCM (25 mL) and washed with aq. 1.0 M HCl solution (2 x 20 mL) then water (2 x 20 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (58 mg, 0.084 mmol, 38%) was obtained as a beige powder.

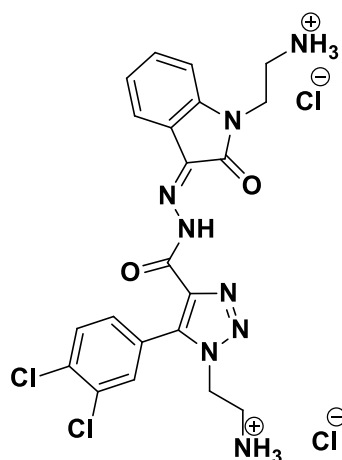
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 11.60 (br s, 1 H, NH), 8.39 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 8.28 (br s, 1 H, 1 NH), 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 8.03 (br s, 1 H, NH), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 4.65-4.60 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.79-3.75 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.60-3.56 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.19-3.15 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.31 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 9 H, 3 CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.2 (2 CO), 155.7 (CO), 155.5 (CO), 145.3 (C<sub>quat</sub>), 144.9 (C<sub>quat</sub>), 141.1 (C<sub>quat</sub>), 137.2 (C<sub>quat</sub>), 132.8 (CH), 131.9 (C<sub>quat</sub>), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 130.8 (CH), 130.1 (CH), 129.8 (C<sub>quat</sub>), 128.5 (CH), 125.7 (CH), 122.2 (CH), 115.0 (C<sub>quat</sub>), 109.5 (CH), 78.0 (C<sub>quat</sub>), 77.8 (C<sub>quat</sub>), 55.2 (2 CH<sub>2</sub>), 37.7 (2 CH<sub>2</sub>), 28.1 (2 x 3 CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 686.21, Found: 685.24; [M-H]<sup>-</sup>; Rt = 3.67 min.

**Melting point:** > 300°C.

**1-(2-Aminoethyl)-N'-[(3Z)-1-(2-aminoethyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene]-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazide dihydrochloride (154)**



C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 560.26 g/mol

**Z (100 %)**

A solution of *tert*-butyl *N*-[2-(4-{*N*'-[(3Z)-1-(2-{{*tert*-butoxy}carbonyl}amino)ethyl]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-ylidene}hydrazinecarbonyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl]carbamate (**153**) (1 eq., 82.4 mg, 0.12 mmol) in dioxane (2 mL) was stirred at room temperature for 4 h in presence of 4 M HCl solution in dioxane (15 eq., 0.45 mL, 1.80 mmol). The precipitate was filtered, dissolved in a mixture MeOH / H<sub>2</sub>O (1:10, v/v) and lyophilized.

The title compound (50.4 mg, 0.09 mmol, 75%) was obtained as an orange powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 13.96 (br s, 1 H, NH), 8.54 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.38 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H), 8.32 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.66 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 4.94 (t, *J* = 5.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.12-4.08 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.51-3.45 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.12-3.05 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>).

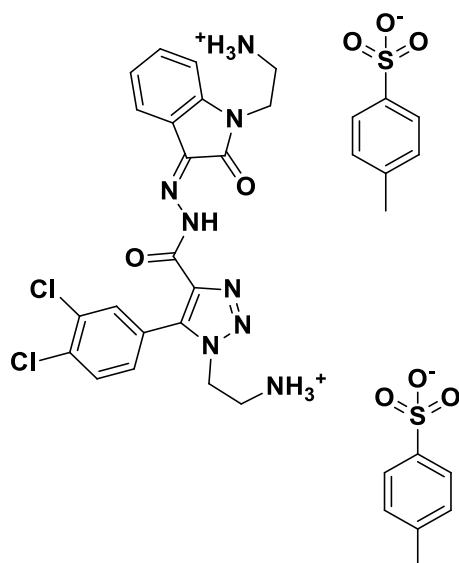
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 161.5 (CO), 156.6 (CO), 146.6 (C<sub>quat</sub>), 142.8 (C<sub>quat</sub>), 138.1 (C<sub>quat</sub>), 136.8 (C<sub>quat</sub>), 132.1 (CH), 131.9 (C<sub>quat</sub>), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 130.7 (CH), 130.6 (CH), 129.4 (CH), 129.0 (C<sub>quat</sub>), 123.4 (CH), 120.9 (CH), 119.6 (C<sub>quat</sub>), 111.2 (CH), 52.7 (CH<sub>2</sub>), 37.9 (CH<sub>2</sub>), 37.0 (CH<sub>2</sub>), 36.5 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 487.3, Found: 487.2; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.80 min, 485.1 [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 2.11 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 23.60 min, purity > 99%.

**Melting point:** 274 -276 °C.

**2-(4-(2-(1-(2-Ammonioethyl)-2-oxoindolin-3-ylidene)hydrazinecarbonyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethanaminium 4-methylbenzenesulfonate (155)**



C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>  
Mw: 831.75 g/mol

**Z (100 %)**

A mixture of *tert*-butyl *N*-[2-(4-{*N*'-[(3Z)-1-(2-[[*tert*-butoxy]carbonyl]amino)ethyl]-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-ylidene]hydrazinecarbonyl}-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl]carbamate (**153**)(1 eq., 51.6 mg, 0.075 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (4.5 eq., 64.0 mg, 0.34 mmol) in ethanol (2 mL) was heated at reflux for 2 h. The precipitate was filtered.

The title compound (36.0 mg, 0.043 mmol, 58%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 13.94 (br s, 1 H, NH), 8.37 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 8.04 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.91 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.53 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 4 H), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.23 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 4 H), 4.86 (t, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 4.06 (t, *J* = 5.0 Hz, 2 H), 3.53-3.48 (m, 2 H), 3.16-3.08 (m, 2 H), 2.28 (s, 6 H).

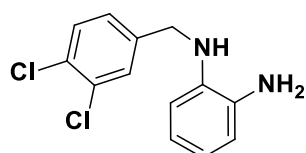
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 161.6 (CO), 156.6 (CO), 146.7 (C<sub>quat</sub>), 145.3 (C<sub>quat</sub>), 142.7 (2 C<sub>quat</sub>), 138.1 (2 C<sub>quat</sub>), 137.8 (C<sub>quat</sub>), 136.9 (C<sub>quat</sub>), 133.0 (C<sub>quat</sub>), 132.2 (CH), 131.9 (CH), 131.1 (C<sub>quat</sub>), 130.6 (CH), 129.4 (CH), 129.0 (CH), 128.1 (4 CH), 125.4 (4 CH), 123.5 (CH), 120.9 (C<sub>quat</sub>), 119.6 (C<sub>quat</sub>), 110.1 (CH), 52.9 (CH<sub>2</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub>), 37.1 (CH<sub>2</sub>), 36.8 (CH<sub>2</sub>), 20.8 (2 CH<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 830.15, Found: 487.06; [M-2OTs+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.47 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>=23.64 min, purity > 99%.

**Melting point:** > 300 °C.

**N-1-(3,4-dichlorobenzyl)benzene-1,2-diamine (156)**



C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>  
Mw: 267.15 g/mol

1,2-Benzenediamine (1.5 eq., 0.50 g, 4.62 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 eq., 0.64 g, 4.62 mmol) were suspended in MeOH (10 mL) and cooled to 0 °C. 3,4-Dichlorobenzyl chloride (1 eq., 0.60 g, 0.43 mL,

3.08 mmol) was added very slowly to the solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was taken up in EtOAc, washed with water and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95:5, v/v).

The title compound (0.37 g, 1.40 mmol, 46 %) was obtained as a brown oil.

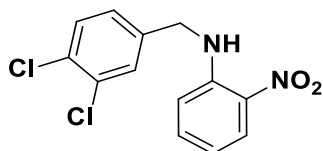
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 7.61 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.36 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1 H), 6.62-6.51 (m, 1 H), 6.46-6.36 (m, 2 H), 6.32-6.22 (m, 1 H), 5.24 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H, NH), 4.56 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.31 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 142.8 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (C<sub>quat</sub>), 135.9 (C<sub>quat</sub>), 131.9 (C<sub>quat</sub>), 131.0 (CH), 129.8 (C<sub>quat</sub>), 129.7 (CH), 128.0 (CH), 118.3 (CH), 118.1 (CH), 115.3 (CH), 111.2 (CH), 46.6 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 266.04, Found: 267.10; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 3.15 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>=24.82 min, purity > 99%.

#### **N-(3,4-dichlorobenzyl)-2-nitroaniline (157)**



C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Mw: 297.14 g/mol

*o*-Nitroaniline (1.5 eq., 0.60 g, 4.34 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 eq., 0.60 g, 4.34 mmol) were suspended in MeOH (10 mL) and cooled to 0 °C. 3,4-Dichlorobenzyl chloride (1 eq., 0.57 mg, 0.40 mL, 2.90 mmol) was added very slowly to the solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was taken up in EtOAc, washed with water and brine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was further purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (0.22 g, 0.75 mmol, 26%) was obtained as a white powder.

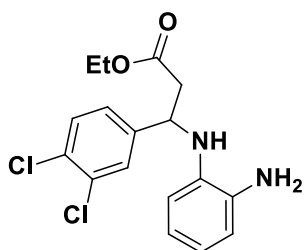
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 8.45 (br s, 1 H, NH), 8.28-8.20 (m, 1 H), 7.49-7.38 (m, 3 H), 7.21 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 6.75 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1 H), 6.71 (s, 1 H), 4.55 (d, *J* = 5.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 145.2 (C<sub>quat</sub>), 137.3 (C<sub>quat</sub>), 136.2 (CH), 131.7 (C<sub>quat</sub>), 131.4 (C<sub>quat</sub>), 130.9 (CH), 130.0 (CH), 128.9 (C<sub>quat</sub>), 127.9 (CH), 125.1 (CH), 118.3 (CH), 114.1 (CH), 47.0 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 296.01, Found: 297.13; [M+H]<sup>+</sup>, Rt = 2.25 min.

**Melting point:** 110-112 °C.

### Ethyl 3-((2-aminophenyl)amino)-3-(3,4-dichlorophenyl)propanoate (159)



$C_{17}H_{18}Cl_2N_2O_2$   
Mw: 353.24 g/mol

Zn (4 eq., 1.21 g, 18.50 mmol) was added to a solution of ethyl bromoacetate (2.5 eq., 1.93 g, 1.28 mL, 11.60 mmol) in anhydrous ACN (20 mL). The mixture was stirred for five min at room temperature. Then 3,4-dichlorobenzaldehyde (1.1 eq., 0.890 g, 5.09 mmol) and 1,2-benzenediamine (1 eq., 0.50 g, 4.62 mmol) were added along with the organic halide in the mixture. The resulting solution was stirred for one hour at room temperature. Then, the mixture was quenched with aq. saturated ammonium chloride solution. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was separated, dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

The title compound (0.35 g, 0.99 mmol, 26%) was obtained as a white powder.

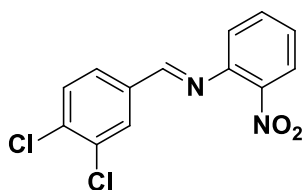
$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 7.51 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.40 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 7.24 (dd,  $J = 8.3$ , 2.1 Hz, 1 H), 6.81–6.63 (m, 3 H), 6.38 (dd,  $J = 7.0$ , 2.1 Hz, 1 H), 4.77 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1 H, CH), 4.16 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 2.82 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 171.2 (CO), 143.1 ( $C_{quat}$ ), 136.6 ( $C_{quat}$ ), 135.7 ( $C_{quat}$ ), 135.4 ( $C_{quat}$ ), 133.2 ( $C_{quat}$ ), 131.1 (CH), 128.8 (CH), 126.2 (CH), 120.8 (CH), 120.2 (CH), 117.3 (CH), 114.6 (CH), 61.4 ( $CH_2$ ), 54.8 (CH), 43.1 ( $CH_2$ ), 14.5 ( $CH_3$ )

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 353.07, Found: 353.07;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 3.27$  min.

Melting point: 102–105 °C.

### (E)-N-(3,4-dichlorobenzylidene)-2-nitroaniline (160)



$C_{13}H_8Cl_2N_2O_2$   
Mw: 295.12 g/mol

*o*-Nitroaniline (1 eq., 2.00 g, 14.50 mmol) was added to a solution of 3,4-dichlorobenzaldehyde (1 eq., 2.53 g, 14.50 mmol) in toluene (40 mL). The mixture was stirred overnight at reflux using a Dean Stark apparatus and the precipitate was collected by filtration.

The title compound (1.28 g, 4.34 mmol, 30%) was obtained as a white powder.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $DMSO-d_6$ ): 8.70 (s, 1 H), 8.14 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1 H), 8.02 (dd,  $J = 8.1$ , 1.3 Hz, 1 H), 7.92 (dd,  $J = 8.4$ , 1.9 Hz, 1 H), 7.85 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 7.77 (ddd,  $J = 8.2$ , 7.5, 1.2 Hz, 1 H), 7.48 (ddd,  $J = 8.1$ , 7.5, 1.3 Hz, 1 H), 7.39 (dd,  $J = 8.0$ , 1.2 Hz, 1 H).

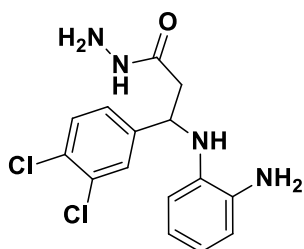
$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $DMSO-d_6$ ): 161.9 (CH), 145.6 ( $C_{quat}$ ), 144.3 ( $C_{quat}$ ), 136.7 ( $C_{quat}$ ), 135.6 ( $C_{quat}$ ), 135.1 (CH), 132.7 ( $C_{quat}$ ), 132.2 (CH), 131.4 (CH), 129.5 (CH), 127.5 (CH), 125.1 (CH), 121.9 (CH).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 294.00, Found: 171.07;  $[M-C_6H_4NO_2-H]^-$ ,  $R_t = 3.17$  min.



**Melting point:** 146-148 °C.

**3-((2-Aminophenyl)amino)-3-(3,4-dichlorophenyl)propanehydrazide (162)**



C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O  
Mw: 339.22 g/mol

This compound was prepared from ethyl 3-[(2-aminophenyl)amino]-3-(3,4-dichlorophenyl)propanoate (**159**) (1 eq., 0.35 g, 0.99 mmol) and hydrazine monohydrate solution (20 eq., 1.53 g, 1.49 mL, 19.80 mmol) as described in the *General Procedure for Hydrazide Synthesis*.

The title compound (0.14 g, 0.41 mmol, 42%) was obtained as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 9.02 (br s, 1 H, NH), 7.62 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.35 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1 H), 6.55 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1 H), 6.46-6.27 (m, 2 H), 6.22 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1 H), 5.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H, NH), 4.78 (dd, *J* = 14.1, 7.2 Hz, 1 H, NH), 4.60 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.24 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 2.66-2.55 (m, 1H, CH).

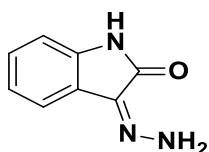
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 169.6 (CO), 146.2 (C<sub>quat</sub>), 136.7 (C<sub>quat</sub>), 134.7 (C<sub>quat</sub>), 131.7 (C<sub>quat</sub>), 131.2 (C<sub>quat</sub>), 129.9 (CH), 129.3 (CH), 128.0 (CH), 118.6 (CH), 118.2 (CH), 115.6 (CH), 112.8 (CH), 54.2 (CH), 42.7 (CH<sub>2</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 338.07, Found: 337.10; [M-H]<sup>-</sup>, Rt = 2.45 min.

**HPLC:** C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub>=21.83 min, purity > 99%.

**Melting point:** 140-143 °C.

**(Z)-3-hydrazonoindolin-2-one (164)**



C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O  
Mw: 161.16 g/mol

A solution of 65% aq. hydrazine monohydrate (1 eq., 0.26 g, 0.25 mL, 3.40 mmol) and isatin (1 eq., 0.50 g, 3.40 mmol) in methanol (10 mL) was refluxed for 3 h and the precipitate was collected by filtration.

The title compound (0.52 g, 3.23 mmol, 95%) was obtained as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 10.69 (br s, 1 H), 10.54 (d, *J* = 14.3 Hz, 1 H), 9.55 (d, *J* = 14.3 Hz, 1 H), 7.36 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.16 (td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1 H), 6.98 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1 H), 6.86 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 163.6 (CO), 139.5 (C<sub>quat</sub>), 127.9 (CH), 127.0 (C<sub>quat</sub>), 123.1 (C<sub>quat</sub>), 122.2 (CH), 118.3 (CH), 110.8 (CH).

**LC-MS (ESI)**  $m/z$  Calculated: 161.08, Found: 162.04;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 1.94$  min.

**HPLC:**  $C_{18}$  column:  $t_r=20.33$  min, purity > 99%.

**Melting point:** 207-210 °C.

## **II. Molecular modeling**

Molecular studies were performed using Gold suite v5.2203 within the Hermes v1.6 GUI (CCDC®). The docking was realized on the TEAD crystal structure from the hTEAD<sub>1194-411</sub>-hYAP<sub>150-171</sub> complex (PDB 3KYS). The binding site was defined as a sphere centered on Lys<sub>289</sub> at the interface 3. Its radius was set to 12 Å in order to include specific residues identified by directed mutagenesis. Compounds (175 000 molecules from ZINC database) were docking set to 10 000 operations per compound and a maximum of ten final poses, but with an early termination stopping the calculations if 3 poses are generated within a RMSD of 1.5 Å. Next, the best ChemPLP score pose only was conserved for each compound. A score per atom was also calculated by dividing this score by the number of heavy atoms of the compound, to keep as a guideline of the embedment of the molecule. Finally, the number of hydrogen bonds formed with the residues of the binding site was extracted and allowed to highlight ligands.

## **III. Binding tests**

hTEAD<sub>41-434</sub> was purchased from Cusabio® while hTEAD<sub>2217-447</sub> was produced and purified at the “Centre de Biologie Structurale de Montpellier” by Dr Frédéric Allemand. The peptide YAP<sub>50-102</sub> was obtained by chemical synthesis from Xprochem®.

### **A. Thermal Shift Assay**

Thermal Shift Assay was performed on an ABI Prism 7900 HT, originally designed for real-time quantitative PCR, in a 96-well plate format. The gradient method contained 70 cycles and started at 25 °C by rating the temperature of 1 °C/cycle. All experiments were conducted with the hTEAD<sub>2217-447</sub> protein (20 μM) in the purification buffer [TRIS 20 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, TCEP 1 mM, Glycérol 5%]. A dilution of the 5000x SYPRO® Orange commercial solution was first performed in the buffer to obtain a 10x SYPRO® Orange intermediate solution, which was diluted with hTEAD<sub>2217-447</sub> to obtain a 1-5 μM final protein concentration range. The total volume kept constant (40 μL) to obtain samples containing constant concentration of SYPRO® orange and varied analyte/protein concentrations. Analyte solutions were prepared from stock solutions at 10 mM in DMSO and added to the mixture to reach a final DMSO concentration of 2.5% and a 50-250 μM compound concentration range. To determine the melting temperature T<sub>m</sub> for the protein, a Boltzmann model was used to fit protein unfolding curves using the GraphPad Prism® software.

## B. Surface Plasmon Resonance

All experiments were carried out on a Biacore3000 system and Series S sensor Chip NTAor CM5. HEPES buffer (10 mM) in a 4-6 pH range was prepared from a [HEPES (pH 7.4) 10 mM, NaCl 150 mM, TCEP 0.25 mM] solution adjusted to the desired pH by addition of 1M HCl.

**General procedure for immobilization:** Before immobilization, the dextran was cleaned and hydrated by EDTA 0.35 M solution for 1 min at 20  $\mu$ L/min. Flow cell 1 was used as reference and control surface to correct bulk refractive index changes and check for nonspecific binding. The sensor chip flow cells were activated for 7 min by injection of mixture 0.4 M EDC/0.1 M NHS at 5  $\mu$ L/mL. After activation, proteins were injected with corresponding time/flow on the Flow cell 2. An injection of 1 M ethanolamine HCl (pH 8.5) was flowed to block residual activated groups. Finally, the surface was regenerated with EDTA 0.35 M solution for 1 min at 20  $\mu$ L/min.

**YAP immobilization:** YAP<sub>50-102</sub> was dissolved in ultrapure water at a concentration of 10  $\mu$ g/mL in an appropriate buffer and immobilized on CM5 chip by repeated short time injections at 15 $\mu$ L/min.

**TEAD immobilization:** Before injecting TEAD, the surface had to be activated with NiCl<sub>2</sub> 0.5 mM for 1 min at 20  $\mu$ L/min. hTEAD<sub>41-434</sub> was furnished in HEPES (pH 7.4) 10 mM and diluted in an appropriate buffer before being injected at 50  $\mu$ g/mL on the NTA chip for 2 min at 5  $\mu$ L/min.

For compound measurements, the reaction buffer was completed with 10% of DMSO. Analyte solutions were prepared from stock solutions (10 mM in DMSO) and diluted with the reaction buffer to obtain a final DMSO concentration of 10%. Kinetics experiments were performed at 25°C with a flow rate of 50 mL/min in running buffer [HEPES (pH 7.4) 10 mM, NaCl 150 mM, TCEP 0.25 mM, EDTA 50  $\mu$ M, P20 0.05%, DMSO 10%]. After baseline equilibration with a series of buffer blanks, a DMSO correction series was performed from 9% to 11%. Each cycle consisted of a compound-injection phase (1 min) and a compound-dissociation phase (10 min). Data collection requires processing to remove systematic artefacts related to nonspecific binding, signal drift, and bulk refractive index change. Data sets were processed and analysed using Biaeval® and Scrubber® software.

## C. MicroScale Thermophoresis

Experiments were performed on a NanoTemperMonolith™ NT.115<sup>PICO</sup> instrument with blue/red filters. YAP<sub>50-102</sub> and hTEAD<sub>41-434</sub> proteins were fluorescently labelled using Monolith NT™ protein labelling kit RED-NHS.

**General procedure for labeling protein:** The maleimide-NT647 was used for the labeling of YAP and TEAD. For labeling, 10  $\mu$ M of protein were mixed with 30  $\mu$ M of maleimide-NT647 dye and incubated

in the dark at room temperature for 30 min. For buffer exchange and removal of the residual dye, the solution was purified on MidiTrop column G25 (furnished in the kit). Finally, the fluorescence was measured to determine the protein concentration to obtain a necessary signal for analysis.

Samples were prepared in reaction buffer [HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, P20 0.05%, TCEP 0.25 mM, BSA 5 mg/mL] and loaded into standard treated capillaries. Measurements were performed at 25 °C using 40% LED and 60% MST power with a MST-on time of 20s and a laser-off time of 5s. Data analysis were carried out using NanoTemper<sup>®</sup> analysis software. The parameters were deduced in T-Jump and the resulting dose-reponse curves fitted to a one-site binding model to extract  $K_d$  values.

#### **D. Time-resolved FRET assay**

Serial dilutions of the peptides/proteins were incubated in white 96-well plates with flat opaque bottom (Greiner Bio-One) for 30min–6h at room temperature with His-hTEAD<sub>41-434</sub> and N-biotinylated YAP<sub>50-102</sub> at a 10-250  $\mu$ M concentration range in reaction buffer [LANCE Europium Anti-6X His Antibody (0.125nM, PerkinElmer), Streptavidin XL665 (10nM, Cisbio) in HEPES (pH 7.4, 50 mM), KCl (100mM), Tween-20 (0.05 %), TCEP (0.25mM), EDTA (1mM), and BSA (0.05%)]. The fluorescence was measured (50ms delay between excitation and fluorescence) with a Spectramax i3 and use of an excitation wavelength of 340 nm and emission wavelengths of 620 nm and 665 nm. Data analyses were carried out by using the TR-FRET ratio emission 655 nm/620 nm.

## **IV. Biology**

### **A. Cell cultures**

MDA-MB-231 (breast), HCT-116 (colon) and HEK293 (kidney) cell lines were purchased from the American Type Culture Collection and cultivated in DMEM media containing 10% of heat inactivated FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin.

### **B. Western blot**

Total extracts of cells were obtained with a RIPA based buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). Western blots were carried out using 20  $\mu$ g of protein lysates with the NuPage Electrophoresis and Iblot transfer systems (Life Technologies).  $\beta$ -Actin was used as loading control for total extracts.

### C. Luciferase Reporter Assay

HEK293T cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells in 24 well plates coated with polyethylenimine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cells were transfected with the TEAD luciferase reporter plasmid 8XGTIIC-Luciferase (Addgene reference 34615) and a control  $\beta$ -galactosidase plasmid CMV- $\beta$ Gal using the lipofectamine 2000 Reagent (Life Technologies, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Compounds were tested at then different concentrations ranging from 0.25 to 20  $\mu\text{M}$ .

After 24 hours post transfection, cells were lysed in Reporter Lysis Buffer (Promega) and luciferase activity was measured on the Mithras LB940 plate reader and normalized to  $\beta$ -galactosidase.  $\beta$ -galactosidase control allowed us to qualitatively estimate the cytotoxicity of the tested compounds.

### D. Real-time PCR

Total RNAs were extracted from cultured cells or human tumors with the Nucleospin extraction kit (Macherey Nagel). Messenger RNAs were retrotranscribed from 1  $\mu\text{g}$  total RNA by using the High-Capacity cDNA Archive Kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR was performed using the Sso Fast Evagreen SuperMix kit according to the manufacturer's protocol and the CFX 96 real time PCR system (Biorad). The forward and reverse primers used were as follow: 5'-TTACCAATGACAACGCCTCCT-3' and 5'-TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC-3' for CTGF, 5'-ACCGCTCTGAAGGGGATCT-3' and 5'-ACTGATGTTTACAGTTGGGCTG-3' for Cyr61, 5'-GTTTGGAGCTGTGATGGAAGGC-3' and 5'-CGCTTCACTCAGGAAATCCTCC-3' for AXL, 5'-TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA-3' and 5'-TCATGCTTAGTCCACTGTCTGT-3' for YAP. Expression levels of genes of interest were normalized to the mRNA level of RPLP0 housekeeping gene and compared by using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method.

### E. Cytotoxicity assay

The human neuroblastoma cell line (SY5Y) was cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 mg/ml streptomycin, 100 IU/mL penicillin, 1 mM non-essential amino acids and 10% (v/v) heatinactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich), and grown at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were seeded at 2000 cells per well onto 96-well plates in DMEM medium. Cells were starved for 24 h to obtain synchronous cultures, and were then incubated in culture medium that contained various concentrations of test compounds, each dissolved in less than 0.1% DMSO. After 72 h of incubation, cell growth was estimated by the colorimetric MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) assay.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 Cancer, L. I. C. I., Cancer, chiffres et définition. <http://www.e-cancer.fr/> (le 5 août 2017)
- 2 Cancer, L. I. C. I., Le dépistage des cancers. <http://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/brochures/depistage-cancers.pdf> (le 7 août 2017)
- 3 Cancer, I. N. D., Plan Cancer 2014-2019. <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs> (le 5 août 2017)
- 4 PasseportSante, Comprendre les différentes phases du cancer. <http://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=vrais-boucliers-contre-le-cancer> (le 7 août 2017)
- 5 InfoCancer, Les étapes de la cancérisation. <http://www.arcagy.org/infocancer/en-savoir-plus/cancer/qu-est-ce-que-le-cancer/les-etapes-de-la-cancerisation.html> (le 6 août 2015)
- 6 Inserm, Angiogenèse. <http://www.inserm.fr/dossiers-d-information/angiogenese> (le 7 août 2017)
- 7 Hanahan, D. and Weinberg, R. A., The Hallmarks of Cancer. *Cell*.**2000**, *100*, 57-70.
- 8 Hanahan, D. and Weinberg, R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*.**2011**, *144*, 646-674.
- 9 Goustin, A. S.; Leof, E. B.; Shipley, G. D. and Moses, H. L., Growth Factors and Cancer. *Cancer Res*.**1986**, *46*, 1015-1029.
- 10 CEA, Hypoxie et Angiogenèse. [http://irtsv.cea.fr/dsv/irtsv/Pages/Actualites/Resultats-scientifiques/L26\\_NCherradi.aspx](http://irtsv.cea.fr/dsv/irtsv/Pages/Actualites/Resultats-scientifiques/L26_NCherradi.aspx) (le 7 août 2017)
- 11 Cancer, L. I. C. I., Les traitements du cancer. <https://www.ligue-cancer.net/shared/brochures/traitements-cancers.pdf> (le 7 août 2017)
- 12 Pharmacomedicale.org, Anticancéreux : les points essentiels. <http://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticancereux-les-points-essentiels> (le 5 août 2017)
- 13 Bardet, P. L., Developmental control of organ growth by the Hippo pathway. *Med Sci (Paris)*.**2009**, *25*, 253-257.
- 14 Johnson, R. and Halder, G., The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov*.**2014**, *13*, 63-79.
- 15 Meng, Z., Moroishi, T. and Guan, K.-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*.**2016**, *30*, 1–17.
- 16 Genevet, A.; Wehr, M. C.; Brain, R.; Thompson, B. J.; Tapon, N. Kibra Is a Regulator of the Salvador/Warts/Hippo Signaling Network. *Dev. Cell*.**2010**, *18*, 300–308.
- 17 Piccolo, S.; Dupont, S. and Cordenonsi, M., The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiol. Rev*.**2014**, *94*, 1287-1312.
- 18 Ota, M. and Sasaki, H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*.**2008**, *135*, 4059-4069.
- 19 Zhao, B.; Ye, X.; Yu, J.; Li, L.; Li, W.; Li, S.; Yu, J.; Lin, J. D.; Wang, C.-Y.; Chinnaiyan, A. M.; Lai, Z.-C.; Guan, K.-L. TEAD Mediates YAP-Dependent Gene Induction and Growth Control. *Genes Dev*.**2008**, *22*, 1962–1971.
- 20 Xu, M. Z.; Chan, S. W.; Liu, A. M.; Wong, K. F. *et al.*, AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*.**2010**, *30*, 1229-1240.
- 21 Zhao, B.; Li, L.; Lei, Q.; Guan, K. L. The Hippo-YAP Pathway in Organ Size Control and Tumorigenesis: An Updated Version. *Genes Dev*.**2010**, *24*, 862–874.
- 22 Santucci, M.; Vignudelli, T.; Ferrari, S.; Mor, M.; Scalvini, L.; Bolognesi, M. L.; Uliassi, E.; Costi, M. P. The Hippo Pathway and YAP/TAZ–TEAD Protein–Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment: Miniperspective. *J. Med. Chem*. **2015**, *58*, 4857–4873.
- 23 Zhang, L.; Ren, F.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Wang, B.; Jiang, J. The TEAD/TEF Family of Transcription Factor Scalloped Mediates Hippo Signaling in Organ Size Control. *Dev. Cell*.**2008**, *14*, 377–387.



- 24 Guo, C.; Tommasi, S.; Liu, L.; Yee, J.-K.; Dammann, R.; Pfeifer, G. P. RASSF1A Is Part of a Complex Similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats Tumor-Suppressor Network. *Curr. Biol.***2007**, *17*, 700–705.
- 25 Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J. L.; Lian, I.; Wang, L. H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; Fu, X.-D.; Mills, G. B.; Guan, K.-L. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein Coupled Receptor Signaling. *Cell.* **2012**, *150*, 780–791.
- 26 Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y., & Sasaki, H. Redundant Roles of *Tead1* and *Tead2* in Notochord Development and the Regulation of Cell Proliferation and Survival. *Molecular and Cellular Biology.* **2008**, *28*, 3177–3189.
- 27 Sudol, M.; Bork, P.; Einbond, A.; Kastury, K.; Druck, T.; Negrini, M.; Huebner, K.; Lehman, D. Characterization of the Mammalian YAP (Yes-Associated Protein) Gene and Its Role in Defining a Novel Protein Module, the WW Domain. *J. Biol. Chem.***1995**, *270*, 14733–14741.
- 28 Sudol, M. YAP1 Oncogene and Its Eight Isoforms. *Oncogene.***2013**, *32*, 3922–3922.
- 29 Gaffney, C. J.; Oka, T.; Mazack, V.; Hilman, D.; Gat, U.; Muramatsu, T.; Inazawa, J.; Golden, A.; Carey, D. J.; Farooq, A.; Tromp, G.; Sudol, M. Identification, Basic Characterization and Evolutionary Analysis of Differentially Spliced mRNA Isoforms of Human YAP1 Gene. *Gene.* **2012**, *509*, 215–222.
- 30 Kanai, F.; Marignani, P. A.; Sarbassova, D.; Yagi, R.; Hall, R. A.; Donowitz, M.; Hisaminato, A.; Fujiwara, T.; Ito, Y.; Cantley, L. C.; Yaffe, M. B. TAZ: A Novel Transcriptional Co-Activator Regulated by Interactions with 14-3-3 and PDZ Domain Proteins. *EMBO J.* **2000**, *19*, 6778–6791.
- 31 Hilman, D.; Gat, U. The Evolutionary History of YAP and the Hippo/YAP Pathway. *Mol. Biol. Evol.***2011**, *28*, 2403–2417.
- 32 Zhao, B.; Li, L.; Guan, K.-L. Hippo Signaling at a Glance. *J. Cell Sci.***2010**, *123*, 4001–4006.
- 33 Wilkinson, D. S.; Jariwala, J. S.; Anderson, E.; Mitra, K.; Meisenhelder, J.; Chang, J. T.; Ideker, T.; Hunter, T.; Nizet, V.; Dillin, A.; Hansen, M. Phosphorylation of LC3 by the Hippo Kinases STK3/STK4 Is Essential for Autophagy. *Mol. Cell.***2015**, *57*, 55–68.
- 34 Kwon, Y.; Vinayagam, A.; Sun, X.; Dephoure, N.; Gygi, S. P.; Hong, P.; Perrimon, N. The Hippo Signaling Pathway Interactome. *Science.***2013**, *342*, 737–740.
- 35 Couzens, A. L.; Knight, J. D. R.; Kean, M. J.; Teo, G.; Weiss, A.; Dunham, W. H.; Lin, Z.-Y.; Bagshaw, R. D.; Sicheri, F.; Pawson, T.; Wrana, J. L.; Choi, H.; Gingras, A.-C. Protein Interaction Network of the Mammalian Hippo Pathway Reveals Mechanisms of Kinase-Phosphatase Interactions. *Sci. Signal.***2013**, *6*, rs15.
- 36 Wang, W.; Li, X.; Huang, J.; Feng, L.; Dolinta, K. G.; Chen, J. Defining the Protein–Protein Interaction Network of the Human Hippo Pathway. *Mol. Cell. Proteomics MCP.***2014**, *13*, 119–131.
- 37 Vassilev, A.; Kaneko, K. J.; Shu, H.; Zhao, Y.; DePamphilis, M. L. TEAD/TEF Transcription Factors Utilize the Activation Domain of YAP65, a Src/Yes-Associated Protein Localized in the Cytoplasm. *Genes Dev.***2001**, *15*, 1229–1241.
- 38 Zhou, Y.; Huang, T.; Cheng, A.; Yu, J.; Kang, W.; To, K. The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.***2016**, *17*, 138.
- 39 Xiao, J. H.; Davidson, I.; Matthes, H.; Garnier, J.-M.; Chambon, P. Cloning, Expression, and Transcriptional Properties of the Human Enhancer Factor TEF-1. *Cell.***1987**, *65*, 551–568.
- 40 Chen, Z.; Friedrich, G. A.; Soriano, P. Transcriptional Enhancer Factor 1 Disruption by a Retroviral Gene Trap Leads to Heart Defects and Embryonic Lethality in Mice. *Genes Dev.***1994**, *8*, 2293–2301.
- 41 Mar, J. H.; Ordahl, C. P. M-CAT Binding Factor, a Novel Trans-Acting Factor Governing Muscle-Specific Transcription. *Mol. Cell. Biol.***1990**, *10*, 4271–4283.
- 42 Yasunami, M.; Suzuki, K.; Ohkubo, H. A Novel Family of TEA Domain-Containing Transcription Factors with Distinct Spatiotemporal Expression Patterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***1996**, *228*, 365–370.

- 43 Jacquemin, P. ; Depetris, D.; Mattei, M.G. ; Martial, J.A.; Davidson, I. Localization of human transcription factor TEF-4 and TEF-5 (TEAD2, TEAD3) genes to chromosomes 19q13.3 and 6p21.2 using fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid analysis. *Genomics*. **1999**, 55,127-129.
- 44 Maeda, T.; Chapman, D. L.; Stewart, A. F. R. Mammalian Vestigial-like 2, a Cofactor of TEF-1 and MEF2 Transcription Factors That Promotes Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.***2002**, 277, 48889–48898.
- 45 Azakie, A.; Fineman, J. R.; He, Y. Myocardial Transcription Factors Are Modulated during Pathologic Cardiac Hypertrophy in Vivo. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.***1996**, 132, 1262–1271.
- 46 Jacquemin, P.; Hwang, J.-J.; Martial, J. A.; Dollé, P.; Davidson, I. A Novel Family of Developmentally Regulated Mammalian Transcription Factors Containing the TEA/ATTS DNA Binding Domain. *J. Biol. Chem.***1996**, 271, 21775–21785.
- 47 Pobbati, A.V.; Hong, W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biology and Therapy*.**2013**, 14, 390-398
- 48 Belandia, B.; Parker, M. G. Functional Interaction between the P160 Coactivator Proteins and the Transcriptional Enhancer Factor Family of Transcription Factors. *J. Biol. Chem.***2000**, 275, 30801–30805.
- 49 Butler, A. J.; Ordahl, C. P. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Binds with Transcription Enhancer Factor 1 to MCAT1 Elements To Regulate Muscle-Specific Transcription. *Mol. Cell. Biol.***1999**, 19, 296–306.
- 50 Potthoff, M. J.; Olson, E. N. MEF2: A Central Regulator of Diverse Developmental Programs. *Development*.**2007**, 134, 4131.
- 51 Gupta, M. P.; Amin, C. S.; Gupta, M.; Hay, N.; Zak, R. Transcription Enhancer Factor 1 Interacts with a Basic Helix-Loop-Helix Zipper Protein, Max, for Positive Regulation of Cardiac Alpha-Myosin Heavy-Chain Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 3924–3936.
- 52 Li, H.; Wang, Z.; Zhang, W.; Qian, K.; Liao, G.; Xu, W.; Zhang, S. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *Med Oncol.* **2015**, 32-83.
- 53 Hallor, K.H. *et al.* Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J. Pathol.***2009**, 217, 716-727.
- 54 Cody, N. A. L.; Ouellet, V.; Manderson, E. N.; Quinn, M. C. J.; Filali-Mouhim, A.; Tellis, P.; Zietarska, M.; Provencher, D. M.; Mes-Masson, A.-M.; Chevrette, M.; Tonin, P. N. Transfer of Chromosome 3 Fragments Suppresses Tumorigenicity of an Ovarian Cancer Cell Line Monoallelic for Chromosome 3p. *Oncogene*. **2006**, 26, 618–632.
- 55 Noland, C.L.; Gierke, S.; Schnier, P.D.; Murray, J.; Sandoval, W.N.; Sagolla, M.; Dey, A.; Hannoush, R.N.; Fairbrother, W.J.; Cunningham, C.N. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure*.**2016**, 24, 179-186.
- 56 Chan, P.; Han, X.; Zheng, B.; De Ran, M.; Yu, J.; Jarugumilli, G.K.; Deng, H.; Pan, D.; Luo, X.; Wu, X. Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 282-289.
- 57 Chamberlain, L. H.; Shipston, M. J. The Physiology of Protein S-Acylation. *Physiol. Rev.***2015**, 95, 341–376.
- 58 Hannoush, R. N.; Arenas-Ramirez, N. Imaging the Lipidome:  $\omega$ -Alkynyl Fatty Acids for Detection and Cellular Visualization of Lipid-Modified Proteins. *ACS Chem. Biol.***2009**, 4, 581–587.
- 59 Gao, X.; Arenas-Ramirez, N.; Scales, S. J.; Hannoush, R. N. Membrane Targeting of Palmitoylated Wnt and Hedgehog Revealed by Chemical Probes. *FEBS Lett.***2011**, 585, 2501–2506.
- 60 Buglino, J. A.; Resh, M. D. Palmitoylation of Hedgehog Proteins. *Vitam. Horm.***2012**, 88, 229–252.

- 61 Qi, Y.; Yu, J.; Han, W.; Fan, X.; Qian, H.; Wei, H.; Tsai, Y. S.; Zhao, J.; Zhang, W.; Liu, Q.; Meng, S.; Wang, Y.; Wang, Z. A Splicing Isoform of TEAD4 Attenuates the Hippo–YAP Signalling to Inhibit Tumour Proliferation. *Nat. Commun.***2016**, *7*, ncomms11840.
- 62 Imajo, M.; Miyatake, K.; Imura, A.; Miyamoto, A.; Nishida, E. A Molecular Mechanism That Links Hippo Signalling to the Inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling. *EMBO J.***2012**, *31*, 1109–1122.
- 63 Mao, B.; Hu, F.; Cheng, J.; Wang, P.; Xu, M.; Yuan, F.; Meng, S.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Bi, W. SIRT1 Regulates YAP2-Mediated Cell Proliferation and Chemoresistance in Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene***2014**, *33*, 1468-1473.
- 64 Rosenbluh, J.; Nijhawan, D.; Cox, A. G.; Li, X.; Neal, J. T.; Schafer, E. J.; Zack, T. I.; Wang, X.; Tsherniak, A.; Schinzel, A. C.; Shao, D. D.; Schumacher, S. E.; Weir, B. A.; Vazquez, F.; Cowley, G. S.; Root, D. E.; Mesirov, J. P.; Beroukhi, R.; Kuo, C. J.; Goessling, W.; Hahn, W. C.  $\beta$ -Catenin Driven Cancers Require a YAP1 Transcriptional Complex for Survival and Tumorigenesis. *Cell***2012**, *151*, 1457-1473.
- 65 Hata, S.; Hirayama, J.; Kajiho, H.; Nakagawa, K.; Hata, Y.; Katada, T.; Furutani-Seiki, M.; Nishina, H. A Novel Acetylation Cycle of Transcription Co-Activator Yes-Associated Protein That Is Downstream of Hippo Pathway Is Triggered in Response to S N 2 Alkylating Agents. *J. Biol. Chem.***2012**, *287*, 22089-22098.
- 66 Li, Z.; Zhao, B.; Wang, P.; Chen, F.; Dong, Z.; Yang, H.; Guan, K.-L.; Xu, Y. Structural Insights into the YAP and TEAD Complex. *Genes Dev.***2010**, *24*, 235-240.
- 67 Chen, L.; Chan, S. W.; Zhang, X.; Walsh, M.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. Structural Basis of YAP Recognition by TEAD4 in the Hippo Pathway. *Genes Dev.***2010**, *24*, 290–300.
- 68 Tian, W.; Yu, J.; Tomchick, D. R.; Pan, D.; Luo, X. Structural and Functional Analysis of the YAP-Binding Domain of Human TEAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2010**, *107*, 7293-7298.
- 69 Hau, J. C.; Erdmann, D.; Mesrouze, Y.; Furet, P.; Fontana, P.; Zimmermann, C.; Schmelzle, T.; Hofmann, F.; Chène, P. The TEAD4-YAP/TAZ Protein-Protein Interaction: Expected Similarities and Unexpected Differences. *ChemBioChem***2013**, *14*, 1218-1225.
- 70 Mesrouze, Y.; Bokhovchuk, F.; Meyerhofer, M.; Fontana, P.; Zimmermann, C.; Martin, T.; Delaunay, C.; Erdmann, D.; Schmelzle, T.; Chene, P. Dissection of the Interaction between the Intrinsically Disordered YAP Protein and the Transcription Factor TEAD. *eLife***2017**, *6*, e25068.
- 71 Zhang, Z.; Lin, Z.; Zhou, Z.; Shen, H. C.; Yan, S. F.; Mayweg, A. V.; Xu, Z.; Qin, N.; Wong, J. C.; Zhang, Z.; Rong, Y.; Fry, D. C.; Hu, T. Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP–TEAD Protein–Protein Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.***2014**, *5*, 993-998.
- 72 Kaan, H. Y. K.; Chan, S. W.; Tan, S. K. J.; Guo, F.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. Crystal Structure of TAZ-TEAD Complex Reveals a Distinct Interaction Mode from That of YAP-TEAD Complex. *Sci. Rep.***2017**, *7*, 453-468.
- 73 Pobbati, A. V.; Chan, S. W.; Lee, I.; Song, H.; Hong, W. Structural and Functional Similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD Complexes. *Structure***2012**, *20*, 1135-1140.
- 74 Jiao, S.; Wang, H.; Shi, Z.; Dong, A.; Zhang, W.; Song, X.; He, F.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wang, W.; Wang, X.; Guo, T.; Li, P.; Zhao, Y.; Ji, H.; Zhang, L.; Zhou, Z. A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell***2014**, *25*, 166-180.
- 75 Mesrouze, Y.; Hau, J. C.; Erdmann, D.; Zimmermann, C.; Fontana, P.; Schmelzle, T.; Chène, P. The Surprising Features of the TEAD4-Vgll1 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem***2014**, *15*, 537-542.
- 76 Harvey, K. F.; Zhang, X.; Thomas, D. M. The Hippo Pathway and Human Cancer. *Nat. Rev. Cancer***2013**, *13*, 246-257.
- 77 Fossdal, R. A Novel TEAD1 Mutation Is the Causative Allele in Sveinsson’s Chorioretinal Atrophy (Helicoid Peripapillary Chorioretinal Degeneration). *Hum. Mol. Genet.***2004**, *13*, 975-981.
- 78 Moroishi, T.; Hansen, C. G.; Guan, K.-L. The Emerging Roles of YAP and TAZ in Cancer. *Nat. Rev. Cancer***2015**, *15*, 73-79.

- 79 Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Dev. Cell.***2010**, *19*, 491-505.
- 80 Zhang, K.; Qi, H.-X.; Hu, Z.-M.; Chang, Y.-N.; Shi, Z.-M.; Han, X.-H.; Han, Y.-W.; Zhang, R.-X.; Zhang, Z.; Chen, T.; Hong, W. YAP and TAZ Take Center Stage in Cancer. *Biochemistry (Mosc.)***2015**, *54*, 6555-6566.
- 81 Lamar, J. M.; Stern, P.; Liu, H.; Schindler, J. W.; Jiang, Z.-G.; Hynes, R. O. The Hippo Pathway Target, YAP, Promotes Metastasis through Its TEAD-Interaction Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2012**, *109*, E2441-E2450.
- 82 Overholtzer, M.; Zhang, J.; Smolen, G. A.; Muir, B.; Li, W.; Sgroi, D. C.; Deng, C.-X.; Brugge, J. S.; Haber, D. A. Transforming Properties of YAP, a Candidate Oncogene on the Chromosome 11q22 Amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2006**, *103*, 12405-12410.
- 83 Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A. R.; Poletti, A.; Daidone, M. G.; Dupont, S.; Basso, G.; Bicciato, S.; Piccolo, S. The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell.***2011**, *147*, 759-772.
- 84 Zhang, X.; George, J.; Deb, S.; Degoutin, J. L.; Takano, E. A.; Fox, S. B.; Bowtell, D. D. L.; Harvey, K. F. The Hippo Pathway Transcriptional Co-Activator, YAP, Is an Ovarian Cancer Oncogene. *Oncogene***2011**, *30*, 2810-2819.
- 85 Muramatsu, T.; Imoto, I.; Matsui, T.; Kozaki, K.; Haruki, S.; Sudol, M.; Shimada, Y.; Tsuda, H.; Kawano, T.; Inazawa, J. YAP Is a Candidate Oncogene for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Carcinogenesis***2011**, *32*, 389-398.
- 86 Camargo, F. D.; Gokhale, S.; Johnnidis, J. B.; Fu, D.; Bell, G. W.; Jaenisch, R.; Brummelkamp, T. R. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Curr. Biol.***2007**, *17*, 2054-2060.
- 87 Avruch, J.; Zhou, D.; Bardeesy, N. YAP Oncogene Overexpression Supercharges Colon Cancer Proliferation. *Cell Cycle***2012**, *11*, 1090-1096.
- 88 Lei, Q.-Y.; Zhang, H.; Zhao, B.; Zha, Z.-Y.; Bai, F.; Pei, X.-H.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Guan, K.-L. TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Mol. Cell. Biol.***2008**, *28*, 2426-2436.
- 89 Hélias-Rodzewicz, Z.; Pérot, G.; Chibon, F.; Ferreira, C.; Lagarde, P.; Terrier, P.; Coindre, J.M.; Aurias, A. YAP1 and VGLL3, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. **2010**, *49*, 1161-1171.
- 90 Hallor, K.H.; Sciot, R.; Staaf, J.; Heidenblad, M.; Rydholm, A.; Bauer, H.C.; Aström, K.; Domanski, H.A.; Meis, J.M.; Kindblom, L.G.; Panagopoulos, I.; Mandahl, N.; Mertens, F. Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J. Pathol.***2009**, *217*, 716-727.
- 91 Jiao, S.; Li, C.; Hao, Q.; Miao, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zhou, Z. VGLL4 targets a TCF4-TEAD4 complex to coregulate Wnt and Hippo signaling in colorectal cancer. *Nat. Commun.***2017**, *8*, 14058.
- 92 Hucl, T.; Brody, J. R.; Gallmeier, E.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Farrance, I. K.; Kern, S. E. High Cancer-Specific Expression of Mesothelin (MSLN) Is Attributable to an Upstream Enhancer Containing a Transcription Enhancer Factor-dependent MCAT Motif. *Cancer Res.***2007**, *67*, 9055-9065.
- 93 Knight, J. F.; Shepherd, C. J.; Rizzo, S.; Brewer, D.; Jhavar, S.; Dodson, A. R.; Cooper, C. S.; Eeles, R.; Falconer, A.; Kovacs, G.; Garrett, M. D.; Norman, A. R.; Shipley, J.; Hudson, D. L. TEAD1 and C-Cbl Are Novel Prostate Basal Cell Markers That Correlate with Poor Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Br. J. Cancer.***2008**, *99*, 1849-1858.
- 94 Sebio, A.; Lenz, H.-J. Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***2015**, *21*, 5002-5007.
- 95 Liu-Chittenden, Y.; Huang, B.; Shim, J. S.; Chen, Q.; Lee, S.-J.; Anders, R. A.; Liu, J. O.; Pan, D. Genetic and Pharmacological Disruption of the TEAD-YAP Complex Suppresses the Oncogenic

Activity of YAP. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1300-1305.

- 96 Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B. Verteporfin Inhibits YAP Function through Up-Regulating 14-3-3 $\sigma$  Sequestering YAP in the Cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 27-30.
- 97 Basu, D.; Lettan, R.; Damodaran, K.; Strellec, S.; Reyes-Mugica, M.; Rebbaa, A. Identification, Mechanism of Action, and Antitumor Activity of a Small Molecule Inhibitor of Hippo, TGF- $\beta$ , and Wnt Signaling Pathways. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 1457-1467.
- 98 Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J. L.; Lian, I.; Wang, L. H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; Fu, X.-D.; Mills, G. B.; Guan, K.-L. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein Coupled Receptor Signaling. *Cell* **2012**, *150*, 780-791.
- 99 Yu, F.-X.; Zhang, Y.; Park, H. W.; Jewell, J. L.; Chen, Q.; Deng, Y.; Pan, D.; Taylor, S. S.; Lai, Z.-C.; Guan, K.-L. Protein Kinase A Activates the Hippo Pathway to Modulate Cell Proliferation and Differentiation. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 1223-1232.
- 100 Oku, Y.; Nishiya, N.; Shito, T.; Yamamoto, R.; Yamamoto, Y.; Oyama, C.; Uehara, Y. Small Molecules Inhibiting the Nuclear Localization of YAP/TAZ for Chemotherapeutics and Chemosensitizers against Breast Cancers. *FEBS Open Bio.* **2015**, *5*, 542-549.
- 101 Taccioli, C.; Sorrentino, G.; Zannini, A.; Caroli, J.; Beneventano, D.; Anderlucci, L.; Lolli, M.; Bicciato, S.; Del Sal, G. MDP, a Database Linking Drug Response Data to Genomic Information, Identifies Dasatinib and Statins as a Combinatorial Strategy to Inhibit YAP/TAZ in Cancer Cells. *Oncotarget.* **2015**, *6*, 38854.
- 102 Sorrentino, G.; Ruggeri, N.; Specchia, V.; Cordenonsi, M.; Mano, M.; Dupont, S.; Manfrin, A.; Ingallina, E.; Sommaggio, R.; Piazza, S.; Rosato, A.; Piccolo, S.; Del Sal, G. Metabolic Control of YAP and TAZ by the Mevalonate Pathway. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 357-366.
- 103 Wang, W.; Li, X.; Huang, J.; Feng, L.; Dolinta, K. G.; Chen, J. Defining the Protein-Protein Interaction Network of the Human Hippo Pathway. *Mol. Cell. Proteomics MCP.* **2014**, *13*, 119-131.
- 104 Zhou, Z.; Hu, T.; Xu, Z.; Lin, Z.; Zhang, Z.; Feng, T.; Zhu, L.; Rong, Y.; Shen, H.; Luk, J. M.; Zhang, X.; Qin, N. Targeting Hippo Pathway by Specific Interruption of YAP-TEAD Interaction Using Cyclic YAP-like Peptides. *FASEB J.* **2015**, *29*, 724-732.
- 105 Barth, M.; Contal, S.; Montalbetti, C.; Spitzer, L. Preparation of new 4-(1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-yl)hydrazono]methyl]-2-methoxyphenols as inhibitors of the YAP/TAZ-TEAD interaction and their use in the treatment of malignant mesothelioma, PCT Int. Appl., WO 2017064277 A1 20170420, **2017**.
- 106 Pobbati, A. V.; Han, X.; Hung, A. W.; Weiguang, S.; Huda, N.; Chen, G.-Y.; Kang, C.; Chia, C. S. B.; Luo, X.; Hong, W.; Poulsen, A. Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure.* **2015**, *23*, 2076-2086
- 107 Xu, W. TEAD transcription factor autopalmitylation inhibitors, PCT Int. Appl. WO 2017053706 A1 20170330, **2017**.
- 108 Kaan, H.Y.K.; Sim, A.Y.L.; Tan, S.K.J.; Verma, C.; Song, H. Targeting YAP/TAZ-TEAD protein-protein interactions using fragment-based and computational modeling approaches. *PLoS One.* **2017**, *12*, e0178381.
- 109 Cimperman, P.; Baranauskienė, L.; Jachimovičiūtė, S.; Jachno, J.; Torresan, J.; Michailovienė, V.; Matulienė, J.; Sereikaitė, J.; Bumelis, V.; Matulis, D. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3222-3231.
- 110 Trugnan, G.; Fontanges, P.; Delautier, D.; Ait-Slimane, T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De Nouvelles Techniques Pour Voir La Vie En Couleur ! *médecine/sciences.* **2004**, *20*, 1027-1034.
- 111 Fielding, L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 39-53.
- 112 Ciulli, A. Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **2013**, *1008*, 357-388.

- 113 Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov.***2002**, *1*, 515-528.
- 114 Kodoyianni, V. Label-Free Analysis of Biomolecular Interactions Using SPR Imaging. *BioTechniques.***2011**, *50*, 32-40.
- 115 Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *ASSAY Drug Dev. Technol.***2011**, *9*, 342-353.
- 116 Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond. *J. Mol. Struct.***2014**, *1077*, 101–113.
- 117 Khavrutskii, L.; Yeh, J.; Timofeeva, O.; Tarasov, S. G.; Pritt, S.; Stefanisko, K.; Tarasova, N. Protein Purification-Free Method of Binding Affinity Determination by Microscale Thermophoresis. *J. Vis. Exp.***2013**, No. 78.
- 118 Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Biophys. Tools Biol. Vol. One Vitro Tech.***2008**, *84*, 79-113.
- 119 Velazquez-Campoy, A.; Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry to Determine Association Constants for High-Affinity Ligands. *Nat. Protoc.***2006**, *1*, 186-191.
- 120 Cho, H.; Kozasa, T.; Bondjers, C.; Betsholtz, C.; Kehrl, J. H. Pericyte-Specific Expression of Rgs5: Implications for PDGF and EDG Receptor Signaling during Vascular Maturation. *FASEB J.***2003**.
- 121 Stanger, B. Z., Quit your YAPing: a new target for cancer therapy. *Genes Dev.***2012**, *26*, 1263-1267.
- 122 Huang, H.; Song, W.; Rieffel, J.; Lovell, J. F. Emerging applications of porphyrines in photomedicine. *Front. Phys.***2015**, *3*, 3-23.
- 123 Richter, A.M.; Waterfield, E.; Jain, A.K.; Allison, B.; Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Levy, J.G., Photosensitising potency of structural analogues of benzoporphyrin derivative (BPD) in a mouse tumour model. *Br. J. Cancer.* **1991**, *63*, 87-93.
- 124 Mellish, K. J. and Borwn, S. B., Verteporfin : a milestone in ophthalmology and photodynamic therapy. *Exp. Opin. Pharmacother.***2001**, *2*, 351-361.
- 125 Fernandez, J. M.; Bilgin, M. D.; Grossweiner, L. I., Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J. Photochem. Photobiol. B.***1997**, *37*, 131-140.
- 126 Keene, J. P.; Kessel, D.; Land, E. J.; Redmond, R. W. *et al.*, Direct detection of singlet oxygen sensitized by hematoporphyrin and related compounds. *Photochem. Photobiol.***1986**, *43*, 117-120.
- 127 Gibault, F.; Corvaisier, M.; Bailly, F.; Huet, G.; Melnyk, P.; Cotellet, P. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 1171-1184.
- 128 Richter, A. M.; Yip, S.; Meadows, H.; Jain, A. K. *et al.*, Photosensitizing potencies of the structural analogues of benzoporphyrin derivative in different biological test systems. *J. Clin. Laser Med. Surg.***1996**, *14*, 335-341.
- 129 Martin, P.; Mueller, M.; Flubacher, D.; Boudier, A.; Blaser, H. U.; Spielvogel, D., *Organic Process Research & Development.* **2010**, *14*, 799-804.
- 130 Kong, D.; Zhao, Y.; Men, T. and Teng, C. B., Hippo signaling pathway in liver and pancreas: the potential drug target for tumor therapy. *J. Drug Target.***2015**, *23*, 125-133.
- 131 Ma, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Wei, Q. *et al.*, Hippo-YAP signaling pathway: a new paradigm for cancer therapy. *Int. J. Cancer.* **2015**, *137*, 2275-2286.
- 132 Chiou, J. F.; Wang, Y. H.; Jou, M. J.; Liu, T. Z. *et al.*, Verteporfin-photoinduced apoptosis in HepG2 cells mediated by reactive oxygen and nitrogen species intermediates. *Free Radic. Res.***2010**, *44*, 155-170.
- 133 Peng, T. I.; Chang, C. J.; Guo, M. J.; Wang, Y. H. *et al.*, Mitochondrion-targeted photosensitizer enhances the photodynamic effect-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1042*, 419-428.

- 134 Belzacq, A. S.; Jacotot, E.; Vieira, H. L. A.; Mistro, D. *et al.*, Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin. Identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Res.***2001**, *61*, 1260-1264.
- 135 Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B., *Amer. J. Cancer Res.***2016**, *6*, 27-37.
- 136 Donohue, E.; Balgi, A. D.; Komatsu, M.; Roberge, M., *PLoS One.* **2014**, *9*, e114964.
- 137 Zhang, H.; Ramakrishnan, S. K.; Triner, D.; Centofanti, B.; Maitra, D.; Gyorffy, B.; Sebolt-Leopold, J. S.; Dame, M. K.; Varani, J.; Brenner, D. E.; Fearon, E. R.; Omary, M. B.; Shah, Y. M., *Science Signaling*, **2015**, *8*, RA98.
- 138 Shiner, C. M. and Lash, T. D., Porphyrins with exocyclic rings. Part 21: Influence of pyrrolic and carbocyclic ring alkyl substituents on the synthesis of porphyrins bearing six-membered exocyclic rings. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 11628-11640.
- 139 Sanz-Cervera, J. F.; Blasco, R.; Piera, J.; Cynamon, M. *et al.*, Solution versus fluorous versus solid-phase synthesis of 2,5-disubstituted 1,3-azoles. Preliminary antibacterial activity studies. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 8988-8996.
- 140 Paine, J. B. and Dolphin, D., Pyrrole chemistry. An improved synthesis of ethyl pyrrole-2-carboxylate esters from diethyl aminomalonate. *J. Org. Chem.***1985**, *50*, 5598-5604.
- 141 Johnson, A. W.; Markham, E.; Price, R. and Shaw, K. B., The synthesis of tri- and tetra-alkylpyrroles. *J. Chem. Soc.***1958**, 4254-4257.
- 142 Schmuck, C.; Rupprecht, D.; Urban, C. and Walden, N., Synthesis of orthogonally protected pyrrole tricarboxylic acid derivatives: versatile building blocks for pyrrole-containing compounds. *Synthesis*, **2006**, 89-96.
- 143 Martin, P.; Mueller, M.; Flubacher, D.; Boudier, A. *et al.*, Total synthesis of hematoporphyrin and protoporphyrin: a conceptually new approach. *Organic Process Research & Development*. **2010**, *14*, 799-804.
- 144 Schlabach, M.; Limbach, H. H.; Bunnenberg, E.; Shu, A. Y. L. *et al.*, NMR study of kinetic HH/HD/DH/DD isotope effects on the tautomerism of acetylporphyrin: evidence for a stepwise double proton transfer. *J. Am. Chem. Soc.***1993**, *115*, 4554-4565.
- 145 Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H. *et al.*, Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore. Rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.***2004**, *126*, 3357-3367.
- 146 May, D. A. and Lash, T. D., Porphyrins with exocyclic rings. 2. Synthesis of geochemically significant tetrahydrobenzoporphyrins from 4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindoles. *J. Org. Chem.***1992**, *57*, 4820-4828.
- 147 Paine, J. B. and Dolphin, D., 5-Unsubstituted 2-pyrrolecarboxaldehydes for porphyrin synthesis and the cyanovinyl protecting group. *J. Org. Chem.***1988**, *53*, 2787-2795.
- 148 Jacquet, O.; Bergholz, T.; Magnier-Bouvier, C.; Mellah, M. *et al.*, Palladium-catalyzed and samarium-promoted coupling of stereochemically-biased allylic acetates with carbonyl compounds. *Tetrahedron***2010**, *66*, 222-226.
- 149 Settambolo, R.; Lazzaroni, R.; Messeri, T.; Mazzetti, M. *et al.*, Synthesis of 3-vinylpyrrole. *J. Org. Chem.***1993**, *58*, 7899-7902.
- 150 Mula, S.; Ray, A. K.; Banerjee, M.; Chaudhuri, T. *et al.*, Design and development of a new pyrromethene dye with improved photostability and lasing Efficiency: theoretical rationalization of photophysical and photochemical properties. *J. Org. Chem.***2008**, *73*, 2146-2154.
- 151 Rokach, J.; Hamel, P.; Kakushima, M. and Smith, G. M., A simple and efficient route to  $\beta$ -substituted pyrroles. *Tetrahedron Lett.***1981**, *22*, 4901-4904.
- 152 Noland, W. E. and Lanzatella, N. P., Access to indoles via Diels-Alder reactions of 3-vinylpyrroles. *J. Heterocycl. Chem.***2009**, *46*, 1285-1295.

- 153 Yasuhara, A. and Sakamoto, T., Deprotection of N-sulfonyl nitrogen-heteroaromatics with tetrabutylammonium fluoride. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 595-596.
- 154 Kusunoki, M.; Nakagawa, S.; Seo, K.; Hamana, T. *et al.*, A side reaction in solid phase synthesis. Insertion of glycine residues into peptide chains via  $N^{\text{im}} \rightarrow N^{\alpha}$  transfer. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 381-386.
- 155 Van der Eijk, J. M.; Nolte, R. J. M. and Zwikker, J. W., A simple and mild method for the removal of the Nlm-tosyl protecting group. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 547-548.
- 156 Willumstad, T. P.; Haze, O.; Mak, X. Y.; Lam, T. Y. *et al.*, Batch and flow photochemical benzannulations based on the reaction of ynamides and diazo ketones. Application to the synthesis of polycyclic aromatic and heteroaromatic compounds. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11450-11469.
- 157 Yang, R. and Qiu, F. G., General entry to aspidosperma alkaloids: enantioselective total synthesis of (-)-aspidophytine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6015-6018.
- 158 Grehn, L. and Ragnarsson, U., Novel efficient total synthesis of antiviral antibiotic distamycin A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3492-3497.
- 159 Brinkman, H. R.; Landi, J. J.; Paterson, J. B. and Stone, P. J., The Use of p-toluenesulfonic acid for removal of the N-t-butoxy-carbonyl protecting group in solid phase peptide synthesis. *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 459-465.
- 160 Sundberg, R. J.; Amat, M. and Fernando, A. M., Analogs of the iboga alkaloids. Synthesis and reactions of (+-)-15-oxo-20-deethylcoronaridine derivatives. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3151-3159.
- 161 Houghten, R. A.; Beckman, A. and Ostresh, J. M., Use of 10% sulfuric acid/dioxane for removal of Na-tertiary-butyloxycarbonyl group during solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1986**, *27*, 653-658.
- 162 Hosmane, R. S.; Hiremath, S. P. and Schneller, S. W., Synthesis of indoles and carbazoles: Diels-Alder reactions of nitrovinyl-pyrroles and -benzindoles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1973**, 2450-2453.
- 163 Jones, R. A.; Marriott, M. T. P.; Rosenthal, W. P. and Sepulveda Arques, J., Pyrrole studies. 22. [4.p. + 2.p.] Cycloaddition reactions with vinylpyrroles. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4515-4519.
- 164 Okabe, T.; Kuzuhara, D.; Suzuki, M.; Aratani, N. *et al.*, Synthesis and electrochemical properties of porphycene-diketopyrrolopyrrole conjugates. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3508-3511.
- 165 Malapel-Andrieu, B. and Mérour, J.-Y., Synthesis and reactivity of substituted 3-(((Trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)-1H-indole-2-carboxylate in palladium-catalyzed reactions. *Tetrahedron.* **1998**, *54*, 11079-11094.
- 166 Wang, J. and Scott, A. I., An efficient synthesis of 3-vinylpyrroles by Stille coupling reaction of 3-iodopyrroles with vinyltributyltin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7043-7046.
- 167 Boiadjiev, S. E. and Lightner, D. A., Atropisomerism in monopyrroles. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2002**, *13*, 1721-1732.
- 168 Poriel, C.; Lachia, M.; Wilson, C.; Davies, J. R. *et al.*, Oxidative rearrangement of indoles: a new approach to the EFHG-tetracyclic core of diazepam. *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 2978-2987.
- 169 Boiadjiev, S. E. and Lightner, D. A., Novel benzoic acid congeners of bilirubin. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7591-7604.
- 170 Masakazu Tanaka, M.; Takahashi, M.; Sakamoto, E.; Imai, M.; Matsui, A.; Fujio, M.; Funakoshi, K.; Sakai, K. and Suemune, H. Enantio- and diastereoselective construction of 4,9-dimethylspiro[4.4]nonane-2,7-dione using Rh-catalyzed asymmetric cyclization. *Tetrahedron.* **2001**, *57*, 1197-1204.
- 171 Wang, J-Q; Kathy D. Miller, K.D.; Sledge, G.W. and Zheng, Q.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4380-4384.
- 172 Smith, S. M. and Takacs, J. M., Amide-directed catalytic asymmetric hydroboration of trisubstituted alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1740-1741.



- 173 Lash, T. D.; Mani, U. N.; Keck, A.-S. I. M. and Jones, M. A., Normal and abnormal heme biosynthesis. 6. Synthesis and metabolism of a series of monovinylporphyrinogens related to harderoporphyrinogen. Further insights into the oxidative decarboxylation of porphyrinogen substrates by coproporphyrinogen oxidase. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3183-3192.
- 174 Barco, A.; Baricordi, N.; Benetti, S.; De Risi, C. *et al.*, A new enantiodivergent synthesis of the Geissman–Waiss lactone. *Tetrahedron*. **2007**, *63*, 4278-4283.
- 175 Li, G.; Graham, A.; Chen, Y.; Dobhal, M. P. *et al.*, Synthesis, comparative photosensitizing efficacy, human serum albumin (site II) binding ability, and intracellular localization characteristics of novel benzobacteriochlorins derived from vic-dihydroxybacteriochlorins. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5349-5359.
- 176 Loudet, A. and Burgess, K., BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.
- 177 Donohue, E.; Tovey, A.; Vogl, A.W.; Arns, S.; Sternberg, E.; Young, R.N.; Roberge, M. Inhibition of autophagosome formation by the benzoporphyrin derivative verteporfin. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7290-7300.
- 178 Peng, T.I.; Chang, C.J.; Guo, M.J.; Wang, Y.H.; Yu, J.S.; Wu, H.Y.; Jou, M.J. Mitochondrion-targeted photosensitizer enhances the photodynamic effect-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2005**, *1042*, 419-428.
- 179 Belzacq, A.S.; Jacotot, E.; Vieira, H.L.A.; Mistro, D.; Granville, D.J.; Xie, Z.; Reed, J.C.; Kroemer, G.; Brenner, C. Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin: identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1260–1264.
- 180 Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 $\sigma$  sequestering YAP in the cytoplasm. Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *6*, 27-37.
- 181 Labbé, C. M.; Laconde, G.; Kuenemann, M. A.; Villoutreix, B. O.; Sperandio, O. IPPI-DB: A Manually Curated and Interactive Database of Small Non-Peptide Inhibitors of Protein–protein Interactions. *Drug Discov. Today*. **2013**, *18*, 958-968.
- 182 Zhang, J.; Shreeve, J. M., 3,3'-Dinitroamino-4,4'-azoxyfurazan and its derivatives: an assembly of diverse N-O building blocks for high-performance energetic materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4437-4445.
- 183 Ren, H.-P.; Liu, Z.-W.; Lu, J.; Liu, Z.-T., The [Bmim]4W10O23 catalyzed oxidation of 3,4-diaminofurazan to 3,4-dinitrofurazan in hydrogen peroxide. *J. Indus. & Engin. Chem. Res.* **2011**, *50*, 6615-6619.
- 184 Batog, L. V.; Rozhkov, V. Y.; Struchkovan M. L., Azido-1,2,5-oxadiazoles in reaction with 1,3-dicarbonyl compounds. *Mendeleev Commun.* **2002**, *12*, 159-161.
- 185 Olesen, P. H.; Sorensen, A. R.; Urso, B.; Kurtzhals, P.; Bowler, A. N.; Ehrbar, U.; Hansen, B. F., Synthesis and in vitro characterization of 1-(4-aminofurazan-3-yl)-5-dialkylaminomethyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid derivatives. A new class of selective GSK-3 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3333-3341.
- 186 Lampe, J. W. *et al.*, Cytoskeletal active Rho kinase inhibitor compounds, composition and use. WO 2008/077057, **2008**, 89-90.
- 187 Karimi Zarchi, M. A.; Nabaee, R.; Barani, S. Diazotization-Azidation of Amines in Water by Using Crosslinked Poly(4-Vinylpyridine)-Supported Azide Ion. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *123*, 788-795.
- 188 McCall, J.; Kelly Robert, C.; Romero Donna, L., Heterocyclic compounds for the inhibition of pask. WO2014/66795. **2014**.
- 189 Merck Serono Quattropani, A. C., C.; Seville, E.; Schwarz, M.; Marin, D., Triazole oxadiazoles derivatives. WO2009/080663 A1. **2009**.
- 190 Abdel-Aziz, H. A.; Elsaman, T.; Al-Dhfyhan, A.; Attia, M. I.; Al-Rashood, K. A.; Al-Obaid, A.-R. M. Synthesis and Anticancer Potential of Certain Novel 2-Oxo-N'-(2-Oxoindolin-3-Ylidene)-2H-Chromene-3-Carbohydrazides. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 358-363.

- 191 He, J.-B.; Feng, L.-L.; Li, J.; Tao, R.-J.; Ren, Y.-L.; Wan, J.; He, H.-W. Design, Synthesis and Molecular Modeling of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Pyruvate Dehydrogenase Complex E1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (1), 89–94.
- 192 Yan, Y.; Liu, Z.; Zhang, J.; Xu, R.; Hu, X.; Liu, G. A Reverse Method for Diversity Introduction of Benzimidazole to Synthesize H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP Enzyme Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (14), 4189-4192.
- 193 Adibi, H.; Khodaei, M. M.; Pakravan, P.; Abiri, R. Synthesis, Characterization, and in Vitro Antimicrobial Evaluation of Hydrazone and Bishydrazone Derivatives of Isatin. *Pharm. Chem. J.* **2010**, *44*, 219-227.
- 194 Nicolle, S. M.; Moody, C. J. Potassium N-Iodo p-Toluenesulfonamide (TsNIK, Iodamine-T): A New Reagent for the Oxidation of Hydrazones to Diazo Compounds. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2014**, *20*, 4420-4425.
- 195 Lynch, S. M. Preparation of substituted triazole and imidazole compounds as LMP7 inhibitors. WO 2014086663 A1. **2014**.
- 196 Yang, P.; Xu, H.; Zhou, J. S. Nickel-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Olefins for the Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12210-12213.
- 197 Buckle, D. R.; Rockel, C. J. M., Studies on *v*-triazoles. Part 4. The 4-methoxybenzyl group, a versatile *N*-protecting group for the synthesis of *N*-unsubstituted *v*-triazoles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* **1982**, 627-630.
- 198 Buckman, B. O.; Nicholas, J. B.; Emayan, K.; Seiwert, S. D., Lysophosphatidic acid receptor antagonists. US 2014/0200215 A1, **2014**. p246.
- 199 Wade Downey, C.; Ingersoll, J. A.; Glist, H. M.; Dombrowski, C. M.; Barnett, A. T. One-Pot Silyl Ketene Acetal-Formation Mukaiyama-Mannich Additions to Imines Mediated by Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate: One-Pot Mukaiyama-Mannich Addition Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7287-7291.
- 200 Patil, C. J.; Patil, M. C.; Patil, M. C. Studies on Synthesis of Aromatic Schiff Bases: Part-II. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Ketimines from Benzophenone with Substituted-Anilines. *JCBPS.* **2016**, *6*, 241-247.
- 201 Sengmany, S. and Le Gall, E. An Expedient Three-Component Approach to the Synthesis of  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amines under Barbier-like Conditions. *Synlett.* **2008**, *7*, 1031-1035.