N°d'ordre NNT : 2017LYSE1233

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 205 EDISS :
Ecole Interdisciplinaire Science et Santé

Spécialité de doctorat :

Discipline : **Chimie Thérapeutique et Médicinale**

Soutenue publiquement le 17/11/2017 par :

FAOUZI Abdelfattah

Synthèses et évaluations biologiques d'analogues de la combrétastatine A-4 et d'inhibiteurs de kinases DYRK

Devant le jury composé de :

Professeure BRIANÇON Stéphanie – Université Claude Bernard Lyon 1

Professeur HAMZE Abdallah – Université Paris Sud - Rapporteur

Professeure POPOWYCZ Florence – Université Claude Bernard Lyon 1 - Rapportrice

Professeur ANIZON Fabrice – Université Clermond Auvergne - Rapporteur

Professeur LOMBERGET Thierry – Université Claude Bernard Lyon 1 – Directeur de thèse

Professeur LE BORGNE – Université Claude Bernard Lyon 1 – Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Une des problématiques les plus ardue que j'ai eu à résoudre lors de ces trois années de thèse ne concerne rien d'autre que cette partie : RE-MER-CIE-MENTS !
J'écris actuellement ces lignes en étant plongé sous ma couette quelque part à des milliers de km de ma belle ville de Lyon, seul dans un appartement à Montréal, mes écouteurs vissés à mes oreilles, écoutant du Kendrick Lamar, et en me demandant tout simplement comment je pourrais remercier la totalité des personnes que j'ai rencontrées, appréciées, et avec lesquelles j'ai partagé des moments inoubliables et d'autres plus difficiles…

Je débute par mes encadrants : les Pr Lomberget Thierry et Pr Le Borgne Marc, respectivement directeur et co-directeur de thèse.

A toi Thierry, que j'ai eu comme enseignant, encadrant lors de mes stages de Master puis enfin en tant que directeur de thèse, j'adresse mes remerciements. J'ai également été honoré de te voir revêtir au cours de ma thèse le titre de Professeur. Une fois de plus, mes félicitations les plus sincères.

Marc, que dire de plus si ce n'est un gigantesque : « Merci ». Je pense sincèrement que tu es, de par ton implication, ton travail, ton efficacité ainsi que par ta bonne humeur en toute circonstance, un modèle dont nous devrions tous nous inspirer et dont je tenterais de m'approcher au cours des prochaines années. Je n'ai pas de superlatifs pour décrire tout le bien que je pense de toi, et sache que je ne te souhaite que le meilleur pour la suite mais que te connaissant, tu feras probablement de l'équipe B2MC un pôle d'excellence et une valeur sûre !
Si j'avais un seul et unique conseil : ne change rien et reste tel quel !

Ma FROOOIDE épopée canadienne n'aurait jamais été la même sans toi, Gaëlle.
Ta gentillesse, ton aide, tes remarques toujours avisées, ta vision de la recherche, ta logique… Je pourrais encore continuer pendant plusieurs minutes mais cela ne contribuerait qu'à renforcer un point : l'impact que tu as eu sur ma thèse et moi-même est à la hauteur de la reconnaissance que j'ai pour toi. Enorme.
Si je ne devais remercier qu'une seule personne pour mon côté « biologiste », ce serait toi, tout naturellement.
Lorsque tu liras ce manuscrit, sache que j'espère vraiment tous vous revoir un de ces jours, toi, ainsi que les autres protagonistes du laboratoire « LNP ».

« Les autres protagonistes » justement…

Florian, Ina, Soudeh, Cloé et les autres : vous représentez l'image même d'une équipe soudée (sans jeu de mot je t'assure Mme. Tehrani !), joyeuse et la façon que vous avez de vous entraider, vous soutenir mutuellement, m'auront du premier jusqu'au dernier jour, impressionné. Merci chaudement à tous de m'avoir si bien intégré, soutenu, encouragé et aussi parfois « titillé ». Je ne pensais pas un jour rencontrer un groupe de personne dont je ne pourrais penser que du bien mais visiblement, vous êtes l'exception.
Même si cela m'embête de l'admettre, Ina avait raison au bout du compte : vous allez, très clairement, me manquer.

A ma mère, mon père, mes frères et ma sœur, ma famille : je vous aime de tout mon cœur.
Si la thèse m'a fait grandir en tant qu'élève (que je suis et serais vraisemblablement toute ma vie), elle m'a aussi appris qu'avoir une famille dont le soutien est infaillible, dont les encouragements et l'amour sont illimités, est la chose la plus importante.
Rien ne m'a jamais fait autant avancer et si, aujourd'hui je peux écrire ces quelques mots, c'est principalement grâce à vous tous. Toutes les lettres du monde ne sauraient décrire mes sentiments, c'est pourquoi je ne m'étendrais pas d'avantage sur ce que je ressens pour vous.

A mes ami(e)s les médecins, pharmaciens, dentistes, et les autres aux métiers farfelus (Julien le joueur de Poker !) : merci à tous !

A mes élèves de PACES, 2ème, 3ème et 4ème année de Pharmacie : on dit souvent qu'on apprend autant de nos élèves qu'ils n'apprennent de nous ; je ne peux que confirmer cela. Avoir pu vous apporter mon aide et mes conseils représente pour moi une immense fierté, et j'espère tous vous voir couronnée de succès dans un futur proche, vraiment.

A mes collègues du laboratoire B2MC :
Benoit, Ludovic, Caroline : mes acolytes avec lesquels j'ai passé de si bons moments que ce soit au laboratoire ou en dehors, avec lesquels j'ai ri, plaisanté et qui ont contribué à rendre le travail de ces dernières années tellement plus agréable
Dalila, merci pour ton enthousiasme et ton aide tout au long de ma thèse ; j'aurais du mal dans le futur à retrouver une secrétaire avec laquelle je pourrais autant rire !
Merci à toi Laurent qui de par ton expertise variée et dans différents domaines (notamment en informatique et analytique !!!) a su me fournir de précieux conseils lors de ces 3 dernières années.
Une forte pensée également pour mes différents stagiaires sans qui mes travaux et mes recherches n'auraient été les mêmes : je vous suis, extrêmement

reconnaissant. En particulier à toi Alexandre, chargé de reprendre le flambeau de doctorant et à qui je souhaite, la plus grande réussite possible !

Aussi, un grand merci à toute l'équipe de chimie organique pour leur gentillesse et plus particulièrement à toi Zouhair, pour ta bienveillance et ton aide durant cette thèse.

Une pensée affectueuse pour le Pr Roland Barret, retraité aujourd'hui, qui a été le premier à qui j'ai fait part de mon envie de faire de la recherche… Merci de m'avoir encouragé dans cette voie.

Bien évidemment, je tiens à remercier les membres du jury et notamment les rapporteurs qui m'ont fait l'honneur de lire, critiquer et apporter davantage de clarté à ce manuscrit ainsi que pour leur présence le jour de la soutenance.

L'équipe du Dr Mathias Engel de l'Université de la Sarre en Allemagne ainsi que le Pr Caroline Barrette de l'Université de Grenoble sont remerciées pour leur contribution sur les évaluations biologiques des composés synthétisés.

Enfin, je tiens à remercier l'Université de Montréal, l'Université Claude Bernard Lyon 1 et la région Rhône-Alpes Auvergne (CMIRA) pour avoir permis la réalisation de mon projet de mobilité international au Canada.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS 10

INTRODUCTION GENERALE 12

PARTIE 1 : SYNTHESE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DES ANALOGUES DE LA COMBRETASTATINE A-4 18

CHAPITRE 1: INHIBITION DE LA POLYMÉRISATION DE LA TUBULINE EN MICROTUBULE 19

1. STRUCTURE ET IDENTIFICATION DE LA NATURE COMPLEXE DES HÉTÉRODIMÈRES DE MICROTUBULES 19
1.1 STRUCTURE 19
1.2 RÔLES ET FONCTIONS DES MICROTUBULES 20
2. DYNAMIQUE DES MICROTUBULES 23
2.1 INSTABILITÉ DYNAMIQUE DES MICROTUBULES 23
3. LES MICROTUBULES EN TANT QUE CIBLE DANS LE DÉVELOPPEMENT D'AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES 25
3.1 AGENTS DÉSTABILISANTS DU FUSEAU MITOTIQUE (MDAS) 26
3.2 LES AGENTS STABILISANTS DU FUSEAU MITOTIQUE (MSAS) 29
4. AGENTS CIBLANT ET PERTURBATEURS DE LA VASCULARISATION TUMORALE 32
4.1 CROISSANCE TUMORALE ET VASCULARISATION 32
4.1.1 Angiogenèse et néovascularisation 32
4.1.2 Angiogenèse tumorale 33
4.2 THÉRAPIE ANTIANGIOGÉNIQUE: AGENTS PERTURBATEURS DE LA VASCULARISATION (VDAS) ET INHIBITEURS ANGIOGÉNIQUES (AIS) 34
4.3 MÉCANISME DE RÉSISTANCE TUMORALE AUX AGENTS PERTURBATEURS DE LA VASCULARISATION 39
4.4 INTÉRÊT D'UNE COMBINAISON DES VDAS 41
5. LA COMBRETASTATINE A-4 ET SES DERIVES EN TANT QU'AGENTS ANTITUMORAUX PERTURBATEURS DE LA VASCULARISATION 42
5.1 DE LA DÉCOUVERTE DE LA COMBRÉTASTATINE A-4 À SON APPLICATION EN TANT QU'AGENT ANTICANCÉREUX 42
5.2 RELATIONS STRUCTURES-ACTIVITÉ (SARS) DE LA CA-4 45
5.2.1 Modification sur le noyau aromatique A triméthoxybenzène 45
5.2.2 Noyau B aromatique de la combrétastatine A-4 47
5.2.2.1. Pharmacomodulation des substituants présents sur le noyau B 47
5.2.2.2. Remplacement du noyau B par un motif hétérocyclique 50
5.2.2.3. Modification de la double liaison cis-méthylène reliant les noyaux A et B 53
5.2.2.4. Remplacement de la double liaison par un motif hétérocyclique 59
6. SYNTHÈSE DE LA CA-4 67
6.1 REACTION DE WITTIG 67
6.2 RÉACTION DE RAMBERG-BÄCKLUND 68
6.3 RÉDUCTION *VIA* UNE SÉQUENCE HYDROSILYLATION – PROTODÉSILYLATION 69
6.4 RÉACTION DE PERKIN 70
6.5 RÉACTION DE KUMADA-CORRIU 71

SYNTHESE DES ANALOGUES HETEROCYCLIQUES DE LA CA-4 73

1. SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS *(Z)-ETHYLENIQUE* BENZO[*B*]THIOPHÈNE ET THIOPHÈNE DÉRIVÉS DE LA CA-4 73
1.1 UTILISATION DE LA RÉACTION DE SUZUKI-MIYAURA 73
1.1.1 Synthèse des produits de départ en vue du couplage de Suzuki-Miyaura 73
1.1.2 Synthèse des derivés méthoxy-hydroxythiophènes 76
1.2 SYNTHÈSE DE DERIVÉS MÉTHOXYTHIOPHÈNES DE LA CA-4 PAR RÉACTION DE WITTIG 79

1.3 Synthèse des dérivés (*Z*)-stilbènes *via* couplage de Sonogashira combinée à une hydrogénation partielle pallado-catalysée des diarylacétylènes 83
1.3.1 Synthèse des halogénures de 2-hétéroaryle 84
1.3.2 Couplage de Sonogashira 86
1.3.3 Réduction partielle stéréosélective pallado-catalysée des diarylacétylènes 87
2. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DE LA PHÈNSTATINE ET *ISO*-MÉTHYLÈNE DE LA CA-4 89
3. Dérivés 1,2,3-triazole de la CA-4 **92**

PARTIE EXPERIMENTALE DU PREMIER CHAPITRE **95**

CHAPITRE 2 : EVALUATIONS DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES ANALOGUES DE LA COMBRETASTATINE A-4 ..... **129**

1. Evaluation de l'effet antitubuline **131**
2. Evaluation de l'effet antiprolifératif **136**
3. Effet sur le cycle cellulaire **139**

PARTIE 2 : SYNTHESE, EVALUATIONS BIOLOGIQUES ET NANOFORMULATIONS DES INHIBITEURS DE DYRKS KINASES **141**

CHAPITRE 3: INHIBITEURS DE KINASES DYRK **142**

1. Origine de la Famille de protéines Dyrk **142**
1.1 La famille de protéines MBK / DYRK chez les nématodes 142
1.2 La famille de protéines DYRK chez la drosophile 142
1.3 La famille de protéines kinases DYRK chez les mammifères et l'homme 143
2. Mécanismes d'activation et de regulation des kinases dyrk **144**
3. La protéine kinase Dyrk1A **147**
3.1 Gène 147
3.2 Structure protéique, activation et régulation de Dyrk1A 147
3.3 Fonctions de Dyrk1A 148
4. Dyrk1B **150**
4.1 Structure et généralités 150
4.2 Activation de la kinase Dyrk1B 151
4.3 Fonction de la protéine Dyrk1B 151
5. Dyrk2 **153**
5.1 Généralités 153
5.2 Fonctions et activation 153
5.2.1. Activité en tant que priming kinase et régulation de la transition G1/S 153
5.2.2. Transition G2/M et complexe EDVP E3 ligase 154
5.2.3. Inhibition du phénomène de métastatisation 155
5.2.4. Inducteur de l'apoptose 156
6. Pathologies associées aux dérèglements de l'expression des kinases Dyrk **157**
6.1 Neuropathologies et Dyrk1A : Alzheimer, Syndrome de Down et pathologies associées 157
6.2 Dyrk1A et implication dans les cancers 158
6.3 Dyrk1B et cancers 159
7. Inhibiteurs de kinases Dyrk **160**
7.1 Interaction des inhibiteurs de kinases DYRK avec leurs cibles thérapeutiques 160
7.2 Inhibiteurs monocycliques 162
7.3 Inhibiteurs bicycliques 163
7.4 Inhibiteurs tricycliques et tétracycliques 165
7.5 Inhibiteurs polyphénoliques 166

CHAPITRE 4 : LES INDENOBENZO[*B*]THIOPHÈNES EN TANT QU'INHIBITEURS DES KINASES DYRK. 169

1. TRAVAUX PRÉALABLES ET GENÈSE DU PROJET 169
1.1 INHIBITEURS DE LA KINASE CK2 ET FAMILLE DE PROTÉINES DYRK 169
1.2 STRATÉGIE DE DÉVELOPPEMENT ET ÉTUDE DU COMPOSÉ « HIT » CV210 172
1.3 ETUDES DE MODÉLISATION MOLÉCULAIRE 173
2. SYNTHÈSE D'INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES 177
2.1 SYNTHÈSE DES PRODUITS DE DÉPART 178
2.1.1 Préparation des dérivés iodobenzaldéhydes 178
2.1.1.1. Synthèse du 2-iodo-3-méthoxybenzaldéhyde **189** 179
2.1.1.2. Synthèse du 2-iodo-5-méthoxybenzaldéhyde **191** 179
2.1.1.3. Synthèse du 2-iodo-4-méthoxybenzaldéhyde **194** 180
2.1.1.4. Synthèse du 2-iodo-6-méthoxybenzaldéhyde **197** 180
2.1.2 Synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes **198-201** 181
2.1.2.1. Réaction de métallation : déprotonation / addition électrophile menant à la formation d'alcools secondaires 183
2.1.2.2. Réaction d'oxydation de l'alcool secondaire 188
2.1.2.3. Cyclisation pallado-catalysée par mise en jeu d'une phosphine encombrée 191

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 4 197

CHAPITRE 5 : EVALUATIONS DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUES DES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES ... 224

1. EVALUATION DE L'INHIBITION DE LA PROTÉINE KINASE DYRK1A PAR LES DÉRIVÉS INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES 224
1.1. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DES INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES SUR LA PROTÉINE KINASE DYRK1A 224
1.2. MÉCANISME D'INHIBITION DU COMPOSÉ AFA 144-1 228
2. EVALUATION DE L'EFFET CYTOTOXIQUE SUR UN PANEL DE LIGNEES CELLULAIRES 229
2.1. ESSAIS MTT SUR LES DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES 232
2.2. EVALUATION DE L'EFFET SYNÉRGETIQUE, PAR LE TEST MTT, DE LA CO ADMINISTRATION DU TMZ ET DE L'AFA 144-1 234
2.2.1. Lignée U87 234
2.2.2. Lignée U138 235
3. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES SUR LA PROTÉINE KINASE CK2 236
3.1. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES SUR LA PROTÉINE CK2 236
3.2. EVALUATION DE LA CYTOTOXICTÉ DES INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES AFA 115-1 ET AFA 144-1 SUR DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES EXPRIMANT CK2 238

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 5 240

DYRK KINASES-TARGETED ASSAYS 240
CYTOTOXIC ASSAYS 241
CK2-TARGETED ASSAYS 242

CHAPITRE 6 : ETUDES DU PASSAGE DES COMPOSÉS INDÉNOBENZO[*B*]THIOPHÈNES AU TRAVERS DE LA BARRIÈRE HÉMATO ENCÉPHALIQUE 245

1. STRUCTURE, FONCTIONS ET ROLES PHYSIOLOGIQUES DE LA BHE 245
1.1 PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DE LA BHE 245
1.1.1 Caractéristiques et liaisons des cellules endothéliales de la BHE 246
1.1.2 Jonctions serrées 247
1.1.3 Jonctions adhérentes 248

1.1.4 Intégrité de la BHE 248
1.2 PHYSIOLOGIE DE LA BHE 249
1.2.1 Passage *via* une diffusion paracellulaire 249
1.2.2 Passage *via* une diffusion transcellulaire 250
1.2.3 Transcytose médiée par des récepteurs 251
1.2.4 Transport *via* les transporteurs d'efflux 251
1.2.5 Endocytose de molécules chargées 251
1.2.6 Transport médié par des transporteurs spécifiques 252
2. MODÈLES D'ÉVALUATION *IN VITRO* EXPÉRIMENTAUX ET PAMPA-BBB 252
2.1 GÉNÉRALITÉS SUR LES MODÈLES D'ÉVALUATION *IN VITRO* 252
2.2 MODÈLES *IN VITRO* PAMPA-BBB 253
2.2.1. Evaluation du passage de la membrane phospholipidique de la BHE par les indénobenzo[*b*]thiophènes 255
2.2.2. Analyse des résultats obtenus après test PAMPA-BBB 258

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 6 261

CHAPITRE 7 : ETUDES ET TECHNIQUES DE NANOENCAPSULATION DES COMPOSES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES 265

1. INTERET ET DEVELOPPEMENT DE NANOFORMULATIONS DANS LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES 265
1.1. FORMATION DE NANOSPHÈRES POLYMÉRIQUES 267
1.2. ETUDE DE CARACTÉRISATION 268
1.3. CHOIX DU POLYMÈRE POUR LE DEVELOPPMENT DE NANOPARTICULES 269
2. ETUDE DE NANOFORMULATIONS 272
2.1. NANOPARTICULES « BLANCHES » 272
2.2. NANOPARTICULES D'HARMINE 273
2.3. NANOPARTICULES D'AFA 144-1 274

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE 277

ANNEXE : PUBLICATION 280

BIBLIOGRAPHIE 287

ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine Di-Phosphates
AI	Angiogenic Inhibitors
Akt	Protéine Kinase B
APP	Amyloid Precursor Protein
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
Asp	Asparagine
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Tri-Phosphates
BBB	Blood-Brain Barrier
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Bu	Butyle
CA-1	Combrétastatine A-1
CA-3	Combrétastatine A-3
CA-4	Combrétastatine A-4
CA-4P	Combrétastatine A-4 Phosphate
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDK	Cyclin-dependent kinase
CE_{50}	Concentration Efficace Médiane
CEP	Cellule Endothéliale Progénitrice
CK2	Caséine kinase 2
Da	Dalton
DCM	Dichlorométhane
DLE	Drug Loading Efficiency
DMAT	2-diméthylamino- 4,5,6,7-tétrabromo-1H-benzimidazole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	*N,N*-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
DRB	5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole
DSCR	Down Syndrome Critical Region
Dyrk	Dual Specificity tyrosine phosphorylation regulated Kinases
EE	Entrapment Efficiency
EGCG	Epigallocatéchin-3-gallate
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EMT	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
Et	Ethyle
GDP	Guanosine Di-Phosphate
Glu	Glutamine
GSK	Glycogen synthase kinase
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HAR	Harmine
HIF	Hypoxic inducible factors
HIPK	Homeodomain-Interacting Protein Kinase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC_{50}	Half maximal Inhibitory Concentration
IL	Interleukine
INDY	Inhibitor of Dyrk family kinases
IPT	Inhibition de la Polymérisation de la Tubuline
JAM	Molécule d'Adhésion Jointive
kB	Kilo Base
Leu	Leucine
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
Lys	Lysine
MAP	Microtubule–associated Protein
MBK	Minibrain Kinase
MDA	Microtubule Destabilizing Agent
Me	Méthyle
miARN	Micro Acide ribonucléique
MKK3	Mitogen-activated kinase kinase 3
MOAO	Monoamine Oxydase
Mp	Melting Point

MS	Mass Spectrometry
MSA	Microtubule Stabilizing Agent
MTOC	Microtubule-organizing Center
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
MW	Molecular Weight
Myrk	Minibrain-related kinase
n.d.	Non Défini (ou non déterminé)
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NIS	*N*-iodosuccinimide
NLS	Nuclear Localization Signal
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
OAP	Orthogonal Array of Particle
OMA	Oocyte Maturation
P-gp	P-glycoprotein
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PBL	Porcine Brain Lipid membrane
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PdI	Indice de Polydispersité
PG	Protecting Group
Phe	Phénylalanine
PIM	Proto-oncogene serine/threonine kinase
PLA-PEG	Polylactic Acid-Polyethylene Glycol
PLGA	Poly Lactic-co-Glycolic Acid
PPA	Acide Polyphosphorique
Pr	Propyle
Rdt	Rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces Réactifs de l'Oxygène
RSA	Relations Structure Activités
SAR	Structural Activity Relationship
SD	Syndrome de Down
Ser	Sérine
SNC	Système Nerveux Central
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
ta	température ambiante
TAM	Tumor Associated Macrophage
TBA	Tubulin Binding Agent
TBB	Tetrabromobenzotriazole
TBDMS	*tert*-Butyldimethylsilyl ether
TCP	Tubuline Carboxypeptidase
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Thréonine
TIPS	Ether de triisopropylsilyle
TMEDA	Tetramethylethylenediamine
TMP	2,2,6,6-Tetramethylpiperidine
TMZ	Témozolomide
TPI	Tubulin Polymerization Inhibition
TTL	Tubuline Tyrosine Ligase
Val	Valine
VDA	Vascular Disrupting Agent
VTA	Vascular Targeting Agent
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
X-ray	Rayonnement X
Z-av	Z-Average
ZO	Zonula Occluden
ζ	Potentiel Zeta

INTRODUCTION GENERALE

Première partie : analogue de la combrétastatine A-4

En 2015, on estime le nombre de nouveaux cas de cancer à plus de 385000 et le nombre de décès par cancer à 149500. Ces chiffres, plus élevés chez l'homme que chez la femme, connaissent ces dernières années une nette recrudescence chez les patients de sexe féminin (poumon, sein). La tendance est globalement la même au niveau mondial avec une prédominance des cancers colorectaux, du sein, de la prostate ou encore du poumon.

Globalement, la principale difficulté pour lutter contre les cancers se situe dans la capacité à les détecter avant qu'ils ne métastasent. De même, les nombreux phénomènes de résistance aux traitements chimiothérapeutiques sont malheureusement de plus en plus courant, ce qui complique encore d'avantage le « combat » contre cette pathologie.

Par conséquent, le manque de nouveaux traitement anticancéreux capable d'éradiquer les cellules tumorales dans leurs intégralités sans pour autant compromettre la santé du malade est actuellement un des enjeux majeurs de la recherche. En dépit de la concurrence énorme ainsi que des difficultés (notamment financières) à mettre en place de tels projets, la recherche ainsi que la synthèse de composés efficaces et innovants restent une priorité au niveau thérapeutique.

De par son implication dans la croissance, la survie et le phénomène de métastase des cellules cancéreuses, le réseau vasculaire tumorale représente une cible extrêmement intéressante ainsi qu'une alternative prometteuse aux traitements anticancéreux actuels.
Contrairement aux inhibiteurs de l'angiogenèse qui perturbent directement la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, une seconde classe de composés qualifiés de VDAs (pour « Vascular Disrupting Agents ») visant les cellules endothéliales, de même que les péricytes, conduisant à la vascularisation des cellules tumorales, provoquent des phénomènes d'ischémie et de nécrose cellulaire. Un exemple notable de ce type de composés n'est autre que la combrétastatine A-4 (plus communément appelé CA-4), qui est un composé naturel extrait d'un arbuste sud-africain, le *Combretum caffrum.* Ce dernier a été pour la première fois découvert, extrait et isolé par le chercheur américain G.R. Pettit en 1989.[1] Des études sur la CA-4 ont alors montré que cette dernière disposait de la particularité de pouvoir inhiber très efficacement la polymérisation des dimères α et β de tubuline en microtubules, résultant alors en la non-formation du cytosquelette, conduisant à l'apoptose de la cellule. Par conséquent, cette

molécule bloque efficacement la multiplication des cellules cancéreuses par arrêt du cycle cellulaire. De plus, le champ d'action de ce composé est très large, disposant d'une action prouvée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses telles que celles du carcinome gastrique Hs764T, du carcinome pancréatique CFPAC-1 ou encore du cancer du sein MCF-7.[2]
Finalement, ce composé naturel est une source d'inspiration pour le développement d'analogues aux caractéristiques physico-chimiques améliorées.
Le développement de nouveaux analogues de la CA-4 s'avère crucial car ce composé dispose non seulement d'une solubilité réduite mais peut aussi être instable lorsqu'il est administré. En effet, il a été démontré que la double liaison centrale de configuration (*Z*) s'isomérise *in vivo* en double liaison de configuration (*E*) ; le composé formé, la (*E*)-combrétastatine A-4 étant jusqu'à 30 fois moins actif que son stéréoisomère (*Z*), ceci pose donc un véritable problème.[3]
Les synthèses de nombreux analogues portant notamment un groupement phosphate (R = OPO_3Na_2, fosbrétabuline) ou une chaîne latérale aminoalcool (R = NH-sérinol, ombrabuline) se sont révélés très efficaces, et ces composés sont actuellement en phase d'études cliniques avancées pour le traitement de nombreux cancers (*Figure 1*).

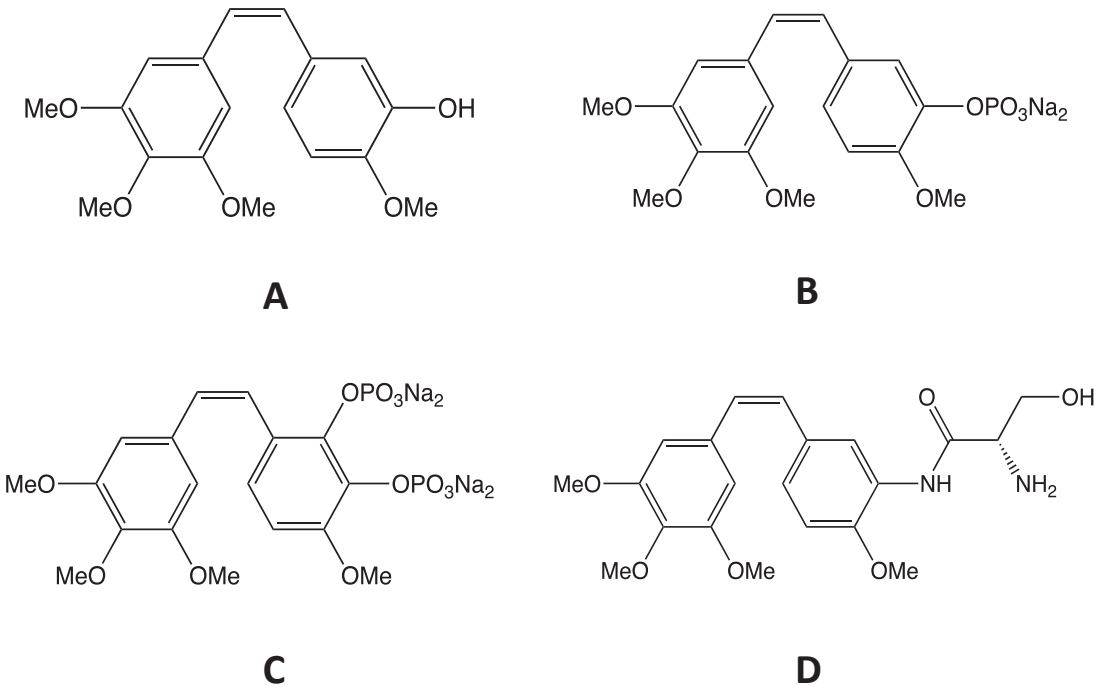


Figure 1: Combrétastatine A-4 (A) et ses dérivés solubles fosbrétabuline (B), OXi4503 (C) et ombrabuline (D).

Mon travail effectué lors de cette thèse a consisté dans un premier temps en la synthèse de nouveaux dérivés actifs de la CA-4 en remplaçant le noyau B par différents hétérocycles tels qu'un thiophène, un benzothiophène, ou un

benzothiazole, ces derniers étant destinés à être évalués pour leurs propriétés inhibitrices de la polymérisation de la tubuline et antiprolifératives. Nous avons également réalisé plusieurs pharmacomodulations avec notamment le remplacement de la double liaison par un groupement cétone (synthèse d'analogues de la phenstatine) et la conception d'analogues dit *iso*méthylène (*Figure 2*).

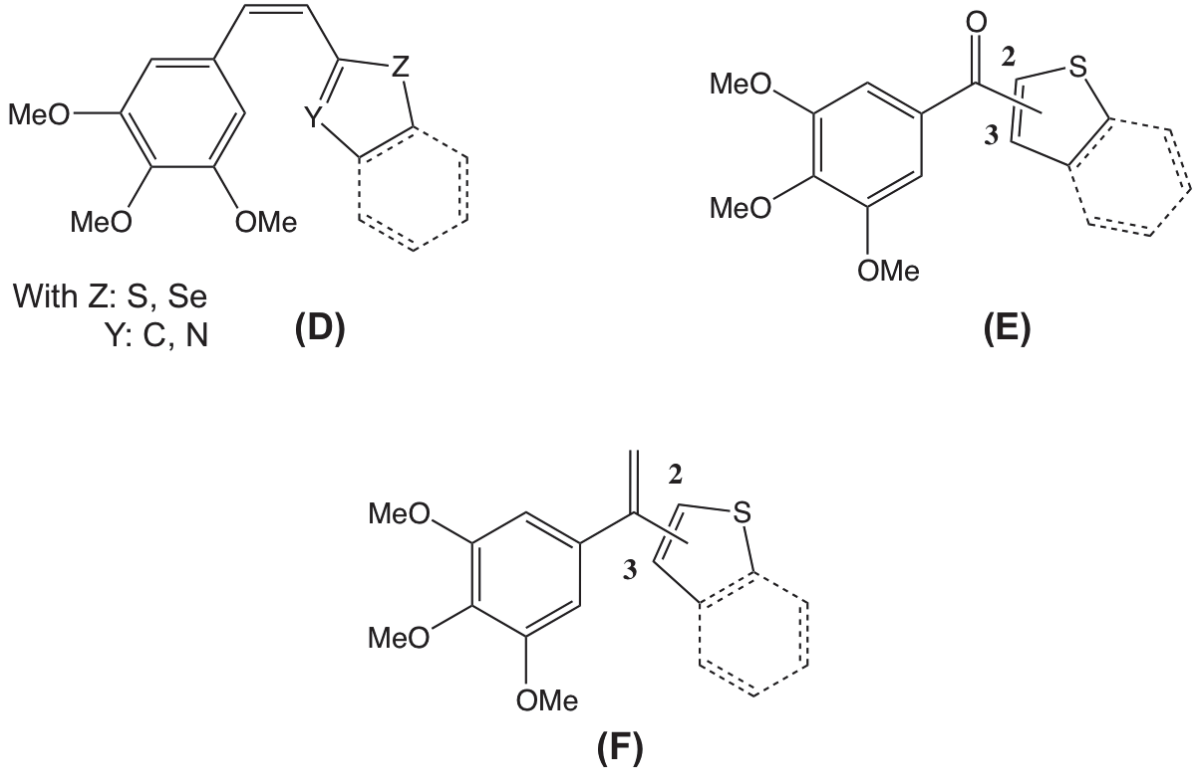


Figure 2: Développement d'analogues (*Z*)-alcène (D), de la phenstatine (E) et *iso*méthylène de la CA-4 (F).

Deuxième partie : Inhibiteurs de kinases DYRK

Avec plus de 24 millions de personnes touchées dans le monde, les pathologies d'ordre neurodégénératives représentent un problème majeur de santé publique.[4] Mais il est également très important de considérer l'incidence future des maladies neurodégénératives, on estime à plus de 42 millions le nombres de personnes qui seraient atteintes par ce fléau d'ici à 2020. Plus de 70% de ces cas seront attribués à la maladie d'Alzheimer à elle seule, dont les symptômes les plus évidents consistent en un déclin évident des fonctions cognitives de la personne.

La famille des protéines kinases DYRK (pour « Dual Specificity tyrosine phosphorylation regulated Kinases ») a fait l'objet ces dernières années d'une attention toute particulière de par son implication centrale dans de nombreux phénomènes physiologiques et notamment au niveau des phases primaires du développement neuronal et du système nerveux central.[5] Cette grande famille de protéines comporte jusqu'à 5 types de kinases différentes dont font partie Dyrk1A, Dyrk1B ou encore Dyrk2, et appartiennent au groupe CMGC du kinome eucaryote regroupant également les kinases dépendantes des cyclines CDKs et les glycogènes synthases kinases GSKs.[5]

Plus particulièrement, Dyrk1A et Dyrk1B ont été étudiées spécifiquement de par le rôle joué par ces kinases dans de nombreux cancers (notamment le glioblastome GBM) et certaines pathologies neurocérébrales.
La protéine kinase Dyrk1A a été identifiée comme étant issue de la partie terminale du chromosome 21, connue aussi sous le nom de région critique du syndrome de Down (trisomie 21). Le dérèglement de l'expression de *Dyrk1A* pourrait être responsable du développement anormal du système nerveux dans les phases primaires et de retards mentaux, menant irrémédiablement au phénotype du syndrome de Down.[5]
De plus, la kinase Dyrk1A phosphoryle directement la protéine tau, connue surtout pour sa participation à la stabilisation des microtubules neuronales et pourrait représenter de ce fait une cible intéressante dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer ou la trisomie 21.[6]
Partageant jusqu'à plus de 85% d'homologie structurale avec Dyrk1A, Dyrk1B ou kinase Myrk (pour « Minibrain-related kinase »), est une isoforme ubiquitaire qui a été montrée comme étant surexprimée dans différents cancers tels que les carcinomes du pancréas, ovarien ou du colon. L'implication de cette protéine dans les phénomènes de résistance par des phénomènes de réparation de l'ADN ou par passage *via* un état de dormance cellulaire font de Dyrk1B une cible prometteuse aussi bien dans les traitements anticancéreux que pour lutter contre les pathologies neurodégénératives[6].

Nous avons identifié au sein de notre laboratoire une molécule inhibant ces 2 kinases. Initialement développé dans le but d'inhiber la protéine kinase CK2 (caséine kinase 2), le composé prénommé CV210 a montré une activité inhibitrice de Dyrk1A/Dyrk1B (*Figure 3*). De plus, après différents tests sur les protéines CK2, nous avons observés que CV210 était, en comparaison à Dyrk1A et Dyrk1B, très peu voire inactif sur ces dernières. De par son activité, cette molécule est aujourd'hui notre composé « hit » et nous visons lors des travaux de cette thèse présenter la synthèse de multiples analogues dans le but d'améliorer l'activité initiale mais aussi sa spécificité sur Dyrk1A ou sur Dyrk1B.

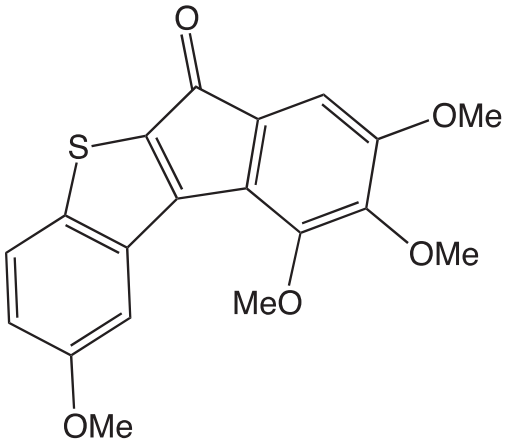


Figure 3: Le CV210, composé "hit"

Dans cette optique, nous avons réalisé différentes pharmacomodulations de nos composés dits « indénobenzo[b]thiophènes » afin d'observer les effets de tels composés sur Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2 mais aussi sur CK2 (*Figure 4*). Ainsi, la synthèse de régioisomère de ce composé s'est avéré très intéressante.

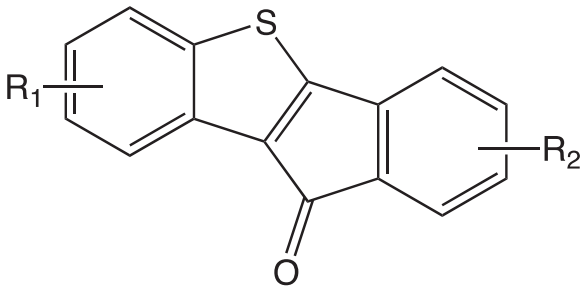


Figure 4: Structure-type des dérivés indènobenzo[*b*]thiophènes étudiés lors de cette thèse

Nous avons donc synthétisé de nombreux analogues en vue d'étudier les relations structures activités (RSA) de nos indénobenzo[*b*]thiophènes. Ceci nous a permis d'affiner nos connaissances vis-à-vis des kinases de type DYRK. Dans un dernier

temps, nous avons sélectionné les molécules candidates les plus prometteuses afin de (i) réaliser une étude autour de leurs caractéristiques physico-chimiques (Log P, solubilités dans différents solvants), (ii) d'analyser leurs comportements au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et (iii) de réaliser des nano-encapsulations.

PARTIE 1 : SYNTHESE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DES ANALOGUES DE LA COMBRETASTATINE A-4

CHAPITRE 1: INHIBITION DE LA POLYMERISATION DE LA TUBULINE EN MICROTUBULE

1. STRUCTURE ET IDENTIFICATION DE LA NATURE COMPLEXE DES HETERODIMERES DE MICROTUBULES

1.1 Structure

Les microtubules sont de longs filaments composants principaux du cytosquelette formés après polymérisation des dimères α et β de tubuline. Les sous-unités α et β de tubuline partagent environ 50% d'homologie au niveau structural et possèdent un poids moléculaire de l'ordre de 50 kDa. Lorsque les conditions physiologiques et intracellulaires sont favorables à la formation de microtubules, les dimères α et β s'associent de façon spontanée afin de former une structure dites en hétérodimère (*Figure 5*).[7]

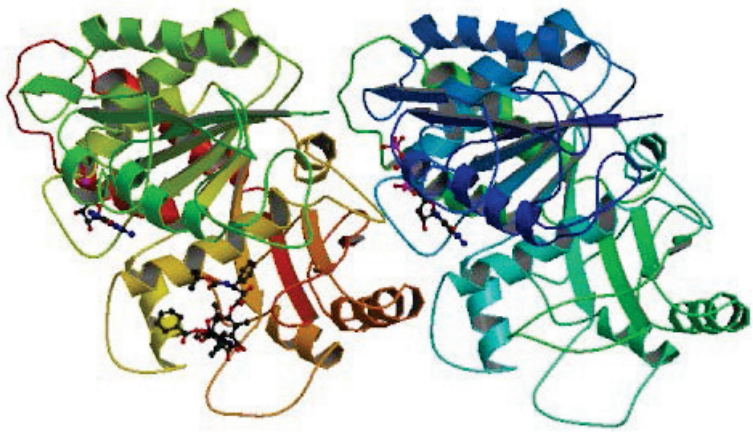


Figure 5: hétérodimères d'α- et de β-tubuline[7]

Les hétérodimères formés vont alors polymériser bout-à-bout en protofilaments linéaires qui vont s'associer latéralement afin de former un seul et unique microtubule qui peut encore s'allonger *via* l'addition d'autres α/β dimères de tubulines (*Figure 6*).[8] En général, une microtubule est constituée par l'association de 13 protofilaments de tubuline.

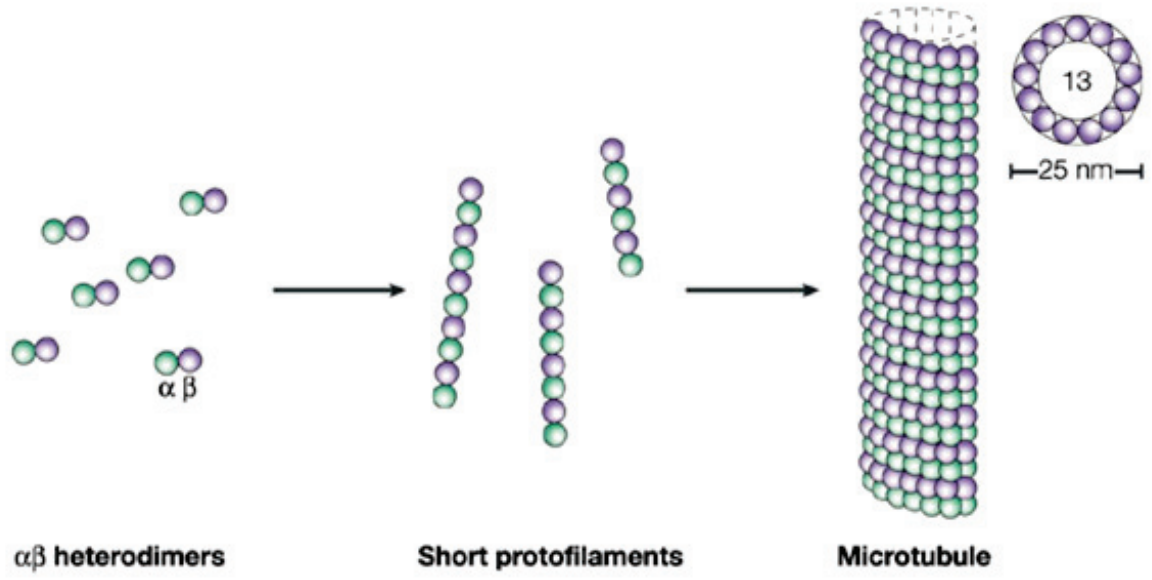


Figure 6: Polymérisation des dimères d'α- et β-tubuline menant à la formation de microtubules[8]

Les microtubules disposent de plus d'une certaine polarité qui est primordiale à leurs fonctions biologiques. Comme décrit précédemment, les dimères de tubulines polymérisent bout-à-bout, c'est-à-dire par liaison de l'extrémité β d'une sous unité à l'extrémité α de la sous-unité portée par le dimère suivant.[8] De ce fait, au sein même d'un protofilament on observera une extrémité composé d'une sous unité α alors que l'autre extrémité sera composée d'une sous unité β-tubuline. Ces extrémités sont alors qualifiées d'extrémités (−) et (+) respectivement. L'association de ces protofilaments parallèlement l'un à l'autre, est donc réalisé selon une polarité bien particulière qui va orienter l'élongation de ces microtubules. Ce phénomène est d'ailleurs significativement beaucoup plus rapide au niveau de l'extrémité (+).[8]
Finalement, le regroupement de ces protofilaments génère une structure en forme de pseudo-hélice, où chaque « tour » d'hélice contient 13 dimères de tubulines, chacun issue d'un protofilament différent.

1.2 Rôles et fonctions des microtubules

Les microtubules, de par leurs structures filamenteuses composant du cytosquelette, vont être impliqué dans un grand nombre de procédés physiologiques et plus particulièrement durant la mitose.

Le fuseau mitotique est créé à partir de 3 sous-groupes de microtubules : polaires, astraux et kinétochoriens.[9] Chacune de ces structures va jouer un rôle spécifique au moment de la séparation des chromosomes, phénomène observé lors de la phase « d'interphase » du cycle cellulaire.
Provenant du centre organisateur des microtubules MTOC (microtubule-organizing center), les microtubules astraux interagissent avec les composantes du cytosquelette au niveau de la membrane cellulaire. Ils fonctionnent notamment en synergie avec les dynéines, disposant d'un rôle moteur lors des phénomènes de divisions cellulaires. En effet, elles vont participer au phénomène de séparation du MTOC vers la membrane cellulaire en positionnant ce dernier dans une conformation bien précise, permettant la suite de la mitose (*Figure 7*).[9]
Les microtubules kinétochoriens sont, comme leurs noms l'indiquent, directement liés aux kinétochores, partie centrale des centromères chromosomiques. Ils vont participer au bon placement dans le plan équatorial des chromosomes lors de l'étape de prométaphase de divisions cellulaires. Ils vont aussi, avec la participation des microtubules polaires, jouer un rôle prépondérant dans le partage des chromosomes en 2 lots identiques lors des étapes d'anaphase et de métaphase.[9]

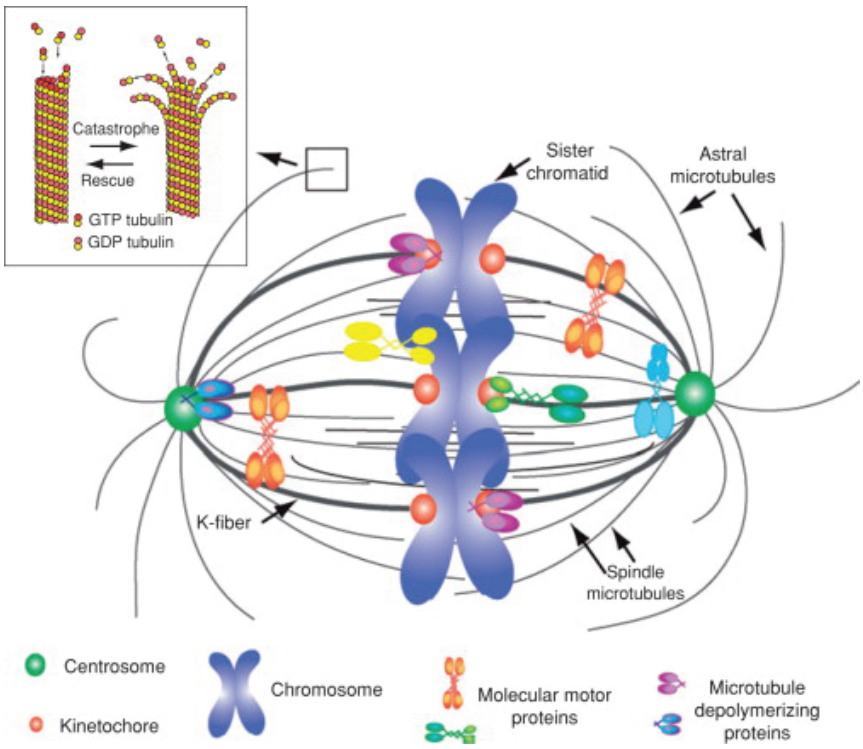


Figure 7 : Organisation du fuseau mitotique au sein des cellules eucaryotes[9]

Les microtubules sont non seulement impliqués dans les phénomènes de division cellulaire mais vont aussi jouer un rôle important au niveau structural des cellules

eucaryotes. En effet, les cellules eucaryotes disposent généralement d'organelles particulières appelées cils et flagelles, à l'origine notamment de la motilité de ces cellules (*Figure 8*).[10] A l'intérieur même de ces organelles, on retrouve une structure microtubulaire cytosquelettique communément appelé axonème. Formant la partie axiale et motrice de ces cils et flagelles, il est constitué d'un cylindre de 9 doublets de microtubules, associés entre eux par des bras de dynéine ainsi que des ponts de nexine élastiques.[10]
De plus, le cytosquelette de l'axonème est à l'origine de la formation de nombreux complexes protéiques et rend possible les échanges entre la surface tissulaire et les cellules épithéliales. Ceci est primordial étant donné que ces mêmes cils recouvrent une partie extrêmement importante de la surface des organes impliqués dans les phénomènes de respiration (cellules nasales, du pharynx ou encore de la trachée). Ils vont ici servir à détoxifier le milieu en expulsant, *via* les sécrétions de mucus, les molécules « déchets ».[10]

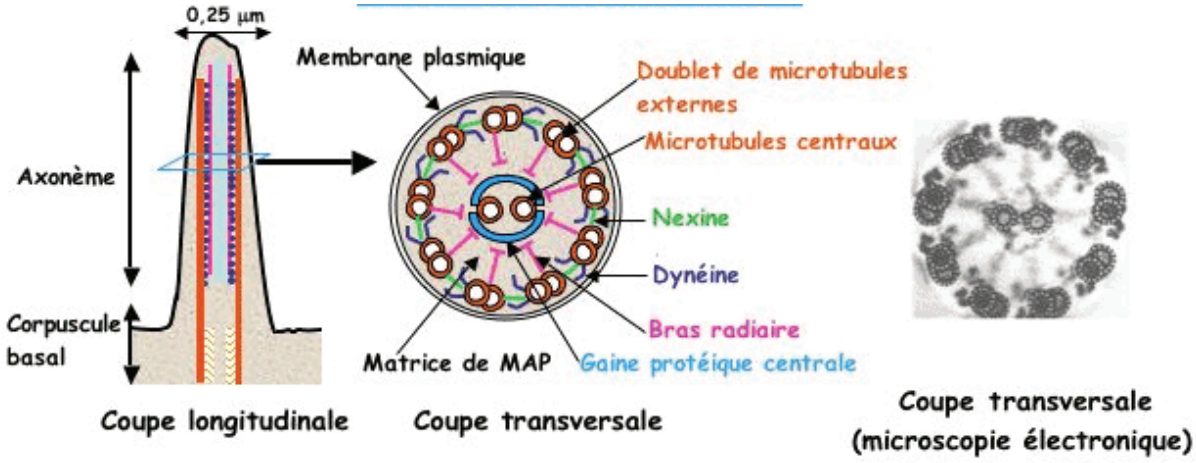


Figure 8: Structures des cils et flagelles

Aussi, ces microtubules peuvent servir de « rails » favorisant le transport intracellulaire de composants cytoplasmiques. Par liaison aux protéines associées aux microtubules MAPs (microtubules-associated proteins), ils sont capables de contrôler le transport et d'assurer, grâce à des phénomènes d'exocytoses, la bonne délivrance de vésicules au niveau de sites spécifiques. Ces phénomènes ont été observés de façon notable au travers des axones des cellules neuronale (composées principalement de microtubules) où diverses protéines, vésicules membranaires et organelles (mitochondries) sont transportés à partir du corps cellulaire vers l'extrémité axonale. L'hydrolyse de l'ATP fournit dans ce cas précis l'énergie nécessaire à ce transport.

2. DYNAMIQUE DES MICROTUBULES

2.1 Instabilité dynamique des microtubules

Comme précisé précédemment, les microtubules sont formés par polymérisation des hétérodimères d'α- et de β-tubuline, phénomène lui-même régulé par l'hydrolyse d'une molécule de GTP associée à la membrane de la β-tubuline. Ce procédé se déroule après un certain délai à la suite de l'incorporation au préalable d'un dimère de tubuline au niveau de l'extrémité du microtubule. Il a été démonté que cette extrémité possède une coiffe ou « cap » de tubuline-GTP (plus communément surnommé « cap GTP ») qui favorise la stabilisation alors que le tronc microtubulaire est formé lui-même de tubuline-GDP, ce qui le rend intrinsèquement plus instable.[8] Ce modèle permet d'expliquer la dynamique et le cycle de stabilité/instabilité des microtubules ; en présence d'un cap le microtubule continuera de croître alors qu'une perte de ce dernier entrainera son rétrécissement (*Figure 9*).

Tel que montré précédemment, les microtubules sont aussi des structures polarisées distinctement d'une extrémité à l'autre. Le taux de polarisation des deux extrémités de microtubules sont une conséquence de cette polarité ; l'extrémité la plus dynamique et qui donc va croître le plus rapidement est qualifié d'extrémité (+) alors que son opposé, thermodynamiquement plus lente, est qualifié de (-).[11]

Aussi, la polarité de ces fuseaux de microtubules est centrale aux fonctionnements des protéines motrices telles que les kinésines et les dynéines qui hydrolysent l'ATP afin de se mouvoir unilatéralement le long des microtubules[12]. Après d'innombrables controverses sur l'orientation des dimères α/β, il a récemment été décrété qu'au sein même d'un protofilament, les hétérodimères α/β étaient orientés de façon à ce que les monomères de β-tubuline pointent vers l'extrémité (+) des microtubules. Par conséquent, les monomères de β-tubuline sont exposés au niveau de l'extrémité (+) alors que les monomères d'α-tubuline sont présent au niveau de l'extrémité (-).[11]

Cette théorie a été confirmée par plusieurs données. Notamment, la fixation de GTP marqué (GTP fluorescent) exclusivement au niveau l'extrémité positive des microtubules, plus spécifiquement au niveau du site E de la tubuline β.[13] Dans un second temps, en présence d'AMPPNP (analogue non hydrolysable de l'ATP), il a été observé que le domaine moteur des kinésines se fixait principalement sur la tubuline β. Surtout, des études portant sur la structure microtubulaire ont montrés que le monomère de tubuline sur lequel se fixe la kinésine est situé sur la région (+).[14]

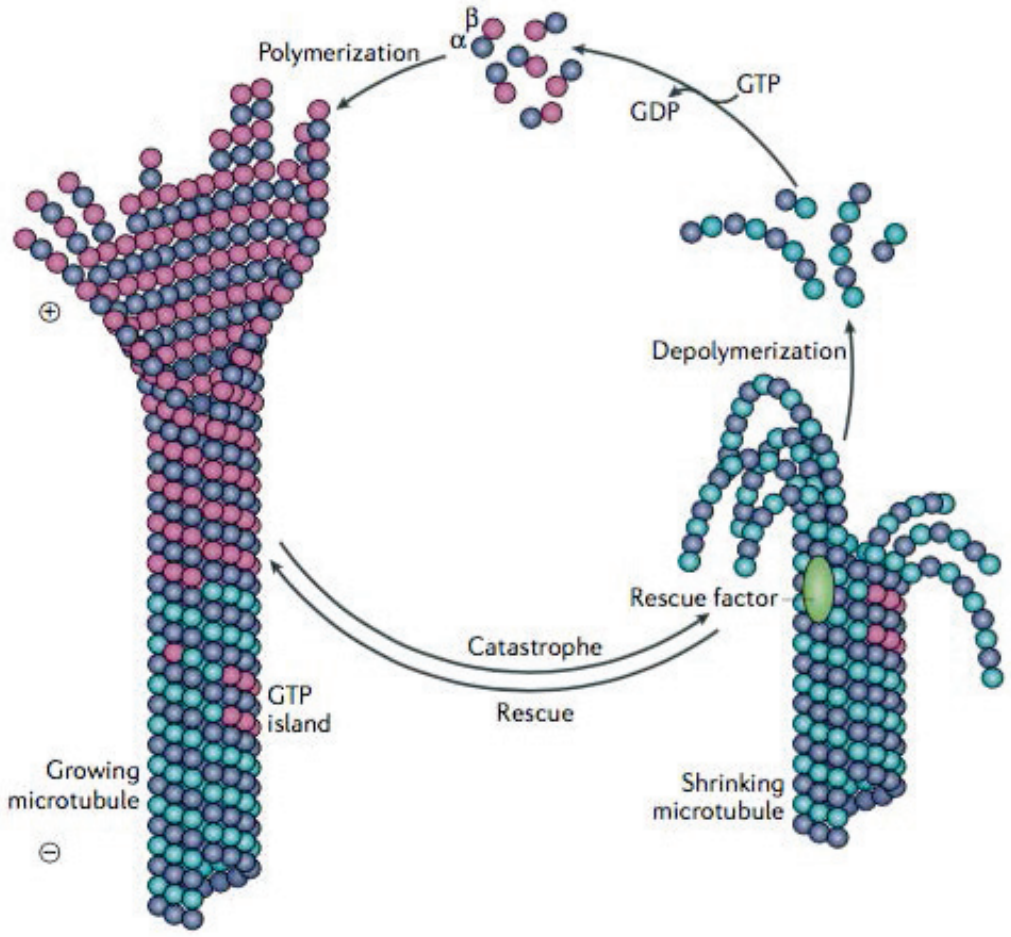


Figure 9: dynamique de polymérisation / dépolymérisation des microtubules[3]

Par marquage *via* un anticorps spécifique d'un peptide de la sous unité α-tubuline, ont aussi réussi à identifier l'extrémité négative par des essais de motilité relatifs à la kinésine.[15]
Jusqu'encore récemment, la nature précise des interactions latérales entre les différentes sous-unités de protofilaments adjacentes l'une à l'autre était de la même manière sujette à de nombreuses controverses. Au niveau structural, 2 types de treillis microtubulaire ou « lattice » ont été débattus :

- (a) type A, présentant une association latérale de protofilaments provenant de l'interaction entre les monomères α et β ; les monomères α d'un protofilament interagissant avec les monomères β d'un autre protofilament qui lui est adjacent et vice versa
- (b) type B, au sein duquel les monomères α et β d'un protofilament interagissent avec les monomères α et β d'un protofilament qui lui est adjacent et vice versa

A l'origine, il a été décrété que la structure des microtubules correspondait à celle des fuseaux de type A, c'est-à-dire dans laquelle les monomères voisins

présentent un motif hélicoïdal formé grâce aux interactions entre les sous-unités α et β.[16] Cependant, les nombreuses analyses structurales réalisées par la suite ont démontrées que la véritable organisation microtubulaire correspondait à celle de type B.[17] Il a notamment été montré que dans cette organisation les sous-unités voisines les plus proches entre deux protofilaments adjacents étaient identiques (α-α ou β-β). Cependant, la majorité des protofilaments présente en plus une couture sous forme de « lattice A », où par conséquent les sous-unités voisines les plus proches sont différentes. Cette couture peut d'ailleurs jouer un rôle au niveau de la stabilité des microtubules et/ou de sa liaison à des MAPs spécifiques.
Finalement, bien que les fuseaux de microtubules soient actuellement décrits comme étant hélicoïdaux, il est désormais prouvé que ces derniers ne s'associent pas *via* un système classique de polymérisation en hélice. Les études les plus récentes montrent en effet que l'accroissement d'une structure « planaire » (formée par l'interaction initiale entre les protofilaments) de microtubule croît jusqu'à formation de la structure type complète en forme de « tube ».

3. LES MICROTUBULES EN TANT QUE CIBLE DANS LE DEVELOPPEMENT D'AGENTS CHIMIOTHERAPEUTIQUES

Les microtubules sont donc des structures impliquées directement dans de nombreux procédés physiologiques et en particulier la mitose. Durant cette phase de division cellulaire, le matériel génétique et les chromosomes sont notamment séparés en deux ensembles identiques qui vont, après réalisation du cycle cellulaire, aboutir à la formation de deux cellules filles. L'importance des microtubules dans ce phénomène en fait par définition une cible intéressante à étudier dans le développement de nouveaux agents anticancéreux. La nature et la dynamique même de ces structures microtubulaires ont permis le design de nombreux agents antimitotiques (ciblant différents sites d'action) et qui ont montré une activité remarquable dans certains types de cancer. Ces agents chimiothérapeutiques, plus communément appelés poisons du fuseau mitotique, disposent d'une activité anti-néoplasique par fixation direct sur différents sites de la tubuline (*Figure 10*).[8] Ils vont alors altérer la dynamique de formation, ce qui va résulter en un arrêt prolongé du cycle cellulaire responsable finalement d'un phénomène d'apoptose.[8]

Bien qu'il soit établi que la destruction des cellules tumorales est initialement due à une altération de l'équilibre tubuline-microtubule, les poisons du fuseau sont classés en deux groupes présentant deux modes d'action bien distincts. Le premier, va regrouper les agents déstabilisants du fuseau mitotique (MDAs) qui vont inhiber la polymérisation des dimères de tubuline en microtubules. Alors que le second va englober les agents stabilisants du fuseau mitotique (MSAs), qui vont favoriser la polymérisation en microtubule.

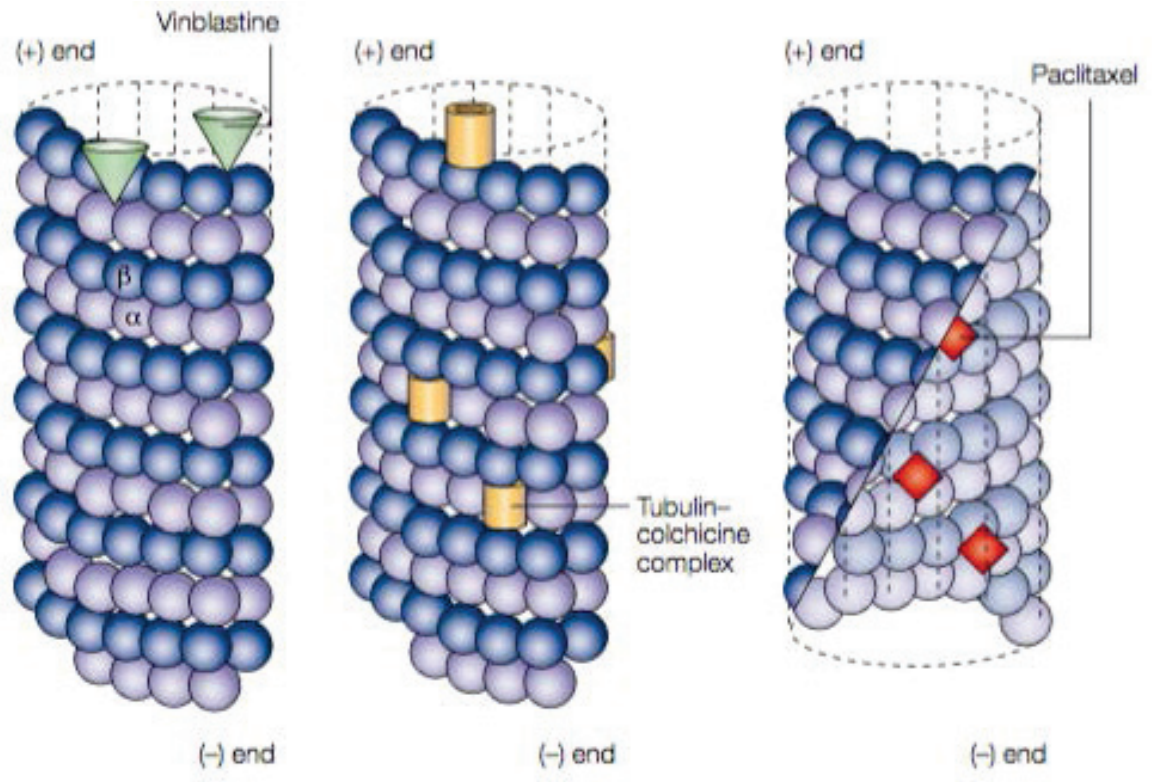


Figure 10: Sites de liaison des agents ciblant les microtubules[8]

3.1 Agents déstabilisants du fuseau mitotique (MDAs)

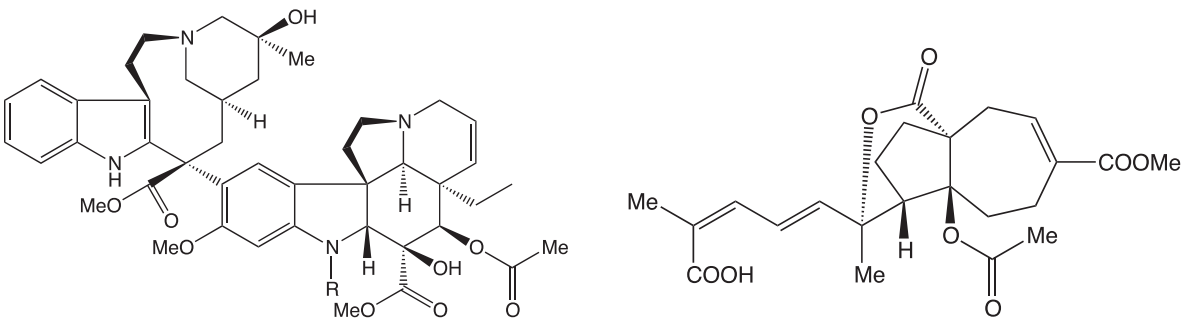
Les agents déstabilisants du fuseau mitotique vont se fixer spécifiquement sur les dimères de tubuline et entrainer la dépolymérisation des microtubules en tubuline. De nombreux agents composent cette classe thérapeutique avec notamment les *Vinca*-alcaloïdes dont font partie des produits naturels tels que la vincristine ou encore la vinblastine (*Figure 11*). La plupart de ces composés sont d'ailleurs déjà utilisés directement dans le traitement de certaines pathologies ou sont alors actuellement en phase d'études cliniques avancées (*Tableau 1*).
- Plus particulièrement, les *Vinca-alcaloïdes* sont utilisés dans les traitements anticancéreux en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques qui ne disposent pas de résistances croisées avec ces derniers. En comparaison à d'autres MDAs, ils démontrent un mécanisme d'action distinct caractérisé par une interaction avec de nombreux sites présents sur la β-tubuline, altérant la dynamique des microtubules et résultant en un arrêt du cycle cellulaire lors de la métaphase. Les *Vinca-alcaloïdes* de première et seconde génération tels que la

vinblastine ou la vincristine sont utilisés dans le traitement de lymphomes et de carcinomes mais manifestent une neurotoxicité non négligeable.[18]
Plus récemment, d'autres dérivés comme la vinflunine (extraite de la pervenche de Madagascar) ont été validés par la Haute autorité de Santé (HAS) dans le traitement du cancer urothélial de vessie à cellules transitionnelles avancé ou métastatique, et montrent une activité satisfaisante mais surtout une faible toxicité périphérique.[18]

- La colchicine et ses dérivés comme la demecolcine sont très célèbres pour leurs activités antimitotiques marquées. Ils sont extraits à partir de *Colchicum autumnale* et de *Gloriosa superba*, deux végétaux appartenant à la famille des Herbacées. Ces composés ont notamment démontré une activité cytotoxique impressionnante lors des expérimentations *in vivo*. Ces produits d'origine naturels se fixent sur un site unique situé à l'interface des sous unités α et β de tubuline. Il en résulte alors la formation d'un complexe tubuline-colchicine empêchant la polymérisation en microtubule.[19]
Ce composé est en fait actuellement seulement utilisé comme traitement de référence pour la crise de goutte, et en prévention dans le traitement des péricardites aigues.

- Les cryptophycines sont des dérivés synthétiques de depsipeptides macrocycliques produit par une cyanobactérie du genre *Nostoc*. De la même façon que la colchicine et les *Vinca-alcaloïdes*, il a été prouvé que ces agents inhibaient la polymérisation de la tubuline en microtubule. De plus, ils sont à l'heure actuelle les agents déstabilisants du fuseau les plus actifs et affichent une cytotoxicité remarquable contre de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses résistantes.[20]
Ceci a stimulé la synthèse ainsi que la recherche sur les analogues de cryptophycine et a abouti à la découverte d'un dérivé également très actif, la Cryptophycin-52 (C-52). Après avoir atteint la phase 2 d'essais cliniques et montré des résultats encourageants, il a cependant été retiré pour cause de toxicité neuronale périphérique trop importante (*Tableau 1*).[21]

- L'acide pseudolarique B est un diterpène isolé à partir de *Pseudolarix kaempferi Gordon* et qui a la capacité d'inhiber spécifiquement la croissance ainsi que la prolifération tumorale par déstabilisation du fuseau mitotique. Aussi, ce terpène dispose d'un mécanisme d'action plus complexe et favorise le phénomène d'autophagie qui consiste en la dégradation partielle du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes. Il a particulièrement été employé dans le traitement du carcinome thyroïdien, donnant des résultats très prometteurs[22].



yptophycin 52

Figure 11: Quelques exemples d'agents déstabilisants du fuseau mitotique[13-17]

Une liste des principaux agents déstabilisants du fuseau mitotique au stade d'essai clinique ou préclinique a été répertorié dans le tableau ci-après (*Tableau 1*).

Composé médicamenteux	Effets et propriétés	Phase d'étude clinique
Cryptophycines	Induction d'apoptose. Effet synergétique avec les agents chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques.	Phase II pour les carcinomes ovariens résistants et NSCLC mais retiré après observation de neuropathie périphérique.
Combretastatin A-4-P	Activité antivasculaire et antiangiogénique. Effet synergétique avec les agents radiothérapeutiques, hyperthermiques, chimiothérapeutique et immunothérapeutiques.	Phases II et III pour le traitement des tumeurs solides aux stades avancés (cancer du poumon et de la thyroïde) en combinaison avec le carboplatine.

Combretastatin A-1-P	Activité antivasculaire et antiangiogénique supérieure à celle de la CA-4P. Effet synergétique avec les agents chimiothérapeutiques.	Phase I pour les tumeurs solides, les leucémies myéloïdes aigües et les syndromes myélodysplasiques.
Ombrabuline	Activité antivasculaire et antiangiogénique supérieure à celle de la CA-4P. Effet synergétique avec les agents chimiothérapeutiques.	Phase I seul ou en combinaison / Phase III pour le traitement des sarcomes à tissus mous avancés.
Soblidotin	Induction d'apoptose. Activité antivasculaire et antitumorale sur les tumeurs résistantes à la vincristine, docétaxel et paclitaxel.	Phase II pour le traitement des tumeurs solides aux stades avancés. (Sarcome des tissus mous, NSCLC).
D-24851	Efficacité à des doses non toxique chez le rat. Aucun effet neurotoxique. Applicable à un traitement par voie oral. Activité antitumorale sur les cellules multirésistantes.	Phases II et III pour le traitement des tumeurs solides aux stades avancés.
Acide pseudolarique B	Activité antiangiogénique. Aucune neurotoxicité observée chez les animaux traités. Activité antitumorale sur les cellules multirésistantes.	Phase d'étude préclinique.
Embellistatine	Activité antiangiogénique.	Phase d'étude préclinique.

Tableau 1: Agents déstabilisants du fuseau mitotique au stade d'essai clinique ou préclinique[18]

3.2 Les agents stabilisants du fuseau mitotique (MSAs)

Contrairement aux MDAs, les agents stabilisants du fuseau mitotique manifestent une spécificité très faible voire nulle pour la tubuline seule. En revanche, ils possèdent une affinité importante pour la tubuline incluses dans les microtubules et vont ainsi favoriser drastiquement la polymérisation par stabilisation des fuseaux de microtubules ; d'où leur dénomination (*Figure 12*).[13]

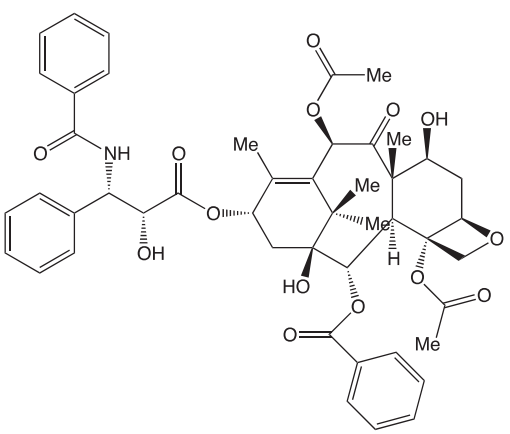
- Parmi les agents stabilisant du fuseau mitotique, la famille des taxanes est peut-être celle qui a fait l'objet d'études et de recherches les plus approfondies.[23] Possédant la capacité d'altérer des mécanismes cellulaires-clés comme par exemple la mitose, le Paclitaxel et ses dérivés semi-synthétiques font partie de ces composés dont la découverte a été une étape importante dans la lutte contre le

cancer lors du 20ème siècle. Le Paclitaxel (Taxol ®) est une molécule de structure complexe isolée pour la première fois à partir de l'écorce d'un arbre, l'if du pacifique, en 1967 par Monroe Wall et Mansukh Wani.[24] Etonnement, ce produit n'a pas suscité de vif intérêt de la part de la communauté scientifique lors de sa découverte. Ce n'est qu'à partir de 1979, lorsque Peter Schiff et Susan Horwitz identifièrent le mode d'action de ce dernier, qu'il fit l'objet d'une bien plus grande attention. En effet, et contrairement aux *Vinca-alcaloïdes* ou autres agents déstabilisants du fuseau, le Paclitaxel stimule la polymerisation en microtubule par fixation sur les sous-unités de β tubuline. Plus spécifiquement, il va se fixer sur la surface interne microtubulaire et exercer son action.[25]

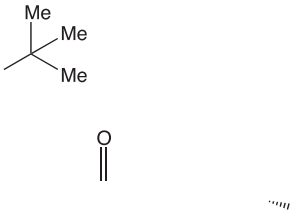
- Isolé à partir d'un organisme bactérien prénommé *Solangium cellulosum*, les epothilones sont des structures de type macrolides qui ont été décrits pout la première fois en 1993 pour leur activité antifongique caractéristique. De la même façon que le Paclitaxel, ils ne connurent une recrudescence d'intérêt qu'après découverte de leur activité similaire à celle des MSAs.[26] Ils se fixent exactement sur le même site que les taxanes, agissant comme inhibiteur compétitif avec ces derniers.[18,27] Il existe 4 classes d'épothilones naturels (A, B, C et D) qui, contrairement aux taxanes, disposent d'une bonne solubilité et sont également très efficaces contre les lignées cellulaires multi-résistantes.[28]

- Les laulilamides sont d'autres produits d'origines naturels retrouvés dans l'éponge marine *Cacospongia mycofijiensis* et qui sont actuellement en phase d'essais précliniques. Ces macrolides agissent à la manière d'un MSA mais ils vont se fixer sur un site différent localisé au niveau de deux sous unités adjacentes de ß-tubuline entre les protofilaments des microtubules. Ils vont alors cause l'arrêt du cycle mitotique et une apoptose des cellules ; ils ont notamment été testé dans les traitements contre le cancer du sein.[29] De plus, les laulilamides ont montré une activité intéressante contre les lignées cellulaires multi-résistantes qui surexpriment la glycoprotéine-P ainsi qu'un effet synergétique lorsque coadministré avec les taxanes.

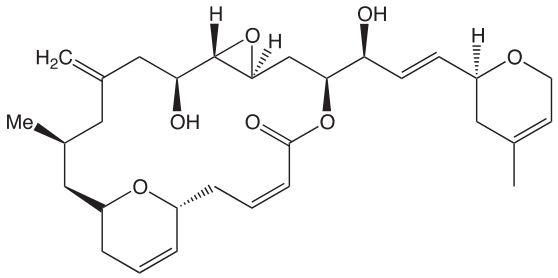
- Enfin, l'ixabepilone est un analogue de l'épothilone B, très efficace notamment dans le traitement des cancers du sein avancés ou métastasiques très agressifs, résistants au paclitaxel.[28]



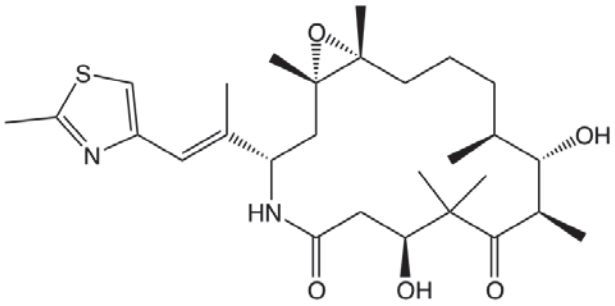
Paclitaxel



Docetaxel



R=H Epothilone A
R=Me Epohtilone B



Ixabepilone

Figure 12: Exemples d'agents stabilisants du fuseau mitotique[13]

Une liste des principaux agents stabilisants du fuseau mitotique au stade d'essai clinique ou préclinique a été répertorié dans le tableau ci-après (*Tableau 2*).

Composé médicamenteux	Effets et propriétés	Phase d'étude clinique
Epothilones	Solubilité élevée en milieu aqueux. Actif sur les lignées multirésistantes. Malléabilité chimique.	Phase II/III pour les tumeurs solides sensibles aux dérivés taxanes (cancers du sein, poumon et de la prostate).[24]
Ixabepilone	Analogue de l'Epothilone B, activité métabolique supérieure et actif contre les lignées mutlirésistantes. .	Approuvé en 2007 (par la FDA) pour les cancers métastasique du sein, plusieurs essais cliniques actuellement en cours sur les tumeurs solides.[26]
Laulimalide	Actif sur les lignées multirésistantes, activité antioangiogénique, effet synergétique en combinaison avec le docetaxel.	Phase d'étude préclinique.[28]
Dictyostatine	Actif sur les lignées multirésistantes, effet synergétique en combinaison avec le taxol.	Phase d'étude préclinique.[28]

Tableau 2 : Agents déstabilisants du fuseau mitotique au stade d'essai clinique ou préclinique[18]

4. AGENTS CIBLANT ET PERTURBATEURS DE LA VASCULARISATION TUMORALE

4.1 Croissance tumorale et vascularisation

4.1.1 Angiogenèse et néovascularisation

L'angiogenèse est décrit comme la formation de nouveau vaisseaux sanguins à partir de la vascularisation préexistante et est impliquée dans divers phénomènes physiologiques tels que l'inflammation, la réparation tissulaire ou encore la cicatrisation. Ce procédé se décompose en plusieurs étapes, chacune étant contrôlée par différents facteurs chimiques et mécaniques *in vivo*. Trois mécanismes fondamentaux de l'angiogenèse ont été identifiés dont le « sprouting » (angiogenèse par bourgeonnement), l'intussusception et la septation[30] :

- L'angiogenèse par bourgeonnement ou "sprouting", a été la première forme décrite et conduit, après activation des cellules endothéliales, à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire.[30] La migration orientée des cellules endothéliales, favorisée par un réseau de facteurs pro-angiogéniques, est suivi d'une phase de prolifération, puis d'une différenciation en structure capillaire. Ceci aboutit finalement à la formation du lumen, par recrutement de fibres musculaires lisses qui vont délimiter le vaisseau nouveau, et par la reformation de la membrane basale précédemment détruite,[23]

- La septation, aussi connu sous le nom de division longitudinale, consiste en la séparation en deux d'un vaisseau capillaire préexistant, ce qui va engendrer la formation d'un nouveau capillaire le long du premier. Ceci va être caractérisé par une poussée des cellules endothéliales à l'intérieur du vaisseau originel,[23]

- Enfin, l'intussusception correspond à un élargissement et à une séparation de vaisseaux déjà formés. L'angiogenèse intussusceptive va entrainer l'accroissement de la surface des capillaires en produisant une invagination contrôlée par les cellules endothéliales qui résulte, finalement, en un développement de nouveau vaisseau.[23]

4.1.2 Angiogenèse tumorale

La néovascularisation caractérisant la croissance des capillaires alimentant les cellules tumorales est souvent un phénomène anarchique, non contrôlé, qui va engendrer un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques ; on parle alors d'angiogenèse pathologique ou tumorale.[24]
La cellule tumorale, pour se développer, nécessite un apport extrêmement important en nutriments (O_2, glucose…) mais doit également pouvoir éliminer les déchets produits (acidose, CO_2). Afin de pouvoir proliférer, la tumeur va promouvoir sa croissance en envoyant des signaux (facteurs pro-angiogéniques) tels que les facteurs de croissances VEGF aux cellules endothéliales environnantes normalement quiescentes. Ces dernières vont alors acquérir un phénotype angiogénique permettant le développement massif de nouveaux vaisseaux désordonnés, hémorragiques et caractérisés par une perméabilité accrue. Ce réseau tissulaire anormal ne va par conséquent pas pouvoir permettre de maintenir des échanges stables et homogènes entre la cellule tumorale et le milieu (*Figure 13*).[24] Ceci va alors entrainer un redéveloppement de nouveaux vaisseaux aux propriétés similaires. Ce cycle de croissance va non seulement

contrebalancer le phénomène d'apoptose mais aussi permettre la dissémination des cellules tumorales aux travers du réseau vasculaire nouveau, disposant d'une étanchéité beaucoup moins importante que celle des capillaires normaux : c'est le phénomène de métastase. Toutes les enzymes nécessaires à la migration et à la dissolution des cellules endothéliales sont présentes au niveau de la croissance capillaire (collagénases, activateur du plasminogène…) ; mis à profit par les cellules tumorales, elles vont leur permettre de migrer.[24]

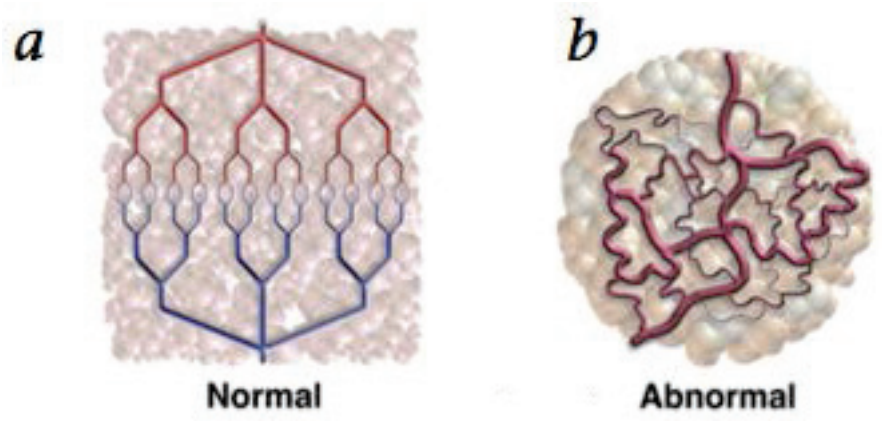


Figure 13: Adapté d'après Jain[31], comparaison entre (a) les réseaux vasculaires « normaux » et (b) anormaux des cellules tumorales

De même, le faible apport en O_2 va résulter en la formation d'un microenvironnement hypoxique, dans lequel la pression interstitielle sera particulièrement élevée et où des facteurs de type HIF (Hypoxic inducible factors) seront surexprimés. Tous ces facteurs vont favoriser encore d'avantage la croissance tumoral.[32,33]

4.2 Thérapie antiangiogénique: agents perturbateurs de la vascularisation (VDAs) et inhibiteurs angiogéniques (AIs)

Il est à présent évident que le développement cellulaire tumorale nécessite une quantité extrêmement importante en nutriments et cela de tous types : cibler spécifiquement la vascularisation des cellules cancéreuses offre donc un angle d'approche intéressant et nouveau dans le traitement anticancéreux. Les stratégies actuelles se basent en général sur des traitements en combinaison d'agents antiangiogéniques qui ciblent aussi bien la vascularisation que la tumeur elle-

même. Ces composés sont habituellement subdivisés en deux catégories qui sont les agents ciblant la vascularisation (VTAs) et les inhibiteurs angiogéniques (AIs).

Les AIs sont des molécules cytostatiques qui vont empêcher la croissance de nouveaux capillaires sanguins au stade précoce du développement chronique des cancers. Ils sont employés afin de bloquer la naissance de nouveaux capillaires sans pour autant affecter le réseau vasculaire préexistant. Ils ont aussi pour rôle de « normaliser » les conditions physiologiques (pression interstitielle, échanges divers…) de ce dernier.[34]
En comparaison avec d'autres traitements de type chimio- ou radiothérapeutiques, les AIs offrent l'avantage d'être beaucoup plus spécifiques et par conséquent démontrent une toxicité périphérique faible ainsi qu'un profil d'innocuité très favorable. De nombreux exemples d'inhibiteurs angiogéniques sont décrits dans la littérature mais on constate que la majeure partie de ces produits ont pour cible des facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance des cellules endothéliales VEGF, des fibroblastes FGFs ou encore les PDGFs (platelet-derived growth factors).[35]
En outre, l'approche ciblée dans le traitement des cancers a permis ces dernières années le développement de nombreux inhibiteurs se basant sur l'utilisation d'anticorps, de récepteurs solubles ou encore mettant en jeu des voies de signalisation bien spécifiques. Plusieurs produits ciblant la vascularisation tumorale avec une approche différente sont d'ailleurs actuellement en cours d'études cliniques ou précliniques, comme le bavituximab (anticorps monoclonal dirigé contre le composant membranaire phosphatidylsérine) ou encore le NGR-TNF, molécule ciblant spécifiquement le motif peptidique CNGRC de la membrane vasculaire.[36]

Les agents perturbateurs de la vascularisation représentent, de par leur mécanisme d'action, une classe relativement distincte de petites molécules qui vont interagir avec le réseau vasculaire préétabli entourant la cellule tumorale *(Figure 14*). Par leur action directe et rapide sur ce réseau responsable de l'apport en nutriments et notamment de l'O_2 primordial au développement, les VDAs vont entrainer la destruction du système sanguin par des phénomènes d'ischémies et d'apoptose. Ceci va aboutir en définitive à une nécrose centrale de tout le réseau alimentant la cellule cancéreuse.[37] Ce procédé a été montré comme étant la conséquence de la nature imparfaite, perméable et immature des vaisseaux sanguins situé au niveau de la tumeur. Ces capillaires présentent en effet une nette déficience, lors de leur formation, en fibre musculaire lisse ainsi qu'une membrane basale au caractère poreux.[37]

Cependant, certains mécanismes de résistance ont été observé après traitement seul aux VDAs tels que la survie d'un anneau viable de cellules tumorales. Aussi, certaines études ont montré une variabilité au niveau des réponses aux traitements

selon la nature du cancer. En effet, ce phénomène va être conditionné par la nature même du réseau tumoral qui va présenter une instabilité, une fragilité ou encore une taille de jonctions entre les cellules endothéliales différente selon le type de cancer.

Ces agents perturbateurs de la vascularisation sont pour la plupart des composés qui vont être liés à des anticorps ou à des peptides et qui vont cibler soit une toxine, des facteurs pro-apoptotiques ou alors des facteurs procoagulants appartenant à l'endothélium des cellules tumorales.[38]

D'autre part, les petites molécules possédant une activité de type VDA peuvent être divisés en deux sous-groupes : les flavonoïdes et les agents ciblant la tubuline (TBAs).

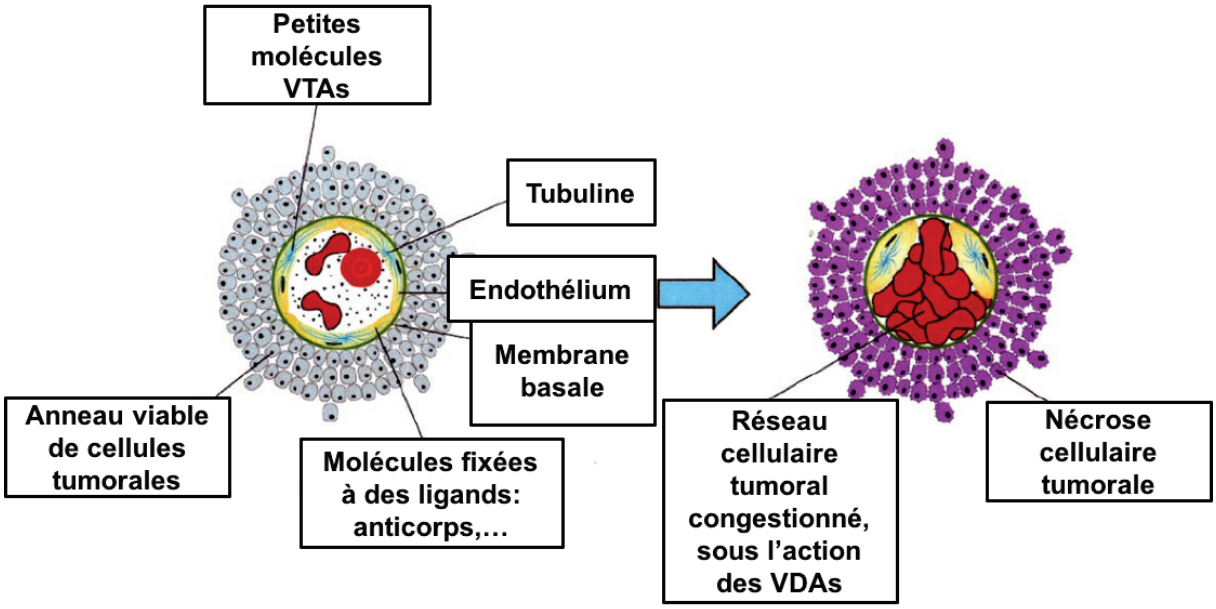
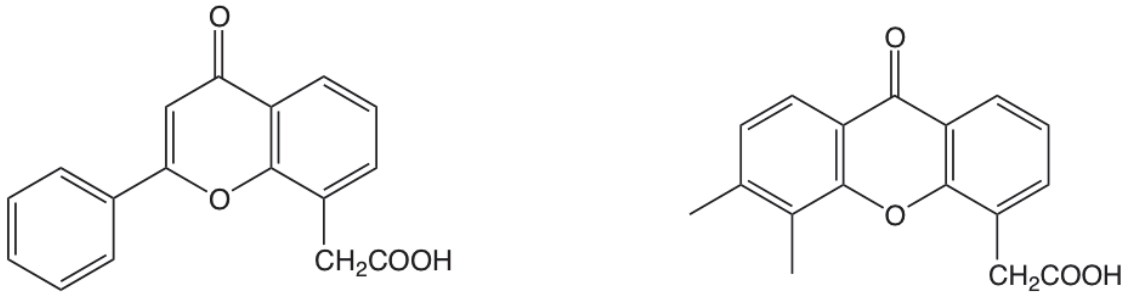


Figure 14: Adapté d'après Thorpe[39], zone d'action des agents perturbateurs de la vascularisation

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques qui peuvent être retrouvé dans une grande variété de végétaux, de fruits ou encore de thés. Ils ont été démontrés comme des agents pouvant inhiber la prolifération des cellules cancéreuses ou encore comme disposant de propriétés anti-angiogéniques[40]. Ils vont entrainer un dérèglement de l'actine composant le cytosquelette, des cassures au niveau des brins d'ADN, l'apoptose des cellules endothéliales ainsi qu'un relargage massif de cytokines.
Le premier flavonoïde disposant d'une activité anti-vasculaire à avoir été identifié est l'acide acétique de flavone ou FAA ; mais ce dernier n'a pas donné les résultats

escomptés lors des phases d'études précliniques chez l'homme.[41] Cette découverte a alors stimulé le développement et la synthèse de nombreux dérivés du FAA, ce qui a notamment abouti à l'identification du composé ASA404 (DMXAA, Vadimezan) et de ses analogues mono- et bi-substitué XAA (xanthenone-4-acetic acid) (*Figure 15*).



FAA ASA404

Figure 15: Dérivés flavonoïdes à activité VDA[33]

Plus récemment, d'autres études sur les dérivés du XAA ont démontrés que ces composés n'induisaient pas les mêmes résultats chez les cellules murines que chez les cellules humaines ; d'où la nécessité de modèles animaux appropriés dans la sélection de médicaments candidats.[42]

Initialement utilisés en tant qu'agents antimitotiques dans les stratégies chimiothérapeutiques, les TBAs ont depuis démontré une activité antivasculaire marquée. En effet, lorsqu'ils sont fixés à la tubuline, ils entrainent une polymérisation des microtubules accompagnée d'une stabilisation du fuseau mitotique (taxanes, épothilones) ou alors la dépolymérisation et donc une instabilité du réseau microtubulaire (colchicine, vinca alcaloïdes).[43]

L'organisation du cytosquelette des cellules endothéliales peut donc être directement perturbée par ces agents, avec pour conséquence des modifications du réseau vasculaire, une réduction du débit sanguin et une désorganisation de la membrane basale. Ceci va entrainer des effets sur la dynamique des microtubules, dont l'incapacité à réaliser des contacts avec les jonctions adhérentes. Plus précisément, les TBAs vont avoir un effet sur la motilité et les interactions intercellulaires, en touchant spécifiquement certaines voies de signalisation. Ainsi, les protéines telles que les VE-cadherine, p120-catenine, ß-catenine ou encore la vinculine, contribuent tous à la formation des jonctions adhérentes à la surface cellulaire et sont les principaux médiateurs de la dynamique des cellules endothéliales.[44] Ces interactions homotypiques, primordiales dans la réalisation

du « bourgeonnement » angiogénique et qui sont directement interconnectés aux récepteurs VEGF, vont finalement être entièrement perturbés par les TBAs.[43]
Le TBA qui a été le plus étudié au cours de ces dernières années n'est autre que la combrétastatine A-4 ou CA-4, décrite de façon exhaustive dans le chapitre suivant.[45]

D'autre agents TBAs tels que le MPC-6827, le CYT 997 ou l'ABT-751, sont actuellement en phase d'études cliniques chez les patients atteints de tumeurs solides métastasiques ou de lymphome non hodgkinien (*Figure 16*).[28,45]

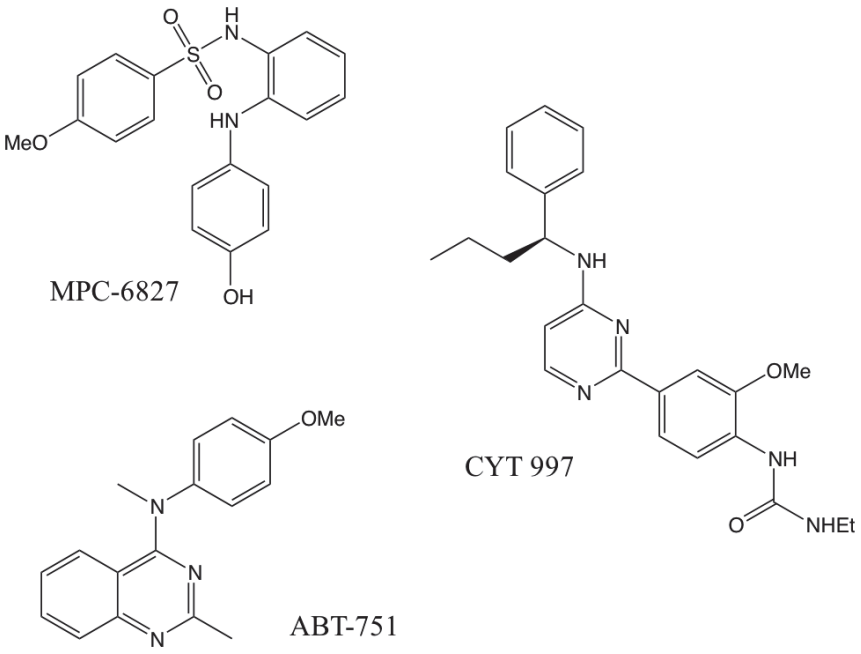


Figure 16 : Quelques exemples de TBAs en cours d'études cliniques[28,45]

Une liste des principaux agents utilisés dans les thérapies antivasculaires a été répertorié dans le *Tableau 3*.

AIs		**VDAs**	
Composé médicament	**Cible thérapeutique**	**Composé médicament**	**Cible thérapeutique**
Bevacizumab Aflibercept Vandetanib	VEGF-A VEGF-A, PIGF VEGFRs, EGFRs, RET	CA-4P AVE9062 OXi4503 MPC-6827 BNC105P ABT-751	Tubuline
MEDI-522 Cilengitide	$\alpha_v\beta_3$ intégrine	VEGF-gélonine	Ab-toxine
A422885.66	Tie-2 angiopoiétine	ASA404	Cytokin induction

		(vadimezan)	VEGFR2
E4G10	VE-cadhérine	Gene therapy Peptide targeting	$\alpha_v\beta_3$ intégrine
Regorafenib	VEGFRs, PDGFR, FGFRs, Tie2, DDR2, Trk2A, Eph2A, RAF-1, BRAF, BRAFV600E, SAPK2, PTK5, Abl	Thérapie photodynamique	Non déterminé
Sunitinib	VEGFRs, PDGFs, KIT, RET, CSF-1R, Flt3		
Endostatine Angiostatine Thrombospondine	Inhibiteur endogène, effet multiple et varié		

Tableau 3 : Liste des principaux agents perturbateurs de la vascularisation et des inhibiteurs de l'angiogenèse utilisés dans les thérapies antivasculaires[35]

4.3 Mécanisme de résistance tumorale aux agents perturbateurs de la vascularisation

Le développement ainsi que l'émergence de VDAs ciblant directement la vascularisation des cellules tumorales a été une avancée importante dans la lutte contre le cancer, donnant des résultats prometteurs sur un spectre large de lignées cellulaires cancéreuses. Mais, en dépit de l'activité marquée de ces composés, de nombreuses études récentes ont montré que les agents perturbateurs de la vascularisation peuvent entrainer l'apparition de phénomènes de résistance limitant l'activité et la sélectivité de ces produits (*Figure 17*).
L'exemple le plus fréquent réside dans l'apparition d'un anneau résiduel cellulaire viable aux abords de la tumeur après traitement aux VDAs.[46] Ces cellules, néoplasiques, vont survivre grâce à l'apport en nutriment par les vaisseaux situés en périphérie de la cellule cancéreuse. Le réseau périphérique n'est en effet pas affecté par un traitement avec des VDAs, permettant donc une reprise de la croissance tumorale. Aussi, il a été démontré que les cellules composants cet anneau résiduel présentent un phénotype résistant à l'hypoxie et vont être, de par l'apport en nutriment périphérique, moins dépendant de l'angiogénèse tumorale. Ils vont alors permettre l'expression de nombreux facteurs tels que ceux de croissance VEGFs, induit par l'hypoxie HIF-α, ou encore d'autres lié au phénotype angiogénique de ces cellules. En conséquence, il en résultera une survie des cellules tumorales renforçant même leur caractère métastasique.[46]

Un autre mécanisme de résistance est lié à l'implication des macrophages associés

aux tumeurs (TAMs).[47] Les TAMs sont des monocytes circulant que l'on retrouve à proximité et/ou l'intérieur même de la masse tumorale et qui pourraient aussi bien favoriser le développement que la suppression des cancers. Ces macrophages spécifiques interagissent avec un nombre important de facteurs de croissances, de cytokines et d'autres protéines, en participant directement à la différenciation phénotypique et fonctionnelle de ces derniers. Une corrélation entre le taux de TAMs et un mauvais pronostic vital a été mis en avant dans différents cancers tels que ceux du poumons, du sein ou encore du carcinome ovarien.[47]

Les cellules endothéliales progénitrices circulantes ou CEPs, sont par définition des cellules d'origine médullaires qui sont responsables de la formation de vaisseaux sanguins durant la phase embryonnaire du développement prénatal.[48] Les CEPs ont la capacité de proliférer et de se différencier en des cellules endothéliales immatures qui peuvent alors devenir le foyer de la vasculature tumorale. Leur implication dans l'angiogenèse tumorale a donc été particulièrement étudiée lors de ces dernières années. Pour preuve, Mancuso *et al.*[49] ont démontré que de fortes concentrations en CEPs étaient généralement détectée dans les concentrations circulantes des patients atteints d'un cancer, et pouvait être corrélé à une augmentation de la concentration en VEGF dans le réseau sanguin de la cellule cancéreuse. Ceci prouve que ces cellules endothéliales progénitrices jouent un rôle central dans le développement et la mise en place du système vasculaire tumoral. De la même façon, des recherches plus poussées ont mis en avant la localisation à l'intérieur même de la vascularisation tumorale des CEPs, ce qui va grandement faciliter leur incorporation dans le réseau vasculaire fonctionnel.[50]

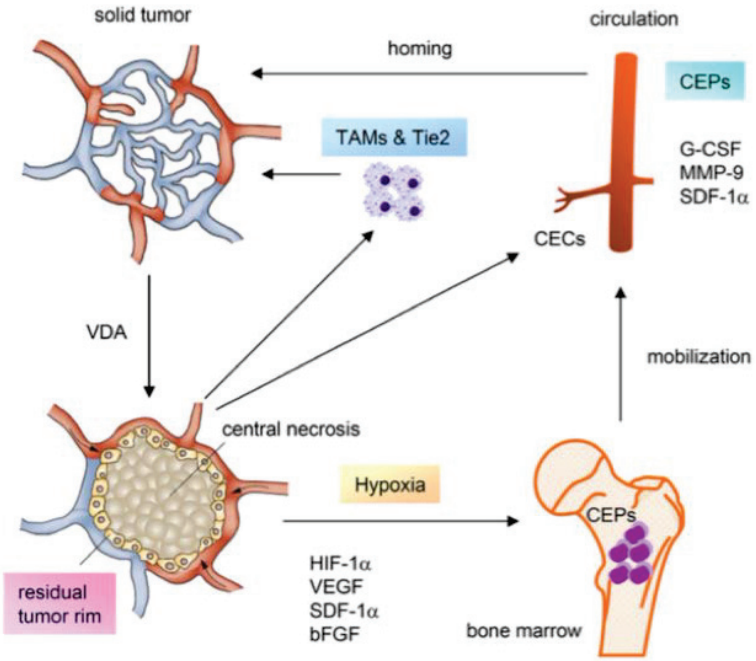


Figure 17: Mécanismes de résistance tumorale aux VDAs[51]

4.4 Intérêt d'une combinaison des VDAs

La combinaison de VDAs avec d'autres agents chimiothérapeutiques communément utilisés a démontré une efficacité accrue dans le traitement des cancers. En effet, il a été constaté une nette réduction de l'anneau résiduel cellulaire viable au niveau périphérique du cœur tumoral, habituellement observé après traitement aux VDAs[37]. Ainsi, la combinaison d'AIs et de VDAs entraine un effet synergique ou additif dans les stratégies antitumorales, donnée qui a été confirmée dans les études précliniques menées au cours de ces dernières années.[38]

Shake *et coll*. ont par exemple démontré qu'un prétraitement *via* des inhibiteurs de facteurs de croissance VEGF diminuaient le recrutement de cellules tumorales progénitrices, impliquées dans les phénomènes de résistance, et amélioraient l'effet antivasculaire des VDAs.[52]
Aussi, Siemann *et coll.* ont mis en avant un effet synergique lors de l'utilisation du bevacizumab en combinaison avec l'OXi4503 (CA-1P), dans le traitement des cancers rénaux.[46] Ces résultats ont par ailleurs stimulé d'autres recherches tel des essais en combinaison entre la CA-4P et le bevacizumab, chez des patients souffrant de cancers en stade avancé. Les observations subséquentes à ces recherches ont prouvé que le bevacizumab permettait un maintien de l'activité antivasculaire induite par la CA-4P.[53]

Un autre exemple marquant de ce type de thérapie concerne l'ASA404, agent antivasculaire, utilisé en combinaison avec le paclitaxel ou le carboplatine, chez des patients atteint par une tumeur maligne du poumon non à petites cellules (NSCLC) en stade III ou IV[54]. D'autres essais en combinaison de ce composé avec des dérivés de la famille des taxanes ont également été réalisés sur des modèles de glioblastomes murins et en phase II chez des patients souffrant de cancers de la prostate avancé[55]. Il a alors été observé que la masse tumorale diminuait dans les modèles de glioblastomes. En revanche, chez les patients souffrant des cancers de la prostate, les mécanismes de l'effet accru antitumoral doivent encore être élucidés ; une étude clinique en phase III étant actuellement en cours.

D'autres taxanes tels que le docetaxel ou le paclitaxel ont de la même façon été testés en combinaison avec des VDAs, le ZD6126 et le pinabuline (NPI-2358) respectivement.[56] Ces deux agents déstabilisants du fuseau ont montré un effet synergique anticancéreux dans les études cliniques en phase I, sur les patients atteint de tumeurs solides ou de NSCLC avancé.[57]

Les inhibiteurs de topoisomérases I et II tels que l'irinotécan, ont aussi été testé dans des études précliniques en association aux VDAs. L'effet de l'irinotécan a été évalué en combinaison au dérivé KML001 (sodium métaarsenite, en Phase II

d'étude clinique pour les tumeurs solides) ou au trioxyde d'arsenic (TRISENOX®), et la doxorubicine en bithérapie avec la CA-4P, l'OXi4503 ou l'OXi8007.[58,59,60] Les mêmes observations que précédemment ont alors pu être remarquées : des résultats encourageants caractérisés notamment par des activités antitumorales améliorées.

En persepective, il est important de noter que l'utilisation des VDAs en combinaison avec d'autres agents antitumoraux possédant un mécanisme d'action différent démontre des résultats très prometteurs. Le nombre d'essais cliniques incorporant ce type de composé est d'ailleurs actuellement en pleine expansion sur différentes pathologies. Surtout, certaines molécules telles que le DMXAA affichent une cytotoxicité et des activités antitumorales qui poussent à l'optimisme.

5. LA COMBRETASTATINE A-4 ET SES DERIVES EN TANT QU'AGENTS ANTITUMORAUX PERTURBATEURS DE LA VASCULARISATION

5.1 De la découverte de la Combrétastatine A-4 à son application en tant qu'agent anticancéreux

Les Combrétacées représentent une famille importante de végétaux regroupant à la fois des arbres, arbustes et des plantes généralement localisés dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique et de l'Inde. Certaines espèces appartenant au genre *Combretum* sont utilisées depuis plusieurs décennies en médecine traditionnelle pour traiter diverses pathologies telles que la malaria, les hépatites, le diabète ou encore la diarrhée.[61] La récolte et l'étude approfondie de ces végétaux a permis de mettre en avant la présence de composés actifs triterpèniques, flavonoïdes ou encore d'autres amino-acides non protéinogènes.



Figure 18: L'arbuste sud-africain *Combretum caffrum*[62]

Les combrétastatines, molécules dont la structure s'apparente à celle de la colchicine, ont été découvertes de façon similaire. Les composés appartenant à cette classe de stilbénoïdes vont tous présenter trois motifs structuraux en commun : un noyau A triméthoxybenzène, un noyau B substitué en –C2, –C3 et/ou en –C4 ainsi qu'une liaison éthylénique qui va relier ces motifs.
En particulier, un des composés de cette classe connu sous le nom de combrétastatine A-4 ou CA-4 (*Figure 19*), a été découvert comme étant un puissant agent antiprolifératif et le plus actif de la série des combrétastatines (avec la CA-1). Ce dernier, a été pour la première fois extrait et isolé à partir du saule sud-africain *Combretum caffrum* par Pettit *et al.* en 1989[1] : il a alors été vastement étudié pour son activité anti-tubuline (*Figure 18*).[1]

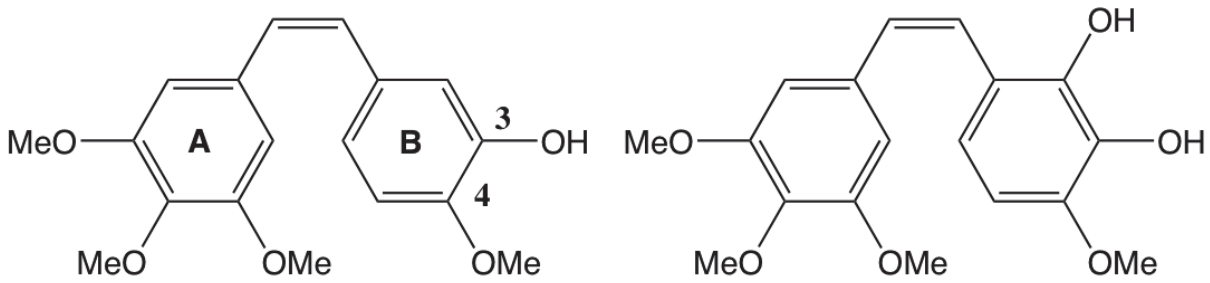


Figure 19: Structure chimique de la (Z)-Combretastatine A-4 (à gauche) et de la CA-1 (à droite)

En effet, la CA-4 montre une activité extrêmement marquée en se fixant spécifiquement sur les dimères de tubuline, inhibant ainsi leur polymérisation en microtubule et entrainant ainsi une destruction du cytosquelette. Cette molécule, va en fait se lier au niveau d'un site dit de la colchicine, et agir en tant que poison du fuseau mitotique.[2] La conséquence directe de ce phénomène sera un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M de la mitose déclenchant un mécanisme d'apoptose qui sera responsable, finalement, de la perturbation du système vasculaire tumoral.[2]
De plus, ce composé s'est montré actif sur un spectre large de cancers et notamment sur des lignées multi-résistantes.[2]
Cependant, il est admis que la CA-4 est un composé qui, lorsqu'administré *in vivo*, va voir sa double liaison de configuration (*Z*) reliant les noyaux A et B isomériser en double liaison (*E*), thermodynamiquement plus stable *(Figure 20*). Cette modification structurale est délétère puisqu'elle abaisse drastiquement l'activité de ce type de molécule (jusqu'à plus de 30 fois).[63] Aussi, cette molécule possède une faible solubilité *in vivo* ce qui limite son utilisation. Mais, la CA-4 est également un composé de structure relativement simple, permettant donc de procéder à de nombreux procédés de pharmacomodulation aussi bien sur les

noyaux A et B que sur la double liaison centrale.

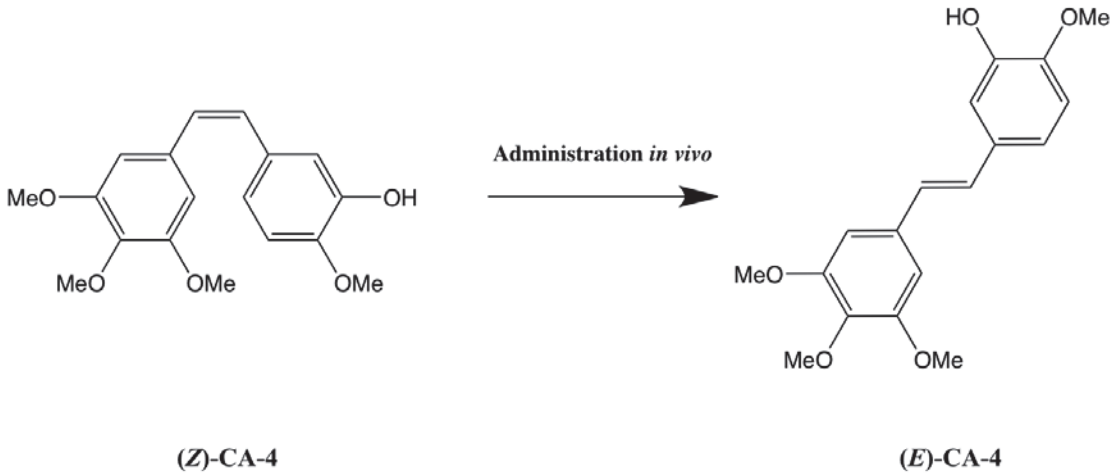
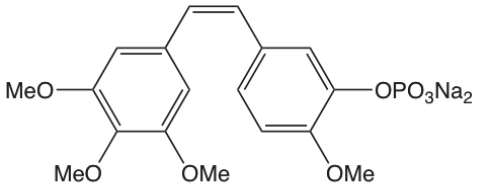
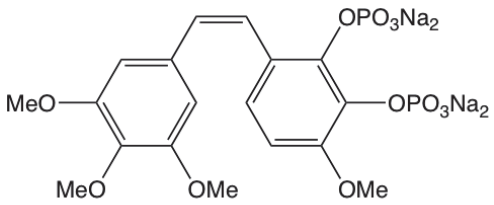


Figure 20: Isomérisation de la double liaison (*Z*) en double liaison (*E*) sur la CA-4[58]

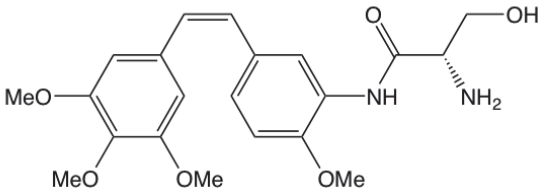
C'est ce qui a inspiré la synthèse de la combrétastatine A-4 phosphate (CA-4P), analogue possédant de biens meilleurs paramètres de solubilité et qui est actuellement en phase II et III d'évaluation clinique (Cancer de la thyroïde, NSCLC (cancer des poumons non à petites cellules)). Les résultats préliminaires de ces investigations sont d'ailleurs prometteurs avec une tolérance accrue ainsi que des toxicités hépatique et rénale nettement moins importante de ce composé[18]. D'autres dérivés de la CA-4 tels que le AVE8062[64] et l'OXi4503[65] seul et en combinaison sont également en cours d'essais cliniques, en phase II/III et phase I respectivement (*Figure 21*).



CA-4P



Oxi4503



AVE8062

Figure 21: Analogues de la CA-4 actuellement en phase d'essais cliniques: CA-4P, OXi4503 et AVE8062[66]

5.2 Relations structures-activité (SARs) de la CA-4

Les combrétastatines d'origine naturelle sont des substances très actives disposant de valeurs d'activités antiprolifératives de l'ordre du nanomolaire. Cependant, dans le but d'optimiser encore d'avantage leur spécificité et leur paramètre de solubilité, de nombreux dérivés ont été synthétisés et étudié au cours de ces dernières années.
Les modifications structurales se portent principalement sur les trois domaines pharmacophoriques que sont les deux noyaux aromatiques A et B ainsi que la double liaison oléfinique les reliant.

5.2.1 Modification sur le noyau aromatique A triméthoxybenzène

Dès la découverte de la classe des combrétastatines, le noyau aromatique A triméthoxybenzène a été décrit comme étant un élément primordial à la fixation de ce type de molécule sur la tubuline et par conséquent, est essentiel à son activité. En effet, ce motif cyclique est connu comme étant celui qui va se lier spécifiquement au site de la colchicine des hétérodimères de tubuline et permettre l'activité cytotoxique (*Figure 22*). La présence de ce pharmacophore sur divers autres composés tels que la colchicine, la steganacine ou encore la podophyllotoxine en fait donc un élément caractéristique commun aux agents antitubulines (*Figure 23*).
La substitution de l'un des groupements méthoxy entraine dans la très grande majorité des cas une baisse significative d'activité et/ou de spécificité ; de nombreux procédés de pharmacomodulations par des halogènes ou d'autres groupements alkyles ont été testés, sans qu'aucun ne se révèle particulièrement efficace. De plus, en comparaison avec la CA-3 qui possède un groupement hydroxyle à la place du *para*-méthoxy, la CA-4 démontre une affinité et une activité antitubuline beaucoup plus marquée (CA-4 EC_{50} = 9 nM ; CA-3 EC_{50} = 0,026 µg/mL) (*Figure 23*).[67,68]

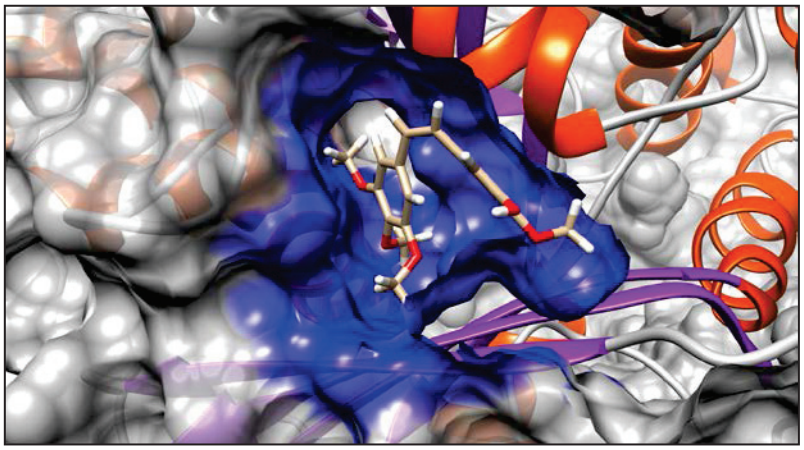


Figure 22: Site de fixation de la colchicine sur l'α-tubuline (docking de la CA-4 dans la structure X-ray 1SA0.pdb)

Lors de leurs multiples recherches, Pettit *et al.* ont synthétisé toute une série d'analogues de la CA-4 en substituant les groupements *m*-méthoxy par des atomes fluors (*Figure 24*).[69] Tous ces dérivés, ont montré des valeurs d'activités antiprolifératives acceptables, sans pour autant se montrer plus actifs que la CA-4 naturelle (dérivé fluoré de la *Figure 24*, Inhibition de la polymérisation de la tubuline TPI IC_{50} = 1,5 µM, CA-4 TPI IC_{50} = 9 nM). Le remplacement du fluor par des groupements plus volumineux à l'instar du brome ou du chlore, n'a donné que des résultats décevants, les composés synthétisés étant très peu voire complétement inactifs. Ceci a permis de mettre encore plus en avant le rôle clé joué par les groupements *méta*- et *para*-méthoxy dans l'activité cytotoxique des analogues de la CA-4.

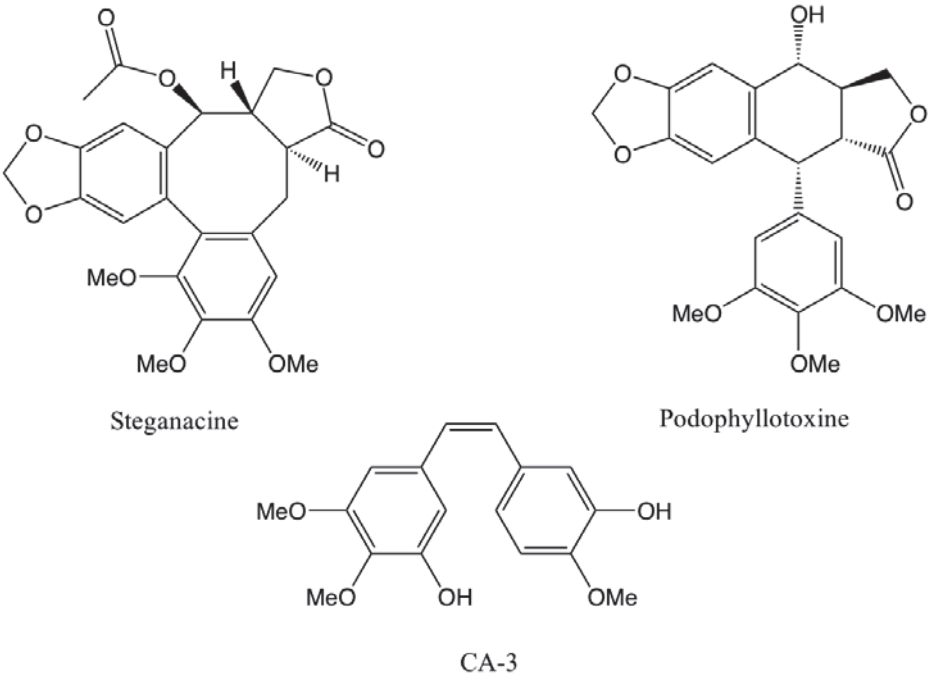


Figure 23: Structure de la stéganacine, podophyllotoxine et de la CA-3[66]

Un autre groupe de recherche mené par Hadfield[70] s'est focalisé sur la substitution du noyau A triméthoxybenzène par un triméthylbenzène (TPI IC_{50} = 0,12 µM) (*Figure 24*).

Les conclusions et observations liées à ces études furent les mêmes que celle de Pettit avant lui : une légère perte de spécificité et des activités antiprolifératives conservées.

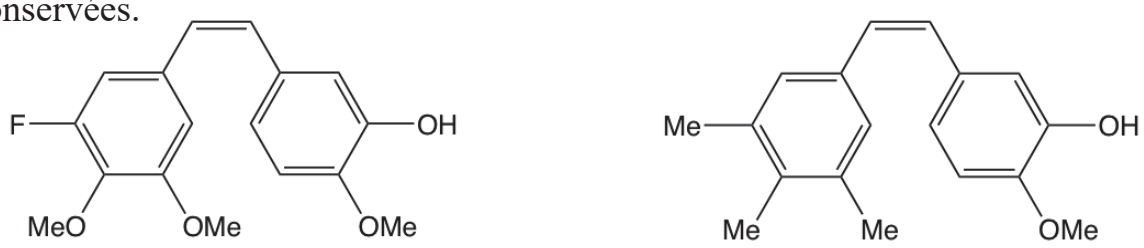


Figure 24: Quelques exemples d'analogues de la CA-4 substitués sur le noyau A, avec un dérivé fluoré (à gauche) et un dérivé méthylé (à droite)[62,63]

Ces quelques exemples de recherches menés par différents groupes nous montrent que le noyau A est un motif central dont la conservation dans la structure naturelle de la CA-4 n'est pas une coïncidence. Son implication dans l'activité, la spécificité ou encore dans les propriétés en tant qu'agent antiprolifératif de la CA-4 ne font aucun doute.
Cependant, certains mystères demeurent quant à la façon dont le 3,4,5-triméthoxybenzène affecte directement tous ces paramètres et pourrait ne pas être aussi crucial qu'il n'y parait. L'émergence de nouveaux dérivés bioisostèriques du noyau A de la CA-4 serait d'une grande aide, et pourrait apporter d'autres éléments de réponse concernant le rôle spécifique joué par ce groupement.

5.2.2 Noyau B aromatique de la combrétastatine A-4

Connu également sous le nom de « noyau B non essentiel », ce motif a longtemps été et est toujours très étudié. Le nombre impressionnant de publications dans la littérature concernant uniquement les pharmacomodulation et évaluations biologiques de dérivés du noyau B de la CA-4 en est une preuve notable. Ce motif, relativement simple structurellement, a été l'objet de nombreuses substitutions donnant lieu au design d'analogues particulièrement actifs et aux propriétés physico-chimiques optimisées. L'exemple le plus évident est celui de la CA-4P, où la substitution de l'hydroxyle par un groupement phosphate a permis d'améliorer grandement la solubilité et l'activité VDA.
Plus généralement, les procédés de pharmacomodulations sur ce noyau sont divisés en deux catégories :

- le remplacement direct du noyau B par un hétérocycle différent,
- la remplacement des substituants présents sur le noyau B.

5.2.2.1. Pharmacomodulation des substituants présents sur le noyau B

Dépendamment de la nature de la substitution qui va être réalisée, différents mécanismes de synthèse vont être utilisés. Le noyau B de la CA-4 présente initialement un groupement méthoxy en *para* et est substitué par un hydroxyle en position *méta*.
La stratégie initiale d'étude a donc logiquement consisté au remplacement de ces deux groupements fonctionnels par un autre substituant ou bioisostère. Les résultats préliminaires ont rapidement montré que le méthoxy en position *para* était indispensable à l'activité de ces dérivés alors que l'hydroxyle, lui, pouvait être facilement remplacé.[71] Pour vérifier ces hypothèses, la synthèse du composé **F** désoxy (*Figure 25*), s'est avéré fondamentale. Cette expérience a en effet montré que cet analogue disposait d'activités biologiques quasiment égales à celle de la CA-4 (IC_{50}= 0.1 nM sur lignée SKMEL-5). En revanche, la synthèse du

composé H ne possédant pas de groupement méthoxy en *para (Figure 25*), a révélé une absence totale d'activité aussi bien cytotoxique qu'antiproliférative.

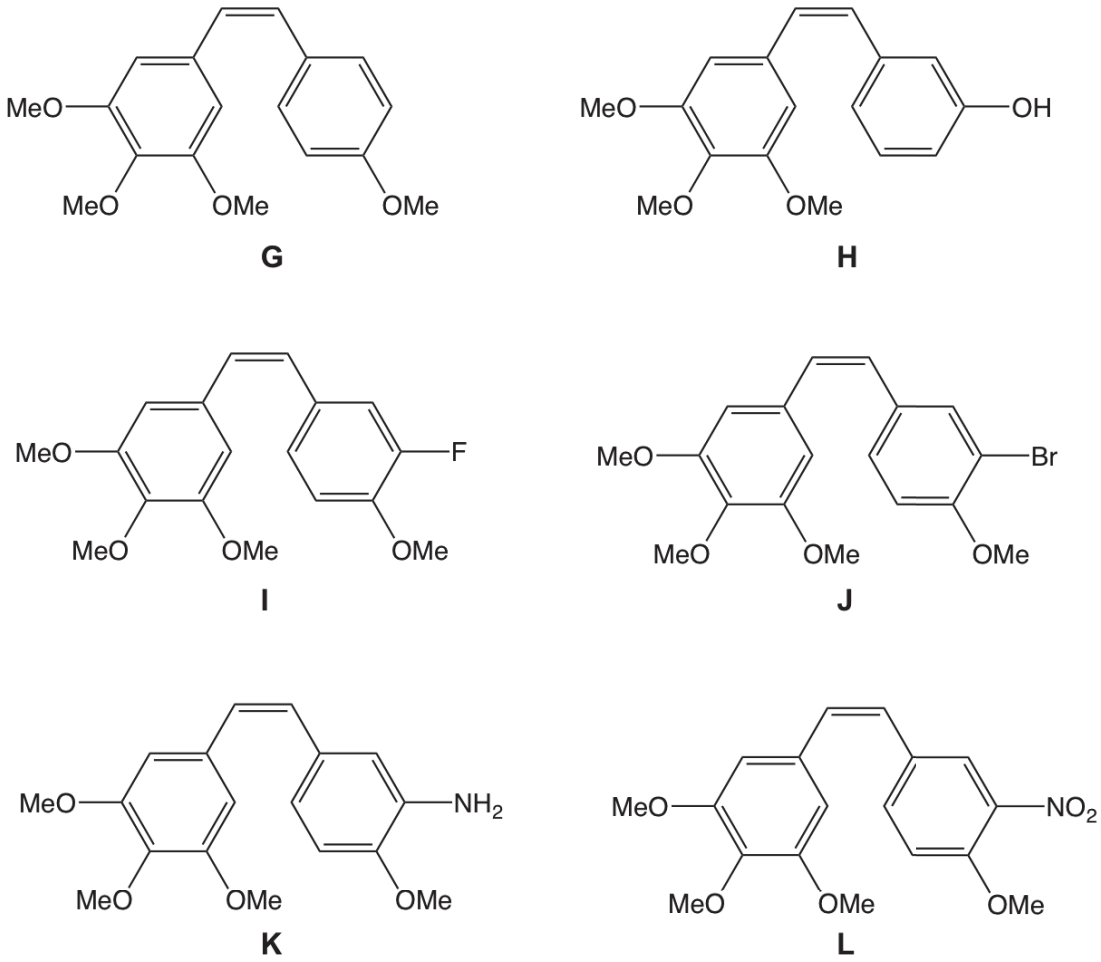


Figure 25: Quelques exemples d'analogues de la CA-4 substitués sur le noyau B[63]

Aussi, le déplacement de ce groupement de la position *para* aux positions *ortho* et/ou *méta* entraine une baisse de l'activité des composés. Ces résultats confirment donc tout à fait les observations et autres hypothèses de départ.
C'est d'ailleurs grâce à ces informations que les premiers composés les plus intéressants ont été synthétisés. Par exemple, le remplacement de l'hydroxyle par un autre groupement électroattracteur tel que le fluor (composé I, *Figure 25*) a démontré que ce dernier était un bien meilleur inhibiteur que la CA-4 elle-même (IC_{50}= 4 nm sur lignée K562).[69] Cependant, le remplacement par un autre halogène tel que le brome (composé J, *Figure 25*) a aussi conduit à un dérivé environ dix fois moins cytotoxique (TPI IC_{50}=1.1 µM), preuve que d'autres

paramètres tels que l'encombrement stérique étaient à prendre en compte.
Un autre bel exemple d'analogue substitué sur le cycle B, a été mis en avant par la substitution isostérique de l'hydroxyle OH par une amine NH_2. En effet, cette transformation a permis de former le dérivé (composé K*, Figure 25*) qui affiche des valeurs d'activités biologiques légèrement supérieures à celle de la CA-4, stimulant ainsi la recherche sur ce composé.[72] C'est ainsi que la prodrogue associée AVE8062 a été synthétisée, et est actuellement en phase I et II d'essais cliniques en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques sur différentes tumeurs solides et sur les cancers du poumons métastasiques non à petites cellules (NSCLC).[73,74]
Le composé L (*Figure 25*) substitué par un groupement nitro $–NO_2$, est quant à lui légèrement moins actifs en comparaison à la CA-4, (TPI IC_{50} = 1.8 µM alors que CA-4 TPI IC_{50}= 1.2 µM).[75] Ceci serait dû au caractère extrêmement electroattracteur de ce groupement, modifiant ainsi que la densité électronique du noyau aromatique et sa réactivité au niveau moléculaire.
Plus récemment, certains chercheurs se sont penchés sur la substitution du groupement hydroxyle par un acide boronique. Cette stratégie s'est révélé très intéressante car ce type de dérivé présente habituellement une excellente solubilité. Par ailleurs, après évaluations biologiques, ce dérivé a affiché des valeurs de cytotoxicité et d'inhibition de la polymérisation de la tubuline accrues, en faisant une piste d'étude à explorer davantage.[76,77]
Pour finir, le groupe de Pinney a cherché à insérer un groupement azoture $-N_3$ en position *méta*.[78] Bien qu'inintéressante en vue de la synthèse en soi de composé actif, cette autre pharmacomodulation pourrait être un outil en vue de former des analogues plus complexes (*via* une cycloaddition de Huisgen, « Click chemistry » …) ou encore des biomarqueurs.

Comme précisé ci-avant, les études menées sur la substitution du groupement méthoxy en *para* du noyau B (par Cushman[71] notamment) se sont révélées dans la majorité des cas délétère en abaissant grandement voire totalement l'activité antiproliférative des composés.[71] La substitution par un éthoxy ou un propoxy a abouti à des conclusions similaires : une perte nette d'activité. De même, le remplacement de l'oxygène par un soufre plus volumineux mais moins éléctronégatif à conduit a l'obtention de composés inactifs. L'atome d'oxygène semble donc être fondamental par sa capacité à accepter, former très facilement des liaisons hydrogènes. Lors de cette même étude, la substitution du groupement méthoxy par un chlore puis par un méthyle a montré une baisse de la cytotoxicité sans pour autant affecter l'activité antitubuline.
Finalement, ce groupement méthoxy semble être un motif clé afin d'obtenir des molécules cytotoxiques. En revanche, il ne semble joué aucun rôle dans la capacité de la CA-4 et de ses analogues à se lier puis inhiber la polymérisation de la tubuline en microtubule.

Les pharmacomodulations du noyau B se sont focalisé sur les substituants en *para*, *méta*, mais aussi sur la position *ortho* qui n'est initialement pas substituée. Aussi, l'introduction d'un dérivé sur cette position influence directement l'angle dièdre formé par le noyau B et la double liaison (*Z*) (*Figure 26*). Ainsi, si l'angle obtenu après insertion d'un substituant diffère de façon négligeable avec la CA-4, l'obtention de composés bloqués « conformationnellement » va avoir pour conséquence des groupements fonctionnels induisant une conformation avantageuse, conduisant potentiellement au développement de composés plus actifs que le produit naturel.[79]

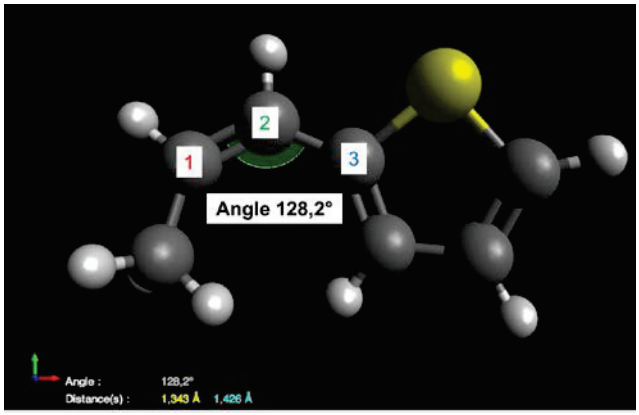


Figure 26 : angle dièdre des analogues stillbènes (*calculé via Avogadro*®) de la CA-4

5.2.2.2. Remplacement du noyau B par un motif hétérocyclique

Un autre exemple de développement d'analogues de la CA-4 consiste en la synthèse de dérivés possédant un cycle B différent, avec une préférence pour un hétérocycle. Ce type de pharmacomodulation est très répandu dans l'étude des relations structure-activité puisqu'il permet potentiellement de créer des structures disposant d'une biodisponibilité, solubilité et activité optimisées. L'établissement de nouvelles interactions (hydrophobes, hydrophiles, électrostatiques…) avec les cibles thérapeutiques peut aussi être une des conséquences de ces pharmacomodulations.

Plusieurs remplacements du noyau B ont donc été réalisées avec par exemple ceux correspondant à la substitution du cycle phénolique par un benzo[*b*]thiophène ou un benzofurane. Simoni *et coll*. ont par ailleurs démontré que ces composés affichaient une certaine activité et induisaient la formation de cellules polynucléées, avec des profils de distribution en chromatine anormaux.[80] Par ailleurs, l'introduction d'une fonction hydroxyle ou de groupements hydrophobes peu encombrants en position -2 et -3 de l'hétérocycle a donné des résultats prometteurs ainsi que de meilleures activités en comparaison aux produits initiaux.
Ainsi, et comme démontré par Sanjayan *et coll.*, la synthèse d'hybrides

nocodazoles de la CA-4 s'est révélé particulièrement intéressante. En effet, le remplacement du noyau thiophène de ce dernier dans une structure de type CA-4 permet une meilleure fixation au niveau du site de la colchicine de la tubuline et de ce fait, une activité antiproliférative plus importante (*Figure 27*).[81]
De la même façon, la synthèse de nouveaux dérivés benzoxazolone a fait très récemment l'objet d'études poussées par Gerova *et coll.*[82]. L'évaluation de l'activité cytotoxique de ces composés a alors démontré des IC_{50} inférieurs à 1 µM sur de nombreuses lignées résistantes aux traitements habituels telles que HT-29, HepG2 ou encore K562 (*Figure 27*).
Tout aussi récemment, d'autres analogues de type dihydroindolone ont été synthétisé par Andreani *et coll.,* et ont montré d'excellentes activités antiprolifératives: le composé le plus actif présentant même des IC_{50} de l'ordre de 100 nM sur des lignées cellulaires cancéreuses du sein, du colon et leucémiques (*Figure 27*).[83]
Gagné-Boulet *et coll.* ont quant à eux développé tout une librairie de bioisostères comme par exemple les styryl-N-phényl-N-éthylurée (SEU), les styryl-N-phényl-N-(2-chloroéthyl)urée (SCEU) ou encore les styrylphenylimidazolidin-2-ones (SIMZ). Parmi ces derniers, le dérivé triméthoxyphenyl-SIMZ CA-4 dispose d'une excellente activité inhibitrice sur les cellules HT-29, affichant une IC_{50}= 1,7 nM (*Figure 28*).

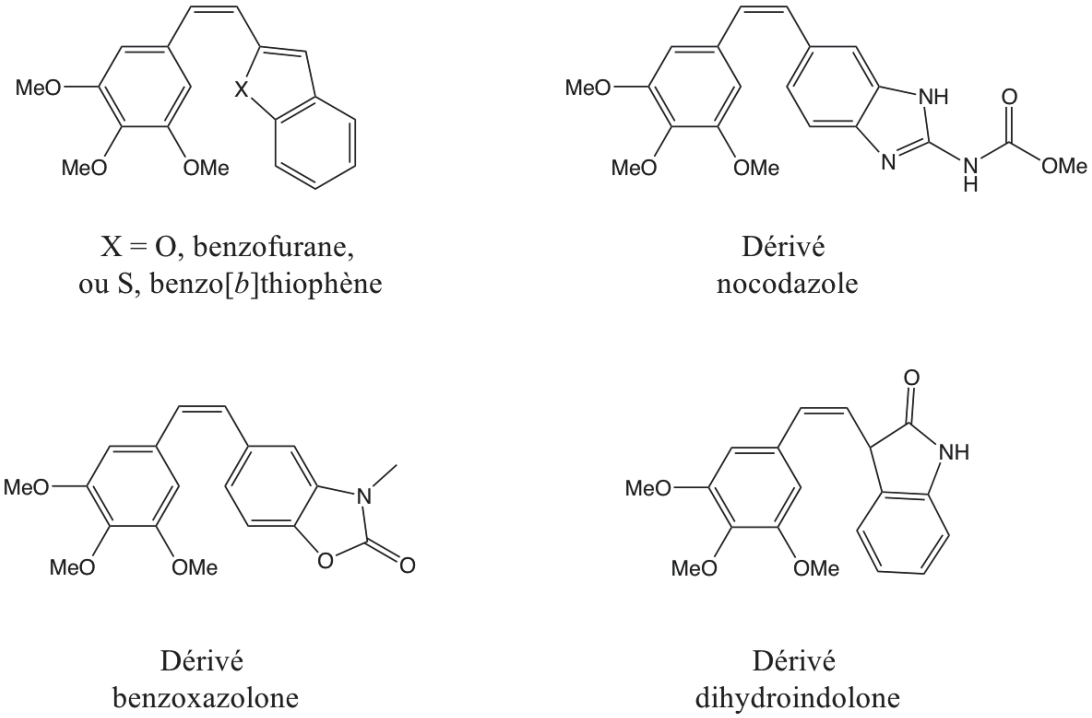


Figure 27 : Exemples de pharmacomodulation du noyau B de la CA-4 [72,73,74]

En comparaison, les SEU n'ont démontré que de très faibles activités, certains

étant même complètement inactifs. Ces analogues se lient également spécifiquement sur le site de la colchicine, bloquent le cycle cellulaire en phase G2/M et entrainent la dépolymérisation du fuseau microtubulaire.
De leur côté, Duan *et coll.* ont mené leurs études sur les composés acylhydrazones, avant d'évaluer leur activité inhibitrice directement sur la tubuline. Le produit le plus intéressant, possédant un noyau benzyle greffé sur le groupement indolique, affichait des activités antiprolifératives comprises entre 0,08 et 35 µM sur différentes lignées cancéreuses. En revanche, bien que les études de modélisation moléculaire aient démontré une conjugaison spécifique sur le site de la colchicine, les activités cytotoxiques de ce composé se montrèrent très faibles.
De la même façon, et bien que la substitution du noyau isovaniline par un groupement phényle ait donné des résultats peu probants, le groupe de Medarde a tenté d'insérer un noyau naphtalène en lieu et place de ce dernier.
Malheureusement, ici encore le composé obtenu a démontré une activité cytotoxique et antitubuline moindre, environ 4 à 5 fois plus faible que celle de la CA-4. D'autres types de dérivés azotés tel que les analogues quinoline et quinoxaline, plus solubles, ont également été étudiés par Medarde *et coll*. Etonnement, le composé quinoline a montré une activité cytotoxique beaucoup plus faible que celle de la CA-4 alors que son activité antitubuline fut conservé (*Figure 28*).

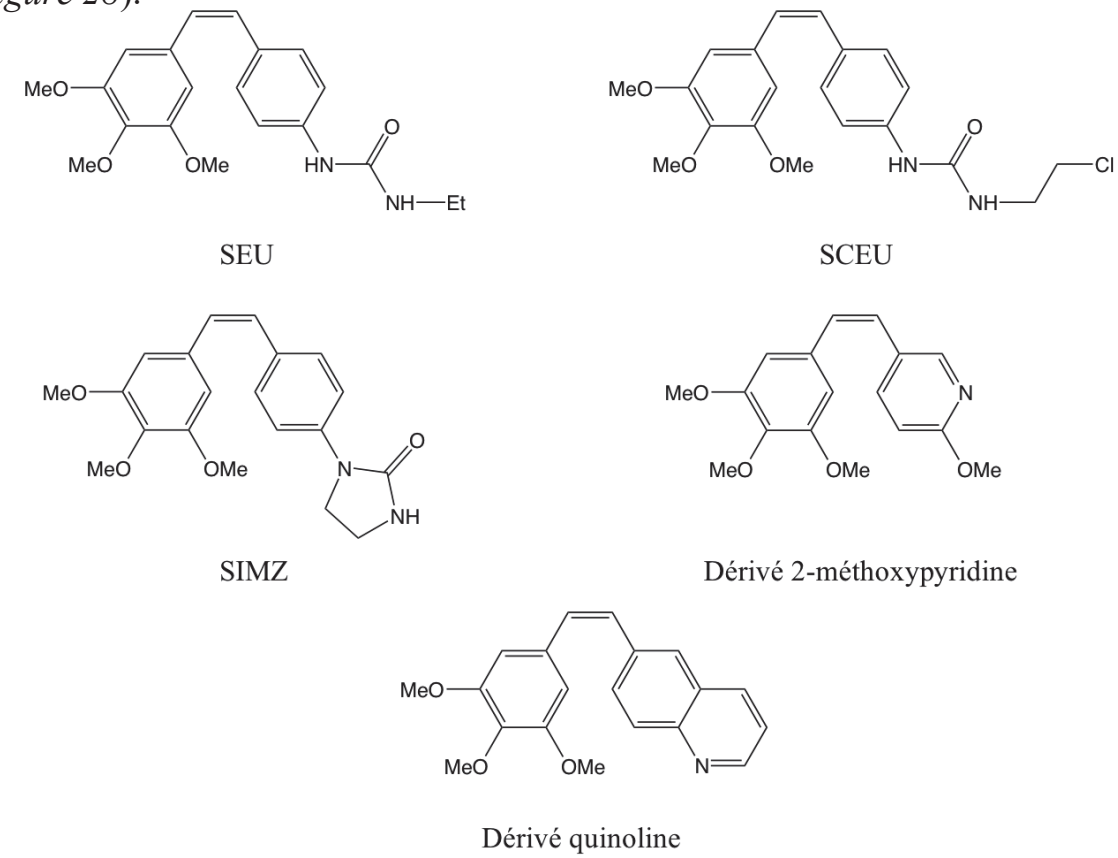


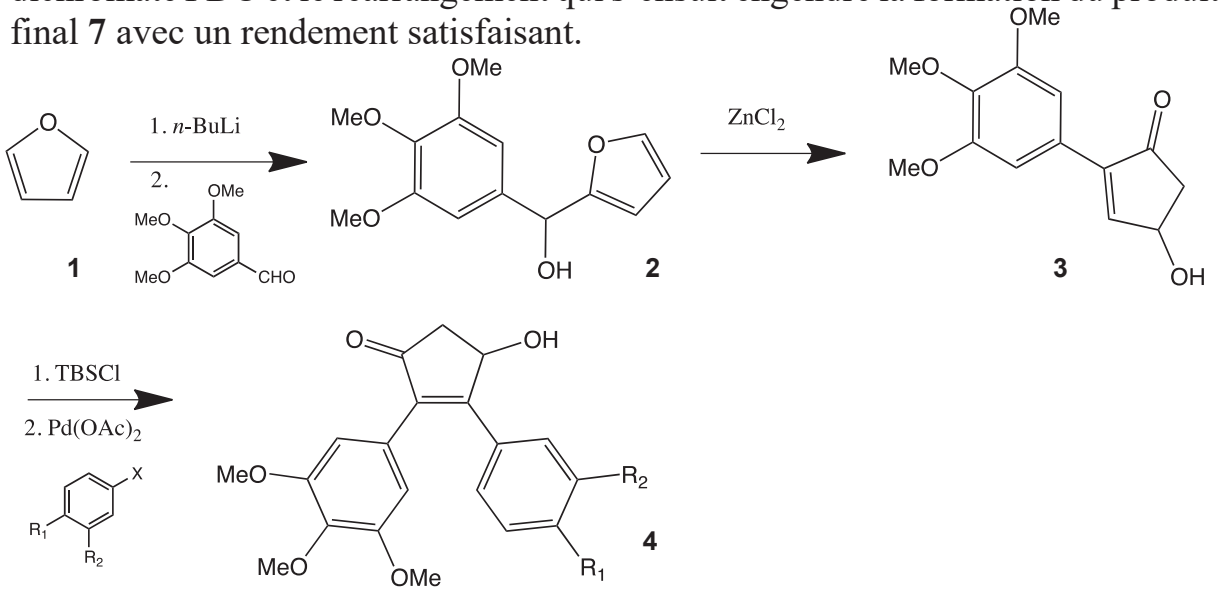
Figure 28: Exemples de pharmacomodulation du noyau B de la CA-4[75]

Finalement, les dérivés quinoxalines n'ont quant à eux pas donné des résultats permettant une possible utilisation en tant qu'inhibiteur spécifique de la tubuline.[84]

5.2.2.3. Modification de la double liaison cis-méthylène reliant les noyaux A et B

Parmi les nombreuses modifications structurales envisagées, le remplacement de la double liaison de configuration spécifique (*Z*) reliant les deux cycles aromatiques A et B offrent de nombreux avantages tels que l'amélioration des caractéristiques physico-chimiques, la rétention de la configuration, ou encore l'amélioration du potentiel biologique des composés.
Aussi, ces modifications structurales permettent d'augmenter la rigidité des composés bloqué stériquement et notamment lors de l 'incorporation de cycle en lieu et place de la double liaison *cis*.

Un exemple marquant de ce type de pharmacomodulation a été démontré par Gurjar et coll. qui ont synthétisé des dérivés cyclopentanone de la CA-4 (*Schéma 1*).[85] Leur étude, focalisée sur la synthèse et l'évaluation biologique de composés 2,3-diaryl-4/5-hydrocyclopent-2-èn-1-one a mis en avant une cytotoxicité accrue sur un panel important de lignées cellulaires cancéreuses humaines (pancréas, larynx, ovaire, colon et poumons) ainsi qu'une activité anti-tubuline. Le procédé de synthèse consiste dans un premier temps en la condensation du 2-furanyllithium sur le **1** pour conduire au 2-furylméthanol. Ce dernier est alors transformé en 2-aryl-4-hydroxycyclopentènone **3** par addition de l'acide de Lewis $ZnCl_2$ qui, après avoir été protégé (composé **5**), subit un couplage de Heck[86] avec l'halogénure aromatique conduisant à une série des 4-hydroxycyclopentènones.
L'ether de silyle **5** permet aussi la synthèse de la série des 5-hydroxycyclopentènones par réaction d'addition 1,2 avec un organomagnésien arylique sur la fonction cétone. L'oxydation subséquente avec le pyridinium dichromate PDC et le réarrangement qui s'ensuit engendre la formation du produit final **7** avec un rendement satisfaisant.



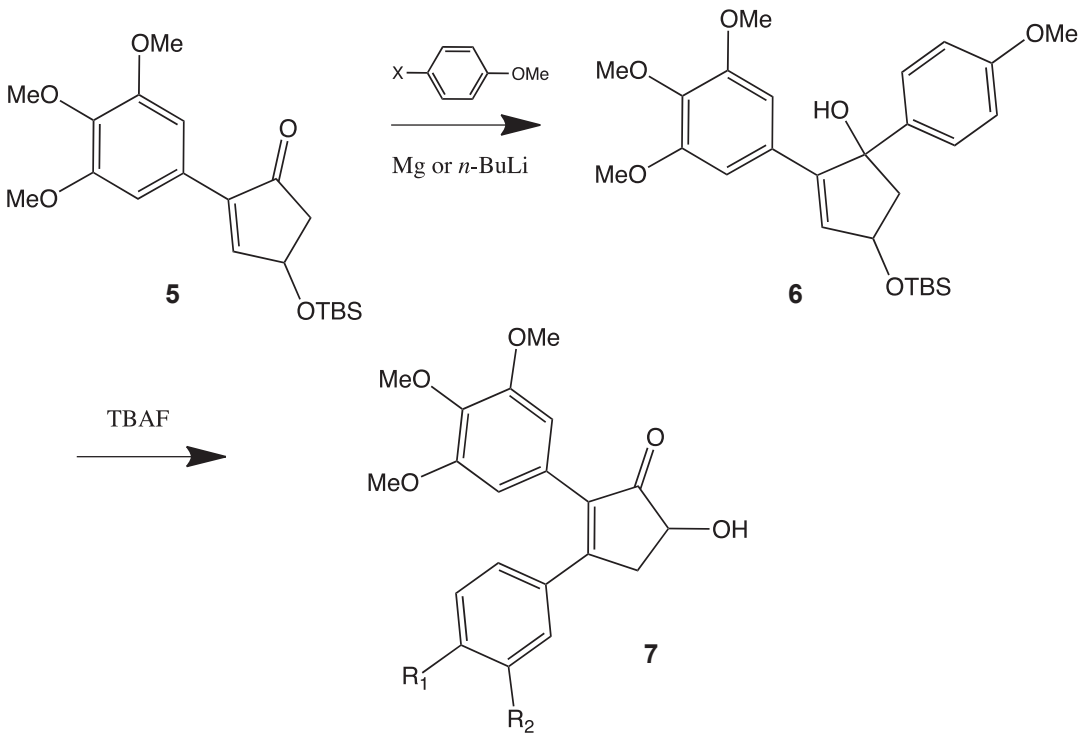


Schéma 1: Synthèse des dérivés cyclopentanone de la CA-4 par Gurjar et coll.[85]

Dans une étude différente et dans le but d'évaluer l'impact de la rigidité structurale sur les effets antiprolifératifs et anti-tubulines, Flynn *et coll*. se sont penchés sur la synthèse des dérivés indénones et indanones de la CA-4 (*Schéma 2*).[87]

La première partie de la synthèse se focalise sur la formation des diarylpropinones **10** par fonctionnalisation du méthoxybenzaldehyde *m*-substitué en dérivé dibromé **9**. L'addition de *n*-BuLi en présence de manganèse conduit alors au diarylalcyne correspondant. Ce dernier est ensuite soumis à un couplage pallado-catalysé découlant sur un mélange (*Z*)/(*E*) des stéréosisomères chalconiques **11**. La raison de cette faible stéréosélectivité est attribuée principalement à la présence de triphénylphosphine qui, même en quantité catalytique, déstabilise l'équilibre thermodynamique réactionnel. La cyclisation successive de Nazarov[88] des 2-aryl- et 2-aroylchalcone par utilisation de triflate de cuivre et d'acide méthylsulfonique entraine la formation du composé indanone correspondant **12**. Finalement, l'oxydation par le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone DDQ, résulte en la synthèse de la série des indènones **13**. Les premières évaluations biologiques des différents intermédiaires ont démontré que les chalcones disposaient de bien meilleures activités anti-tubulines en comparaison au couple indènones/indanones. Cependant, les différents tests de cytotoxicité sur les cellules tumorales associées aux cancers du sein MCF-7, ont prouvé que cette série de composés ne disposait d'aucune activité notoire sur ce type de lignées tumorales, au contraire de la CA-4.

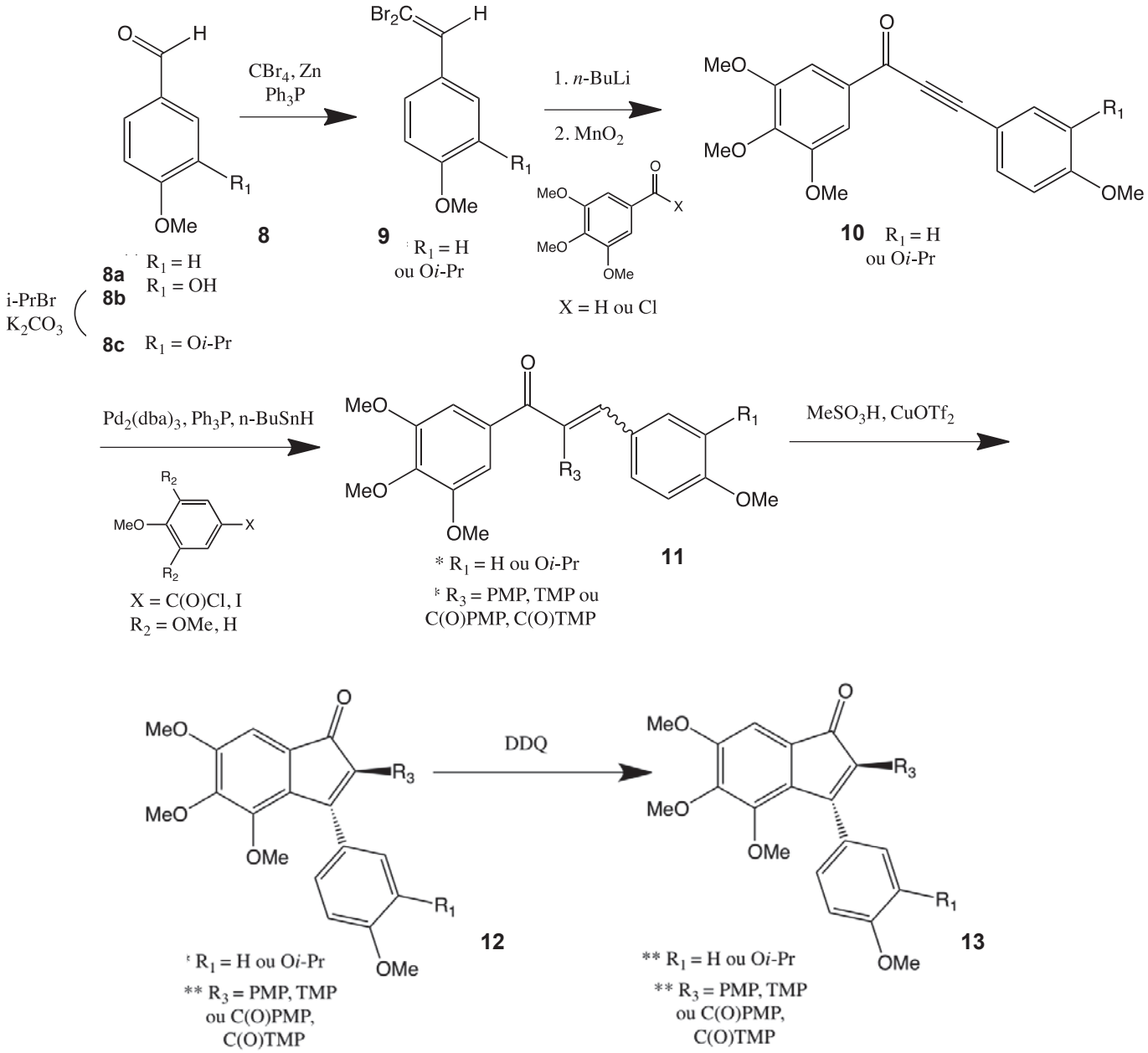


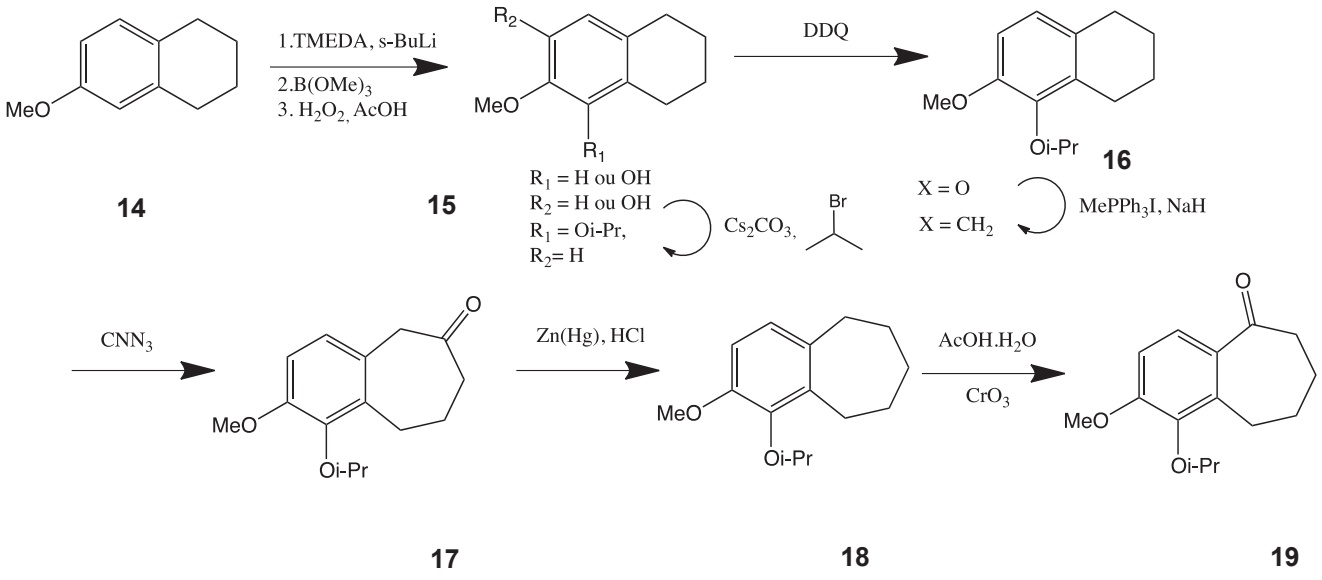
Schéma 2: Synthèse des dérivés indénones et indanones de la CA-4 par Flynn et coll.[87]

Les travaux de Pinney et coll., se basant sur la synthèse d'analogues suberènes de la CA-4, ont apporté encore d'avantage d'informations sur les relations structures activités des composés inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline (*Schéma 3*).[89]

La préparation de ces composés s'appuie sur la synthèse préalable des intermédiaires **19** et **20** . Pour se faire, le 6-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène est hydroxylé puis ensuite protégé sous forme d'un ether *iso*-propylique pour mener au composé **15**. L'oxydation sélective de ce dernier par le DDQ suivi par

une réaction de Wittig conduit au dérivé méthylène, puis la réaction avec le cyanure d'azide CNN_3, génère la tétralone **17** primordiale en vue de la formation des produits finaux. La réduction de la cétone *via* réaction de Clemenssen[90] puis l'oxydation en position 6 du cycle par le trioxyde de chrome CrO_3 génère l'isomère **19**, lui aussi centrale dans l'obtention des composés désirés. Les réactions sur les composés **17** et **19** ont par la suite été menées en parallèle. Le couplage avec le bromotriméhtoxybenzène en présence de n-BuLi, génère alors le composé hydroxylé **21** qui après déshydratation à l'anhydride acétique et déprotection subséquente, permet la formation des composés initialement désirés **23** et **24**.

Les tests biologiques réalisés sur tout un panel de lignées cellulaires tumorales (de la prostate, des poumons ou encore du carcinome ovarien) confirment que la position en *cis*, le motif triméthoxybenzène de la CA-4, potentialise l'activité de ce type de composés. Aussi, l'analogue **24** a été mis en avant comme étant le plus actif, disposant de valeurs d'activité de l'ordre du nanomolaire sur les 3 types de cellules cancéreuses : des poumons, de la prostate et de l'ovaire.[89]



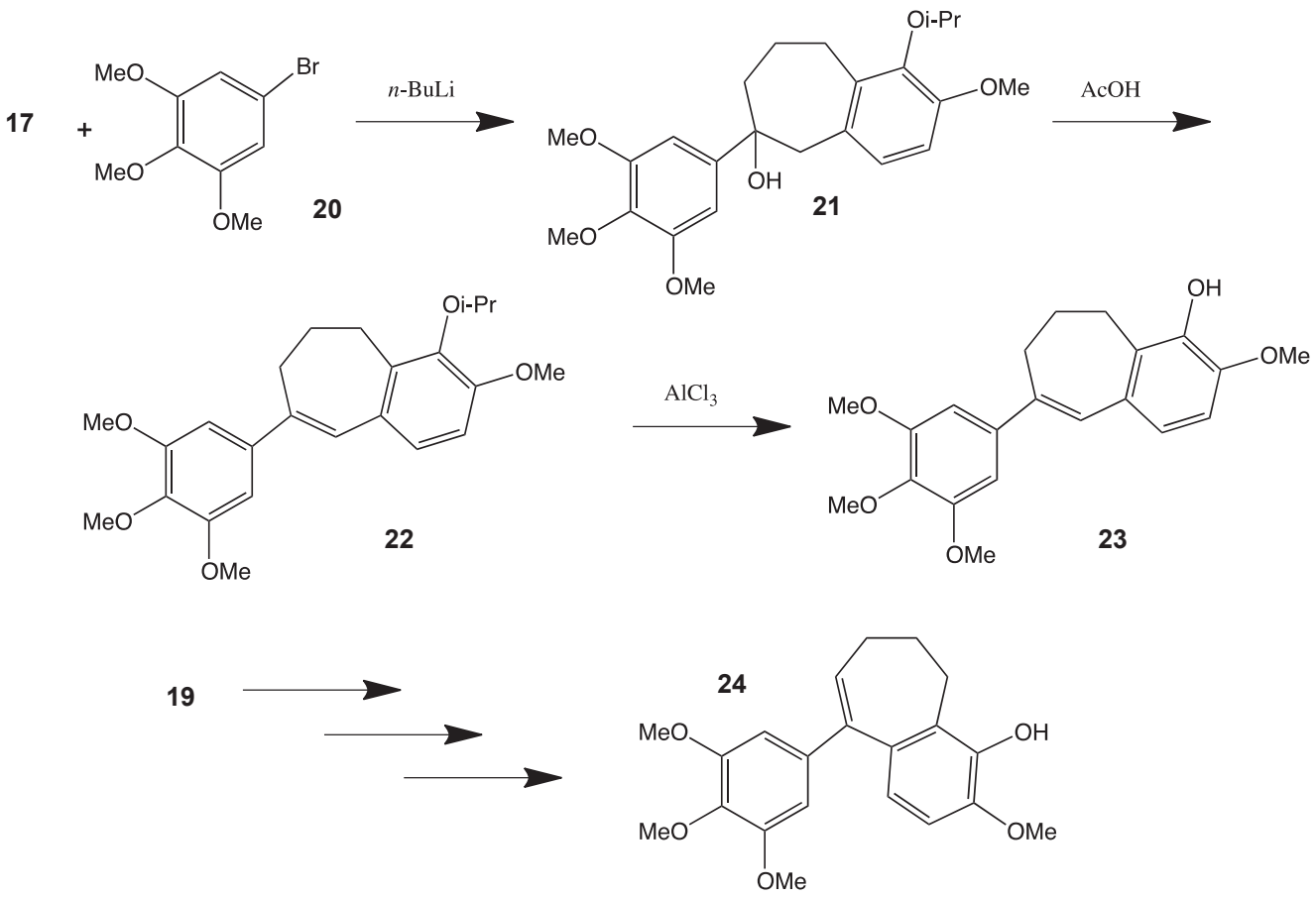


Schéma 3 : Travaux de Pinney et coll. sur la synthèse d'analogues suberènes de la CA-4[89]

En plus de la synthèse des analogues subérènes, le groupe de recherche mené par Hu s'est aussi intéressé au composé **27** et ses analogues, porteurs des motifs sulfonamide et carbazole de la CA-4 (*Schéma 4*).[91] La formation, au préalable, de chlorures de sulfonyl carbazole qui sont ensuite traités par différentes anilines (en présence d'une quantité stoechiométrique de triéthylamine) fournissent les analogues sulfonamides carbazoles avec de bons rendements.

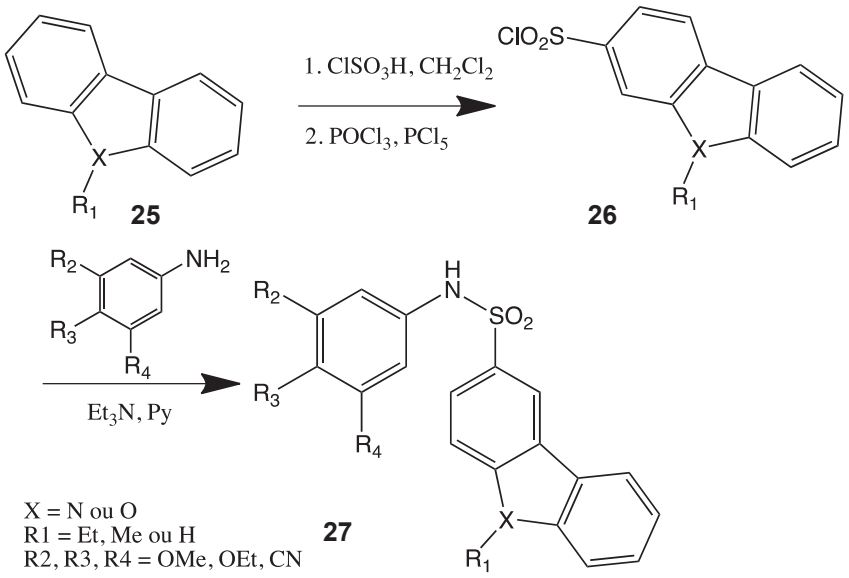


Schéma 4: Travaux de Hu et coll. sur la synthèse d'analogues sulfonamide et carbazole de la CA-4[91]

Les évaluations biologiques ainsi que les études additionnelles de RSAs sur des cellules humaines de leucémie CEM ont prouvé que l'azote en position 9 (composé **27**) et la présence d'un groupement alkyle greffé sur ce dernier étaient prépondérants dans le but d'obtenir une activité cytotoxique. En effet, le remplacement du cycle carbazole par un dibenzofurane (composé **O**, *Figure 29*) montre une perte nette d'activité (IC_{50} > 10 µM), soulignant ces observations. Aussi, la présence d'un trimethoxybenzène semble être critique ici en en vue d'obtenir une certaine activité, comme le démontre la faible efficacité du composé **P** avec une IC_{50} > 10 µM (*Figure 29*).

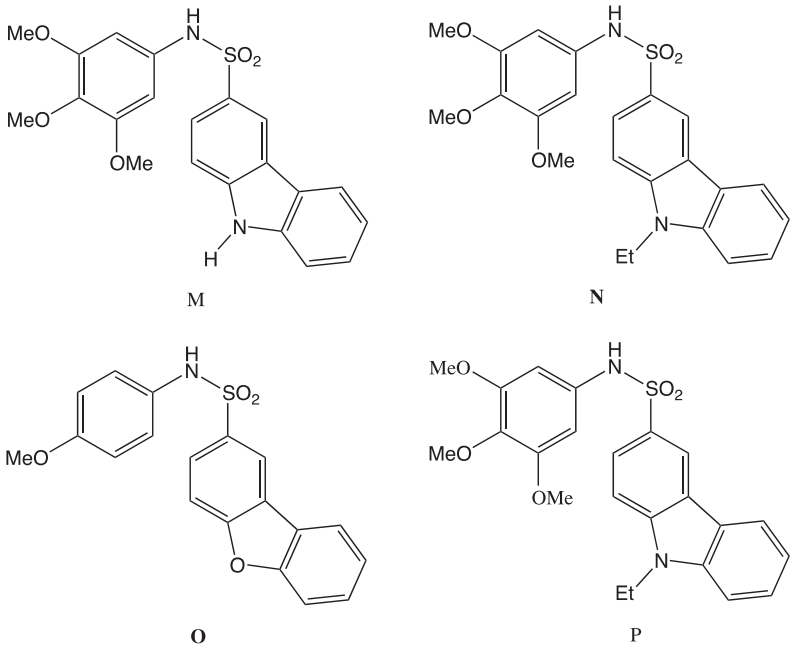


Figure 29: Synthèse des analogues carbazole et sulfonamide par Hu et coll.[91]

Dans une autre étude, Alami et coll. ont remplacé la double liaison centrale (*Z*) de la CA-4 par une fonction 1,2-dicétonique grâce à une méthode d'oxydation douce catalysée au palladium (*Schéma 5*).[92] Le schéma réactionnel implique la synthèse d'alcynes dissymétriques qui sont ensuite oxydés en présence d'iodure de palladium afin d'offrir d'excellents rendements finaux sur des substrats porteurs de groupements fonctionnels différents sur le groupement R (acétamide, acétate, fluor…). De plus, ces analogues affichent d'impressionnantes valeurs d'activités antiprolifératives comprise en 20 et 50 nM sur des lignées du carcinome, du poumon ou encore du colon.

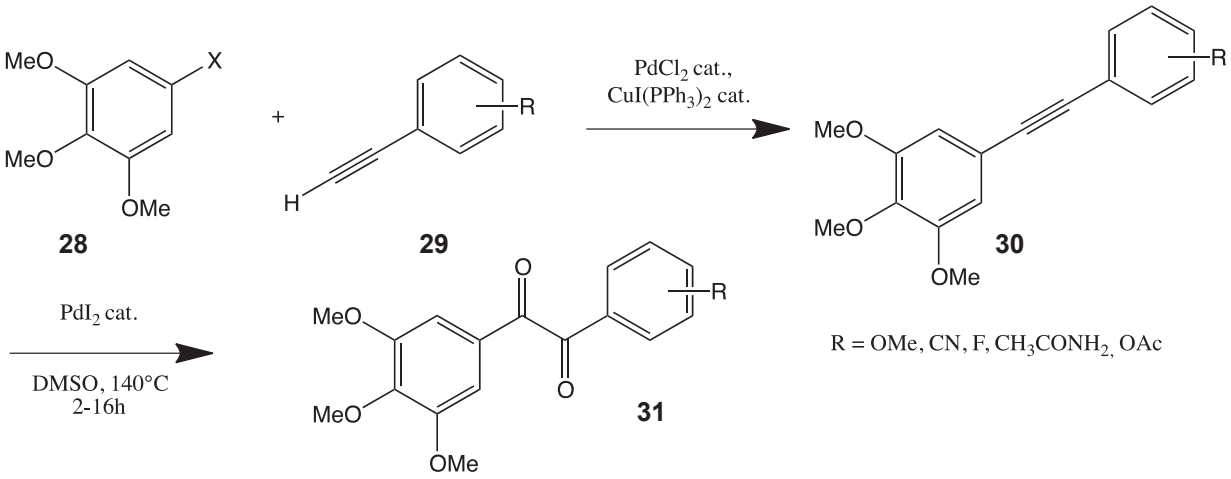


Schéma 5: Substitution la double liaison (*Z*) de la CA-4 par une fonction 1,2-dicétonique par Alami et coll.[93]

5.2.2.4. Remplacement de la double liaison par un motif hétérocyclique

En plus des modifications structurales citées ci-dessus, une part importante de la pharmacomodulation des composés derivés de la CA-4 repose sur le remplacement de la double liaison *cis* par un hétérocycle. Cette stratégie permet de conserver les caractéristiques structurales essentielles à la CA-4 tout en bloquant l'isomérisation potentielle (Z)/(E) de la double liaison. Ceci permet donc d'élargir la connaissance et notamment au sein des relations structures activité tout en apportant des données supplémentaires intéressantes, en vue d'augmenter la librairie de produits analogues à la CA-4. La synthèse de dérivés isoxazoles, benzothiazoles, dioxolane ou encore imidazoles, sont donc des pistes qui ont été vastement étudié.

Welsh et coll. ont par exemple étudié l'impact de la fixation d'un noyau triazole en lieu et place de la double liaison mais aussi la modification du cycle B de la CA-4 par d'autres hétérocycles (*Schéma 6*).[94]
A partir du chlorure d'acide 3,4,5-trimethoxybenzoique, l'amide **33** est formé puis

est ensuite transformé en thioamide **34** (rendements quantitatifs) par utilisation du réactif de Lawesson P_4S_{10} et de la méthode de Curphrey.[95] L'ajout dans le milieu d'hydrazine à 0°C forme alors l'amidrazone **35** qui, après traitement par le triéthylorthoformate en condition acide, conduit au composé final **36**. Les résultats obtenus montrent une activité importante de la majorité des dérivés synthétisés contre un panel important de lignées cancéreuses et en particulier contre les cellules multi-résistantes (MDR). Les études de cristallographie et des interactions inhibiteurs-protéines menées en parallèles prouvent que le composé le plus actif **36a** se fixe au niveau de la ß-tubuline principalement et établit uniquement des interactions hydrophobes avec l'α-tubuline. Ceci est en accord avec les données de la littérature, où la colchicine a été montré comme se fixant principalement sur la ß-tubuline.

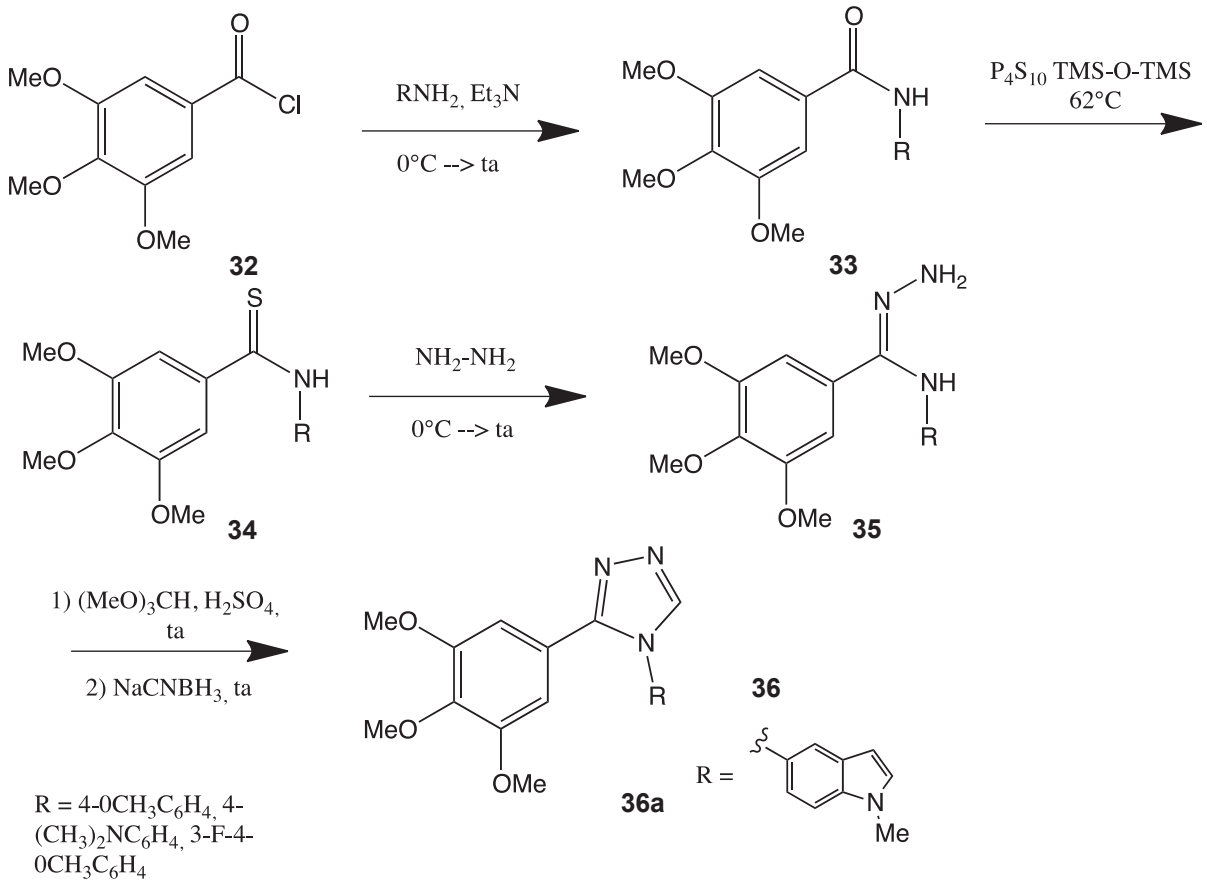


Schéma 6: Synthèse des analogues substitué par un noyau triazole en lieu et place de la double liaison éthylénique par Welsh et coll.[94]

De par la versatilité et la position différente à laquelle peuvent être fixé les trois atomes d'azote, les dérivés triazoles ont largement été investigué et une autre étude menée cette fois-ci par Hansen et coll.[96] a permis la synthèse de nombreux dérivés triazoles ; certain par cycloaddition de Huisgen[97] et d'autres en présence de dérivés éthers magnésiens (*Schéma 7*) . Le 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde est

initialement transformé en alcyne terminal par réarrangement de Colvin[98] (LDA, $TMSCHN_2$, -78°C), qui après avoir été mis en réaction avec EtMgCl pour former *in situ* le dérivé magnésien correspondant, réagit avec un azoture pour donner le composé final **39** avec des rendements très satisfaisants. En utilisant exactement la même méthode mais en fixant l'azoture sur le dérivé triméthoxybenzène cette fois-ci, une série de régioisomère (composé **42**) a également été préparée.
Après un screening initial sur des cellules cancéreuses leucémiques, les composés les plus prometteurs ont été sélectionnés et évalués pour leur capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline. La très grande majorité des composants ont affiché une cytotoxicité bien moindre que celle de la CA-4, de l'ordre du micromolaire. En revanche, le composé **42a** fait ici preuve d'exception puisqu'il a été montré comme étant actif sur 5 types différents de lignées tumorales (fibroblastes, du mélanome…) avec des valeurs d'activité comprises entre 31 et 0,7 nM.

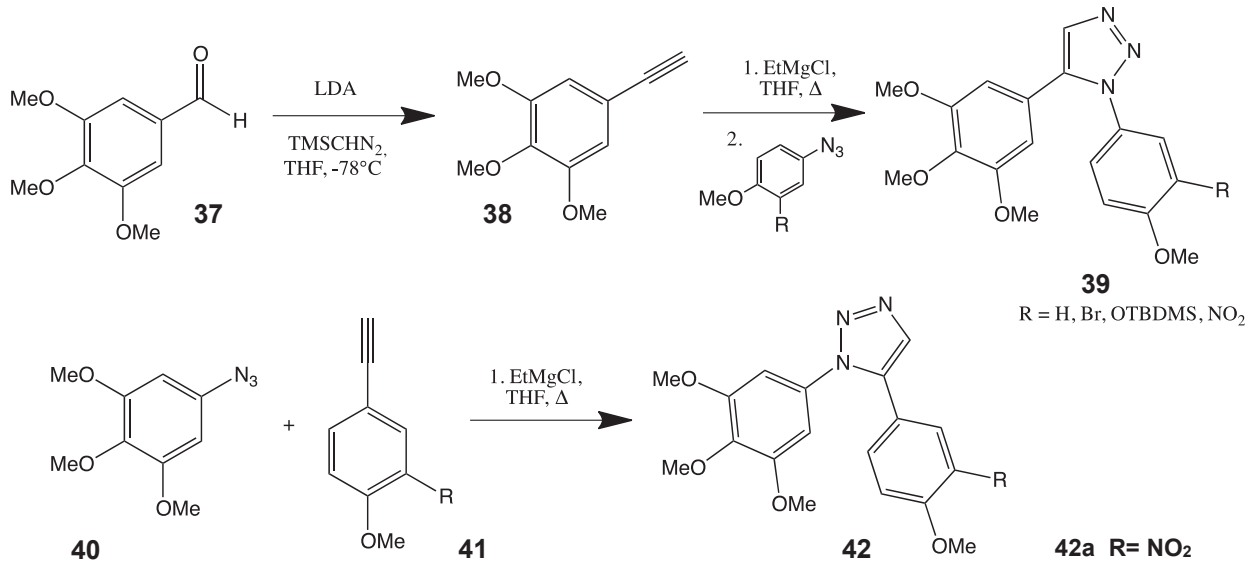


Schéma 7: Synthèse des analogues substitué par un noyau triazole en lieu et place de la double liaison ethylénique par Hansen et coll.[96]

D'autres dérivés azotés de la CA-4, les pyrazolines, ont eux aussi été étudiés pour leur activités antitubulines et antiprolifératives par Lee et son équipe de recherche (*Schéma 8*).[99] Les études préalables de cristallographie X ont montré que la substitution de la double liaison par un noyau pyrazole instaurait une rigidité structurale, responsable d'une baisse notoire de l'activité de ces composés.
De ce fait, la fixation d'un noyau pyrazoline influe sur cette rigidité ainsi que l'aromaticité, rendant particulièrement pertinent la synthèse de ce type de molécule. Aussi, un test additionnel d'inhibition de la kinésine, protéine associée au fuseau mitotique, a démontré une activité positive des composés *N*-acétylé, poussant les auteurs à synthétiser le composé **44b**.

Le schéma réactionnel s'appuie sur une addition d'hydrazine sur la chalcone **43**, dans l'éthanol ou l'acide acétique à reflux. L'obtention du composé **44** se fait en une étape avec des rendements plus ou moins satisfaisants.

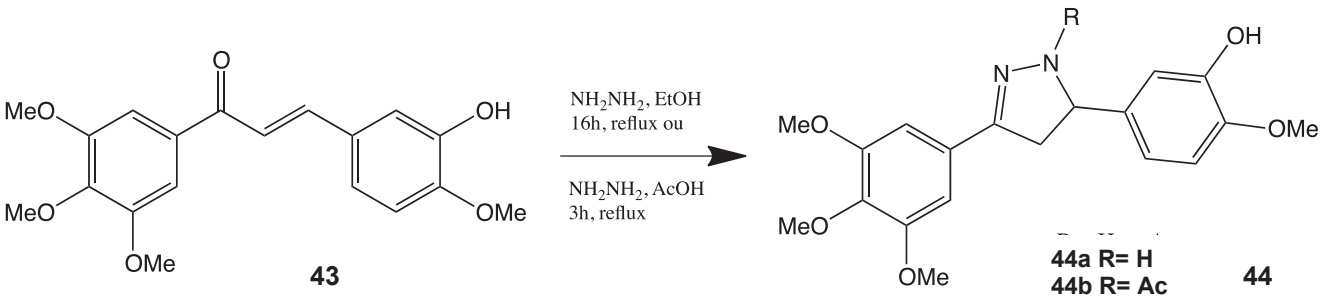


Schéma 8: Synthèse des analogues pyrazolines en lieu et place de la double liaison ethylénique par Lee et coll.[99]

Finalement, les études *in vitro* de cytotoxicité confirment que ces analogues sont des candidats crédibles dans l'optique de synthétiser de nouveaux composés à visée anticancéreuse, affichant pour le composé le plus actif **44a,** des valeurs d'IC_{50} de 2,1 et 0.55 µM sur les lignées B16 et L1210 (mélanome et leucémie respectivement).
En revanche, la présence d'un groupement acétyle sur le composé **44b** par exemple, a finalement été montrée comme étant un critère délétère, abaissant l'activité de ces analogues structuraux de la CA-4 (IC_{50} >10 µM).

Pui-Kai Li et coll.[100] ont concentré une partie importante de leur travail à l'étude de l'inhibiteur de tyrosine kinase SU5416[101], fixant le facteur de croissance VEGF (*Figure 30*). Ainsi, ils ont synthétisé tout une librairie d'hybrides basés sur les motifs SU5416/CA-4, et ont évalué leurs activités biologiques (*Schéma 9*).

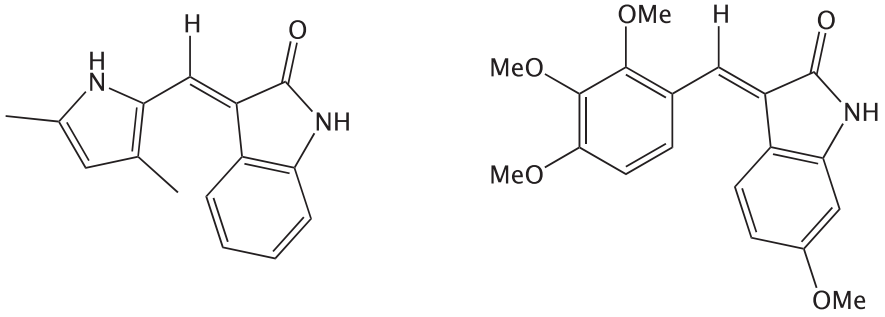


Figure 30: Structure du composé SU5416 et un exemple d'hydbride [93]

Ils ont tout d'abord préparé le précurseur 6-alcoxyindolin-2-one **48** par transformation du dérivé nitrobenzène **45** en diester benzénique **46**, conduisant après réaction de Krapcho au monoester **47**. La cyclisation réductrice qui s'en suit, promue par le fer dans l'acide acétique, mène donc à **48** qui par réaction avec

le dérivé benzaldéhyde, permet la synthèse des produits 3-benzylidèneindolin-2-one finaux **49** avec des rendements assez variables (25-77%). L'ultime étape de couplage fournit majoritairement les regioisomères (*E*).
Les évaluations biologiques ont prouvé que l'un des composés (portant en R1 un atome d'hydrogène et des groupements méthoxys en R2/R3) était efficace sur 46 lignées cellulaires avec notamment des activités inférieures à 10 nM pour les cancers colorectaux, du système nerveux central ou encore de la prostate. Le mécanisme d'action spécifique fut ensuite étudié *via* une étude comparative avec un antimitotique connu, la podophyllotoxine, ce qui a prouvé que le composé **49** bloquait le cycle cellulaire en phase G2/M de la mitose. Également, l'étude des relations structures-activités a démontré l'importance des substituants méthoxy dans l'efficacité de ces analogues de la CA-4 : le remplacement des éthers méthyliques par des groupements éthyles ou méthyles entrainent en effet une importante baisse de cytotoxicité. Selon les auteurs, c'est la capacité à former ou non des liaisons hydrogènes ainsi que les changements électroniques induit au sein du noyau aromatique qui seraient responsable de cette variation importante d'activité.

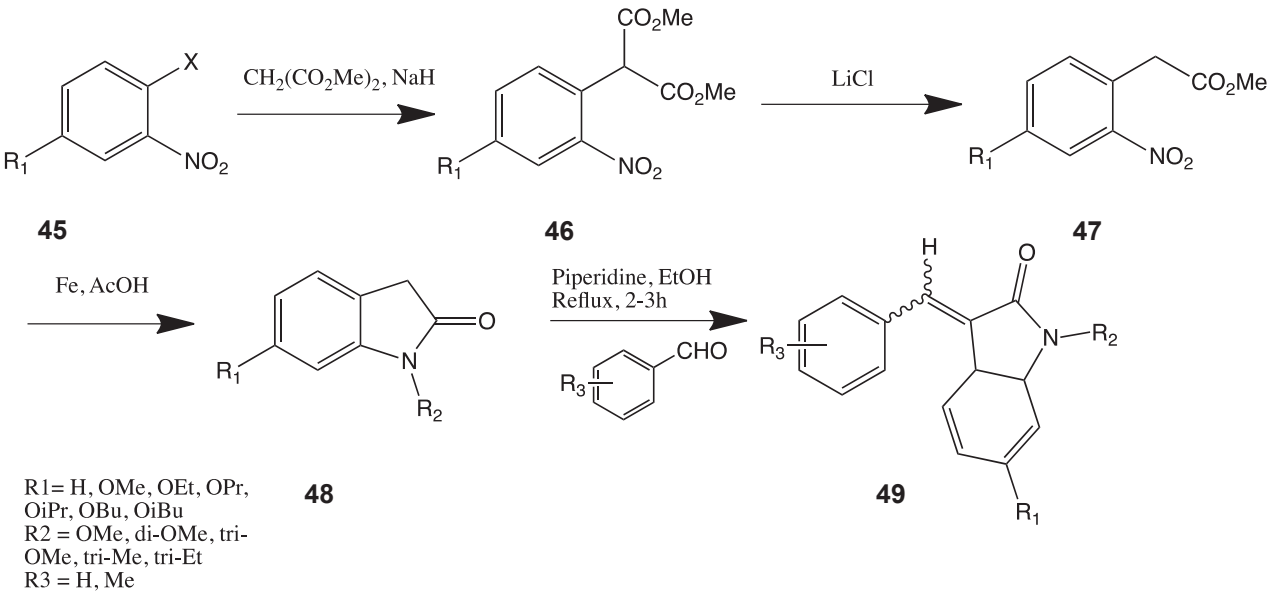


Schéma 9: Synthèse des analogues SU5416 de la CA-4 par Pui-Kai Li et coll.[100]

Pontikis et coll.[102] ont de leur côté utilisé une carbocyclisation de Heck couplée à une réaction de Suzuki afin de préparer des vinylogues de la structure **49**, également porteurs de motifs oxindoles (*Schéma 10*). Pour faire suite à leurs travaux antérieurs focalisés sur la synthèse de dérivés dièniques inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, les auteurs ont décidé d'étudier la rigidité structurale induite par l'incorporation d'un autre cycle entre la double liaison (*E*) et un des substituants aromatiques. L'étape centrale consiste en une réaction en tandem combinant une cyclisation intramoléculaire et un couplage pallado-

catalysé entre l'acide triméthoxybenzène boronique et l'amidoalcyne **53** ; ceci résulte en la synthèse du (*E*)-3-arylmethylène oxindole **54**. Le dérivé **55** (*E,E*)-3-alkylidèneoxindole est formé à partir de l'alcène boronique adéquat. La préparation au préalable de l'amidoalcyne se base sur la réaction entre l'iodoaniline **51** et l'acide but-3-ynoique **50**, fonctionnalisé par la suite en amide **52** en présence d'hydrure de sodium et de l'halogénoalcane correspondant. Le couplage en tandem de Heck-Suzuki-Miyaura, en présence d'une quantité catalytique de $Pd(OAc)_2$ et de triphénylphosphine PPh_3 en milieu basique (ici utilisation de CsF) garantit une excellente stéréospécificité, générant principalement le dérivé (*E*) avec de très bons rendements.

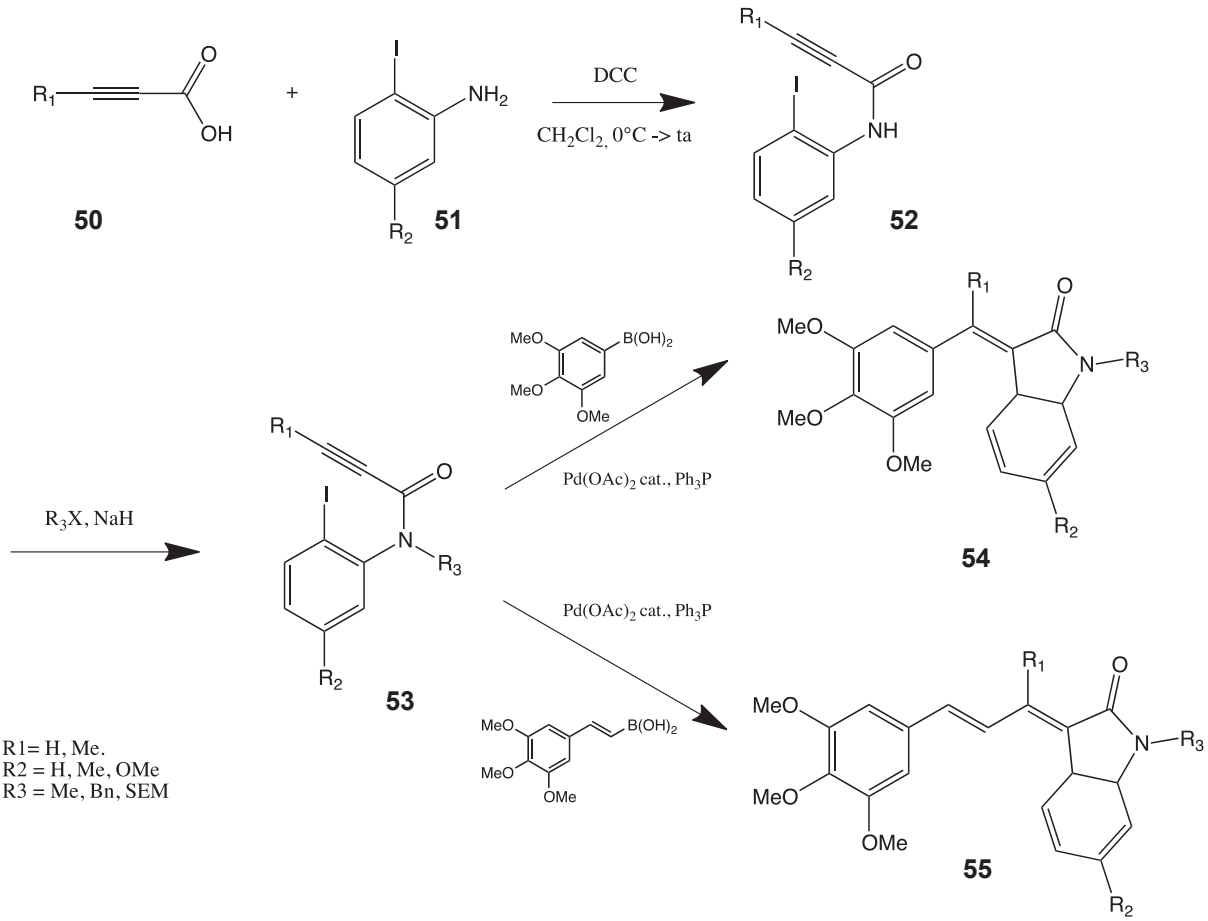


Schéma 10: Couplage en tandem de Heck-Suzuki-Miyaura menant à la Synthèse d'analogues de la CA-4 par Pontikis et coll.[102]

En plus de l'étude des hétérocycles azotés, certains dérivés soufrés ont été synthétisés et testés afin d'évaluer l'impact de cet hétéroatome sur l'activité. L'incorporation de thiophène ou encore de benzo[*b*]thiophène sont des pharmacomodulations fréquemment mises en jeu et offre des modifications

structurales non négligeable, grâce notamment à un diamètre atomique plus important ce qui entraine une modification conformationnelle de la molécule.
Dans une publication assez récente de Ding et coll.[103], la synthèse d'analogues thiadiazoles de la CA-4 a été élaborée sur la base de deux schémas réactionnels différents (*Schéma 11*). Le premier, nécessite l'introduction du groupe phosphonate sur le triméthoxybenzaldéhyde au moyen de la réaction de Pudovik. La protection de la fonction alcool (sous forme d'éther de THP), sa condensation avec le benzaldéhyde substitué de façon adéquate suivi d'une l'hydrolyse acide génère alors ces dérivés de la déoxybenzoïne **59**. La réaction entre **59** et le toluènesulfonhydrazide H_2NNHTs et l'ajout de chlorure de thionyle dans le milieu mène au composé voulu **60** avec un excellent rendement (80-93%).

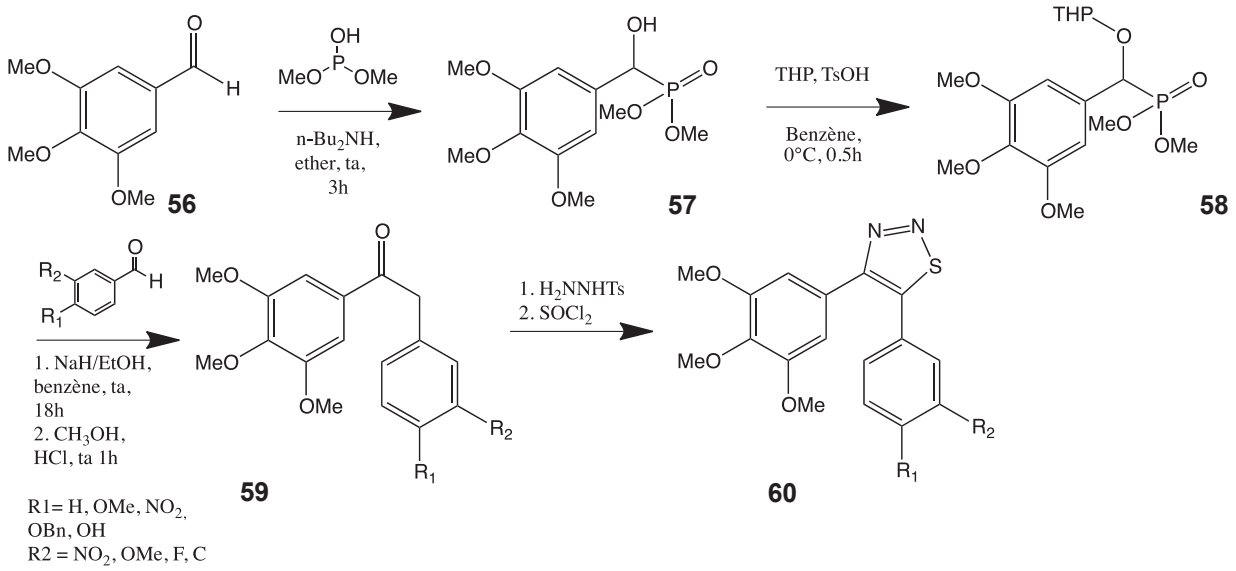


Schéma 11: Synthèse d'analogues thiadiazoles de la CA-4 par Ding et coll.[103]

L'autre voie d'accès, menant au thiadiazole régioisomère **64**, implique dans un premier temps la synthèse de l'hydrazone **62** qui subit par la suite la même série de transformations chimiques que précédemment pour mener au composé final **64** (*Schéma 12*). Le potentiel antiprolifératif des composés synthétisés a par la suite été évalué sur des lignées cellulaires cancéreuses du colon, leucémiques et endothéliales. Les dérivés qui ont démontré les meilleures activités ont alors subi des tests plus poussés avec notamment l'étude de l'interaction de ces derniers avec les microtubules ou encore l'évaluation de leur effet sur le cycle cellulaire. Ces études ont démontré une activité ainsi qu'un mécanisme d'action de ces analogues similaire à celui de la CA-4. En effet, il a été observé un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et une inhibition très importante de la polymérisation de la tubuline en microtubule (TPI IC_{50} = 0,6-0,8 µM).

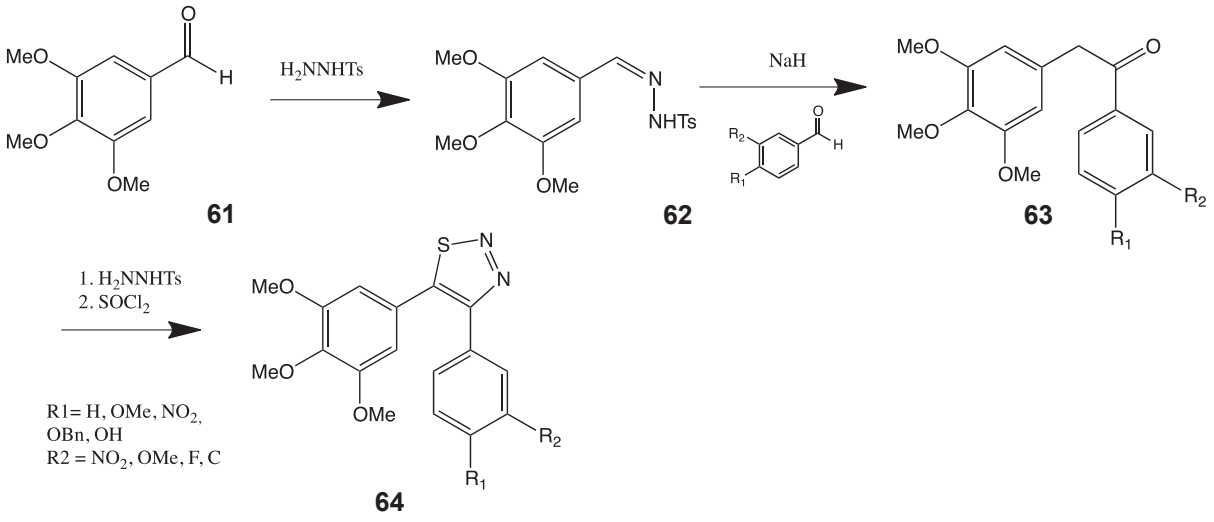


Schéma 12 :Synthèse d'analogues thiadiazide de la CA-4 par Ding et coll.[103]

De la même facon, Barbier et *coll.*[104] ont étudié l'interaction des analogues coumarines de la combrétastatine et plus précisément des 4-arylcoumarines avec le réseau microtubulaire (*Schéma 13*). La voie de synthèse mise en jeu implique premièrement la réaction entre la 4-hydroxycoumarine **65** et l'anhydride triflique qui conduit au 4-trifluorométhylsulfonyloxycoumarine **66**. Puis, le couplage de Suzuki-Miyaura[105] avec divers acides boroniques mène directement aux dérivés finaux **67**. Cette étape finale a été particulièrement étudiée au cours des dernières années, et, en tenant compte de la versatilité ainsi que des résultats obtenus par réaction de Suzuki-Miyaura, les auteurs ont décidé d'associer le $Pd(PPh_3)_4$ et le co-catalyseur CuI. Les études subséquentes de cytotoxicité sur des cellules de cancers du sein (HBL-100) ont prouvé que les dérivés 4-arylcoumarines altéraient le cycle cellulaire et induisaient un phénomène d'apoptose. Le marquage du réseau microtubulaire et les analyses d'immunofluorescence ont aussi montré que ces analogues se fixait spécifiquement sur la tubuline mais à des concentrations environ 100 fois plus importante que pour la CA-4.

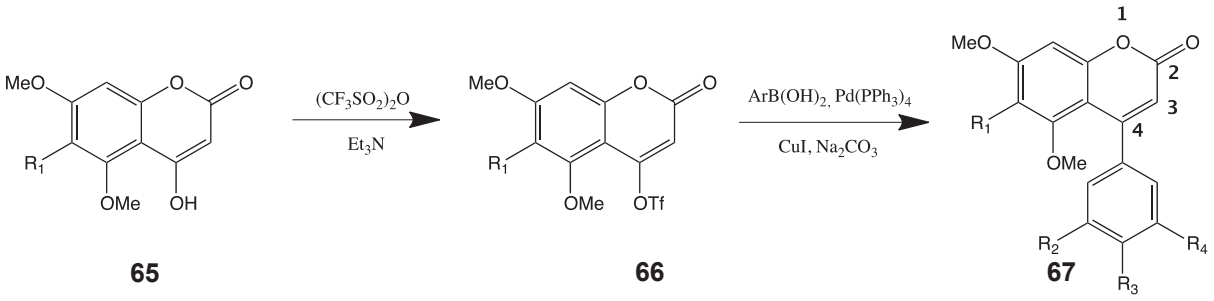


Schéma 13: Synthèse d'analogues 4-arylcoumarines de la CA-4 par Barbier et coll.[104]

6. SYNTHESE DE LA CA-4

6.1 Reaction de Wittig

L'une des premières synthèses de la CA-4 fut réalisée par la réaction de Wittig, méthode simple et extrêmement connue qui est employée généralement dans l'optique de créer une double liaison (*Schéma 14*).[106] Cependant, cette réaction souffre principalement d'une faible stéréoselectivité, résultant en un mélange des stéréoisomères (*Z*) et (*E*). Dans le cas de la CA-4, Pettit et *al.* ont obtenu de bons résultats ainsi qu'une stéréoselectivité assez intéressante, réussissant à isoler le composé (*Z*).[61] A partir de l'isovanilline **68** protégée par un groupement terbutyldimethylsilyle, puis par réduction dans un second temps de l'aldéhyde en alcool secondaire : le derivé **70** est alors fonctionnalisé en sel de phosphonium. La réaction de ce dernier avec le 3,4,5-triméthoxybenzaldèhyde conduit alors à la CA-4 avec un rendement de 93% et un ratio 1/1,5 pour les composés (*Z*)/(*E*). Ces derniers sont alors séparés par chromatographie sur gel de silice avant d'être déprotégé, dans l'ultime étape.

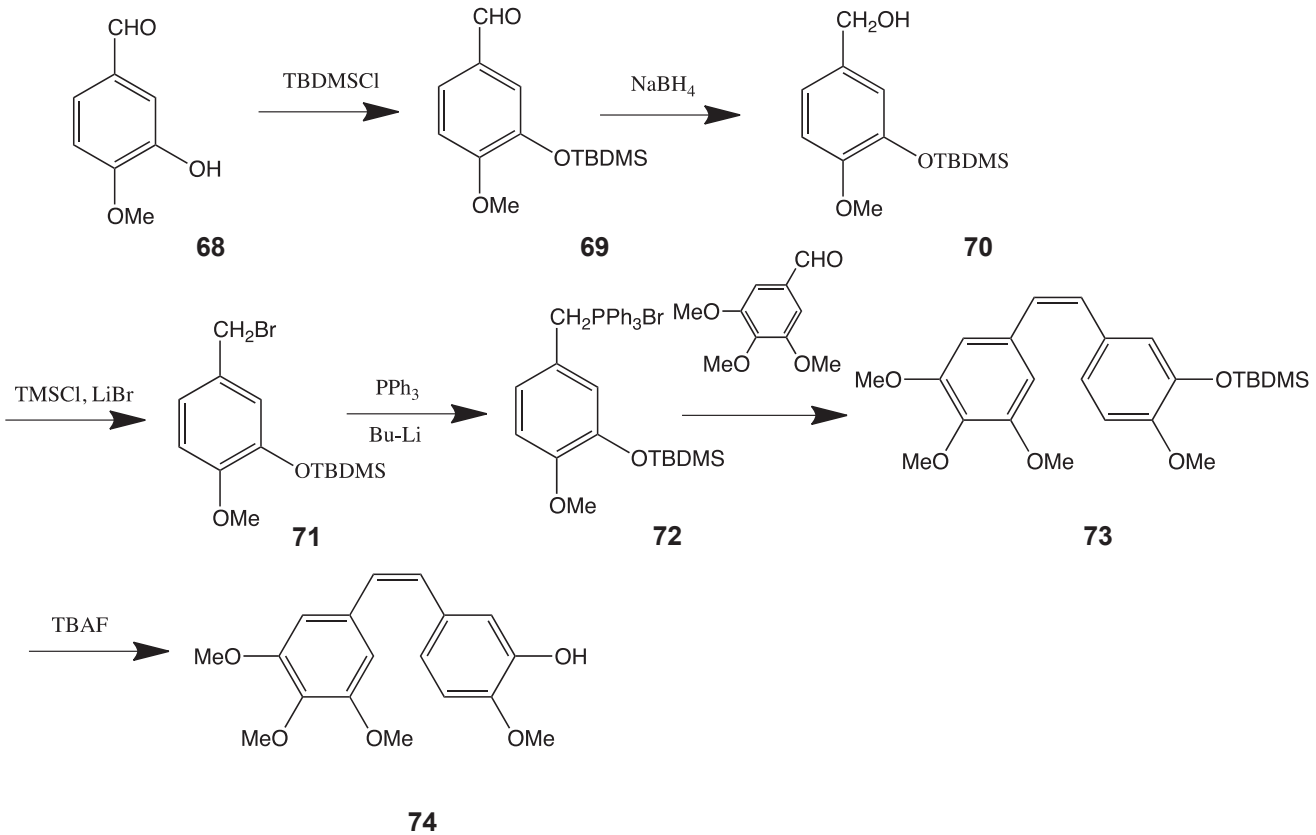


Schéma 14: Synthèse de la CA-4 par la réaction de Wittig[98]

Harrowven et coll. ont optimisé cette voie de synthèse de Wittig pour la synthèse de la CA-4 ainsi que pour ses analogues (*Schéma 15*).[107] Pour cela, ils se sont notamment inspiré du travail de Gilheany qui a remarqué une amélioration de la stéréosélectivité lorsque ce type de synthèse mettait en jeu des composés disposant de substituants halogénés en position *ortho* par rapport au phosphonium. Ainsi, la condensation de ces derniers avec le dérivé triméthoxybenzaldèhyde en présence de *t*-BuOK, a donné de très bons résultats avec une stéréoseléctivité (*Z*)/(*E*) du coomposé **77,** allant de 9/1 jusque 45/1 pour certains dérivés. Finalement, la déhalogénation après addition de *n*-BuLi puis hydrolyse du lithien formé *in situ* permet la formation du dérivé (*Z*)-stillbène **78** correspondant avec d'excellents rendements.

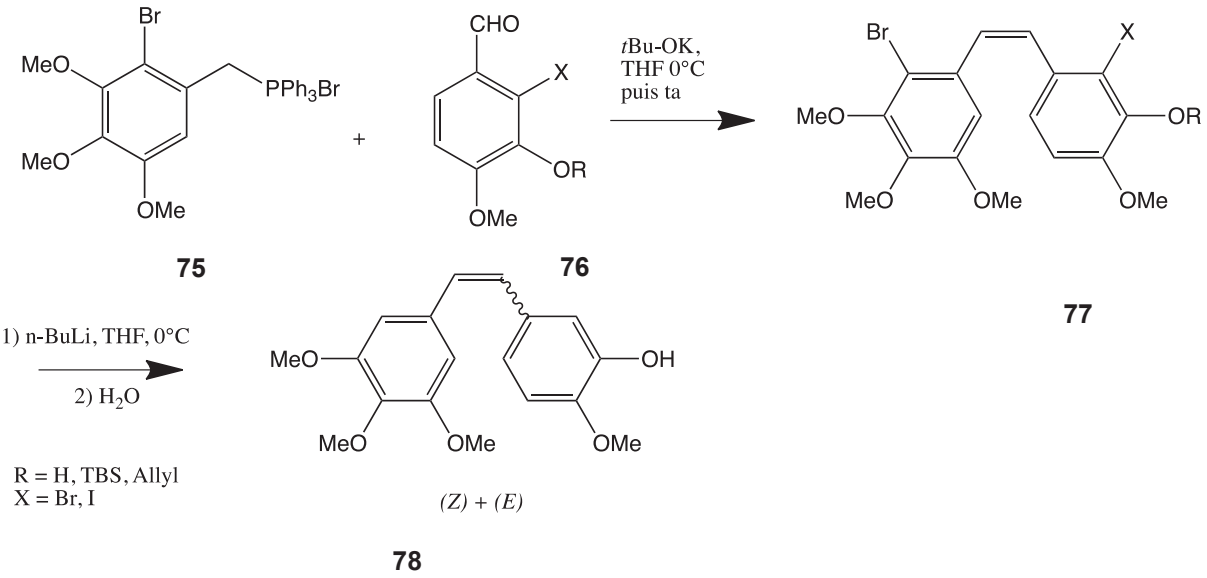


Schéma 15: Travaux d'Harrowven et coll.[107] sur la synthèse optimisée de la CA-4 par réaction de Wittig

6.2 Réaction de Ramberg-Bäcklund

Le groupe de recherche mené par Taylor a quant à lui proposé une autre stratégie, s'inspirant principalement de la réaction de Ramberg-Bäcklund comme observé dans le *Schéma 16*.[108] Le dérivé thiol, **79** obtenu par transformation de l'alcool benzylique grâce au réactif de Lawesson, est ensuite mis en présence du composé **80** et d'hydroxyde de potassium KOH conduisant au sulfure correspondant. L'oxydation par le *m*-CPBA en la sulfone **81** qui subit alors la réaction de Ramberg-Bäcklund, conduit au composé O-silylé selon différentes conditions : respectivement celles de Chan et *coll.*, Franck et *coll.* et de Meyers, détaillées ci-après. Cette dernière est d'ailleurs celle qui dans ce cas précis offre la meilleure stéréosélectivité pour le composé (*Z*) (53/47).

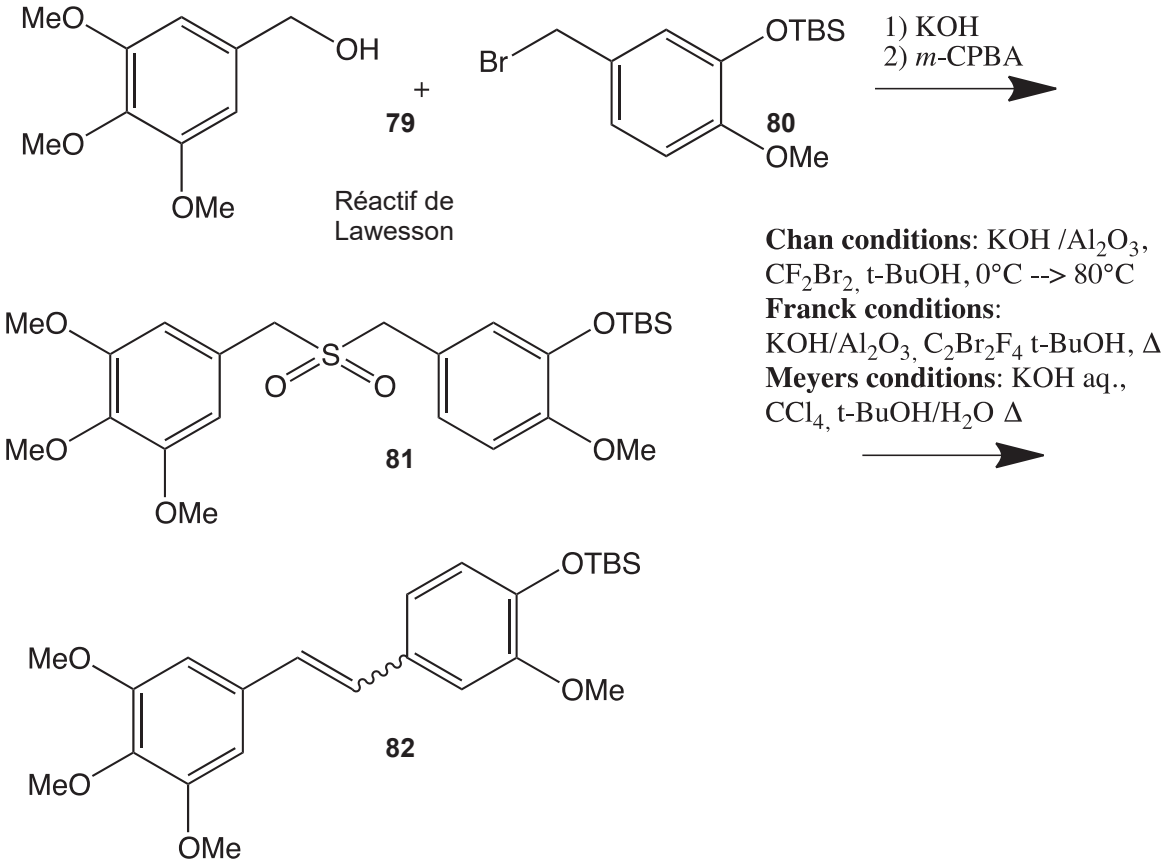


Schéma 16: Synthèse de la CA-4 via la réaction de par Ramberg-Bäcklund[108]

Meyers et *coll.* ont utilisé spécifiquement les conditions décrites par Ramberg-Bäcklund, réalisant la synthèse dans un mélange *t*-BuOH/H_2O, et faisant intervenir le tétrachlorure de carbone CCl_4 ainsi que l'hydroxyde de potassium KOH en tant qu'espèces réactives par un mécanisme d'halogénation *in situ* (*Schéma 16*). Franck et *coll.* ont eux modifié ces conditions en remplaçant le CCl_4 par $C_2F_4Br_2$, en ajoutant de l'Al_2O_3 dans le milieu et en chauffant à 50°C. Finalement, afin d'éviter la formation d'adduit dihydrocyclopropane, le groupe de Chan s'est appuyé sur l'utilisation de CF_2Br_2 (produisant le carbène CF_2 moins réactif que Cl_2) ainsi que sur un chauffage « progressif » (0°C →80°C) pour réaliser la synthèse du composé final.

6.3 Réduction *via* une séquence hydrosilylation – protodésilylation

Alami et *coll.* ont assez récemment imaginé une nouvelle voie alternative en vue de la synthèse de composés de type (*Z*)-éthylènes. Par un procédé séquentiel

d'hydrosilylation – protodésilylation sur des diarylacétylènes, elle permet l'obtention d'analogues de la CA-4 avec une excellente stéréoselectivité ((*Z*)/(*E*) : 9/1). La mise en jeu de catalyseurs dérivés du platine et notamment le PtO_2 a donné les meilleurs rendements. Aussi, il a été démontré que la stéréosélectivité de cette réaction était peu dépendante du catalyseur employé mais qu'elle était gouvernée très majoritairement par l'effet *ortho*-directeur du groupement positionné sur l'alcyne.
Au contraire des conditions de Lindlar, ce procédé offre une réactivité plus « douce » qui empêche la réduction (souvent observée) de l'alcyne jusqu'à l'alcane et limite le phénomène d'isomérisation du régioisomère (*Z*) à (*E*). Cette méthode a notamment été décrite pour la synthèse de nombreux inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline de configuration (*Z*) (*Schéma 17*).[109]

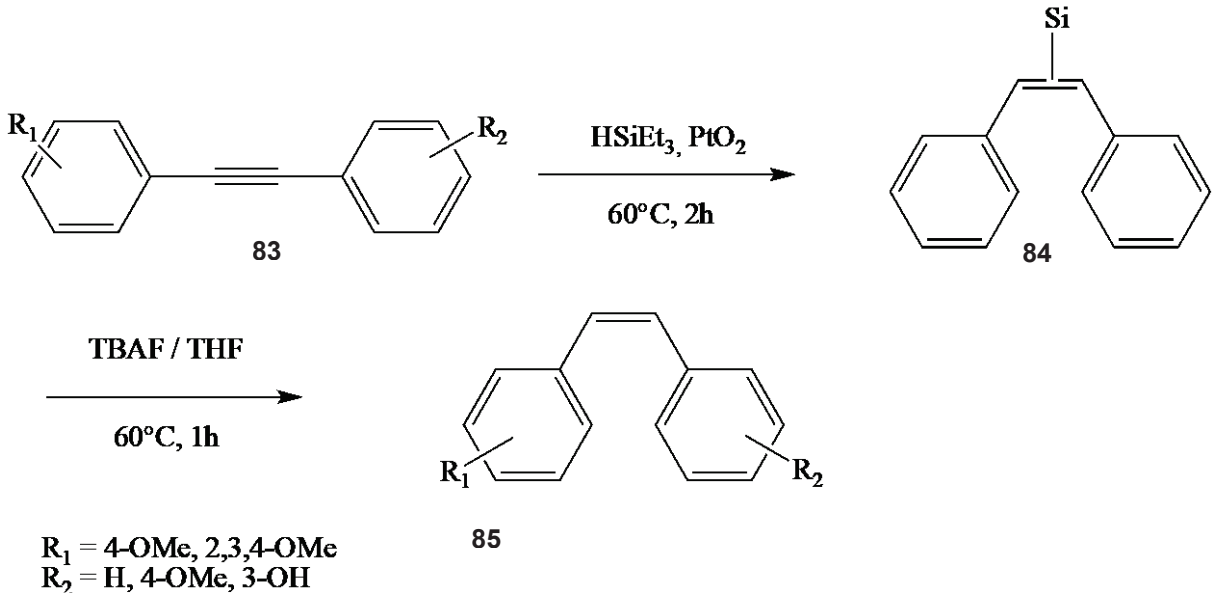


Schéma 17: Hydrosilylation-protodésilylation « one-pot » appliquée à la synthèse de la CA-4 par Alami et coll.[109]

6.4 Réaction de Perkin

Une autre synthèse très efficace de la CA-4 et de ses dérivés met en jeu la condensation dite de Perkin à partir de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et de l'acide benzylique **87** en présence d'anhydride acétique et de triéthylamine (*Schéma 18*).[110] Le dérivé **86**, est d'abord bromé en position *méta* et sa réaction subséquente dans les conditions décrites précédemment entraine la formation de l'acide 2,3-diarylacrylique **88** avec une excellente stéréoselectivté (*Z*)/(*E*) (19/1). Les étapes suivantes d'hydroxylation menant au composé **89** et de décarboxylation (en présence de cuivre, dans la quinoléine à 220°C) qui résulte finalement en la formation de la CA-4 avec un rendement global de 38%.

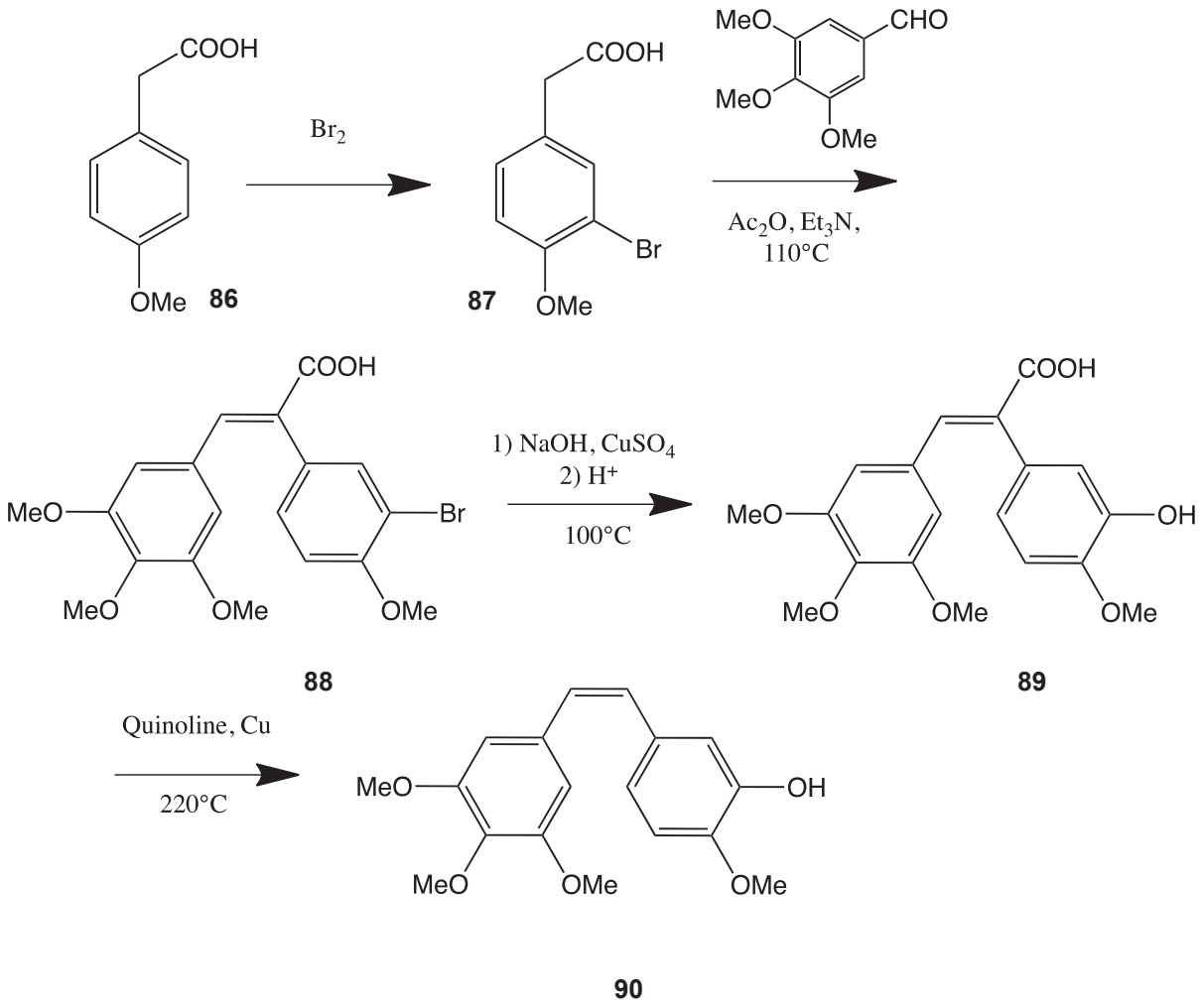


Schéma 18: Synthèse de la CA-4 par mise en jeu de la réaction de Perkin[110]

6.5 Réaction de Kumada-Corriu

Camacho-Dávila a été le tout premier chercheur a utilisé le couplage de Kumada-Corriu dans le but de synthétiser des dérivés de type CA-4 (*Schéma 19*).[111] Cette méthode, nécessite la synthèse au préalable du réactif de Grignard **94** en 3 étapes. Ce dernier est synthétisé après bromation en *méta* du guaiacol **91**, qui est dans un second temps protégé puis transformé en organomagnésien **94**. En parallèle, la synthèse stéréospécifique du dérivé (*Z*)-monobromovinyl-3,4,5-triméthoxybenzène **97** nécessite de faire réagir le 3,4,5-triméthoxybenzaldèhyde dans les conditions de Corey-Fuchs (CBr_4, Ph_3P) puis de le soumettre ensuite à une étape de réduction pallado-catalysée stéréosélective. La réaction entre les composés **94** et **97** en présence du catalyseur acétylacétonate ferrique est l'étape-clé, puisqu'elle permet non seulement la rétention de la stéréochimie du composé (*Z*) sans pour autant déprotéger la groupement silylé. L'étape finale de désilylation par le fluorure de potassium KF dans l'eau, permet la régénération du

phénol et conduit à l'obtention de la CA-4 avec un rendement global satisfaisant de 40% et une stéréospécificité conservée.

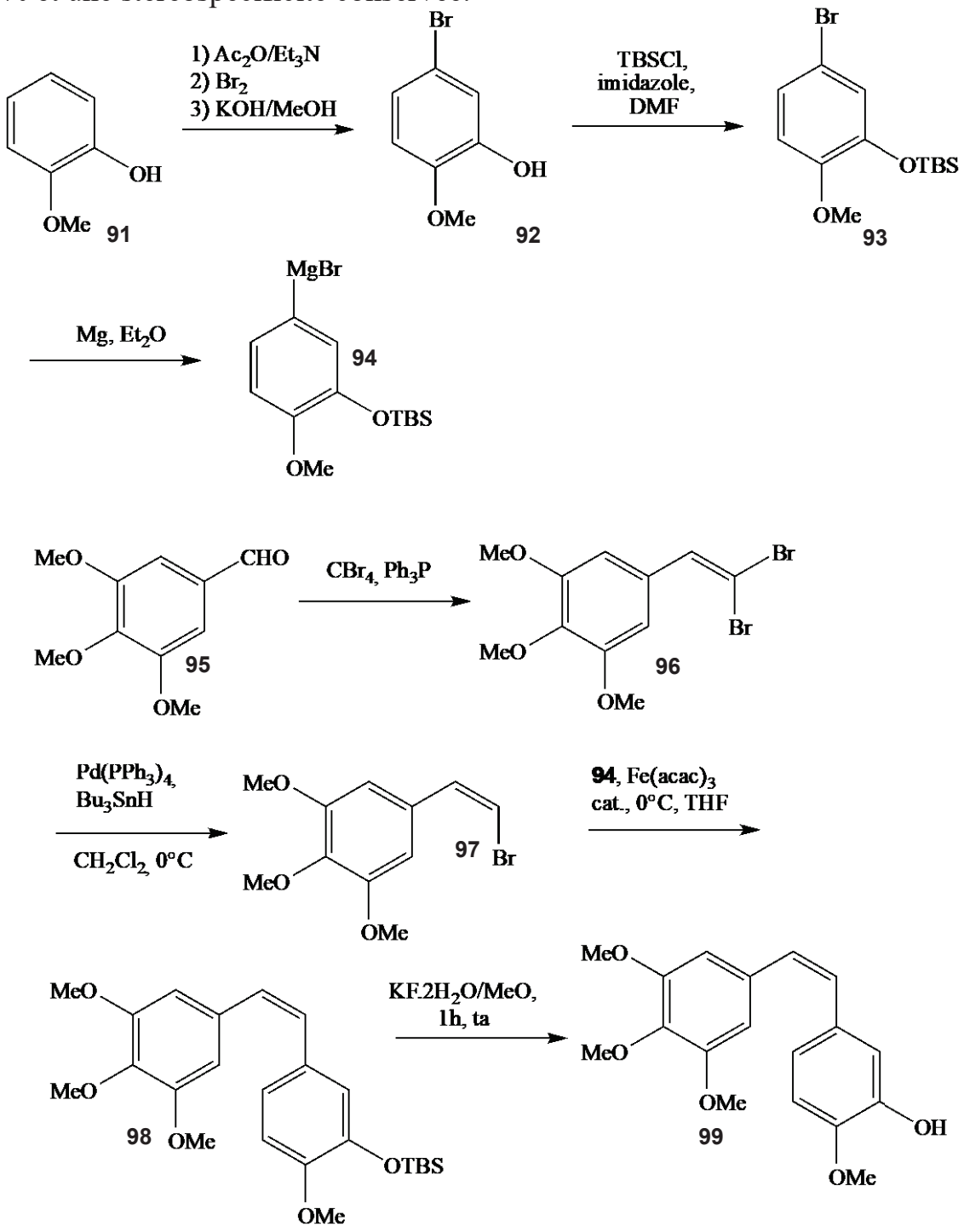


Schéma 19: Synthèse de la CA-4 par Camacho-Davila[111]

SYNTHESE DES ANALOGUES HETEROCYCLIQUES DE LA CA-4

Tel que mentionné précédemment, les analyses des relations structures activités ainsi que les synthèses menées précédemment au laboratoire, ont mis en avant l'intérêt des analogues possédants différentes structures hétérocycliques à la place du noyau B de la CA-4. De plus, le remplacement de la double liaison *cis* reliant les deux noyaux par une insaturation de type *iso*, par un groupement cétonique ou encore par un noyau triazole constitue des options intéressantes que nous avons cherché à étudier dans le cadre de cette thèse : ceci dans l'optique de bloquer le phénomène d'isomérisation *in vivo* propre à la CA-4.

1. SYNTHESE DE DERIVES *(Z)-ETHYLENIQUE* BENZO[*B*]THIOPHENE ET THIOPHENE DERIVES DE LA CA-4

Les dérivés stilbènes représentent une part importante des pharmacomodulations réalisées sur la CA-4. De par l'analyse des résultats de modélisation moléculaire et des données de la littérature, la synthèse d'analogues benzo[*b*]thiophène et thiophène offre donc une alternative intéressante aux noyaux furane et indole, nous permettant ainsi d'évaluer les activités biologiques et antiprolifératives de ces bioisostères.
Ainsi et comme décrit ci-après, différentes méthodes ont été utilisées.

1.1 Utilisation de la réaction de Suzuki-Miyaura

Comme précédemment décrite, le couplage de Suzuki-Miyaura permet la formation d'alcènes et son application à la synthèse d'analogues de la CA-4 a déjà été étudié dans plusieurs publications.[102,112]
Par ce couplage, nous visons avant tout la synthèse stéréospécifique de dérivés *cis* de la CA-4 : le ratio *(Z)/(E)* a donc été le paramètre clé que nous avons cherché à atteindre lors de ce travail.

1.1.1 Synthèse des produits de départ en vue du couplage de Suzuki-Miyaura

Le couplage de Suzuki-Miyaura met en jeu deux espèces distincts réactives en la présence d'un dérivé halogéné (dans le cas présent, monobromovinyltriméthoxybenzène 101) ainsi qu'un dérivé du bore (ici, un acide boronique).
Dans un premier temps, l'obtention du monobromovinyltriméthoxybenzène 101 se fait en 2 étapes, à partir du 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde. Ce dernier est transformé en dibromovinyltriméthoxybenzène 100 sous l'action du tétrabromure de méthane et de PPh_3 dans le CH_2Cl_2. L'hydrogénolyse d'une liaison carbone-

brome pallado-catalysée subséquente résulte en l'obtention du (*Z*)-bromoalcène correspondant avec un ratio (*Z*)/(*E*) = 91/9 (*Schéma 20*).

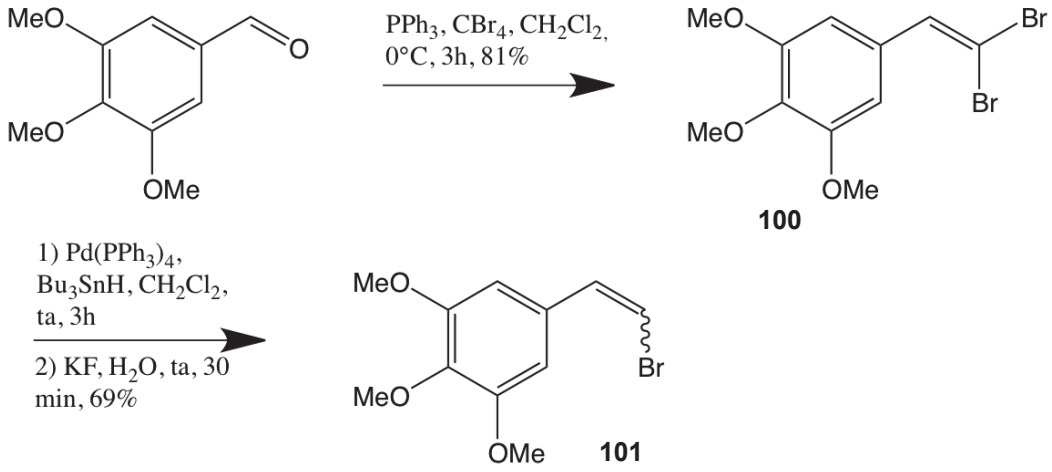


Schéma 20: synthèse du 1-[(Z)-2-bromovinyl)]-3,4,5-trimethoxybenzène

Cette réaction entraine la formation du dérivé (*Z*) final désiré, qui est très difficile à séparer par simple chromatographie sur gel de silice de son régioisomère (*E*).

Les acides boroniques porteurs d'un noyau thiophène envisagés sont des dérivés commerciaux, que nous nous sommes donc procuré dans le but de réaliser la synthèse.
A l'inverse, les acides 2- et 3-benzo[*b*]thiophénylboronique ont été synthétisés au préalable dans notre laboratoire selon le *Schéma 21*.

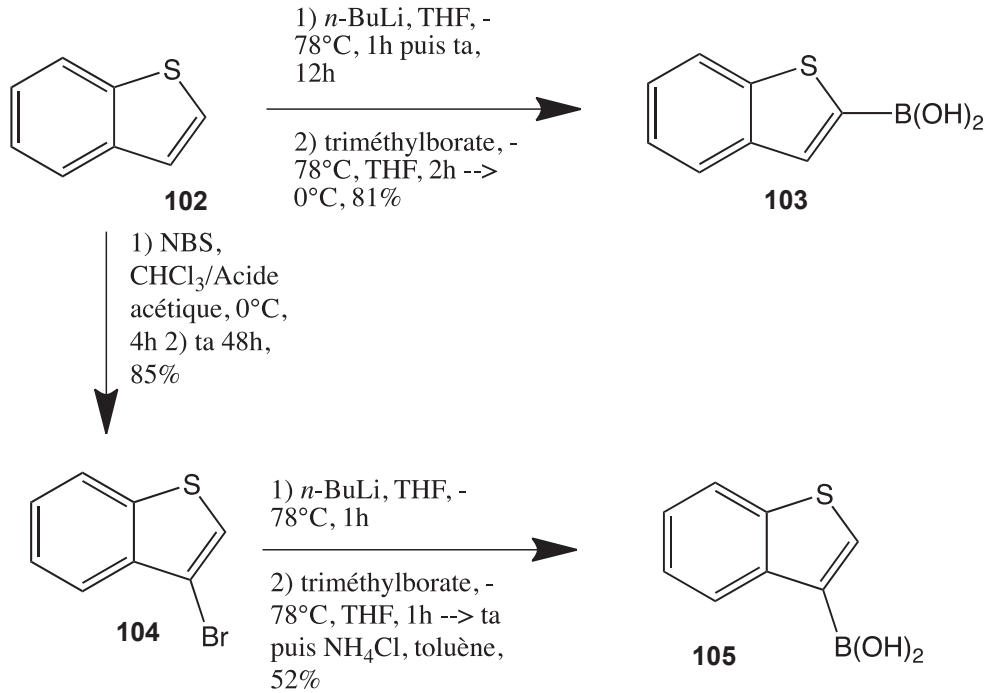


Schéma 21: synthèse des acides benzo[*b*]thiophènes boroniques

Finalement, le couplage entre les deux espèces est mis en jeu, selon les conditions expérimentales décrites dans le *Schéma 22*.

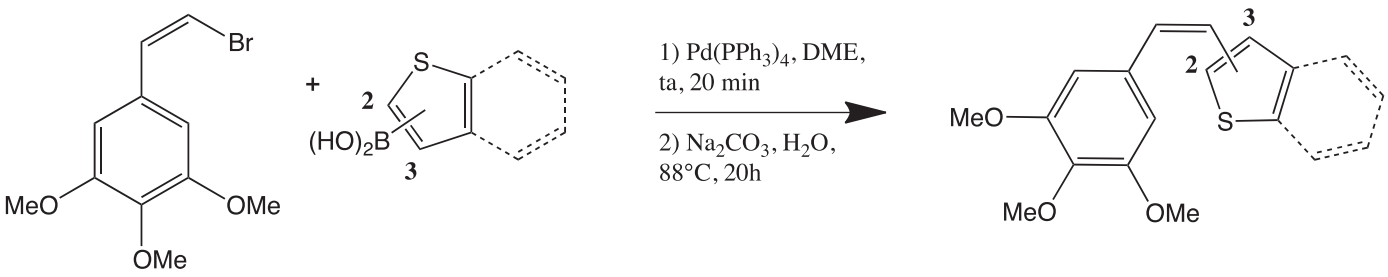


Schéma 22: Schéma général de la synthèse de derivés hétérocyclique soufrés de la CA-4 *via* couplage de Suzuki-Miyaura

L'analyse du ratio (*Z*)/(*E*) réalisé sur le brut réactionnel ainsi que le rendement après le couplage nous donne les résultats suivants (*Tableau 4*) :

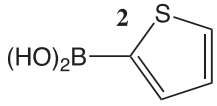
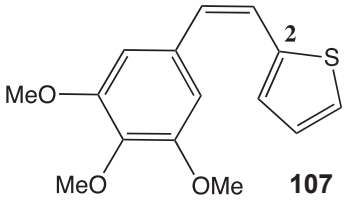
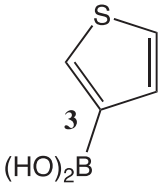
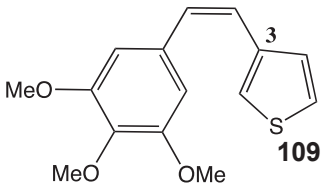
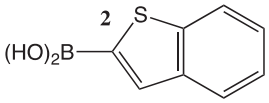
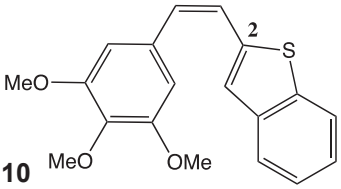
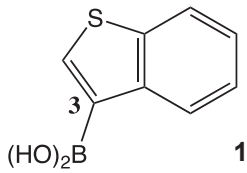
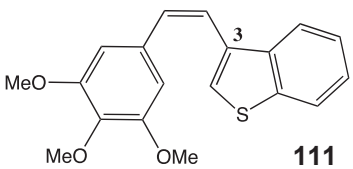
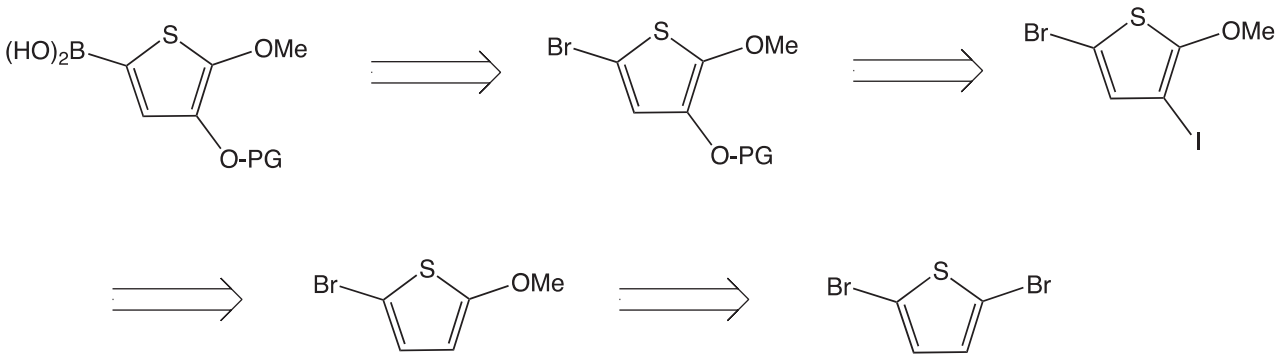
Substrat	Produit	Ratio (*Z*)/(*E*)	Rendement isolé (*Z*) (%)
 **106**	 **107**	**70 / 30**	**57 %**
 **108**	 **109**	**80 / 20**	**59 %**
 **103**	 **110**	**90 / 10**	**57 %**
 **105**	 **111**	**83 / 17**	**28 %**

Tableau 4 : Synthèse des dérivés soufrés hétérocycliques

1.1.2 Synthèse des derivés méthoxy-hydroxythiophènes

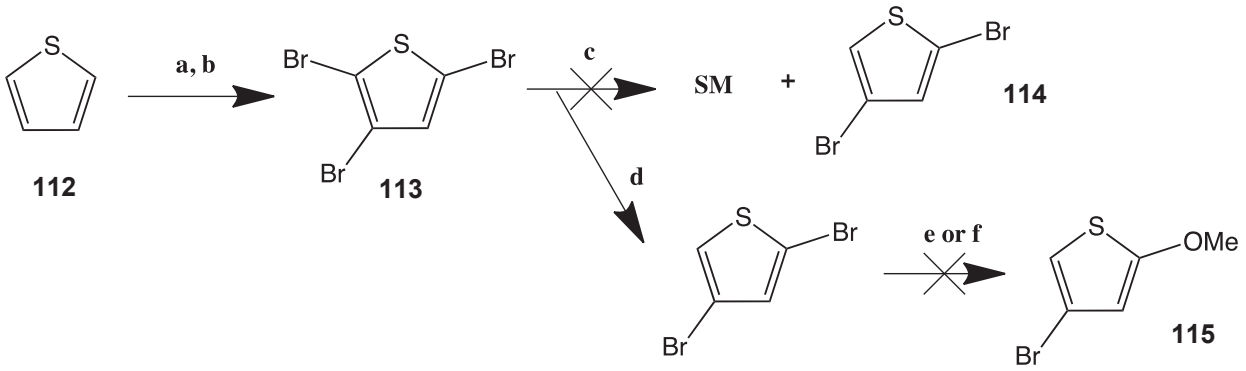
Dans le but d'explorer les relations structure-activités, nous avons également essayer de synthétiser les derivés thiophènes doublement substitués par un groupement méthoxy et hydroxyle afin de nous rapprocher le plus possible de la structure de la CA-4, le noyau thiophène etant un motif isostère du noyau phényle. Le voie de synthèse principale qui a consisté en la formation au préalable de l'acide boronique correspondant et que nous avons imaginé est la suivante (*Figure 31*) :



PG = Groupement Protecteur

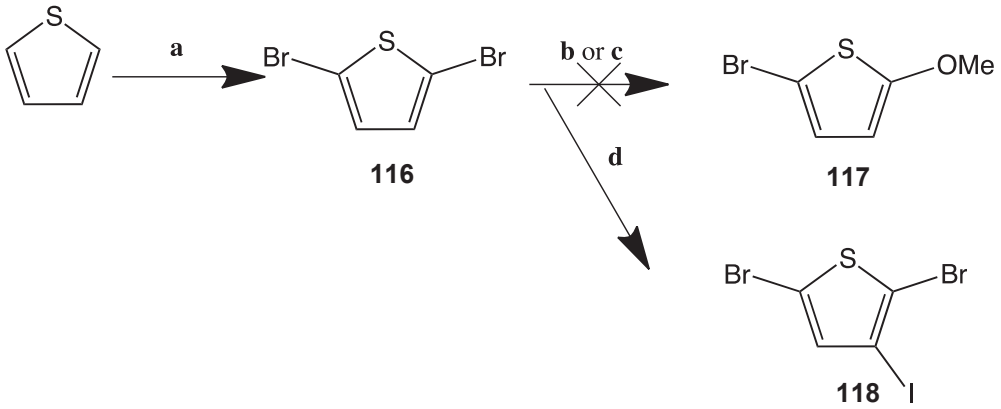
Figure 31 : Approche rétrosynthétique des derivés acides méthoxy-hydroxythiophènes boroniques

Bien que le stratégie de synthèse que nous avons imaginé semblait prometteuse, nous avons été confrontés à de nombreux problèmes lors de nos experimentations. Dans un premier temps et tel que demontré ci-après, la synthèse du 4-bromo-2-méthoxythiophène s'est avérée très difficile, notamment de par la position de l'atome de brome sur le noyau thiophène, disposant d'une réactivité difficile à contrôler dans ce cas précis (obtention de derivé di- et tri-bromé). Ceci nous a donc poussé à nous tourner vers une autre approche synthétique, en incoporant par exemple un atome halogéné différent (*Schéma 23*, *Schéma 24*).



a. Br_2, CH_2Cl_2, ta, 24h; b. Reflux 2h, 80%; c. n-BuLi, Et_2O, -40°C, 5 min; d. *n*-BuLi, Et_2O, -78°C, 10 min, 46%; e. NaOMe, CuBr, MeOH, Reflux, 5h; f. MeOH, KOH, 18-C-6, Toluène, 110°C, 4h.

Schéma 23 : Première tentative de synthèse du 4-bromo-2-méthoxythiophène



a. 1) HBr, Et_2O -25°C, 5 min 2) Br_2/Et_2O, -25°C, 45 min 3) -5°C, 30 min, 34%; b. NaOMe, CuBr, MeOH, Reflux (70°C), 5h; c. MeOH, KOH, 18-C-6, Toluène, 110°C, 4h; d. NIS, $BF_3.Et_2O$, 0°C, 30 min puis ta, 24h, 50%.

Schéma 24 : Deuxième tentative de synthèse du 4-bromo-2-méthoxythiophène

Le caractère nucléophile de la substitution réalisée sur le noyau thiophène ainsi que la difficulté à insérer un autre groupement électroattracteur en position 2 du cycle expliquent surement l'échec de cette voie de synthèse. Ceci étant, nous avons tout de même réussi à former le 2,4-dibromo-3-iodothiophène sur lequel, malheureusement, les différentes étapes de substitutions nucléophiles se sont montrées non concluantes.

Dans la fin des années 1980, L.Brandsma et R.L.P. De Jong ont également travaillé sur la synthèse de dérivés thiophènes substitués en différentes positions (*Schéma 25*).[113] A partir de dérivés 1,3-dimétalliques acétyléniques mis en réaction avec des thiocarbonyles non énolisables, ils ont synthétisé tout une librairie de thiophènes fonctionnalisés et, par la suite, évalué l'efficacité de ces voies de synthèse.

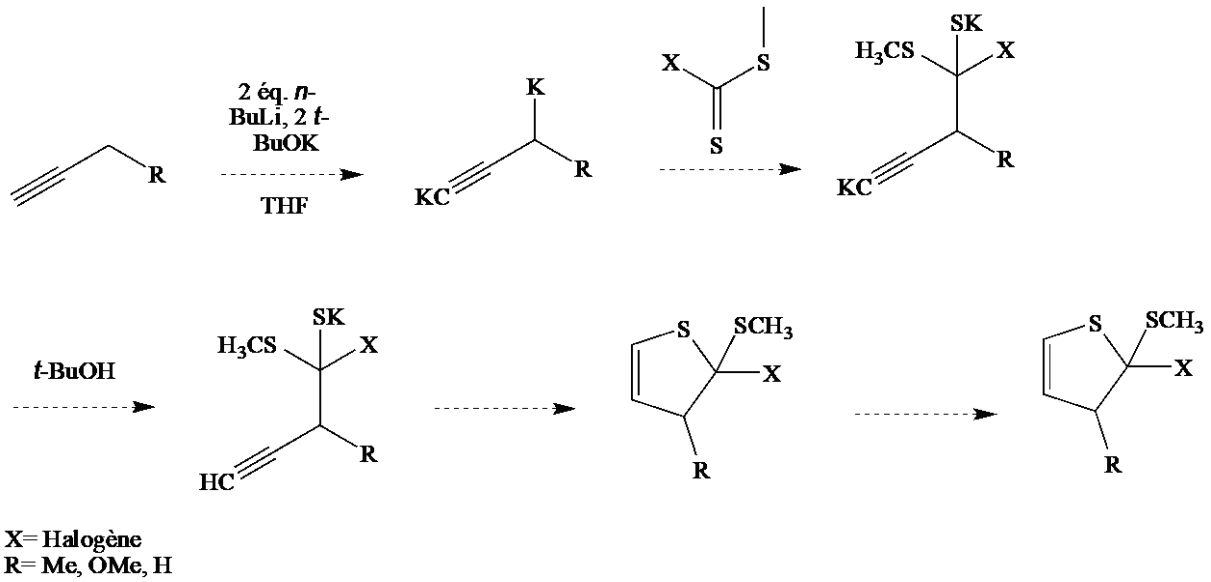


Schéma 25: Méthode de L.Brandsma et R.L.P. De Jong pour la synthèse de thiophènes substitués

Nous nous sommes donc inspiré de leur travail, et avons adapté leur méthode à la synthèse de nos dérivés méthoxyhydroxythiophène selon le schéma réactionnel suivant (*Schéma 26*) :

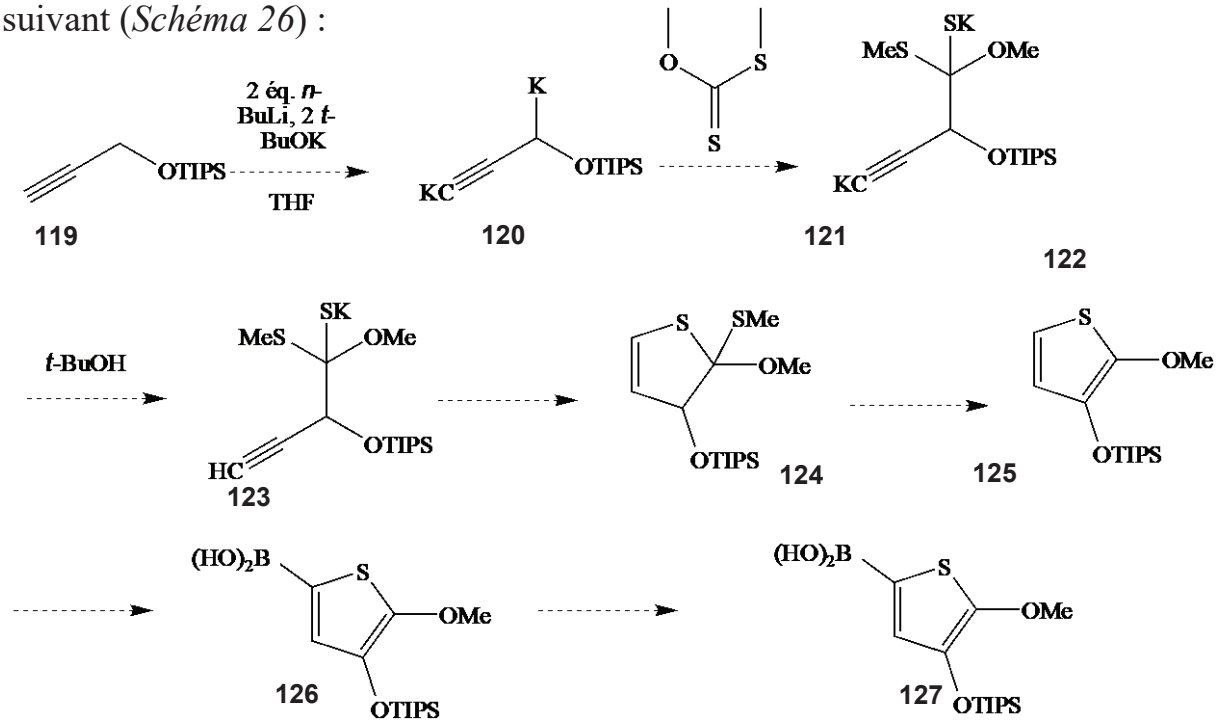


Schéma 26: Stratégie de synthèse des derivés méthoxyhydroxythiophènes inspirée de Brandsma et De Jong

Malgré de nombreux essais, ce mécanisme réactionnel n'a pas donné les résultats escomptés. Notamment, l'étape de cyclisation s'est avéré extrêmement difficile à

réaliser, et ne fournit pas le composé désiré (*Schéma 27*). Etant donné la taille importante du groupement protecteur, nous avons réalisé cette synthèse en modifiant ce dernier et en portant notre choix sur d'autres groupements.

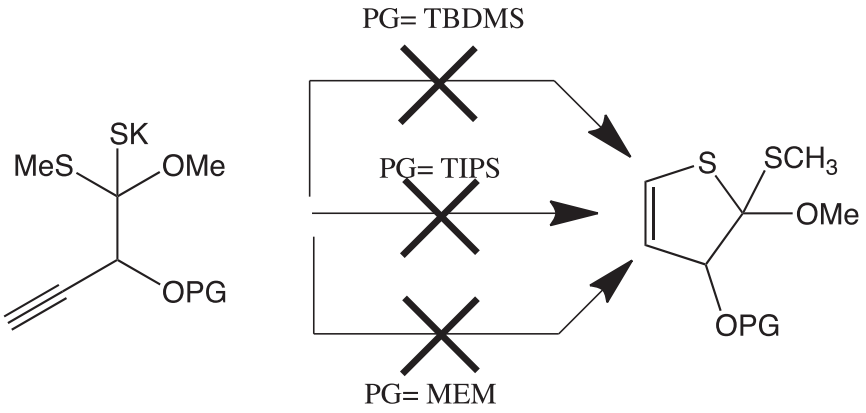


Schéma 27: Tentative de synthèse des dérivés thiophènes protégés

Cependant, le remplacement par un éther de méthoxyéthoxyméthyl MEM ou par un autre groupement silylé a donné exactement le même résultat.

Il est important de noter que les réactifs utilisés lors de nos expérimentations ont tous été purifiés ou dosés avant utilisation, afin de s'assurer de leurs qualités. Aussi, ces manipulations ont été menées dans une atmosphère inerte sous argon, permettant ainsi de garantir des conditions stables pendant toute la durée de la réaction.

1.2 Synthèse de derivés méthoxythiophènes de la CA-4 par réaction de Wittig

Après l'échec des synthèses précédentes, nous nous sommes tourné vers la synthèse de composés méthoxythiophènes de la CA-4. En effet, et d'après les études de modélisation moléculaire, les composés **128** et **129** présentent un intérêt tout particulier puisqu'ils semblent s'intercaler directement (pour le composé **128**) dans le site de la colchicine, d'une façon presque similaire à celle de la CA-4 (*Figure 32*).

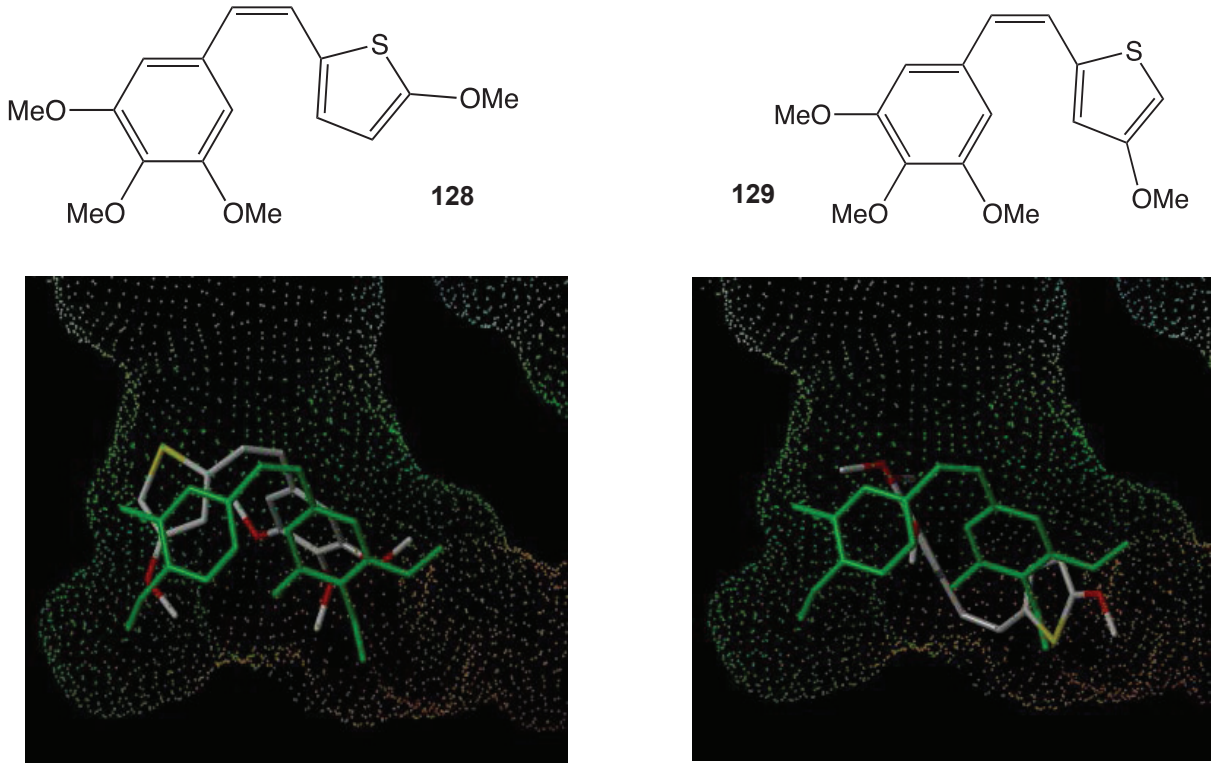
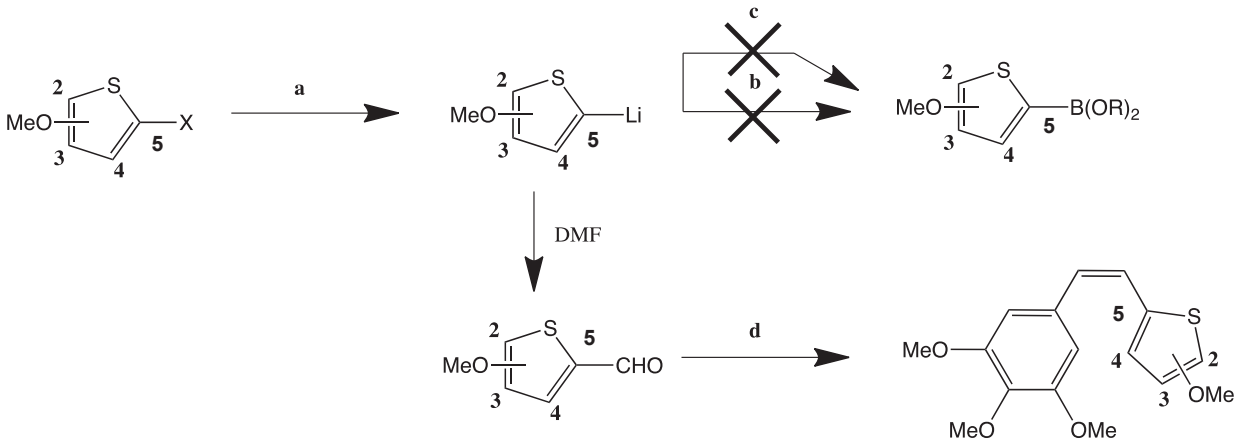


Figure 32: Poses privilégiées après docking moléculaire (fichier 1sa0.pdb) de la CA-4 (en vert), des composés **128** et **129.**

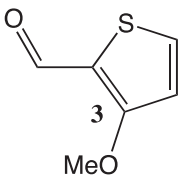
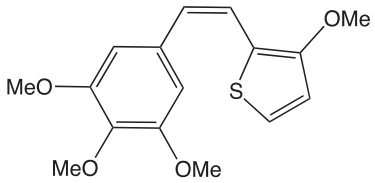
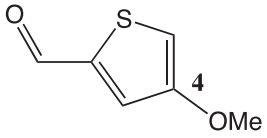
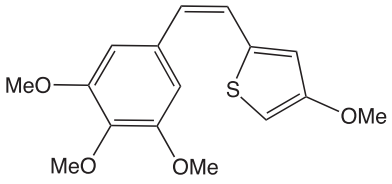
Pour cela, nous avons essayé de fonctionnaliser la position 5 du thiophène en acide boronique. Malgré toutes nos tentatives et après avoir fait varier l'espèce électrophile (triméthylborate ou bis-pinacolate), nous avons décidé de piéger le lithien formé *in situ* par du DMF (*Schéma 28*). La synthèse de l'aldéhyde correspondant confirme donc que c'est le piègage par le derivé du bore qui pose problème ; l'encombrement stérique ainsi que l'effet électronique induit par le soufre semble impacter grandement le positionnement du groupement borate en position 2.
Bien que cette méthode ait déjà été exploré et que la stéréospécificité de la réaction soit moindre que celle de Suzuki-Miyaura, la réaction de Wittig fut alors logiquement employée en vue de synthétiser les composés finaux. La formation au préalable des dérivés aldéhydes du thiophène s'avérant efficace, nous nous sommes donc concentré davantage sur cette méthode selon l'approche suivante (*Schéma 28*).



a. *n*-BuLi 1.1 eq, Et_2O pour précurseur **130** et THF pour précurseur **132/134**, -78°C, 1h puis addition DMF (1.2 equiv), 20 min, rt puis reflux 1h pour précurseur **130**, 90%, et -70°C 15 min puis 2h rt pour précurseurs **132/134**, 47% / 37%; b. triméthylborate, THF, -70°C 2h puis -70°C → ta; c. Bispinacolato diboron, THF, -70°C 2h puis -70°C → ta; d.1) bromure de 3,4,5-trimethoxybenzyltriphenylphosphonium 1.0 equiv, THF, *n*-Buli, -78°C, 30 min, puis rt 1h. 2) addition de l'aldéhyde, THF, -78°C, 1h puis ta, 24h, 14% pour **131**, 23% pour **133** et 47% pour **134**.

Schéma 28 : Synthèse de derivés méthoxythiophènes de la CA-4

En plus des dérivés substitués en position 2 et 3 du thiophène, nous avons de la même manière synthétisé le composé substitué en position 4 afin de réaliser un travail complet de pharmacomodulation. Le résultat de ces expérimentations sont résumés dans le *Tableau 5*.

Substrat		**Produit**		**Rdt (%)**
130		**131**		**14**
132		**133**		**23**

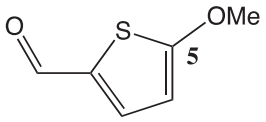
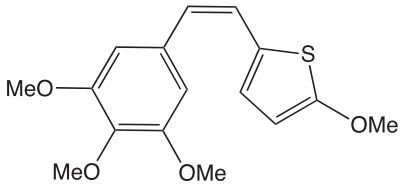
134		**135**		**47**

Tableau 5 : Rendements obtenus lors de la synthèse des dérivés thiophènes de la CA-4

Le but de ce travail sur les analogues thiophènes et benzo[*b*]thiophène était non seulement d'évaluer l'effet de la substitution du noyau B de la CA-4 par un hétérocycle soufré, mais également d'analyser des facteurs plus complexes tels que l'importance de la conformation et notamment la rigidité induite par la présence d'une double liaison (*Z*). En d'autres termes, l'angle dièdre présent entre le plan du noyau aromatique et celui de la liaison *cis*-méthylène joue un rôle clé dans l'activité antiproliférative du composé puisqu'il va impacter la faculté à se fixer spécifiquement au niveau du site de la colchicine (*Figure 26*).

Ainsi nous avons synthétisé un analogue structurellement proche de type benzo[*b*]thiophène, et qui permet d'évaluer cette hypothèse. Notre choix s'est porté sur le dérivé (*Z*)-3-méthyl-(3,4,5-triméthoxystyryl)benzo[*b*]thiophène, formé *via* réaction de Wittig à partir du 3-méthyl-benzo[*b*]thiophènecarboxaldéhyde **137**, obtenu au préalable à partir du composé **136** (*Schéma 29*).

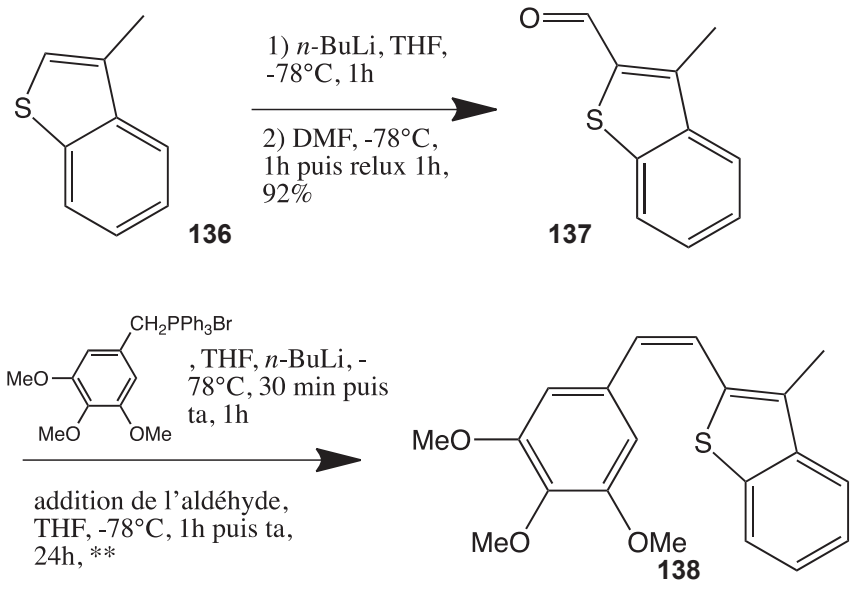


Schéma 29: Synthèse du (Z)-3-méthyl-(3,4,5-triméthoxystyryl)benzo[*b*]thiophène par réaction de Wittig

Dans la continuité de ces travaux, nous avons également voulu appliquer la réaction de Wittig à la synthèse de l'analogue hydroxylé en position 5 du benzo[*b*]thiophène selon le schéma suivant (*Schéma 30*) :

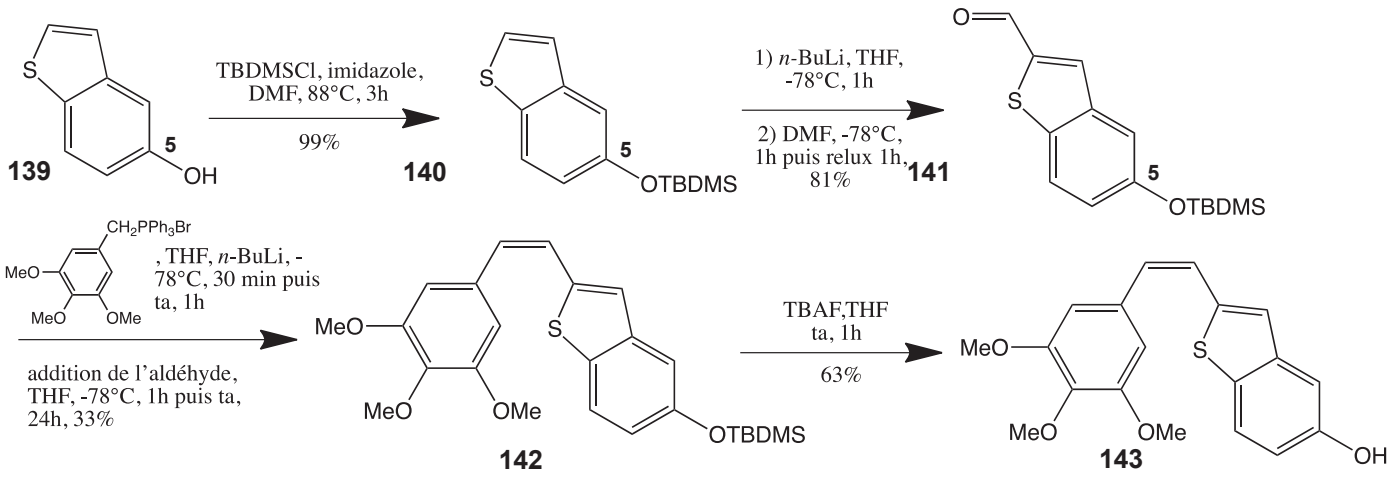


Schéma 30: Synthèse du (Z)-(3,4,5-triméthoxystyryl)benzo[*b*]thiophèn-5-ol **143** par réaction de Wittig

Comme observé, la synthèse de ce composé **143** nécessite préalablement une étape de protection (réalisée grâce au chlorure de *tert*-butyl diméthyl silyle) ainsi qu'une étape de déprotection en présence d'un réactif fluorée, le TBAF.

Cette synthèse a été réalisée en vue d'obtenir un nouvel analogue *cis*-méthylène de la CA-4 substitué par un groupement polaire en position 5 du benzo[*b*]thiophène. En effet, la substitution dans cette position des analogues de la CA-4 a précédemment été réalisée dans notre laboratoire et a montré des résultats prometteurs, que nous avons tenté d'exploiter.[114]

1.3 Synthèse des dérivés (*Z*)-stilbènes *via* couplage de Sonogashira combinée à une hydrogénation partielle pallado-catalysée des diarylacétylènes

Les réactions de Wittig et de Suzuki nous ont permis de synthétiser un certain nombre de composés dérivés de la CA-4 avec des rendements plus ou moins satisfaisants selon les produits de départ. De ce fait, et d'après certaines études déjà menées au laboratoire par Thi Thanh Binh NGUYEN, l'hydrogénation partielle catalysée par l'acétate de palladium II $Pd(OAc)_2$ offre une perspective nouvelle et intéressante dans le but de synthétiser stéréoselectivement des analogues (*Z*)-stilbènes de la CA-4 (*Schéma 31*).

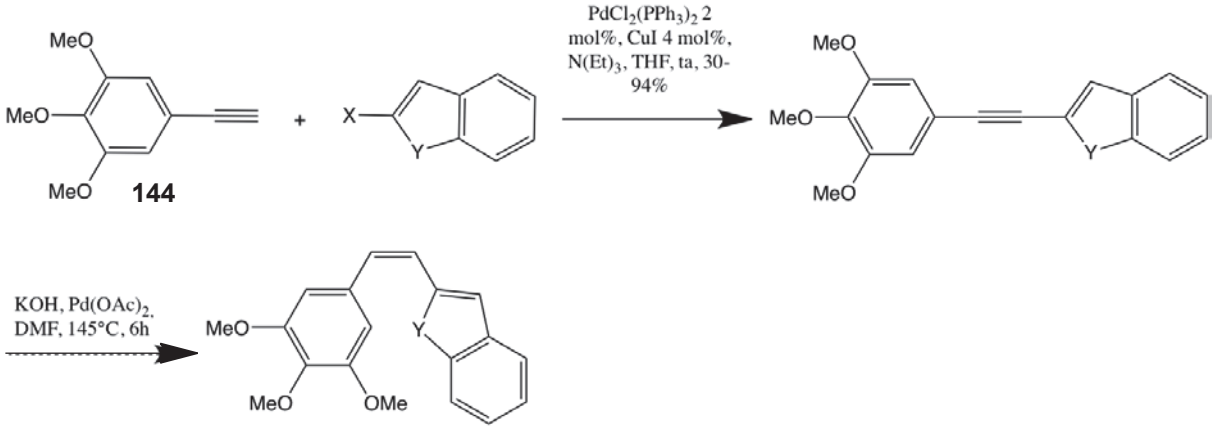


Schéma 31: Synthèse de derivés (*Z*)-stilbènes *via* réaction de Sonogashira selon Nguyen et coll.[114] combinée à l'hydrogénation partielle de la double liaison

1.3.1 Synthèse des halogénures de 2-hétéroaryle

La déprotonation des hétéroarènes est une méthode qui a assez récemment été revisité par Mongin *et coll.* en 2008.[115] Dans leur publication, ils ont regioséléctivement déprotoné la position 2 d'un grand nombre d'hétérocycles aromatiques à 5 membres. Pour cela, ils ont employé des agrégats mixtes de Li/Zn formés *in situ* à partir de $ZnCl_2$.TMEDA et de 2,2,6,6-tétraméthylpiperidinamidure de lithium en solution dans le THF (*Schéma 32*). Les anions intermédiaires formés grâce à ce procédé présentent une stabilité accrue en comparaison à d'autres méthodes de déprotonation, ce qui favorise une cinétique réactionnelle à des températures moins importantes (parfois température ambiante). Le piégeage subséquent par un électrophile permet alors la fonctionnalisation d'un grand nombre de noyaux aromatiques tels que les indoles, benzofurane, benzoxazole, benzothiazole, pyrrole, spécifiquement sur la position 2 du noyau aromatique.

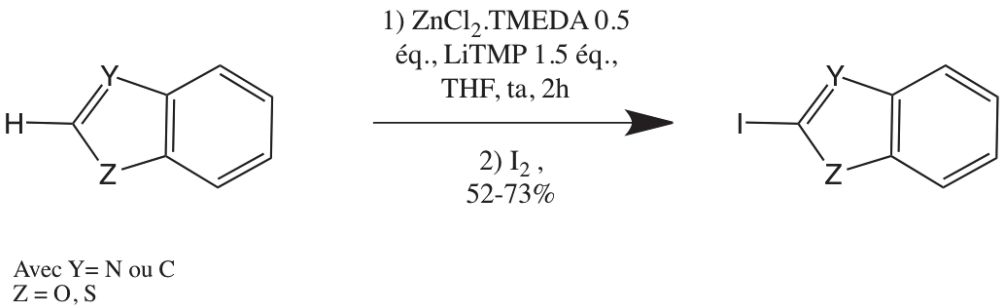


Schéma 32: Déprotonation-iodation des hétérocycles aromatiques par Mongin et coll.[115]

L'efficacité de cette méthode ainsi que la vaste diversité de substrats

hétérocycliques à laquelle elle peut être appliquée, en font un procédé de choix dans l'optique de former les dérivés halogénés nécessaires à la réaction subséquente de Sonogashira. Nous avons donc appliqué ce protocole expérimental à la synthèse de divers cycles aromatiques et obtenu d'excellents rendements, comme listé dans le *Tableau 6*.

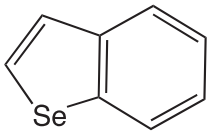
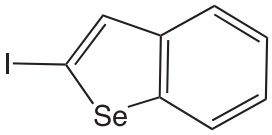
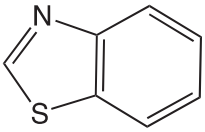
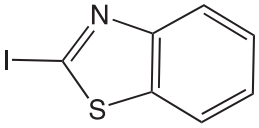
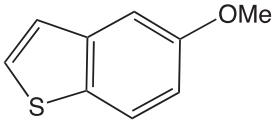
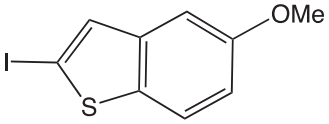
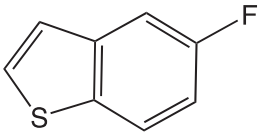
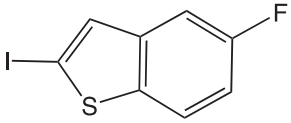
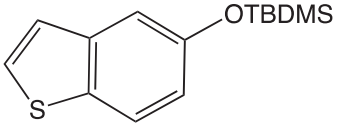
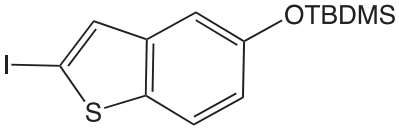
Substrat		Produit		Rdt (%)
145		**146**		**82**
147		**148**		**85**
149		**150**		**83**
151		**152**		**99**
153		**154**		**63**

Tableau 6**:** Résultat de l'halogénation sur différents hétéroarènes

La cinétique de la substitution électrophile réactionnelle varie de façon non négligeable dépendamment du substrat de départ : le suivi *via* chromatographie sur couche mince (CCM) après l'étape « d'iodation » sélective permet d'évaluer ce paramètre. Dans certains cas, la réaction s'achève seulement 2h après addition d'iode I_2, alors que pour d'autres réactifs il faut réaliser la réaction sur 24h avant d'obtenir le produit final iodé spécifiquement dans la position 2.

1.3.2 Couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira est une méthode relativement ancienne mais toujours très employée en chimie organique afin de former des liaisons C-C acétylénique. C'est une réaction de « cross coupling » pallado-catalysée qui met en jeu un alcyne terminal et un noyau arylique ou vinylique en conditions douces et en présence d'une base faible. Dans notre exemple, c'est le 5-éthynyl-1,2,3-triméthoxybenzène **144** qui va réagir avec l'hétéroarène en présence de CuI, $N(Et)_3$ et d'un catalyseur au palladium pour mener à l'alcyne correspondant (*Schéma 30* et *Tableau 7*).

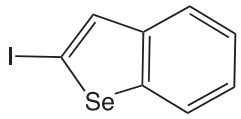
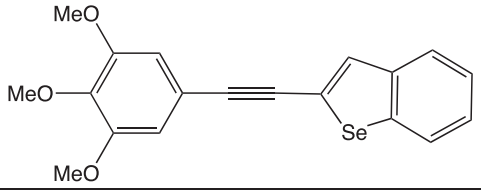
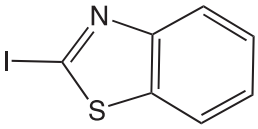
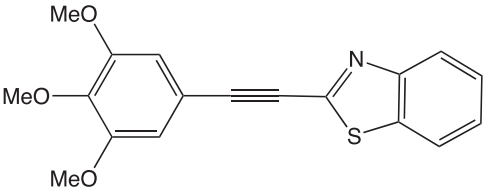
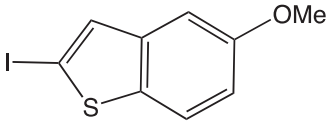
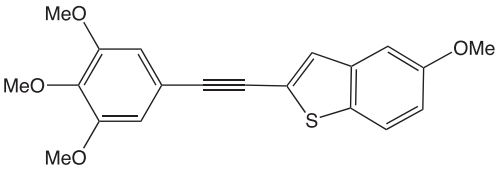
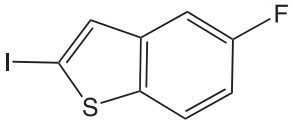
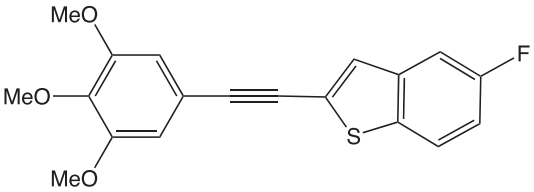
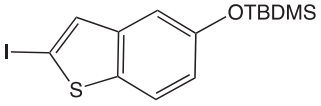
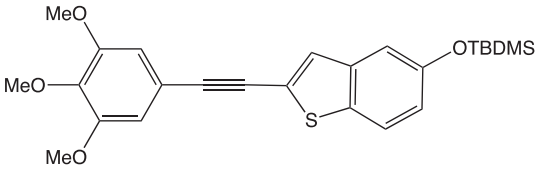
Halogénoarène		Produit de couplage		Rdt (%)
155		**156**		**93**
157		**158**		**60**
159		**160**		**88**
161		**162**		**67**
163		**164**		**95**

Tableau 7**:** Résultats des différents couplages de Sonogashira

Comme observé ci-dessus, la réaction de Sonogashira s'est montré particulièrement efficace pour la synthèse des alcynes correspondants puisque nous avons obtenu chacun des produits de couplage efficacement avec des

rendements variant de correct (composés **158** et **162**) à excellent (composés **156**, **160** et **164**).
Les analyses RMN du proton et du carbone 13 permettent de confirmer la structure des diaryalcynes obtenus avec la disparition du proton acétylénique à 3 ppm et l'observation de deux carbones tertiaires d'alcyne vers 79-97 ppm.

1.3.3 Réduction partielle stéréosélective pallado-catalysée des diarylacétylènes

L'hydrogénation partielle de la triple liaison acétylénique a fait l'objet de nombreuses études au cours de ces dernières années avec notamment l'utilisation de différents catalyseurs métalliques à base de mercure, d'or, de cuivre mais surtout de palladium.[116] Les difficultés généralement rencontrées au cours des différentes études font état d'une surhydrogénation non voulue jusqu'à l'alcane ou encore de problèmes d'oligomérisation, qui découlent sur l'inactivation du catalyseur conduisant ainsi à l'échec de la réaction. L'une des premières réductions partielles d'alcynes fut réalisée en utilisant le Pd désactivé de Lindlar, conduisant à l'alcène correspondant (*Schéma 33*).

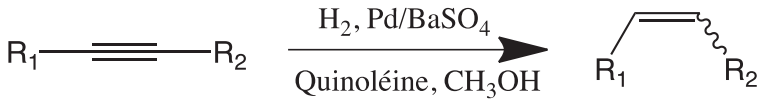


Schéma 33: Semi-hydrogénation catalysée par le réactif de Lindlar

En plus du problème de surhydrogénation conduisant à l'alcane, la stéréoséléctivité de l'alcène obtenu est un paramètre central que nous nous devons de contrôler, dans le but de synthétiser spécifiquement les dérivés (*Z*) finaux. Comme décrit dans la littérature, de nombreuses méthodes existent mais très peu d'entre elles aboutissent en la formation d'alcènes (*Z*) avec d'excellents rendements.

Li *et coll.*[117] ont développé une méthode employant comme catalyseur principal le palladium acétate (II) $Pd(OAc)_2$, en présence de KOH en solution dans le DMF (*Schéma 34*). Le mécanisme réactionnel réside en la formation *in situ* de formiate par hydrolyse basique du DMF, et qui va alors réduire la triple liaison acétylénique arpès insertion dans le complexe du palladium et élimination du CO_2. Cette réaction est réalisée en tube scellé et peut être appliqué à une vaste gamme de composés diarylacétylènes, avec des rendements qui sont généralement satisfaisants. La très bonne stéréoséléctivité en fait donc une méthode de choix pour la synthèse d'alcènes (*Z*), avec une application toute particulière pour les analogues de la CA-4 comme décrit spécifiquement par les auteurs.

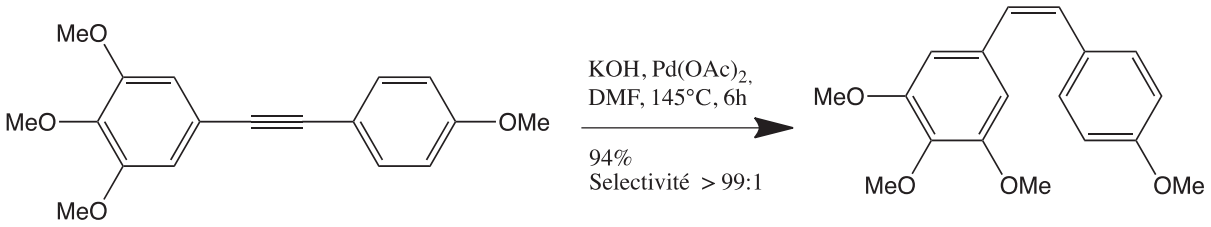


Schéma 34: Synthèse des analogues de la CA-4 par Li et coll.

Les dérivés éthyléniques synthétisés précédemment ont donc été soumis à ce procédé de semi-hydrogénation et ont donné les produits suivants (*Tableau 8*) :

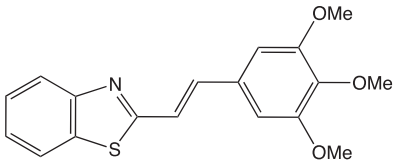
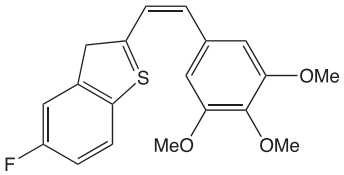
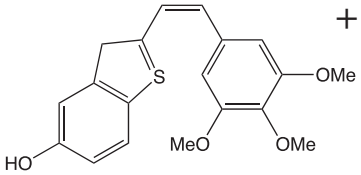
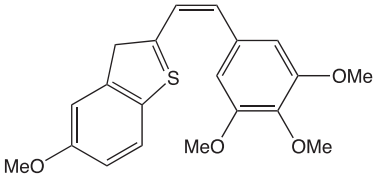
Produit de départ (PD)	**Produit final**		**Rapport (*Z*)/(*E*) (brut réactionnel)**	**Rdt final (*Z*) isolé (%)**
158	**165**		**1/99**	**35**
162	**166**		**92/8**	**30**
156	**/**	**PD**	**n.d.**	**n.d.**
164	**167**	 **+ PD**	**85/15**	**32**
160	**168**	 **+ PD**	**90/10**	**28**

Tableau 8: Résultats de la semi-hydrogénation partielle pallado-catalysée

Dans le cas du dérivé fluorobenzo[*b*]thiophène **162**, les conditions de synthèse selon Li *et coll.*, ont permis de synthétiser avec une excellente stéréosélectivité le composé final **166**. En effet, les analyses RMN du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C démontrent qu'avec ce dérivé, le régioisomère (*Z*) est formé à plus de 95%. En revanche, à partir du dérivé benzothiazole **158**, le composé **165** (*E*) non désiré initialement est obtenu stéréospécifiquement (< 99%).
D'autre part, l'hydrogénation partielle des dérivés **164** et **160** a donné des résultats quasi-similaires : la réduction permet la formation des composés finaux mais la présence d'une quantité non négligeable de produit de départ dans le milieu entache la réaction. De plus, la séparation par chromatographie sur colonne de silice est ici extrêmement compliquée : la polarité des composés étant pratiquement la même, ce procédé s'avère ici inefficace pour obtenir le dérivé (*Z*). Enfin, la réduction du 2-((3,4,5-triméthoxyphenyl)éthynyl)benzo[*b*]sélénophène s'est révélée la plus problématique. En effet, et malgré de nombreuses tentatives, le seul produit retrouvé dans le milieu n'est autre que le produit de départ **156**. L'atome de sélénium impacte grandement l'issue de la réaction, puisque sa seule présence permettrait vraisemblablement d'empoisonner le catalyseur, rendant la réduction de la triple liaison difficilement réalisable dans ces conditions réactionnelles.

2. SYNTHESE DES DERIVES DE LA PHENSTATINE ET *ISO*-METHYLENE DE LA CA-4

L'isomérisation *in vivo* de la double liaison (*Z*) en (*E*) des analogues de la CA-4 est un problème important puisqu'il induit une baisse de l'activité cytotoxique et biologique, diminuant alors l'efficacité lors de l'administration de ce type de composé. Afin de limiter ce phénomène et dans l'optique de créer des molécules potentiellement actives *in vivo*, nous nous sommes orientés vers la synthèse de composés disposant d'une double liaison *iso*-éthylènique en lieu et place de la double liaison (*Z*) traditionnellement retrouvé sur la CA-4. Ces analogues, prénommés *iso*-combrétastatines A-4 (*iso*CA-4), ont déjà fait l'objet d'études et ont démontré des activités très prometteuses (*Figure 33*).[118,119] De la même manière, les dérivés cétoniques nommés phenstatines,[120] représentent une alternative intéressante car ils affichent également une conformation bloquée de façon stérique en plus d'une polarité relativement accrue.

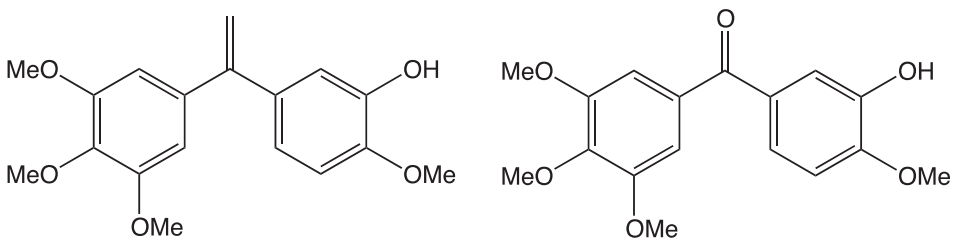
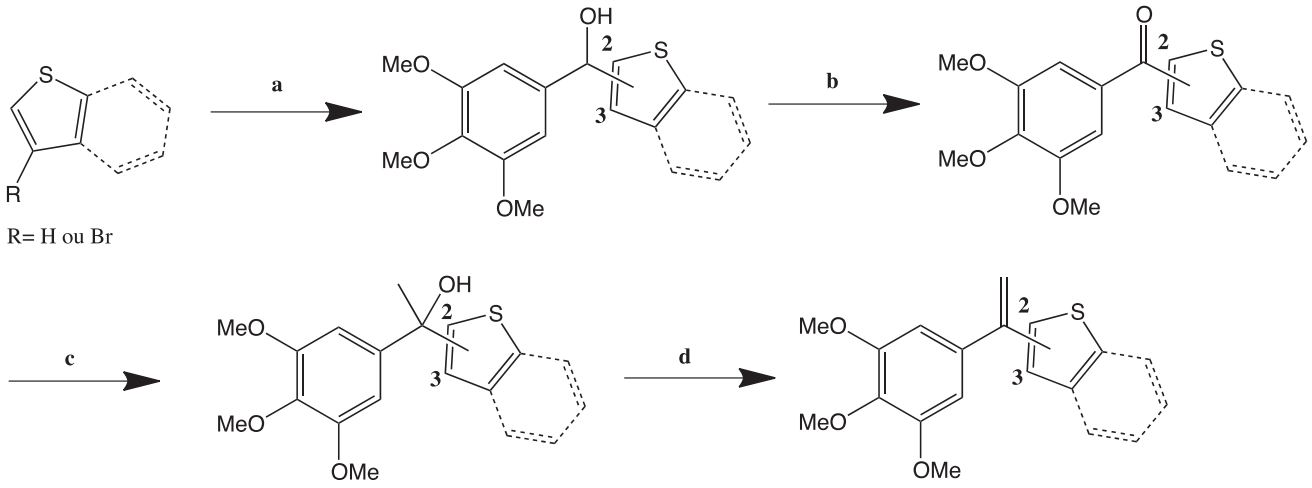


Figure 33 : Dérivés *iso*CA-4 (à gauche) et phenstatine (à droite)

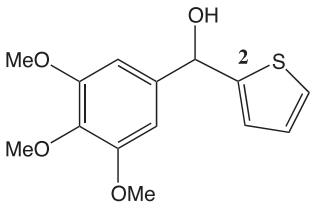
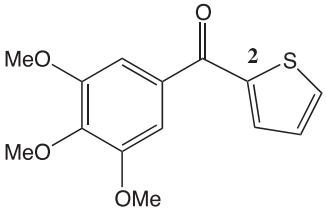
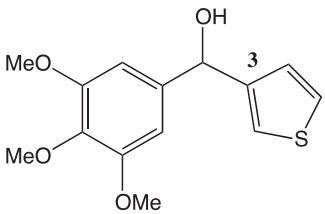
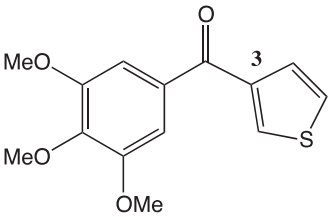
Les pharmacomodulations observées dans la litérature ont été réalisés sur des analogues de l'i*so*CA-4 possédant un noyau benzofurane ou indole au lieu du noyau B habituel.[68]

Dans la continuité de notre travail sur les hétérocycles soufrés aromatiques, nous avons donc synthétisé une librairie de composés porteurs de motifs *iso* et phenstatine, benzo[*b*]thiophènes et thiophènes de la CA-4 en vue d'évaluer dans un premier temps leurs propriétés inhibitrices de la polymérisation de la tubuline et leurs activités antiproliferatives. Pour cela, nous nous sommes basés sur la voie synthétique décrite dans le *Schéma 35*.



a.1) *n*-BuLi 1.3 éq, Et_2O, 0°C, 1.5h 2) 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde, 0°C, 3h, 82-85%; b. MnO_2 6 éq, CH_3CN, rt, 4h, 80-99% ; c. 1) MeMgI 3 éq, THF, 0°C, 30 min 2) rt, 15 min puis 75°C, 2h, 92-95% ; d. *p*-TsOH, toluène, reflux 2h, 89-93%.

Schéma 35: Synthèse des dérivés *iso*-CA-4 et phenstatine

Substrat		Rdt (%)	Produit		Rdt (%)
169		**80**	**170**		**99**
171		**72**	**172**		**99**

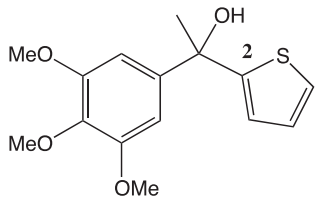
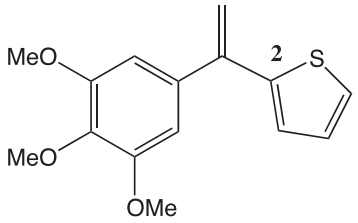
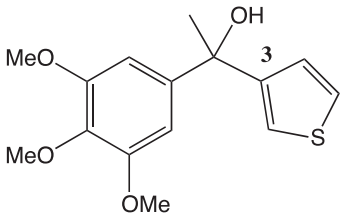
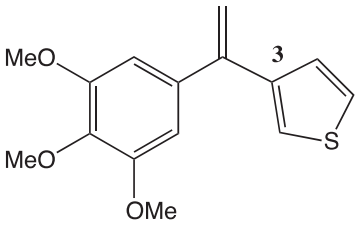
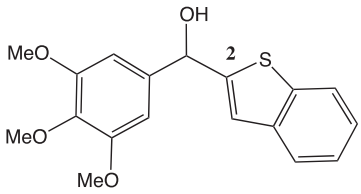
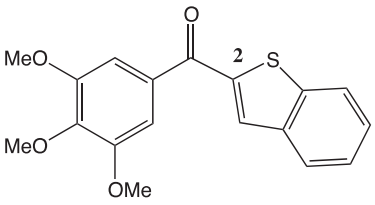
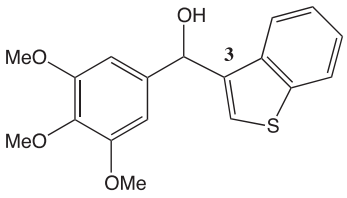
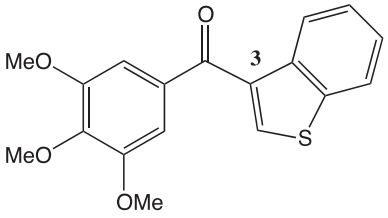
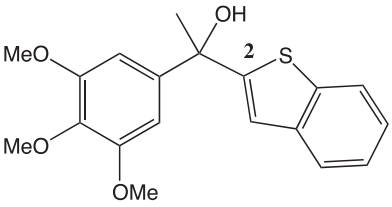
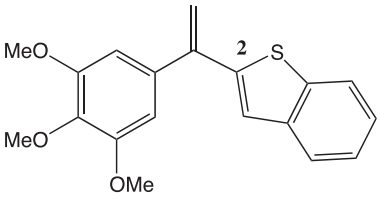
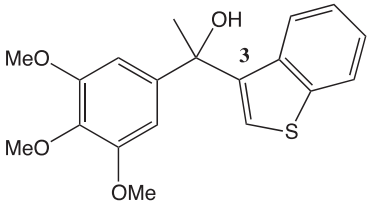
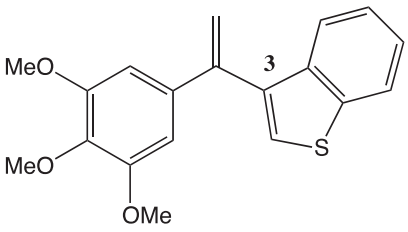
173		**67**	**174**		**98**
175		**76**	**176**		**94**
177		**85**	**178**		**97**
179		**82**	**180**		**80**
181		**77**	**182**		**93**
183		**82**	**184**		**89**

Tableau 9**:** Résultats des synthèses de derivés phenstatines et isoéthylènes de la CA-4

Les analyses par spectrométrie de masse et RMN nous ont permis de confirmer les structures des molécules **170-184** obtenus, par la disparition des deux protons de l'alcool tertiaire pour les composés finaux cétonique, et par la présence d'un singulet pour les protons iso-éthyléniques.

3. DERIVES 1,2,3-TRIAZOLE DE LA CA-4

Dans la continuité de nos travaux et afin de diversifier encore d'avantage notre connaissance sur les analogues de la CA-4, nous avons également synthétisé des dérivés possédant un noyau triazole à la place de la double liaison (*Z*). D'autre part, ce noyau azoté peut être substitué par différents groupements (*Figure 34*). Welsh *et coll.*[94] ont d'ailleurs synthétisé tout une série de derivés 3,4-diaryl-1,2,4-triazoles qui ont démontré d'excellentes activités antiprolifératives similaires à celle de la CA-4 mais une bien moins bonne cytotoxicité. De leur coté, Romagnoli *et coll.*[121] ont synthétisé spécifiquement des analogues de 1,5-diaryl-1,2,4-triazole et observé que ces derniers possédaient des valeurs cytotoxiques et d'inhibition de la polymérisation de la tubuline comparable à celle de la CA-4.[121]

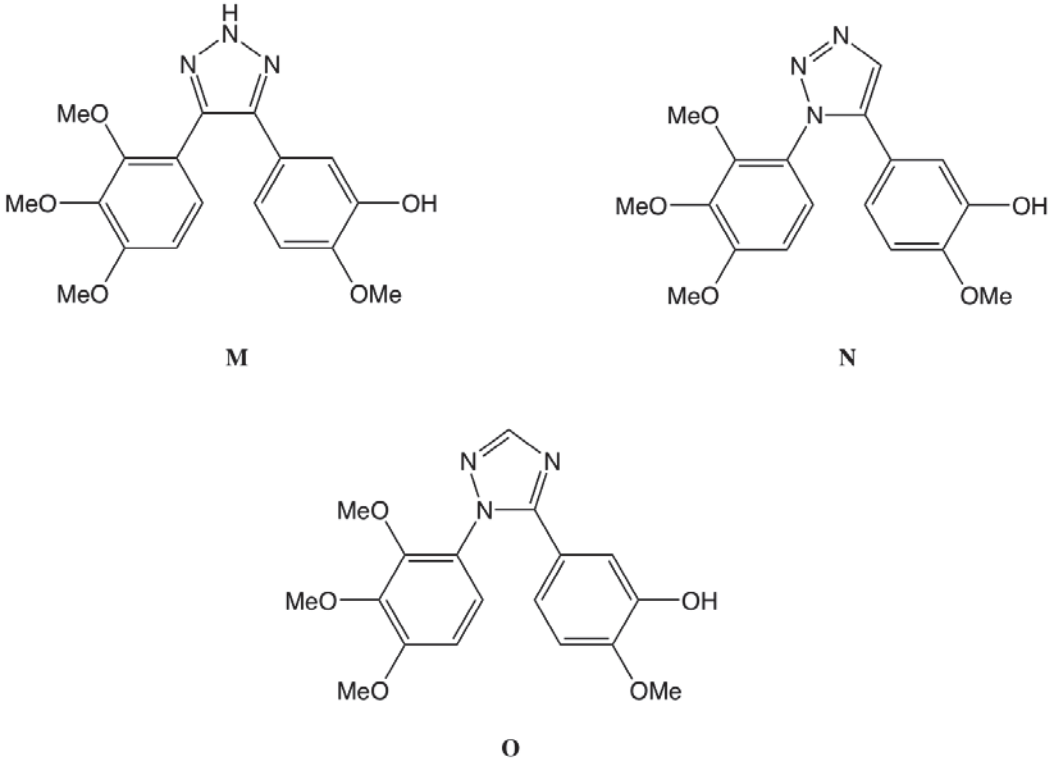


Figure 34: Structures de différents analogues triazoles de la CA-4

C'est dans cette optique que nous avons décidé de réaliser la synthèse de dérivés benzo[*b*]thiophènes possédant donc un noyau triazole en position centrale.
Pour ce faire, nous avons utilisé la cycloaddition [2+3] de Huisgen, permettant à partir de l'addition d'un dérivé azoture R_3-N_3 sur un alcyne, la synthèse de l'analogue triazole CA-4 correspondant (*Figure 35*).

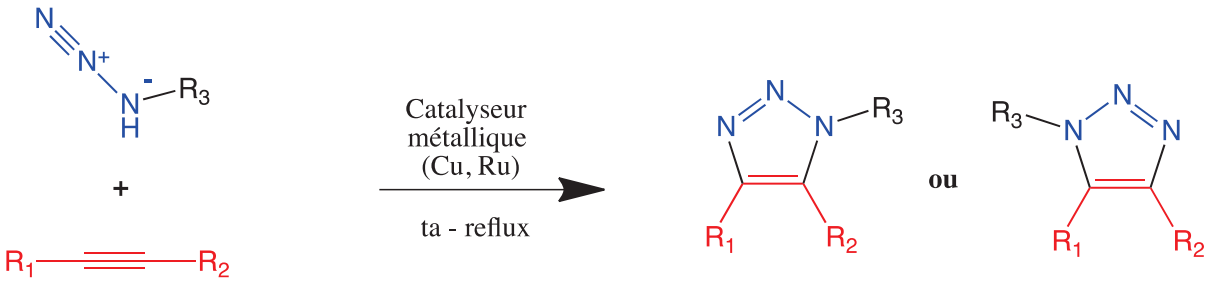


Figure 35 : Cycloaddition de Huisgen (Utilisation du catalyseur métallique Cu pour obtention du dérivé de gauche, et Ru pour le dérivé de droite)

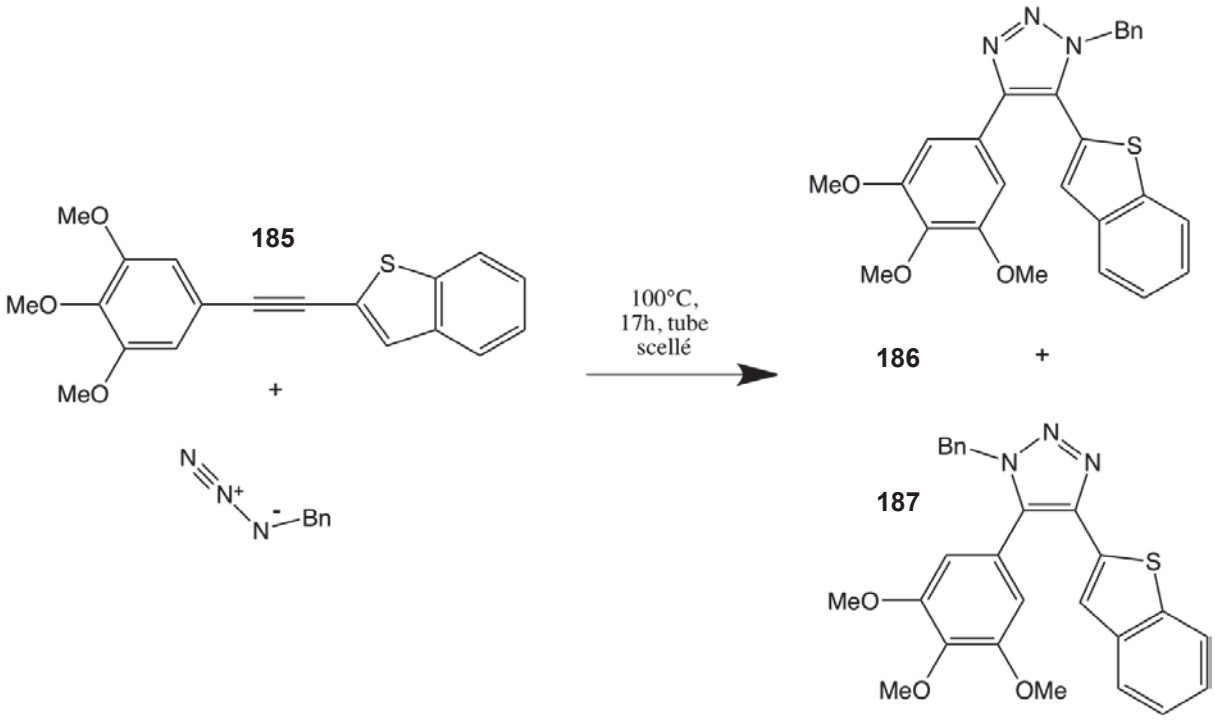


Schéma 36 : Synthèse de dérivés triazoles de la CA-4

Les composés finaux **186** et **187** ont été obtenu sous la forme d'un mélange des deux régioisomères avec un rendement de 35%.
En revanche, la séparation par chromatographie sur colonne de silice s'est avérée particulièrement difficile à réaliser. En effet, nous avons uniquement réussi à isoler un des composés avec un rendement de 6 %, accompagné d'un mélange inséparable des deux régioisomères. (Rdt = 20%).
Les analyses RMN ^{13}C, ^{1}H et surtout le spectre NOESY (*Figure 36*) ont confirmé que le composé isolé était le **186.**
En effet, on peut observer un couplage entre les protons benzyliques **BnCH2-R** et les 2 protons H1 du triméthoxybenzène, nous indiquant une conformation spatiale dans laquelle ces deux positions sont proches l'une de l'autre.

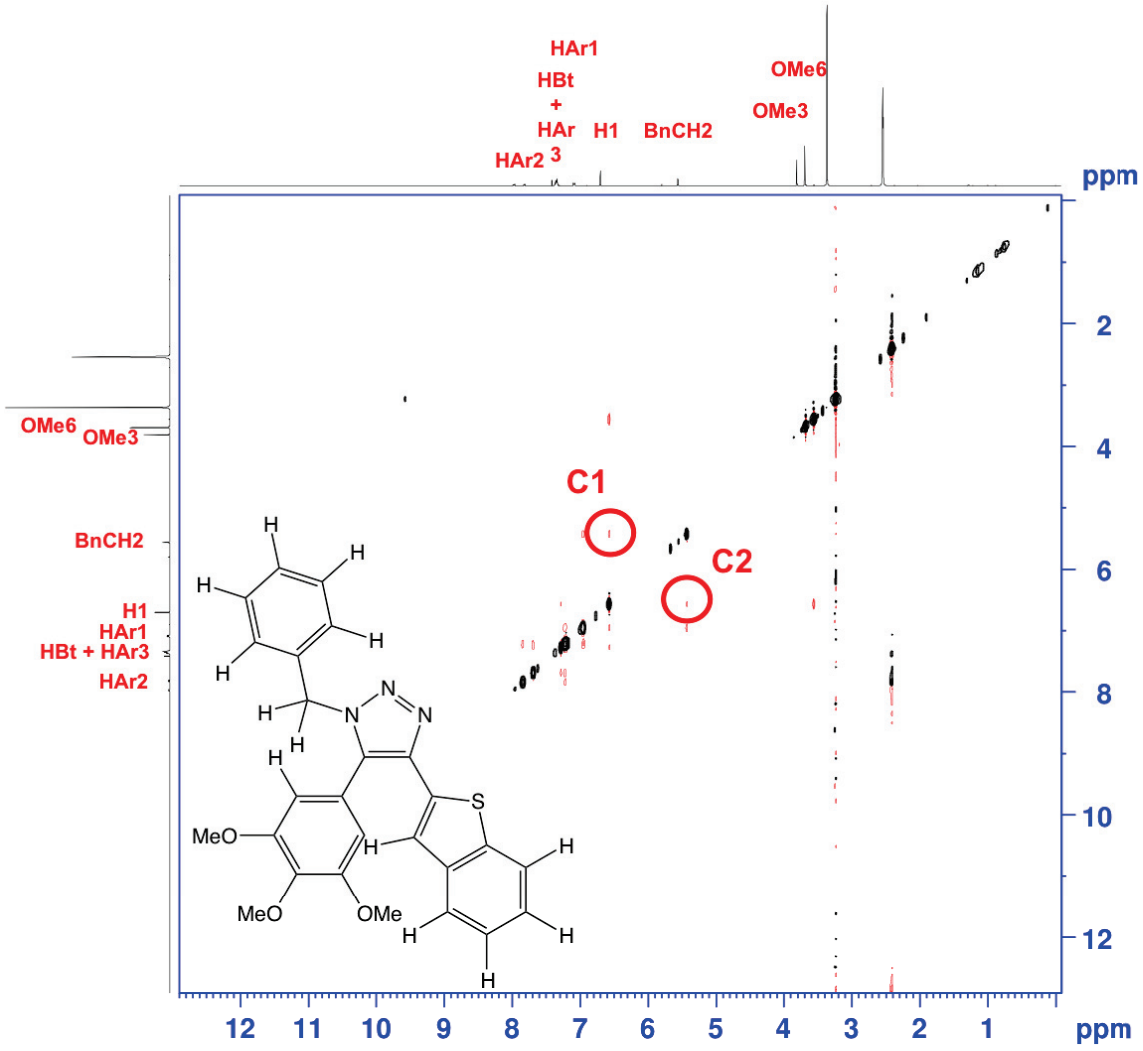


Figure 36: Spectre NOESY du composé **186**

PARTIE EXPERIMENTALE DU PREMIER CHAPITRE

All reactions were carried out under a positive pressure of argon and with oven-dried glassware. Melting points were measured on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded on Bruker ALS300, DRX300 and DRX400 Fourier transform spectrometers, using an internal deuterium lock, operating at 300 or 400 MHz. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to internal standard (tetramethylsilane, δH=0.00; $CDCl_3$, δH=7.26 and DMSO-*d*$_6$, δH=2.50). Data are presented as follows: chemical shift (δ, ppm), multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quadruplet, m=multiplet, br=broad), coupling constant, integration. Atom numbering refers to (benzo)heterocycle nomenclature. Carbon magnetic resonance (^{13}C NMR) spectra were recorded on Bruker ALS300 or DRX 400 Fourier transform spectrometers, using an internal deuterium lock, operating at 75 and 100 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to internal standard (tetramethylsilane, δ_C=0.00; $CDCl_3$, δ_C=77.16 and DMSO-*d*$_6$, δ_C=39.52). Carbon multiplicities (indicated in parentheses) were determined by DEPT experiments. High-resolution mass spectra were recorded on a Bruker MicroTOF Q.

Agilent HPLC/MS consists of a 1290 Infinity system with a binary pump, degasser, autosampler, thermostated column compartment, 1260 Infinity Diode Array Detector and 6120 single quadrupole mass spectrometer. The entire system was controlled by ChemStation (Agilent Technologies, Rev B.04.02 SP1). The column was a Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1×50 mm, 1.8 mm. The samples were analyzed in the positive ion mode of the Electron Spray Ionization (ESI) source, whose conditions were as follow: gas temperature, 350°C, drying gas (N_2) at 12.0 L/min, nebulizer gas at 35 psig, Vcap at 3000 V, fragmentor at 70 V.

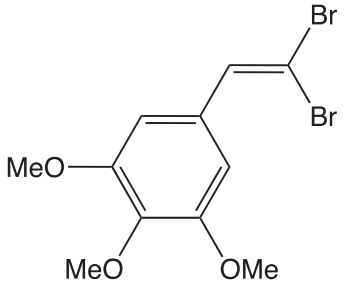
Reactions were monitored with analytical Thin Layer Chromatography (TLC), which was carried out using Merck commercial aluminium sheets coated (0.2 mm layer thickness) with Kieselgel 60F_{254}, with visualization by ultraviolet and anisaldehyde stain solution.

Product purification by flash column chromatography was performed using Merck Kieselgel 60 Å (40-63µm). Methanol was of analytical grade and were used as received without purification. *N,N*-Dimethylformamide (DMF), THF and Et_2O (Acroseal®, over molecular sieves) are purchased by Acros Organics. Dichloromethane was distilled over $LiAlH_4$ prior to use. For extraction/purification, diethyl ether, cyclohexane and ethyl acetate (AcOEt) were of reagent grade.

All other chemical reagents were used as received. 3,4,5-Trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) were prepared according to known procedures.[122,68]

5-(2,2-dibromovinyl)-1,2,3-trimethoxybenzene

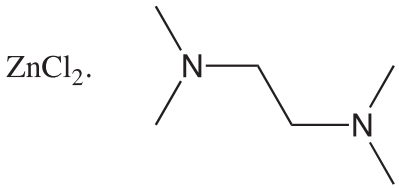
Referenced as compound 100



Chemical Formula : $C_{11}H_{12}Br_2O_3$
Molecular Weight : 352.02 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[123] 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (2.943 g, 15 mmol) and triphenylphosphine (8.26 g, 31.47 mmol) were dissolved in 45 ml of CH_2Cl_2 under argon. CBr_4 (5.47 g, 16.5 mmol) was dissolved in 15 ml of CH_2Cl_2 and placed in a addition funnel. The CBr_4 solution was added at a steady rate over 45 minutes in to the reaction mixture which was then stirred under argon for three hours at 0°C, poured into 150 ml of petroleum ether, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was stirred with *n*-hexane (4 x 80 ml) to separate 1-(2,2-dibromovinyl)-3,4,5-trimethoxybenzene from triphenylphosphine oxide, filtered and then evaporated. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 80 : 20) to afford 4.227 g of 5-(2,2-dibromovinyl)-1,2,3-trimethoxybenzene as a yellow solid (80%).
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.86 (s, 6H), 3.87 (s, 3H), 6.80 (s, 2H), 7.41 (s, 1H). The ^{1}H NMR spectra of this product corresponds to that of 5-(2,2-dibromovinyl)-1,2,3-trimethoxybenzene described in the literature.[123]

$ZnCl_2$.TMEDA complex



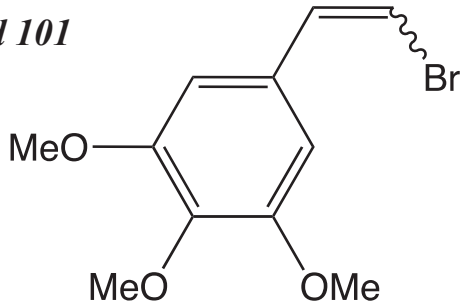
Chemical Formula : $C_6H_{16}Cl_2N_2Zn$
Molecular Weight : 116.20 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[114] $ZnCl_2$ (6.110 g, 45 mmol) was melted under reduced pressor then cooled to room temperature two times. A saturated solution of this solid in THF (45 ml) was prepared under argon. 40 ml of this solution were poured into

an erlenmeyer, and then 10 ml of TMEDA was added dropwise under agitation. After 15 minutes, the crude product was recuperated by filtration, recrystalized in THF and dried under reduced pressor. 7.109 g of $ZnCl_2$.TMEDA were obtained as a white powder (63%). Mp = 176.5- 177.5°C (lit. mp = 176-177°C).

5-(2-bromovinyl)-1,2,3-trimethoxybenzene

Referenced as compound 101

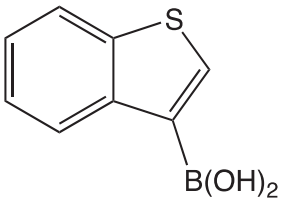


Chemical Formula : $C_{11}H_{13}BrO_3$
Molecular Weight : 273.12 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[124] To a stirred suspension of 1-[2,2-dibromovinyl)]-3,4,5-trimethoxybenzene (2.112 g, 6 mmol) and $Pd(Ph_3P)_4$ (0.278 g, 0.24 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (22 ml) was slowly added Bu_3SnH (1.95 ml, 7.2 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (9.5 ml) under an argon atmosphere. The mixture was allowed to stir for 3 h and then hydrolyzed by the addition of aqueous KF (0.905g, 15.6 mmol in 80 ml H_2O). After 30 minutes, the precipitated tin salts were filtered over a 0.45 µm glass fiber filter and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 ml). The organic phases were combined, dried and the solvent was evaporated. Purification of the residue by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 80:20) gave an inseparable mixture of 1-[(*Z*)-2-bromovinyl)]-3,4,5-trimethoxybenzene and 1-[(*E*)-2-bromovinyl)]-3,4,5-trimethoxybenzene (91:9) as a yellow oil (1.200 g, 85%). On the ^{1}H NMR spectra of this mixture, peaks correspond to each isomer were determined by peak intengration.
(*Z*)-isomer: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.87 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 6.38 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.97-7.00 (m, 3H).
(*E*)-isomer: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.79 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 6.51 (s, 1H), 6.69 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H).
The ^{1}H NMR spectra of the (*Z*) product corresponds to that of 1-[(*Z*)-2-bromovinyl)]-3,4,5- trimethoxybenzene described in the literature.[124]

benzo[*b*]thiophen-3-ylboronic acid

Referenced as compound 105

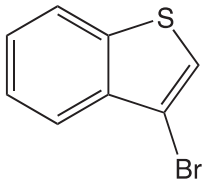


Chemical Formula : $C_8H_7BO_2S$
Molecular Weight : 178.02 g.mol^{-1}

To a solution of 3-bromo-benzo[*b*]thiophene (2.13 g, 10.00 mmol) in THF (22 ml) in a 100 ml round bottom flask at -60°C, was added dropwise *n*-BuLi 2.5 M in hexane (4.81 mL, 12.00 mmol) and the resulting mixture was stirred for 1h at -60°C. Then, trimethylborate (1.72 mL, 15.00 mmol) was added to the reaction mixture which was stirred 1h at-60°C and 1h while letting gradually warm up to room temperature. The reaction mixture was then quenched with NH_4Cl (11 mL) and toluene (22 mL) was added. The mixture was washed with water (325 mL) and the combined organic phases were finally dried with $MgSO_4$, filtered and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2/MeOH 95:5) to give compound 105 (1.02 g, 59%) as a white solid.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.49 (m, 2H), 7.85-7.90 (m, 2H), 8.0 (dd, J = 6.9-2.4, 2H), 8.34 (s, 1H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[125]

3-bromobenzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 103

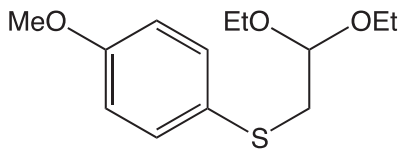


Chemical Formula : C_8H_5BrS
Molecular Weight : 213.09 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[125]

To a solution of benzo[*b*]thiophene (1.38g, 10 mmol) in a mixture of $CHCl_3$ (10 ml) and AcOH (10 ml) in a round bottom flask at 0°C, N-bromosuccinimide (2.23 g, 12.5 mmol) were added portionwise in 2h. The mixture was then allowed gradually warm to room temperature and stirred for additional 24h. The resulting solution was washed with a saturated solution of $Na_2S_2O_3$ (50 ml), the organic layer was then quenched with water, extracted three times with chloroform (3 × 100 ml), dried with Na_2SO_4 and evaporated. The crude oil was then purified by flash chromatography (cyclohexane) to give 3-bromobenzothiophene (2.1 g, 99%) as a colorless oil.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.38 – 7.51 (m, 3H), 7.83 – 7.87 (m, 3H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[125]

(2,2-diethoxyethyl)(4-methoxyphenyl)sulfane

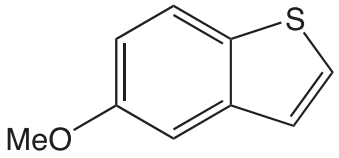


Chemical Formula : $C_{13}H_{20}O_3S$
Molecular Weight : 256.36 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[126]
To a mixture of 4-methoxybenzenethiol (0.28 g, 2 mmol) and potassium carbonate (0.28 g, 2 mmol) in acetone (3 ml) in a round bottom flask at room temperature, bromoacetaldehyde diethyl acetal (0.36 g, 1.82 mmol) was added dropwise in 10 min and stirred for 18 h. The resulting mixture was then filtered and washed with acetone. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with water (100 ml) and extracted three times with Et_2O (3 × 50 ml). The combined organic phase was washed with brine, dried with Na_2SO_4, and evaporated. The crude oil was then purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane; 1:9) to give 1-(2,2-diethoxy-ethylsulfanyl)-4-methoxy-benzene (0.45 g, 96%) as an yellow oil.
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.07 (t, 6H), 2.98 (d, 2H), 3.39 – 3.6 (m, 4H), 2.9 (s, 3H), 4.53 (t, 1H), 6.9 (d, J = 8.7, 2H), 7.37 (d, J = 8.7, 2H). Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[126]

5-methoxybenzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 149

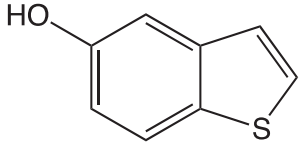


Chemical Formula : C_9H_8OS
Molecular Weight : 178.02 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[127]
To a 250 ml round bottom flask equipped with a condenser at room temperature, polyphosphoric acid 81% (1.0 g) and anhydrous chlorobenzene (15 ml) were added, then the mixture was heated to reflux. After 15min under reflux, 1-(2,2-diethoxy-ethylsulfanyl)-4-methoxy-benzene (0,55 g, 2,14 mmol) was added dropwise in 15 min, the mixture was then refluxed overnight. The reaction was cooled to room temperature and water (150 ml) was added and the solution was extracted three times with CH_2Cl_2 (3 × 50 ml), the combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and evaporated. The black oil was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane; 5/95) to give 5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0,3 g, 85%) as a colorless oil.
^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ = 3.88 (s, 3H), 7.0 (dd, J = 8.7 - 2.4. 1H), 7.25 – 7.28 (m, 2H), 7.44 (d, J = 5.4, 1H), 7.74 (d, J = 8.7, 1H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[112]

benzo[*b*]thiophen-5-ol

Referenced as compound 139



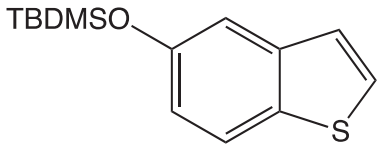
Chemical Formula : C_8H_6OS
Molecular Weight : 150.20 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[127]
To a solution of 5-methoxybenzo[b]thiophene (1.0 g, 6.1 mmol) in PhCl (15.0 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of boron tribromide dimethyl sulfide

complex (2.0 g, 6.4 mmol) in PhCl (6.0 mL) over 15 min. The reaction was then heated at reflux during 5h. After cooling, the reaction was quenched with H_2O (20 mL), the organic phase separated and washed with H_2O (20 mL), dried over $MgSO_4$, and the solvent removed in vacuo. The crude material was purified by flash column chromatography (EtOAc : Cyclohexane 8/2) to afford 5-hydroxybenzo[b]thiophene as a white powder (0.600 g, 66%).
^{1}H NMR (500 MHz, acetone-d_6): δ = 8.32 (s, 1H), 7.43 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.56 (d, J=5.5 Hz, 1H), 7.28 (d, J= 2.3 Hz, 1H), 7.25 (d, J=5.3 Hz, 1H), 6.96 (dd, J=2.3 Hz, 1H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[127]

(benzo[*b*]thiophen-5-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane

Referenced as compound 140

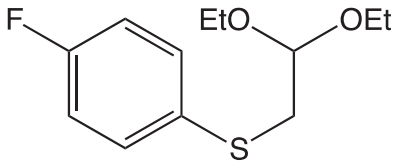


Chemical Formula : $C_{14}H_{20}OSSi$
Molecular Weight : 264.46 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[128]
To a solution of benzo[b]thiophen-5-ol (0.200 g, 1.33 mmol) in DMF (0.5 mL) was added TBDMSCl (0.240 g, 1.6 mmol) and Imidazole (0.226 g, 3.33 mmol). The reaction was stirred overnight at room temperature. Then, the mixture was extracted with diethyl ether (5 mL) and the organic phase was washed with H_2O (5 mL), 1M HCl aqueous solution (5 mL), a saturated solution of NaCl (5 mL), dried over $MgSO_4$, and the solvent removed in vacuo. The crude material was purified by flash column chromatography (EtOAc : Cyclohexane 0.5/9.5) to afford the final product as a colorless oil (0.195 g, 55%).
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.47 (d, J = 15, 1H), 7.19 (d, J = 15, 1H) 7.04 (d, J= 15, 1H), 7.02–6.99 (m, 1H), 6.70–6.68 (m, 1H), 0.79 (s, 9H), 0.30–0.00 (m, 6H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 153.0, 140.9, 132.8, 127.3, 123.4, 122.9, 118.7, 113.5, 29.7, 25.7.
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[129]

(2,2-diethoxyethyl)(4-fluorophenyl)sulfane

Referenced as compound 100

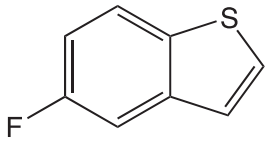


Chemical Formula : $C_{12}H_{17}FO_2S$
Molecular Weight : 244.33 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[130]
Following the synthesis of (2,2-diethoxyethyl)(4-methoxyphenyl)sulfane, scale: 4-fluorobenzenethiol (1.280 g, 10 mmol), potassium carbonate (1.383 g, 10 mmol), DMF (20 ml), bromoacetaldehyde diethyl acetal (1.4 mL, 9 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 0.5:9.5) to give the desired product (1.68 g, 69 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR ($CDC1_3$, 400 MHz): δ = 3.05 (d, J= 6.4 Hz, 2H), 3.32 (s, 6H), 4.49 (t, J= 6.4 Hz, 1H), 6.97-7.01 (m, 2H), 7.38-7.42 (m, 2H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[130]

5-fluorobenzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 151

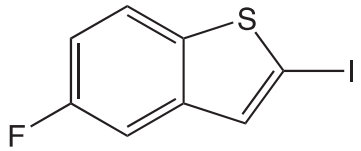


Chemical Formula : C_8H_5FS
Molecular Weight : 152.19 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 5-methoxybenzo[*b*]thiophene, scale: (2,2-diethoxyethyl)(4-fluorophenyl)sulfane (1.68 g, 6.86 mmol), chlorobenzene (56 mL), PPA (11.62 g, 34.3 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane) to give the desired product (0.627 g, 60 %) as a colorless oil.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.10 (dt, J= 8.7 - 2.4, 1H), 7.27 (dd, J=12.6-7.2, 1H), 7.45 - 7.54 (m, 2H), 7.77 (dd, J= 8.7, 4.8, 1H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[131]

5-fluoro-2-iodobenzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 152

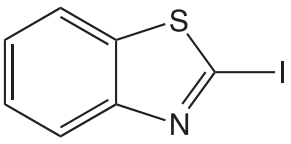


Chemical Formula : C_8H_4FIS
Molecular Weight : 278.09 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[115]
To a stirred, cooled (0°C) solution of TMP (0.55 ml, 3.0 mmol) in THF (2.5 ml) were successively added *n*-BuLi (about 1.6 M hexane solution, 3.0 mmol) and, 5 min later, $ZnCl_2$.TMEDA (0.250 g, 1.0 mmol). The mixture was stirred for 15 min at 0 °C before introduction of 6-fluorobenzo[*b*]thiophene (2.0 mmol) at 10°C. After 2 h at room temperature, a solution of I_2 (0.76 g, 3.0 mmol) in THF (5 ml) was added. The mixture was stirred overnight before addition of an aqueous saturated solution of $Na_2S_2O_3$ (2 mL) and extraction with EtOAc (3 × 10 ml). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 0.5 : 9.5) to give the desired product (0.550 g, 99 %) as an orange solid.
Mp: 98-99°C.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.63 (dd, J = 8.8 - 4.8, 1H), 7.35 (dd, J = 9.2 - 2.5, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.07 (ddd, J = 8.9 - 8.8 – 2.4, 1H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): : δ = 84.73 (C), 108.13 (d, J = 23.20, CH), 113.44 (d, J = 24.96, CH). 123.66 (d, J = 9.40, CH). 133.70 (d, J = 4.22, CH). 139.96 (d, J = 1.22, C). 142.15 (d, J = 14.70, C). 161.77 (d, J = 239.40, C).
HRMS (EI$^+$) : m/z calcd for C_8H_4FIS [M$^+$]: 277.9057; found: 277.9060.

2-iodobenzo[*d*]thiazole

Referenced as compound 148

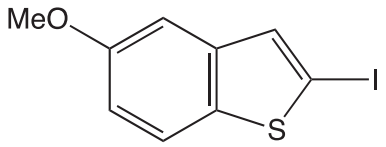


Chemical Formula : C_7H_4INS
Molecular Weight : 261.08 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 5-fluoro-2-iodobenzo[*b*]thiophene, scale: benzo[*d*]thiazole (0.540 g, 4 mmol), TMP (1.1 ml, 6 mmol) , THF (15 mL), *n*-BuLi (2.4 mL, 6 mmol), $ZnCl_2$.TMEDA (0.500 g, 2.0 mmol), I_2 (1.54 g, 6.0 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 1 : 9) to give the desired product (0.882 g, 85 %) as an orange solid.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) δ= 8.06 (dd, *J*= 7.5 - 1.8, 1H), 7.87 (dd, *J*=6.9 - 1.5, 1H), 7.50-7.38 (m, 2H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[115]

2-iodo-5-methoxybenzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 150

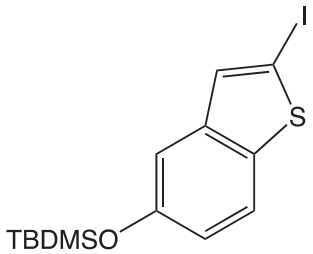


Chemical Formula: C_9H_7IOS
Molecular Weight: 290,12

Following the synthesis of 6-fluoro-2-iodobenzo[*b*]thiophene, scale: 5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.310 g, 1.90 mmol), TMP (0.52 ml, 2.83 mmol) , THF (7 mL), *n*-BuLi (1.14 mL, 2.83 mmol), $ZnCl_2$,TMEDA (0.238 g, 0.95 mmol), I_2 (0.718 g, 2.83 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 1 : 9) to give the desired product (0.452 g, 83 %) as an orange solid.
Mp: 94-95°C.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ= 3.93 (s, 3H), 6.91 (s, 1H) , 7.29 – 7.39 (m, 2H), 7.72 (s, 1H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) : δ = 56.20 (C), 105.46 (C), 115.51 (C), 126.77 (CH), 132.20 (CH), 134.54 (C), 142.90 (CH), 153.31 (CH).

***tert*-butyl((2-iodobenzo[*b*]thiophen-5-yl)oxy)dimethylsilane**

Referenced as compound 154

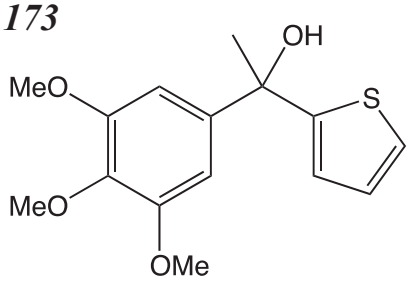


Chemical Formula: $C_{14}H_{19}IOSSi$
Molecular Weight: 390,36 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 6-fluoro-2-iodobenzo[*b*]thiophene, scale: (benzo[*b*]thiophen-5-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (0.200 g, 0.51 mmol), TMP (0.14 ml, 0.76 mmol) , THF (2 mL), *n*-BuLi (0.3 mL, 0.76 mmol), $ZnCl_2$,TMEDA (0.063 g, 0.25 mmol), I_2 (0.19 g, 0.76 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 1 : 9) to give the desired product (0.161 g, 81 %) as an orange solid.
Mp: 78-79°C.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ= 0.86 (s, 9H), 6.49 (dd, J= 0.9 – 7.8, 1H), 6.99 (t, J= 7.9, 1H), 7.13 (dd, J= 0.8 – 7.9, 1H), 7.31 (s, 1H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) : δ = - 4.24 (CH_3), 18.22 (C), 25.68 (CH_3) , 28.16 (CH), 78.65 (C), 112.73 (CH), 115.41 (CH), 125.78 (CH), 134.30 (CH), 136.72 (C), 142.74 (C), 149.22 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{14}H_{20}IOSSi$ [MH^+]: 391.0043; found: 391.0049.

1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol

Referenced as compound 173



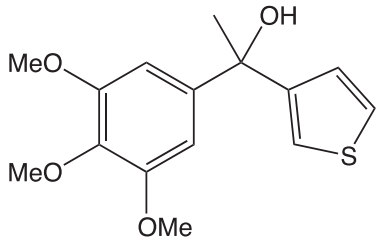
Chemical Formula: $C_{15}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 294.37 g.mol^{-1}

To a solution of 2-bromothiophene (0.98 g, 6mmol) in THF (30 mL) in a 100 ml round bottom flask under argon at -70°C, *n*-BuLi 2,5 M in hexane (3.6 ml, 9 mmol) was added dropwise and stirred for 1h. To the reaction mixture was then added a solution of 3,4,5 trimethoxyacetophenone (1.5 g, 7.2 mmol) which was stirred 1h at -70°C and 4h at room temperature. The solution was quenched with satured NaCl (60 ml) and extracted three times with ethyl acetate (3 × 100 ml). The combined organic phases were finally dried with Na_2SO_4, filtered, evaporated and purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 3:7) to give compound **173** (1.19 g, 67%) as a white solid.
^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ = 2.46 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 6.00 (s, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.92 (m, 1H), 6.96 (t, *J* = 4,3, 1H), 7.29 (dd, *J* = 5.0 – 1.3, 1H).
^{1}H NMR (400 MHz, acetone-*d6*): δ = 1.97 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.78 (s, 6H), 5.02 (s, 1H), 6.86 (s, 2H), 6.91 (dd, J = 4.8 - 3.6, 1H), 6.98 (dd, J = 4.0 - 1.2, 1H), 7.28 (dd, J = 5.2 - 1.2, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, acetone-*d_6*): δ = 32.52 (CH_3), 56.38 (CH_3), 60.44 (CH_3), 74.82 (C), 104.12 (CH), 124.12 (CH), 125.1 (CH), 126.98 (CH), 137.99 (C), 145.14 (C), 153.74 (C), 155.73 (C).

1–thiophen-3-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol

Referenced as compound 175

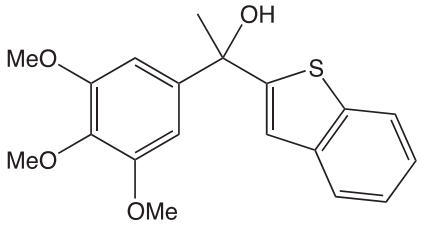


Chemical Formula : $C_{15}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 294.37 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 3-bromothiophene (0.98 g, 6 mmol), Et_2O (80 ml), n-BuLi (3.6 ml, 9 mmol), 3,4,5-trimethoxyacetophenone (1.5 g, 7.2 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 3/7) to give compound the desired product (1.4 g, 76%) as a white solid.
^{1}H NMR (300MHz, DMSO-*d_6*): δ = 3.62 (s, 3H), 3.74 (s, 6H), 5.66 (s, 1H), 5.82 (br s, 1H), 6.70 (s, 2H), 7.03 (dd, *J* = 5.0 – 1.2, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.41 (dd, *J* = 5.0 – 3.0).
^{1}H NMR (400 MHz, acetone-*d6*): δ = 1.89 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.76 (s, 6H), 4.66 (s, 1H), 6.80 (s, 2H), 7.08 (dd, J = 4.4 – 1.2, 1H), 7.32 (m, 2H).
^{13}C NMR (100 MHz, acetone-*d_6*): δ = 31.50 (CH_3), 56.36 (CH_3), 60.42 (CH_3), 74.56 (C), 104.20 (CH), 120.64 (CH), 125.95 (CH), 127.97 (CH), 137.81 (C), 145.43 (C), 151.96 (C), 153.75 (C).

1-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanol

Referenced as compound 181



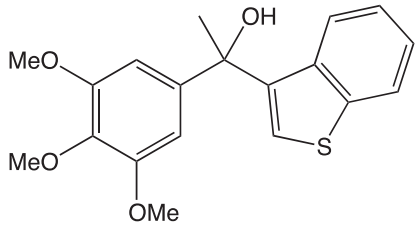
Chemical Formula : $C_{19}H_{20}O_4S$
Molecular Weight : 344,42 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: benzo[*b*]thiophene (1.385 g, 10 mmol), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (5.2 ml, 13

mmol), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (2.768 g, 14 mmol), Et_2O (10 ml + 60 ml), 0°C, 3h.The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 3 / 7) to give benzo[*b*]thiophen-2-yl-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-methanol (1.6 g, 70 %) as a white solid.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.85 (s, 9H), 6.03 (s, 1H), 6.72 (s, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.27 – 7.31 (m, 1H), 7.31 – 7.35 (m, 1H), 7.7 (d, J = 6.8, 1H), 7.78 (d, J = 7.6, 1H).
^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN-*d6*): δ = 2,14 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,92 (s, 6H), 4,36 (br s, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,37 (s, 1H), 7,39 – 7,43 (m, 1H), 7,44 – 7,48 (m, 1H), 7,86 (d, J = 7,2, 1H), 7,92 (d, J = 7,2, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN): δ = 30,49 (CH_3), 55,39 (CH_3), 59,48 (CH_3), 74,11 (C), 102,6 (CH), 119,53 (CH), 121,86 (CH), 123,21 (CH), 123,81 (CH), 123,92 (CH), 136,55 (C), 139,21 (C), 139,38 (C), 143,07 (C), 152,56 (C), 154,8 (C).
LC/MS (retention time 3,75min) m/z (ESI^+) 327,2 (MH^+ - H_2O, 100%), 328,1 (21,5), 329,1 (7), 367,1 (MNa^+, 11,5), 711,2 ($2MNa^+$, 19,5).

1-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanol

Referenced as compound 183

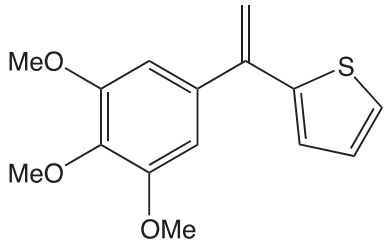


Chemical Formula : $C_{19}H_{20}O_4S$
Molecular Weight : 344,42 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 3-bromobenzo[*b*]thiophene (1.8 g, 8.45 mmol), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (4.05 ml, 10.14 mmol), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (2.16 g, 11 mmol), Et_2O (10 ml + 40 ml). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 4 / 6) to give benzo[*b*]thiophen-3-yl-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-methanol (1.43 g, 50 %) as a white solid; mp 90.5°C.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.81 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 6.08 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.33 – 7.35 (m, 2H), 7.77 – 7.8 (m, 1H), 7.84 – 7.86 (m, 1H).
LC/MS (retention time 3,75min) m/z (ESI^+) 327,1 (MH^+ - H_2O, 100%), 328,1 (19,5), 329,1 (19,5), 367,1 (MNa^+, 41,5), 711,2 ($2MNa^+$, 44,5).

2-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl]-thiophene

Referenced as compound 174

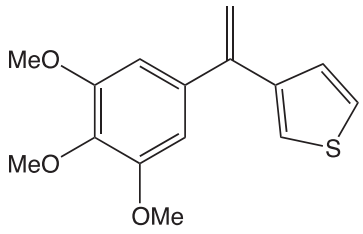


Chemical Formula : $C_{15}H_{16}O_3S$
Molecular Weight : 276.35 g.mol^{-1}

To a solution of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol (0.294 g, 1 mmol) in toluene (50 ml), *p*-TsOH (8.6 mg, 0.05 mmol) was added and the reaction was stirred at 130°C for 2h. The mixture was then dried with Na_2SO_4, filtered and slowly evaporated to obtain a volume ≈10 ml. Finally, the crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 2:8) to give 2-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl]-thiophene (0.270 g, 98 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ= 3.848 (s, 6H), 3.888 (s, 3H), 5.232 (s, 1H), 5.561 (s, 1H), 6.668 (s, 2H), 6.983 (m, 2H), 7.251 (dd, *J*= 4.5 - 1.6, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ= 55.01 (CH_3), 59.38 (CH_3), 104.9 (CH), 111.9 (CH_2), 124.49 (CH), 125.65 (CH), 126.52 (CH), 127.34 (C), 133.31 (C), 133.72 (C), 135.64 (C), 142.6 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{15}H_{16}NaO_3S$ [MNa^+]: 299.0712; found: 299.0708.

3-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl]-thiophene

Referenced as compound 176



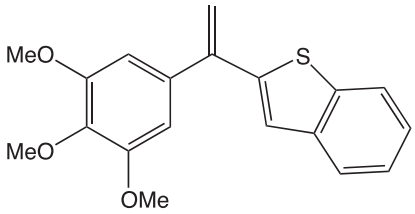
Chemical Formula : $C_{15}H_{16}O_3S$
Molecular Weight : 276.35 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl]-thiophene, scale: 1–thiophen-3-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol (0.294 g, 1 mmol), toluene (50 ml), p-TsOH (8.6 mg, 0.05 mmol). The crude product was purified by

flash chromatography (EtOAc / cyclohexane : 2 / 8) to give the desired product (0.26 g, 94 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (400MHz, acetone-d_6): δ= 3.836 (s, 6H), 3.881 (s, 3H), 5.35 (d, *J*= 1.2, 1H), 5.50 (*J*= 1.2, 1H), 6.614 (s, 2H), 7.186 (m, 2H), 7.305 (dd, *J* = 5.1 – 3.2, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, acetone-d_6): δ= 56.25 (CH_3), 61.01 (CH_3), 105.52 (CH) 113.09 (CH_2), 123.49 (CH), 125.6 (CH), 127.24 (CH), 137.31 (C), 137.9 (C), 142.42 (C), 144.71 (C), 152.99 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{15}H_{16}NaO_3S$ [MNa^+]: 299.0712; found: 299.0719.

2-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)vinyl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 182

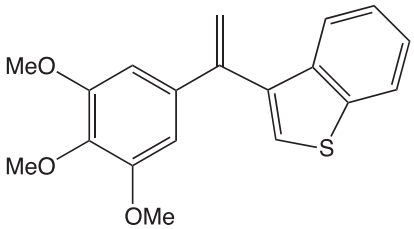


Chemical Formula : $C_{19}H_{18}O_3S$
Molecular Weight : 326.41 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl]-thiophene, scale: 1–thiophen-3-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol (0.172 g, 0.50 mmol), toluene (50 ml), *p*-TsOH (0.004 g, 0.025 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt : cyclohexane 30 : 70) to give the desired compound (0.151 g, 93 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ = 3.86 (s, 3H), 3.91 (s, 6H), 5.37 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 6.70 (s, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.80 (m, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ= 56.32 (CH_3), 61.07 (CH_3), 105.85 (CH), 115.85 (CH_2), 122.25 (CH), 123.72 (CH), 123.9 (CH), 124.56 (CH), 124.93 (CH), 36.26 (C), 138.15 (C), 139.55 (C), 140.18 (C), 143.95 (C), 144.67 (C), 153.09 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{18}NaO_3S$ [MNa^+]: 349.0869; found: 349.0864.

3-(1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)vinyl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 184

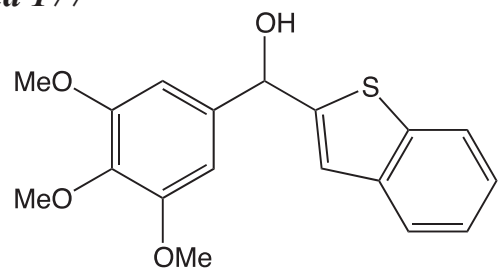


Chemical Formula : $C_{19}H_{18}O_3S$
Molecular Weight : 326.41 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl]-thiophene, scale:: 1-(benzo[b]thiophen-3-yl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanol (0.172 g, 0.50 mmol), toluene (50 ml), *p*-TsOH (0.004 g, 0.025 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / cyclohexane : 30 / 70) to give the desired compound (0.145 g, 89 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ= 3.66 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 5.48 (d, J = 1.2, 1H), 5.82 (d, J=1.2, 1H), 6.6 (s, 2H) 7.28 - 7.43 (m, 3H), 7.73 (s, 1H), 8.02 (d, J= 7.2, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 56.27 (CH_3), 61.09 (CH_3), 104.84 (CH), 115.54 (CH_2), 122.85 (CH), 123.81 (CH), 124.22 (CH), 124.43 (CH), 125.43 (CH), 136.65 (C), 136.65 (C), 137.62 (C), 138.20 (C), 138.30 (C), 140.04 (C), 143.99 (C), 153.15 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{18}NaO_3S$ [MNa^+]: 349.0869; found: 349.0851.

benzo[*b*]thiophen-2-yl(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 177

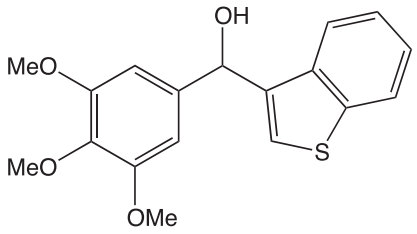


Chemical Formula : $C_{18}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 330.40 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: benzo[*b*]thiophene (1.38 g, 10 mmol), *n*-BuLi (5.2 ml, 13 mmol), Et_2O (70 ml), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (2.57 g, 13 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 3:7) to give the desired compound (2.81 g, 85 %) as a white solid.
^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ = 3.85 (s, 9H), 6.03 (s, 1H), 6.72 (s, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.27 - 7.35 (m, 2H), 7.70 (dd, J = 7.2 – 1.9, 1H), 7.79 (d, J = 7.6, 1H)
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 56.27 (CH_3), 61.00 (CH_3), 73.21 (CH), 103.49 (CH), 121.40 (CH), 122.56 (CH), 123.76 (CH), 124.44 (CH), 137.78 (C), 138.34 (C), 139.47 (C), 139.99 (C), 148.53 (C), 153.47 (C).
LC/MS (retention time 3,5min) m/z (ESI$^+$) 313,1 (MH^+ - H_2O, 100%), 314,1 (22), 315,1 (6,5), 353,1 (MNa^+, 6,5), 683,2 ($2MNa^+$, 14,5).

benzo[*b*]thiophen-3-yl(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 179

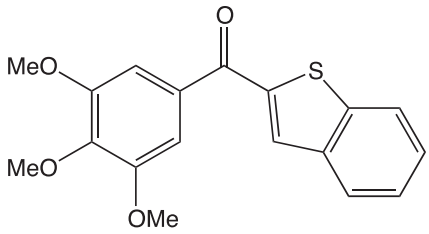


Chemical Formula : $C_{18}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 330.40 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 3-bromobenzo[*b*]thiophene (0.85 g, 4 mmol), *n*-BuLi (2 ml, 4.8 mmol), Et_2O (35 ml), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (1.02 g, 5.2 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : cyclohexane 3:7) to give the right compound (1.08 g, 82 %) as a white and yellow solid.
^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ = 3.81 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 6.08 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.78 (m, 1H), 7.85 (m, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 56.22 (CH_3), 60.96 (CH_3), 72.23 (CH), 103.93 (CH), 122.68 (CH), 122.98 (CH), 124.20 (CH), 124.25 (CH), 124.61 (CH), 137.39 (C), 137.62 (C), 138.05 (C), 138.58 (C), 141.06 (C), 153.42 (C).
LC/MS (retention time 3,4min) m/z (ESI^+) 313,1 (MH^+ - H_2O, 100%), 314,1 (22), 315,1 (6,5), 353,1 (MNa^+, 9), 683,2 ($2MNa^+$, 12,5).

benzo[*b*]thiophen-2-yl(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 178



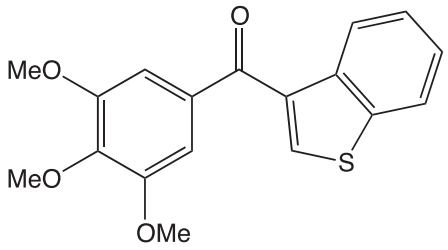
Chemical Formula : $C_{18}H_{16}O_4S$
Molecular Weight : 328.38 g.mol^{-1}

To a solution of benzo[*b*]thiophen-2-yl-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-methanol (0.99 g, 3 mmol) in acetonitrile (150 ml) in a round bottom flask of 250 ml at room temperature, MnO_2 (0.7824 g, 9 mmol) was added and stirred during 2h. Then a second equal portion of MnO_2 (0.7824 g, 9 mmol) was added and stirred

also during 2h. Next, the suspension was filtered through a thin layer of silica to remove the black solid, washing 3 times with CH_3CN. Finally, the product was purified *via* flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 3 / 7) to give the desired compound (0.95 g, 97 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ = 3.93 (s, 6H), 3.96 (s, 3H), 7.20 (s, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.92 (m, 3H).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{18}H_{16}NaO_4S$ [MNa^+]: 351.0662; found: 351.0650.

benzo[*b*]thiophen-2-yl(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 180

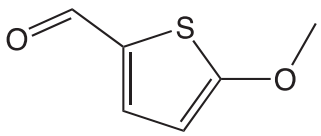


Chemical Formula : $C_{18}H_{16}O_4S$
Molecular Weight : 328.38 g.mol^{-1}

Following the synthesis of benzo[*b*]thiophen-2-yl(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone, scale: benzo[*b*]thiophen-3-yl-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-methanol (0.95 g, 2.87 mmol), MnO_2 (0.75 g, 8.61 mmol), MnO_2 (0.75 g, 8.61 mmol), CH_3CN (100 ml). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / cyclohexane : 3 / 7) to give compound the desired compound (0.756 g, 80 %) as a white solid.
^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ = 3.89 (s, 6H), 3.95 (s, 3H), 7.14 (s, 2H), 7.44 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.91 (d, J = 8.0, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.48 (d, J = 8.0, 1H)
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 56.44 (CH_3), 61.09 (CH_3), 107.28 (CH), 122.47 (CH), 125.13 (CH), 125.69 (CH), 125.71 (CH), 134.35 (C), 134.92 (C), 137.19 (CH), 137.6 (C), 140.14 (C), 142.13 (C), 153.1 (C), 189.90 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{18}H_{16}O_4S$ [MNa^+]: 351,0657; found: 351,0662.

5-methoxythiophene-2-carbaldehyde

Referenced as compound 134

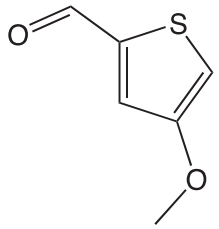


Chemical Formula : $C_6H_6O_2S$
Molecular Weight : 142.18 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[132]
A 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexanes (1.53 ml, 3.81 mmol) was added dropwise under argon at 0°C to a stirred solution of 2-methoxythiophene (0.4 g, 3.47 mmol) in anhydrous diethyl ether (8 ml). The reaction mixture was then stirred for 1 h at 0°C and was allowed to stand 15 min at room temperature. DMF (0.27 mL, 3.47 mmol) dissolved in anhydrous diethyl ether (7 ml) was added dropwise at room temperature. The mixture was heated at reflux for 1 h. The mixture was poured into water (50 ml) and extracted with ethyl acetate (3 × 75 ml). The combined organic extracts were washed with H_2O (100 ml), dried with $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica (AcOEt / Cyclohexane : 20 / 80) afforded the desired product as an orange oil (0.46 g, 95 %).
^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 3.97 (s, 3H), 6.32 (d, J= 7.5 Hz, 1H), 7.49 (d, 7.5 Hz, H), 9.63 (s, 1H).

4-methoxythiophene-2-carbaldehyde

Referenced as compound 132



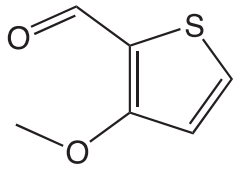
Chemical Formula : $C_6H_6O_2S$
Molecular Weight : 142.18 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[133]
To a solution of 3-methoxythiophene (2 g, 17.5 mmol) in THF (20 ml) at −78°C, n-BuLi (7.75 ml, 19.3 mmol) was added. After stirring for 1h, DMF (1.64 ml, 21.1 mmol) was added. The solution was stirred for 2h at room temperature and then poured into water (50 ml), extracted with ethyl acetate (3 × 75 ml) and CH_2Cl_2 (2 × 75 ml). The combined organic extracts were dried with $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica (AcOEt / Cyclohexane : 20 / 80) afforded the desired product as a yellow solid (0.917 g, 37 %) and 3-methoxythiophene-2-carbaldehyde as an orange solid (1.1717 g, 47 %).
^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 3.83 (s, 3H), 6.55 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 7.23 (d, 1.5 Hz, H), 9.84 (s, 1H).

Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[133]

3-methoxythiophene-2-carbaldehyde

Referenced as compound 130

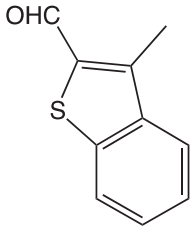


Chemical Formula : $C_6H_6O_2S$
Molecular Weight : 142.18 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[133]
To a solution of 3-methoxythiophene (2 g, 17.5 mmol) in THF (20 ml) at −78°C, *n*-BuLi (7.75 ml, 19.3 mmol) was added. After stirring for 1h, DMF (1.64 ml, 21.1 mmol) was added. The solution was stirred for 2h at room temperature and then poured into water (50 ml), extracted with ethyl acetate (3 × 75 ml) and CH_2Cl_2 (2 × 75 ml). The combined organic extracts were dried with $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica (AcOEt : Cyclohexane / 20 : 80) afforded the desired product as a orange solid (1.1717 g, 47 %) and 4-methoxythiophene-2-carbaldehyde as an yellow solid (1.917 g, 37 %).
^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ= 3.99 (s, 3H), 6.87 (d, 1H), 7.64 (dd, 1H), 9.99 (s, 1H). Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[133]

3-methylbenzo[*b*]thiophene-2-carbaldehyde

Referenced as compound 137



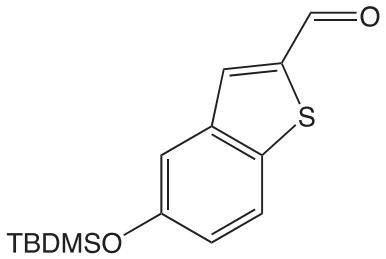
Chemical Formula : $C_{10}H_8OS$
Molecular Weight : 176.23 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 4-methoxythiophene-2-carbaldehyde, scale: 3-methylbenzo[*b*]thiophene (0.5 g, 3.4 mmol), THF (6 ml), *n*-BuLi (1.62 ml, 4.0 mmol), DMF (0.3 ml, 3.71 mmol).
Purification by flash chromatography on silica (AcOEt / Cyclohexane : 1 / 9)

afforded the desired product as a yellow solid (0.435 g, 73 %).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ=10.34 (s, 1H), 7.85 - 7.90 (m, 2H), 7.42 - 7.53 (m, 2H), 2.79 (s, 3H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[134]

5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophene-2-carbaldehyde

Referenced as compound 141

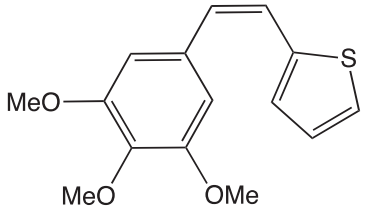


Chemical Formula : $C_{15}H_{20}O_2SSi$
Molecular Weight : 292.47 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 4-methoxythiophene-2-carbaldehyde, scale: (benzo[*b*]thiophen-5-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (0.6 g, 2.3 mmol), THF (4 ml), *n*-BuLi (1.0 mL, 2.5 mmol), DMF (0.25 ml, 2.7 mmol).
Purification by flash chromatography on silica (AcOEt / Cyclohexane : 1 / 9) afforded the desired product as a yellow solid (0.540 g, 81 %).
Mp; 54-55°C
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ = 0.32 (s, 6H), 0.99 (s, 9H), 6.99 – 7.07 (m, 1H), 7.98 – 8.02 (m, 1H), 8.12 (d, J= 14.8, 1H), 8.28 (d, J = 14.8, 1H) 9.54 (s, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ = 25.9 (CH3), 29.8 (CH3), 30.2 (C), 112.5 (CH), 114.5 (CH), 120.5 (CH), 127.4 (CH), 138.5 (C), 142.6 (C), 146.3 (C), 151.1 (C), 186,4 (CH).

(*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)thiophene

Referenced as compound 107

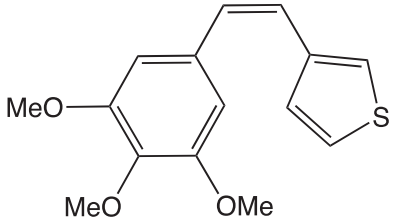


Chemical Formula : $C_{15}H_{16}O_3S$
Molecular Weight : 276.35 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[133]
1-(2-Bromovinyl)-3,4,5-trimethoxybenzene (Z/E ratio 91/9, determined by ^{1}H NMR) (0.126 g, 0.46 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (0.027 g, 0.023 mmol) were stirred in 1,2-dimethoxyethane (7 ml) under argon for 20 min. 3-benzo[*b*]thiopheneboronic acid (0,070 g, 0.55 mmol) and sodium carbonate (0.049 g, 0.46 mmol) in water (4.2 ml) were added, the mixture was heated under reflux during 20 h. After cooling and decantation, the aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate (2 × 7 ml). The combined organic phases were washed with brine (7 ml), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. This crude product was purified by column chromatography (cyclohexane / ethyl acetate : 80 / 20) to give the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.081 g, 57 %) and a mixture of (*Z*) and (*E*) isomer (0.047 g, 33%).
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)**:** δ= 3.80 (s, 6H), 3.88 (s, 3H), 6.50 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 6.61 (s, 2H), 6.67 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 5.2 - 3.6 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)**:** δ= 56.01 (CH_3), 60.98 (CH_3), 105.76 (CH), 123.10 (CH), 125.61 (CH), 126.39 (CH), 128.41 (CH), 128.81 (CH), 132.46 (C), 137.50 (C), 139.56 (C), 153.20 (C)
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[114]

(*Z*)-3-(3,4,5-trimethoxystyryl)thiophene

Referenced as compound 109



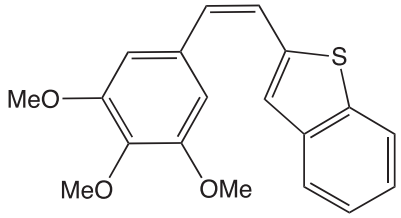
Chemical Formula : $C_{15}H_{16}O_3S$
Molecular Weight : 276.35 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*Z*)-2-(3,4,5 trimethoxystyryl)thiophene, scale : 1-(2-Bromovinyl)-3,4,5-trimethoxybenzene (0.273 g, 1.0 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (0.06 g, 0.05 mmol), 1,2-dimethoxyethane (15 ml), 3-benzo[*b*]thiopheneboronic acid (0.172 g, 1.15 mmol) and sodium carbonate (0.100 g, 0.95 mmol) in water (10 ml).
This crude product was purified by column chromatography (cyclohexane / ethyl acetate : 90 / 10) to give the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.160 g, 59 %) and a mixture of (*Z*) and (*E*) isomer (0.097 g, 35 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.64 (s, 6H) 3.66 (s, 3H), 6.49 (d, J = 12.4, 1H), 6.55 (d, J = 12.4, 1H), 6.57 (s, 2H), 6.93 (dd, J = 1.2 - 4.8, 1H), 7.41-7.42 (m, 1H), 7.46 (dd, J = 2.8 - 4.8).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ= 55.51 (CH_3), 60.00 (CH_3), 105.75 (CH), 124.58 (CH), 125.86 (CH), 127.61 (CH), 129.22 (CH), 132.41 (CH), 136.69(C), 137.79 (C), 136.84 (C), 152.52 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{15}H_{16}NaO_3S$ [MNa^+]: 299.0712; found: 299.0701.

(*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 110



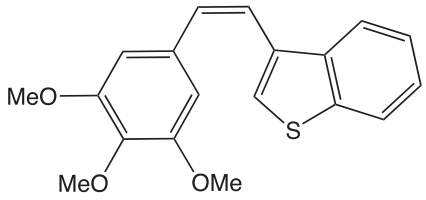
Chemical Formula : $C_{19}H_{18}O_3S$
Molecular Weight : 326.41 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[114]
To a stirred suspension of 3,4,5-trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide (1.57 g, 3 mmol) in THF (31 ml) at -78°C was added dropwise (10 min) *n*-BuLi 2.5 M in hexane (2.4 ml, 6 mmol). The stirring was continued at -78°C for 30 min and at room temperature for 1 h. The dark red reaction mixture was cooled to -78°C and a solution of benzo[*b*]thiophene-2-carboxaldehyde (0.486 g, 3 mmol) in THF (10 ml) was then added dropwise (15 min). The stirring was continued at -78°C for 1 h and at room temperature for 18 h. Subsequently, the mixture was quenched with ice-cold water (20 ml) and ethyl acetate (30 ml) was then added. After decantation, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 × 30 ml) and dichloromethane (3 × 30 ml). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated under reduced pressure to give a yellow residue. The crude product (Z/E ratio 45/55, determined by ^{1}H NMR) was purified by silica gel flash column chromatography treated with triethylamine (AcOEt : Cyclohexane / 15 : 85) to afford the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.434 g, 47 %) and the (*E*) isomer as a yellow solid (0.0622 g, 7 %).
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.79 (s, 6H), 3.91 (s, 3H), 6.65 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 6.76 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.22 - 7.31 (m, 3H), 7.65 - 7.68 (m, 2H).
^{13}C NMR (100 MHz**,** $CDCl_3$): δ = 56.01 (CH_3), 60.98 (CH_3), 106.01 (CH), 121.96 (CH), 123.17 (CH), 123.62 (CH), 124.22 (CH), 124.58 (CH), 125.37 (CH), 130.93 (CH), 131.93 (C), 137.79 (C), 138.87 (C), 139.80 (C), 140.01 (C), 153.14

(C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{18}NaO_3S$ [MNa^+]: 349.0869; found: 349.0861. Spectral data were in agreement with those reported in the literature.[114]

(*Z*)-3-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 111

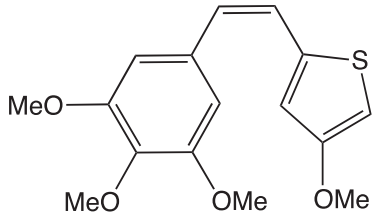


Chemical Formula : $C_{19}H_{18}O_3S$
Molecular Weight : 326.41 g.mol^{-1}

1-(2-Bromovinyl)-3,4,5-trimethoxybenzene (*Z*/*E* ratio 91/9, determined by ^{1}H NMR) (0.546 g, 2.00 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (0.10 g, 0.10 mmol) were stirred in 1,2-dimethoxyethane (30 ml) under argon at room temperature for 20 min. 3-benzo[*b*]thiopheneboronic acid (0.41 g, 2.30 mmol) and sodium carbonate (0.20 g, 1.90 mmol) in water (20 ml) were added, the mixture was heated under reflux during 20 h. After cooling and decantation, the aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate (2 × 30 ml). The combined organic phases were washed with brine (20 ml), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. This crude product was purified twice by column chromatography on silica gel deactivated by Et_3N (AcOEt : Cyclohexane : 85 / 15) to give the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.179 g, 28 %) and a mixture of (*Z*) and (*E*) isomer (0.053 g, 8 %).
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 3.54 (s, 6H), 3.81 (s, 3H), 6.46 (s, 2H), 6.67 (d, J = 12.0, 1H), 6.71 (d, J = 12.0, 1H), 7.31 – 7.37 (m, 3H), 7.66 – 7.69 (m, 1H), 7.84 – 7.87 (m, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ= 55.77 (CH_3), 60.94 (CH_3), 106 (CH), 121.98 (CH), 122.69 (CH), 122.84 (CH), 123.89 (CH), 24.26 (CH), 124.55 (CH), 132.37 (C), 132.5 (CH), 133.07 (C), 137.39 (C), 138.13 (C), 139.82 (C), 152.88 (C).

(*Z*)-4-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)thiophene

Referenced as compound 133

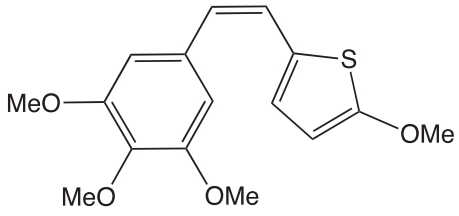


Chemical Formula : $C_{16}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 306.38 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene, scale: 3,4,5-trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide (1.57 g, 3 mmol) solution in THF (31 ml), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (2.4 ml, 6 mmol), 4-methoxythiophene-2-carbaldehyde (0.426 g, 3 mmol) in THF (10 ml). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography treated with triethylamine (AcOEt / Cyclohexane : 15 / 85) to afford the (*Z*) isomer as a light yellow solid (0.213 g, 23 %) and the (*E*) isomer as a yellow solid (0.152 g, 17 %).
Mp : 54-55°C.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.68 (s, 6H), 3.73 (s, 6H), 6.43 (d, J = 1.6, 1H), 6.51 (d, J = 12.0, 1H), 6.61 (d, J = 12.0, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.76 (d, J = 1.2, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ= 55.69 (CH), 56.94 (CH), 60.05 (CH), 98.08 (CH), 105.72 (CH), 120.43 (CH), 122.88 (C), 128.97 (CH), 131.74 (C), 137.01 (C), 137.60 (C), 152.78 (2C), 157.00 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{18}NaO_4S$ [MNa^+]: 329.0818; found: 329.0821.

(*Z*)-2-methoxy-5-(3,4,5-trimethoxystyryl)thiophene

Referenced as compound 135



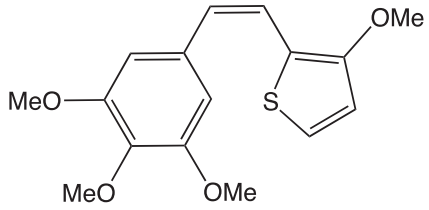
Chemical Formula : $C_{16}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 306.38 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene.

Scale: 3,4,5-trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide (1.57 g, 3 mmol) solution in THF (31 ml), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (2.4 ml, 6 mmol), 5-methoxythiophene-2-carbaldehyde (0.426 g, 3 mmol) in THF (10 ml). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography treated with triethylamine (AcOEt / Cyclohexane : 15 / 85) to afford the (*Z*) isomer as a yellow solid (0.127 g, 14 %), a mixture of (*Z*)/(*E*) isomers (0.165 g, 18 %) and the (*E*) isomer as a yellow solid (0.144 g, 16 %).
Mp: 50-51°C.
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.73 (s, 6H) 3.85 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.17 (d, J = 3.9, 1H), 6.30 (d, J = 12.3, 1H), 6.56 (d, J = 12.3, 1H), 6.63 (s, 2H), 6.80 (d, J = 3.9, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ= 55.73 (CH), 59.77 (CH), 60.07 (CH), 102.77 (CH), 105.75 (CH), 123.95 (CH), 124.71 (C), 125.07 (CH), 128.39 (C), 132.16 (C), 136.84 (C), 152.79 (C), 165.50 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{18}NaO_4S$ [MNa^+]: 329.0818; found: 329.0805.

(*Z*)-3-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)thiophene

Referenced as compound 131

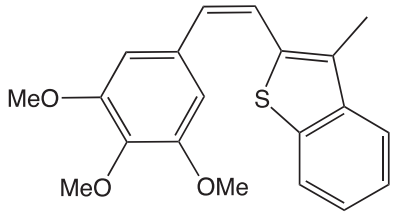


Chemical Formula : $C_{16}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 306.38 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene. scale: 3,4,5-trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide (1.57 g, 3 mmol) solution in THF (31 ml), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (2.4 ml, 6 mmol), 3-methoxythiophene-2-carbaldehyde (0.426 g, 3 mmol) in THF (10 ml). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography treated with triethylamine (AcOEt / Cyclohexane : 15 / 85) to afford the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.434 g, 47 %) and the (*E*) isomer as a yellow solid (0.062 g, 7 %).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.67 (s, 3H) 3.72 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 6.36 (d, J = 12.1, 1H), 6.63 (d, J = 12.1, 3H), 6.95 (d, J = 5.6, 1H), 7.29 (d, J = 5.5, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ= 55.75 (CH), 58.60 (CH), 60.11 (CH), 105.78 (CH), 115.15 (CH), 115.75 (CH), 119.08 (CH), 124.45 (C), 125.47 (CH), 132.44 (C), 136.88 (C), 152.77 (C), 156.99 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{18}NaO_4S$ [MNa^+]: 329.0818; found: 329.0814.

(*Z*)-3-methyl-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 138

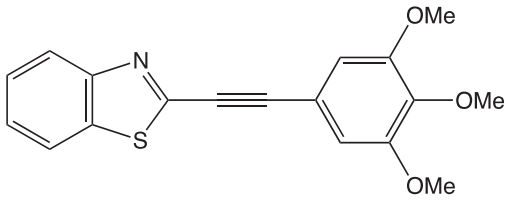


Chemical Formula : $C_{20}H_{20}O_3S$
Molecular Weight : 340.44 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene. scale: 3,4,5-trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide (1.26 g, 2.4 mmol) solution in THF (25 mL), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (1.92 mLl 3.8 mmol), 3-methylbenzo[*b*]thiophene-2-carbaldehyde (0.424 g, 2.4 mmol) in THF (8 mL). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography treated with triethylamine (AcOEt / Cyclohexane : 15 / 85) to afford the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.165 g, 21 %) and the (*E*) isomer as a yellow solid (0.372 g, 45 %).
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 2.31 (s, 3H), 3.58 (s, 6H), 3.66 (s, *3*H), 6.75 (d, *J*=12.0, 1H), 6.84 (d, *J*= 12.0, 1H), 7.38-7.29 (m, 2H), 7.72 (dd, *J*= 7.6 - 1.0, 1H), 7.83 (dd, *J* =7.6 - 1.0, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ= 12.51 (CH_3), 56.07 (CH_3), 60.59 (CH_3), 106.67 (CH), 121.74 (CH), 122.34 (CH), 122.66 (CH), 124.66 (CH), 125.40 (CH), 131.18 (C), 132.13 (C), 132.57 (CH), 133.91 (C), 137.75 (C), 138.84 (C), 139.92 (C), 153.11 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{20}H_{20}NaO_3S$ [MNa^+]: 363.1025; found: 363.1011.

2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*d*]thiazole

Referenced as compound 158



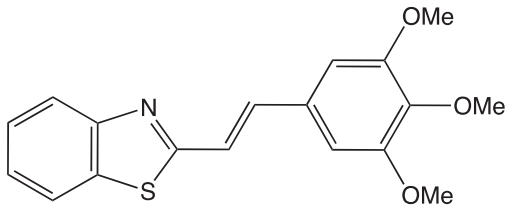
Chemical Formula : $C_{18}H_{15}NO_3S$
Molecular Weight : 325.38 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[114]
To a stirred solution of 2-iodobenzo[*d*]thiazole (0.522 g, 2 mmol), $PdCl_2(PPh3)_2$

(0.028 g, 0.04 mmol) and CuI (0.015 g, 0.08 mmol) in THF (12 ml) at room temperature, was added Et_3N (0.4 ml, 2.6 mmol) and 5-ethynyl-1,2,3-trimethoxybenzene (0.461 ml, 2.4 mmol). The stirring was continued at room temperature for 19 h. Subsequently, the mixture was filtered, washed with THF (2 × 20 ml), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give an orange residue. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 20 / 80) to afford the desired product as a yellow powder (0.394 g, 60 %).
Mp = 111-112°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*) δ= 3.71 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 6.92 (s, 2H), 7.27 – 7.44 (m, 2H), 7.88 (d, *J*= 8.0, 2H), 8.05 (d, J = 7.9, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d_6*) δ= 56.53 (CH_3), 60.63 (CH_3), 79.64 (CH), 84.41 (CH), 97.17 (CH), 109.24 (CH), 117.20 (CH), 123.98 (CH), 125.76 (C), 126.29 (C), 133.18 (CH), 139.34 (C), 141.86 (C), 142.25 (C), 153.48 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{18}H_{16}NO_3S$ [MH^+]: 326.0845; found: 326.0840.

(*E*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*d*]thiazole

Referenced as compound 165



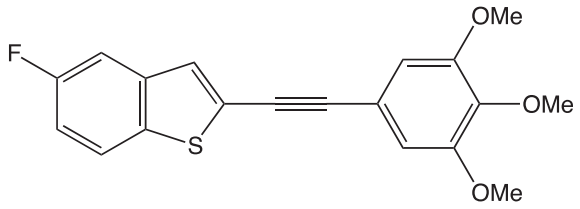
Chemical Formula : $C_{18}H_{17}NO_3S$
Molecular Weight : 327.40 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[117]
2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*d*]thiazole (0.325 mg, 1 mmol), KOH (84 mg, 1.5 mmol), $Pd(OAc)_2$ (5 mg, 0.02 mmol), and DMF (2.5 ml) were placed in a screw-cap tube (25 ml) under a nitrogen atmosphere, and the tube was capped and the mixture heated in an oil bath at 145°C with stirring for 6 h. After the reaction mixture was cooled to room temperature, the crude reaction mixture was diluted with H_2O (10 ml), extracted with EtOAc (3 × 30 ml), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give a thick brown oil. The residue was then subjected to silica gel column chromatography (AcOEt : Cyclohexane / 20 : 80) to afford the desired product as a yellow moss (111 mg, 34 %).
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*) δ= 3.70 (s, 3H), 3.85 (s, 6H), 7.15 (s, 2H), 7.43 (td, *J*= 1.2 - 8.2, 1H), 7.51 (td, *J*= 1.2 – 7.6, 1H), 7.60 (d, J = 16.0, 1H), 7.66 (d, J = 16.0, 1H), 7.96 (d, J = 8.0, 1H), 8.09 (d, J = 8.09, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d_6*) δ= 56.49 (CH_3), 60.59 (CH_3), 105.71 (CH),

121.70 (CH), 122.66 (CH), 122.91 (CH), 125.85 (CH), 126.99 (CH), 131.30 (C), 134.44 (C), 138.13 (CH), 139.19 (C), 153.60 (C), 153.97 (C), 167.06 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{18}H_{18}NO_3S$ [MH^+]: 326.0825; found: 328.0820.

5-fluoro-2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 162

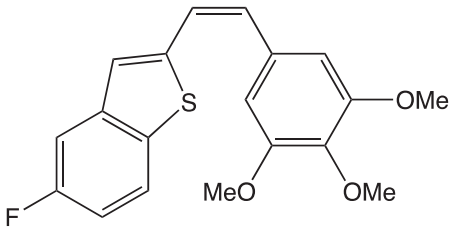


Chemical Formula : $C_{19}H_{15}FO_3S$
Molecular Weight : 342.38 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of 2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*d*]thiazole, scale: 2-iodo-5-fluorobenzo[*b*]thiophene (0.500 g, 1.8 mmol), $PdCl_{2(}PPh_3)_2$ (0.025 g, 0.038 mmol), CuI (0.014 g, 0.07 mmol), THF (11 ml), Et_3N (0.32 ml, 2.34 mmol), 5-ethynyl-1,2,3-trimethoxybenzene (0.414 ml, 2.16 mmol).
The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 5 / 95) to afford the desired product as a yellow powder (0.411 g, 67 %).
Mp: 102-103°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.71 (s, 3H) 3.82 (s, 6H), 6.94 (d, J = 14.1, 1H), 7.29 - 7.36 (m, J = 12.1, 1H), 7.63 - 7.70 (m, 2H), 7.99 - 8.03 (m, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ= 56.30 (CH_3), 56.31 (CH_3), 60.90 (CH), 83.90 (C), 99.30 (C), 111.70 (C), 111.71 (CH), 115.20 (CH), 116.10 (CH), 117.80 (C), 123.50 (CH), 127.70 (CH), 133.40 (C), 137.10 (C), 139.80 (C), 140.30 (C), 152.80 (C), 152.81 (C), 171.10 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{16}FO_3S$ [MNa^+]: 343.0799; found: 343.0785.

(*Z*)-5-fluoro-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 166

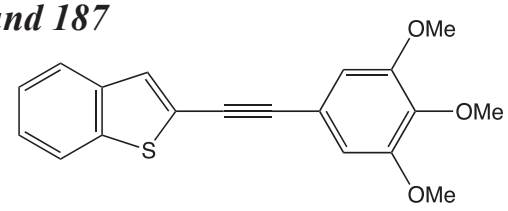


Chemical Formula : $C_{19}H_{17}FO_3S$
Molecular Weight : 344.40 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*E*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*d*]thiazole, scale: 5-fluoro-2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*b*]thiophene (0.342 mg, 1 mmol), KOH (84 mg, 1.5 mmol), $Pd(OAc)_2$ (5 mg, 0.02 mmol), and DMF (2.5 ml). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 10 / 90) to afford the desired product as a yellow oil (0.100 g, 30 %).
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.73 (s, 6H) 3.76 (s, 3H), 6.70 (s, 2H), 6.76 (d, J = 11.9, 1H), 6.86 (d, J = 11.9, 1H), 7.08 (td, J = 2.5 - 9, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.44 (dd, J = 2.6 – 9.7, 1H), 7.7 (q, J= 3.8, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ= 56.29 (CH_3), 60.65 (CH_3), 106.49 (CH), 109.00 (CH), 109.23 (CH), 113.70 (CH), 113.94 (CH), 123.75 (CH), 124.34 (CH), 124.43 (CH), 126.29 (CH), 126.33 (CH), 131.90 (C), 132.10 (CH), 135.47 (C), 137.88 (C), 140.08 (C), 140.18 (C), 142.52 (C), 153.35 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{17}FNaO_3S$ [MNa^+]: 367.0775; found: 367.0761.

2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*b*]thiophene

Referenced as compound 187

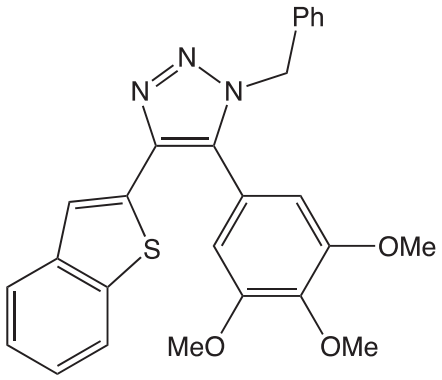


Chemical Formula : $C_{19}H_{16}O_3S$
Molecular Weight : 324.39 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of 2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*d*]thiazole, scale: 2-iodobenzo[*b*]thiophene (0.520 g, 2.00 mmol), 1-ethynyl-3,4,5-trimethoxybenzene (0.461 g, 2.40 mmol), $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0.028 g, 0.04 mmol), CuI (0.015 g, 0.08 mmol), Et_3N (0.36 ml, 2.6 mmol), THF (12 ml). Reaction time at room temperature: 19h. The crude product was then purified by silica gel flash column chromatography (cyclohexane / ethyl acetate : 90 / 10) to afford 0.610 g of a pale orange solid (94 %).
Mp = 95-98°C
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ= 3.89 (s, 9H), 6.80 (s, 2H), 7.35 - 7.39 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.74 - 7.84 (m, 2H).
^{13}C NMR (100 MHz $CDCl_3$) : δ= 56.14 (CH_3), 60.97 (CH_3), 82.04 (C), 94.89 (C), 108.72 (CH), 117.44 (C), 121.96 (CH), 123.10 (C), 123.72 (CH), 124.70 (CH), 125.36 (CH), 128.57 (CH), 139.08 (C), 139.18 (C), 140.19 (C), 159.09 (C).

4-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)-1-benzyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazole

Referenced as compound 187

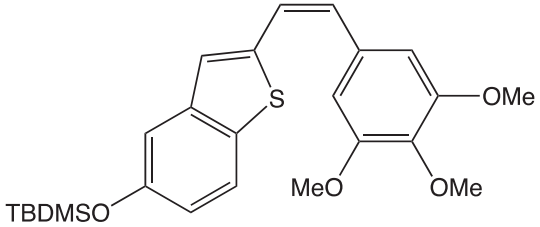


Chemical Formula : $C_{26}H_{23}N_3O_3S$
Molecular Weight : 457.54 g.mol^{-1}

2-((3,4,5-trimethoxyphenyl)ethynyl)benzo[*b*]thiophene (0.400 mg, 1.23 mmol), and benzyl azide (385 µl, 3.08 mmol) were placed in a screw-cap tube under a nitrogen atmosphere, and the tube was capped and the mixture heated in an oil bath at 100°C with stirring for 17 h. After the reaction mixture was cooled to room temperature, the crude reaction mixture was diluted with EtOAc (20 ml) and concentrated under reduced pressure. Then, the thick brown residue was diluted with diisopropyl ether (2 ml), heated and concentrated under reduced pressure. This operation was repeated 3 times and the supernatant was subsequently collected.
The white residue was finally subjected to silica gel column chromatography (AcOEt : Cyclohexane / 20 : 80) to afford the desired product as a white powder (30.2 mg, 6 %), and a mixture of both isomer (110 mg, 20 %) as a white powder.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.65 (s, 6H) 3.77 (s, 3H), 5.52 (s, 2H), 6.66 (s, 2H), 7.05 (dd, J = 1.8 – 7.6, 2H), 7.30 (m, 5H), 7.37 (s, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.93 (m, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ= 52.17 (CH_2), 56.50 (CH_3), 60.73 (CH_3), 108.05 (CH), 120.44 (CH), 121.61 (C), 122.79 (CH), 124.23 (CH), 125.12 (CH), 127.86 (CH), 128.35 (CH), 129.09 (CH), 133.70 (C), 134.61 (C), 136.17 (C), 138.87 (C), 139.18 (C), 139.57 (C), 139.97 (C), 153.78 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{26}H_{23}N_3NaO_3S$ [MNa^+]: 480.1352; found: 480.1334.

(*Z*)-*tert*-butyldimethyl((2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophen-5-yl)oxy)silane

Referenced as compound 142

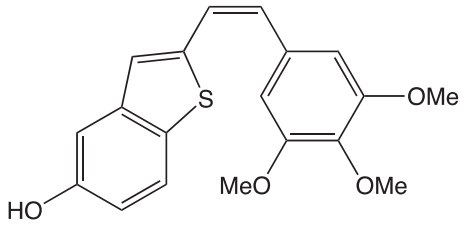


Chemical Formula : $C_{25}H_{32}O_4SSi$
Molecular Weight : 456.67 g.mol^{-1}

Following the same procedure for the synthesis of (*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophene, scale: 3,4,5-trimethoxybenzyl-triphenylphosphonium bromide (0.523 g, 1.0 mmol) solution in THF (11 ml), *n*-BuLi 2.5 M in hexane (0.8 ml, 2 mmol), 5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophene-2-carbaldehyde (0.292 g, 1.0 mmol) in THF (4 ml). The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 10 / 90) to afford the (*Z*) isomer as a yellow oil (0.152 g, 33 %) and the (*E*) isomer as a yellow solid (0.184 g, 40 %).
Mp: 77-78°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 0.18 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 3.70 (d, J = 2.6, 9H), 6.67 (d, J =12.1, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.83 (m, 2H), 7.21 (d, J = 2.5, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.67 (d, J= 8.6, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) : δ= 2.73 (C) 18.44 (CH_3) 26.06 (CH_3) 26.27 (CH_3) 26.80 (CH_3), 55.37 (CH_3), 56.24 (CH_3), 60.62 (CH_3), 106.51 (CH), 113.50 (CH), 119.42 (CH), 123.46 (CH), 123.92 (CH), 126.43(CH), 131.35(C), 132.01(CH), 132.99(C), 137.78(C), 140.33(C), 141.01(C), 153.05(C), 153.25(C)
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{25}H_{33}NaO_4SSi$ [MNa^+]: 479.1683; found: 479.1691.

(*Z*)-2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophen-5-ol

Referenced as compound 143



Chemical Formula : $C_{19}H_{18}O_4S$
Molecular Weight : 342.41 g.mol^{-1}

To a stirred solution of (*Z*)-*tert*-butyldimethyl((2-(3,4,5-trimethoxystyryl)benzo[*b*]thiophen-5-yl)oxy)silane (0.150 g, 0.33 mmol), in THF (2 ml) at room temperature, was added TBAF (0.258 g, 1 mmol). The stirring was continued at room temperature for 1 h. Subsequently, the mixture was diluted with EtOAc (20 ml) washed with $NaHCO_3$ (2 × 10 ml), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 30 / 70) to afford the desired product as a yellow oil (71 mg, 63 %).

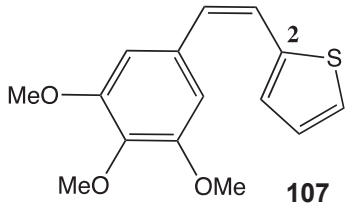
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ= 3.70 (d, J = 4.3, 9H), 6.64 (d, J =12.0, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.80 (m, 2H), 7.07 (d, J = 2.0, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.67 (d, J= 8.6, 1H), 9.39 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ= 56.26 (CH_3), 60.63 (CH_3), 104.55 (CH), 106.54 (CH), 108.33 (CH), 115.76 (CH), 123.25 (CH), 124.11 (CH), 126.39 (CH), 130.66 (C), 130.95 (CH), 132.12 (C), 137.74 (C), 140.31 (C), 140.54 (C), 153.24 (C), 155.42 (C).

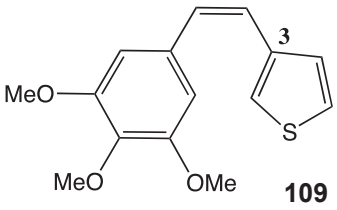
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{19}H_{18}NaO_4S$ [MNa^+]: 365.0818; found: 365.0806.

CHAPITRE 2 : EVALUATIONS DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES ANALOGUES DE LA COMBRETASTATINE A-4

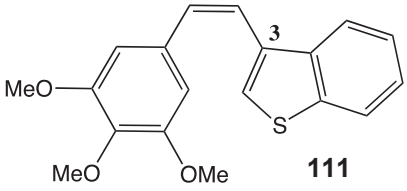
Produits finaux, testés pour leurs propriétés antiprolifératives



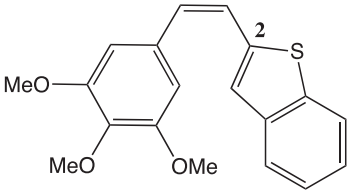
107



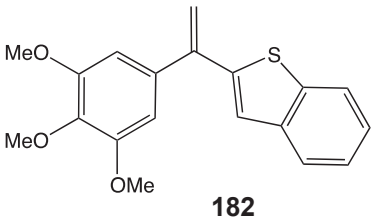
109



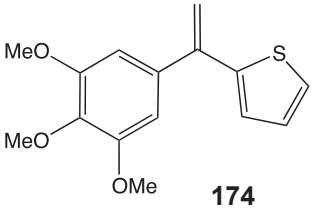
111



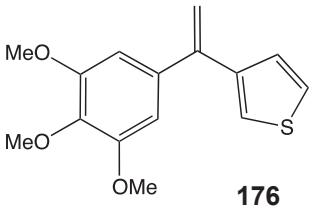
110



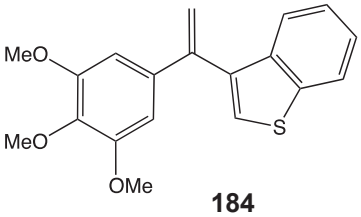
182



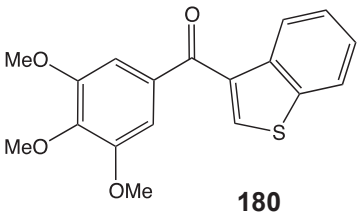
174



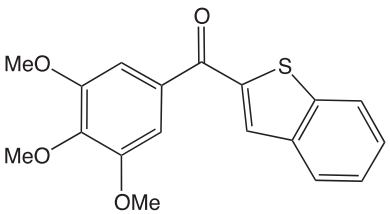
176



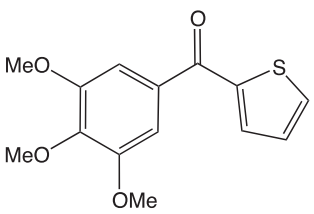
184



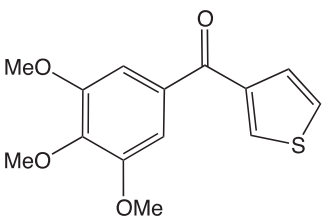
180



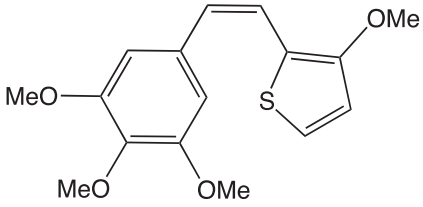
178



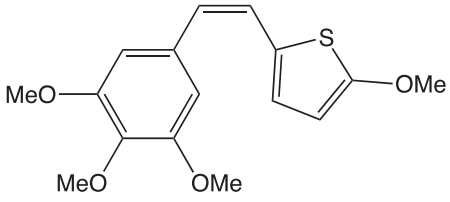
170



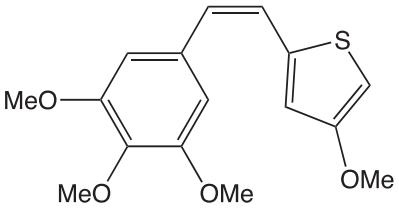
172



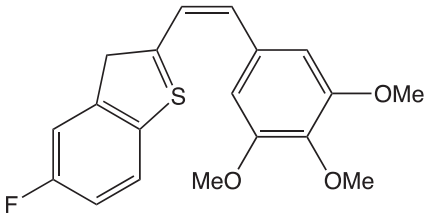
131



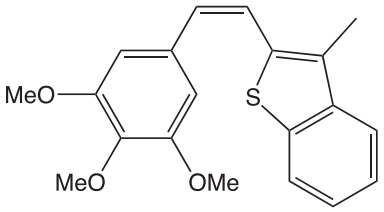
135



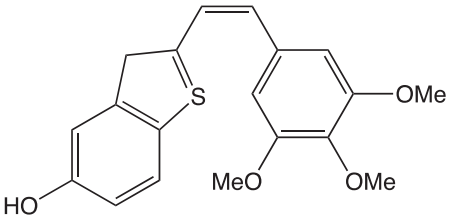
133



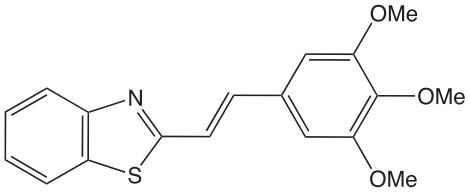
166



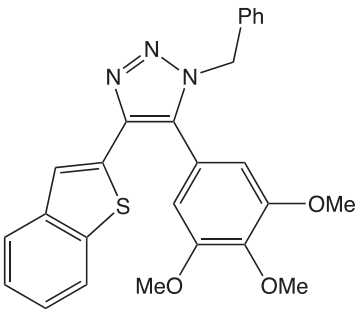
138



143



165



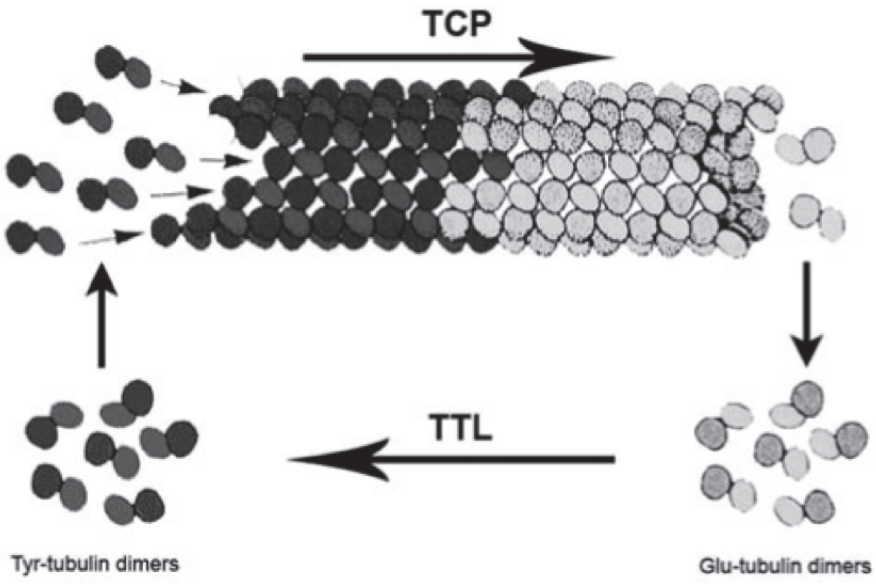
187

La synthèse chimique des composés précédents a représenté une part importante de mon travail. Ces expérimentations ont mené à la formation de nombreux dérivés dont nous allons, au cours de ce chapitre, présenter les évaluations biologiques. Celles-ci consistent dans un premier temps en l'évaluation de la capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline en microtubule. Ensuite, les composés les plus actifs ont été sélectionnés et nous avons évalué leurs effets antiprolifératifs sur un panel de lignées cellulaires regroupant IC8, MES-SA et DX5, RL, A2780 et MIA PaCa-2.
Certains de ces tests biologiques ont été réalisée, pour la majeure partie, au sein de l'équipe du Dr Caroline Barrette au CEA de Grenoble, et notamment l'évaluation de l'effet antitubuline. D'autres ont été plus récemment étudié au niveau du laboratoire Anticorps Anticancer, sous la responsabilité du Dr Charles Dumontet et du Dr Lars Peter Jordheim.

1. EVALUATION DE L'EFFET ANTITUBULINE

La CA-4 et ses analogues ont été décrits, tel que nous l'avons mentionné précédemment, comme des composés disposant spécifiquement d'un effet en tant qu'agent antivasculaire par action directe sur la tubuline. Leur capacité à se fixer spécifiquement au niveau du site de la colchicine, empêche donc la polymérisation en microtubule préalable à l'étape de mitose subséquente.
Le test multiparamétrique réalisé est celui décrit par Vassal et coll.[135]. Ce dernier s'appuie sur le principe de double marquage *via* des anticorps spécifiques des extrémités tyrosinées et détyrosinées de la tubuline (*Figure 37*). Ce test *in cellulo* permet de déterminer précisément la nature du type de poison mitotique que représente le composé. En d'autres termes, nous allons pouvoir distinguer les agents inhibiteur de la formation du fuseau mitotique telle que la colchicine, des agents stabilisateurs comme par exemple les taxoïdes.

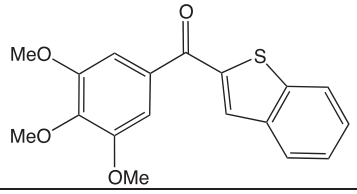
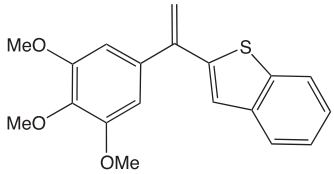
Dans un premier temps, les composés synthétisés sont incubés pendant 2h avec différentes lignées cellulaires qui sont ensuite perméabilisées par une méthode « douce », permettant de conserver la structure microtubulaire tout en favorisant l'extraction des dimères de tubuline dans la solution tampon. Après fixation et double marquage par les anticorps spécifiques des extrémités Glumatines (tubuline sous forme de dimères) et Tyrosines (tubuline inclus dans les microtubules), l'intensité de la fluorescence est alors quantifiée. Une diminution de la fluorescence dans le compartiment évaluant la tubuline tyrosinée est à mettre en lien avec un agent déstabilisateur du fuseau mitotique alors qu'une une augmentation de la fluorescence dans le « canal Glutamine » démontre une drogue stabilisatrice du fuseau.



Avec TCP = Tubuline Carboxypeptidase
TTL Tubuline Tyrosine Ligase

Figure 37 : Principe du test multiparamétrique conçu par Vassal *et al.*[135] pour évaluer l'effet antitubuline

Les dérivés *iso*CA-4 et phenstatines furent les premiers à être testés (*Tableau 10*) par cette méthode et ont donné des résultats intéressants selon l'hétérocycle greffé en lieu et place du cycle B. La combrétastatine A-4 a été évaluée en tant que composé de référence.

Produit	Inhibition Polymérisation Tubuline (IPT) CE_{50} (en µM)
CA-4	**0,009**
178 	**> 10,0**
182 	**0,321**

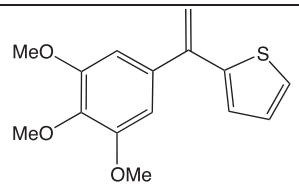
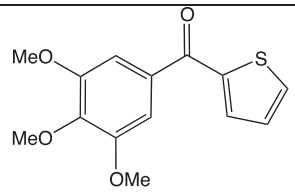
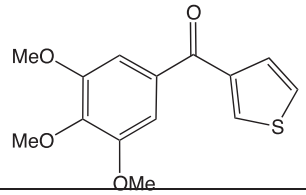
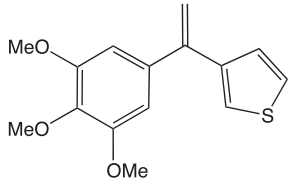
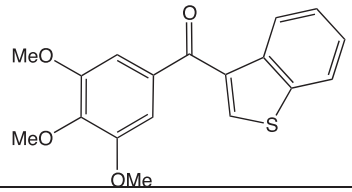
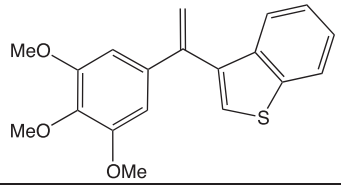
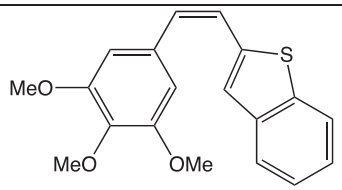
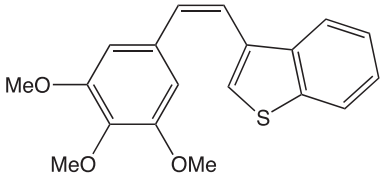
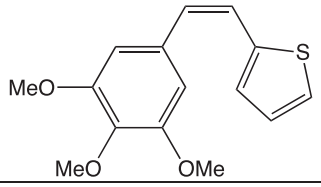
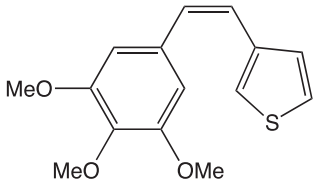
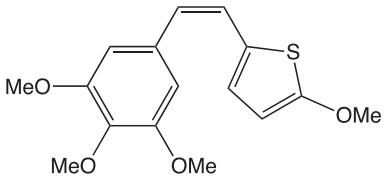
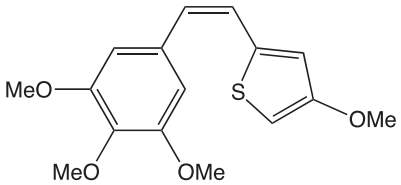
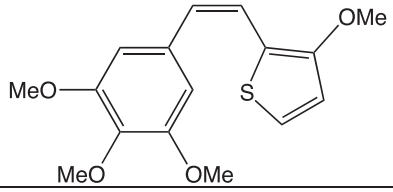
174		**> 10,0**
170		**> 10,0**
172		**> 10,0**
176		**> 10,0**
180		**> 10,0**
184		**3,897**

Tableau 10 : Inhibition de la polymérisation de la tubuline par les phenstatines et les dérivés *iso*CA-4

L'analyse des résultats obtenus nous permet de tirer plusieurs enseignements sur les différentes relations structures-activités.
Ainsi, seul le composé **182**, disposant d'une EC_{50} de l'ordre de la centaine de nanomolaire, et le **184** se sont montré actifs. La présence d'un motif benzo[*b*]thiophène et le greffage en position 2 semble donc permettre une certaine inhibition de la polymérisation de la tubuline en microtubule (comme observé avec le composé **182)**. De la même façon, la synthèse de dérivés présentant une liaison éthylénique parait être un choix plus judicieux que la synthèse d'isostère cétonique. En effet, aucune des phenstatines synthétisées précédemment n'a démontré d'activité IPT. Enfin, la simplification structurale du benzo[*b*]thiophène par un thiophène simple découle systématiquement sur une activité inhibitrice très faible, avec des EC_{50} supérieurs à 10 µM.

Les dérivés stilbènes synthétisés dans le cadre de mon travail de thèse ont de la même façon été testés pour leurs effet IPT, les résultats étant présentés dans le *Tableau 11*.

Produit	Inhibition Polymérisation Tubuline (IPT) CE_{50} (en µM)
110 	**0,08**
111 	**2,430**
107 	**> 10,0**
109 	**> 10,0**
135 	**1,558**
133 	**0,081**
131 	**> 10,0**

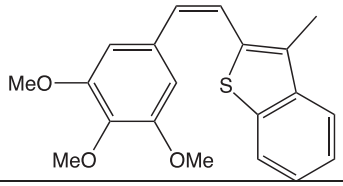
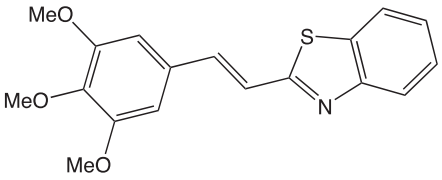
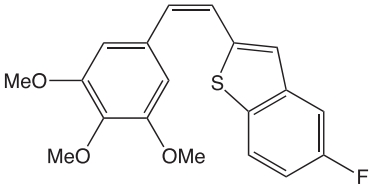
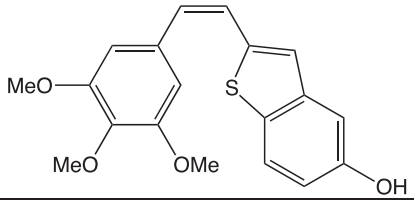
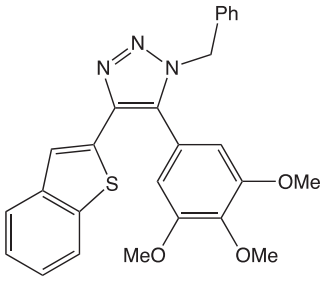
138 	**0,55**
165 	**> 10,0**
166 	**0,52**
143 	**0,72**
187 	**> 10,0**

Tableau 11: Inhibition de la polymérisation de la tubuline par les dérivés *cis*-éthylèniques de la CA-4

Les dérivés **133** méthoxythiophène et **110** benzo[*b*]thiophène ont montré des activités remarquables, légèrement inférieures à la centaine de nanomolaire. Ainsi, le greffage de l'hétérocycle par la position 2 semble entrainer une amélioration de l'activité, prouvé notamment par les différences flagrantes d'IPT entre les analogues **110** et **111**.
L'introduction d'un groupement méthoxy sur le thiophène modifie également grandement la capacité de ce type de dérivés à inhiber la polymérisation de la tubuline. En effet, on peut observer un facteur d'inhibition supérieur à 1000 entre les analogues **107** et **133**.
La position du groupement méthoxy est aussi critique, puisque le composé **133**, possédant ce motif en position 3, démontre une spécificité plus importante que le régioisomère **135**

Les évaluations biologiques des composés **131**, **165** disposant d'un noyau benzothiazole, **166** et **143** substitués respectivement en position 5 du benzo[*b*]thiophène par un fluor et un hydroxyle, et du triazole 187 sont actuellement en cours.

2. EVALUATION DE L'EFFET ANTIPROLIFERATIF

La capacité dont dispose une drogue à limiter la prolifération des lignées cellulaire va être qualifiée d'effet antiprolifératif ou cytotoxique. Afin d'évaluer ce paramètre, plusieurs essais peuvent être employés, les plus connus étant les tests MTT et de la résazurine (*Figure 38*, *Figure 39*).[136,137]
Le principe de ce premier test repose sur la quantification des cellules vivantes grâce à l'utilisation d'un marqueur coloré, le sel de tetrazolium ou MTT de couleur jaune, qui va être réduit en formazan de couleur violette par la réductase mitochondriale.

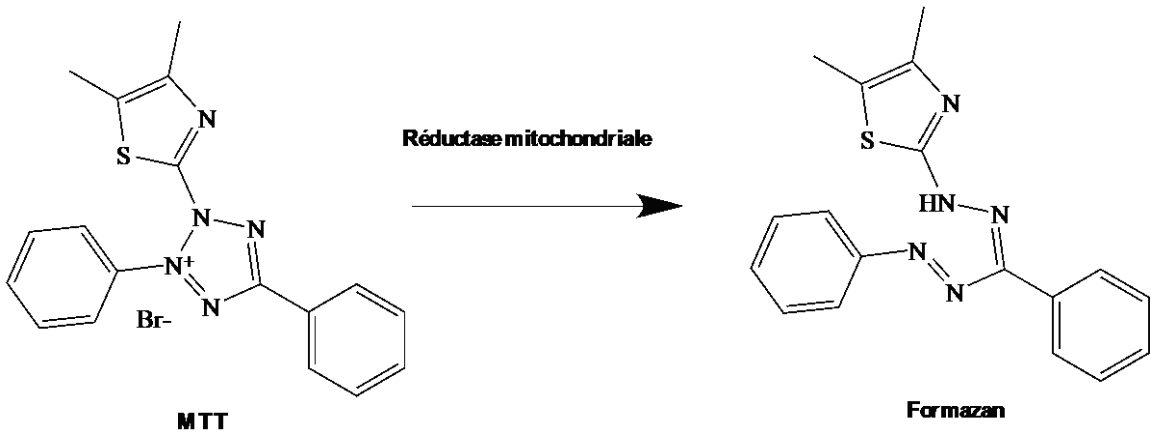


Figure 38: Principe du test MTT[129]

La réductase mitochondriale va être retrouvée dans le milieu extrinsèque uniquement si la structure cellulaire est détruite. En d'autres termes, plus la concentration en réductase sera importante, et plus la drogue sera active, synonyme de mort cellulaire et donc d'activité anti-proliférative de la drogue.
La quantification de la densité optique, de l'absorbance, à une longueur d'onde référence (généralement de 570 nm) permet alors d'évaluer le nombre de cellules vivantes dans le milieu.

Le test à la résazurine repose sur le même principe puisque ce dernier va être transformé en résofurine rose et fluorescent, par les cellules viables actives métaboliquement dans le milieu. La quantification de la fluorescence permet alors de determiner le taux de cellules vivantes dans le milieu.

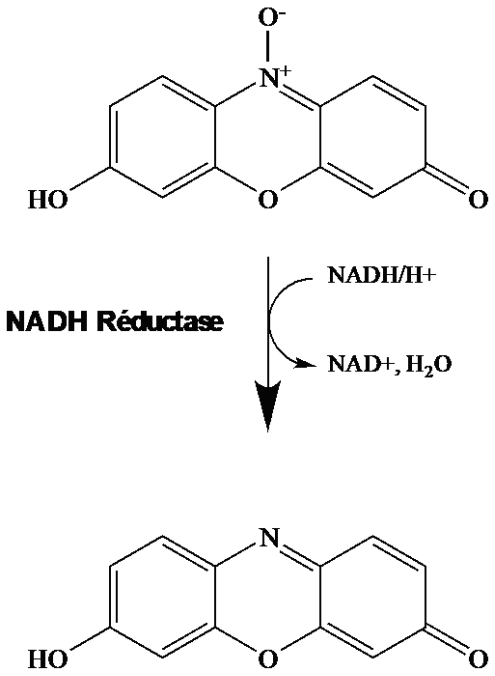


Figure 39: Principe du test à la résazurine[130]

Nos premiers essais ont été effectués sur les lignées cellulaires IC-8, MES-SA et MES-SA DX5. La première provient d'une souche de type mélanome humain, la seconde est issue d'un sarcome utérin d'origine humaine et enfin les cellules DX5 présentent un phénomène de chimiorésistance.

Le protocole expérimentale employé est le suivant :

- Incubation des cellules pendant 24h dans un milieu de culture adapté possédant les nutriments nécessaires au bon dévelopemment cellulaire
- Exposition aux drogues à différentes concentrations pendant 48h
- Révelation par ajout d'une solution de MTT et mesure de l'absorbance à une longeur d'onde λ= 570 nm (avec λ_{ref} = 630 nm).

Dans notre cas, ces essais n'ont été réalisés que sur les composés ayant démontré une inhibition de la polymérisation de la tubuline importante. Ces résultats sont présentés dans le *Tableau 12*.

Produit	**CI_{50} (en nM)**
Colchicine	**IC8 : 15** **MES-SA : 15** **MES-SA DX5 : > 500**

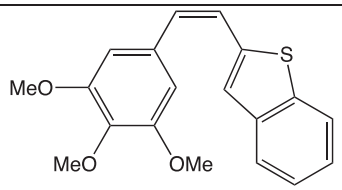
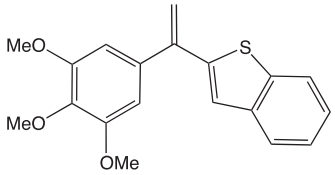
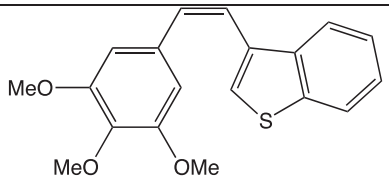
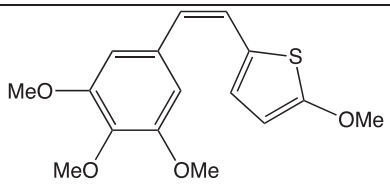
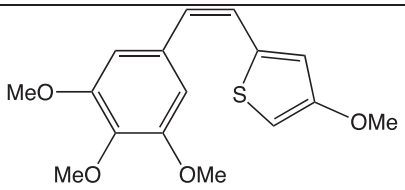
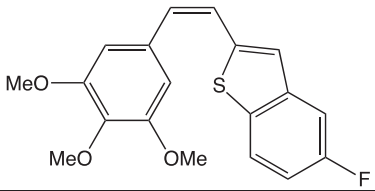
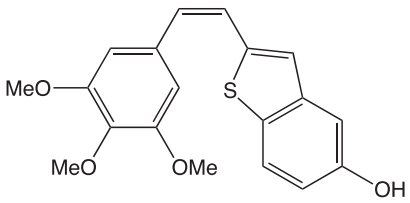
CA-4		**IC8 : 4** **MES-SA : 3** **MES-SA DX5 : n.d.**
110		**IC8 : 17** **MES-SA : 13** **MES-SA DX5 : 19**
182		**IC8 : 101** **MES-SA : 95** **MES-SA DX5 : 150**
111		**IC8 : 288** **MES-SA : 191** **MES-SA DX5 : n.d.**
135		**IC8 : 76** **MES-SA : 53** **MES-SA DX5 : 75**
133		**IC8 : 27** **MES-SA : 25** **MES-SA DX5 : 27**
166		**RL : 38** **A2780 : 200** **MIA PaCa-2 : 200**
143		**n.d.**

Tableau 12: Évaluation de l'activité antiproliférative des dérivés synthétisés sélectionnés

Ainsi, bien que le composé **182** *iso*-éthylénique fasse figure d'exception, ce sont les dérivés (*Z*)-éthyléniques greffés en position 2 qui démontrent les activités cytotoxiques les plus fortes. En particulier, les composés **110**, **133** et **135** se sont montrés les plus actifs, avec des valeurs de CI_{50} inférieures à la centaine de

nanomolaire et donc comparables à celles de la colchicine. En outre, nous constatons que ces derniers restent actifs sur une lignée multi-résistante telle que MES-SA DX5, alors que la colchicine se montre inefficace sur ce type de cellule.

Finalement, l'évaluation biologique des différents analogues hétérocycliques de la CA-4 a permis de faire émerger des composés nouveaux, aux activités prometteuses et qui ont permis d'explorer encore davantage les SARs. Pour autant, la CA-4 reste toujours la molécule affichant les activités d'inhibition les plus intéressantes à ce jour.

3. EFFET SUR LE CYCLE CELLULAIRE

L'étude des effets sur le cycle cellulaire des composés précédemments évalués est actuellement en cours de détermination par l'une des équipes partenaires du projet: la technique utilisée est la cytométrie en flux.

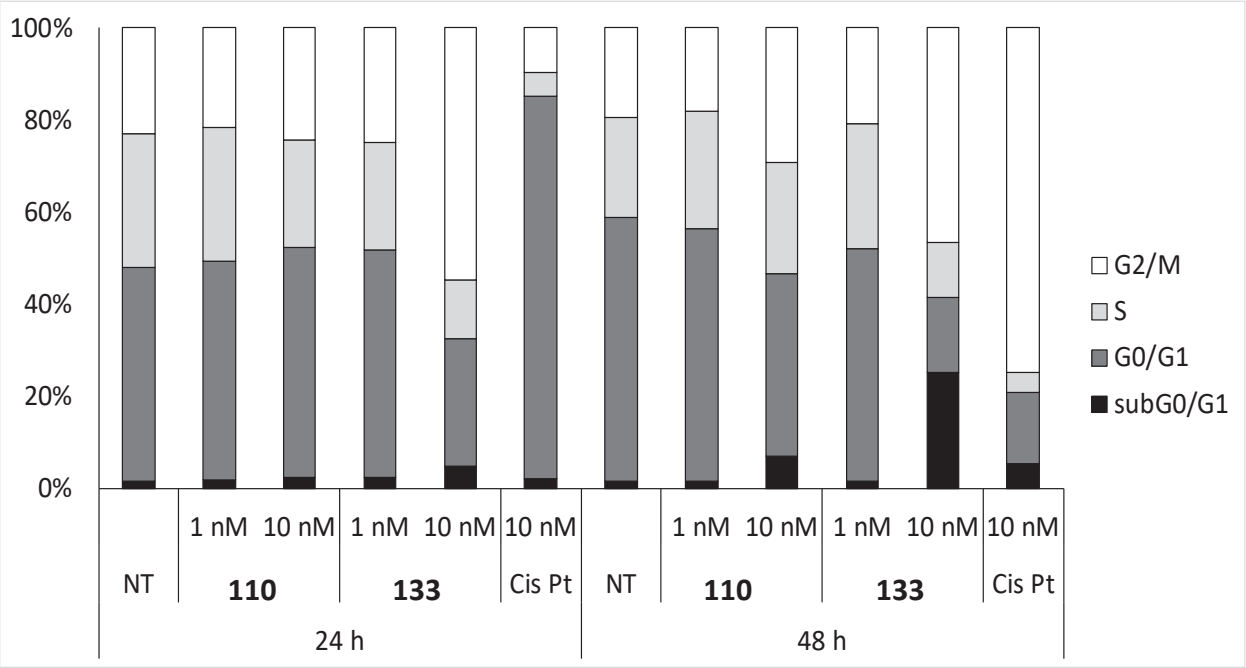


Figure 40: Évaluation de l'effet sur le cycle cellulaire (lignée cellulaire RL) de différentes drogues après 24h et 48h. SubG0/G1 correspond aux cellules apoptotiques, NT aux cellules non traitées et Cis Pt au Cisplatine.

Les composés les plus actifs ont donc été sélectionnés et évaluer pour leur capacité à entrainer l'arrêt du cycle cellulaire dans les lignées RL. L'exposition à 1 nM du composé **133** entraine un arrêt important du cycle cellulaire en phase G2/M après 24h (54,6% vs. 22,7%) ainsi qu'une induction de l'apoptose (24,9% vs. 1,6%) après 48h. L'exposition à une concentration égale à 1 nM de ce dérivé n'a en revanche pas perturbé la distribution du cycle cellulaire. Concernant le composé

110, l'incubation à 10 nM a entrainé un arrêt du cycle en phase G2/M après 24h (28,8% vs. 19,3%) mais n'a induit un phénomène d'apoptose (7.0% vs 1.6%) qu'après 48h d'exposition à la drogue. On remarque également que cette apoptose est moins marquée qu'avec le composé **133**.
Ces résultats confirme donc que les effets observés lors des différents tests MTT sont représentatifs d'un effet en tant qu'agents sur le cycle cellulaire.

PARTIE 2 : SYNTHESE, EVALUATIONS BIOLOGIQUES ET NANOFORMULATIONS DES INHIBITEURS DE DYRKS KINASES

CHAPITRE 3: INHIBITEURS DE KINASES DYRK

1. ORIGINE DE LA FAMILLE DE PROTEINES DYRK

1.1 La famille de protéines MBK / DYRK chez les nématodes

Deux types de gènes codant pour le phénotype « minibrain » ont été identifié chez *Caenorhabditis elegans* : mbk-1 et mbk-2. Bien que mbk-1 soit encore relativement très peu connu, mbk-2 a lui fait l'objet de recherche intense lors de ces dernières années.[138]
Il a donc été observé qu'une baisse de l'expression en mbk-1 n'altérait en rien le développement physiologique des mutants, alors que la présence d'une copie supplémentaire de ce gène entrainait une perturbation de la chimiotaxie, notamment au niveau des substances chimioattractives volatiles. A l'opposé, les mutants souffrant d'une déplétion en mbk-2 affichent un taux de survie nul, à mettre en relation avec de graves perturbations de la cytogenèse embryonnaire.[138]
D'autres études menées par différents groupes de recherche, ont montré que le gène mbk-2 était primordial en vue de promouvoir le développement de l'oocyte jusqu'à l'embryon grâce à l'implication de ce gène à travers plusieurs étapes de l'embryogenèse. Mbk-2 permet aussi non seulement d'orienter le fuseau mitotique durant la phase de division cellulaire mais jouerait également un rôle dans la dégradation des protéines que sont OMA-1/OMA-2 et MEI-1. De par sa faculté à se relocaliser dans le cortex jusque dans le cytoplasme des cellules neuronales durant la phase de méiose, MBK-2 va disposer d'une forte accessibilité à ses substrats et va ainsi permettre sa propre activation par une action spécifique sur son répresseur, encore méconnu à ce jour. Néanmoins, c'est par la formation de complexes protéiques avec les pseudophosphatases EGG-3, EGG-4, EGG-5 et grâce à la phosphorylation par CDK-1 de ces dernières que les mécanismes de contrôles vont être mis en jeu. Finalement, la phosphorylation par MBK-2 des protéines MEX-5/MEX-6 et d'OMA-1, répresseur transcriptionnel lors de la phase primaire du développement embryonnaire, font de cette classe protéique une composante importante au niveau de plusieurs procédés physiologiques.[138]

1.2 La famille de protéines DYRK chez la drosophile

L'étude de cette enzyme chez la drosophile a montré qu'il existait 3 membres de la sous-famille DYRK en la présence de *mnb* (*drosophila* minibrain), *dDyrk2* et *dDyrk3*. Bien que l'étude de *mnb* chez la drosophile ait permis d'établir un modèle précis du fonctionnement catalytique de la kinase DYRK, très peu de choses sont

encore connues à ce jour sur les différentes cibles ou substrats de cette protéine chez cette espèce.
Le gène *mnb* pour « *minibrain* », a été dénommé de la sorte car il est associé au phénotype hypomorphe des mouches mutantes, entrainant des dysfonctionnements cérébraux importants.[139] En effet, au niveau histologique, la dérégulation de *mnb* découle sur un espacement anormalement élevé des neuroblastes cellulaires du cerveau chez la larve et à une réduction de la taille des lobes optiques et du cerveau chez l'adulte. Ceci est associé à des capacités sensorielles, olfactives, mémorielles et d'apprentissage réduites, bien en deçà des espèces présentant un phénotype « sauvage » (wild type) normal. Ceci confirme donc que *mnb* est central dans la neurogenèse post-embryonnaire.
dDyrk2, qui partage le pourcentage d'homologie le plus élevé avec la kinase Dyrk4, présente chez les mammifères, a été montrée comme étant catalytiquement active durant toutes les étapes du développement mais d'avantage lors des phases d'embryogenèse et de nymphose.
L'isoforme dDyrk3 a lui été identifié comme un régulateur du facteur transcriptionnel nucléaire des lymphocytes T NFAT, lors du screening génomique chez la drosophile.

1.3 La famille de protéines kinases DYRK chez les mammifères et l'homme

Les protéines kinases font partie des cibles les plus étudiées actuellement dans le développement de composés actifs aticancéreux, comme prouvé par le nombre grandissant de publications sur le sujet. Parmi ces protéines au rôle si spécifique, la famille des kinases DYRK (pour « Dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated Kinases » ou encore « Dual-specificity Yak-related kinases ») englobe tout un groupe de protéines subdivisées en 3 sous-familles : les kinases DYRK, les kinases HIPKs (Homeodomain-interacting protein kinases) et les PRP4, kinases qui vont intervenir au niveau du splicéosome (complexe moléculaire permettant l'épissage) et des kinétochores. Plus spécifiquement encore, la classe des DYRK comprend 3 éléments que sont Dyrk1, Dyrk2 et les protéines Yak.
Les sous-classes Dyrk1 et 2 sont finalement elles-mêmes composés de 5 kinases différentes que sont Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3 (ou REDK) et Dyrk4. Ces protéines sont classées selon leur degré d'homologie structurale : ceci est un point clé dans la compréhension de l'intérêt thérapeutique que pourrait représenter ces molécules (Figure 41).[140] Ainsi, depuis la découverte de Yak1p il y a plus de 20 ans, il a été montré que ces enzymes partageaient énormément de similitudes avec leurs ancêtres du règne eucaryote. Leurs conservations structurales, homologiques et biochimiques au cours des siècles de l'évolution est une caractéristique importante, relative à cette famille de kinases.[140]

En plus de cette classification, les kinases DYRK font parties du groupe CMGC du kinome eucaryote qui comprend également les kinases dépendantes des

cyclines CDKs, les glycogènes synthases kinases GSKs et les kinases associées aux protéines-Rho RCKs.[5] L'intérêt, relativement récent, que toutes ces kinases suscitent provient de leur implication dans un grand nombre de procédés physiologiques et notamment dans le développement cérébral, les phénomènes d'apoptose ou encore dans la régulation de l'épissage.[141]

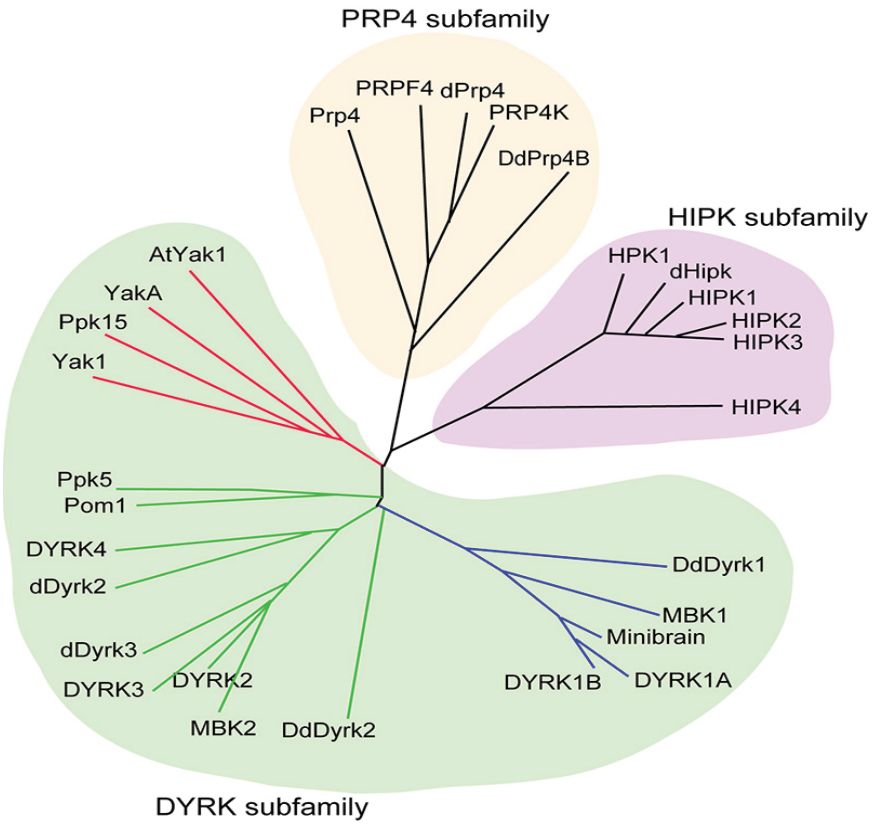


Figure 41: Famille de protéines DYRK[5]

2. MECANISMES D'ACTIVATION ET DE REGULATION DES KINASES DYRK

Plusieurs membres de la famille des CMGC disposent d'un site de phosphorylation au niveau de leur boucle d'activation entre les sous-domaines VII et VIII associés aux protéines kinases (Figure 42). La phosphorylation au préalable par une kinase sous-jacente est généralement requise en vue de l'activité optimale de ces protéines. Les kinases MAP telles que ERK1/2 ou encore p38, sont d'excellents exemples puisqu'elles disposent d'un motif TXY (thréonine-X-tyrosine) au niveau de leur boucles d'activations ; c'est la phosphorylation sous-jacente des résidus tyrosine et thréonine de ce motif par une autre kinase, la MAP kinase kinase (ou MEK) qui va permettre l'activation des kinases.

La famille des kinases DYRK disposent, quant à elles, d'un motif YXY (tyrosine-X-tyrosine) au niveau de la zone correspondant à la boucle d'activation. Cependant, au lieu d'une phosphorylation au préalable par une autre kinase, c'est par une étape d'autophosphorylation sur le résidu Tyr que cette enzyme va être activée.

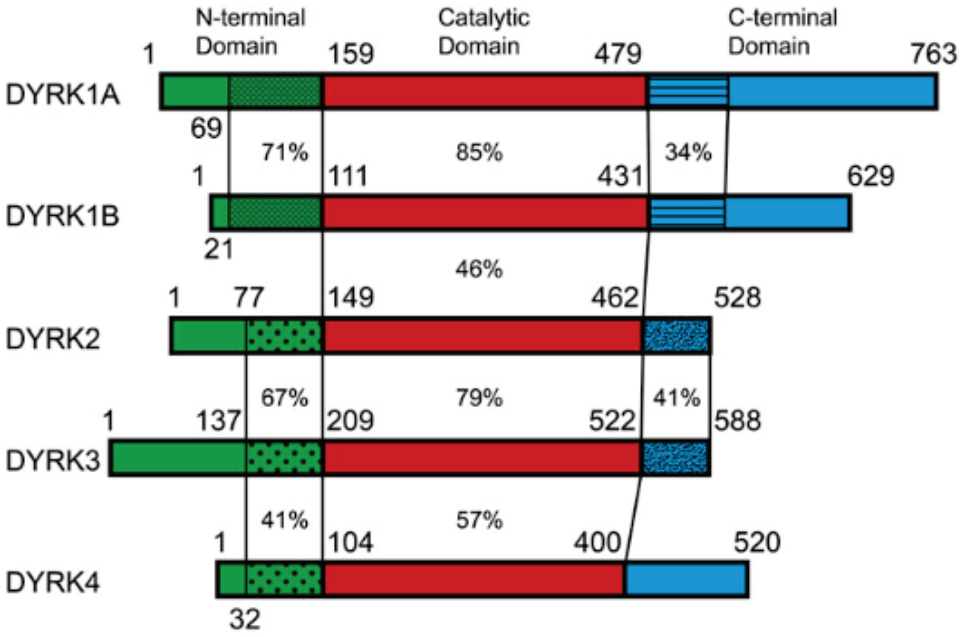


Figure 42: Pourcentage d'homologie structural entre les membres de la sous-famille des kinases DYRK[138]

En effet et contrairement au procédé habituel qui nécessite la phosphorylation de la kinase par une autre kinase, les kinases DYRK peuvent s'autophosphoryler en passant par la formation d'un intermédiaire transitoire durant le phénomène de translation protéique (Figure 43).[5] En ciblant une zone intramoléculaire située sur la boucle d'activation, ces kinases vont alors pouvoir atteindre leur maturation et activation « complète ». Curieusement, l'activité tyrosine kinase est alors perdue après cette étape d'autophosphorylation. Néanmoins, le mécanisme exact par lequel va se faire cette activation et notamment les changements conformationnels induits au niveau de la boucle d'activation sont encore très peu connus.[142]

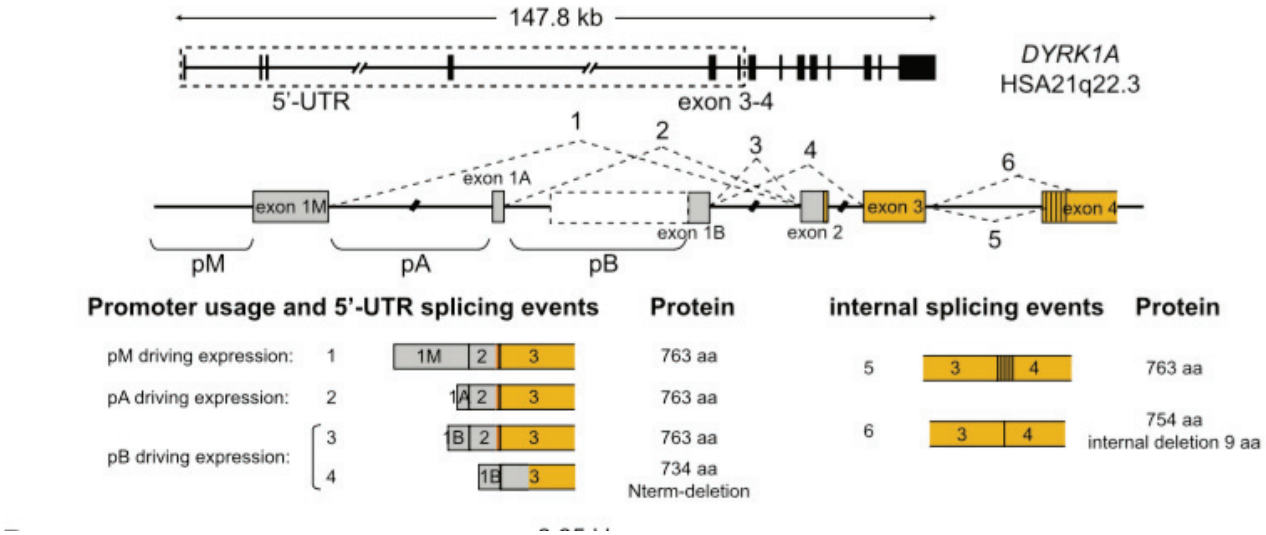


Figure 43: Représentation structurale génomique de la protéine Dyrk1A[1]

Egalement, les protéines DYRK se distinguent par leur capacité à être constitutivement actives, caractéristique également observée chez d'autres kinases. En plus de leur faculté à s'autophosphoryler, ces molécules vont en effet être régulées par de nombreux autres mécanismes et notamment des phénomènes de phosphorylation et déphosphorylation localisés au niveau de leur boucle d'activation et sur d'autres sites voisins.[143,144]
Malheureusement, il n'y a actuellement que très peu d'information sur les mécanismes de modulation de l'activité de ces protéines. Cependant, plusieurs hypothèses ont été envisagées telle qu'une déphosphorylation de la boucle d'activation qui bloquerait alors l'activité enzymatique des DYRK. En revanche, aucune phosphatase spécifique n'a à ce jour encore été décrite. Aussi, des processus autre que la modification de la boucle d'activation pourraient être impliqués comme par exemple les régulations de Dyrk1B par MKK3 ou encore la phosphorylation de Dyrk2 par la protéine ATM, mis en évidence dans certaines études récentes.[144,143]
Enfin, la localisation subcellulaire de ces protéines pourrait vraisemblablement contribuer à moduler leurs fonctions enzymatiques. En effet, la migration soit au niveau cytoplasmique, soit dans le noyau, permettrait de « séquestrer » les protéines DYRK loin de leur substrat, bloquant l'interaction avec ces derniers et permettrait donc ainsi de moduler indirectement leurs fonctions. Ce mécanisme, retrouvé chez d'autres kinases, pourrait donc constituer un premier élément de réponse.

D'autres systèmes de régulation pourraient être aussi impliqués, au vue des multiples interactions des Dyrks et notamment de Dyrk1A.

Les kinases DYRK sont donc finalement des éléments essentiels et impliquées dans le contrôle, la modulation et la stabilité de nombreuses protéines. L'analyse des différentes isoformes de cette famille de kinases dans les paragraphes suivants, va permettre de mieux comprendre l'intérêt thérapeutique que pourrait présenter ces protéines.

3. LA PROTEINE KINASE DYRK1A

3.1 Gène

Initialement, le gène *Dyrk1A* a été décrit comme provenant d'une région spécifique localisée au niveau du chromosme 21, plus connu comme la région critique du Syndrome de Down. Plus exactement, ce gène s'étend sur 148,6 kb, comporte 16 exons et 15 introns.[145] Le promoteur de ce gène ne dispose pas de boite Thymidine / adénine TATA mais présente une région riche en cytosine et guanine (CG). Trois ilots CG ainsi que plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription (SP1, CREB, AP4) ont été mis en évidence au niveau de la région 5' N-terminale. Des études poussées ont également montré au niveau du promoteur essentiel du gène *dyrk1A* des sites de fixation pour l'ARN polymérase II et une régulation épigénétique a été détectée au niveau des histones H2AZ et sur la lysine 4 de l'histone H3. Ces trois marqueurs sont caractéristiques d'une activité transcriptionnelle. Au niveau de l'extrémité 3' C-terminale, un site de polyadénylation (AATAAA), trois queues poly(A) atypiques et sept motifs ATTTA impliqués dans la déstabilisation de l'ARN suggèrent une régulation par des miARN et ont été mis en évidence grâce à un séquençage par ADNc.[146]
A l'heure actuelle, 62 gènes orthologues (gènes issus d'un ancêtre commun) ont été identifiés dont huit paralogues (gène dont la structure ou la fonction a changé au cours de l'évolution par rapport au gène ancestral) distincts chez l'homme : 4 appartenant à la famille des Dyrks (Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3 et Dyrk4) et 4 appartenant à la famille HIPK (HIPK1, HIPK2, HIPK3 et HIPK4). La localisation chromosomique, le rôle, l'expression, et la localisation cellulaire de ces derniers différent tous de celles de Dyrk1A.

3.2 Structure protéique, activation et régulation de Dyrk1A

La protéine Dyrk1A est composés de 5 domaines spécifiques : un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite en N-terminal, une région responsable de l'activité kinase, un domaine riche en acide glutamique-proline-serine-thréonine (PEST), une zone riche en histidine et enfin un domaine sérine/thréonine (S/T) spécifique. Comme mentionné précédemment, Dyrk1A est une protéine constitutivement active ; l'autophosphorylation sur la tyrosine Y321 engendrant la formation d'une forme transitoire de cette kinase. Soundararajan *et al*. ont

d'ailleurs démontré que le résidu Y321 était un facteur clé dans la stabilisation de la conformation active de Dyrk1A.[147]
Aussi, un autre élément caractéristique des kinases Dyrks et observable chez Dyrk1A consiste en la phosphorylation exclusive des substrats peptidiques sur les résidus sérine/thréonine engagés dans un motif consensus de 5 aminoacides RPX(S/T)P.[147] Mais il a également été prouvé que cette enzyme montre une préférence pour les substrats présentant une arginine en position P-2 ou P+4 avec une proline en P+1. Ceci a notamment été observé au niveau des interactions entre Dyrk1A et la protéine associée au microtubule tau ou encore la caspase 9.[148,149]
Cependant, d'autres protéines telles que p53 ou la synucléine ne possèdent aucun de ces résidus dans ces positions précises et sont pourtant des substrats reconnus de Dyrk1A. Ceci démontre la grande flexibilité et plasticité de Dyrk1A qui va phosphoryler un large panel de protéines impliquées dans des procédés physiologiques diverses.

De plus, l'activité kinase de Dyrk1A est supposée être directement corrélée à la concentration en protéine dans le milieu. Cette caractéristique, peu répandue au sein du kinome eucaryote, est plus connu sous le nom de « *dosage effect* ». En d'autres termes, les variations même très faibles du niveau d'expression de l'activité de Dyrk1A semble affecter la fonction et l'activité de cette protéine. Ceci va altérer drastiquement le niveau de régulation des substrats et ainsi, permettre à Dyrk1A de moduler divers phénomènes physiopathologiques. Un des meilleurs exemples est le syndrome de Down, où l'on peut observer une activité jusqu'à 1,5 fois plus importante de Dyrk1A en comparaison à l'activité chez les sujets sains.

3.3 Fonctions de Dyrk1A

Dyrk1A va phosphoryler un grand nombre de substrats qui vont chacun intervenir dans diverses fonctions et dans plusieurs voies de transduction du signal (Figure 44).
Ainsi, Dyrk1A serait potentiellement impliquée dans de nombreux procédés physiopathologiques et physiologiques dont :

- La morphogenèse cérébrale : contrôle du volume et de la densité cellulaire cérébrale, mise en place des neurones, des cellules gliales et des neurites,
- La régulation de la différenciation, de la prolifération et de la croissance cellulaire ; par l'implication dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la survie cellulaire en phosphorylant notamment la caspase 9 ou la protéine p53 ou encore certains facteurs de croissance tel que VEGFR,

- Le contrôle de l'endocytose, de la fusion des vésicules synaptique et de la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique par la phosphorylation de protéines synaptiques,
- La transcription des gènes par la phosphorylation de nombreux facteurs de transcription tel que CREB, NFAT, STAT3,

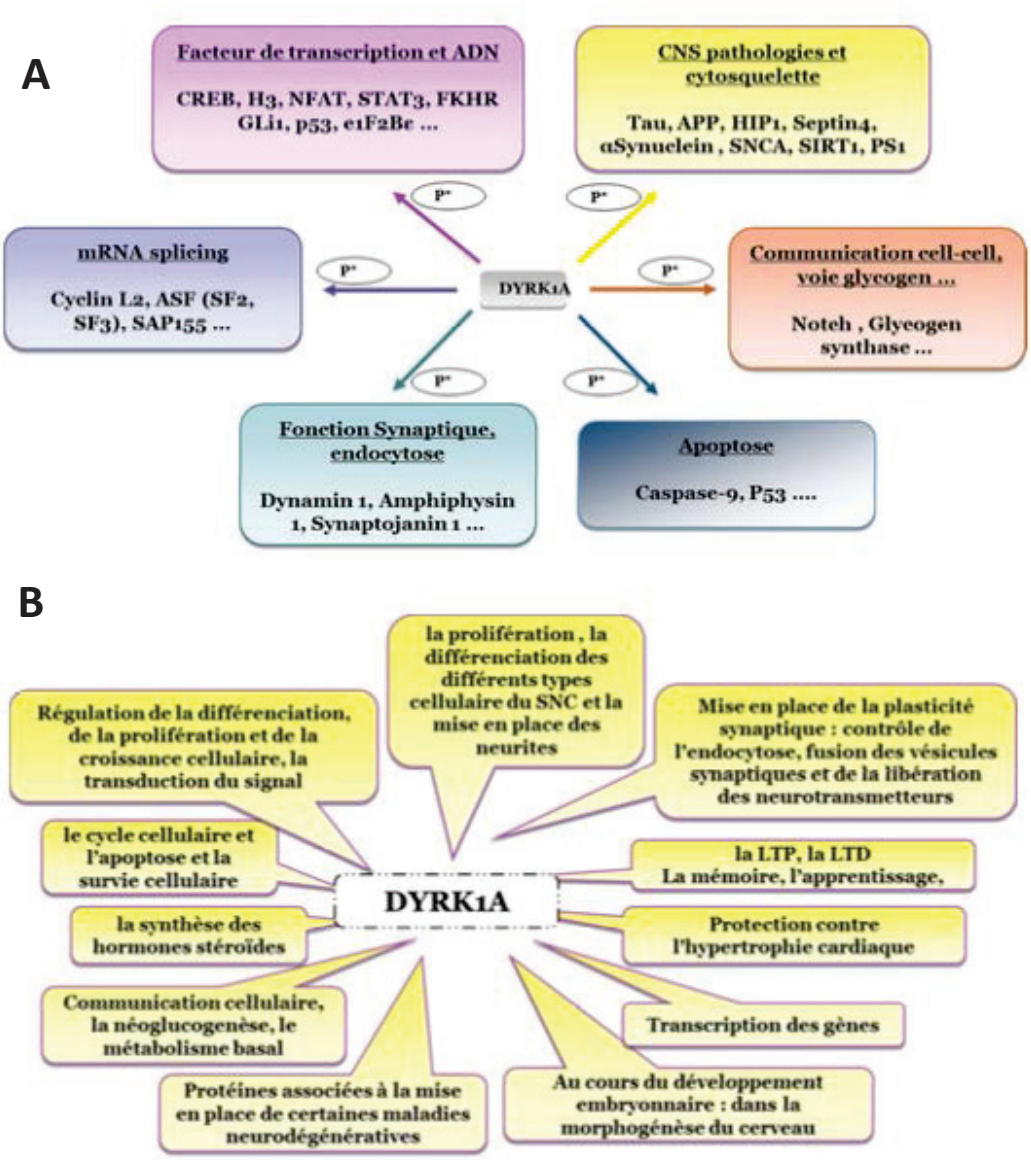


Figure 44: Implication de Dyrk1A dans (A) la phosphorylation de nombreux substrats et (B) des phénomènes physiologiques[150,141]

- Le métabolisme cellulaire (glycogenèse, néoglycogenèse), par la phosphorylation de protéines telles que Notch ou la glycogène synthase,

- L'épissage alternatif, par la phosphorylation de la cycline L2 et de le protéine ASF entre autres,
- Le développement de pathologies neurodégénératives et de cancers (cf. ci-après), par la phosphorylation des protéines Tau, APP, Erk, Akt.

De façon générale, on constate que cette protéine dispose d'un nombre très élevé de substrats et que c'était son implication dans le développement de pathologies qui a suscité un véritable intérêt au cours de ces dernières années.

4. DYRK1B

4.1 Structure et généralités

La kinase Dyrk1B, aussi connu sous le nom de Mirk kinase (pour Minibrain related kinase), fait partie intégrante de la famille des kinases DYRK. De la même façon que Dyrk1A, Dyrk1B est une sérine/thréonine kinase qui a la capacité de s'autophosphoryler sur un résidu tyrosine.

Le gène Mirk est situé à l'intérieur de la région centrale de 660kb de l'amplicon (fragment d'ADN amplifié par des processus de réplication) 19q13 retrouvé dans 12% des cellules pancréatiques primaires mais surtout dans plus de 30% des cellules matures T3 et T4 et dans les métastases originaires des ganglions lymphatiques.

La protéine Mirk dispose quant à elle d'un domaine conservé spécifique à l'activité kinase, de domaines C- et N-terminaux uniques, et d'une séquence de localisation nucléaire bipartite au niveau de cette même partie N-terminale.
Cette protéine est exprimée très faiblement dans de nombreux tissus mais est fortement surexprimée dans les tumeurs solides ainsi que dans les cellules du cerveau et des muscles squelettiques. Les cancers de type adénocarcinome ductal pancréatique (Dyrk1B est retrouvée dans plus de 90% des cellules cancéreuses pancréatiques obtenus après résection), du colon ou ovarien ont montré des valeurs de concentration en Dyrk1B très importante, bien que son mécanisme d'action soit encore très peu connu.
Il a été démontré que cette kinase favorisait la viabilité des cellules agressives cancéreuses, notamment en promouvant leur différenciation.
Elle est citée dans la littérature comme étant une protéine favorisant les mécanismes de chimiorésistances et disposant de multiples fonctions, avec une implication toute particulière lors de la différenciation des cellules musculaires et notamment au niveau des phases de transcription et de survie cellulaire.[151,6]

Même si les études récentes montrent des résultats prometteurs, il est à noter que les voies de signalisation et les mécanismes précis de Dyrk1B sont encore très peu connus à ce jour.

4.2 Activation de la kinase Dyrk1B

Le séquençage des tumeurs solides a permis d'écarter l'hypothèse suggérant une activation de Dyrk1B par des processus de mutations. Des recherches plus récentes ont alors montré que cette kinase était activée par des cascades de signalisations pro-oncogèniques associées aux GTPase K-ras ou H-ras, à partir de la kinase MKK3 notamment.[152] De la même façon, Dyrk1B peut être activée après administration de composés chimiothérapeutiques tels que le 5-fluorouracile ou le nocodazole par différentes des voies de signalisation, toujours associées à MKK3.

4.3 Fonction de la protéine Dyrk1B

Comme décrit précédemment, Dyrk1B va être impliquée dans la phosphorylation de nombreux substrats et ainsi contribuer directement ou indirectement à la modulation de plusieurs fonctions au niveau physiologique.

Une de ses fonctions principales est de maintenir les cellules de types myoblastes dans un état de quiescence, par la phosphorylation de p27 (peptide inhibiteur de CDK) et en induisant l'élimination de la cycline D (Figure 45). En effet, Dyrk1B va se lier spécifiquement à GSK3 ß, et c'est ce complexe qui va ensuite phosphoryler la cycline D, entrainant alors la destruction de cette protéine.
De la même façon, Dyrk1B phosphoryle LIN52 qui permet la stabilisation du complexe « DREAM ». Ce dernier, va permettre le maintien à l'état de dormance cellulaire G0 en « séquestrant » certains facteurs de transcription spécifiques tels que E2F4 ou E2F5, nécessaires à la mise en place du cycle cellulaire (Figure 46).

Une des autres fonctions notoires de Dyrk1B, provient de sa capacité à abaisser la concentration en dérivés réactifs de l'oxygène ROS (« Reactive Oxygen Species »). En effet, Deng, Friedman et coll.[153] ont noté une augmentation, dans les myoblastes et dans les myotubes, de la concentration en ROS après inhibition ou déplétion de la kinase Mirk.[154] Ces espèces délétères sont notamment produites dans les cellules cancéreuses car ces dernières présentent un métabolisme plus élevé. Ainsi, les stimulations par les oncogènes vont favoriser un environnement de stress oxydatif important, caractérisé donc par une forte concentration en ROS. En conséquence, Mirk va promouvoir la survie des cellules tumorales en permettant de normaliser les conditions de stress élevées, propres au développement tumoral.

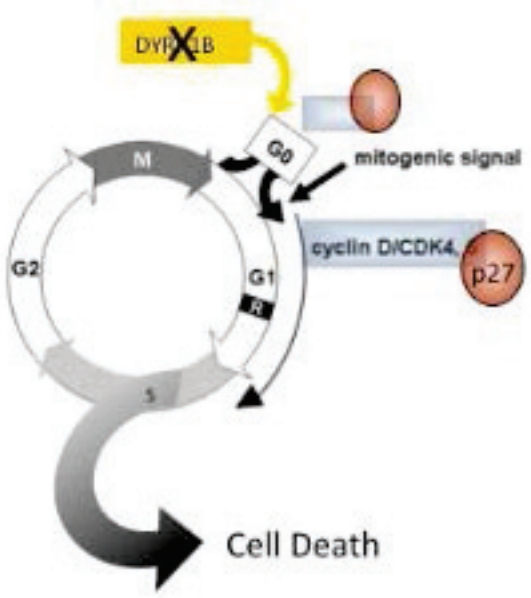


Figure 45: Maintien de l'état de quiescence G0 par action de Dyrk1B[155]

De plus, certaines études ont mis en avant la capacité de cette kinase à activer les facteurs de transcription tels que DcOH/HNF1, impliqués dans la régulation et l'expression de nombreux gènes (notamment ceux du foie), et qui vont favoriser la translocation mitochondriale du facteur pro-oncogénique p21. Ce dernier, est lui-même impliqué dans les mécanismes de survie cellulaire *via* activation de la caspase 3.

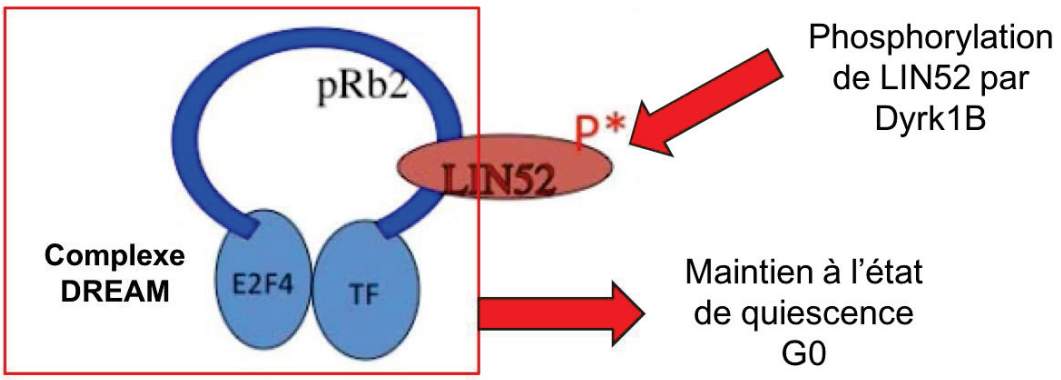


Figure 46: Maintien de l'état de quiescence G0 par action de Dyrk1B sur le complexe DREAM[155]

5. DYRK2

5.1 Généralités

Membre à part entière de la famille des DYRK, Dyrk2 est une protéine qui n'affiche pour autant pas les mêmes caractéristiques que Dyrk1A et Dyrk1B. Contrairement à ces deux protéines qui appartiennent à la classe 1 des kinases DYRK et qui vont présenter une localisation majoritairement nucléaire, Dyrk2 va être retrouvée principalement au niveau cytoplasmique. Ainsi, cette enzyme va afficher des propriétés de distribution tissulaire, une spécificité au niveau des substrats, et des fonctions bien différentes de celles décrites précédemment. Comme observé ci-après, cette protéine a été particulièrement décrite lors des dernières années, et davantage d'information (principalement sur ces fonctions) sont disponibles en comparaison de Dyrk1A/1B.[156]

5.2 Fonctions et activation

5.2.1. Activité en tant que priming kinase et régulation de la transition G1/S

Une des fonctions les plus importantes de Dyrk2 est sa faculté à agir en tant que « priming » kinase (Figure 46). Par définition, ce type d'activité correspond à une phosphorylation préalable d'une kinase qui va ensuite rendre possible la phosphorylation subséquente d'un résidu voisin par une kinase différente. Ceci résultera en une cascade réactionnelle phosphorylative menant à des effets multiples, selon les résidus impliqués.[157]
Dans le cas de Dyrk2, ce procédé a été observé sur la kinase GSK3 et va mettre en jeu les deux facteurs de transcription c-Jun et c-Myc. En effet et comme démontré par Yoshida et Nihira, c-Jun et c-Myc sont des substrats directs de Dyrk2. Plus précisément, ces 2 protéines vont être exprimées de façon transitoire lors du cycle cellulaire et leurs niveaux d'expression va rapidement diminuer lors de la transition G1/S. Ceci est à mettre en relation avec l'ubiquitination par Fbw7 de ces facteurs, qui va ensuite entrainer leur dégradation.[158]
Ainsi, il a été montré que c'est la phosphorylation au préalable *via* Dyrk2 puis *via* GSK3 qui va permettre la reconnaissance par Fbw7 et l'ubiquitination de ces facteurs de transcription. Ceci va alors initier la dégradation par le protéasome de c-Jun et de c-Myc et permettre finalement la progression du cycle cellulaire (Figure 47).[158]

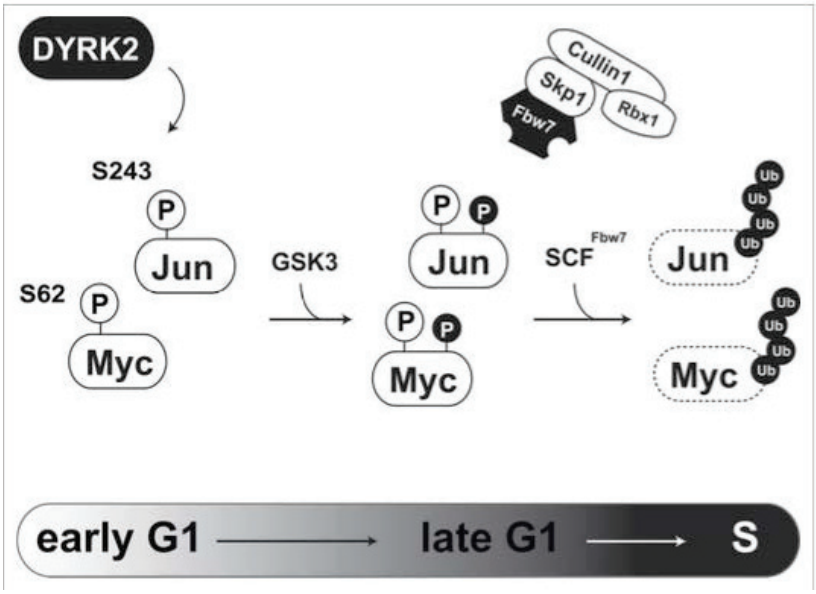


Figure 47: Activité en tant que « priming kinase » de Dyrk2[156]

Ceci renforce donc l'idée que Dyrk2 joue un rôle important dans la modulation et le contrôle du cycle cellulaire.

5.2.2. Transition G2/M et complexe EDVP E3 ligase

Certains substrats de Dyrk2 ne vont pas nécessiter de seconde phosphorylation, préalable à leurs dégradations. Ainsi, la « télomèrase reverse transcriptase » (TERT) ainsi que la katanine p-60 sont ubiquitinées par le complexe EDD-DB1-VprBP (EDVP) E3 ligase, phénomène qui est déclenché par la phosphorylation *via* Dyrk2.[159] La protéine TERT est une sous-unité catalytique de la télomérase et c'est elle qui va catalyser l'élongation des télomères, notamment au sein des cellules cancéreuses.[160] La phosphorylation sur la Ser457 de TERT par Dyrk2 va alors entrainer sa dégradation par le protéasome en phase G2/M du cycle cellulaire. Une forte activité de la télomérase est généralement perçue comme un indicateur d'une cellule à l'activité métabolique trop importante liée à des caractéristiques tumorales : en catalysant la répression de TERT, Dyrk2 démontre dans ce cas une autre fonction en tant qu'agent oncosuppresseur.
De la même façon, la katanine p-60 est une enzyme qui va intervenir lors de la formation du fuseau mitotique. Dyrk2 phosphoryle la katanine p-60 sur 3 sites spécifiques (Ser42, Ser109 et Thr133) et entraine également sa dégradation par le protéasome. Des études ont montré que l'inhibition de Dyrk2 résultait en une expression aberrante de katanine p-60 et finalement en une impossibilité des cellules à « finaliser » le cycle cellulaire. Lors de cette même expérimentation, des cellules polyploïdes (>4N) ont été détectées.[161] L'activité de Dyrk2 va donc également permettre le bon déroulement du cycle cellulaire, par un contrôle direct

de la phase G2/M du cycle mitotique (Figure 48).

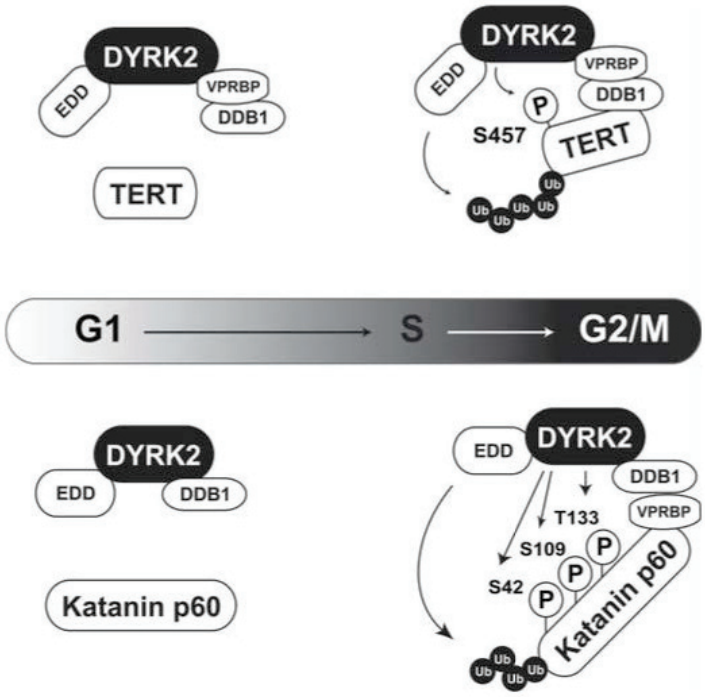


Figure 48: Activité de la kinase Dyrk2 lors de la phase G2/M du cycle cellulaire[149]

5.2.3. Inhibition du phénomène de métastatisation

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) désigne le passage d'un groupe de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse. Ce procédé, observé notamment lors du développement d'un cancer du sein, a aussi été démontré lors du développement de cellules métastasiques. Le facteur de transcription de la superfamille des protéines Snail est le principal marqueur de ce phénomène délétère. Ce dernier, va inhiber l'expression de la E-cadhérine qui permet le maintien d'un phénotype cellulaire de type épithélial.[162] Ainsi, et de la même façon que pour c-Jun et c-Myc, l'activité de Dyrk2 en tant que « priming kinase » va permettre la phosphorylation par GSK3 et la dégradation subséquente de la protéine Snail. Finalement, Dyrk2 va permettre de réguler négativement l'EMT et donc de bloquer la prolifération cellulaire des métastases dans différents types de cancers tel que l'adénocarcinome prostatique (Figure 49).[163]

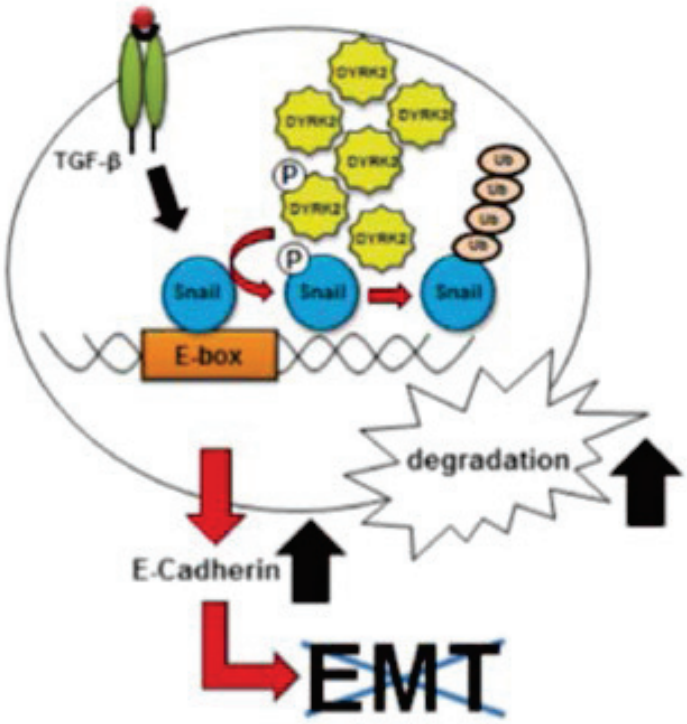


Figure 49: Inhibition du phénomène de métastatisation par Dyrk2[162]

5.2.4. Inducteur de l'apoptose

Le matériel génétique des cellules endothéliales est continuellement endommagé par les agents extérieurs comme par exemple les ultra-violets, les ROS ou encore par des dérivés génotoxiques. Les phénomènes de réparation de l'ADN sont alors activés et vont permettre un rétablissement rapide des cellules touchées. En revanche, si les dommages sont trop importants, la machinerie cellulaire va déclencher l'apoptose afin d'éliminer ces cellules. Ce phénomène, est enclenché principalement par le facteur de transcription p-53 qui agit en tant que régulateur de la machinerie cellulaire.[164] En condition normale, p-53 est dégradé *via* ubiquitination par la « murine double minute 2 » (MDM2). Mais, dans des conditions de dommages génomiques, p-53 « échappe » à cette dégradation grâce notamment à la phosphorylation sur la Ser42 par Dyrk2 et HIPK2.[165,166] Ceci va alors entrainer l'apoptose des cellules endommagées. La phosphorylation de p-53 va donc sélectivement activer les gènes inducteurs de l'apoptose (p53AIP1, amphiréguline), ce qui indique que ce procédé de phosphorylation va altérer la sélectivité des promoteurs au niveau des gènes cibles et non sa stabilité.[167,168]
Ces résultats démontrent que l'induction de l'apoptose et la réparation de l'ADN sont d'autres fonctions de la kinase Dyrk2, qui vont être déclenchées en réponse aux stimuli génotoxiques (Figure 50).

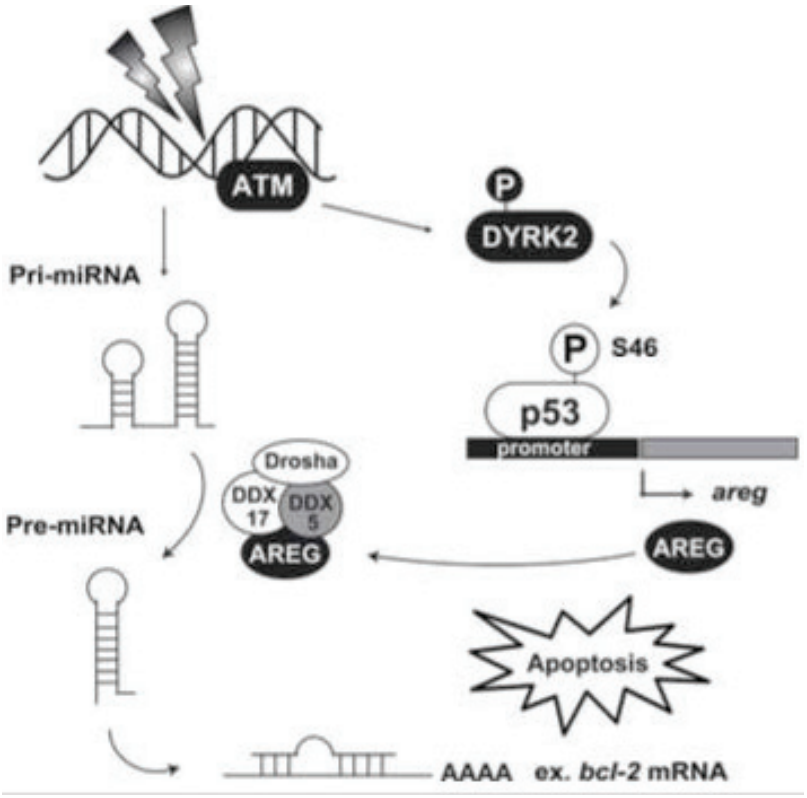


Figure 50: Activité pro-apoptotique de la kinase Dyrk2[149]

6. PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX DEREGLEMENTS DE L'EXPRESSION DES KINASES DYRK

6.1 Neuropathologies et Dyrk1A : Alzheimer, Syndrome de Down et pathologies associées

De par sa localisation sur le chromosome 21, trois copies du gène *Dyrk1A* sont présents chez les sujets atteints par le syndrome de Down (SD) également connu sous le nom de trisomie 21. Cette copie additionnelle de Dyrk1A entraine donc une surexpression de cette protéine responsable d'une augmentation de son activité catalytique. Ceci découle sur des aberrations lors de la morphogenèse neuronale et aboutit en conséquence à un développement anormal du cerveau.
Certaines études ont d'ailleurs montré que Dyrk1A était exprimée de façon importante dans les tissus du cœur et du cerveau lors des phases primaires du développement postnatal et que son niveau d'expression diminuait graduellement après la naissance. Ces mêmes recherches ont aussi démontré que le taille et le poids du cerveau chez des enfants touchés par syndrome de Down étaient quasiment similaire à celui d'enfants sains : ce n'est que dans les phases plus tardives de l'enfance que ces paramètres vont grandement diminuer. De plus, il a

été observé chez les fœtus trisomiques une absence quasi-totale de cellules prolifératrices au niveau de la région de l'hippocampe et que la surexpression de Dyrk1A entrainait une différenciation neuronales prématurées des cellules progénitrices qui résulte en une déplétion des neurones matures.
Toutes ces observations soulignent une corrélation majeure entre les phénotypes associés au SD et surexpression de Dyrk1A.

Comme expliqué précédemment, Dyrk1A dispose aussi d'une fonction de « priming kinase » et va notamment phosphoryler GSK3 qui est elle-même impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau associée aux microtubules tau. Il n'est donc pas étonnant que les sujets présentant une trisomie 21 présentent des signes précoces ainsi qu'une prédisposition à la maladie d'Alzheimer. De plus, le gène APP précurseur de fibres ß-amyloïdes est, de la même manière que Dyrk1A, également localisé sur le chromosome 21. Il va donc aussi être surexprimé chez les sujets trisomiques. L'APP étant un substrat de Dyrk1A, la phosphorylation de cette protéine par Dyrk1A va entrainer la formation d'agrégats peptidiques neurotoxiques $Aß_{40}$ et $Aß_{42}$ qui vont eux-mêmes permettre la formation de plaques amyloïdes, caractéristiques des sujets souffrant de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, on a pu observer dans les tissus des neuroblastomes que l'augmentation en fibre ß-amyloïdes était responsable d'une augmentation de la transcription de l'ARNm de *Dyrk1A*. Ceci va donc favoriser la phosphorylation de la protéine tau et montrer l'impact d'une surexpression de Dyrk1A sur la mise en place d'un phénotype pro-Alzheimer.

6.2 Dyrk1A et implication dans les cancers

De nombreuses études sur différentes lignées cellulaires cancéreuses ont été menées au cours de ces dernières années et ont démontré l'implication de Dyrk1A dans les phénomènes pro-oncogéniques. Bien que les mécanismes d'action précis de cette kinase restent encore très peu connus, il existe un lien évident entre l'expression de Dyrk1A et la carcinogenèse.

Abekhoukh *et al.*[169] ont par exemple montré que la surexpression de Dyrk1A était corrélée à une augmentation de l'expression des protéines MEK, Erk et Akt. Ces protéines, qui sont toutes impliquées dans les phénomènes de divisions et de proliférations cellulaires, sont notamment présentes en concentration importante lors de la genèse des cellules tumorales.

Pozo *et al.*[170] ont de leur côté étudié le développement de lignées cancéreuses de type glioblastome-EGFR dépendantes et, plus particulièrement, l'importance de Dyrk1A dans le développement de ces dernières. Il a été observé que la suppression de l'activité de Dyrk1A par un inhibiteur spécifique entrainait une perte de la capacité à proliférer des cellules tumorale et ce, même après retrait de

l'inhibiteur. Dyrk1A aurait donc un effet irréversible sur la stabilité du facteur de croissance EGFR *via* un mécanisme complexe mettant en jeu la dégradation par les lysosomes. Même si les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* ont montré quelques différences, il est clair que cette kinase intervient directement dans l'établissement ainsi que dans la vascularisation des cellules gliales.[170]
Ces observations ont été confirmées par d'autres études sur le facteur oncogénique Notch1, également substrat de la protéine kinase Dyrk1A, et qui a surtout été montré comme élément-clé dans le développement des gliomes et d'autres tumeurs malignes.[171]
Plus spécifiquement, la phosphorylation de ce facteur va entrainer une baisse de son activité dans les neuroblastomes et ainsi altérer les phénomènes d'angiogenèse, ou encore l'expression de la caspase 3 dans les gliomes.[172]

Dyrk1A est également une kinase impliquée dans la cascade phosphorylative de la protéine NFAT1 : elle va donc affecter aussi bien sa localisation cellulaire que son activité transcriptionnelle.[173] Le facteur NFAT1 favorise l'angiogenèse des cellules endothéliales, et a, de plus, été démontré comme pouvant impacter la migration ainsi que l'invasion des cellules tumorales dans le développement de cancers du sein.[174]

De la même façon, Dyrk1A augmente l'activité du facteur de transcription Gli1 (« glioma-associated oncogene 1 »), impliqué dans la voie de signalisation du « Hedgehog ».[175] Cette dernière est actuellement très étudiée puisqu'elle a été prouvée comme étant centrale dans les procédés d'embryogenèse, la stabilité des cellules embryonnaires et la tumorogénèse.[176]

STAT3 (transducteur et activateur du signal de transcription 3) est un autre facteur de transcription, phosphorylé par Dyrk1A, et qui impacte le développement d'un grand nombre de tumeur en régulant entre autres la prolifération cellulaire, la progression du cycle mitotique, l'apoptose ou encore l'angiogenèse.[177] STAT3 est surexprimé dans différents cancers et représente actuellement une cible intéressante dans les stratégies anticancéreuses.[178]

De façon intéressante, Dyrk1A va aussi permettre de bloquer l'apoptose dans certaines lignées tumorales multi-résistantes, en phosphorylant spécifiquement la caspase-9 sur la Thr125.[149] L'inhibition de Dyrk1A représente dans ce cas précis une alternative prometteuse en vue de lutter contre les cancers résistants aux composés chimiothérapeutiques inducteurs de l'apoptose.

6.3 Dyrk1B et cancers

Comme décrit précédemment dans les fonctions de cette kinase, Dyrk1B/Mirk va être principalement impliquée dans les mécanismes de résistance des cellules

tumorales issues de cancers pancréatiques, ovariens ou de sarcomes.[155,179] Nous avons également précisé que cette protéine était localisée au niveau de l'amplicon 19q13, qui est notamment retrouvé dans les cancers pancréatiques, ovariens ou encore dans différents types de lymphomes.[180,155]
La surexpression de Dyrk1B va promouvoir la survie des cellules tumorales en augmentant la production de dérivés antioxydants, en favorisant le passage à l'état de quiescence ou encore en participant à la réparation de l'ADN
En effet, plusieurs études ont démontré que l'inhibition pharmacologique de cette protéine était corrélée à une augmentation subséquente de la concentration en dérivé ROS, de l'apoptose, des dommages génomiques et une sortie de la phase de quiescence G0.[153] Des résultats similaires furent observés après déplétion du gène Mirk.[152]

7. INHIBITEURS DE KINASES DYRK

Au cours des dernières années, un grand nombre d'inhibiteurs de la famille des kinases DYRK, notamment de Dyrk1A, a été développé. Nous nous attacherons ici à décrire dans un premier temps les mécanismes d'action potentiels de ces inhibiteurs, avant de classer les composés les plus actifs en fonction de leur structure. Certains de ces inhibiteurs seront décrits de façon plus précise, de par leur importance et les recherches qu'ils ont stimulées dans la littérature.

7.1 Interaction des inhibiteurs de kinases DYRK avec leurs cibles thérapeutiques

Etant donné la grande variété structurale des composés inhibiteurs des kinases DYRK, il s'avère difficile de présenter des études de relations structures-activités clairement définies et précises. Ainsi, et pour solutionner cette limite, des études de docking moléculaires et de co-cristallisation ont été réalisées en présence d'inhibiteurs ATP-compétitifs de Dyrk1A décrits. Ceci a notamment permis de mettre en avant l'importance de certains amino-acides dans l'interaction avec les inhibiteurs.[181] Ainsi, il a été démontré que la plupart des inhibiteurs disposaient d'un mécanisme ATP-compétitif et interagissaient avec Dyrk1A en se fixant à l'intérieur même du site catalytique de la kinase. Aussi, certains inhibiteurs peuvent se fixer au niveau d'autres régions de la protéine Dyrk1A, et donc agir en tant qu'inhibiteur indirect. L'autre mode d'inhibition possible consiste alors en l'interaction directe ou indirecte avec la boucle d'activation de Dyrk1A afin de bloquer l'étape d'autophosphorylation et l'activité de la kinase.[181]

La structure cristallographique de Dyrk1A a été récemment déterminée en complexant la kinase et le composé indazole D15 (*Figure 50*). Le dérivé D15 va interagir avec la protéine en se fixant au niveau de site de l'ATP et former des

liaisons hydrogène avec les résidus Asp307, Glu239, Asn292, et Leu241. Il pourrait aussi interagir avec les résidus Val306 et Val173, dû à leur relative proximité (*Figure 50*).[181]

De la même façon, l'harmine a également été co-cristallisé avec Dyrk1A. Ceci a permis de confirmer le mode d'inhibition ATP-compétitif de ce composé avec cette kinase. Cette molécule au motif carabazole va former des liaisons hydrogènes avec Leu142 et Lys188 et pourrait aussi interagir avec les résidus Leu294, Val222, Val306, Phe238, Glu203, Glu239 et Asp307 (*Figure 50*).[182]

La troisième molécule à avoir été co-cristallisée avec Dyrk1A est le dérivé benzothiazole INDY, qui va former des liaisons hydrogènes avec Lys188 et Leu241 au niveau du site de fixation à l'ATP. Ce dernier pourrait aussi interagir avec Ala186 et Val173 (Figure 51).[183]

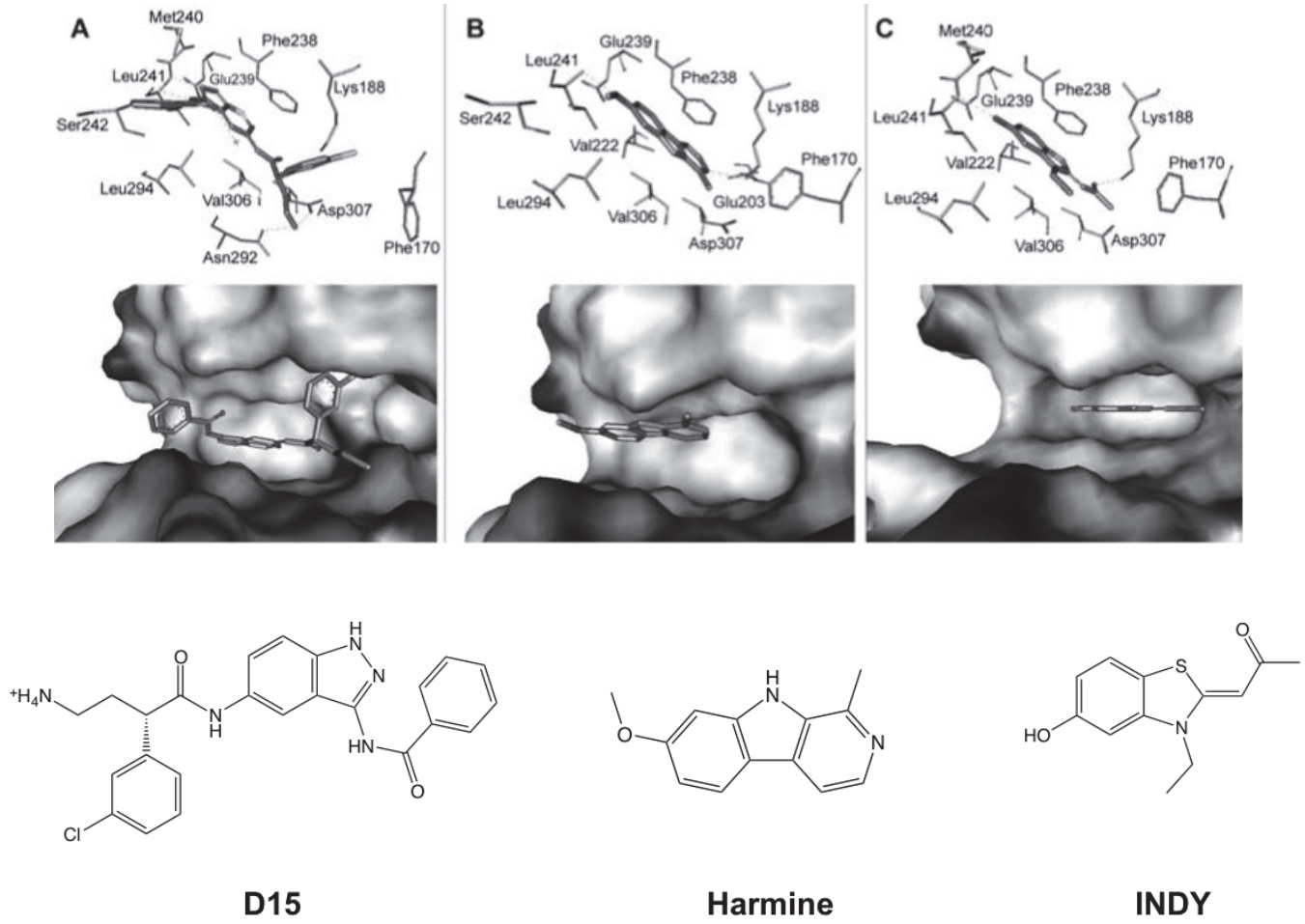


Figure 51: Co-cristallisation et interactions entre (A) le composé D15, (B) l'harmine et (C) le composé INDY et la protéine Dyrk1A[183,184]

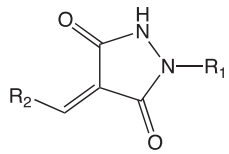
Le mode d'interaction d'autres inhibiteurs avec Dyrk1A reste encore très peu connu à l'heure actuelle. On peut supposer qu'ils agissent dans la majorité des cas de manière ATP-compétitive. Cependant, il existe certaines exceptions comme par exemple l'Epigallocatechin-3-gallate ou EGCG, un des inhibiteurs les plus actifs sur Dyrk1A avec une CI_{50} = 40 nM (Tableau 16). Ce dernier dispose d'un mécanisme d'action non ATP-compétitif, encore inconnu à ce jour.[185]

7.2 Inhibiteurs monocycliques

Le premier groupe d'inhibiteur peut être caractérisé par une structure n'affichant qu'un seul noyau hétérocyclique (*Tableau 13*). Les composés, disposant d'un noyau pyrazolidine-3,5-diones, ont été découvert par Kim *et al.* dans une étude sur les déficits neurologiques.[186] Il a été prouvé que les composés de cette série pouvaient aussi bien inhiber le processus d'autophosphorylation que la protéine mature avec une CI_{50} comprises entre 0,6 (autophosphorylation) et 1,3 µM (sur protéine mature), respectivement.[186]

L'autre classe d'inhibiteurs est apparenté aux imidazolones, qui sont identifiés comme étant des dérivés de l'alcaloïde leucettamine B. Ces composés ont montré des activités très intéressantes sur protéines isolées, de l'ordre de la dizaine de nanomolaire, et sont l'objet de nombreux brevets et d'études poussées.[187]

Un autre exemple d'inhibiteurs monocycliques sont les dérivés pyridines, initialement découverts en tant qu'agents anticancéreux inhibiteurs de la protéine Akt.[188] Ce type de composés ne démontre en revanche qu'une très faible spécificité et interagit avec de nombreuses autres protéines telle que Erk ou PIM.

Structure-type	**CI_{50} la plus faible sur protéine mature (µM)**	**CI_{50} inhibition autophosphorylation (µM)**	**Mode d'inhibition**
pyrazolidine-3,5-dione  R_1, R_2, non connus (structure brevetée)	1,3	0,6	ATP-compétitif

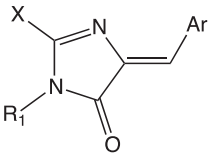
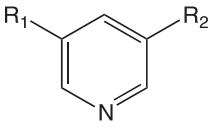
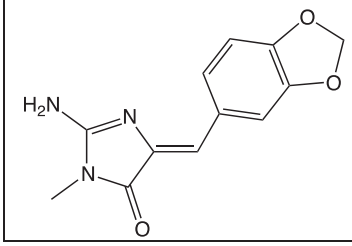
Imidazolone  Avec Ar = benzo[d][1,3]dioxole R_1= Me X= Me-COHN	0,07	n.d.	Inconnu
Pyridine  Avec R_1= Phénol R_2= 3-hydroxy-1H-indole	0,01	n.d.	Inconnu
Leucettamine B 	0,90	n.d.	Inconnu

Tableau 13: Inhibiteurs monocycliques

7.3 Inhibiteurs bicycliques

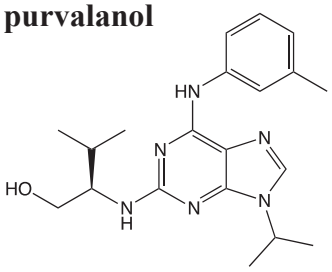
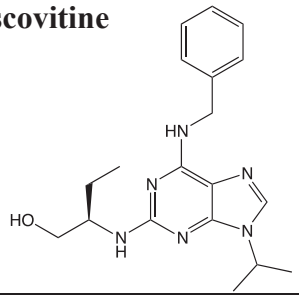
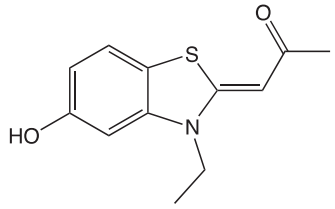
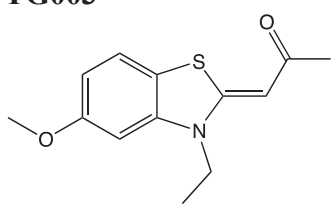
Le purvalanol et la roscovitine sont deux dérivés disposant d'une structure dérivée d'une base purique, et qui ont été découverts grâce à leur effet inhibiteur des kinases dépendantes de cyclines CDKs (*Tableau 14*). Bien que plus spécifiques de ces dernières (0,3-3,1 μM), elles affichent des valeurs d'inhibition sur Dyrk1A de l'ordre du micromolaire. Il est à noter que la (*R*)-roscovitine (seliciclib) est actuellement en cours d'études cliniques en tant qu'agent anticancéreux pour les tumeurs solides et non-solides. L'équipe de Laurent Meijer a notamment développé plusieurs analogues de ce composé actif.[187]

Les dérivés de type benzothiazole comme l'INDY (INhibiteur de DYrk1A) et le TG003 sont d'excellents inhibiteurs de Dyrk1A (*Tableau 14*). Plus particulièrement, l'INDY est à ce jour un des inhibiteurs les plus efficaces de Dyrk1A mais exerce aussi une forte action sur les autres composantes de la famille des Dyrks kinases.[183] En revanche et contrairement à l'harmine, l'INDY n'interagit pas avec les monoamines oxydases (MOA). Aussi, l'activité

potentielle antitumorale et les bénéfices au niveau neuronal de ces molécules n'ont encore pas été démontrés.

De la même façon, le tetrabromobenzimidazoles (TBB) inhibe fortement Dyrk1A mais présente une très faible sélectivité (*Tableau 14*).[34] Il a été découvert initialement pour un effet inhibiteur sur la caséine kinase CK2.[189]

D'autres composés disposant d'une structure pyrimidinyl-azaindole, plus communément appelé mériolines, sont des hybrides des alcaloïdes marins méridianines et variolines (*Tableau 14*). Ils ont démontré une activité anti-Dyrk1A marquée, et un effet pro-apoptotique sur plusieurs lignées cellulaires.

Structure	CI_{50} sur protéine mature (µM)	CI_{50} inhibition autophosphorylation (µM)	Mode d'inhibition
purvalanol 	0,3	n.d.	Inconnu
roscovitine 	3,1	n.d.	ATP-compétitif
INDY 	0,2	n.d.	ATP-compétitif
TG003 	0,9	n.d.	Inconnu

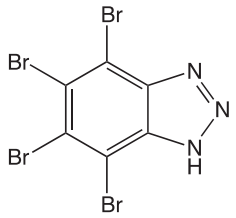
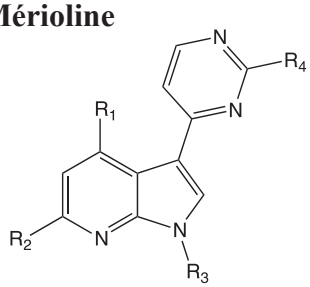
TBB 	4,4	n.d.	Inconnu (CK2 : ATP-compétitif)
Mérioline  R_1, R_2, R_3 = H, OH, OMe, OEt et R_4 = NH_2	0,08	n.d.	Inconnu (CK2 : ATP-compétitif)

Tableau 14: Inhibiteurs bicycliques

7.4 Inhibiteurs tricycliques et tétracycliques

Les dérivés de type ß-carboline représentent une classe importante d'inhibiteurs de la protéine kinase Dyrk1A, le composé le plus célèbre étant l'harmine (*Tableau 15*). Connu depuis des années par les populations aborigènes de l'Amazonie, cet alcaloïde est un composé naturel extrait à partir d'une liane, souvent consommée sous forme de breuvage appelée « ayahuasca ». L'harmine a été identifiée comme étant un antagoniste de la sérotonine et un inhibiteur des MAO impliquées directement dans la régulation de l'humeur.
Sa faculté à inhiber les protéines de la famille des CDKs, a donc encouragé les chercheurs à étudier d'avantage l'activité de ce composé sur tout un panel de protéines kinases. C'est ainsi que la découverte de l'harmine en tant qu'inhibiteur spécifique de la famille des Dyrks a été mis en avant. Cette molécule est en effet très active contre cette famille de kinases puisqu'elle interagit avec Dyrk1A à des concentrations inhibitrices de l'ordre de la dizaine de nanomolaire et avec Dyrk1B/Dyrk2 à des valeurs de concentration environ 10 fois plus importante.
Mais, ce composé est également actif sur d'autres kinases, notamment celle de la famille des PIM ou encore de CK1[190] ; d'où la nécessité de synthétiser des dérivés plus spécifiques.
La découverte d'analogues de cette molécule tels que l'harmalol (fonction hydroxyle OH en lieu et place du méthoxy OMe) et les études associées ont démontré que ces molécules présentaient des valeurs d'activité beaucoup plus faible que celle l'harmine et d'une spécificité moindre en comparaison.[191]

La quinazolinone IQA est une molécule tétracyclique qui a été développée afin de cibler spécifiquement la kinase CK2 dans les stratégies chimiothérapeutiques. Mais, il a été prouvé que ce composé était également actif sur Dyrk1A, à des valeurs de concentration environ 20 plus importantes.

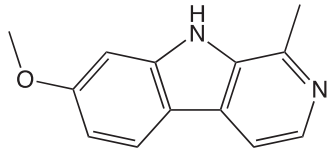
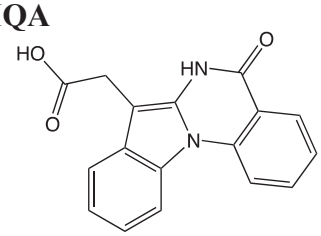
Structure	CI_{50} sur protéine mature (µM)	CI_{50} inhibition autophosphorylation (µM)	Mode d'inhibition
harmine 	0,08	5	ATP-compétitif
IQA 	8	/	Inconnu (CK2 : ATP-compétitif)

Tableau 15: Inhibiteurs tricycliques et tétracycliques

7.5 Inhibiteurs polyphénoliques

La dernière classe d'inhibiteurs des kinases DYRK va regrouper des composés présentant un motif multi-cycliques polyphénoliques (*Tableau 16*). Ces dérivés sont notamment connus pour être de puissants antioxydants, antiinflammatoires et anticancéreux.[184]

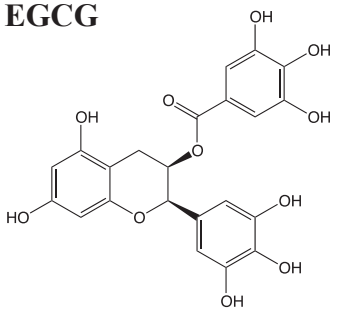
Retrouvé majoritairement dans le thé vert, l'épigallocatéchin-3-gallate ou EGCG est un très bon exemple de polyphénol possédant de multiples propriétés bénéfiques. Par exemple, il a été démontré que ce dérivé disposait d'une activité antioxydante, favorisait la diminution des lipoprotéines à faible densité LDL, ou encore impactait la prolifération des cellules neuronales progénitrices lors de la neurogénèse de l'hippocampe chez l'adulte.[192] Ces effets variés ont contribué à stimuler de nombreuses études sur les relations entre l'EGCG et les maladies cardiovasculaires, le diabète, les cancers ou les maladies neurodégénératives.[193]
Elles ont notamment démontré que l'EGCG disposait de la faculté à traverser efficacement la barrière hémato-encéphalique (BHE) et atteindre le parenchyme cérébral.[194] Ceci est une caractéristique intéressante dans le développement de composés actifs destinés à contrer les troubles cognitifs ou les syndromes

neurodégénératifs.

L'EGCG est aussi connu pour être un inhibiteur très spécifique et sélectif de la kinase Dyrk1A (IC_{50}= 40 nM).[195] Des recherches menées sur des chiots transgéniques surexprimant cette kinase ont notamment révélé que l'administration de l'EGCG avait une action normalisatrice sur la morphologie cérébrale. D'autres études menées cette fois-ci sur des souris adultes présentant un phénotype équivalent à la trisomie 21, ont démontré une amélioration notable de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe et un recouvrement important de leurs fonctions cognitives.[196]
Ainsi, on suppose que l'EGCG aurait un impact non négligeable sur les pathologies induites par une surexpression de Dyrk1A, et qu'elle pourrait donc être un composé potentiellement intéressant dans la lutte contre le syndrome de Down.[193]

L'apigénine est un flavonoïde retrouvé en forte concentration dans de multiples herbes et végétaux dont le thym, le persil et la menthe. Son activité inhibitrice sur Dyrk1A a été vastement décrite au cours de ces dernières années, de même que son activité anti-CK2.[184]

Extraite à partir de la rhubarbe ou encore de la bourdaine, l'émodine a de la même façon été étudiée pour son action sur Dyrk1A. Ce composé inhibe cette protéine mais également CK2 avec des valeurs d'activités comparables et affiche une sélectivité intéressante pour ces deux enzymes.[197]

Structure	CI_{50} sur protéine mature (µM)	CI_{50} inhibition autophosphorylation (µM)	Mode d'inhibition
EGCG 	0,04	/	Non ATP-compétitif

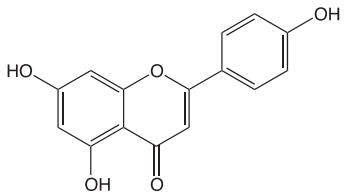
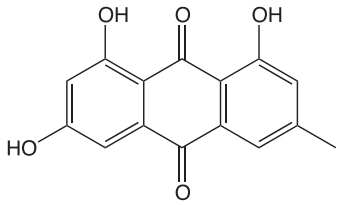
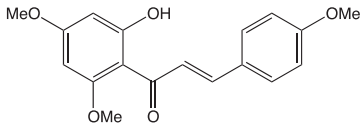
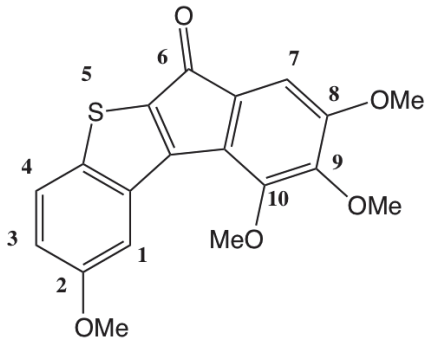
apigénine 	< 10	5	Inconnu
émodine 	0,7	/	Inconnu
flavokavaine 	< 10	/	Inconnu

Tableau 16: Inhibiteurs polyphénoliques

CHAPITRE 4 : LES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES EN TANT QU'INHIBITEURS DES KINASES DYRK

Les travaux entrepris par notre groupe de recherche, ont permis de sélectionner les dérivés indénobenzo[*b*]thiophènes en tant que molécules inhibitrices des protéines kinases et donc disposant d'une potentielle activité thérapeutique. Notamment, les études menées par DO Cong Viet dans le cadre de sa thèse, ont démontré que ce type de dérivés possédait une action inhibitrice sur la protéine kinase CK2, actuellement très étudiée.
CK2 et les protéines DYRK étant phylogénétiquement très proches, il nous a donc semblé logique d'évaluer ces molécules sur DYRK, en parallèle à CK2.



CV210

2,8,9,10-tetramethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Figure 52: Structure du composé CV210

C'est à partir de ce postulat de départ et dans la continuité des travaux réalisés par notre équipe, que nous avons synthétisé toute une librairie de composés analogues de la molécule CV210 qui a démontré une forte activité et spécificité vis-à-vis des kinases DYRK, puis évalué leurs cytotoxicités sur plusieurs lignées cellulaires (Figure 52). Finalement, nous avons développé des nanoparticules encapsulant les composés les plus prometteurs.

1. TRAVAUX PREALABLES ET GENESE DU PROJET

1.1 Inhibiteurs de la kinase CK2 et famille de protéines DYRK

L'enzyme CK2, dénommée « caséine kinase 2 », est une sérine-thréonine kinase ubiquitaire qui a été découverte il y a déjà plusieurs décennies en tant que membre très important de la famille des protéines kinases.[198] Etant très largement pléiotrope, elle est impliquée dans la formation d'une très grande proportion du

phosphoprotéome, phosphorylant plus de 200 substrats. CK2 est une protéine constitutivement active : elle ne va donc nécessiter aucun stimulus particulier afin de phosphoryler ses différents substrats. Son implication dans le développement de nombreuses pathologies telles que la sclérose multiple, l'hypertrophie cardiaque ou encore la fibrose cystique, a contribué à développer l'intérêt autour de cette protéine. Mais, c'est surtout son rôle et sa surexpression dans le développement de cellules cancéreuses qui a stimulé la très grande majorité des recherches sur CK2. Un grand nombre d'inhibiteurs de cette protéine a d'ailleurs été synthétisé, pouvant agir selon un mécanisme d'action différent, en fonction du site de fixation de ces derniers. Cependant, il est bien connu que la synthèse d'inhibiteurs spécifiques de protéines kinases est une étape délicate, et notamment pour CK2 comme expliqué entre autres par Cozza et coll., CK2 étant structurellement très proches d'autres kinases (Figure 53).[199]

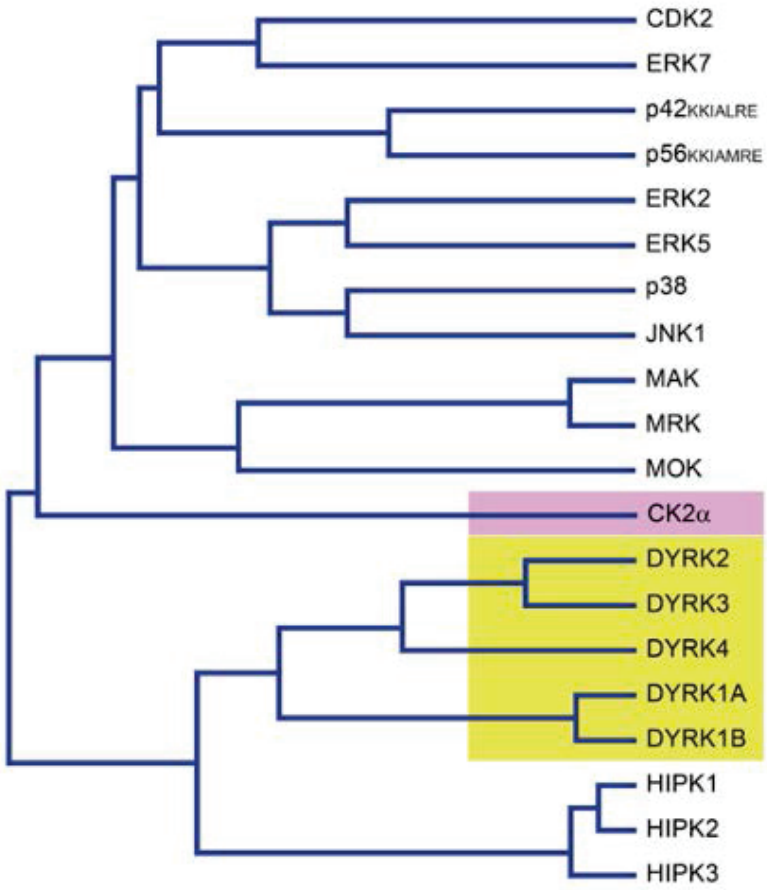
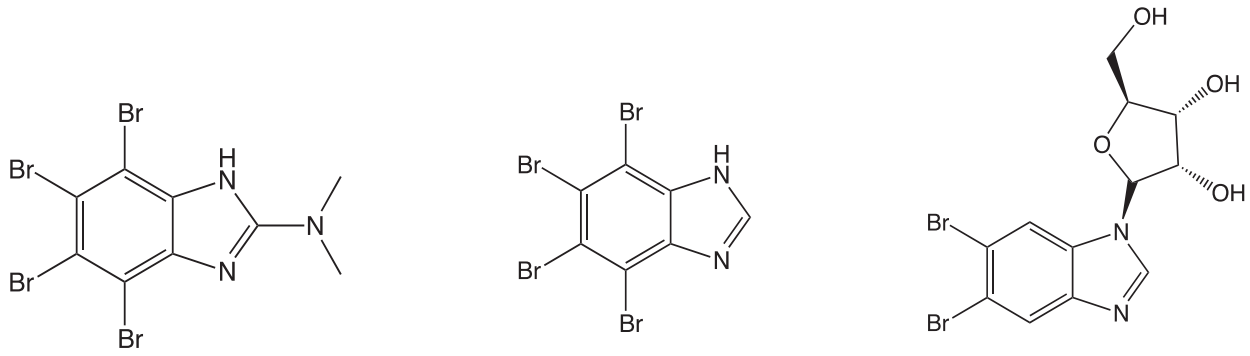


Figure 53: Arbre phylogénétique du groupe CMGC des protéines kinase[199]

En effet, et si on analyse comparativement les inhibitions de Dyrk1A et de CK2 par plusieurs composés, on constate alors une inhibition généralement conjointe de ces deux kinases (Figure 54). De ce fait, des inhibiteurs très efficaces sur CK2 tels que le DRB, le TBB, le TBBz (4,5,6,7-tetrabromo-*1H*-benzimidazole) ou encore le DMAT (2-dimethylamino- 4,5,6,7-tetrabromo-*1H*-benzimidazole), démontrent des activités très fortes sur les kinases DYRK.[189]



DMAT **TBBz** **DRB**

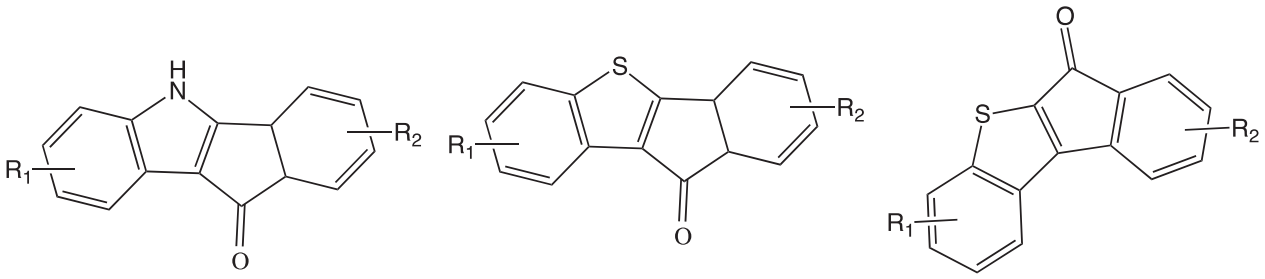
	CK2	DYRK1A
Staurosporine	19.5	0.012
Emodin	0.9–2.0	4.2
Quercetin	19 % at 20 µM	21 % at 10 µM
Apigenin	30	15 % at 10 µM
NBC	0.37	15
dNBC	32	0.6
DRB	6–10	19 % at 10 µM
IQA	0.39	50 % at 10 µM
DMAT	0.15	0.12
DMAT	7 % at 10 µM	5 % at 10 µM
TBB	0.15–1.6	1–4.4
TBB	6 % at 10 µM	4 % at 10 µM
TBBz	10 % at 10 µM	3 % at 10 µM
CX-4945	0.001–0.003	5 % at 0.5 µM for DYRK2
Harmine	>10	0.034
Leucettine L41	0.32	0.012

Figure 54: Structure du DMAT, TBBz, du DRB, et comparatif d'inhibition sur CK2 et Dyrk1A par différents composés.[189]

1.2 Stratégie de développement et étude du composé « hit » CV210

Comme décrit en préambule de ce chapitre, les recherches sur CK2 ont stimulé le développement de nombreux composés inhibiteurs de ces kinases. Ainsi, Hundsdörfer *et al.* ont prouvé que les composés indéno[1,2-*b*]indoles étaient des inhibiteurs ATP-compétitifs de CK2. Ils ont également démontré par des méthodes *in silico* qu'ils disposaient potentiellement de la faculté à franchir efficacement la membrane cellulaire.[199,200,201]
Le développement de composés inhibiteurs de la protéine kinase CK2 étant une thématique importante de notre équipe de recherche, notre expertise dans la synthèse de composé soufrés tricycliques et les différentes études de Relations Structures-Activités nous ont donc poussé à concevoir des structures dites indénobenzo[*b*]thiophènes comme inhibiteurs potentiels des protéines CK2 et Dyrk (Figure 55).

Ces tétracycles, structurellement très proches des indéno[1,2-*b*]indoles, ont été testé sur CK2 mais également sur les kinases DYRK. C'est sur ces dernières qu'elles ont montré la plus forte inhibition avec des valeurs de CI_{50} qui ont atteint pour la molécule CV210, 320 et 150 nM sur Dyrk1A et Dyrk1B respectivement (*Tableau 17*).



Indéno[1,2-*b*]indoles | **Indénobenzo[*b*]thiophènes (régioisomères indénoindoles)** | **Indénobenzo[*b*]thiophènes**

Figure 55: Structure des composés indéno[1,2-b]indoles, indénobenzo[*b*]thiophènes

De plus, l'évaluation des propriétés inhibitrices du composé CV210 nous montre, qu'en comparaison à l'harmine et à l'INDY (inhibiteurs de référence des protéines kinases DYRK), cette molécule possède des valeurs d'inhibition sur Dyrk1A et Dyrk1B similaires. Aussi, sa faible activité sur Dyrk2 est une première preuve de sélectivité de ce composé. En effet, et comme décrit précédemment, Dyrk2 est une protéine essentielle à de nombreux phénomènes telle que la réparation de l'ADN ou encore le contrôle du cycle cellulaire. Son dérèglement est donc inducteur de nombreux processus néfastes au bon fonctionnement physiologique.[156]

L'inhibiteur CV210 fait donc ici office de molécule « hit » et présente un avantage certain, sa sélectivité Dyrk1A-B / Dyrk2, en comparaison aux autres inhibiteurs décrits (*Tableau 17*).

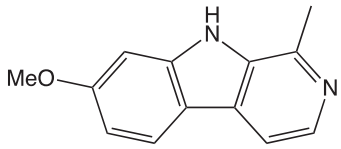
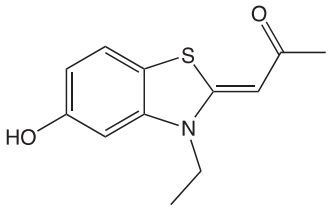
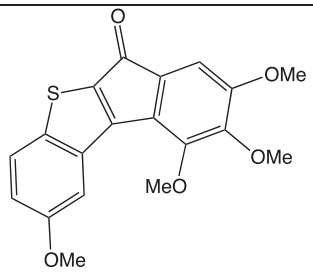
Nom	Structure	CI_{50} Dyrk1A (nM)	CI_{50} Dyrk1B (nM)	CI_{50} Dyrk2 (nM)
Harmine		**228**	**100**	**3000**
INDY		**82,5**	**112**	**35,2**
CV210		**150**	**320**	**> 5000**

Tableau 17: Evaluation de l'inhibition des kinases DYRK par l'Harmine, l'INDY et le CV210

Bien que les valeurs de CI_{50} ne soient pas les plus favorables par rapport aux références, elles n'en demeurent pas moins intéressantes. Ceci a stimulé la conception et la synthèse de plusieurs analogues au CV210, que nous décrirons dans un prochain chapitre.

1.3 Etudes de modélisation moléculaire

Dans cette optique, et en collaboration avec l'équipe du Dr Matthias Engel de l'Université de la Sarre en Allemagne, des études de modélisation moléculaire ont été réalisées.
Plus précisément, ce sont le mode ainsi que le site de fixation du composé CV210

sur Dyrk1A qui ont été comparés. Les superpositions de l'harmine et de l'INDY avec notre composé « hit » au sein du site actif, dans la structure cristallographique de la protéine (fichiers pdb : 3ANR et 3ANQ) nous permettent d'apporter d'autres informations complémentaires et primordiales, telles que les différentes interactions des molécules dans le site à ATP de cette cible thérapeutique (Figure 56).

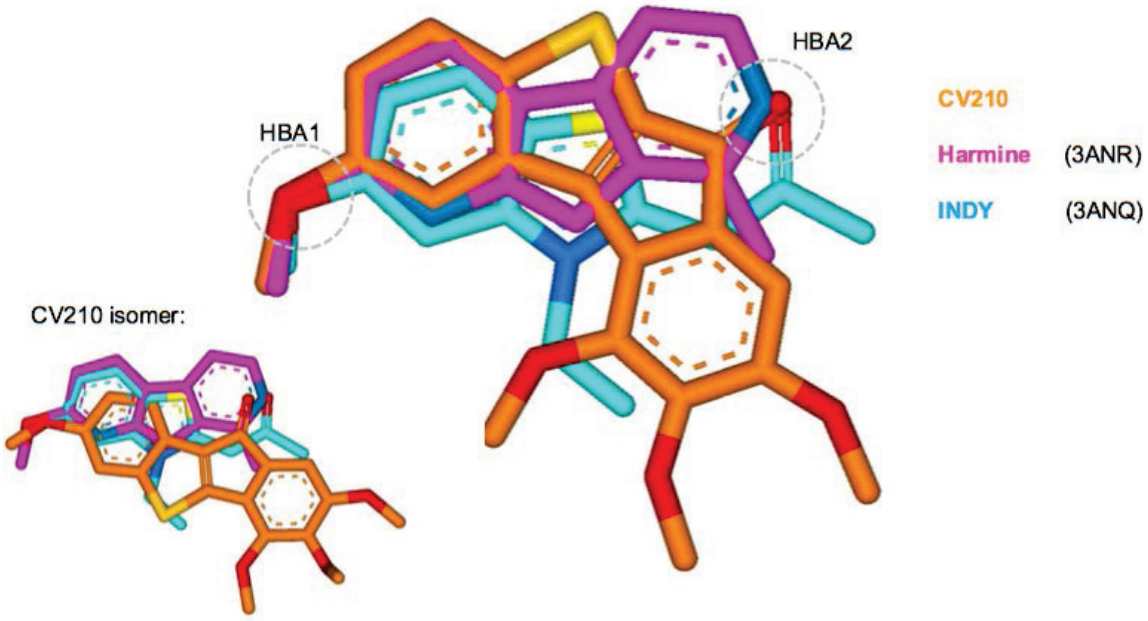


Figure 56: Modélisation moléculaire: superposition des composés CV210 (en haut, orange), de l'harmine (rose) de l'INDY (bleu) et du régioisomère du CV210 (en bas) au sein du site actif de Dyrk1A

Les premières observations font état d'une superposition pratiquement similaire des 3 composés décrits précédemment, avec notamment deux points d'interactions principaux que sont HBA1 et HBA2.

Ainsi pour aller encore plus loin, des études focalisées sur la position de la fixation, la conformation structurale de notre inhibiteur, et les interactions avec les acides aminés du site actif de Dyrk1A ont été réalisées sur le complexe 3ANR (complexe Dyrk1A/Harmine humain).

Deux modes de fixations se dégagent après analyse des résultats :

- Positionnement du CV210 à l'intérieur du site à ATP de Dyrk1A, avec interactions principales des sites HBA1 et HBA2 avec les amino-acides

présents dans la poche de fixation (Figure 57),

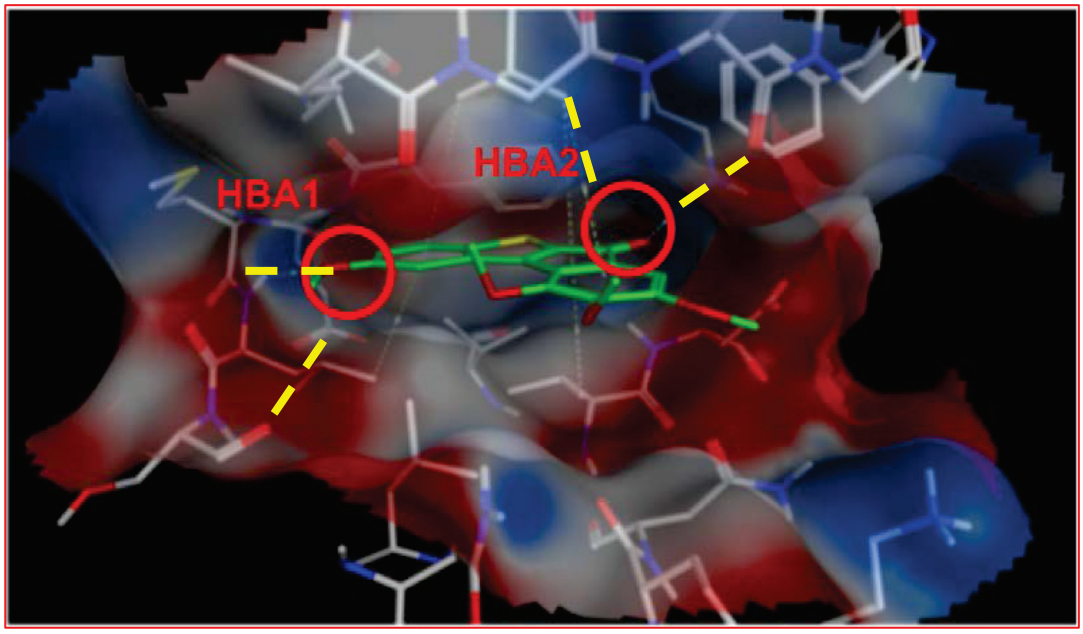


Figure 57: Positionnement et représentation structurale la plus favorable du CV210 au sein de la protéine Dyrk1A (fichier pdb: 3ANR)

- Positionnement « inverse » à la conformation précédente : le CV210 ne se fixe alors pas en fonction des sites HBA1 et HBA2 mais de façon diamétralement opposée dans le site à ATP de Dyrk1A (Figure 58).

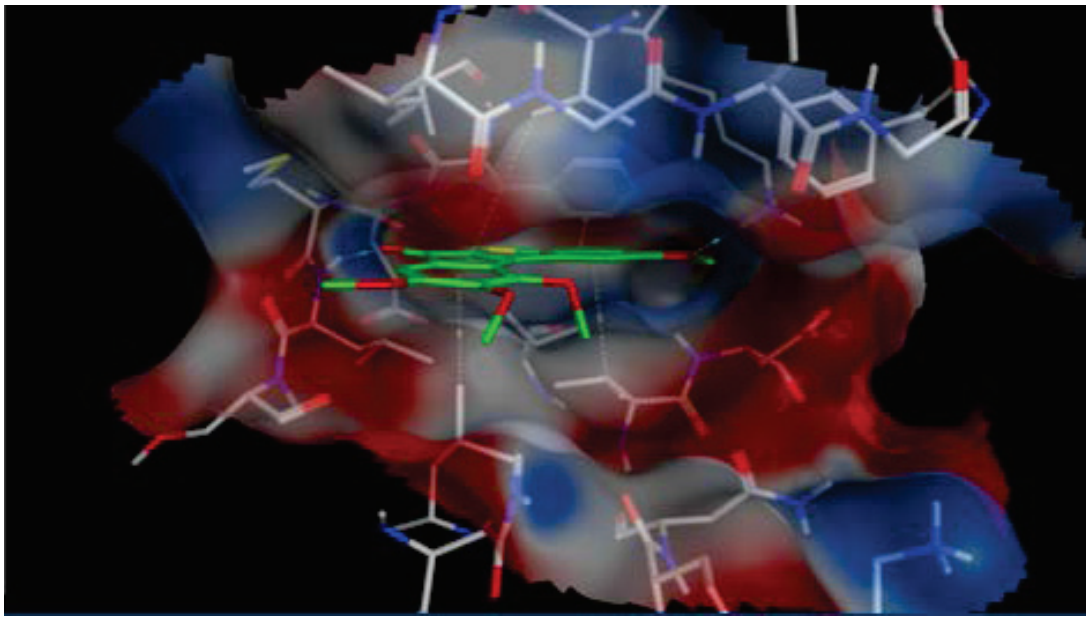


Figure 58: Positionnement et représentation structurale en mode « inverse » moins favorable du CV210 au sein de la protéine Dyrk1A (fichier pdb: 3ANR)

HBA1 semble englober les groupements méthoxy de CV210 ou de l'harmine mais aussi l'hydroxyle de l'INDY. La présence d'un atome d'oxygène dans chacun de ces substituants permet de déduire la présence d'une région polaire permettant la formation de liaisons hydrogènes et électrostatiques favorisant la fixation sur Dyrk1A.
Le deuxième point d'interaction que représente HBA2 est constitué de l'azote du groupement pyrido-indolique de l'harmine, ainsi que des cétones aromatique et aliphatique du CV210 et de l'INDY. Ici encore, la présence d'un atome électronégatif sur les inhibiteurs étudiés démontre qu'une fonction donneuse d'électrons impacte positivement la fixation sur la protéine kinase.

La conformation n°1 (*Figure 56*) est celle qui a obtenu le score le plus élevé. Elle est donc celle qui parait la plus probable pour expliquer le positionnement de notre composé sur le site actif de la kinase. Le docking du CV210 correspond au même mode que celui de l'harmine et de l'INDY.

La conformation n°2 (*Figure 57*), en mode inverse, est celle qui a montré le second plus haut score. Les sites d'interactions sont ici complètement opposés à ceux observés dans la conformation n°1, c'est-à-dire que le CV210 va s'établir dans la position contraire à la précédente.
Ce mode de fixation représente donc une alternative crédible au premier mode de docking.
De plus, le noyau triméthoxybenzène du CV210 est à première vue trivial puisqu'il semble se situer hors de la poche de fixation à Dyrk1A et n'interagit donc avec aucun acide aminé environnant.

Les évaluations biologiques précédemment réalisées, combinées aux études de docking, nous ont donc permis de tirer plusieurs enseignements importants :

- les dérivés tétracycliques indénobenzo[*b*]thiophènes pourraient présenter potentiellement une double sélectivité pour Dyrk1A et Dyrk1B,

- la présence de substituants électrodonneurs forts (tels des groupements de type methoxy) respectivement dans les positions 2 et 6 du tétracycle (Figure 59), et dont le noyau benzène serait dépourvu d'un ou de plusieurs substituants méthoxy en position 8, 9 ou 10, pourrait engendrer une sélectivité prononcée sur Dyrk1A/1B,

- le composé CV210 se positionne sur Dyrk1A selon deux modes de « docking » possibles ; de la même façon que l'INDY et l'harmine ou en position inverse, cette dernière conformation affichant un score moins élevé.

Nous allons donc, dans les parties suivantes de ce chapitre, décrire la synthèse des multiples analogues du CV210 puis ensuite présenter leurs activités inhibitrices sur les kinases DYRK.

2. SYNTHESE D'INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES

Cette partie du chapitre illustrera la synthèse de nombreux dérivés de types indénobenzo[*b*]thiophènes, analogues structuraux du CV210.
Dans un premier temps, nous avons établi un schéma rétrosynthétique à partir duquel nous avons imaginé une voie de synthèse cohérente (Figure 59).

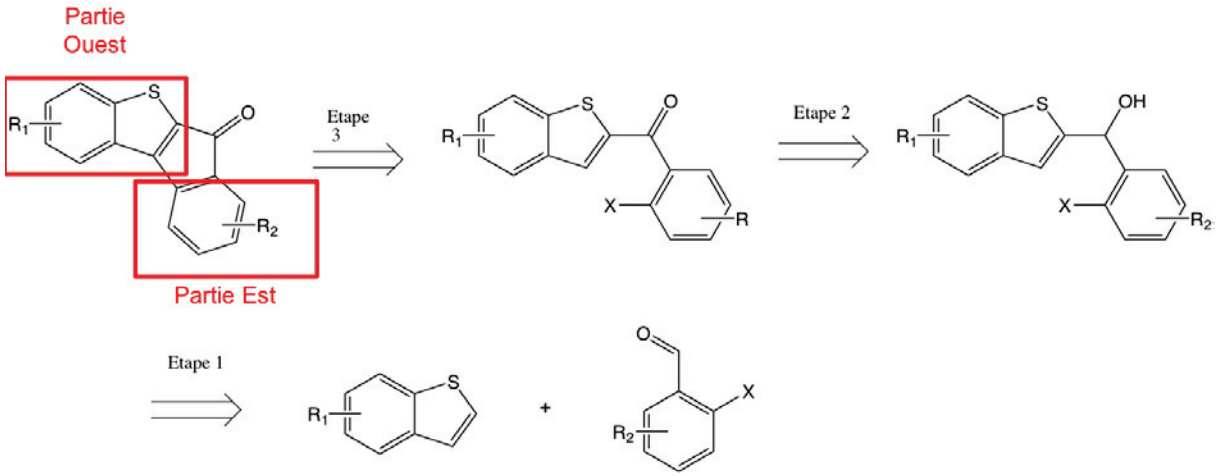


Figure 59: Analyse rétrosynthétique menant aux indénobenzo[*b*]thiophènes cibles

Comme indiqué dans la Figure 58, la première étape de cette stratégie de synthèse va correspondre au couplage entre le dérivé halogéno-benzaldéhyde (substitué ou non par un groupe R2) et le benzothiophène (substitué ou non par un groupe R1) d'un lithien. C'est la déprotonation par cette espèce du benzothiophène en position 2 qui va alors permettre l'addition nucléophile sur l'aldéhyde aromatique et la formation de l'alcool secondaire correspondant. L'oxydation de l'alcool en cétone lors de l'étape 2 puis la cyclisation intramoléculaire pallado-catalysée (étape 3) permettront finalement la synthèse du tétracycle souhaité.

L'étude structural du composé « hit » CV210 nous permet d'établir certaines propositions de pharmacomodulations autours de plusieurs points comme décrit dans la Figure 60.

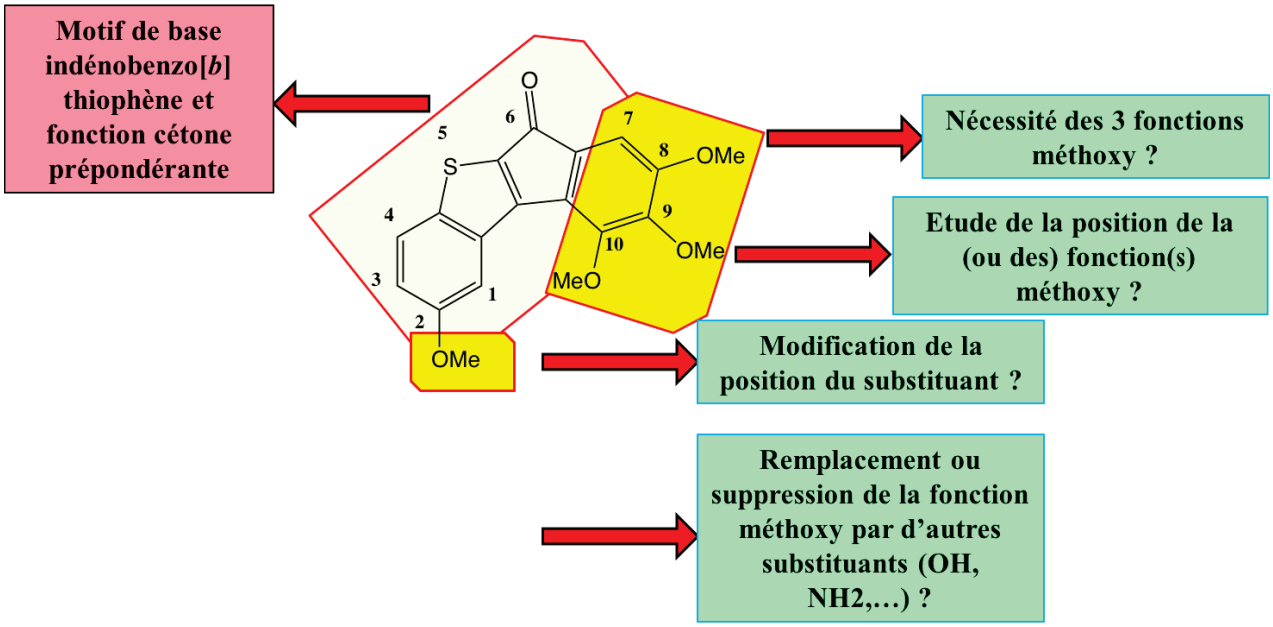


Figure 60: Stratégie de pharmacomodulation des indénobenzo[*b*]thiophènes cibles

Ainsi, nous souhaitions orienter nos synthèses autour de la formation de composés conservant un motif de base tétracyclique indénobenzo[*b*]thiophène ainsi que la fonction cétone en position 6. De plus, il serait utile dans un premier temps de remplacer le motif triméthoxy aromatique par un seul groupe méthoxy car ce dernier ne semble être essentiel à la fixation sur la kinase Dyrk1A. Enfin, le remplacement du méthoxy en position 2 par un groupement électroattracteur fort (comme un atome de fluor) est une option que nous allons privilégier.

2.1 Synthèse des produits de départ

2.1.1 Préparation des dérivés iodobenzaldéhydes

En vue de réaliser la réaction entre les deux produits de départ halogéno-benzaldéhyde et benzothiophène, nous avons tout d'abord dû choisir quel halogène allait être fixé sur le noyau benzaldéhyde. Ce dernier est d'une importance cruciale, puisque c'est lors de l'ultime étape que va se produire l'étape de cyclisation permettant la formation d'une liaison carbone-carbone par réactivité de l'atome d'halogène. Aussi, ce dernier doit être conservé lors des étapes préalables, sa réactivité devant donc être limité lors deux premières étapes du schéma rétrosynthétique ci-dessus (Figure 58).

Après étude et analyse de la littérature, notre choix s'est porté sur l'atome d'iode qui dispose d'une réactivité intéressante lors des réactions intramoléculaire palladocatalysées de type « Heck » et aussi parce que la synthèse de composés

iodobenzaldéhyde est très documentée.

Comme cité précédemment, nous visons dans ce chapitre la synthèse du motif tétracyclique disposant d'un seul groupement méthoxy sur la partie « Est » de la molécule (*Figure 58*). De ce fait, notre travail a consisté initialement en la formation de composés de type iodobenzaldéhyde porteurs de mono-méthoxy en différentes positions.

2.1.1.1. Synthèse du 2-iodo-3-méthoxybenzaldéhyde **189**

La formation de ce dérivé aromatique nécessite l'utilisation d'un protocole expérimental multi-étapes, permettant de greffer spécifiquement l'atome d'iode en position *ortho* des groupements aldéhyde et méthoxy du *m*-anisaldéhyde (*Schéma 37*).

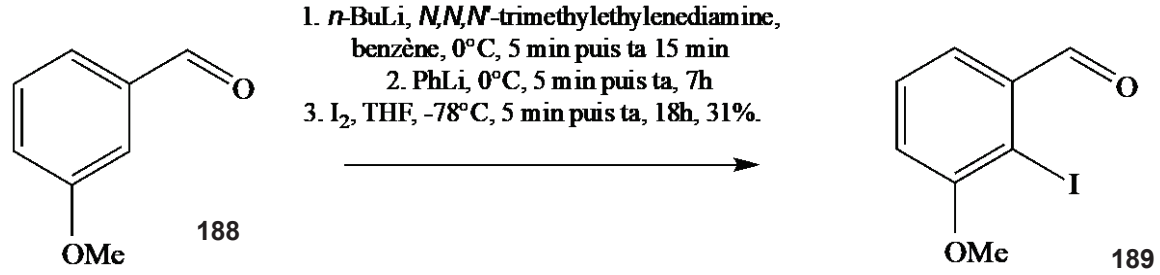


Schéma 37: Synthèse du 2-iodo-3-méthoxybenzaldéhyde

2.1.1.2. Synthèse du 2-iodo-5-méthoxybenzaldéhyde **191**

La synthèse de ce régioisomère se base sur le protocole de Hathaway *et coll.*[202] qui met en jeu l'addition du diiode dans l'acide périodique afin de générer une espèce éléctrophile I^+ qui s'additionne en position 6 du noyau aromatique (*Schéma 38*).

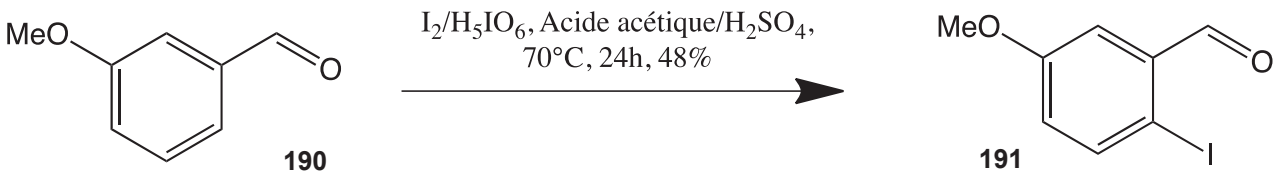


Schéma 38: Synthèse du 2-iodo-5-méthoxybenzaldéhyde **191**

Cette méthode permet donc de synthétiser le composé final avec un rendement assez moyen de 48%.

2.1.1.3. Synthèse du 2-iodo-4-méthoxybenzaldéhyde **194**

En vue d'obtenir le 2-iodo-4-méthoxybenzaldéhyde, nous avons au préalable synthétisé le 1-(diméthoxyméthyl)-4-méthoxybenzène, par ajout de triméthylorthoformate dans l'acétone et en présence de résine Amberlyst® 15 (*Schéma 39*). Cette résine va jouer le rôle de catalyseur acide et ainsi favoriser les échanges de protons H^+. Lors de la deuxième étape, la déprotonation régioseléctive en position 2 par le *t*-BuLi suivi de l'addition d'I_2 permet la formation du 2-iodo-4-méthoxybenzaldéhyde avec un faible rendement global.

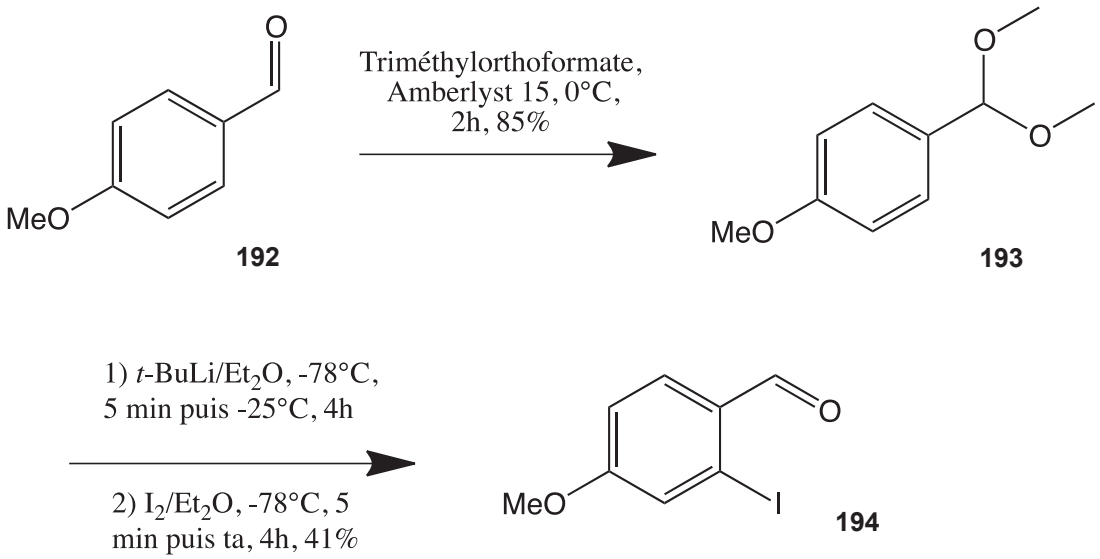


Schéma 39: Synthèse du 2-iodo-4-méthoxybenzaldéhyde **194**

2.1.1.4. Synthèse du 2-iodo-6-méthoxybenzaldéhyde **197**

La synthèse du dernier régioisomère requis pour notre étude, s'est pour sa part, avérée plus délicate. En effet, le 2-iodo-6-méthoxybenzaldéhyde ne dispose pas de protocole décrit dans la littérature. Nous avons donc au préalable formé le 2-iodo-6-méthoxyphénol par utilisation du formaldéhyde en présence de l'acide de Lewis $MgCl_2$ puis le phénol est ensuite converti en groupe méthoxy pour conduire au composé cible, selon le Schéma 40 :[203]

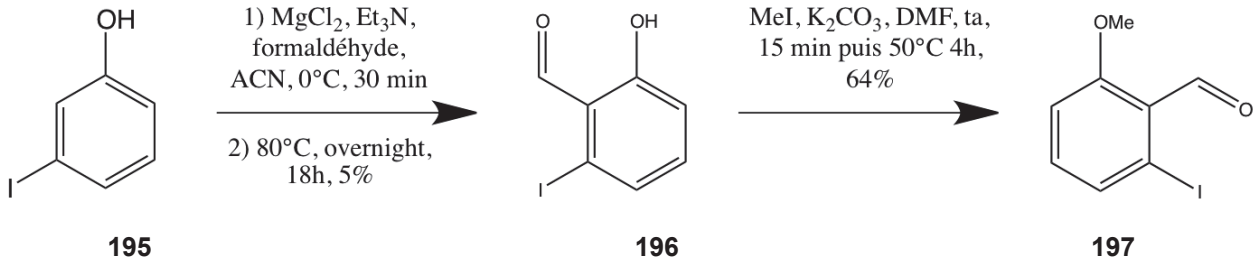


Schéma 40: Synthèse du 2-iodo-6-méthoxybenzaldéhyde **197**

Comme nous pouvons le constater, l'obtention du 2-iodo-6-méthoxyphénol se fait avec un rendement extrêmement médiocre. En revanche, la méthylation est globalement satisfaisante, nous permettant d'isoler le composé final **197**.

2.1.2 Synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes **198-201**

En vue de synthétiser les différents cycles benzo[*b*]thiophènes substitués de manière adéquate, nous avons adopté une stratégie nous permettant d'obtenir les composés de départ en 2 étapes, grâce à un protocole dérivé de la méthode de Pérez-Silanes et coll.[204] La première consiste en l'addition de bromoacétaldéhyde diéthyl acétal, en présence de K_2CO_3, sur un thiophénol qui génère alors le composé diéthoxylé correspondant. Ce dernier va ensuite subir une étape de cyclisation catalysé par l'acide polyphosphorique PPA dans le chlorobenzène aboutissant à la formation du benzo[*b*]thiophène substitué dans les positions 5 ou 7 (*Schéma 41*).

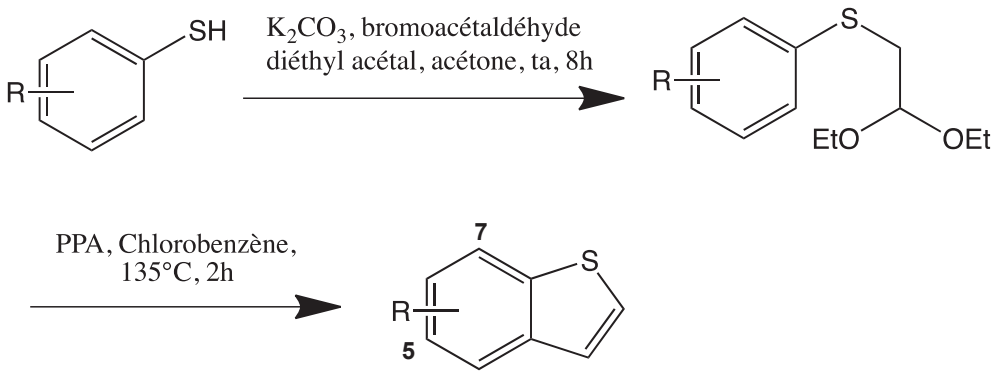
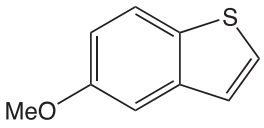
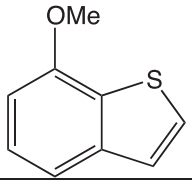


Schéma 41 : Synthèse des dérivés benzo[*b*]thiophènes **198-201**

Nous présentons dans le *Tableau 18* ci-après les composés obtenus ainsi que le rendement global de cette stratégie de synthèse :

Composé précurseur	Dérivé benzo[*b*]thiophène	Rdt global (%)
198		**77**
199		**65**

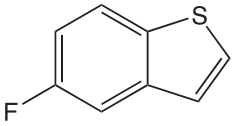
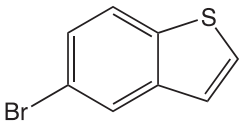
200		**60**
201		**81**

Tableau 18 : Cyclisation des dérivés diéthoxylés, précurseurs de benzo[*b*]thiophènes

Comme nous pouvons le constater, cette étape de cyclisation se montre satisfaisante en termes de rendements, allant de 60 à 81%. Elle s'avère également efficace afin d'obtenir ces produits de départ de manière rapide et avec une application possible sur une grande variété d'hétérocycles soufrés différemment substitués.

Certains de nos dérivés finaux tétracycliques nécessitant la présence d'un groupement hydroxy en lieu et place du méthoxy initial, quelques étapes additionnelles ont donc été mises en place dans cette optique.
Pour ce faire, le 5-méthoxybenzo[*b*]thiophène a été engagé dans une étape de déméthylation par un complexe tribromure de bore / diméthylsulfure avant d'être ensuite protégé à l'aide d'un groupement éther de silyle encombré, le *tert*-butyldiméthylsilyle TBDMS (*Schéma 42*).

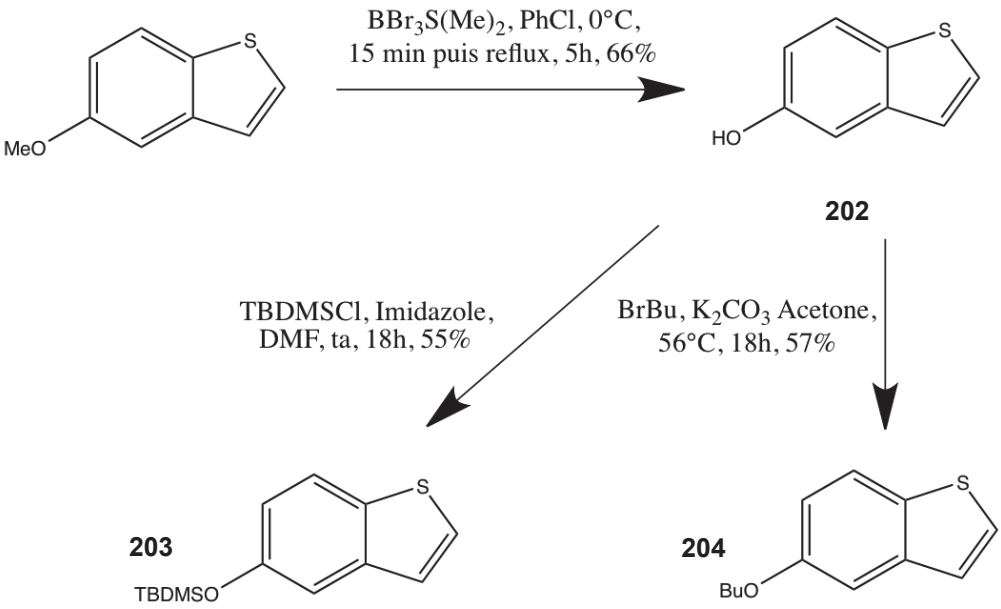


Schéma 42: Synthèse des précurseurs benzo[*b*]thiophènes protégés **203** et **204**

Globalement, la synthèse du (benzo[*b*]thiophen-5-yloxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane s'avère correcte, avec des rendements supérieurs à 50% lors de ces deux étapes.

Aussi, la synthèse du 5-butoxybenzo[*b*]thiophène est réalisé directement à partir du 5-hydroxybenzo[*b*]thiophène, avec un rendement correct.

2.1.2.1. Réaction de métallation : déprotonation / addition électrophile menant à la formation d'alcools secondaires

L'addition de *n*-BuLi sur le dérivé benzo[*b*]thiophène va permettre la formation d'un lithien *in situ* qui, après ajout du benzaldéhyde substitué dans le milieu, va réagir sur la fonction aldéhyde et former l'alcool secondaire correspondant. Cette étape est inspirée de nos expérimentations sur les analogues de la CA-4 où nous faisions réagir un dérivé lithien sur des cycles (benzo[*b*])thiophènes halogénés ou non afin d'obtenir des alcools intermédiaires de la synthèse de produit finaux (*Schéma 43* et *Tableau 19*).

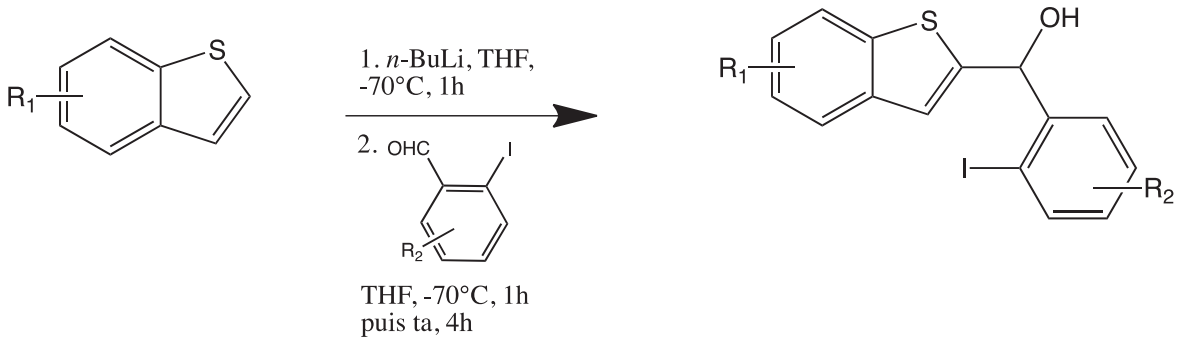
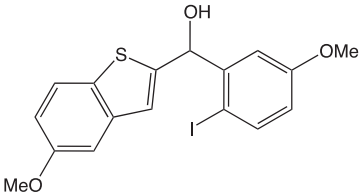
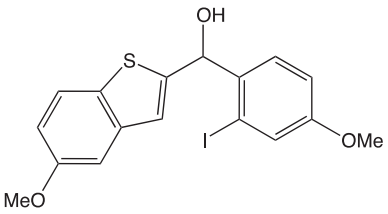
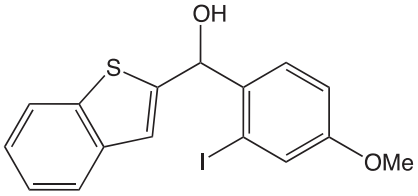
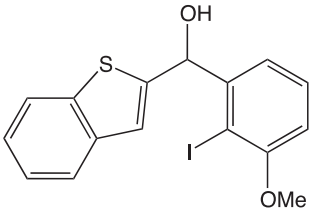
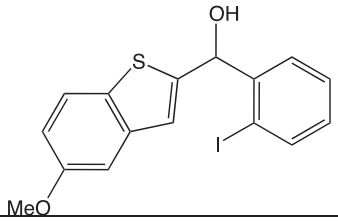
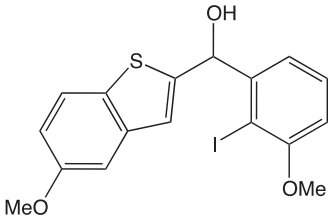
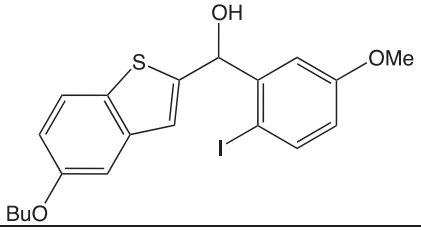
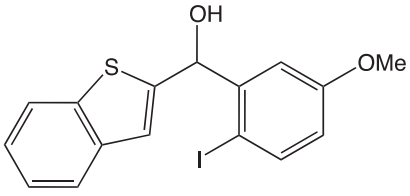
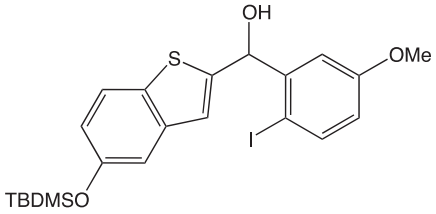


Schéma 43: Synthèse des dérivés alcools secondaires **207- 221**

Produits de départ : benzo[*b*]thiophène + iodobenzaldéhyde	**Dérivé alcool secondaire**	**Rdt (%)**
198 **191**	**207** 	**68**

198 194	208 	54
206 194	209 	84
206 189	210 	86
198 205	211 	94
198 189	212 	81
204 191	213 	50
206 191	214 	78
203 191	215 	61

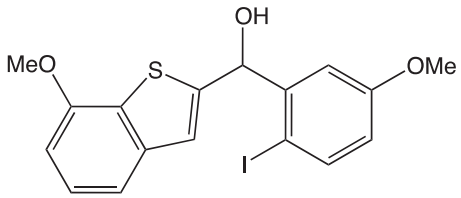
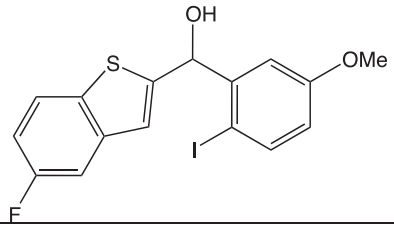
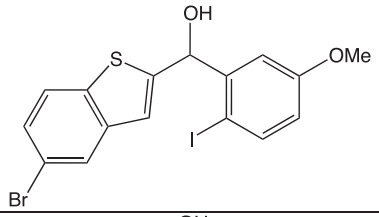
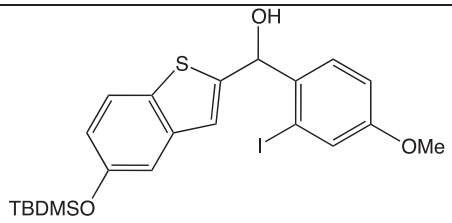
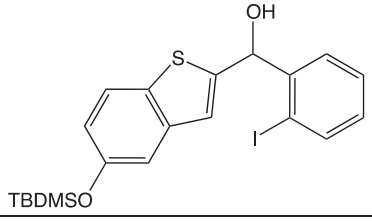
199 **191**	**216** 	**77**
200 **191**	**217** 	**64**
201 **191**	**218** 	**79**
203 **194**	**219** 	**87**
203 **205**	**220** 	**87**

Tableau 19: Rendements obtenus pour la synthèse des alcools secondaires **207-220**

Comme constaté dans le *Tableau 19*, cette réaction donne globalement de très bons résultats avec des dérivés variés. Nous pouvons aussi constater que la présence d'un atome d'halogène, d'un groupement silylé ou méthoxy n'altère en rien la sélectivité de cette méthode, puisque les rendements restent tout à fait satisfaisants même dans ces cas précis.

Le composé **221** a lui été synthétisé selon une voie de synthèse légèrement différente. Ainsi, ce dernier a été déprotoné en position 3 du dérivé benzo[*b*]thiophene et son addition électrophile subséquente sur le dérivé iodobenzaldéhyde est réalisé selon le mécanisme suivant (*Schéma 44*) :

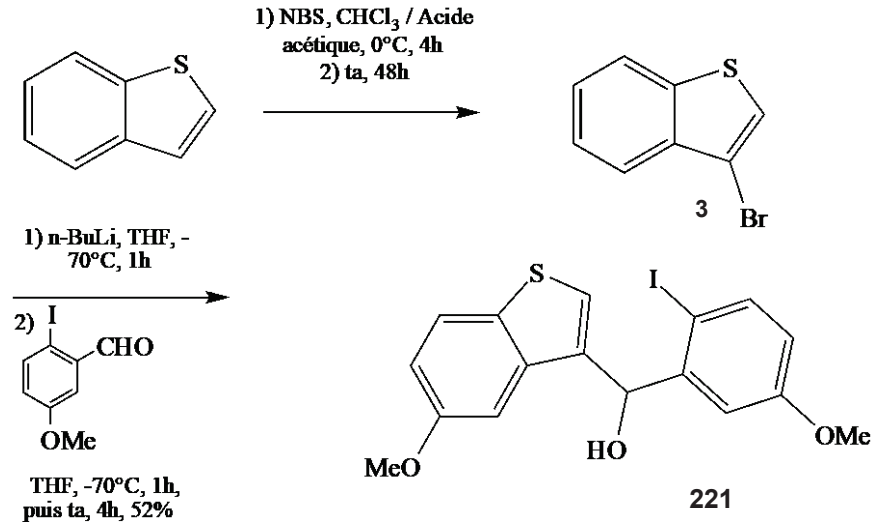


Schéma 44 : Synthèse du dérivés alcool secondaire **221**

En revanche, l'application de ce procédé à la synthèse du (2-iodo-6-méthoxyphenyl)(5-méthoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)méthanol s'est avérée inefficace (*Schéma 45*) :

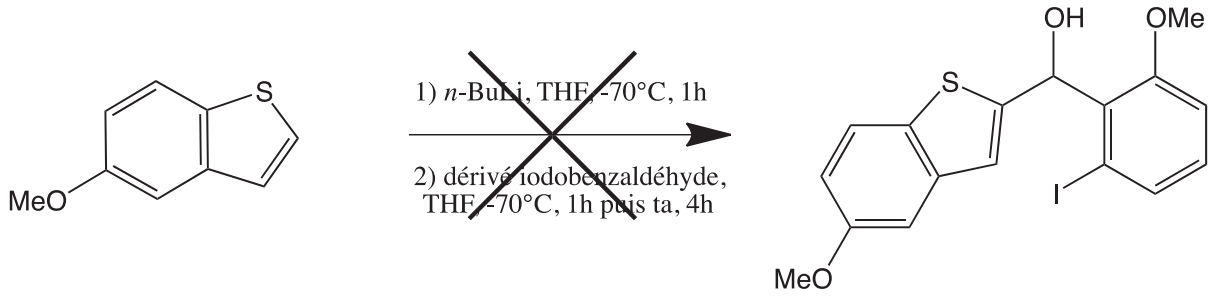


Schéma 45: Tentative de synthèse du (2-iodo-6-méthoxyphenyl)(5-methoxybenzo[b]thiophen-2-yl)méthanol

Nous avons constaté la même chose lors de la tentative de synthèse du benzo[*b*]thiophèn-2-yl(2-iodo-6-méthoxyphenyl)méthanol (*Schéma 46*) :

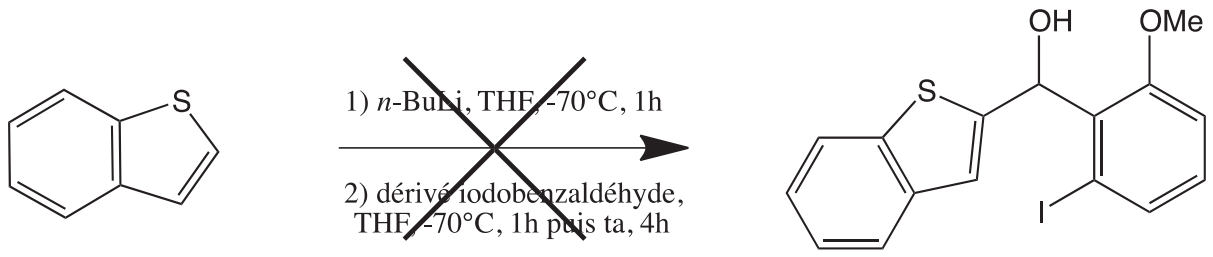


Schéma 46: Tentative de synthèse du benzo[b]thiophèn-2-yl(2-iodo-6-méthoxyphényl)méthanol

Une des raisons expliquant l'échec de ces réactions proviendrait de l'encombrement stérique induit par le groupement méthoxy et l'iode situé directement dans chacune des positions *ortho* de la fonction aldéhyde, cible du lithien intermédiaire formé *in situ* après ajout de *n*-BuLi. En conséquence, ces derniers bloqueraient potentiellement l'approche du lithien comme observé en *Figure 61*.

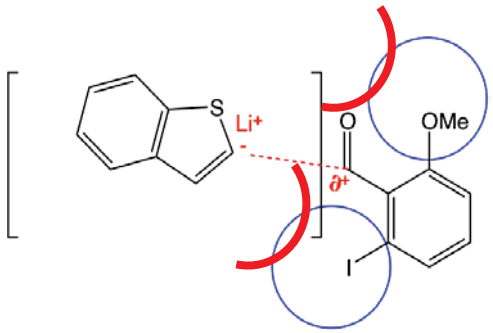


Figure 61: Gène stérique entre le dérivé lithien benzo[*b*]thiophène formé *in situ* et le 2-iodo-6-méthoxybenzaldéhyde

Ces échecs nous ont par conséquent incité à utiliser une voie d'approche différente afin de tenter d'obtenir ces produis. Plutôt que d'utiliser une déprotonation avec du *n*-BuLi qui nous conduirait préférentiellement à l'échange iode/lithium, nous avons préféré utiliser la méthode développée par le groupe de Florence Mongin de l'Université de Rennes,[115] par utilisation d'un agrégat mixte lithium/zinc et qui permet l'addition régiosélective sur la position 2 de nombreux hétérocycles, notamment de type benzo[*b*]thiophène. Mais, il s'avère que l'échange halogène/TMPLi est également favorisé dans cas précis, menant à l'obtention du régioisomère en position 3 avec un très bon rendement (*Schéma 47*).

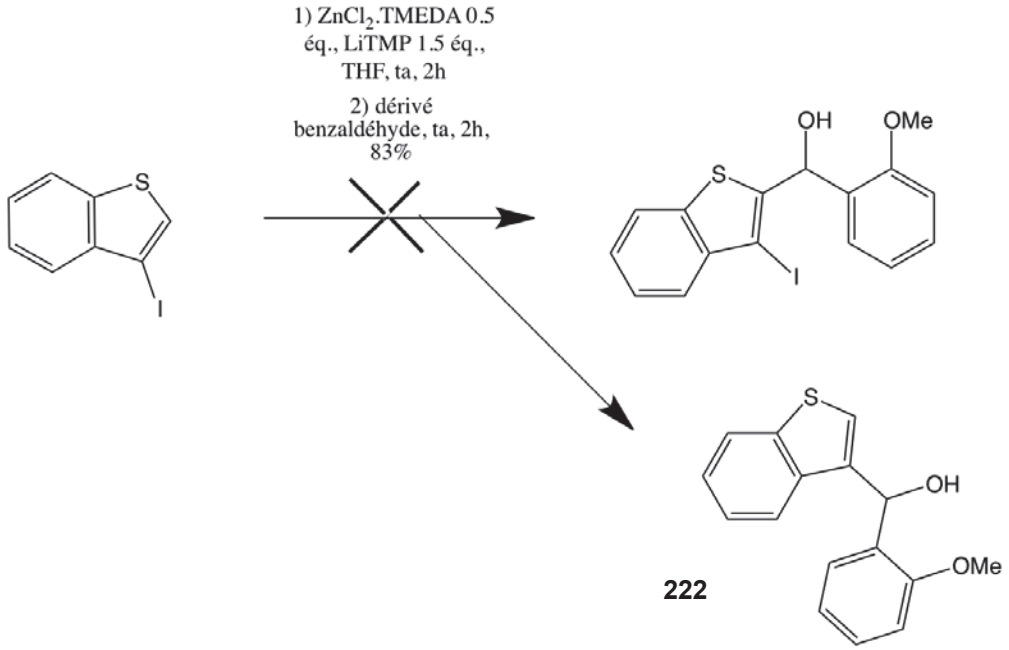


Schéma 47: Tentative de synthèse du benzo[*b*]thiophèn-2-yl(2-iodo-6-méthoxyphényl)méthanol par la méthode de Mongin[115]

2.1.2.2. Réaction d'oxydation de l'alcool secondaire

La seconde étape de ce procédé synthétique consiste en l'oxydation de la fonction alcool secondaire caractéristique des composés benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodophenyl)méthanol.
Le protocole expérimental mis en jeu ici a été inspiré par nos expérimentations sur les dérivés de la CA-4 traités dans les chapitres précédents (*Schéma 48*).

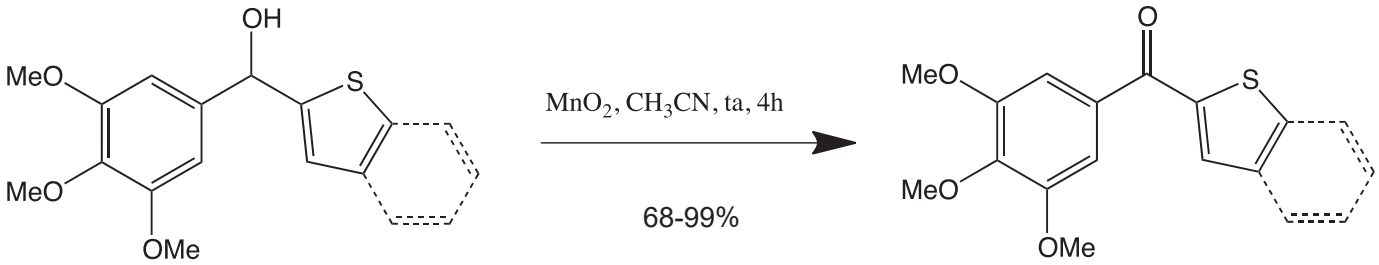


Schéma 48: Oxydation de l'alcool secondaire en dérivé (benzo[*b*])thiophène de la phenstatine.

Plusieurs conditions ont été ici testées, focalisées principalement sur le nombre d'équivalents molaires de MnO_2 employés lors de nos synthèses. Les résultats obtenus sont présentés dans le *Schéma 49*.

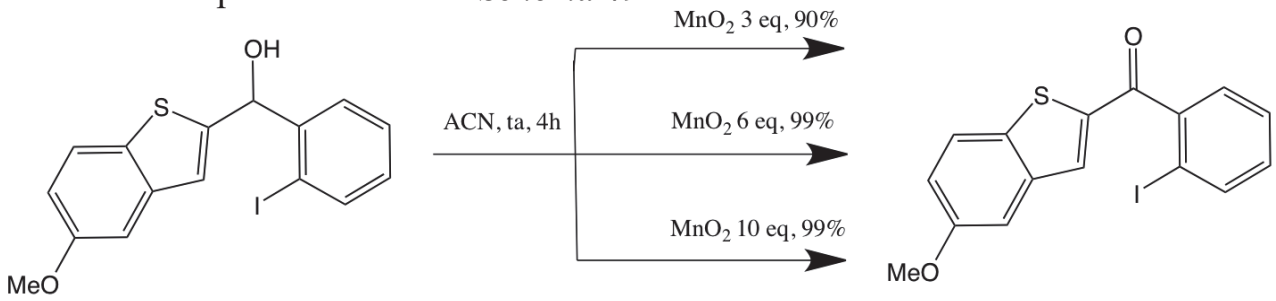
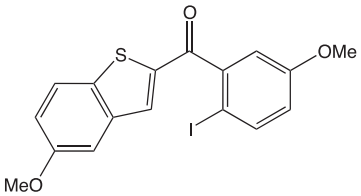
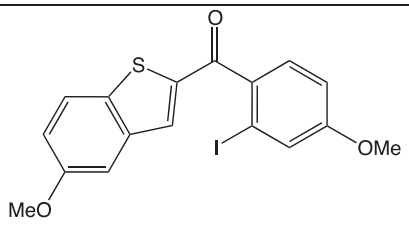
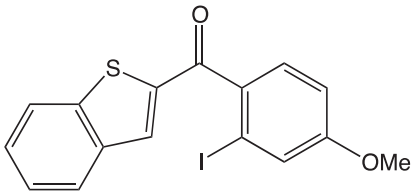
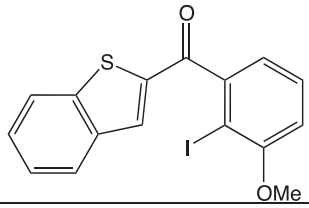
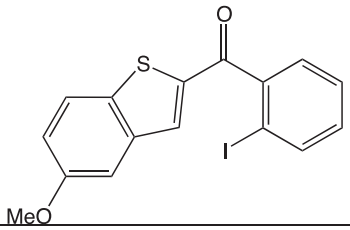
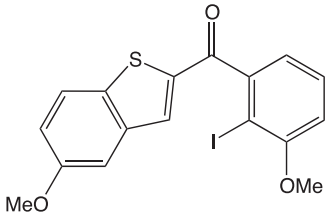
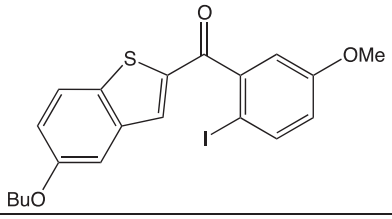
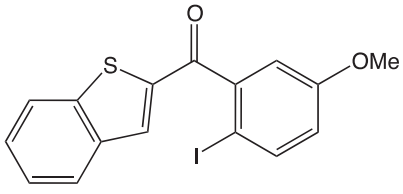
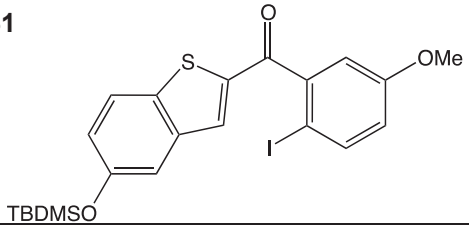


Schéma 49: Conditions réactionnelles évaluées pour l'oxydation de l'alcool secondaire

Nous avons donc employé au cours de nos expérimentations 6 équivalents molaires de MnO_2 ; conditions qui offrent le meilleur compromis entre rendement et quantité de réactif utilisée. La réaction est réalisée dans l'acétonitrile à température ambiante pendant 4h, avec contrôle régulier de l'avancement de la réaction par CCM.

Dérivé alcool secondaire	**Produit oxydé**	**Rdt (%)**
207	**223** 	**93**

208	224 	95
209	225 	99
210	226 	87
211	227 	99
212	228 	82
213	229 	99
214	230 	95
215	231 	93

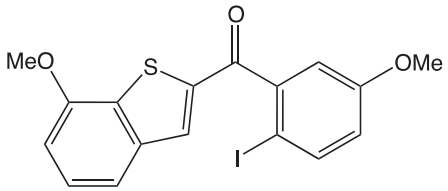
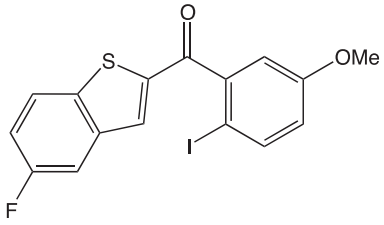
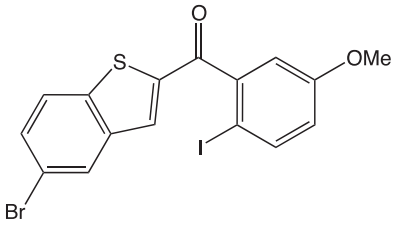
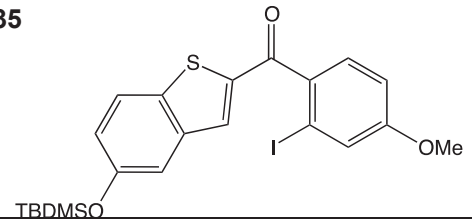
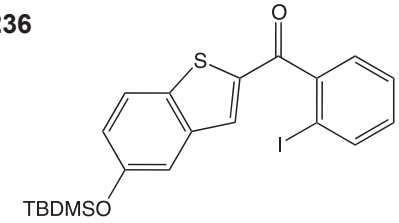
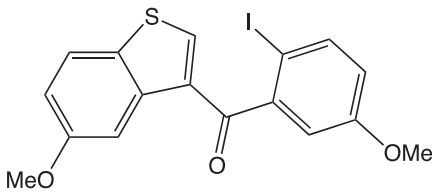
216	**232** 	**89**
217	**233** 	**96**
218	**234** 	**97**
219	**235** 	**68**
220	**236** 	**99**
221	**237** 	**92**

Tableau 20: Rendement obtenus lors de l'étape d'oxydation des alcools **207-221** en cétones **223-237**

Comme constaté dans le *Tableau 20*, l'oxydation des alcools obtenus précédemment fonctionne extrêmement bien, avec des rendements généralement supérieurs à 90%.

2.1.2.3. Cyclisation pallado-catalysée par mise en jeu d'une phosphine encombrée

En 2013, Marquise *et coll.*[205] se sont penchés sur la formation d'azafluorénones et d'indéno[2,1-*b*]thiophen-8-one par une méthode de cyclisation pallado-catalysée de dérivés halogénés mettant en jeu une phosphine encombrée éléctrodonneuse, la tricyclohexylphosphine ou la tritertiobutylphosphine et du K_2CO_3 jouant le rôle de base. Par cette voie d'accès, ils ont efficacement formé les dérivés correspondants avec des rendements satisfaisants (*Schéma 50*).

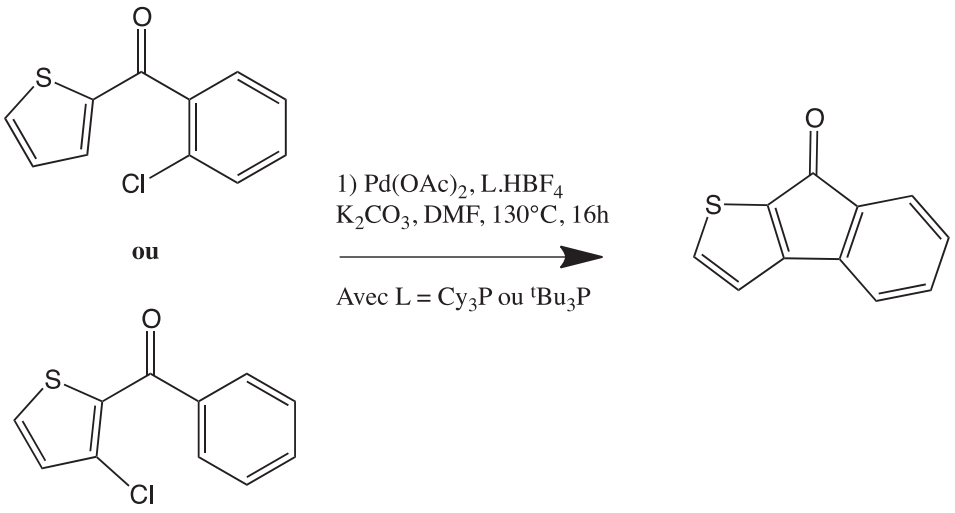


Schéma 50: Formation indéno[2,1-b]thiophen-8-one par cyclisation intramoléculaire pallado-catalysée selon Marquise et coll.[205]

Nous nous sommes donc inspirés de leurs travaux et avons adapté la procédure précédemment décrite à la synthèse de nos analogues tétracycliques selon le *Schéma 51* :

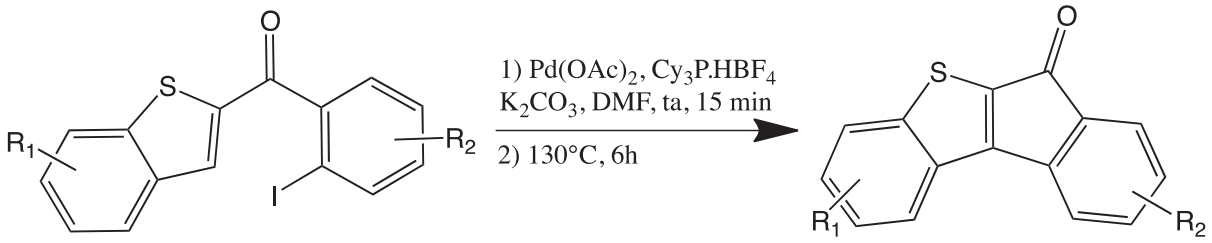


Schéma 51: Arylation-cyclisation intramoléculaire catalysée par l'acétate de palladium et avec utilisation de la phosphine encombrée $Cy_3P.HBF_4$.

Nous avons décidé de fixer l'atome d'halogène sur le cycle benzénique et non sur le benzo[*b*]thiophène car il s'avère moins problématique de synthétiser les produits de départ *ortho* halogéno-benzaldéhydes substitués plutôt que leurs homologues halogénobenzo[*b*]thiophènes. Aussi, nous avons dans notre cas de figure choisi l'iode en tant que groupe partant halogéné car il offre une meilleure réactivité dans les réactions de cyclisation intramoléculaire.

Deux conditions réactionnelles ont alors été testés, en faisant variés le nombre d'équivalents du système catalytique (*Schéma 52*) :

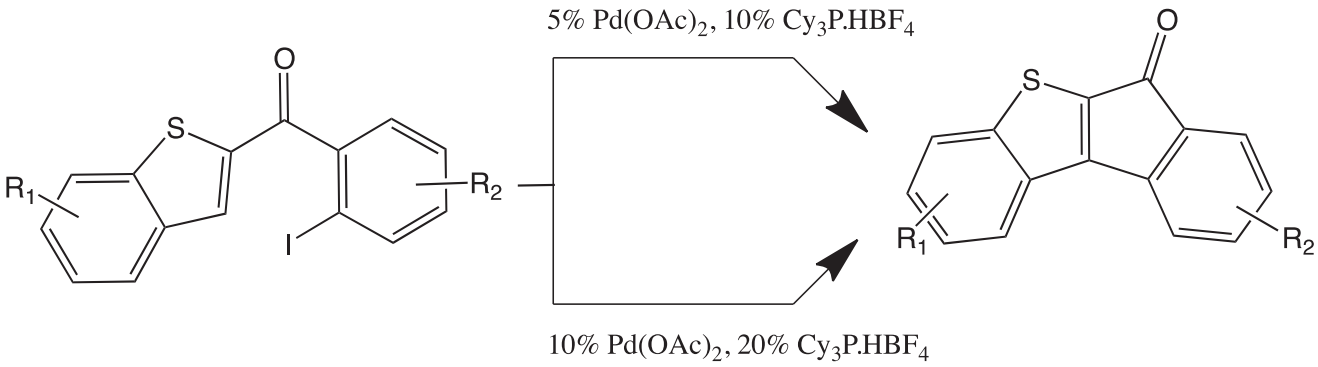
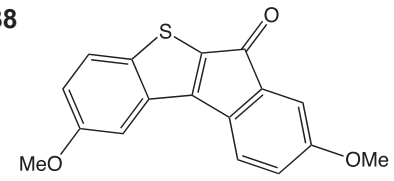
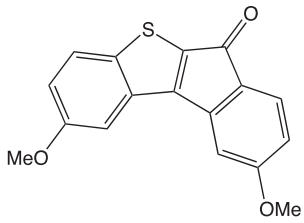
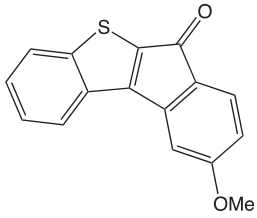
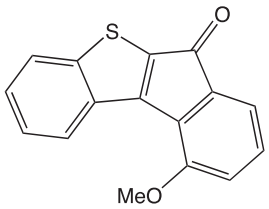
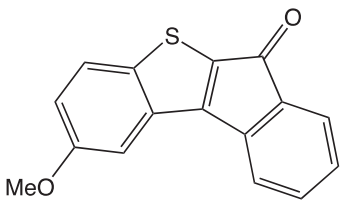
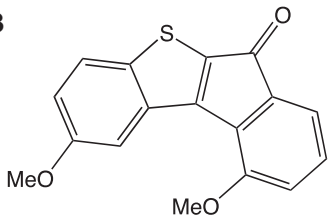
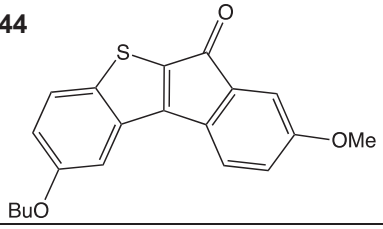
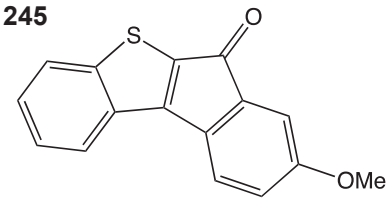
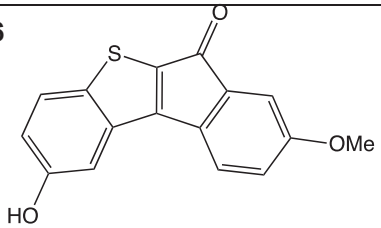


Schéma 52: Conditions réactionnelles évaluées lors de nos expérimentations

C'est avec les premières conditions (5% mol de palladium) que nous avons obtenues les meilleurs rendements ; de ce fait, ce sont celles-cis qui ont été utilisées lors de la suite de nos expérimentations.
Comme observée ci-dessous (*Tableau 21*), cette étape de notre schéma de synthèse a permis de préparer efficacement tout un panel de molécules tétracycliques.

Halogéno-arène	Produit de couplage	Rdt (%)
223	**238** 	**76**

224	239 	86
225	240 	75
226	241 	89
227	242 	92
228	243 	85
229	244 	93
230	245 	90
231	246 	66

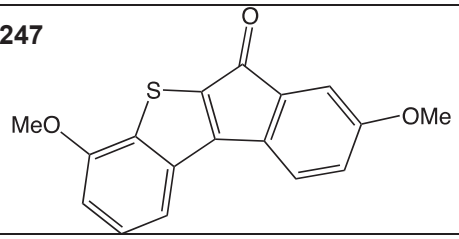
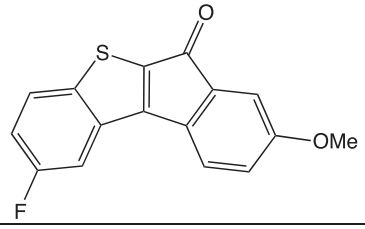
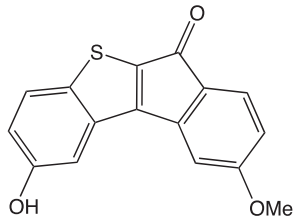
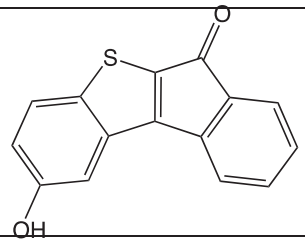
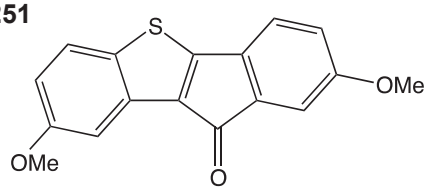
232	**247** 	**87**
233	**248** 	**82**
235	**249** 	**54**
236	**250** 	**55**
237	**251** 	**57**

Tableau 21: Résultats de synthèse des produits finaux **238-251**

Les composés obtenus offrent donc en règle générale des rendements très satisfaisants. Aussi, nous avons pu noter que l'étape de purification subséquente s'avère très facile à mener, et n'est même certaines fois pas nécessaire puisque le produit brut (obtenu par filtration rapide sur un gel de silice) est dénué de toutes impuretés comme nous avons pu en témoigner dans les spectres RMN (^{13}C et ^{1}H) et HPLC-MS.
Cette réaction est donc très efficace car il n'est observé aucun produit secondaire, et cela même en très faible quantité.

De plus, les tétracycles obtenus présentent la particularité d'être très coloré grâce à la forte délocalisation des électrons induite par les groupements aromatiques greffés les uns aux autres, avec des teintes variant du rouge jusqu'au marron foncé. Ceci est d'autant plus avantageux puisque cela facilite la visualisation de

leurs séparations par chromatographie sur couche mince ou sur colonne de silice.

La seule exception ici concerne la cyclisation du composé **234**, porteur d'un atome de brome en position 2 du tétracycle. En effet, lors de la réalisation de l'étape finale, nous n'avons pas réussi à générer le composé voulu (*Schéma 53*).

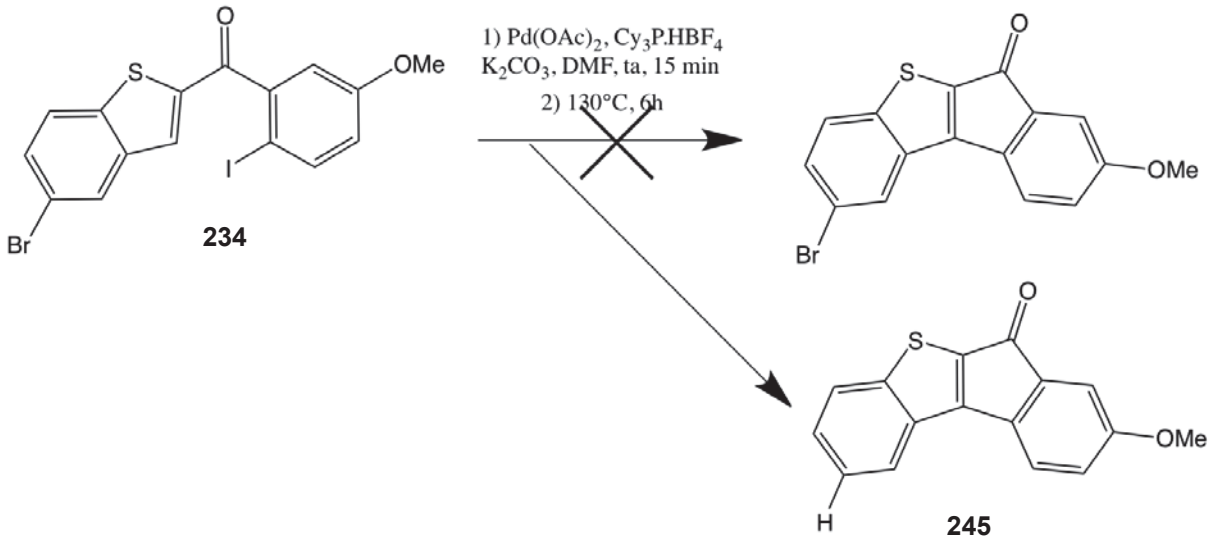


Schéma 53: Echange halogène-hydrogène lors de l'étape 3 de cyclisation du composé **234**

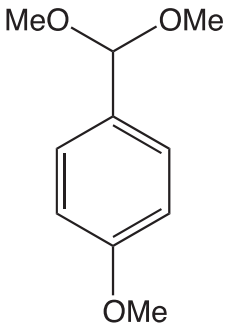
A l'inverse, cette réaction à entrainer la formation du composé **245**, déjà synthétisé précédemment. Ainsi, dans cet exemple précis, le départ du brome va être catalysé par la présence d'un catalyseur métallique $Pd(OAc)_2$ et la basicité du milieu ainsi que la température réactionnelle vont favoriser l'échange halogène-hydrogène observé dans le *Schéma 53*.

En conclusion, la synthèse de nos composés de type indénobenzo[*b*]thiophène s'appuie sur une voie d'approche rapide puisque la synthèse des différents tétracycles se fait en 3 ou 4 étapes selon le composé désiré. De la même façon, les rendements sont très satisfaisants : les composés finals sont obtenus à partir des dérivés benzo[*b*]thiophènes et *ortho*-iodobenzaldéhydes, avec un rendement global sur les 3 ou 4 étapes supérieur à 50%.

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 4

1-(Dimethoxymethyl)-4-methoxybenzene

Referenced as compound 193

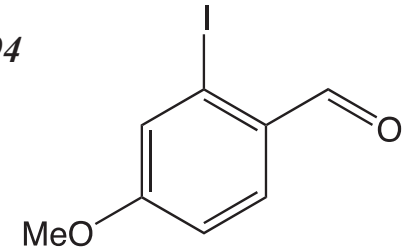


Chemical Formula : $C_{10}H_{14}O_3$
Molecular Weight : 182.22 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[206]
A mixture of the carbonyl compound (1.0 g, 7.34 mmol), triethyl orthoformate (4 ml, 36.75 mmol), and Amberlyst-15 (0.25 g) was stirred under a nitrogen atmosphere for 2h at 0°C.
Then the resine was filtered off and the resulting crude product was washed with hexane (4 x 25 ml). Purification by silica gel flash column chromatography treated with triethylamine (AcOEt / Cyclohexane : 10 / 90) afforded the desired product as a colorless oil (1.092 g, 82 %).
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.36 (d, J=8.8, 2H), 6.89 (d, J=8.8, 2H), 5.35 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.31 (s, 6H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[206]

2-iodo-4-methoxybenzaldehyde

Referenced as compound 194

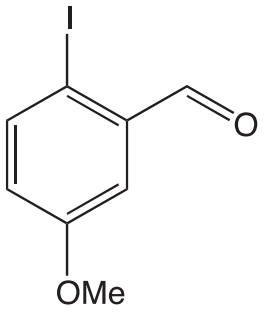


Chemical Formula : $C_8H_7IO_2$
Molecular Weight : 262.04 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[207]
To a stirred solution of 1-(dimethoxymethyl)-4-methoxybenzene (1.081 g, 5.9 mmol) in Et_2O (25 ml) at -78°C was added dropwise (10 min) *t*-BuLi 1.6 M in pentane (4 ml, 7.1 mmol). The acetone cold bath was gradually warmed to -25°C and the stirring continued at this temperature for 4h. Then, the yellow oil mixture was cooled to -78°C and a solution of iodine (1.5 g, 5.9 mmol) in Et_2O (16 ml) was added, the stirring continued for 15 min before removing the acetone cold bath and stirring at room temperature for 2 more hours. Subsequently, the mixture was quenched with ice-cold water (20 ml), acidified with HCl 2M (30 ml), extracted with Et_2O (2 x 50 ml), "half-evaporated" and HCl 2 M (50 ml) added, and the resulting mixture stirred overnight at room temperature. After decantation, water was added (30 ml) and the organic layer was successively washed with $NaHCO_3$ (2 x 30 ml), water (30 ml), NaCl (2 x 30 ml) dried with Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The purple solid was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 10 / 90) to afford the desired product as a white solid (0.63 g, 41 %).
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.92 (s, 1H), 7.83 (d, J = 8.7, 1H), 7.43 (d, J = 2.1, 1H), 6.97 (dd, J = 8.6 - 1.6, 1H), 3.87 (s, 3H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[207]

2-iodo-5-methoxybenzaldehyde

Referenced as compound 191



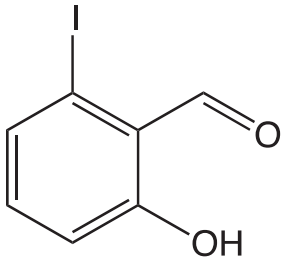
Chemical Formula : $C_8H_7IO_2$
Molecular Weight : 262.04 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[202]
To 100 ml of acetic acid, 5.77 g (40 mmol) m-anisaldehyde, 4.71 g (18 mmol) of iodine, and 1.40 g (6 mmol) of periodic acid were added, followed by 20 ml of water and 3 ml of sulfuric acid. A dark purple solution resulted. The mixture was heated and stirred at 65–70°C overnight. After the reaction was cooled, saturated sodium bisulfite $NaHSO_3$ solution was added to remove the dark color. A yellow precipitate formed upon pouring the solution into ice water. The precipitate was

filtered off and recrystallized in 95% ethanol to yield 4.816 g (46 %) of 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde as a light yellow solid.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.0 (s, 1H), 7.80 (d, J = 8.7, 1H), 7.42 (d, J = 2.9, 1H), 6.91 (dd, J = 2.9 - 8.6, 1H), 3.84 (s, 3H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[202]

2-hydroxy-6-iodobenzaldehyde

Referenced as compound 196

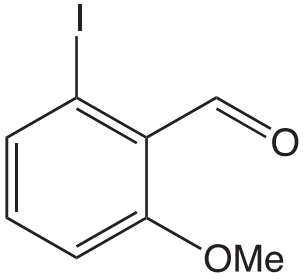


Chemical Formula: $C_7H_5IO_2$
Molecular Weight: 248.02 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[208]
The reaction was carried out in a large flask equipped with a stirrer and reflux condenser. A solution of 3-Iodophenol (5 g, 22.7 mmol) in acetonitrile (80 ml) was cooled in an ice-water bath and magnesium chloride (6.4 g, 67.2 mmol), was added to the phenol in small batches over 10 minutes to give a pink cloudy solution. Triethylamine (25.3 mL, 181.2 mmol) was added to the acetonitrile solution gradually over 5 minutes, keeping the solution at 0°C, followed with the addition of paraformaldehyde (9.6 g, 320 mmol) in small 0.5 g – 1 g batches over 10 minutes. Once the addition of the paraformaldehyde was complete the reaction vessel with the reflux condenser in place was removed from the cooling bath and warmed quickly to 80°C. After 0.25 h of heating the solids started to dissolve and around 1h of heating the reaction solution was almost a homogenous golden yellow color which slowly started to turn to an orange color. The reaction was kept at 80°C for 18.5h; the reaction had become a deep orange in color. The reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with a saturated solution of NH_4Cl (175 mL), extracted with EtOAc (3 x 75 ml), washed with $NaHCO_3$ (2 x 75 ml), HCl 1 M (2 x 75 ml), brine (50 ml) dried with Na_2SO_4, filtered through a Celite® pad and evaporated under reduced pressure. The brown solid was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 10 / 90) to afford the desired product as a yellow solid (0.226 g, 5 %) and 2-hydroxy-6-iodobenzaldehyde as white solid (3,02 g, 53 %).
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 12.07 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 7.51 (d, J= 7.6, 1H), 7.15 (t, J = 8.1, 1H), 7.00 (dt, J = 8.6 - 0.9, 1H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[208]

2-iodo-6-methoxybenzaldehyde

Referenced as compound 197

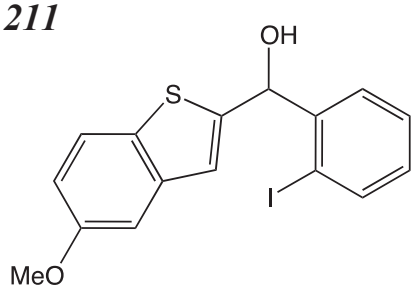


Chemical Formula : $C_8H_7IO_2$
Molecular Weight : 262.04 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[209]
A dry round bottomed flask was charged with 2-hydroxy-6-iodobenzaldehyde (0.204 g, 0.82 mmol), K_2CO_3 (0.114 g, 0.82 mmol) and 18-crown-6-ether (0.216 g, 0.82 mmol) and dispersed in anhydrous DMF (12 ml). The resulting mixture was cooled down to 0 °C, MeI (0.06 mL, 1.025 mmol) added dropwise and the reaction mixture left stirring overnight gradually reaching rt. Reaction mixture was diluted by H_2O (30 ml) and extracted with EtOAc (3 x 50 ml). Organic phases were pooled and washed with brine (3 x 20 ml), dried over $MgSO_4$ and filtered before solvents were removed under reduced pressure. The resulting crude compound was purified by flash column chromatography on silica (AcOEt / Cyclohexane : 10 / 90) to afford the desired product as yellow solid (0.124 g, 58 %).
^{1}**H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 10.25 (s, 1H), 7.59 (d, J= 7.7, 1H), 7.13 (t, J=8.0, 1H), 6.99 (d, J= 8.4, 1H), 3.91 (s, 3H).
Spectral data were in agreement to those reported in the literature.[209]

(2-iodophenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol

Referenced as compound 211

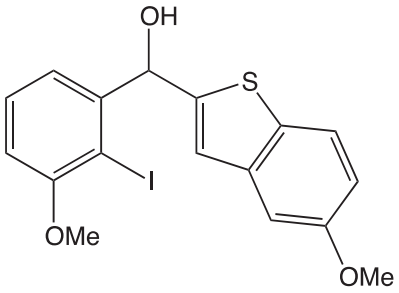


Chemical Formula : $C_{16}H_{13}IO_2S$
Molecular Weight : 396.24 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.200 g, 1.2 mmol), THF (10 ml), *n*-BuLi (0.54 ml, 1.5 mmol), 2-iodobenzaldehyde (0.372 g, 1.6 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give the desired product (0.458 g, 94 %) as a white moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.35 (s, 3H), 6.09 (d, *J*= 3.9, 1H), 6.61 (d, *J*= 4.8, 1H), 6.87 (d, *J*= 8.3, 1H), 7.08 (t, *J*= 15.6, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.28 (t, *J*= 15.6, 1H), 7.36 (d, *J*= 7.8, 1H), 7.47 (t, *J*= 15.1, 1H), 7.67 (d, *J*= 7.9, 1H), 7.86 (d, *J*= 7.9, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 55.60 (CH_3), 71.10 (CH), 99.30 (C), 111.90 (CH), 115.90 (CH), 122.70 (CH), 123.90 (CH), 128.60 (CH), 129.30 (CH), 130.40 (CH), 133.60 (C), 137.20 (C), 139.80 (CH), 140.50 (C), 146.10 (C), 157.80 (C).

(2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol

Referenced as compound 212

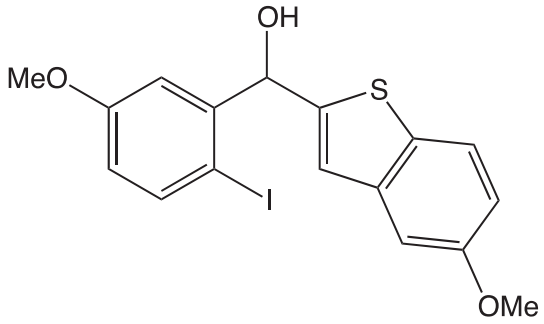


Chemical Formula : $C_{17}H_{15}IO_3S$
Molecular Weight : 426.27 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.196 g, 1.2 mmol), THF (10 ml), *n*-BuLi (0.5 ml, 1.4 mmol), 2-iodo-3-methoxybenzaldehyde (0.4 g, 1.56 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1.5 / 8.5) to give the desired product (0.416 g, 81 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.76 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.18 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.93 (m, 2H), 7.01 (s, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.40 (t, *J*= 7.8, 1H), 7.72 (d, J = 9.0, 1H).

(2-iodo-5-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol

Referenced as compound 207

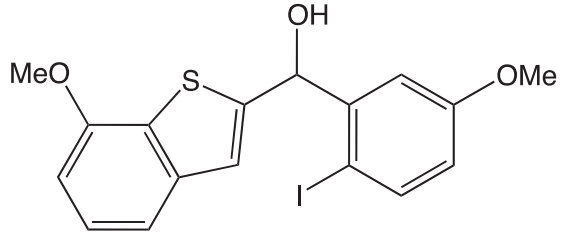


Chemical Formula : $C_{17}H_{15}IO_3S$
Molecular Weight : 426.27 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.164 g, 1 mmol), THF (10 mL), n-BuLi (0.4 mL, 1.2 mmol), 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (0.340 g, 1.3 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1.5 / 8.5) to give the desired product (0.291 g, 68 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.81 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.26 (s, 1H), 6.66 (dd, *J*= 3.2-8.8, 1H), 6.95 (dd, *J*= 2.6-8.8, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.15 (d, J = 2.6, 1H), 7.29 (d, J = 3.3, 1H), 7.63 (d, *J*= 8.8, 1H), 7.68 (d, *J*= 8.6, 1H).

(2-iodo-5-methoxyphenyl)(7-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol

Referenced as compound 216



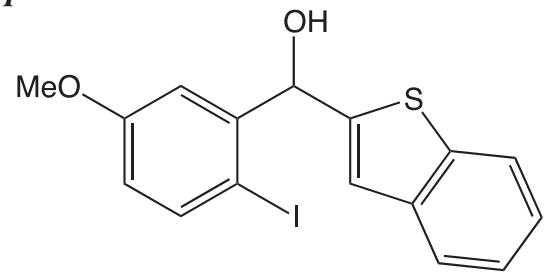
Chemical Formula : $C_{17}H_{15}IO_3S$
Molecular Weight : 426.27 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 7-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.246 g, 1.5 mmol), THF (12 ml), *n*-BuLi (0.6 ml, 1.8 mmol), 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (0.51 g, 1.95 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1.5 / 8.5) to give the desired product (0.493 g, 77 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.76 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.00 (d, *J*= 4.5, 1H), 6.61 (d, *J*= 4.7, 1H), 6.75 (dd, *J*= 3.1 - 8.8, 1H), 6.87 (d, *J*= 7.7, 1H), 7.11 (d, *J*=

1.0, 1H), 7.24 (d, *J*= 3.2, 1H), 7.28 (t, J = 2.6, 1H), 7.36 (d, J = 8.0, 1H), 7.72 (d, *J*= 8.6, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 55.50 (CH_3), 56.30 (CH_3), 71.10 (CH), 99.40 (C), 111.30 (CH), 112.80 (CH), 120.80 (CH), 123.70 (CH), 127.50 (CH), 128.80 (CH), 133.10 (C), 134.50 (C), 136.40 (CH), 137.10 (C), 146.40 (C), 155.60 (C), 157.80 (C).

benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 214

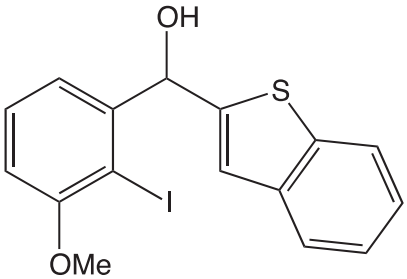


Chemical Formula: $C_{16}H_{13}IO_2S$
Molecular Weight: 396,24 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: benzo[*b*]thiophene (0.335 g, 2.5 mmol), THF (20 ml), *n*-BuLi (1 ml, 3 mmol), 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (0.85 g, 3.25 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 2 / 8) to give the desired product (0.772 g, 78 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.81 (s, 3H), 6.28 (s, 1H), 6.66 (dd, *J*= 4.0 - 11.6, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.31 (m, 3H), 7.11 (d, *J*= 1.0, 1H), 7.75 (m, 3H).

benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-3-methoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 210

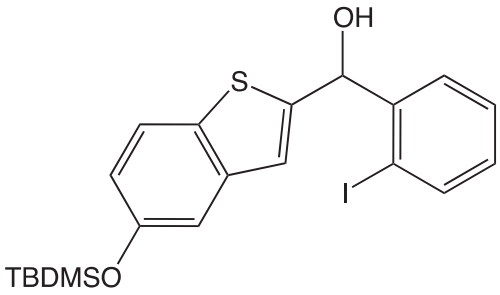


Chemical Formula: $C_{16}H_{13}IO_2S$
Molecular Weight: 396,24 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: methoxybenzo[*b*]thiophene (55 mg, 0.4 mmol), THF (4 ml), *n*-BuLi (0.17 ml, 0.5 mmol), 2-iodo-3-methoxybenzaldehyde (0.140 g, 0.54 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1.5 / 8.5) to give the desired product (0.140 g, 86 %) as a white moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.91 (s, 3H), 6.47 (s, 1H), 6.82 (dd, *J*= 8 - 1.6, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.3 (m, 3H), 7.37 (t, *J*= 7.8, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.77 (m, 1H).

(5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodophenyl)methanol

Referenced as compound 220

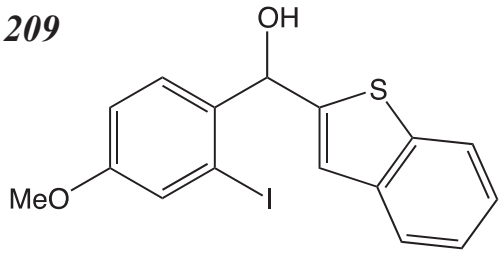


Chemical Formula : $C_{21}H_{25}IO_2SSi$
Molecular Weight : 496.48 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: (benzo[*b*]thiophen-5-yloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (0.317 g, 1.2 mmol), THF (10 ml), n-BuLi (0.52 ml, 1.44 mmol), 2-iodobenzaldehyde (0.362 g, 1.6 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1.5 / 8.5) to give the desired product (0.518 g, 87 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 1.05 (s, 15H), 6.29 (s, 1H) 7.34 (dd, *J*= 1.2 – 8.8, 1H), 7.44 (ddd, *J*= 1.2 – 1.4 – 7.8, 1H), 7.45 (ddd, *J*= 0.5 – 1.2 – 7.7, 1H), 7.54 (ddd, *J*= 1.2 – 7.5 – 7.9, 1H), 7.69 (ddd, *J*= 0.5 – 1.4 – 7.8, 1H), 7.74 (dt, *J*= 0.5 – 8.8, 1H) 7.98 (dd, *J*= 0.6 – 1.6, 1H), 7.99 (ddd, *J*= 0.5 – 1.2 – 7.6, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 18.10 (3C), 25.7 (3C), 71.40 (CH), 99.20 (CH), 111.00 (CH), 114.70 (CH), 122.30 (CH), 123.70 (CH), 128.90 (CH), 129.80 (CH), 130.20 (CH), 133.40 (C), 137.10 (C), 139.60 (CH), 140.30 (C), 145.00 (C).

benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-4-methoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 209

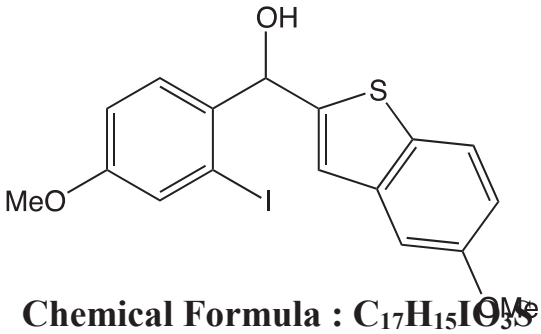


Chemical Formula : $C_{16}H_{13}IO_2S$
Molecular Weight : 396.24 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: benzo[*b*]thiophene (0.250 g, 1.86 mmol), THF (15 ml), n-BuLi (0.75 ml, 2.23 mmol), 2-iodo-4-methoxybenzaldehyde (0.630 g, 2.4 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 1.5:8.5) to give the desired product (0.619 g, 84%) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.78 (s, 3H), 6.28 (s, 1H) 6.93 - 6.97 (m, 1H), 7.16 (d, *J*= 12.3, 1H), 7.26 - 7.30 (m, 2H), 7.37 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.52 (d, *J*= 8.7, 1H), 7.61 - 7.78 (m, 3H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 55.16 (CH_3), 74.03 (CH), 98.12 (C), 104.32 (CH), 116.00 (CH), 121.03 (CH), 125.55 (CH), 127.01 (C), 127.74 (C), 128.47 (CH), 129.49 (CH), 138.75 (CH), 140.58 (C), 145.68 (C), 149.04 (C), 153.64 (C).

(2-iodo-4-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol

Referenced as compound 208



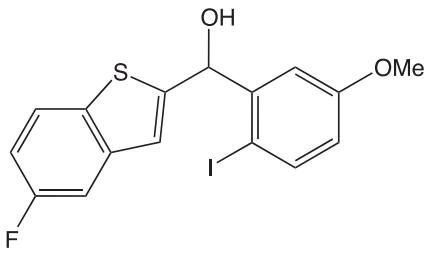
Chemical Formula : $C_{17}H_{15}IO_3S$
Molecular Weight : 426.27 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.246 g, 1.5 mmol), THF (12 ml), *n*-BuLi (0.61 ml, 1.8 mmol), 2-iodo-4-methoxybenzaldehyde (0.510 g, 1.95 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 2:8) to give the desired product (0.342 g, 54 %) as a yellow moss.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.78 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 6.93 (td, *J* = 2.5 - 8.7, 3H), 7.05 (s, 1H), 7.13 (d, *J*= 2.3, 1H), 7.36 (d, *J*= 2.6, 1H), 7.52 (d, *J*= 8.7, 1H), 7.62 (dd, *J*= 2.1 - 8.8, 1H).

(5-fluorobenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 217

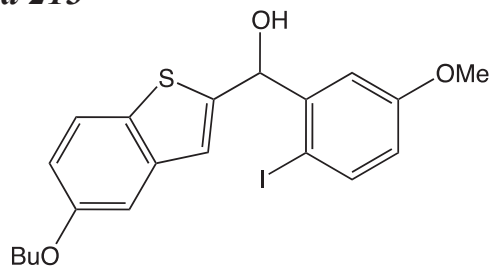


Chemical Formula : $C_{16}H_{12}FIO_2S$
Molecular Weight : 414.23 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 5-fluorobenzo[*b*]thiophene (0.200 g, 1.31 mmol), THF (11 ml), n-BuLi (0.57 ml, 1.58 mmol), 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (0.450 g, 1.70 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 1:9) to give compound the desired product (0.343 g, 64%) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 3.75 (s, 3H), 5.37 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.91 (dd, *J*= 2.9 – 8.7, 1H), 7.08 (dd, *J*= 0.5 - 2.9, 1H), 7.1 (dd, *J*= 1.5 - 8.9, 1H), 7.15 (dd, *J*= 1.5 – 1.9, 1H), 7.28 (dd, *J*= 0.5 - 8.7, 1H), 7.32 (dd, *J*= 0.5 – 1.9, 1H), 7.58 (dt, *J*= 0.5 – 8.8, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 54.60 (CH_3), 71.30 (CH), 97.60 (C), 110.80 (CH), 114.30 (CH), 116.70 (CH), 120.90 (CH), 123.70 (CH), 127.50 (CH), 133.00 (C), 136.40 (CH), 137.20 (C), 140.20 (C), 146.00 (C), 157.70 (C), 160.90 (C).

(5-butoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanol

Referenced as compound 213

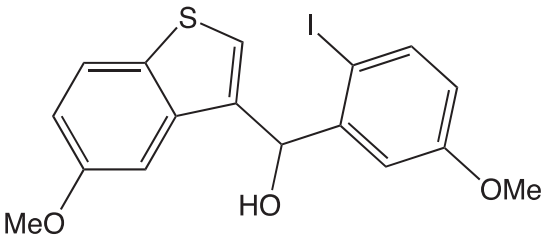


Chemical Formula : $C_{20}H_{21}IO_3S$
Molecular Weight : 468.35 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 5-butoxybenzo[*b*]thiophene (0.150 g, 0.73 mmol), THF (6 ml), *n*-BuLi (0.32 ml, 0.88 mmol), 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (0.248 g, 0.95 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give compound the desired product (0.168 g, 50 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 0.97 (t, *J*= 7.4, 3H), 1.41 - 1.53 (m, 3H), 1.71 - 1.79 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.96 (t, *J* = 6.8, 2H), 6.23 (d, *J* = 3.2, 1H), 6.64 (dd, *J*= 3.0-8.7, 1H), 6.92 (dd, *J*= 2.5 - 8.9, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.12 (d, *J*= 2.5, 1H), 7.27 (d, *J*= 3.2, 1H), 7.60 (d, *J*= 2.6, 1H), 7.68 (d, *J*= 2.6, 1H).

(2-iodo-5-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-3-yl)methanol

Referenced as compound 221

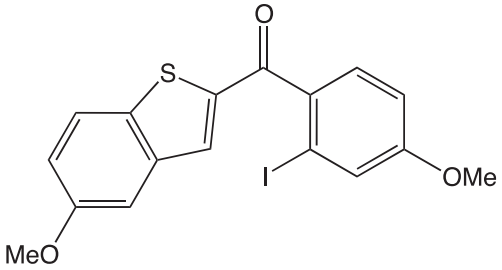


Chemical Formula : $C_{17}H_{15}IO_3S$
Molecular Weight : 426.27 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 1–thiophen-2-yl-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)ethanol, scale: 3-bromo-5-methoxybenzo[*b*]thiophene (0.350 g, 1.44 mmol), THF (12 ml), n-BuLi (0.72 ml, 1.73 mmol), 2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (0.490 g, 1.87 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 2 / 8) to give the desired product (0.319 g, 52 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.75 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 6.00 (d, *J* = 4.4, 1H), 6.60 (d, *J*= 5.5, 1H), 6.75 (dd, *J*= 3.0 - 8.7, 1H), 6.93 (dd, *J*= 2.8 - 8.7, 1H), 7.05 (s, 1H) 7.25 (d, *J*= 3.2, 1H), 7.32 (d, *J*= 2.6, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.74 (d, *J*= 9.0, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 55.40 (CH_3), 56.40 (CH_3), 71.80 (CH), 99.40 (C), 111.10 (CH), 112.10 (CH), 115.40 (CH), 120.80 (CH), 121.60 (CH), 129.10 (C), 129.30 (CH), 136.50 (CH), 137.40 (C), 138.10 (C), 146.20 (C), 157.70 (C), 158?70 (C).

(2-iodo-4-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone

Referenced as compound 224

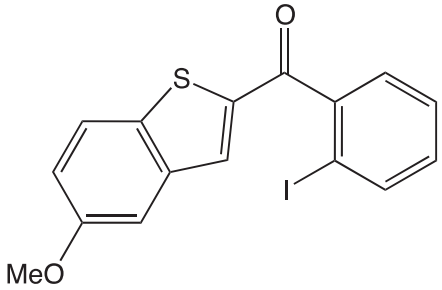


Chemical Formula: $C_{17}H_{13}IO_3S$
Molecular Weight: 424.25 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale(2-iodo-4-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol (0.335 g, 0.80 mmol), MnO_2 (0.400 g), ACN (18 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 1.5/8.5) to give compound the desired product (0.318 g, 95 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.75 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 6.96 (dd, *J* = 2.4 - 8.7, 1H), 7.13 (dd, *J*= 2.5 - 8.8, 1H), 7.21 (d, *J*= 2.7, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.41 (d, *J*= 8.4, 1H), 7.48 (d, *J*= 2.6, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.72 (d, *J*= 3.7, 1H), 7.74 (d, *J*= 4.0, 1H).

(2-iodophenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone

Referenced as compound 227



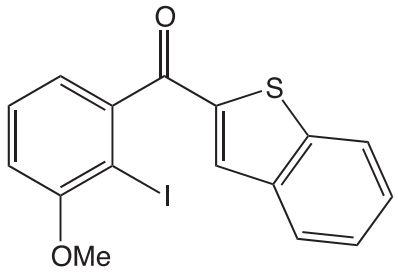
Chemical Formula : $C_{16}H_{11}IO_2S$
Molecular Weight : 394.23 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale (2-iodophenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanol (0.400 g, 1 mmol), MnO_2 (0.520 g, 6 mmol), ACN (22 ml).

The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give the desired product (0.398 g, 99 %) as a white moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 4.00 (s, 3H), 7.14 (d, *J* = 7.5, 1H), 7.32 – 7.37 (m, 1H), 7.43 (m, *J* = 8.0, 1H), 7.57 – 7.63 (m, 3H), 7.76 (s, 1H) 8.02 (d, *J*= 8.0, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 55.70 (CH_3), 91.40 (C), 111.10 (CH), 115.40 (CH), 125.80 (CH), 127.80 (CH), 129.10 (CH), 129.40 (CH), 130.40 (CH), 137.20 (C), 140.20 (C), 140.60 (CH), 143.60 (C), 144.90 (C), 157.80 (C), 184.40 (C).

benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-3-methoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 226

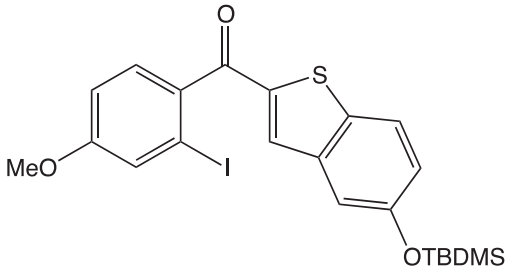


Chemical Formula : $C_{16}H_{11}IO_2S$
Molecular Weight : 394.23 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-3-methoxyphenyl)methanol (0.134 g, 0.34 mmol), MnO_2 (0.176 g, 2.1 mmol), ACN (8 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc : Cyclohexane 2:8) to give the desired product (0.117 g, 87 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 3.96 (s, 3H), 6.96 (dd, *J* =8.3 - 1.2, 1H), 7.02 (dd, *J*=7.5 - 1.3, 1H), 7.44 (m, 3H), 7.58 (d, *J*= 0.7, 1H), 7.80 (d, *J*=8.0, 1H), 7.91 (dd, *J*= 8.2 - 0.9, 1H).

(5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-4-methoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 235

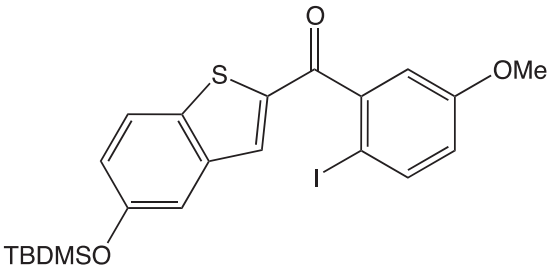


Chemical Formula : $C_{22}H_{25}IO_3SSi$
Molecular Weight : 524,49 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale (5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-4-methoxyphenyl)methanol (0.500 g, 0.95 mmol), MnO_2 (0.490 g, 5.7 mmol), ACN (23 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give the desired product (0.341 g, 68 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 0.50 (s, 6H), 0.75 (s, 9H), 3.87 (s, 3H), 6.85 (dd, *J* = 2.5 - 8.3, 1H), 6.95 (dd, *J*= 0.6 – 2.5, 1H), 7.33 (dd, *J* = 1.2 - 8.9, 1H) 7.45 (ddd, *J*= 0.5 – 1.2 – 1.7, 1H), 7.56 (d, *J*= 0.5 – 8.3, 1H), 7.64 (dd, *J*= 0.5 - 8.9, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 26.00 (6C), 55.50 (CH_3), 71.20 (CH), 96.30 (C), 114.60 (CH), 120.40 (CH), 123.70 (CH), 125.30 (CH), 127.50 (CH), 127.60 (CH), 127.80 (CH), 133.00 (C), 136.90 (C), 137.20 (C), 140.20 (C), 146.00 (C), 164.20 (C).

(5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 231

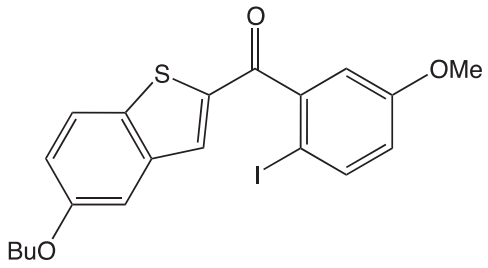


Chemical Formula : $C_{22}H_{25}IO_3SSi$
Molecular Weight : 524.49 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: (5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5 methoxyphenyl)methanol (0.225 g, 0.43 mmol), MnO_2 (0.220 g, 2.56 mmol), ACN (10 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give the desired product (0.210 g, 93 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 0.18 (s, 6H), 0.97 (s, 9H), 3.80 (s, 3H), 6.78 (dd, *J* = 3.0 - 8.8, 1H), 6.97 (d, *J*= 3.0, 1H), 7.04 (dd, *J* = 2.4 - 8.8, 1H) 7.21 (d, *J*= 2.2, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.75 (dd, *J*= 8.6 - 14.2, 1H).

(5-butoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 229

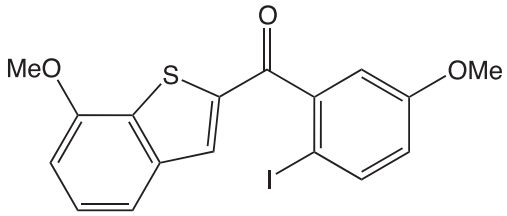


Chemical Formula : $C_{20}H_{19}IO_3S$
Molecular Weight : 466.33 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: (5-butoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanol (0.160 g, 0.34 mmol), MnO_2 (0.180 g, 2 mmol), ACN (8 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give the desired product (0.159 g, 99 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 0.97 (t, J= 7.3, 3H), 1.49 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.98 (t, J=6.6, 2H), 6.80 (dd, *J* = 8.7 - 3, 1H), 6.99 (d, *J*=3, 1H), 7.15 (dd, *J*= 2.4 - 9, 1H), 7.22 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.54 (d, *J*= 0.6, 1H), 7.77 (t, *J*= 8.7, 2H).

(2-iodo-5-methoxyphenyl)(7-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone

Referenced as compound 232

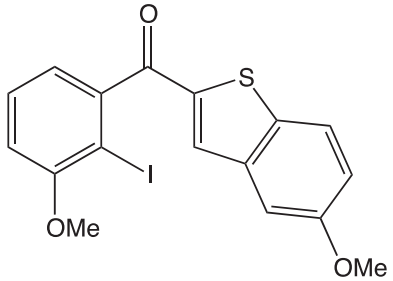


Chemical Formula : $C_{17}H_{13}IO_3S$
Molecular Weight : 424.25 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: (7-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanol (0.426 g, 1 mmol), MnO_2 (0.520 g, 6 mmol), ACN (22.5 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give the desired product (0.342 g, 54 %) as a white moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 3.80 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 6.79 (dd, *J* =3.2 - 8.7, 1H), 6.87 (d, *J*= 7.8, 1H), 6.97 (d, *J*= 3.2, 1H), 7.33 (t, *J*= 7.7, 1H), 7.42 (d, *J*= 8.1, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.76 (d, *J*= 8.8, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 55.50 (CH_3), 56.30 (CH_3), 91.10 (C), 111.30 (CH), 112.90 (CH), 120.90 (CH), 127.50 (CH), 128.80 (CH), 129.30 (CH), 134.50 (C), 136.40 (CH), 137.10 (C), 143.60 (C), 144.90 (C), 155.30 (C), 157.60 (C), 184.30 (C).

(2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone

Referenced as compound 228



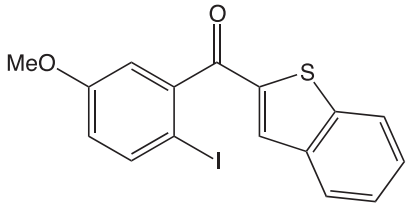
Chemical Formula : $C_{17}H_{13}IO_3S$
Molecular Weight : 424.25 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-

iodo-3-methoxyphenyl)methanol (0.416 g, 0.976 mmol), MnO_2 (0.500 g), ACN (21 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 2 / 8) to give the desired product (0.340 g, 82 %) as a yellow moss.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.81 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.93 (dd, *J* =1.3 - 8.2, 1H), 7.00 (dd, *J*= 1.2 - 7.6, 1H), 7.12 (dd, *J*= 2.6 - 8.8, 1H), 7.18 (d, *J*= 8.8, 1H), 7.41 (t, *J*= 7.8, 1H), 7.50 (s, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 55.50 (CH_3), 56.50 (CH_3), 84.20 (C), 111.10 (CH), 111.80 (CH), 115.40 (CH), 125.90 (CH), 129.10 (CH), 129.40 (CH), 137.20 (C), 140.20 (C), 143.70 (C), 144.30 (C), 157.30 (C), 158.90 (C), 184.50(C).

benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone

Referenced as compound 230

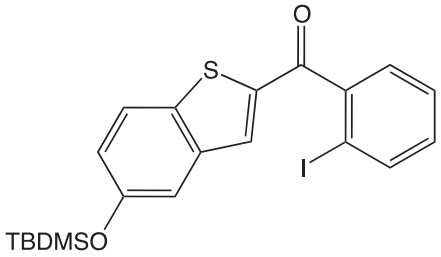


Chemical Formula : $C_{16}H_{11}IO_2S$
Molecular Weight : 394.23 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanol, (0.773 g, 1.95 mmol), MnO_2 (1.02 g, 11.7 mmol), ACN (40 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 2 / 8) to give the desired compound (0.730 g, 95 %) as a white moss.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 3.80 (s, 3H), 6.8 (dd, *J*= 3.1 - 8.7, 1H),), 6.98 (d, *J*= 3.1, 1H),7.38 (t, *J*= 7.6, 1H) 7.48 (t, *J*= 6.8, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.78 (d, *J*= 8.6, 1H), 7.82 (d, *J*= 8.1, 1H), 7.90 (d, *J*= 8.2, 1H).

(5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodophenyl)methanone

Referenced as compound 236

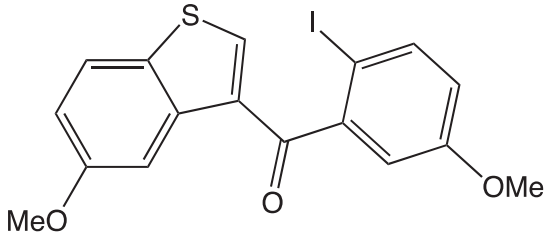


Chemical Formula : $C_{21}H_{23}IO_2SSi$
Molecular Weight : 494.46 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: (5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodophenyl)methanol (0.470 g, 0.95 mmol), MnO_2 (0.490 g, 5.68 mmol), ACN (23 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9) to give compound the desired product (0.465 g, 99 %) as a yellow oil.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 0.19 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 7.13 (dd, *J*=2.4 - 8.8, 1H), 7.32 - 7.36 (m, 1H), 7.52 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.56 - 7.59 (m, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.96 (d, *J*= 8.4, 1H), 8.01 (d, *J*= 8.1, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 25.70 (6C), 79.10 (CH_3), 92.83 (CH), 115.76 (CH), 123.03 (CH), 124.18 (CH), 128.10 (CH), 131.79 (CH), 134.44 (CH), 135.82 (C), 139.28 (CH), 140.21 (C), 142.63 (C), 143.43 (C), 153.23 (C), 190.94 (C).

(2-iodo-5-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-3-yl)methanone

Referenced as compound 237



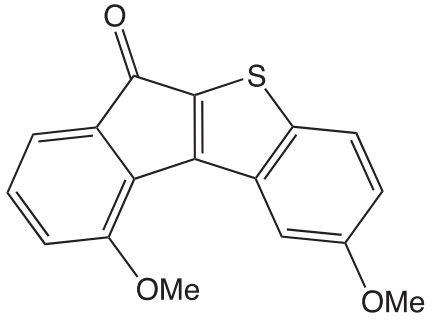
Chemical Formula : $C_{17}H_{13}IO_3S$
Molecular Weight : 424.25 g.mol^{-1}

Following the synthesis of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone, scale: (2-iodo-5-methoxyphenyl)(5-

methoxybenzo[*b*]thiophen-3-yl)methanol (0.250 g, 0.59 mmol), MnO_2 (0.352 g, 3.52 mmol), ACN (14 ml).
The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc / Cyclohexane : 1 / 9).
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.96 (dd, *J* =3.4 – 9.1, 1H), 7.21 (m, 2H) 7.60 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.85 (d, *J*= 8.5, 1H), 7.98 (d, *J*=9.1, 1H).

2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 243

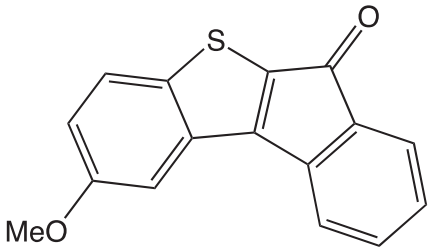


Chemical Formula : $C_{17}H_{12}O_3S$
Molecular Weight : 296.34 g.mol^{-1}

This compound was synthesized in accordance with the same procedure reported in the literature.[205]
To a stirred solution of (2-iodo-3-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone (0.330 g, 0.8 mmol) in DMF (10 ml) was added $Pd(OAc)_2$ (9 mg, 0.04 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (30 mg, 0.08 mmol) and K_2CO_3 (0.216 g, 1.76 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min before getting gradually warmed to 130°C and the stirring was continued for another 18h. After cooling to room temperature, the dark colored solution was filtered using a silica pad, water was added (10 ml), extracted with DCM (3×20 mL), dried with Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The dark red solid was purified by silica gel flash column chromatography (AcOEt/Cyclohexane, 20/80) to afford the desired product as a red solid (0.196 g, 85 %).
Mp: 220-221°C.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 3.88 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 7.11 (dd, J= 2.5 - 7.3, 1H), 7.17 (dd, *J*= 2.7 - 9.0, 1H), 7.29 (d, J= 2.9, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.9, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.9, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 55.08 (CH_3), 56.02 (CH_3), 107.32 (CH), 116.99 (CH), 118.60 (CH), 120.21 (CH), 125.20 (CH), 131.49 (C), 132.87 (C), 135.17 (CH), 137.47 (C), 138.39 (C), 140.01 (C), 151.40 (C), 152.17 (CH), 157.80 (C), 186.27 (C).

2-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 242



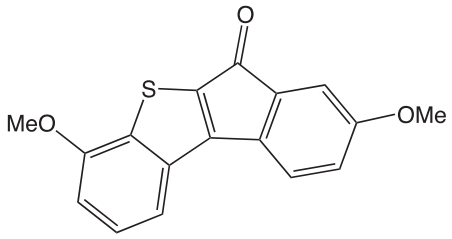
Chemical Formula : $C_{16}H_{10}O_2S$
Molecular Weight : 266.31 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (2-iodophenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone (0.360 g, 0.91 mmol)) in DMF (15 ml), $Pd(OAc)_2$ (10 mg, 0.046 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (34 mg, 0.091 mmol) and K_2CO_3 (0.252 g, 1.83 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / cyclohexane : 3 / 7) to give the desired product (0.224 g, 92 %) as an orange solid.
Mp: 201-202°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 4.01 (s, 3H), 7.18 (d, J= 7.9, 1H), 7.30 (t, *J*= 7.6, 1H), 7.47 - 7.58 (m, 3H), 7.78 (d, *J*= 7.2, 1H), 7.96 (d, J = 7.9, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 61.26 (CH_3), 113.66 (CH), 122.13 (CH), 125.84 (CH), 129.01 (CH), 133.38 (CH), 133.85 (C), 133.98 (C), 137.96 (C), 139.82 (CH), 140.91 (C), 141.04 (C), 141.50 (C), 144.54 (C), 158.62 (CH), 159.84 (C).

HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{10}NaO_2S$ [MNa^+]: 289.0294; found: 289.0299.

4,8-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 247

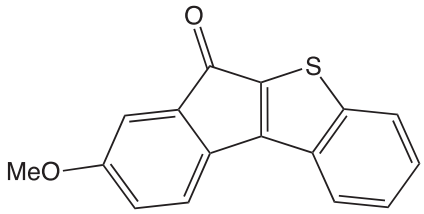


Chemical Formula : $C_{17}H_{12}O_3S$
Molecular Weight : 296.34 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (2-iodo-5-methoxyphenyl)(7-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone (0.300 g, 0.71 mmol)) in DMF (11 ml), $Pd(OAc)_2$ (8 mg, 0.035 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (26 mg, 0.07 mmol) and K_2CO_3 (0.195 g, 1.42 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 3 / 7) to give the desired product (0.184 g, 87 %) as a red solid.
Mp: 231-232°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 3.82 (s, 3H), 4.0 (s, 3H), 6.97 (dd, J= 2.5 - 8.0, 1H), 7.07 (d, *J*= 2.5, 1H), 7.18 (d, *J*= 8.0, 1H), 7.56 (t, *J*= 7.9, 1H), 7.68 (d, J = 8.0, 1H), 7.93 (d, J= 7.9, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 56.24 (CH_3), 56.47 (CH_3), 108.98 (CH), 112.62 (CH), 117.03 (CH), 117.52 (CH), 122.03 (CH), 128.52 (CH), 131.72 (C), 133.02 (C), 135.01 (C), 136.29 (C), 138.95 (CH), 154.91 (C), 155.07 (C), 160.63 (CH), 186.64 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}O_3S$ [MH^+]: 297.0580; found: 297.0580.

8-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 245

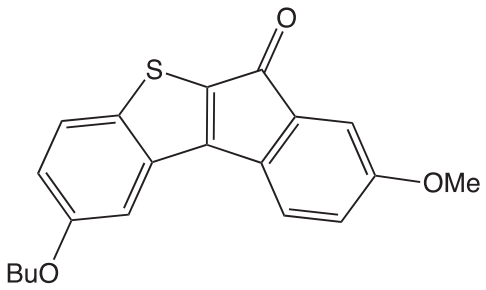


Chemical Formula : $C_{16}H_{10}O_2S$
Molecular Weight : 266.31 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone (0.73 g, 1.85 mmol) in DMF (20 ml), $Pd(OAc)_2$ (21 mg, 0.18 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (68 mg, 0.09 mmol)) and K_2CO_3 (0.511 g, 3.7 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt : cyclohexane 3:7) to give the desired product (0.44 g, 90%) as an red solid.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 3.80 (s, 3H), 6.92 (dd, J= 2.6-7.9, 1H), 7.01 (d, *J*= 2.3, 1H), 7.5 3- 7.56 (m, 2H), 7.64 (d, *J*= 7.7, 1H), 8.08 - 8.10 (m, 1H), 8.27 - 8.29 (m, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 55.20 (CH_3), 112.49 (CH), 116.87 (CH), 121.95 (CH), 125.16 (CH), 125.45 (CH), 126.77 (CH), 128.76 (CH), 131.63 (C), 131.78 (C), 134.76 (C), 138.97 (C), 148.10 (C), 154.25 (C), 160.55 (C), 186.58 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}O_2S$ [MH^+]: 267.0474; found: 267.0465.

2-butoxy-8-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 244

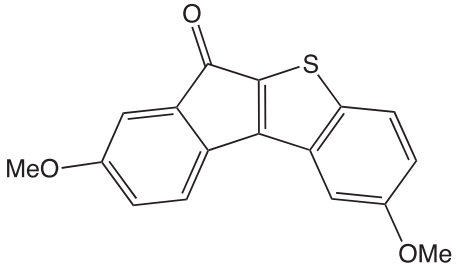


Chemical Formula : $C_{20}H_{18}O_3S$
Molecular Weight : 338.42 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : 5-butoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone (0.150 g, 0.32 mmol)) in DMF (5 ml), $Pd(OAc)_2$ (4 mg, 0.016 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (12 mg, 0.032 mmol) and K_2CO_3 (89 mg, 0.64 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 3 / 7) to give the desired product (0.100 g, 93 %) as a red solid.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 0.97 (t, J = 7.3, 3H), 1.44 - 1.54 (m, 2H), 1.72 - 1.79 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.11 (t, *J* = 6.4, 2H), 6.89 (dd, *J*= 2.5 - 8.0, 1H), 6.99 (d, *J*= 2.5, 1H), 7.15 (dd, *J*= 2.5 - 9.2, 1H), 7.56 (d, J = 2.3, 1H), 7.69 (d, J= 8.1, 1H), 7.93 (d, J =8.7).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ= 13.71 (CH_3), 18.73 (CH2), 26.27, 30.70 (CH2), 55.6 (CH3), 67.69 (CH2), 106.28 (CH), 111.63 (CH), 116.34 (CH), 119.06 (CH), 121.54 (CH), 125.52 (C), 131.32 (CH), 132.18 (C), 135.18 (C), 138.34 (C), 140.05 (C), 153.03 (C), 157.70 (C), 159.82 (C), 186.06 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{20}H_{19}O_3S$ [MH^+]: 339.1049; found: 339.1049.

2,8-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 238

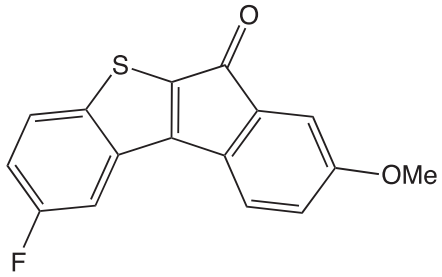


Chemical Formula : $C_{17}H_{12}O_3S$
Molecular Weight : 296.34 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (2-iodo-5-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)methanone (0.268 g, 0.63 mmol) in DMF (7 ml), $Pd(OAc)_2$ (7 mg, 0.03 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (24 mg, 0.06 mmol)) and K_2CO_3 (0.175 g, 1.26 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt : cyclohexane 3:7) to give the desired product (0.143 g, 76 %) as an red solid.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.83 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.95 (dd, *J* = 2.5 - 8.2, 1H), 7.05 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.21 (d, *J* = 2.5 - 9.0, 1H)), 7.65 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.76 (d, *J*=8.2, 1H), 7.99 (d, *J*= 8.9, 1H).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}O_3S$ [MH^+]: 297.0580; found: 297.0574.

2-fluoro-8-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 248

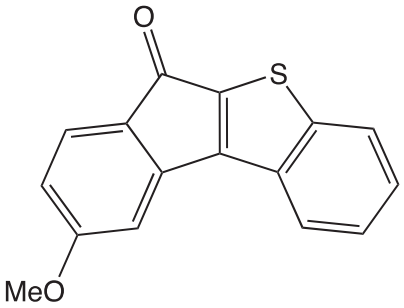


Chemical Formula : $C_{16}H_9FO_2S$
Molecular Weight : 284.30 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (5-fluorobenzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone (0.315 g, 0.76 mmol) in DMF (12 ml), $Pd(OAc)_2$ (9 mg, 0.038 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (28 mg, 0.076 mmol)) and K_2CO_3 (0.211 g, 1.58 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / cyclohexane : 3 / 7) to give the desired product (0.177 g, 82 %) as an red solid.
Mp: 215-216°C.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.76 (s, 3H), 8.29 (dd, *J* = 2.8 – 6.8, 1H), 8.40 (t, *J*= 2.8, 2H), 9.02 (d, *J* = 8.0, 1H)), 9.44 - 9.46 (m, 2H).
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ= 60.98 (CH_3), 115.11 (C), 115.36 (CH), 117.36 (C), 121.84 (CH), 122.11 (CH), 122.37 (CH), 127.00 (CH), 132.02 (CH), 136.25 (C), 137.26 (C), 141.95 (C), 143.32 (C), 148.55 (C), 165.32 (C), 191.30 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{10}FO_2S$ [MH^+]: 285.0380; found: 285.0387.

9-methoxy-6H-benzo[*b*]indeno[1,2-d]thiophen-6-one

Referenced as compound 240

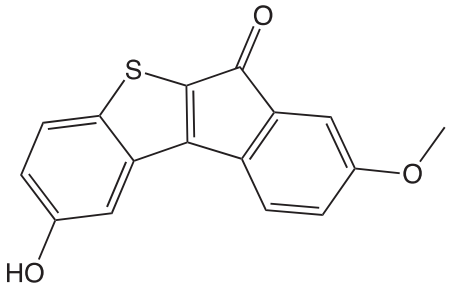


Chemical Formula : $C_{16}H_{10}O_2S$
Molecular Weight : 266.31 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : benzo[*b*]thiophen-2-yl(2-iodo-4-methoxyphenyl)methanone (0.6 g, 1.55 mmol) in DMF (17 ml), $Pd(OAc)_2$ (18 mg, 0.08 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (57 mg, 0.16 mmol)) and K_2CO_3 (0.43 g, 3.1 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt : cyclohexane 3:7) to give the desired product (0.310 g, 75 %) as an orange solid.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ= 3.89 (s, 3H), 6.56 (dd, *J* = 2.3-8.0, 1H), 7.01 (d, *J*= 2.3, 1H), 7.24 (s, 1H)), 7.45 (m, 3H), 7.86 (dd, *J*= 1.5-7, 1H), 8.01 (dd, *J*= 1.5-6.5, 1H).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{16}H_{11}O_2S$ [MH^+]: 267.0474; found: 267.0475.

2-hydroxy-8-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 246



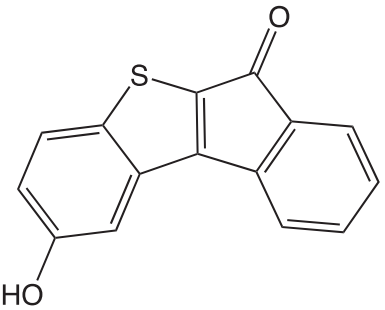
Chemical Formula : $C_{16}H_{10}O_3S$
Molecular Weight : 282.31 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-5-methoxyphenyl)methanone (0.200 g, 0.38 mmol) in DMF (6 ml), $Pd(OAc)_2$ (5 mg, 0.02 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (15 mg, 0.04 mmol)) and K_2CO_3 (0.105 g, 0.76 mmol).

The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / cyclohexane : 4 / 6) to give the desired product (0.071 g, 66 %) as a dark brown solid.
Mp: 219-220°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 3.80 (s, 3H), 6.92 (dd, J= 2.4 - 7.9, 1H), 6.99 (d, *J* = 2.4, 1H), 7.08 (dd, *J*= 2.3 - 8.8, 1H), 7.45 (d, *J*= 7.9, 1H), 7.48 (d, *J*= 2.3, 1H), 7.87 (d, *J*= 9, 1H), 9.94 (s, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 55.69 (CH_3), 108.36 (CH), 112.02 (CH), 116.35 (CH), 119.07 (CH), 120.89 (CH), 125.61 (CH), 131.51 (C), 132.50 (C), 135.12 (C), 138.52 (C), 138.78 (C), 152.79 (C), 156.36 (C), 159.86 (C), 186.14 (C).
HRMS (ESI^{+}): m/z calcd for $C_{16}H_{11}O_3S$ [MH^{+}]: 283.0423; found: 283.0429.

2-hydroxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 250

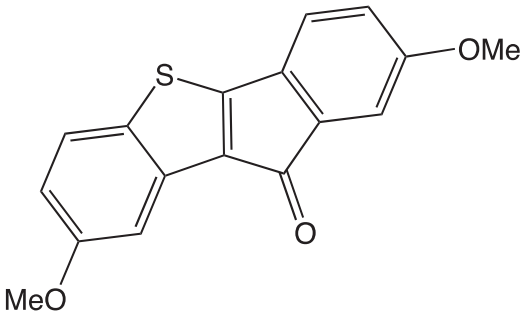


Chemical Formula : $C_{15}H_8O_2S$
Molecular Weight : 252.29 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodophenyl)methanone (0.260 g, 0.68 mmol) in DMF (12 ml), $Pd(OAc)_2$ (8 mg, 0.034 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (25 mg, 0.068 mmol)) and K_2CO_3 (0.189 g, 1.37 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / Cyclohexane : 3 / 7) to give the desired product (0.094 g, 55 %) as an orange solid.
Mp: 262-263°C.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 7.1 (dd, *J*= 2.3 - 8.8, 1H), 7.26 (td, *J*= 0.9 - 7.8, 1H), 7.44 - 7.6 (m, 4H), 7.92(d, *J*= 8.9, 1H), 9.96 (s, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 108.26 (CH), 119.03 (CH), 120.04 (CH), 123.63 (CH), 125.67 (CH), 128.38 (CH), 132.71 (C), 134.52 (CH), 136.34 (C), 136.74 (C), 138.63 (C), 139.55 (C), 151.75 (C), 156.48 (C), 186.55.

2,8-dimethoxy-10*H*-benzo[*b*]indeno[2,1-*d*]thiophen-10-one

Referenced as compound 251

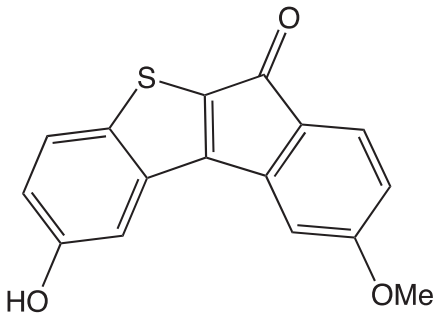


Chemical Formula : $C_{17}H_{12}O_3S$
Molecular Weight : 296.34 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (2-iodo-5-methoxyphenyl)(5-methoxybenzo[*b*]thiophen-3-yl)methanone (0.200 g, 0.47 mmol) in DMF (8 ml), $Pd(OAc)_2$ (6 mg, 0.08 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (57 mg, 0.16 mmol)) and K_2CO_3 (0.43 g, 3.1 mmol).
The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt : cyclohexane 3:7) to give the desired product (0.080 g, 57 %) as an red solid.
Mp: 189-190°C
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ= 3.93 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 6.94 (dd, *J*= 2.8 – 8.0, 1H), 7.05 (d, *J*= 2.4, 1H), 7.20 (dd, *J*= 2.4 – 8.8, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.99 (d, *J*= 9.2, 1H).
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO): δ= 56.20 (CH_3), 56.28 (CH_3), 106.29 (CH), 112.31 (CH), 117.02 (CH), 119.46 (CH), 122.15 (C), 126.17 (CH), 131.90 (C), 132.75 (C), 135.84 (C), 138.94 (C), 140.77 (C), 153.60 (C), 158.91 (C), 160.46 (C), 186.65 (C).
HRMS (ESI$^+$): m/z calcd for $C_{17}H_{13}O_3S$ [MH^+]: 297.0580; found: 297.0580.

2-hydroxy-9-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one

Referenced as compound 249



Chemical Formula : $C_{16}H_{10}O_3S$
Molecular Weight : 282.31 g.mol^{-1}

Following the synthesis of 2,10-dimethoxy-6*H*-benzo[*b*]indeno[1,2-*d*]thiophen-6-one, scale : (5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)benzo[*b*]thiophen-2-yl)(2-iodo-4-methoxyphenyl)methanone (0.160 g, 0.40 mmol) in DMF (7 ml), $Pd(OAc)_2$ (5 mg, 0.02 mmol), $Cy_3P.HBF_4$ (15 mg, 0.04 mmol)) and K_2CO_3 (0.110 g, 0.4 mmol).

The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt / cyclohexane : 3 / 7) to give the desired product (0.060 g, 55 %) as an orange solid.

Mp: 250-251°C

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ= 3.90 (s, 3H), 6.70 (dd, *J*= 2.3 – 8.1, 1H), 7.07 (dd, *J*= 2.4 – 8.8, 1H), 7.14 (d, J=2.1, 1H), 7.40 (d, *J*= 8.1, 1H), 7.57 (d, J=2.2, 1H), 7.90 (d, J= 8.9, 1H), 9.92 (s, 1H).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO) δ= 56.46 (CH_3), 108.71 (CH), 109.24 (CH), 110.66 (CH), 119.09 (CH), 126.07 (C), 126.17 (CH), 129.00(C), 133.17 (C), 138.59 (C), 139.04 (C), 142.44 (C), 150.07 (C), 156.91 (C), 165.12 (C), 185.95 (C).

CHAPITRE 5 : EVALUATIONS DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUES DES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES

Les travaux réalisés au laboratoire nous ont permis de synthétiser un grand nombre d'analogues du CV210, dont nous avons dans un premier temps évaluer la capacité à inhiber l'activité de la kinase Dyrk1A. Sur la base des résultats obtenus, nous avons alors sélectionné les composés les plus intéressants afin de mener d'autres tests biologiques.

Ainsi, et de la même façon que pour l'évaluation biologique des analogues de la CA-4, plusieurs tests de viabilité cellulaire ont été réalisés sur les dérivés tetracycliques indénobenzo[*b*]thiophènes. Les kinases DYRK étant impliquées dans le développement de nombreux cancers et notamment du glioblastome multiforme, plusieurs lignées gliales humaines et murines ont été utilisées. Nous avons également souhaité étudier la capacité ou non dont disposaient nos composés à passer la membrane plasmatique des cellules et à induire une cytotoxicité sur des lignées cellulaires spécifiques, exprimant Dyrk1A et caractéristiques du glioblastome.

Aussi, et en parallèle à ce travail, des tests additionnels sur les composés indénobenzo[*b*]thiophènes ont été réalisés. Comme expliqué précédemment, les inhibiteurs des kinases DYRK et de CK2 sont de par leurs natures et la structure des cibles thérapeutique visées, intimement liés. En collaboration avec nos partenaires, nous avons donc désiré compléter nos recherches sur une potentielle application de ces molécules à l'inhibition de la protéine CK2.

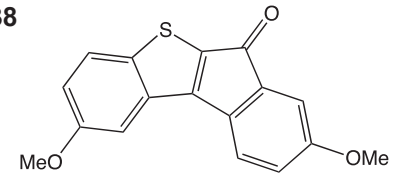
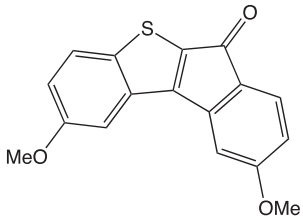
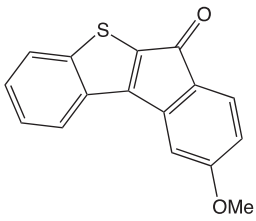
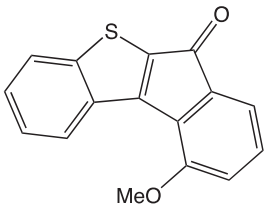
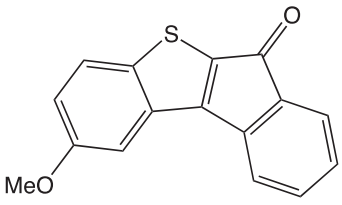
1. EVALUATION DE L'INHIBITION DE LA PROTEINE KINASE DYRK1A PAR LES DERIVES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES

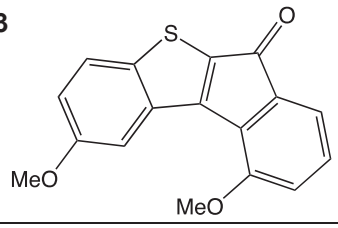
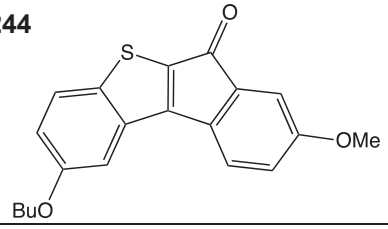
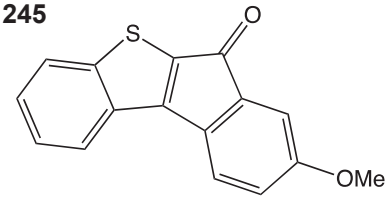
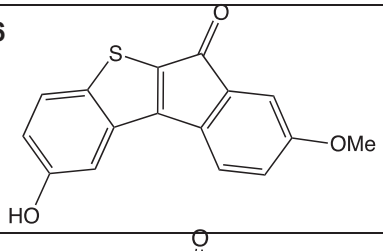
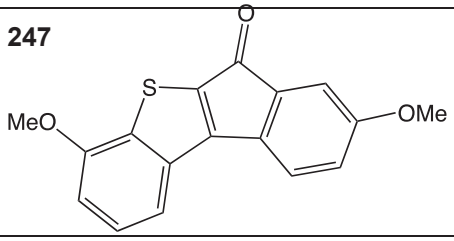
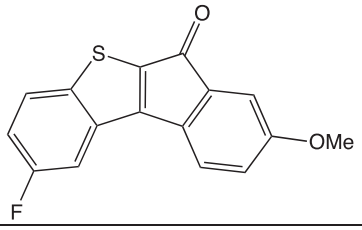
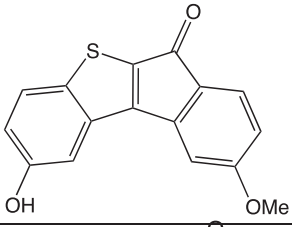
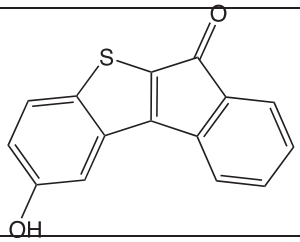
1.1. Evaluation de l'activité inhibitrice des indénobenzo[*b*]thiophènes sur la protéine kinase Dyrk1A

L'équipe du Dr Matthias Engel de l'Université de la Sarre en Allemagne a procédé à l'évaluation de l'activité inhibitrice des molécules synthétisées précédemment sur la kinase Dyrk1A principalement. Ainsi, un test mettant en jeu un peptide substrat de la kinase et de l'ATP marqué radioactivement au ^{32}P a permis de quantifier l'inhibition de l'activité enzymatique de la protéine cible *in vitro*.

Comme observé ci-dessous, certains de nos composés ont également été évalués pour leur capacité à inhiber d'autres protéines de la famille des kinases DYRK telles que Dyrk1B et Dyrk2. Malheureusement, ces deux derniers tests n'ont pu être réalisés sur toutes nos molécules.

Les résultats obtenus sont présentés dans le *Tableau 22*.

Molécule	% Inhibition (évaluation à 1 µM puis à 0,25 µM)		
	Dyrk1A	Dyrk1B	Dyrk2
238 	< 5	< 5	6,1
239 	25,3	< 5	< 5
240 	< 5	< 5	9,8
241 	< 5	< 5	< 5
242 	32,4	< 5	n.d.

243 	27,6	< 5	26,2
244 	< 5	< 5	n.d.
245 	< 5	< 5	< 5
246 	90,1	80,5	n.d.
247 	33,5	< 5	n.d.
248 	< 5	< 5	n.d.
249 	83,3	n.d.	n.d.
250 	78,9	n.d.	n.d.

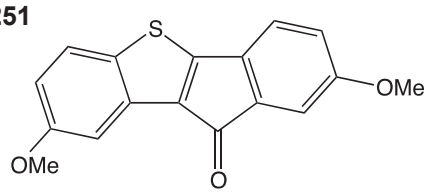
251 	**33,7**	**n.d.**	**n.d.**

Tableau 22: Pourcentage d'inhibition de l'activité des kinases Dyrk1A, Dyrk1B et Dyrk2 par les composés indénobenzo[*b*]thiophène

D'après les résultats obtenus précédemment, les valeurs de IC_{50} des composés les plus intéressants ont pu être déterminées et sont présentées dans le Tableau *23*.

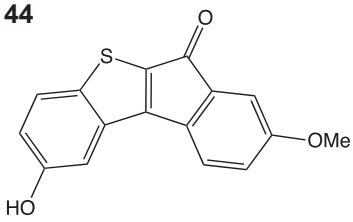
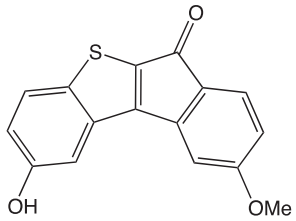
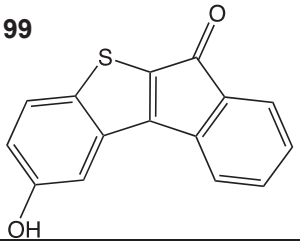
Molécule	**Dyrk1A IC_{50} (nM)**
AFA 144 	**41**
AFA 207 	**116**
AFA 199 	**105**

Tableau 23: Valeurs de IC_{50} des composés tétracycliques les plus prometteurs

Ainsi, les composés qui se montrent les plus intéressants sont les molécules **246**, **250** et **249** correspondant respectivement à l'**AFA 144**, l'**AFA 199** et l'**AFA 207**. Les valeurs de CI_{50} des composés **AFA 199** et **AFA 207** sont actuellement en cours d'étude. Le composé AFA **144** quant à lui, dispose d'une excellente activité inhibitrice sur la kinase Dyrk1A avec une valeur de CI_{50} = 41 nM, supérieure à

celle de l'harmine ou encore du composé INDY.

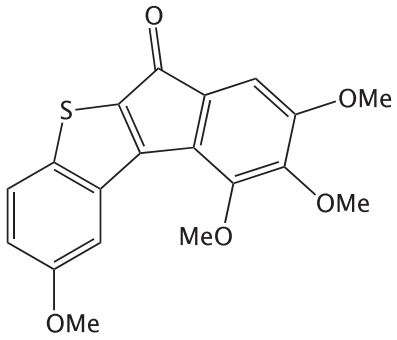
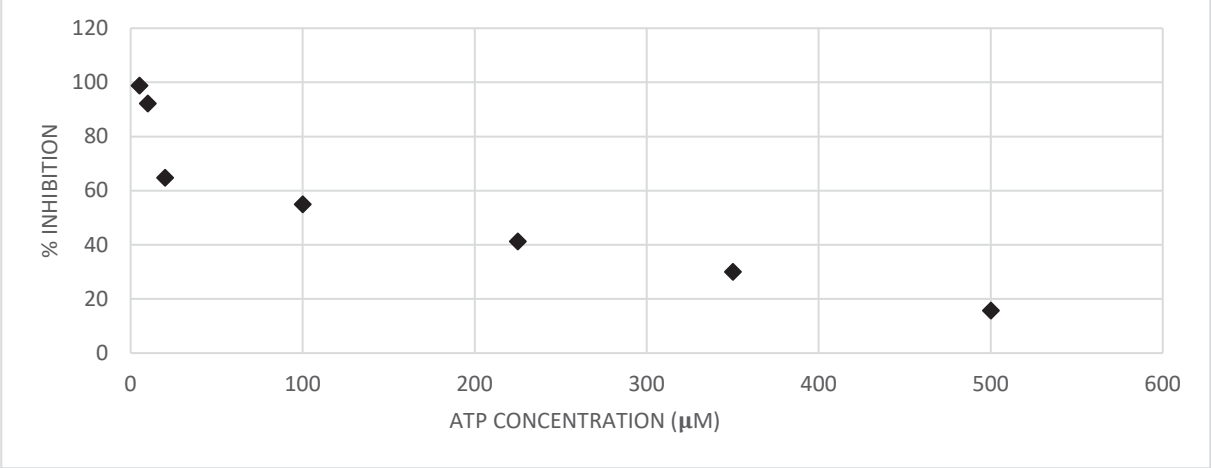


Figure 62: Structure du CV210

Comme nous pouvons aisément le constater, ces derniers possèdent tous un groupement hydroxyle –OH en position 2 du tétracycle. En accord avec les études de modélisation moléculaire réalisées précédemment, il parait évident que le remplacement du groupement méthoxy en position 2 (présent sur la molécule CV210) par un groupement donneur de liaison hydrogène tel qu'une fonction alcool, augmente l'activité du composé et permet une fixation plus forte au niveau du site actif de la kinase.
De la même façon, le greffage d'un groupement méthoxy en position 8 ou 9 du tétracycle semble favorable à une activité plus importante des composés synthétisés. L'**AFA 199**, ne possédant aucun groupement méthoxy sur la partie « EST » du tétracycle, affiche ainsi une activité légèrement moins importante que les analogues **AFA 144** et **AFA 207**. Par ailleurs, ces deux analogues ne disposent sur la partie « OUEST » que d'un seul méthoxy (en position 8 ou 9), contrairement au CV210 qui possède quant à lui un motif triméthoxybenzène. Comme décrit dans le chapitre précèdent, ce motif semble se situer hors de la poche de fixation de la protéine kinase et être trivial à l'activité du composé. Cette hypothèse est en partie confirmée par les valeurs d'IC_{50} obtenues lors des tests enzymatiques. Mais, il semble aussi intéressant de noter que la présence d'au moins un groupement méthoxy en position 8 ou 9 est à mettre en lien avec une activité plus forte des indénobenzo[*b*]thiophènes. Ce dernier interagirait donc finalement avec un ou plusieurs résidus du site de fixation à l'ATP.

1.2. Mécanisme d'inhibition du composé AFA 144-1

Nous avons ensuite étudié le mode d'inhibition de notre composé le plus actif, l'**AFA 144**. Pour se faire, nous avons cherché à étudier l'évolution du pourcentage d'inhibition de Dyrk1A, en présence de notre inhibiteur **AFA 144**, en fonction de la concentration en ATP dans le milieu (*Graphique 1*).



Graphique 1: Evolution du pourcentage d'inhibition de la kinase Dyrk1A par le composé **AFA 144** en fonction de la concentration en ATP.

Comme nous pouvons le constater, le pourcentage d'inhibition de la protéine kinase Dyrk1A va diminuer en fonction de la quantité en substrat (ici l'ATP), lorsque l'inhibiteur **AFA 144** reste à concentration constante. Ceci signifie que le mécanisme d'inhibition est de type ATP-compétitif.

2. EVALUATION DE L'EFFET CYTOTOXIQUE SUR UN PANEL DE LIGNEES CELLULAIRES

La sélection d'un panel de différentes lignées cellulaires est un point très important dans la mise au point d'évaluations biologiques précises, permettant de réellement étudier l'impact de nos composés sur le développement du glioblastome.
En effet, ces dernières doivent exprimer ou surexprimer Dyrk1A afin que nos composés puissent inhiber cette kinase au niveau intracellulaire.

Nous avons sélectionnée les lignées suivantes selon les informations contenues dans la littérature pour des lignées surexprimant Dyrk1A :[170]

- U87, lignée humaine de type glioblastome. D'origine épithéliale, elle a été obtenue à partir d'un patient masculin atteint d'un glioblastome âgé de 44 ans.

- U138, lignée humaine de type glioblastome. Elle a été obtenue à partir d'un patient masculin atteint d'un glioblastome âgé de 47 ans.

- U251, lignée humaine de type glioblastome, origine épithéliale

- bEnd.3, cellule issue du cortex cérébral d'origine murine, localisation

tissulaire : cortex cérébral, cerveau), origine endothéliale

- MDCK-8, cellule rénale issue d'une lignée canine (Madon-Darby), origine épithéliale.

Les 3 premières lignées U87, U138 et U251, toutes d'origines humaines, ont été choisies afin d'analyser véritablement l'effet de nos molécules sur des cellules endothéliales du cerveau humain.
La lignée bEnd.3, murine, a été pour sa part sélectionnée afin de vérifier la conséquence de l'administration de nos composés sur les cellules du cerveau de souris.
Enfin, la lignée MDCK-8, a été mise en présence de nos composés dans le but de contrôler l'effet de ces derniers sur des cellules non cérébrales. Ceci va notamment permettre d'analyser la spécificité et la cytotoxicité de nos composés sur des lignées cellulaires n'exprimant pas Dyrk1A.

Les tests que nous avons par la suite réalisés ont été dans un premier temps validés par la réalisation dans les conditions adéquates de répétabilité (au moins à 3 reprises, indépendamment) et après évaluation de différentes conditions expérimentales, ceci dans l'optique d'obtenir un essai le plus efficace et fiable que possible.

Le test de cytotoxicité choisi dans ce cas a été le test MTT. Le protocole de ce dernier ainsi que son fonctionnement ont déjà été détaillés précédemment lors de l'évaluation biologique des analogues de la CA-4 (Figure 38).

Afin de réaliser nos essais, nous avons ensuite utilisé les conditions suivantes :

- Croissance des cellules pendant une durée de 24h dans le milieu correspondant (EMEM ou DMEM selon les lignées cellulaires) à l'abri de la lumière, 37°C, 5% CO_2.

- Incubation des drogues à différentes concentrations pendant une durée de 48h à l'abri de la lumière, 37°C, 5% CO_2.

- Après 48h, ajout de la solution de MTT (5mg.mL^{-1}) dans la plaque de 96 puits, incubation pendant 4h à l'abri de la lumière, 37°C, 5% CO_2.

- Dissolution des cristaux violets formés à partir du MTT par ajout de DMSO (200 µL) et incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant une durée de 2h supplémentaires.

- Lecture spectrophotométrique des résultats à une longueur d'onde fixée

λ=570 nm et une longueur d'onde de référence λ_{ref} = 630 nm.

Le choix des différents composés que nous avons utilisé s'est porté sur notre composé de référence l'**AFA 144** ainsi que du régioisomère **AFA 207** et du composé sans méthoxy **AFA 199**. Nous avons aussi sélectionné l'harmine (HAR) et le témozolomide (TMZ) afin de comparer l'effet de nos dérivés avec celui de ces deux substances, respectivement inhibiteur des kinases DYRK et agent anticancéreux de référence pour le traitement du glioblastome (*Figure 63*).

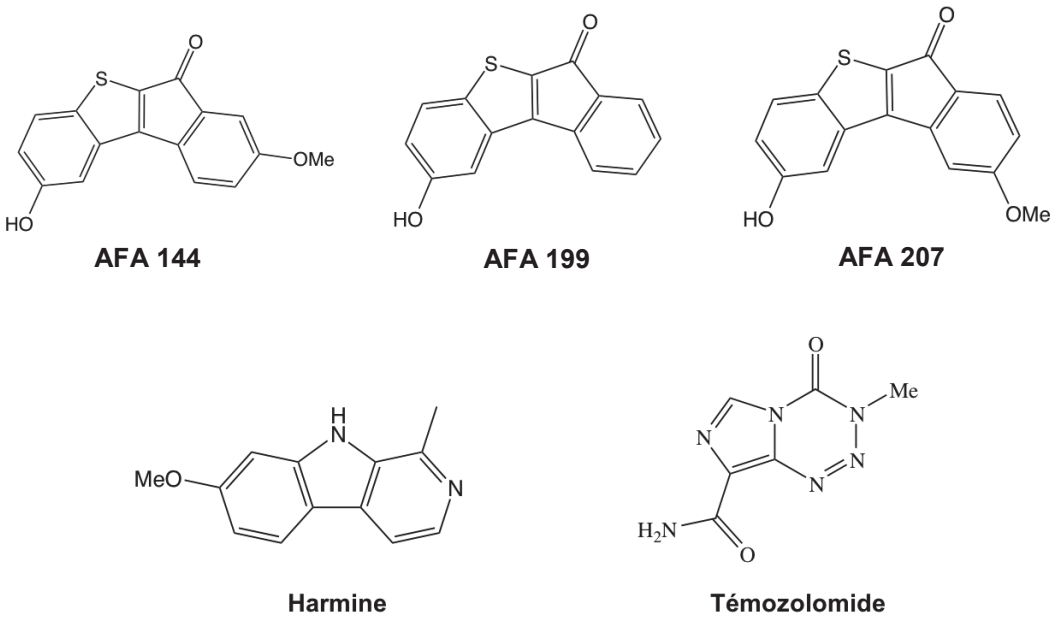


Figure 63: Différentes drogues utilisées lors de nos tests de cytotoxicité

Nous avons réalisé ces tests dans des plaques 96 puits, comme observé en Figure 64.

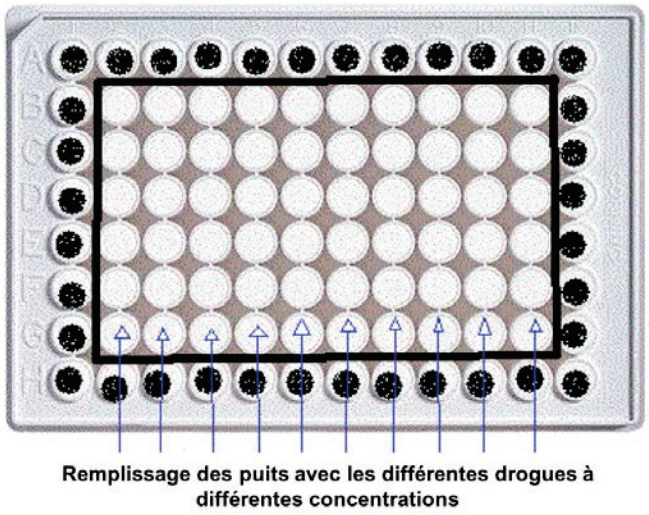


Figure 64: Utilisation de plaques 96 puits pour le test MTT

2.1. Essais MTT sur les différentes lignées cellulaires

Nous avons donc évalué l'effet cytotoxique des dérivés **AFA 144**, **AFA 199**, **AFA 207**, de l'harmine et du témozolomide (TMZ) sur les différentes lignées cellulaires sélectionnées précédemment. Le potentiel cytotoxique est quantifié par l'IC_{50}, ou concentration inhibitrice de la croissance de 50% des cellules, définie précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 24, ci-dessous.

IC_{50} (µM) / Lignées cellulaire	AFA 144	AFA 199	AFA 207	Harmine	TMZ
U87	> 200	> 200	124	> 200	24
U138	> 200	> 200	142	> 200	18
U251	> 200	> 200	> 200	> 200	100
MDCK8	> 200	> 200	> 200	42.4	n.d.
BEND-3	n.d.	n.d.	n.d.	> 200	> 200

Tableau 24: Evaluation de la viabilité cellulaire des dérivés indénobenzo[*b*]thiophènes **AFA 144**, **AFA 199**, **AFA 207**, de l'harmine et du TMZ sur un panel de plusieurs lignées cellulaires

Comme nous pouvons le constater, l'effet cytotoxique des composés synthétisés précédemment a donné des résultats intéressants, bien que les valeurs d'activités inhibitrices s'avèrent inférieures à nos attentes initiales. En effet, et en comparaison à un anticancéreux de référence tel que le TMZ, seul le composé **AFA 207** a montré des valeurs d'CI_{50} inférieures à 200 µM, de 124 µM et 142 µM sur les lignées du glioblastome U87 et U138, respectivement. Il s'est en revanche montré très peu actif sur la lignée U251.
Les autres dérivés **AFA 144** et **AFA 199** n'ont pas inhibé ou alors très faiblement la prolifération de ces lignées cellulaires, qu'elles soient caractéristiques du glioblastome ou non.
Les mêmes observations ont pu être établies avec l'harmine. En effet, on peut remarquer que cet inhibiteur n'a eu aucun impact sur les cellules U87, U138 et U251, présentant de très faibles valeurs d'IC_{50}. Paradoxalement, la lignée MDCK-8 semble être affectée par l'harmine. Ceci peut se comprendre par la très faible spécificité de ce produit qui est actif sur un grand nombre de protéines kinase différentes.
Aussi, comme attendu, le TMZ, inhibe la prolifération des lignées cellulaires du glioblastome avec des valeurs d'IC_{50} comprises entre 18 et 100 µM. Cependant, ces valeurs sont élevées au regard de ce que l'on peut attendre d'une IC_{50} d'une molécule anticancéreuse active agissant dans une lignée sensible. Les lignées de glioblastome utilisées semblent toutes résistantes. De plus, la lignée U251 semble présenter une plus grande résistance en comparaison aux 2 autres sous-types cellulaires du glioblastome, nécessitant une concentration en drogue significativement plus importante afin d'atteindre une inhibition de 50% de sa prolifération.
Enfin, la lignée bEnd.3 a montré des limitations quant à la mise en place de nos tests MTT. En effet, nous avons observé de nombreuses difficultés lors de la réalisation de ces derniers, ne distinguant soit aucune baisse de la prolifération cellulaire tumorale ou alors des résultats aberrants. La petite taille de ces cellules, problématique lors du dénombrement cellulaire, pourrait expliquer en partie ces résultats.

Ainsi, ces études nous permettent de tirer plusieurs informations et de formuler certaines hypothèses suivantes :

- Les dérivés indénobenzo[*b*]thiophènes pénètreraient très difficilement la membrane plasmatique des cellules,

- Les lignées choisies ne surexprimeraient peut-être pas suffisamment la kinase Dyrk1A, ne permettant pas d'observer un éventuel phénomène d'inhibition de la prolifération des cellules tumorales,

- Les lignées cellulaires tumorales seraient peut-être particulièrement

résistantes et surexprimeraient les pompes d'efflux : elles rejetteraient les drogues dans le milieu extracellulaire,

- Bien que les solutions contenant nos drogues soient stables et homogènes, des problèmes de solubilités à long terme pourraient être la raison de ces faibles IC_{50}.

2.2. Evaluation de l'effet synérgetique, par le test MTT, de la co administration du TMZ et de l'AFA 144

Dans le but de poursuivre les investigations et de vérifier un potentiel effet synergique du composé **AFA 144** avec d'autres principes actifs cytotoxiques, nous avons procédé à plusieurs tests MTT en présence de notre composé le plus actif et le TMZ. Les études ont été réalisées 6 fois mais uniquement sur 3 concentrations différentes, définies en fonction de la dose minimale à laquelle a pu être observé un effet thérapeutique du composé TMZ. En effet, si une augmentation de l'activité et donc une baisse d'IC_{50} est alors observée, ceci ne pourra découler que de l'administration en simultané de l'**AFA 144**.

Les résultats obtenus sur les lignées U87 et U138 sont présentés ci-après, par les Figure 65 et Figure 66.

2.2.1. Lignée U87

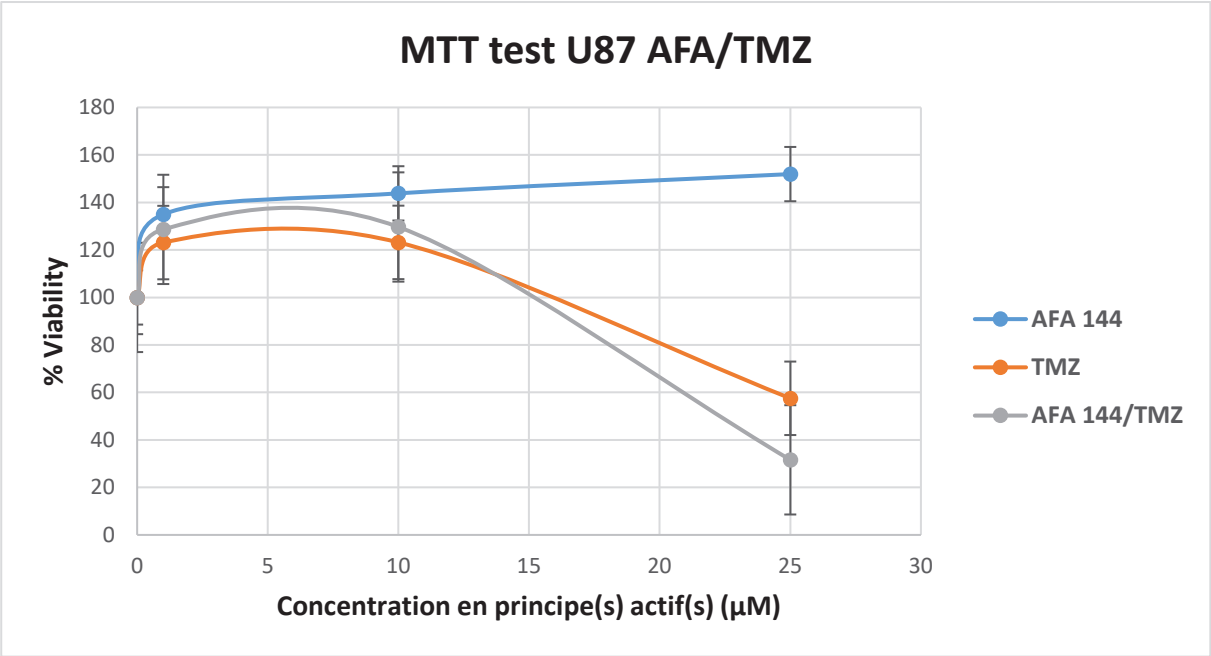


Figure 65: Test MTT entre l'AFA 144 et le TMZ sur la lignée U87.

Comme observé ci-dessus, le traitement par le composé **AFA 144** seul entraine un effet de « boost » sur la prolifération des cellules tumorales : on passe en effet d'une viabilité de 100 à 150 %. Le TMZ, en revanche, va se comporter comme un agent anti-prolifératif avec une valeur d'IC_{50} = 33,3 µM. La co-administration du TMZ et de l'**AFA 144** a une activité encore plus forte, affichant une IC_{50} = 23,7 µM.
Ainsi, nous pouvons ici conclure quant à un potentiel effet synergique entre le dérivé **AFA 144** et le TMZ sur la lignée cellulaire du glioblastome U87. On observe en effet une baisse de plus de 28% de l'CI_{50} du mélange, baisse qui est donc relativement significative.

2.2.2. Lignée U138

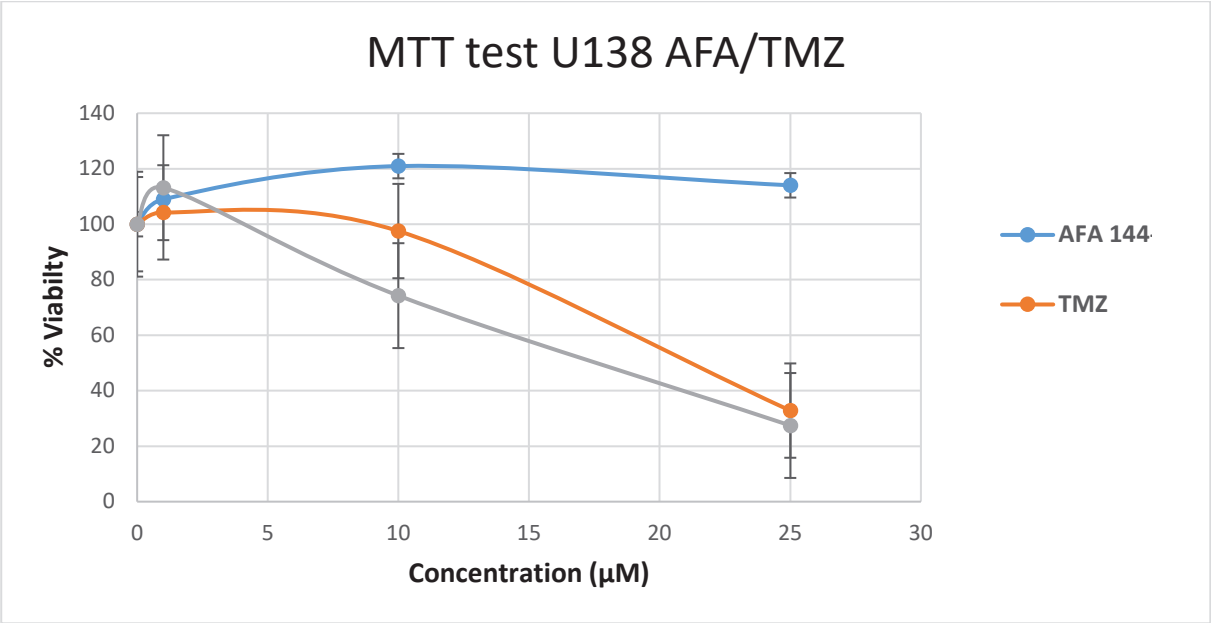


Figure 66: Test MTT synergétique entre l'AFA 144 et le TMZ sur la lignée U138.

De la même façon que pour la lignée U87 et comme observé en Figure 66, le traitement par le composé **AFA 144** entraine un effet de « boost » sur la prolifération des cellules tumorale : on passe en effet d'une viabilité de 100 à environ 120 %. Le TMZ, va lui une fois de plus se comporter comme un agent anti-prolifératif avec une valeur d'IC_{50} = 21,2 µM. La co-administration du TMZ et de l'**AFA 144** a une activité légèrement plus importante, affichant une IC_{50} = 17,8 µM.
Ici, sur la lignée cellulaire du glioblastome U138, un potentiel effet synergique

entre les dérivés **AFA 144** et le TMZ est plus difficile à mettre en avant. On observe en effet une baisse d'environ 16% de la CI_{50} du mélange en comparaison à la CI_{50} du TMZ seul, baisse qui peut s'avérer significative.

3. EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES SUR LA PROTEINE KINASE CK2

En parallèle à nos évaluations des propriétés inhibitrices sur les kinases Dyrks, nous avons également testé nos composés sur la protéine kinase CK2. Nos molécules de type indénobenzo[*b*]thiophène affichent un modèle structural se rapprochant grandement des indéno[1,2-*b*]indoles. Ces derniers, ont démontré des activités remarquables sur CK2, ce qui a stimulé notre exploration sur cette protéine.[199,200,201] Ainsi, nous avons évalué les activités inhibitrices de nos tétracycles sur cette cible thérapeutique, *via* un test basé sur l'électrophorèse capillaire (Figure 67). Mais, faute de temps, une partie seulement de notre librairie de composés a pu être testé.

Les composés les plus intéressants ont par la suite été intégrés dans les essais de cytotoxicités sur différentes lignées cellulaires tumorales.

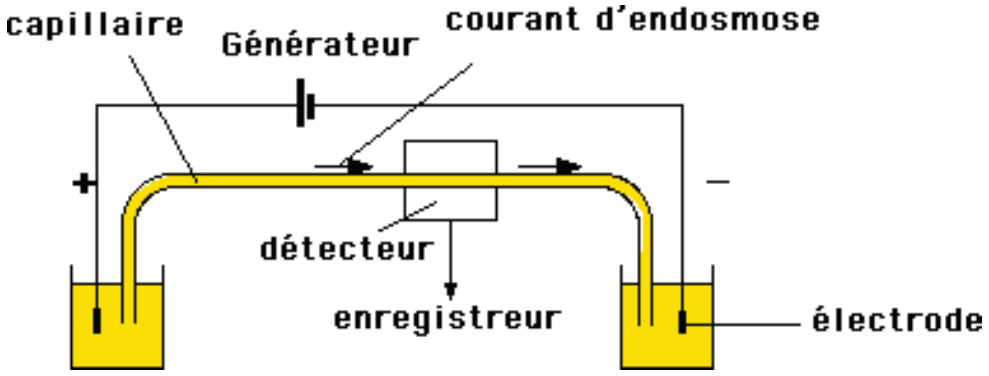
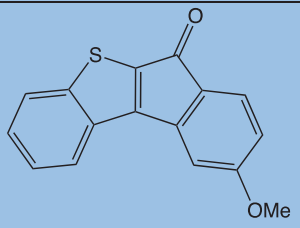
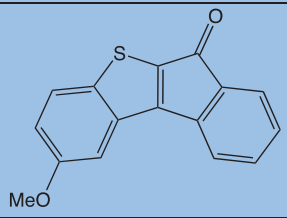
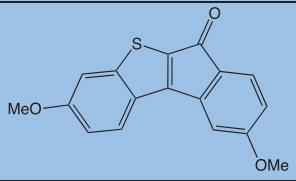
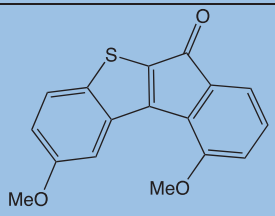
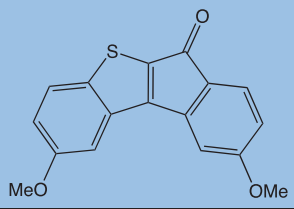
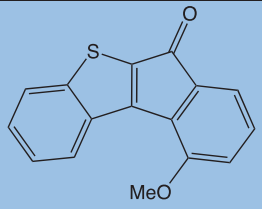
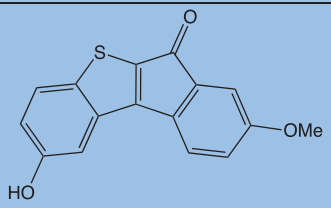
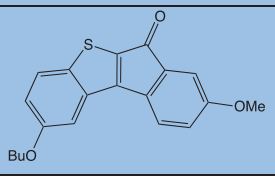
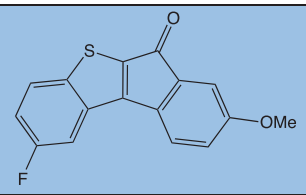
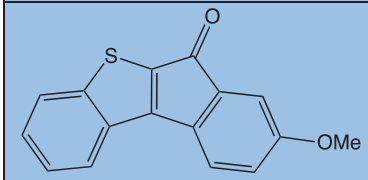
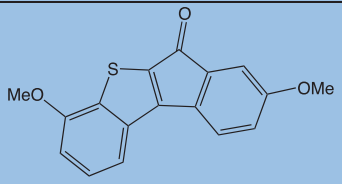


Figure 67: Principe général de l'électrophorèse capillaire [211]

3.1. Evaluation de l'activité biologique des indénobenzo[*b*]thiophènes sur la protéine CK2

Plusieurs tests ont été réalisés afin de vérifier l'impact des molécules synthétisées sur d'autres protéines que les kinases DYRK. Ainsi, et de par la proximité avec nos cibles thérapeutiques, nous avons désiré compléter notre étude globale par l'étude de l'activité des indénobenzo[*b*]thiophènes sur CK2 (Tableau 25).

Nom et structure	% Inhibition à 10 µM	IC_{50} (µM)
 240	36	n.d.
 242	19,3	n.d.
 238	47,8	n.d.
 243	70,5	0,25
 239	49,3	n.d.
 241	49,3	n.d.
 AFA 144	82,4	0,32
 244	31,8	n.d.

 **248**	**42,9**	**n.d.**
 **245**	**25,1**	**n.d.**
 **247**	**58,9**	**9,95**

n.d.: non défini

Tableau 25: Valeurs d'inhibition de CK2α par les composés synthétisés.

Deux des composés, le **243** et l'**AFA 144**, ont démontré une forte inhibition de la protéine CK2 avec des valeurs d'IC_{50} égales à 0,25 et 0,32 µM respectivement. L'inhibition à 10 µM s'élève à plus de 70% dans les deux cas. Dans une moindre efficacité, le composé **247** inhibe également CK2 avec une IC_{50} = 9,95 µM.

Ainsi, la présence d'un groupement hydroxyle ou méthoxy en position 2 du tétracycle et celle d'un deuxième substituant méthoxy sur la partie « Est » de la molécule semble favoriser significativement l'inhibition de CK2α, avec des valeurs d'activité s'approchant de celles des dérivés indéno[1,2-*b*]indoles cités précédemment.[208,209,210]

De par leur activité et afin de poursuivre nos études, les molécules **243** et **AFA 144** ont été testées sur différentes lignées cellulaires tumorales.

3.2. Evaluation de la cytotoxicté des indénobenzo[*b*]thiophènes 243 et AFA 144 sur différentes lignées cellulaires cancéreuses

L'évaluation de l'activité antiproliférative des composés **243** et **AFA 144** a été réalisé à 20 µM, *via* le test MTT, sur un panel de 3 lignées cellulaires dont :

- MCF7, lignée cellulaire caractéristique du cancer du sein
- A427, lignée cellulaire caractéristique du cancer des poumons

- A431, lignée cellulaire caractéristique du carcinome épidermoïde.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 26).

Lignée tumorale	Viabilité cellulaire après traitement par 20 µM de 243 après 48h (%)	Viabilité cellulaire après traitement par 20 µM d'AFA 144 après 48h (%)
MCF7	**20**	**50**
A427	**> 90**	**> 90**
A431	**36**	**52**

Tableau 26: Évaluation de l'activité antiproliférative des dérivés **243** et **AFA 144**

Ainsi, concernant le composé **243**, on observe une forte activité antiproliférative sur la lignée MCF7 du cancer du sein, avec une réduction de la viabilité cellulaire d'environ 80%. De plus, ce composé s'est montré très actif sur les cellules A431 avec une viabilité cellulaire observée après 48h de 36%. En revanche, son effet sur la lignée A427 est pratiquement nul (< 10%).

Le composé **AFA 144** a lui démontré une activité significative et pratiquement similaire sur les deux lignées MCF7 et A431, avec 50 et 52% de viabilité cellulaire restante respectivement. En revanche, et de la même façon que pour **243**, il s'est revelé inefficace sur la lignée A427.

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 5

Dyrk kinases-targeted assays

Protein expression and purification

An expression plasmid encoding the catalytic domain of human Dyrk1A fused to an N-terminal hexahistidine-tag (termed pET45b-Dyrk1A-cd) was constructed as described in the Supporting Information section (Construction of the pET45b-Dyrk1A-cd expression plasmid, in File S2). Human hexahistidine-tagged Dyrk1A (His6-Dyrk1A) and glutathione S-transferase (GST)-fusioned Dyrk2 were both expressed in Escherichia coli. E. coli BL21(DE3) cells were co-transformed using either the pET45b- Dyrk1A-cd or the pGEX-2TK-Dyrk2 (kind gift from W. Becker, Aachen) expression plasmid together with the pRARE plasmid (Novagen), carrying genes of human tRNAs which are rare in E. coli to increase the yield of recombinant proteins. The transformed bacteria were grown in LB medium containing 50 mg/mL ampicillin and 25 mg/mL chloramphenicol. Protein expression was induced by addition of 0.5 mM isopropyl b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) overnight at 18uC. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.27 M Sucrose, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM b-glycerophosphate disodium salt, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 1% Triton X100, cOmplete Mini Protease inhibitor cocktail tablets) and lysed by sonication. His6- Dyrk1A was purified by affinity chromatography using Ni^{2+}-Sepharose beads (GE Healthcare Bio Sciences, LOT # 10038389) as follows: the cleared cell lysate was gently stirred with the beads overnight at 4uC. Then the beads were filled into an empty chromatography column and the column washed three times with 10 volumes lysis buffer, followed by one wash with lysis buffer containing 20 mM imidazole. After another wash using 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, and 100 mM NaCl, the bound proteins were eluted using 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 200 mM imidazole, and 0.1 mM EGTA. The proteins were dialyzed against the same buffer without imidazole, 20% glycerol was added, and the proteins snap frozen in dry ice/isopropanol and stored at 280uC. GST-Dyrk2 fusion protein was purified from the lysate using glutathione-agarose beads (Machery-Nagel, LOT # 1212001) essentially as described previously for GST- PKCf [63].

Kinase assays

Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2 kinase reactions were performed in a reaction buffer containing 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM ATP and 0.33 mM [^{32}P-ATP] as well as the appropriate substrate peptides, which were 100 mM Woodtide for the Dyrk isoforms

(KKISGRLSPIMTEQ-NH_2). The kinase reactions were performed at 30uC for 15 min and terminated by spotting 5 mL of the reaction mixture onto a P81 phosphocellulose membrane (Whatman). The membrane was washed four times with 0.3% phosphoric acid and one time with acetone and dried. The dry membrane was exposed in a cassette to a Phosphor Screen Imaging Plate (FujiFilm) and the signals detected by scanning of the imaging plate in a Fuji FLA-3000 PhosphoImager. The spots were quantified using AIDA software (Raytest, Version 3.52) to determine the activities of the kinases in the assay reactions. For IC_{50} determinations, eight concentrations of each compound were used in triplicates, and the percentage of inhibition at 5 mM was also calculated from the average of triplicate values. IC_{50} values were calculated by fitting the data with Origin Pro 8.6 (OriginLabs). The calculated IC_{50} values are representative of at least two independent determinations.

Cytotoxic assays

Cultivation of eukaryotic cell lines

Adherent cells were grown in 175 cm flasks in the incubator at 37°C and 5% CO_2. Every 48 – 72 h media were changed by vacuum pump driven extraction of the old media and addition of 12 ml of pre-warmed, fresh media. Once cells reached a density of 80% they were transferred into new flasks. For passaging these cell lines, 1x trypsin was used to detach the adherent cells from the flask. For this procedure cells were washed with 5 ml PBS and incubated with 2 ml of 1x trypsin solution for 2 minutes at 37°C and 5% CO_2 After detachment of cells, the trypsination was confirmed under the microscope. The reaction was stopped by addition of 5 ml fresh media, followed by centrifugation for 4 min at 700 x g. Supernatant was discarded and the pellet was suspended in 1 ml of warm medium, then cells were seeded into new culture flasks with 12 ml of fresh medium in the desired dilution.

For cryopreservation cells were harvested, dispersed in their corresponding freezing media and given into cryotubes. To maximize cell viability the freezing process includes longer cooling periods with low temperature differences (1h at 6°C, 24h at -20°C, multiple days at -80°C, long term freezing in liquid nitrogen).

In order to seed defined number of cells for assays, cell number was determined after harvesting. For this step, cells were suspended in 1 ml of fresh media and 10 µl cell solution were diluted 1:100 in PBS. A cell counter was used to determine cell number.

MTT test

This cytotoxicity assay is based on the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to the purple formazan, which forms insoluble crystals in the watery medium. The formazan crystals are dissolved in an appropriate solvent and absorption is measured. Cellular oxidoreductases reduce the MTT facilitating NAD(P)H, meaning that higher cell viability will increase the amount of produced formazan crystals.

For the MTT cytotoxicity assay, U87, U138, U251, BEND-3 and MDCK-8 cells were grown in flasks until 80% confluency is reached. After harvesting of the cells and suspending the pellet in 1 ml warm medium, 5.000 cells per 100 µL medium were seeded in each well of a 96 well plate. Cells were incubated for 24h at 37°C and 5% CO_2. To the initial 100 µL medium was added 100 µL of fresh medium containing different concentrations of inhibitor and a final concentration of DMSO < 1%. A control containing 1% DMSO and a control containing no cells were used. After further incubation for 48 h, the medium was removed, the wells were washed with 100 µL of PBS and 100 µL of fresh medium was added. 10 µL of MTT solution was added. During incubation for 4 h the violet formazan crystals form. The medium was removed and 100 µL of DMSO were added to solubilize the formazan crystals. After shaking in the dark for 30 min at 37°C the absorbance is determined at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. Reduction of MTT in the 1% DMSO control was set to 100% viability and inhibitor effects on cell viability were compared. The viability assay was performed at least 3 times for each sample and reproduced in an independent experiment.

Synergetic MTT test

The only difference between this test and the usual MTT assay relies in the co-administration of two inhibitors at equal concentrations instead of one. Further steps are to be followed accordingly to the initial MTT test.

CK2-targeted assays

CK2 activity determination by capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis was used to separate non-phosphorylate peptides from phosphorylated peptides in order to determine kinase activity. The substrate peptide RRRDDDSDDD is phosphorylated by CK2α, resulting in a changed of charge at pH 2 for the product peptide. The separation is possible, because

introduction of a phosphate group into the peptide reduces the positive charge of the peptide, thus leading to slower migration of the product to the cathode. This change of charge results in separated product and educt peaks.

For one kinase reaction sample 80 µl 1x kinase buffer containing 1 µg CK2 holoenzyme were preincubated with 2 µl inhibitor solution in a 96 well plate at 37°C. The kinase reaction was started by addition of 120 µl of 1x assay buffer containing 0.1 mM ATP and 0.2 mM substrate peptide RRRDDDSDDD into each well. Samples were incubated for 7 minutes at 37°C while shaking at 250 rpm. In order to stop the reaction, the sample volume was transferred into a well of a 96 well plate with 5 µl of ice cold stopping solution. Stored on ice the 96 well plate is then inserted into the CE. For evaluation of inhibitor effects on enzymatic activity a control, containing 1% DMSO and no inhibitor, was set to 100% activity. Another control sample containing no CK2 is set to 0% activity[209210211].

Parameters for CE

Effective capillary length	20 cm
Detection of absorption	214 nm
Reference wavelength	195 nm
Inner capillary diameter	50 µm
Electric current	30 µA

Conditioning procedure for capillary

Washing with H_2O	20 min
Washing with washing solution	1 h
Washing with H_2O	20 min
Washing with background electrolyte	20 min
Separation with background electrolyte	6 min

Separation method for activity assay

Injection	20 sec, 1 psi

Separation 6 min

Washing

Before measuring CK2 activity, the capillary was washed and conditioned according to the conditioning procedure. Each sample was injected for 20 sec at 1 psi and then separated for 6 minutes at a current of 30 μA. For calculation of inhibition percentage, the peak height of the corresponding DMSO control was compared to the inhibitor sample. If a compound showed more than 50% inhibition at 10 μM concentration, the IC_{50} value was determined. All inhibition determinations were conducted three times in independent duplicates. For the determination of IC_{50} values nine concentrations were measured for each compound (0.001 μM, 0.01 μM, 0.0316 μM, 0.1 μM, 0.316 μM, 1 μM, 3.16 μM, 10 μM, 100 μM). The nine data points were plotted into a semi-logarithmic scale and a regression curve is fitted by GraphPad Prism. IC_{50} values were given for all compounds that reached 100% inhibition of CK2, if the inhibition did not reach 100% even at the highest concentration of the compound applicable relative IC_{50} values were calculated. For relative IC_{50} values maximum inhibition was set to 100% inhibition.

CHAPITRE 6 : ETUDES DU PASSAGE DES COMPOSES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES AU TRAVERS DE LA BARRIERE HEMATO ENCEPHALIQUE

Le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) représente, depuis maintenant plusieurs années, un véritable « challenge » dans la création de composés potentiellement actifs au niveau central. Relativement peu étudiée jusque très récemment, elle fait désormais l'objet d'une attention toute particulière de par sa faculté à bloquer l'accès de près de 99% des xénobiotiques au niveau du cerveau.
C'est dans cette optique que nous avons, dans ce chapitre, essayer d'étudier plus spécifiquement la faculté dont pourrait disposer nos molécules à traverser cette couche considérée par certains comme impénétrable.
En collaboration avec l'Université de Montréal et l'équipe du Laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutiques (LNP) dirigée par le Pr. Gaëlle Roullin, nous avons utilisé un modèle *in vitro* nommé PAMPA-BBB (pour « Blood Brain Barrier »), reflétant le passage de cette barrière en comparaison à différentes autres molécules de référence.

Nous allons donc dans un premier temps présenter l'histologie de la BHE, et expliquer les caractéristiques physiologiques qui induisent sa très faible perméabilité. Dans une seconde partie, nous allons présenter précisément le modèle *in vitro* PAMPA-BBB, ses applications, ainsi que son fonctionnement. Enfin, nous évaluerons la capacité de nos indénobenzo[*b*]thiophènes à passer ou non cette BHE.

1. STRUCTURE, FONCTIONS ET ROLES PHYSIOLOGIQUES DE LA BHE

1.1 Principales caractéristiques de la BHE

La littérature actuelle regorge de nombreuses publications attestant que la BHE est une barrière pratiquement imperméable : elle bloquerait le passage de 100% des grosses molécules et jusqu'à 98% des molécules considérées comme « petites » (< 400 Da).[212] Cette dernière est constituée par un vaste endothélium vasculaire qui interagit directement avec les cellules neuronales, les astrocytes et les péricytes. Son rôle est de protéger le cerveau contre tout type d'agents

extérieurs, limitant ainsi l'entrée de substances actives au niveau du système nerveux central. Ceci est particulièrement problématique dans l'optique de traiter des troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer ou encore de Parkinson.

Ainsi, bien que les capillaires cérébraux soient morphologiquement similaires à ceux pouvant être retrouvés dans de nombreux tissus, les vaisseaux du cerveau sont quant à eux reliés directement au niveau fonctionnel aux cellules constituants le parenchyme cérébral. De ce fait, la BHE est formée de vaisseaux sanguins qui découlent de cellules endothéliales spécialisées, d'astrocytes, de péricytes et des terminaisons neuronales.

De par leurs localisations, les extrémités astrocytaires vont former une membrane basale laminaire extrêmement restrictive. Les péricytes, qui sont un groupe majeur de cellules mésenchymateuses, occupent l'espace périvasculaire qui se situe entre la couche de capillaires sanguins et les extrémités des pieds astrocytaires ; excepté dans les « larges » vaisseaux où ces dernières sont remplacées par des fibres squelettiques lisses. Ces péricytes vont notamment jouer un rôle important dans le maintien, la stabilité, l'angiogenèse et la réparation au niveau des cellules endothéliales cérébrales. Enfin, les neurones participent également activement à la structure si particulière de cette BHE puisqu'ils sont liées directement à toutes les cellules formant cette membrane.[213]

1.1.1 Caractéristiques et liaisons des cellules endothéliales de la BHE

Afin d'assurer une perméabilité quasi-nulle, les cellules endothéliales de la BHE doivent disposer de caractéristiques bien particulières en comparaison aux cellules endothéliales périphériques.

Plus spécifiquement :

- elles doivent disposer d'un nombre de vésicules d'endocytose plus faible, afin de limiter le flux transcellulaire,

- elles ne doivent pas présenter de fenestrations,

- elles doivent disposer d'une très haute résistance électrique due aux jonctions serrées, qui limitent le flux paracellulaire,

- elles doivent disposer d'un volume mitochondrial plus développé, reflétant un métabolisme cellulaire plus important,

- elles doivent disposer de nombreux systèmes de transport spécialisés.[214]

Au niveau subcellulaire, les composants principaux responsables de l'intégrité structurale sont les jonctions serrées ainsi que les jonctions adhérentes. Les jonctions serrées contribuent à la liaison ponctiforme des cellules endothéliales, formant alors une structure tubulaire continue, alors que les jonctions adhérentes vont permettre l'initiation et le maintien des contacts entre ces mêmes cellules endothéliales.[215] Ceci représente une différence énorme en comparaison aux cellules endothéliales périphériques qui montrent des jonctions serrées situées au pôle apical, séparément des jonctions adhérentes.

Le complexe jointif consiste d'ailleurs en un regroupement de protéines transmembranaires et d'autres protéines cytoplasmiques localisées au niveau de la zone apicale de l'endothélium. Les protéines transmembranaires interagissent directement à l'intérieur même du complexe jointif alors que les protéines cytoplasmiques vont permettre « l'ancrage » des filaments d'actine du cytosquelette sur ces mêmes protéines transmembranaires.[216]

1.1.2 Jonctions serrées

Localisées dans la partie supérieure de la section apicale du plasma membranaire, ces jonctions constituent la « barrière » la plus importante qui va bloquer la diffusion paracellulaire, participant également à la régulation de la diffusion latérale entre le pôle apical et basolatéral de la membrane plasmatique (Figure 68).[217]

Elles sont constituées d'au moins 3 protéines transmembranaires que sont la claudine (localisée exclusivement dans les jonctions serrées), l'occludine ainsi que par les molécules d'adhésions jointives ou « JAMs », membres de la superfamille des immunoglobulines.[218,219,220] Elles partagent toutes un seul domaine transmembranaire et deux boucles larges de type immunoglobuline. Les JAMs sont par ailleurs aussi impliquées dans la régulation de la migration transendothéliale des monocytes.[221]
Les occludines se lient à la protéine ZO-1 (« zonula occludens protein 1 ») par leur partie C-terminale dans tous les types d'endothélium.[222] Cependant, il a été mis en avant que dans l'endothélium cérébral, la distribution de ZO-1 était beaucoup plus continue et que l'expression en occludines était plus importante. Ceci contribue à la forte résistance des jonctions, caractéristique majeure de ce type de structure. Aussi, il a été observé que les occludines présentes au niveau cérébral serait davantage phosphorylées que celles retrouvées en périphérie : ceci contribuerait à renforcer la résistance de la BHE.[214]

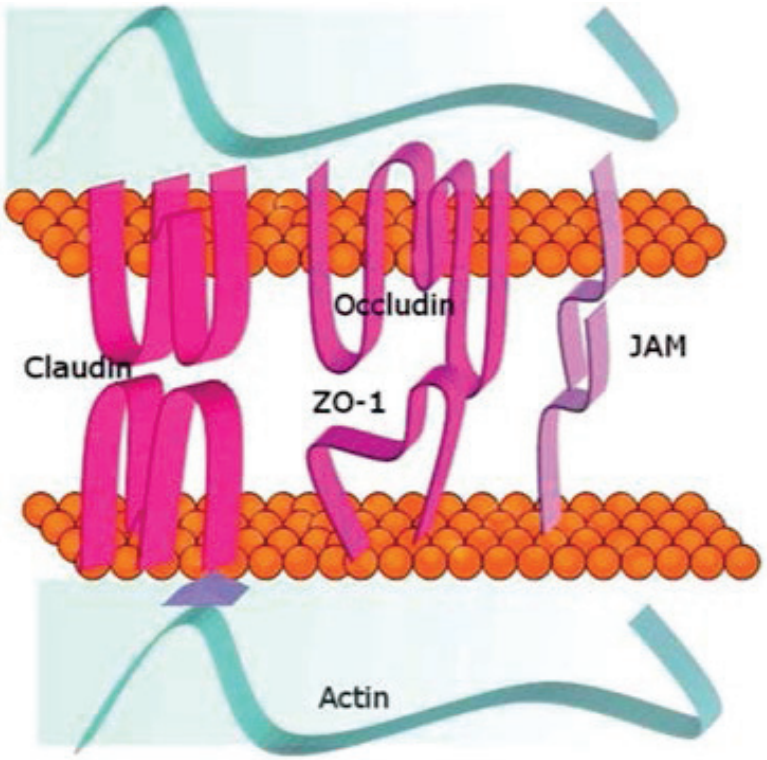


Figure 68: Schéma représentatif des jonctions serrée[213]

1.1.3 Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont une composante essentielle au maintien des jonctions serrées. Elles sont formées principalement de glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines, plus spécifiquement de cadhérines appartenant à l'endothélium vasculaire (Ve-cadherin), capable de former des complexes adhésifs homotypiques avec les cellules adjacentes en présence d'ions Ca^{2+}.[216] Ces glycoprotéines sont liées au cytosquelette à travers une plaque cytoplasmique elle-même ancrée par des protéines de la superfamille « Armadillo » tels que les α-caténines ou encore les β-caténines.[223] Ces dernières possèdent toutes une répétition Armadillo, qui est une séquence de 42 acides aminés permettant la liaison à l'extrémité cytoplasmique des cadhérines classiques.[224]

1.1.4 Intégrité de la BHE

Les nombreuses expérimentations réalisées dans les différentes études démontrent que le microenvironnement est un paramètre très important dans l'induction des propriétés cellulaires et donc dans l'intégrité de la BHE.
Les astrocytes jouent un rôle dans la formation et le maintien de la BHE alors que

les pieds astrocytaires sont directement en contact avec les cellules endothéliales dans une structure particulière dite « en filet ».[225] Cet « enchevêtrement » structural est l'objet de propriétés bien spécifiques et il y a notamment été observé une très haute densité en particules nommées OAPs.[226] Cette structure est par ailleurs le siège d'aquaporines, qui procurent à la BHE les ions nécessaires ainsi que la capacité à réguler son homéostasie. La présence de ces protéines au niveau des astrocytes est corrélée à l'expression en agrine, un protéoglycane à sulfate d'héparane située sur la surface basale laminaire.[227] L'agrine est impliquée dans l'intégrité de la BHE et s'accumule dans les microvaisseaux cérébraux lorsque cette dernière acquière sa structure sous forme resserrée. De plus, il a été démontré dans de nombreux modèles de co-culture astrocyte/cellules endothéliales *in vitro*, une forte résistance électrique qui est caractéristique d'une très faible perméabilité membranaire. De la même façon, les astrocytes régissent l'intégrité de la BHE par l'expression de transporteurs tels que la glycoprotéine-P ou encore d'enzymes spécifiques comme l'γ-GTP.[228] Aussi, les astrocytes vont interagir avec les cellules endothéliales grâce à la sécrétion de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation telles que les cytokines (IL-6), les neurotrophines et d'autres facteurs de croissance (TGF-ß, GDNF,…).[229]
Réciproquement, les cellules endothéliales vont exercer un effet sur les astrocytes par la sécrétion d'un facteur dérivé de l'endothélium nommé LIF (« Leukaemia inhibitory factor »).
Pour finir, les péricytes ainsi que les microglies ont aussi été découvertes comme étant impliquées dans l'intégrité de la BHE, contribuant respectivement à la croissance de l'endothélium et aux processus de transports transcellulaires.[230]

1.2 Physiologie de la BHE

Les nutriments, les ions ainsi que d'autres molécules vont pénétrer la BHE par des phénomènes de diffusion paracellulaire (*via* utilisation du complexe jointif) ou par passage transcellulaire directement au travers des cellules (Figure 69).

1.2.1 Passage *via* une diffusion paracellulaire

La pénétration *via* le mécanisme de diffusion paracellulaire est un phénomène de diffusion passif, qui consiste en un mouvement des substances lipophiles ou à très faible masse molaire au travers de la BHE.

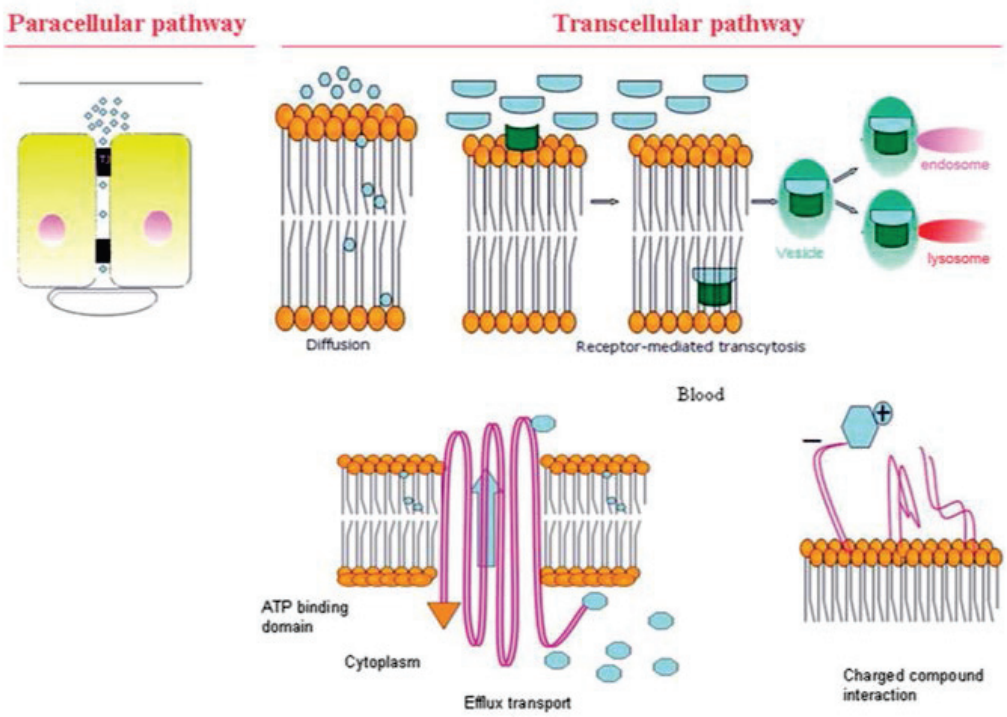


Figure 69: Différents mécanismes de diffusion au travers de la BHE[213]

Ce passage est contrôlé par les gradients électrochimiques, hydrostatiques et osmotiques. Au niveau structural, il est médié par les jonctions serrées et par la concentration en soluté présente de part et d'autre de la barrière (concentration dépendant). De plus, c'est le cytosquelette endothélial et ses paramètres de contractilité et de forces adhésives qui vont moduler la perméabilité du complexe jointif.[231] En effet, grâce à un subtil équilibre dynamique entre ces deux types de forces, l'échange *via* la diffusion paracellulaire va pouvoir être réalisé.
Cependant, il est important de noter que ce phénomène joue un rôle mineur dans la diffusion des composés actifs visant le cerveau.[232] L'eau, la glycérine ou encore l'urée sont des exemples de molécules disposant de ce type de transport au niveau du cerveau.

1.2.2 Passage *via* une diffusion transcellulaire

Ce type de diffusion qui peut à la fois être énergie ou non-énergie dépendant, regroupe plusieurs procédés de passage de la BHE. Parmi ces derniers, on retrouve notamment les phénomènes de transcytose médiés par des récepteurs, les transporteurs d'efflux, l'endocytose de molécules chargées positivement ou encore le transport médié par des transporteurs spécifiques.[231,232]

1.2.3 Transcytose médiée par des récepteurs

Ce type de passage constitue le mécanisme principal mis en jeu par les cellules endothéliales du cerveau afin de promouvoir le passage de molécules hormonales ou de haute masse molaire telles que l'insuline, la leptine ou encore la transferrine à travers la BHE.[233,234] C'est un type de transport actif qui dépend de la température et peut être saturé. Plus spécifiquement, la reconnaissance de la molécule par le récepteur correspondant va entrainer la formation d'une vésicule d'endocytose qui va ensuite fusionner avec les endosomes, entrainer la dissociation du complexe ligand/récepteur, et relarguer finalement le contenu de la vésicule dans le cytoplasme, résultant finalement en son exocytose.[235]
La transcytose médiée par certains récepteurs est donc considérée comme une cible intéressante dans le développement de molécules visant le SNC car elle n'est ni dépendante de la taille ou de la lipophilie des composés associés. Aussi, la très haute spécificité de ce mécanisme permettrait un transport efficace du principe actif.

1.2.4 Transport *via* les transporteurs d'efflux

Ce procédé de transport actif va permettre la détoxification du SNC par transfert de substrats déchets (non voulus et qui auraient malencontreusement passé la BHE) vers la circulation systémique.[236] Un exemple pertinent consiste en l'efflux de substances thérapeutiques qui auraient réussi à pénétrer dans les cellules endothéliales mais qui sont ensuite expulsées par les pompes à efflux. En particulier, la P-gp, membre glycosylé de la famille des transporteurs ABC, est fortement exprimée sur la membrane luminale des cellules endothéliales.[237] Elle va alors entrainer une résistance envers les xénobiotiques (anticancéreux, antiobiotiques) par expulsion massive de ces derniers vers le compartiment périphérique.

1.2.5 Endocytose de molécules chargées

Les substances chargées positivement comme par exemple l'albumine cationique ou les histones interagissent avec des composés chargés négativement au niveau de la membrane endothéliale permettant ainsi l'endocytose et le passage subséquent de la BHE.[238] Ce mode de passage biologique peut être utilisé en vue d'augmenter la libération de substances actives conjuguées à travers la BHE telles que les β-endorphines associées à l'albumine cationique.
Ce type d'approche est également exploré actuellement et particulièrement pour le passage d'anticorps pour le diagnostic, l'imagerie et le traitement de maladies neurodégénératives.[239]

1.2.6 Transport médié par des transporteurs spécifiques

Ce mode de transport de substance actives est saturable et peut être énergie comme non-énergie dépendant, ce qui va influencer l'échange de substance entre le compartiment systémique et le parenchyme cérébral.[240] Ces transporteurs sont généralement polarisés et localisés des deux côtés de la paroi, c'est-à-dire du côté luminal et abluminal.
Il existe de nombreux transporteurs exprimés sur les cellules endothéliales du cerveau, et qui vont sélectivement véhiculer un nombre important de molécules comme le glucose, grâce au transporteur GLUT-1.[241] Dans le cas des acides aminés, il existe d'autres transporteurs sélectifs ainsi qu'énergie-dépendants, et qui vont être influencés par les caractéristiques physico-chimiques de chaque acide aminé.
En effet, les acides aminés de forte masse molaire, neutres et à structure aromatique vont être transportés par le système N- ou L- (système de transport sodium-dépendant) alors que ceux à faible masse molaire et neutres vont être transportés par le système A-. De la même façon, le système ASC (système de transport ubiquitaire sodium-dépendant pour les acides aminés neutres) est responsable du transport d'acides aminés soufrés et notamment de cystéines. Finalement, ce sont les pompes Na/K+ et les co-transporteurs Na^+/Cl^- qui vont permettre le passage des acides aminé chargés électroniquement.[242]

2. MODELES D'EVALUATION *IN VITRO* EXPERIMENTAUX ET PAMPA-BBB

2.1 Généralités sur les modèles d'évaluation *in vitro*

Actuellement, les nombreux modèles *in vitro* mimant la BHE en développement mettent en jeu des cultures bovines, porcines, de cellules endothéliales humaines ou de lignées cellulaires immortalisées.
Ces alternatives aux modèles *in vivo* animaliers ont l'avantage de ne présenter aucun problème bioéthique, d'être moins chers et il est plus simple d'y vérifier les conditions de répétabilité.
Ce type de modèle doit avant tout reproduire les caractéristiques fonctionnelles et structurales de la BHE et donc, présenter une haute expression en protéines jointives et en pompes d'efflux, une forte perméabilité sélective, ainsi qu'une forte résistance électrique (TEER). Ceci est caractéristique d'une barrière mature et intègre.[243]
La complexité de ces modèles peut varier énormément, allant de la simple monocouche cellulaire à des co-cultures avec des cellules endothéliales et du tissu cortical. Plus spécifiquement, les co-cultures qui reproduisent le mieux la BHE *in*

vivo sont celles obtenus à partir de capillaires cérébraux, composées de cellules endothéliale d'un côté du filtre, et d'astrocytes de l'autre.
De nombreux modèles sont développés en utilisant d'autres lignées cellulaires non cérébrales telles que les Caco-2 (carcinome du colon) et les cellules ECV304 (co-culture de cellules endothéliales et épithéliales). Bien que les résultats soient prometteurs, ces cellules ne sont issues de l'endothélium cérébral et ne présentent donc pas exactement les mêmes caractéristiques telles que l'expression de transporteurs ou l'absence de processus métaboliques spécifiques.
A l'heure actuelle, ce sont surtout les cultures de cellules endothéliales du cerveau qui sont utilisés afin des tester la neurotoxicité de composés en développement ainsi que leur perméabilité vis-à-vis de la BHE mais certains facteurs, tels que la contamination ou la faible croissance cellulaire limitent leur application.[244]
A ce jour, les monocouches murines endothéliales sont celles qui représentent le modèle le plus simple pour les études de criblage et dans les phases de développement précoce du médicament. Cependant, et comme précédemment mentionné, ce sont les modèles de co-culture qui semblent les plus proches des conditions *in vivo*, de par notamment leur perméabilité sélective.

Un exemple de modèle *in vitro* pathologique développé est celui de Cucullo et coll.[245], qui se base sur des cellules primaires obtenues après biopsie d'un patient épileptique ayant subi de nombreuses interventions chirurgicales. Cette approche alternative permet donc d'évaluer la perméabilité d'une BHE fragilisée vis-à-vis de composés médicamenteux.
D'autres méthodes ont également été développées, mettant en avant l'utilisation de modèles microfluidiques de BHE *in vitro* ou encore de cellules issues de la drosophile ou du poisson zèbre (zebrafish).[246]

2.2 Modèles *in vitro* PAMPA-BBB

Le PAMPA, pour « parallel artificial membrane permeability assay », est une approche qui a été initialement développée par Kansy et coll. en 1998.[247] C'est un modèle non cellulaire, de criblage à haut débit, qui va permettre de tester la perméabilité de composés mais uniquement par diffusion passive.[247] Le PAMPA est réalisé dans des plaques 96 puits microtitrée (plaque possédant de multiples « puits » d'un volume d'une centaine de microlitre généralement), non poreuses et est complétement artificiel. Cette méthode est largement utilisée dans les phases primaires du développement de substances médicamenteuses, afin de déterminer le passage passif au travers de la membrane phospholipidique. Elle est très peu couteuse, robuste, et dispose d'une excellente reproductibilité. Le modèle original PAMPA utilisait la phosphatidylcholine en tant que membrane ; depuis, de nombreuses nouvelles méthodes se sont développées et permettent une prédiction

de la perméabilité de la BHE, de la barrière gastro-intestinale ou encore de la peau (Figure 70).[248,249]

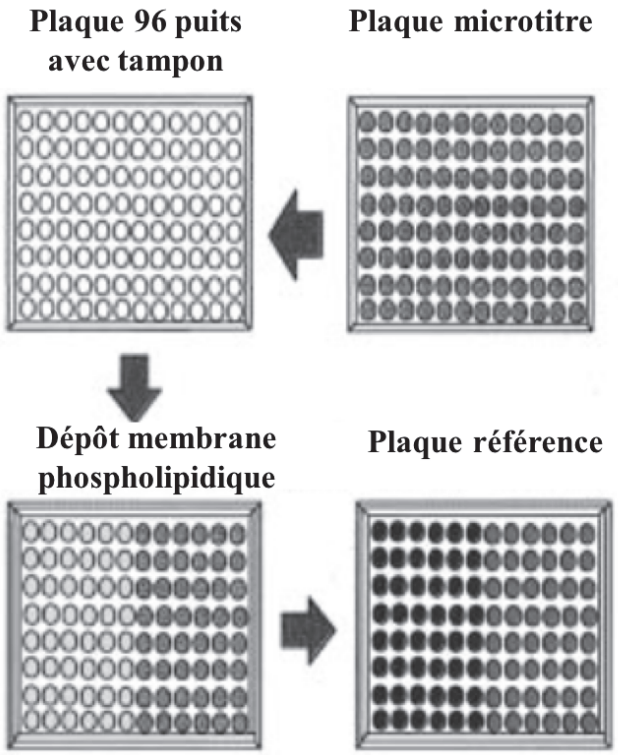


Figure 70: Mise en place du PAMPA-BBB (adapté selon Kansy et al.[247]). La première étape va consister par le remplissage avec du tampon de la plaque 96 puits (pH = 6,5/7,4), recouverte ensuite par une plaque microtitrée. Puis, le dépôt de la membrane est effectué. Finalement, le dispositif est recouvert avec une seconde plaque, et c'est l'ajout d'une solution contenant ou non le principe actif qui permet de démarrer l'essai.

Notamment, Di et coll.[250] ont été les premiers à développer un modèle de BHE s'appuyant sur une membrane artificielle phospholipidique cérébrale porcine (PBLE), solubilisée dans du *n*-dodécane. Le passage de 30 composés actifs a ensuite été évalué, et ces derniers ont été classés en deux catégories : ceux passant la barrière efficacement (SNC +) et ceux disposant d'un très faible taux de passage (SNC -). Ce test peut être réalisé en condition iso-pH, c'est-à-dire avec un pH physiologique de 7,4 des 2 côtés de la barrière biologique. Afin de mimer certains phénomènes tel que l'absorption intestinale, il peut aussi être effectué dans des conditions de gradient de pH ; généralement comprises entre 5,2-6,9 du côté du compartiment donneur et avec un pH physiologique au niveau du compartiment

receveur.

2.2.1. Evaluation du passage de la membrane phospholipidique de la BHE par les indénobenzo[*b*]thiophènes

C'est sur le principe de ce même PAMPA-BBB que nous avons mis en place notre test *in vitro*, évaluant la perméabilité des composés synthétisés précédemment. Le modèle utilisé, nommé OptiB3-PAMPA, se base sur une « multi-drug K7 », c'est-à-dire sur une petite librairie de composés, disposant chacun de perméabilités *in vivo* et *in vitro* variables, quantifiées respectivement par le logBB et le P_{app} (Figure 71).

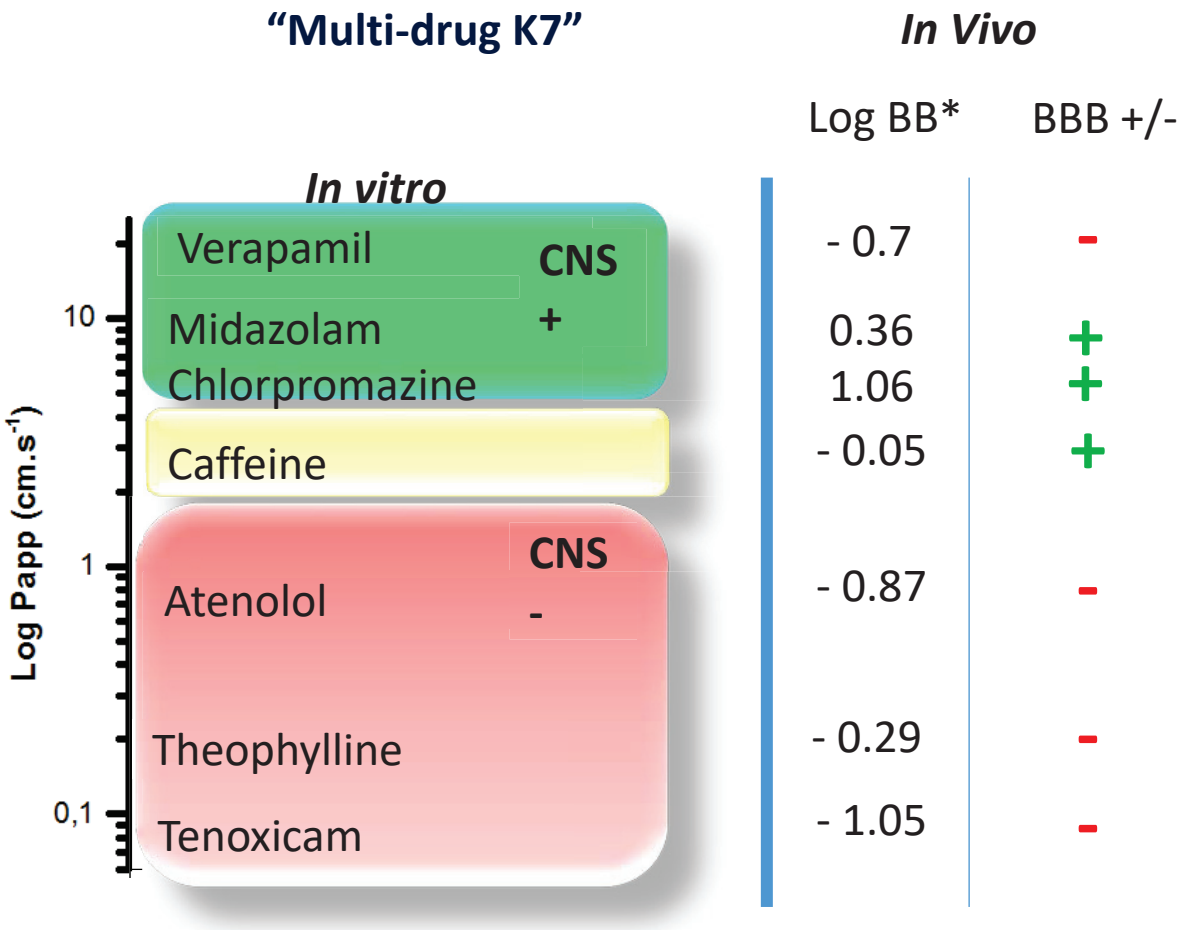


Figure 71: K7 « multi-drug » de référence, classification des perméabilités in vivo et in vitro de différents composés actifs. Conception Florian Bernard©, Université de Montréal.

Le logBB, est défini par la formule :[251]

$$\log BB = \log [[\text{Principe actif}_{\textbf{cerveau}}] / [[\text{Principe actif}_{\textbf{sang}}]]$$

Avec $[\text{Principe actif}_{\textbf{cerveau}}]$ = Concentration en principe actif dans le cerveau à l'équilibre
$[\text{Principe actif}_{\textbf{sang}}]$ = Concentration en principe actif dans le sang à l'équilibre

C'est une valeur permettant de quantifier la perméabilité *in vivo* de la BHE pour un composé actif précis.
Le P_{app} correspond au coefficient de perméabilité apparent *in vitro* et est défini par la formule :

$$Papp = (V_r * dC_r) / (dt * A * C_{D0})$$

Avec V_r = Volume du compartiment receveur
dC_r/dt = variation de la concentration du compartiment receveur par rapport au temps
A = Aire de la surface membranaire
C_{D0} = Concentration initiale en principe actif dans le compartiment donneur

Ainsi, la perméabilité de nos composés va être comparativement analysée avec celles associées aux autres molécules dans le but d'établir un profil reflétant le passage de la BHE. L'échelle de perméabilité permettra alors de démontrer si nos composés passent efficacement, moyennement, ou très faiblement la membrane phospholipidique de façon passive.
Il est à noter que le vérapamil, bien que disposant d'un logBB intéressant, est un substrat des P-gp et est de ce fait expulsé hors de la BHE par les mécanismes d'efflux membranaires.
Aussi, l'injection en simultané d'un standard interne (dans notre cas le métoclopramide) s'avère primordial afin de vérifier les bonnes condition d'équilbre.

Ainsi, nous allons réaliser 3 analyses variables et à différentes concentrations :

- une analyse en présence uniquement de la cassette,
- une analyse avec notre composé le plus actif, l'AFA 144-1,
- une analyse en présence de l'AFA 144-1 dilué dans la cassette.

Les différentes analyses seront réalisées sur une période d'incubation de 2h, à 37°C, et à une vitesse de 50 rpm sur un modèle schématique similaire à la figure 72.

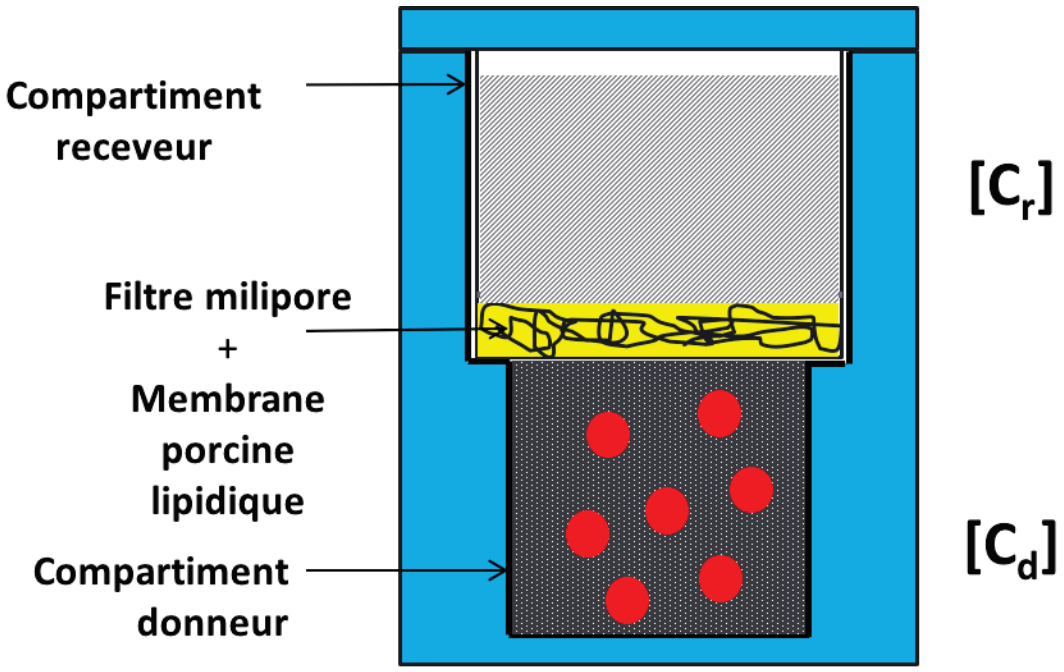


Figure 72**:** Représentation schématique du PAMPA-BBB, Conception Florian Bernard©, Université de Montréal

Ensuite, la détection puis l'analyse quantitative des composés seront réalisées *via* HPLC-MS/MS selon les recommandations validées et en accord avec la FDA et l'EMA (Figure 73).

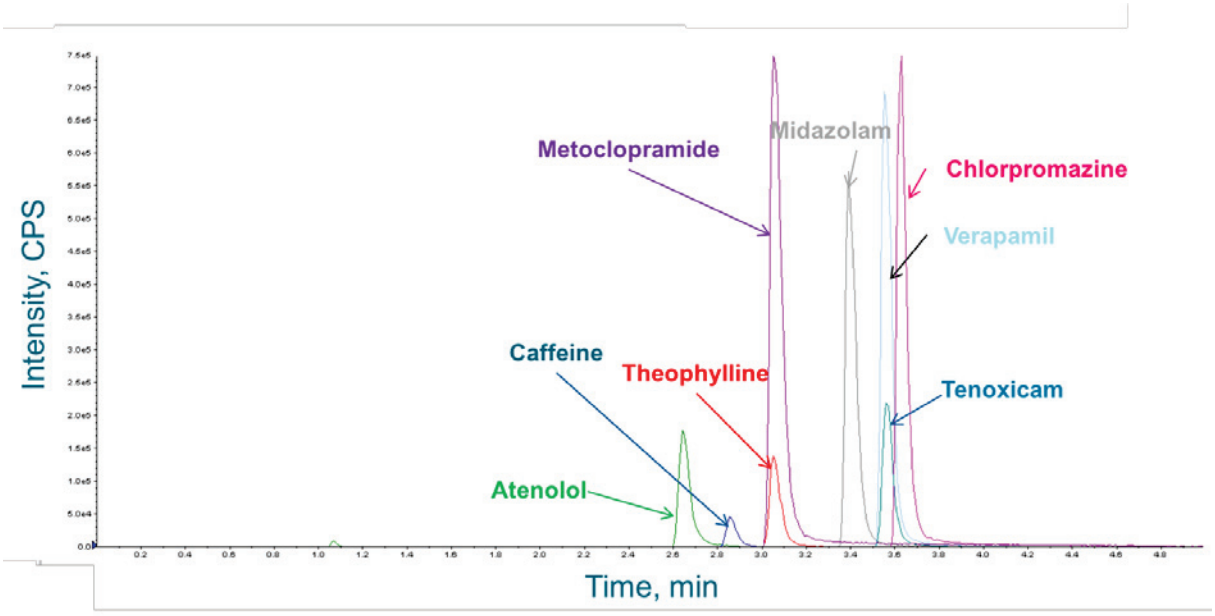
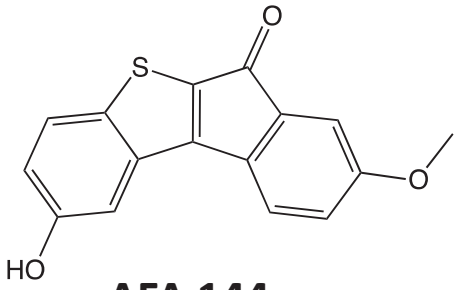


Figure 73**:** Détection via HPLC-MS/MS des différents composés

2.2.2. Analyse des résultats obtenus après test PAMPA-BBB

Nous allons donc utiliser ici le test PAMPA-BBB et évaluer le passage du composé **AFA 144** au travers de la BHE. Ce dernier affiche une très forte hydrophobie, une faible masse molaire et l'évaluation de son activité sur la kinase Dyrk1A s'est avérée très prometteuse comme l'indique la Figure 74, avec une $CE_{50} = 41$ nM.



AFA 144

MW: 282.31 $g.mol^{-1}$

Mp: 219-220°C

LogP (est) : 3.82

Dyrk1A EC_{50}: 41 nM

Figure 74: Caractéristiques physico-chimiques du composé AFA 144-1

Après mise en place et réalisation de cet essai sur une membrane phospholipidique porcine du cerveau, plusieurs données expérimentales sont obtenues. Le classement, la normalisation et l'analyse des résultats obtenus *via* HPLC-MS/MS permet alors d'établir deux courbes correspondant aux log(P_{app}) en fonction des logBB pour :

- la librairie « Multi-drug K7 » en rouge,
- la librairie « Multi-drug K7 » et le composé AFA 144-1 en bleu

Les résultats sont présentés ci-après dans la Figure 75.

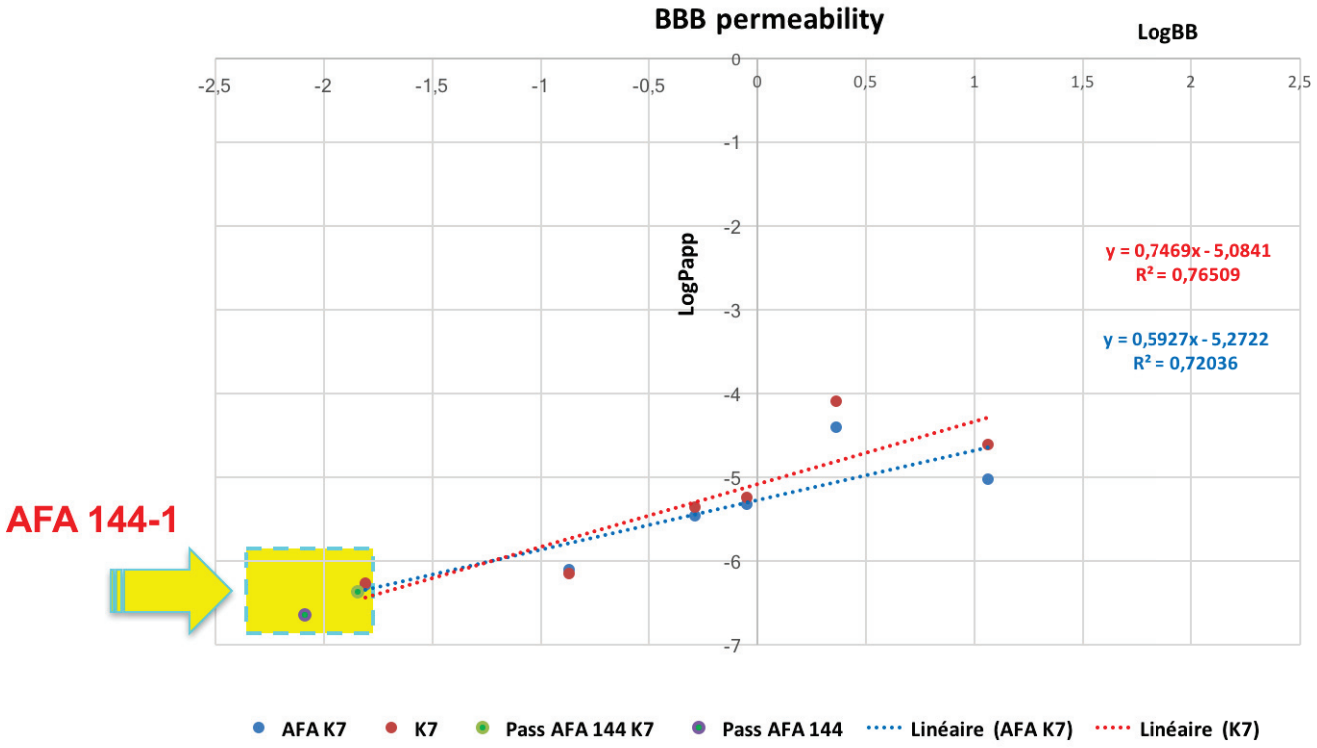


Figure 75: Résultat du test PAMPA-BBB, avec la librairie « Multi-drug K7 » (en rouge), et la librairie « Multi-drug K7 » et le composé AFA 144-1 (en bleu)

L'analyse de ces résultats permet alors de tirer plusieurs conclusions.

- Dans un premier temps, l'étude des coefficients de corrélation R^2 qui sont égaux à 0,76509 et 0,72036, respectivement pour la « Multi-drug K7 » et la « Multi-drug K7 » accompagnée du composé **AFA 144**, sont ici très satisfaisants. En effet, et contrairement aux modèles *in silico*, l'expérimentation par utilisation du PAMPA-BBB permet la mesure d'un effet *in vivo* par un test *in vitro*. Ainsi, et d'après la littérature, des coefficients supérieurs à 0,70 sont considérés comme élevés et donc satisfaisants.[252]

- Aussi, l'analyse de ces deux courbes démontrent une linéarité assez similaire, avec des équations de droite proche l'une de l'autre. Chaque expérimentation ayant été réalisée 3 fois, ceci est le témoin d'un test robuste et disposant d'une bonne répétabilité.

- La présence d'autres principes actifs dans le milieu ne semble pas influencer la diffusion au travers de la BHE par le composé **AFA 144**. En effet, et si on observe la Figure 75 (indiqué par un carré jaune délimité de bleu), l'évaluation des deux passages au travers de la BHE est pratiquement identique ; le composé AFA 144 seul semblant diffuser légèrement moins efficacement.

- Dans les 2 cas de figure, il s'avère que le composé **AFA 144** dispose de la perméabilité membranaire la plus faible en comparaison aux autres molécules de la « multi-drug K7 » : ce composé va donc très peu ou de façon négligeable diffuser passivement à travers la BHE. Une des raisons avancées proviendrait de la très faible solubilité du produit, qui même dans un solvant polaire aprotique tel que le DMSO, s'est avéré très difficile à solubiliser entièrement. Nous pouvons donc supposer que ce dernier ne pénètre pas ou très peu à travers la membrane phospholipidique porcine, car il pourrait recristalliser *in vitro*.

Conclusion

Pour conclure, notre composé de référence tétracyclique **AFA 144** semblait initialement disposer de caractéristiques physico-chimiques favorisant une diffusion par voie passive au travers de la BHE. En effet, sa très faible polarité ($logP_{est}$ = à 3,82) et sa masse molaire relativement peu élevée en faisait une molécule de choix afin de surmonter cette barrière biologique pratiquement imperméable. Mais, le test PAMPA-BBB a prouvé que notre composé ne diffusait pas efficacement par un mécanisme passif au travers de la BHE. Ainsi, il faudrait donc explorer d'autres modèles permettant d'évaluer le passage par transport actif de l'**AFA 144** ou alors nous pencher vers des méthodes de vectorisation de la molécule. C'est cette stratégie que nous avons décidé d'adopter et qui sera traitée dans le chapitre suivant.

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 6

1.1. Chemicals

DMSO, acetonitrile, formic acid, chloroform, PBS, *n*-dodecane and all other reference compounds were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich; except for porcine polar brain lipid extract, which was obtained from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA). Water was obtained from a Milli-Q water-purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) and used for all aqueous solutions.

1.2. PAMPA method

1.2.1. Membrane solution preparation

800 µL of PBLE ([PBLE] = 25 $mg.mL^{-1}$ in chloroform) was added in a pre-weighted round bottom flask. The chloroform was then evaporated and PBLE was subsequently dissolved in 1000 µL of pure n-dodecane. The final PBLE concentration was equal to 20 $mg.mL^{-1}$, which was used to coat each well in the PAMPA-BBB apparatus.

1.2.2. Drug solution preparation

Briefly, the stock solutions of each compound were prepared in DMSO, PBS or in ACN/Water (50/50) as described in *Tableau 27*.

Compound	MW ($g.mol^{-1}$)	Diluent	Final concentration		Weight (mg)	DMSO Volume (mL)
			mM	$g.L^{-1}$		
Chlorpromazine	355.33	PBS	28	9.93	248	25
Verapamil	491.1	PBS	15	7.31	73	10
Midazolam	325.77	DMSO	53	17.26	17	1
Caffeine	194.19	PBS	26	4.99	125	25
Atenolol	266.34	PBS	4	0.98	25	25

Theophyline	**180.17**	**PBS**	**46**	**8.31**	**208**	**25**
Tenoxicam	**337.376**	**DMSO**	**50**	**16.86**	**17**	**1**
Metoclopramide	**336.26**	**ACN / Water**	**10**	**3.36**	**34**	**10**

Tableau 27: Stock solution preparation

Then, 2 subsequent dilutions were used to prepare each final compound solution, as illustrated in *Tableau 28* and *Tableau 29*.

Compound	**chlorpromazine**	**verapamil**	**midazolam**	**caffeine**	**atenolol**	**theophyline**	**tenoxicam**
Initial Concentration (µM)	**28**	**15**	**53**	**26**	**4**	**46**	**50**
Final concentration (µM)	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
Final Volume (µL)	**10000**	**10000**	**10000**	**10000**	**10000**	**10000**	**10000**
DMSO %	**0**	**100**	**100**	**0**	**0**	**0**	**100**
Initial Volume (µL)	**357**	**667**	**189**	**385**	**2500**	**217**	**200**
Dilution	**28**	**15**	**53**	**26**	**4**	**46**	**50**
PBS added Volume (µL)	**5486**						
Final DMSO %	**10.7**						

Tableau 28: First dilution

Initial Concentration (µM)	**1000**
Final Concentration (µM)	**50**
Final Volume (µL)	**33000**
DMSO %	**10,7**
Initial Volume (µL)	**1650**
Dilution	**20**
PBS added Volume (µL)	**31350**
Final DMSO %	**0.5**

Tableau 29: Second dilution

Each final compound solution was obtained at a concentration of 50 µM.

1.2.3. Internal standard preparation

The metoclopramide was used as the internal standard for the HPLC measurements. This compound was not poured directly in the multi-drug K7. Instead, it was added at a precise concentration prepared as followed:

IS1: Final Concentration = 5,89 µM (in ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA)
14,72 µL of 10 mM metoclopramide solution in a 25 mL calibrated flask, and make up to the mark with a solution of ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA.

IS2: : Final Concentration = 560 nM (in ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA)
951 µL of 5,89 µM metoclopramide solution (IS1) in a 10 mL calibrated flask, and make up to the mark with a solution of ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA.

IS3 : : Final Concentration = 311 nM (in ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA)
528 µL of 5,89 µM metoclopramide solution (IS1) in a 10 mL calibrated flask, and make up to the mark with a solution of ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA.

IS4: Final Concentration = 283 nM (in ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA)
480 µL of 5,89 µM metoclopramide solution 5,89 µM (IS1) in a 10 mL calibrated flask, and make up to the mark with a solution of ACN/H2O (1:1) + 0,1 % FA.

D1: 3 mL of a 50% ACN/Eau/0.1 FA solution and make up to the mark with a solution of PBS 7.4.

1.2.4. PAMPA apparatus

Then, a parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) system was used to determine the effective permeability and membrane retention. Each well of the top plate (96-well polycarbonate-based filter donor plates (MultiscreenTM-IP, MAIPN4510, pore size 0.45 µm; Millipore)) was coated with 10 µl of porcine polar brain lipid extract (PBLE) solution, then 300 µM of drug solutions was put on the membrane. The bottom plate (96-well PTFE acceptor plates (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR; Millipore)), was filled with 300 µl buffer solution (0.01 M PBS buffer, pH = 7.4). The donor and acceptor plates were fit, and the donor plate was coated with a wet paper tissue and a plate lid to avoid the evaporation of the solvent. The sandwich system was incubated at 37 °C or at room temperature for 2h at 50 rpm. (The plates were shaken and incubated in a Heidolph Titramax 1000.) After the incubation, PAMPA sandwich plates were separated and compound concentrations in donor ($C_D(t)$) and acceptor ($C_A(t)$)

solutions were determined by HPLC-MS/MS.
Test solutions, originated from PAMPA experiments were prepared in 96-well polypropylene plates (Agilent, Waldbronn, Germany) and sealed before injection.

1.2.5. Quantitative chromatographic analysis

Measurements were performed on a AB Sciex API 4000 LC/MS/MS with Agilent 1100 LC, equipped with a vacuum degasser, a binary pump, a Nexera SIL-30ACMP Multiplate Autosampler, and a column oven and controlled with LabSolutions software. Chromatographic analysis was performed at 40 °C on a Chromolith FastGradient RP-18e, 50 mm × 2 mm monolith column (Merck, Darmstadt, Germany) with a mobile phase flow rate of 1.7 ml/min. Composition of mobile phase A was 0.1% (v/v) formic acid in water, mobile phase B was the mixture of acetonitrile and water 95:5 (v/v) with 0.1% (v/v) formic acid. The applied gradient program was a two-step linear gradient of 0–15% B in the first 0.3 min, then 15–100% B at a range of 0.3–1.8 min, 100% B was kept for another 0.6 min, and finally at 2.41 min the percentage of B was dropped to 0%. This was followed by a 0.55 min equilibration period prior to the next injection corresponding to approximately 3 min total analysis time per sample. Chromatograms were recorded at 200–500 nm and integration was at the UV_{max} of each compound. The applied injection volume was 6 µl.

1.2.6. Data treatment

Measured $logP_e$ values were correlated to logBB values taken from the literature ($logP_e$ values are presented in the Supplementary Material, while see Table 1 for logBB references). LogBB is the logarithm of the ratio of the steady-state total concentration of a compound in the brain to that in the plasma. The goodness of linear correlation ($logP_e$ vs logBB) was shown by R^2 values. This correlation was further characterized by a ranking method based on the sum of ranking differences (SRD). SRD was computed by summing the absolute differences of data rankings with respect to a reference. Here, the in vivo logBB data were used as reference. The resulting SRD patterns suggested the pertinence of modeling.

CHAPITRE 7 : ETUDES ET TECHNIQUES DE NANOENCAPSULATION DES COMPOSES INDENOBENZO[*B*]THIOPHENES

D'après les résultats obtenus lors des différents essais biologiques, nous avons décidé d'effectuer une étude préliminaire sur l'encapsulation de notre composé le plus actif sous la forme de nanoparticules, le 2-hydroxy-8-methoxy-6*H*-benzo[*b*]indéno[1,2-*d*]thiophèn-6-one AFA 144-1. Le but est d'obtenir un produit qui passerait potentiellement la BHE de manière efficace et disposerait donc d'un meilleur effet *in vivo* que la molécule sous sa forme initiale.

1. INTERET ET DEVELOPPEMENT DE NANOFORMULATIONS DANS LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES

Le transport direct ainsi que la solubilisation de molécules présentant une polarité limitée constituent actuellement un des enjeux majeurs dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques. Des études menées dans les années 2000 ont montrées que le coût du développement d'un médicament était d'environ 800 millions de dollars (USD), et que l'une des raisons principales était que seulement une molécule sur dix présentait un profil de biodisponibilité satisfaisant pour atteindre les phases finales de validation.[253] En outre, un système de classification biopharmaceutique, le système BCS (Figure 76), a été mise en place pour la prédiction de l'absorption intestinale des médicaments
C'est pour cela que la protection des principes actifs et le contrôle de leur libération au niveau d'un site précis fait toujours aujourd'hui l'objet d'intenses études.
Les problèmes rencontrés lors de l'administration d'un médicament sont généralement causés par :

- Une concentration médicamenteuse délivrée insuffisante, potentiellement dû à une métabolisation du composé actif, à sa pénétration au niveau d'autres tissus ou bien à une mauvaise capacité d'absorption tissulaire

- La faible solubilité du composé dans le milieu physiologique

- Une clairance ainsi qu'une élimination rapide de la substance active

- Des paramètres pharmacocinétiques insatisfaisants

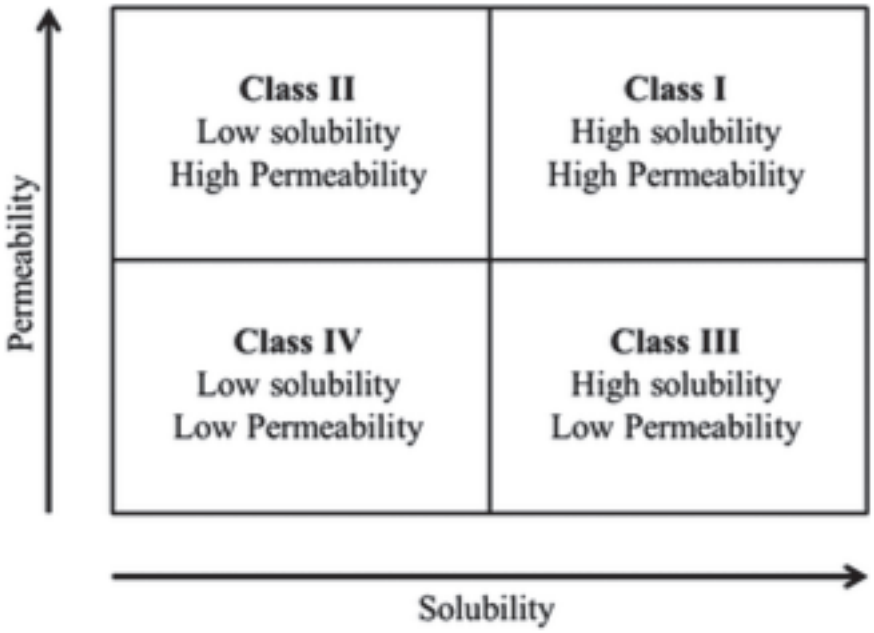


Figure 76: Différents catégories médicamenteuses selon le système de classification biopharmaceutique (BCS)

Différentes stratégies ont donc été imaginées comme par exemple, l'approche par synthèse de prodrogue (appelée aussi promédicament) permettant notamment l'administration d'une molécule inactive qui suite à une métabolisation *in vivo* va permettre la transformation en un métabolite actif présentant une absorption, une distribution, un métabolisme, une élimination (ADME) et une sélectivité optimisée.
C'est dans cette même optique que la synthèse de nouveaux vecteurs grâce notamment à l'utilisation de nanotechnologies a été mise en œuvre.[254] Ces derniers ont notamment été validés par la Food and Drug Administration (FDA) pour la délivrance de principes actifs que ce soit des peptides, des protéines ou des vaccins. Ce type de formulation permet la libération contrôlée sur des périodes très longues pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines et dispose de paramètres de biocompatiblité et de biodiosponibilité accrus.[255]
La dénomination en tant que particules « nano » (aussi appelées nanosphères ou nanocapsules) provient directement de la taille à laquelle les particules ont été formulées, qui est de l'ordre de la dizaine ou centaine de nanomètre. Ce type de formulation offre de nombreux avantages tels que :

- L'administration de principes actifs très peu solubles en suspension aqueuse,

- L'amélioration de la stabilité du principe actif,

- La protection du principe actif vis-à-vis du métabolisme primaire et secondaire (oxydation, hydrolyse, isomérisation, …),

- Le contrôle de la cinétique de libération du médicament,

- Une meilleure biocompatibilité tissulaire,

- De meilleurs paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

Il existe plusieurs méthodes et procédés permettant la formation de nanoparticules comme celles répertoriées par Wais *et coll.* au cours de leurs récents travaux.[256] Trois catégories principales se dégagent :

- les méthodes « top-down »,

- les méthodes « bottom-up »,

- les méthodes d'encapsulation.

Dans le cadre de cette thèse, nous allons particulièrement cibler la dernière technique, mettant en jeu une matrice polymérique et un principe actif hydrophobe qui vont permettre la formation d'une « nanosphère » spécifique.

1.1. Formation de nanosphères polymériques

Grâce à leur très petite taille mais aussi à une surface importante, les nanoparticules disposent d'uniques avantages en comparaison à d'autres types de formulation.[257]Afin de former les nanosphères, nous avons utilisé la technique de dite de « nanoprécipitation » qui est une méthode très simple à mettre en œuvre, avant tout destinée à l'encapsulation de composés actifs hydrophobes.[257] Elle permet la formation instantanée de nanoparticules et peut aisément être réalisée en une seule étape. Cette méthode, requière l'addition de deux solvants miscibles dans lequel l'un de ces derniers (le solvant) va permettre la solubilisation du polymère et du composé actif alors que le second (« le non-solvant ») ne le permettra pas. Fessi et coll.[258] ont été les premiers à développer et breveter la technique de nanoprécipitation pour la préparation de nanoparticules en vue d'une administration de composés médicamenteux.

Dans notre cas de figure, nous avons développé un procédé modifié de nanoprécipitation utilisant un co-solvant afin d'augmenter l'EE et le DLE (définis

ci-après), réduire la taille des particules et favoriser une libération prolongée du composé actif.
Le protocole de « nanoprécipitation modifiée » utilisé (décrit de façon précise en partie expérimentale) est le suivant :

- Dissolution du composé actif et du polymère dans un volume d'acétone,
- Addition "goutte-à-goutte" à un débit de 0,5 mL.min^{-1} de 3 mL de cette phase organique dans une solution aqueuse d'un volume v= 37,5 mL contenant ou non un surfactif (tween 20, concentration à 1% du volume total)
- Homogénéisation à l'aide d'un agitateur magnétique de l'émulsion obtenue
- Purification des nanoparticules *via* 3 cycles de dialyse (membrane cellulosique Por®6 pour dialyse 50 kDa, Spectrum Laboratories, USA) d'une durée de 2h chacune, la dernière étant réalisée sur 18h en milieu aqueux

Pour la formulation des nanoparticules blanches, chargées d'harmine ou d'AFA 144-1, nous suivrons exactement cette procédure en faisant varier les différentes concentrations en composés actifs, polymère ou en surfactif. Les différentes formulations testées ainsi que les études de caractérisation sont décrites ci-après.

1.2. Etude de caractérisation

La caractérisation des nanoparticules repose en général sur la quantification de plusieurs paramètres physiques dont :

- Le diamètre moyen des particules (Z-average) en nanomètre (nm)

- L'indice de polydispersité (PdI), qui représente la polydispersité de la distribution des particules. Le PdI est une valeur comprise entre 0 et 1, 1 étant la valeur de plus grande polydispersité,

- Le potentiel zêta ou ζ, qui représente la charge électrique en mV de la surface des particules colloïdales. Il est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité de l'échantillon,

- L'efficacité d'encapsulation (« Entrapment efficiency » ou « EE »), qui va permettre l'estimation de la quantité de drogue encapsulée dans les nanoparticules polymériques. Il va être quantifié via la formule suivante :

% EE = [(Quantité de drogue encapsulée) / (Quantité de drogue totale)]*100

- Taux de chargement DLE (« Drug loading efficiency »), qui va permettre d'estimer la quantité de drogue encapsulée en fonction de la masse totale de nanoparticules (NPs).

% DLE = [(Masse de drogue encapsulée) / (Masse de NPs chargées)]*100

Dans notre cas de figure, nous avons réalisés les mesures du diamètre moyen, du PdI ainsi que du potentiel ζ en utilisant le Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). Afin de permettre une bonne répétabilité et de valider ses résultats, nous avons réalisé au moins 3 lectures avec un nombre d'échantillon ≥ 3.

L'estimation des quantités de drogue encapsulées a quant à elle été réalisée via analyse spectrophotométrique en utilisant le Tecan Safire Plate Reader (Tecan, USA).

1.3. Choix du polymère pour le developpment de nanoparticules

Lors du développement de nanoparticules polymérique, se pose alors la question du choix du type de polymère à utiliser au sein de ses formulations. Il en existe plusieurs sortes tels que ceux d'origine naturelle, biosynthétique ou totalement synthétisé chimiquement.

1.3.1. Polymère d'origine naturelle

Les polymères d'origine naturelle sont une ressource renouvelable qui peuvent être obtenus à partir de différentes sources végétales ou animales. Leur dégradation sous forme d'eau, de dioxyde de carbone ou de petites molécules inorganiques en font des matières premières résolument écologiques. Les plus connus et utilisés sont le chitosane, l'alginate ou encore l'amidon.[259]

Le chitosane dispose d'une bonne biocompatibilité, biodégradabilité, et a la capacité de se lier aux protéines négativement chargées ou aux plasmides grâce à des interactions électrostatiques afin de former des polymères composites les protégeant des phénomènes de dégradations.[259] La présence en grande nombre de fonctions hydroxyles et amines sur le squelette composant le chitosane permet la modification de ce dernier (acylation, alkylation, carboxyméthylation, hydroxylation) et l'obtention de nombreux dérivés hémi-synthétiques. Parmi ceux-là, les dérivés obtenus à partir de carboxyméthylation et de « quaternerisation » (transformation d'une amine tertiaire en amine quaternaire) démontrent une excellente solubilité dans l'eau et sont l'objet de plusieurs études. Pour toutes ces raisons, le chitosane et ses nombreux dérivés sont considérés actuellement comme des polymères avec un très grand potentiel au niveau biomédical.[259]

L'amidon est de son côté très connu pour sa non-toxicité, ses facultés à ne pas

entrainer d'interactions médicamenteuses et peut-être stocké très facilement. Ainsi, il est vastement utilisé dans l'industrie pharmaceutique en tant que transporteur, excipient ou encore comme agent protecteur (plasma). Plus particulièrement, il a été observé que les micro- et nanosphères d'amidon permettent d'augmenter la surface d'adsorption et la concentration en groupements fonctionnels de ce composé, d'améliorer la stabilité colloïdale et de prolonger la durée de relargage de la substance active.[259]

L'alginate est un polysaccharide naturel obtenu principalement à partir de plantes marines tels que les *Chlorophyceae, Cyanophyceae* et *Rhodophyceae*. De nos jours, les nombreux alginates utilisés sont principalement des dérivés comme par exemple l'alginate de sodium ou de calcium. Ces polymères sont classés selon leur viscosité, qui peut être faible, modérée ou importante, dépendamment de leur masse molaire relative et de leur composition en alginate. Ils démontrent de nombreuses caractéristiques intéressantes telles qu'une bonne adsorption des ions métalliques, une excellente absorption de l'humidité, sont biodégradables, biocompatibles et possède une perméabilité importante à l'oxygène.[259]

1.3.2. Polymère d'origine biosynthétique

Les polymères biosynthétiques sont obtenus par des procédés d'hydrolyse enzymatique (par utilisation d'enzymes microbiennes) et contiennent des polyesters ainsi que des polysaccharides microbiens.[260] De bons exemple de ces polymères sont le poly-ß-hydroxybutyrate (PHB) ou encore le poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate).

Le PHB est un type de polymère de masse molaire importante produit par les microorganismes dans des conditions non favorables de croissance, avec un apport limité en nutriments.[260] Ce dernier dispose de caractéristiques proches à celles des polymères synthétiques (biocompatibilité, biodégradable, activité optique, etc…). Il peut être utilisé en tant que transporteur mais également en tant que matière première dans la régénération tissulaire et les chirurgies osseuses. Les études *in vitro* et *in vivo* ont prouvé que les nanoparticules polymériques de PHB à base d'acide désoxycholiques et d'insuline améliorait l'absorption intestinale de l'insuline et résultait en un effet hypoglycémiant prolongé, au-delà de 24h. Aussi, le PHB est vastement utilisé en tant que composant des réservoirs sanguins et substituant vasculaire pour sa capacité à se désorber des protéines contenues dans le sérum.[260]

1.3.3. Polymère d'origine synthétique

Il existe actuellement un nombre impressionnant de polymère d'origine synthétique. On peut citer notamment le PLGA, le PLA, le polyuréthane (PU), le poly(methyl méthacrylate) et le polyvinylpyrrolidone (PVP) qui sont tous synthétisé chimiquement.[261]

Le PLA et ses copolymères sont entièrement biodégradables, biocompatibles, non-toxiques, renouvelables et sont approuvé par la FDA.[261] De plus, ils disposent d'une excellente élasticité ainsi que d'une faible durée de demi-vie ce qui permet leur utilisation dans plusieurs domaines dont la réparation osseuse et des cartilages, ou en tant que transporteurs dans les formulations à libération prolongée.[261] Dans ces dernières, le PLA va permettre la libération graduelle du principe actif par sa dégradation lente *in vivo*.

Le PU et ses dérivés disposent d'une excellente biocompatibilité (biologique, sanguine et tissulaire), d'une bonne élasticité ainsi que d'une importante résistance en comparaison aux autres matériaux polymériques.[261] Ils ont ainsi été utilisé pour la production de cathéters ou encore d'organe artificiels. Les avantages que le PU procure sont une très faible toxicité, est non-allergène ou carcinogène et est un bon inducteur de la coagulation. En revanche, il ne peut être dégradé naturellement ce qui est un frein à son utilisation. De ce fait, de nombreuses études récentes portent sur le développement de dérivés du PU biodégradables tels que ceux à base de lignine, de cellulose ou encore de d'amidon.[261]

Le PLGA est un type de dérivé biodégradable utilisés dans de nombreuses formulations telles que les microsphères, les nanoparticules ou encore les biofilms.[261] Les principes actifs encapsulés dans les nanoparticules ou microsphères de PLGA ont la particularité d'avoir une activité antitumorale plus marquée, moins d'effets secondaires et une meilleure durée de vie. C'est pourquoi les copolymères de PLGA ont été vastement employé pour la libération prolongée d'agents chimiothérapeutiques, d'antiobiotiques, de peptides et de protéines.[261]

1.3.4. Facteurs influençant la libération du principe actif dans les nanoparticules polymériques PLA-PEG

Le copolymère PLA-PEG est un polymère amphiphile qui montre une bonne stabilité *in vivo*. Le greffage de chaines hydrophiles de PEG permet d'augmenter la solubilité des principes actifs insolubles, empêche l'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules et bloque l'activité du système réticulo-endoplasmique à leur égard.[262]

En outre, plusieurs facteurs peuvent altérer la cinétique de libération du principe actifs dont les plus importants : le poids moléculaire et la longueur des chaines de PLA et de PEG.[263] Ces caractéristiques peuvent être contrôlé en modifiant la concentration de ces 2 polymères et la masse molaire en PEG. Il a ainsi été constaté que plus la chaine de PLA était longue, plus la taille des nanoparticules et le taux d'encapsulation était important. Aussi, plus la masse molaire de PEG est importante, plus la quantité en principe actif libéré est importante.[263] Ainsi, il est possible de contrôler la libération du principe actif en faisant varier la masse

molaire de PEG (ce qui va aussi impacter la masse molaire total du copolymère PLA-PEG).[262] Yang et coll.[264] ont constaté que l'augmentation de la taille des chaines de PLA permettant d'augmenter le diamètre des micelles, le taux d'encapsulation et l'interaction entre ces chaines de PLA et un principe actif hydrophobe. Dans le cas du PEG, une faible masse molaire en PEG va entrainer une déformation des chaines par manque de flexibilité. Par conséquent, une augmentation de la masse molaire de PEG entraine une meilleure stabilité structurale. A l'inverse, l'augmentation trop importante de la taille des chaines de PLA va déstructurer le copolymère, ce qui peut même résulter en la condensation des particules dans le solvant.

L'étude de la littérature démontre le travail réalisé sur les diblocks copolymériques PLA-PEG. En particulier, l'impact de la taille de la chaine PEG sur les taux d'encapsulation et la libération prolongé du principe actif. En fonction de la masse molaire du principe actif, le choix se porte généralement sur les PLA-PEG_{1000}, PLA-PEG_{2000}, PLA-PEG_{5000} ou PLA-PEG_{10000}.[264]

2. ETUDE DE NANOFORMULATIONS

2.1. Nanoparticules « blanches »

L'étude de la littérature a permis d'établir un premier profil des nanoformulations possibles. Nous avons débuté par une formulation extrêmement simple en présence de PLGA (« poly-(lactic-co-glycolic acid) ») et de poloxamer par la technique de nanoprécipitation (Tableau *30*).

Formulation	**1-3**
PLGA (% m/m)	**1**
Poloxamer (% m/m)	**0,5**

Tableau 30: Composition des nanoformulations blanches (% m/m en suspension purifiée)

Nous avons donc synthétisé efficacement une suspension de nanoparticules « blanches », n'incorporant aucun principe actif, possédant une matrice polymérique de PLGA. Les valeurs des paramètres caractéristiques de cette formulation sont résumées dans le tableau suivant (Tableau *31*).

Paramètre	**Valeur**

Z-ave (nm)	142,3 ± 4,4
PdI	0,086 ± 0,02
ζ (mV)	-29,8 ± 1,33

Tableau 31: Caractérisation des nanoformulations blanches

Il s'agit donc de caractéristiques intéressantes pour un usage parentéral car le diamètre hydrdynamique est inférieur à 200 nm, la polydispersité est très faible et la surface de charge, clairement négative, garantit une bonne stabilité de la suspension colloidale par répulsions électrostatiques.

2.2. Nanoparticules d'harmine

Afin d'optimiser la synthèse de nos nanoformulations, nous avons ensuite tenté de synthétiser des nanoparticules chargées en harmine, composé qui se rapproche de par sa masse moléculaire, son logP et sa structure chimique, de notre composé **AFA 144** (Tableau *32*).

Formulation	1-3	4-6	7-9	10-12
Poloxamer (% m/m)	0,5	0,5	/	/
PLGA (% m/m)	1	1	/	/
PLA-PEG (% m/m)	/	/	1	1
Harmine ($mg.mL^{-1}$)	2	1	1	1
Tween 20 (% m/m)	/	/	/	1

Tableau 32: Composition des nanoformulations d'harmine

Toutes les formulations 1-9 ont toutes abouti à la formation d'une suspension instable, caractérisée par des phénomènes de précipitations et de sédimentations internes. C'est pour cela que nous avons modifié plusieurs facteurs lors de nos différentes expérimentations :

- Diminution de la quantité en drogue (harmine)
- Changement de la nature du polymère (PLA-PEG à la place du PLGA+ poloxamer)

- Ajout d'un surfactant (Tween 20)

En conséquence, nous avons finalement abouti à la synthèse d'une nanosuspension stable d'harmine, encapsulée dans une matrice polymérique de PLA-PEG. Les valeurs des paramètres caractéristiques de cette formulation sont résumées dans le tableau suivant (Tableau *33*).

Paramètre	Valeurs
Z-ave (nm)	82,4 ± 2,42
PdI	0,22 ± 0,03
ζ (mV)	-11,3 ± 0,8
EE (%)	21 ± 0,9
DLE (%)	2,3 ± 0,02

Tableau 33: Caractérisation des nanoformulations d'harmine

Afin de réaliser une étude comparative entre nos différents échantillons, nous avons synthétisé une nouvelle suspension de nanoparticules blanches, basée cette fois-ci sur la formulation suivante (Tableau *34*) et avons procédé ensuite à sa caractérisation (Tableau *35*) :

Formulation	1-3
PLA-PEG (% m/m)	1
Tween 20 (% m/m)	1

Tableau 34: Composition des nanoformulations blanches

Paramètre	Valeurs
Z-ave (nm)	99,5 ± 1,32
PdI	0,19 ± 0,01
ζ (mV)	-1,43 ± 0,12

Tableau 35: Caractérisation des nanoparticules blanches

2.3. Nanoparticules d'AFA 144

Faisant suite à nos travaux précédents, nous avons adapté le protocole expérimental utilisé lors de la formation des nanoparticules d'harmine à la synthèse des nanoparticules chargées en **AFA 144** (Tableau *36*).

Formulation	1-3

PLA-PEG (% m/m)	1
AFA 144 (mg.mL^{-1})	1
Tween 20 (% m/m)	1

Tableau 36: Composition des nanoformulations chargées en AFA 144

Cette formulation s'est révélée efficace puisque nous avons réussi à créer une suspension stable, où notre dérivé indénobenzo[*b*]thiophène a pu être efficacement encapsulé.
Nous avons ensuite logiquement procédé à la mesure des valeurs des paramètres caractéristiques de cette formulation, qui sont résumées dans le tableau suivant (Tableau *37*).

Paramètre	Valeurs
Z-ave (nm)	92,4 ± 2,01
PdI	0,131± 0,02
ζ (mV)	-9,8 ± 1,01
EE (%)	33 ± 1,2
DLE (%)	3,75 ± 0,1

Tableau 37: Caractérisation des nanoformulations chargées en AFA 144

Ainsi, nous avons réussi à synthétiser une suspension de nanoparticules chargée en **AFA 144** et une autre chargée en harmine grâce à la formulation suivante :

- PLA-PEG 1% (m/m)
- Drogue (1mg.mL^{-1})
- Tween 20 1% (m/m)

Les nanosphères obtenus disposent d'une taille moyenne inférieure à 100 nm, d'un bon indice de polydispersité ainsi que d'un potentiel ζ de l'ordre de -10 mV.

Finalement, si nous comparons les nanoformulations d'harmine et d'**AFA 144**, nous pouvons observer que les particules d'**AFA 144** sont légèrement plus petites que celles d'harmine, qu'elles disposent d'un meilleur PdI et que les taux d'encapsulation et de chargement sont supérieurs.
Nous pouvons donc conclure quant à une formulation plus efficace du composé **AFA 144** en comparaison à l'harmine.

Aussi et afin d'aller plus loin, nous prévoyons de réaliser très prochainement des tests de libération et de stabilité du principe actif **AFA 144**.

Nanoparticules synthesis :

NPs were prepared by the nanoprecipitation method.Similar hydrodynamic diameters were obtained through adjustments of the polymer concentrations in the organic phase.

Briefly, PLA-PEG_{5000} polymer was dissolved in acetone at a concentration of 10 $mg.mL^{-1}$. The active compounds (Harmine or AFA 144) were then diluted by a mixture of PLA-PEG_{5000} / acetone to reach an active compound content of 1 $mg.mL^{-1}$. These solutions were then injected in MilliQ water (volume ratio 1:3) at a constant flow rate of 1 $mL \times min^{-1}$ under magnetic stirring. Control PLA NPs (without Harmine or AFA 144) were similarly obtained by dissolving PLA-PEG_{5000} in acetone.

NPs were purified by dialysis (Por®6 pre-wetted membrane dialysis 50 kDa, Spectrum Laboratories, USA) against a 100-fold volume of Milli-Q water for 6 h, three times.
An additional step of purification and concentration of NPs was carried out by using a polysulfone tangential filtration membrane (pore size: 50 nm, Spectrum Laboratories, USA) at a flow rate of 3.5 $mL \times min^{-1}$ (Table S5). NP suspensions were concentrated between 3 to 5 times while remaining stable at 4°C for at least 2 weeks.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE

Au cours de cette thèse, nous avons étudié deux thématiques principales que sont le développement d'analogues de la CA-4 et d'inhibiteurs de kinases Dyrk.

Les travaux effectués sur la CA-4 ont permis de synthétiser un grand nombre d'analogues nouveaux, et cela par différentes voies synthétiques. Nous avons dans un premier temps exploré la pharmacomodulation du noyau B en le remplaçant par différents motifs tels que le benzo[*b*]thiophène, le thiophène ou encore le benzothiazole. Ces derniers ont de plus été greffés et substitués dans différentes positions caractéristiques par des groupements généralement polaires dans le but d'augmenter leur activité. Aussi, nous avons étudié le remplacement de la double liaison par un noyau hétéroaromatique, une liaison iso-éthylénique ou encore cétonique afin de créer des produits disposant d'une stabilité métaboliques accrues par rapport à la CA-4. Par ailleurs, nous avons pu comparer lors de ces travaux l'efficacité de différentes voies synthétiques tels que le couplage de Suzuki, la réaction de Wittig, la semi-hydrogénation partielle pallado-catalysée ou encore la cycloaddition [2+3] de Huisgen (*Figure 76*).

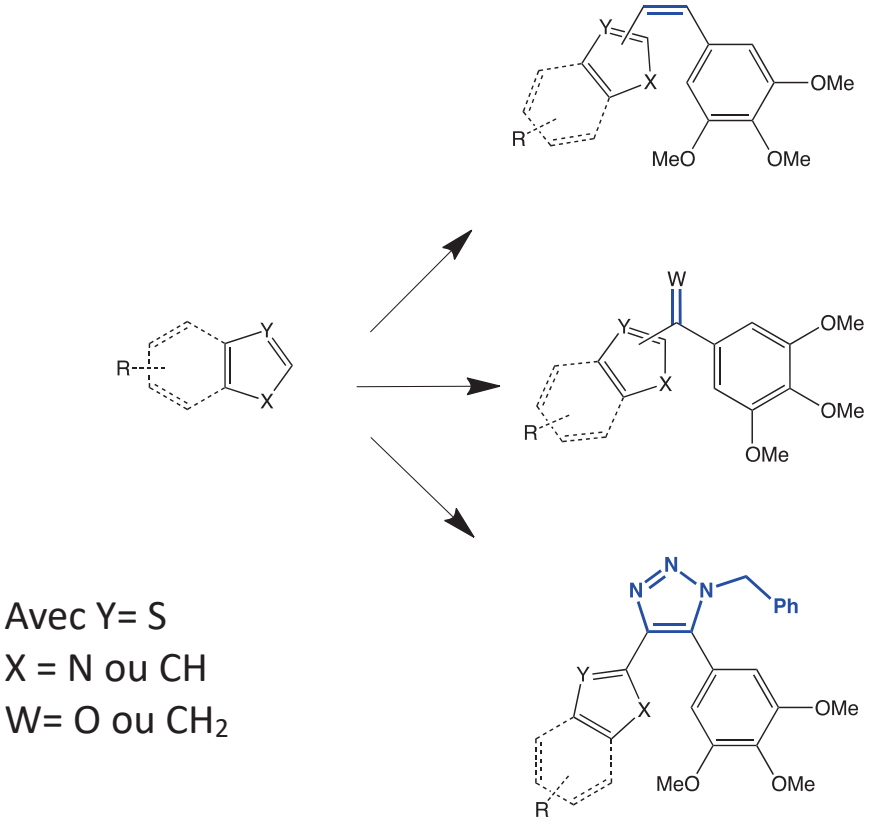


Figure 77: Différents analogues de la CA-4 préparés

L'étude de la série des analogues *iso*CA-4 a permis de mettre en évidence un produit présentant une activité non négligeable, le composé **182**. Mais, la majorité des phenstatines et des dérivés *iso*CA-4 synthétisés se sont montrés inactifs lors des tests de prolifération cellulaire.
Les produits finaux **110**, **133** et **135**, présentant une double liaison *cis*-méthylénique et greffés en position 2 se sont avérés les plus intéressants avec des IC_{50} inférieures à la centaine de nanomolaire (Figure *77*). Ainsi, les noyaux benzo[*b*]thiophène et thiophène favorisent l'activité cytotoxique par inhibition de la polymérisation de la tubuline en microtubule. Il est intéressant de noter que les valeurs d'activité inhibitrice sont pratiquement similaires quel que soit la lignée étudiée. Ces composés sont donc cytotoxiques sur un panel cellulaire varié, comprenant une lignée multi-résistante.

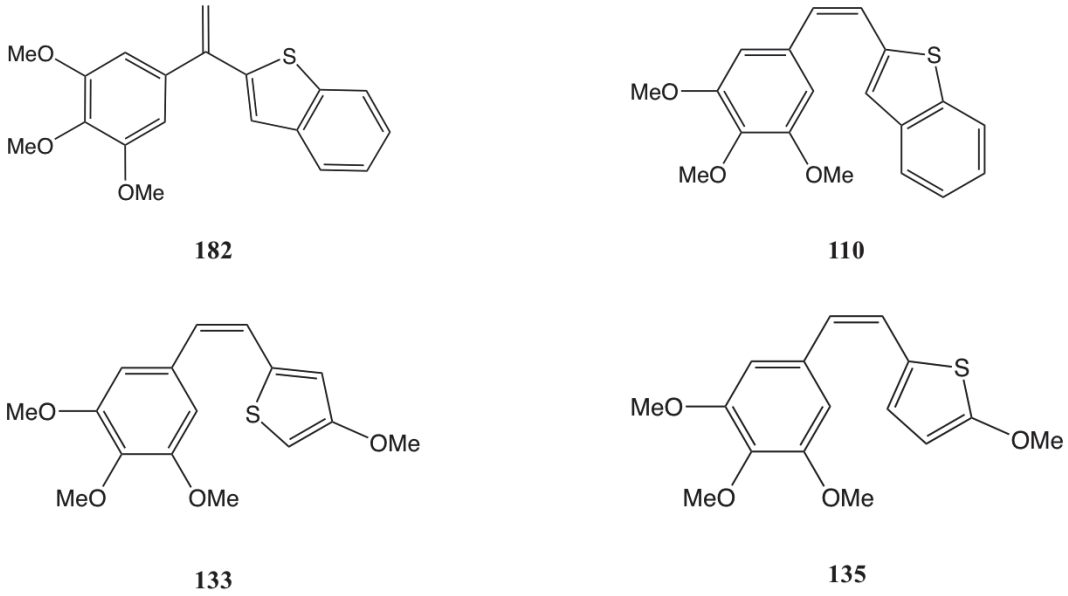


Figure 78: Analogues de la CA-4 synthétisés les plus actifs

La série des indénobenzo[*b*]thiophènes, initialement développée dans le but de créer des inhibiteurs de la protéine kinase CK2. Cependant, les résultats des premiers tests ont montré une plus grande spécificité pour la famille des kinases Dyrk, impliquée notamment dans le développement de maladie neurodégénératives (syndrome de Down, Alzheimer) ou du glioblastome.

La synthèse d'une série de 14 analogues du composé CV210 nous a permis de tirer plusieurs enseignements sur les relations structure-activité, et notamment l'importance d'une substitution par un groupement polaire hydrole en position 5 du tétracycle. Ainsi, le composé qui s'est avéré le plus actif est le dérivé **246** (également surnommé **AFA 144**), disposant d'une IC_{50} de 41 nM sur Dyrk1A (*Figure 78*).

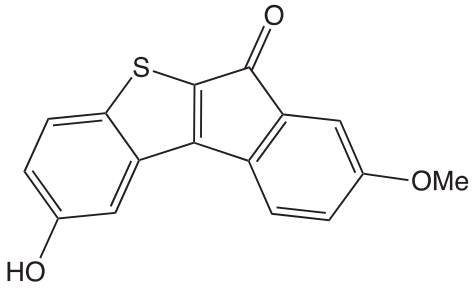


Figure 79: Composé **246** / **AFA 144**, molécule « hit »

Malheureusement, les tests subséquents de cytotoxicité ont démontré une faible activité de notre molécule « hit », potentiellement dû à des problèmes de solubilité dans le milieu cellulaire. De la même façon, la perméabilité de la BHE vis-à-vis de notre composé **AFA 144** s'est avéré très faible, ce dernier ne diffusant pratiquement pas à travers cette structure biologique. Nous avons alors décidé d'orienter nos travaux vers l'élaboration d'une formulation pouvant favoriser le passage de cette structure extrêmement jointive. La synthèse de vecteurs, et plus particulièrement de nanoparticules incorporant l'**AFA 144** s'est alors révélée très intéressante. La forte hydrophobie de ce tétracycle ($LogP_{est}$ = 3,82) conjuguée à sa faible masse moléculaire en ont fait un composé de choix dans la synthèse de ce type de formulation. Nous avons donc réussi à préparer des nanosphères polymériques à base de [PLA-PEG] présentant un taux d'encapsulation de 33 % et une efficacité d'encapsulation de 3,75 %. Ces structures font actuellement l'objet de tests de viabilité cellulaire sur des cellules du glioblastome. Le but final de ces travaux étant la formation de nanosphères présentant une cytotoxicité accrue sur ces lignées, en comparaison au produit non encapsulé.
Il sera alors ensuite intéressant d'étudier l'impact de ces nanoparticules sur des modèles *in vivo* du glioblastome.

ANNEXE : PUBLICATION

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 174–180

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and biological evaluation of thiophene and benzo[*b*]thiophene analogs of combretastatin A-4 and isocombretastatin A-4: A comparison between the linkage positions of the 3,4,5-trimethoxystyrene unit

Cong Viet Do [a,†], Abdelfattah Faouzi [a,†], Caroline Barette [c,d,e], Amaury Farce [g,h], Marie-Odile Fauvarque [c,d,e], Evelyne Colomb [b], Laura Catry [a], Odile Berthier-Vergnes [f], Marek Haftek [b], Roland Barret [a], Thierry Lomberget [a,*]

[a] Université de Lyon, Université Lyon 1, Faculté de Pharmacie – ISPB, EA 4446 Biomolécules, Cancer et Chimiorésistances, SFR Santé Lyon-Est CNRS UMS3453 – INSERM US7, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon Cedex 08, France
[b] Université Lyon 1, Faculté de Médecine et de Pharmacie, EA 4169 «Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of the Skin Barrier Function», 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon Cedex 08, France
[c] Univ. Grenoble Alpes, iRTSV-BGE, F-38000 Grenoble, France
[d] CEA, iRTSV-BGE, F-38000 Grenoble, France
[e] INSERM U1038, BGE, F-38000 Grenoble, France
[f] Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, CNRS UMR5534 – Université Lyon 1, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France
[g] Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France
[h] Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, EA GRIIOT (4481), IFR114, 3 Rue du Pr Laguesse, B.P. 83, F-59006 Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 July 2015
Revised 3 November 2015
Accepted 4 November 2015
Available online 10 November 2015

Keywords:
Combretastatin A-4
Inhibitors of tubulin assembly
Antiproliferative agents
Heterocycles
Melanocyte

ABSTRACT

Combretastatin A-4 and isocombretastatin A-4 derivatives having thiophenes or benzo[*b*]thiophenes instead of the B ring were prepared and evaluated for their in cellulo tubulin polymerization inhibition (TPI) and antiproliferative activities. The presence of the benzo[*b*]thiophene ring proved to have a crucial effect as most of the thiophene derivatives, except those having one methoxy group, were inactive to inhibit tubulin polymerization into microtubules. The influence of the attachment position was also studied: benzo[*b*]thiophenes having *iso* or *cis* 3,4,5-trimethoxystyrenes at position 2 were 12–30-fold more active than the 3-regioisomers for the TPI activity. Some of the novel designed compounds exhibited interesting anti-proliferative effects on two different cell lines.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cancer incidence is increasing worldwide[1] and, to face this ever-growing threat, scientists have stepped up efforts to find efficient treatments for all type of cancers.

Skin cancers are by far the most frequent forms of malignancy in man. Among these, malignant melanoma, which origin is in the pigment-producing cells (i.e., melanocytes) remains the most aggressive one. Indeed, although this disease comprises less than 5% of malignant skin tumors, it causes almost 60% of all deaths due to skin cancers.[2] This bad prognosis is partly due its strong tendency to give metastases. When possible, surgical exeresis is the first choice treatment and chemotherapy is used thereafter against metastases, according to several regimens.[3]

Nature has always been for the medicinal chemist an important source of inspiration for the development of many anti-cancer agents.[4] The inhibition of tubulin polymerization or microtubules depolymerization within cancer cells, thus leading to apoptosis,[5] was one of the most interesting approaches.[6]

A striking example of these tubulin-targeting agents[7] is combretastatin A-4 (CA-4, Fig. 1), which was isolated in the 90s from the bark of the south african willow tree *Combretum caffrum* by Pettit research group.[8,9]

This compound has shown remarkable tubulin polymerization inhibition activity and antiproliferative effects against a variety of cancer cells.[10]

* Corresponding author. Tel.: +33 478 777 082; fax: +33 478 777 082.
E-mail address: thierry.lomberget@univ-lyon1.fr (T. Lomberget).
† These two authors contributed equally.

http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.010
0960-894X/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

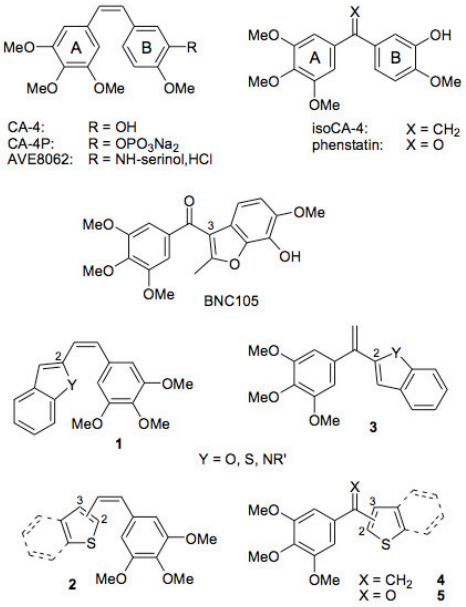


Figure 1. Combretastatin A-4 and its soluble derivatives, synthetic methylene and keto tubulin-targeting compounds.

Despite these potent activities, solubility parameters had to be improved and this was achieved with the preparation of several derivatives, having a phosphate group (R = OPO_3Na_2, fosbretabulin[10,11]) or an aminoalcohol side chain (R = NH-serinol hydrochloride salt, ombrabulin[12]). These compounds, which demonstrated Vascular Targeting or Disrupting properties,[13] actually undergo clinical evaluations for the treatment of various cancers but also diseases associated to vascularization disorders.[14]

Nevertheless, these compounds, known to interact with the colchicine binding site of tubulin,[15] were reported to isomerize in vivo,[16] thus leading to the less active *trans* isomers.[17] While this isomerization is not deleterious for the development of CA-4 derivatives as anticancer drugs (as shown by fosbretabulin and ombrabulin), the discovery of new tubulin-targeting agents based on this structure that also avoid the *Z* to *E* isomerization still remains a stimulating challenge.[18]

Besides the addition of a substituent onto the double bond,[19] one of the solutions to block this isomerization was to replace it by an (hetero)cycle[20] or by designing *iso* methylene derivatives, so-called isocombretastatins (e.g., *iso*CA-4, Fig. 1).[21,22] Other research groups also developed the isosteric version of *iso*CA-4, i.e., phenstatin[23] derivatives, and those ketones have also shown interesting tubulin-targeting properties. Based on this 3,4,5-trimethoxybenzophenone scaffold, several heterocyclic analogs were developed, including indoles,[24a] benzo[*b*]thiophenes[24b] or benzofurans such as BNC105[24c] (Fig. 1) which is currently undergoing clinical trials.

Our initial strategy for the development of new tubulin-targeting molecules aimed to evaluate the effect of the replacement of the B ring with different benzoheterocycles, attached to position 2, leading to compounds **1** (Fig. 1). This preliminary work demonstrated that the most active compound possessed a benzo[*b*]thiophene ring (Y = S).[25] One of the objectives of the present Letter was to evaluate the importance of the vicinal aromatic ring (thiophene versus benzo[*b*]thiophene) but also the effect of the grafting of the 3,4,5-trimethoxystyrene unit on these sulfur (benzo)heterocycles at different 2 and 3 positions (Fig. 1, compounds **2**).

Moreover, in parallel to our work, Alami and co-workers have described the preparation of *iso*CA-4 derivatives with substituted benzofurans **3a** (Y = O) and indole **3b** (Y = NR′) (Fig. 1) using a palladium-catalyzed coupling/ring closure domino reaction.[26]

So, the second goal of the present study was to assess the effect of the grafting of the 2-[1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-vinyl] unit on sulfur heterocycles, at both positions 2 and 3, so extending the knowledge of the structure–activity relationships of this family (Fig. 1, compounds **4**).

The key step of our synthetic strategy to these new *iso*CA-4 derivatives **4** relied on the preparation of the methylene group by water elimination on methyl diarylcarbinols **6**: these compounds could be in turn obtained by trapping the appropriate aryl lithium species with 3,4,5-trimethoxyacetophenone **7a** (R′ = Me) or after addition of methyl magnesium iodide onto the diarylketo derivatives **5** (Fig. 2).

Since the first synthesis of phenstatin,[23] the preparation of biaryl keto derivatives were usually based on the addition of the aryl lithium onto an amide, derived from a benzoic acid. Recently, an alternative process which was described by Rigo and co-workers[27] and Petrov et al.[28] used an acylation process of a benzoic acid on the appropriate aromatic substrate, in Eaton's reagent (P_2O_5 in $MeSO_3H$).

In our synthetic approach, those compounds **5** could be prepared by the addition of the (benzo)thiophene lithium reagent, generated at the appropriate 2- or 3-position, onto 3,4,5-trimethoxy benzaldehyde **7b** (R′ = H), followed by an oxidation step of the obtained alcohol (Fig. 2).[29] By this way, the isosteric replacement of the exocyclic CH_2 in compounds **4** by an oxygen atom (phenstatin analogs **5**) could also be investigated.[30]

For the present study, in the thiophene series, 2- and 3-lithio species were prepared using halogen/lithium exchange with *n*-BuLi on commercially available 2- and 3-bromothiophene. The corresponding aryl lithium intermediate was then trapped by 3,4,5-trimethoxy acetophenone **7a** to obtain **6a**,**b**. These tertiary alcohols were submitted to an acid-catalyzed dehydration and the target compounds **4a**,**b** were isolated with good yields over these two steps (Scheme 1).[31]

For the preparation of benzoheterocyclic derivatives, 2- and 3-lithio reagents were obtained after deprotonation of benzo[*b*] thiophene itself or by bromine/lithium exchange on its 3-bromo derivative **8**[32] (Scheme 2).

After addition of aldehyde **7b**, alcohols **9a**,**b** (Scheme 2) were isolated and further oxidized into ketones **5a**,**b** using MnO_2 in acetonitrile (Scheme 3). These carbonyl compounds were thereafter

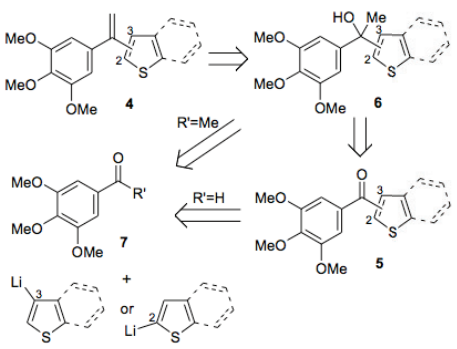
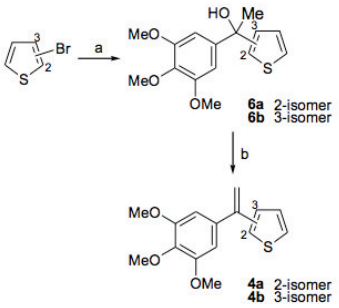
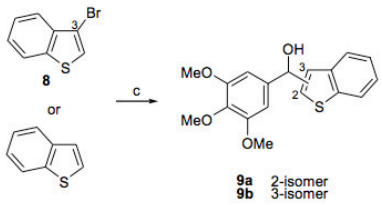


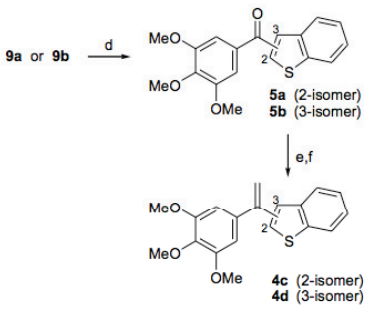
Figure 2. Synthetic strategy to *iso* methylene derivatives **4**.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) *n*-BuLi 1.5 equiv, THF for **6a** and Et_2O for **6b**, −70 °C, 1 h then addition of **7a** (1.2 equiv), −70 °C, 1 h then rt for 4 h, 67% for **6a** and 76% for **6b**. (b) *p*-TsOH 5 mol %, toluene, reflux, 2 h for **4a** and 1 h for **4b**, 98% for **4a** and 94% for **4b**.



Scheme 2. Reagents and conditions: (c) *n*-BuLi 1.3 equiv, Et_2O, 0 °C, 1.5 h then addition of **7b** (1.3 equiv), 0 °C, 3 h, 85% for **9a**, 82% for **9b**.



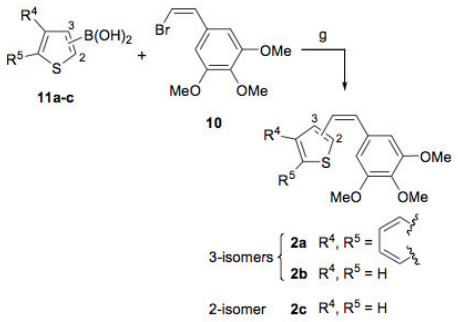
Scheme 3. Reagents and conditions: (d) MnO_2 6 equiv, CH_3CN, rt, 4 h, 99% for **5a** and 80% for **5b**. (e) MeMgI 3 equiv, THF, 0 °C, 30 min then rt, 15 min then 75 °C, 2 h, 95% for **6c** and 92% for **6d**. (f) *p*-TsOH 5 mol%, toluene, reflux, 2 h for **4c** and 1 h for **4d**; 93% for **4c** and 89% for **4d**.

submitted to the Grignard reagent addition/dehydration sequence to give benzo[*b*]thiophene *iso*CA-4 analogs **4c,d** (Scheme 3).

According to the same sequence and in order to complete our structure/activity relationship study, compound **3a**[26] (Fig. 1, Y = O) was prepared with a 62% overall yield, starting from benzofuran.

Among the different possibilities to get the *Z* isomer of methylene compounds **2**,[33] the Suzuki coupling[34] did not appear to be the most stereoselective reaction but one of the most direct strategy. Hence, the preparation of new (benzo)thiophene derivatives **2a–c** was carried out according to this palladium-catalyzed cross-coupling reaction between *Z*-monobromo derivative **10**[35] and the appropriate boronic acids **11a–c**[36] (Scheme 4).

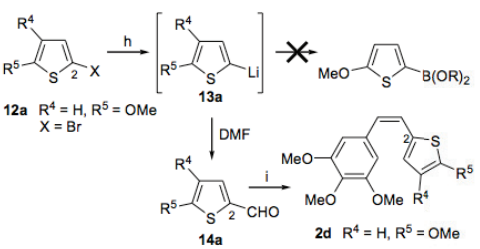
To prepare 2-methoxythiophene derivative **2d** (R^4 = H and R^5 = OMe) using a Suzuki coupling, the preparation of suitable



Scheme 4. Reagents and conditions: (g) $Pd(PPh_3)_4$ 5 mol %, Na_2CO_3 1.0 equiv, DME/water, 90 °C, 20 h, 28% for **2a**, 59% for **2b**, 38% for **2c**.

boron derivatives was necessary. Unfortunately, all our attempts based on a bromine/lithium exchange on **12a** followed by trapping of the aryl lithium intermediate **13a** by either trimethylborate (combined with an acidic hydrolysis) or bis-pinacolato diboron were unsuccessful to obtain the expected compounds (Scheme 5). It has been proved that the limitation step was not the formation of **13a** but its electrophilic trapping with organoboron reagents. Indeed, after the in situ formation, organolithium species **13a** was easily trapped by *N,N*-dimethylformamide (DMF) to obtain aldehyde **14a** (Scheme 5). Finally, a Wittig reaction[10,33] with this aldehyde allowed us to obtain the desired *Z* methylene methoxythiophene derivative **2d** with a low isolated yields, due to the poor stereoselectivity during the olefin formation (Scheme 5). The other 4-methoxy regioisomer **2e** (R^4 = OMe, R^5 = H) was obtained by using the same strategy on the known 4-methoxy-thiophene-2-carboxaldehyde[37] **14b** (Scheme 5).

All the prepared compounds, i.e., original *iso* derivatives **4b–d**, phenstatin **5b** and (*Z*) methylenes **2a–e**, known (*Z*)-**1b** and (*E*)-**1b**,[25] **3a**,[26] **4a**,[31] **5a**[38]) were then evaluated for their ability to inhibit tubulin assembly, using an in cellulo assay.[39] This test is based on parallel, discriminant fluorescent immunostainings of both tyrosinated and detyrosinated tubulin pools inside HeLa cells after a 2-hour exposure to compounds. A gentle cell permeabilization to eliminate free tyrosinated tubulin pool while preserving dynamic tyrosinated microtubules as well as detyrosinated stable microtubules was thereafter realized: this assay reflects thus the activity of either microtubules polymerization and depolymerization inhibitors.[39,40] The additional interest of this in cellulo tubulin polymerization inhibition (TPI) evaluation[41] is to know if the compound would be active within the cancer cell: this could be very interesting when developing a new drug as it could shorten the hit-to-lead transposition.



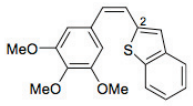
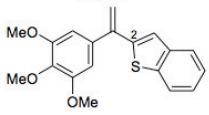
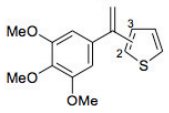
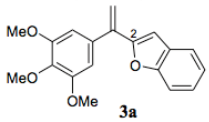
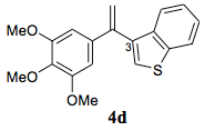
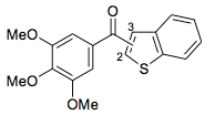
Scheme 5. Reagents and conditions: (h) *n*-BuLi 1.1 equiv, THF, −78 °C, 1 h then addition of DMF (1.2 equiv), −78 °C, 20 min then rt 2 h, 90% for **14a**, 37% for **14b**. (i) (1) 3,4,5-Trimethoxybenzyltriphenylphosphonium bromide 1.0 equiv, THF, *n*-Buli, −78 °C, 30 min, then rt 1 h. (2) Aldehyde addition, THF, −78 °C, 1 h then rt, 24 h, 14% for **2d**, 23% for **2e**.

Combretastatin A-4 was used as the reference compound (Table 1, entry 2), as well as (*Z*)-**1b**, which was formerly in vitro evaluated on purified tubulin and for antiproliferative effects on keratinocyte cells.[25]

This screening was helpful to draw several conclusions, as described hereafter.

One of the objectives of this Letter was to compare the tubulin polymerization modification using the known alkene derivative (*Z*)-**1b** with its isomethylene geometric isomer **4c**. In contrast to what was described in the literature for CA-4,[21] we have observed a significant loss of activity (EC_{50} value for tubulin polymerization inhibition drops from 80 to 321 nM) when including the isomethylene structural unit instead of the *cis* alkene (Table 1, entries 3 and 4).

Table 1
Inhibition of tubulin assembly and antiproliferative effects of colchicine, CA-4, (*Z*)-**1b**, synthesized *iso* **4** and keto **5** derivatives

Entry	Compound	EC_{50} for in cellulo TPI[a]	IC_{50} for anti-proliferative effects[c]
1	Colchicine	n.d.	IC8: 15 nM MES-SA: 15 nM
2	CA-4	9 nM	IC8: 4 nM MES-SA: 3 nM
3	 (*Z*)-**1b**	80 nM[b]	IC8: 17 nM MES-SA: 13 nM
4	 **4c**	321 nM	IC8: 101 nM MES-SA: 95 nM
5	 **4a** (2-isomer) **4b** (3-isomer)	**4a** > 10 μM **4b** > 10 μM	n.d. n.d.
6	 **3a**	>10 μM	n.d.
7	 **4d**	3.897 μM	n.d.
8	 **5a** (2-isomer) **5b** (3-isomer)	**5a** > 10 μM **5b** > 10 μM	n.d. n.d.

n.d.: Not determined, due to low TPI activities.
[a] EC_{50}: compound concentration required to decrease dynamic, tyrosinated microtubules content by 50%.
[b] Determined on isolated tubulin, TPI EC_{50} for compound (*Z*)-**1b** was equal to 2.6 μM.[40]
[c] IC_{50}: a sample's concentration which produces a 50% reduction in IC8 or MES-SA cell activity. For details, see Supplementary materials.

The position of the substitution was also crucial as the TPI activity was 12-fold lower for the 3-substituted *iso* compound **4d** (Table 1, entry 7) than its 2-regioisomer **4c** (Table 1, entry 4). The same tendency was observed for the *cis* alkene derivatives **1b** and **2a** (Table 1, entry 3 and Table 2, entry 2).

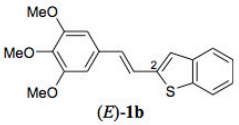
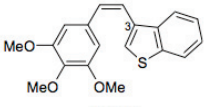
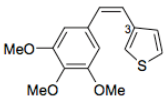
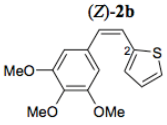
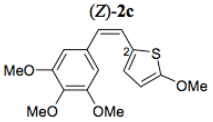
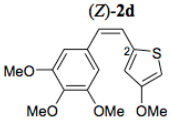
Structure simplification in the *iso* series, from benzo[*b*]thiophene to thiophene, resulted in the total loss of TPI activity, whatever the 2- or 3-substitution of the heterocycle (Table 1, entry 5).

Replacement of the sulfur with an oxygen atom in the benzoheterocycle (Table 1, entries 4 and 6) resulted also in a dramatic loss of activity. This last result is in accordance with a previous tendency for the methylene series.[25]

Finally, the isosteric replacement of the *iso* methylene group in **4c**,**d** with a ketone also led to a very low in cellulo TPI activity for **5**, whatever the position of the substitution (Table 1, entry 8).

After the in cellulo TPI screening, antiproliferative effects of the five most active compounds were then evaluated on two different cell lines, by using the MTT[42] or resazurin[43] assays (Tables 1 and 2, last column).

Table 2
Inhibition of tubulin assembly and antiproliferative effects for (*E*)-**1b** and newly synthesized (*Z*)-**2a–e**

Entry	Compound	EC_{50} for in cellulo TPI[a]	IC_{50} for anti-proliferative effect[b]
1	 (*E*)-**1b**	3.185 μM	n.d.
2	 (*Z*)-**2a**	2.430 μM	IC8: 288 nM MES-SA: 191 nM
3	 (*Z*)-**2b**	>10 μM	n.d.
4	 (*Z*)-**2c**	>10 μM	n.d.
5	 (*Z*)-**2d**	1.558 μM	IC8: 76 nM MES-SA: 53 nM
6	 (*Z*)-**2e**	81 nM	IC8: 27 nM MES-SA: 25 nM

n.d.: Not determined, due to low TPI activities.
[a] EC_{50}: compound concentration required to decrease dynamic, tyrosinated microtubules content by 50%.
[b] IC_{50}: a sample's concentration which produces a 50% reduction in IC8 or MES-SA cell activity. For details, see Supplementary materials.

IC8 line is a well-characterized human melanoma clone selected on the basis of its relatively low metastatic potential. The cells are robust in culture and therefore appropriate for pharmaco-toxicological tests.[44] MES-SA cell line has been developed from a uterine sarcoma[45] and is frequently used for anticancer drug sensitivity testing.

We have noticed a good correlation between the TPI and antiproliferative activities for all these compounds. The most active new *iso* derivative **4c** possesses an interesting IC_{50} value of 101 nM on IC8 and 95 nM on MES-SA (Table 1, entry 4), which is however almost 6–7-fold less active than our previously described alkene derivative (*Z*)-**1b** (Table 1, entry 3), having itself an antiproliferative activity on these two cell lines equivalent to that of colchicine (Table 1, entry 1).

As stated before, these first results on the isosteric modulations of the *cis* double bond of **1b** were rather disappointing and, if such *iso* compounds (e.g., **4c**) could be a solution to prevent the *cis* to *trans* in vivo isomerization, the anti-proliferative activity range appeared to be too low for a further development.

To improve our knowledge on structure/activity relationships on the *cis* 3,4,5-trimethoxystyrene derivatives, the biological evaluation of new compounds (*Z*)-**2a**–**e** was then carried out (Table 2).

First, it is important to notice that our in cellulo TPI screening reflects the compounds' real activity within the cell and a remarkable example is brought by (*E*)-**1b**, who has displayed a 40-fold lower TPI activity (Table 2, entry 1) than its stereomer (*Z*)-**1b** (Table 1, entry 3). Indeed, we have previously reported[25] that (*E*)-**1b** exhibited a 3-fold lower TPI activity on purified tubulin than (*Z*)-**1b**.[17]

The 3-regioisomer (*Z*)-**2a** (Table 2, entry 2) was less active than (*Z*)-**1b**, emphasizing the importance of the 2-substitution of the benzo[*b*]thiophene ring[46] for both TPI (EC_{50} = 2.430 μM) and antiproliferative activities (IC_{50} = 288 nM on IC8 cells and IC_{50} = 191 nM on MES-SA cells).

Ring simplification, from benzothiophene to thiophene, resulted in a dramatic loss of TPI activity, for both positions 3 (Table 2, entry 3) and 2 (Table 2, entry 4).

Though the presence of the fused aromatic ring seemed to be important, we wanted also to evaluate the influence of methoxy groups: introduction of this ether at different positions of the thiophene ring resulted in a significant improvement of the TPI. Indeed, (*Z*)-**2d** was at least 7-fold more potent than (*Z*)-**2c** (Table 2, entries 4 and 5) whereas EC_{50} for (*Z*)-**2e** was radically improved to reach 81 nM (Table 2, entry 6). Anti-proliferative activities of these two methoxy derivatives (*Z*)-**2d** and (*Z*)-**2e** appeared to be interesting: 76 nM/27 nM, respectively, on IC8 cell line and 53 nM/25 nM, respectively, on MES-SA cell line (Table 2, entries 5 and 6). Thiophene derivative (*Z*)-**2e** has shown similar activities than the benzo[*b*]thiophene analog (*Z*)-**1b** (Table 1, entry 3).

Lastly, combretastatin A-4 remains the most active compound, with a remarkable 4 nM IC_{50} value for IC8 cells and 3 nM IC_{50} value for MES-SA cells (Table 1, entry 2).

To bring some light on the observed biological activities, some docking experiments were carried out (Figs. 3 and 4).[47] 30 solutions were generated for each molecule and the consistency of the pose was assessed visually. In cases of several clusters of solutions, their relative population was taken into account to try to evaluate the stability of the binding mode.

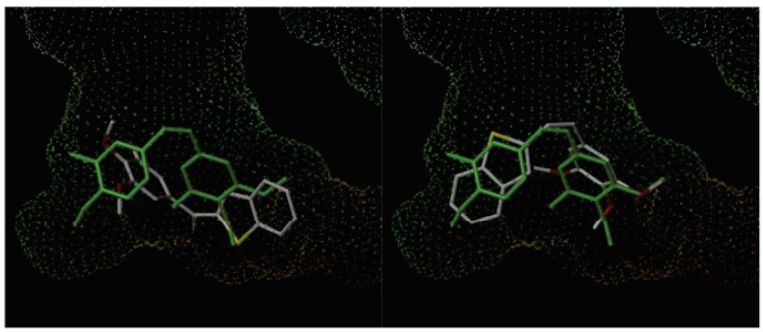


Figure 3. Docking experiments (1sa0.pdb) of combretastatin A-4 (green), *iso* derivative **4c** (left) and (*Z*)-**1b** (right).

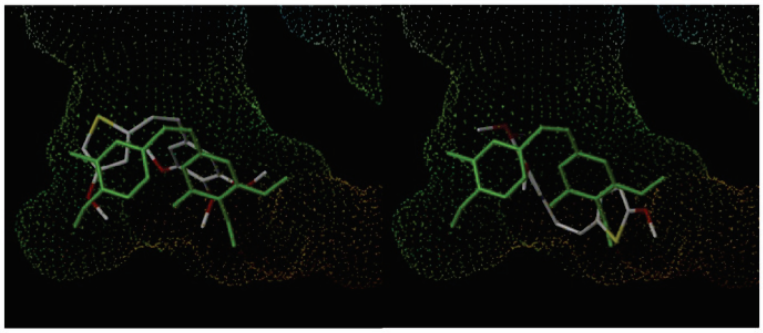


Figure 4. Docking experiments (1sa0.pdb) of combretastatin A-4 (green), (*Z*)-**2d** (left) and (*Z*)-**2e** (right).

The compounds of the *iso* series (Table 1) behave in a rather similar way, with multiple conformations emerging, none of which is really predominant. There is a discernable gradient of gathering though, with **4c** and **4d** having respectively, 29 conformations and about a half of the generated conformations gathered in a single cluster, hinting to a stronger affinity for the target. Interestingly, the near unique solution found for compound **4c** is occupying the pocket in a different manner than CA-4 (Fig. 3, on the left), which is common with one of the conformations not comprised in the main cluster of **4d**. The larger cluster of this compound has the benzothiophene left in the same position, but the trimethoxylated ring is pointing upward as the compound's orientation is inverted. Overall, oxygenated compounds in this series have difficulties to fit into the binding site due to an electrostatic mismatch with the surface of the pocket.

By contrast, (*Z*)-**1b**, with its different scaffold, adopts two major conformations. The less numerous is nearly identical to **4c**, while the other is reminiscent of CA-4, with the inversion of the trimethoxy ring (Fig. 3, on the right).

(*E*)-**1b** has several conformations. Hindered by its length and rigidity, it is unable to fit into the pocket, but adopts for about half of the solutions a straight conformation up the entry of the pocket, the benzothiophene being in the depth of the cavity: this binding mode perfectly matches with the observed biological evaluations.

Interestingly, the last four compounds of Table 2 can be easily divided in two groups. The two molecules without methoxy ((*Z*)-**2b**,**c**) are clearly too small and deprived of interaction to find a stable binding mode, with numerous conformations and several small size clusters of solutions. On the other hand, larger compounds behave much better. (*Z*)-**2a** has a full third of the solutions in a single cluster rather close to CA-4, with the planar benzothiophene occupying the position of the trimethoxylated cycle of CA-4, pulling away its own trimethoxybenzene in the entrance of the pocket. A less numerous conformations appear, with a placement identical to CA-4, with the rings inverted. The biological results clearly show that this last binding mode is predominant in cellular test. (*Z*)-**2d** and (*Z*)-**2e**, with a methoxy on the thiophene ring, have a different behavior than their congeners. (*Z*)-**2e** has a larger cluster of about two thirds of the solutions with the three trimethoxy groups in the middle of the pocket and the alkene linkage in contact with the pocket. The last third is again nearly identical to CA-4 (Fig. 4, on the right). (*Z*) **2d** has the same conformations (Fig. 4, on the left), with an altered repartition between the two giving a larger cluster of solutions looking like CA-4, but this cluster is still the smallest and less well scored. The ranking is of these two compounds is in the reverse order, probably due to the fact that the sulfur atom of (Z)-**2e** is shielded by the adjacent methoxy and not so strongly disfavorably involved in scoring when not in contact with the pocket. In this particular case, with hindsight, the small size of the compound also resulted in an overevaluation of the fitness of conformations more closely packed against the pocket.

To conclude with this work, we have described the preparation of *cis* and *iso* methylene diaryl derivatives according to Suzuki/Wittig reactions and to a strategy using an alcohol formation/dehydration sequence. In cellulo TPI properties and antiproliferative effects were determined: *iso* derivatives could be of interest for the development of new tubulin-binding agents aiming to limit the *Z* to *E* in vivo isomerization process but were rather disappointing in terms of tubulin polymerization inhibition efficacy and antiproliferative effects to be further developed.

Moreover, we have shown that both the nature of the sulfur heterocycle, benzo[*b*]thiophene versus thiophene, and the position (2 or 3 position) of its grafting were crucial for the biological activities of *cis* and *iso* 3,4,5-trimethoxystyrene compounds. Finally, we have observed a significant improvement when adding a methoxy group on the appropriate position of the thiophene ring, as observed for compound (*Z*)-**2e**. The structure/activity relationships were confirmed by docking studies and these data could be helpful for the design of new (benzo)thiophene analogs of our hit compounds (*Z*)-**1b** and (*Z*)-**2e**.

Acknowledgments

C.V.D. would like to thank the University of Science and Technology of Hanoi (USTH) for a Ph.D. fellowship. Pr. Ahcène Boumendjel is also acknowledged for his suggestion concerning the preparation of compounds **6a,b**. R.B. is grateful to "La Ligue Contre le Cancer, comité Auvergne" for financial support.

Supplementary data

Supplementary data (these data include experimental procedures, docking poses of (*E*)-**1b**, (*Z*)-**2a** and **4d**, ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of the thiophene and benzo[*b*]thiophene derivatives described in this article, LC–UV-MS chromatographic profiles of new evaluated compounds and antiproliferative effects (IC50 curves) of CA-4, colchicine, (*Z*)-**1b**, (*Z*)-**2a**, (*Z*)-**2d**,**e** and **4c** on IC8/MES-SA cell lines) associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.010.

References and notes

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Laversanne, M.; Brewster, D. H.; Gombe Mbalawa, C.; Kohler, B.; Piñeros, M.; Steliarova-Foucher, E.; Swaminathan, R.; Antoni, S.; Soerjomataram, I.; Forman, D. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 2060.
2. Rigel, D. S. *Semin. Cutaneous Med. Surg.* **2010**, *29*, 204.
3. Saranga-Perry, V.; Ambe, C.; Zager, J. S.; Kudchadkar, R. R. *CA – Cancer J. Clin.* **2014**, *64*, 171.
4. Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012.
5. Dumontet, C.; Jordan, M. A. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2010**, *9*, 790.
6. Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259.
7. Field, J. J.; Kanakkanthara, A.; Miller, J. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5050.
8. Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. *Experientia* **1989**, *45*, 209.
9. Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Schmidt, J. M.; Hogan, F. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1666.
10. Pettit, G. R.; Rhodes, M. R.; Herald, D. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M.; Pettit, R. K. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4087.
11. (a) Nabha, S. M.; Mohammad, R. M.; Dandashi, M. H.; Coupaye-Gerard, B.; Aboukameel, A.; Pettit, G. R.; Al-Katib, A. M. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2735; (b) Kirwan, I. G.; Loadman, P. M.; Swaine, D. J.; Anthoney, D. A.; Pettit, G. R.; Lippert, J. W. I. I. I.; Shnyder, S. D.; Cooper, P. A.; Bibby, M. C. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1446.
12. (a) Ohsumi, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Hatanaka, T.; Morinaga, Y.; Nihei, Y.; Ohishi, K.; Suga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3022; (b) Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Ohishi, K.; Okano, A.; Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Nakagawa, R.; Tsuji, T.; Akiyama, Y.; Saito, S.; Hori, K.; Sato, Y.; Tsuruo, T. *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 1016; (c) Hori, K.; Saito, S.; Kubota, K. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1604.
13. For reviews on vascular disrupting agents, see: (a) Gaya, A. M.; Rustin, G. J. S. *Clin. Oncol.* **2005**, *17*, 277; (b) Pilat, M. J.; LoRusso, P. M. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 1021; (c) Marrelli, M.; Conforti, F.; Statti, G. A.; Cachet, X.; Michel, S.; Tillequin, F.; Menichini, F. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3035; (d) Mason, R. P.; Zhao, D.; Liu, L.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G. *Integr. Biol.* **2011**, *3*, 375; (e) Porcù, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1485.
14. A search with international non-proprietary names fosbretabulin and ombrabulin on http://www.clinicaltrials.gov/ web site returns clinical trials for the treatments of many cancers (alone or in combination with other drugs) but also diseases related to vascularization disorders (polypoidal choroidal vasculopathy, choroidal neovascularization secondary to pathologic myopia and neovascular age-related macular degeneration).
15. (a) Lin, M. C.; Ho, H. H.; Pettit, G. R.; Hamel, E. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6984; For a review of drugs interacting with the colchicine binding site, see: (b) Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943.
16. Aprile, S.; Del Grosso, E.; Tron, G. C.; Grosa, G. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 2252.
17. Previous work reported that (*Z*)-combretastatin A-4 was 30 times more potent than its (*E*) isomer for the in vitro inhibition of tubulin polymerization: see Ref. 10.
18. (a) Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033; (b) Shan, Y.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, M.; Dong, Y. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 523.

19. For one example, see: Babu, B.; Lee, M.; Lee, L.; Strobel, R.; Brockway, O.; Nickols, A.; Sjoholm, R.; Tzou, S.; Chavda, S.; Desta, D.; Fraley, G.; Siegfried, A.; Pennington, W.; Hartley, R. M.; Westbrook, C.; Mooberry, S. L.; Kiakos, K.; Hartley, J. A.; Lee, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2359.
20. (a) Fürst, R.; Zupkó, I.; Berényi, Á.; Ecker, G. F.; Rinner, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6948; (b) O'Boyle, N. M.; Carr, M.; Greene, L. M.; Bergin, O.; Nathwani, S. M.; McCabe, T.; Lloyd, D. G.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8569; (c) Theeramunkong, S.; Caldarelli, A.; Massarotti, A.; Aprile, S.; Caprioglio, D.; Zaninetti, R.; Teruggi, A.; Pirali, T.; Grosa, G.; Tron, G. C.; Genazzani, A. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4977; (d) Zheng, S.; Zhong, Q.; Mottamal, M.; Zhang, Q.; Zhang, C.; LeMelle, E.; McFerrin, H.; Wang, G. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3369.
21. (a) Messaoudi, S.; Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J.-F.; De Losada, J. R.; Liu, J.-M.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J.-D.; Alami, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4538; (b) Álvarez, R.; Álvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, B. G.; Medarde, M.; Peláez, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6422.
22. For an example of constraint *iso*CA-4 derivatives: Rasolofonjatovo, E.; Provot, O.; Hamze, A.; Rodrigo, J.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Desravines, D.; Dubois, J.; Brion, J.-D.; Alami, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 22.
23. Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1688.
24. (a) Hadimani, M. B.; MacDonough, M. T.; Ghatak, A.; Strecker, T. E.; Lopez, R.; Sriram, M.; Nguyen, B. L.; Hall, J. J.; Kessler, R. J.; Shirali, A. R.; Liu, L.; Garner, C. M.; Pettit, G. R.; Hamel, E.; Chaplin, D. J.; Mason, R. P.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1668; (b) Pinney, K. G.; Bounds, A. D.; Dingeman, K. M.; Mocharla, V. P.; Pettit, G. R.; Bai, R.; Hamel, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1081; (c) Flynn, B. L.; Gill, G. S.; Grobelny, D. W.; Chaplin, J. H.; Paul, D.; Leske, A. F.; Lavranos, T. C.; Chalmers, D. K.; Charman, S. A.; Kostewicz, E.; Shackleford, D. M.; Morizzi, J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; Kremmidiotis, G. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6014.
25. Nguyen, T. T. B.; Lomberget, T.; Tran, N. C.; Colomb, E.; Nachtergaele, L.; Thoret, S.; Dubois, J.; Guillaume, J.; Abdayem, R.; Haftek, M.; Barret, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7227.
26. Tréguier, B.; Rasolofonjatovo, E.; Hamze, A.; Provot, O.; Wdzieczak-Bakala, J.; Dubois, J.; Brion, J.-D.; Alami, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4868.
27. Ghinet, A.; Tourteau, A.; Rigo, B.; Stocker, V.; Leman, M.; Farce, A.; Dubois, J.; Gautret, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2932.
28. Petrov, O. I.; Gerova, M. S.; Chanev, C. D.; Petrova, K. V. *Synthesis* **2011**, 3711.
29. For a recent literature precedent of phenstatin synthesis using a PDC-mediated alcohol oxidation into a ketone, see: Chen, J.; Brown, D. P.; Wang, Y.-J.; Chen, Z.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5119.
30. (a) Patani, G. A.; LaVoie, E. J. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147; (b) Lima, L. M. A.; Barreiro, E. J. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23.
31. During our studies, a research group published a 4 steps synthesis of compound **4a**, using a Negishi cross-coupling reaction: Malysheva, Y. B.; Buchvalova, S. Y.; Svirshchevskaya, E. V.; Fokin, V. V.; Fedorov, A. Y. *Synlett* **2013**, 1772. It is noteworthy that the TPI activity of this compound was still not described before our Letter..
32. Fournier Dit Chabert, J.; Joucla, L.; David, E.; Lemaire, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3221.
33. Nguyen, T. T. B.; Lomberget, T.; Tran, N. C.; Barret, R. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2336.
34. (a) Bazin, M.-A.; Jouanne, M.; El-Kashef, H.; Rault, S. *Synlett* **2009**, 2789; (b) Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8135.
35. Herz, H.-G.; Queiroz, M. J. R. P.; Maas, G. *Synthesis* **1999**, 1013.
36. Boronic acids **11b,c** were commercially available whereas **11a** was prepared by trapping the appropriate heteroaryl lithium species by $B(OMe)_3$, followed by hydrolysis. See supporting information for details.
37. Jeong, Y.-C.; Ahn, D.-J.; Lee, W.-S.; Lee, S.-H.; Ahn, K.-H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 1063.
38. Although the synthesis (according to a different 4 steps approach) and antiproliferative effects of C2-derivative **5a** was reported in the following reference, its regioisomer **5b** (at position 3) was still not studied before our work: Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Carrion, M. D.; Cruz-Lopez, O.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Pipitone, M. R.; Balzarini, J.; Brancale, A.; Hamel, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5114.
39. Vassal, E.; Barette, C.; Fonrose, X.; Dupont, R.; Sans-Soleilhac, E.; Lafanechère, L. J. *Biomol. Screening* **2006**, *11*, 377.
40. For a specified substance (e.g. (*Z*)-**1b**), the EC_{50} values between this TPI cellular evaluation and a turbidimetric test on purified tubulin are different: for comparison, see Table 1, entry 3 and Ref. 25.
41. For another method of the determination of microtubule content in the whole cell, see: Morrison, K. C.; Hergenrother, P. J. *Anal. Biochem.* **2012**, *420*, 26.
42. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
43. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421.
44. Bechetoille, N.; Haftek, M.; Staquet, M. J.; Cochran, A. J.; Schmitt, D.; Berthier-Vergnes, O. *Melanoma Res.* **2000**, *10*, 427.
45. Harker, W. G.; MacKintosh, F. R.; Sikic, B. I. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 4943.
46. For an example of benzothiophene acrylonitrile analogs targeting tubulin assembly, see: Penthala, N. R.; Sonar, V. N.; Horn, J.; Leggas, M.; Yadlapalli, J. S. K. B.; Crooks, P. A. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 1073.
47. See Supporting information for details.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. Isolation and Structure of the Strong Cell Growth and Tubulin Inhibitor Combretastatin A-4. *Experientia* **1989**, *45* (2), 209–211.

(2) Greene, L. M.; Meegan, M. J.; Zisterer, D. M. Combretastatins: More Than Just Vascular Targeting Agents? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355* (2), 212–227.

(3) Aprile, S.; Del Grosso, E.; Tron, G. C.; Grosa, G. In Vitro Metabolism Study of Combretastatin A-4 in Rat and Human Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35* (12), 2252–2261.

(4) Heemels, M.-T. Neurodegenerative Diseases. *Nature* **2016**, *539* (7628), 179–179.

(5) Aranda, S.; Laguna, A.; de la Luna, S. DYRK Family of Protein Kinases: Evolutionary Relationships, Biochemical Properties, and Functional Roles. *FASEB J.* **2011**, *25* (2), 449–462.

(6) Li, L.; Liu, Y.; Zhang, Q.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Yan, B. Comparison of Cancer Cell Survival Triggered by Microtubule Damage after Turning Dyrk1B Kinase On and Off. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 731–742.

(7) Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. Structure of the Aβ Tubulin Dimer by Electron Crystallography. *Nature* **1998**, *391* (6663), 199–203.

(8) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265.

(9) Walczak, C. E.; Heald, R. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function. In *International Review of Cytology*; Elsevier, 2008; Vol. 265, pp 111–158.

(10) Hyams, J. S.; Lloyd, C. W. *Microtubules*; Wiley-Liss, 1994.

(11) Allen, C.; Borisy, G. G. Structural Polarity and Directional Growth of Microtubules of Chlamydomonas Flagella. *J. Mol. Biol.* **1974**, *90* (2), 381–402.

(12) Sablin, E. P.; Jon Kull, F.; Cooke, R.; Vale, R. D.; Fletterick, R. J. Crystal Structure of the Motor Domain of the Kinesin-Related Motor Ncd. *Nature* **1996**, *380* (6574), 555–559.

(13) Horio, T.; Murata, T. The Role of Dynamic Instability in Microtubule Organization. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*.

(14) Hirose, K.; Tajima, K.; Hamajima, N.; Inoue, M.; Takezaki, T.; Kuroishi, T.; Yoshida, M.; Tokudome, S. A Large-Scale, Hospital-Based Case-Control Study of Risk Factors of Breast Cancer according to Menopausal Status. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* **1995**, *86* (2), 146–154.

(15) Fan, H. Y.; Cheng, K. K.; Klein, H. L. Mutations in the RNA Polymerase II Transcription Machinery Suppress the Hyperrecombination Mutant hpr1 Delta of Saccharomyces Cerevisiae. *Genetics* **1996**, *142* (3), 749–759.

(16) Amos, L. A. The Microtubule Lattice — 20 Years on. *Trends Cell Biol.* **1995**, *5* (2), 48–51.

(17) Kikkawa, Y.; Umeda, M.; Miyazaki, K. Marked Stimulation of Cell Adhesion and Motility by Ladsin, a Laminin-Like Scatter Factor. *J. Biochem. (Tokyo)* **1994**, *116* (4), 862–869.

(18) Fanale, D.; Bronte, G.; Passiglia, F.; Calò, V.; Castiglia, M.; Di Piazza, F.; Barraco,

N.; Cangemi, A.; Catarella, M. T.; Insalaco, L.; et al. Stabilizing versus Destabilizing the Microtubules: A Double-Edge Sword for an Effective Cancer Treatment Option? *Anal. Cell. Pathol.* **2015**, *2015*, 1–19.
(19) Huczyński, A.; Majcher, U.; Maj, E.; Wietrzyk, J.; Janczak, J.; Moshari, M.; Tuszynski, J. A.; Bartl, F. Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Docking of Colchicine Derivatives. *Bioorganic Chem.* **2016**, *64*, 103–112.
(20) Kumar, A.; Kumar, M.; Sharma, S.; Guru, S. K.; Bhushan, S.; Shah, B. A. Design and Synthesis of a New Class of Cryptophycins Based Tubulin Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *93*, 55–63.
(21) Field, J. J.; Kanakkanthara, A.; Miller, J. H. Microtubule-Targeting Agents Are Clinically Successful due to Both Mitotic and Interphase Impairment of Microtubule Function. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (18), 5050–5059.
(22) Yu, J.; Ren, P.; Zhong, T.; Wang, Y.; Yan, M.; Xue, B.; Li, R.; Dai, C.; Liu, C.; Chen, G.; et al. Pseudolaric Acid B Inhibits Proliferation in SW579 Human Thyroid Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Med. Rep.* **2015**.
(23) Hidaka, M.; Koga, T.; Kiyota, H.; Horiguchi, T.; Shi, Q.-W.; Hirose, K.; Uchida, T. Relationship between the Structures of Taxane Derivatives and Their Microtubule Polymerization Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76* (2), 349–352.
(24) Kinghorn, A. D.; Powell, R. G. Special Issue for Monroe Wall and Mansukh Wani. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (2), 127–128.
(25) Dumontet, C.; Jordan, M. A. Microtubule-Binding Agents: A Dynamic Field of Cancer Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (10), 790–803.
(26) Zhao, Y.; Mu, X.; Du, G. Microtubule-Stabilizing Agents: New Drug Discovery and Cancer Therapy. *Pharmacol. Ther.* **2015**.
(27) Rogalska, A.; Marczak, A. Epothilone B Induces Human Ovarian Cancer OV-90 Cell Apoptosis via External Pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *39* (2), 700–712.
(28) Thomas, E.; Tabernero, J.; Fornier, M.; Conte, P.; Fumoleau, P.; Lluch, A.; Vahdat, L. T.; Bunnell, C. A.; Burris, H. A.; Viens, P.; et al. Phase II Clinical Trial of Ixabepilone (BMS-247550), an Epothilone B Analog, in Patients With Taxane-Resistant Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25* (23), 3399–3406.
(29) Churchill, C. D. M.; Klobukowski, M.; Tuszynski, J. A. The Unique Binding Mode of Laulimalide to Two Tubulin Protofilaments. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86* (2), 190–199.
(30) Carmeliet, P. Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000**, *6* (4), 389–395.
(31) Jain, R. K. Normalizing Tumor Vasculature with Anti-Angiogenic Therapy: A New Paradigm for Combination Therapy. *Nat. Med.* **2001**, *7* (9), 987–989.
(32) Qian, C.-N.; Tan, M.-H.; Yang, J.-P.; Cao, Y. Revisiting Tumor Angiogenesis: Vessel Co-Option, Vessel Remodeling, and Cancer Cell-Derived Vasculature Formation. *Chin. J. Cancer* **2016**, *35* (1).
(33) Treps, L.; Gavard, J. [Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad]. *Médecine Sci. MS* **2015**, *31* (11), 989–995.
(34) Smith, B.; Medda, F.; Gokhale, V.; Dunckley, T.; Hulme, C. Recent Advances in the Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Selective DYRK1A Inhibitors: A New Avenue for a Disease Modifying Treatment of Alzheimer's? *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3* (11), 857–872.
(35) Porcù, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Recent Advances in Vascular Disrupting Agents in Cancer Therapy. *Future Med. Chem.* **2014**, *6* (13), 1485–1498.
(36) Yadav, L. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**.
(37) Pilat, M. J.; LoRusso, P. M. Vascular Disrupting Agents. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*

(4), 1021–1039.
(38) Thorpe, P. E.; Chaplin, D. J.; Blakey, D. C. The First International Conference on Vascular Targeting: Meeting Overview. *Cancer Res.* **2003**, *63* (5), 1144–1147.
(39) Thorpe, P. E. Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (2), 415–427.
(40) Hooper, A. T.; Loganzo, F.; May, C.; Gerber, H.-P. Identification and Development of Vascular Disrupting Agents: Natural Products That Interfere with Tumor Growth. In *Natural Products and Cancer Drug Discovery*; Koehn, F. E., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2013; pp 17–38.
(41) Hasani, A.; Leighl, N. Classification and Toxicities of Vascular Disrupting Agents. *Clin. Lung Cancer* **2011**, *12* (1), 18–25.
(42) Tijono, S. M.; Guo, K.; Henare, K.; Palmer, B. D.; Wang, L.-C. S.; Albelda, S. M.; Ching, L.-M. Identification of Human-Selective Analogues of the Vascular-Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid (DMXAA). *Br. J. Cancer* **2013**, *108* (6), 1306–1315.
(43) Schwartz, E. L. Antivascular Actions of Microtubule-Binding Drugs. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (8), 2594–2601.
(44) Giannotta, M.; Trani, M.; Dejana, E. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Dev. Cell* **2013**, *26* (5), 441–454.
(45) Rajak, H.; Kumar Dewangan, P.; Patel, V.; Kumar Jain, D.; Singh, A.; Veerasamy, R.; Chander Sharma, P.; Dixit, A. Design of Combretastatin A-4 Analogs as Tubulin Targeted Vascular Disrupting Agent with Special Emphasis on Their Cis-Restricted Isomers. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19* (10), 1923–1955.
(46) Siemann, D. W. The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for Its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* **2011**, *37* (1), 63–74.
(47) Allavena, P.; Sica, A.; Solinas, G.; Porta, C.; Mantovani, A. The Inflammatory Micro-Environment in Tumor Progression: The Role of Tumor-Associated Macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**, *66* (1), 1–9.
(48) Monge, M.; Massy, Z. A.; Zonneveld, A. J. van; Rabelink, T. J. Cellules progénitrices endothéliales, de quoi parle-t-on ? *Néphrologie Thérapeutique* **2011**, *7* (7), 521–525.
(49) Mancuso, P.; Burlini, A.; Pruneri, G.; Goldhirsch, A.; Martinelli, G.; Bertolini, F. Resting and Activated Endothelial Cells Are Increased in the Peripheral Blood of Cancer Patients. *Blood* **2001**, *97* (11), 3658–3661.
(50) Ribatti, D. The Involvement of Endothelial Progenitor Cells in Tumor Angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **2004**, *8* (3), 294–300.
(51) Tumor Resistance to Vascular Disrupting Agents: Mechanisms, Imaging, and Solutions. *Oncotarget* **2015**.
(52) Shaked, Y. Therapy-Induced Acute Recruitment of Circulating Endothelial Progenitor Cells to Tumors. *Science* **2006**, *313* (5794), 1785–1787.
(53) Nathan, P.; Zweifel, M.; Padhani, A. R.; Koh, D.-M.; Ng, M.; Collins, D. J.; Harris, A.; Carden, C.; Smythe, J.; Fisher, N.; et al. Phase I Trial of Combretastatin A4 Phosphate (CA4P) in Combination with Bevacizumab in Patients with Advanced Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (12), 3428–3439.
(54) McKeage, M. J.; Baguley, B. C. Disrupting Established Tumor Blood Vessels: An Emerging Therapeutic Strategy for Cancer. *Cancer* **2010**, *116* (8), 1859–1871.
(55) Milanović, D.; Braun, F.; Weber, W.; Grosu, A. L.; Behe, M.; Niedermann, G. The Influence of the Combined Treatment with Vadimezan (ASA404) and Taxol on the Growth of U251 Glioblastoma Xenografts. *BMC Cancer* **2012**, *12* (1).
(56) Kanthou, C.; Tozer, G. M. Microtubule Depolymerizing Vascular Disrupting Agents: Novel Therapeutic Agents for Oncology and Other Pathologies: Microtubule Depolymerizing

Vascular Disrupting Agents. *Int. J. Exp. Pathol.* **2009**, *90* (3), 284–294.
(57) Okuyama, K.; Kaida, A.; Hayashi, Y.; Hayashi, Y.; Harada, K.; Miura, M. KPU-300, a Novel Benzophenone–Diketopiperazine–Type Anti-Microtubule Agent with a 2-Pyridyl Structure, Is a Potent Radiosensitizer That Synchronizes the Cell Cycle in Early M Phase. *PLOS ONE* **2015**, *10* (12), e0145995.
(58) Moon, C. H.; Lee, S. J.; Lee, H. Y.; Lee, J. C.; Cha, H.; Cho, W. J.; Park, J. W.; Park, H. J.; Seo, J.; Lee, Y. H.; et al. KML001 Displays Vascular Disrupting Properties and Irinotecan Combined Antitumor Activities in a Murine Tumor Model. *PLoS ONE* **2013**, *8* (1), e53900.
(59) Lee, J. C.; Lee, H. Y.; Moon, C. H.; Lee, S. J.; Lee, W. H.; Cha, H. J.; Park, S.; Lee, Y. H.; Park, H. J.; Song, H.-T.; et al. Arsenic Trioxide as a Vascular Disrupting Agent: Synergistic Effect with Irinotecan on Tumor Growth Delay in a CT26 Allograft Model. *Transl. Oncol.* **2013**, *6* (1), 83–91.
(60) Dalal, S.; Burchill, S. A. Preclinical Evaluation of Vascular-Disrupting Agents in Ewing's Sarcoma Family of Tumours. *Eur. J. Cancer* **2009**, *45* (4), 713–722.
(61) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Schmidt, J. M.; Hogan, F. Antineoplastic Agents. 291. Isolation and Synthesis of Combretastatins A-4, A-5, and A-6(1a). *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (10), 1666–1672.
(62) Masika, P. J.; Van Averbeke, W.; Sonandi, A. Use of Herbal Remedies by Small-Scale Farmers to Treat Livestock Diseases in Central Eastern Cape Province, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2000**, *71* (2).
(63) Pettit, G. R.; Rhodes, M. R.; Herald, D. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M.; Pettit, R. K. Antineoplastic Agents. 445. Synthesis and Evaluation of Structural Modifications of (*Z*)- and (*E*)-Combretastatin A-4 [1]. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (12), 4087–4099.
(64) Hori, K.; Saito, S.; Kubota, K. A Novel Combretastatin A-4 Derivative, AC7700, Strongly Stanches Tumour Blood Flow and Inhibits Growth of Tumours Developing in Various Tissues and Organs. *Br. J. Cancer* **2002**, *86* (10), 1604–1614.
(65) Bothwell, K.; Folaron, M.; Seshadri, M. Preclinical Activity of the Vascular Disrupting Agent OXi4503 against Head and Neck Cancer. *Cancers* **2016**, *8* (1), 11.
(66) Mikstacka, R.; Stefański, T.; Różański, J. Tubulin-Interactive Stilbene Derivatives as Anticancer Agents. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2013**, *18* (3).
(67) Pettit, G. R.; Singh, S. B. Isolation, Structure, and Synthesis of Combretastatin A-2, A-3, and B-2. *Can. J. Chem.* **1987**, *65* (10), 2390–2396.
(68) Do, C. V.; Faouzi, A.; Barette, C.; Farce, A.; Fauvarque, M.-O.; Colomb, E.; Catry, L.; Berthier-Vergnes, O.; Haftek, M.; Barret, R.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of Thiophene and Benzo[b]thiophene Analogs of Combretastatin A-4 and Isocombretastatin A-4: A Comparison between the Linkage Positions of the 3,4,5-Trimethoxystyrene Unit. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (1), 174–180.
(69) Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A. Synthesis and Anticancer Activity of Fluorinated Analogues of Combretastatin A-4. *J. Fluor. Chem.* **2003**, *123* (1), 101–108.
(70) Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan, S.; McGown, A. T. Structural Requirements for the Interaction of Combretastatins with Tubulin: How Important Is the Trimethoxy Unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (17), 3033–3037.
(71) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; He, H. M.; Lin, C. M.; Hamel, E. Synthesis and Evaluation of Analogues of (Z)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethene as Potential Cytotoxic and Antimitotic Agents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (12), 2293–2306.
(72) Ohsumi, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Hatanaka, T.; Morinaga, Y.; Nihei, Y.; Ohishi, K.; Suga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Novel Combretastatin Analogues Effective

against Murine Solid Tumors: Design and Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (16), 3022–3032.
(73) von Pawel, J.; Gorbounova, V.; Reck, M.; Kowalski, D. M.; Allard, A.; Chadjaa, M.; Rey, A.; Bennouna, J.; Grossi, F. DISRUPT: A Randomised Phase 2 Trial of Ombrabulin (AVE8062) plus a Taxane–platinum Regimen as First-Line Therapy for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* **2014**, *85* (2), 224–229.
(74) Bahleda, R.; Sessa, C.; Del Conte, G.; Gianni, L.; Capri, G.; Varga, A.; Oprea, C.; Daglish, B.; Hospitel, M.; Soria, J.-C. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Ombrabulin (AVE8062) Combined with Cisplatin/Docetaxel or Carboplatin/Paclitaxel in Patients with Advanced Solid Tumors. *Invest. New Drugs* **2014**, *32* (6), 1188–1196.
(75) Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (11), 3033–3044.
(76) Kong, Y.; Grembecka, J.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Mooberry, S. L.; Sabat, M.; Rieger, J.; Brown, M. L. Structure-Based Discovery of a Boronic Acid Bioisostere of Combretastatin A-4. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (9), 1007–1014.
(77) Kong, Y.; Wang, K.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Mooberry, S. L.; Paige, M. A.; Brown, M. L. A Boronic Acid Chalcone Analog of Combretastatin A-4 as a Potent Anti-Proliferation Agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (2), 971–977.
(78) Pinney, K. G.; Mejia, M. P.; Villalobos, V. M.; Rosenquist, B. E.; Pettit, G. R.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E. Synthesis and Biological Evaluation of Aryl Azide Derivatives of Combretastatin a-4 as Molecular Probes for Tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (10), 2417–2425.
(79) Monk, K. A.; Siles, R.; Hadimani, M. B.; Mugabe, B. E.; Ackley, J. F.; Studerus, S. W.; Edvardsen, K.; Trawick, M. L.; Garner, C. M.; Rhodes, M. R.; et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Combretastatin Nitrogen-Containing Derivatives as Inhibitors of Tubulin Assembly and Vascular Disrupting Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (9), 3231–3244.
(80) Simoni, D.; Romagnoli, R.; Baruchello, R.; Rondanin, R.; Rizzi, M.; Pavani, M. G.; Alloatti, D.; Giannini, G.; Marcellini, M.; Riccioni, T.; et al. Novel Combretastatin Analogues Endowed with Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (11), 3143–3152.
(81) Kale, S. S.; Jedhe, G. S.; Meshram, S. N.; Santra, M. K.; Hamel, E.; Sanjayan, G. J. Novel Hybrid Nocodazole Analogues as Tubulin Polymerization Inhibitors and Their Antiproliferative Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (9), 1982–1985.
(82) Gerova, M. S.; Stateva, S. R.; Radonova, E. M.; Kalenderska, R. B.; Rusew, R. I.; Nikolova, R. P.; Chanev, C. D.; Shivachev, B. L.; Apostolova, M. D.; Petrov, O. I. Combretastatin A-4 Analogues with Benzoxazolone Scaffold: Synthesis, Structure and Biological Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 121–133.
(83) Andreani, A.; Granaiola, M.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Varoli, L.; Vieceli Dalla Sega, F.; Prata, C.; Nguyen, T. L.; Bai, R.; et al. Cytotoxic Activities of Substituted 3-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)-1,3-Dihydroindol-2-Ones and Studies on Their Mechanisms of Action. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 603–612.
(84) Pérez-Melero, C.; Maya, A. B. .; del Rey, B.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. A New Family of Quinoline and Quinoxaline Analogues of Combretastatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (14), 3771–3774.
(85) Gurjar, M. K.; Wakharkar, R. D.; Singh, A. T.; Jaggi, M.; Borate, H. B.; Shinde, P. D.; Verma, R.; Rajendran, P.; Dutt, S.; Singh, G.; et al. Synthesis and Evaluation of 4/5-Hydroxy-2,3-Diaryl(substituted)-Cyclopent-2-En-1-Ones as Cis-Restricted Analogues of Combretastatin A-4 as Novel Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (8), 1744–1753.
(86) Rosner, T.; Le Bars, J.; Pfaltz, A.; Blackmond, D. G. Kinetic Studies of Heck

Coupling Reactions Using Palladacycle Catalysts: Experimental and Kinetic Modeling of the Role of Dimer Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (9), 1848–1855.
(87) Kerr, D. J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; Flynn, B. L. The Concise Synthesis of Chalcone, Indanone and Indenone Analogues of Combretastatin A4. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (9), 3290–3298.
(88) Frontier, A. J.; Collison, C. The Nazarov Cyclization in Organic Synthesis. Recent Advances. *Tetrahedron* **2005**, *61* (32), 7577–7606.
(89) Sriram, M.; Hall, J. J.; Grohmann, N. C.; Strecker, T. E.; Wootton, T.; Franken, A.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Dihydronaphthalene and Benzosuberene Analogs of the Combretastatins as Inhibitors of Tubulin Polymerization in Cancer Chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (17), 8161–8171.
(90) Buchanan, J. G. S. C.; Woodgate, P. D. The Clemmensen Reduction of Difunctional Ketones. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1969**, *23* (4), 522.
(91) Hu, L.; Li, Z.; Li, Y.; Qu, J.; Ling, Y.-H.; Jiang, J.; Boykin, D. W. Synthesis and Structure−Activity Relationships of Carbazole Sulfonamides as a Novel Class of Antimitotic Agents Against Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6273–6282.
(92) Hamze, A.; Giraud, A.; Messaoudi, S.; Provot, O.; Peyrat, J.-F.; Bignon, J.; Liu, J.-M.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; et al. Synthesis, Biological Evaluation of 1,1-Diarylethylenes as a Novel Class of Antimitotic Agents. *ChemMedChem* **2009**, *4* (11), 1912–1924.
(93) Hamze, A.; Giraud, A.; Messaoudi, S.; Provot, O.; Peyrat, J.-F.; Bignon, J.; Liu, J.-M.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; et al. Synthesis, Biological Evaluation of 1,1-Diarylethylenes as a Novel Class of Antimitotic Agents. *ChemMedChem* **2009**, *4* (11), 1912–1924.
(94) Zhang, Q.; Peng, Y.; Wang, X. I.; Keenan, S. M.; Arora, S.; Welsh, W. J. Highly Potent Triazole-Based Tubulin Polymerization Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (4), 749–754.
(95) Curphey, T. J. Thionation with the Reagent Combination of Phosphorus Pentasulfide and Hexamethyldisiloxane. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (18), 6461–6473.
(96) Odlo, K.; Hentzen, J.; dit Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A. B. S. M.; Sylte, I.; Skrede, M.; Florenes, V. A.; Hansen, T. V. 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles as Cis-Restricted Analogues of Combretastatin A-4: Synthesis, Molecular Modeling and Evaluation as Cytotoxic Agents and Inhibitors of Tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (9), 4829–4838.
(97) Huisgen, R.; Mloston, G.; Polborn, K.; Sustmann, R. 1,3-Dithiolanes from Cycloadditions of Alicyclic and Aliphatic Thiocarbonyl Ylides with Thiones: Regioselectivity. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9* (10), 2256–2263.
(98) Miwa, K.; Aoyama, T.; Shioiri, T. Extension of the Colvin Rearrangement Using Trimethylsilyldiazomethane. A New Synthesis of Alkynes. *Synlett* **1994**, *1994* (2), 107–108.
(99) Johnson, M.; Younglove, B.; Lee, L.; LeBlanc, R.; Holt, H.; Hills, P.; Mackay, H.; Brown, T.; Mooberry, S. L.; Lee, M. Design, Synthesis, and Biological Testing of Pyrazoline Derivatives of Combretastatin-A4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (21), 5897–5901.
(100) Pandit, B.; Sun, Y.; Chen, P.; Sackett, D. L.; Hu, Z.; Rich, W.; Li, C.; Lewis, A.; Schaefer, K.; Li, P.-K. Structure–activity-Relationship Studies of Conformationally Restricted Analogs of Combretastatin A-4 Derived from SU5416. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (19), 6492–6501.
(101) Sun, L.; Tran, N.; Tang, F.; App, H.; Hirth, P.; McMahon, G.; Tang, C. Synthesis and Biological Evaluations of 3-Substituted Indolin-2-Ones: A Novel Class of Tyrosine Kinase Inhibitors That Exhibit Selectivity toward Particular Receptor Tyrosine Kinases. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (14), 2588–2603.

(102) Arthuis, M.; Pontikis, R.; Florent, J.-C. Tandem Heck–Suzuki–Miyaura Reaction: Application to the Synthesis of Constrained Analogues of Combretastatin A-4. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (36), 6397–6400.
(103) Wu, M.; Sun, Q.; Yang, C.; Chen, D.; Ding, J.; Chen, Y.; Lin, L.; Xie, Y. Synthesis and Activity of Combretastatin A-4 Analogues: 1,2,3-Thiadiazoles as Potent Antitumor Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 869–873.
(104) Rappl, C.; Barbier, P.; Bourgarel-Rey, V.; Grégoire, C.; Gilli, R.; Carre, M.; Combes, S.; Finet, J.-P.; Peyrot, V. Interaction of 4-Arylcoumarin Analogues of Combretastatins with Microtubule Network of HBL100 Cells and Binding to Tubulin †. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45* (30), 9210–9218.
(105) Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (E)-Alkenes by the Reaction of Alk-1-Enylboranes with Aryl Halides in the Presence of Palladium Catalyst. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, No. 19, 866.
(106) Marsden, S. P. Organic Synthesis: The Wittig Reaction Cleans up. *Nat. Chem.* **2009**, *1* (9), 685–687.
(107) Harrowven, D.; Guy, I.; Howell, M.; Packham, G. The Synthesis of a Combretastatin A-4 Based Library and Discovery of New Cooperative *Ortho* -Effects in Wittig Reactions Leading to (*Z*)-Stilbenes. *Synlett* **2006**, *2006* (18), 2977–2980.
(108) Robinson, J. E.; Taylor, R. J. K. A Ramberg–Bäcklund Route to the Stilbenoid Anti-Cancer Agents Combretastatin A-4 and DMU-212. *Chem. Commun.* **2007**, *0* (16), 1617–1619.
(109) Giraud, A.; Provot, O.; Hamzé, A.; Brion, J.-D.; Alami, M. One-Pot Hydrosilylation–protodesilylation of Functionalized Diarylalkynes: A Highly Selective Access to Z-Stilbenes. Application to the Synthesis of Combretastatin A-4. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (7), 1107–1110.
(110) Zou, Y.; Xiao, C.-F.; Zhong, R.-Q.; Wei, W.; Huang, W.-M.; He, S.-J. Synthesis of Combretastatin A-4 and Erianin. *J. Chem. Res.* **2008**, *2008* (6), 354–356.
(111) Camacho-Dávila, A. A. Kumada–Corriu Cross Coupling Route to the Anti-Cancer Agent Combretastatin A-4. *Synth. Commun.* **2008**, *38* (21), 3823–3833.
(112) Theeramunkong, S.; Caldarelli, A.; Massarotti, A.; Aprile, S.; Caprioglio, D.; Zaninetti, R.; Teruggi, A.; Pirali, T.; Grosa, G.; Tron, G. C.; et al. Regioselective Suzuki Coupling of Dihaloheteroaromatic Compounds as a Rapid Strategy To Synthesize Potent Rigid Combretastatin Analogues. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (14), 4977–4986.
(113) Synthesis of 2,3-Disubstituted Thiophenes from 1,3-Dimetallated Acetylenes and Non-Enolizable Thiocarbonyl Compounds. *Synth. Commun.* **1990**, *20* (22), 3427–3431.
(114) Nguyen, T. T. B.; Lomberget, T.; Tran, N. C.; Barret, R. Synthesis of (Z) Isomers of Benzoheterocyclic Derivatives of Combretastatin A-4: A Comparative Study of Several Methods. *Tetrahedron* **2013**, *69* (10), 2336–2347.
(115) L'Helgoual'c, J.-M.; Seggio, A.; Chevallier, F.; Yonehara, M.; Jeanneau, E.; Uchiyama, M.; Mongin, F. Deprotonative Metalation of Five-Membered Aromatic Heterocycles Using Mixed Lithium−Zinc Species. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (1), 177–183.
(116) Grossman, R. B. Transition-Metal-Catalyzed and -Mediated Reactions. In *The Art of Writing Reasonable Organic Reaction Mechanisms*; Springer New York: New York, NY, 2003; pp 270–333.
(117) Li, J.; Hua, R.; Liu, T. Highly Chemo- and Stereoselective Palladium-Catalyzed Transfer Semihydrogenation of Internal Alkynes Affording *Cis* -Alkenes. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (9), 2966–2970.
(118) Messaoudi, S.; Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J.-F.; De Losada, J. R.; Liu, J.-M.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; et al. *Iso* Combretastatins A versus Combretastatins A: The Forgotten *Iso* CA-4 Isomer as a Highly Promising Cytotoxic and

Antitubulin Agent. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (14), 4538–4542.
(119) Álvarez, R.; Álvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, B. G.; Medarde, M.; Peláez, R. Isocombretastatins A: 1,1-Diarylethenes as Potent Inhibitors of Tubulin Polymerization and Cytotoxic Compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (17), 6422–6431.
(120) Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. Antineoplastic Agents. 379. Synthesis of Phenstatin Phosphate [1a, †]. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (10), 1688–1695.
(121) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Cruz-Lopez, O.; Lopez Cara, C.; Carrion, M. D.; Brancale, A.; Hamel, E.; Chen, L.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; et al. Synthesis and Antitumor Activity of 1,5-Disubstituted 1,2,4-Triazoles as Cis-Restricted Combretastatin Analogues. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (10), 4248–4258.
(122) Coulson, D. R.; Satek, L. C.; Grim, S. O. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0). In *Inorganic Syntheses*; Cotton, F. A., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2007; pp 121–124.
(123) Rao, M. L. N.; Islam, S. S.; Dasgupta, P. Rapid Access to Unsymmetrical 1,3-Diynes and 2,5-Disubstituted Thiophenes under Ligand and Pd/Ni-Free Cu-Catalysis. *RSC Adv* **2015**, *5* (95), 78090–78098.
(124) Herz, H.-G. 2-Arylvinylation of 1-Methylindole by Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Synthesis* **1999**, *1999* (6), 1013–1016.
(125) Fournier Dit Chabert, J.; Joucla, L.; David, E.; Lemaire, M. An Efficient Phosphine-Free Palladium Coupling for the Synthesis of New 2-Arylbenzo[b]thiophenes. *Tetrahedron* **2004**, *60* (14), 3221–3230.
(126) Takeuchi, K.; Kohn, T. J.; Sall, D. J.; Denney, M. L.; McCowan, J. R.; Smith, G. F.; Gifford-Moore, D. S. Dibasic Benzo[b]thiophene Derivatives as a Novel Class of Active Site Directed Thrombin Inhibitors: 4. SAR Studies on the Conformationally Restricted C3-Side Chain of Hydroxybenzo[b]thiophenes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (5), 759–764.
(127) Tang, D.-T. D.; Collins, K. D.; Glorius, F. Completely Regioselective Direct C–H Functionalization of Benzo[*B*]Thiophenes Using a Simple Heterogeneous Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (20), 7450–7453.
(128) Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. Protection of Hydroxyl Groups as Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (17), 6190–6191.
(129) Cerminara, I.; Chiummiento, L.; Funicello, M.; Guarnaccio, A.; Lupattelli, P. Heterocycles in Peptidomimetics and Pseudopeptides: Design and Synthesis. *Pharmaceuticals* **2012**, *5* (12), 297–316.
(130) Hatzenbuhler, N.; Evrard, D.; Mewshaw, R.; Zhou, D.; Shah, U.; Inghrim, J.; Lenicek, S.; Baudy, R.; Butera, J.; Sabb, A.; et al. 3-Amino Choman and 2-Amino Tetralin Derivatives. WO2005012291 (A1), February 10, 2005.
(131) Chen, Y.; 陈友喜; He, L.; 贺礼东; Zhu, X.; 朱行武. C-Benzo Five-Membered Heteroaromatic Ring Aryl Glucoside Derivative and Preparation Method Therefor and Use Thereof. WO/2016/000599, January 8, 2016.
(132) Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Belsley, M.; Lodeiro, C.; Raposo, M. M. M. Synthesis and Characterization of Novel (Oligo)thienyl-Imidazo-Phenanthrolines as Versatile π-Conjugated Systems for Several Optical Applications. *Tetrahedron* **2008**, *64* (39), 9230–9238.
(133) Jeong, Y.-C.; Ahn, D.-J.; Lee, W.-S.; Lee, S.-H.; Ahn, K.-H. Synthesis of New Chiral Ligands Based on Thiophene Derivatives for Use in Catalytic Asymmetric Oxidation of Sulfides. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32* (3), 1063–1066.
(134) Matthews, J. M.; Qin, N.; Colburn, R. W.; Dax, S. L.; Hawkins, M.; McNally, J. J.; Reany, L.; Youngman, M. A.; Baker, J.; Hutchinson, T.; et al. The Design and Synthesis of Novel, Phosphonate-Containing Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8)

Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (8), 2922–2926.
(135) Vassal, E.; Barette, C.; Fonrose, X.; Dupont, R.; Sans-Soleilhac, E.; Lafanechère, L. Miniaturization and Validation of a Sensitive Multiparametric Cell-Based Assay for the Concomitant Detection of Microtubule-Destabilizing and Microtubule-Stabilizing Agents. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11* (4), 377–389.
(136) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.
(137) Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Aminesin Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction¶. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76* (4), 385–390.
(138) Raich, W. B.; Moorman, C.; Lacefield, C. O.; Lehrer, J.; Bartsch, D.; Plasterk, R. H. A.; Kandel, E. R.; Hobert, O. Characterization of Caenorhabditis Elegans Homologs of the Down Syndrome Candidate Gene DYRK1A. *Genetics* **2003**, *163* (2), 571–580.
(139) Tejedor, F. J.; Hämmerle, B. MNB/DYRK1A as a Multiple Regulator of Neuronal Development: MNB/DYRK1A in Neuronal Development. *FEBS J.* **2011**, *278* (2), 223–235.
(140) Becker, W.; Weber, Y.; Wetzel, K.; Eirmbter, K.; Tejedor, F. J.; Joost, H. G. Sequence Characteristics, Subcellular Localization, and Substrate Specificity of DYRK-Related Kinases, a Novel Family of Dual Specificity Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (40), 25893–25902.
(141) Wegiel, J.; Gong, C.-X.; Hwang, Y.-W. The Role of DYRK1A in Neurodegenerative Diseases: Role of DYRK1A in Neurodegenerative Diseases. *FEBS J.* **2011**, *278* (2), 236–245.
(142) Kinstrie, R.; Luebbering, N.; Miranda-Saavedra, D.; Sibbet, G.; Han, J.; Lochhead, P. A.; Cleghon, V. Characterization of a Domain That Transiently Converts Class 2 DYRKs into Intramolecular Tyrosine Kinases. *Sci. Signal.* **2010**, *3* (111), ra16.
(143) Lim, S.; Jin, K.; Friedman, E. Mirk Protein Kinase Is Activated by MKK3 and Functions as a Transcriptional Activator of HNF1alpha. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (28), 25040–25046.
(144) Taira, N.; Yamamoto, H.; Yamaguchi, T.; Miki, Y.; Yoshida, K. ATM Augments Nuclear Stabilization of DYRK2 by Inhibiting MDM2 in the Apoptotic Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (7), 4909–4919.
(145) Yamada, Y. A Comprehensive Analysis of Allelic Methylation Status of CpG Islands on Human Chromosome 21q. *Genome Res.* **2004**, *14* (2), 247–266.
(146) Maenz, B.; Hekerman, P.; Vela, E. M.; Galceran, J.; Becker, W. Characterization of the Human DYRK1A Promoter and Its Regulation by the Transcription Factor E2F1. *BMC Mol. Biol.* **2008**, *9* (1), 30.
(147) Soundararajan, M.; Roos, A. K.; Savitsky, P.; Filippakopoulos, P.; Kettenbach, A. N.; Olsen, J. V.; Gerber, S. A.; Eswaran, J.; Knapp, S.; Elkins, J. M. Structures of Down Syndrome Kinases, DYRKs, Reveal Mechanisms of Kinase Activation and Substrate Recognition. *Structure* **2013**, *21* (6), 986–996.
(148) Ryoo, S.-R.; Jeong, H. K.; Radnaabazar, C.; Yoo, J.-J.; Cho, H.-J.; Lee, H.-W.; Kim, I.-S.; Cheon, Y.-H.; Ahn, Y. S.; Chung, S.-H.; et al. DYRK1A-Mediated Hyperphosphorylation of Tau: A FUNCTIONAL LINK BETWEEN DOWN SYNDROME AND ALZHEIMER DISEASE. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (48), 34850–34857.
(149) Seifert, A.; Allan, L. A.; Clarke, P. R. DYRK1A Phosphorylates Caspase 9 at an Inhibitory Site and Is Potently Inhibited in Human Cells by Harmine: Phosphorylation of Caspase 9 by DYRK1A. *FEBS J.* **2008**, *275* (24), 6268–6280.
(150) Guedj, F.; Pereira, P. L.; Najas, S.; Barallobre, M.-J.; Chabert, C.; Souchet, B.; Sebrie, C.; Verney, C.; Herault, Y.; Arbones, M.; et al. DYRK1A: A Master Regulatory Protein

Controlling Brain Growth. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46* (1), 190–203.
(151) Friedman, E. Mirk/Dyrk1B in Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *102* (2), 274–279.
(152) Jin, K.; Park, S.; Ewton, D. Z.; Friedman, E. The Survival Kinase Mirk/Dyrk1B Is a Downstream Effector of Oncogenic K-Ras in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67* (15), 7247–7255.
(153) Deng, X.; Friedman, E. Mirk Kinase Inhibition Blocks the in Vivo Growth of Pancreatic Cancer Cells. *Genes Cancer* **2014**, *5* (9–10), 337–347.
(154) The Normal Function of the Cancer Kinase Mirk/dyrk1B Is to Reduce Reactive Oxygen Species. *Genes Cancer* **2014**, 22.
(155) Friedman, E. Mirk/dyrk1B Kinase in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (3), 5560–5575.
(156) Nihira, N. T.; Yoshida, K. Engagement of DYRK2 in Proper Control for Cell Division. *Cell Cycle* **2015**, *14* (6), 802–807.
(157) Becker, W. Emerging Role of DYRK Family Protein Kinases as Regulators of Protein Stability in Cell Cycle Control. *Cell Cycle* **2012**, *11* (18), 3389–3394.
(158) Taira, N.; Mimoto, R.; Kurata, M.; Yamaguchi, T.; Kitagawa, M.; Miki, Y.; Yoshida, K. DYRK2 Priming Phosphorylation of c-Jun and c-Myc Modulates Cell Cycle Progression in Human Cancer Cells. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (3), 859–872.
(159) Jung, H.-Y.; Wang, X.; Jun, S.; Park, J.-I. Dyrk2-Associated EDD-DDB1-VprBP E3 Ligase Inhibits Telomerase by TERT Degradation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (10), 7252–7262.
(160) Blasco, M. A. Telomeres and Human Disease: Ageing, Cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6* (8), 611–622.
(161) Maddika, S.; Chen, J. Protein Kinase DYRK2 Is a Scaffold That Facilitates Assembly of an E3 Ligase. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (4), 409–419.
(162) Yamaguchi, N.; Mimoto, R.; Yanaihara, N.; Imawari, Y.; Hirooka, S.; Okamoto, A.; Yoshida, K. DYRK2 Regulates Epithelial-Mesenchymal-Transition and Chemosensitivity through Snail Degradation in Ovarian Serous Adenocarcinoma. *Tumor Biol.* **2015**, *36* (8), 5913–5923.
(163) Mimoto, R.; Taira, N.; Takahashi, H.; Yamaguchi, T.; Okabe, M.; Uchida, K.; Miki, Y.; Yoshida, K. DYRK2 Controls the Epithelial?mesenchymal Transition in Breast Cancer by Degrading Snail. *Cancer Lett.* **2013**, *339* (2), 214–225.
(164) Taira, N.; Yoshida, K. Post-Translational Modifications of p53 Tumor Suppressor: Determinants of Its Functional Targets. *Histol. Histopathol.* **2012**, *27* (4), 437–443.
(165) Taira, N.; Nihira, K.; Yamaguchi, T.; Miki, Y.; Yoshida, K. DYRK2 Is Targeted to the Nucleus and Controls p53 via Ser46 Phosphorylation in the Apoptotic Response to DNA Damage. *Mol. Cell* **2007**, *25* (5), 725–738.
(166) D'Orazi, G.; Cecchinelli, B.; Bruno, T.; Manni, I.; Higashimoto, Y.; Saito, S. 'ichi; Gostissa, M.; Coen, S.; Marchetti, A.; Del Sal, G.; et al. Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2 Phosphorylates p53 at Ser 46 and Mediates Apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4* (1), 11–19.
(167) Wesierska-Gadek, J.; Gueorguieva, M.; Horky, M. Roscovitine-Induced up-Regulation of p53AIP1 Protein Precedes the Onset of Apoptosis in Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4* (1), 113–124.
(168) Taira, N.; Yamaguchi, T.; Kimura, J.; Lu, Z.-G.; Fukuda, S.; Higashiyama, S.; Ono, M.; Yoshida, K. Induction of Amphiregulin by p53 Promotes Apoptosis via Control of microRNA Biogenesis in Response to DNA Damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (2), 717–722.
(169) Abekhoukh, S.; Planque, C.; Ripoll, C.; Urbaniak, P.; Paul, J.-L.; Delabar, J.-M.; Janel, N. Dyrk1A, a Serine/Threonine Kinase, Is Involved in ERK and Akt Activation in the Brain of Hyperhomocysteinemic Mice. *Mol. Neurobiol.* **2013**, *47* (1), 105–116.

(170) Pozo, N.; Zahonero, C.; Fernández, P.; Liñares, J. M.; Ayuso, A.; Hagiwara, M.; Pérez, A.; Ricoy, J. R.; Hernández-Laín, A.; Sepúlveda, J. M.; et al. Inhibition of DYRK1A Destabilizes EGFR and Reduces EGFR-Dependent Glioblastoma Growth. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123* (6), 2475–2487.
(171) Fernandez-Martinez, J.; Vela, E. M.; Tora-Ponsioen, M.; Ocana, O. H.; Nieto, M. A.; Galceran, J. Attenuation of Notch Signalling by the Down-Syndrome-Associated Kinase DYRK1A. *J. Cell Sci.* **2009**, *122* (10), 1574–1583.
(172) Purow, B. W. Expression of Notch-1 and Its Ligands, Delta-Like-1 and Jagged-1, Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation. *Cancer Res.* **2005**, *65* (6), 2353–2363.
(173) Gwack, Y.; Sharma, S.; Nardone, J.; Tanasa, B.; Iuga, A.; Srikanth, S.; Okamura, H.; Bolton, D.; Feske, S.; Hogan, P. G.; et al. A Genome-Wide Drosophila RNAi Screen Identifies DYRK-Family Kinases as Regulators of NFAT. *Nature* **2006**, *441* (7093), 646–650.
(174) Foug?re, M.; Gaudineau, B.; Barbier, J.; Guaddachi, F.; Feugeas, J.-P.; Auboeuf, D.; Jauliac, S. NFAT3 Transcription Factor Inhibits Breast Cancer Cell Motility by Targeting the Lipocalin 2 Gene. *Oncogene* **2010**, *29* (15), 2292–2301.
(175) Mahindroo, N.; Punchihewa, C.; Fujii, N. Hedgehog-Gli Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (13), 3829–3845.
(176) Peukert, S.; Miller-Moslin, K. Small-Molecule Inhibitors of the Hedgehog Signaling Pathway as Cancer Therapeutics. *ChemMedChem* **2010**, *5* (4), 500–512.
(177) Masuda, M.; Wakasaki, T.; Suzui, M.; Toh, S.; Joe, A. K.; Weinstein, I. B. Stat3 Orchestrates Tumor Development and Progression: The Achilles' Heel of Head and Neck Cancers? *Curr. Cancer Drug Targets* **2010**, *10* (1), 117–126.
(178) Liu, Y.; Li, C.; Lin, J. STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10* (7), 512–519.
(179) Friedman, E. The Role of Mirk Kinase in Sarcomas. *Sarcoma* **2011**, *2011*, 1–5.
(180) Kuuselo, R.; Simon, R.; Karhu, R.; Tennstedt, P.; Marx, A. H.; Izbicki, J. R.; Yekebas, E.; Sauter, G.; Kallioniemi, A. 19q13 Amplification Is Associated with High Grade and Stage in Pancreatic Cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **2010**, NA-NA.
(181) Becker, W.; Sippl, W. Activation, Regulation, and Inhibition of DYRK1A: Activation, Regulation, and Inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **2011**, *278* (2), 246–256.
(182) Adayev, T.; Wegiel, J.; Hwang, Y.-W. Harmine Is an ATP-Competitive Inhibitor for Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A (Dyrk1A). *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507* (2), 212–218.
(183) Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; et al. Development of a Novel Selective Inhibitor of the Down Syndrome-Related Kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* **2010**, *1* (7), 1–9.
(184) Ionescu, A.; Dufrasne, F.; Gelbcke, M.; Jabin, I.; Kiss, R.; Lamoral-Theys, D. DYRK1A Kinase Inhibitors with Emphasis on Cancer. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12* (13), 1315–1329.
(185) Adayev, T.; Chen-Hwang, M.-C.; Murakami, N.; Wegiel, J.; Hwang, Y.-W. Kinetic Properties of a MNB/DYRK1A Mutant Suitable for the Elucidation of Biochemical Pathways ? *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45* (39), 12011–12019.
(186) Kim, N. D.; Yoon, J.; Kim, J. H.; Lee, J. T.; Chon, Y. S.; Hwang, M.-K.; Ha, I.; Song, W.-J. Putative Therapeutic Agents for the Learning and Memory Deficits of People with Down Syndrome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (14), 3772–3776.
(187) Carreaux, F.; Bazureau, J.-P.; Renault, S.; Meijer, L.; Lozach, O. Imidazolone Derivatives, Preparation Method Thereof and Biological Use of Same. CA2694377 (A1) Abstract of corresponding document: FR2919608 (A1), April 23, 2009.
(188) Fala, F.; Blalock, W. L.; Tazzari, P. L.; Cappellini, A.; Chiarini, F.; Martinelli, G.; Tafuri, A.; McCubrey, J. A.; Cocco, L.; Martelli, A. M. Proapoptotic Activity and

Chemosensitizing Effect of the Novel Akt Inhibitor (2S)-1-(1H-Indol-3-Yl)-3-[5-(3-Methyl-2H-Indazol-5-Yl)pyridin-3-yl]oxypropan2-Amine (A443654) in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74* (3), 884–895.
(189) Ruzzene, M.; Penzo, D.; Pinna, L. A. Protein Kinase CK2 Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole (TBB) Induces Apoptosis and Caspase-Dependent Degradation of Haematopoietic Lineage Cell-Specific Protein 1 (HS1) in Jurkat Cells. *Biochem. J.* **2002**, *364* (1), 41–47.
(190) Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; Mclauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P. The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: A Further Update. *Biochem. J.* **2007**, *408* (3), 297–315.
(191) Kartal, M.; Altun, M. L.; Kurucu, S. HPLC Method for the Analysis of Harmol, Harmalol, Harmine and Harmaline in the Seeds of Peganum Harmala L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31* (2), 263–269.
(192) Wang, Y.; Li, M.; Xu, X.; Song, M.; Tao, H.; Bai, Y. Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Promotes Neural Progenitor Cell Proliferation and Sonic Hedgehog Pathway Activation during Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56* (8), 1292–1303.
(193) De la Torre, R.; De Sola, S.; Pons, M.; Duchon, A.; de Lagran, M. M.; Farré, M.; Fitó, M.; Benejam, B.; Langohr, K.; Rodriguez, J.; et al. Epigallocatechin-3-Gallate, a DYRK1A Inhibitor, Rescues Cognitive Deficits in Down Syndrome Mouse Models and in Humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58* (2), 278–288.
(194) Suganuma, M.; Okabe, S.; Oniyama, M.; Tada, Y.; Ito, H.; Fujiki, H. Wide Distribution of [3H](-)-Epigallocatechin Gallate, a Cancer Preventive Tea Polyphenol, in Mouse Tissue. *Carcinogenesis* **1998**, *19* (10), 1771–1776.
(195) McLAUCHLAN, H.; Elliott, M.; Cohen, P. The Specificities of Protein Kinase Inhibitors: An Update. *Biochem. J.* **2003**, *371* (1), 199–204.
(196) Guedj, F.; Sébrié, C.; Rivals, I.; Ledru, A.; Paly, E.; Bizot, J. C.; Smith, D.; Rubin, E.; Gillet, B.; Arbones, M.; et al. Green Tea Polyphenols Rescue of Brain Defects Induced by Overexpression of DYRK1A. *PLoS ONE* **2009**, *4* (2), e4606.
(197) Janeczko, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Golczyk, H. Emodin, a Natural Inhibitor of Protein Kinase CK2, Suppresses Growth, Hyphal Development, and Biofilm Formation of *Candida Albicans*: The Effects of Emodin on *Candida Albicans*. *Yeast* **2017**, *34* (6), 253–265.
(198) Dobrowolska, G.; Lozeman, F. J.; Li, D.; Krebs, E. G. CK2, a Protein Kinase of the next Millennium. *Mol. Cell. Biochem.* **1999**, *191* (1–2), 3–12.
(199) Cozza, G.; Meggio, F.; Moro, S. The Dark Side of Protein Kinase CK2 Inhibition. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (19), 2867–2884.
(200) Ahmed, K.; Issinger, O. G.; Szyszka, R. *Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States*; Advances in Biochemistry in Health and Disease; Springer International Publishing, 2015.
(201) Hundsd?rfer, C.; Hemmerling, H.-J.; G?tz, C.; Totzke, F.; Bednarski, P.; Le Borgne, M.; Jose, J. Indeno[1,2-B]indole Derivatives as a Novel Class of Potent Human Protein Kinase CK2 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (7), 2282–2289.
(202) Hathaway, B. A.; White, K. L.; McGill, M. E. Comparison of Iodination of Methoxylated Benzaldehydes and Related Compounds Using Iodine/Silver Nitrate and Iodine/Periodic Acid. *Synth. Commun.* **2007**, *37* (21), 3855–3860.
(203) Bovonsombat, P.; Leykajarakul, J.; Khan, C.; Pla-on, K.; Krause, M. M.; Khanthapura, P.; Ali, R.; Doowa, N. Regioselective Iodination of Phenol and Analogues Using N-Iodosuccinimide and P-Toluenesulfonic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (22), 2664–2667.
(204) Pérez-Silanes, S.; Martínez-Esparza, J.; Oficialdegui, A. M.; Villanueva, H.; Orúas,

L.; Monge, A. Synthesis of New 5-Substitutedbenzo[*B*]Thiophene Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, *38* (5), 1025–1030.
(205) Marquise, N.; Harford, P. J.; Chevallier, F.; Roisnel, T.; Wheatley, A. E. H.; Gros, P. C.; Mongin, F. Efficient Two-Step Access to Azafluorenones and Related Compounds. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (24), 3154–3157.
(206) Karmakar, S.; Datta, A. Role of Heavy Atom Tunneling in Myers–Saito Cyclization of Cyclic Enyne-Cumulene Systems. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (5), 945–950.
(207) Plaumann, H. P.; Keay, B. A.; Rodrigo, R. The Regiospecific Lithiation of Aromatic Acetals. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (51), 4921–4924.
(208) WO2010056788A1.pdf.
(209) Molino, B. F.; Liu, S.; Guzzo, P. R.; Beck, J. P. Aryl- and Heteroaryl-Substituted Tetrahydroisoquinolines and Use Thereof to Block Reuptake of Norepinephrine, Dopamine, and Serotonin. US2006052378 (A1), March 9, 2006.
(210) Alchab, F.; Ettouati, L.; Bouaziz, Z.; Bollacke, A.; Delcros, J.-G.; Gertzen, C.; Gohlke, H.; Pinaud, N.; Marchivie, M.; Guillon, J.; et al. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling of Substituted Indeno[1,2-B]indoles as Inhibitors of Human Protein Kinase CK2. *Pharmaceuticals* **2015**, *8* (2), 279–302.
(211) Gratz, A.; Götz, C.; Jose, J. A CE-Based Assay for Human Protein Kinase CK2 Activity Measurement and Inhibitor Screening. *ELECTROPHORESIS* **2010**, *31* (4), 634–640.
(212) Pardridge, W. M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRX* **2005**, *2* (1), 3–14.
(213) Tajes, M.; Ramos-Fernández, E.; Weng-Jiang, X.; Bosch-Morató, M.; Guivernau, B.; Eraso-Pichot, A.; Salvador, B.; Fernàndez-Busquets, X.; Roquer, J.; Muñoz, F. J. The Blood-Brain Barrier: Structure, Function and Therapeutic Approaches to Cross It. *Mol. Membr. Biol.* **2014**, *31* (5), 152–167.
(214) Rubin, L. L.; Staddon, J. M. THE CELL BIOLOGY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22* (1), 11–28.
(215) Staddon, J. M.; Rubin, L. L. Cell Adhesion, Cell Junctions and the Blood—brain Barrier. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6* (5), 622–627.
(216) Petty, M. A.; Lo, E. H. Junctional Complexes of the Blood-Brain Barrier: Permeability Changes in Neuroinflammation. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *68* (5), 311–323.
(217) Brown, D.; Stow, J. L. Protein Trafficking and Polarity in Kidney Epithelium: From Cell Biology to Physiology. *Physiol. Rev.* **1996**, *76* (1), 245–297.
(218) González-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Ávila-Flores, A. MAGUK Proteins: Structure and Role in the Tight Junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2000**, *11* (4), 315–324.
(219) Balda, M. S.; Flores-Maldonado, C.; Cereijido, M.; Matter, K. Multiple Domains of Occludin Are Involved in the Regulation of Paracellular Permeability. *J. Cell. Biochem.* **2000**, *78* (1), 85–96.
(220) Bazzoni, G. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiol. Rev.* **2004**, *84* (3), 869–901.
(221) Palmeri, D. Vascular Endothelial Junction-Associated Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Is Localized to Intercellular Boundaries of Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (25), 19139–19145.
(222) Furuse, M.; Sasaki, H.; Tsukita, S. Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species within and between Tight Junction Strands. *J. Cell Biol.* **1999**, *147* (4), 891–903.
(223) McCrea, P. D.; Gumbiner, B. M. Purification of a 92-kDa Cytoplasmic Protein Tightly Associated with the Cell-Cell Adhesion Molecule E-Cadherin (Uvomorulin). Characterization and Extractability of the Protein Complex from the Cell Cytostructure. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (7), 4514–4520.
(224) Aono, S.; Nakagawa, S.; Reynolds, A. B.; Takeichi, M. p120(ctn) Acts as an

Inhibitory Regulator of Cadherin Function in Colon Carcinoma Cells. *J. Cell Biol.* **1999**, *145* (3), 551–562.
(225) Wolburg, H.; Lippoldt, A. Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier: Development, Composition and Regulation. *Vascul. Pharmacol.* **2002**, *38* (6), 323–337.
(226) Kacem, K.; Lacombe, P.; Seylaz, J.; Bonvento, G. Structural Organization of the Perivascular Astrocyte Endfeet and Their Relationship with the Endothelial Glucose Transporter: A Confocal Microscopy Study. *Glia* **1998**, *23* (1), 1–10.
(227) Verkman, A. S. Aquaporin Water Channels and Endothelial Cell Function. *J. Anat.* **2002**, *200* (6), 617–627.
(228) Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte–endothelial Interactions at the Blood–brain Barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7* (1), 41–53.
(229) Haseloff, R. F.; Blasig, I. E.; Bauer, H. C.; Bauer, H. In Search of the Astrocytic Factor(s) Modulating Blood-Brain Barrier Functions in Brain Capillary Endothelial Cells in Vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25* (1), 25–39.
(230) Hellström, M.; Gerhardt, H.; Kalén, M.; Li, X.; Eriksson, U.; Wolburg, H.; Betsholtz, C. Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *J. Cell Biol.* **2001**, *153* (3), 543–554.
(231) Miller, G. DRUG TARGETING: Breaking Down Barriers. *Science* **2002**, *297* (5584), 1116–1118.
(232) Orthmann, A.; Fichtner, I.; Zeisig, R. Improving the Transport of Chemotherapeutic Drugs across the Blood–brain Barrier. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2011**, *4* (4), 477–490.
(233) Engelhardt, B.; Sorokin, L. The Blood–brain and the Blood–cerebrospinal Fluid Barriers: Function and Dysfunction. *Semin. Immunopathol.* **2009**, *31* (4), 497–511.
(234) Holly, J.; Perks, C. The Role of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Neuroendocrinology* **2006**, *83* (3–4), 154–160.
(235) Scherrmann, J. M. Drug Delivery to Brain via the Blood-Brain Barrier. *Vascul. Pharmacol.* **2002**, *38* (6), 349–354.
(236) Newton, H. B. Advances in Strategies to Improve Drug Delivery to Brain Tumors. *Expert Rev. Neurother.* **2006**, *6* (10), 1495–1509.
(237) Löscher, W.; Potschka, H. Role of Drug Efflux Transporters in the Brain for Drug Disposition and Treatment of Brain Diseases. *Prog. Neurobiol.* **2005**, *76* (1), 22–76.
(238) Kang, Y. S.; Pardridge, W. M. Brain Delivery of Biotin Bound to a Conjugate of Neutral Avidin and Cationized Human Albumin. *Pharm. Res.* **1994**, *11* (9), 1257–1264.
(239) Pardridge, W. M.; Triguero, D.; Buciak, J.; Yang, J. Evaluation of Cationized Rat Albumin as a Potential Blood-Brain Barrier Drug Transport Vector. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *255* (2), 893–899.
(240) Brasnjevic, I.; Steinbusch, H. W. M.; Schmitz, C.; Martinez-Martinez, P. Delivery of Peptide and Protein Drugs over the Blood–brain Barrier. *Prog. Neurobiol.* **2009**, *87* (4), 212–251.
(241) Tamai, I.; Tsuji, A. Transporter-Mediated Permeation of Drugs across the Blood-Brain Barrier. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89* (11), 1371–1388.
(242) Mann, G. E.; Yudilevich, D. L.; Sobrevia, L. Regulation of Amino Acid and Glucose Transporters in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Physiol. Rev.* **2003**, *83* (1), 183–252.
(243) Booth, R.; Kim, H. Characterization of a Microfluidic in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier (μBBB). *Lab. Chip* **2012**, *12* (10), 1784.
(244) Brown, R. C.; Morris, A. P.; O'Neil, R. G. Tight Junction Protein Expression and Barrier Properties of Immortalized Mouse Brain Microvessel Endothelial Cells. *Brain Res.* **2007**, *1130*, 17–30.
(245) Cucullo, L.; Hossain, M.; Rapp, E.; Manders, T.; Marchi, N.; Janigro, D. Development of a Humanized In Vitro Blood?Brain Barrier Model to Screen for Brain Penetration of

Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* **2007**, *48* (3), 505–516.
(246) Geldenhuys, W. J.; Allen, D. D.; Bloomquist, J. R. Novel Models for Assessing Blood–brain Barrier Drug Permeation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8* (6), 647–653.
(247) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007–1010.
(248) Sinkó, B.; Garrigues, T. M.; Balogh, G. T.; Nagy, Z. K.; Tsinman, O.; Avdeef, A.; Takács-Novák, K. Skin–PAMPA: A New Method for Fast Prediction of Skin Penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45* (5), 698–707.
(249) Bicker, J.; Alves, G.; Fortuna, A.; Falcão, A. Blood–brain Barrier Models and Their Relevance for a Successful Development of CNS Drug Delivery Systems: A Review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *87* (3), 409–432.
(250) Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38* (3), 223–232.
(251) Balogh, G. T.; Müller, J.; Könczöl, Á. pH-Gradient PAMPA-Based in Vitro Model Assay for Drug-Induced Phospholipidosis in Early Stage of Drug Discovery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49* (1), 81–89.
(252) Müller, J.; Esső, K.; Dargó, G.; Könczöl, Á.; Balogh, G. T. Tuning the Predictive Capacity of the PAMPA-BBB Model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *79*, 53–60.
(253) Basavaraj, S.; Betageri, G. V. Can Formulation and Drug Delivery Reduce Attrition during Drug Discovery and Development—review of Feasibility, Benefits and Challenges. *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4* (1), 3–17.
(254) Barratt, G. Colloidal Drug Carriers: Achievements and Perspectives. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2003**, *60* (1), 21–37.
(255) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block Copolymer Micelles for Drug Delivery: Design, Characterization and Biological Significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 37–48.
(256) Wais, U.; Jackson, A. W.; He, T.; Zhang, H. Nanoformulation and Encapsulation Approaches for Poorly Water-Soluble Drug Nanoparticles. *Nanoscale* **2016**, *8* (4), 1746–1769.
(257) Callewaert, M.; Dukic, S.; Van Gulick, L.; Vittier, M.; Gafa, V.; Andry, M.-C.; Molinari, M.; Roullin, V. G. Etoposide Encapsulation in Surface-Modified Poly(lactide- *Co* -Glycolide) Nanoparticles Strongly Enhances Glioma Antitumor Efficiency. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101A* (5), 1319–1327.
(258) Martínez Rivas, C. J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q. A.; Galindo Rodríguez, S. A.; Román, R. Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (1), 66–81.
(259) Bhatia, S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*; Springer International Publishing, 2016.
(260) Carlini, A. S.; Adamiak, L.; Gianneschi, N. C. Biosynthetic Polymers as Functional Materials. *Macromolecules* **2016**, *49* (12), 4379–4394.
(261) Hamid Akash, M. S.; Rehman, K.; Chen, S. Natural and Synthetic Polymers as Drug Carriers for Delivery of Therapeutic Proteins. *Polym. Rev.* **2015**, *55* (3), 371–406.
(262) Zeng, Z. Recent Advances in PEG–PLA Block Copolymer Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2010**, 1057.
(263) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG–PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10374–10385.
(264) Ni, F.; Jiang, L.; Yang, R.; Chen, Z.; Qi, X.; Wang, J. Effects of PEG Length and Iron

Oxide Nanoparticles Size on Reduced Protein Adsorption and Non-Specific Uptake by Macrophage Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12* (3), 2094–2100.