



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

**INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE et
CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE**

THÈSE présentée par :

Fabienne SAAB

soutenue le : **22 Janvier 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Interface Chimie-Biologie : Systèmes moléculaires à visées thérapeutiques

**Inhibiteurs de la voie Raf/MEK/ERK :
Synthèse de composés à structure 4-
azaindolique et évaluation de leur efficacité
par la mise au point de tests TR-FRET**

THÈSE dirigée par :

**Françoise SCHOENTGEN
Jean-Yves MÉROUR**

Directeur de Recherche, CNRS Orléans et UPMC
Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

**Jean-Claude FLORENT
Ralph JOCKERS**

Directeur de recherche, Institut Curie Paris
Directeur de recherche, Institut Cochin Paris

JURY :

Christiane GUILLOUZO

Directeur de recherche, Université de Rennes 1,
Présidente du jury

Philippe BOUGNOUX

Professeur PU-PH, Université de Tours

Valérie BÉNÉTEAU

Maître de conférences, Université d'Orléans

Jean-Claude FLORENT

Directeur de recherche, Institut Curie Paris

Ralph JOCKERS

Directeur de recherche, Institut Cochin Paris

Sylvain ROUTIER

Professeur, Université d'Orléans

Françoise SCHOENTGEN

Directeur de Recherche, Université de Paris 6

Jean-Yves MÉROUR

Professeur, Université d'Orléans

Remerciements

Le présent travail a été réalisé au sein de deux laboratoires ; le Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans (CBM, UPR 4301 CNRS) sous la direction du Directeur de recherche Françoise Schoentgen ; et l'Institut de Chimie Organique et Analytique à l'Université d'Orléans (ICOA, UMR-CNRS 6005), sous la direction du Professeur Jean-Yves Mérour.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Directeur de recherche Françoise Schoentgen et au Professeur Jean-Yves Mérour pour la confiance dont ils ont fait preuve à mon égard en me proposant ce sujet de recherche. Je leur adresse également mes sincères remerciements pour leur disponibilité, leur soutien, les conseils éclairés et leur rigueur scientifique que j'ai eu la chance de recevoir tout au long de ces trois années.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Sylvain Routier et au Docteur Valérie Bénéteau pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à ce travail. Leurs précieux conseils qu'ils ont su me prodiguer, et la disponibilité dont ils ont fait preuve, m'ont beaucoup aidée dans la conduite de ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux Directeurs de recherche Jean-Claude Florent et Ralph Jockers pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'assurer le travail d'évaluation qui en découle.

Mes remerciements s'adressent également au Directeur de recherche Christiane Guillouzo, au Docteur Valérie Bénéteau, au Professeur en médecine Philippe Bougnoux et au Professeur Sylvain Routier qui me font l'honneur de participer au jugement de ces travaux en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier tout particulièrement les chercheurs avec lesquels nous avons travaillé en collaboration et sans qui ce travail n'aurait pas été possible : Agnès Delmas et Vincent Aucagne pour m'avoir si gentiment accueillie dans leur laboratoire et de m'avoir fait bénéficier de leur expertise en synthèse peptidique ; Stéphane Bourg et Françoise Vovelle pour leur travail effectué en modélisation moléculaire ; les équipes de Christiane Guillouzo et Laurent Meijer pour les tests réalisés sur les lignées de cellules tumorales et sur les kinases CDK5, GSK3, DYRK1A ; l'équipe de Martine Cadène pour les analyses de spectrométrie de masse et l'équipe de Christian Damblon pour l'étude des interactions peptides/PEBP par RMN.

Je remercie vivement l'Institut National du Cancer et le Cancéropôle Grand Ouest pour le financement de cette thèse.

Je souhaiterais remercier très chaleureusement tous mes collègues de l'I.C.O.A. et du C.B.M. qui m'ont permis de réaliser ce travail dans une ambiance très sympathique.

Je tiens également à remercier tout particulièrement ma mère et Nicolas pour le soutien et les encouragements qu'ils m'ont apporté pendant ces trois années.

Enfin, un immense merci à ma famille et mes amis qui ont fait le déplacement pour assister à ma soutenance.

Abréviations :

AA: Acide aminé

aq. : Aqueux

(Hét)Ar : Hétéroaromatique

5-HT : 5-Hydroxytryptamine ou Sérotonine

Ac : Acétyl

AC : Adénylate cyclase

ADP : Adénosine diphosphate

Akt ou PKB

ALPHA : Amplified Luminescence Proximity Homogenous assay

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Ar ou arom : Aromatique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Bcr-Abl : Bcr, Breakpoint cluster region, Abl, Abelson

BINAP : 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyle

Bn ou Bzl : Benzyle

Boc : *tert*-Butoxycarbonyl

Bu : Butyle

BuLi: Butyllithium

Bzl ou Bn : Benzyle

CCM : Chromatographie sur couche mince

CDK : Cyclin-dependent kinase

Cpm : Coups par minute

CR : Conserved region

CRD : Cystein rich domain

CSP : Cellules souches périphériques

Da : Dalton

DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DCE : Dichloroéthane

DCM : Dichlorométhane

DIPA: Diisopropylamine
DIPEA : Diisopropyléthylamine
DMA : Diméthylacétamide
DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
DME : Diméthyléter
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMF-DEA : diméthylformamide diéthyle acétal
DMF-DMA : diméthylformamide diméthyle acétal
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNMT : DNA méthyltransférase
DO : Densité optique
DPPF : 1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène
DTT : Dithiotréitol
DYRK1A : Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A
 E^+ : Electrophile
 EC_{50} : Effective concentration, concentration conduisant à 50 % d'activité
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EP : Ether de pétrole
Eph : Ephrine
éq. ou equiv. : Equivalent
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ES : Electrospray
Et : Ethyle
FAK : Focal-adhesion kinase
FDA : Food and Drug Administration
FI : Fluorescence Intensity
Fmoc : 9*H*-Fluorèn-9-yl-méthoxycarbonyle
FMN : Flavine mononucléotide
FP : Fluorescence Polarization
FQ : Fluorescence Quench
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAB1 : GRB2-associated binding protein 1

GFP : Green fluorescent protein
GIST : Gastrointestinal stromal tumor
GP : Groupe protecteur
GPCR : G protein-coupled receptor
GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3
GST : Glutathion-S-Transférase
GTP : Guanosine triphosphate
HAT : Histone acétyltransférase
HCC : Hepatocellular carcinoma
HDAC : Histone désacétylase
HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER : Human epidermal receptor
HGF : Hepatocyte growth factor
HLA : Human leucocyte antigen
HMPA : 4-Hydroxymethylphenoxyacetic acid
HPLC : High performance liquid chromatography
HRMS : High resolution mass spectroscopy
HSP : Heat shock protein
Hz : Hertz
HOBt : 1-Hydroxy-benzotriazole
HBTU : 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
HATU : 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %
IGFR : Insulin-like growth factor receptor
IKK : IκB kinase
IL : Interleukine
Ind : Indole
IR : Infra rouge ou Insulin Receptor
IRS : Insulin receptor substrate
IS : Ion spray
JAK : Janus kinase
JNK : Jun *N*-terminal kinase

LDA : Lithium diisopropylamide
LiTMP : Lithium tétraméthylpipéridide
LMC : Leucémie myéloïde chronique
mAbs : Anticorps monoclonaux
M.O. : Micro-onde
MALDI : Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MBP : Myelin basic protein
mCPBA : *m*-Chloroperoxybenzoic acid
Me : Méthyle
MEK : Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase
MOPS : 3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid
Mp : Melting point
mTor : Mammalian target of rapamycin
MW : Molecular Weight
NF- κ B : Nuclear factor kappa enhancer binding protein
NIK : Nuclear factor kappaB-inducing kinase
NIS : *N*-Iodosuccinimide
NMP : *N*-méthyl-2-pyrrolidone
NMR : Nuclear Magnetic Resonance
PAK : p21-activated protein kinase
Pbf : 2,2,4,6,7-Pentaméthyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pd(OAc)₂ : Acétate de palladium
Pd(PPh₃)₄ : Palladium tétrakis triphénylphosphine
Pd/C : Palladium on carbon
Pd₂(dba)₃ : Tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium
pdb : Protein data bank
PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor
PDK1 : 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1
PEBP : Phosphatidyl ethanolamine binding protein
PEGA : Polyéthylène glycol polyacrylamide
PEG-PS : Polyéthylène glycol-polystyrène
PFBA : Phosphocellulose filter binding assay

Ph : Phényle
PI3K : Phosphoinositide 3 kinase
PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB : Protéine kinase B ou Akt
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PMDTA : Pentaméthyl-diéthylène-triamine
PS : Polystyrène
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
Pyr : Pyridine
R.T. : Room temperature
RBD : Ras binding domain
RCC : Renal cell carcinoma
Rf : Retention factor
RKIP : Raf kinase inhibitor protein
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RON : Récepteur d'origine nantais
RP-HPLC : Reverse phase-HPLC ou HPLC en phase inverse
RSA : Relation-structure-activité
RTK : Récepteur tyrosine kinase
siRNA : Small interfering RNA
SOS : Son of sevenles
SPA : Scintillation proximity assay
SPPS : Solid-phase peptide synthesis
Src : Sarcoma
STAT : Signal transducers and activator of transcription
t.a. : Température ambiante
TAK : Thylakoid membrane protein kinase
TBAF : Tetra-*n*-butylammonium fluoride
*t*Bu : *tertiobutyle*
TEAA : Triéthylammonium acétate
Tf : Triflate (CF₃SO₂)
TFA : Trifluoroacetic acid

THF : Tétrahydrofurane

TIS : Triisopropylsilane

TMEDA : Tétraméthyléthylènediamine

TMP: Tétraméthylpipéridine

TMS : Triméthylsilyle

TNF : Tumor necrosis factor

TOF : Time of flight

TRAIL : Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRF : Time Resolved Fluorescence

TR-FRET : Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

VDA : Vascular disrupting agents

VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor

VNS : Vicarious nucleophilic substitution

Xantphos : 4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène

Acides aminés

A	Ala	Alanine	I	Ile	Isoleucine	R	Arg	Arginine
C	Cys	Cystéine	K	Lys	Lysine	S	Ser	Sérine
D	Asp	Aspartate	L	Leu	Leucine	T	Thr	Thréonine
E	Glu	Glutamate	M	Met	Méthionine	V	Val	Valine
F	Phe	Phénylalanine	N	Asn	Asparagine	W	Trp	Tryptophane
G	Gly	Glycine	P	Pro	Proline	Y	Tyr	Tyrosine
H	His	Histidine	Q	Gln	Glutamine			

Chapitre I : INTRODUCTION.....	5
I/ Introduction générale sur le cancer	4
I-1 Le cancer.....	4
I-2 Les chiffres du cancer en France	5
I-2.1 Incidence.....	5
I-2.2 Mortalité.....	5
I-2.3 Taux de survie.....	5
I-3 Les traitements des cancers.....	6
I-3.1 La chirurgie.....	6
I-3.2 La radiothérapie	6
I-3.3 La chimiothérapie	7
I-3.4 L'hormonothérapie.....	8
I-3.5 Les biothérapies	8
I-3.5.1 L'immunothérapie.....	8
I-3.5.2 La thérapie génique.....	9
I-3.5.3 Les thérapies cellulaires (greffes).....	10
II/ La chimiothérapie anticancéreuse ciblée ou thérapie ciblée	10
II-1 Le cycle cellulaire.....	11
II-1.1 Les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDKs)	11
II-1.2 Les protéines kinases mitotiques (Aurora)	13
II-2 La vascularisation des tumeurs	14
II-2.1 Les inhibiteurs de l'angiogenèse	14
II-2.2 Les agents anti-vasculaires (VDAs)	16
II-3 Les modulateurs épigénétiques.....	17
II-3.1 Les inhibiteurs des DNA méthyltransférases (DNMTs).....	18
II-3.2 Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACs)	19
II-4 Les protéines chaperonnes.....	21
II-5 L'apoptose	22
II-6 Les inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaire autres que la voie Raf/MEK/ERK	23
II-6.1 Les récepteurs tyrosine kinases (RTKs)	25
II-6.1.1 Le récepteur Bcr-Abl.....	25
II-6.1.2 Les récepteurs au facteur de croissance épidermique (HER).....	26
II-6.1.3 Le récepteur c-Met	27
II-6.1.4 Les récepteurs du facteur de croissance de type insuline (IGFRs)	28
II-6.2 Les protéines kinases intracellulaires	29
II-6.2.1 La protéine c-Src.....	29
II-6.2.2 La voie PI3k/Akt/mTor	30
III/ Inhibition de la voie MAPK : Raf/MEK/ERK.....	33
III-1 Rôle de la voie Raf/MEK/ERK dans le cancer	33
III-2 Approches thérapeutiques actuelles pour inhiber la voie Raf/MEK/ERK.....	35
III-2.1 Les inhibiteurs de Ras	35
III-2.2 Les inhibiteurs de MEK	36
III-2.3 Les inhibiteurs de ERK	37
III-2.4 Les inhibiteurs de Raf.....	37
III-2.4.1 Les stratégies indirectes pour inhiber Raf.....	37
III-2.4.2 La stratégie antisens : les oligonucléotides et les ARN interférants.....	38
III-2.4.3 Les inhibiteurs de l'activité kinase Raf.....	40
IV/ Présentation du travail de thèse	43
IV-1 La protéine kinase Raf choisie comme cible thérapeutique anticancéreuse	44
IV-1.1 La famille des protéines Raf kinases et leur rôle dans le cancer.....	44
IV-1.2 La régulation des kinases Raf	46

IV-2 Le projet.....	48
V/ Conception rationnelle d'inhibiteurs de Raf-1	50
V-1 La structure conservée des protéines kinases.....	50
V-2 Les différents types d'inhibiteurs de kinases.....	53
V-3 Les différentes familles chimiques des inhibiteurs de Raf	56
V-3.1 La famille des urées et composés apparentés	56
V-3.2 La famille des imidazoles et molécules apparentées	58
V-3.3 La famille des benzamides	59
V-3.4 La famille des oxindoles.....	60
V-3.5 La famille des pyrazines.....	61
V-3.6 La famille des azaindoles (ou pyrrolopyridines)	62
V-4 Les structures tridimensionnelles de Raf.....	64
V-5 Elaboration de notre pharmacophore.....	70
VI/ Synthèse, réactivité et propriétés biologiques des dérivés du 4-azaindole	72
VI-1 Introduction générale sur les azaindoles.....	72
VI-2 Synthèse du 4-azaindole.....	75
VI-3 Fonctionnalisation du 4-azaindole	82
VI-4 Propriétés biologiques des dérivés 4-azaindoliques.....	86
VII/ Vers les mimes topologiques de l'interaction Raf/PEBP	88
VII-1 La famille des PEBPs.....	88
VII-2 Les rôles biologiques de la protéine PEBP/RKIP	92
VII-2.1. Rôles de PEBP/RKIP en lien avec le cancer	92
VII-2.1.1 PEBP/RKIP modulatrice de certaines voies de signalisation intracellulaire.....	92
VII-2.1.2 PEBP/RKIP suppresseur de métastases	94
VII-2.1.3 PEBP/RKIP agent sensibilisant à l'apoptose	95
VII-3 L'interaction Raf/PEBP	95
VIII/ Tests d'activité kinases.....	97
VIII-1 Choix des méthodes.....	98
VIII-1.1 Détection directe de la phosphorylation du substrat : méthodes radioactives	100
VIII-1.1.1 PFBA (<i>Phosphocellulose Filter Binding Assay</i>).....	101
VIII-1.1.2 SPA (<i>Scintillation Proximity Assay</i>)	101
VIII-1.2 Détection indirecte de la phosphorylation du substrat : méthodes non radioactives	102
Chapitre II : RESULTATS	106
I/ Synthèse des inhibiteurs de Raf-1 à structure 4-azaindolique	105
I-1 Schémas rétrosynthétiques envisagés pour la synthèse des inhibiteurs de Raf	105
I-2 Synthèse du synthon 5-méthoxy-4-azaindole.....	106
I-3 Fonctionnalisation du C-2 du 5-méthoxy-4-azaindole	108
I-3.1 N-protection du 5-méthoxy-4-azaindole	109
I-3.2 Formation des dérivés lithiés en position C-2.....	110
I-3.3 Etude de la réactivité des dérivés lithiés en position C-2 du 4-azaindole	113
I-4 Fonctionnalisation du C-5 à partir du 5-méthoxy-4-azaindole	115
I-4.1 Fonctionnalisation du C-5 via un couplage de Suzuki.....	116
I-4.2 Fonctionnalisation du C-5 via un couplage de Buchwald.....	119
I-5 Synthèse des inhibiteurs disubstitués en N-1 et C-5 du 4-azaindole	124
I-6 Synthèse des inhibiteurs disubstitués en C-2 et C-5 du 4-azaindole	130
I-7 Vers la fonctionnalisation du C-3 du 4-azaindole par une réaction d'échange halogène-métal.....	136
I-7.1 Synthèse du synthon halogéné en position C-3.....	136
I-7.2 Réaction d'échange halogène-métal à partir du composé 89.....	137
I-8 Docking des inhibiteurs synthétisés dans le site actif de Raf.....	139

II/ Evaluation biologique des inhibiteurs synthétisés.....	143
II-1 Mise au point des tests enzymatiques <i>in vitro</i> sur la voie Raf/MEK/ERK.....	143
II-1.1 Optimisation et validation des tests directs sur Raf-1, MEK et ERK.....	145
II-1.1.1 Résultats de l'optimisation et de la validation du test direct sur Raf-1.....	146
II-1.1.2 Résultats de l'optimisation et de la validation du test direct sur MEK-1.....	152
II-1.1.3 Résultats de l'optimisation et de la validation du test direct sur ERK-2.....	156
II-1.2 Optimisation et validation du test sur la double cascade MEK/ERK.....	160
II-1.3 Optimisation et validation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK.....	165
II-1.4 Evaluation de la qualité des tests.....	172
II-1.5 Evaluation des inhibiteurs synthétisés.....	174
II-2 Etude la protéine PEBP/RKIP, inhibiteur naturel de la voie Raf/MEK/ERK	175
II-3 Activité biologique des produits synthétisés.....	178
II-3.1 Activité biologique des produits substitués en position C-5 et N-1 du 4-azaindole	178
II-3.2 Activité biologique des produits substitués en position C-5 et C-2 du 4-azaindole	182
III/ Synthèse de peptides issus de Raf-1 pour l'étude de l'interaction Raf/PEBP.....	186
III-1 Synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc.....	186
XI-2 Stratégies de synthèse pour les peptides multiphosphorylés	191
III-3 Synthèse du 19mères non phosphorylé P1	193
III-4 Synthèse du 19mères diphosphorylé P2	194
III-5 Synthèse du 19mères triphosphorylé P3	196
III-6 Purification des peptides P1, P2, P3	196
III-6.1 Purification du peptide P1	197
III-6.2 Purification du peptide diphosphorylé P2	198
III-6.3 Purification du peptide triphosphorylé P3.....	199
Chapitre III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	204
I/ Synthèses chimiques	203
II/ Tests d'activité enzymatique	206
III/ Caractérisation des inhibiteurs par les tests d'activité enzymatique	211
IV/ Modélisation moléculaire des inhibiteurs synthétiques.....	213
V/ Etude de l'interaction Raf/PEBP	214
VI/ Perspectives	216
Chapitre IV : MATERIELS ET METHODES	220
I/ Synthèse organique des dérivés 4-azaindoliques	220
I-1 Généralités	220
I-2 Modes opératoires et caractérisations structurales.....	221
II/ Mise au point des tests d'activité enzymatique de la voie Raf/MEK/ERK.....	265
II-1 Les enzymes et les réactifs.....	265
II-2 Les tests avec la méthode PFBA.....	265
II-3 Les tests avec la méthode Lance Ultra TM (Perkin Elmer).....	266
II-4 Les tests avec la méthode Lanthascreen TM (Invitrogen)	269
II-5 Analyse des données expérimentales.....	271
III/ Synthèse des peptides issus de Raf-1.....	271
III-1 Méthodes générales.....	271
III-2 Modes opératoires	273

Chapitre I

INTRODUCTION

Chapitre I : INTRODUCTION

I/ Introduction générale sur le cancer

I-1 Le cancer

Le mot cancer, vient d'un mot latin signifiant « crabe » et désigne une maladie caractérisée par une multiplication anarchique de cellules anormales. Elles peuvent être situées dans n'importe quel organe et échappent à tout contrôle.¹ Sous l'influence de facteurs "carcinogènes" ou "cancérogènes" qui peuvent être génétiques, environnementaux (virus, irradiation, substances polluantes, ondes électromagnétiques), relatifs au mode de vie (tabac, alcool, alimentation, exposition au soleil, surpoids...), le génome humain subit des altérations, appelées mutations génétiques, qu'il est normalement en mesure de réparer. Lorsque ce système de réparation est défectueux, la cellule conserve ces mutations et devient anormale. En se multipliant, les cellules cancéreuses donnent naissance à une tumeur de plus en plus grosse qui va se vasculariser en sécrétant des molécules provoquant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). Ceux-ci lui apportent les nutriments et l'oxygène nécessaires à sa croissance. Les cellules cancéreuses envahissent progressivement les tissus voisins, atteignent les ganglions et se propagent par la circulation sanguine et lymphatique. Elles peuvent alors se fixer dans d'autres organes, s'y multiplier et former des métastases. Il existe plus d'une centaine de cancers, définis en fonction de la cellule initiale dont ils sont issus.¹ Selon le tissu envahi, on parle de :

- Carcinome : Il concerne les tissus épithéliaux. Il en existe deux types : les carcinomes épidermoïdes (utérus, œsophage...), et les carcinomes glandulaires ou adénocarcinomes (sein, côlon...). Les carcinomes sont les cancers les plus répandus (environ 80 %).
- Sarcome : Il concerne les tissus conjonctifs par exemple osseux, cartilagineux, musculaires, adipeux, vasculaires... Les sarcomes sont très rares (moins de 1%).
- Lymphome : Il concerne le tissu hématopoïétique (moelle rouge des os où les cellules du sang se forment) et les ganglions lymphatiques (maladie de Hodgkin).
- Leucémie : Il concerne les tissus de la moelle osseuse responsable de la production des globules blancs.
- Mélanome : Il concerne les tissus mélaniques (peau, iris...).

¹ Institut National du Cancer : <http://www.e-cancer.fr/>

On peut aussi classer les cancers selon les organes touchés (sein, foie, côlon, cerveau, poumon, ovaires....).

I-2 Les chiffres du cancer en France

I-2.1 Incidence

L'incidence est un terme utilisé en épidémiologie pour décrire la fréquence d'une maladie dans une population. Selon l'Institut national de veille sanitaire (InVS),² le nombre de nouveaux cas de cancer en 2005 en France a été estimé à près de 320 000 pour les 2 sexes confondus, 180 000 chez les hommes et 140 000 chez les femmes. En 2005, les 3 cancers les plus fréquents chez l'homme sont les cancers de la prostate, du poumon et du côlon-rectum avec respectivement 62 000, 24 000 et 20 000 nouveaux cas en 2005. Chez la femme, les 3 cancers les plus fréquents sont les cancers du sein, du côlon-rectum et du poumon avec respectivement 50 000, 17 500 et 7 000 nouveaux cas. De 1980 à 2005, l'augmentation du risque de cancer (mesuré par le taux d'incidence standardisé par rapport à l'âge) est de +35% chez l'homme et +43% chez la femme.

I-2.2 Mortalité

La mortalité, ou taux de mortalité, est le nombre de décès annuels rapporté au nombre d'habitants d'un territoire donné. Selon l'InVS, en 2004, le cancer a pris la place des maladies cardio-vasculaires au premier rang des causes de mortalité en France.² Alors que l'incidence a considérablement augmenté, le risque de mortalité par cancer a diminué ces 25 dernières années : -25% chez l'homme et -20% chez la femme.

I-2.3 Taux de survie

Selon l'étude publiée en février 2007 par le Réseau français des Registres du Cancer (Francim) et financée par la Ligue Nationale contre le Cancer, aujourd'hui, un plus d'un Français sur deux (52 %) survit à son cancer 5 ans après le diagnostic.³ C'est l'étude la plus exhaustive jamais réalisée à ce jour en France, elle a porté sur plus de 200 000 patients âgés de plus de 15 ans, a recensé tous les cas de cancers dans 14 départements, entre 1989 et 1997

² Institut de veille sanitaire : <http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers/>

³ La Ligue contre le Cancer : <http://www.ligue-cancer.net/>

avec une mise à jour du statut vital au 1^{er} janvier 2002. Les chiffres obtenus placent la France en bonne position par rapport à d'autres pays européens, mais ce taux global de guérison à 5 ans cache des disparités selon les pathologies, le sexe et l'âge des patients.

I-3 Les traitements des cancers

Après l'établissement du diagnostic, l'oncologue propose au patient un traitement personnalisé qui fait appel à une ou plusieurs techniques.^{3,4} Les premiers traitements de cancers sont la chirurgie et la radiothérapie qui guérissent la plupart des cancers localisés. Viennent ensuite la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les biothérapies (thérapie génique, immunothérapie, greffes) qui ont une action plutôt générale et s'adressent aux cancers généralisés.

I-3.1 La chirurgie

La chirurgie permet de retirer la tumeur, par conséquent elle diminue les symptômes, réduit les risques de propagation du cancer et accroît souvent l'efficacité des autres formes de traitement. Elle contribue à guérir une proportion importante de cancers solides très localisés et accessibles. D'importants progrès ont été réalisés dans les techniques chirurgicales pour les rendre moins invasives. La chirurgie mammaire en est un exemple et, aujourd'hui, la chirurgie conservatrice (seule la tumeur est enlevée avec une marge de sécurité) associée à une radiothérapie postopératoire peut être proposée à beaucoup de femmes avec des résultats équivalents à l'ablation de la totalité du sein (mastectomie).

I-3.2 La radiothérapie

C'est un traitement qui consiste à exposer les malades à des rayonnements de haute énergie (rayons X, électrons, photons) destinés à détruire les cellules cancéreuses. Ils sont très efficaces pour détruire les cellules cancéreuses mais doivent être ciblés sur celles-ci avec beaucoup de précision pour éviter d'endommager les tissus normaux. C'est pourquoi ils ne peuvent pas être utilisés dans tous les cancers. La radiothérapie peut précéder la chirurgie pour réduire préalablement la tumeur et la rendre plus aisément opérable, ou la suivre pour compléter l'intervention en détruisant les cellules qui auraient échappé à la chirurgie. La

⁴ Association pour la Recherche sur le Cancer : <http://www.arc-asso.fr/Les-traitements/article/Les-traitements.html>.

radiothérapie peut aussi être combinée à la chimiothérapie. Dans la majorité des cas, la radiothérapie est réalisée « en ambulatoire » : le patient rentre chez lui après sa séance. Les techniques de radiothérapie modernes, de plus en plus précises, réduisent au maximum les effets secondaires. Il s'agit essentiellement d'irritations de la peau et de fatigue. La tomothérapie, l'une des dernières évolutions techniques de la radiothérapie, permet de cibler la tumeur avec une grande précision. Cela est particulièrement nécessaire pour les tumeurs de forme complexe ou situées au voisinage immédiat d'organes extrêmement radiosensibles.

I-3.3 La chimiothérapie

Jusqu'à la première moitié du 20^{ème} siècle, seulement deux armes permettaient de lutter contre le cancer : la chirurgie et la radiothérapie. La première ère de l'histoire de la chimiothérapie commence dans les années 40 avec la découverte de l'effet leucopéniant (diminution du nombre de leucocytes) du gaz moutarde, s'en suit l'ère des thérapies ciblées à partir des années 90.^{5,6} La chimiothérapie est utilisée en premier lieu lorsque le cancer n'est pas localisé : cancer du sang ou métastases. Les médicaments peuvent être prescrits seuls, combinés ou en association avec une chirurgie ou une radiothérapie. La chimiothérapie est généralement administrée en intraveineuse ou par voie orale (plus pratique pour le patient). La classification des médicaments anticancéreux se fait suivant leur mécanisme d'action et leur appartenance à des familles chimiques. Ils peuvent détruire les cellules cancéreuses, stopper ou freiner leur croissance, ou encore aider l'organisme à s'en débarrasser plus efficacement. Parmi les traitements utilisés en chimiothérapie, on distingue : les traitements cytotoxiques et les thérapies ciblées.

- **Les traitements cytotoxiques** ont été les premiers découverts et sont encore « classiquement » utilisés en clinique. Par définition, les médicaments cytotoxiques sont utilisés en chimiothérapie pour tuer les cellules cancéreuses.⁷ Malheureusement ils ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et agissent sur toutes les cellules en division ce qui explique les effets secondaires. Parmi les effets secondaires les plus fréquents, on distingue des modifications de la formule sanguine (diminution de certains globules blancs, des globules rouges et des plaquettes), des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée, constipation), chute des cheveux, fatigue.

⁵ Chabner B.A., Roberts T.G.: Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 65-72.

⁶ Neidle S., Thurston D.E.: Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 285-96.

Les agents cytotoxiques sont classés en fonction de leur mécanisme d'action. On distingue cinq familles : les agents alkylants, les agents intercalants, les inhibiteurs de topoisomérases, les antimétabolites et les antimitotiques ou poisons du fuseau.

- **Les thérapies ciblées**, plus récentes sont dirigées contre des cibles thérapeutiques (enzymes, récepteurs, protéines) spécifiquement impliquées dans l'oncogenèse.

Le travail de cette thèse participant à la recherche de nouveaux médicaments ciblés, nous avons choisi de détailler dans le chapitre suivant ces nouvelles thérapies en décrivant les principales cibles thérapeutiques contre le cancer en cours d'investigation ou validées par le développement d'un médicament.

I-3.4 L'hormonothérapie

Les traitements hormonaux sont des traitements qui agissent en modifiant la sécrétion d'hormones ou en bloquant l'action de ces hormones, entravant ainsi la prolifération des cellules tumorales sensibles à ces mêmes hormones. C'est le cas par exemple de certains cancers du sein ou de la prostate, dont la croissance est favorisée par des hormones pour lesquelles ils ont des récepteurs spécifiques. Le principe de l'hormonothérapie est de bloquer les récepteurs hormonaux en utilisant des antagonistes des hormones. Par exemple, différents produits sont actuellement utilisés en tant qu'anti-estrogènes, notamment le tamoxifène pour traiter le cancer du sein. Dans le cancer de la prostate : on inhibe l'action de la testostérone par des anti-androgènes. L'hormonothérapie est le plus souvent associée à d'autres traitements, notamment la chirurgie et la radiothérapie.

I-3.5 Les biothérapies

La biothérapie est une méthode thérapeutique fondée sur l'emploi d'organismes vivants ou de substances prélevées sur des organismes vivants (enzymes, protéines, anticorps, gènes) par opposition à chimiothérapie, où l'on utilise des substances de synthèse. Les biothérapies recouvrent principalement les thérapies géniques (transfert de gènes, intervention sur les gènes), les thérapies cellulaires (greffes) et les différents types d'immunothérapies.

I-3.5.1 L'immunothérapie

Cette méthode consiste à détruire les cellules cancéreuses par des réactions immunitaires. Mais la grande difficulté de l'immunothérapie réside dans le fait que les cellules

tumorales sont peu antigéniques. On distingue deux types d'immunothérapie : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active.

L'immunothérapie passive constitue un volet important de ce qu'on appelle maintenant les thérapies ciblées. L'immunothérapie passive consiste en effet à administrer au malade des anticorps artificiels (dits « monoclonaux ») produits en laboratoire. Ils sont destinés à viser une cible moléculaire précise présente de façon plus ou moins spécifique à la surface des cellules cancéreuses. On utilise aussi des anticorps contre des facteurs nécessaires à la multiplication des cellules malignes dont on bloque ainsi la prolifération. Leur nombre et leur variété augmentent très rapidement et ils sont de plus en plus utilisés en complément de la chimiothérapie classique. Ainsi, le trastuzumab ou Herceptin[®] s'adresse aux femmes ayant un cancer du sein résistant au traitement habituel en raison de la présence en surabondance du récepteur HER-2.

L'immunothérapie active consiste à améliorer le fonctionnement du système immunitaire afin qu'il puisse se défendre et détruire les cellules cancéreuses. L'immunothérapie active se pratique selon deux modalités : l'immunothérapie non spécifique et l'immunothérapie spécifique.

- L'immunothérapie non spécifique vise à stimuler l'activité globale du système immunitaire, sans cibler la tumeur. On utilise pour cela des cytokines (par exemple l'interféron alpha, l'interleukine 2) pour stimuler la prolifération des cellules immunitaires. En cancérologie, l'interféron est utilisé dans le traitement des cancers du rein, des leucémies, des lymphomes, myélomes ou mélanomes. L'interleukine 2 est essentiellement indiquée dans deux cancers chimiorésistants : le cancer du rein métastatique, et le mélanome métastatique.

- L'immunothérapie spécifique nommée aussi vaccination thérapeutique ou thérapie génique est décrite ci-dessous.

I-3.5.2 La thérapie génique

Le principe de la thérapie génique est d' "injecter" dans une cellule un gène, soit pour remplacer un gène déficient, soit pour faire fabriquer une substance destinée à détruire les cellules tumorales, comme l'interleukine. Cette thérapeutique est encore expérimentale, elle n'est prescrite que dans le cadre d'essais cliniques. Plusieurs techniques sont en cours d'étude. Par exemple, la stimulation du système immunitaire par injection dans les lymphocytes d'un gène exprimant l'interleukine 2 dans le but de détruire les cellules cancéreuses ; la technique du gène "suicide" : les cellules tumorales sont transfectées par un gène codant pour une partie

du virus de l'herpès afin de rendre sensibles les cellules à un médicament antiviral, le Gancyclovir.

I-3.5.3 Les thérapies cellulaires (greffes)

La thérapie cellulaire consiste en une greffe de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques (CSP) dans le but de renforcer la régénération des cellules sanguines pour permettre de circonscrire une aplasie sanguine (absence ou taux très bas des globules sanguins, blancs, rouges et plaquettes) due à une chimiothérapie à forte dose, associée ou non à une irradiation de tout le corps. Les greffes sont essentiellement pratiquées dans les cas de leucémies, lymphomes en rechute et certains myélomes. Plus récemment, elles ont été proposées contre certaines tumeurs solides chimiosensibles de mauvais pronostic, tels certains cancers du poumon, du testicule, de l'ovaire ou du sein. La greffe de moelle osseuse est soit autologue (la moelle est prélevée chez le propre patient), soit allogénique (la moelle est prélevée chez un donneur pour être réinjectée à un receveur). Dans le cas d'une allogreffe, le donneur et le receveur doivent être compatibles : ils doivent partager les mêmes antigènes du système de compatibilité tissulaire ou système HLA. Les autogreffes de CSP consistent à greffer au patient ses propres cellules jeunes circulant dans son sang lorsqu'il sera en aplasie provoquée par la chimiothérapie. C'est une thérapie récente, plus simple que la greffe de moelle. La greffe de sang de cordon ombilical (particulièrement riche en cellules jeunes hématopoïétiques) est indiquée chez les enfants atteints de leucémies ou d'autres cancers hématologiques. Par ailleurs, les cellules jeunes immatures sont encore très peu antigéniques et de ce fait, la greffe est mieux supportée avec un minimum de risques de rejet ou encore de transmission de virus.

II/ La chimiothérapie anticancéreuse ciblée ou thérapie ciblée

La thérapie ciblée est par définition plus spécifique des cellules tumorales.^{7,8} En pratique, elle est souvent associée à la chimiothérapie cytotoxique. Elle a permis d'augmenter l'efficacité des traitements sans en majorer la toxicité de façon trop importante. A la fin des années 80, les progrès en biologie moléculaire et en génétique ont permis d'obtenir de nouvelles données sur les mécanismes de l'oncogenèse. Ces progrès ont montré que la

⁷ Ma W.W., Adjei A.A.: Novel agents on the horizon for cancer therapy. *C.A. Cancer J. Clin.*, **2009**, 59, 111-37.

⁸ Rosa D.D., Ismael G., Lago L.D., Awada A.: Molecular-targeted therapies: lessons from years of clinical development. *Cancer Treat. Rev.*, **2008**, 34, 61-8.

prolifération des cellules cancéreuses, l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la formation des métastases sont des processus régulés par un réseau complexe de signaux cellulaires impliquant un grand nombre de protéines. La recherche a pu mettre en évidence que de nombreux oncogènes codent pour des protéines kinases. Au début des années 90 commence alors l'ère de la thérapie ciblée avec l'explosion du nombre de cibles thérapeutiques découvertes. En 2001, les études de Brian Druker aboutissent à la mise sur le marché du Glivec® (imatinib mésylate) pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (**Figure 1**).

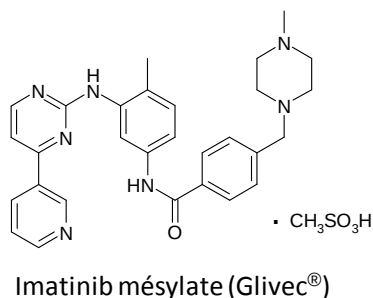


Figure 1 : Structure du Glivec® (Imatinib mésylate)

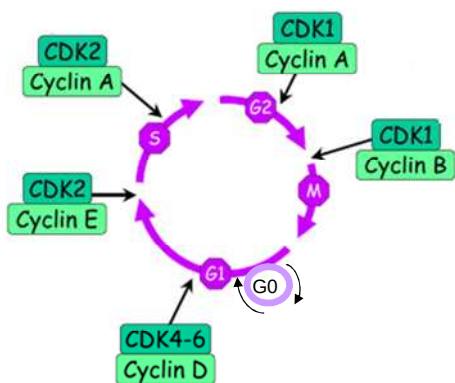
C'est le premier médicament dirigé contre une protéine kinase spécifique des cellules tumorales. Il marque le début de la thérapie ciblée dans les traitements antinéoplasiques. En 2004, la FDA approuve le premier anticorps monoclonal Avastin® (bevacizumab) utilisé en thérapie ciblée pour le traitement du cancer du côlon. D'autres médicaments de type anticorps monoclonaux ou petites molécules inhibitrices de protéines kinases, sont utilisés actuellement en clinique avec succès. Pour éclaircir ce réseau complexe d'interactions cellulaires, la suite de ce chapitre décrit les principales cibles thérapeutiques anticancéreuses actuellement en cours d'investigation ou validées par le développement d'un médicament.

II-1 Le cycle cellulaire

II-1.1 Les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDKs)

Les mécanismes de la régulation du cycle cellulaire reposent essentiellement sur deux structures protéiques complémentaires : les protéines appelées CDK pour cycline-dependent kinase et les cyclines (**Figure 2**).⁹

⁹ Meyerson M., Enders G.H., Wu C.L., Su L.K., Gorka C., Nelson C., Harlow E., Tsai L.H.: A family of human cdc2-related protein kinases. *Embo J.*, **1992**, 11, 2909–17.



G1 : croissance, préparation à la réplication

S : réplication de l'ADN

G2 : croissance, préparation à la mitose

M : mitose (division cellulaire)

G0 : cellule au repos, hors du cycle cellulaire

Figure 2 : Régulation du cycle cellulaire par les cycline-dependent kinases (CDKs)

La CDK2 régule le passage de la phase **G1** à la phase **S**, CDK4 et CDK6 régulent le passage de la phase **G0** à la phase **G1**. La CDK1 régule le passage des cellules en mitose (phase **M**). CDK7, CDK8 et CDK9 sont impliquées dans la régulation de la transcription. Une dizaine de cyclines participent à la régulation du cycle, elles appartiennent à 4 classes : les cyclines A, B, D et E. Dans les cancers, plusieurs événements génétiques et épigénétiques sont à l'origine d'une surexpression, de l'absence des cyclines ou d'une diminution du niveau d'expression des inhibiteurs de CDKs.¹⁰ Plusieurs travaux ont montré que l'expression d'inhibiteurs de CDKs entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules.¹¹ C'est à partir de ces observations que le développement pharmacologique des inhibiteurs de CDKs a commencé, dans le but de favoriser l'apoptose des cellules tumorales.¹² Les inhibiteurs de CDKs de première génération sont des inhibiteurs ATP compétitifs. Parmi eux, le flavopiridol et la (R)-roscovitine (CYC-202) sont en phases II et III pour un grand nombre de cancers (**Figure 3**).

¹⁰ Sherr C.J.: Cancer and cell cycles. *Science*, **1996**, 274, 1672–7.

¹¹ Shapiro G.I., Harper J.W.: Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J. Clin. Invest.*, **1999**, 104, 1645–53.

¹² Orzáez M., Gortat A., Mondragón L., Bachs O., Pérez-Payá E.: ATP-noncompetitive inhibitors of CDK-cyclin complexes. *ChemMedChem*, **2009**, 4, 19–24.

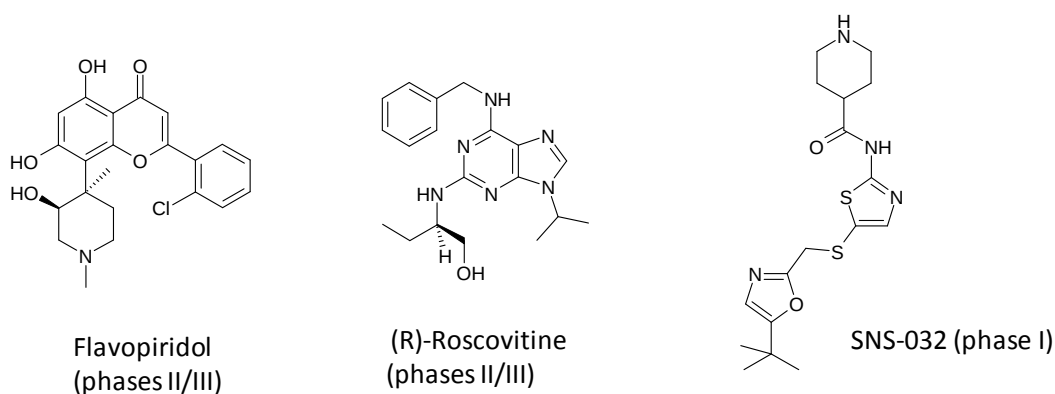


Figure 3 : Exemples d'inhibiteurs de CDKs

Du fait de certains résultats décevants obtenus en phase II, une seconde génération d'inhibiteurs ont été développés.¹³ Ils sont actuellement en phase I et II. Parmi eux se trouve SNS-032 (**Figure 3**) et AT-7519. D'autres inhibiteurs de type peptidique non ATP compétitifs et plus spécifiques vis-à-vis des CDKs sont actuellement en phase préclinique (CIP, NBI1).¹²

II-1.2 Les protéines kinases mitotiques (Aurora)

Chaque cellule fille doit hériter en sortie de mitose d'un seul centrosome et d'un génome parfaitement diploïde. Une mitose anormale produit des cellules aneuploïdes contenant un nombre anormal de centrosomes, deux caractères qui sont devenus des signatures de cellules tumorales.¹⁴ La famille Aurora, qui compte trois sérine/thréonine kinases (A, B et C) chez l'homme, est impliquée dans la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse.¹⁵ Ces trois protéines sont surexprimées dans un grand nombre de tumeurs caractérisées par une aneuploïdie et une amplification des centrosomes. Parmi ces trois kinases, seule Aurora-A possède un réel potentiel oncogénique en particulier dans les cancers du sein¹⁶ et les cancers colorectaux.¹⁷ Plusieurs inhibiteurs sont actuellement évalués en

¹³ Malumbres M., Pevarello P., Barbacid M., Bischoff J.R.: CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol. Sci.*, **2008**, 29, 16–21.

¹⁴ Descamps S., Prigent C.: Aurora-A, -B et -C : à l'aube d'une nouvelle connexion entre l'amplification des centrosomes, l'aneuploïdie et le cancer ? *Médecine/sciences*, **2002**, 18, 474–80.

¹⁵ Carvajal R.D., Tse A., Schwartz G.K.: Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 6869–75.

¹⁶ Zhou H., Kuang J., Zhong L., Kuo W.L., Gray J.W., Sahin A., Brinkley B.R., Sen S.: Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.*, **1998**, 20, 189–93.

¹⁷ Bischoff J.R., Anderson L., Zhu Y., Mossie K., Ng L., Souza B., Schryver B., Flanagan P., Clairvoyant F., Ginther C., Chan C.S., Novotny M., Slamon D.J., Plowman G.D.: A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.*, **1998**, 17, 3052–65.

phases cliniques (**Figure 4**). Parmi eux, AZD-1152 est un inhibiteur sélectif d'Aurora-B,¹⁸ il est en phase II pour le traitement des leucémies. MK-0457 (VX-680) est un inhibiteur ATP compétitif ciblant les 3 isoformes d'Aurora, il est actuellement en phase I.¹⁹

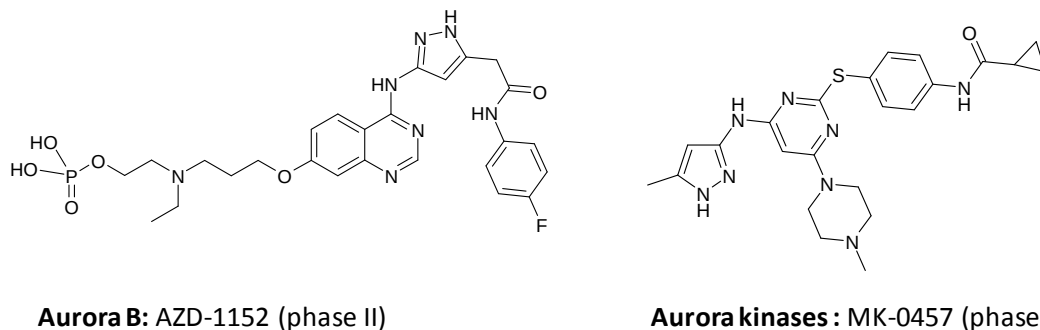


Figure 4 : Exemples d'inhibiteurs d'Aurora en phase clinique

II-2 La vascularisation des tumeurs

Les inhibiteurs de la vascularisation des tumeurs sont classés selon leur mécanisme d'action en deux catégories : les inhibiteurs de l'angiogenèse d'une part et les agents anti-vasculaires d'autre part.

II-2.1 Les inhibiteurs de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. L'hypothèse de l'angiogenèse dans le processus cancéreux a été décrite pour la première fois en 1971 par le biologiste Dr Judah Folkman.²⁰ Il observa que les cellules tumorales ont besoin pour grossir au-delà de 2 mm³ de détourner ou de fabriquer de nouveaux vaisseaux. Il formula le concept alors novateur des médicaments anti-angiogéniques. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le récepteur (VEGFR) sont aujourd'hui des cibles thérapeutiques de choix contre le cancer.²¹ Beaucoup d'inhibiteurs ont été développés : des anticorps monoclonaux dirigés

¹⁸ Wilkinson R.W., Odedra R., Heaton S.P., Wedge S.R., Keen N.J., Crafter C., Foster J.R., Brady M.C., Bigley A., Brown E., Byth K.F., Barrass N.C., Mundt K.E., Foote K.M., Heron N.M., Jung F.H., Mortlock A.A., Boyle F.T., Green S.: AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, **2007**, 13, 3682–88.

¹⁹ Tyler R.K., Shpiro N., Marquez R., Evers P.A.: VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. *Cell Cycle*, **2007**, 6, 2846–54.

²⁰ Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N. Engl. J. Med.*, **1971**, 285, 1182-86.

²¹ Soltan J., Dreys J.: Mode of action and clinical impact of VEGF signaling inhibitors. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2009**, 9, 649-62.

contre le domaine extracellulaire du VEGFR d'une part et des petites molécules inhibitrices de protéines kinases d'autre part. Parmi les anticorps, le bevacizumab²² (Avastin®) a été approuvé par la FDA pour traiter les cancers du sein, du côlon-rectum, du poumon. D'autres anticorps sont en cours d'évaluation (Aflibercept, IMC-1C11). Parmi les molécules approuvées, le Sorafenib²³ (Nexavar®) et le Sunitinib²⁴ (Sutent®) sont des inhibiteurs multi kinases (VEGFRs, PDGFR, c-kit, Raf). Le Sorafenib est indiqué dans le traitement du cancer du rein avancé, et le carcinome hépatocellulaire, le Sunitinib est indiqué pour traiter les tumeurs stromales gastro-intestinales et le cancer du rein. D'autres molécules sont actuellement en phase II : Vatalanib, AMG-706, Pazopanib. La **Figure 5** illustre quelques exemples d'inhibiteurs du VEGFR.

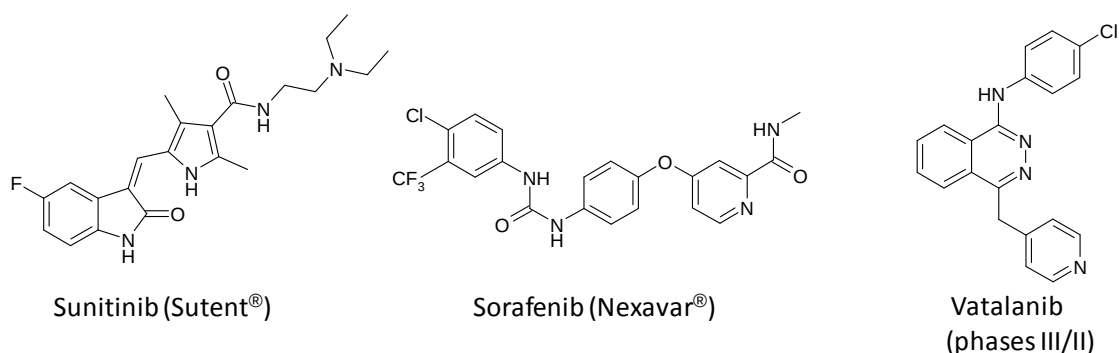


Figure 5 : Exemples de molécules inhibitrices du VEGFR

Une nouvelle stratégie pour inhiber l'angiogenèse et la formation de métastases est actuellement en cours d'évaluation clinique.²⁵ Elle consiste à bloquer l'interaction entre les intégrines et les ligands de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine). Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire, elles sont constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Ce ne sont pas des récepteurs tyrosine kinase mais ces récepteurs sont capables de transmettre des signaux intracellulaires régulant la prolifération, la survie, la migration et l'angiogenèse. Plusieurs antagonistes des intégrines proangiogéniques et

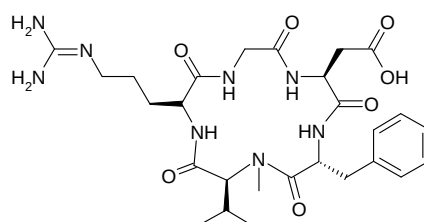
²² Ranieri G., Patruno R., Ruggieri E., Montemurro S., Valerio P., Ribatti D.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Curr. Med. Chem.*, **2006**, 13, 1845–57.

²³ Wilhelm S.M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L.E., Bollag G., Trail P.A.: BAY43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7099–7109.

²⁴ Osusky K.L., Hallahan D.E., Fu A., Ye F., Shyr Y., Geng L.: The receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248 impedes endothelial cell migration, tubule formation, and blood vessel formation in vivo, but has little effect on existing tumor vessels. *Angiogenesis*, **2004**, 7, 225–33.

²⁵ Jin H., Varner J.: Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer*, **2004**, 90, 561–65.

prométastatiques : $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \nu\beta 5$ sont en cours d'évaluation. Il s'agit soit d'anticorps monoclonaux, soit de petites molécules inhibitrices. Parmi les anticorps, le Volociximab²⁶ qui est dirigé contre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est en phase II pour traiter les cancers du pancréas, du poumon non à petites cellules et les mélanomes. Parmi les molécules en cours d'évaluation, la plus avancée est le peptide Cilengitide (EMD-121974) inhibiteur des intégrines $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \nu\beta 5$ (**Figure 6**).²⁷ Il est en phase II pour le traitement de plusieurs cancers (cerveau, tête et cou, leucémies, mélanomes, prostate).



Intégrines $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \nu\beta 5$:
Cilengitide (phase II)

Figure 6 : Structure de l'inhibiteur d'intégrines : Cilengitide

II-2.2 Les agents anti-vasculaires (VDAs)

Les agents anti-vasculaires (VDA) ciblent les cellules endothéliales en provoquant l'effondrement rapide et sélectif des vaisseaux tumoraux. Contrairement aux agents antiangiogéniques qui agissent sur les vaisseaux naissants, les agents anti-vasculaires ciblent les vaisseaux tumoraux déjà établis. La plupart des VDAs agissent en perturbant le cytosquelette et les jonctions intercellulaires conduisant à la nécrose des cellules tumorales.²⁸ Ils sont divisés en 2 classes : les agents déstabilisants de la tubuline et les flavonoïdes (**Figure 7**).

Les agents déstabilisant de la tubuline : ce sont des analogues de la colchicine : les combretastatines. Ces molécules interagissent avec la tubuline, induisant une dépolymérisation des microtubules ce qui déstabilise le cytosquelette des cellules

²⁶ Ramakrishnan V., Bhaskar V., Law D.A., Wong M.H., DuBridge R.B., Breinberg D., O'Hara C., Powers D.B., Liu G., Grove J., Hevezi P., Cass K.M., Watson S., Evangelista F., Powers R.A., Finck B., Wills M., Caras I., Fang Y., McDonald D., Johnson D., Murray R., Jeffry U.: Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J. Exp. Ther. Oncol.*, **2006**, 5, 273–86.

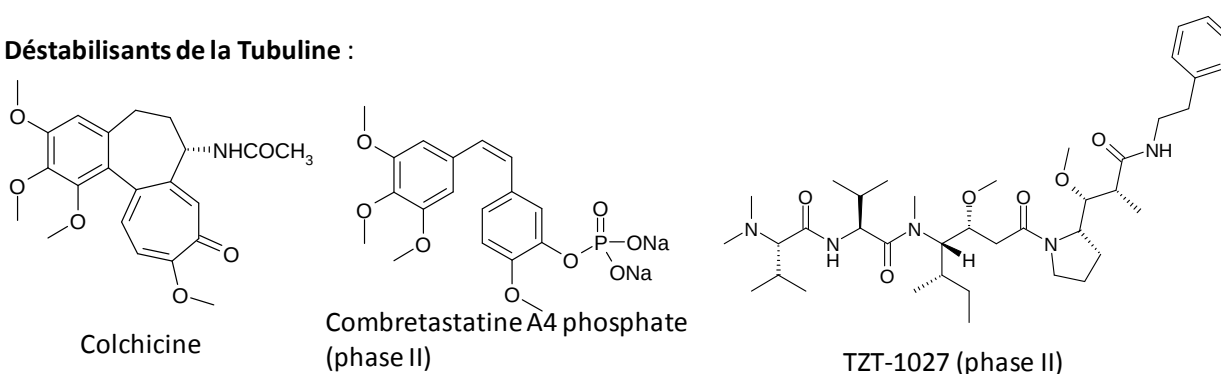
²⁷ Hariharan S., Gustafson D., Holden S., McConkey D., Davis D., Morrow M., Basche M., Gore L., Zang C., O'Bryant C.L., Baron A., Galleman D., Colevas D., Eckhardt S.G.: Assessment of the biological and pharmacological effects of the $\alpha \nu\beta 3$ and $\alpha \nu\beta 5$ integrin receptor antagonist, cilengitide (EMD 121974), in patients with advanced solid tumors. *Ann. Oncol.*, **2007**, 18, 1400–07.

²⁸ Hinnen P., Eskens F.A.: Vascular disrupting agents in clinical development. *Br. J. Cancer*, **2007**, 96, 1159–65.

endothéliales. La combretastatine A4 phosphate²⁹ (CA4P) est le composé leader de cette classe, il est actuellement en phase II pour le traitement des cancers de la thyroïde et du poumon non à petites cellules. D'autres dérivés de la famille des combretastatines sont en cours d'évaluation clinique. Un autre dérivé de cette classe le TZT-1027,³⁰ est un analogue synthétique de la dolastatine-10 isolée du mollusque *Dolabella auricularia*, il est aussi en phase II pour les cancers du poumon non à petites cellules et les sarcomes.

Les flavonoïdes : Le dérivé le plus étudié est l'acide 5,6-diméthylxanthénone-4-acétique (DMXAA),³¹ il est actuellement en phase III pour traiter le cancer du poumon non à petites cellules.

Déstabilisants de la Tubuline :



Flavonoïdes :

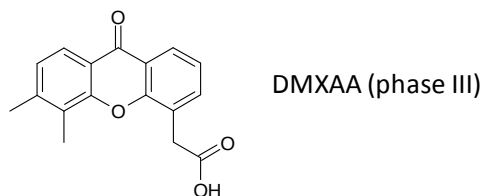


Figure 7 : Exemples d'agents anti-vasculaires (VDA)

II-3 Les modulateurs épigénétiques

Hormis des mutations directes de l'ADN des oncogènes, l'expansion d'une cellule cancéreuse est fréquemment associée à des modifications épigénétiques c'est-à-dire non

²⁹ Tozer G.M., Prise V.E., Wilson J., Locke R.J., Vojnovic B., Stratford M.R., Dennis M.F., Chaplin D.J.: Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res.*, **1999**, 59, 1626–34.

³⁰ de Jonge M.J., van der Gaast A., Planting A.S., van Doorn L., Lems A., Boot I., Wanders J., Satomi M., Verweij J.: Phase I and pharmacokinetic study of the dolastatin 10 analogue TZT-1027, given on days 1 and 8 of a 3-week cycle in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 3806–13.

³¹ Rustin G.J., Bradley C., Galbraith S., Stratford M., Loadman P., Waller S., Bellenger K., Gumbrell L., Folkes L., Halbert G.: 5,6-dimethylxanthénone-4-acetic acid (DMXAA), a novel antivascular agent: phase I clinical and pharmacokinetic study. *Br. J. Cancer*, **2003**, 88, 1160–67.

directement codées par la séquence de l'ADN. Ces modifications peuvent se produire spontanément, en réponse à l'environnement. Parmi ces modifications épigénétiques, l'acétylation des histones (protéines liées à l'ADN) et la méthylation de l'ADN semblent jouer un rôle important.³² Les modifications épigénétiques constituent un programme qui déciderait quels gènes activer ou inhiber. L'extinction de gènes suppresseurs de tumeur ou l'activation d'oncogènes sont impliquées dans la dérégulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose.³³ Dans ce contexte, une stratégie thérapeutique actuellement très prometteuse consiste à corriger les erreurs épigénétiques à l'aide de composés modulant l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux.³⁴

II-3.1 Les inhibiteurs des DNA méthyltransférases (DNMTs)

La méthylation de l'ADN se produit principalement dans des régions appelées îlots CpG riches en dinucléotides CG. Les DNA méthyltransférases (DNMTs) catalysent l'addition d'un groupement méthyle provenant du donneur S-adenosylméthionine sur le carbone 5 d'une cytosine, ce qui conduit à la répression de l'expression du gène en aval. Les inhibiteurs de DNMTs sont classés en deux groupes : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques (**Figure 8**).

Les inhibiteurs nucléosidiques : ils fonctionnent comme des analogues de nucléosides et peuvent donc s'insérer dans l'ADN en lieu et place de la cytosine mais ne peuvent pas être méthylés. Parmi les inhibiteurs nucléosidiques les plus étudiés : la 5-azacytidine (Vidaza®) a été approuvée par la FDA pour le traitement des syndromes myélodysplasiques en 2004. Cependant, du fait de sa forte toxicité, et sa faible stabilité métabolique d'autres analogues de la cytidine ont été développés tels que la Zébularine.³⁵

Les inhibiteurs non nucléosidiques : Ce groupe comprend la procaine, l'(-)-épigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) et le RG108. Ces molécules inhibent les DNMTs soit en bloquant le site actif de l'enzyme (EGCG et RG108) soit en se fixant sur les îlots CpG de

³² Vandermeers F., Kettmann R., Willems L. : Implication des modifications épigénétiques dans les cancers : développement de nouvelles approches thérapeutiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2008**, 12, 211–18. <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=2464>.

³³ Mack G.S.: Epigenetic cancer therapy makes headway. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2006**, 98, 1443–1444.

³⁴ Zheng Y.G., Wu J., Chen Z., Goodman M.: Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med. Res. Rev.*, **2008**, 28, 645–87.

³⁵ Marquez V.E., Kelley J.A., Agbaria R., Ben-Kasus T., Cheng J.C., Yoo C.B., Jones P.A.: Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **2005**, 1058, 246–54.

l'ADN empêchant ainsi la liaison des DNMTs à l'ADN (procaïne). Ces inhibiteurs sont moins toxiques que les inhibiteurs nucléosidiques.³⁶

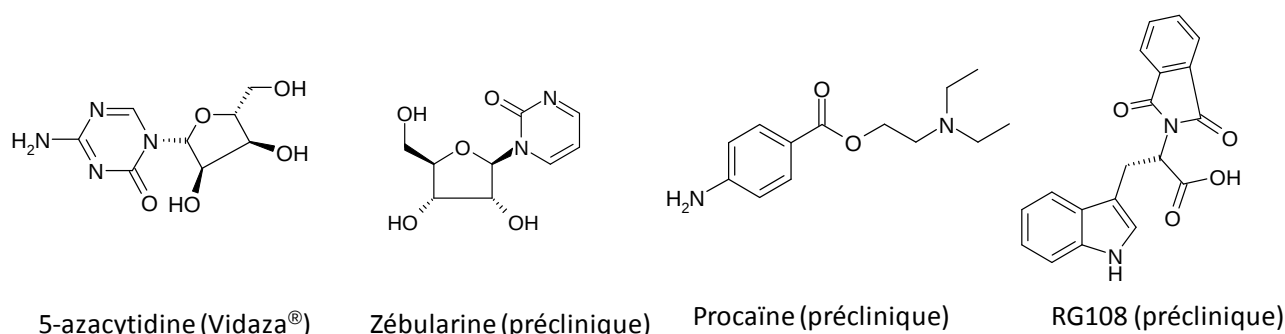


Figure 8 : Exemples d'inhibiteurs nucléosidiques et non-nucléosidiques des DNA méthyltransférases (DNMTs)

II-3.2 Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACs)

L'acétylation est le transfert d'un groupement acétyle provenant de l'acétyl-coenzyme A sur le groupement ϵ -amino de certains résidus lysine. Deux familles d'enzymes influencent les niveaux d'acétylation des lysines des histones : les histones acétyltransférases (HATs) et les histones désacétylases (HDACs). L'acétylation entraîne la neutralisation de la charge positive du groupement NH_3^+ de la lysine menant à la diminution des contacts avec l'ADN nucléosomique qui possède une charge négative à cause des groupements PO_4^{3-} . Ces modifications produisent une chromatine plus flexible, où l'ADN est plus accessible aux facteurs de transcription. Le rôle répresseur transcriptionnel des HDACs peut être supprimé par les inhibiteurs des histones désacétylases. Ces molécules constituent actuellement un grand espoir de remèdes contre certains cancers, de nombreuses molécules sont en cours d'évaluation clinique. En ciblant les HDACs, ces inhibiteurs provoquent l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses, l'induction de leur différenciation et/ou leur mise en apoptose.³⁷ Les inhibiteurs de HDACs possèdent le même mécanisme d'action : ils se lient dans le site catalytique contenant un atome de zinc conservé chez les HDACs. Ils sont classés en trois catégories en fonction de leur structure : les hydromates, les benzamides, les tetrapeptides cycliques et les acides aliphatiques. Les principaux exemples sont représentés dans la **Figure 9**.

³⁶ Hellebrekers D.M., Griffioen A.W., van Engeland M.: Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2007**, 1775, 76–91.

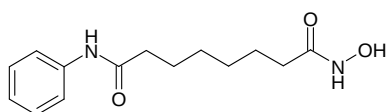
³⁷ Kelly W.K., O'Connor O.A., Marks P.A.: Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2002**, 11, 1695–1713.

Les hydroxamates : Le Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid : SAHA) est le premier composé de cette classe qui fut approuvé par la FDA pour le traitement du lymphome cutané à cellules T (CTCL).³⁶ Il est actuellement en cours d'évaluation pour d'autres types de cancers. D'autres inhibiteurs de cette classe sont en phase clinique tels que Belinostat (PXD101), Panobinostat (LBH589), ITF-2357, Pyroxamide...

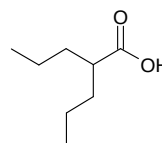
Les benzamides : La molécule la plus étudiée de cette classe est le MS-275 (SNDX-275), elle est actuellement en phase II pour plusieurs types de cancers.³⁸

Les tétrapeptides cycliques : Ils constituent la classe la plus complexe au niveau structural. On y retrouve notamment le depsipeptide³⁹ (Romidepsine ou FR-901228), la trapoxine et l'apidicine. Le plus avancé cliniquement est le depsipeptide qui est en phase II pour de nombreux types de cancers.

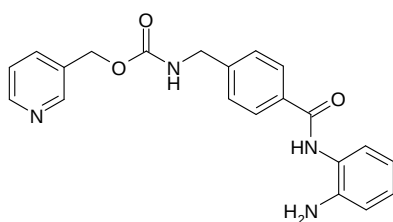
Les acides aliphatiques : Il s'agit d'une classe comprenant des petits acides gras. Les principaux inhibiteurs de cette classe sont le valproate et le phénylbutyrate. Ils sont actuellement en phase II pour plusieurs types de cancers tels que les cancers du cerveau, du sein, colorectal, les leucémies.



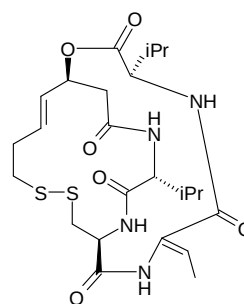
Hydroxamate : Vorinostat (phases II/III)



Acide aliphatique: Acide Valproïque (phase II)



Benzamide : MS-275 (phase II)



Tétrapeptide cyclique: FR-901228 (phase II)

Figure 9 : Exemples d'inhibiteurs des histones désacétylases (HDACs)

³⁸ Hess-Stumpp H., Bracker T.U., Henderson D., Politz O.: MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases—the development of an anticancer agent. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2007**, 39, 1388–1405.

³⁹ Radhakrishnan V., Song Y.S., Thiruvengadam D.: Romidepsin (depsipeptide) induced cell cycle arrest, apoptosis and histone hyperacetylation in lung carcinoma cells (A549) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. *Biomed. Pharmacother.*, **2008**, 62, 85–93.

II-4 Les protéines chaperonnes

Les protéines chaperonnes permettent le bon repliement tridimensionnel de leurs protéines cibles. Leur rôle physiologique est de protéger les protéines de la dégradation et du stress environnemental (chaleur, hypoxie, radiation). La protéine chaperonne HSP90 est actuellement la plus étudiée en cancérothérapie.⁴⁰ En effet, plusieurs arguments expliquent cet engouement. Tout d'abord des travaux ont montré qu'un niveau élevé de HSP90 permettait l'accumulation de protéines mutées pouvant être à l'origine de cancer.⁴¹ L'inhibition de HSP90 minimiserait la toxicité vis-à-vis des cellules normales car elles expriment moins d'HSP90 que les cellules cancéreuses. De plus, plusieurs protéines oncogéniques responsables de la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses telles que EGFR, c-Met, Raf, CDK4, Bcr-Abl, FLT3, p53 sont ses substrats. Par conséquent l'inhibition d'HSP90 permettrait d'inhiber plusieurs voies de signalisation cellulaire, en particulier la voie Raf/MEK/ERK ce qui est très intéressant pour traiter les tumeurs présentant plusieurs anomalies génétiques.

La geldanamycine est un antibiotique, ce fut le premier inhibiteur d'HSP90 découvert.⁴² A cause de sa forte toxicité hépatique, sa faible stabilité métabolique et sa faible solubilité, plusieurs analogues ont été développés (**Figure 10**).

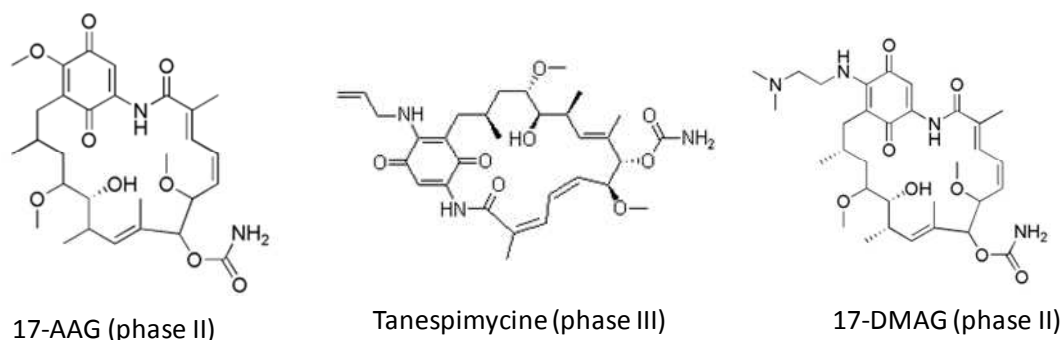


Figure 10 : Inhibiteurs de la protéine chaperonne HSP90

Le premier à entrer en phase clinique fut le 17-AAG (17-allylamino-geldanamycin), il est actuellement en phase II pour le traitement de nombreux types de cancers.⁴³ D'autres

⁴⁰ Mahalingam D., Swords R., Carew J.S., Nawrocki S.T., Bhalla K., Giles F.J.: Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br. J. Cancer*, **2009**, 19, 1523-9.

⁴¹ Kitano H.: Cancer robustness: tumour tactics. *Nature*, **2003**, 426, 125.

⁴² Whitesell L., Mimnaugh E.G., De Costa B., Myers C.E., Neckers L.M.: Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1994**, 91, 8324-8.

analogues de cette classe sont aussi en cours d'évaluation : la tanespimycine (KOS-953), 17-DMAG, IPI-504.

II-5 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un stimulus. Elle est indispensable à la survie des organismes pluricellulaires. Les cellules cancéreuses sont généralement des cellules dans lesquels ce mécanisme ne fonctionne plus. Elles survivent et se multiplient en dépit d'anomalies génétiques survenues au cours de la vie de la cellule, alors que normalement elles auraient dû être détruites par apoptose.⁴⁴ Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation :

- Une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor) ;
- Une voie dite intrinsèque localisée dans la mitochondrie régulée par les protéines antiapoptotiques : Bcl-2 et Bcl-XL et les protéines proapoptotiques : Bid, Bad et Bim.

Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés au cours de l'apoptose : exposition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire, arrêt de la réplication, fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

Plusieurs stratégies sont à l'essai pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses (**Figure 11**) :

- 1) La synthèse d'agonistes du récepteur TRAIL membre de la superfamille des récepteurs au TNF.⁴⁵ Actuellement un anticorps monoclonal le Mapatumumab⁴⁶ et une molécule AMG-655 (structure non accessible) sont en phase II pour divers types de cancers.

⁴³ Ronnen E.A., Kondagunta G.V., Ishill N., Sweeney S.M., Deluca J.K., Schwartz L., Bacik J., Motzer R.J.: A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs*, **2006**, 24, 543–46.

⁴⁴ Klein S., McCormick F., Levitzki A.: Killing time for cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 573–80.

⁴⁵ Ziegler D.S., Kung A.L.: Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, **2008**, 20, 97–103.

⁴⁶ Tolcher A.W., Mita M., Meropol N.J., von Mehren M., Patnaik A., Padavic K., Hill M., Mays T., McCoy T., Fox N.L., Halpern W., Corey A., Cohen R.B.: Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J. Clin. Oncol.*, **2007**, 25, 1390–95.

2) La synthèse d'antagonistes de la survivine qui est une protéine inhibitrice de l'apoptose dont la surexpression favorise la progression du cancer et représente un marqueur de mauvais pronostic.⁴⁷ Plusieurs molécules sont en cours d'évaluation telles qu'YM-155 et LY-2181308 (oligonucléotide antisens) qui sont actuellement en phase II.

3) La synthèse d'antagonistes de la protéine antiapoptotique Bcl-2 pour remédier à la surexpression de Bcl-2 qui est responsable de la formation et la progression de la tumeur et de la chimiorésistance.⁴⁸ Oblimersen, un oligonucléotide antisens de Bcl-2 est actuellement en phase III pour les mélanomes et les myélomes et en phase II pour d'autres nombreux cancers.⁴⁹ D'autres molécules inhibant des interactions protéine/protéine spécifiques de Bcl-2 sont en cours d'évaluation : Obatoclax et ABT-263.

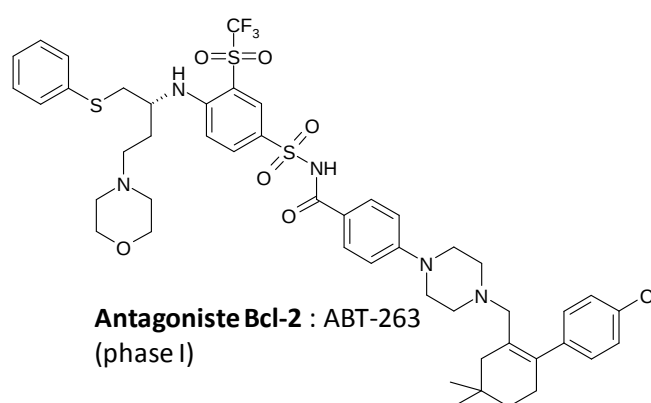
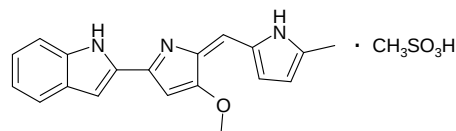
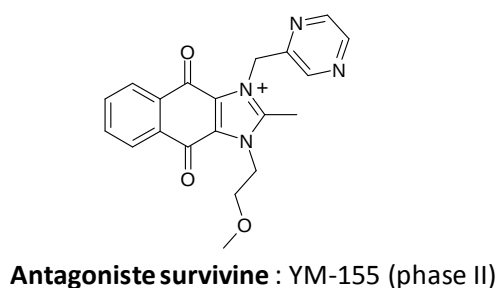


Figure 11 : Exemples de molécules inductrices de l'apoptose

II-6 Les inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaire autres que la voie Raf/MEK/ERK

La signalisation cellulaire ou transduction du signal désigne l'intégration d'un message d'origine extracellulaire par une cellule. Le message passe à travers la membrane plasmique,

⁴⁷ Hunter A.M., LaCasse E.C., Korneluk R.G.: The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, **2007**, 12, 1543–68.

⁴⁸ Fesik S.W.: Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 876–85.

⁴⁹ O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E., Larratt L.M., Skotnicki A., Koziner B., Chanan-Khan A.A., Seymour J.F., Bociek R.G., Pavletic S., Rai K.R.: Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, **2007**, 25, 1114–20.

arrive dans le cytoplasme, puis passe dans le noyau pour générer la transcription de protéines. Les cellules émettent des médiateurs ou ligands (hormones, facteurs de croissance, cytokines, peptides...) qui sont détectés par d'autres cellules au niveau de récepteurs extra ou intracellulaires spécifiques, ce qui induit une réponse de la cellule réceptrice. La fixation du ligand sur son récepteur induit un changement de conformation de celui-ci, ce qui active une cascade de réactions biochimiques conduites par les enzymes à l'intérieur de la cellule (par exemple une série de phosphorylations pour les protéines kinases).

Les voies de signalisation régulent finement des processus cellulaires clés tels que la prolifération, la différenciation, la mobilité, la réponse au stress, l'apoptose, le métabolisme et l'inflammation. La **Figure 12** représente les principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces processus.

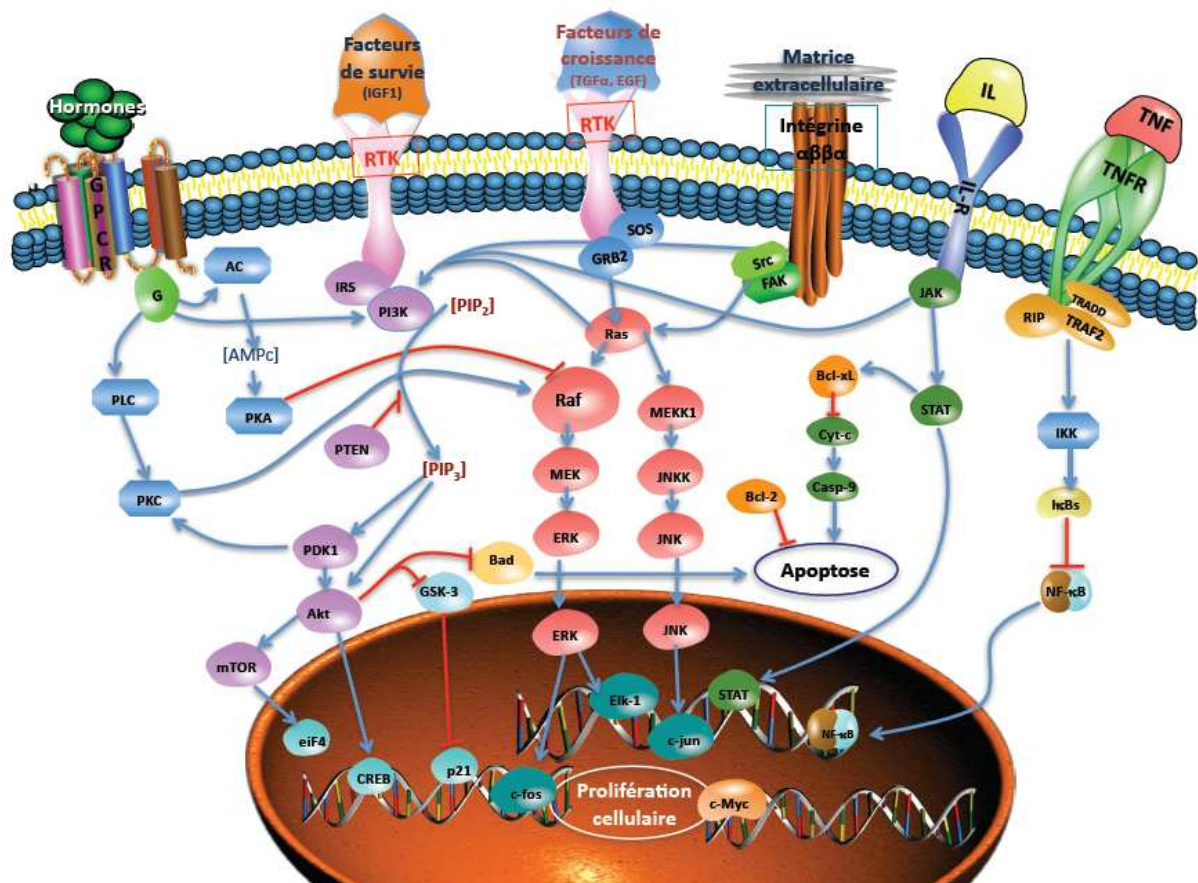


Figure 12 : Principales voies de signalisation intracellulaire

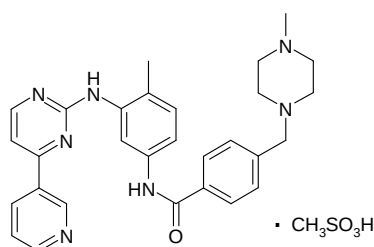
Dans les cellules cancéreuses, certaines voies de signalisation sont altérées par la mutation ou la surexpression d'un oncogène, conduisant à leur dérégulation. En général,

plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la carcinogénèse.^{50,51} Selon les protéines altérées, le phénotype de la cellule cancéreuse sera différent. Parmi les cibles les plus attractives de la thérapie ciblée anticancéreuse participant à la signalisation intracellulaire, on distingue: les récepteurs tyrosine kinases (RTKs), la voie MAP kinase Raf/MEK/ERK et la voie PI3K/Akt/mTor.

II-6.1 Les récepteurs tyrosine kinases (RTKs)

II-6.1.1 Le récepteur Bcr-Abl

Le Glivec[®] (imatinib) représente le premier médicament anticancéreux spécifiquement ciblé (**Figure 13**). Synthétisé en 1992 sous le nom STI571 ou CGP57148B par le groupe Novartis, il a été approuvé en 2001 par la FDA pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique⁵² (LMC) positive au chromosome Philadelphie (Ph⁺) et en 2002 pour le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST).^{53,54} Le Glivec[®] a révolutionné le traitement de la LMC et des GISTs en devenant le médicament le plus prescrit contre ces maladies. Il est significativement plus efficace et mieux toléré que les thérapies suivies jusqu'à ce jour.



Imatinib mésylate (Glivec[®])

Figure 13 : Structure du Glivec (Imatinib mésylate), inhibiteur des RTKs : Bcr-Abl, c-kit et PDGFR- α

⁵⁰ Bianco R., Melisi D., Ciardiello F., Tortora G.: Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur. J. Cancer*, **2006**, 42, 290-4.

⁵¹ Adjei A.A., Hidalgo M.: Intracellular Signal Transduction Pathway Proteins As Targets for Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, 23, 5386-403.

⁵² Deininger M.W., Goldman J.M., Lydon N., Melo J.V.: The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*, **1997**, 90, 3691-98.

⁵³ Demetri G.D., von Mehren M., Blanke C.D., Van den Abbeele A.D., Eisenberg B., Roberts P.J., Heinrich M.C., Tuveson D.A., Singer S., Janicek M., Fletcher J.A., Silverman S.G., Silberman S.L., Capdeville R., Kiese B., Peng B., Dimitrijevic S., Druker B.J., Corless C., Fletcher C.D., Joensuu H.: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.*, **2002**, 347, 472-80.

⁵⁴ O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A., Gathmann I., Baccarani M., Cervantes F., Cornelissen J.J., Fischer T., Hochhaus A., Hughes T., Lechner K., Nielsen J.L., Rousselot P., Reiffers J., Saglio G., Shepherd J., Simonsson B., Gratwohl A., Goldman J.M., Kantarjian H., Taylor K., Verhoef G., Bolton A.E., Capdeville R., Druker B.J.: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **2003**, 348, 994-1004.

Il s'agit d'un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinases : Bcr-Abl, c-Kit, et PDGFR. Bcr-Abl est une protéine chimérique anormale issue de la fusion du gène Abl à la région Bcr du chromosome 22. Cette anomalie chromosomique baptisée chromosome Philadelphie (Ph) est responsable de l'activité tyrosine kinase constitutive de Bcr-Abl conduisant à la prolifération des cellules leucémiques. Des mutations dans les gènes codant pour les récepteurs c-KIT et PDGFR- α ^{55,56} conduisent à leur suractivation responsable de la formation des GISTs.

II-6.1.2 Les récepteurs au facteur de croissance épidermique (HER)

La famille des EGFRs⁵⁷ est composée des 4 récepteurs transmembranaires HER1 (erbB-1), HER2 (erbB-2 ou neu), HER3 (erbB-3) et HER4 (erbB-4). Ils contiennent tous un domaine intracellulaire tyrosine kinase sauf HER3. Tous les membres de la famille sauf HER2 sont capables de lier des ligands extracellulaires. L'activation des EGFRs induit l'activation de plusieurs voies de signalisation en particulier les voies Raf/MEK/ERK et PI3K/Akt/mTor favorisant la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie, la mobilité, l'adhésion cellulaire.⁵⁸ Les EGFRs sont surexprimés ou suractivés dans plusieurs carcinomes.^{59,60} Deux approches sont développées actuellement pour inhiber les EGFRs : les anticorps monoclonaux (mAbs) dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur d'une part et les petites molécules inhibitrices de tyrosine kinase qui se lient au domaine tyrosine kinase intracellulaire d'autre part. En bloquant l'interaction ligand-récepteur, les mAbs inhibent l'homo ou l'hétérodimérisation du récepteur ce qui induit leur internalisation et par conséquent l'inhibition de la voie de signalisation médiée par le récepteur. Plusieurs mAbs ont été approuvés par la FDA :

- le Cetuximab (Erbix[®]) et le Panitumumab (Vectibix[®]) sont dirigés contre HER1 et sont indiqués pour traiter le cancer colorectal ;

⁵⁵ Heinrich M.C., Rubin B.P., Longley B.J., Fletcher J.A.: Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum. Pathol.*, **2002**, 33, 484-95.

⁵⁶ Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., McGreevey L., Chen C.J., Joseph N., Singer S., Griffith D.J., Haley A., Town A., Demetri G.D., Fletcher C.D., Fletcher J.A.: PDGFR α activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, **2003**, 299, 708-10.

⁵⁷ Carpenter G., Cohen S.: Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 7709-12.

⁵⁸ Yarden Y., Sliwkowski M.X.: Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2001**, 2, 127-37.

⁵⁹ Harari P.M., Allen G.W., Bonner J.A.: Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J. Clin. Oncol.*, **2007**, 25, 4057-65.

⁶⁰ Mendelsohn J., Baselga J.: Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin. Oncol.*, **2006**, 33, 369-85.

- le Trastuzumab (Herceptin[®]) est dirigé contre HER2 et indiqué pour traiter les cancers du sein où HER2 est surexprimé. Beaucoup d'autres mAbs sont en phase clinique II/III (Matuzumab, Pertuzumab, ...).

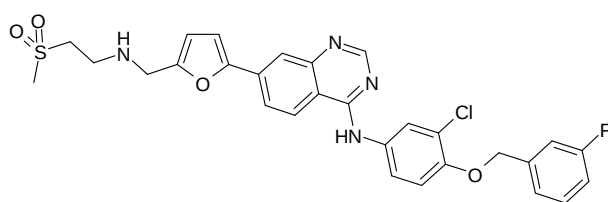
Concernant les petites molécules inhibitrices de tyrosine kinase, trois produits sont actuellement utilisés en clinique (**Figure 14**) :

- Gefitinib (Iressa[®]), spécifique de HER1 est indiqué dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules ;

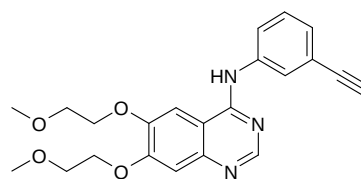
- Erlotinib (Tarceva[®]), spécifique de HER1 est indiqué dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules et du pancréas ;

- Lapatinib (Tykerb[®]) spécifique de HER2 et HER1 est indiqué pour traiter les cancers du sein où HER2 est surexprimé.⁶¹

D'autres molécules inhibitrices sont actuellement en phase clinique I et II. Comme le lapatinib, elles ne sont plus spécifiques d'un seul type de récepteur HER. Par exemple XL-647 inhibe HER1, HER2, HER4, VEGFR2 et EPHB4 (récepteur de l'éphrine B4).



HER2 et HER1 : Lapatinib (Tykerb[®])



HER1 : Erlotinib (Tarceva[®])

Figure 14 : Exemples d'inhibiteurs des EGFRs

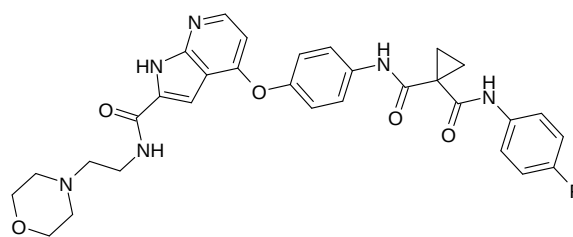
II-6.1.3 Le récepteur c-Met

c-Met est un récepteur transmembranaire tyrosine kinase impliqué dans la régulation de la mobilité, la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire.⁶² Il lie un seul ligand le facteur de croissance hépatocyte (HGF), ce qui induit le recrutement à la membrane de plusieurs protéines effectrices, principalement : Gab1, Grb2 et PI3K. c-Met contribue à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont les principales sont les voies Raf/MEK/ERK et PI3K/Akt. Des mutations génétiques du gène codant pour le récepteur (le proto-oncogène MET), la surexpression de MET ou une stimulation anormale du récepteur sont à l'origine de sa suractivation. Plusieurs mutations oncogéniques ont été identifiées dans

⁶¹ Moy B., Kirkpatrick P., Kar S., Goss P.: Lapatinib. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 431–32.

⁶² Rosario M., Birchmeier W.: How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell. Biol.*, **2003**, 13, 328–35.

plusieurs types de cancers (estomac, rein, poumon) ce qui fait de c-Met une cible thérapeutique très attractive.⁶³ Plusieurs inhibiteurs sont actuellement en phase clinique dont deux anticorps monoclonaux anti-HGF (AMG-102, OA-5D5) en phase I et quatre molécules parmi lesquelles XL-880 (**Figure 15**) qui est en phase I/II pour les cancers du rein, de l'estomac et du cou. XL-880 a la particularité d'inhiber plusieurs RTKs : c-Met, VEGFR-2, PDGFR- β , Kit, FLT3, Tie-2 et Ron.



XL-880 (phase I/II)

Figure 15 : Structure de XL-880, inhibiteur du RTK c-Met

II-6.1.4 Les récepteurs du facteur de croissance de type insuline (IGFRs)

Les récepteurs du facteur de croissance de type insuline (IGFRs) sont des récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinase. Le récepteur IGR de type 1 (IGF-1R) est capable de lier les ligands IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) et IGF-2. Il partage 84 % d'homologie avec le récepteur à l'insuline (IR).⁶⁴ Le récepteur IGR de type 2 lie uniquement l'IGF-2 et ne possède pas de domaine tyrosine kinase. L'activation des récepteurs IGF-1R et IR conduit à l'activation en aval des voies Raf/MEK/ERK et PI3K/Akt favorisant la prolifération cellulaire, la survie et la formation de métastases. En effet, la suractivation de ces récepteurs est impliquée dans de nombreux cancers comme le sein, la prostate, le côlon, le pancréas, le foie et les mélanomes.⁶⁵ Par conséquent une stratégie permettant de cibler uniquement les récepteurs IGF-1R ne serait pas suffisante pour bloquer l'activation des voies médiées par les ligands IGF et le récepteur à l'insuline (IR) devrait aussi être ciblé. Cependant à cause de son rôle important dans l'homéostasie du glucose, la stratégie idéale serait de cibler les récepteurs IGFR et IR uniquement dans les cellules tumorales pour éviter de potentielles complications

⁶³ Christensen J.G., Burrows J., Salgia R.: c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.*, **2005**, 225, 1-26.

⁶⁴ Sachdev D., Yee D.: Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, 6, 1-12.

⁶⁵ Pollak M. Insulin-like growth factor related signaling and cancer development.: *Recent Results Cancer Res.*, **2007**, 174, 49-53.

telles que l'apparition de diabète de type 2. Actuellement, il n'existe que des inhibiteurs dirigés contre l'IGF-1R en phase clinique. Cinq anticorps monoclonaux sont en cours d'évaluation, le plus avancé est le CP-721, 871 qui en phase III pour les cancers du poumon non à petites cellules et en phase II pour les cancers du sein, colorectal, de la prostate et le sarcome d'Ewing. Parmi les molécules inhibitrices, trois sont en phase I : XL-228, OSI-906 (**Figure 16**), et l'acide nordihydroguarécétique.

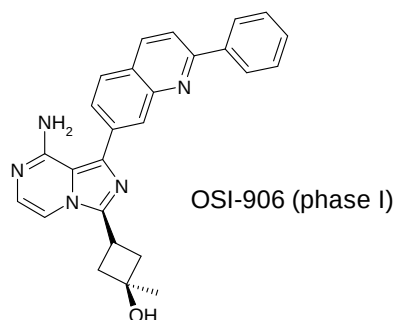


Figure 16 : Structure d'OSI-906, inhibiteur du RTK IGF-1R

II-6.2 Les protéines kinases intracellulaires

En aval des RTKs, interviennent un grand nombre de protéines kinases intracellulaires pour continuer à transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule. Parmi les protéines kinases intracellulaires les plus attractives de la thérapie ciblée anticancéreuse, on distingue : c-Src, PI3K, Akt, mTor, Raf, MEK, ERK.

II-6.2.1 La protéine c-Src

c-Src fut la première protéine tyrosine kinase soluble découverte en 1979 par J-M. Bishop and H.E. Varmus. Plusieurs études ont montré qu'elle joue un rôle important dans la carcinogénèse (mitose, adhésion, invasion, mobilité).⁶⁶ Src est une protéine médiatrice du signal mitotique entre les récepteurs aux facteurs de croissance tels que EGFR, c-Met et l'IGF-1R et d'autres protéines situées en aval des voies de signalisation telles que Ras, PI3K et FAK (Focal-adhesion kinase).⁶⁷ La dérégulation de l'activité de Src est impliquée dans l'apparition de plusieurs cancers (sein, poumon, colorectal, ovaires).⁶⁶

⁶⁶ Frame M.C.: Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2002**, 1602, 114–30.

⁶⁷ Laird A.D., Li G., Moss K.G., Blake R.A., Broome M.A., Cherrington J.M., Mendel D.B.: Src family kinase activity is required for signal transducer and activator of transcription 3 and focal adhesion kinase phosphorylation and vascular endothelial growth factor signaling in vivo and for anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, 2, 461–69.

Actuellement une seule molécule, le Dasatinib (Sprycel®), a été approuvée par la FDA pour traiter les leucémies myéloïdes chroniques en cas de résistance à l'imatinib et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) Ph⁺.⁶⁸ Le Dasatinib est un inhibiteur spécifique des deux protéines kinases c-Src et Abl. Il possède un mécanisme d'action assez semblable à celui de l'imatinib, il inhibe aussi Bcr-Abl mais il a la particularité d'agir sur des formes de l'enzyme résistantes à l'imatinib.⁶⁹ Quatre autres molécules sont actuellement en phase clinique I et II (Bosutinib, AZD-0530, XL-999 et XL-228). La **Figure 17** illustre quelques exemples d'inhibiteurs de la protéine kinase Src.

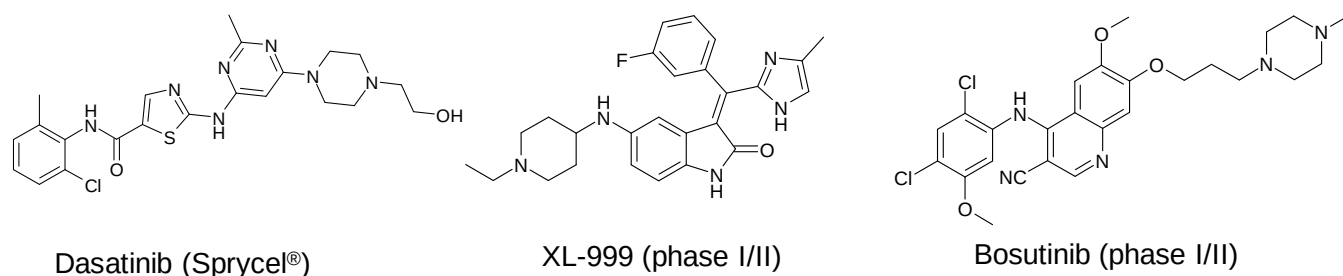


Figure 17 : Exemples d'inhibiteurs de la protéine kinase Src

II-6.2.2 La voie PI3k/Akt/mTor

La voie de la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) joue un rôle majeur dans les cellules, en régulant notamment la prolifération cellulaire, la survie, la mobilité, la différenciation, le métabolisme du glucose. La dérégulation de cette voie est impliquée dans de nombreux processus tumoraux, et représente une cible particulièrement intéressante pour les traitements anticancéreux.^{70,71} Elle est activée en amont par la liaison de nombreux ligands extracellulaires (facteurs de croissance, insuline, cytokines) à leurs récepteurs d'intérêt tels que les récepteurs tyrosine kinases (voir précédemment) et les récepteurs couplés aux protéines G. La régulation de cette voie de signalisation est complexe due à l'existence d'une boucle de rétrocontrôle et d'interconnexions avec d'autres axes de signalisation comme la voie Raf/MEK/ERK. Les PI3Ks génèrent la formation du phospholipide membranaire (PIP3) qui est le principal second messenger conduisant à l'activation des protéines kinases Akt (aussi

⁶⁸ Olivieri A., Manzione L.: Dasatinib: a new step in molecular target therapy. *Ann. Oncol.*, **2007**, 18, 42– 46.

⁶⁹ Burgess M.R., Skaggs B.J., Shah N.P., Lee F.Y., Sawyers C.L.: Comparative analysis of 2 clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2005**, 102, 3395–3400.

⁷⁰ Engelman J. A., Luo J., Cantley L.C.: The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Rev. Genet.*, **2006**, 7, 606–19.

⁷¹ Liu P., Cheng H., Roberts T.M., Zhao J.J.: Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2009**, 8, 627-44.

appelée PKB) et PDK1. Le gène suppresseur de tumeur PTEN code pour une phosphatase qui déphosphoryle PIP3, par conséquent elle agit comme un régulateur négatif de la voie de signalisation.⁷² Des travaux récents en génomique ont permis de montrer que plusieurs protéines de la voie sont mutées ou altérées dans de nombreux cancers induisant une suractivation de la voie. C'est le cas des protéines PTEN, PI3K et PDK1.⁷¹

Outre le fait que mTor soit la protéine substrat d'Akt, le lien entre mTor et le cancer fut établi avec la mise en évidence du mécanisme d'action de la Rapamycine (Rapamune®).⁷³ En effet il a été montré que l'effet antinéoplasique de la Rapamycine est dû à l'inhibition de mTor.

Les inhibiteurs de PI3K (Figure 18) : La Wortmannine (produit naturel) et LY294002 (produit de synthèse) furent les deux premiers inhibiteurs de PI3K découverts mais ils sont trop toxiques pour être utilisés en clinique.⁷⁴ Une dizaine de molécules sont actuellement en cours d'évaluation clinique.⁷⁵ Plusieurs d'entre elles ont une double spécificité envers PI3K et mTor. C'est le cas pour les produits BEZ235 et BGT226, les plus avancés dans les essais cliniques.^{76,77} Ils sont en phase I/II pour le traitement des tumeurs solides avancées, le cancer du sein et le syndrome Cowden causé par des mutations de PTEN.

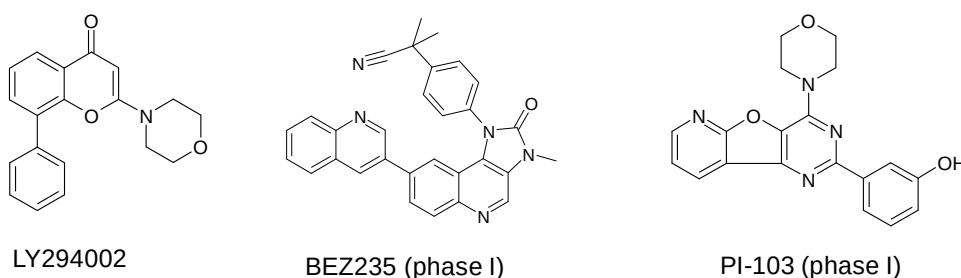


Figure 18 : Exemples d'inhibiteurs de PI3K

Les inhibiteurs d'Akt (Figure 19) : Plusieurs inhibiteurs ont été développés et ils peuvent être regroupés en différentes classes : les analogues lipidiques du phosphatidylinositol, les inhibiteurs ATP compétitifs et les inhibiteurs allostériques.

⁷² Cantley L.C., Neel B.G.: New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 4240–45.

⁷³ 39. Ma W.W., Hidalgo M.: Exploiting novel molecular targets in gastrointestinal cancers. *World J. Gastroenterol.*, **2007**, 13, 5845–56.

⁷⁴ Knight Z.A., Shokat K.M.: Chemically targeting the PI3K family. *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, 35, 245–49.

⁷⁵ Sundstrom T.J., Anderson A.C., Wright D.L.: Inhibitors of phosphoinositide-3-kinase: a structure-based approach to understanding potency and selectivity. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 840–50.

⁷⁶ Garcia-Echeverria C., Sellers W.R.: Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*, **2008**, 27, 5511–26.

⁷⁷ Marone R., Cmiljanovic V., Giese B., Wymann M.P.: Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2008**, 1784, 159–85.

L'inhibiteur le plus avancé en clinique est la perifosine⁷⁸ (analogue lipidique du phosphatidylinositol) qui prévient la liaison d'Akt au PIP3 empêchant ainsi son activation. Il est actuellement en phase I/II pour traiter les tumeurs solides avancées, les myélomes multiples, le cancer des ovaires, les sarcomes des tissus mous et les mélanomes malins. Parmi les autres inhibiteurs en phase I, on peut citer : GSK-690693⁷⁹ qui est un inhibiteur ATP compétitif et MK-2206⁸⁰ qui est un inhibiteur allostérique.

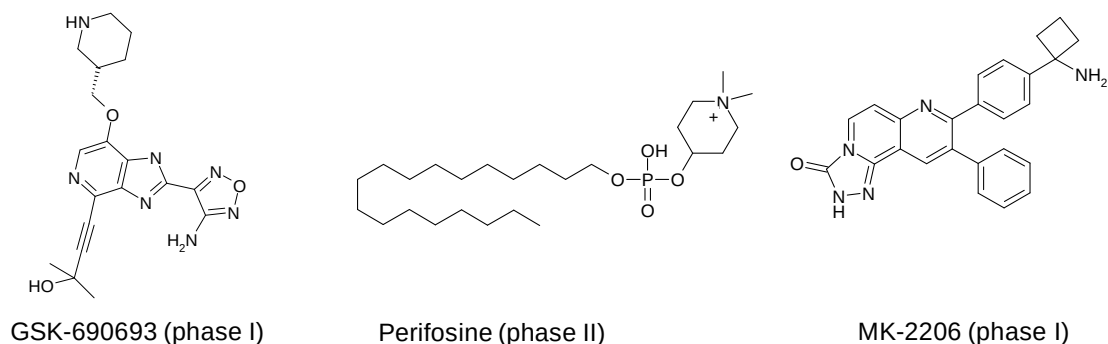


Figure 19 : Exemples d'inhibiteurs d'Akt en phase clinique

Les inhibiteurs de mTor : Plusieurs analogues de la Rapamycine ont été approuvés par la FDA : le Temsirolimus (Torisel[®]) indiqué dans les cancers du rein avancés (**Figure 20**) comme la Rapamycine et l'Everolimus (Afinitor[®]) pour traiter les sarcomes.⁸¹ Ces produits sont aussi en phase clinique pour d'autres types de cancers. Deux inhibiteurs ATP compétitifs OSI-027 et AZD8055 sont actuellement en phase I pour traiter les tumeurs solides avancées et les lymphomes, leurs structures chimiques ne sont pas encore accessibles.⁸²

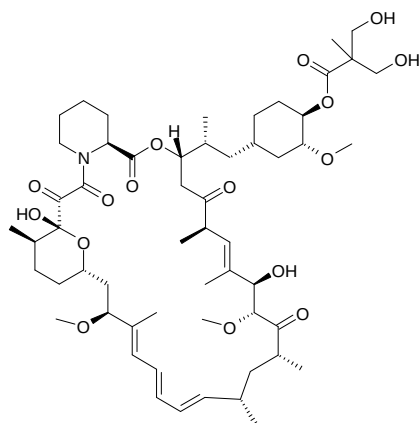
⁷⁸ Hilgard P., Klenner T., Stekar J., Nössner G., Kutscher B., Engel J.: D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur. J. Cancer*, **1997**, 33, 442–6.

⁷⁹ Rhodes N., Heerding D.A., Duckett D.R., Eberwein D.J., Knick V.B., Lansing T.J., McConnell R.T., Gilmer T.M., Zhang S.Y., Robell K., Kahana J.A., Geske R.S., Kleymenova E.V., Choudhry A.E., Lai Z., Leber J.D., Minthorn E.A., Strum S.L., Wood E.R., Huang P.S., Copeland R.A., Kumar R.: Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer Res.*, **2008**, 68, 2366–74.

⁸⁰ Lindsley C.W., Barnett S.F., Yaroschak M., Bilodeau M.T., Layton M.E.: Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, 7, 1349–63.

⁸¹ Faivre S., Kroemer G., Raymond E.: Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5, 671–88.

⁸² Feldman M.E., Apsel B., Uotila A., Loewith R., Knight Z.A., Ruggero D., Shokat K.M.: Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.*, **2009**, 7, e38.



mTor : Temsirolimus (Torisel®)

Figure 20 : Structure de l'inhibiteur de mTor Temsirolimus (Torisel®)

III/ Inhibition de la voie MAPK : Raf/MEK/ERK

III-1 Rôle de la voie Raf/MEK/ERK dans le cancer

De nombreuses études ont montré que la voie Raf/MEK/ERK est majoritairement impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, la survie, l'adhésion, la mobilité et la différenciation (**Figure 21**). Elle est composée de la protéine Ras et des 3 protéines kinases Raf, MEK et ERK. Ras, Raf et MEK sont les principales cibles thérapeutiques anticancéreuses de la voie.^{83,84} Elle est activée en réponse à des stimuli extracellulaires tels que les facteurs de croissance et les cytokines qui se lient aux récepteurs RTKs (EGFR, VEGFR, PDGFR, c-Met, c-Kit) et aux GPCRs, respectivement. L'information est transmise à la protéine Ras (GTPase) *via* les protéines adaptatrices Grb2 et SOS. Ras activée devient affine pour de nombreuses protéines effectrices dont les plus connues sont Raf, PI3K, PAK et Rac.⁸⁵ Le recrutement de Raf à la membrane provoque son activation par une cascade d'évènements de déphosphorylations puis de phosphorylations.^{86,87} Raf activée phosphoryle la protéine kinase MEK pour l'activer. MEK active phosphoryle à son tour la protéine kinase ERK. ERK phosphorylée a de nombreux substrats tels que des protéines cytoplasmiques, des

⁸³ Roberts P.J., Der C.J.: Targeting the Raf-Mek-Erk mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **2007**, 26, 3291-3310.

⁸⁴ Wong K.K.: Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **2009**, 4, 28-35.

⁸⁵ Marshall C.J.: Ras effectors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1996**, 8, 197-204.

⁸⁶ Dhillon A.S., Kolch W.: Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, 404, 3-9.

⁸⁷ Wellbrock C., Karasarides M., Marais R.: The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2004**, 5, 875-85.

facteurs de transcription, des régulateurs de la traduction et les protéines kinases de la famille Rsk.⁸⁸

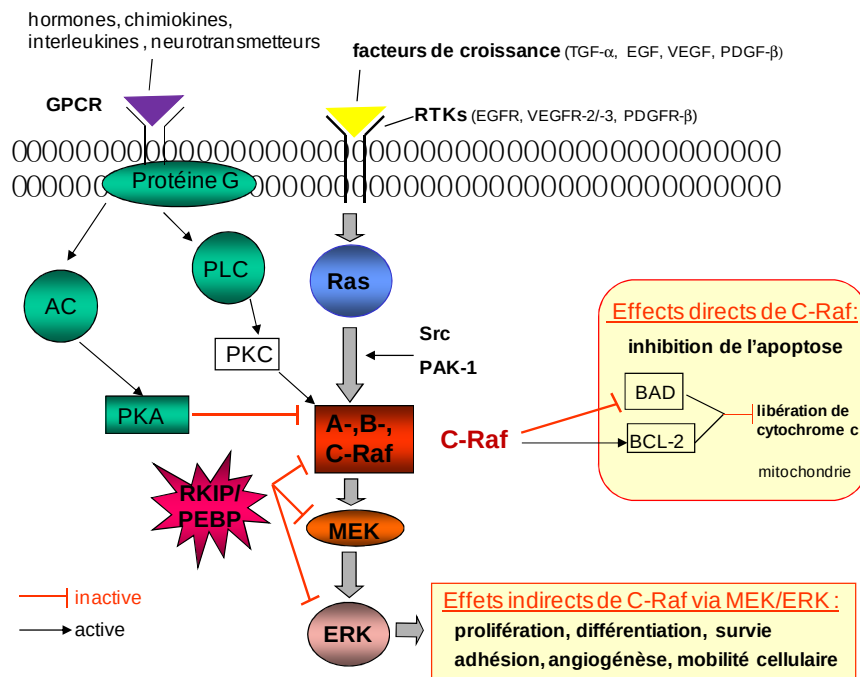


Figure 21 : La voie de signalisation Raf/MEK/ERK. GPCR : récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, RTK : récepteurs tyrosine kinase, AC : adénylate cyclase, PLC : phospholipase C, PKA et PKC: protéines kinases A et C, RKIP ou PEBP : Raf kinase inhibitor protein ou phosphatidyl ethanolamine binding protein.

Il existe de nombreuses mutations oncogéniques des gènes RAS codant pour des formes suractivées de Ras⁸⁹ (K-Ras, H-Ras et N-Ras). Elles sont à l'origine de la suractivation de la voie Raf/MEK/ERK. Les mutations de Ras représentent 20 % à 30 % des cancers chez l'homme. La forme mutée K-Ras est la plus fréquente et elle existe dans les cancers du pancréas (90 %), du côlon (50 %), du poumon (30 %), de la thyroïde (50 %), dans les leucémies aiguës (5-30 %) et les leucémies myéloïdes chroniques (65 %).⁹⁰ La suractivation de la voie résulte aussi de mutations ou de la surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, PDGFR, VEGFR) situés en amont de la voie.

Dans la cellule, il existe un inhibiteur naturel de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK : la protéine appelée PEBP ou RKIP (Phosphatidyl Ethanolamine Binding

⁸⁸ Yoon S., Seger R.: The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, **2006**, 24, 21-44.

⁸⁹ Malumbres M., Barbacid M.: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 459-65.

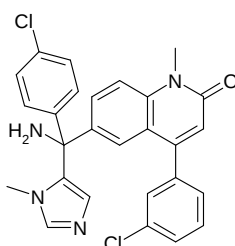
⁹⁰ Rajalingam K., Schreck R., Rapp U.R., Albert S.: Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2007**, 1773, 1177-95.

Protein ou Raf kinase inhibitor protein). Elle inhibe la voie par interaction directe avec les protéines kinases Raf, MEK et ERK (**Figure 21**).⁹¹

III-2 Approches thérapeutiques actuelles pour inhiber la voie Raf/MEK/ERK

III-2.1 Les inhibiteurs de Ras

L'approche consiste à bloquer les modifications post-traductionnelles de Ras, telle que la farnésylation, qui permettent son association à la membrane et son activation. Ainsi, les enzymes impliquées dans ces modifications sont des cibles thérapeutiques potentielles. L'enzyme la plus étudiée est la farnésyltransférase (FTase) dont plusieurs inhibiteurs ont été développés. Le plus avancé est le Tipifarnib qui est en phase III pour le traitement des leucémies et en phase II pour d'autres cancers (sein, cerveau, colorectal...).⁹² Cependant le Tipifarnib a donné des résultats décevants dans des études de phase II et en phase III pour le cancer du pancréas (**Figure 22**).⁹³ L'efficacité des inhibiteurs de Ras en cancérothérapie reste encore à prouver. Par conséquent, plus d'efforts ont été investis pour concevoir des inhibiteurs de Raf et MEK.



Inhibiteur de la farnésyltransférase :
Tipifarnib (phase III)

Figure 22 : Structure du Tipifarnib, inhibiteur de l'activation de Ras

⁹¹ Yeung K., Seitz T., Li S., Janosch P., McFerran B., Kaiser C., Fee F., Katsanakis K.D., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W.: Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, **1999**, 401, 173-7.

⁹² Zhu K., Hamilton A.D., Sebt S.M.: Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: current status. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, **2003**, 4, 1428-35.

⁹³ Van Cutsem E., van de Velde H., Karasek P., Oettle H., Vervenne W.L., Szawlowski A., Schoffski P., Post S., Verslype C., Neumann H., Safran H., Humblet Y., Perez Ruixo J., Ma Y., Von Hoff D.: Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, 22, 1430-38.

III-2.2 Les inhibiteurs de MEK

MEK est une sérine/thréonine et une tyrosine kinase, elle existe sous deux isoformes MEK1 et MEK2. Elles sont très spécifiques, à ce jour un seul substrat est connu : la protéine ERK sous ses deux isoformes ERK1 et ERK2. L'activation constitutive de MEK est due à des stimuli en amont de la voie de signalisation tels que des mutations au niveau des RTKs, de Ras ou de B-Raf. Par conséquent le développement d'inhibiteurs de MEK est une approche prometteuse pour la thérapie anticancéreuse.⁹⁴ La plupart des inhibiteurs connus de MEK sont des inhibiteurs allostériques, ils ne se fixent pas dans la poche ATP ce qui explique leur fort degré de spécificité vis-à-vis de MEK. CI-1040 fut le premier inhibiteur à être étudié en phase clinique.⁹⁵ Son développement s'arrêta en phase II à cause de sa faible stabilité métabolique et de sa pauvre biodisponibilité. Du fait des résultats encourageants observés en phase préclinique⁹⁶ et en phase I pour son activité antitumorale, des efforts ont été poursuivis dans cette voie et plusieurs analogues du CI-1040 ont été développés (**Figure 23**). PD0325901⁹⁷ et AZD-6244⁹⁸ (ARRY-142886) sont actuellement les plus avancés, ils sont en phase II pour le traitement de nombreux types de cancers (sein, poumon, colorectal, foie...). Les principaux effets secondaires observés pour cette classe d'inhibiteurs sont des éruptions cutanées, des œdèmes et des troubles de la vision.

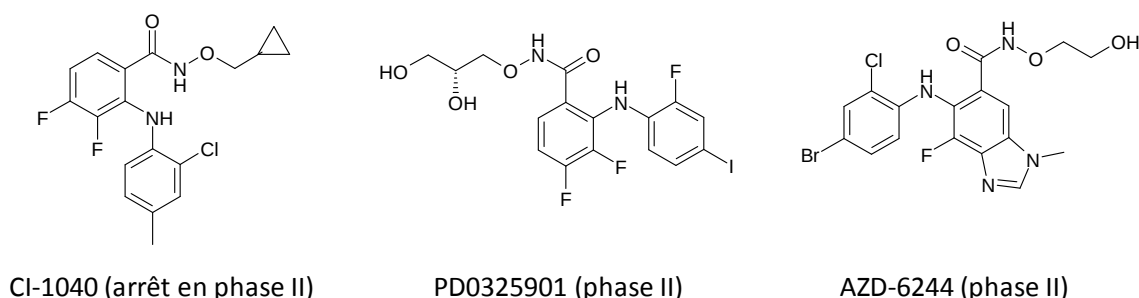


Figure 23 : Principaux inhibiteurs de MEK en phase clinique

⁹⁴ Friday B.B., Adjei A.A.: Advances in targeting the ras/Raf/MEK/ERK mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14, 342–46.

⁹⁵ Allen L.F., Sebolt-Leopold J., Meyer M.B.: CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin. Oncol.*, **2003**, 30, 105–16.

⁹⁶ Sebolt-Leopold J.S., Dudley D.T., Herrera R., Van Becelaere K., Wiland A., Gowan R.C., Tecle H., Barrett S.D., Bridges A., Przybranowski S., Leopold W.R., Saltiel A.R.: Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*. *Nat. Med.*, **1999**, 5, 810–16.

⁹⁷ Messersmith W.A., Hidalgo M., Carducci M., Eckhardt S.G.: Novel targets in solid tumors: MEK inhibitors. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, **2006**, 4, 831–36.

⁹⁸ Yeh T.C., Marsh V., Bernat B.A., Ballard J., Colwell H., Evans R.J., Parry J., Smith D., Brandhuber B.J., Gross S., Marlow A., Hurley B., Lyssikatos J., Lee P.A., Winkler J.D., Koch K., Wallace E.: Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, **2007**, 13, 1576–83.

III-2.3 Les inhibiteurs de ERK

Jusqu'à ce jour, il n'y a aucun inhibiteur connu en phase clinique malgré la connaissance de plusieurs inhibiteurs sélectifs de ERK et la disponibilité de la structure cristallographique de ERK2.^{99,100,101,102} La question de savoir si un inhibiteur de ERK deviendra un jour un médicament anticancéreux reste ouverte et les efforts se poursuivent pour mieux comprendre comment ERK régule la prolifération cellulaire et l'apoptose.¹⁰³

III-2.4 Les inhibiteurs de Raf

Les protéines kinases Raf sont des sérine/thréonine kinases, 3 isoformes sont actuellement connues chez les mammifères : A, B et C-Raf aussi appelée Raf-1.¹⁰⁴ Les protéines Raf-1 et B-Raf sont des cibles thérapeutiques de choix contre le cancer et plusieurs stratégies sont actuellement développées pour les inhiber telles que : les oligonucléotides antisens, les petites molécules inhibitrices de l'activité kinase, les inhibiteurs de l'interaction Raf-Ras et les composés qui déstabilisent la protéine Raf.^{105,106,107,108}

III-2.4.1 Les stratégies indirectes pour inhiber Raf

MCP-110 : est un aryle amide développé par NexusPharma, c'est à ce jour la seule molécule qui inhibe l'interaction entre Ras et Raf empêchant ainsi l'activation de Raf (**Figure**

⁹⁹ Ohori M., Kinoshita T., Okubo M., Sato K., Yamazaki A., Arakawa H., Nishimura S., Inamura N., Nakajima H., Neya M., Miyake H., Fujii T.: Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 336-57.

¹⁰⁰ Kinoshita T., Warizaya M., Ohori M., Sato K., Neya M., Fujii T.: Crystal structure of human ERK2 complexed with a pyrazolo[3,4-c]pyridazine derivative. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 55.

¹⁰¹ Aronov A.M., Baker C., Bemis G.W., Cao J., Chen G., Ford P.J., Germann U.A., Green J., Hale M.R., Jacobs M., Janetka J.W., Maltais F., Martinez-Botella G., Namchuk M.N., Straub J., Tang Q., Xie X.: Flipped Out: Structure-Guided Design of Selective Pyrazolylpyrrole ERK Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 1280-87.

¹⁰² Park H., Bahn Y.J., Jeong D.G., Woo E.J., Kwon J.S., Ryu S.E.: Identification of novel inhibitors of extracellular signal-regulated kinase 2 based on the structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 5372-76.

¹⁰³ Mebratu Y., Tesfaigzi Y.: How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*, **2009**, 8, 1168-75.

¹⁰⁴ Hagemann C., Rapp U.R.: Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell. Res.*, **1999**, 253, 34-46.

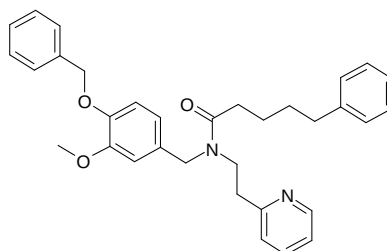
¹⁰⁵ Khazak V., Astsaturov I., Serebriiskii I.G., Golemis E.A.: Selective Raf inhibition in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2007**, 11, 1587-609.

¹⁰⁶ Beeram M., Patnaik A., Rowinsky E.K.: Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, 23, 6771-90.

¹⁰⁷ Wellbrock C., Karasarides M., Marais R.: The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 5, 875-85.

¹⁰⁸ Gollob J.A., Wilhelm S., Carter C., Kelley S.L.: Rôle of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin. Oncol.*, **2006**, 33, 392-406.

24).^{109,110} MP-110 a montré un effet anti prolifératif sur cellules cancéreuses et sur des modèles murins de cancers où la voie Raf/MEK/ERK est suractivée.¹¹¹ Il est actuellement en développement préclinique.



MCP110 : préclinique

Figure 24 : Structure de MCP-110, inhibiteur de l'interaction Ras-Raf

III-2.4.2 La stratégie antisens : les oligonucléotides et les ARN interférants

Les oligonucléotides antisens sont de courts fragments d'ADN synthétiques de 15 à 20 bases dont la séquence est complémentaire de celle d'un ARN messager (ARNm). L'hybridation de l'oligonucléotide antisens à sa cible empêche la traduction de l'ARNm en protéine. Dans un premier temps, deux oligonucléotides antisens dirigés contre C-Raf ont été développés : ISIS 5132 et LERafAON. ISIS 5132 est un oligonucléotide de 20 bases avec 19 liens internucléotidiques de type phosphorothioate. Ce composé a montré une activité antitumorale dans plusieurs études précliniques menées sur cellules et sur des modèles murins de cancers.^{112,113} Malheureusement, son développement s'arrêta en phase II car aucune

¹⁰⁹ Kato-Stankiewicz J., Hakimi I., Zhi G., Zhang J., Serebriiskii I., Guo L., Edamatsu H., Koide H., Menon S., Eckl R., Sakamuri S., Lu Y., Chen Q.Z., Agarwal S., Baumbach W.R., Golemis E.A., Tamanoi F., Khazak V.: Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2002**, 99, 14398-403.

¹¹⁰ Lu Y., Sakamuri S., Chen Q.Z., Keng Y.F., Khazak V., Illgen K., Schabbert S., Weber L., Menon S.R.: Solution phase parallel synthesis and evaluation of MAPK inhibitory activities of close structural analogues of a Ras pathway modulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 3957-62.

¹¹¹ Skobeleva N., Menon S., Weber L., Golemis E.A., Khazak V.: *In vitro* and *in vivo* synergy of MCP compounds with mitogen-activated protein kinase pathway- and microtubule-targeting inhibitors. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, 6, 898-906.

¹¹² Monia B.P., Sasnor H., Johnston J.F., Freier S.M., Lesnik E.A., Muller M., Geiger T., Altmann K.H., Moser H., Fabbro D.: Sequence-specific antitumor activity of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted to human C-raf kinase supports an antisense mechanism of action *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, 93, 15481-84.

¹¹³ Monia B.P., Johnston J.F., Geiger T., Muller M., Fabbro D.: Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase. *Nat. Med.*, **1996**, 2, 668-75.

réponse antitumorale ne fut observée.^{114,115,116} Un autre oligonucléotide antisens de C-Raf : le LERafAON cette fois ci encapsulé dans un liposome fut développé pour le protéger de la dégradation et améliorer sa biodisponibilité. Le LERafAON a montré une activité antitumorale sur les modèles de cancers murins¹¹⁷ et il a été évalué en phase I en monothérapie ou en combinaison avec d'autres anticancéreux.¹¹⁸ Les résultats obtenus de ces essais ont conduit au développement d'une nouvelle formulation liposomale qui est actuellement en cours d'évaluation.

Les ARN interférents (siRNA) sont de petits ARN double brin de 21-22 nucléotides. Les siRNAs (small interfering RNA) à l'état de double brin sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique nommé RISC (pour RNA induce silencing complex). Celui-ci s'active en libérant le brin complémentaire de l'ARN ou brin sens qui va reconnaître son transcrit cible, un ARNm. La conséquence est l'inhibition de la traduction de l'ARNm ciblé. Récemment, plusieurs siRNAs ont été développés contre la forme mutée de B-Raf V600E d'une part et C-Raf d'autre part. L'efficacité du siRNA ciblant B-Raf V600E a été démontrée dans le cancer papillaire de la thyroïde.¹¹⁹ D'autres résultats encourageants montrant l'efficacité antitumorale du siRNA ciblant C-Raf ont été obtenus dans des modèles de cancers de la prostate et du sein.¹²⁰ Ces résultats ouvrent des perspectives dans le développement de thérapeutiques ciblant les ARNms.

¹¹⁴ Oza A.M., Elit L., Swenerton K., Faught W., Ghatage P., Carey M., McIntosh L., Dorr A., Holmlund J.T., Eisenhauer E.: Phase II study of CGP 69846A (ISIS 5132) in recurrent epithelial ovarian cancer: an NCIC clinical trials group study (NCIC IND.116). *Gynecol. Oncol.*, **2003**, 89, 129–33.

¹¹⁵ Tolcher A.W., Reyno L., Venner P.M., Ernst S.D., Moore M., Geary R.S., Chi K., Hall S., Walsh W., Dorr A., Eisenhauer E.: A randomized phase II and pharmacokinetic study of the antisense oligonucleotides ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with hormonerefractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2002**, 8, 2530–35.

¹¹⁶ Cripps M.C., Figueredo A.T., Oza A.M., Taylor M.J., Fields A.L., Holmlund J.T., McIntosh L.W., Geary R.S., Eisenhauer E.A.: Phase II randomized study of ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with locally advanced or metastatic colorectal cancer: a National Cancer Institute of Canada clinical trials group study. *Clin. Cancer Res.*, **2002**, 8, 2188–2192.

¹¹⁷ Mewani R.R., Tang W., Rahman A., Dritschilo A., Ahmad I., Kasid U.N., Gokhale P.C.: Enhanced therapeutic effects of doxorubicin and paclitaxel in combination with liposomeentrapped ends-modified raf antisense oligonucleotide against human prostate, lung and breast tumor models. *Int. J. Oncol.*, **2004**, 24, 1181–88.

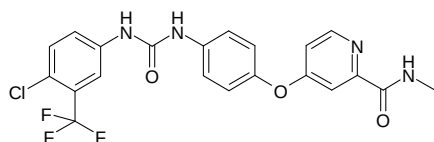
¹¹⁸ Rudin C.M., Marshall J.L., Huang C.H., Kindler H.L., Zhang C., Kumar D., Gokhale P.C., Steinberg J., Wanaski S., Kasid U.N., Ratain M.J.: Delivery of a liposomal c-raf-1 antisense oligonucleotide by weekly bolus dosing in patients with advanced solid tumors: a phase I study. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10, 7244–51.

¹¹⁹ Liu D., Liu Z., Condouris S., Xing M.: BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2007**, 92, 2264–71.

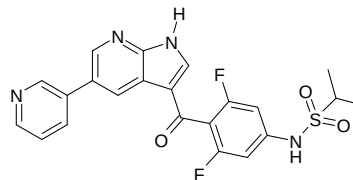
¹²⁰ Leng Q., Mixson A.J.: Small interfering RNA targetinf Raf-1 inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.*, **2005**, 12, 682–90.

III-2.4.3 Les inhibiteurs de l'activité kinase Raf

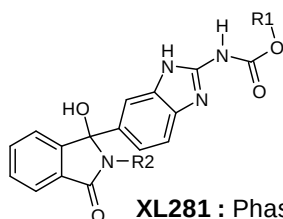
A ce jour, huit inhibiteurs de Raf sont en évaluation préclinique et clinique : Sorafenib, PLX4032, Raf265, XL281, ZM336372, AZ628, AAL881 et LBT613 (**Figure 25**).



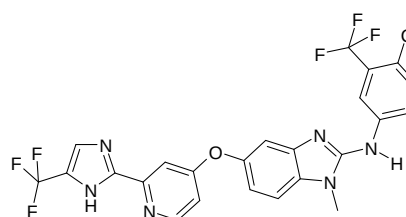
Sorafenib : Nexavar® RCC (2005), HCC (2007)
Phase II : NCSLS, thyroïde, tête et cou, sarcomes



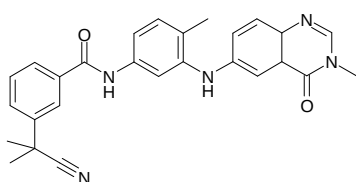
PLX4032 : phase I mélanomes



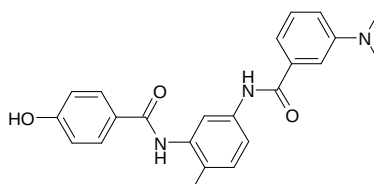
XL281 : Phase I tumeurs solides



Raf265 : phase I mélanomes



AZ628 : préclinique



ZM-336372 : préclinique

Figure 25 : Structures chimiques des inhibiteurs de Raf en phases clinique et préclinique. Les structures d'AAL-881 et de LBT-613 ne sont pas encore accessibles.

Le Sorafenib est à ce jour le seul inhibiteur de Raf utilisé en clinique. Il est important de noter que la plupart de ces inhibiteurs sont aussi actifs sur d'autres kinases ce qui soulève la question de savoir si leur efficacité antitumorale provient de l'inhibition de Raf ou d'autres kinase. Par exemple une étude a montré que le Sorafenib était actif sur plus de 60 kinases.¹²¹ A présent, la grande question est de savoir s'il faut augmenter ou diminuer la spécificité vis-à-vis de Raf pour améliorer l'index thérapeutique.¹²² Diminuer la spécificité permettrait de cibler plusieurs kinases oncogènes et pourrait améliorer l'efficacité antitumorale du composé. Augmenter la spécificité permettrait de savoir si Raf est une cible anticancéreuse pertinente d'une part et pourrait diminuer les effets toxiques liés au traitement d'autre part.

¹²¹ Fabian M.A., Biggs W.H. 3rd, Treiber D.K., Atteridge C.E., Azimioara M.D., Benedetti M.G., Carter T.A., Ciceri P., Edeen P.T., Floyd M., Ford J.M., Galvin M., Gerlach J.L., Grotzfeld R.M., Herrgard S., Insko D.E., Insko M.A., Lai A.G., Lélías J.M., Mehta S.A., Milanov Z.V., Velasco A.M., Wodicka L.M., Patel H.K., Zarrinkar P.P., Lockhart D.J.: A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.*, **2005**, 23, 329-36.

¹²² Ghoreschi K., Laurence A., O'Shea J.J.: Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nat. Immunol.*, **2009**, 10, 356-60.

Le Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®) est un composé disponible *per os* de la famille des bi-aryles urées développé par Bayer. Il fut le premier inhibiteur de cette classe à entrer en phase clinique. Il a été découvert à la suite d'un criblage haut débit réalisé sur Raf.¹²³ Wilhelm S. M. et ses collègues ont réalisé les études précliniques du Sorafenib. Les essais *in vitro* réalisés sur enzymes purifiées ont montré que le Sorafenib est un inhibiteur puissant de C-Raf, B-Raf et B-Raf V600E avec des valeurs d'IC₅₀ de 6, 22 et 38 nM respectivement.¹²⁴ Ils ont montré que le Sorafenib était aussi un puissant inhibiteur d'autres kinases : VEGFR-1, 2 et 3, Flt-3, p38 et c-Kit avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures à 70 nM. Ces mêmes auteurs ont montré que le Sorafenib réduit efficacement la phosphorylation de MEK et ERK sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses.¹²⁴ Le Sorafenib a été évalué sur un grand nombre de modèles murins de cancers (sein, côlon, rein, pancréas et thyroïde) et il a montré, selon les modèles, des activités antiproliférative, antiangiogénique et proapoptotique.^{125,126,127} Cependant l'activité tumorale du Sorafenib serait majoritairement due à son effet anti angiogénique *via* l'inhibition des VEGFRs. L'implication directe de l'inhibition de Raf reste encore à être élucidée. La mise sur le marché du Sorafenib a été obtenue en décembre 2005 pour le traitement des cancers du rein avancés (RCC)¹²⁸ et en décembre 2007 pour les cancers du foie inopérables (HCC).¹²⁹ Il est actuellement en phase II pour un grand nombre de types de cancers, soit en monothérapie, soit en combinaison avec d'autres anticancéreux.

Le PLX-4032 est un composé disponible *per os* de la famille des pyrrolo[2,3-*b*]pyridine ou 7-azaindole développé par Plexxicon et Roche. Il inhibe *in vitro* la forme

¹²³ Lyons J.F., Wilhelm S., Hibner B., Bollag G.: Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr. Relat. Cancer*, **2001**, 8, 219-25.

¹²⁴ Wilhelm S.M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L.E., Bollag G., Trail P.A.: BAY43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7099-7109.

¹²⁵ Chang Y.S., Adnane J., Trail P.A., Levy J., Henderson A., Xue D., Bortolon E., Ichetovkin M., Chen C., McNabola A., Wilkie D., Carter C.A., Taylor I.C., Lynch M., Wilhelm S.: Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and includes tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, 59, 561-74.

¹²⁶ Liu L., Cao Y., Chen C., Zhang X., McNabola A., Wilkie D., Wilhelm S., Lynch M., Carter C.: Sorafenib blocks the Raf/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 11851-58.

¹²⁷ Murphy D.A., Makonnen S., Lassoued W., Feldman M.D., Carter C., Lee W.M.: Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angionenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY46-9006). *Am. J. Pathol.*, **2006**, 169, 1875-85.

¹²⁸ Escudier B., Eisen T., Stadler W.M., Szczylik C., Oudard S., Siebels M., Negrier S., Chevreau C., Solska E., Desai A.A., Rolland F., Demkow T., Hutson T.E., Gore M., Freeman S., Schwartz B., Shan M., Simantov R., Bukowski R.M.: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **2007**, 356, 125-134.

¹²⁹ Kane R.C., Farrell A.T., Madabushi R., Booth B., Chattopadhyay S., Sridhara R., Justice R., Pazdur R.: Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Oncologist*, **2009**, 14, 95-100.

mutante de B-Raf V600E et B-Raf avec des valeurs d'IC₅₀ de 31 et 100 nM respectivement. Le PLX-4032 inhibe à des valeurs d'IC₅₀ submicromolaires la prolifération cellulaire dans les cancers de la thyroïde et les mélanomes portant la mutation B-Raf V600E.¹³⁰ Il est actuellement en phase I pour le traitement des mélanomes portant la mutation B-Raf V600E.

Le ZM-336372 fut la première molécule inhibitrice de Raf décrite dans la littérature : il inhibe *in vitro* C-Raf et B-Raf avec des valeurs d'IC₅₀ de 10 et 100 nM respectivement.¹³¹ C'est un composé de la famille des benzamides développé par AstraZeneca. Des résultats inattendus ont montré que ce produit induisait une activation paradoxale de la voie MAP kinase dans des essais cellulaires.¹³¹ Cet effet serait dû à l'inhibition d'autres kinases par ZM-336372. Bien que l'inhibition de la voie Raf/MEK/ERK soit associée à une induction de la mort des cellules cancéreuses, des travaux récents ont montré que l'activation de la voie induit aussi l'apoptose dans certains types de cancers ;¹³² pour cette raison, le développement de ZM-336372 a été repris.

L'AZ-628 est un composé de la famille des benzamides développé par AstraZeneca. Le cycle benzamide central est fonctionnalisé par une quinazolinone. Il inhibe *in vitro* B-Raf, B-Raf V600E et C-Raf et avec des valeurs d'IC₅₀ de 105, 34 et 29 nM respectivement.¹³³ Son profil de spécificité montre qu'il inhibe aussi d'autres protéines kinases telles que VEGFR, Lyn et Flt1. Les études précliniques sont en cours.

Raf-265(CHIR-45) est un composé disponible *per os* développé par Chiron et Novartis de la famille des benzimidazoles. Il inhibe *in vitro* B-Raf, B-Raf V600E et C-Raf et avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 3 et 60 nM.¹³⁴ Les études précliniques ont montré qu'il avait une activité antiproliférative dans les cancers où la voie MAP kinase est suractivée.¹³⁵ Raf-

¹³⁰ Sala E., Mologni L., Truffa S., Gaetano C., Bollag G.E., Gambacorti-Passerini C.: BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.*, **2008**, 6, 751-9.

¹³¹ Hall-Jackson C.A., Evers P.A., Cohen P., Goedert M., Boyle F.T., Hewitt N., Plant H., Hedge P.: Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chem. Biol.*, **1999**, 6, 559-68.

¹³² a) Van Gompel J.J., Kunnimalaiyaan M., Holen K., Chen H.: ZM336372, a Raf-1 activator, suppresses growth and neuroendocrine hormone levels in carcinoid tumor cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, 4, 910-7. b) Kappes A., Vaccaro A., Kunnimalaiyaan M., Chen H.: ZM336372, a Raf-1 activator, inhibits growth of pheochromocytoma cells. *J. Surg. Res.*, **2006**, 133, 42-5. c) Houben R., Ortmann S., Schrama D., Herold M.J., Berberich I., Reichardt H.M., Becker J.C.: Activation of the MAP kinase pathway induces apoptosis in the Merkel cell carcinoma cell line UISO. *J. Invest. Dermatol.*, **2007**, 127, 2116-22.

¹³³ Shen M., Wu A., Aquila B., Lyne P., Drew L. *et al.*: Linking molecular characteristics to the pharmacological response of a panel of cancer cell lines to the BRAF inhibitor, AZ628. Los Angeles, USA. *AACR 98th Meeting*, **2007**.

¹³⁴ Tsai J., Zhang J., Bremer R., Hirth A.P., Bollag G.: Development of a novel inhibitor of oncogenic B-Raf. Washington, DC, USA. *AACR 97th Meeting*, **2006**.

¹³⁵ Amiri P., Aikawa M.E., Dove J., Stuart D.D., Poon D., Pick T., Ramurthy S., Subramanian S., Levine B., Costales A., Harris A., Paul R.: CHIR-45 is a potent selective inhibitor of c-Raf/B-Raf/mutB-Raf that effectively

265 inhibe aussi d'autres kinases en particulier VEGFR-2 ce qui devrait lui conférer une activité antiangiogénique. Il est actuellement en phase I d'évaluation.

XL-281 est un composé disponible *per os* développé par Exelixis de la famille des benzimidazoles. Il inhibe spécifiquement *in vitro* B-Raf, B-Raf V600E et C-Raf.¹³⁶ XL281 a montré un effet antitumoral dans les modèles de cancers chez l'homme.¹³⁷ Il est actuellement en phase I pour le traitement des tumeurs solides.

L'AAL-881 et le LBT-613 sont des composés de la famille des isoquinolones, développés par Novartis. AAL-881 inhibe *in vitro* B-Raf V600E, B-Raf, et C-Raf avec des valeurs d'IC₅₀ de 220, 940 et 430 nM respectivement.¹³⁸ AAL-881 inhibe aussi d'autres protéines kinases dont VEGFR-2. Il a montré un fort effet antiprolifératif au niveau cellulaire et dans les modèles murins de cancers de la thyroïde et les glioblastomes.¹³⁹ LBT-613 possède une activité inhibitrice 10 fois plus grande qu'AAL-881.¹⁴⁰ Ces deux composés sont en cours d'évaluation préclinique.

IV/ Présentation du travail de thèse

Ce projet de thèse a été financé par l'InCa (Institut National du Cancer). C'est un projet **multidisciplinaire** basé sur une collaboration entre un laboratoire de biologie : le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, UPR 4301 CNRS) à Orléans et un laboratoire de chimie organique : l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA, UMR 6005 CNRS) à Orléans. Plus précisément, les travaux de thèse ont principalement été réalisés au sein de l'équipe de Françoise Schoentgen (directeur de recherche au CNRS) au CBM et au sein de l'équipe du professeur Jean-Yves Mérour à l'ICOA. Nos recherches ont aussi été

inhibits proliferation and survival of cancer cell lines with Ras/Raf pathway mutations. *AACR 97th Meeting*, **2006**.

¹³⁶ Anand N.K., Blazey C.M., Joshi A. A. *et al.*: Raf modulators and methods of use. US20080009488, 2008.

¹³⁷ Malek S.: Selective inhibition of RAF results in downregulation of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway and inhibition of tumor growth in vivo. Prague, *18th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*, **2006**.

¹³⁸ Sathornsumetee S., Hjelmeland A.B., Keir S.T., McLendon R.E., Batt D., Ramsey T., Yusuff N., Rasheed B.K., Kieran M.W., Laforme A., Bigner D.D., Friedman H.S., Rich J.N.: AAL881, a novel small molecule inhibitor of RAF and vascular endothelial growth factor receptor activities, blocks the growth of malignant glioma. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 8722-30.

¹³⁹ Mitsiades C.S., Negri J., McMullan C., McMillin D.W., Sozopoulos E., Fanourakis G., Voutsinas G., Tseleni-Balafouta S., Poulaki V., Batt D., Mitsiades N.: Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, 6, 1070-8.

¹⁴⁰ Ouyang B., Knauf J.A., Smith E.P., Zhang L., Ramsey T., Yusuff N., Batt D., Fagin J.A.: Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 1785-93.

subventionnées par le Cancéropôle Grand Ouest, la Ligue Nationale Contre le Cancer et la région Centre.

IV-1 La protéine kinase Raf choisie comme cible thérapeutique anticancéreuse

Pour remédier à la suractivation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK observée dans 30 % des cancers chez l'homme,^{83,90} nous avons choisi d'inhiber la protéine Raf. La protéine Raf est une protéine effectrice importante de Ras, elle se situe au centre de la voie MAP kinase régulant principalement la prolifération cellulaire (**Figure 21**).

IV-1.1 La famille des protéines Raf kinases et leur rôle dans le cancer

Le caractère proto-oncogène de C-Raf fut le premier à être mis en évidence chez la souris (v-raf),¹⁴¹ puis chez le poulet (vRmil).¹⁴² Ces travaux ont montré que ce gène était responsable de la transformation des cellules normales en cellules tumorales. Chaque isoforme possède 3 régions conservées (CR) en commun : CR1, CR2 et CR3 (**Figure 26**). CR1 contient le domaine de liaison à Ras (RBD) et le domaine riche en cystéines (CRD), CR2 est le domaine de régulation et CR3 est le domaine kinase. Au niveau structural, la partie N-terminale est composée des domaines CR1 et CR2 qui forme la boucle d'activation. La partie C-terminale comprend le domaine kinase.

Les isoformes de Raf possèdent des localisations tissulaires et subcellulaires différentes suggérant des fonctions différentes de celles-ci.^{143,144} En particulier, B- Raf et C- Raf sont exprimées de façon ubiquitaire contrairement à A-Raf. De plus, A- et C-Raf sont localisées de façon stable ou transitoire dans les mitochondries ce qui suggère leur rôle dans la régulation de l'apoptose.^{145,146}

¹⁴¹ Jansen H.W., Lurz R., Bister K., Bonner T.I., Mark G.E., Rapp U.R.: Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. *Nature*, **1984**, 307, 281-84.

¹⁴² Suttrave P., Bonner T.I., Rapp U.R., Jansen H.W., Patschinsky T., Bister K.: Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil: Homologue of murine retroviral oncogene v-raf. *Nature*, **1984**, 309, 85-8.

¹⁴³ Leicht D.T., Balan V., Kaplun A., Singh-Gupta V., Kaplun L., Dobson M., Tzivion G.: Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2007**, 1773, 1196-212.

¹⁴⁴ Chong H., Vikis H.G., Guan K.L.: Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell. Signal.*, **2003**, 15, 463-9.

¹⁴⁵ Mikula M., Schreiber M., Husak Z., Kucerovala L., R  th J., Wieser R., Zatloukal K., Beug H., Wagner E.F., Baccarini M.: Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J.*, **2001**, 20, 1952-62.

¹⁴⁶ Yuryev A., Ono M., Goff S.A., Macaluso F., Wennogle L.P.: Isoformspecific localization of A-RAF in mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, **2000**, 20, 4870-78.

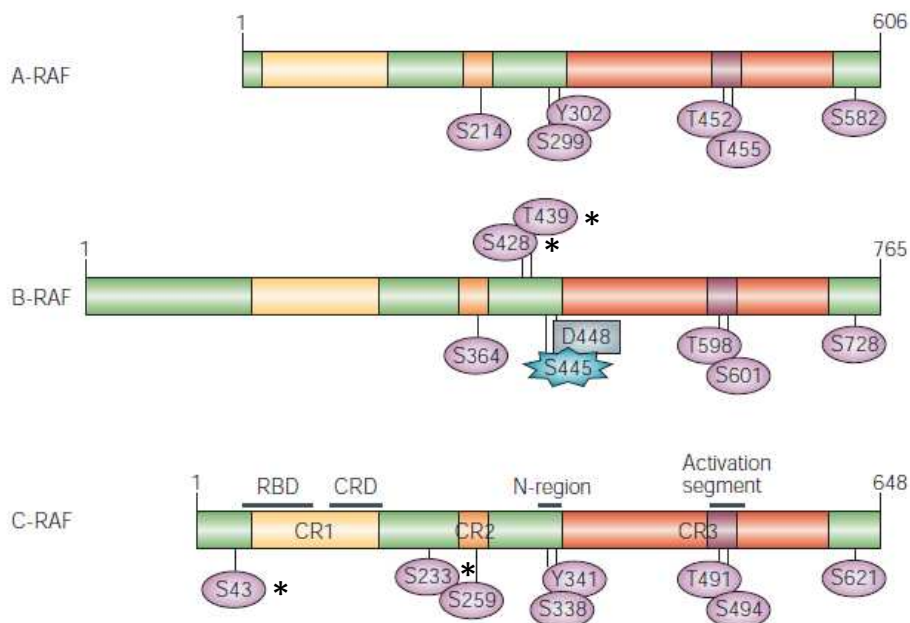


Figure 26 : La structure conservée des protéines Raf. Les 3 isoformes de Raf : A-Raf, B-Raf et C-Raf partagent 3 régions conservées CR1 (jaune), CR2 (orange) et CR3 (rouge). CR1 contient le domaine de liaison à Ras (RBD) et le domaine riche en cystéines (CRD) indispensable au recrutement de Raf à la membrane. CR2 est un domaine riche en sérine/thréonine et CR3 est le domaine catalytique kinase. Les principaux sites de phosphorylations impliqués dans la régulation de Raf sont conservés et indiqués. Les autres sites de phosphorylations non conservés sont marqués d'un astérisque. Deux sites conservés mais modifiés dans B-Raf sont marqués en bleu : S445 est constitutivement phosphorylée et la T341 conservée est remplacée par le résidu acide D448.⁸⁷

En particulier des études ont montré l'effet antiapoptotique de C-Raf en phosphorylant et inactivant la protéine BAD et en activant Bcl-2 ce qui empêche la libération de cytochrome c.^{147,148} Au niveau biochimique, B-Raf possède l'activité kinase basale la plus élevée vis-à-vis de la phosphorylation du substrat MEK suivi de C- puis A-Raf.¹⁴⁹ C-Raf et B-Raf sont à ce jour, les 2 isoformes les plus impliquées dans le cancer et par conséquent les plus étudiées. En 2002, la mutation oncogène de B-Raf V600E responsable de son activité catalytique constitutive a été identifiée dans 70 % des mélanomes.¹⁵⁰ Elle est aussi fréquemment présente

¹⁴⁷ Wang H.G., Rapp U.R., Reed J.C.: Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, 1996, 87, 629-38.

¹⁴⁸ Salomoni P., Wasik M.A., Riedel R.F., Reiss K., Choi J.K., Skorski T., Calabretta B.: Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-déficient BCR/ABL mutant. *J. Exp. Med.*, 1998, 187, 1995-2007.

¹⁴⁹ Mason C.S., Springer C.J., Cooper R.G., Superti-Furga G., Marshall C.J., Marais R.: Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J.*, 1999, 18, 2137-48.

¹⁵⁰ Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner

dans les cancers de la thyroïde, des ovaires et colorectal.¹⁵¹ Cependant ces cancers ne représentent qu'une petite fraction (8 %) des cancers chez l'homme où Raf jouerait un rôle. Concernant C-Raf, un nombre très limité de mutations oncogènes ont été identifiées et aucune pour A-Raf malgré des recherches intensives.^{152,153,154} La majorité des cancers impliquant une suractivation de la voie Raf/MEK/ERK, ne porte pas de mutations de Raf mais des mutations au niveau de Ras ou des récepteurs aux facteurs de croissance. Par conséquent, le rôle important de Raf-1 dans le cancer est bien établi par sa capacité à transmettre les signaux oncogènes provenant de Ras et des récepteurs aux facteurs de croissance^{155,156,157,158} et par les nombreuses études qui ont démontré que le blocage de C-Raf, *via* des ARN antisens, des siRNAs ou des molécules inhibitrices, entraîne une réversion de la transformation des cellules induite par la protéine oncogène Ras.^{159,160,161,162}

IV-1.2 La régulation des kinases Raf

La plupart des connaissances actuelles sur la régulation des protéines Raf portent sur C-Raf et B-Raf. La première étape indispensable à l'activation de Raf est sa liaison à Ras *via*

D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **2002**, 417, 949–54.

¹⁵¹ Madhunapantula S.V., Robertson G.P.: Is B-Raf a good therapeutic target for melanoma and other malignancies? *Cancer Res.*, **2008**, 68, 5-8.

¹⁵² Zebisch A., Staber P.B., Delavar A., Bodner C., Hiden K., Fischereder K., Janakiraman M., Linkesch W., Auner H.W., Emberger W., Windpassinger C., Schimek M.G., Hoefler G., Troppmair J., Sill H.: Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 3401-8.

¹⁵³ Heidecker G., Huleihel M., Cleveland J.L., Kolch W., Beck T.W., Lloyd P., Pawson T., Rapp U.R.: Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol. Cell Biol.*, **1990**, 10, 2503-12.

¹⁵⁴ Fransén K., Klintonäs M., Osterström A., Dimberg J., Monstein H.J., Söderkvist P.: Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, **2004**, 25, 527-33.

¹⁵⁵ Weinstein-Oppenheim C.R., Blalock W.L., Steelman L.S., Chang F., McCubrey J.A.: The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, 88, 229-79.

¹⁵⁶ Kolch W., Kotwaliwale A., Vass K., Janosch P.: The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev. Mol. Med.*, **2002**, 1–18.

¹⁵⁷ Repasky G.A., Chenette E.J., Der C.J.: Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.*, **2004**, 14, 639–47.

¹⁵⁸ McPhillips F., Mullen P., MacLeod K.G., Sewell J.M., Monia B.P., Cameron D.A., Smyth J.F., Langdon S.P.: Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor-stimulated growth in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, **2006**, 27, 729–39.

¹⁵⁹ Cuadrado A., Bruder J.T., Heidaran M.A., App H., Rapp U.R., Aaronson S.A.: H-ras and raf-1 cooperate in transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, **1993**, 8, 2443–48.

¹⁶⁰ Kasid U., Dritschilo A.: RAF antisense oligonucleotide as a tumor radiosensitizer. *Oncogene*, **2003**, 22, 5876–84.

¹⁶¹ Leng Q., Mixson A.J.: Small interfering RNA targeting Raf-1 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.*, **2005**, 12, 682–90.

¹⁶² Kim J.S., Lee C., Foxworth A., Waldman T.: B-Raf is dispensable for K-Ras-mediated oncogenesis in human cancer cells. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 1932–37.

son domaine CR1 (RBD et CRD) ce qui entraîne son recrutement à la membrane cellulaire. Raf subit ensuite une série de phosphorylations à des sites spécifiques qui sont représentés pour chaque isoforme sur la **Figure 26**. Les principaux sites de phosphorylation sont conservés dans les 3 isoformes de Raf. Les sites de régulation non conservés sont marqués d'un astérisque. A-Raf et C-Raf existent sous une forme inactive où les résidus S259 et S621 (numérotation pour C-Raf) sont phosphorylés et liés à la protéine 14-3-3.¹⁶³ La liaison de Raf à Ras déplace la protéine 14-3-3, ce qui libère l'accès aux sites S259 et S621 qui sont déphosphorylés par des phosphatases. S259 est aussi un site de phosphorylation de Raf par les protéines PKA et PKB (ou Akt) permettant la régulation négative de Raf. S43 et S233 sont aussi des sites de régulation négative de C-Raf par la PKA.¹⁶⁴

Pour être active, C-Raf est phosphorylée au niveau de 4 autres sites : S338, Y341, T491 et S494. Les sites S338 et Y341 sont les plus importants pour l'activité, ils sont situés dans la région N-terminale du domaine kinase. La S338 est phosphorylée par la protéine kinase PAK et Y341 par les kinases de la famille Src (par exemple Src, JAK). Le site homologue de S338 chez B-Raf, S445 est constitutivement phosphorylé tandis que le site Y341 est remplacé par un résidu acide : D448 dont la charge négative mime une phosphorylation. Ces 2 raisons expliquent que l'activité basale de B-Raf est plus importante par rapport aux 2 autres isoformes. Les sites S445 et D448 ont été renumérotés récemment S446 et D449 après la découverte d'une erreur dans l'assignement des acides aminés à partir de la séquence nucléotidique de B-Raf. Les 2 autres sites d'activation T491 et S494 conservés aussi dans A-Raf (T452, T455) et B-Raf (T458, S601), sont situés dans la boucle d'activation (**Figure 26**)¹⁶⁵ mais les protéines kinases à l'origine de leur phosphorylation ne sont pas encore connues. La mutation V600E (nommée auparavant V599E) de B-Raf la plus fréquemment observée dans les cancers se situe dans la boucle d'activation et induit une activation constitutive de B-Raf.¹⁵⁰ Une fois activées, B-Raf et C-Raf phosphorylent les deux isoformes de MEK : MEK-1 et MEK-2 sur ses deux résidus sérines respectivement 218/222 et 222/226 tandis que A-Raf active seulement MEK-1. A ce jour d'autres protéines substrats sont connues pour C-Raf. Elle phosphoryle des protéines impliquées dans la régulation de

¹⁶³ Chong H., Vikis H.G., Guan K.L.: Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.*, **2003**, 15, 463-9.

¹⁶⁴ Dumaz N., Light Y., Marais R.: Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1 independent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, **2002**, 22, 3717-28.

¹⁶⁵ Chong H., Lee J., Guan K.L.: Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J.*, **2001**, 20, 3716-27.

l'apoptose telles qu'I κ B et ASK-1.¹⁶⁶ La phosphorylation d'I κ B induit la libération du facteur de transcription NF- κ B.¹⁶⁷ C-Raf phosphoryle aussi des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire¹⁶⁸ : BAD, Bcl-2¹⁴⁷ et la protéine du rétinoblastome (Rb),¹⁶⁹ p53¹⁷⁰ et Cdc25.¹⁷¹

IV-2 Le projet

Pour remédier à la suractivation de la voie de signalisation MAP-kinase Raf/MEK/ERK observée dans 30 % des cancers chez l'homme, nous avons choisi d'inhiber l'isoforme C-Raf (ou Raf-1). Pour y parvenir, nous avons envisagé 2 stratégies. La première approche consiste à synthétiser des molécules inhibitrices de l'activité kinase de Raf. La deuxième approche serait la synthèse de mimes peptidiques de son inhibiteur naturel, la PEBP, pour reproduire l'interaction Raf/PEBP. Afin de tester les molécules potentiellement inhibitrices synthétisées au cours de la thèse, nous avons effectué nous-mêmes la mise au point des tests d'activité kinases sur C-Raf d'une part et sur la triple cascade Raf/MEK/ERK d'autre part. La mise au point d'un test sur la cascade complète présente l'avantage de pouvoir identifier des inhibiteurs de Raf mais aussi de MEK ou ERK. Une fois leur mise au point terminée, ces tests ont été mis à la disposition d'autres équipes de chimistes du Cancéropôle Grand Ouest. Les inhibiteurs potentiels ont aussi été évalués *in vitro* en collaboration avec le Dr Christiane Guillouzo (directrice de recherche, unité Inserm 522, Rennes) sur des lignées de cellules cancéreuses afin de mesurer leur cytotoxicité (capacité à tuer les cellules cancéreuses).

Le travail de cette thèse s'est déroulé suivant trois axes principaux : 1) la conception rationnelle et la synthèse des inhibiteurs de Raf-1 à structure 4-azaindolique, 2) l'évaluation biologique des inhibiteurs synthétisés et 3) la synthèse de peptides issus de Raf-1 pour l'étude de l'interaction Raf/PEBP. La conception rationnelle des inhibiteurs de Raf a été effectuée au

¹⁶⁶ Chen J., Fujii K., Zhang L., Roberts T., Fu H.: Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2001**, 98, 7783–88.

¹⁶⁷ Li S., Sedivy J.M.: Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, 90, 9247–51.

¹⁶⁸ Kerkhoff E., Rapp U.R.: Cell cycle targets of Ras/Raf signalling, *Oncogene*, **1998**, 17, 1457–62.

¹⁶⁹ Wang S., Ghosh R.N., Chellappan S.P.: Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation, *Mol. Cell. Biol.*, **1998**, 18, 7487–98.

¹⁷⁰ Jamal S., Ziff E.B.: Raf phosphorylates p53 in vitro and potentiates p53-dependent transcriptional transactivation *in vivo*. *Oncogene*, **1995**, 10, 2095–2101.

¹⁷¹ Galaktionov K., Jessus C., Beach D.: Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation, *Genes Dev.*, **1995**, 9, 1046–58.

sein de l'équipe de Jean-Yves Mérour (professeur de chimie émérite), actuellement dirigée par le professeur Sylvain Routier. En effet, cette équipe est spécialisée dans la chimie des hétérocycles azot  s¹⁷² (indole, pyridine, pyrido/ pyrimido pyridine, azaindole, triazine et autres) qu'elle applique à la synthèse d'inhibiteurs de protéines kinases.¹⁷³ La mise au point des tests et l'évaluation de l'activité inhibitrice des molécules synthétisées, de même que la partie mimes topologiques de l'interaction Raf/PEBP ont été réalisés au sein de l'équipe du Dr Françoise Schoentgen. Cette équipe est spécialisée dans l'étude structurale et fonctionnelle de PEBP/RKIP¹⁷⁴ et l'étude des interactions ligands/PEBP.¹⁷⁵

Pour réaliser ce projet, nous avons aussi développé trois autres collaborations. Une collaboration avec Stéphane Bourg (ingénieur d'étude à l'ICOA) a été établie dès le début du projet pour la partie modélisation moléculaire consistant en la création d'un modèle *in silico* de C-Raf pour la conception rationnelle des inhibiteurs et pour l'étude de l'interaction Raf/PEBP. La conception d'inhibiteurs mimant la PEBP nécessite en amont un gros travail de modélisation de l'interaction Raf/PEBP car il existe à ce jour peu d'informations structurales et moléculaires sur le mécanisme d'inhibition de Raf par la PEBP. D'autre part, pour tenter d'apporter de nouveaux éléments structuraux de l'interaction Raf/PEBP, nous avons entrepris

¹⁷² a) Chiurato M., Routier S., Troin Y., Guillaumet G.: New efficient route to fused aryltetrahydroindolizines via N-acyliminium intermediates. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 18, 3011-21. b) Pellegatti L., Vedrenne E., Leger J-M., Jarry C., Routier S.: First efficient palladium-catalyzed aminations of pyrimidines, 1,2,4-triazines and tetrazines by original methyl sulfur release. *Synlett*, **2009**, 13, 2137-42. c) Popowycz F., Routier S., Joseph B., Mérour J-Y.: Synthesis and reactivity of 7-azaindole (1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine). *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1031-64. d) Popowycz F., Mérour J.Y., Joseph B.: Synthesis and reactivity of 4-, 5-, 6-azaindoles. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 8689-8707. e) Tikad A., Routier S., Akssira M., Leger J-M., Jarry C., Guillaumet G.: Efficient Access to Novel Mono- and Disubstituted Pyrido[3,2-d]pyrimidines. *Synlett*, **2006**, 12, 1938-42. f) Routier S., Mérour J-Y., Dias N., Lansiaux A., Bailly C., Lozach O., Meijer L.: Synthesis and biological evaluation of novel phenylcarbazoles as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 789-99. g) Touzeau F., Arrault A., Guillaumet G., Scalbert E., Pfeiffer B., Rettori M-C., Renard P., Mérour J-Y.: Synthesis and biological evaluation of new 2-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine derivatives. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 1962 - 79.

¹⁷³ a) Jacquemard U., Dias N., Lansiaux A., Bailly C., Loge C., Robert J-M., Lozach O., Meijer L., Mérour J-Y., Routier S.: Synthesis of 3,5- bis(2-indolyl)pyridine and 3-[(2-Indolyl)-5-phenyl]pyridine derivatives as CDK inhibitors and cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 4932-53.

b) Lefoix M., Coudert G., Routier S., Pfeiffer B., Caignard D.H., Hickman J., Pierr   A., Golsteyn R.M., L  once S., Bossard C., Mérour J-Y.: Novel 5-azaindolocarbazoles as cytotoxic agents and Chk1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 5303-21.

¹⁷⁴ a) Rautureau G., Jouv  nsal L., Decoville M., Locker D., Vovelle F., Schoentgen F.: Cloning, high yield over-expression, purification, and characterization of CG18594, a new PEBP/RKIP family member from *Drosophila melanogaster*. *Protein Expr. Purif.*, **2006**, 48, 90-7. b) Serre L., Vallée B., Bureaud N., Schoentgen F., Zelwer C.: Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain : a novel structural class of phospholipids binding proteins. *Structure*, **1998**, 6, 1255-65.

¹⁷⁵ a) Atmanene C., Laux A., Glattard E., Muller A., Schoentgen F., Metz-Boutigue M.H., Aunis D., Van Dorselaer A., Stefano G.B., Sanglier-Cianf  rani S., Goumon Y.: Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med. Sci. Monit.*, **2009**, 15, 178-87. b) Schoentgen F., Jollès P.: From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett.*, **1995**, 369, 22-6.

la synthèse de peptides issus de Raf-1. Ce travail a été effectué au sein de l'équipe d'Agnès Delmas au CBM, spécialisée dans la synthèse peptidique.¹⁷⁶ Les études de l'interaction des peptides de Raf-1 avec la PEBP humaine ont été réalisées au CBM par RMN (équipe de Françoise Vovelle et Christian Damblon¹⁷⁷) et par spectrométrie de masse (équipe de Martine Cadène¹⁷⁸). Ces études devraient apporter de nouveaux éléments concernant le mécanisme moléculaire d'inhibition de la PEBP et par la suite, ouvrir des voies vers la synthèse de nouveaux inhibiteurs mimant l'action de PEBP.

V/ Conception rationnelle d'inhibiteurs de Raf-1

Pour concevoir nos inhibiteurs de Raf-1 de façon rationnelle, nous avons pris connaissance dans un premier temps des données structurales décrites dans la littérature concernant les protéines kinases et les stratégies utilisées pour le développement d'inhibiteurs de kinases. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés plus précisément aux informations structurales concernant notre cible Raf afin de définir les pré-requis structuraux pour élaborer notre pharmacophore.

V-1 La structure conservée des protéines kinases

A ce jour, il existe plus de 118 structures de protéines kinases déposées dans la protéine data bank.^{179,180} La comparaison de ces différentes structures a montré que les domaines catalytiques des protéines kinases étaient très conservés aussi bien au niveau de leur séquence en acides aminés qu'au niveau de leur structure tridimensionnelle.¹⁸¹ Le domaine kinase est composé de deux lobes : le lobe N-terminal et le lobe C-terminal (**Figure 27 A**). Le

¹⁷⁶ a) Jacquin O., Balbeur D., Damblon C., Marchot P., De Pauw E., Roberts G.C., Frère J.M., Matagne A.: Positively Cooperative Binding of Zinc Ions to *Bacillus cereus* 569/H/9 beta-Lactamase II Suggests that the Binuclear Enzyme Is the Only Relevant Form for Catalysis. *J. Mol. Biol.*, 2009. b) Rautureau G., Jouvencal L., Schoentgen F., Vovelle F.: ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments of CG7054, a new PEBP from *Drosophila melanogaster*. *J. Biomol. NMR*, **2007**, 38, 187.

¹⁷⁷ Cremer G.A., Jariq H., Delmas A.F.: Combining a polar resin and a pseudo-proline to optimize the solid-phase synthesis of a "difficult sequence". *J. Pept. Sci.*, **2006**, 12, 437-42.

¹⁷⁸ Seibert C., Cadene M., Sanfiz A., Chait B.T., Sakmar T.P.: Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2002**, 99, 11031-6.

¹⁷⁹ Marsden B.D., Knapp S.: Doing more than just the structure-structural genomics in kinase drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, 12, 40-5.

¹⁸⁰ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

¹⁸¹ Huse M., Kuriyan J.: The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, **2002**, 109, 275-82.

lobe *N*-terminal est constitué de cinq brins β et d'une hélice appelée α C. Le lobe *C*-terminal est composé majoritairement d'hélices α . Entre les deux lobes se trouve une région charnière (*hinge region*) où se trouve la poche ATP. La majorité des petites molécules inhibitrices de kinases cible le site ATP.¹⁸² Par conséquent, une bonne compréhension du site ATP est essentielle pour le design des inhibiteurs. Le site ATP est divisé en plusieurs parties (**Figure 27 B**):

- (1) **Le site de liaison de l'adénine** : L'adénine interagit avec la région charnière en formant 2 liaisons hydrogènes.
- (2) **Le site de fixation du sucre** : c'est une région hydrophile dans la plupart des protéines kinases.
- (3) **Le site de liaison des groupements phosphates de l'ATP** : c'est une région très exposée au solvant qui interagit avec une boucle très conservée appelée P loop (ou G loop) située au dessus. Cette boucle possède un motif conservé riche en glycines (G) : GXGXØG où X peut être n'importe quel acide aminé et Ø une tyrosine ou une phénylalanine. La majorité des inhibiteurs de kinases n'exploite pas les sites de fixation du ribose et des phosphates sauf quelques exceptions par exemple AZD0530 un nouvel inhibiteur de Src et Abl.
- (4) **La poche hydrophobe I** : cette poche n'est pas occupée par l'ATP mais elle est exploitée par la plupart des inhibiteurs de kinases. Elle joue un rôle important dans la sélectivité des inhibiteurs. La taille et l'accès à cette poche est contrôlée par un résidu hydrophobe appelé ; « gatekeeper ».
- (5) **La poche hydrophobe II** : cette poche n'est pas occupée par l'ATP, elle peut être exploitée pour gagner de l'affinité avec les inhibiteurs.

Entre les deux lobes, du côté opposé de la région charnière se trouve la boucle d'activation où se situe les résidus à phosphoryler (sérine, thréonine ou tyrosine) pour activer la kinase et le motif très conservé DFG (aspartate, phénylalanine, glycine). Cette boucle change de conformation selon qu'elle est phosphorylée ou non. En effet, les protéines kinases peuvent adopter au moins deux conformations appelées « DFG in » ou forme active correspondant au maximum d'activité et « DFG out » ou forme inactive correspondant à l'activité minimale. A l'état inactif, la boucle se loge dans le site actif ce qui bloque la liaison du substrat et de l'ATP. La conformation « DFG out » libère une poche hydrophobe qui peut être ciblée par des inhibiteurs notamment pour augmenter leur sélectivité. A l'état actif, la boucle se déplace du centre du site actif libérant l'accès au substrat et à l'ATP. Ce changement de conformation induit aussi la bonne orientation du motif DFG pour la catalyse.

Le transfert du phosphate nécessite un arrangement optimal dans l'espace de plusieurs résidus catalytiques qui sont conservés dans toutes les kinases. Il s'agit de l'aspartate (D) du

¹⁸² Zhang J., Yang P.L., Gray N.S.: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, **2009**, 9, 28-39.

motif DFG, d'une asparagine (N) située aussi sur la boucle d'activation, d'une lysine (K) située dans le lobe *N*-terminal, et d'un résidu glutamate (E) appartenant à l'hélice α C.

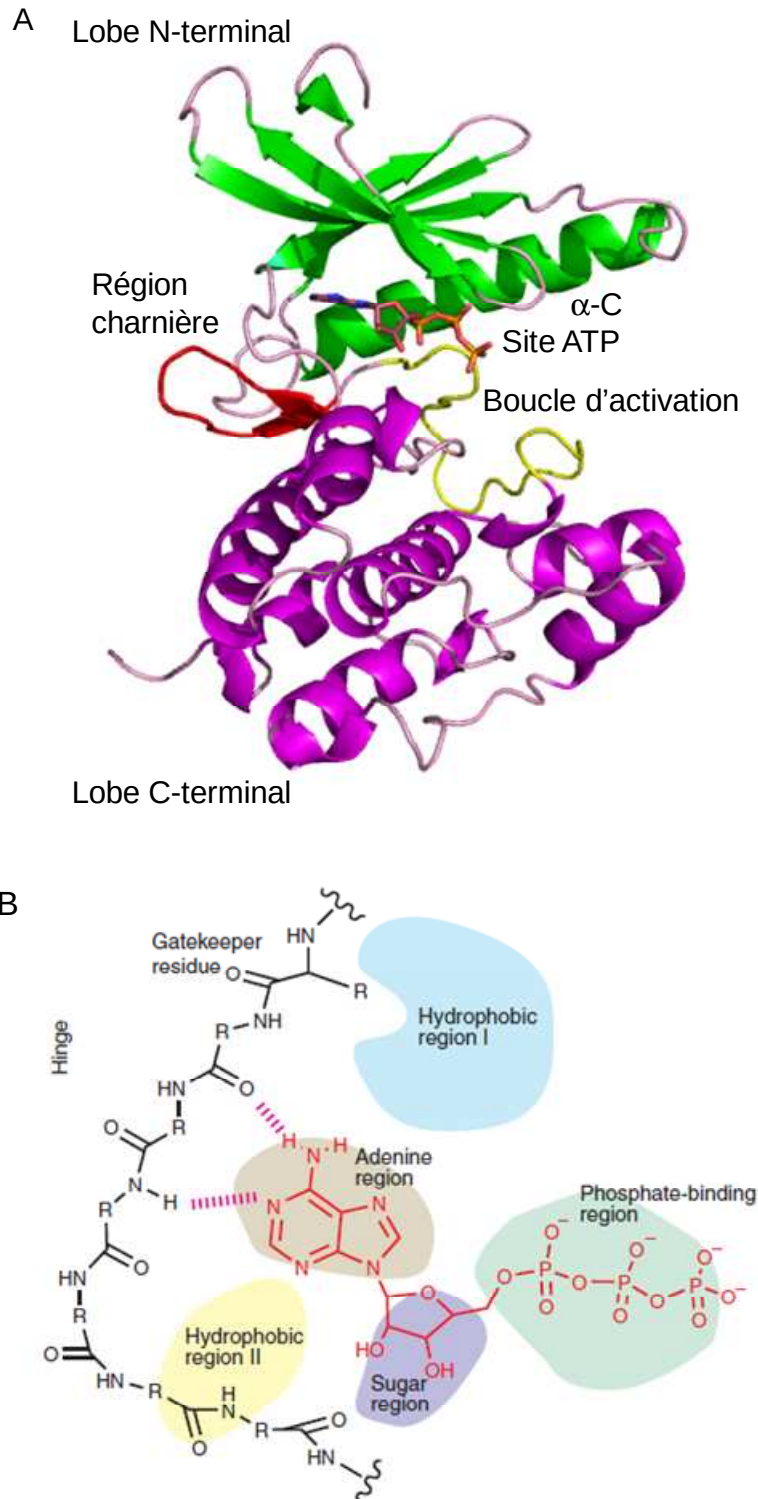


Figure 27 : Structure des protéines kinases (A) Structure tridimensionnelle conservée des protéines kinases (code pdb : 1PHK), (B) Représentation schématique de la poche ATP.¹⁸²

V-2 Les différents types d'inhibiteurs de kinases

Les différents inhibiteurs sont classés selon leur mode d'interaction. On distingue quatre types d'inhibiteur.¹⁸³

- **Le type I** : Il s'agit des inhibiteurs ATP compétitifs, ils ciblent la forme active de la kinase. C'est la classe la plus représentée. Ils sont le plus souvent identifiés par des criblages sur enzymes purifiées. Les inhibiteurs du type I sont constitués généralement d'un hétérocycle central (quinazolines, pyrimidines, purines, imidazoles, pyrazoles, quinolines, oxindoles) qui occupe le site de l'adénine (**Figure 28**).¹⁸⁴ Ce cycle est ensuite fonctionnalisé pour occuper les poches hydrophobes I et II afin de gagner en sélectivité (**Figure 29 A**). Par exemple : le triarylimidazole SB203580 est un inhibiteur de p38,¹⁸⁵ PD166326 est un inhibiteur de Abl 1.¹⁸⁶

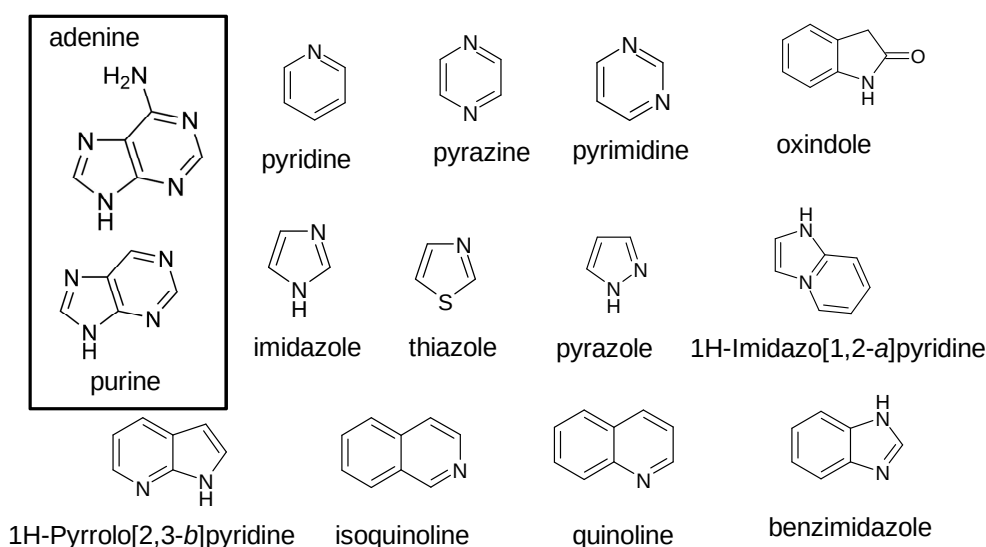


Figure 28 : Exemples d'analogues hétérocycliques de l'adénine utilisés pour la synthèse d'inhibiteurs de kinases de type I et II.

- **Le type II** : Les inhibiteurs du type II reconnaissent la conformation inactive de la kinase. Ils se fixent dans la poche ATP et dans un site hydrophobe adjacent à la poche ATP

¹⁸³ Liu Y., Gray N.S.: Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, 2, 358-64.

¹⁸⁴ Ghose A.K., Herbertz T., Pippin D.A., Salvino J.M., Mallamo J.P.: Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 5149-71.

¹⁸⁵ Wilson K.P., McCaffrey P.G., Hsiao K., Pazhanisamy S., Galullo V., Bemis G.W., Fitzgibbon M.J., Caron P.R., Murcko M.A., Su M.S.: The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chem Biol.*, **1997**, 4, 423-31.

¹⁸⁶ Nagar B., Hantschel O., Young M.A., Scheffzek K., Veach D., Bornmann W., Clarkson B., Superti-Furga G., Kuriyan J.: Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, **2003**, 112, 859-71.

créé par la conformation « DFG-out ». Les résidus formant la poche adjacente sont moins conservés ce qui favorise le gain en sélectivité. Ils sont identifiés en général par des criblages sur enzymes purifiées et sur cellules. Les inhibiteurs de type II possèdent une partie hétérocyclique liant la poche ATP, un système donneur/accepteur de liaison hydrogène (amides, urée) bloquant les résidus catalytiques (le plus souvent D du motif DFG et E de l'hélice α C) et une partie hydrophobe liant le site allostérique (**Figure 29 B**). Parmi les inhibiteurs de type II, on distingue le Sorafenib¹⁸⁷ (inhibiteur de Raf), l'imatinib¹⁸⁸ (inhibiteur de Bcr-Abl), BIRB796¹⁸⁹ (inhibiteur de p38).

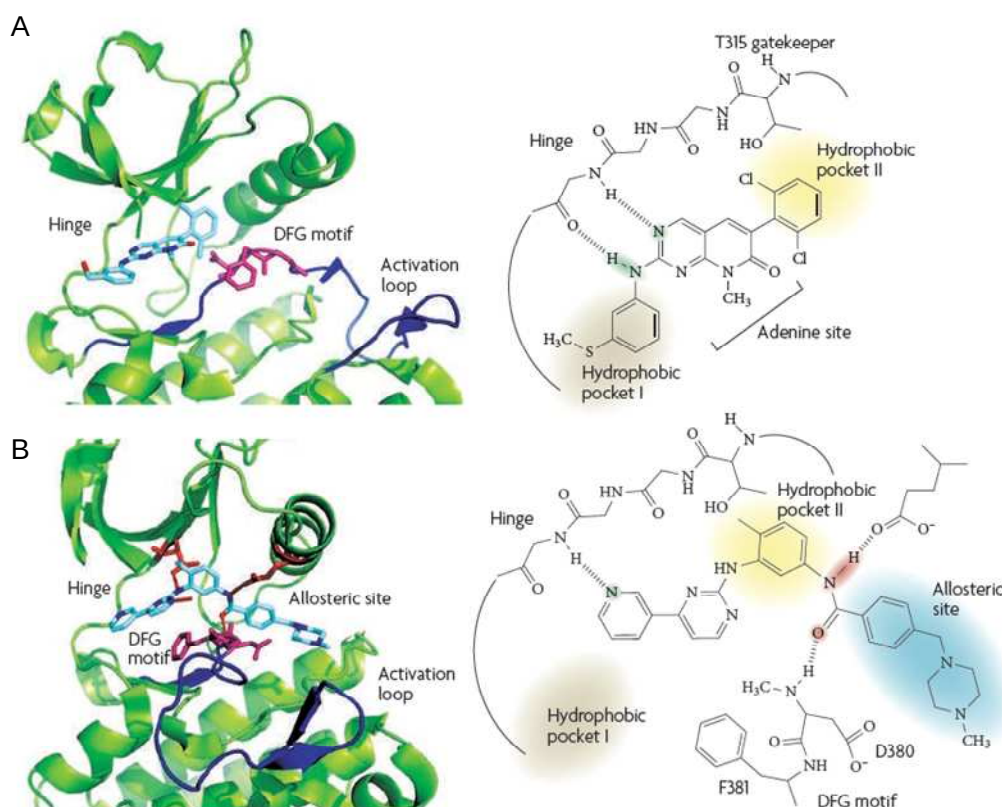


Figure 29 : Mode de liaison des inhibiteurs de kinases.¹⁸² (A) Conformation DFG-in de Abl 1 en présence de son inhibiteur de type I PD166326 (code PDB : 1OPK). (B) Conformation DFG-out de Abl 1 en présence de son inhibiteur de type II imatinib (Glivec®) (code PDB : 1IEP).

¹⁸⁷ Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V.M., Jones C.M., Marshall C.J., Springer C.J., Barford D., Marais R.: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, **2004**, 116, 855–67.

¹⁸⁸ Nagar B., Bornmann W.G., Pellicena P., Schindler T., Veach D.R., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J.: Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.*, **2002**, 62, 4236–43.

¹⁸⁹ Regan J., Breitfelder S., Cirillo P., Gilmore T., Graham A.G., Hickey E., Klaus B., Madwed J., Moriak M., Moss N., Pargellis C., Pav S., Proto A., Swinamer A., Tong L., Torcellini C.: Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2994–3008.

- Le type III : Les inhibiteurs allostériques, ils se fixent à l'extérieur du site ATP. Ce sont des inhibiteurs très spécifiques car ils ciblent des régions impliquées dans la régulation spécifique de la kinase d'intérêt. Dans le futur, plus d'inhibiteurs allostériques devraient être découverts grâce notamment au développement des techniques de criblage sur cellules. Parmi les inhibiteurs allostériques, on peut citer CI-1040 (MEK1/2)¹⁹⁰ et BMS-345541 (IKK) (Figure 30).¹⁹¹

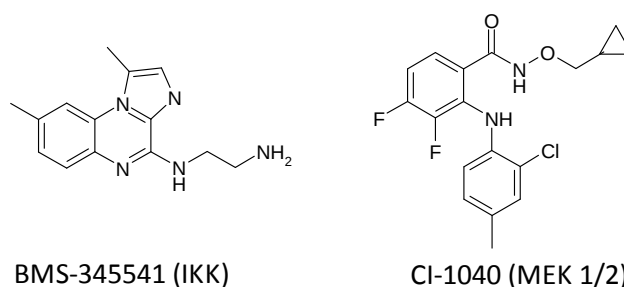


Figure 30 : Exemple de deux inhibiteurs de kinases de type III

- Le type IV : Les inhibiteurs covalents, ils forment une liaison covalente, irréversible dans le site actif. La plupart du temps, ils réagissent avec un résidu nucléophile, une cystéine située à proximité du site de l'ATP.¹⁹² Plusieurs inhibiteurs covalents de l'EGFR sont en cours d'évaluation clinique dont HKI-272 et CL-387785 (Figure 31).¹⁹³

¹⁹⁰ Ohren J.F., Chen H., Pavlovsky A., Whitehead C., Zhang E., Kuffa P., Yan C., McConnell P., Spessard C., Banotai C., Mueller W.T., Delaney A., Omer .C., Sebolt-Leopold J., Dudley D.T., Leung I.K., Flamme C., Warmus J., Kaufman M., Barrett S., Tecle H., Hasemann C.A.: Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **2004**, 11, 1192–97.

¹⁹¹ McIntyre K.W., Shuster D.J., Gillooly K.M., Dambach D.M., Pattoli M.A., Lu P., Zhou X.D., Qiu Y., Zusi F.C., Burke J.R.: A highly selective inhibitor of I κ B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.*, **2003**, 48, 2652–59.

¹⁹² Cohen M.S., Zhang C., Shokat K.M., Taunton J.: Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science*, **2005**, 308, 1318–21.

¹⁹³ Kwak E.L., Sordella R., Bell D.W., Godin-Heymann N., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Driscoll D.R., Fidias P., Lynch T.J., Rabindran S.K., McGinnis J.P., Wissner A., Sharma S.V., Isselbacher K.J., Settleman J., Haber D.A.: Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2005**, 102, 7665–70.

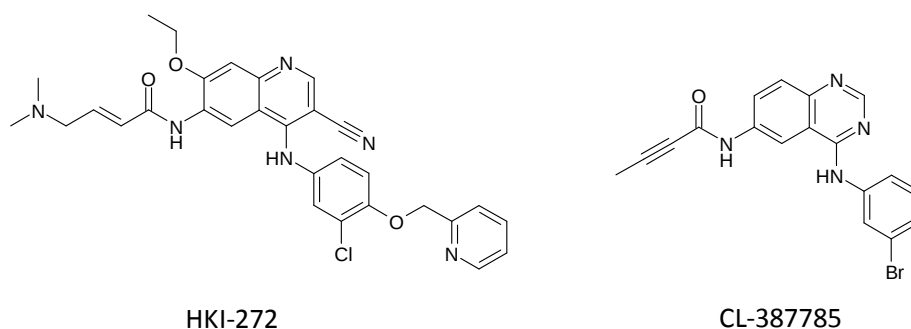


Figure 31 : Inhibiteurs covalents de l'EGFR

V-3 Les différentes familles chimiques des inhibiteurs de Raf

Plusieurs composés ont été décrits dans la littérature comme des inhibiteurs potentiels de Raf depuis une dizaine d'années.¹⁹⁴ A ce jour, ces composés peuvent être classés en 6 familles : la famille des urées et composés apparentés, la famille des imidazoles et molécules apparentées, les benzamides, les oxindoles, les pyrazines et les azaindoles ou pyrrolopyridines.

V-3.1 La famille des urées et composés apparentés

La fonction urée est très utilisée pour la conception des inhibiteurs de kinases,¹⁹⁵ elle a été la première classe validée cliniquement pour Raf avec la mise sur le marché du Sorafenib. Le premier hit de cette classe fut découvert par le groupe Bayer à l'issue d'un criblage haut-débit sur Raf-1 et reporté en 2001 (**Tableau 1**, entrée 1).¹⁹⁶ C'est un inhibiteur d'activité modeste (IC_{50} Raf = 17 μ M) par conséquent, Bayer s'est lancé dans une grande campagne d'optimisation de ce hit qui a abouti à la découverte du Sorafenib.¹⁹⁷ Par la suite, d'autres groupes ont développé d'autres aryles urées pour inhiber Raf en changeant les cycles A, B, C du Sorafenib et/ou le lien entre les cycles (**Tableau 1**, entrées 3-7). Par exemple, le groupe

¹⁹⁴ Smith R.A., Dumas J., Adnane L., Wilhelm S.M.: Recent advances in the research and development of RAF kinase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2006**, 6, 1071-89.

¹⁹⁵ Dumas J., Smith R.A., Lowinger T.B.: Recent developments in the discovery of protein kinase inhibitors from the urea class. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **2004**, 7, 600-16.

¹⁹⁶ Smith R.A., Barbosa J., Blum C.L., Bobko M.A., Caringal Y.V., Dally R., Johnson J.S., Katz M.E., Kennure N., Kingery-Wood J., Lee W., Lowinger T.B., Lyons J., Marsh V., Rogers D.H., Swartz S., Walling T., Wild H.: Discovery of heterocyclic ureas as a new class of raf kinase inhibitors: identification of a second generation lead by a combinatorial chemistry approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2775-8.

¹⁹⁷ Lowinger T.B., Riedl B., Dumas J., Smith R.A.: Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. *Curr. Pharm. Des.*, **2002**, 8, 2269-78.

Astex a synthétisé une série d'arylurées où les 3 cycles aromatiques du Sorafenib A, B et C ont été modifiés (entrée 3).¹⁹⁸

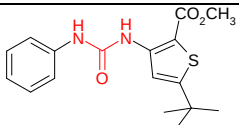
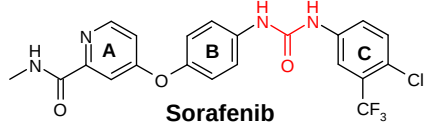
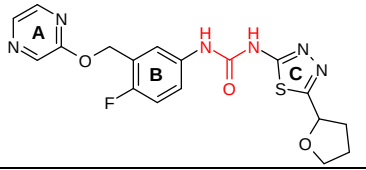
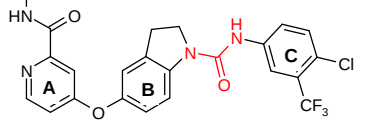
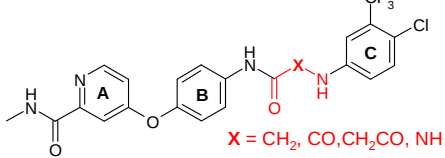
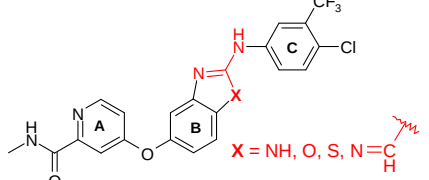
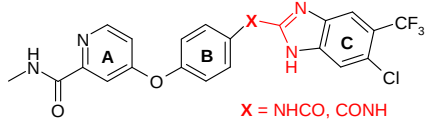
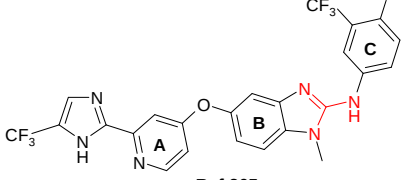
	Structure	Développeur	IC ₅₀ C-Raf μ M	Références
1		Bayer	17	196
2	 Sorafenib	Bayer	0,006	197
3		Astex	< 0,010	198
4		GSK et Novartis	< 0,250	199
5	 $X = CH_2, CO, CH_2CO, NH$	Merck	< 5	200
6	 $X = NH, O, S, N=C(H)$	Chiron	< 5	201, 203
7	 $X = NHCO, CONH$	Merck	< 5	202
8	 Raf 265	Novartis	< 0,1	204

Tableau 1 : Inhibiteurs de Raf de la famille des urées et composés apparentés

Le groupe GSK a obtenu une activité submicromolaire vis-à-vis de Raf en incluant un des atomes d'azote de la fonction urée dans un cycle pyrrolidine (entrée 4).¹⁹⁹ D'autres efforts

¹⁹⁸ Gill A., Woodhead S.J., Apaya R.P. *et al.*: Raf Kinase Inhibitors. PCT Pat. Appl. WO 05002673, **2004**.

ont été déployés pour remplacer la fonction urée du Sorafenib, soit en insérant des groupements entre le NH et le CO (entrée 5), soit en fusionnant la fonction urée avec le cycle C ou B (entrées 6, 7). Par exemple, le groupe Merck a inséré des groupements méthylène, carbonyle et amino entre le NH et le CO de la fonction urée.²⁰⁰

Les entreprises Chiron/Amgen et Merck ont synthétisé de nombreux composés où la fonction urée a été fusionnée conduisant à la formation des cycles benzimidazoles, benzoxazoles, benzothiazoles^{201,202} et quinazolines.²⁰³ Novartis a aussi reporté récemment une étude de relation structure-activité (RSA) à partir du noyau 2-arylamino-benzimidazole.²⁰⁴ Ces travaux ont contribué à la découverte de l'inhibiteur Raf-265 actuellement en phase I (entrée 8). Ils ont permis d'améliorer la solubilité et l'inhibition de la voie Raf/MEK/ERK au niveau cellulaire par rapport au Sorafenib.

V-3.2 La famille des imidazoles et molécules apparentées

Les inhibiteurs de la famille des imidazoles sont tous basés sur le même modèle pharmacophorique constitué d'un hétérocycle central à 5 chaînons trisubstitué. Les principaux exemples sont représentés dans le **Tableau 2**. Les études de RSA ont débuté après la découverte du L-779,450²⁰⁵ (entrée 1) et concernent la variation de la nature des substituants^{206,207} (entrées 2, 3) et le remplacement du cycle central imidazole par d'autres hétérocycles tels que le furane²⁰⁸ (entrée 3) ou le pyrazole²⁰⁹ (entrée 4). Toutes ces études de

¹⁹⁹ Adams J.L., Bryan D.L., Goodman S.N. *et al.*: Chemical compounds. PCT Pat. Appl. WO 04043379, **2003**.

²⁰⁰ a) Buchstaller H.P., Wiesner M., Sirrenberg C. *et al.*: Oxamide Derivatives Useful as Raf Kinase Inhibitors. PCT Pat. Appl. WO 04085399, **2004**. b) Bruge D., Buchstaller H.P., Grell M. *et al.*: Malonamide Derivatives. PCT Pat. Appl. WO 05005389, **2004**. c) Finsinger D., Buchstaller H.P., Zenke F. *et al.*: Diacylhydrazine Derivatives. PCT Pat. Appl. WO 05058832, **2004**.

²⁰¹ DiPietro L.V., Harmange J.C., Van der Plas S. *et al.*: Fused Azoles such as 2,5-Disubstituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles. PCT Pat. Appl. WO 04085425, **2004**.

²⁰² Buchstaller H.P., Finsinger D., Zenke F. *et al.*: Benzimidazole Derivatives as Raf Kinase Inhibitors. PCT Pat. Appl. WO 05004864, **2004**.

²⁰³ Ramurthy S., Renhowe P.A., Subramanian S.: 2,6-Disubstituted Quinazolines, Quinoxalines, quinolines and Isoquinolines as Inhibitors of Raf Kinase for Treatment of Cancer. PCT Pat. Appl. WO 05037285, **2004**.

²⁰⁴ Ramurthy S., Subramanian S., Aikawa M., Amiri P., Costales A., Dove J., Fong S., Jansen J.M., Levine B., Ma S., McBride C.M., Michaelian J., Pick T., Poon D.J., Girish S., Shafer C.M., Stuart D., Sung L., Renhowe P.A.: Design and synthesis of orally bioavailable benzimidazoles as Raf kinase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 7049-52.

²⁰⁵ Claremon D.A., Heimbrook D.C., Patrick D.R. *et al.*: Preparation of Imidazole Derivatives for Treatment of Raf-mediated Disease. Brit. UK Pat. appl., GB 2306108, **1996**.

²⁰⁶ Takle A.K., Brown M.J., Davies S., Dean D.K., Francis G., Gaiba A., Hird A.W., King F.D., Lovell P.J., Naylor A., Reith A.D., Steadman J.G., Wilson D.M.: The identification of potent and selective imidazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 378-81.

²⁰⁷ Wolin R.L., Bembenek S.D., Wei J., Crawford S., Lundeen K., Brunmark A., Karlsson L., Edwards J.P., Blevitt J.M.: Dual binding site inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 2825-9.

²⁰⁸ Takle A.K., Bamford M.J., Davies S., Davis R.P., Dean D.K., Gaiba A., Irving E.A., King F.D., Naylor A., Parr C.A., Ray A.M., Reith A.D., Smith B.B., Staton P.C., Steadman J.G., Stean T.O., Wilson D.M.: The

RSA réalisées par différents groupes pharmaceutiques ont abouti à la synthèse de puissants inhibiteurs sélectifs de Raf.

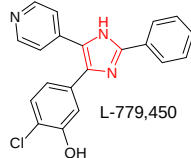
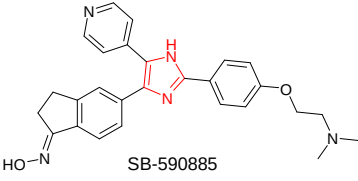
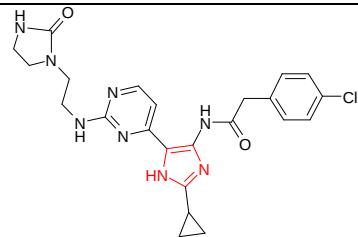
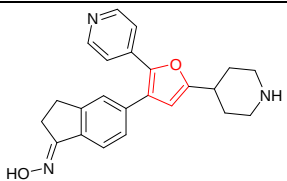
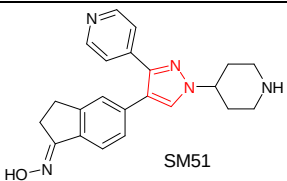
	Structure	Développeur	IC ₅₀ C-Raf nM	Références
1	 L-779,450	Merck	1,4	205
2	 SB-590885	SKB	1,7	206
3	 	Johnson & Johnson Pharmaceutical	1,0	207
4	 	SKB	2,4 (B-Raf)	208
5	 SM51	Genentech	0,03 (B-Raf)	209

Tableau 2 : Inhibiteurs de Raf de la famille des imidazoles et molécules apparentées

V-3.3 La famille des benzamides

ZM-336372 est le premier dérivé de cette famille, découvert par AstraZeneca dans les années 90.¹³¹ Il est actuellement en phase d'évaluation préclinique. Sa structure est proche de celle du Glivec® (imatinib). La fonction amide permet l'interaction avec la boucle DFG et

identification of potent, selective and CNS penetrant furan-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 4373-6.

²⁰⁹ Hansen J.D., Grina J., Newhouse B., Welch M., Topalov G., Littman N., Callejo M., Gloor S., Martinson M., Laird E., Brandhuber B.J., Vigers G., Morales T., Woessner R., Randolph N., Lyssikatos J., Olivero A.: Potent and selective pyrazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 4692-95.

l'hélice α C. Par la suite, Novartis a synthétisé des analogues dont la structure est proche de celles de ZM-336372 et de l'imatinib.²¹⁰ Ces structures sont détaillées dans le **Tableau 3**.

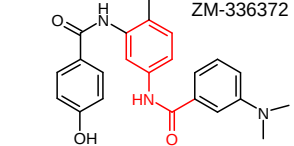
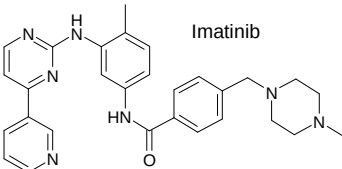
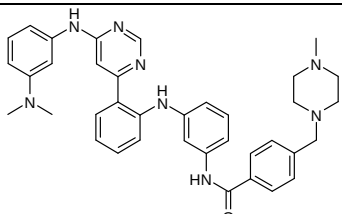
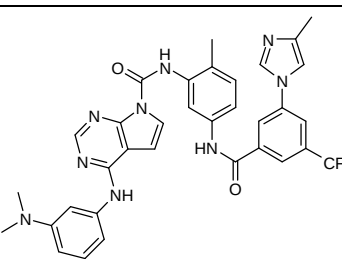
Composé	Développeur	IC ₅₀ Raf nM	Références
 ZM-336372	AstraZeneca	70 (C-Raf)	131
 Imatinib	Novartis	Inhibiteur de Bcl-Abl	188
	Novartis	667 (B-Raf)	210
	Novartis	32 (B-Raf)	210

Tableau 3 : Inhibiteurs de Raf de la famille des benzamides

V-3.4 La famille des oxindoles

Les principaux inhibiteurs de la famille des oxindoles sont détaillés dans le **Tableau 4**. GW-5074 est le premier inhibiteur de Raf de cette famille reporté par Novartis en 1999-2000.²¹¹ En parallèle, Novartis a développé d'autres analogues, par exemple des aza-

²¹⁰ a) Batt D.B., Ramsey T.M., Sabio M.L.: 2-Aminopyrimidine Derivatives as Raf Kinase Inhibitors, Process for their Preparation, and their Use, e.g. in the Treatment of Proliferative Diseases such as Cancer. PCT Pat. Appl. WO 04110452, **2004**. b) Chopiuk G., Furet P., Steemsma R. *et al.*: Pyrimidinylarylmaines and Pyrimidinylaryl Benzamides as Protein Kinase Inhibitors and their Preparation. PCT Pat. Appl. WO 05033086, **2004**. c) Ding Q., Gray N., Uno T. *et al.*: A Preparation of Heteroarenoypyrazole Derivatives, Useful as Protein Kinase Inhibitors. PCT Pat. Appl. WO 05039486, **2004**.

²¹¹ Lackey K., Cory M., Davis R., Frye S.V., Harris P.A., Hunter R.N., Jung D.K., McDonald O.B., McNutt R.W., Peel M.R., Rutkowske R.D., Veal J.M., Wood E.R.: The discovery of potent cRaf1 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, 10, 223-6.

oxindoles.²¹² GW-5074 est actuellement étudié pour son utilisation éventuelle pour traiter les maladies neurodégénératives.²¹³

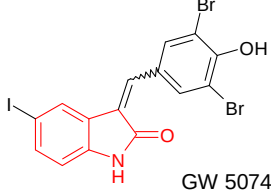
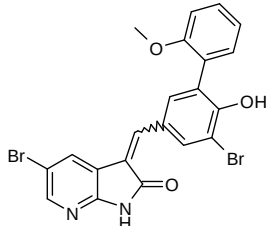
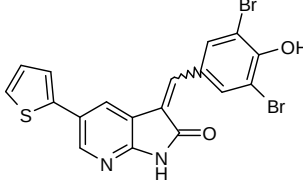
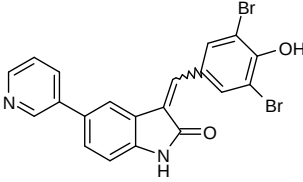
	Composé	Développeur	IC ₅₀ C-Raf nM	Références
1	 GW 5074	GSK	11	211
2		GSK	700	212
3		GSK	< 1000	212
4		GSK	11	211

Tableau 4 : Inhibiteurs de Raf de la famille des oxindoles

V-3.5 La famille des pyrazines

Le **Tableau 5** récapitule les principaux inhibiteurs de cette classe. Il s'agit d'inhibiteurs composés d'un cycle central pyrazine disubstitué en position 2 et 6. L'identification d'une nouvelle structure inhibitrice de B-Raf avec une valeur d'IC₅₀ de 3.5 µM de type pyrazine résulte d'un criblage haut débit d'une bibliothèque de molécules réalisé par l'équipe de Caroline Springer à l'institute of Cancer Research (ICR) (**Tableau 5**, entrée 1).²¹⁴ Les études de RSA réalisées à partir de ce produit ont consisté à modifier la nature du

²¹² Cheung M., Glennon K.C., Peel M.R. *et al.*: Preparation of Arylmethylidene-azaoxindoles as Protein Kinase Inhibitors. *PCT Pat. Appl. WO 99021859*, **1998**.

²¹³ Chen H.M., Wang L., D'Mello S.R.: Inhibition of ATF-3 expression by B-Raf mediates the neuroprotective action of GW5074. *J. Neurochem.*, **2008**, 105, 1300-12.

²¹⁴ Niculescu-Duvaz I., Roman E., Whittaker S.R., Friedlos F., Kirk R., Scanlon I.J., Davies L.C., Niculescu-Duvaz D., Marais R., Springer C.J.: Novel inhibitors of B-RAF based on a disubstituted pyrazine scaffold. Generation of a nanomolar lead. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 407-16.

cycle C (entrées 2, 3) ce qui a permis d'améliorer l'activité inhibitrice *in vitro* vis-à-vis de B-Raf d'un facteur 4.²¹⁴ La poursuite de cette étude de RSA sur le cycle C a mené à la découverte de plusieurs composés possédant une plus grande sélectivité vis à vis de B-Raf V600E par rapport à C-Raf avec un facteur allant de 5 à 86 fois (entrée 4).²¹⁵

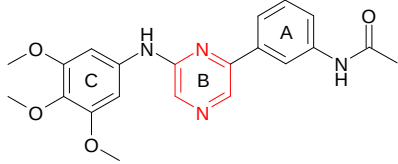
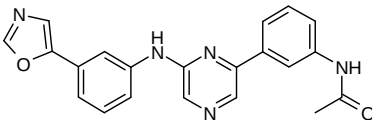
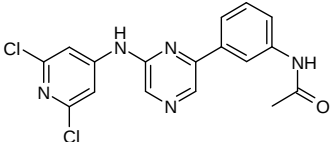
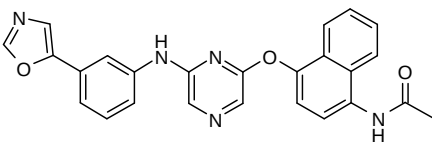
	Structure	Développeur	IC ₅₀ B-Raf μ M	Références
1		Institute of Cancer Research (ICR)	3,5	214
2		ICR	0,79	214
3		ICR	0,95	214
4		ICR	0,31 V600E B-Raf	215

Tableau 5 : Inhibiteurs de Raf de la famille des pyrazines

V-3.6 La famille des azaindoles (ou pyrrolopyridines)

En 2008, le groupe Plexxikon a reporté les résultats obtenus pour une campagne de criblage de petits fragments de 150 à 350 Da sur plusieurs protéines kinases de structure connue.²¹⁶ Ces travaux ont révélé la liaison du cycle 7-azaindole dans la poche ATP. Ils ont synthétisé une série de dérivés 7-azaindole disubstitués en position C-5 et C-3 qu'ils ont optimisé pour cibler B-Raf et V600E B-Raf.²¹⁶ D'autres chercheurs de chez GSK ont publié l'utilisation du noyau 7-azaindole comme ligand de la région charnière où se situe la poche

²¹⁵ Niculescu-Duvaz I., Roman E., Whittaker S.R., Friedlos F., Kirk R., Scanlon I.J., Davies L.C., Niculescu-Duvaz D., Marais R., Springer C.J.: Novel inhibitors of the v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF) based on a 2,6-disubstituted pyrazine scaffold. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3261-74.

²¹⁶ Tsai J., Lee J.T., Wang W., Zhang J., Cho H., Mamo S., Bremer R., Gillette S., Kong J., Haass N.K., Sproesser K., Li L., Smalley K.S., Fong D., Zhu Y.L., Marimuthu A., Nguyen H., Lam B., Liu J., Cheung I., Rice J., Suzuki Y., Luu C., Settachatgul C., Shellooe R., Cantwell J., Kim S.H., Schlessinger J., Zhang K.Y., West B.L., Powell B., Habets G., Zhang C., Ibrahim P.N., Hirth P., Artis D.R., Herlyn M., Bollag G.: Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2008**, 105, 3041-46.

ATP. Ils ont conçu leur pharmacophore à partir des données structurales connues pour le Sorafenib et SB-590885.²¹⁷ Le **Tableau 6** représente les meilleurs inhibiteurs de cette famille.

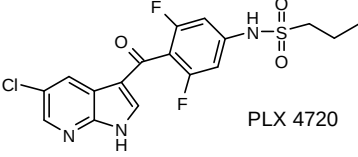
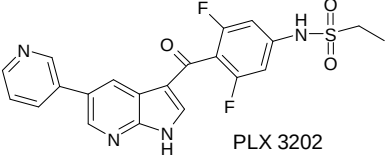
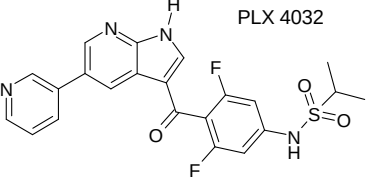
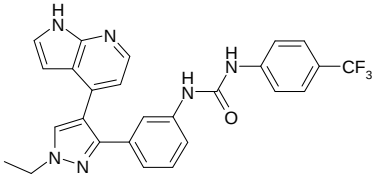
	Structure	Développeur	IC ₅₀ Raf nM	Références
1	 PLX 4720	Plexxicon	6,7 (C-Raf) 160 (B-Raf) 13 (V600E B-Raf)	216
2	 PLX 3202	Plexxicon	non communiqué	216
3	 PLX 4032	Plexxicon	100 (B-Raf) 31 (V600E B-Raf)	216
4		GSK	2,5 (B-Raf)	217

Tableau 6 : Inhibiteurs de Raf de la famille des azaindoles

Les produits obtenus par Plexxicon (**Tableau 6**, entrées 1-3) sont très sélectifs vis-à-vis de la forme oncogénique V600E B-Raf et actifs *in vitro* sur cellules de mélanomes mais aussi *in vivo* sur des modèles murins de mélanomes.²¹⁶ Aujourd'hui le PLX 4032 (entrée 3) est actuellement en phase I pour le traitement des mélanomes. Le composé synthétisé par GSK (entrée 4) a montré une bonne activité inhibitrice *in vitro* sur B-Raf et sur cellules tumorales et un meilleur profil de sélectivité que le Sorafenib. Il est notamment 100 fois plus efficace sur B-Raf que sur VEGFR-2 et c-Met.²¹⁷

²¹⁷ Tang J., Hamajima T., Nakano M., Sato H., Dickerson S.H., Lackey K.E.: Knowledge-based design of 7-azaindoles as selective B-Raf inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 4610-4.

V-4 Les structures tridimensionnelles de Raf

Les données structurales concernant Raf sont encore limitées, il n'existe pas de structure de la protéine entière, ni de structures de Raf en complexe avec Ras ou MEK. Les seules structures résolues à ce jour concernent les domaines kinases de B-Raf et sa forme mutée V600E B-Raf en complexe avec différents inhibiteurs. Concernant Raf-1, seules des études réalisées par RMN sur son domaine de liaison à Ras (RBD et CRD) sont disponibles. Raf-1 et B-Raf ont 74 % d'identité de séquence au niveau de leur domaine kinase (**Figure 32**). Par conséquent, on peut considérer que leurs sites actifs sont très similaires. C'est à partir des structures de B-Raf avec les différents inhibiteurs que nous avons défini les pré-requis structuraux indispensables pour l'inhibition. Les différentes structures cristallographiques disponibles de Raf en interaction avec des inhibiteurs sont répertoriées ci-dessous dans le **Tableau 7**. Les inhibiteurs ont été cristallisés en présence de la forme sauvage ou de la forme mutée de B-Raf. Les interactions impliquées étant similaires dans la plupart des cas, seules les interactions avec la forme sauvage sont décrites ci-dessous. Cette thèse ayant débuté en novembre 2006, seules à cette date étaient disponibles les structures entre Raf et le Sorafenib.

```

73.9% identity in 333 residues overlap; Score: 1304.0; Gap frequency: 0.0%
B-Raf      13 QREKSSSSSEDRNRMKTLGRDSSDDWEIPDGQITVGQRIGSGSFGTVYKKGWHDVAV
Raf-1      6 QREAPVSGTQEKNKIRPRGQRDSSYYWEIEASEVMLSTRIGSGSFGTVYKKGWHDVAV
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
B-Raf      73 KMLNVTAPTPQQLQAFKNEVGVLKTRHVNILLFMGYSTKPQLAIVTQWCEGSSLYHHLH
Raf-1      66 KILKVDPTPEQFQAFRNEAVLRKTRHVNILLFMGYMTKDNLAIVTQWCEGSSLYKHLH
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
B-Raf      133 IIE TKFEMI KLIDIA RQTA QGMDYLHAKSIIHRDLKSNNIFLHEDLTVKIGDFGLATVKS
Raf-1      126 VQETKFQMFQLIDIA RQTA QGMDYLHAKNIIHRDMKSNNIFLHEGLTVKIGDFGLATVKS
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
B-Raf      193 RWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQSDVYAFGIVLYELMTGQLPYSHNNR
Raf-1      186 RWSGSQQVEQPTGSVLWMAPEVIRMQDNPFQSDVYSYGIVLYELMTGELPYSHNNR
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
B-Raf      253 DQIIIFMVGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLKKRDERPLFPQILASIELLARSLP
Raf-1      246 DQIIIFMVGRGYASPDLSKLYKNCPKAMKRLVADCVKKVKEERPLFPQILSSIQLQHSPLP
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
B-Raf      313 KIHRSASEPSLNRA GFQTEDFS LYACASPKTPI
Raf-1      306 KINRSASEPSLHRAAHTEDINACTLTTPRLPV
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figure 32 : Alignement de séquence correspondant aux domaines kinases de B-Raf et C-Raf

Interaction B-Raf/ Sorafenib : La **Figure 33** illustre les principales interactions entre le Sorafenib et le site actif de B-Raf.²¹⁸ Le Sorafenib inhibe *in vitro* Raf-1 et B-Raf avec des valeurs d'IC₅₀ égales à 6 nM et 38 nM respectivement. La résolution de la structure a permis

²¹⁸ Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V.M., Jones C.M., Marshall C.J., Springer C.J., Barford D., Marais R.: Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*, **2004**, 116, 855–67.

de déterminer que le Sorafenib est un inhibiteur de type II. Le cycle pyridinyle du Sorafenib occupe la poche ATP et interagit avec trois résidus aromatiques (Trp531, Phe583 et Phe595). L'azote pyridinique et le substituant carboxamide forment deux liaisons hydrogènes avec le NH du résidu Cys532. La fonction urée est impliquée dans deux liaisons hydrogènes : l'un des 2 groupements NH interagit avec le groupement carboxylate du résidu catalytique Glu501, le carbonyle forme une autre liaison hydrogène avec le NH de l'Asp594 du motif DFG. Le cycle phényle et ses substituants Cl et CF₃ se logent dans la poche hydrophobe située derrière la poche ATP normalement occupée par le résidu Phe595 dans la conformation active (DFG-in) de B-Raf et qui devient accessible dans la conformation DFG-out.

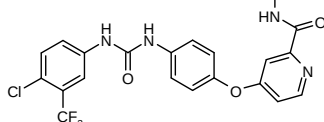
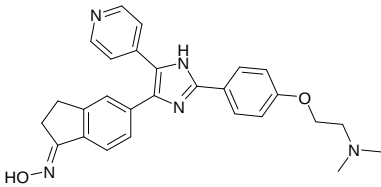
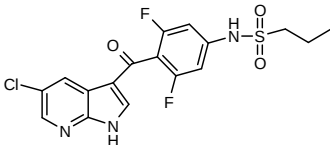
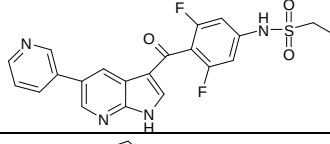
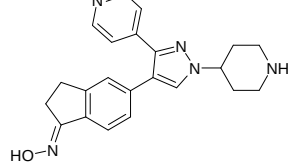
Code	Raf	Inhibiteur	Structure	Date	Référence
1UWH	B-Raf	Sorafenib		Mars 2004	218
1UWJ	V600E B-Raf				
2FB8	B-Raf	SB-590885		Décembre 2006	219
3C4C	B-Raf	PLX 4720		Février 2008	216
3C4D	V600E B-Raf	PLX 3203		Février 2008	216
3D4Q	B-Raf	SM51		Août 2008	209

Tableau 7 : Structures cristallographiques des complexes Raf/ inhibiteurs

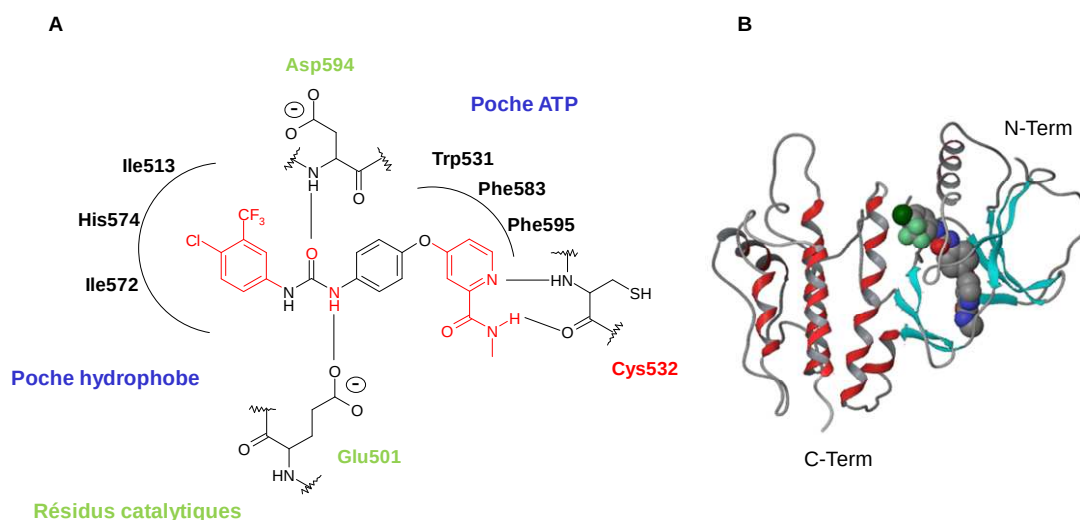


Figure 33 : (A) Mode d'interaction entre le Sorafenib et B-Raf. (B) Fixation du Sorafenib dans la région charnière de B-Raf (code pdb : 1UWH)²¹⁸

Interaction B-Raf/ SB-590885 : Le triarylimidazole SB-590885 est un inhibiteur plus spécifique vis-à-vis de Raf que le Sorafenib (**Tableau 7**).²¹⁹ Il inhibe *in vitro* Raf-1 et B-Raf avec des valeurs d'IC₅₀ égales à 1.72 nM et 0.16 nM respectivement. Il s'agit d'un inhibiteur ATP compétitif (type I) qui se fixe sur la forme active de Raf. Les trois cycles imidazole, pyridine et indane-oxime se fixent dans la poche ATP principalement par interactions hydrophobes avec les résidus Phe583, Leu514, Ala481, Val471, Lys483, Thr529 (**Figure 34**). La fonction oxime forme 2 liaisons hydrogène : le groupement OH interagit avec le groupement carboxylate du résidu catalytique Glu501, l'atome d'azote interagit avec le groupement carboxylate du résidu catalytique Asp594. Le cycle pyridinyle forme une liaison hydrogène avec le NH du résidu Cys532 localisé dans la poche ATP. Asp594 et Cys532 sont aussi ciblés par le Sorafenib. La partie diméthylaminoéthoxyphényle dirigée vers l'extérieur de la protéine forme des liaisons hydrophobes avec les résidus Val471, Ile463 et Gly464.

²¹⁹ King A.J., Patrick D.R., Batorsky R.S., Ho M.L., Do H.T., Zhang S.Y., Kumar R., Rusnak D.W., Takle A.K., Wilson D.M., Hugger E., Wang L., Karreth F., Loughheed J.C., Lee J., Chau D., Stout T.J., May E.W., Rominger C.M., Schaber M.D., Luo L., Lakdawala A.S., Adams J.L., Contractor R.G., Smalley K.S., Herlyn M., Morrissey M.M., Tuveson D.A., Huang P.S.: Demonstration of a Genetic Therapeutic Index for Tumors Expressing Oncogenic BRAF by the Kinase Inhibitor SB-590885. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 11100-05.

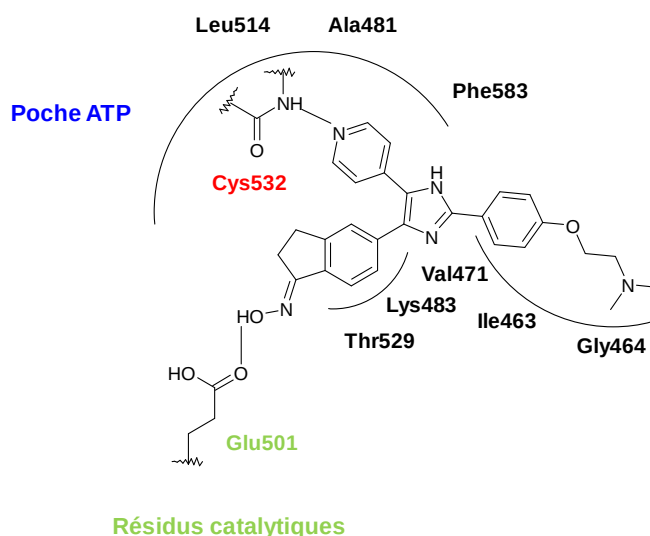


Figure 34 : Mode d'interaction entre B-Raf et SB-590885

Interaction B-Raf/ PLX 4720 ou PLX 3203 : Le PLX 4720 et le PLX 3203 sont des dérivés 7-azaindoliques qui sont plus sélectifs que le Sorafenib vis-à-vis de Raf (**Tableau 7**).²¹⁶ Ce sont des inhibiteurs de type I se fixant sur la forme active de Raf. PLX 4720 inhibe *in vitro* Raf-1 et B-Raf avec des valeurs d'IC₅₀ égales à 6.7 nM et 160 nM respectivement. Les PLX 4720 et PLX 3203 interagissent avec B-Raf selon le même mode d'interaction qui est décrit dans la **Figure 35**. Cependant PLX 3203 a été cristallisé avec la forme mutée B-Raf V600E alors que le PLX 4720 a été cristallisé avec la forme sauvage. La plupart des résidus avec lesquels ils interagissent sont ciblés par le Sorafenib.

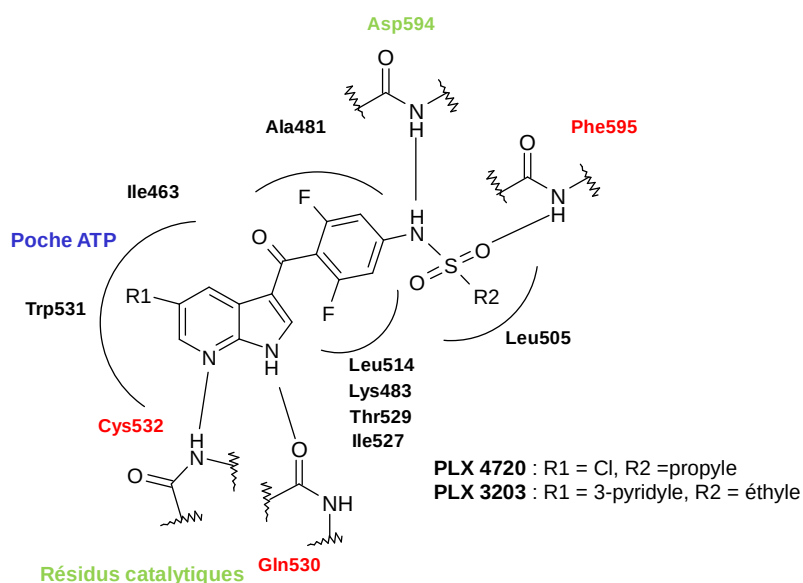


Figure 35 : Mode d'interaction entre B-Raf et PLX 4720

L'hétérocycle central 7-azaindole permet l'ancrage dans la poche ATP en formant deux liaisons hydrogènes : entre l'azote pyridinique et le NH du résidu Cys532 d'une part, le NH du pyrrole et le CO du résidu Gln530. Le 7-azaindole forme également de nombreuses liaisons hydrophobes au sein de cette poche avec les résidus Trp531, Thr529, Leu514 et Ala481. L'atome de chlore en position C-5 interagit par contact de Van Der Waals avec Ile463. Le motif difluoro-phényle est ancré dans une poche hydrophobe formée par les résidus Ala481, Val482, Lys483, Val471, Ile527, Thr529, Leu514 et Phe583. L'atome d'azote du groupement sulfonamide forme une liaison hydrogène avec le résidu catalytique Asp594 tandis qu'un des deux atomes d'oxygène de la fonction sulfone forme une liaison hydrogène avec le NH du résidu Phe595 du motif DFG. Le groupement propyle est important pour la sélectivité car il se lie dans une poche hydrophobe sélective de Raf.

Interaction B-Raf/ SM51 : SM51 est un analogue pyrazole du composé SB-590885 comme le montre la superposition des 2 inhibiteurs (**Figure 36**).²⁰⁹ SM51 inhibe *in vitro* B-Raf de façon plus efficace que SB-590885 avec une valeur d'IC₅₀ égale à 0.03 nM. SM51 se fixe selon le même mode d'interaction que SB-590885 : les trois substituants du cycle central sont orientés dans la même direction que pour SB-590885 (**Figure 36**). Il s'agit d'un inhibiteur ATP compétitif (type I) qui se fixe sur la forme active de Raf. Deux des 3 substituants du pyrazole sont identiques au SB-590885 : le cycle pyridinyle et l'indane-oxime.

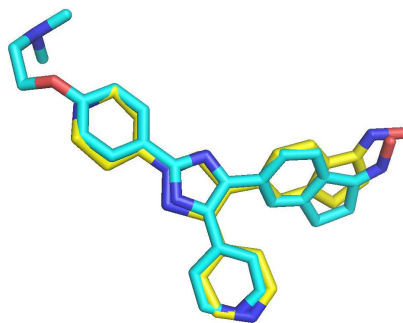


Figure 36 : Superposition des inhibiteurs SB-590885 (bleu) et SM51 (jaune) à partir des structures cristallographiques : 2FB8 et 3D4Q

Au lieu d'interagir avec le résidu catalytique Asp594, l'azote de la fonction oxime forme une liaison hydrogène avec le groupement NH₂ d'un autre résidu catalytique Lys483 (**Figure 37**). La partie diméthylaminoéthoxyphényle de SB-590885 est remplacée par un cycle pipéridine permettant de gagner en efficacité grâce à l'apport d'une liaison hydrogène entre le NH du cycle pipéridine et le CO du résidu Ile463.

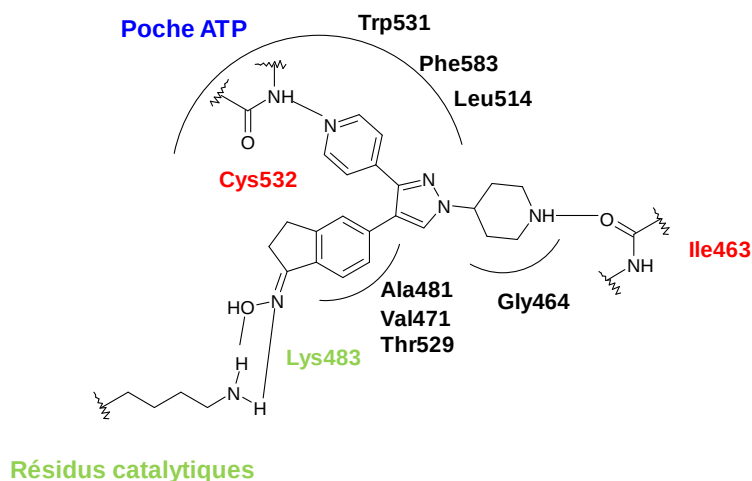


Figure 37 : Mode d'interaction entre B-Raf et PLX SM51

La superposition des différentes structures cristallographiques (**Figure 38**) montre que les inhibiteurs se superposent bien au niveau de la poche ATP, ce qui suggère un mode d'interaction similaire. Globalement, l'interaction entre B-Raf et son inhibiteur implique de nombreuses interactions hydrophobes mais aussi 2 à 4 liaisons hydrogènes. La reconnaissance au niveau de la poche ATP se fait essentiellement par des interactions hydrophobes pour se lier dans le site de l'adénine et du ribose. Ces interactions se font *via* l'utilisation d'hétérocycles aromatiques (azaindole, imidazole, pyrazole) et au moins un point d'ancrage avec une liaison hydrogène. D'autres systèmes donneur et/ou accepteur de liaisons hydrogènes seront indispensables pour se loger dans la poche phosphate et bloquer les résidus importants pour la catalyse enzymatique (Asp 594, Phe 595, Glu 501, Lys 483).

Des études de relation structure-activité se sont multipliées après l'apparition des structures cristallographiques de Raf et ont permis l'utilisation des techniques de modélisation moléculaire tels que le 3D-QSAR (three-dimensional quantitative structure activity relationship),²²⁰ et le criblage virtuel de bibliothèques de molécules pour accélérer l'identification et l'optimisation des molécules inhibitrices.^{221,222} Ces techniques *in silico* ont pour but de prédire au mieux l'activité biologique en fonction de la structure chimique.

²²⁰ Thaimattam R., Daga P., Rajjak S.A., Banerjee R., Iqbal J.: 3D-QSAR CoMFA, CoMSIA studies on substituted ureas as Raf-1 kinase inhibitors and its confirmation with structure-based studies. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 6415-25.

²²¹ Li H.F., Lu T., Zhu T., Jiang Y.J., Rao S.S., Hu L.Y., Xin B.T., Chen Y.D.: Virtual screening for Raf-1 kinase inhibitors based on pharmacophore model of substituted ureas. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 1240-9.

²²² Fratev F., Ósk Jónsdóttir S., Mihaylova E., Pajeva I.: Molecular Basis of Inactive B-RAF(WT) and B-RAF(V600E) Ligand Inhibition, Selectivity and Conformational Stability: An *in Silico* Study. *Mol. Pharm.*, **2008**, 6, 144-57.

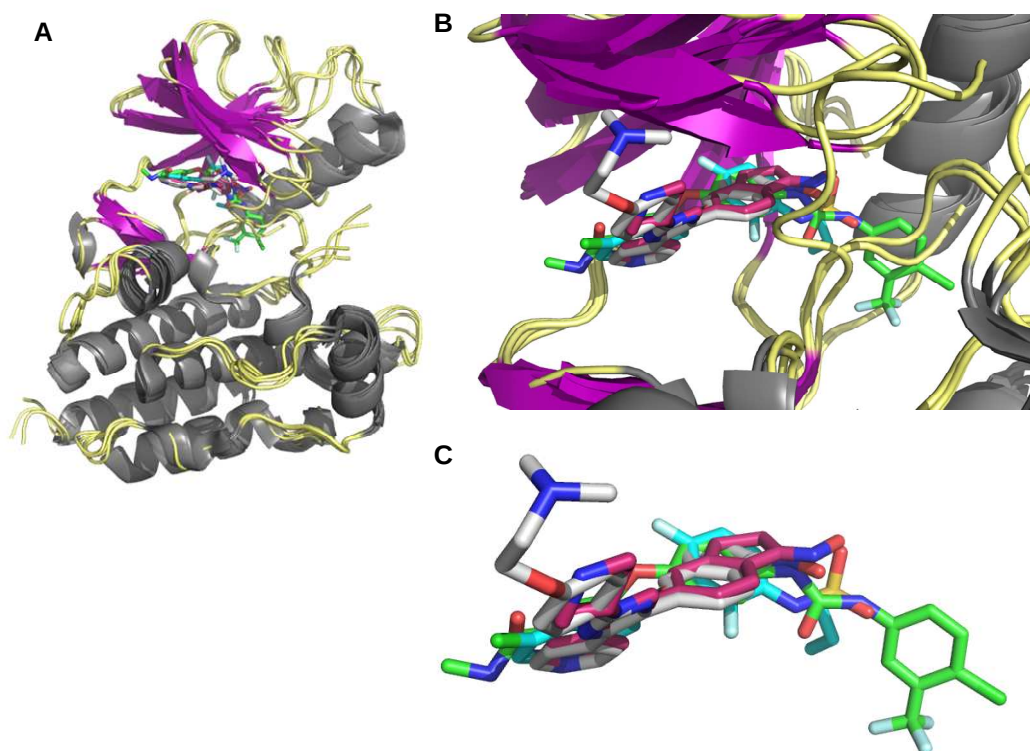


Figure 38 : (A) Superposition des 4 structures cristallographiques de B-Raf avec 4 inhibiteurs : **Sorafenib** (1UWH), **PLX 4720** (3C4C), **SB-590885** (2FB8), **SM51** (3D4Q). (B) Zoom de la région charnière où se fixent les différents inhibiteurs. (C) Zoom sur la superposition des 4 inhibiteurs. Cette figure a été réalisée à l'aide du logiciel Pymol

V-5 Elaboration de notre pharmacophore

Pour élaborer notre pharmacophore, nous nous sommes basés sur les structures cristallographiques des complexes B-Raf/ inhibiteurs disponibles. Au début de la thèse, seules deux structures cristallographiques de Raf étaient décrites : les complexes B-Raf/ Sorafenib d'une part et B-Raf/ SB-590885 d'autre part. La conception d'inhibiteurs ciblant les formes inactives des protéines kinases est une stratégie pour gagner en sélectivité.⁷¹ Notre choix s'est alors porté sur la synthèse d'inhibiteurs analogues du Sorafenib en raison de son mode d'interaction. D'après la structure cristallographique du complexe B-Raf/Sorafenib (1UWH), le Sorafenib est un composé tricyclique qui se lie préférentiellement à la forme inactive ou DGF « out » en occupant une poche hydrophobe spécifique de Raf, ce qui en fait un inhibiteur de type II.²¹⁸ Cette poche n'est pas occupée dans le cas du composé SB-590885 qui est un inhibiteur de type I (ATP compétitif).

Au début de cette thèse, en collaboration avec Stéphane Bourg pour la partie modélisation moléculaire, nous avons commencé la synthèse des inhibiteurs de Raf

principalement à partir des informations structurales issues des données cristallographiques du complexe B-Raf/ Sorafenib d'une part et des études de RSA réalisées à partir du Sorafenib d'autre part. Pour élaborer notre pharmacophore, nous avons défini les pré-requis structuraux indispensables pour l'inhibition de la protéine Raf.

L'interaction entre B-Raf et le Sorafenib implique de nombreuses interactions hydrophobes et 4 liaisons hydrogènes (**Figure 33**). Comme cela a été décrit précédemment, la fixation des inhibiteurs dans la poche ATP requière la présence de groupements hydrophobes pour occuper le site de la base (adénine) et du sucre (ribose). Des systèmes donneur et/ou accepteur de liaisons hydrogènes (urée, amides, amines, sulfonamides) sont indispensables pour se loger dans la poche phosphate et bloquer les résidus catalytiques (Asp 594, Glu 501 et Lys 483). Les hétérocycles aromatiques (pyrazine, imidazole, benzothiazole, pyrazole, azaindole) sont utilisés pour accéder à cette poche.

A partir du Sorafenib, nous avons conçu notre modèle pharmacophorique représenté dans la **Figure 39**.

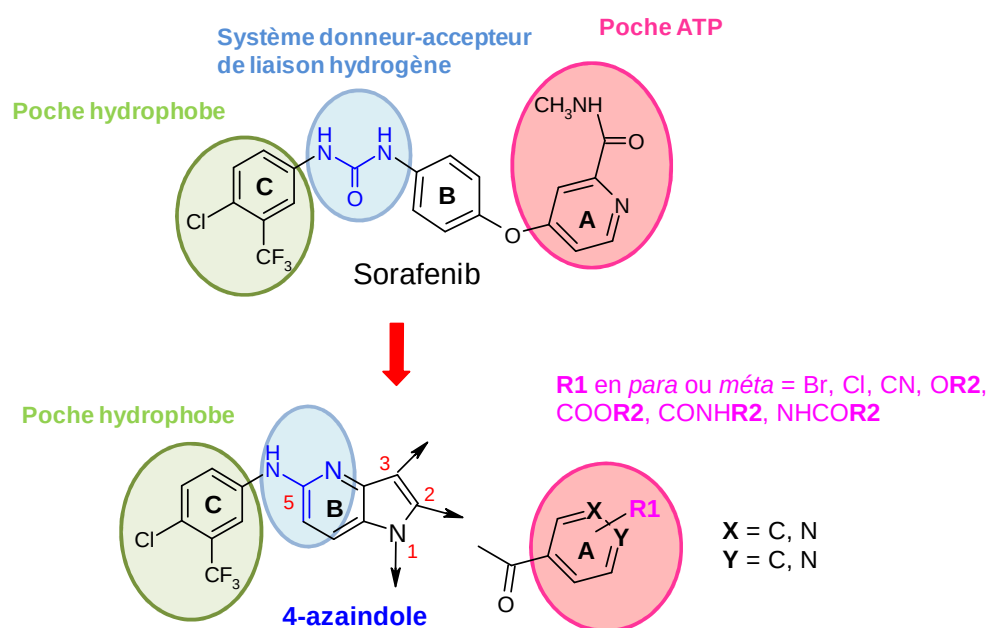


Figure 39 : Séries de composés envisagées pour la synthèse d'analogues du Sorafenib

Nos travaux portent essentiellement sur l'utilisation du noyau 4-azaindole étudié au laboratoire comme hétérocycle central **B**. Le cycle **C** du Sorafenib sera greffé en position C-5 du 4-azaindole pour maintenir la reconnaissance avec la poche hydrophobe spécifique de Raf. Le cycle aromatique **A** sera alternativement positionné en N-1, C-2 ou C-3 du noyau 4-azaindole. Nous avons choisi comme cycle **A** un groupement phényle ou pyridinyle. Le cycle **A** a été fonctionnalisé en position *para* ou *méta* par des groupements

électrodonneurs (méthoxy OMe, amine NH₂) et électroattracteurs (halogènes, ester COOMe, nitrile CN, amide CONH ou NHCO). Les substituants méthoxy, ester et nitrile sont aussi accepteurs de liaison hydrogène tandis que le groupement amine est donneur de liaison hydrogène. Les groupements amides, accepteurs et donneurs de liaisons hydrogènes permettent l'ancrage dans la poche ATP. Le cycle aryle **A** fonctionnalisé ou non par un halogène favorisera les contacts hydrophobes au sein de la poche ATP. Dans un premier temps, nous avons choisi la fonction cétone pour faire le lien entre les cycles **A** et **B**.

Comme cela a été décrit précédemment, plusieurs groupes de recherche ont synthétisé des inhibiteurs puissants de Raf en fusionnant la fonction urée du Sorafenib dans un hétérocycle, en particulier les benzimidazoles. Notre stratégie a été d'inclure la fonction urée du Sorafenib indispensable pour bloquer les résidus catalytiques dans le cycle 4-azaindole. L'azote en position *N*-4 et le NH porté par le sommet *C*-5 du 4-azaindole pourraient éventuellement conduire à la formation de deux liaisons hydrogènes comme la fonction urée.

Les synthèses organiques ont utilisé le savoir faire du laboratoire en chimie des hétérocycles azotés avec tout particulièrement l'utilisation des réactions anioniques et les réactions de couplages catalysés au palladium. L'optimisation des structures s'est faite en fonction des valeurs IC₅₀ déterminées *in vitro* sur Raf-1 et sur des lignées de cellules cancéreuses (test de cytotoxicité).

VI/ Synthèse, réactivité et propriétés biologiques des dérivés du 4-azaindole

VI-1 Introduction générale sur les azaindoles

L'indole est l'un des hétérocycles les plus représentés parmi les molécules biologiquement actives d'origine naturelles ou synthétiques. Le remplacement d'un des atomes de carbone sur les positions 4-7 de l'indole conduit aux 4-, 5-, 6-, 7-azaindoles ou pyrrolopyridines (**Figure 40**).

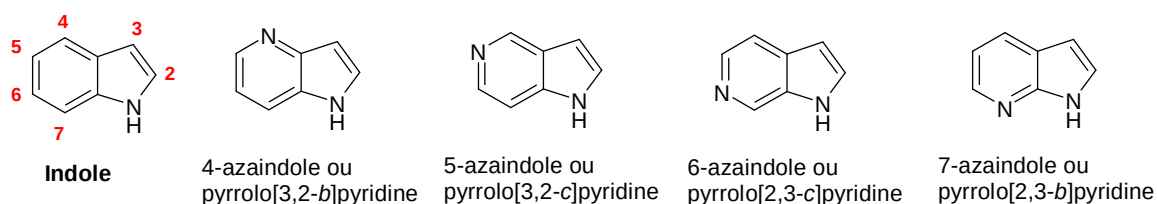


Figure 40 : Structures de l'indole et des 4-, 5-, 6- et 7-azaindoles

Les azaindoles sont considérés comme des bioisostères de l'indole, par conséquent ils ont un intérêt pharmacologique majeur pour améliorer l'activité, la sélectivité et la biodisponibilité des dérivés indoliques. Par exemple, l'équipe de Benoit Joseph a travaillé sur des inhibiteurs de kinase de la famille indolique, les méridianines (3-(2-aminopyrimidin-4-yl)indoles). Elle a synthétisé l'analogue 7-azaindole : 3-(pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles (mériolines) afin d'en évaluer son activité biologique.²²³ La plupart des azaindoles sont des molécules synthétiques, seul le squelette 7-azaindole est retrouvé dans un produit d'origine naturelle : la Varioline B, issue d'un organisme marin, l'éponge *Kirkpatrickia varialosa*, connue pour ses propriétés anti-cancéreuses.^{224,225}

Le développement de méthodes chimiques efficaces pour préparer les dérivés azaindoliques constitue un challenge chimique. Ceci s'explique en partie par le fait que l'azote pyridinique appauvrit la densité électronique du cycle. Par conséquent, les méthodes de synthèse développées pour l'indole, telle que la cyclisation de Fisher, donnent le plus souvent des faibles rendements sauf en présence de groupement méthoxy.²²⁶ Grâce au développement de la chimie organométallique, en particulier les réactions de catalyse aux métaux de transition et les réactions de lithiation, de nouvelles voies synthétiques sont apparues après les années 90. Plusieurs revues récentes ont été publiées sur les synthèses et la fonctionnalisation des azaindoles.^{227,228,229} Concernant la réactivité des azaindoles non substitués, plusieurs études théoriques et expérimentales ont été publiées à partir des années 60.²³⁰ Il s'agit essentiellement d'études comparatives entre l'indole et les azaindoles au sujet

²²³ Echalié A., Bettayeb K., Ferandin Y., Lozach O., Clément M., Valette A., Liger F., Marquet B., Morris J.C., Endicott J.A., Joseph B., Meijer L.: Meriolins (3-(Pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): Synthesis, Kinase Inhibitory Activity, Cellular Effects, and Structure of a CDK2/Cyclin A/Meriolin Complex. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 737–51.

²²⁴ Perry N.B., Ettouati L., Litaudon M., Blunt J.W., Munro M.H. G., Parkin S., Hope H.: Alkaloids from the Antarctic sponge *Kirkpatrickia Varialosa*. Part 1: variolin B, a new antitumour and antiviral compound. *Tetrahedron*, **1994**, 50, 3987–92.

²²⁵ Trimurtulu G., Faulkner D.J., Perry N.B., Ettouati L., Litaudon M., Blunt J.W., Munro M.H.G, Jameson G.B.: Alkaloids from the Antarctic sponge *Kirkpatrickia Varialosa*. Part 2: variolin A and N(3')-methyltetrahydrovariolin B. *Tetrahedron*, **1994**, 50, 3993–4000.

²²⁶ Jeanty M., Blu J., Suzenet F., Guillaumet G.: Synthesis of 4- and 6-Azaindoles via the Fischer Reaction. *Org.Lett.*, **2009**, 11, 5142–45.

²²⁷ Song J.J., Reeves J.T., Gallou F., Tan Z., Yee N.K., Senanayake C.H.: Organometallic methods for the synthesis and functionalization of azaindoles. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 1120–32.

²²⁸ Popowycz F., Mérour J.Y., Joseph B.: Synthesis and reactivity of 4-, 5-, 6-azaindoles. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 8689–8707.

²²⁹ Popowycz F., Routier S., Joseph B., Mérour J-Y.: Synthesis and reactivity of 7-azaindole(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine). *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1031–64.

²³⁰ a) Adler T.K., Albert A.: Diazaindenes (azaindoles). I. Ionization constants and spectra. *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1794–7. b) Adler T.K., Albert A.: The biological and physical properties of the azaindoles. *J. Med. Chem.*, **1963**, 6, 480–3. c) Yakhontov L.N., Portnov M.A., Azimov V.A., Lapan E.I.: Derivatives of azaindoles. XXXII. Comparative study of azaindole ionization constants by applying correlation. *Zh. Org. Khim.*, **1969**, 5, 956–61. d) Yakhontov L.N., Azimov V.A., Lapan E.I.: Reactivity of isomeric azaindoles. *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 24,

de leur basicité, solubilité, répartition des charges, stabilité, formes tautomères. En 1960, Alder a reporté que les azaindoles sont des molécules plus basiques et plus solubles dans l'eau que l'indole lui-même et ce dû à la présence d'un atome d'azote sur le cycle benzénique (**Figure 41**).

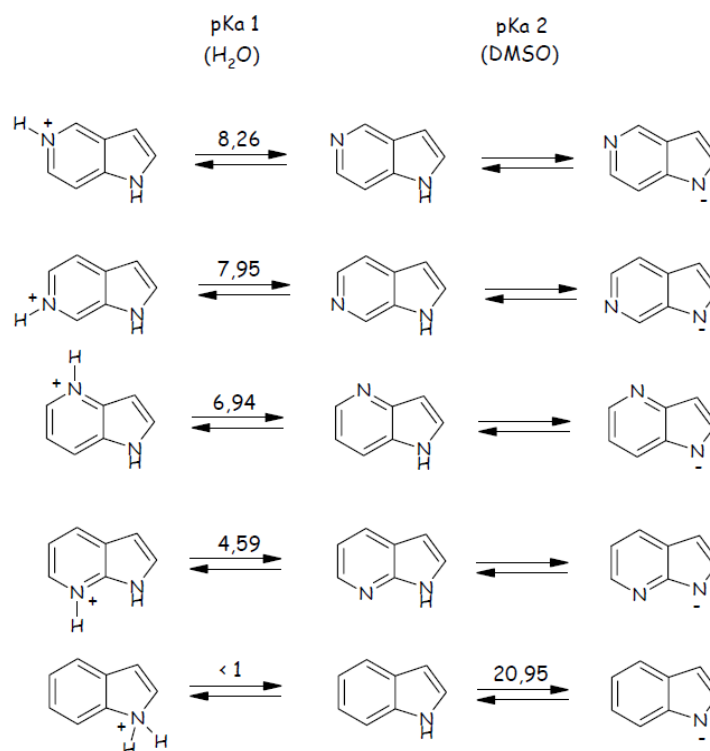


Figure 41 : Basicité de l'indole et des azaindoles^{230a}

Contrairement à l'indole, les pKas de déprotonation des azaindoles n'ont jamais été décrits à notre connaissance. La mesure de la densité électronique sur chaque sommet des 4 isomères indique que la partie pyrrolique est très peu affectée par l'azote du cycle pyridinique. Pour les azaindoles comme pour l'indole, le carbone C-3 reste le site le plus nucléophile et le C-2 le plus électrophile. Cependant, la réactivité du C-3 est plus faible par rapport à l'indole. En 1979, Azimov a étudié la vitesse de nitration du sommet C-3 des 4-, 5-, 6- et 7-azaindoles. Il a montré que le 5-azaindole était le plus réactif suivi dans l'ordre, par les 7-, 4- et 6-azaindoles. En 1993, Mahadevan a montré que les 4- et 7-azaindoles sont plus réactifs que les

1909-12. e) Azimov V.A., Prokopov A.A., Zhivotovskaya I.S., Polievktov M.K., Yakhontov L.N.: Derivatives of azaindoles. 58. Comparative kinetics of the nitration of isomeric 4-, 5-, 6- and 7-azaindoles. *Khim. Getero. Soed.*, **1979**, 11, 1489-91. f) Catalan J., Mo O., Perez P., Yanez M.A.: Theoretical study of the structure, charge distribution and gas-phase basicity of azaindoles. *Tetrahedron*, **1983**, 39, 2851-6. g) Mahadevan I., Rasmussen M.: Ambident heterocyclic reactivity: the alkylation of pyrrolopyridines (azaindoles, diazaindenes). *Tetrahedron*, **1993**, 49, 33, 7337-52. h) Kereselidze J.A., Pachuliya Z.V., Zarkuya T.Sh., Samsoniya S.A.: Correlations of the Physicochemical Parameters of Azaindoles with their Reactions. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2006**, 42, 918-28.

6- et 5-azaindoles au cours de diverses réactions d'alkylation, effectuées en conditions basiques sur l'azote N-1.

VI-2 Synthèse du 4-azaindole

Les premières voies de synthèse développées pour construire le cycle 4-azaindole font appel aux méthodes traditionnellement utilisées pour la préparation des indoles. Il s'agit des réactions de Reissert,²³¹ Batcho-Leimgruber,²³² Madelung,²³³ Bartoli²³⁴ et Gassman.²³⁵ La réaction de Madelung a été reportée pour les 7- et 5-azaindoles.²²⁷ Les réactions de Bartoli et Gassman ont été peu utilisées pour la synthèse du 4-azaindole dû essentiellement aux conditions de température drastiques qu'elles nécessitent et aux médiocres rendements obtenus. Les travaux de Wang décrivent la synthèse de Bartoli appliquée au 4-azaindole (**Schéma 1**).²³⁶ Cette synthèse consiste à faire réagir un nitroarène *ortho* substitué avec un bromure de vinyl magnésium à - 78 °C. A partir de la 3-nitro-pyridine substituée en 4 et/ou 6, la réaction de Bartoli a conduit aux dérivés 4-azaindole substitués en 7 et/ou 5 avec des rendements moyens compris entre 11 et 50 %.

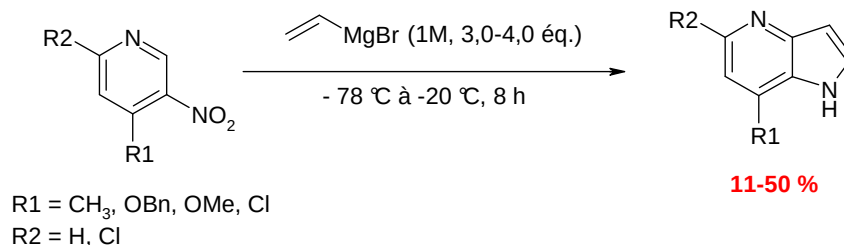


Schéma 1 : Synthèse de Bartoli appliquée à la synthèse de dérivés 4-azaindoliques

²³¹ a) A. Reissert : Reissert Indole Synthesis, **1897**, *Ber.*, 30, 1030. b) Kermack W.O., Perkin W.H., Robinson R.: Harmin and harmaline. Part V. The synthesis of norharman. *J. Chem. Soc.*, **1921**, 119, 1602-42.

²³² a) Batcho, A. D.; Leimgruber, W. : Indoles from 2-Methylnitrobenzenes by Condensation with Formamide Acetals followed by Reduction: 4-Benzoyloxyindole. *Org. Synth.*, **1985**, 63, 214-20. b) Clark R.D., Repke D.B.: The Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. *Heterocycles*, **1984**, 22, 195-221.

²³³ a) Madelung W., *Ber.*, **1912**, 45, 1128. b) Houlihan W.J., Parrino V.A., Uike Y.: Lithiation of N-(2-alkylphenyl)alkanamides and related compounds. A modified Madelung indole synthesis. *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4511-15.

²³⁴ Bartoli G., Palmieri G., Bosco M., Dalpozzo R.: The reaction of vinyl grignard reagents with 2-substituted nitroarenes: A new approach to the synthesis of 7-substituted indoles. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2129-32.

²³⁵ Gassman P.G., Gruetzmacher G., van Bergen T.J.: General Method for the Synthesis of Indoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 6508.

²³⁶ Zhang Z., Yang Z., Meanwell N.A., Kadow J.F., Wang T.: A General Method for the Preparation of 4- and 6-Azaindoles. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 2345-47.

Les travaux de Wood ont appliqué la synthèse de Gassman pour les 4-, 6- et 7-azaindoles.²³⁷ Cette voie de synthèse en one-pot a permis d'accéder à des 4-azaindoles fonctionnalisés en 2 par un groupement méthyle et en 3 par un méthylsulfure avec des rendements compris entre 25 et 70 % (**Schéma 2**).

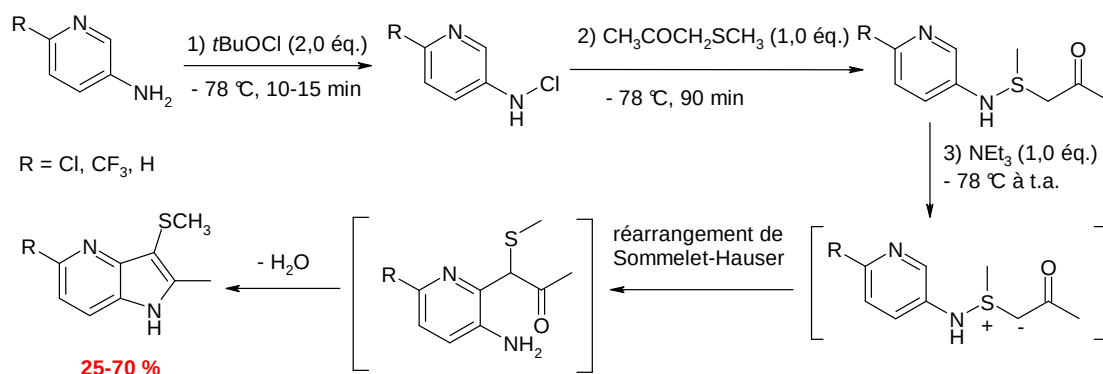


Schéma 2 : Réaction de Gassman appliquée à la synthèse de dérivés 4-azaindologiques

Les réactions apparentées aux synthèses de Reissert et Batcho-Leimgruber sont les 2 plus décrites pour la synthèse du 4-azaindole. Ces réactions furent ensuite modernisées à partir des années 80 avec l'apparition des réactions de couplages catalysés au palladium qui ont permis l'accès au 4-azaindole dans des conditions plus douces. Une autre réaction largement utilisée pour la synthèse des hétérocycles substitués, dont le 4-azaindole, est la substitution nucléophile indirecte (vicarious nucleophilic substitution ou VNS).²³⁸ Seront décrites ci-dessous les principales réactions qui ont été utilisées pour la synthèse du 4-azaindole. Ces réactions sont en général reprises et améliorées pour la synthèse de 4-azaindole substitués.^{227,228} La plupart des méthodes utilisent comme produit de départ une pyridine disubstituée en position 3 et 2 pour le 4-azaindole.

La cyclisation de type Reissert (Schéma 3): La première synthèse de type Reissert envisagée pour le 4-azaindole fut réalisée par Fontan R. *et al.* en 1981 à partir de la 3-amino-2-chloro-pyridine (**1**).²³⁹

²³⁷ Debenham S.D., Chan A., Kun L., Price K., Wood H.B.: A Convenient One-Pot Synthesis of 4-, 6-, and 7-azaindoles from aminopyridines. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 2283-85.

²³⁸ Makosza M.: Vicarious Nucleophilic Substitution of Hydrogen in the Chemistry of Heterocyclic Compounds. *Synthesis*, **1991**, 2, 103-11.

²³⁹ Fontan R., Galvez C., Viladoms P.: SRN1 reaction. Synthetic application to 4-azaindoles. *Heterocycles*, **1981**, 16, 1473-4.

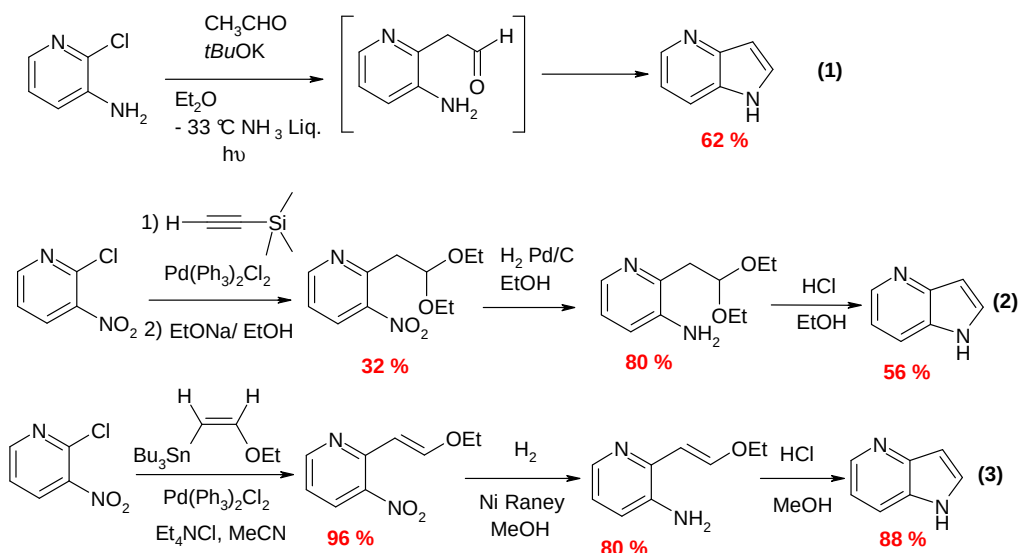


Schéma 3 : Cyclisation de type Reissert

L'atome de chlore est substitué par un énolate puis la cyclisation est effectuée sous irradiation. Sakamoto T. effectua une réaction de Sonogashira²⁴⁰ avec le TMS acétylène sur la 2-chloro-3-nitropyridine.^{241,242} Après déprotection et addition d'éthanol sur la triple liaison l'acétal est obtenu (32 %) (2). La réduction du groupement nitro en amine suivi d'un traitement acide conduit au 4-azaindole.

Les auteurs ont ensuite amélioré le rendement de la première étape (96 %) en réalisant un couplage pallado-catalysé de Stille²⁴³ avec un éthoxy-vinyl-tributyl étain (3). Le groupement éthoxy-vinyl est équivalent à un aldéhyde protégé. Les étapes suivantes sont équivalentes à la voie (2). D'autres méthodologies utilisant un couplage de Sonogashira pallado-catalysé pour la synthèse des intermédiaires 3-amino-2-alkynyl-pyridines ont été reprises plus récemment par Cacchi (Schéma 4 (1)) et Davies (Schéma 4 (2)) pour la synthèse de dérivés 4-azaindoles substitués en position C-2 et/ou C-3.^{244,245} Encore plus

²⁴⁰ Sonogashira K., Tohda Y., Hagihara N.: A Convenient Synthesis of Acetylenes: Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes and Bromopyridines. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 16, 4467–70.

²⁴¹ Sakamoto T., Kondo Y., Yamanaka H.: Condensed heteroaromatic ring systems. VI. Synthesis of indoles and pyrrolopyridines from o-nitroarylacetylenes. *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 2362–8.

²⁴² Sakamoto T., Satoh C., Kondo Y., Hiroshi Y.: Condensed heteroaromatic ring systems. XXII. Simple and general synthesis of 1H-pyrrolopyridines. *Heterocycles*, **1992**, 34, 2379–84.

²⁴³ Milstein D., Stille J.K.: A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 3636–38.

²⁴⁴ Cacchi S., Fabrizi G., Parisi L.M.: The Aminopalladation-Reductive Elimination Process as a Tool for the Solution-Phase Synthesis of 2,3-Disubstituted Azaindole Libraries. *J. Comb. Chem.*, **2005**, 7, 510–12.

²⁴⁵ McLaughlin M., Palucki M., Davies I.W.: Efficient Access to Azaindoles and Indoles. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3307–10.

récemment, l'équipe de Simon a reporté une voie de synthèse permettant d'accéder à des 5-amido-2-méthyl-4-azaindole (**Schéma 4 (3)**).²⁴⁶

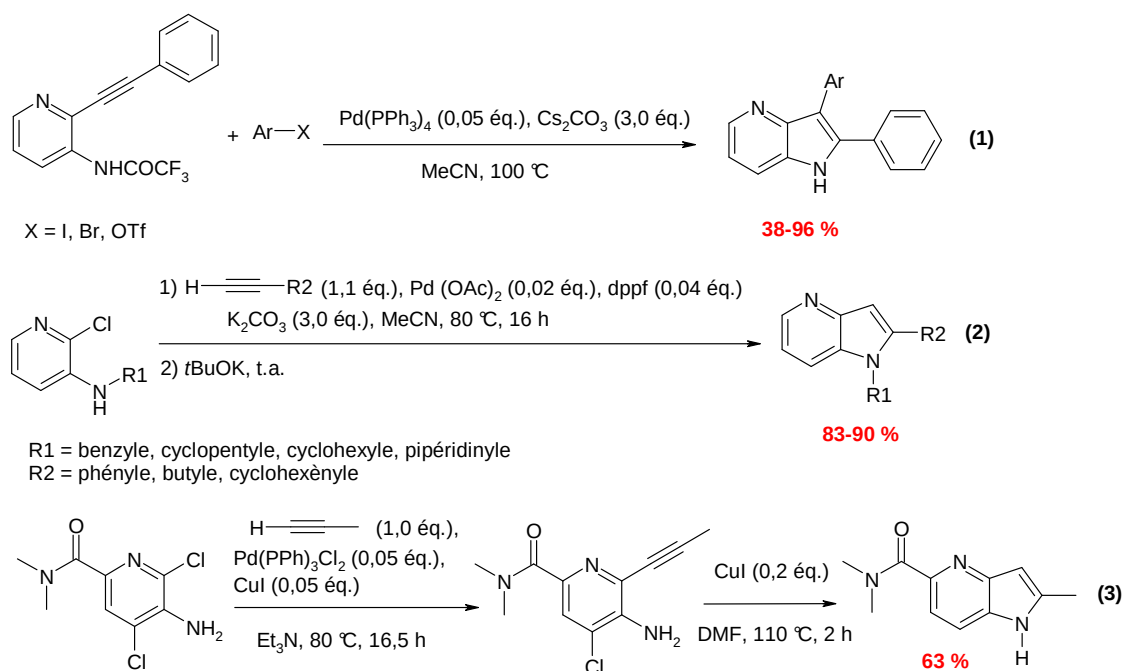


Schéma 4 : Utilisation plus récentes de la réaction de Sonogashira pour la synthèse de dérivés 4-azaindoles substitués

D'autres réactions pallado-catalysées ont été utilisées pour la construction du cycle 4-azaindole telles que la réaction de Heck et l'hétéroann\u00e9lation de Larock.

- *La réaction de Heck* : Une autre réaction pallado-catalys\u00e9e, la réaction de Heck²⁴⁷ a \u00e9t\u00e9 utilis\u00e9e pour construire le noyau 4-azaindole \u00e0 partir de la 3-amino-pyridine halog\u00e9n\u00e9e en 2.^{248,249,250} La fonction amine r\u00e9agit avec une c\u00e9tone pour former une \u00e9namine. La r\u00e9action de Heck se fait selon un m\u00e9canisme intramol\u00e9culaire entre l'\u00e9namine et le groupement halog\u00e8ne en 2 (**Sch\u00e9ma 5**). Cette r\u00e9action n'est cependant pas g\u00e9n\u00e9ralisable \u00e0 toutes les c\u00e9tones. Les meilleurs r\u00e9sultats sont obtenus avec les α -c\u00e9to-acides et les c\u00e9tones aliphatiques cycliques.

²⁴⁶ Palmer A.M., M\u00fcnch G., Brehm C., Zimmermann P.J., Buhr W., Feth M.P., Simon W.A.: 5-Substituted 1H-pyrrolo[3,2-b]pyridines as inhibitors of gastric acid secretion. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 1511-30.

²⁴⁷ Heck R.F., Nolley J.P.: Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides, *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 2320-22.

²⁴⁸ Nazar\u00e9 M., Schneider C., Lindenschmidt A., Will D.W.: A Flexible, Palladium-Catalyzed Indole and Azaindole Synthesis by Direct Annulation of Chloroanilines and Chloroaminopyridines with Ketones. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 4526-28.

²⁴⁹ Lachance N., April M., Joly M.A.: Rapid and Efficient Microwave-Assisted Synthesis of 4-, 5-, 6- and 7-Azaindoles. *Synthesis*, **2005**, 15, 2571-77.

²⁵⁰ Trejo A., Arzeno H., Browner M., Chanda S., Cheng S., Comer D.D., Dalrymple S.A., Dunten P., Lafargue J., Lovejoy B., Freire-Moar J., Lim J., McIntosh J., Miller J., Papp E., Reuter D., Roberts R., Sanpablo F., Saunders J., Song K., Villasenor A., Warren S.D., Welch M., Weller P., Whiteley P.E., Zeng L., Goldstein D.M.: Design and synthesis of 4-azaindoles as inhibitors of p38 MAP kinase. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 4702-13.

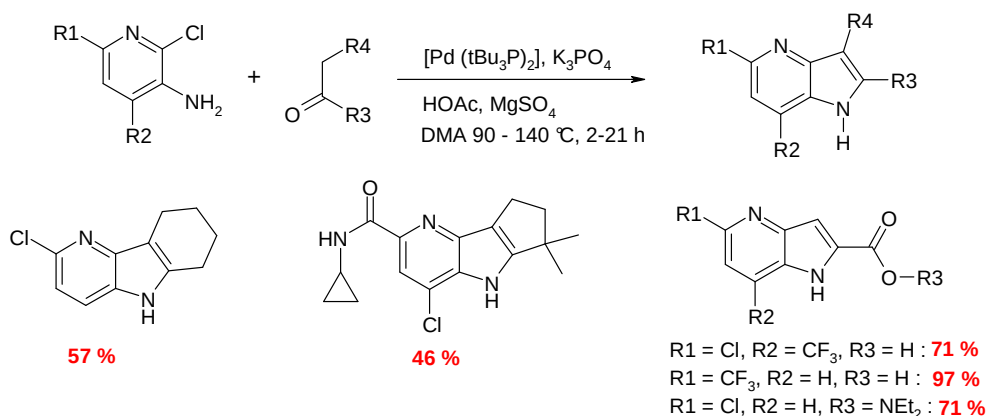


Schéma 5 : Réaction de Heck appliquée à la synthèse de dérivés 4-azaindoliques substitués²⁴⁸

- L'hétéroannélation d'alcynes internes : est une réaction pallado-catalysée décrite initialement par Larock en 1991 pour la synthèse de l'indole.²⁵¹ Elle fut ensuite utilisée surtout pour la synthèse des 5-, 6- et 7-azaindoles.²⁵² Cette réaction permet d'accéder à des azaindoles substitués en 2 et 3. Elle a été récemment appliquée à la synthèse du 4-azaindole (Schéma 6).²⁵³

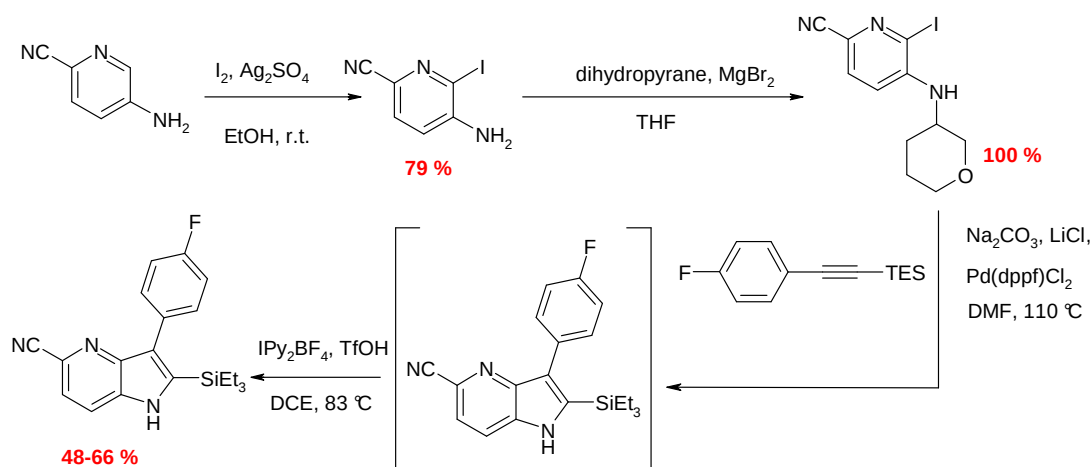


Schéma 6 : Hétéroannélation d'alcynes internes de type Larock pour la synthèse de 4-azaindole-2, 3 disubstitué²⁵³

²⁵¹ Larock R.C., Yum E.K.: Synthesis Of Indoles Via Palladium-Catalyzed Heteroannulation Of Internal Alkynes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6689-90.

²⁵² a) Wensbo D., Eriksson A., Jeschke T., Anny U., Gronowitz S., Cohen L.A.: Palladium-catalysed synthesis of heterocondensed pyrroles. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 2823-26. b) Park S.S., Choi J.K., Yum E.K., Ha D.C.: A facile synthesis of 2,3-disubstituted pyrrolo[2,3-b]pyridines via palladium-catalyzed heteroannulation with internal alkynes. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 627-30.

²⁵³ Koolman H., Heinrich T., Böttcher H., Rautenberg W., Reggeline M.: Syntheses of novel 2,3-diaryl-substituted 5-cyano-4-azaindoles exhibiting c-Met inhibition activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 1879-82.

La réaction de Batcho-Leimgruber : C'est l'une des réactions les plus utilisées pour produire des indoles à partir d'*ortho*-nitrotoluènes. Cette réaction a été initialement décrite par Azimov en 1977 à partir de la 2-méthyl-3-nitro-pyridine (nitro picoline) pour accéder en 2 étapes au 4-azaindole avec de très bons rendements (**Schéma 7**).²⁵⁴ Elle fut ensuite appliquée à la synthèse des 5-, 6- et 7- azaindoles.²⁵⁵ Cette réaction est encore largement utilisée aujourd'hui pour la synthèse du 4-azaindole.²⁵⁶ La première étape est la formation d'une énamine en utilisant le *N,N*-diméthylformamide diméthyle ou diéthyle acétal (DMF-DMA ou DMF-DEA). La deuxième étape est la cyclisation par hydrogénation catalytique.

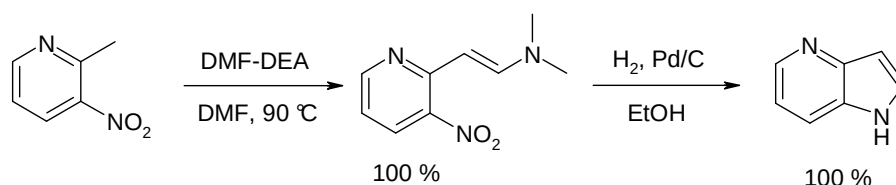


Schéma 7 : Synthèse d'Azimov de type Batcho-Leimgruber²⁵⁴

En 2006, Zhu a utilisé cette synthèse pour accéder à des 4-azaindoles substitués en position 3 par des groupements acyle, benzyle et alkyle (**Schéma 8**).²⁵⁷ Après la formation de l'énamine, l'électrophile est additionné en présence de la base diisopropyléthylamine. En général, ils ont obtenus des rendements moyens compris entre 36 et 64 %.

La substitution nucléophile indirecte (VNS) : Le principe général de cette réaction est la substitution nucléophile d'un halogène ou un autre groupe nucléofuge localisé en *ortho* ou *para* d'un nitroarène. Concernant la synthèse du 4-azaindole, elle a été décrite pour la première fois en 1988 par Makosza.²⁵⁸ Cette réaction permet d'obtenir le 4-azaindole substitué en position C-5 par un groupement éther qui est en général un groupement méthoxy. La première étape est une réaction de substitution nucléophile de l'hydrogène en *ortho* du

²⁵⁴ Azimov V.A., Yakhontov L.N.: Synthesis of 4-azaindoles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1977**, 1425.

²⁵⁵ Azimov V.A., Prokopov A.A., Zhivotovskaya I.S., Polievktov M.K., Yakhontov L.N.: Derivatives of azaindoles. 58. Comparative kinetics of the nitration of isomeric 4-, 5-, 6- and 7-azaindoles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1979**, 1489-91.

²⁵⁶ a) Dunn R., Xie W., Tehim A.: 3' Substituted Compounds Having 5-HT₆ Receptor Affinity. PCT Pat. Appl. WO 2009023844, **2009**. b) Giordanetto F., Karlsson O., Lindberg J., Larsson L.O., Linusson A., Evertsson E., Morgan D.G., Inghardt T.: Discovery of cyclopentane- and cyclohexane-trans-1,3-diamines as potent melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4232-41. c) Cash M.T., Schreiner P.R., Robert S.: Excited state tautomerization of azaindole. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 3701-06. d) Sloan M.J., Phillips R.S.: Enzymic synthesis of aza-L-tryptophans: the preparation of 5- and 6-aza-L-tryptophan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2, 1053-6.

²⁵⁷ Zhu J., Wong H., Zhang, Zhongxing Y., Zhiwei M., Nicholas A., Kadow J.F., Wang T.: An effective procedure for the preparation of 3-substituted-4- or 6-azaindoles from *ortho*-methyl nitro pyridines. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 5653-56.

²⁵⁸ Makosza M., Danikiewicz W., Wojciechowski K.: Simple and general synthesis of hydroxy- and methoxyindoles via vicarious nucleophilic substitution of hydrogen. *Liebigs Ann. Chem.*, **1988**, 3, 203-8.

groupement nitro de la 2-méthoxy-5-nitropyridine avec l'anion dérivé du 4-chlorophénoxyacétonitrile. Le composé (6-méthoxy-3-nitropyridin-2-yl)acétonitrile est obtenu avec un bon rendement de 86 %. La deuxième étape est la cyclisation par hydrogénation catalytique pour donner le 5-méthoxy-4-azaindole avec un rendement de 57 % (**Schéma 9**).²⁵⁹ Cette réaction a été décrite dans d'autres nombreux travaux.²⁶⁰

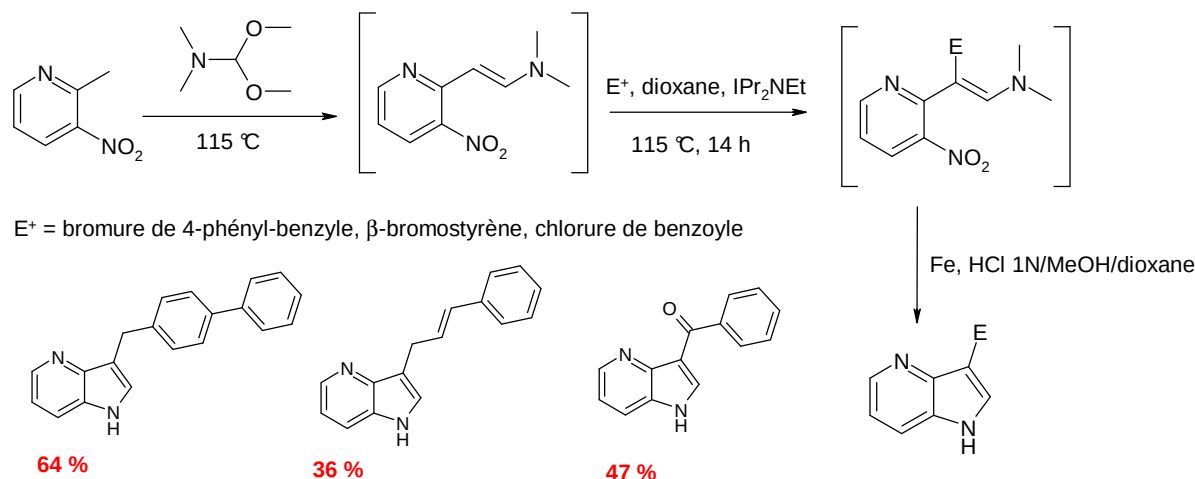


Schéma 8 : Application de la réaction de Batcho-Leimgruber pour la synthèse de dérivés 4-azaindole substitués en 3²⁵⁷

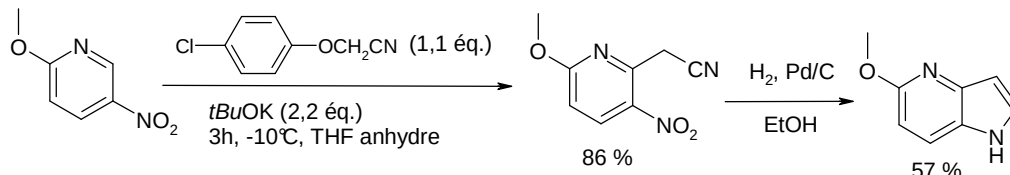


Schéma 9 : Substitution nucléophile indirecte (VNS) selon Makosza pour la synthèse du 5-méthoxy-4-azaindole²⁵⁸

²⁵⁹ Papageorgiou C., Camenisch G., Borer X.: Cell Permeability as a Parameter for Lead Generation in the Protein Tyrosine Kinase Inhibition Field. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1549-52.

²⁶⁰ a) Yamawaki K., Nomura T., Yasukata T., Uotani K., Miwa H., Takeda K., Nishitania Y.: A novel series of parenteral cephalosporins exhibiting potent activities against *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative pathogens: Synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 6716-32. b) Larraya C., Guillard J., Renard P., Audinot V., Boutin J.A., Delagrangre P., Bennejean C., Viaud-Massuard M.C.: Preparation of 4-azaindole and 7-azaindole dimers with a bisalkoxyalkyl spacer in order to preferentially target melatonin MT1 receptors over melatonin MT2 receptors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, 39, 515-26. c) Van de Poël H., Guillaumet G., Viaud-Massuard M.C.: Synthesis of 6,7,8,9-tetrahydropyrido[2,3-b]indolizine and 3,4-dihydro-2H-pyrido[2',3':4,5]pyrrolo[2,1-b][1,3]oxazine derivatives as new melatonin receptor ligands. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1205-08. d) Mazéas D., Guillaumet G., Viaud M.C.: Synthesis of New Melatonergic Ligands Including Azaindole Moiety. *Heterocycles*, **1999**, 50, 1065-80. e) Macor J.E., Burkhart C.A., Heym J.H., Ives J.L., Lebel L.A., Newman M.E., Nielsen J.A., Ryan K., Schulz D.W., Torgersen L.K., Koe B.K.: 3-(1,2,5,6-Tetrahydropyrid-4-yl)pyrrolo[3,2-b]pyrid-5-one: a potent and selective serotonin (5-HT1B) agonist and rotationally restricted phenolic analogue of 5-methoxy-3-(1,2,5,6-tetrahydropyrid-4-yl)indole. *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2087-93. f) Macor J.E., Newman M.E.: The Synthesis of Rotationally Restricted Phenolic Analog of 5-Methoxy-3-(1,2,5,6-Tetrahydropyrid-4-yl)indole (RU-24,969). *Heterocycles*, **1990**, 31, 805-09.

Balayant les idées reçues, l'équipe de Franck Suzenet, à l'ICOA, a montré qu'il était possible de construire le noyau 4-azaindole *via* une réaction de Fischer à partir de la 6-méthoxypyridin-3-ylhydrazine avec de bons rendements (**Schéma 10**).²²⁶

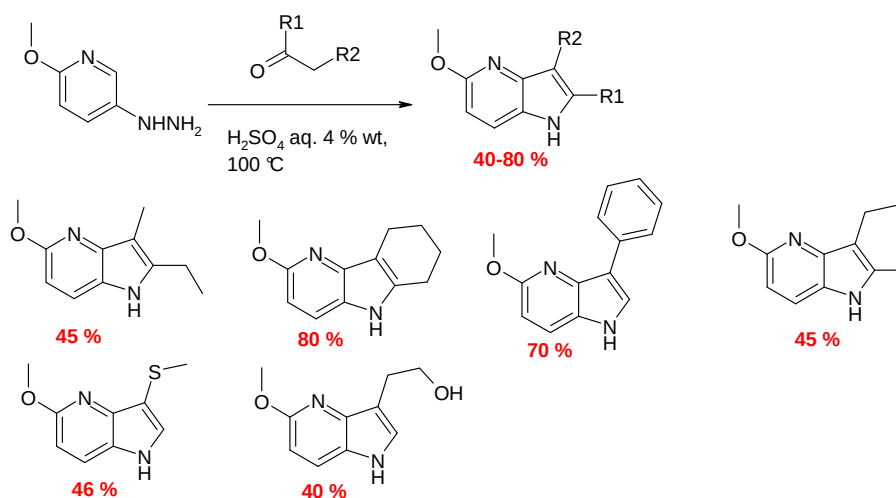


Schéma 10 : Réaction de Fischer appliquée à la synthèse de dérivés 4-azaindoliques

VI-3 Fonctionnalisation du 4-azaindole

La plupart des réactions utilisées par la fonctionnalisation des azaindoles fait appel à la chimie organométallique telles que les réactions de lithiation,^{227,228} de couplage catalysé au palladium (Suzuki, Stille) et les échanges halogène-métal. Les principaux sites de fonctionnalisation du 4-azaindole sont l'azote en 1 (*N*-1), les sommets 2 (*C*-2), 3 (*C*-3) et 5 (*C*-5).

Fonctionnalisation de *N*-1 : Il s'agit essentiellement de réactions d'alkylation en milieu basique (NaH) (**Schéma 11**).²⁶¹

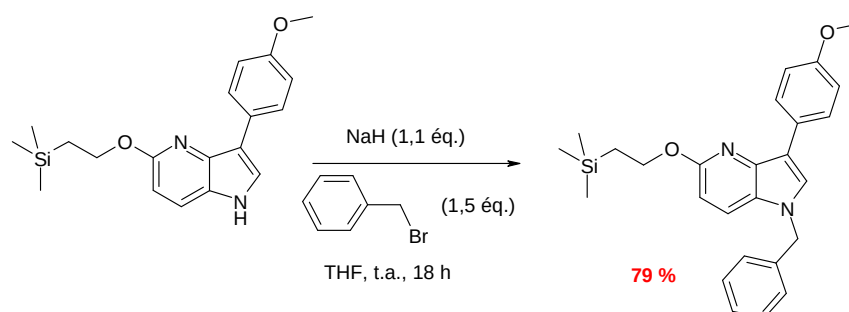


Schéma 11 : Exemple de fonctionnalisation en *N*-1 du noyau 4-azaindole²⁶¹

²⁶¹ Van de Poël H., Guillaumet G., Viaud-Massuard M.C.: Synthesis of 6,7,8,9-tetrahydropyrido[2,3-*b*]indolizine and 3,4-dihydro-2H-pyrido[2',3':4,5]pyrrolo[2,1-*b*][1,3]oxazine derivatives as new melatonin receptor ligands. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1205-08.

Fonctionnalisation du C-2 : La fonctionnalisation du sommet C-2 a été initialement décrite à partir du 5-azaindole *N*-protégé en présence de bases fortes lithiées (**Schéma 12 (1)**).²⁶² La méthodologie a ensuite été reprise pour le 7-azaindole (**2**)²⁶³ et le 4-azaindole (**3**).²⁶⁴ Cette méthode permet d'introduire en C-2 un groupe partant tel qu'un atome d'iode, des groupements tributylétain ou triméthylsilyle qui pourront être engagés dans des réactions de couplages pallo catalysés afin de créer une liaison carbone-carbone. Cette méthodologie a notamment été décrite pour les 5-²⁶⁵ et 7-azaindoles.²⁶⁶

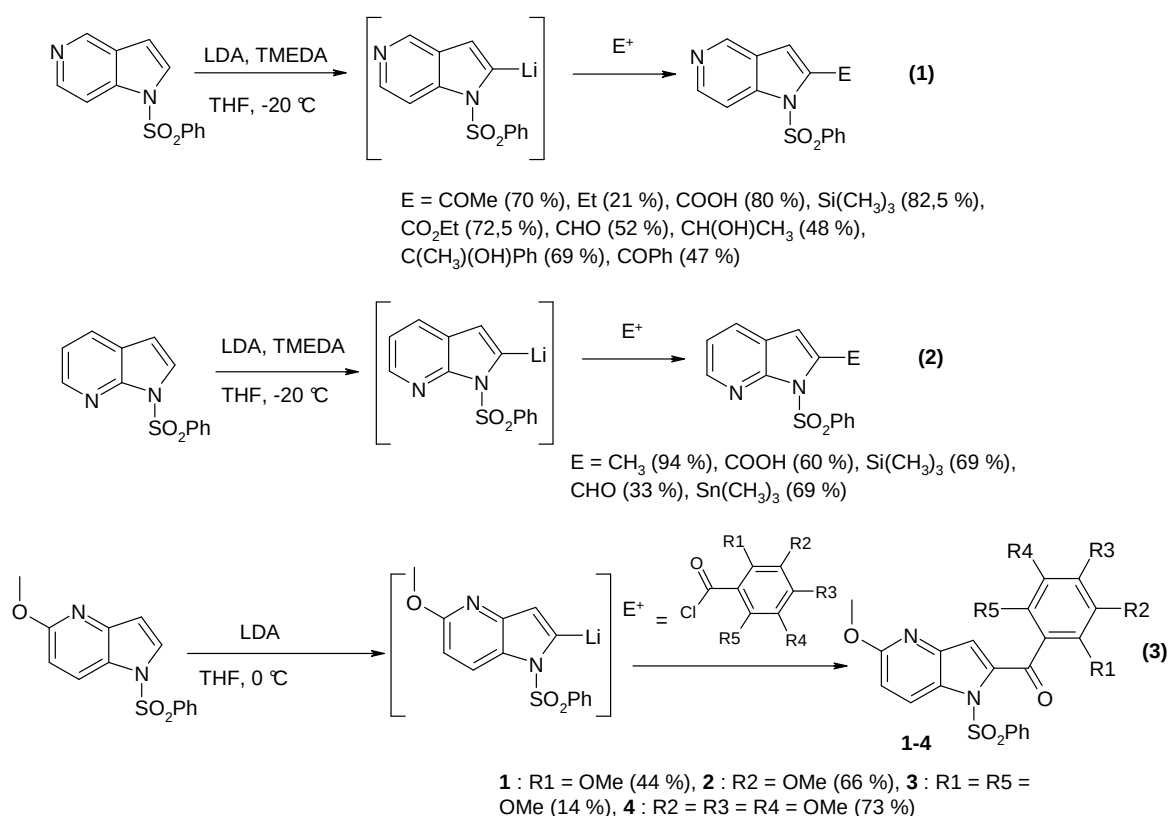


Schéma 12 : Fonctionnalisation en C-2 des dérivés 5-, 7- et 4-azaindoles²⁶²⁻²⁶⁴

²⁶² Dormoy J.R., Alain Heymes A.: Synthèse industrielle en série elliptique. I : Elaboration d'une nouvelle voie d'accès aux 6*H*-pyrido[4,3-*b*]carbazoles et analogues: A. Synthèse et étude des précurseurs. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 2885-2914.

²⁶³ Desarbre E., Coudret S., Meheust C., Mérou J.Y.: Synthesis of 2-Substituted-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridines: Preparation of 7-azaolivacine analogue and 7-azaindolopyridopyrimidine derivatives. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 3637-48.

²⁶⁴ Mahboobi S., Pongratz H., Hufsky H., Hockemeyer J., Frieser M., Lyssenko A., Paper D.H., Bürgermeister J., Böhrer F.D., Fiebig H.H., Burger A.M., Baasner S., Beckers T.: Synthetic 2-arylindole derivatives as a new class of potent tubulin-inhibitory, antimitotic agents. *J Med Chem.*, **2001**, 44, 4535-53.

²⁶⁵ Chi S.M., Choi J.K., Yum E.K., Chi D.Y.: Palladium-catalyzed functionalization of 5- and 7-azaindoles. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 919-22.

²⁶⁶ Benoît J., Da Costa H., Mérou J.Y.: Synthesis of Pyrido[2,3-*b*]indole Derivatives via Diels–Alder Reactions of 2- and 3-Vinylpyrrolo[2,3-*b*]pyridines. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 3189-96.

Fonctionnalisation du C-3 : La plupart des réactions utilisées pour fonctionnaliser les indoles donnent des rendements inférieurs pour le 4-azaindole à l'exception de la réaction d'halogénéation (iodation ou bromation) qui donne de très bons rendements.²⁶⁷ A ce jour, ont été reportés quelques exemples d'acylations de Friedel-Crafts,²⁶⁸ des réactions de Mannich,²⁶⁹ des nitrations,²⁷⁰ formylations,²⁷¹ des condensations avec des pipéridones²⁷² et des additions d'aryle disulfure.²⁷³ Récemment, une nouvelle méthode a été reportée pour la synthèse de dérivés 4-azaindoles substitués en 3 de façon à avoir des analogues du tryptophane et de la mélatonine.²⁷⁴

Les 3-iodo- ou 3-bromo- 4-azaindoles peuvent subir deux types de réactions : des réactions pallado-catalysées **(1)** d'une part^{253,259} ou des réactions d'échange halogène-métal **(2)** d'autre part (**Schéma 13**).²⁷⁵ Dans le cas de l'échange halogène-métal décrit par l'équipe de Grob, l'atome de brome est remplacé par un groupement tributyle étain en présence de *n*-

²⁶⁷ a) Iodation : Papageorgiou C., Camenisch G., Borer X.: Cell Permeability as a Parameter for Lead Generation in the Protein Tyrosine Kinase Inhibition Field. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1549-52. b) Bromation : Gallou F., Reeves J.T., Zhulin T., Song J.J., Yee N.K., Harcken C., Pingrong L., Thomson D., Senanayake C.H.: Practical Regioselective Bromination of Azaindoles and Diazaindoles. *Synlett*, **2007**, 2, 211-4.

²⁶⁸ Zhang Z., Yang Z., Wang T.J.: Synthesis of C3-Substituted 4-azaindoles: An Easy Access to 4-Azamelatonin and Protected 4-Azatryptophan. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 6226-27.

²⁶⁹ Yakhontov L.N., Azimov V.A.: The Synthesis of 3-Substituted 4-Azaindoles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1970**, 6, 32-36.

²⁷⁰ a) Azimov V.A., Prokopov A.A., Zhivotovskaya I.S., Polievktov M.K., Yakhontov L.N.: Derivatives of azaindoles. 58. Comparative kinetics of the nitration of isomeric 4-, 5-, 6- and 7-azaindoles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1979**, 1489-91. b) Dunn R., Xie W., Tehim A.: 3' Substituted Compounds Having 5-HT₆ Receptor Affinity. PCT Pat. Appl. WO 2009023844, **2009**.

²⁷¹ a) Mazéas D., Guillaumet G., Viaud M.C.: Synthesis of New Melatonergic Ligands Including Azaindole Moiety. *Heterocycles*, **1999**, 50, 1065-80. b) Van de Poël H., Guillaumet G., Viaud-Massuard M.C.: Synthesis of 6,7,8,9-tetrahydropyrido[2,3-*b*]indolizine and 3,4-dihydro-2H-pyrido[2',3':4,5]pyrrolo[2,1-*b*][1,3]oxazine derivatives as new melatonin receptor ligands. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1205-08. c) Larraya C., Guillard J., Renard P., Audinot V., Boutin J.A., Delagrangé P., Bennejean C., Viaud-Massuard M.C.: Preparation of 4-azaindole and 7-azaindole dimers with a bisalkoxyalkyl spacer in order to preferentially target melatonin MT1 receptors over melatonin MT2 receptors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, 39, 515-26.

²⁷² a) Macor J. E., Newman M.E.: The Synthesis of Rotationally Restricted Phenolic Analog of 5-Methoxy-3-(1,2,5,6-Tetrahydropyrid-4-yl)indole (RU-24,969). *Heterocycles*, **1990**, 31, 805-09. b) Filla S.A., Mathes B.M., Johnson K.W., Phebus L.A., Cohen M.L., Nelson D.L., Zgombick J.M., Erickson J.A., Schenck K.W., Wainscott D.B., Branchek T.A., Schaus J.M.: Novel potent 5-HT(1F) receptor agonists: structure-activity studies of a series of substituted N-[3-(1-methyl-4-piperidinyl)-1H-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl]amides. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 3060-71.

²⁷³ a) Ahmed M., Briggs M.A., Bromidge S.M., Buck T., Campbell L., Deeks N.J., Garner A., Gordon L., Hamprecht D.W., Holland V., Johnson C.N., Medhurst A.D., Mitchell D.J., Moss S.F., Powles J., Seal J.T., Stean T.O., Stemp G., Thompson M., Trail B., Upton N., Winborn K., Witty D.R.: Bicyclic heteroaryl piperazines as selective brain penetrant 5-HT₆ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4867. b) Porter J., Lumb S., Franklin R.J., Gascon-Simorte J.M., Calmiano M., Riche K.L., Lallemand B., Keyaerts J., Edwards H., Maloney A., Delgado J., King L., Foley A., Lecomte F., Reuberson J., Meier C., Batchelor M.: Discovery of 4-azaindoles as novel inhibitors of c-Met kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 2780-84.

²⁷⁴ Jeanty M., Suzenet F., Guillaumet G.: Synthesis of C3-substituted 4-azaindoles: an easy access to 4-azamelatonin and protected 4-azatryptophan. *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7390-3.

²⁷⁵ Kelly T.A., McNeil D.W., Rose J.M., David E., Shih C.K., Grob P.M.: Novel Non-Nucleoside Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. 6. 2-Indol-3-yl- and 2-Azaindol-3-yl dipyrrolo-diazepinones. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2430-33.

Buli et TMEDA afin de réaliser des couplages de Stille. Cependant, le dérivé stannylé en 3 fut obtenu avec un rendement médiocre de 18 %.

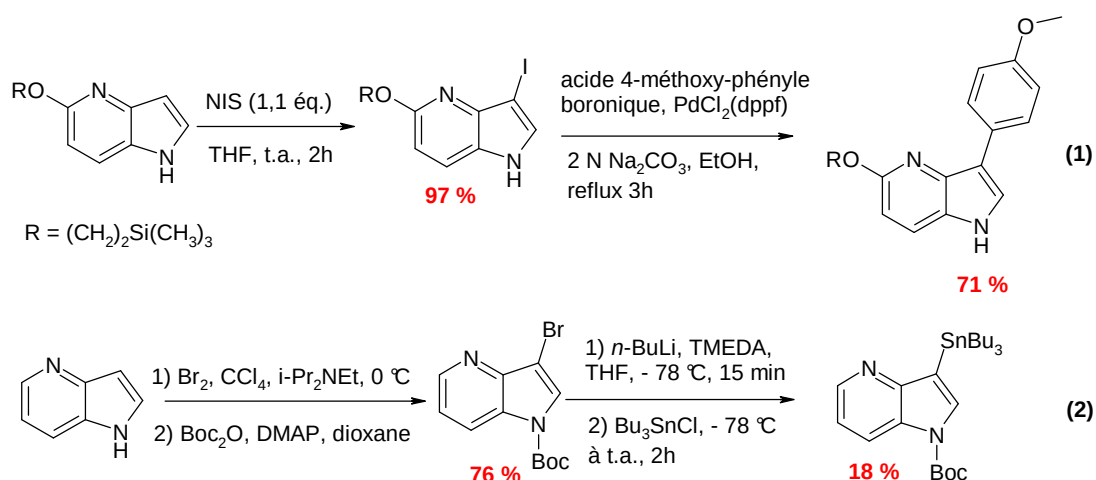


Schéma 13 : Exemples de fonctionnalisation en C-3 du 4-azaindole^{259,275}

Fonctionnalisation du C-5 : D'après les informations décrites plus haut, la plupart des groupements retrouvés en position C-5 sont les groupements méthoxy, cyano et chlore qui sont souvent introduits dès la première étape de synthèse du 4-azaindole via la fonctionnalisation adéquate en position 6 de la 3-aminopyridine. A partir du synthon 5-méthoxy-4-azaindole, des dimères liés par un espaceur alkoxy ont été synthétisés après la déprotection du groupement méthoxy suivi de sa O-alkylation.²⁷⁶ Deux exemples de fonctionnalisation en position C-5 à partir du noyau 4-azaindole N-protégé ont été décrits (**Schéma 14**). Le premier a été reporté en 1992 par Macor et consiste à introduire un groupement cyano via la formation d'un N-oxyde sur l'azote pyridinique à partir du 4-azaindole N-protégé par un groupement carbamate (**1**).²⁷⁷ Le deuxième exemple a été récemment décrit dans un brevet et consiste à chlorer la position 5 via la formation d'un N-oxyde sur l'azote pyridinique à partir du 4-azaindole N-protégé par un groupement tosylé (**2**).²⁷⁸ Les rendements de cyanation ou chloration sont cependant moyens, inférieurs à 50 %.

²⁷⁶ Larraya C., Guillard J., Viaud-Massuard M.C. *et al.*: Preparation of 4-azaindole and 7-azaindole dimers with a bisalkoxyalkyl spacer in order to preferentially target melatonin MT1 receptors over melatonin MT2 receptors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, 39, 515-26.

²⁷⁷ Macor J.E., Post R., Ryan K.: A Synthesis of 5-Carboxamidopyrrolo[3,2-b]pyridine. *J. Heterocycl. Chem.*, **1992**, 29, 1465-7.

²⁷⁸ Dunn R., Xie W., Tehim A. *et al.*: 3' Substituted Compounds Having 5-HT₆ Receptor Affinity. PCT Pat. Appl. WO 2009023844, **2009**.

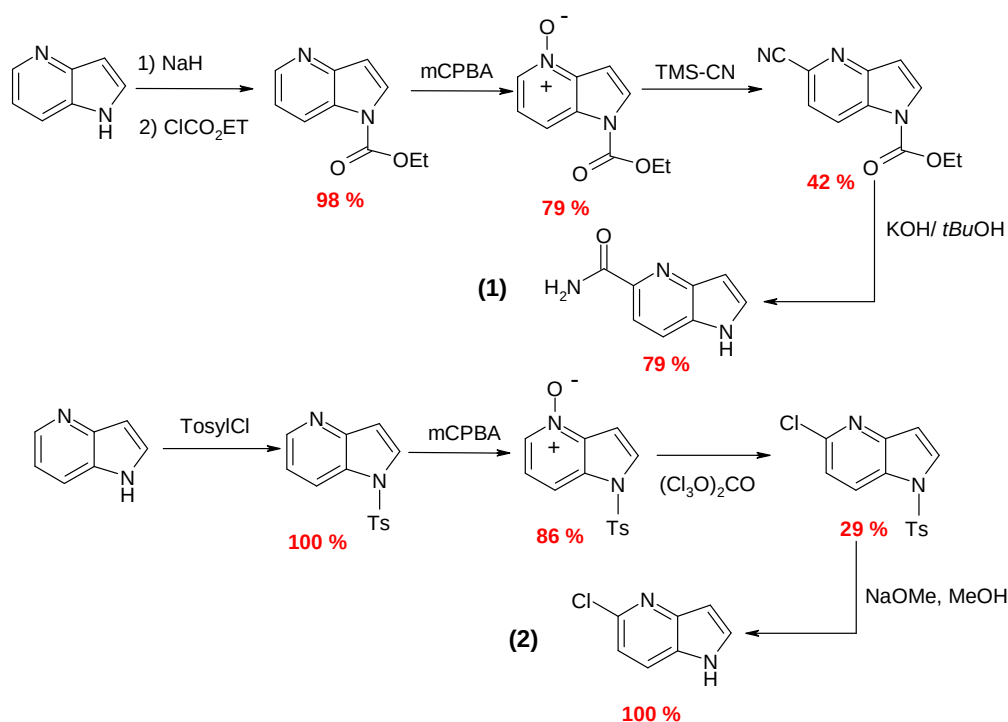


Schéma 14 : Exemple de fonctionnalisation du sommet C-5 du noyau 4-azaindole^{277,278}

Fonctionnalisation du C-7 : Un exemple récent tiré d'un brevet, décrit la fonctionnalisation en position C-7 par un groupement méthoxy ou chlore via la formation d'un *N*-oxyde sur l'azote pyridinique à partir du 4-azaindole cette fois-ci non protégé en *N*-1 (Schéma 15).²⁷⁸

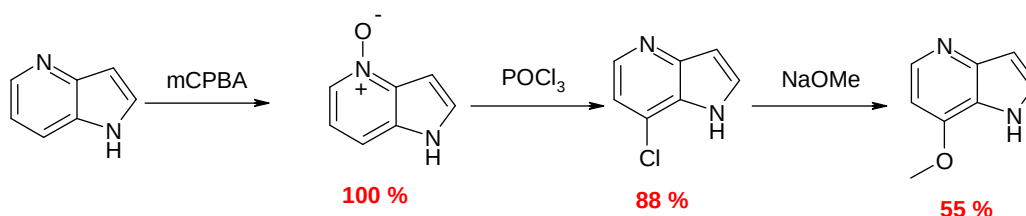


Schéma 15 : Exemple de fonctionnalisation du sommet 7 du noyau 4-azaindole²⁷⁸

VI-4 Propriétés biologiques des dérivés 4-azaindoliques

Concernant les applications biologiques du 4-azaindole, de nombreux brevets et publications ont été décrits dans la littérature. La **Figure 42** illustre quelques exemples. Parmi les applications les plus récentes, le 4-azaindole est utilisé en tant qu'inhibiteur de protéines

kinases : p38 (1),²⁵⁰ GSK-3 β (2),²⁷⁹ c-Met (3),²⁸⁰ (4),²⁵³ ligands des récepteurs à la sérotonine 5-HT : (5),²⁸¹ (6),²⁷⁸ et antibactérien (7).²⁸²

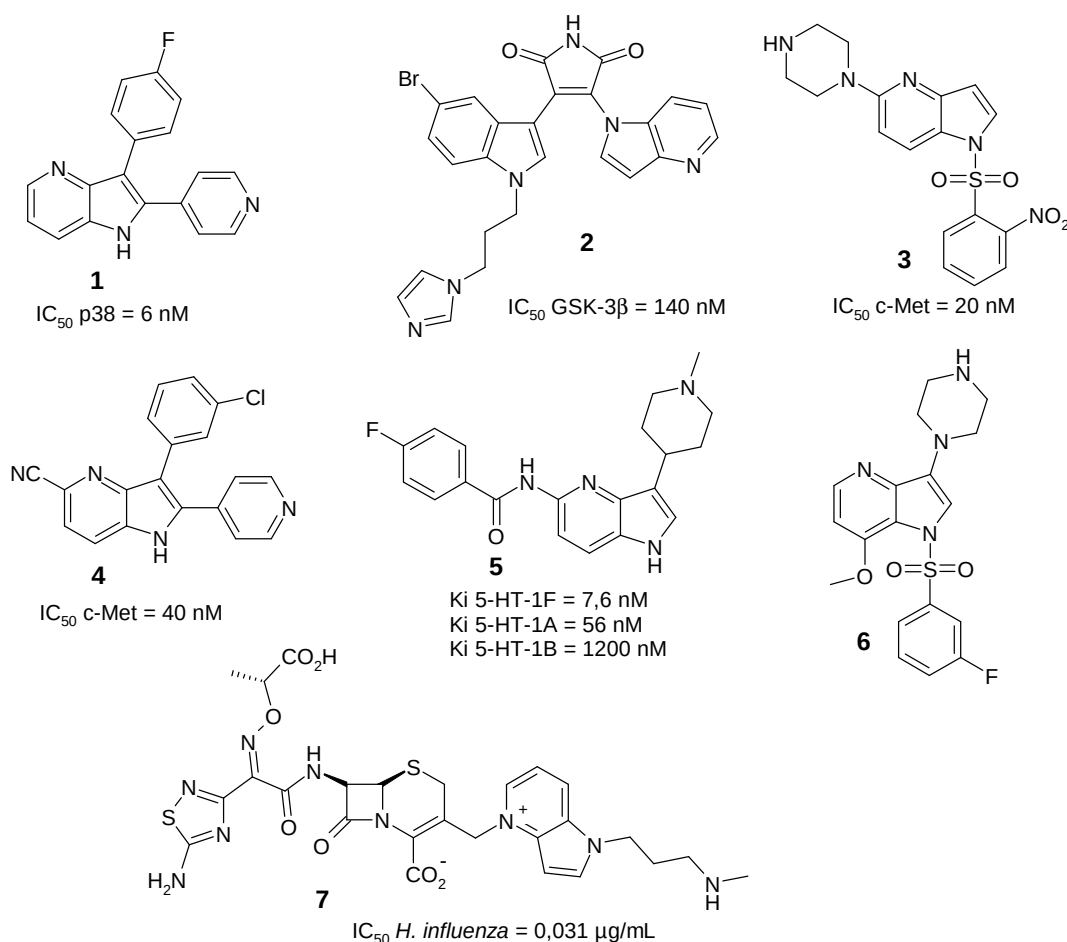


Figure 42 : Applications biologiques du 4-azaindole : (1), inhibiteur de la kinase p38 ; (2) inhibiteur de la kinase GSK-3 β ; (3) et (4), inhibiteur du RTK c-Met ; (5) et (6) ligands des récepteurs 5-HT ; (7) antibactérien

²⁷⁹ Ye Q., Xu G., Lv D., Cheng Z., Li J., Hu Y.: Synthesis and biological evaluation of novel 4-azaindoly-indolyl-maleimides as glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 4302-12.

²⁸⁰ Porter J., Lumb S., Franklin R.J., Gascon-Simorte J.M., Calmiano M., Riche K.L., Lallemand B., Keyaerts J., Edwards H., Maloney A., Delgado J., King L., Foley A., Lecomte F., Reuberson J., Meier C., Batchelor M.: Discovery of 4-azaindoles as novel inhibitors of c-Met kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 2780-84.

²⁸¹ Filla S.A., Mathes B.M., Johnson K.W., Phebus L.A., Cohen M.L., Nelson D.L., Zgombick J.M., Erickson J.A., Schenck K.W., Wainscott D.B., Branchek T.A., Schaus J.M.: Novel potent 5-HT(1F) receptor agonists: structure-activity studies of a series of substituted *N*-[3-(1-methyl-4-piperidinyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl]amides. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 3060-71.

²⁸² Yamawaki K., Nomura T., Yasukata T., Uotani K., Miwa H., Takeda K., Nishitani Y.: A novel series of parenteral cephalosporins exhibiting potent activities against *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative pathogens: Synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 6716-32.

VII/ Vers les mimes topologiques de l'interaction Raf/PEBP

L'une des stratégies possibles pour inhiber Raf serait de mimer l'action de son seul inhibiteur naturel connu à ce jour, la protéine PEBP (phosphatidylethanolamine binding protein) qui est aussi appelée RKIP (Raf-kinase inhibitor protein). La PEBP/RKIP est un modèle intéressant pour deux raisons principales : d'une part, elle inhibe la voie Raf/MEK/ERK et d'autre part, elle joue un rôle important contre l'évolution des cancers. Dans les cellules tumorales la PEBP agit comme un suppresseur de métastases en s'opposant à leur développement de telle sorte que la diminution du taux d'expression de la PEBP dans les tumeurs est un facteur de pronostic défavorable. Par ailleurs, la présence de la PEBP dans les cellules cancéreuses les sensibilise à la chimiothérapie et à l'immunothérapie. La PEBP apparait donc comme un agent à la fois protecteur contre le cancer et favorable à la réponse des cellules tumorales aux traitements anti-cancéreux. Ces effets font de la PEBP un modèle qui peut servir de base pour la conception de nouveaux médicaments.

VII-1 La famille des PEBPs

La PEBP/RKIP, qui est un suppresseur de métastases chez l'homme, appartient à une vaste famille de protéines qui comprend à ce jour plus de 400 membres mis en évidence dans de nombreuses espèces (bactéries, levures, parasites de l'homme et du chien, plantes, insectes, mammifères).²⁸³ Il s'agit de protéines globulaires dont la masse moléculaire est d'environ 20-25 kDa. Dans toutes les espèces, les PEBPs semblent être impliquées dans la morphogénèse et la différenciation cellulaire et tissulaire.²⁸⁴ Cependant, à l'intérieur d'une même espèce on rencontre souvent plusieurs isoformes de PEBPs (5 isoformes chez l'homme, 5 chez la souris, 6 chez la drosophile, 2 chez *E. coli*), dont on ignore le rôle précis à ce jour. Initialement, la première protéine de cette famille a été purifiée à partir du cerveau de bœuf, durant sa purification elle restait associée à des lipides endogènes ce qui a conduit les chercheurs à mener des études d'interactions avec des ligands hydrophobes. La PEBP bovine s'est révélée capable de lier toute une série d'anions organiques ainsi que les phospholipides et particulièrement la phosphatidyléthanolamine, de ce fait elle a été appelée

²⁸³ Klysik J., Theroux S.J., Sedivy J.M., Moffit J.S., Boekelheide K.: Signaling crossroads: The function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell. Signal.*, **2008**, 20, 1-9.

²⁸⁴ Schoentgen F., Jollès P.: From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett.*, **1995**, 369, 22-6.

"phosphatidylethanolamine binding protein" (PEBP).^{285,286} La PEBP de cerveau de bœuf lie également différents nucléotides tels que le FMN et le GTP mais aussi des protéines G,²⁸⁷ des dérivés de la morphine²⁸⁸ et la locostatine.²⁸⁹ La protéine PEBP intervient dans les phases terminales de la différenciation cellulaire, en particulier lors de l'élongation des oligodendrocytes du cerveau en développement (20 jours chez le rat)²⁹⁰ et lors de l'élongation des spermatides.²⁹¹

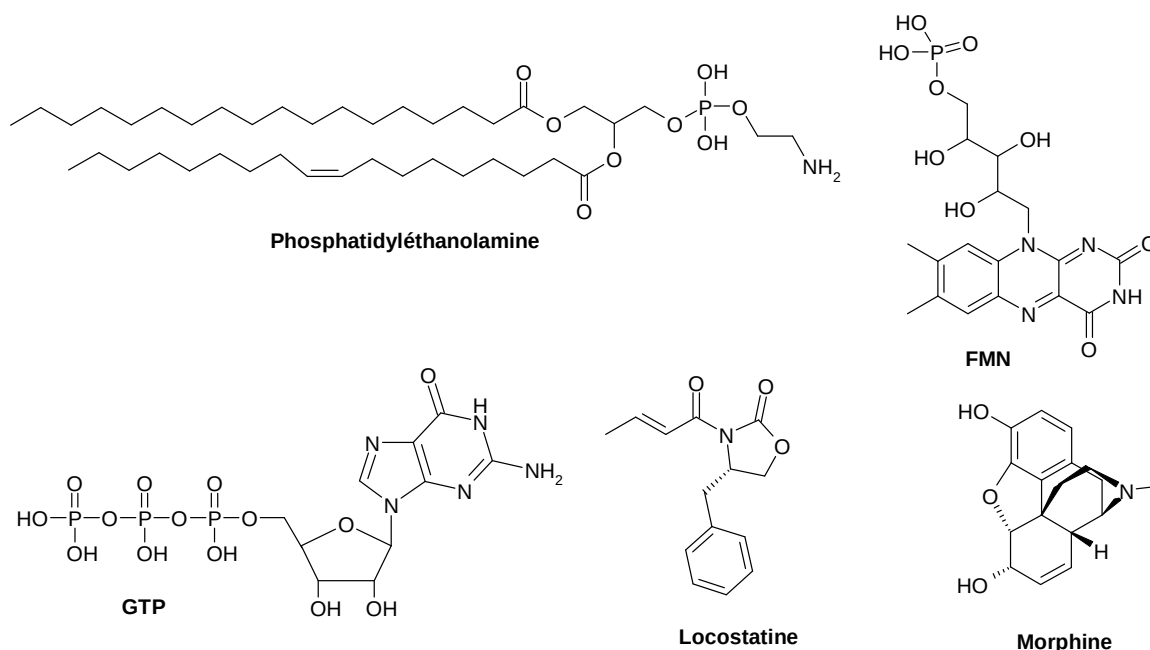


Figure 43 : Ligands de la PEBP de bœuf

Un alignement des séquences connues (dont un exemple est montré **Figure 44**) indique la conservation d'une région centrale de la protéine tandis que les régions N- et C-

²⁸⁵ Bernier I., Jolles P.: Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein purified from bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 790, 174-81.

²⁸⁶ Bernier I., Tresca J.P., Jolles P.: Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 871, 19-23.

²⁸⁷ Bucquoy S., Jollès P., Schoentgen F.: Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 225, 1203-10.

²⁸⁸ Atmanene C., Laux A., Glattard E., Muller A., Schoentgen F., Metz-Boutigue M.H., Aunis D., Van Dorsselaer A., Stefano G.B., Sanglier-Cianféron S., Goumon Y.: Characterization of human and bovine phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP/RKIP) interactions with morphine and morphine-glucuronides determined by noncovalent mass spectrometry. *Med. Sci. Monit.*, **2009**, 15, 178-87.

²⁸⁹ Zhu S., Mc Henry K.T., Lane W.S., Fenteany G.: A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration. *Chem. Biol.*, **2005**, 12, 981-91.

²⁹⁰ Roussel G., Nussbaum F., Schoentgen F., Jollès P., Nussbaum J.L.: Immunological investigation of a 21-Kilodalton cytosolic basic protein in rat brain. *Dev. Neurosci.*, **1988**, 10, 65-74.

²⁹¹ Seddiqi N., Segretain D., Bucquoy S., Pineau C., Jégou B., Jollès P., Schoentgen F.: Characterization and localization of the testicular phosphatidylethanolamine binding protein in rat, mouse and human testis. *Experientia*, **1996**, 52, 101-10.

terminales sont très divergentes. La séquence consensus D-P-D-X-P-X(11)-H-X(28,30)-H-R, trouvée uniquement dans cette famille de protéines, en constitue la signature.

	< αA >	< βA >	< βB >	< βC >	< αB >	<	
Human	PVDLSKWSG	P	P	P	P	P	52
Monkey	PVDLSKWSG	P	P	P	P	P	51
Cow	PVDLSKWSG	P	P	P	P	P	51
Rat	MAADISQW	P	P	P	P	P	52
Dros	MKLPAHLH	P	P	P	P	P	74
OV16	MHCQVVI	P	P	P	P	P	82
Toxc	DEANNAAS	P	P	P	P	P	120
CEN	MAAKVSSD	P	P	P	P	P	58
Plasf	MTIPTISE	P	P	P	P	P	68
Yeast	MNQAIDFA	P	P	P	P	P	77
	βE>	< βF >	< βG >	< βH >	< βI >		
Human	ISWDGLD	S	S	S	S	S	122
Monkey	ISWDGLD	S	S	S	S	S	121
Cow	ITWDGLD	S	S	S	S	S	121
Rat	ISWDGLD	S	S	S	S	S	122
Dros	LDWNA	D	P	E	S	F	143
OV16	VSWDA	E	P	G	A	L	149
Toxc	VTWEA	Q	P	N	D	R	211
CEN	VEVHGDM	R	S	F	T	L	126
Plasf		F	V	L	F	M	133
Yeast	ANAYVPQ	D	D	L	L	F	165
	βI >	< αC >	< βJ >	< αD >			
Human	LVYEQDR	P	L	K	C	D	187
Monkey	LVYEQAR	P	L	K	C	D	186
Cow	LVYEQEG	P	L	K	C	D	186
Rat	LVYEQEQ	P	L	K	C	D	187
Dros	LVYQGS	D	K	L	D	F	210
OV16	LVYKQ	P	G	S	I	T	199
Toxc	LVYRQ	P	A	A	I	N	264
CEN	LLFKQ	K	R	G	Q	A	182
Plasf	IISLIKE	E	D	K	D	N	190
Yeast	LLY...	K	Q	P	K	G	221

Figure 44 : Alignement de séquences homologues d'une sélection de PEBPs issues de différentes espèces : homme, singe, boeuf, rat, drosophile, *Onchocerca volvulus* (parasite de l'homme), *Toxocara canis* (nématode, parasite du chien), *Antirrhinum* (protéine CEN), *Plasmodium falciparum* et la levure (protéine TFS1). La localisation des structures secondaires régulières correspondant à la PEBP/RKIP humaine est indiquée. Sont représentés : en rouge, les résidus identiques dans toute la famille ; en magenta les résidus conservés ; en bleu les résidus conservés dans plus de 50 % de la famille²⁹⁴

Les structures tridimensionnelles de plusieurs PEBPs ont été déterminées à ce jour, il s'agit de la PEBP bovine,²⁹² de la PEBP humaine,²⁹³ de la PEBP-2 de souris,²⁹⁴ d'une isoforme de PEBP chez la Drosophile,²⁹⁵ d'une PEBP de levure,²⁹⁶ d'une PEBP

²⁹² Serre L., Vallée B., Bureau N., Schoentgen F., Zelwer C.: Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipids binding proteins. *Structure*, **1998**, 6, 1255-65.

²⁹³ Banfield M.J., Barker J.J., Perry A.C., Brady R.L.: Function from structure ? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure*, **1998**, 6, 1245-54.

²⁹⁴ Simister P.C., Banfield M.J., Brady R.L.: The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2002**, 58, 1077-80.

²⁹⁵ Rautureau G., Vovelle F., Jouvansal L. et al.: NMR structure of a Phosphatidyl-ethanolamine Binding Protein from drosophila, *Proteins*, **in press**.

²⁹⁶ Mima J., Hayashida M., Fujii T., Narita Y., Hayashi R., Ueda M., Hata Y.: Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J. Mol. Biol.*, **2005**, 346, 1323-34.

d'Antirrhinum²⁹⁷ et de Arabidopsis²⁹⁸ et de 2 PEBPs de *E. coli*.²⁹⁹ La région centrale de la séquence qui est bien conservée entre les différentes espèces, constitue chez toutes les PEBPs un entonnoir qui capte différents ligands tels que des ions phosphate ou acétate et la phosphoryléthanolamine (tête polaire de la phosphatidyléthanolamine), ces ligands étant liés aux protéines cristallisées.

La structure tridimensionnelle de la protéine PEBP/RKIP humaine est identique à celle de la PEBP bovine. Elle est composée essentiellement de deux hélices α et de neuf brins β (Figure 45).

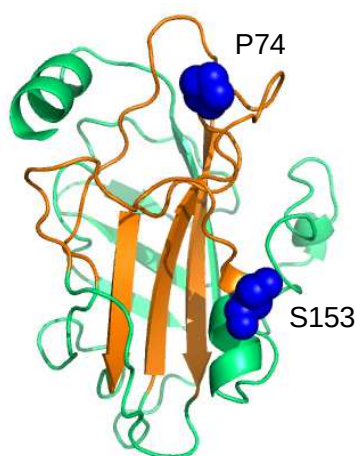


Figure 45 : Structure cristallographique de la PEBP/RKIP.²⁹³ Les résidus formant la poche du ligand sont colorés en orange. Les résidus P74 et S153 sont représentés en sphères bleues. P74 appartient à la poche ligand, c'est un résidu conservé du motif DPDxP. S153 est le site de phosphorylation de la PEBP/RKIP par la PKC

Elle est caractérisée par un large feuillet β central composé de cinq brins β allant des résidus 62 à 125. Ce feuillet est impliqué dans les interactions PEBP-petits ligands. Les quatre autres brins β forment un petit feuillet β (allant des résidus 22 à 53), sur un des côtés de la protéine (organisation structurale en clé grecque). A l'extrémité C-terminale de la protéine se trouve une hélice α , à noter que cette hélice n'existe pas chez les PEBPs de plantes ni de bactéries. Une autre hélice (résidus 151-158) est située près d'une grande boucle (résidus 127-

²⁹⁷ Banfield M.J., Brady R.L.: The structure of *Antirrhinum centroradialis* protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J. Mol. Biol.*, **2000**, 297, 1159-70.

²⁹⁸ Ahn J.H., Miller D., Winter V.J., Banfield M.J., Lee J.H., Yoo S.Y., Henz S.R., Brady R.L., Weigel D.: A divergent external loop confers antagonist activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.*, **2006**, 25, 605-14.

²⁹⁹ Serre L., Pereira de Jesus K., Zelwer C., Bureau N., Schoentgen F., Bénédicti H.: Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J. Mol. Biol.*, **2001**, 310, 619-36.

150), de l'autre côté du feuillet central. Cette hélice comporte un résidu important qui est un site de régulation de PEBP/RKIP, il s'agit de la sérine 153 (S153) qui est phosphorylable par la protéine kinase C (PKC).³⁰⁰ La structure est aussi caractérisée par une autre grande boucle formée par les résidus 104-117 indiquant la flexibilité de la structure. La poche de liaison des petits ligands est caractérisée par le motif hautement conservé DPDxP (résidus 70-74).

VII-2 Les rôles biologiques de la protéine PEBP/RKIP

Chez les mammifères, les PEBPs sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques complexes comme la spermatogénèse,³⁰¹ le contrôle de l'activité cardiaque,³⁰² et le développement du cerveau.³⁰³ Au niveau cellulaire, les fonctions connues de PEBP/RKIP en font un inhibiteur de kinases et de protéases à sérine et elles peuvent expliquer, au moins en partie, son rôle dans le cancer chez l'homme.

VII-2.1. Rôles de PEBP/RKIP en lien avec le cancer

VII-2.1.1 PEBP/RKIP modulatrice de certaines voies de signalisation intracellulaire

A ce jour, la protéine PEBP/RKIP a été décrite comme étant un régulateur de trois voies de signalisation importantes dans les cellules de mammifères (**Figure 46**). Elle inhibe la voie Raf/MEK/ERK qui est impliquée dans la réponse aux stimuli mitogènes et qui contrôle la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la survie et la migration cellulaire. PEBP/RKIP inhibe aussi la voie NF- κ B qui est impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Enfin, lorsque PEBP/RKIP est phosphorylée (S153) par la PKC, elle perd sa capacité à lier Raf mais elle peut alors se lier à la kinase GRK2 et l'inhiber. GRK2 ne peut plus alors phosphoryler les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), ce

³⁰⁰ Corbit K.C., Trakul N., Eves E.M., Diaz B., Marshall M., Rosner M.R.: Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 13061-8.

³⁰¹ Turner K.J., McKinnell C., McLaren T.T., Qureshi S.J., Saunders P.T., Foster P.M., Sharpe R.M.: Detection of germ cell-derived proteins in testicular interstitial fluid: potential for monitoring spermatogenesis *in vivo*. *J. Androl.*, **1996**, 17, 127-36.

³⁰² Goumon Y., Angelone T., Schoentgen F., Chasserot-Golaz S., Almas B., Fukami M.M., Langley K., Welters I.D., Tota B., Aunis D., Metz-Boutigue M.H.: The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 13054-64.

³⁰³ Yuasa H., Ojika K., Mitake S., Katada E., Matsukawa N., Otsuka Y., Fujimori O., Hirano A.: Age-dependent changes in HCNP-related antigen expression in the human hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **2001**, 127, 1-7.

qui bloque leur internalisation.³⁰⁴ Un tel mécanisme permet de réguler la voie de transduction médiée par les GPCRs, voie qui contrôle des processus essentiels tels que l'inflammation, la neurotransmission, la libération d'hormones et la régulation de la pression sanguine.³⁰⁵

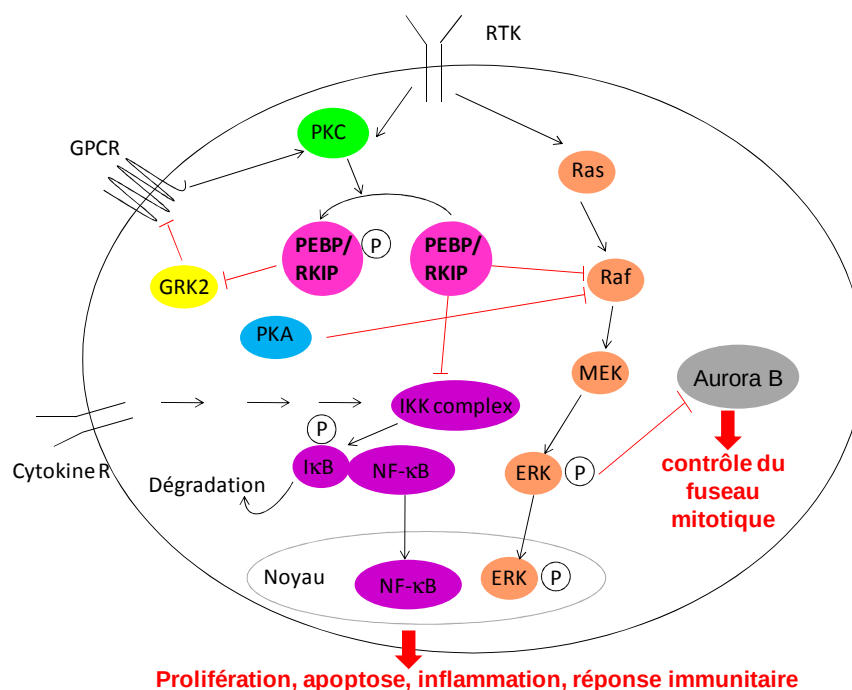


Figure 46 : Rôle de PEBP/RKIP comme modulatrice des voies de signalisation cellulaire : Raf/MEK/ERK, GPCRs et NF- κ B

PEBP/RKIP a d'abord été décrite comme un inhibiteur de la voie Raf/MEK/ERK qui se lie directement à Raf, à MEK et plus faiblement à ERK.^{306,307} PEBP/RKIP agit comme un inhibiteur compétitif de MEK empêchant alors l'activation de MEK par Raf-1.³⁰⁷ De plus, en se liant à Raf-1, PEBP/RKIP bloque deux sites de phosphorylation S238 et Y341 de Raf empêchant l'activation de Raf-1 par les protéines kinases PAK et Src.³⁰⁸ En inhibant la voie Raf/MEK/ERK, PEBP/RKIP influence indirectement l'activité de la protéine kinase Aurora B qui contrôle le bon déroulement de la mitose lors de la ségrégation des chromosomes et la

³⁰⁴ Lorenz K., Lohse M.J., Quittner U.: Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*, **2003**, 426, 574-9.

³⁰⁵ Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J.: Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2002**, 3, 639-50.

³⁰⁶ Yeung K., Seitz T., Li S., Janosch P., McFerran B., Kaiser C., Fee F., Katsanakis K.D., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W.: Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, **1999**, 401, 173-77.

³⁰⁷ Yeung K., Janosch P., McFerran B., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W.: Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol. Cell. Biol.*, **2000**, 20, 3079-85.

³⁰⁸ Trakul N., Menard R.E., Schade G.R., Qian Z., Rosner M.R.: Raf kinase inhibitory protein regulates Raf-1 but not B-Raf kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 24931-40.

cytokinèse.³⁰⁹ Des travaux ont montré que l'absence de PEBP/RKIP dans la cellule entraîne l'hyperactivation de la voie Raf/MEK/ERK conduisant à l'inhibition d'Aurora B, ce qui a pour conséquence la formation de chromosomes anormaux.^{309,310}

Concernant la voie NF- κ B, la PEBP/RKIP agit aussi comme un inhibiteur de kinases en contrôlant plusieurs kinases du complexe IKK incluant NIK, TAK1 et IKK α/β .³¹¹ PEBP/RKIP est un régulateur de l'activation du facteur de transcription NF- κ B en empêchant la libération de NF- κ B en réponse à une stimulation par le TNF- α ou l'interleukine IL-1 β .

VII-2.1.2 PEBP/RKIP suppresseur de métastases

En plus de son implication dans la régulation de plusieurs voies de signalisation dont la dérégulation est impliquée dans l'apparition de cancers, elle a aussi été décrite comme un suppresseur de métastases.³¹² Le rôle de PEBP/RKIP dans la formation des métastases est basé sur la comparaison de son niveau d'expression dans les tissus tumoraux primaires invasifs et non invasifs ainsi que dans les cellules métastatiques. Le lien entre PEBP/RKIP et le cancer a été établi en premier sur des modèles de cellules de prostate métastatique (C4-2B) et non-métastatique (LNCaP).³¹³ Ces travaux ont montré une diminution de l'expression de PEBP/RKIP dans les cellules métastatiques. Par la suite, d'autres études ont rapporté la diminution de l'expression ou l'absence de PEBP/RKIP dans d'autres cancers : sein,³¹⁴ foie,³¹⁵ mélanomes,³¹⁶ thyroïde³¹⁷ et côlon.³¹⁸ Ces résultats suggèrent que PEBP/RKIP agit comme un suppresseur de tumeurs et/ ou métastases pour les tumeurs solides.

³⁰⁹ Eves E.M., Shapiro P., Naik K., Klein U.R., Trakul N., Rosner M.R.: Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol. Cell.*, **2006**, 23, 561-74.

³¹⁰ Al-Mulla F., Hagan S., Al-Ali W., Jacob S.P., Behbehani A.I., Bitar M.S., Dallol A., Kolch W.: Raf kinase inhibitor protein: mechanism of loss of expression and association with genomic instability. *Clin. Pathol.*, **2008**, 61, 524-9.

³¹¹ Yeung K.C., Rose D.W., Dhillon A.S., Yaros D., Gustafsson M., Chatterjee D., McFerran B., Wyche J., Kolch W., Sedivy J.M.: Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.*, **2001**, 21, 7207-17.

³¹² Keller E.T.: Metastasis suppressor genes: a role for Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP). *Anti-Cancer Drugs*, **2004**, 15, 663-69.

³¹³ Fu Z., Smith P.C., Zhang L., Rubin M.A., Dunn R.L., Yao Z., Keller E.T.: Effects of Raf Kinase Inhibitor Protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2003**, 95, 878-89.

³¹⁴ Hagan S., Al-Mulla F., Mallon E., Oien K., Ferrier R., Gusterson B., García J.J., Kolch W.: Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 7392-97.

³¹⁵ Lee H.C., Tian B., Sedivy J.M., Wands J.R., Kim M.: Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology*, **2006**, 131, 1208-17.

³¹⁶ Schuierer M.M., Bataille F., Hagan S., Kolch W., Bosserhoff A.K. Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signalling in melanoma cell lines. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 5186-92.

VII-2.1.3 PEBP/RKIP agent sensibilisant à l'apoptose

Des travaux réalisés sur les cancers du sein et de la prostate ont montré que la chimiothérapie induit l'expression de PEBP/RKIP qui sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose.³¹⁹ Par exemple, dans des cellules cancéreuses de prostate résistantes à la 9-nitrocamptothécine (9NC), la surexpression de PEBP/RKIP sensibilise les cellules à l'apoptose induite par 9NC. D'autres études ont montré que le Rituximab (anticorps) prescrit dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens, entraîne l'expression de PEBP/RKIP responsable de la diminution de la prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose.³²⁰

D'autres travaux ont montré que la surexpression de PEBP/RKIP dans les cellules cancéreuses de prostate et mélanomes est responsable de l'induction de l'apoptose *via* le récepteur de mort cellulaire DR5 appartenant à la famille des récepteurs au TNF.³²¹ Plus récemment, il a été montré que dans les mélanocytes non tumoraux, la forme oncogène B-Raf V600E induit l'apoptose des cellules en induisant PEBP/RKIP.³²²

Tous ces résultats suggèrent que PEBP/RKIP joue le rôle d'inducteur de l'apoptose en réponse à des dérégulations au niveau des voies de signalisation ou en présence d'agents chimiothérapeutiques *via* un mécanisme impliquant les voies Raf/MEK/ERK et NF-κB.

VII-3 L'interaction Raf/PEBP

La PEBP régule les kinases en interagissant directement avec elles. D'après l'équipe de Rosner, il semble que PEBP se lie aux 3 kinases Raf, MEK et ERK mais que la liaison de Raf et de MEK soit mutuellement exclusive, PEBP ne se lierait donc pas de la même façon à

³¹⁷ Akaishi J., Onda M., Asaka S., Okamoto J., Miyamoto S., Nagahama M., Ito K., Kawanami O., Shimizu K.: Growth-suppressive function of phosphatidylethanolamine-binding protein in anaplastic thyroid cancer. *Anticancer Res.*, **2006**, 26, 4437-42.

³¹⁸ Minoo P., Zlobec I., Baker K., Tornillo L., Terracciano L., Jass J.R., Lugli A.: Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2007**, 127, 820-7.

³¹⁹ Chatterjee D., Bai Y., Wang Z., Beach S., Mott S., Roy R., Braastad C., Sun Y., Mukhopadhyay A., Aggarwal B.B., Darnowski J., Pantazis P., Wyche J., Fu Z., Kitagawa Y., Keller E.T., Sedivy J.M., Yeung K.C.: RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 17515-23.

³²⁰ Jazirehi A.R., Vega M.I., Chatterjee D., Goodlick L., Bonavida B.: Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7117-26.

³²¹ Baritaki S., Katsman A., Chatterjee D., Yeung K.C., Spandidos D.A., Bonavida B.: Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Yin Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation. *J. Immunol.*, **2007**, 179, 5441-53.

³²² Wajapeyee N., Serra R.W., Zhu X., Mahalingam M., Green M.R.: Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*, **2008**, 132, 363-74.

Raf, MEK et ERK.³²³ La poche des petits ligands (résidus 62-125) paraît être impliquée dans l'interaction entre PEBP et Raf-1. L'équipe de Yeung, a montré en purifiant plusieurs mutants de PEBP au niveau de la poche des petits ligands, que l'intégrité de la poche est importante pour la liaison de PEBP à Raf-1 et pour sa fonction d'inhibiteur de la voie Raf/MEK/ERK.³²⁴ Les travaux de l'équipe de Rosner, ont montré que l'occupation ou non de la poche ligands pourrait être reliée à un mécanisme de régulation allostérique de PEBP en ayant une conséquence sur son niveau de phosphorylation par la PKC ou ERK.³²⁵

Dans le cadre de notre projet pour concevoir des mimes de l'interaction Raf/PEBP, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la zone d'interaction entre Raf-1 et PEBP. Il n'existe à ce jour aucune structure cristallographique de PEBP en complexe avec Raf ou d'autres de ses partenaires protéiques. Des études de délétion dans la séquence de Raf-1 ont permis de définir la zone de Raf-1 impliquée dans l'interaction avec PEBP.³²⁵ Raf-1 se lie dans la poche des petits ligands de PEBP au niveau des résidus 325-349 de Raf-1 correspondant à la partie N-terminale de son domaine kinase (**Figure 47**).

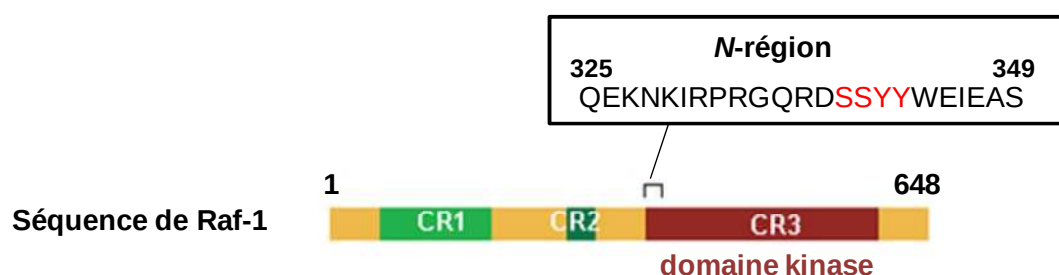


Figure 47 : Région de Raf-1 impliquée dans l'interaction avec PEBP/RKIP

Au milieu de cette séquence de Raf-1, 4 résidus sont susceptibles d'être phosphorylés au cours de l'activation de la voie MAP-kinase. Il s'agit des sérines 338/339 et des tyrosines 340/341. Les auteurs ont réalisé des études de résonance plasmonique de surface pour mesurer l'affinité entre la PEBP et la région minimale de Raf-1 impliquée dans l'interaction (331-349).³²⁵ Pour cela plusieurs peptides de Raf-1 (331-349) ont été synthétisés avec plusieurs niveaux de phosphorylation des résidus sérines 338/339 et des tyrosines 340/341.

³²³ Granovsky A.E., Clark M.C., McElheny D., Heil G., Hong J., Liu X., Kim Y., Joachimiak G., Joachimiak A., Koide S., Rosner M.R.: Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, **2009**, 29, 1306-20

³²⁴ Rath O., Park S., Tang H.H., Banfield M.J., Brady R.L., Lee Y.C., Dignam J.D., Sedivy J.M., Kolch W., Yeung K.C.: The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK. *Cell. Signal.*, **2008**, 20, 935-41.

³²⁵ Park S., Rath O., Beach S., Xiang X., Kelly S.M., Luo Z., Kolch W., Yeung K.C.: Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. *FEBS Lett.*, **2006**, 580, 6405-12.

Les auteurs ont montré une augmentation de l'affinité entre le peptide Raf et la PEBP lorsque plusieurs résidus serines et tyrosines étaient phosphorylés. La meilleure affinité (K_d de 2×10^{-5} M) étant obtenue pour le peptide triphosphorylé au niveau des sérines 338 et 339 et de la tyrosine 341. A la suite de ces études, nous avons synthétisé trois peptides de Raf-1 au sein de l'équipe d'Agnès Delmas au CBM pour étudier leur interaction avec la PEBP humaine par RMN et spectrométrie de masse.

Le but de nos travaux est de compléter les informations structurales et moléculaires sur le mécanisme d'inhibition de Raf par la PEBP pour permettre la conception rationnelle d'un nouveau type d'inhibiteurs capables de mimer le contrôle de Raf-1 par PEBP (**Figure 48**).

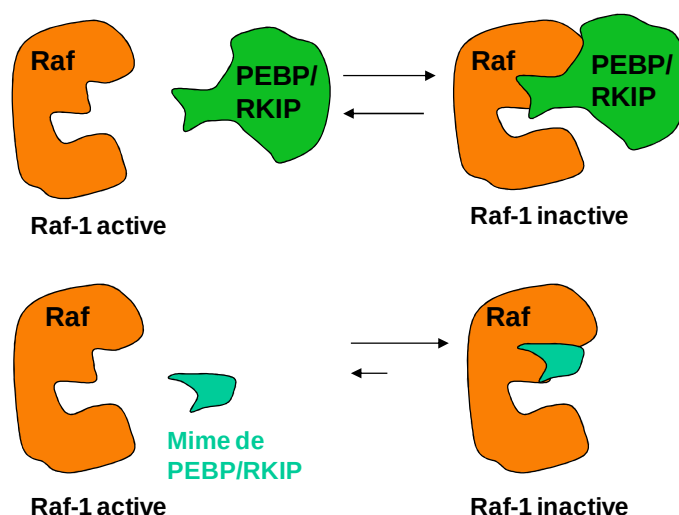


Figure 48 : Mimes topologiques de l'interaction Raf/PEBP

VIII/ Tests d'activité kinases

Afin de tester les molécules potentiellement inhibitrices synthétisées au cours de cette thèse, sur Raf-1 d'une part et sur la cascade Raf/MEK/ERK d'autre part, il a fallu choisir les techniques adaptées parmi les nombreuses méthodes de dosage qui existent pour les protéines kinases.^{326,327,328} Nous avons particulièrement dû tester les méthodes les plus récentes, peu décrites dans la littérature car les industries de biotechnologies créent sans cesse de nouvelles

³²⁶ Von Ahsen O., Bömer U.: High-throughput screening for kinase inhibitors. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 481-90.

³²⁷ Ishida A., Kameshita I., Shigeri Y. *et al.*: Recent advances in technologies for analyzing protein kinases. *J. Pharmacol. Sci.*, **2007**, 103, 5-11.

³²⁸ Eglen R.M., Reisine T.: The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev. Technol.*, **2009**, 7, 22-43.

techniques pour répondre à la demande croissante des plateformes impliquées dans le criblage à haut ou moyen débit. Le choix de la technique n'est pas anodin car les résultats finaux obtenus sur les produits testés peuvent être très différents suivant le type de dosage utilisé.³²⁹ De plus, chacune des méthodes disponibles sur le marché présente des avantages et des inconvénients et nécessite un appareillage particulier (compteur à scintillation, lecteur de plaques, etc...).

VIII-1 Choix des méthodes

La réaction kinase consiste à mettre en présence la protéine kinase avec son substrat et de l'ATP (**Schéma 16**). La kinase transfère le γ -phosphate de l'ATP sur un résidu spécifique du substrat : sérine, thréonine ou tyrosine selon le type de kinase. De nombreuses techniques ont été développées pour détecter la phosphorylation du substrat ou pour mesurer l'avancement de la réaction kinase. Le **Tableau 8** récapitule les principales techniques développées par les différents fournisseurs pour le dosage de l'activité kinase. Ces techniques varient selon la méthode de détection.

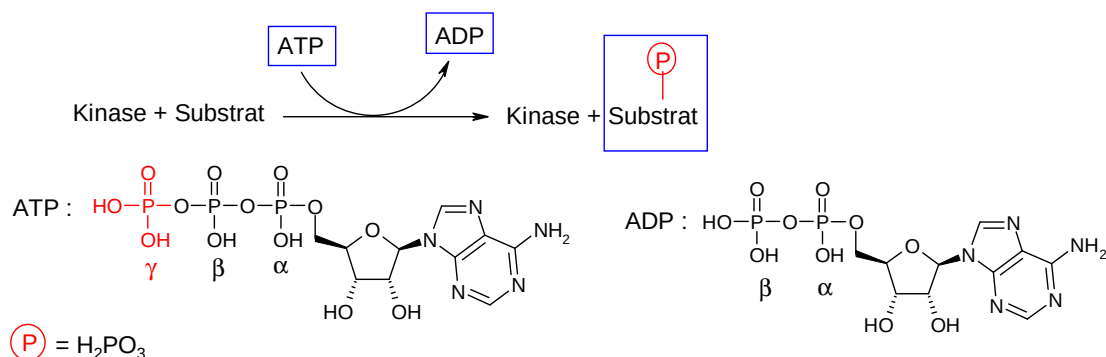


Schéma 16 : La réaction de phosphorylation catalysée par les kinases

Dans la plupart des techniques, le dosage de l'activité kinase est effectué principalement par la mesure de la radioactivité incorporée dans le substrat (PFBA, SPATM, FlashPlateTM), ou par la mesure d'un signal de fluorescence : (Lance UltraTM, HTRFTM, IMAPTM, KinEASETM, Z'LYTETM, TruLightTM ou luminescence (AlphaScreenTM) proportionnel à la quantité de substrat phosphorylé.^{326,328}

³²⁹ Sills M.A., Weiss D., Pham Q., Schweitzer R., Wu X., Wu J.J.: Comparison of assay technologies for a tyrosine kinase assay generates different results in high throughput screening. *J. Biomol. Screening*, **2002**, 7, 191-9.

Méthodes de détection	Mesure de la phosphorylation du substrat		Mesure de la réduction de l'ATP ou l'accumulation de l'ADP
	Radioactive	Non-Radioactive	
Techniques	PFBA (³² P ou ³³ P) SPA TM (³³ P) FlashPlate® (³² P ou ³³ P)	AlphaScreen TM (ALPHA), DELFIA TM (TRF), Lance TM et Lance TM Ultra (TR-FRET), HTRF TM (TR-FRET), Lanthascreen TM (TR-FRET), IMAP TM (TR-FRET et FP), Far-Red Polarscreen TM (FP), KinEASE TM (FP), Z'LYTE TM (FRET), Antibody Beacon TK fluorescence quenching assay (FQ), IQ TM kinase (FQ), TruLight TM (FQ)	Mesure de l'ATP : EasyLite TM (L) et Kinase-Glo TM (L) Mesure de l'ADP : Adapta TM (TR-FRET), ADP-Glo TM (L), Transcreener TM ADP ² Assays (FP, TR-FRET, FI), ADP Quest TM (FI) et ADP Hunter TM (FI)
Avantages	+ simple à utiliser, + détecte la plupart des kinases, + pas besoin d'anticorps, + pas besoin de substrat modifié	+ simple à mettre en œuvre + sensible (besoin de faible quantité d'enzyme) + homogène pour la plupart (sans étapes de lavage) + compatible avec le HTS	+ pas besoin d'anticorps ou substrats spécifiques, + homogène, + peu coûteux, + méthodes généralisables à toutes les kinases
Inconvénients	- étapes de lavage, - coûts relatifs à utilisation de la radioactivité, - HTS limité	- la plupart requiert des anticorps et des substrats spécifiques et marqués, - Interférences observées entre les composés organiques et les méthodes de détection optique (L, FI, FP, TRF, FRET, TR-FRET, ALPHA)	Mesure de l'ATP : - mesure d'une diminution de signal = perte de sensibilité, Mesure de l'ATP ou l'ADP : - sensible aux contaminations par d'autres kinases,

Tableau 8 : Principales techniques disponibles pour le dosage enzymatique de l'activité des kinases. Le nom des fournisseurs pour chaque technique citée est représenté en couleur : GE Healthcare (violet), Perkin Elmer (bleu foncé), CisBio (bleu clair), Invitrogen (fushia), MDS Analytical Technologies (orange), Millipore (vert foncé), Thermo Fisher (gris), Merck Biosciences (vert clair), Promega (rouge), BellBrook Labs (majenta), DiscoveRx (marron). Abréviations : PFBA = Phosphocellulose Binding Assay, SPA = Scintillation Proximity Assay, ALPHA = Amplified Luminescence Proximity Homogeneous assay, TRF = Time Resolved Fluorescence, TR-FRET = Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer, FP = Fluorescence Polarization, FQ = Fluorescence Quench, FI = Fluorescence Intensity, L = Luminescence

Plus récemment, sont arrivées des techniques permettant de mesurer l'avancement de la réaction kinase. Ces méthodes ont l'avantage d'être généralisables à toutes les kinases et permettent d'économiser l'achat d'anticorps ou de substrats marqués spécifiquement. La mesure de l'avancement de la réaction kinase se fait via la mesure de l'ATP consommé³³⁰ (EasyLiteTM, Kinase-GloTM) ou la mesure de l'ADP formé au cours de la réaction kinase

³³⁰ Singh P., Harden B.J., Lillywhite B.J., Broad P.M.: Identification of kinase inhibitors by an ATP depletion method. *Assay Drug Dev. Technol.*, **2004**, 2, 161–9.

(AdaptaTM, ADP QuestTM) (**Tableau 8**),³³¹ il faut donc que ces espèces soient stables au cours de la réaction ; la mesure de l'ATP consommé présente en outre l'inconvénient d'être moins sensible puisqu'on mesure une diminution de signal.

De façon générale, le dosage des kinases en routine et à haut débit n'est pas une tâche triviale car : 1) le dosage de chaque kinase est à mettre au point en fonction de ses caractéristiques enzymatiques et de ses substrats ; 2) il faut choisir une méthode de dosage fiable et robuste pour l'ensemble des kinases et des conditions de dosage ; 3) il est préférable de disposer d'une technique facile à mettre en oeuvre ; 4) Il faut une technique sensible pour minimiser les coûts, les enzymes purifiées étant généralement onéreuses. Au cours de notre travail nous nous sommes exclusivement intéressés aux techniques compatibles avec les kinases de la voie Raf/MEK/ERK.

VIII-1.1 Détection directe de la phosphorylation du substrat : méthodes radioactives

Les premières techniques qui ont été développées pour le dosage de l'activité kinase sont basées sur la mesure directe du phosphate incorporé dans le substrat en utilisant de l'ATP radioactif : l'ATP- γ -³²P ou l'ATP- γ -³³P.³³² Les deux techniques les plus citées pour le dosage de Raf ou de la cascade Raf/MEK/ERK sont PFBA (Phosphocellulose Filter Binding Assay)^{333,334} et SPATM (Scintillation Proximity Assay).³³⁵ Ces techniques ont l'avantage d'être robustes et facilement adaptables à toutes les kinases. Cependant elles nécessitent un équipement de sécurité particulier pour la manipulation de la radioactivité et un compteur à scintillation pour quantifier la radioactivité. Ces deux techniques sont compatibles avec le compteur à scintillation dont nous disposons au CBM : un Victor 14120 multilabel Wallac capable de lire les fioles à scintillation ou les microtubes.

³³¹ Charter N.W., Kauffman L., Singh R., Eglen R.M.: A generic, homogenous method for measuring kinase and inhibitor activity via adenosine 5'-diphosphate accumulation. *J. Biomol. Screen.*, **2006**, 11, 390-9.

³³² Witt J.J., Roskoski R. JR.: Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption. *Anal. Biochem.*, **1975**, 66, 253-8.

³³³ Alessi D.R., Cohen P., Marshall C.J.: Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, MAP kinase, and Raf. *Methods Enzymol.*, **1995**, 255, 279-90.

³³⁴ Wilhelm S.M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L.E., Bollag G., Trail P.A.: BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7099-109.

³³⁵ McDonald O.B., Chen W.J., Ellis B., Hoffman C., Overton L., Rink M., Smith A., Marshall C.J., Wood E.R.: A Scintillation Proximity Assay for the Raf/MEK/ERK kinase cascade: high-throughput screening and identification of selective enzyme inhibitors. *Anal. Biochem.*, **1999**, 268, 318-29.

VIII-1.1.1 PFBA (*Phosphocellulose Filter Binding Assay*)

Cette méthode consiste à mettre l'enzyme en présence de son substrat et d'ATP radioactif. La **Figure 49** illustre l'exemple du dosage de l'activité de Raf.

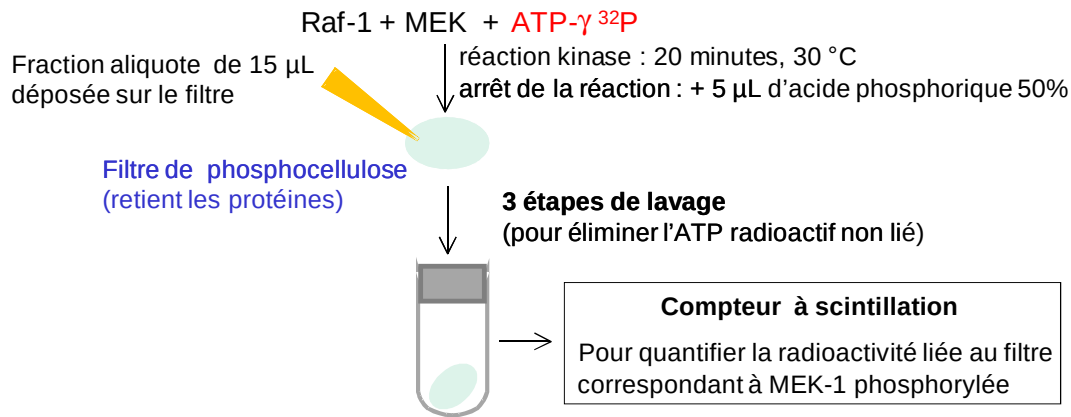


Figure 49 : Schéma de la méthode PFBA pour le dosage de Raf-1

Cette méthode présente les inconvénients d'être peu compatible avec le criblage haut débit à cause des étapes de lavage ; elle est adaptable au format plaques 96 puits à condition d'avoir un compteur adapté de type microbêta[®] ou TopCount[®] (Perkin Elmer).

VIII-1.1.2 SPA (*Scintillation Proximity Assay*)

La méthode SPA, développée par GE Healthcare, est basée sur l'interaction entre un substrat phosphorylé au ³³P et des billes microscopiques qui contiennent un scintillant pouvant être stimulé pour émettre de la lumière. Cette stimulation se produit uniquement quand les molécules radiomarquées d'intérêt sont liées à la surface de la bille (**Figure 50**). Une lumière bleue est alors émise. Elle est détectée à l'aide d'un compteur à scintillation standard. Les billes commercialisées sont recouvertes de différentes substances (anticorps, charges ioniques, glutathion, Cu²⁺, streptavidine, etc.) qui peuvent entrer en interaction avec leur ligand correspondant (antigène, charge opposée, GST, His-tag, biotine, etc.). En comparaison avec la méthode PFBA cette méthode est dépourvue d'étapes de lavage. Ce concept a été adapté sur plaque 96 puits par Perkin Elmer avec la méthode FlashPlateTM qui utilise des plaques recouvertes par exemple de streptavidine et de scintillant.

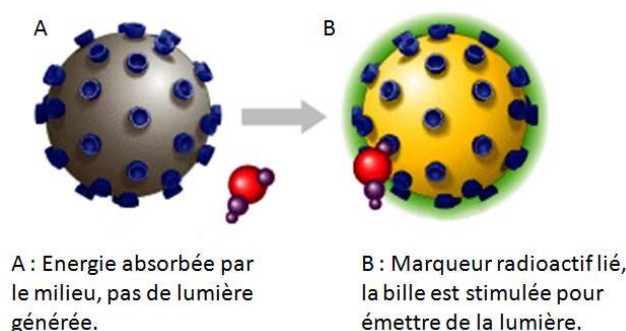


Figure 50 : Schéma du concept de la méthode SPA

VIII-1.2 Détection indirecte de la phosphorylation du substrat : méthodes non radioactives

Les méthodes non radioactives sont des méthodes indirectes nécessitant l'utilisation d'anticorps spécifiques pour reconnaître le substrat phosphorylé. Dans la plupart des cas, elles utilisent des substrats modifiés qui sont différents du substrat physiologique de la kinase étudiée. Il s'agit en général de substrats peptidiques ou protéiques marqué par un fluorophore. La détection est souvent effectuée par des mesures de fluorescence : fluorescence polarisée (FP), intensité de fluorescence (FI), Time Resolved Fluorescence (TRF), Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) ou par luminescence.³²⁸ Avec ces techniques, le signal de fluorescence ou de luminescence est directement proportionnel à la quantité de substrat phosphorylé. Ces méthodes sont très sensibles et faciles à mettre en œuvre au sein du laboratoire, cependant, elles requièrent l'emploi d'anticorps et de substrats spécifiques et marqués.

Nous avons recherché les méthodes de fluorescence ou de luminescence compatibles avec le dosage des enzymes de la voie Raf/MEK/ERK. Notre choix s'est alors porté sur la technologie TR-FRET qui est décrite comme une méthode performante, reproductible et adaptée pour le criblage haut débit.^{326,336} A ce jour, seules deux méthodes de TR-FRET ont été décrites pour mesurer l'activité kinase de la voie Raf/MEK/ERK. La méthode HTRFTM de Cisbio a été mise au point par l'équipe d'Allen uniquement sur la triple cascade Raf/MEK/ERK.³³⁷ A la même période, l'équipe de Vogel (Invitrogen) a mis au point la

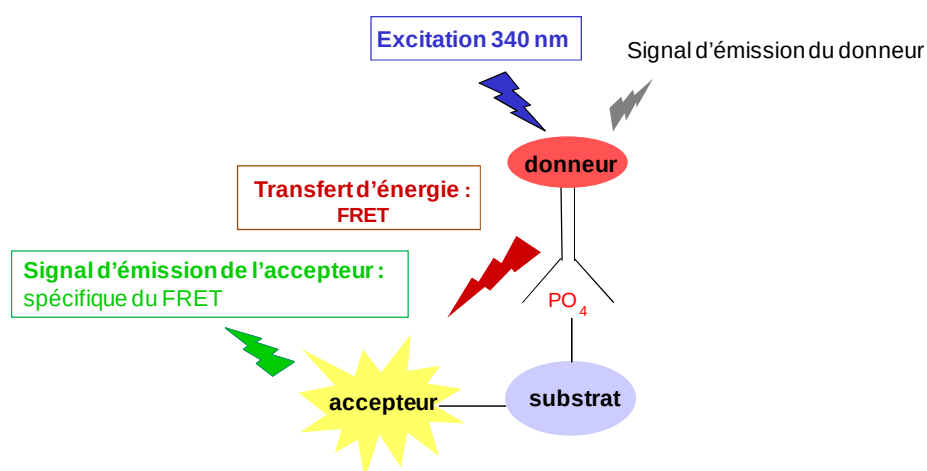
³³⁶ Jia Y., Quinn C.M., Gagnon A.I., Talanian R.: Homogeneous time-resolved fluorescence and its applications for kinase assays in drug discovery. *Anal. Biochem.*, **2006**, 356, 273-81.

³³⁷ Jia Y., Quinn C.M., Clabbers A., Talanian R., Xu Y., Wishart N., Allen H.: Comparative analysis of various in vitro COT kinase assay formats and their applications in inhibitor identification and characterization. *Anal. Biochem.*, **2006**, 350, 268-76.

technologie LanthascreenTM,³³⁸ qui peut être appliquée au dosage de la triple cascade et au dosage de Raf-1.³³⁹

Grâce à l'acquisition récente en juin 2007 au CBM d'un lecteur de microplaque Victor VTM (Perkin Elmer) adapté à la fluorescence en temps résolu d'une part et l'arrivée sur le marché de nouveaux réactifs pour le dosage des activités de Raf-1, MEK et ERK d'autre part, nous avons pu utiliser cette technologie.

Nous avons alors testé deux méthodes qui utilisent le TR-FRET : le Lance UltraTM développé par Perkin Elmer³⁴⁰ ; et le LanthascreenTM de chez Invitrogen.^{336,337} Ces deux techniques sont basées sur le même principe (**Figure 51**).



Méthode	Lanthascreen TM	Lance Ultra TM
Fluorophore donneur	Terbium	Europium
Fluorophore accepteur	Fluorescéine ou GTP	Ulight
Excitation	340 nm	340 nm
Emission	520 nm signal FRET 495 nm (signal du Terbium)	665 nm signal FRET 615 nm (signal de l'Europium)

Figure 51 : Principe des 2 méthodes de TR-FRET : LanthascreenTM et Lance UltraTM

³³⁸ Riddle S.M., Vedvik K.L., Hanson G.T., Vogel K.W.: Time-resolved fluorescence resonance energy transfer kinase assays using physiological protein substrates: applications of terbium-fluorescein and terbium-green fluorescent protein fluorescence resonance energy transfer pairs. *Anal. Biochem.*, **2006**, 356, 108-16.

³³⁹ Kupcho K.R., Bruinsma R., Hallis T.M., Lasky D.A., Somberg R.L., Turek-Etienne T., Vogel K.W., Huwiler K.G.: Fluorescent cascade and direct assays for characterization of Raf signaling pathway inhibitors. *Curr. Chem. Genom.*, **2008**, 1, 43-53.

³⁴⁰ Application note : Development and Optimization of Kinase Assays using New LANCE Ultra TR-FRET Reagents: http://las.perkinelmer.com/content/applicationnotes/app_developmentoptimizationkinaselanceultrafrtreagents.pdf.

Elles utilisent un anticorps dirigé spécifiquement contre le site de phosphorylation du substrat anticorps marqué par un fluorophore donneur et un substrat marqué par un fluorophore accepteur. Elles sont basées sur le transfert d'énergie de fluorescence entre le fluorophore donneur de la famille des Lanthanides (Europium ou Terbium) et le fluorophore accepteur. L'intérêt d'utiliser les lanthanides c'est qu'ils ont une longue vie de fluorescence, ce qui permet de mesurer l'émission de fluorescence après un délai de 50 à 150 microsecondes. Ce délai permet de s'affranchir d'une partie du bruit de fond généré par la fluorescence spontanée. Après excitation du fluorophore donneur à 340 nm, celui-ci va exciter à son tour le fluorophore accepteur uniquement lorsque le substrat sera phosphorylé. L'accepteur excité émet un signal spécifique du transfert de fluorescence (FRET), proportionnel à la quantité de substrat phosphorylé. Afin de s'affranchir des erreurs de pipetage, nous mesurons le rapport émission de fluorescence de l'accepteur/émission de fluorescence du donneur est mesuré.

Les deux méthodes Lance UltraTM et LanthascreenTM diffèrent essentiellement au niveau de la nature des fluorophores donneurs et accepteurs ce qui a pour conséquence des mesures d'émission de fluorescence à des longueurs d'onde différentes. La méthode Lance UltraTM utilise comme fluorophore donneur l'Europium tandis que la méthode LanthascreenTM utilise le Terbium. Le fluorophore accepteur est appelé Ulight dans la technologie Lance UltraTM, il s'agit d'un analogue de l'allophycocyanine modifié de façon à être le moins volumineux possible. La technologie LanthascreenTM utilise des fluorophores accepteurs plus volumineux : la fluorescéine ou la GFP (Green Fluorescent Protein). Une autre différence concerne la nature des substrats utilisés qui varie d'une méthode à l'autre, il s'agit en général de peptides et dans certains cas de la protéine substrat entière.

Chapitre II

RESULTATS

Chapitre II : RESULTATS

I/ Synthèse des inhibiteurs de Raf-1 à structure 4-azaindolique

I-1 Schémas rétrosynthétiques envisagés pour la synthèse des inhibiteurs de Raf

Afin de développer des inhibiteurs originaux de Raf, nous nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles méthodes simples et flexibles permettant de substituer dans un premier temps, le cycle 4-azaindole en positions C-5 et N-1 d'une part et C-5 et C-2 d'autre part. En effet, si les voies de synthèse du 4-azaindole sont bien décrites, il existe moins d'informations sur sa réactivité et sa fonctionnalisation. Notre approche rétrosynthétique pour la synthèse des inhibiteurs de Raf à structure 4-azaindolique est indiquée dans le **Schéma 17** et le **Schéma 18**.

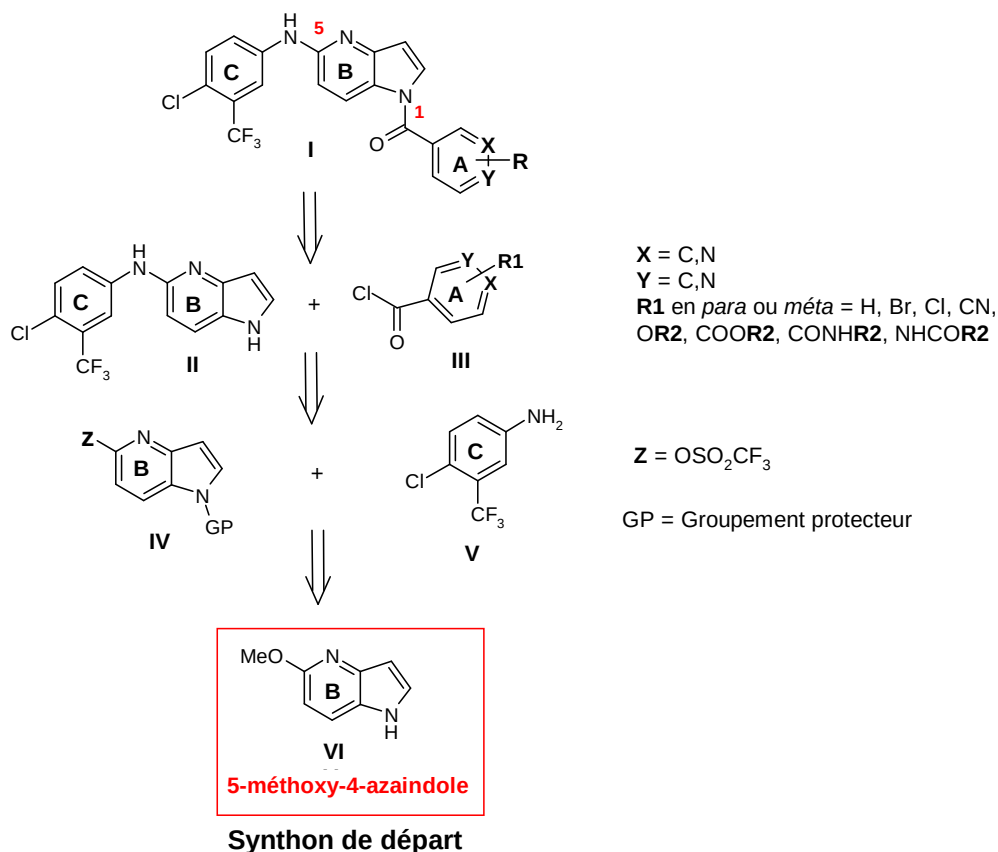


Schéma 17 : Schéma rétrosynthétique envisagé pour la première série de composés disubstitués en positions C-5 et N-1 du noyau 4-azaindole

Les deux voies de synthèse envisagées utilisent le même synthon de départ : le 5-méthoxy-4-azaindole **VI**. Les composés de type **I** seraient obtenus par *N*-acylation au départ du dérivé azaindolique **II** et de divers chlorures d'acide aromatiques **III**. Le 5-amino-

azaindole **II** serait issu d'une réaction d'amination entre le 4-azaindole porteur d'un groupement triflate en position C-5 et la 4-chloro-3-trifluoromethylaniline **V**. Le triflate **IV** proviendrait du dérivé méthoxy correspondant **VI** dont la synthèse est connue.

La deuxième série de composés tricycliques de type **I** (**Schéma 18**), serait obtenue par *N*-arylation du dérivé triflate en position C-5 **II** avec la 4-chloro-3-trifluorométhyl aniline **III**. L'intermédiaire 5-OTf-4-azaindole **II** porteur d'un groupement triflate en position C-5 et acylé en position C-2 serait issu de la condensation du lithien en position C-2 du 5-méthoxy-4-azaindole **IV** sur divers chlorures d'acides **V** ou aldéhydes **VI**.

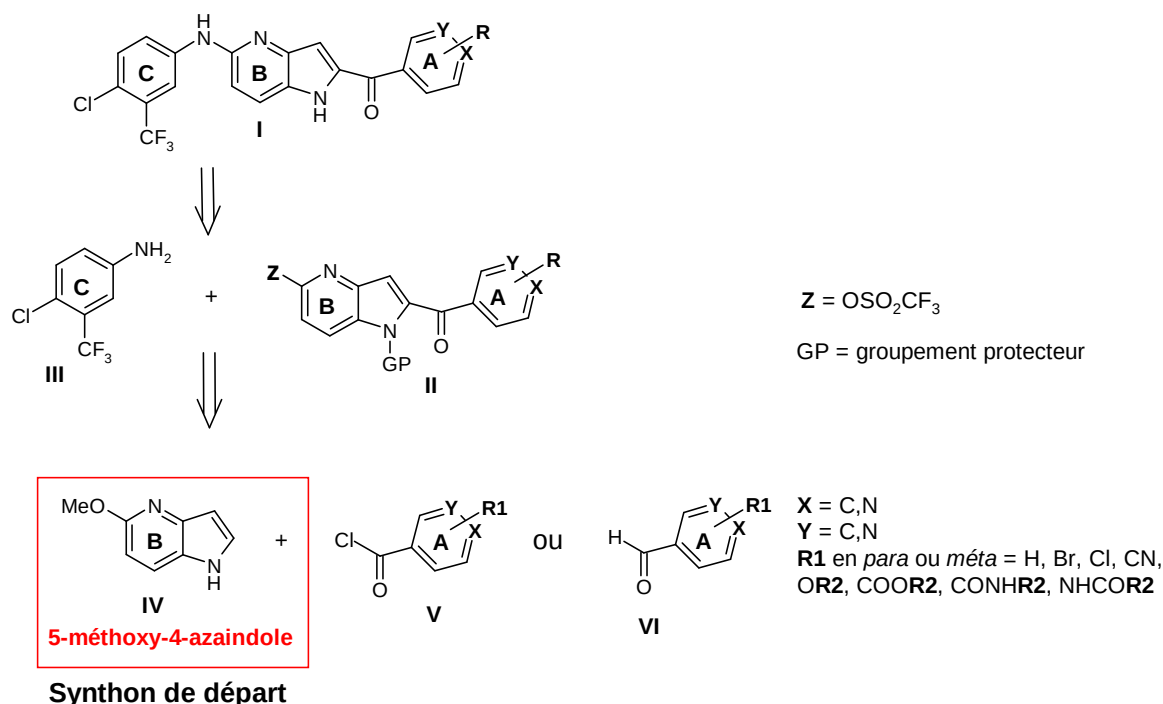


Schéma 18 : Schéma rétrosynthétique envisagé pour la deuxième série de composés disubstitués en positions C-5 et C-2 du noyau 4-azaindole

I-2 Synthèse du synthon 5-méthoxy-4-azaindole

La synthèse du 5-méthoxy-4-azaindole a été réalisée selon la méthodologie décrite par Makosza en 1988.²⁵⁸ La première étape est une réaction de substitution nucléophile indirecte (VNS) entre la 2-méthoxy-5-nitropyridine **1** et le 4-chlorophénoxy-acétonitrile **2** en présence de *tert*ibutylate de potassium (**Schéma 19**). Le composé **3** est obtenu avec un bon rendement (81 %) en accord avec les rendements précédemment obtenus par d'autres auteurs. Ce composé est ensuite engagé dans une réduction catalytique en présence de palladium sur charbon sous pression d'hydrogène (45 psi). Selon les conditions initialement décrites, nous

avons obtenu l'azaindole **5** avec un faible rendement (9 %) inférieur à celui attendu (57 %). En effet, la réaction n'est pas totale, l'intermédiaire réduit mais ouvert **4** est toujours le produit majoritaire même après l'allongement du temps de réaction ou l'augmentation de la température à 45 °C. Une fois l'intermédiaire **4** isolé, il est réengagé dans la réaction de réduction catalytique effectuée dans les mêmes conditions pour donner le produit désiré **5** avec un bon rendement (89 %). La succession des 2 étapes de réduction permet d'obtenir le 5-méthoxy-4-azaindole **5** avec un rendement global de 68 %.

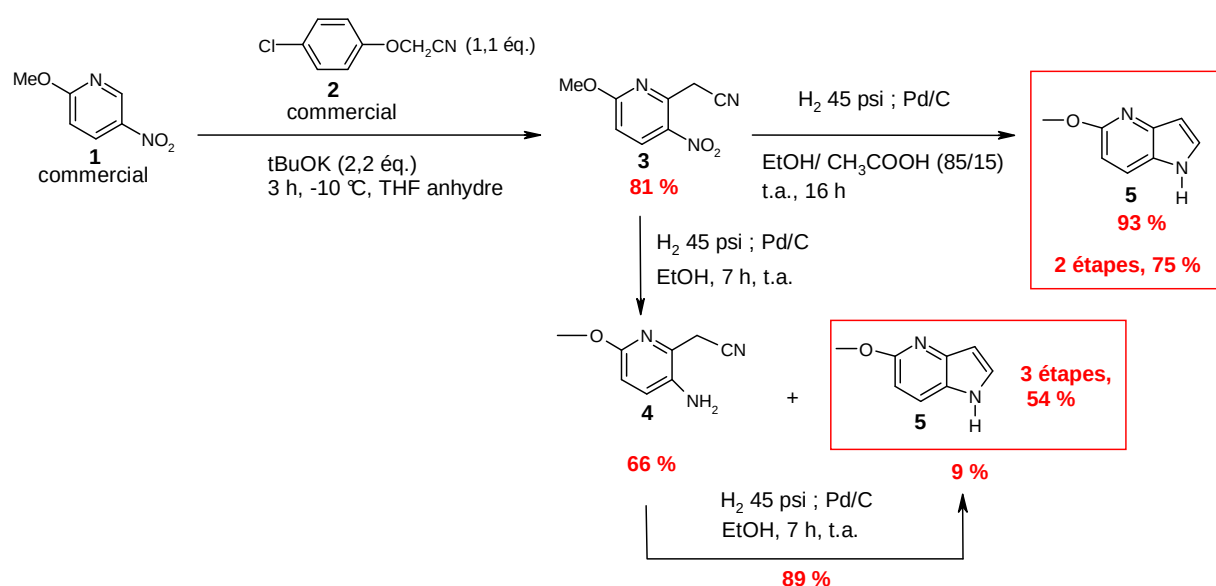


Schéma 19 : Schéma de synthèse du 5-méthoxy-4-azaindole (**5**)

Afin de faciliter l'étape de cyclisation, nous avons ajouté, à l'éthanol, 15 % d'acide acétique. L'addition de l'acide acétique neutralisant l'ammoniac, favorise l'avancement de la réaction (**Schéma 20**). Dans ces conditions, le 5-méthoxy-4-azaindole **5** fut obtenu avec un excellent rendement de 93 %. En dessous de 15 % d'acide acétique, nous n'avons pas observé d'amélioration du rendement. Par conséquent, la synthèse du 5-méthoxy-4-azaindole est réalisée en 2 étapes en présence de 15 % d'acide acétique, à l'échelle de la dizaine de grammes avec un rendement global de 75 %.

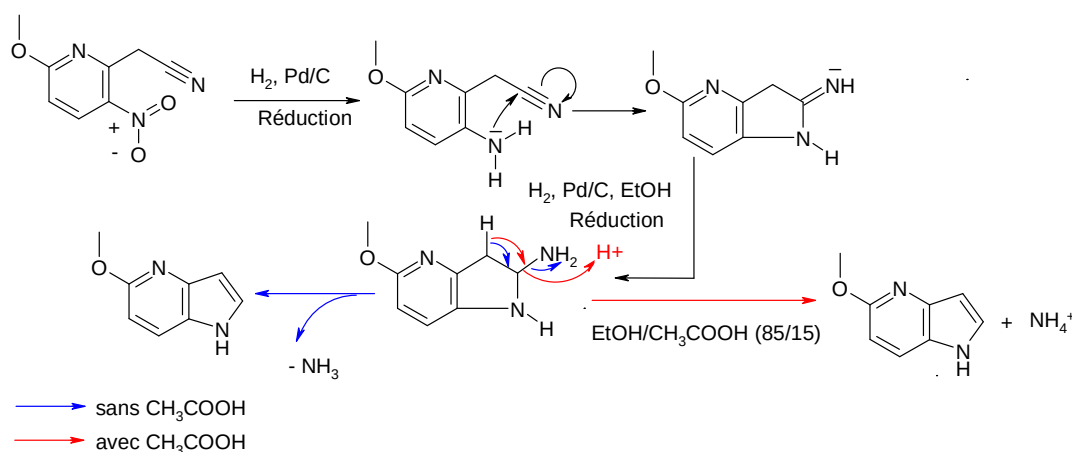


Schéma 20 : Mécanisme hypothétique de la réaction de cyclisation du 5-méthoxy-4-azaindole en présence ou non d'acide acétique (CH_3COOH)

I-3 Fonctionnalisation du C-2 du 5-méthoxy-4-azaindole

La méthode la plus étudiée pour accéder aux dérivés 4-azaindoles substitués en 2, est la cyclisation des dérivés 2-alkynyl-3-amino pyridines réalisée en conditions basiques³⁴¹ ou catalysée par l'or.³⁴² Nous voulions une méthode plus adaptée pour introduire différents types de substituants en C-2 à partir d'un synthon commun **5**. Afin de fonctionnaliser le sommet C-2, nous avons choisi de passer par une réaction de lithiation. Nous avons ensuite étudié la réactivité de l'anion en 2 en condensant différents types d'électrophiles. La réaction de lithiation a été reportée une fois pour la préparation de dérivés 2-aroyle-4-azaindoles à partir du *N*-benzènesulfonyl-5-méthoxy-4-azaindole (**Schéma 21**).²⁶⁴ L'anion en 2 a été obtenu après contact avec la base lithiée LDA (1.1 éq.) à 0 °C pendant 30 minutes. Plusieurs chlorures de benzoyles substitués ou non (1.1 éq.) ont ensuite été additionnés à - 78 °C, puis les auteurs ont laissé remonter la température de la réaction jusqu'à température ambiante pendant la nuit. Pour les 4 chlorures d'acides testés, les rendements obtenus varient de 14 à 73 %.

³⁴¹ a) Rodriguez A.L., Koradin C., Dohle W., Knochel P.: Versatile Indole Synthesis by a 5-endo-dig Cyclization Mediated by Potassium or Cesium Bases. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2488-90. b) Harcken C., Ward Y., Thomson D., Riether D.: A General and Efficient Synthesis of Azaindoles and Diazaindoles. *Synlett*, **2005**, 20, 3121-25. c) McLaughlin M., Palucki M., Davies I.W. : Efficient Access to Azaindoles and Indoles. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3307-10. d) Majumdar K.C., Mondal S.: Regioselective synthesis of substituted pyrrolopyridines based on Pd(II)-mediated cross coupling and base induced heteroannulation. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 6951-53. e) Sun L.P., Wang J.X.: Facile Synthesis of 2-Substituted 4-Azaindoles. *Synth. Commun.*, **2007**, 37, 2187-93.

³⁴² Majumdar K. C., Samanta S., Chattopadhyay B.: A convenient synthesis of pyrrolopyridines and 2-substituted indoles by gold-catalyzed cycloisomerization. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 7213-16.

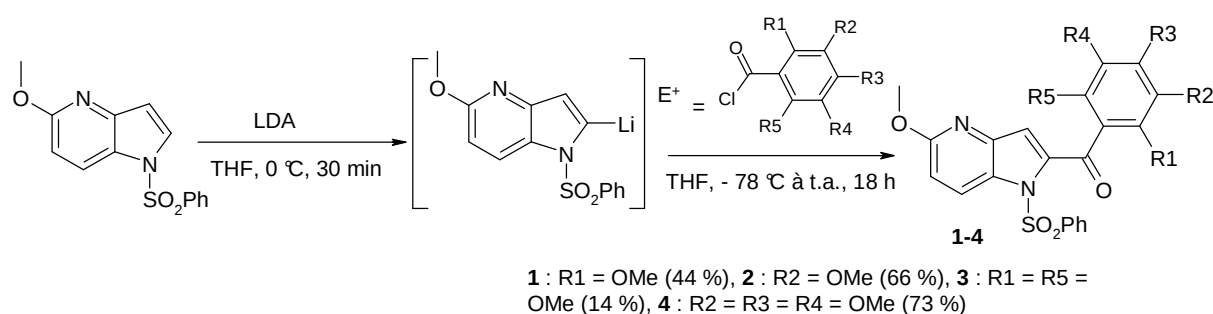


Schéma 21 : Réaction de lithiation appliquée à la fonctionnalisation en C-2 du 4-azaindole, d'après les travaux de Mahboobi et collaborateurs²⁶⁴

I-3.1 N-protection du 5-méthoxy-4-azaindole

La formation des dérivés lithiés se fait en général en présence d'une base forte de type LDA ou LiTMP. L'hydrogène de l'azote en 1 étant le plus acide, il est indispensable de protéger cet azote afin d'arracher le proton en position C-2. Le choix du groupement protecteur est déterminant pour orienter la réaction exclusivement en position C-2. Pour cela, le groupement protecteur doit stabiliser l'intermédiaire lithié. Ainsi, nous avons sélectionné les groupements SO₂Ph (phényl sulfonyle) et Boc (*tert*-Butyloxycarbonyle) (**Figure 52**).

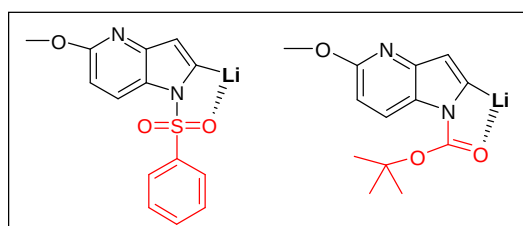


Figure 52 : Stabilisation du dérivé lithié en C-2 par les groupements protecteurs SO₂Ph et Boc

La protection du 5-méthoxy-4-azaindole (**5**) par les groupements SO₂Ph et Boc a été réalisée selon les protocoles décrits par Viaud-Massuard M.-C.²⁷⁶ et Parkar A.A.³⁴³ respectivement (**Schéma 22**). La réaction de **5** avec le chlorure de benzènesulfonyle en présence d'hydroxyde de sodium (NaOH) et de chlorure de benzyltriéthylammonium (catalyseur de transfert de phase) dans le dichlorométhane (DCM) conduit au produit protégé (**6**) avec un très bon rendement (98 %). La protection de **5** avec le di-*tert*-butyldicarbonate (Boc)₂O en présence du catalyseur basique DMAP (4-diméthylaminopyridine) dans le THF conduit au produit **7** avec un rendement comparable (90 %).

³⁴³ Jurcak J.R., Barrague M., Parkar A.A. *et al.*: Preparation of thienopyrazoles as inhibitors of interleukin-2 inducible tyrosine kinase for treating diseases involving overproduction of Th2 cytokine like asthma. PCT Int. Appl., WO2005026175, 2005.

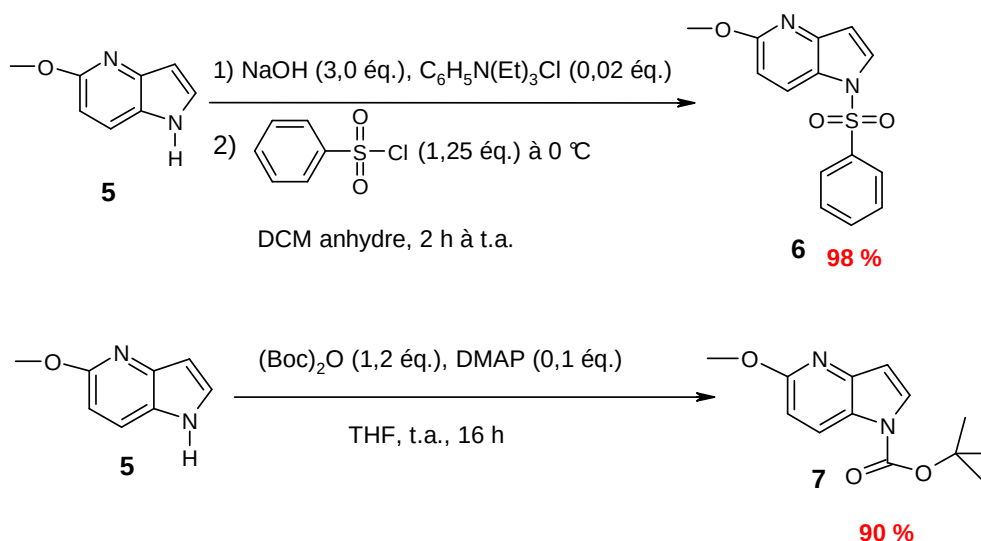


Schéma 22 : Protection de l'azote N-1 du 5-méthoxy-4-azaindole (5)

I-3.2 Formation des dérivés lithiés en position C-2

Plusieurs essais ont été nécessaires pour mettre au point la réaction de lithiation à partir des dérivés **6** et **7**. La première étape a été le choix de la base lithiée : deux bases ont été testées : LDA et LiTMP. Les bases ont été formées *in situ* à partir des amines secondaires : DIPA (Diisopropylamine) et TMP (Tétra-méthyl-pipéridine) qui sont mises en présence de *n*-butyl-lithium (*n*-BuLi) pour former la LDA et LiTMP respectivement. L'emploi d'une solution de LDA commerciale a aussi été testée. La deuxième étape a consisté à choisir la température de formation de l'anion : nous avons testé deux températures : - 78 °C et - 30 °C. Troisièmement, nous avons optimisé le nombre d'équivalents de base nécessaire pour former l'anion en C-2. Nous avons fait varier ce nombre d'équivalents de 1,5 à 3,5. La quatrième étape a consisté à optimiser le temps de lithiation entre 45 et 90 minutes. Le suivi de la formation de l'anion en C-2 s'est fait par traitement à l'eau lourde (D_2O) : une aliquote du mélange réactionnel est plongé dans une ampoule de D_2O . Un suivi en RMN du proton de la disparition du pic correspondant au proton porté par le sommet C-2 (H-2) permet une quantification de l'anion formé. Le pourcentage d'anion est estimé à partir de l'intégration du pic résiduel de H-2. Le **Schéma 23**, le **Tableau 9** et le **Tableau 10** regroupent les résultats obtenus concernant cette optimisation.

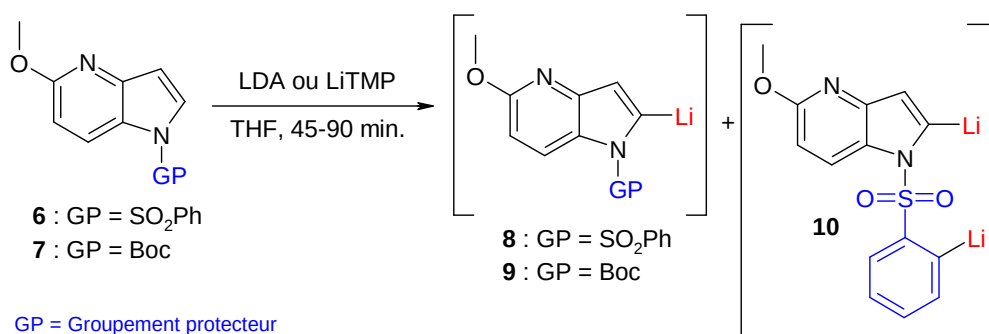


Schéma 23 : Lithiation en C-2 à partir des dérivés N-protégés (6) et (7)

Entrée	GP	Base	éq.	T (°C)	Temps (minutes)	(8) % ^a	(10) % ^a	(6) % ^a
1	SO ₂ Ph	LDA	1,5	- 78	60	-	-	100
2	SO ₂ Ph	LDA	2,5 ou 3,0	- 78	60 - 90	70	-	30
3	SO ₂ Ph	LDA/ TMEDA	1,5/1,4	- 78	60	80 - 90	-	10 - 20
4	SO ₂ Ph	LiTMP	1,5 ou 2,5	- 78	45 ou 60	80 - 90	-	10 - 20
5	SO ₂ Ph	LiTMP	1,5	- 30	60	68	-	32
6	SO ₂ Ph	LDA ou LiTMP	3,5	- 78	60	70	30	-

^aRendements estimés par ¹H RMN après piégeage au D₂O

Tableau 9 : Optimisation de la réaction de lithiation en C-2 à partir du dérivé N-benzènesulfonyl-5-méthoxy-4-azaindole (6)

Quelque soit le groupement protecteur utilisé (GP), il faut utiliser un minimum de 2,5 équivalents de LDA pour obtenir 70 % d'anion en C-2 : **8** ou **9** (Tableau 9, entrée 2 et Tableau 10, entrée 1). L'augmentation du temps de formation de l'anion de 60 à 90 minutes n'a pas permis d'améliorer ce rendement (Tableau 9, entrée 2), de même que l'augmentation du nombre d'équivalent de 2,5 à 3,5 (Tableau 9, entrée 6). L'utilisation du LDA sans additif présente plusieurs inconvénients quelque soit le GP utilisé. Lorsqu'on utilise comme GP le phénylsulfonyl, il se forme au-delà de 3 équivalents de LDA, un produit secondaire correspondant à l'espèce di anionique **10** où le proton en position C-2 et le proton en alpha du groupement SO₂ sont arrachés par la base (Tableau 9, entrée 6).

Lorsqu'on utilise comme GP le Boc, l'utilisation de LDA (2,5 éq.) génère 15 % de produit déprotégé (Tableau 10, entrée 1). L'utilisation de la base LiTMP (pK_a = 37), légèrement plus basique que le LDA (pK_a = 36) a permis d'améliorer les rendements de formation de l'anion en C-2 pour les 2 GP utilisés. En effet, l'utilisation de 1,5 ou 2,5 équivalents de LiTMP a permis d'obtenir 80 à 90 % de monoanion **8** (Tableau 9, entrée 4).

L'augmentation du nombre d'équivalent à 3,5 n'a pas permis d'augmenter ce rendement, le pourcentage de monoanion **8** diminue à 70 % dû à la formation de 30 % de dianion **10** (**Tableau 9**, entrée 6). Aussi, l'utilisation de 1,5 équivalents de LiTMP a permis d'obtenir 80 à 90 % d'anion **9** (**Tableau 9**, entrée 2). Pour évaluer l'influence de la température sur la réaction de lithiation, nous avons réalisé un essai à - 30 °C en présence de 1,5 éq. de LiTMP (**Tableau 9**, entrée 5). A - 30 °C, l'anion **8** est obtenu avec un moins bon rendement de 68 % alors que plus de 80 % d'anion **8** sont obtenus dans les mêmes conditions à - 78 °C. Pour améliorer la réactivité du LDA, nous avons additionné de la *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) qui est un agent complexant du lithium qui va permettre d'éviter la formation d'aggrégats composés de molécules de LDA seul. L'utilisation du mélange LDA/TMEDA (1,5/1,4 éq.) en présence de **6** a permis d'augmenter de 10 à 20 % le rendement de formation de l'anion **8** en comparaison avec l'utilisation de LDA (**Tableau 9**, entrée 3). Concernant le produit **7**, l'addition de TMEDA n'a pas permis d'améliorer le rendement de formation de l'anion **9** (**Tableau 10**, entrée 3).

Entrée	GP	Base	éq.	T (°C)	Temps (minutes)	(7) % ^a	(9) % ^a	(5) % ^a
1	Boc	LDA	2,5	- 78	60	15	70	15
2	Boc	LiTMP	1,5	- 78	60	-	80 - 90	10 - 20
3	Boc	LDA/TMEDA	1,5/ 1,4	- 78	60	15	70	15

^aRendements estimés par ¹H RMN après quenching au D₂O

Tableau 10 : Optimisation de la réaction de lithiation en C-2 à partir du dérivé *N*-tert-butoxycarbonyl-5-méthoxy-4-azaindole (7)

Bilan : Quelque soit le GP utilisé (SO₂Ph ou Boc), les conditions optimales pour former l'anion en position C-2 sont une température de - 78 °C et un temps de réaction d'au moins 45 minutes. Concernant le dérivé *N*-benzènesulfonyl-5-méthoxy-4-azaindole **6**, nous avons retenu les deux meilleures conditions LiTMP (1,5 éq.) (méthode B, partie expérimentale) et le mélange LDA/TMEDA (1,5/1,4 éq.) (méthode C) pour former l'anion **8**. Pour le *N*-tert-butoxycarbonyl-5-méthoxy-4-azaindole **7**, nous avons retenu une condition : LiTMP (1,5 éq.) (méthode B) pour former l'anion **9**. L'utilisation de LDA seul (2,5 éq.) (méthode A), s'est avérée être la méthode la moins efficace pour former les anions **8** ou **9**. Dans le but de fonctionnaliser la position 2 avec les meilleurs rendements, nous avons étudié la réactivité des anions **8** et **9** vis-à-vis de différents électrophiles.

I-3.3 Etude de la réactivité des dérivés lithiés en position C-2 du 4-azaindole

Nous avons étudié la réactivité des anions **8** et **9** (**Schéma 24**) vis-à-vis de trois électrophiles représentatifs : un chlorure d'acide (chlorure de benzoyle), un aldéhyde (4-bromo-benzaldéhyde) et un dihalogène (diiodé). Cette étude nous a permis de fixer la nature du GP et la méthode de formation de l'anion pour la suite de l'étude de réactivité et la suite des synthèses (**Tableau 11**, entrées 1-9).

1) Comparaison des groupements protecteurs : Pour deux des électrophiles, le chlorure de benzoyle et le 4-bromo-benzaldéhyde, les rendements des produits attendus sont nettement meilleurs avec le SO₂Ph que le Boc (comparaison des entrées 1 et 3 puis 4 et 6). Avec le diiodé, des rendements comparables ont été obtenus avec les deux GPs (entrées 7 et 9). Etant donné la plus faible réactivité de l'anion **9** (GP = Boc), nous avons poursuivi cette étude uniquement sur l'anion **8** (GP = SO₂Ph). Le groupement SO₂Ph s'avère être un meilleur GP que le Boc pour la fonctionnalisation du sommet C-2 lors d'une réaction de lithiation.

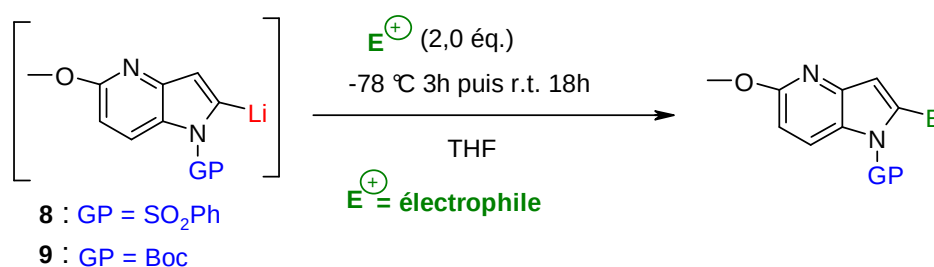


Schéma 24 : Etude de la réactivité des dérivés lithiés en position C-2 (8**) et (**9**)**

2) Choix de la méthode pour la réaction de lithiation en C-2 : La comparaison des rendements obtenus avec les trois électrophiles (chlorure de benzoyle, 4-bromo-benzaldéhyde et diiodé) selon les méthodes B ou C montre que la méthode C est légèrement plus efficace (**Tableau 11**, en comparant les entrées 1-2, 4-5 et 7-8). De plus, la procédure de lithiation est plus rapide à mettre en œuvre avec la méthode C étant donné que l'on peut utiliser une solution de LDA commerciale. Cette méthode a ainsi été choisie pour continuer l'étude de la réactivité de l'anion **8** avec d'autres électrophiles (**Tableau 11**, entrées 10-14). Le chlorure de benzoyle (entrée 2, 57 %), le méthylchloroformate (entrée 10, 62 %) et le DMF (entrée 13, 42 %) sont des électrophiles moins efficaces que le bromo-benzaldéhyde (entrée 5, 90 %). La silylation (entrée 11, 85 %), la stannylation (entrée 12, 83 %) et la boronylation (entrée 14, 95 %) sont réalisées avec de très bon rendements. Ces nouveaux produits **18**, **19** et **21** peuvent

être engagés dans des réactions de couplage pallado-catalysées de type Hiyama, Stille et Suzuki respectivement.

Entrée	Méthode ^a	GP	E ⁺	E	Produit	Rendement ^b (%)
1	B	SO ₂ Ph	PhCOCl	PhCO	11	51
2	C	SO ₂ Ph	PhCOCl	PhCO	11	57
3	B	Boc	PhCOCl	PhCO	12	19
4	B	SO ₂ Ph	4-Br-C ₆ H ₄ CHO	4-Br-C ₆ H ₄ CHOH	13	76
5	C	SO ₂ Ph	4-Br-C ₆ H ₄ CHO	4-Br-C ₆ H ₄ CHOH	13	90
6	B	Boc	4-Br-C ₆ H ₄ CHO	4-Br-C ₆ H ₄ CHOH	14	0 ^c
7	B	SO ₂ Ph	I ₂	I	15	63
8	C	SO ₂ Ph	I ₂	I	15	74
9	B	Boc	I ₂	I	16	67
10	C	SO ₂ Ph	ClCO ₂ CH ₃	CO ₂ CH ₃	17	62
11	C	SO ₂ Ph	(CH ₃) ₃ SiCl	(CH ₃) ₃ Si	18	85
12	C	SO ₂ Ph	ClSnBu ₃	SnBu ₃	19	83
13	C	SO ₂ Ph	DMF	CHO	20	42 ^d
14	C	SO ₂ Ph	B(OCH ₃) ₃	B(OH) ₂	21	95

^aMéthode B : LiTMP (1,5 éq.), Méthode C : LDA/ TMEDA (1,5/ 1,4 éq.) ; ^bRendements des produits isolés ; ^caucun produit isolé, que de la dégradation observée ; ^dProduit non isolé, rendement estimé par ¹H RMN

Tableau 11 : Réactivité des dérivés lithiés en position C-2 (8) et (9)

En conclusion, nos travaux constituent la première étude exhaustive sur la réactivité du dérivé lithié en C-2 du 4-azaindole N-protégé 6 vis-à-vis de divers électrophiles (aldéhydes, chlorures d'acides, méthylchloroformate, DMF, chlorure de triméthylsilyle, chlorure de tributylétain et le triméthylborate). La meilleure condition retenue pour la réaction de lithiation est de former le dérivé lithié en C-2 en présence de LDA/TMEDA (1,5/1,4 éq.) à -78 °C pendant une heure, suivie de l'addition de l'électrophile (2 éq.). La température est remontée jusqu'à température ambiante

pendant la nuit. Tous les dérivés 4-azaindoles fonctionnalisés en position C-2 que nous avons synthétisés (11-21), sont des nouveaux synthons qui pourront être introduits dans la synthèse de produits d'intérêt biologique. En particulier, le potentiel des dérivés iodés (15), triméthyl silyle (18), tributylétain (19) et acide boronique en C-2 (21) en tant que produit de départ dans les réactions de couplage pallado-catalysées reste encore à être exploité, pour augmenter encore la diversité fonctionnelle au niveau du sommet C-2.

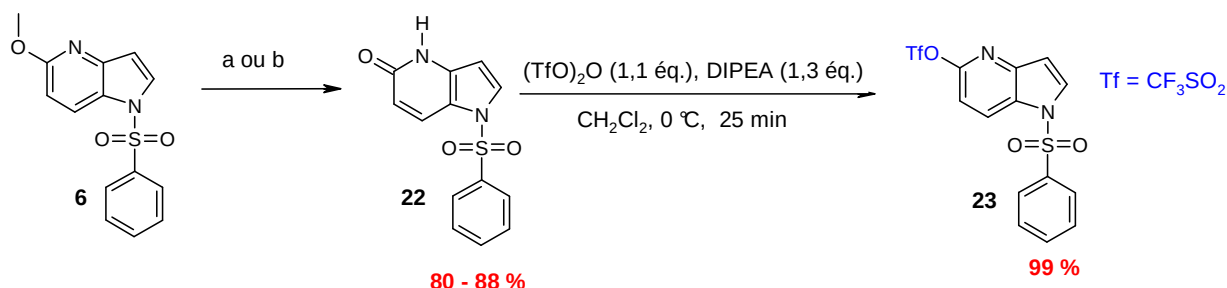
I-4 Fonctionnalisation du C-5 à partir du 5-méthoxy-4-azaindole

Afin de fonctionnaliser le sommet C-5 du noyau 4-azaindole, notre stratégie a été de remplacer le groupement méthoxy du dérivé *N*-benzènesulfonyl-5-méthoxy-4-azaindole **6** par un groupement triflate (CF_3SO_2) (**Schéma 25**). La déprotection du groupement méthoxy est effectuée en présence d'iodure de triméthylsilyle (TMSI) et conduit au produit **22** avec un très bon rendement (88 %).³⁴⁴ Cette méthode s'est avérée plus efficace que celle préalablement décrite qui utilise l'acide de Lewis AlCl_3 (chlorure d'aluminium).²⁷⁶ En effet, ces nouvelles conditions permettent d'obtenir plus rapidement (3h30 au lieu de 18 h) le produit **22** avec un meilleur rendement (88 % au lieu de 80 %). De plus le traitement de la réaction est facilité car on ne génère pas de sels d'aluminium souvent à l'origine d'émulsions qui rendent plus difficile les étapes d'extraction. Le produit **22** est ensuite fonctionnalisé en position C-5 par un groupement triflate pour conduire au triflate **23** de façon quantitative en présence de la base diisopropyléthylamine (DIPEA) et d'anhydride trifluorométhanesulfonique. Ces conditions sont classiquement utilisées pour introduire un groupement triflate sur des substrats hydroxylés.^{345,346} Nous avons ensuite étudié la réactivité du dérivé triflate **23** en l'engageant dans deux types de réactions de couplage pallado-catalysées pour former sur le sommet C-5 une liaison C-C *via* un couplage de Suzuki d'une part, et une liaison C-N *via* un couplage de Buchwald d'autre part.

³⁴⁴ Gesenberg K., Deshpande P.P., Pullockaran A., Feng X., Dedong W., Qi G., Pathiran A.C., Castoro J., Soundararajan N., Staab, A.: Surprising selectivity in the transformation of dimethoxy azaindoles. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 2675-77.

³⁴⁵ Proudfoot J.R., Hargrave K.D., Kapadia S.R., Patel U.R., Grozinger K.G., McNeil D.W., Cullen E., Cardozo M., Tong L., Kelly T.A., Ose J., David E., Mauldin S.C., Fuchs V.U., Vitous J., Hoermann M., Klunder J.M., Palayakotai R., Skiles J.W., Mui P., Richman D.D., Sullivan J.L., Cheng-kon S., Grob P.M., Adams J.: Novel non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. 4. 2-Substituted dipyrroldiazepinones as potent inhibitors of both wild-type and cysteine-181 HIV-1 reverse transcriptase enzymes. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4830-8.

³⁴⁶ Campeau L.C., Parisien M., Jean A., Fagnou K.: Catalytic Direct Arylation with Aryl Chlorides, Bromides, and Iodides : Intramolecular Studies Leading to New Intermolecular Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 581-90.



a) AlCl_3 (10,0 éq.), CH_2Cl_2 , 18 h reflux, 80 % ; b) NaI (1,6 éq.), TMSCl (1,6 éq.), CH_3CN , reflux, 3h30, 88 %

Schéma 25 : Synthèse du dérivé triflate (23)

I-4.1 Fonctionnalisation du C-5 via un couplage de Suzuki

Rappel sur le couplage de Suzuki :

Le couplage de Suzuki est une réaction très utilisée en chimie médicinale qui permet la formation d'une liaison C-C entre une espèce organo-borée (acide, ester boronique ou trifluoroborate de potassium BF_3K) et un dérivé halogéné (chloré, bromé ou iodé) ou un triflate (OTf) en présence d'un catalyseur au palladium, un ligand phosphine et une base (**Schéma 26**).³⁴⁷ Les bases peuvent être utilisées en solution aqueuse ou en suspension dans des solvants tels que le dioxane, le DMF, le DME ou le THF. Plus récemment, des sels de fluor (BF_3K) ont été employés avec efficacité lors de couplages.³⁴⁸ La réaction de Suzuki a l'avantage d'être compatible avec de nombreuses fonctions organiques et ne génère pas de sous-produits toxiques.

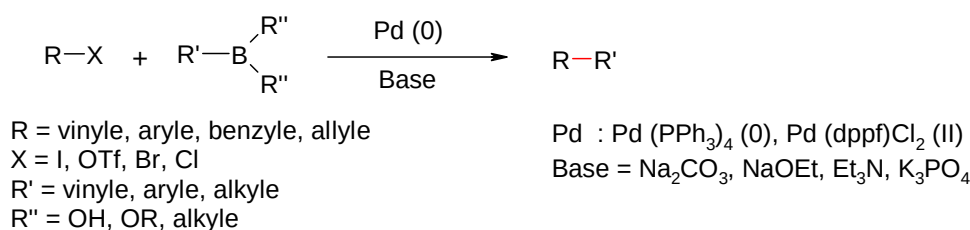


Schéma 26 : Réaction de couplage de Suzuki

³⁴⁷ a) 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. *Chem. Commun.* **1979**, 866-7. b) Miyaura N., Suzuki A.: Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-83. c) Sambasivarao K., Lahiri K., Kashinath D.: Recent applications of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9633-95.

³⁴⁸ Darses S., Genet J.P.: Potassium Organotrifluoroborates: New Perspectives in Organic Synthesis. *Chem. Rev.*, **108**, **2008**, 288-325.

Le cycle catalytique du couplage de Suzuki est composé de quatre étapes (**Schéma 27**) :

- 1) L'addition oxydante : le palladium s'insère dans la liaison R-X et passe du degré d'oxydation 0 à II. Le choix des ligands du palladium influe sur la réactivité. Des ligands volumineux et riches en électrons accélèrent la vitesse de l'étape d'addition oxydante.
- 2) L'activation : La base déplace le groupe partant X, ce qui active le complexe palladié (de degré d'oxydation II) généré.
- 3) La transmétallation : l'acide boronique est préalablement transformé en sel en présence de la base ce qui augmente la nucléophilie du groupement R' et accélère son transfert sur le palladium (transmétallation).
- 4) L'élimination réductrice : la nouvelle liaison C-C se forme et le produit final R-R' est libéré. L'élimination est dite réductrice car le catalyseur Pd (0) est régénéré.

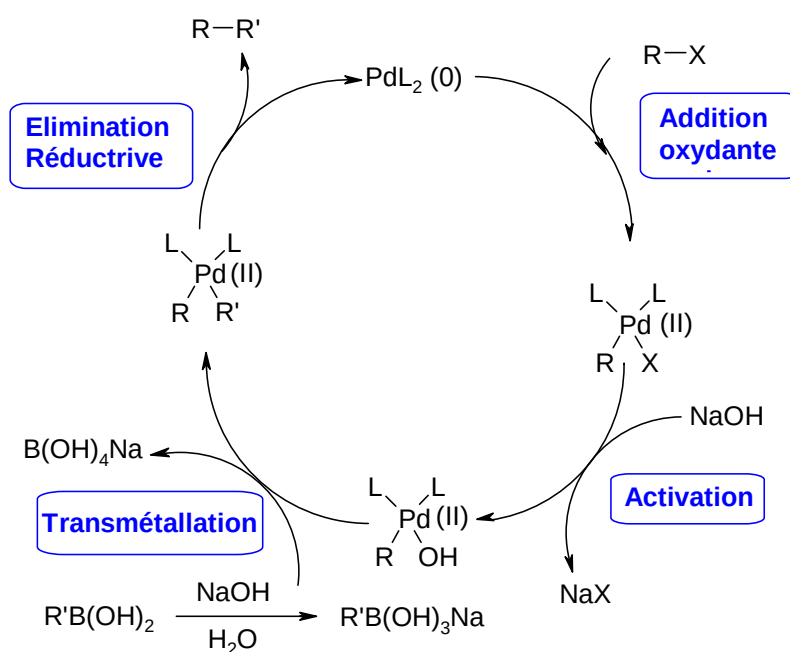
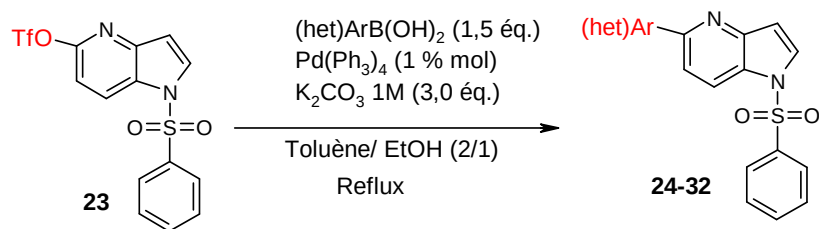


Schéma 27 : Cycle catalytique du couplage de Suzuki

Plusieurs acides boroniques aromatiques et hétéroaromatiques ont été engagés dans des réactions de Suzuki à partir du composé **23**. Elles ont été réalisées avec seulement 1 % de palladium tétrakis triphénylphosphine ($Pd(PPh_3)_4$), une solution aqueuse de carbonate de potassium (3,0 éq.), 1,5 éq. d'acide boronique, à reflux du solvant composé d'un mélange toluène/éthanol (2/1) (**Schéma 28, Tableau 12**). Ces conditions se sont avérées très efficaces pour fonctionnaliser le dérivé triflate **23**.^{349,350}

³⁴⁹ Jacquemard U., Routier S., Dias N., Lansiaux A., Goossens J.F., Bailly C., Mérour J.Y.: Synthesis of 2,5- and 3,5-diphenylpyridine derivatives for DNA recognition and cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40, 1087-95.



Sch\u00e9ma 28 : Conditions utilis\u00e9es pour le couplage de Suzuki \u00e0 partir de (23)

Entr\u00e9e	Ar	Temps (h)	Produit	Rendement* (%)
1		2	24	95
2		2	25	70
3		2	26	96
4		2	27	78
5		1,5	28	91
6		5	29	17
7		2,5	30	88
8		4	31	92
9		6	32	69

*Rendements des produits isol\u00e9s

Tableau 12 : R\u00e9actions de couplage de Suzuki \u00e0 partir du d\u00e9riv\u00e9 23

³⁵⁰ Doherty G.A., Kamenecka T., McCauley E., Van Riper G., Mumford R.A., Tong S., Hagmann W.K.: *N*-aryl 2,6-dimethoxybiphenylalanine analogues as VLA-4 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 729-31.

La plupart des acides boroniques aromatiques ou hétéaromatiques monosubstitués en *ortho*, *méta* et *para* ont donné de très bons rendements de couplage supérieurs à 90 % (**Tableau 12** : entrées 1, 3, 5 et 8). Dans le cas des produits **25**, **27** et **30**, les réactions semblaient totales sur les plaques CCM, par conséquent, les diminutions des rendements observées (70-88 %), sont dues à la purification de ces produits. Le composé **29** est obtenu avec un rendement modeste de 17 % (entrée 6). En effet, la réaction de couplage n'évoluait plus même après 5h de reflux. Ce résultat peut s'expliquer par l'augmentation de l'encombrement stérique engendré par les 2 atomes de chlore en *ortho* et *ortho'* (entrée 7). Les conditions de couplage ont aussi permis d'obtenir un bon rendement avec le *N*-Boc-indole trifluoroborate de potassium préparé au sein de notre laboratoire (69 %, entrée 9).³⁵¹

En conclusion, notre méthode utilisée pour les réactions de couplage de Suzuki, (Pd(PPh₃)₄ (0,01 éq.), K₂CO₃ 1M (3,0 éq.), acide boronique (1,5 éq.), à reflux du mélange toluène/éthanol (2/1) s'est avérée très efficace quelque soit les acides boroniques engagés dans la réaction : aromatiques, hétéroaromatiques, monosubstitués en *ortho*, *para* ou *méta*, disubstitués ou trifluoroborate de potassium (BF₃K). De très bons rendements compris entre 69 et 96 % ont été obtenus avec cette méthode. La seule limite fut observée avec des acides boroniques très encombrés.

I-4.2 Fonctionnalisation du C-5 via un couplage de Buchwald

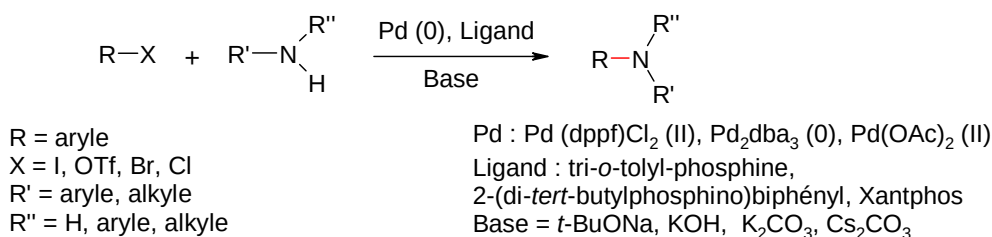
Le deuxième objectif était de réaliser l'amination de la position C-5 du triflate **23**. Les premiers essais pour réaliser une substitution nucléophile directe du groupement triflate se sont avérés inefficaces. Par conséquent, nous avons opté pour la réaction de couplage pallado-catalysée de Buchwald-Hartwig qui est une méthode couramment utilisée pour les aminations des cycles aromatiques et hétéroaromatiques.³⁵²

³⁵¹ Kassis P., Bénéteau V., Mérour J-Y., Routier S.: Potassium [1-(tert-Butoxycarbonyl)-1H-indol-2-yl]trifluoroborate as an efficient building block in palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross couplings. *Synthesis*, **2009**, 14, 2447-53.

³⁵² a) Hartwig J.F.: Transition Metal Catalyzed Synthesis of Arylamines and Aryl Ethers from Aryl Halides and Triflates: Scope and Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2046-67. b) Yin J., Buchwald S.L.: Pd-Catalyzed Intermolecular Amidation of Aryl Halides: The Discovery that Xantphos Can Be Trans-Chelating in a Palladium Complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6043-48. c) Yang B.H., Buchwald S.L.: Palladium-catalyzed amination of aryl halides and sulfonates. *J. Organomet. Chem.*, **1999**, 576, 125-46. d) Ahman J., Buchwald S.L.: An Improved Method for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 6363-66. e) Wolfe J.P., Buchwald S.L.: Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1264-1267. f) Louie J., Driver M.S., Hamann B.C., Hartwig J.F.: Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates and Importance of Triflate Addition Rate. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1268-73. g) Wolfe J.P., Tomori H., Sadighi J.P., Yin J., Buchwald S.L.: Simple, Efficient Catalyst System for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Chlorides, Bromides, and Triflates. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 1158-74.

Rappel sur le couplage de Buchwald-Hartwig:

De même que pour le couplage de Suzuki, le couplage de Buchwald-Hartwig est une autre réaction très utilisée en chimie médicinale qui permet cette fois de former une liaison C-N entre une amine primaire ou secondaire et un dérivé halogéné ou triflate en présence d'un catalyseur au palladium, un ligand phosphine et une base (**Schéma 29**).³⁵² Les bases peuvent être utilisées en solution dans des solvants tels que le dioxane, toluène ou le DME.

**Schéma 29 : Réaction de Buchwald-Hartwig**

Le mécanisme de la réaction de Buchwald-Hartwig est composé des mêmes étapes que la réaction de Suzuki (**Figure 53**).

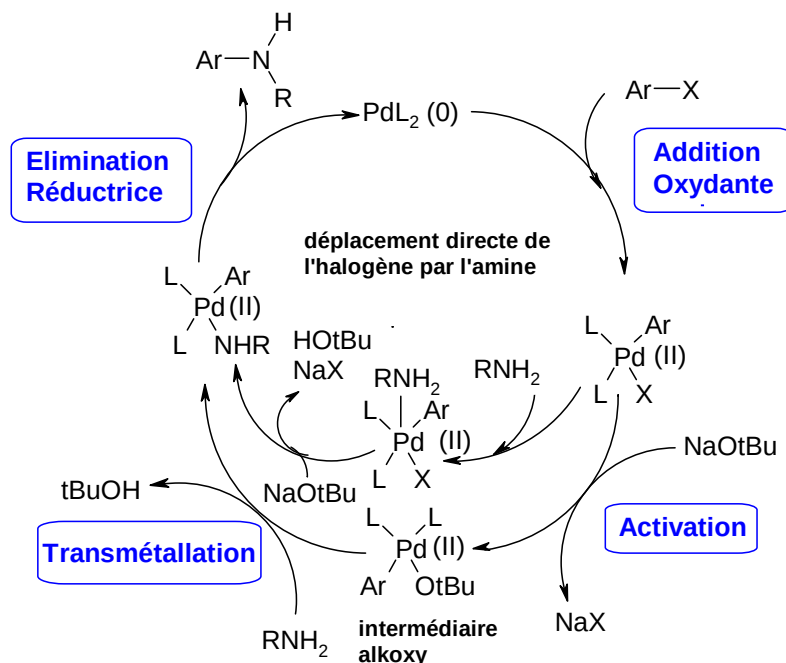


Figure 53 : Cycle catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig

Le cycle catalytique débute par l'addition oxydante du Pd(0) dans la liaison Ar-X. La deuxième étape consiste à substituer le groupe partant X sur le complexe palladié (II). Cette substitution peut se faire selon 2 voies : soit le groupement X est déplacé par la base et il se forme un intermédiaire alkoxy.^{352a)} Soit il est directement déplacé par l'amine après

intervention de la base pour arracher un proton de l'amine.^{352c), g)} Ces deux voies sont suivies de la transmétallation du complexe palladié (II). La dernière étape est l'élimination réductrice au cours de laquelle se forme la liaison C-N. L'aminoaromatique souhaité est libéré et le catalyseur Pd(0) est régénéré.

Différents types d'amines (primaires, secondaires, aliphatiques, aromatiques, cycliques ou acycliques), amides (aliphatiques, aromatiques) ainsi qu'une urée, un carbamate et un sulfonamide furent choisis pour augmenter la diversité en position C-5 et évaluer l'étendue et les limitations de cette stratégie. Afin de choisir la base, le catalyseur au palladium et son ligand, trois conditions opératoires ont été testées à partir de la 4-méthoxy-phénylamine et du triflate **23**.

La première méthode, inspirée des travaux de Buchwald sur les aryles nonaflates,³⁵³ utilise le Pd₂dba₃(0) (0,03 éq.), le ligand : Xantphos (0,02 éq), la base DBU (2,5 éq.) et l'amine (1,5 éq.) dans le toluène. La réaction de couplage est réalisée sous irradiation micro-onde pendant 30 minutes à 150 °C. Selon cette méthode, le produit **33** est obtenu avec un rendement de 63 %. La deuxième méthode, aussi inspirée des travaux de Buchwald,³⁵⁴ utilise la même source de palladium et le même ligand : Pd₂dba₃ (0,03 éq.), Xantphos (0,045 éq.). Dans ce cas, une base inorganique, le carbonate de césium Cs₂CO₃ (1,5 éq.) est utilisée. La réaction de couplage est achevée au reflux du dioxane après 3 heures, pour conduire au produit **33** avec 54 % de rendement. Enfin pour la troisième méthode testée, seule la nature du solvant diffère. Le remplacement du dioxane par le toluène a permis d'obtenir le produit **33** avec un excellent rendement de 98 % (**Tableau 13**, entrée 1). Cette méthode fut ensuite appliquée au reste des amines et amides (**Schéma 30**, **Tableau 13**). Les temps de réaction au reflux du toluène varient selon les amines ou amides et sont indiqués dans le **Tableau 13**.

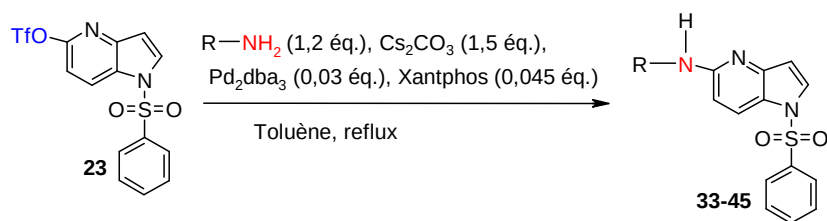
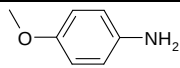
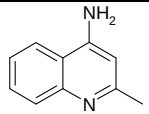
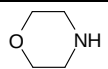
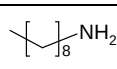
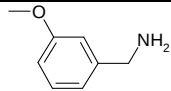
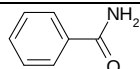
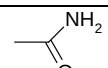
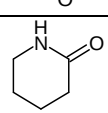
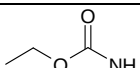
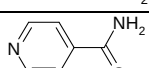
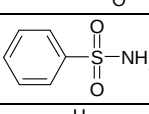
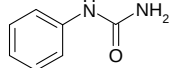
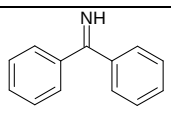


Schéma 30 : Conditions utilisées pour le couplage de Buchwald à partir de (23)

³⁵³ Tundel R.E., Anderson K.W., Buchwald S.L. : Expedited Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Nonaflates through the Use of Microwave-Irradiation and Soluble Organic Amine Bases. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 430-33.

³⁵⁴ Yin J.J., Buchwald S.L.: Palladium-Catalyzed Intermolecular Coupling of Aryl Halides and Amides. *Org.Lett.*, **2000**, 2, 1101-04.

Entrée	R-NH ₂	Temps (h)	Produit	Rendement ^a (%)
1		1	33	98
2		3	34	91
3		2,5	35	80
4		7	36	23
5		7	37	25
6		3	38	94
7		1,5	39	99
8		6,5	40	79
9		2,5	41	72
10		24	42	55 ^b
11		24	43	0 ^c
12		1	44	77
13		5,5	45	66

^aRendements des produits isolés, ^bLe toluène a été remplacé par le dioxane afin d'améliorer la solubilité de l'isonicotinamide. (37 % de rendement obtenu avec le toluène). ^cSeul le produit de départ **23** est isolé.

Tableau 13 : Réactions de couplage de Buchwald à partir du dérivé 23

Concernant les amines, une amine primaire aromatique (4-méthoxy-phénylamine, entrée 1) et une amine primaire hétéroaromatique (2-méthyl-quinolin-4-ylamine, entrée 2) ont été couplées avec des rendements quasiment quantitatifs (98 % et 91 % respectivement). Cette méthode permet aussi l'introduction efficace de la morpholine, une amine aliphatique secondaire (entrée 3, 80 %). A l'inverse, une alkylamine linéaire (*n*-hexylamine, entrée 4) et la 4-méthoxy-benzylamine (entrée 5) ont donné des rendements limités de 23 et 25 % respectivement. Dans ces deux cas, les diverses tentatives d'amélioration des rendements en

remplaçant le solvant par le dioxane, la source de palladium par Pd(OAc)₂, en augmentant le nombre d'équivalents d'amines jusqu'à 4 ainsi que la diminution de la température de réaction à 80 °C ou l'utilisation des micro-ondes, se sont avérées inefficaces.

Concernant les amides, un amide aromatique (benzamide, entrée 6) ou aliphatique acyclique (acétamide, entrée 7) ont conduit à d'excellents rendements de 94 et 99 % (entrée 13) avec un rendement satisfaisant de 66%.respectivement. Un amide secondaire (pipéridin-2-one, entrée 8), le carbamate d'éthyle (entrée 9) et la phénylurée (entrée 12) conduisent également à de bons rendements de 79, 72 et 77 % respectivement. La légère diminution des rendements résulte des difficultés de purification et non de l'avancement de la réaction. Une diminution du rendement de couplage est observée avec un amide hétéroaromatique (isonicotinamide, entrée 10). En effet, le produit **42** est obtenu avec un rendement de 37 % dans le toluène. Le remplacement du toluène par le dioxane permet d'améliorer la solubilité de l'isonicotinamide et augmente ainsi le rendement à 55 %. La seule limitation concerne le phénylsulfonamide (entrée 11) où seul le produit de départ est isolé. Toutes les tentatives pour obtenir le produit de couplage correspondant **43** ont échoué.

Enfin notre méthode, permet aussi de coupler une imine aromatique, la benzophénone (entrée 13) avec un rendement satisfaisant de 66%.

En conclusion, la méthode de couplage mise au point pour la N-arylation du sommet C-5 du noyau 4-azaindole (amine (1,2 éq.), Cs₂CO₃ (1,5 éq.), Pd₂dba₃ (0,03 éq.), Xanthphos (0,045 éq.) au reflux du toluène) s'est avérée très efficace pour le couplage des amines primaires aromatiques et hétéroaromatiques (91-98 %), les amines secondaires cycliques (80 %), les amides aromatiques (94 %) et aliphatiques cycliques (79 %) ou acycliques (99 %), les carbamates (72 %), les urées (77 %) et les imines (66 %). Les limites de cette méthodologie sont les alkyles amines acycliques (23 %), les benzylamines (25 %) et les sulfonamides avec lesquels la réaction de couplage ne marchent pas.

Pour le couplage des alkylamines linéaires, des benzylamines et des sulfonamides d'autres conditions décrites pour les aryles halogénés ou triflates pourront être explorées comme le remplacement du palladium par l'iodure de cuivre (CuI)³⁵⁵ ou le

³⁵⁵ a) Kwong F.Y., Klapars A., Buchwald S.L.: Copper-Catalyzed Coupling of Alkylamines and Aryl Iodides: An Efficient System Even in an Air Atmosphere. *Org. Lett.*, **2002**, 4, 581-84. b) Kwong F.Y., Buchwald S.L.: Mild and Efficient Copper-Catalyzed Amination of Aryl Bromides with Primary Alkylamines. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 793-96. c) Deng W., Liu L., Zhang C., Liu M., Guo Q-X.: Copper-catalysed cross-coupling of sulfonamides with aryl iodides and bromides facilitated by amino acid ligands. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 7295-98. d) Shafir

changement de la base carbonate de césium par une base plus forte le *tert*-butanolate de sodium (NaOtBu) et le remplacement du Xantphos par d'autres ligands (BINAP, DPPF).³⁵⁶

I-5 Synthèse des inhibiteurs disubstitués en *N*-1 et *C*-5 du 4-azaindole

La voie de synthèse optimisée pour obtenir les produits substitués en position *N*-1 et *C*-5 du noyau 4-azaindole est décrite ci-dessous dans le **Schéma 31**. Le triflate **23** est engagé dans une réaction de couplage pallado-catalysé de type Buchwald avec la 4-chloro-3-trifluorométhyl-phénylamine selon les premières conditions décrites précédemment.³⁵³ Après 30 min d'irradiation micro onde à 150 °C, le produit **46** est obtenu avec un très bon rendement de 96 %. A partir du composé **46**, 2 voies de synthèse sont possible.

Selon la voie a), **46** est déprotégé en milieu basique par le TBAF (fluorure de tétra-*n*-butylammonium) pour conduire à l'intermédiaire **47**.^{357,358} Selon la voie b) le groupement amino en position *C*-5 du composé **46** est protégé sélectivement par un groupement Boc en présence de di-*tert*-butyldicarbonate ((Boc)₂O) et DMAP pour conduire au produit **48** avec un rendement de 90 %. L'azote indolique du dérivé **48** est ensuite déprotégé en milieu basique par le TBAF pour conduire à l'intermédiaire **49** avec un rendement de 99 %. Les intermédiaires **47** ou **49** nous serviront de produits de départ pour la condensation en milieu basique de différents chlorures d'acides avec des substituants R variables (électrodonneur,

A., Buchwald S.L.: Highly Selective Room-Temperature Copper-Catalysed C-N Coupling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 8742-43.

³⁵⁶ a) Wolfe J.P., Buchwald S.L.: Palladium-Catalysed Amination of Aryl Triflates. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1264-67. b) Ahman J., Buchwald S.L.: An Improved method for the Palladium-Catalysed Amination of Aryl Triflates. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 6363-66. c) Louie J., Driver M.S., Blake C.H., Hartwig J.F.: Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates and Importance of Triflate Addition Rate. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1268-73. d) Yang B.H., Buchwald S.L.: Palladium-catalyzed amination of aryl halides and sulfonates. *J. Organomet. Chem.*, **1999**, 576, 125-46. e) Wolfe J.P., Tomori H., Sadighi J.P., Yin J., Buchwald S.L.: Simple, Efficient Catalyst System for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Chlorides, Bromides, and Triflates. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 1158-74. f) Ali M.H., Buchwald S.L.: An Improved Method for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Iodides. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 2560-65. g) Burton G., Cao P., Li G., Rivero R.: Palladium-Catalysed Intermolecular Coupling of Aryl Chlorides and Sulfonamides under Microwave Irradiation. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 4373-76. h) Fors B.P., Watson D.A., Biscoe M.R., Buchwald .L.: A Highly Active Catalyst for Pd-Catalyzed Amination Reactions: Cross-Coupling Reactions Using Aryl Mesylates and the Highly Selective Monoarylation of Primary Amines Using Aryl Chlorides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 13552-54.

³⁵⁷ déprotection indole : Yasuhara A., Sakamoto T.: Deprotection of *N*-sulfonyl nitrogen-heteroaromatics with tetrabutylammonium fluoride. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 595-596.

³⁵⁸ déprotection 7-azaindole : Routier S., Ayerbe N., Mérour J.Y., Coudert G., Bailly, C., Pierré A., Pfeiffer B., Caignard D.H., Renard P.: Synthesis and biological evaluation of 7-azaindolocarbazoles. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 6621-6630.

électroattracteur, accepteur et/ou donneur de liaison hydrogène). Le groupement Boc est ensuite déprotégé en fin de synthèse en milieu acide.

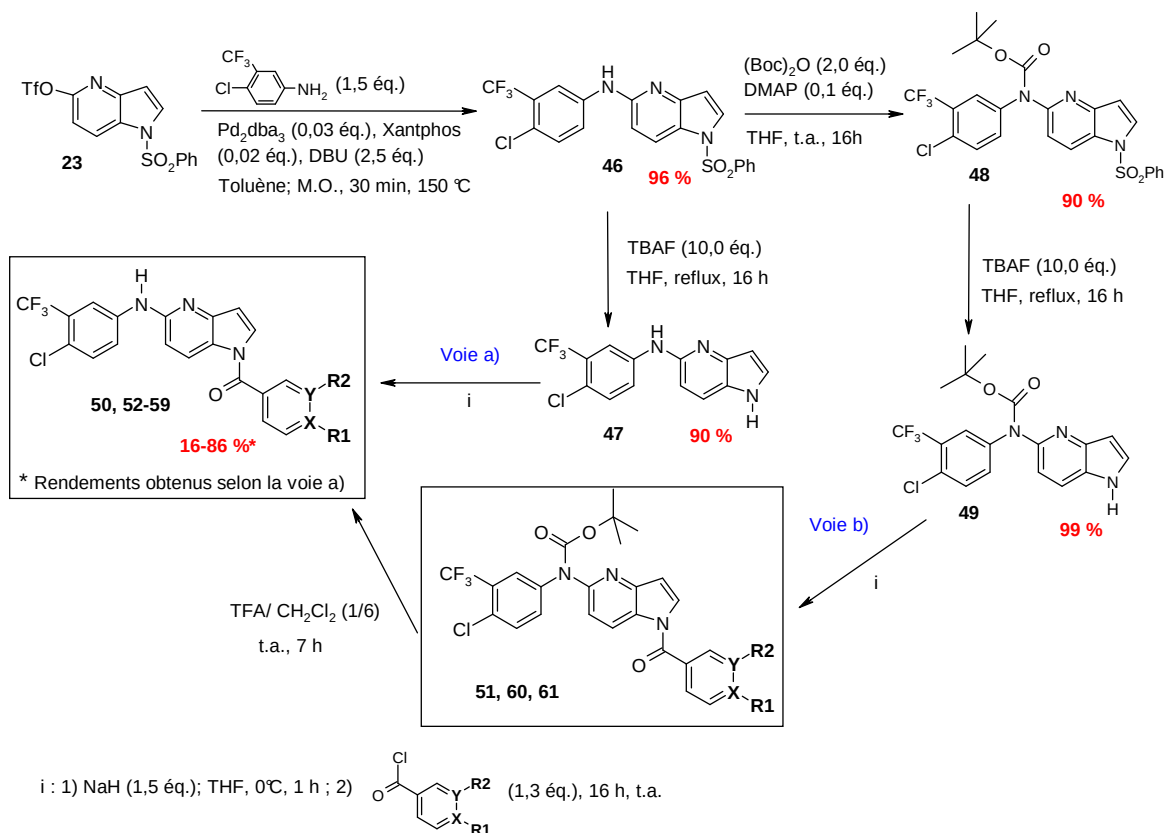


Schéma 31 : Voie de synthèse utilisée pour accéder aux produits finaux disubstitués en N-1 et C-5 du noyau 4-azaindole

Afin de réaliser la condensation des chlorures d'acides selon la voie a) ou b), nous avons comparé les résultats obtenus pour la condensation du chlorure de 4-méthoxy-benzoyle. Selon la voie a) le produit désiré **50** est obtenu en deux étapes à partir de **46** avec un rendement global de 66 %. L'utilisation de l'hydruure de sodium (NaH) permet d'arracher avec une bonne sélectivité le proton de l'azote indolique. Selon la voie b) le composé **50** est obtenu en 4 étapes, en passant par l'intermédiaire **51** avec un rendement global de 74 %. Même si le rendement global à partir de **46** est légèrement plus élevé pour la voie b), nous avons choisi d'utiliser la voie a) plus rapide pour condenser les chlorures d'acides qui ne nécessitent pas d'étape ultérieure de fonctionnalisation.

Afin de connaître l'implication éventuelle du groupement NH en position C-5 du 4-azaindole, quelques composés ont été synthétisés avec le groupement NH protégé par un Boc (**51**, **60** et **61**), d'autres produits possèdent le groupement méthoxy en 5 (**62**, **63**) (**Schéma 32**). Ces derniers sont issus de la condensation des chlorures d'acides dans les mêmes conditions à partir du dérivé 5-méthoxy-4-azaindole **5**.

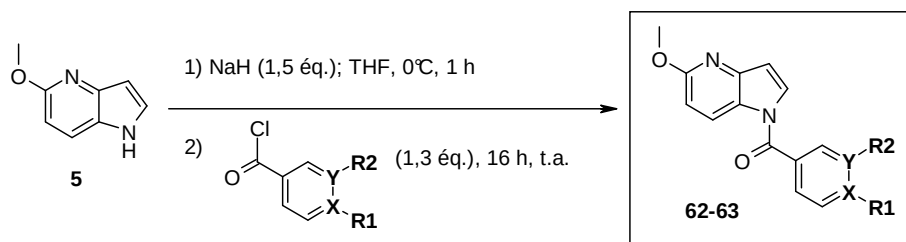


Schéma 32 : Synthèse des produits finaux en série 5-méthoxy-4-azaindole fonctionnalisée en N-1

Selon la nature du chlorure d'acide et le niveau de difficulté de la purification, les rendements de l'étape de condensation des électrophiles varient de 18 à 94 %. (**Tableau 14**, entrées 1-14). Pour la plupart des chlorures d'acides engagés les rendements de condensation sont compris entre 62 et 84 %.

Les principales difficultés rencontrées concernent la synthèse des produits **53**, **55** et **56**. Les produits **53** et **56** sont obtenus avec des rendements de 23 et 21 % en raison de la dégradation des produits formés sur la colonne de silice même après neutralisation de la silice en utilisant 2 % de triéthylamine dans les solvants de purification.

Le produit **55** a été synthétisé à partir de **52** dans le but d'apporter un groupement amide donneur et accepteur de liaison d'hydrogène (**Schéma 33**).

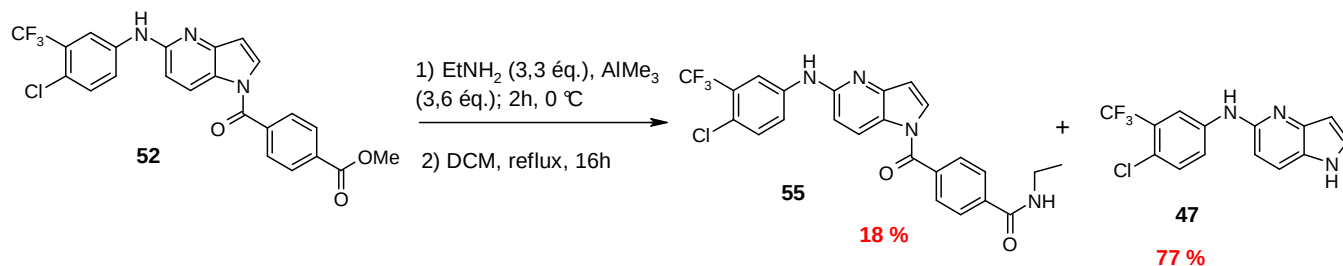
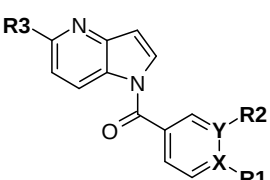
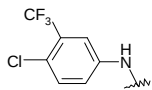
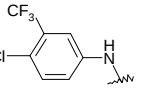
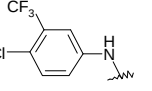
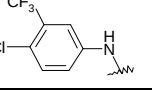
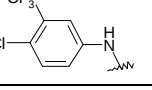
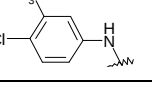
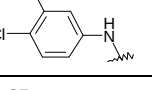
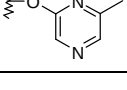
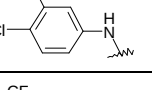
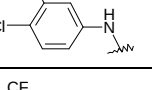
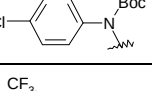
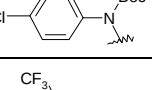
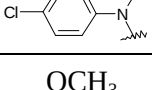


Schéma 33 : Synthèse du produit 55

							
Entrée	X	Y	R1	R2	R3	Produit	Rendement ^a (%)
1	C	C	OCH ₃	H		50	73
2	C	C	COOCH ₃	H		52	73
3	C	C	CN	H		53	23 ^b
4	C	N	Cl	-		54	79
5	C	C	CONHEt	H		55	18 ^c
6	C	C	H	CN		56	21 ^b
7	N	C	-	Cl		57	62
8	C	C	H			58	58
9	C	C	H	NO ₂		59	72
10	C	C	OCH ₃	H		51	94 ^d
11	C	C	H	NO ₂		60	82 ^d
12	C	C	Br	H		61	67 ^d
13	C	N	Cl	-	OCH ₃	62	84
14	C	C	H	NO ₂	OCH ₃	63	62

^aRendements des produits isolés, ^bdégradation pendant la purification sur colonne, ^crendement de la réaction de transformation de l'ester en amide à partir de 52, ^dproduit synthétisé selon la voie b.

Tableau 14 : Produits finaux issus de la condensation de différents chlorures d'acides sur l'azote N-1 du noyau 4-azaindole

La transformation de la fonction ester en amide a été réalisée en présence de triméthylaluminium et d'éthylamine au reflux du dichlorométhane pendant une nuit.³⁵⁹ Malheureusement, le produit **47** est obtenu majoritairement (77 %) alors que le produit **55** est obtenu avec 18 %. Ce faible rendement serait dû à l'instabilité de la liaison amide formée en position *N*-1 du 4-azaindole dans ces conditions. Un autre essai effectué à température ambiante n'a pas permis l'avancement de la réaction. L'autre stratégie envisagée pour apporter un groupement donneur et accepteur de liaison hydrogène fut de partir du produit bromé **61** et de réaliser un couplage pallado-catalysé avec l'acétamide selon les conditions de Buchwald décrites plus haut (**Schéma 34**). Malheureusement cette réaction a conduit exclusivement à la formation du produit **49** ce qui confirme l'hypothèse de la fragilité de la liaison amide en position *N*-1 en présence d'un nucléophile.

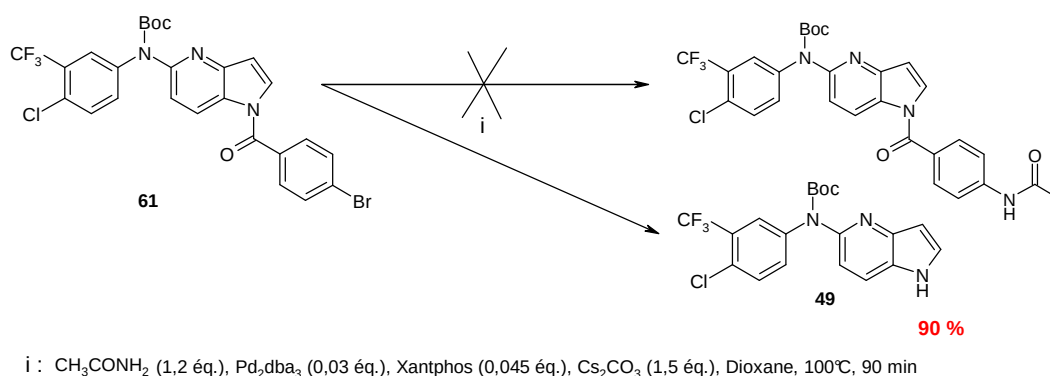


Schéma 34 : Essai de couplage du composé (61) avec l'acétamide

Par conséquent, une fois le chlorure d'acide branché sur le sommet *N*-1 du noyau 4-azaindole, il sera plus difficile d'ajouter une nouvelle fonctionnalisation du produit car la nouvelle liaison amide formée sur le sommet *N*-1 semble très fragile.

Afin d'apporter un groupement donneur de liaison hydrogène, les fonctions nitro des produits **59**, **60** et **63** ont été réduites en amine en présence d'hydrogène pour conduire respectivement aux produits **64**, **65** et **66** (**Schéma 35**).

³⁵⁹ Vivier M., Jarrousse A.S., Bouchon B., Galmier M.J., Auzeloux P., Sauzieres J., Madelmont J.C.: Preliminary studies of new proteasome inhibitors in the tumor targeting approach: synthesis and in vitro cytotoxicity. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 6731-40.

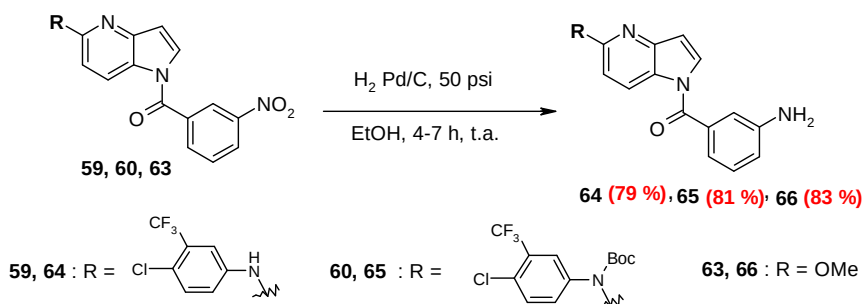


Schéma 35 : Synthèse des composés (64), (65) et (66)

En conclusion, nous avons mis au point une voie de synthèse multi étapes à partir du synthon de base *N*-benzènesulfonyl-5-méthoxy-4-azaindole 6 qui a permis de synthétiser une première série de 17 composés (produits 50-66), fonctionnalisés en position *N*-1 et *C*-5 du noyau 4-azaindole (Schéma 36). Ces produits sont fonctionnalisés en *N*-1 par un groupement hétéroaryle ou aryle cétone (X = Y = C, N) substitué en *para* (R1) ou *mé*ta (R2) par des groupements variables électrodonneurs (OCH₃, Cl) électroattracteurs (NO₂, Br) accepteurs et/ou donneurs de liaison hydrogène (CONH₂, CN, NH₂, pyrazine) dans le but d'interagir avec la poche ATP de Raf-1. Nous avons aussi fait varier la nature du substituant sur le sommet *C*-5 (R3). Pour mimer le cycle C du Sorafenib, la 4-chloro-3-trifluorométhyl-phénylamine est accrochée au sommet *C*-5 via une réaction de couplage pallado-catalysée de type Buchwald à partir de l'intermédiaire triflate en *C*-5. Afin de mesurer l'impact de l'apport de cette liaison NH en position *C*-5 sur l'activité inhibitrice, d'autres produits ont été synthétisés avec la liaison NH protégée par un groupement Boc ou possédant un groupement méthoxy en position *C*-5.

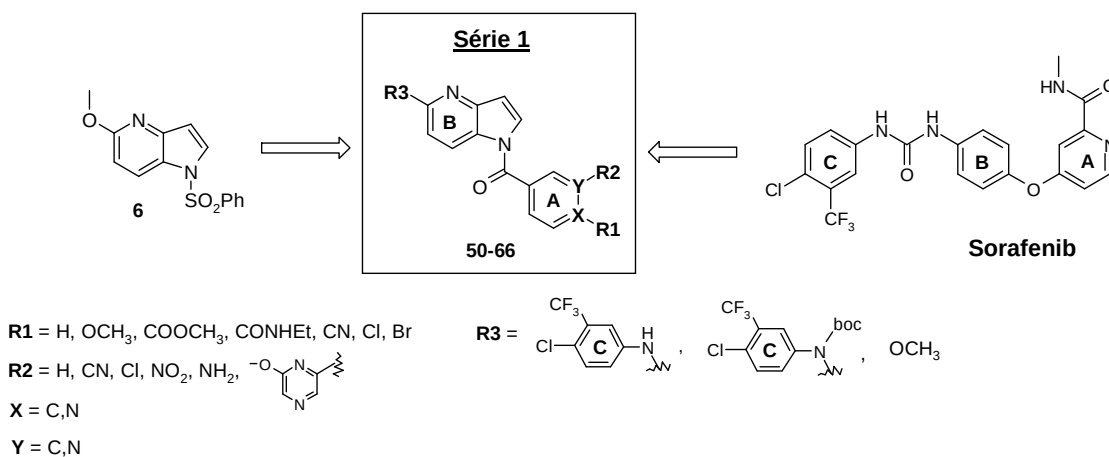


Schéma 36 : Première série de produits finaux synthétisés

I-6 Synthèse des inhibiteurs disubstitués en C-2 et C-5 du 4-azaindole

La synthèse des inhibiteurs disubstitués en C-2 et C-5 du 4-azaindole débute par la réaction de lithiation en position C-2 du synthon *N*-protégé **6** réalisée selon la méthode optimisée B décrite précédemment (**Schéma 37**). Afin d'introduire une fonction cétone en position C-2, deux méthodes sont possibles : une méthode directe et une méthode indirecte. La méthode directe consiste à faire réagir sur l'anion en C-2, un chlorure d'acide. Dans le cas de la méthode indirecte, un aldéhyde est condensé sur l'anion en C-2 conduisant à la formation d'une fonction alcool secondaire qui sera oxydée en cétone. Ainsi plusieurs aldéhydes et chlorures d'acides aromatiques et hétéroaromatiques fonctionnalisés en *para* par différents groupements R ont été utilisés (**Tableau 15**).

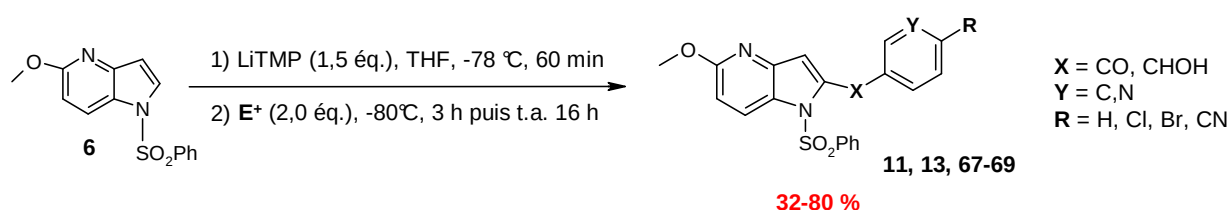


Schéma 37 : Condensation des différents chlorures d'acides et aldéhydes pour fonctionnaliser le C-2 du synthon (**6**)

Entrée	E ⁺	X	Y	R	Produit	Rendement* (%)
1		CO	C	H	11	51
2		CO	N	Cl	67	32
3		CHOH	C	Br	13	76
4		CHOH	C	CN	68	80
5		CHOH	N	Br	69	50

* Rendements des produits isolés

Tableau 15 : Condensation des différents chlorures d'acides et aldéhydes pour fonctionnaliser le C-2 du synthon (**6**)

Comme décrit plus haut, l'étude de la réactivité de l'anion en position C-2 issu du produit **6** a montré que les chlorures d'acides conduisent à de moins bons rendements que les aldéhydes (**Tableau 15**, comparaison des entrées 1, 2 avec 3-5).

Concernant les aldéhydes aromatiques, les rendements de condensation obtenus sont compris entre 70 et 80 %. Le moins bon rendement est obtenu pour le 6-bromo-pyridine-3-carbaldéhyde qui a conduit au produit **69** avec un rendement de 50 % (entrée 6). De même que pour les aldéhydes, le chlorure d'acide hétéroaromatique, chlorure de 6-chloro-nicotinoyl (entrée 2, 32 %) a donné un moins bon rendement que le chlorure de benzoyl (entrée 1, 51 %).

Etant donné que nous avons choisi la fonction cétone pour lier un cycle aromatique à l'azaindole, les aldéhydes sont les électrophiles de choix. La fonction alcool secondaire générée lors de la condensation des aldéhydes est ensuite oxydée en cétone en présence de dioxyde de manganèse pour conduire aux produits **70-72** avec de très bons rendements, compris entre 70 et 100 % (**Tableau 16**).³⁶⁰

Entrée	X	R	Produit de départ	Produit	Rendement* (%)
1	C	Br	13	70	100
2	C	CN	68	71	70
3	N	Br	69	72	90

* Rendements des produits isolés

Tableau 16 : Oxydation de la fonction alcool secondaire générée lors de la condensation des aldéhydes

Par la suite, nous avons montré que la méthode de déprotection du méthoxy par l'iodure de triméthylsilyle utilisé pour le synthon **6**³⁴⁴ est aussi efficace pour les dérivés fonctionnalisés en C-2. Par exemple, les produits **70** et **72** ont conduit respectivement aux produits **73** et **74** avec d'excellents rendements de 82 et 90 % (**Tableau 17**).

³⁶⁰ Marco J.L.: Improved preparation of N-propargyl-2-(5-benzyloxyindolyl)methylamine. *J. Heterocycl. Chem.*, **1998**, 35, 475-6.

Entrée	X	R	Produit de départ	Produit	Rendement* (%)
1	C	Br	70	73	82
2	N	Br	72	74	90

*Rendements des produits isolés

Tableau 17 : Déprotection du groupement 5-méthoxy des produits fonctionnalisés en C-2

A partir du produit **70**, nous avons élaboré une stratégie de synthèse permettant de remplacer l'atome de brome par un groupement donneur/ accepteur de liaison hydrogène tel qu'un groupement amide et de remplacer le groupement 5-méthoxy par un hétérocycle (**Schéma 38**). Le produit **70** est d'abord engagé dans une réaction de couplage pallado-catalysée de Buchwald avec l'acétamide selon la méthodologie mise au point précédemment.³⁵⁴ Le produit **75** est obtenu avec un très bon rendement de 91 %. L'éther méthylique du sommet C-5 est ensuite déprotégé en présence d'iodure de triméthylsilane pour conduire au produit **76** avec un bon rendement de 86 %.

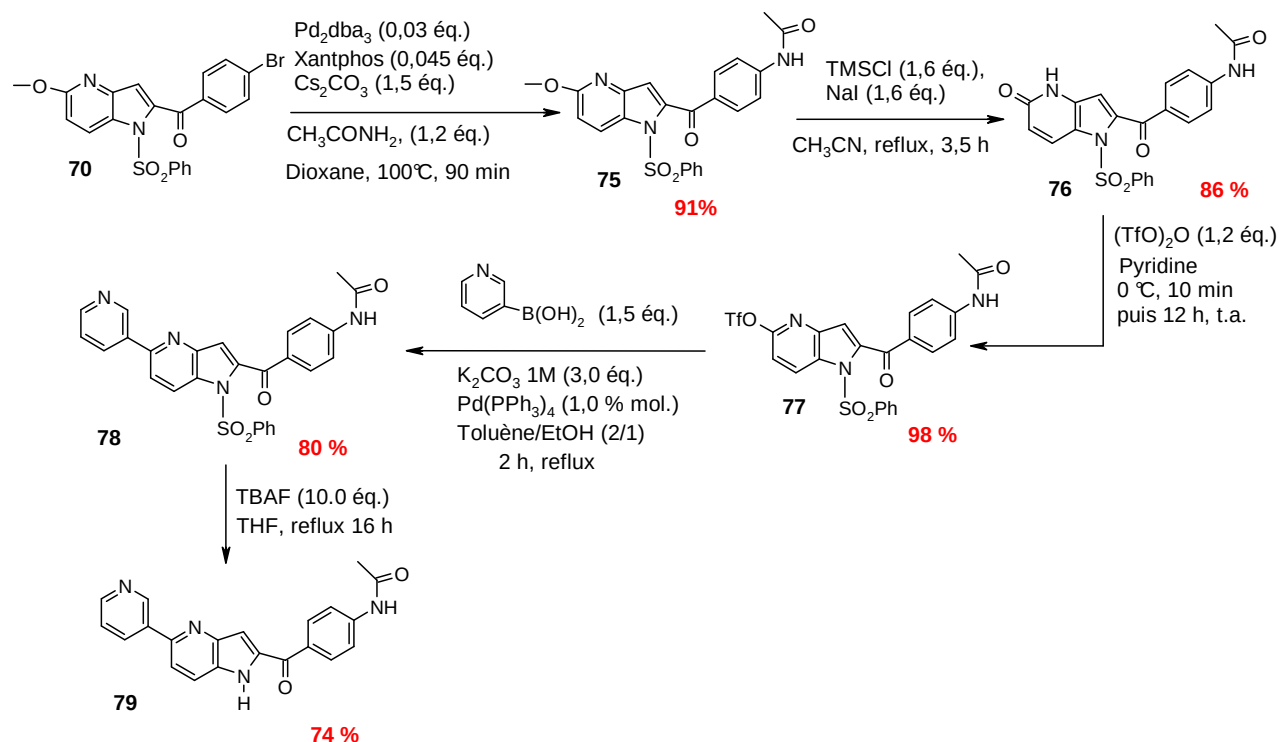


Schéma 38 : Voie de synthèse utilisée pour accéder au produit final (79)

L'étape suivante est la formation du dérivé triflate **77** à partir de **76**. Un premier essai dans les conditions précédemment utilisées pour synthétiser l'intermédiaire **23** (anhydride triflique (1,1 éq.), DIPEA (1,3 éq.), CH₂Cl₂, 25 min à 0 °C), n'a pas permis d'aboutir au produit désiré. Nous observons uniquement de la dégradation. Par conséquent, nous avons cherché d'autres conditions.³⁵⁰

En utilisant la pyridine à la fois comme base et solvant, le triflate **77** est obtenu avec un excellent rendement de 98 %. Ce produit est ensuite engagé dans une réaction de couplage de Suzuki avec l'acide 3-pyridine-boronique selon les conditions optimisées préalablement. Le composé **78** est obtenu avec un bon rendement de 80 %. La dernière étape est la déprotection du groupement phénylsulfonyl en présence de TBAF pour conduire au produit final **79** avec un rendement de 74 % amoindri par les extractions et la purification du produit.

Afin de réaliser également des tests biologiques sur les intermédiaires de synthèse bicycliques déprotégés, les produits *N*-protégés par le groupement phényle sulphonyl (**11**, **68**, **71**, **72**, **75**) ont été déprotégés en présence de TBAF pour conduire respectivement aux produits (**80-84**). Nous avons fait de même pour quelques produits en série 2-pyridone (**74**, **76**, **Tableau 18**). Les rendements de déprotection sont compris entre 69 et 95 %.

Cependant un résultat étonnant a été obtenu lors de la déprotection de l'alcool aromatique secondaire **68** en présence de TBAF. Le produit **82** issu de la déprotection de l'azote en *N*-1 et l'oxydation de la fonction alcool en cétone est obtenu avec un rendement de 92 %. Des travaux reportés par Chi et ses collaborateurs, décrivent l'oxydation du 4-nitrobenzaldéhyde en acide 4-nitrobenzoïque en présence de TBAF avec un rendement de 99 %.³⁶¹ Le mécanisme réactionnel de cette oxydation n'est pas encore connu.

Afin d'obtenir le produit souhaité **81**, nous avons réalisé la coupure du benzènesulfonyl en milieu basique en présence d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. Après 3 heures de reflux dans le méthanol, le produit **81** est obtenu avec 95 % de rendement.

La synthèse du composé **84** a été effectuée par une réaction de lithiation en *C*-2 suivi de l'addition de l'électrophile puis de la transformation du groupement méthoxy en groupement triflate permettant de combiner les réactivités en *C*-2 et *C*-5.

³⁶¹ Chung K-H., Moon B.C., Choong H.L., Lim C.H., Kim J.P., Lee J.H., Chi D.Y.: Oxidation of Aromatic Aldehydes with Tetrabutylammonium Fluoride: Competition with the Cannizzaro Reaction. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2006**, 27, 1203-05.

Entrée	X	Y	R1	R2	Produit de départ	Produit	Rendement ^a (%)
1	CO	C	OCH ₃	H	11	80	92
2	CHOH	C	OCH ₃	CN	68	81	95 ^b
3	CO	C	OCH ₃	CN	71	82	92
4	CO	N	OCH ₃	Br	72	83	72
5	CO	C	OCH ₃	NHCOCH ₃	75	84	84
6	CO	N	-	Br	72	85	69
7	CO	C	-	NHCOCH ₃	74	86	70

^aRendements des produits isolés ; ^bConditions utilisées : NaOH aqueux 2 M (1,6 éq.), MeOH, reflux 3 h

Tableau 18 : Synthèse des produits 80-86

Afin de tester la régiosélectivité de notre réaction de lithiation en C-2, nous avons réalisé la lithiation à partir du dérivé **27** fonctionnalisé en position C-5 par un cycle pyridine (**Schéma 39**). Le produit **87** est obtenu avec un bon rendement de 77 %, ce qui montre que la fonctionnalisation du cycle peut aussi se faire d'abord en C-5 puis en C-2. Cependant cette stratégie ne pourra être utilisée que dans certains cas où le substituant en C-5 de l'azaindole ne possède pas d'atome d'hydrogène labile pouvant interférer avec la réaction de lithiation. Dans ce cas, il faudra d'abord fonctionnaliser le 4-azaindole en C-2 puis en C-5.

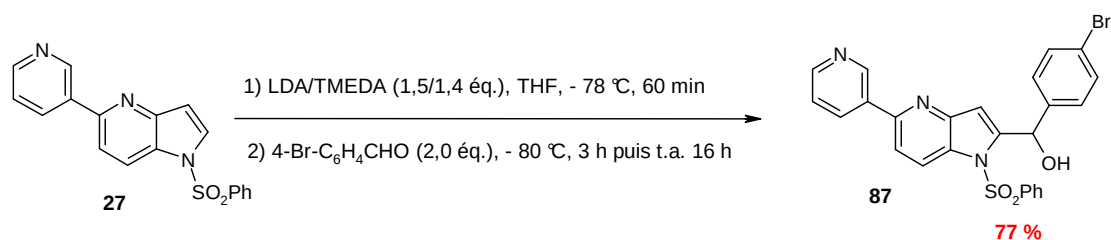


Schéma 39 : Régiosélectivité de la réaction de lithiation en C-2 à partir du dérivé (27) fonctionnalisé en C-5

En conclusion, une deuxième voie de synthèse multi étapes à partir du synthon de base *N*-benzènesulfonyl-5-méthoxy-4-azaindole **6** a permis de synthétiser la seconde série de 22 composés (produits **11,13, 67-86**) en appliquant la méthodologie mise au point sur les réactions de lithiation en *C*-2 (Schéma 40). Les produits sont substitués en position *C*-2 et *C*-5 et/ou en *N*-1 du noyau 4-azaindole. La première étape de synthèse est la réaction de lithiation en *C*-2 suivie de la condensation de différents aldéhydes aromatiques pour accrocher le cycle A. Les aldéhydes utilisés sont substitués en *para* (R2) par des groupements variables électroattracteur (Br), accepteur et/ou donneur de liaison hydrogène (NHCOCH₃, CN) dans le but d'interagir avec la poche ATP de Raf-1. La condensation des aldéhydes aromatiques conduit à la formation d'une fonction alcool secondaire en *C*-2 (X = CHOH). Pour faire varier la nature de l'espaceur entre le cycle B et le cycle A (X), cette fonction alcool a été oxydée en cétone (X = CO). Nous avons aussi fait varier la nature du substituant sur le sommet *C*-5 (R3) : les produits possèdent soit le groupement méthoxy, soit une fonction amide cyclique donneur/accepteur de liaison hydrogène issue de la déprotection du méthoxy, soit un cycle aromatique. Pour accrocher le cycle C, la méthodologie mise au point sur les *N*-arylations a été appliquée pour introduire le cycle 3-pyridinyle. Enfin, pour évaluer l'influence du NH indolique sur l'activité inhibitrice, les produits *N*-protégés par le groupement SO₂Ph (R1) ont été déprotégés.

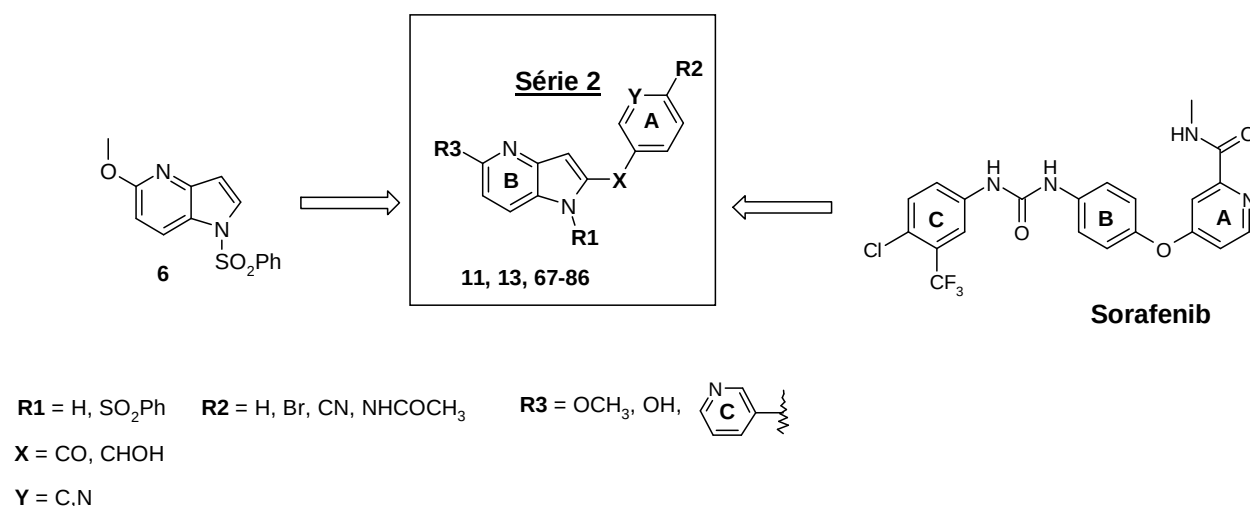


Schéma 40 : Deuxième série de produits finaux synthétisés

I-7 Vers la fonctionnalisation du C-3 du 4-azaindole par une réaction d'échange halogène-métal

I-7.1 Synthèse du synthon halogéné en position C-3

A partir du dérivé halogéné en position C-3 du 4-azaindole, la fonctionnalisation du C-3 peut se faire selon 2 stratégies : un couplage pallado-catalysé d'une part²⁵⁹ ou une réaction d'échange halogène-métal d'autre part.²⁷⁵ Nous avons choisi d'étudier la deuxième stratégie dans un premier temps. Les premiers travaux réalisés par l'équipe de Grob décrivent des réactions d'échange halogène-métal effectuées à partir des dérivés indole et azaindoles iodés ou bromés en position C-3 dans le but d'introduire un groupement tributyle étain.²⁷⁵ Concernant le 4-azaindole (**Schéma 41**), les auteurs sont partis du dérivé bromé en position C-3 et *N*-protégé par un groupement Boc. La réaction d'échange brome-lithium est réalisée à - 78 °C en présence de *n*-BuLi pendant 15 minutes. L'électrophile, le chlorure de tributylstannane, est ensuite additionné à - 78 °C puis la température du mélange est remontée jusqu'à température ambiante. Malheureusement, le produit substitué en C-3 est obtenu avec un faible rendement de 18 %. En vue d'améliorer ce rendement, nous avons choisi d'étudier la réactivité du dérivé iodé en position C-3 et *N*-protégé par un groupement phénylsulfonyl **89**.

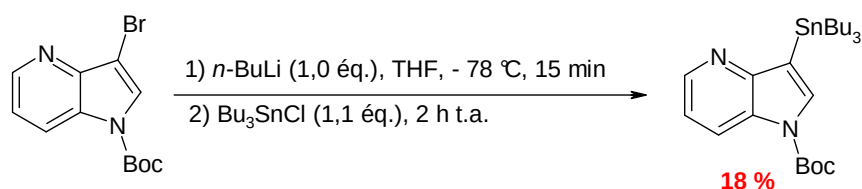


Schéma 41 : Première réaction d'échange halogène-métal décrite à partir du 4-azaindole

Le dérivé *N*-benzènesulfonyl-3-iodo-5-méthoxy-4-azaindole **89** a été synthétisé à partir du 5-méthoxy-4-azaindole **5** (**Schéma 42**). L'iodation du sommet C-3 peut être obtenue selon deux méthodes. La première méthode, décrite par Bergsträßer *et al.* sur le 5-méthoxy-indole,³⁶² a été appliquée au 5-méthoxy-4-azaindole **5**. Ce dernier est mis en présence d'hydroxyde de potassium (KOH) dans du DMF puis est effectuée l'addition de diiode (I₂), ce qui conduit à la formation du produit iodé **88** avec 78 % de rendement. L'autre méthode, décrite par Borer *et al.*, utilise la *N*-iodosuccinimide dans le THF.²⁵⁹ Le 5-méthoxy-4-azaindole **5** est mis en présence de 1,1 équ. de *N*-iodosuccinimide, ce qui conduit au produit

³⁶² Witulski B., Buschmann N., Bergsträßer U.: Hydroboration and Suzuki-Miyaura coupling reactions with the electronically modulated variant of an ynamine : the synthesis of (E)- β -Arylenamides. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 8473-80.

mono-iodé **88** avec un rendement de 77 %. En présence d'un excès de *N*-iodosuccinimide (3,5 éq.), c'est le produit di-iodé **90** qui est obtenu majoritairement avec un rendement de 69 %. Ce produit pourra éventuellement servir de synthon pour une autre étude de réactivité visant à fonctionnaliser les sommets C-2 et C-3 sélectivement. Le produit mono-iodé **88** est ensuite protégé par le groupement phénylesulfonyl selon les conditions utilisées précédemment pour la synthèse de **6**. Le produit protégé **89** est obtenu avec un très bon rendement de 91 %. Selon les conditions de protection décrites pour le 5-azaindole par les équipes Mérour/ Coudert³⁶³ qui utilisent une autre base, l'hydruide de sodium (NaH), sans catalyseur de transfert de phase dans le THF, le produit **89** est obtenu avec un moins bon rendement (50 %).

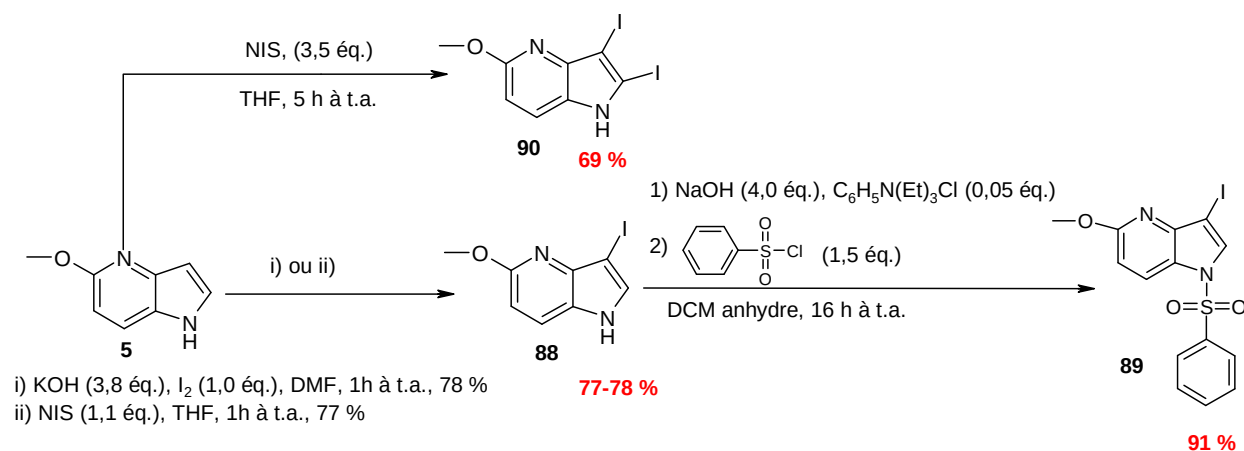


Schéma 42 : Premiers essais de fonctionnalisation du sommet C-3 du 5-méthoxy-4-azaindole (5**)**

I-7.2 Réaction d'échange halogène-métal à partir du composé **89**

Toujours dans l'optique de synthétiser des inhibiteurs de Raf-1, le produit **89** a été engagé dans une réaction d'échange iode-lithium en présence du 4-bromo-benzaldéhyde dans le but de greffer en position C-3, un cycle aromatique relié au cycle central 4-azaindole par une fonction alcool qui pourra ensuite être oxydée en cétone (**Schéma 43**).

Le **Tableau 19** récapitule les conditions opératoires utilisées pour la réaction d'échange iode-lithium à partir du produit **89**, c'est-à-dire la température et la durée de la réaction d'échange. Dans un premier temps, nous avons appliqué à **89** les conditions décrites précédemment pour la réaction d'échange iode-lithium à partir du *N*-benzènesulfonyl-3-iodo-5-azaindole (**Tableau 19**, entrée 1). Après 30 minutes de réaction à -78 °C en présence de 1,2

³⁶³ Lefoix M., Daillant J.P., Routier S., Mérour J-Y., Gillaizeau I., Coudert G.: Versatile and Convenient Methods for the Synthesis of C-2 and C-3 Functionalised 5-Azaindoles. *Synthesis*, **2005**, 20, 3581-8.

éq. de *n*-BuLi, l'électrophile 4-bromo-benzaldéhyde (2,0 éq.) est additionné. Après 3 h d'agitation à -78 °C, la température du mélange est remontée à l'ambiante pendant la nuit.

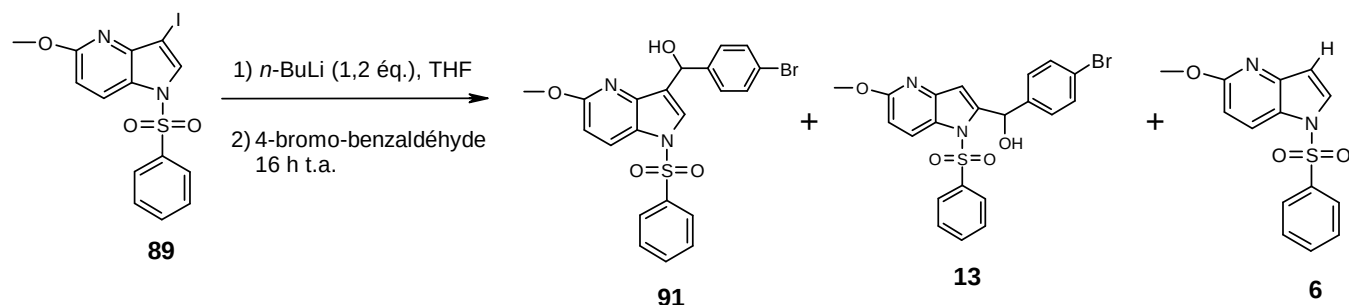


Schéma 43 : Réaction d'échange halogène-méthyl à partir du dérivé N-benzènesulfonyl-3-iodo-5-méthoxy-4-azaindole (89)

Dans ces conditions, le produit **91** substitué en C-3, est obtenu avec un rendement moyen de 35 %. En effet, deux autres produits sont obtenus avec des rendements non négligeables : le produit **13** issu de l'isomérisation du lithien de la position C-3 à C-2 et le produit **6** issu de l'hydrolyse du lithien en C-3. Le dérivé lithié en position C-2 se forme car il est stabilisé par le groupement protecteur phénylesulfonyl. Pour réduire la proportion du produit **13**, nous avons réduit le temps de la réaction d'échange de 30 minutes à 5 minutes (entrée 2). Après 5 minutes à -78 °C, l'échange iode-lithium est effectué à 100 % et nous avons pu réduire de 25 % l'isomérisation du dérivé lithié en C-2. Le produit **91** est obtenu avec un meilleur rendement de 51 %. Afin d'améliorer encore ce rendement, nous avons étudié l'effet de la diminution de la température sur l'isomérisation du lithien (entrée 3). A -100 °C pendant 5 minutes, la réaction d'échange n'est pas totale car nous avons isolé 21 % de produit de départ **89**. De plus, il se forme toujours le dérivé lithié en C-2 puisqu'on obtient 14 % de **13**.

Entrée	Température (°C)	Temps (minutes)	Rendement* (%)			
			(91)	(13)	(6)	(89)
1	- 78	30	35	38	26	0
2	- 78	5	51	13	14	0
3	- 100	5	31	14	17	21

*Rendement des produits isolés

Tableau 19 : Conditions opératoires pour la réaction d'échange iode-lithium à partir de (89)

L'isomérisation du lithien de la position C-3 à C-2 observée dans le cas du 4-azaindole, n'a pas été obtenue dans le cas du 5-azaindole, mais ce phénomène a déjà été décrit pour l'indole.³⁶⁴ Par conséquent, des études complémentaires pour l'optimisation de la réaction d'échange halogène-métal sont nécessaires avant d'étudier la réactivité du dérivé lithié en position C-3 vis-à-vis d'un plus grand nombre d'électrophiles. Parmi les optimisations à envisager, on peut citer : le changement de la source de lithium par exemple en testant avec le *sec*-BuLi ou le *tert*-BuLi, l'addition d'agents complexant du lithium tels que les amines tertiaires TMEDA ou PMDTA.³⁶⁵ Il est aussi envisagé de remplacer le groupement protecteur en N-1 afin de défavoriser la stabilisation du dérivé lithié en C-2 en utilisant par exemple des groupements silylés encombrés tels que le *tert*-butyldiméthylsilyle ou le triisopropylsilyle.³⁶⁶

I-8 Docking des inhibiteurs synthétisés dans le site actif de Raf

Afin de nous guider dans nos synthèses d'inhibiteurs de Raf, analogues du Sorafenib, une collaboration a été établie avec Stéphane Bourg (Ingénieur d'étude ICOA/CBM, Fédération de Recherche, FR CNRS 2708) pour concevoir un modèle de la structure tridimensionnelle de Raf-1.

Il n'est pas connu à ce jour de structure tridimensionnelle de Raf-1. Grâce au développement des outils informatiques il est toutefois possible de travailler sur des modèles structuraux construits à partir d'une protéine présentant une homologie de séquence suffisante avec la protéine d'intérêt. Nous avons montré dans la **Figure 32** (chapitre Introduction, paragraphe V-4), la forte identité de séquence entre B-Raf et Raf-1 (81 %). Cette identité de séquence est de 100 % si on considère les résidus du site actif (situés à moins de 5 Å du Sorafenib) ce qui explique pourquoi les inhibiteurs de B-Raf inhibent aussi Raf-1.

Notre objectif étant de concevoir des inhibiteurs analogues du Sorafenib, ciblant la forme inactive de Raf-1 pour gagner en sélectivité, les études de docking ont été réalisées dans la structure 1UWH correspondant au complexe B-Raf/ Sorafenib *via* le logiciel Flexx.³⁶⁷

³⁶⁴ Saulnier M.G., Gribble G.W.: Generation and Reactions of 3-Lithio-1-(phenylsulfonyl)indole. *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 757-61.

³⁶⁵ Fukuda T., Mine Y., Iwaop M.: Selective C-3 and C-2 lithiation of 1-(2,2-diethylbutanoyl)indole. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 975-9. Preparation and Reactions of 1-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3-lithioindole.

³⁶⁶ Amat M., Hadida S., Sathyanarayana S., Bosch J.: Regioselective Synthesis of 3-Substituted Indoles. *J. Org. Chem.*, **1994**, 59,10-1.

³⁶⁷ Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G.: A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.*, **1996**, 261, 470-89.

Le **Tableau 20** représente les meilleures fonctions de score générées par Flexx pour chaque composé. Plus le score est négatif, meilleure est l'interaction dans le site actif de Raf. En guise de contrôle, les ligands de références Sorafenib, PLX 3203, PLX 4720, SB-590885 et SM51 ont aussi été dockés dans la structure 1UWH.

De ce tableau, nous pouvons dire que les meilleures fonctions de scores comprises entre -34.651 et -28.026 ont été obtenues pour des produits fonctionnalisés en position C-5 et N-1 du 4-azaindole (**50**, **52-58**). Le premier produit disubstitué en C-5 et C-2 du noyau 4-azaindole **84** n'apparaît qu'à un score de -27.042. Par conséquent, il semblerait que les composés disubstitués en C-5 et N-1 du 4-azaindole sont de meilleurs analogues du Sorafenib. Les moins bons scores obtenus pour les ligands références PLX 4720, SB-590885 et SM51 peuvent s'expliquer par le fait qu'ils possèdent un mode de fixation différent par rapport au Sorafenib.

Scores	Produit
-38.957	Sorafenib
-34.651	56
-34.513	55
-31.600	PLX 3203
-31.407	58
-31.123	52
-29.660	50
-28.749	57
-28.417	53
-28.026	54
-27.042	84

Scores	Produit
-25.465	60
-23.880	75
-23.031	SB-590885
-22.335	PLX 4720
-22.099	46
-21.823	76
-21.224	47
-20.482	67
-20.357	65
-20.319	72
-19.265	SM51

Tableau 20 : Fonctions de scoring obtenues pour le docking des molécules synthétisées dans la structure de B-Raf 1UWH avec le logiciel Flexx

La **Figure 54A** illustre la superposition du Sorafenib tel qu'il est dans le site actif de B-Raf avec le composé de la série substituée en position C-5 et N-1 du 4-azaindole ayant donné le meilleur score (**56**). La **Figure 54B** représente la superposition du Sorafenib avec le composé de la série substituée en position C-5 et C-2 du 4-azaindole ayant donné le meilleur score (**84**).

La superposition du Sorafenib avec le produit **56** montre que le 4-azaindole se fixe dans la poche ATP. Le groupement cyano de **56** est bien orienté puisqu'il se superpose bien avec le carbonyle de la fonction urée du Sorafenib. Néanmoins, l'image montre que le groupe trifluorophényle est mal orienté par rapport au Sorafenib. Le produit **84** se superpose très mal avec le Sorafenib ce qui explique les moins bonnes valeurs de score obtenues pour les produits disubstitués en C-5 et C-2 du 4-azaindole. Le 4-azaindole ne semble plus se fixer dans la poche ATP.

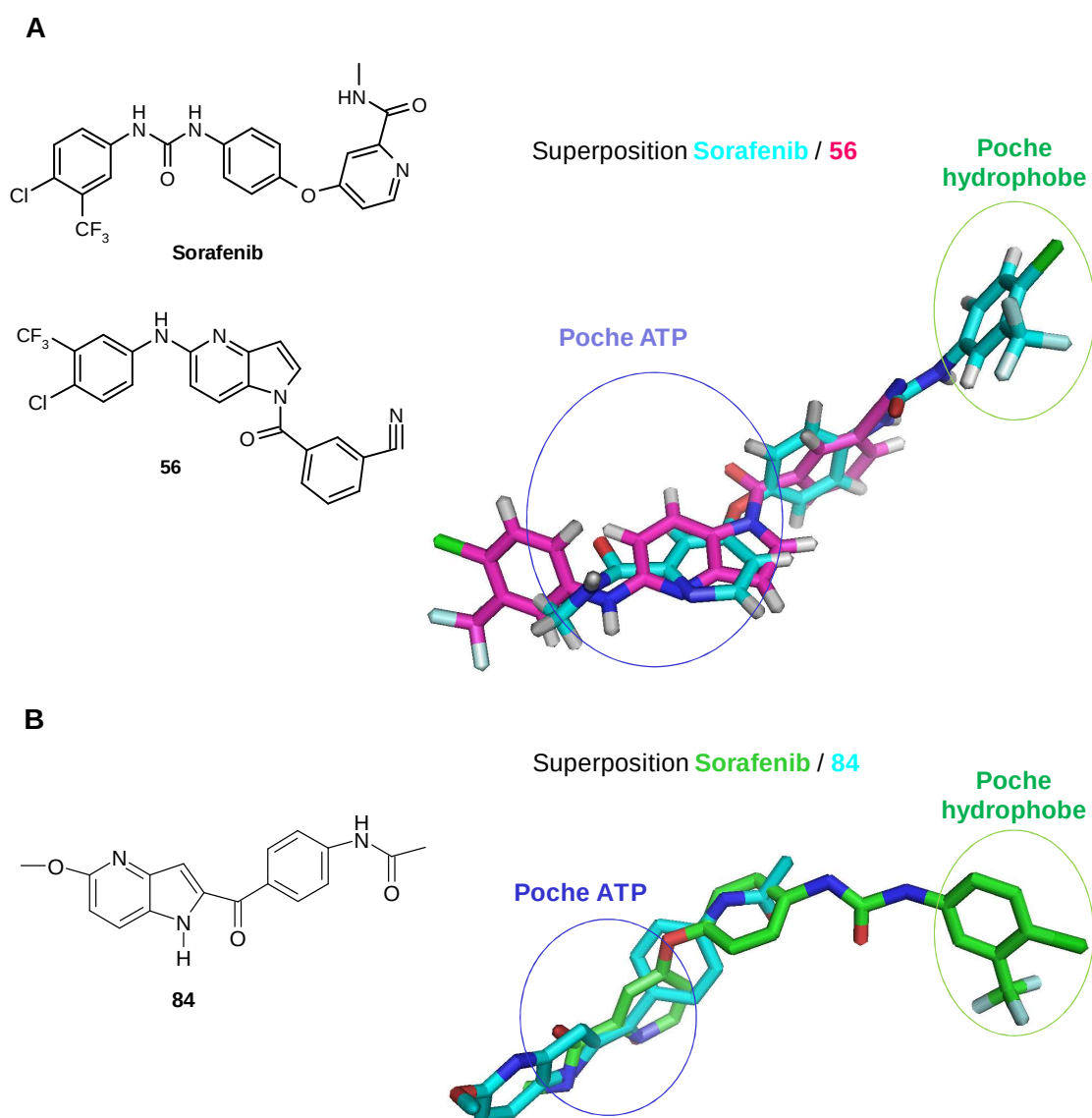


Figure 54 : Images de superposition issues du docking dans la structure 1UWH. (A) Superposition du Sorafenib et du produit synthétisé 56 (B) Superposition du Sorafenib et du produit synthétisé 84

En conclusion, afin de répondre à notre objectif de concevoir des inhibiteurs analogues du Sorafenib, les molécules synthétisées ont été dockées dans la structure homologue 1UWH correspondant au complexe B-Raf/ Sorafenib. Ces études de modélisation ont montré que le noyau 4-azaindole pouvait être un bon ligand de la poche ATP. De plus, ces études de docking permettent maintenant d'orienter les dérivations du 4-azaindole afin de fonctionnaliser ce noyau pour atteindre la poche hydrophobe du site actif.

En conclusion pour ce chapitre, nous avons développé avec succès deux nouvelles méthodologies pour fonctionnaliser le sommet C-2 d'une part et le sommet C-5 du noyau 4-azaindole d'autre part (Figure 55). La première étude porte sur la fonctionnalisation du sommet C-2 par des réactions de lithiation suivies de la condensation de différents électrophiles. La deuxième étude a consisté à mettre au point les conditions de déprotection du groupement 5-méthoxy et la formation du dérivé triflate sur le sommet C-5 pour l'engager dans des réactions de couplages pallado-catalysées de type Suzuki pour la C-arylation et Buchwald pour la N-arylation du sommet C-5. Sauf quelques exceptions, ces deux études de réactivité se sont avérées efficaces pour introduire en C-2 ou en C-5 une grande variété de substituants avec des rendements modérés à élevés. Ces deux études ont été appliquées à la synthèse de molécules potentiellement inhibitrices de Raf-1. La première série concerne les composés fonctionnalisés en position N-1 et C-5 du noyau 4-azaindole. La deuxième série est composée des produits disubstitués en position C-2 et C-5 du noyau 4-azaindole.

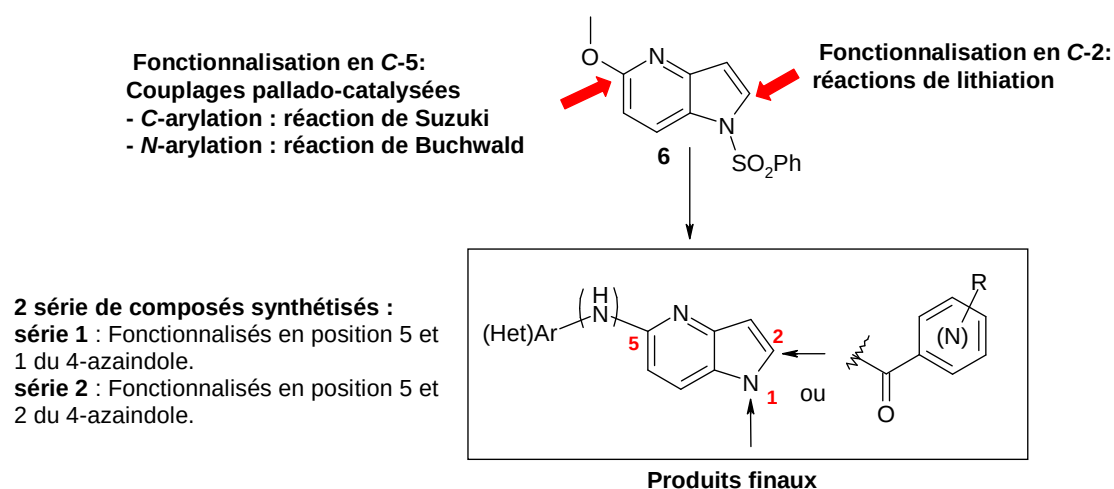


Figure 55 : Application de deux études méthodologiques réalisées sur le 4-azaindole à la synthèse d'inhibiteurs potentiels de Raf-1

II/ Evaluation biologique des inhibiteurs synthétisés

Afin de tester les molécules potentiellement inhibitrices synthétisées au cours de la thèse, nous avons effectué la mise au point des tests d'activité kinases sur Raf-1 et sur la triple cascade Raf/MEK/ERK. Le test sur la cascade complète présente l'avantage de pouvoir identifier des inhibiteurs de Raf mais aussi de MEK ou ERK. En collaboration avec Laurent Meijer, les produits ont été testés *in vitro* sur trois autres kinases DYRK1A, CDK5 et GSK3.

En collaboration avec Christiane Guillouzo, le potentiel cytotoxique de nos composés a été évalué sur six lignées de cellules cancéreuses humaines représentatives de différents organes : sein (MDA-MB 231), foie (Huh7), poumon (NCI), prostate (PC3), côlon (Caco et HCT 116). Pour contrôler leur spécificité vis-à-vis des cellules saines, leur potentiel cytotoxique a aussi été testé sur des cellules humaines de fibroblastes.

II-1 Mise au point des tests enzymatiques *in vitro* sur la voie Raf/MEK/ERK

Notre objectif est de pouvoir caractériser rapidement des nouveaux inhibiteurs de Raf-1 d'une part, et de la voie Raf/MEK/ERK d'autre part. En considérant que les inhibiteurs peuvent avoir plusieurs modes d'action : 1) les inhibiteurs peuvent être spécifiques d'une seule kinase de la cascade ; 2) ils peuvent agir sur plusieurs kinases de la cascade ; 3) ils peuvent être de type allostériques ou ATP compétitifs ; 4) ils peuvent inhiber soit une forme active (DFG « in ») ou inactive (DFG « out ») de la kinase cible, nous avons décidé de développer des tests pour mesurer l'effet des inhibiteurs directement sur Raf-1, MEK et ERK, sur la double cascade MEK/ERK et sur la triple cascade Raf/MEK/ERK (**Figure 56**). La mise au point du test sur la cascade complète permet d'identifier des inhibiteurs de Raf mais aussi de MEK ou ERK.

Pour chaque test d'activité, nous avons testé 3 méthodes : une méthode classique utilisant l'ATP radioactif marqué au ^{32}P appelée PFBA (phosphocellulose filter binding assay), et 2 méthodes qui utilisent la technologie TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) : Lance UltraTM (Perkin Elmer) et LanthascreenTM (Invitrogen). Tous ces tests optimisés sont maintenant à la disposition d'autres équipes de chimistes du Cancéropôle Grand Ouest.

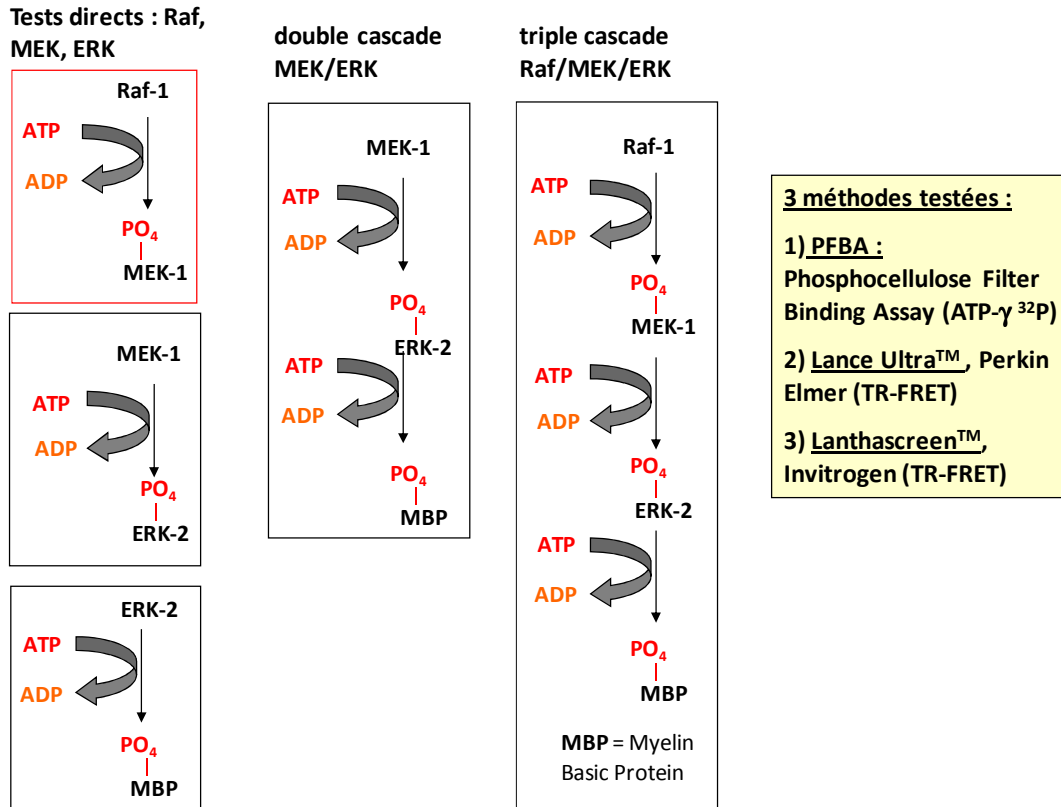


Figure 56 : Ensemble des tests mis au point pour l'étude de la voie Raf/MEK/ERK

Lance Ultra™ et Lanthascreen™ utilisent des substrats différents du substrat physiologique et un mode de détection indirecte dû à l'utilisation d'un anticorps. Les substrats peuvent être des peptides ou des protéines, ils sont marqués par un fluorophore plus ou moins volumineux selon le fournisseur. Les différents substrats et anticorps utilisés pour nos mises au point sont détaillés dans le **Tableau 21**.

Entrée		Lanthascreen™	Lance Ultra™
1	Test direct sur Raf-1		
	Substrat	Fluorescéine_MEK-1	Ulight_Peptide Histone H3
	Anticorps	Terbium-anti-phospho-MEK-1	Europium-anti-phospho-Histone H3
2	Test direct sur MEK-1		
	Substrat	Non disponible	Ulight_Peptide p70S6K
	Anticorps	Non disponible	Europium-anti-phospho-p70S6K
3	Test direct sur ERK-2, double cascade MEK/ERK, triple cascade Raf/MEK/ERK		
	Substrat	GFP-ATF2	Ulight_Peptide MBP
	Anticorps	Terbium-anti-phospho-ATF2	Europium-anti-phospho-MBP

Tableau 21 : Différents substrats et anticorps utilisés pour la mise au point des 3 tests directs sur Raf-1, MEK et ERK, du test sur la double cascade MEK/ERK et du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec les 2 méthodes TR-FRET : Lance Ultra™ et Lanthascreen™

Au total, cinq différents substrats ont été évalués. Concernant Raf-1 et ERK-2, nous avons testé les substrats développés par Perkin Elmer et Invitrogen (**Tableau 21**, entrées 1 et 3) ; concernant MEK-1, seul le substrat du fournisseur Perkin Elmer a pu être testé, Invitrogen n'ayant pas encore commercialisé le sien (**Tableau 21**, entrée 2). Les deux substrats d'ERK (GFP-ATF2 et Ulight_Peptide MBP) sont utilisés pour les tests sur la double cascade MEK/ERK et sur la triple cascade Raf/MEK/ERK.

II-1.1 Optimisation et validation des tests directs sur Raf-1, MEK et ERK

Les trois tests directs sur Raf-1, MEK et ERK ont été optimisés avec les trois méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM en suivant la même approche composée de quatre étapes successives. La première étape est la double titration du substrat et de l'enzyme sous forme active à une concentration non limitante en ATP c'est-à-dire supérieure ou égale à 25 fois le Km apparent pour l'ATP. La concentration optimale en enzyme est choisie de façon à obtenir le meilleur rapport signal sur bruit avec la quantité minimale d'enzyme. La concentration optimale du substrat est le Km apparent pour le substrat c'est-à-dire la concentration de substrat correspondant à 50 % de l'activité maximale de l'enzyme. La deuxième étape est la titration de l'ATP pour déterminer le Km apparent de l'enzyme pour l'ATP. La troisième étape est le suivi du temps de la réaction kinase correspondant à la mesure de la phosphorylation du substrat dans le but de choisir un temps compris dans la phase linéaire de la réaction où la vitesse est constante. Enfin, la quatrième étape est la validation du test en mesurant les effets inhibiteurs de composés dont les valeurs d'IC₅₀ sont reportées dans la littérature et en les comparant avec celles obtenues dans nos conditions.

Les paramètres enzymatiques tels que les Kms apparents pour le substrat ou l'ATP ont été déterminés en appliquant l'équation hyperbolique de Michaelis-Menten : $V_i = V_{max} * [S] / (K_m + [S])$. Afin d'avoir des tests très sensibles, compatibles avec la détection d'inhibiteurs ATP compétitifs ou allostériques, tous les tests d'inhibition ont été réalisés aux concentrations optimisées pour l'enzyme, le substrat (Km apparent) et l'ATP (Km apparent), avec un temps de réaction dans la phase linéaire.

II-1.1.1 Résultats de l'optimisation et de la validation du test direct sur Raf-1

Pour le test direct sur Raf-1, le substrat phosphorylé utilise la protéine MEK-1, le peptide « Ulight_Peptide Histone H3 » et la protéine Fluorescéine_MEK-1 selon les méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM respectivement.

Test direct sur Raf-1 avec la méthode PFBA :

La **Figure 57** représente les courbes obtenues pour l'optimisation du test direct sur Raf-1 avec la méthode PFBA. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont représentés sur la figure. Les détails expérimentaux concernant le déroulement des différents essais sont indiqués dans la légende. La première étape a été l'optimisation des quantités de l'enzyme Raf-1 active et du substrat MEK-1 inactive (**Figure 57a**). Pour y parvenir, nous avons fait varier les concentrations en Raf-1 active et MEK-1 inactive à une concentration d'ATP non limitante (2 μ M). La courbe rouge, correspondant à Raf-1 = 0 représente le bruit de fond, elle montre qu'avec la méthode PFBA le bruit de fond est très faible. La concentration de 18,7 nM fut choisie comme concentration optimale de Raf-1 active car elle permet d'obtenir un excellent rapport signal sur bruit avec un très bon coefficient de détermination R^2 de 0,99. A cette concentration de Raf-1, le K_m apparent pour le substrat MEK-1 est égal à 0,25 μ M. Nous avons ainsi sélectionné ces deux concentrations pour réaliser la titration de l'ATP et une valeur de K_m apparent égale à 0,25 μ M fut obtenue pour l'ATP (**Figure 57b**). La dernière étape d'optimisation, est le choix du temps de réaction. Etant donné que la réaction kinase est linéaire jusqu'à 30 minutes à 30 °C (**Figure 57c**), nous avons choisi le temps 20 min afin d'avoir une bonne sensibilité.

Les tests d'inhibition de Raf-1 ont ensuite été réalisés aux valeurs de K_m s pour l'ATP et MEK-1 pendant 20 minutes.

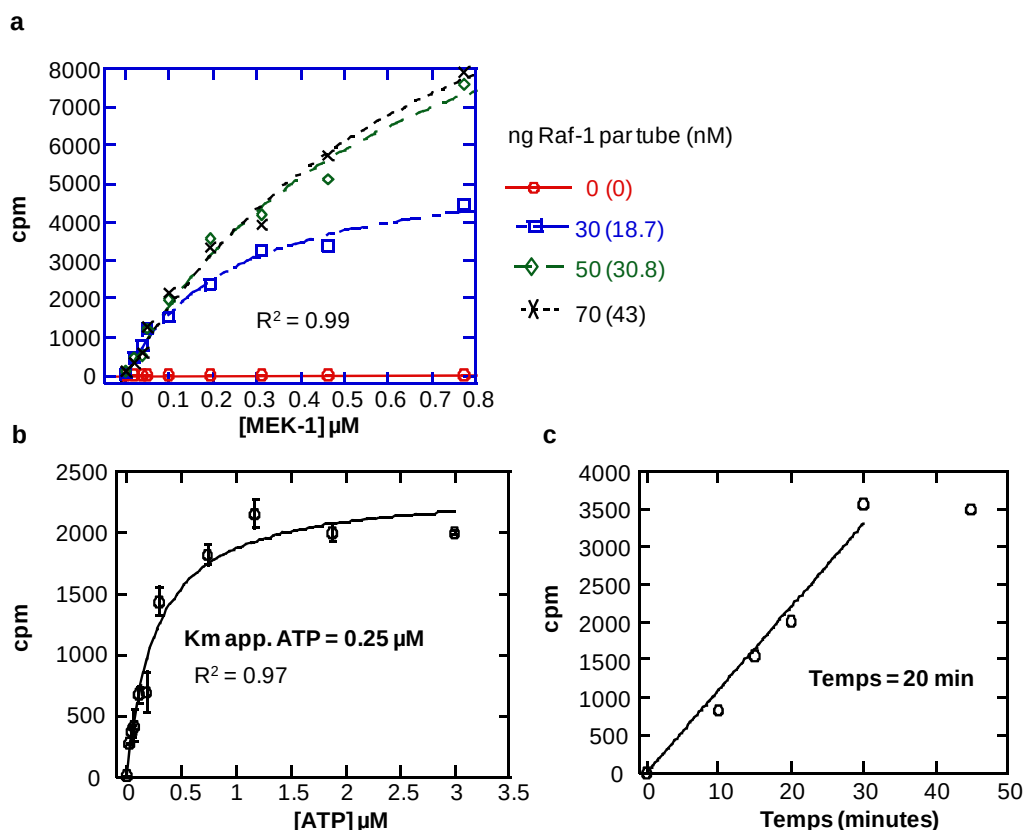


Figure 57 : Optimisation du test direct sur Raf-1 avec la méthode PFBA. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 20 minutes à 30 °C par addition d'acide phosphorique 50 %. Le ^{32}P incorporé par MEK-1 durant la réaction est quantifié avec un compteur à scintillation sans addition de liquide à scintillation. **(a) Optimisation de la concentration optimale de Raf-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en Raf-1 active de 0 à 43 nM ainsi que la concentration en MEK-1 inactive de 0 à 0,77 μM en présence de 2 μM d'ATP et 0,5 μCi d'ATP- γ - ^{32}P par tube. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en Raf-1 active (18,7 nM) et MEK-1 inactive (0,25 μM), en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 3 μM avec 0,5 μCi d'ATP- γ - ^{32}P par tube. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de Raf-1 active (18,7 nM), de MEK-1 inactive (0,25 μM) et d'ATP (0,25 μM) avec 0,5 μCi d'ATP- γ - ^{32}P par tube. Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition de 5 μL d'acide phosphorique 50 %. Seule la partie linéaire de la courbe est représentée.

Tests directs sur Raf-1 avec les méthodes Lance UltraTM et LanthascreenTM:

Nous avons suivi la même approche pour optimiser le test sur Raf-1 avec les méthodes Lance UltraTM et LanthascreenTM. La **Figure 58** et la **Figure 59** représentent les différentes étapes d'optimisation suivies pour les méthodes Lance UltraTM et LanthascreenTM respectivement. Les détails expérimentaux concernant le déroulement des différents essais sont indiqués dans les légendes.

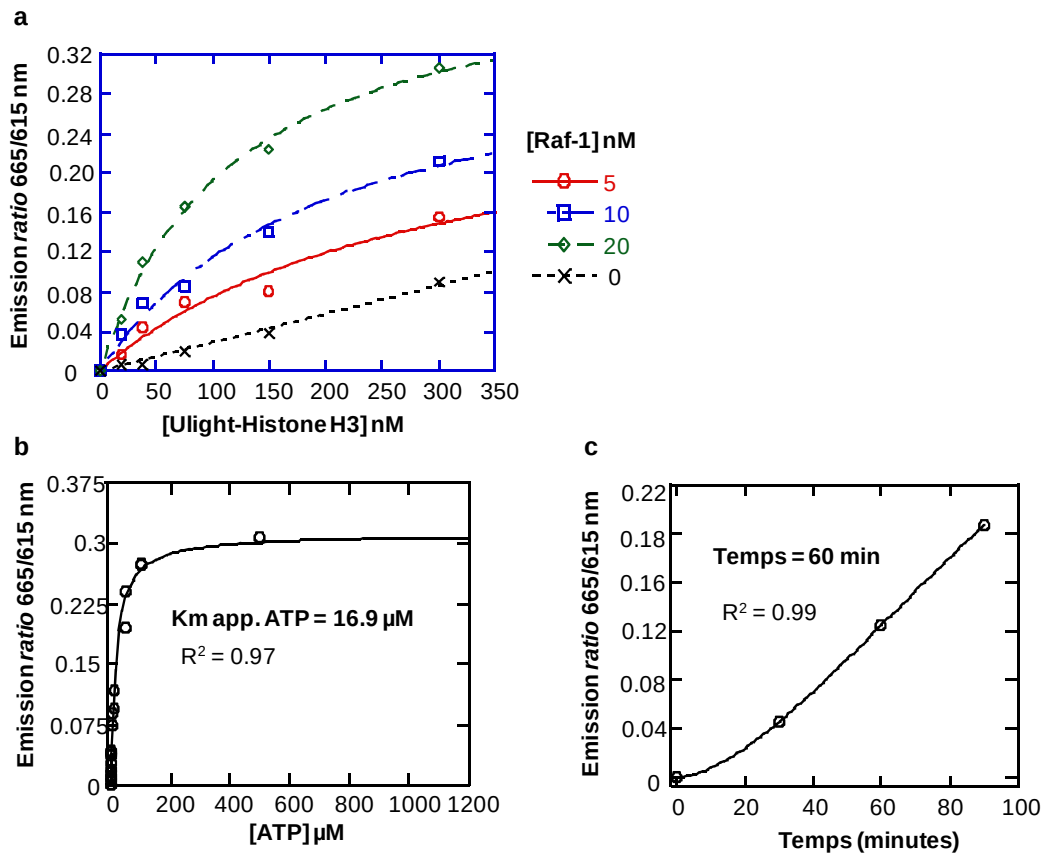


Figure 58 : Optimisation du test direct sur Raf-1 avec la méthode Lance Ultra™. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat Ulight_Peptide Histone H3 est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-Histone H3 marqué à l'Europium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 665 et 615 nm après une excitation à 340 nm avec le lecteur de plaque Victor V™. Les rapports des émissions de fluorescence 665/615 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration optimale de Raf-1 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en Raf-1 active de 0 à 20 nM ainsi que la concentration en Ulight_Peptide Histone H3 de 0 à 300 nM en présence de 50 μ M d'ATP. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en Raf-1 active (20 nM) et Ulight_Peptide Histone H3 (0,05 μ M), en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 500 μ M. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de Raf-1 active (20 nM), d'Ulight_Peptide Histone H3 (0,05 μ M) et d'ATP (16,9 μ M). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

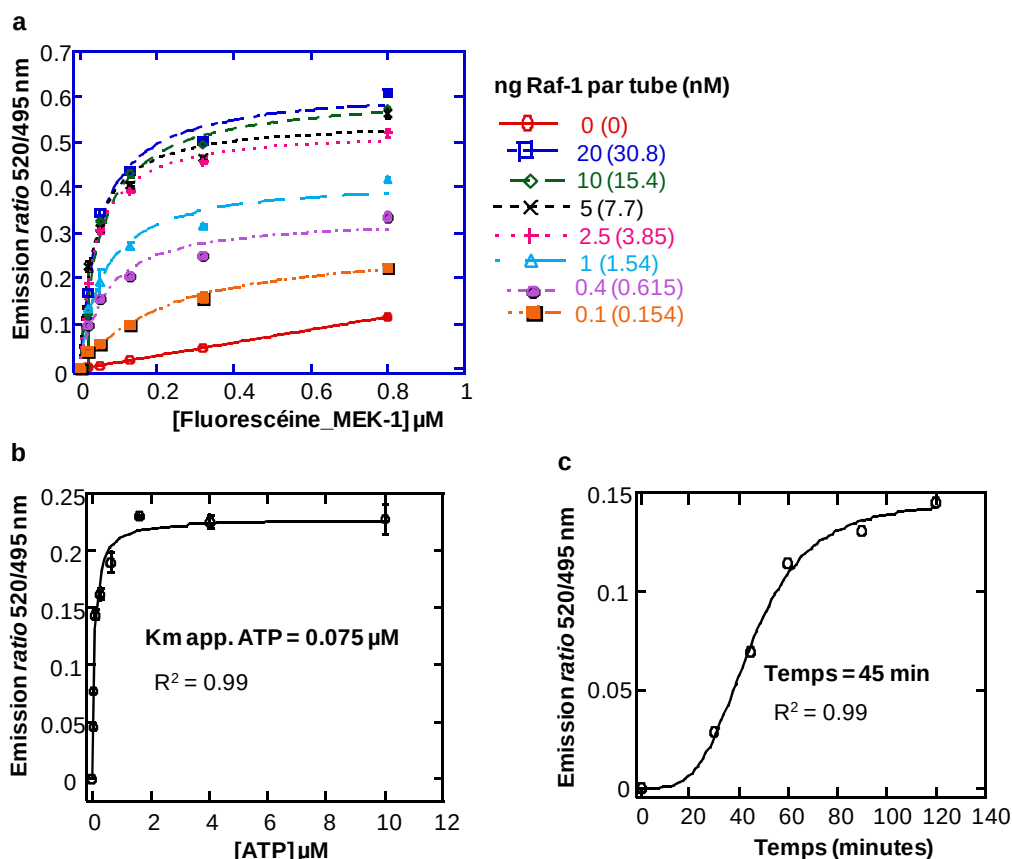


Figure 59 : Optimisation du test direct sur Raf-1 avec la méthode Lanthascreen™. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat fluorescéine_MEK-1 est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-fluorescéine_MEK-1 marqué au Terbium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 520 et 495 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor V™. Les rapports des émissions de fluorescence 520/495 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration optimale de Raf-1 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en Raf-1 active de 0 à 30,8 nM ainsi que la concentration en fluorescéine_MEK-1 de 0 à 0,80 μ M en présence de 1 μ M d'ATP. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en Raf-1 active (3,8 nM) et fluorescéine_MEK-1 (40 nM), en variant la concentration d'ATP de 0 à 10 μ M. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de Raf-1 active (3,8 nM), de fluorescéine_MEK-1 (40 nM) et d'ATP (75 nM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

A l'issue de ces optimisations, le **Tableau 22** récapitule les conditions expérimentales retenues pour réaliser les tests d'inhibition sur Raf-1 selon les 3 méthodes. Les divergences de concentrations observées selon les méthodes s'expliquent par le fait qu'elles utilisent des substrats et un mode de détection différents. La comparaison des concentrations montre

clairement que la méthode LanthascreenTM consomme le moins d'enzyme et de substrat, ce qui lui donne un net avantage économique par rapport aux autres méthodes.

	PFBA	Lance Ultra TM	Lanthascreen TM
[Raf-1 active] nM	18,7	20	3,8
[Km app. Substrat] nM	250	50	40
[Km app. ATP] nM	250	16 900	75
Temps réaction kinase, température	20 minutes, 30 °C	60 minutes, température ambiante	45 minutes, température ambiante

Tableau 22 : Conditions expérimentales retenues pour le test direct sur Raf-1 selon les trois méthodes : PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM

Validation du test direct sur Raf-1 :

Afin de valider ces 3 méthodes, nous avons testé cinq inhibiteurs commerciaux connus de Raf-1 représentatifs des trois types d'inhibition : type I (ATP compétitif), type II (adjacent à la poche ATP) et type III (allostérique), puis nous avons comparé les valeurs d'IC₅₀ mesurées dans nos conditions avec les valeurs d'IC₅₀ reportées dans la littérature. Les inhibiteurs : Sorafenib (type II),²³ GW5074 (type I),²¹¹ ZM 336372 (type I),³⁶⁸ U0126 (type III)³⁶⁹, MEK inhibitor II³⁷⁰ (type III) et la Staurosporine (type I) qui est un inhibiteur multi kinases, ont été testés. Les résultats obtenus pour la validation du test direct sur Raf-1 sont détaillés dans le **Tableau 23**. Pour les 3 premiers composés : Sorafenib, GW5074 et ZM 336372 qui sont des inhibiteurs puissants de Raf-1 (avec des valeurs d'IC₅₀ de 6 à 70 nM), les valeurs d'IC₅₀ mesurées avec les deux techniques PFBA et LanthascreenTM sont cohérentes avec celles obtenues dans la littérature. Par exemple, la **Figure 60** illustre les courbes d'inhibition obtenues pour le Sorafenib avec les deux méthodes PFBA **(a)** et LanthascreenTM **(b)**.

³⁶⁸ Hall-Jackson C.A., Eyers P.A., Cohen P., Goedert M., Boyle F.T., Hewitt N., Plant H., Hedge P.: Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chem. Biol.*, **1999**, 6, 559-68.

³⁶⁹ Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., Trzaskos J.M.: Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 18623-32.

³⁷⁰ Bakare O., Ashendel C.L., Peng H., Zalkow L.H., Burgess E.M.: Synthesis and MEK1 inhibitory activities of imido-substituted 2-chloro-1,4-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 3165-70.

Inhibiteur (type d'inhibition)	IC ₅₀ Raf-1 publiées (nM)	IC ₅₀ Raf-1 mesurées (nM)		
		PFBA	Lance Ultra™	Lanthascreen™
Sorafenib (II)	6	5 ± 0,5	> 50 000	9,3 ± 1,0
GW5074 (I)	9	9,6 ± 0,6	> 50 000	16,2 ± 1,8
ZM 336372 (I)	70	80 ± 8,4	> 50 000	62 ± 6,8
U0126 (III)	n.d. ^a	6 450 ± 742	> 50 000	37 700 ± 31,6
MEK inhibitor II (III)	34 500	29 500 ± 943	> 50 000	22 000 ± 6,0
Staurosporine (I)	> 50 000	> 50 000	> 50 000	> 50 000

^aU0126 est décrit comme un faible inhibiteur de Raf-1, n.d. = non déterminé.

Tableau 23 : Validation du test direct sur Raf-1 avec les trois méthodes PFBA, Lance Ultra™ et Lanthascreen™

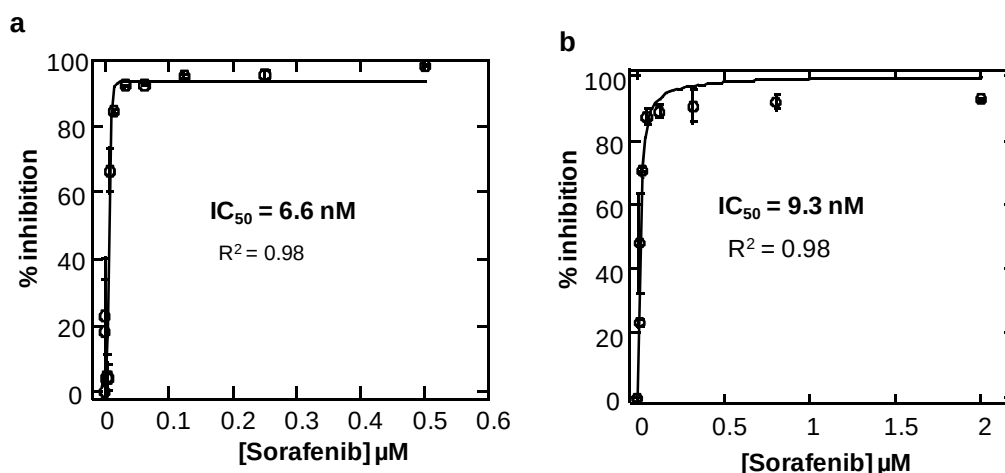


Figure 60 : Inhibition de Raf-1 par le Sorafenib. Les courbes d'IC₅₀ ont été tracées suivant l'équation hyperbolique : % inhibition = 100*x / (IC₅₀+x). Les coefficients de détermination R₂ et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les solutions de Sorafenib ont été diluées en série dans du DMSO. Les essais d'inhibition ont été réalisés selon les conditions optimisées pour le test direct de Raf-1. **(a) La méthode PFBA.** **(b) La méthode Lanthascreen™.**

Les inhibiteurs U0126 et MEK inhibitor II ont aussi été testés afin de s'assurer que nos méthodes étaient aussi capables de détecter des inhibiteurs plus faibles de Raf-1 avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du μM. Concernant MEK inhibitor II, les valeurs d'IC₅₀ obtenues avec les deux méthodes PFBA et Lanthascreen™ sont cohérentes avec la littérature. Dans le cas de l'inhibiteur U0126, la méthode Lanthascreen™ a conduit à une valeur d'IC₅₀ treize fois supérieure à la valeur obtenue avec la méthode PFBA. Etant donné qu'U0126 est décrit

comme un inhibiteur allostérique de MEK empêchant la phosphorylation de MEK par Raf,³⁷¹ ce résultat suggère que l'encombrement stérique généré par la fluorescéine fixée sur MEK-1, bloquerait la liaison d'U0126 à MEK.

Les résultats obtenus montrent que la Staurosporine ne possède aucune activité inhibitrice vis-à-vis de Raf quelque soit la méthode utilisée.

La méthode Lance UltraTM n'a détecté aucun des inhibiteurs de Raf-1 testés même les plus forts tels que le Sorafenib ou GW5074. Ce mauvais résultat s'explique par le fait que le peptide Ulight-Histone H3 développé pour Raf-1 par Perkin Elmer n'est pas un bon substrat. Ce problème est évité par la méthode LanthascreenTM qui utilise comme substrat pour Raf-1 la protéine MEK-1 entière marquée à la fluorescéine.

En conclusion, la méthode Lance UltraTM ne peut pas être utilisée pour caractériser des inhibiteurs de Raf. Les méthodes LanthascreenTM et PFBA ont été validées pour la détection des inhibiteurs de Raf. Même si la méthode LanthascreenTM (TR-FRET) peut induire des valeurs d'IC₅₀ erronées dans certains cas, nous avons choisi d'utiliser cette méthode pour nos tests en routine car elle est plus efficace que la méthode PFBA.

II-1.1.2 Résultats de l'optimisation et de la validation du test direct sur MEK-1

Seules 2 méthodes ont pu être testées pour le test direct sur MEK-1 : Lance UltraTM et PFBA. En effet, un substrat marqué pour MEK-1 n'a pas encore été commercialisé par Invitrogen pour la méthode LanthascreenTM. L'optimisation du test direct sur MEK-1 s'est déroulée selon la même approche que celle suivie pour le test direct sur Raf-1. La **Figure 61** et la **Figure 62** illustrent les courbes obtenues pour les méthodes PFBA et Lance UltraTM respectivement.

Le **Tableau 24** récapitule les concentrations retenues pour les essais d'inhibition sur MEK-1. Les deux méthodes utilisent des concentrations élevées en enzyme MEK-1 active et substrat (ERK-2 inactive ou Ulight_Peptide p70S6K) en comparaison avec le test direct sur Raf-1. Concernant la méthode PFBA, nous avons obtenu une très faible valeur pour le Km apparent pour l'ATP (467 nM) même en utilisant la plus forte concentration en MEK-1 active (250 nM). Par conséquent, il est difficile de travailler à plus faible concentration de MEK-1 et

³⁷¹ Davis S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P.: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, **2000**, 351, 95-105.

ERK-2 car le K_m ATP serait encore plus faible ce qui ferait prélever une trop petite quantité d'ATP radioactif.

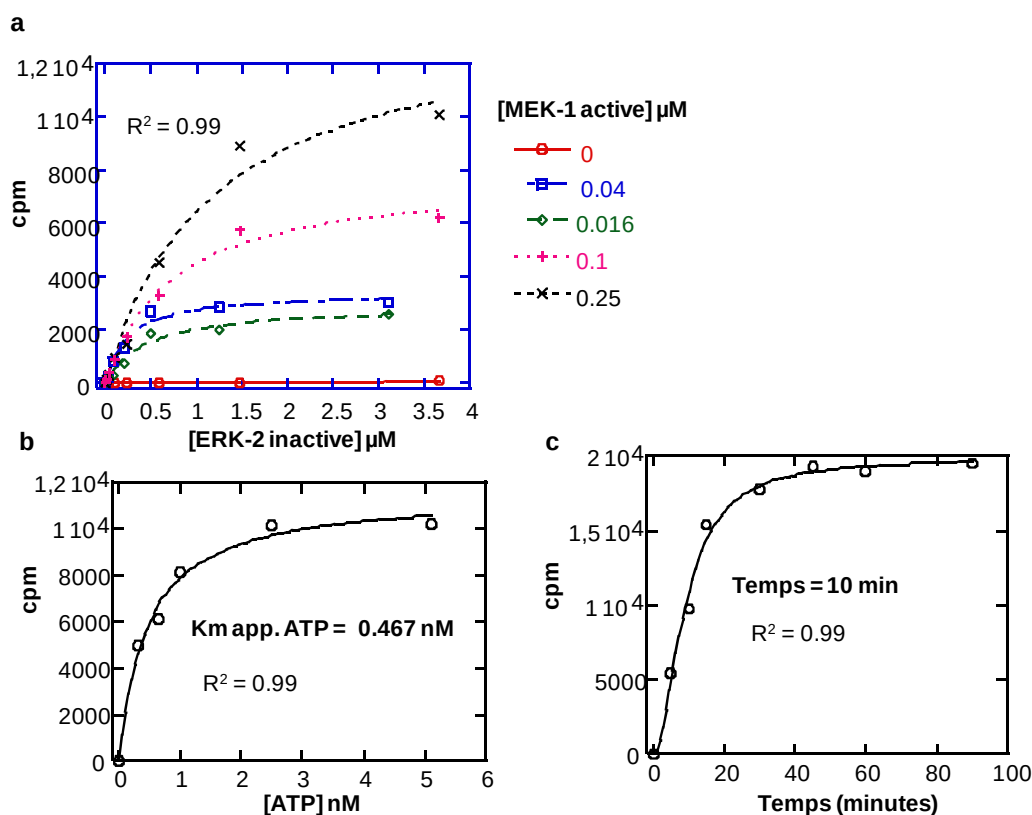


Figure 61 : Optimisation du test direct sur MEK-1 avec la méthode PFBA. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 20 minutes à 30 °C par addition d'acide phosphorique 50 %. Le ^{32}P incorporé par ERK-2 durant la réaction est quantifié avec un compteur à scintillation sans addition de liquide à scintillation. **(a) Optimisation de la concentration optimale de MEK-1 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en MEK-1 active de 0 à 0,25 μ M ainsi que la concentration en ERK-2 inactive de 0 à 3,7 μ M en présence de 2 μ M d'ATP et 0,05 μ Ci d'ATP- γ - ^{32}P par tube. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en MEK-1 active (0,25 μ M) et ERK-2 inactive (1,2 μ M), en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 5 nM avec 0,05 μ Ci d'ATP- γ - ^{32}P par tube. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de MEK-1 active (0,25 μ M), d'ERK-2 inactive (1,2 μ M) et d'ATP (0,467 nM) avec 0,05 μ Ci d'ATP- γ - ^{32}P par tube. Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition de 5 μ L d'acide phosphorique 50 %.

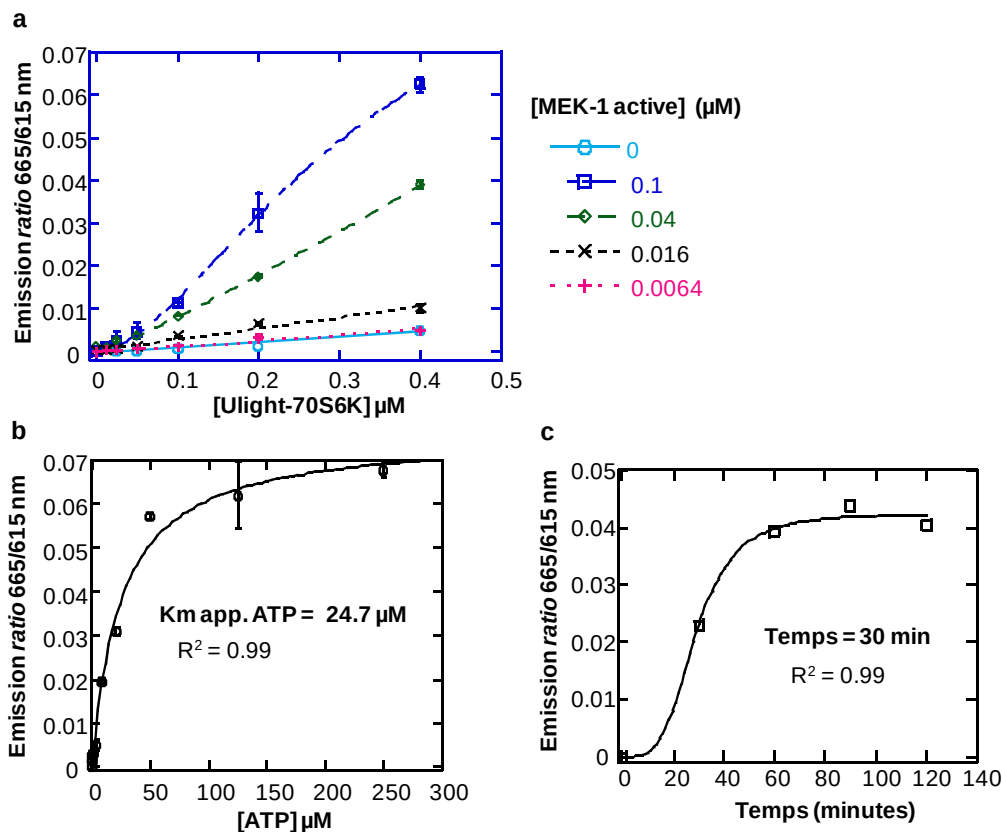


Figure 62 : Optimisation du test direct sur MEK-1 avec la méthode Lance UltraTM. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation de substrat Ulight_Peptide p70S6K est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-p70S6K marqué à l'Europium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 665 et 615 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor VTM. Les rapports des émissions de fluorescence 665/615 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration optimale de MEK-1 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en MEK-1 active de 0 à 0,1 μM ainsi que la concentration en Ulight_Peptide p70S6K de 0 à 0,4 μM en présence de 100 μM d'ATP. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en MEK-1 active (0,1 μM) et Ulight_Peptide p70S6K (0,334 μM), en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 250 μM . **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de MEK-1 active (0,1 μM), d'Ulight_Peptide p70S6K (0,334 μM) et d'ATP (24,7 μM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

	PFBA	Lance Ultra™
[MEK-1 active] nM	250	100
[Km app. Substrat] nM	1 200	334
[Km app. ATP] nM	467	24 700
Temps réaction kinase, température	10 minutes, 30 °C	30 minutes, température ambiante

Tableau 24 : Conditions expérimentales retenues pour le test direct sur MEK-1 selon les deux méthodes : PFBA et Lance Ultra™

Pour valider ces 2 méthodes, nous avons testé 3 inhibiteurs commerciaux de MEK-1 de type allostérique (III) : U0126,³⁶⁹ MEK inhibitor II³⁷⁰ et PD98059³⁷². Nous avons aussi testé la Staurosporine qui est un inhibiteur ATP compétitif (type I) pour un grand nombre de kinases.³³⁹ Les résultats de la validation du test direct sur MEK-1 sont décrits dans le **Tableau 25**.

Inhibiteur (type d'inhibition)	IC₅₀ publiées (nM)	IC₅₀ mesurées (nM)	
		PFBA	Lance Ultra™
U0126 (III)	530	27 600 ± 41,4	> 50 000
MEK inhibitor II (III)	380	4 700 ± 0,262	> 50 000
PD98059 (III)	5 000	> 50 000	> 50 000
Staurosporine (I)	4	2,7 ± 0,275	15,6 ± 2,17

Tableau 25 : Validation du test direct sur MEK-1 avec les deux méthodes PFBA et Lance Ultra™

Les résultats montrent que le test direct sur MEK-1 (qui utilise une forme active de MEK-1), n'est pas en mesure de montrer le caractère inhibiteur des produits U0126, MEK inhibitor II et PD98059 quelque soit la méthode utilisée PFBA ou Lance Ultra™ puisqu'une différence d'au moins un facteur 10 est observée entre les IC₅₀ reportées et celles mesurées. Ces résultats s'expliquent par le fait que ces composés n'inhibent pas la forme active de MEK-1. En effet, des travaux antérieurs ont montré que les produits U0126 et PD98059 bloquent l'activation de MEK-1 par Raf-1 en agissant sur la forme inactive de MEK, ils ne bloquent pas l'activité kinase de MEK.³⁷¹

La Staurosporine a pu être identifiée comme inhibiteur puissant de MEK-1 avec une valeur d'IC₅₀ égale à 2,7 nM avec la méthode PFBA, ce qui est en corrélation avec la valeur

³⁷² Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R.: PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 27489-94.

d'IC₅₀ publiée (4 nM). Cependant, la méthode Lance UltraTM a conduit à une valeur d'IC₅₀ 6 fois supérieure à celle obtenue avec la méthode PFBA. Ce résultat s'explique par le manque de sensibilité de la méthode Lance UltraTM dû à la mauvaise reconnaissance du peptide substrat p70S6K par MEK-1.

En conclusion, ces résultats montrent que le test direct sur MEK-1 ne permet pas d'identifier tous les types d'inhibiteurs de MEK. En effet, il est adapté uniquement pour l'identification des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et ne détecte pas les inhibiteurs allostériques ayant de l'affinité pour la forme active de MEK. Seul le test direct sur MEK-1 avec la méthode PFBA pourrait être utilisé pour détecter des inhibiteurs ATP compétitifs ou allostériques affins pour la forme active de MEK.

II-1.1.3 Résultats de l'optimisation et de la validation du test direct sur ERK-2

La même approche multi étapes a été suivie pour l'optimisation du test direct sur ERK-2 avec les 3 méthodes : PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM. La **Figure 63**, la **Figure 64** et la **Figure 65** décrivent les courbes obtenues pour les trois méthodes respectivement. Le **Tableau 26** résume les concentrations retenues pour les essais d'inhibition sur ERK-2.

De même que pour le test direct sur MEK-1, la méthode PFBA est celle qui consomme le plus d'enzyme et de substrat. Etant donné que le Km apparent pour l'ATP est déjà très faible (0,8 nM), nous pouvons difficilement travailler à plus faible concentration de ERK-2 active car le Km ATP serait encore plus faible ce qui nous ferait prélever une trop petite quantité d'ATP radioactif. La méthode LanthascreenTM semble être la méthode la plus sensible, puisqu'elle utilise les plus faibles quantités en enzyme et substrat.

	PFBA	Lance Ultra TM	Lanthascreen TM
[ERK-2 active] nM	250	187	3,8
[Km app. Substrat] nM	38 000	100	40
[Km app. ATP] nM	0,8	354	421
Temps réaction kinase, température	10 minutes, 30 °C	30 minutes, température ambiante	50 minutes, température ambiante

Tableau 26 : Conditions expérimentales retenues pour le test direct sur ERK-2 selon les trois méthodes : PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM

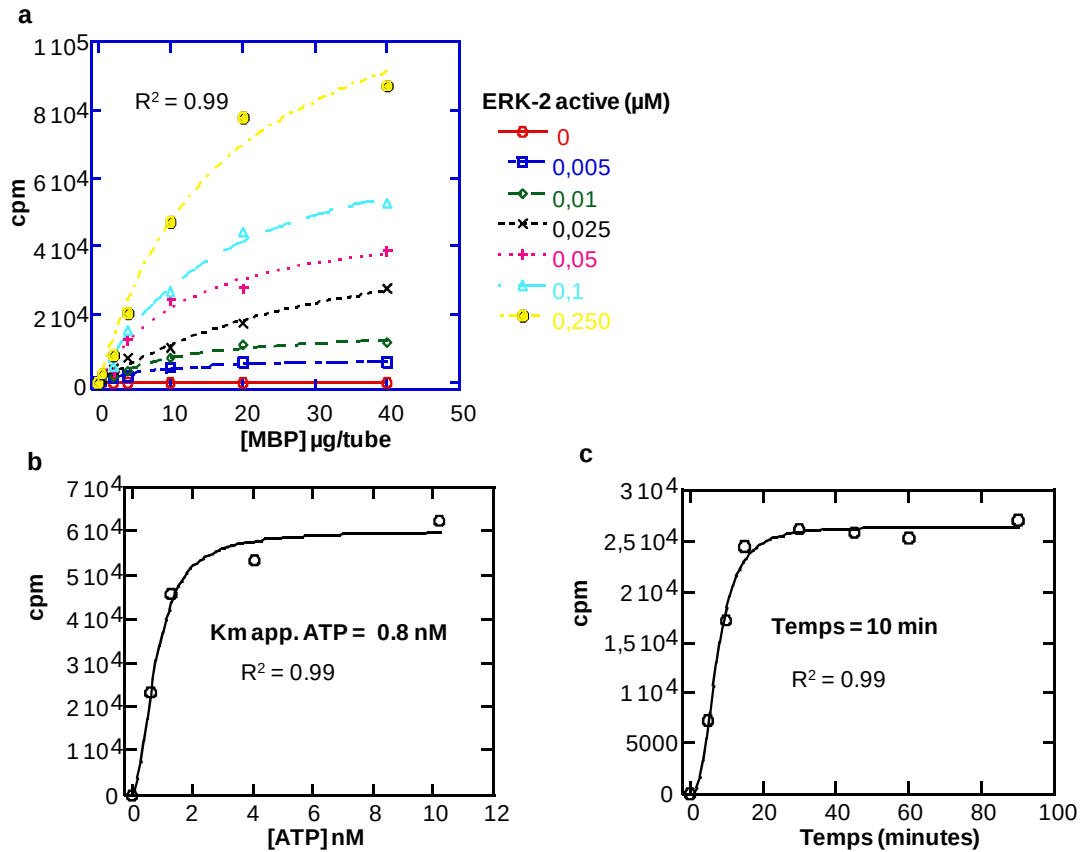


Figure 63 : Optimisation du test direct sur ERK-2 avec la méthode PFBA. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 20 minutes à 30 °C par addition d'acide phosphorique 50 %. Le ^{32}P incorporé par le substrat MBP durant la réaction est quantifié avec un compteur à scintillation sans addition de liquide à scintillation. **(a) Optimisation de la concentration optimale de ERK-2 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en ERK-2 active de 0 à 0,25 μM ainsi que la concentration en MBP de 0 à 40 $\mu\text{g}/\text{tube}$ ou 86,4 μM en présence de 2 μM d'ATP et 0,1 μCi d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ par tube. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en ERK-2 active (0,25 μM) et MBP (17,6 $\mu\text{g}/\text{tube}$ ou 38 μM), en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 10 nM avec 0,1 μCi d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ par tube. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées d'ERK-2 active (0,25 μM), de MBP (17,6 $\mu\text{g}/\text{tube}$ ou 1 mM) et d'ATP (0,8 nM) avec 0,1 μCi d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ par tube. Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition de 5 μL d'acide phosphorique 50 %.

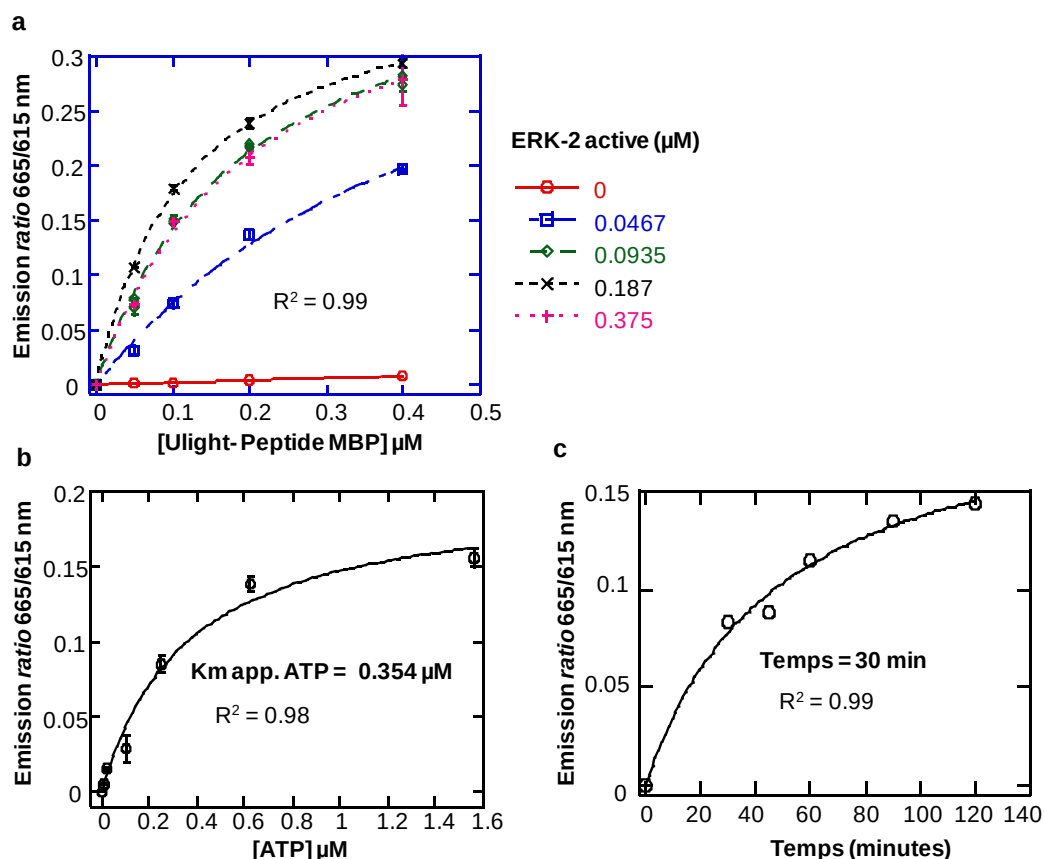


Figure 64 : Optimisation du test direct sur ERK-2 avec la méthode Lance UltraTM. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat Ulight_Peptide MBP est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-Peptide MBP marqué à l'Europium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 665 et 615 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor VTM. Les rapports des émissions de fluorescence 665/615 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration optimale de ERK-2 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en ERK-2 active de 0 à 0,375 μM ainsi que la concentration en Ulight_Peptide MBP de 0 à 0,4 μM en présence de 10 μM d'ATP. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en ERK-2 active (0,187 μM) et Ulight_Peptide MBP (0,1 μM), en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 1.6 μM . **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées d'ERK-2 active (0,187 μM), d'Ulight_Peptide MBP (0,1 μM) et d'ATP (0,354 μM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

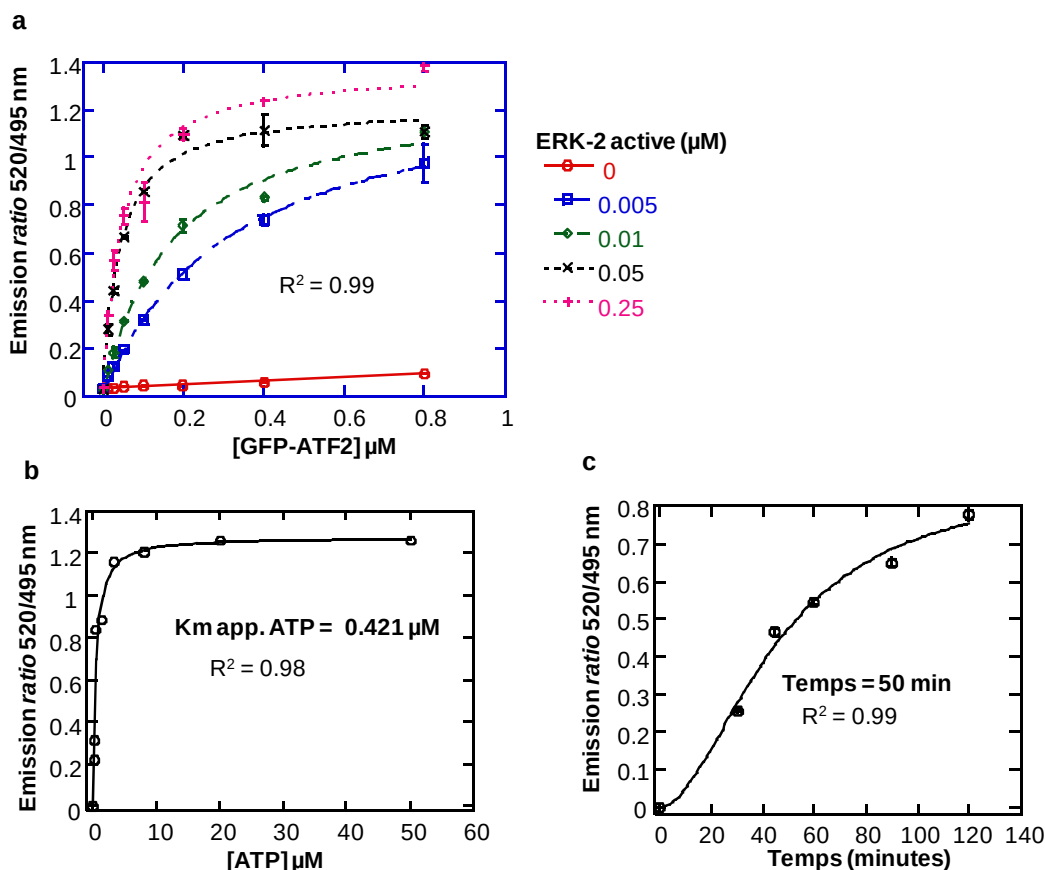


Figure 65 : Optimisation du test direct sur ERK-2 avec la méthode Lanthascreen™. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat GFP_ATF2 est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-ATF2 marqué au Terbium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 520 et 495 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor V™. Les rapports des émissions de fluorescence 520/495 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration optimale de ERK-2 active.** Les essais ont été réalisés en variant la concentration en ERK-2 active de 0 à 0,25 μM ainsi que la concentration en GFP_ATF2 de 0 à 0,80 μM en présence de 10 μM d'ATP. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en ERK-2 active (50 nM) et GFP_ATF2 (40 nM), en variant la concentration d'ATP de 0 à 50 μM . **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées d'ERK-2 active (3,8 nM), de GFP_ATF2 (40 nM) et d'ATP (421 nM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

Pour valider ces 3 méthodes, nous avons testé un inhibiteur commercial spécifique d'ERK-2 : FR180204³⁷³ (type I) et la Staurosporine³³⁹ (type I). Les résultats de la validation du test direct sur ERK-2 sont décrits dans le **Tableau 27**. Les 3 méthodes PFBA, Lance

³⁷³ Ohori M., Kinoshita T., Okubo M., Sato K., Yamazaki A., Arakawa H., Nishimura S., Inamura N., Nakajima H., Neya M., Miyake H., Fujii T.: Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 336, 357-63.

UltraTM et LanthascreenTM ont donné pour les 2 inhibiteurs, des valeurs d'IC₅₀ tout à fait comparables les unes par rapport aux autres et cohérentes avec les valeurs reportées dans la littérature.

<i>Inhibiteur (type d'inhibition)</i>	<i>IC₅₀ publiées (nM)</i>	<i>IC₅₀ mesurées (nM)</i>		
		<i>PFBA</i>	<i>Lance UltraTM</i>	<i>LanthascreenTM</i>
FR180204 (I)	330	310 ± 33,1	268 ± 44,4	259 ± 27,9
Staurosporine (I)	4 400	1 900 ± 194	1 000 ± 23,2	2 100 ± 273

Tableau 27 : Validation du test direct sur ERK-2 avec les trois méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM

En conclusion, les 3 méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM ont été validées pour le test direct sur ERK-2.

II-1.2 Optimisation et validation du test sur la double cascade MEK/ERK

Nous avons montré précédemment que le test direct de MEK-1 permettait d'identifier des inhibiteurs ATP compétitifs de MEK voire des inhibiteurs allostériques ayant de l'affinité pour la forme active de MEK. Néanmoins, il n'existe pas encore d'inhibiteur commercial de MEK permettant de démontrer cette deuxième hypothèse. Nous avons aussi démontré que seule la méthode PFBA pouvait être utilisée pour détecter les inhibiteurs ATP compétitifs de MEK-1. Etant donné que cette méthode présente les inconvénients d'être très coûteuse en enzyme et substrat mais aussi très coûteuse en temps à cause des étapes de lavage, nous avons voulu développer le test sur la double cascade MEK/ERK avec les méthodes de TR-FRET dans le but d'avoir une alternative à l'utilisation de la radioactivité pour le dosage de MEK-1.

A partir des optimisations faites pour le test direct sur ERK-2, les concentrations fixées en enzyme ERK-2 et en substrat final (MBP ou Ulight-peptide MBP ou GFP-ATF2) ont été reprises, l'étape suivante a été la détermination de la concentration en MEK-1 active nécessaire pour activer la double cascade. Nous avons choisi de retenir la concentration en MEK-1 active capable de phosphoryler 50 % du substrat final (EC₅₀) pour se situer dans la phase linéaire de l'hyperbole et maintenir ainsi une bonne sensibilité du test. Par la suite, nous avons déterminé le Km apparent pour l'ATP puis le temps de la réaction kinase de façon à se situer dans la phase linéaire. Les résultats obtenus pour l'optimisation du test sur la double cascade MEK/ERK avec les 3 méthodes sont illustrés dans la **Figure 66**, la **Figure 67** et la **Figure 68**.

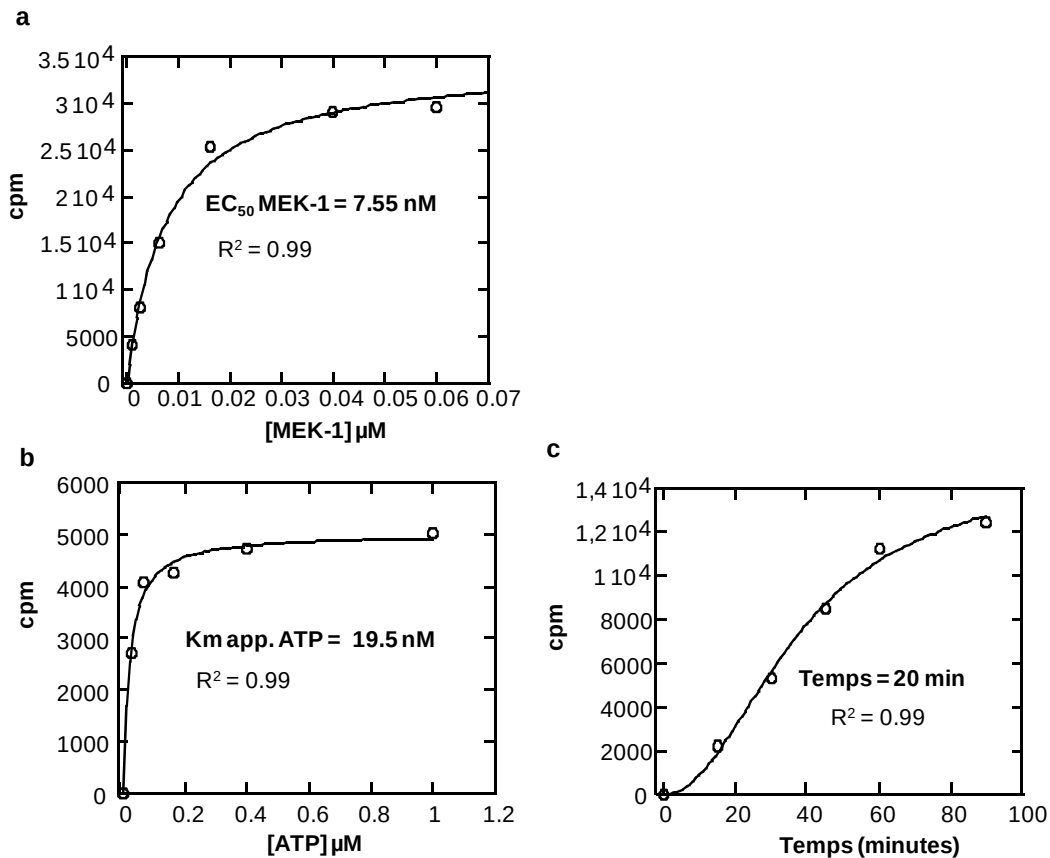


Figure 66 : Optimisation du test sur la double cascade MEK/ERK avec la méthode PFBA. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 20 minutes à 30 °C par addition d'acide phosphorique 50 %. Le ^{32}P incorporé par MBP durant la réaction est quantifié avec un compteur à scintillation sans addition de liquide à scintillation. **(a) Optimisation de la concentration en MEK-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en MEK-1 active de 0 à 0,06 μM en présence d'ERK-2 inactive (0,05 μM), de MBP (28,2 μM) et d'ATP (50 μM) avec 0,1 μCi d'ATP- $\gamma^{32}P$. **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en MEK-1 active (7,55 nM), ERK-2 inactive (0,05 μM), MBP (28,2 μM) en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 1 μM avec 0,1 μCi d'ATP- $\gamma^{32}P$ par tube. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de MEK-1 active (7,55 nM), d'ERK-2 inactive (0,05 μM), de MBP (28,2 μM) et d'ATP (19,5 nM) avec 0,1 μCi d'ATP- $\gamma^{32}P$ par tube. Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition de 5 μL d'acide phosphorique 50 %.

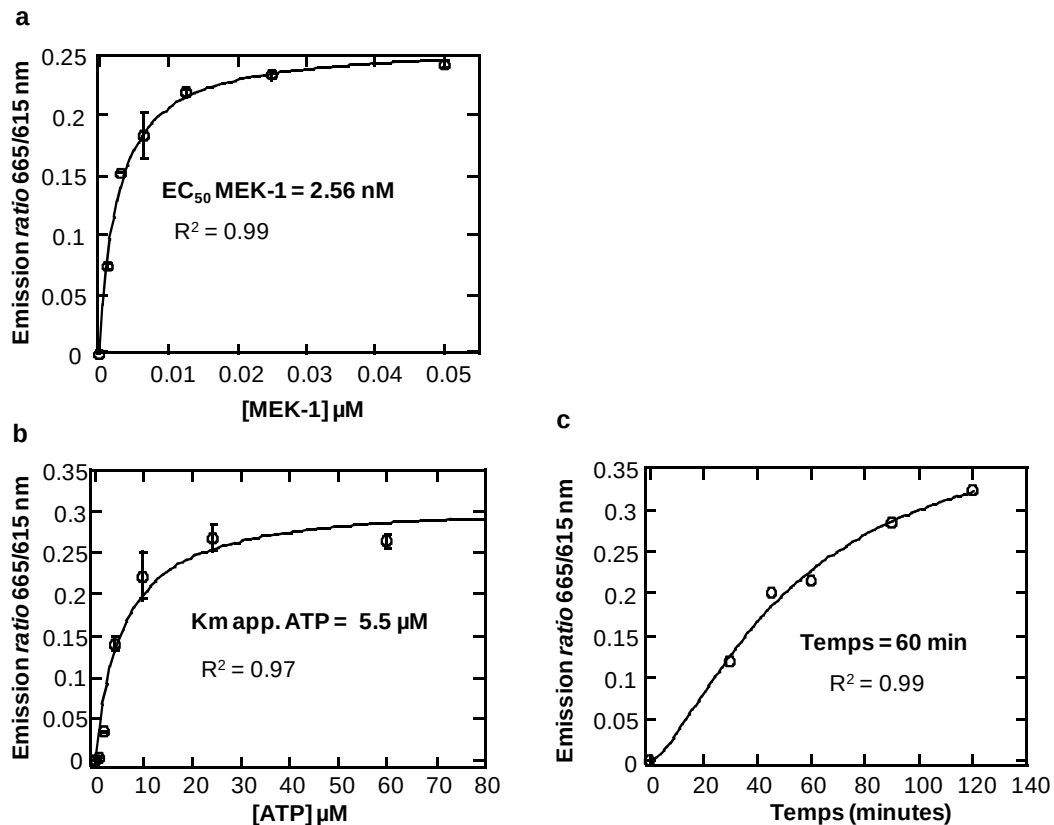


Figure 67 : Optimisation du test sur la double cascade MEK/ERK avec la méthode Lance Ultra™. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat Ulight_Peptide MBP est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-Peptide MBP marqué à l'Europium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 665 et 615 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor V™. Les rapports des émissions de fluorescence 665/615 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration en MEK-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en MEK-1 active de 0 à 0,05 μM en présence d'ERK-2 inactive (0,187 μM), d'Ulight-Peptide MBP (0,1 μM) et d'ATP (50 μM). **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en MEK-1 active (2,56 nM), ERK-2 inactive (0,187 μM) et Ulight-Peptide MBP (0,1 μM) en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 60 μM . **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées en MEK-1 active (2,56 nM), ERK-2 inactive (0,187 μM), Ulight-Peptide MBP (0,1 μM) et ATP (5,5 μM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

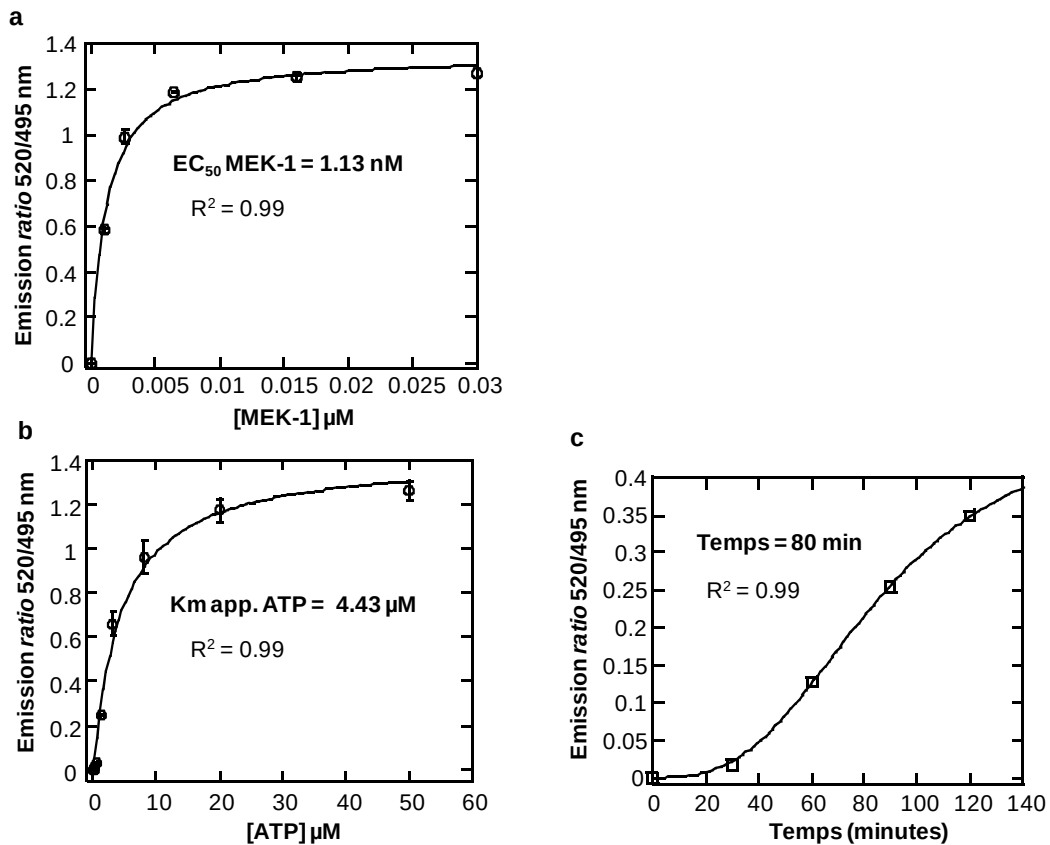


Figure 68 : Optimisation du test sur la double cascade MEK/ERK avec la méthode LanthascreenTM. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat GFP_ATF2 est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-ATF2 marqué au Terbium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 520 et 495 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor VTM. Les rapports des émissions de fluorescence 520/495 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration en MEK-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en MEK-1 active de 0 à 0,03 μM en présence d'ERK-2 inactive (0,05 μM), de GFP_ATF2 (0,04 μM) et d'ATP (50 μM). **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en MEK-1 active (1,13 nM), ERK-2 inactive (0,05 μM) et GFP_ATF2 (0,04 μM) en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 50 μM . **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées en MEK-1 active (1,13 nM), ERK-2 inactive (0,05 μM) et GFP_ATF2 (0,04 μM) et ATP (4,43 μM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

Le **Tableau 28** récapitule les concentrations retenues pour MEK-1 active, ERK-2 inactive, le substrat final (MBP ou Ulight-peptide MBP ou GFP-ATF2) et l'ATP pour les mesures d'inhibition sur la cascade MEK/ERK.

	PFBA	Lance Ultra TM	Lanthascreen TM
[MEK-1 active] nM	7,55	2,56	1,13
[ERK-2 inactive] nM	50	187	50
[Substrat final] nM	28 200	100	40
[Km app. ATP] nM	19,5	5 500	4 430
Temps réaction kinase, température	20 minutes, 30 °C	60 minutes, température ambiante	80 minutes, température ambiante

Tableau 28 : Conditions expérimentales retenues pour le test sur la double cascade MEK/ERK selon les trois méthodes : PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM

Concernant la méthode PFBA, le test sur la double cascade est plus sensible que le dosage direct de MEK-1 (Tableau 24). En effet, le test sur la double cascade utilise 30 fois moins d'enzyme MEK-1 et 24 fois moins d'enzyme ERK-2, ce qui représente un net avantage économique. Les méthodes de TR-FRET, en particulier LanthascreenTM sont encore plus sensibles que la méthode PFBA et permettent de consommer encore moins d'enzymes et de substrats.

Pour valider ce test, nous avons testé les mêmes inhibiteurs que pour le test direct sur MEK-1. Les résultats sont détaillés dans le **Tableau 29**.

Inhibiteur (type d'inhibition)	IC ₅₀ publiées (nM)	IC ₅₀ mesurées (nM)		
		PFBA	Lance Ultra TM	Lanthascreen TM
U0126 (III)	530	33 100 ± 3,67	4 500 ± 206,6	3 800 ± 825,9
MEK inhibtor II (III)	380	7 000 ± 0,289	4 600 ± 59,5	8 700 ± 747,9
PD98059 (III)	5 000	> 50 000	> 50 000	> 50 000
Staurosporine (I)	4,0	1,1 ± 0,276	1,7 ± 0,293	1,1 ± 0,193

Tableau 29 : Validation du test sur la double cascade MEK/ERK avec les trois méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM

Les 3 méthodes ont donné des résultats comparables : ce test ne permet pas d'identifier les inhibiteurs de type allostérique : U0126, MEK inhibtor II et PD98059, par contre pour les 3 méthodes, nous avons obtenu une bonne inhibition de la Staurosporine avec des valeurs

d'IC₅₀ comparables (1,1 et 1,7 nM). Par conséquent, ce test permet d'identifier des inhibiteurs ATP compétitifs de MEK-1.

Les trois méthodes ont été validées pour la détection d'inhibiteurs de MEK ATP compétitifs. Par conséquent, les méthodes non radioactives Lance Ultra™ ou Lanthascreen™ pourront être utilisées en routine à la place du test direct sur MEK-1 uniquement validé avec la méthode PFBA. De plus ces méthodes permettent de travailler à plus faibles concentrations d'enzyme et de substrat ce qui est plus économique.

II-1.3 Optimisation et validation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK

Pour la mise au point du test sur la triple la cascade Raf/MEK/ERK avec les trois méthodes : PFBA, Lance Ultra™ et Lanthascreen™, nous avons suivi une approche multi étapes :³³⁵ 1) la détermination des concentrations optimales d'ERK-2 et son substrat (Km apparent) ; 2) la détermination de la concentration de MEK-1 active pour obtenir 50 % de phosphorylation du substrat Ulight-MBP ; 3) la détermination de la concentration de Raf-1 active pour obtenir 50 % de phosphorylation du substrat Ulight-MBP ; 4) la détermination du Km apparent pour l'ATP ; 5) le choix du temps de réaction pour se situer dans des conditions de vitesse initiale. Les mesures d'IC₅₀ sont effectuées en présence des concentrations optimales déterminées pour Raf-1, MEK-1 et ERK-2, au Km apparent pour l'ATP et dans les conditions de vitesse initiale de la réaction kinase. Ces précautions sont indispensables pour une bonne sensibilité du test vis-à-vis d'inhibiteurs de Raf, MEK et/ou ERK.

La première étape d'optimisation du test sur la triple cascade a déjà été effectuée pour la mise au point du test direct sur ERK-2 avec les trois méthodes (**Figure 63a**, **Figure 64a**, et **Figure 65a**). De même, la deuxième étape d'optimisation de la concentration en MEK-1 a été achevée lors de la mise au point de la double cascade MEK/ERK avec les trois méthodes (**Figure 66a**, **Figure 67a**, et **Figure 68a**). La suite des étapes d'optimisation de la cascade Raf/MEK/ERK avec les trois méthodes PFBA, Lance Ultra™ et Lanthascreen™ sont représentées dans la **Figure 69**, la **Figure 70** et la **Figure 71** respectivement. Les détails expérimentaux sont indiqués dans les légendes.

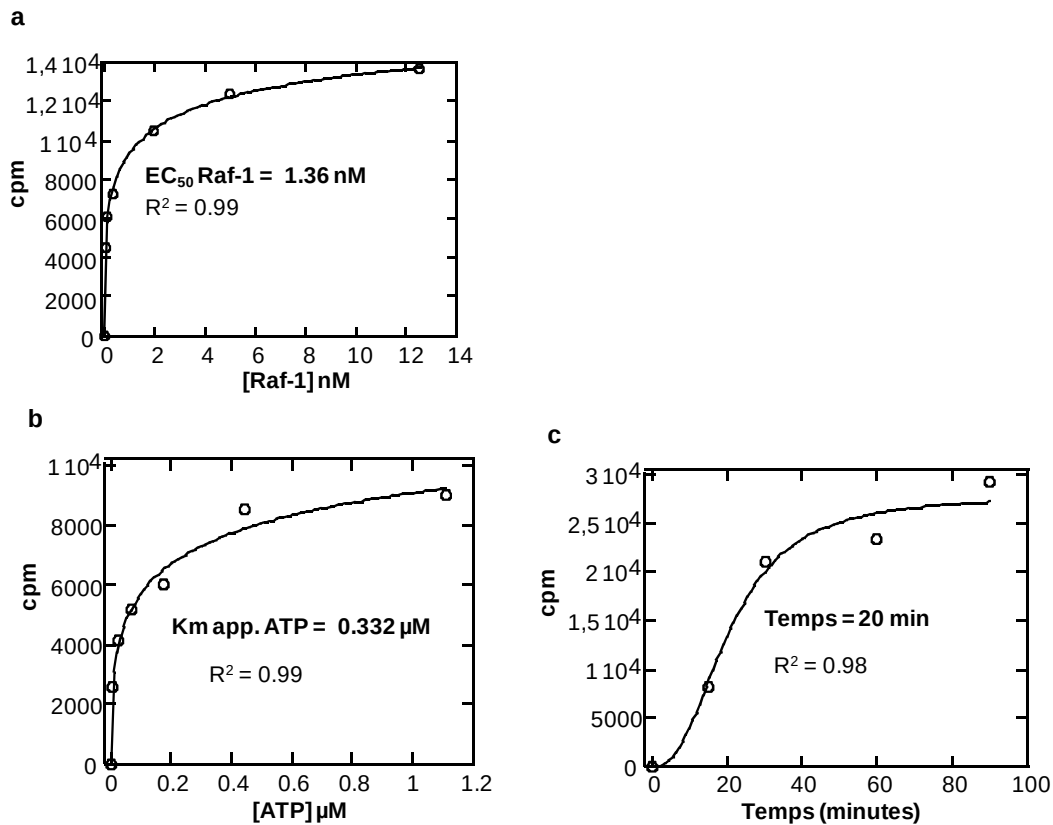


Figure 69 : Optimisation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode PFBA. Les coefficients de détermination R^2 . Les réactions kinase ont été arrêtées après 20 minutes à 30 °C par addition d'acide phosphorique 50 %. Le ^{32}P incorporé par MBP durant la réaction est quantifié avec un compteur à scintillation sans addition de liquide à scintillation. **(a) Optimisation de la concentration en Raf-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en Raf-1 active de 0 à 12,6 nM en présence de MEK-1 inactive (7,55 nM), d'ERK-2 inactive (0,05 μ M), de MBP (28,2 μ M) et d'ATP (2 μ M) avec 0,5 μ Ci d'ATP- γ - ^{32}P . **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en Raf-1 active (1,36 nM), MEK-1 inactive (7,55 nM), ERK-2 inactive (0,05 μ M), MBP (28,2 μ M) en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 1,1 μ M avec 0,5 μ Ci d'ATP- γ - ^{32}P par tube. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées de Raf-1 active (1,36 nM), MEK-1 inactive (7,55 nM), ERK-2 inactive (0,05 μ M), MBP (28,2 μ M) et ATP (0,332 μ M) avec 0,5 μ Ci d'ATP- γ - ^{32}P par tube. Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition de 5 μ L d'acide phosphorique 50 %.

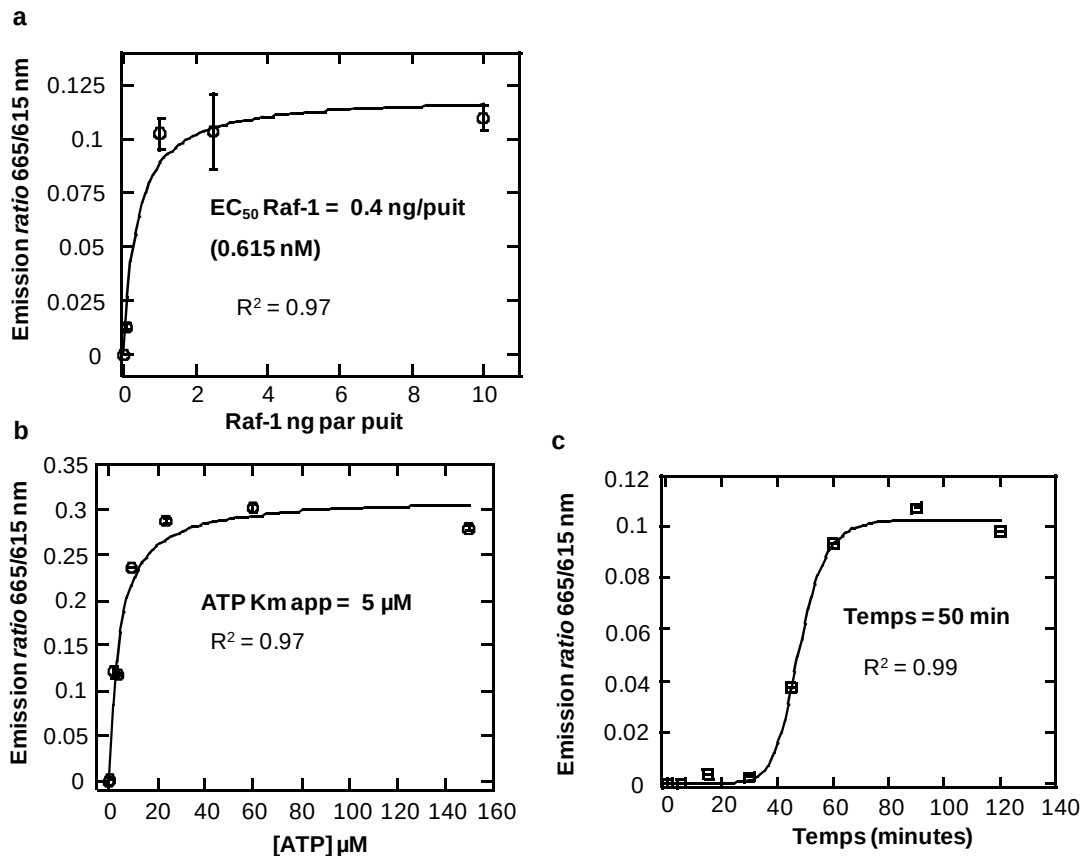


Figure 70 : Optimisation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode Lance UltraTM. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat Ulight_Peptide MBP est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-Peptide MBP marqué à l'Europium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 665 et 615 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor VTM. Les rapports des émissions de fluorescence 665/615 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration en Raf-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en Raf-1 active de 0 à 10 ng/puit (15,4 nM) en présence de MEK-1 inactive (2,56 nM), d'ERK-2 inactive (0,187 μM), d'Ulight-Peptide MBP (0,1 μM) et d'ATP (50 μM). **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en MEK-1 active (2,56 nM), ERK-2 inactive (0,187 μM) et Ulight-Peptide MBP (0,1 μM) en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 150 μM . **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées en Raf-1 active (0,615 nM), MEK-1 inactive (2,56 nM), ERK-2 inactive (0,187 μM), Ulight-Peptide MBP (0,1 μM) et ATP (5 μM). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

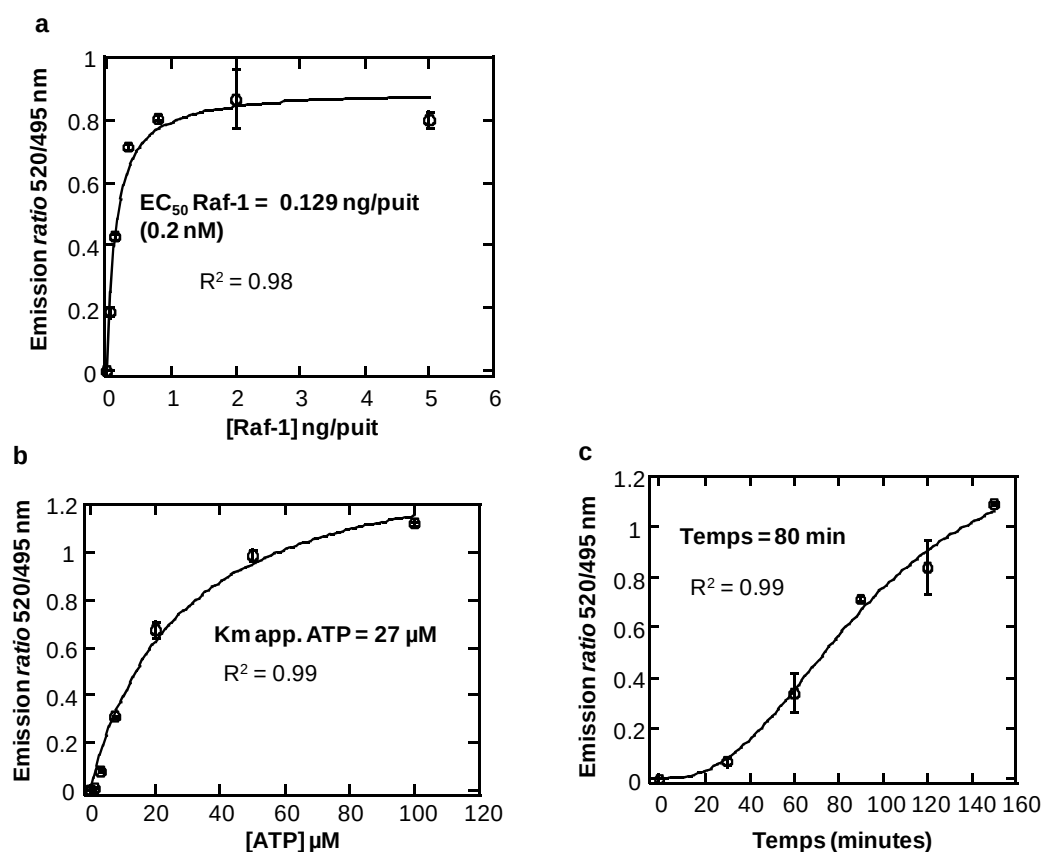


Figure 71 : Optimisation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode LanthascreenTM. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les réactions kinase ont été arrêtées après 60 minutes à température ambiante par addition d'EDTA (40 mM). La phosphorylation du substrat GFP_ATF2 est détectée après l'addition d'anticorps anti-phospho-ATF2 marqué au Terbium (8 nM). Après 20 min d'incubation à température ambiante, les émissions de fluorescence sont enregistrées à 520 et 495 nm après une excitation à 340 nm avec un lecteur de plaque Victor VTM. Les rapports des émissions de fluorescence 520/495 nm sont calculés pour chaque puits. **(a) Optimisation de la concentration en Raf-1 active.** Les essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en Raf-1 active de 0 à 5 ng/tube (7,7 nM) en présence de MEK-1 inactive (1,13 nM), d'ERK-2 inactive (0,05 μ M), de GFP_ATF2 (0,04 μ M) et d'ATP (50 μ M). **(b) Titration de l'ATP.** Les essais ont été réalisés aux concentrations fixes en Raf-1 active (0,2 nM), MEK-1 inactive (1,13 nM), ERK-2 inactive (0,05 μ M) et GFP_ATF2 (0,04 μ M) en faisant varier la concentration d'ATP de 0 à 100 μ M. **(c) Vitesse de la réaction kinase.** Les essais ont été réalisés aux concentrations optimisées en Raf-1 active (0,2 nM), MEK-1 inactive (1,13 nM), ERK-2 inactive (0,05 μ M) et GFP_ATF2 (0,04 μ M) et ATP (27 μ M). Les réactions kinase ont été arrêtées aux temps indiqués par addition d'EDTA (40 mM).

Le **Tableau 30** résume les concentrations retenues pour Raf-1 active, MEK-1 inactive, ERK-2 inactive, le substrat final (MBP ou Ulight-peptide MBP ou GFP-ATF2) et l'ATP pour les mesures d'inhibition sur la triple cascade Raf/MEK/ERK. Comme observé précédemment

pour les autres tests mis au point, les méthodes de TR-FRET Lance Ultra™ et Lanthascreen™ utilisent moins d'enzymes et substrats que la méthode PFBA.

	PFBA	Lance Ultra™	Lanthascreen™
[Raf-1 active] nM	1,36	0,615	0,2
[MEK-1 inactive] nM	7,55	2,56	1,13
[ERK-2 inactive] nM	50	187	50
[Substrat final] nM	28 200	100	40
[Km app. ATP] nM	322	5 000	27 000
Temps réaction kinase, température	20 minutes, 30 °C	50 minutes, température ambiante	80 minutes, température ambiante

Tableau 30 : Conditions expérimentales retenues pour le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK selon les trois méthodes : PFBA, Lance Ultra™ et Lanthascreen™

Pour valider ces méthodes nous avons testé trois inhibiteurs commerciaux de Raf-1 (Sorafenib, GW5074, ZM336372), trois inhibiteurs commerciaux de MEK (U0126, MEK inhibitor II, PD98059), un inhibiteur commercial de ERK (FR180204) et un inhibiteur possédant un large spectre d'action la Staurosporine. Les résultats de ces validations sur la triple cascade Raf/MEK/ERK sont détaillés dans le **Tableau 31**.

	Inhibiteur (inhibition type)	IC ₅₀ publiées (nM)	IC ₅₀ mesurées (nM)		
			PFBA	Lance Ultra™	Lanthascreen™
Raf inhibitors	Sorafenib (II)	6	7 ± 0,6	5 ± 0,3	5,6 ± 0,071
	GW5074 (I)	9	3,2 ± 0,3	8,3 ± 2,4	10,2 ± 2,3
	ZM336372 (I)	70	49 ± 12,3	63,5 ± 8,7	9 ± 0,94
MEK inhibitors	U0126 (III)	530	285 ± 40	800 ± 81,1	125 ± 11,5
	MEK inhibitor II	380	694 ± 160	353 ± 64,3	2 000 ± 428
	PD98059 (III)	5 000	5 000 ± 637	2 700 ± 704	1 000 ± 152
ERK	FR180204 (I)	330	146 ± 61,1	133 ± 26,7	130 ± 20
Other	Staurosporine (I)	63	1,3 ± 0,36	2,6 ± 0,19	1,1 ± 0,2

Tableau 31 : Validation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec les trois méthodes PFBA, Lance Ultra™ et Lanthascreen™

La **Figure 72** illustre des exemples de courbes d'inhibition obtenues avec des inhibiteurs de Raf, MEK et ERK (Sorafenib, ZM336372, U0126, MEK inhibitor II,

FR180204 et Staurosporine) sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode Lance Ultra™.

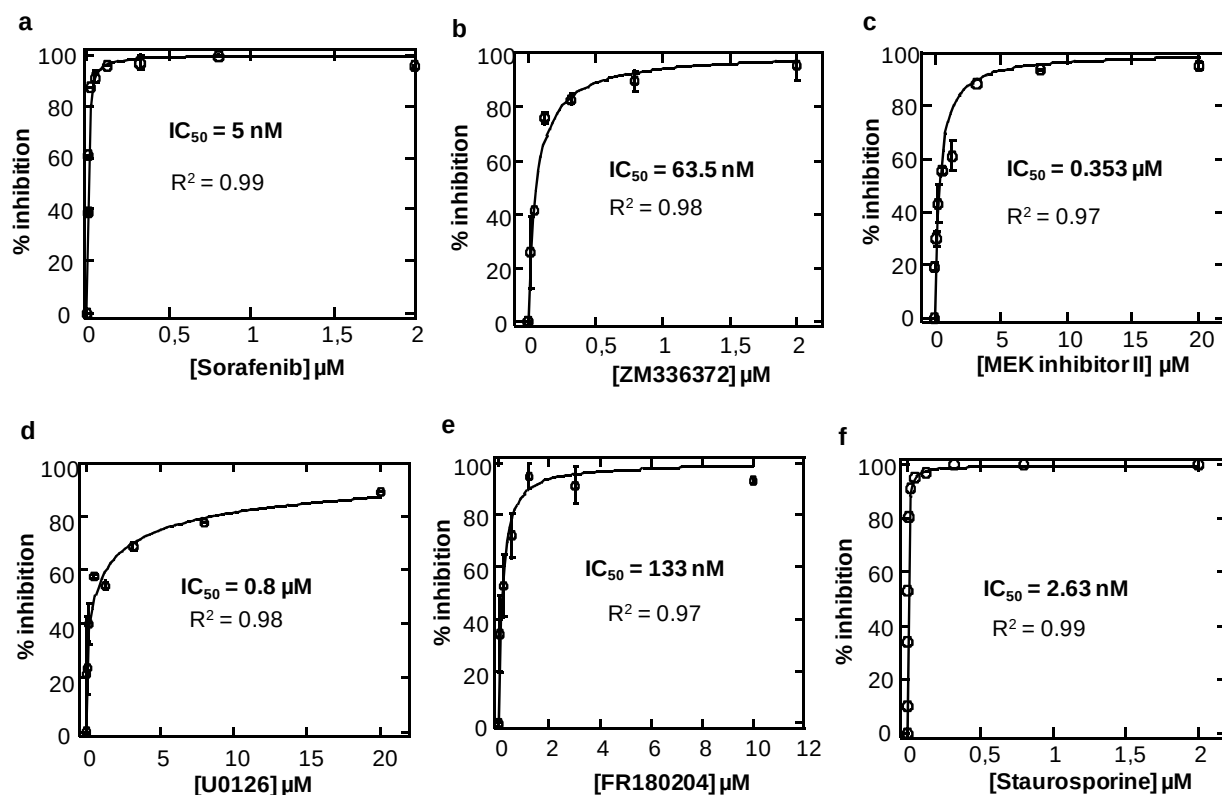


Figure 72 : Exemples de courbes d'inhibition obtenues sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode Lance Ultra™. Les courbes d'IC₅₀ ont été tracées suivant l'équation hyperbolique : % inhibition = $100 \cdot x / (IC_{50} + x)$ ou l'équation sigmoïdale : % inhibition = $(100 \cdot x)^b / (IC_{50}^b + x^b)$, b = nombre de Hill. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les solutions d'inhibiteurs sont diluées en série dans du DMSO. Les essais d'inhibition ont été réalisés selon les conditions optimales pour la triple cascade. (a) Sorafenib. (b) ZM336372. (c) MEK inhibiteur 2. (d) U0126. (e) FR180204. (f) Staurosporine.

Les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour la plupart des inhibiteurs : Sorafenib, GW5074, U0126, PD98059, FR180204 et Staurosporine sont comparables entre les différentes méthodes. Concernant les inhibiteurs Sorafenib, GW5074, U0126, PD98059, FR180204, ces valeurs sont aussi cohérentes avec celles décrites dans la littérature pour les 3 méthodes PFBA, Lance Ultra™ et Lanthascreen™. Dans la plupart des cas, nous observons une différence d'un facteur 2 à 5 entre les valeurs d'IC₅₀ mesurées et celles reportées. Ces divergences ne sont pas significatives et s'expliquent par le fait des diverses techniques ou concentrations d'enzymes, substrats, ATP utilisées par les différents auteurs.

Les travaux décrits par Vogel,³³⁹ ont montré pour la Staurosporine, des valeurs d'IC₅₀ égales à 60 nM sur la triple cascade Raf/MEK/ERK et 4 nM sur la double cascade MEK/ERK

avec la méthode LanthascreenTM. A l'issue de nos optimisations, nous avons obtenu pour la Staurosporine des valeurs d'IC₅₀ comparables comprises entre 1,1 et 2,6 nM pour les tests sur la triple cascade Raf/MEK/ERK. Par conséquent, nous avons retrouvé avec le test sur la triple cascade, la valeur d'IC₅₀ correspondant à l'inhibition directe de MEK par la Staurosporine (2,7 nM). Ainsi, ce résultat est plus cohérent que celui obtenu précédemment par l'équipe de Vogel et indique que notre optimisation du test sur la triple cascade est plus fine pour la détection des inhibiteurs de MEK.

Les valeurs d'IC₅₀ attendues ont été obtenues pour les inhibiteurs allostériques de MEK : U0126, MEK inhibitor II, PD98059 et pour l'inhibiteur ATP compétitif la Staurosporine, par conséquent, le test sur la triple cascade est le plus adapté pour la détection d'inhibiteurs de MEK qu'ils soient allostériques ou ATP compétitifs. Ce résultat s'explique par le fait que les inhibiteurs U0126, MEK inhibitor II, PD98059 ont de l'affinité pour la forme inactive de MEK-1 qui est utilisée dans le test sur la triple cascade.

Néanmoins, quelques différences entre les valeurs d'IC₅₀ mesurées et celles publiées ont été observées pour 2 inhibiteurs ZM336372 et MEK inhibiteur II avec la méthode LanthascreenTM. Concernant ZM336372, une valeur d'IC₅₀ sept fois supérieure à celle attendue a été mesurée tandis que pour MEK inhibiteur II, nous avons obtenu une valeur d'IC₅₀ cinq fois inférieure à celle attendue. Dans un premier temps, nous avons vérifié que ces différences n'étaient pas dues à des interférences avec le signal de fluorescence. Pour cela, nous avons contrôlé que ces deux produits n'absorbent pas à la longueur d'excitation (340 nm) ou n'émettent de la fluorescence dans la zone d'émission mesurée (520 nm et 495 nm) aux concentrations étudiées. Etant donné que nous n'avons pas observé d'émission ou d'absorption de fluorescence par les composés ZM336372 ou MEK inhibiteur II, nous en avons déduit que les divergences observées entre les résultats provenaient d'un phénomène d'interférence entre ces inhibiteurs et le fluorophore accepteur GFP (238 résidus) du substrat final ATF2 en raison de l'encombrement stérique généré par celui-ci. Contrairement à la méthode LanthascreenTM, aucun problème d'interférence ne fut observé avec ces deux produits selon la méthode Lance UltraTM qui utilise un fluorophore accepteur moins volumineux que le GFP (Ulight).

En conclusion, le test sur la triple cascade est le plus adapté pour détecter des inhibiteurs de MEK-1 aussi bien allostériques qu'ATP compétitifs. Bien que la méthode LanthascreenTM utilise les quantités les plus faibles d'enzymes et de substrat que les deux autres méthodes, elle s'est révélée être plus sensible aux interférences avec les

composés inhibiteurs. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser la méthode Lance UltraTM pour nos tests en routine sur la triple cascade dans le but d'identifier des inhibiteurs potentiels de MEK.

II-1.4 Evaluation de la qualité des tests

La reproductibilité et la performance des méthodes utilisées en criblage haut débit sont évaluées par un facteur qualitatif appelé facteur Z'. Les équations et la signification de ce facteur ont été reportées par l'équipe de Zang.³⁷⁴ Le facteur Z' est calculé à partir de 4 paramètres qui sont les moyennes des contrôles positifs et négatifs ainsi que les écarts types correspondant. Un test possédant un facteur Z' compris entre 0,5 et 1 est considéré comme très performant et très reproductible, par conséquent compatible avec les études d'inhibition. A titre d'exemple, nous avons calculé les facteurs Z' de nos deux principaux tests : le test direct sur Raf-1 et le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec les trois méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM. La **Figure 73** illustre les résultats obtenus pour le test direct sur Raf-1 et ses deux méthodes validées : PFBA et LanthascreenTM. Des valeurs de facteurs Z' comparables : 0,88 et 0,83 ont été obtenues pour les deux méthodes mises au point pour le test direct sur Raf-1 indiquant leur excellente reproductibilité.

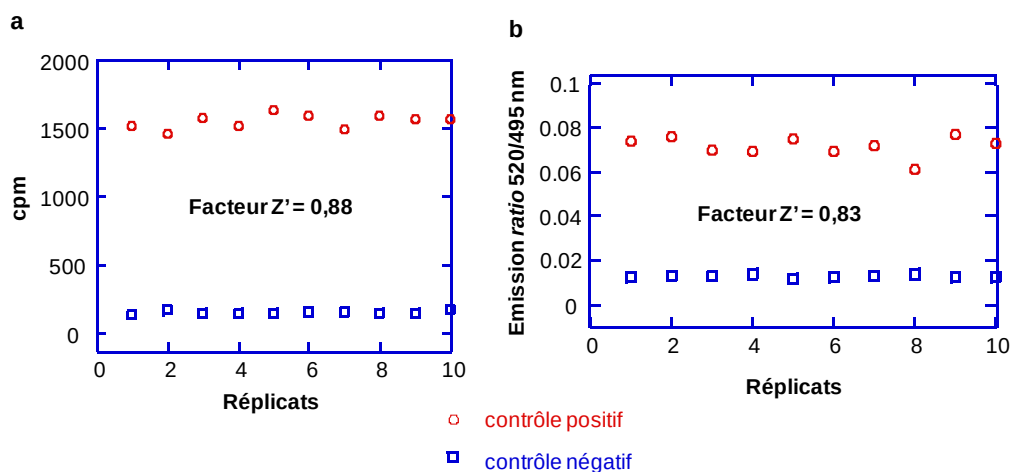


Figure 73 : Calcul du facteur Z' pour le test direct sur Raf-1. Pour chaque méthode, les contrôles positifs ont été obtenus en absence de l'inhibiteur Sorafenib, tandis que les contrôles négatifs ont été réalisés en présence de 2 μ M de Sorafenib. (a) PFBA. (b) LanthascreenTM.

³⁷⁴ Zhang J.H., Chung T.D., Oldenburg K.R.: A Simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.*, **1999**, 4, 67-73.

De même, nous avons calculé le facteur Z' pour chacune des trois méthodes validées pour le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK (**Figure 74**). D'excellentes valeurs de facteurs Z' ont été obtenues : 0,88, 0,86 et 0,87 pour les méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM respectivement. Ces résultats confirment la robustesse et la performance des méthodes mises au point sur la triple cascade, ainsi que leur compatibilité avec les mesures d'inhibition sur la voie Raf/MEK/ERK.

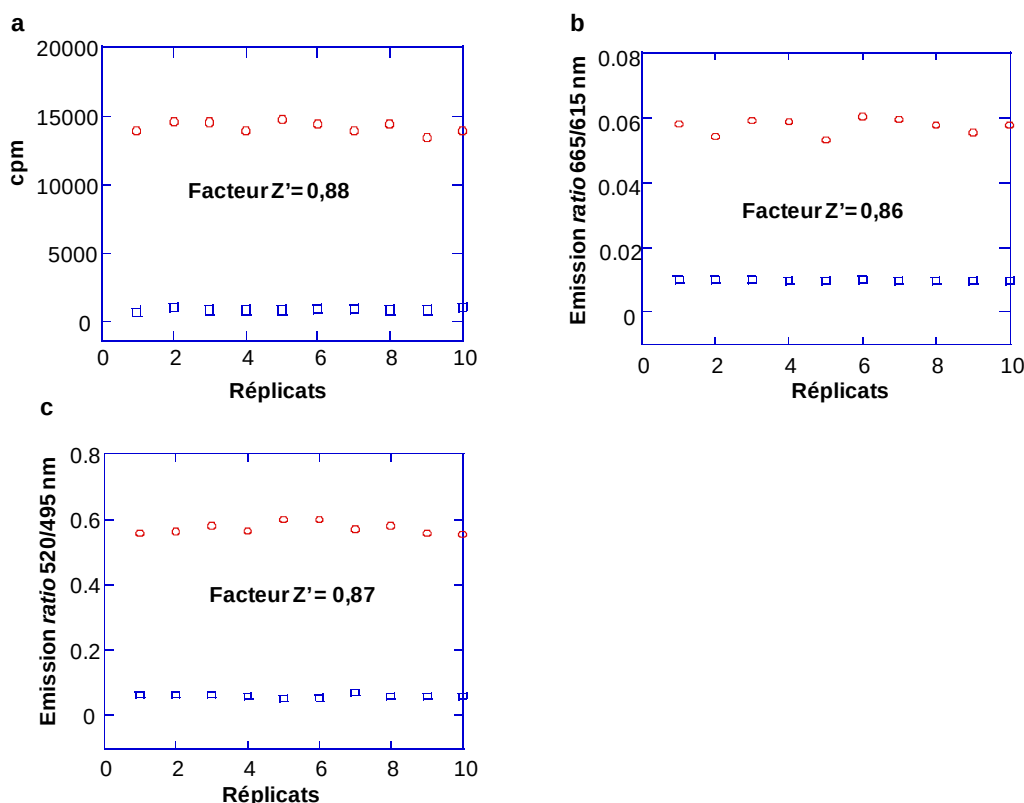


Figure 74 : Calcul du facteur Z' pour le test sur la triple cascade Raf-1/MEK/ERK. Pour chaque méthode, les contrôles positifs ont été obtenus en absence de l'inhibiteur Sorafenib, tandis que les contrôles négatifs ont été réalisés en présence de 2 μ M de Sorafenib. **(a) PFBA. (b) Lance UltraTM. (c) LanthascreenTM.**

En conclusion, pour évaluer la qualité des tests mis au point sur Raf-1 et le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK, les facteurs Z' ont été calculés pour les méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM. D'excellentes valeurs de facteurs Z' ont été obtenues indiquant une excellente reproductibilité de ces méthodes, ainsi que leur compatibilité avec les mesures d'inhibition sur Raf-1 et sur la voie Raf/MEK/ERK.

II-1.5 Evaluation des inhibiteurs synthétisés

Les deux séries de composés synthétisés au cours de la thèse ont été testées sur Raf-1 avec la méthode Lanthascreen™. La **Figure 75a** ci-dessous, illustre les courbes d'inhibition obtenues pour le produit **64**. Dans un premier temps son effet inhibiteur a été mesuré sur Raf-1 avec la méthode Lanthascreen™ (**Figure 75b**), puis mesuré avec notre méthode de référence PFBA pour comparer les deux résultats obtenus (**Figure 75c**). Enfin, nous avons testé son effet inhibiteur sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode Lance Ultra™ (**Figure 75d**) afin de savoir s'il agissait sur d'autres protéines kinases de la voie.

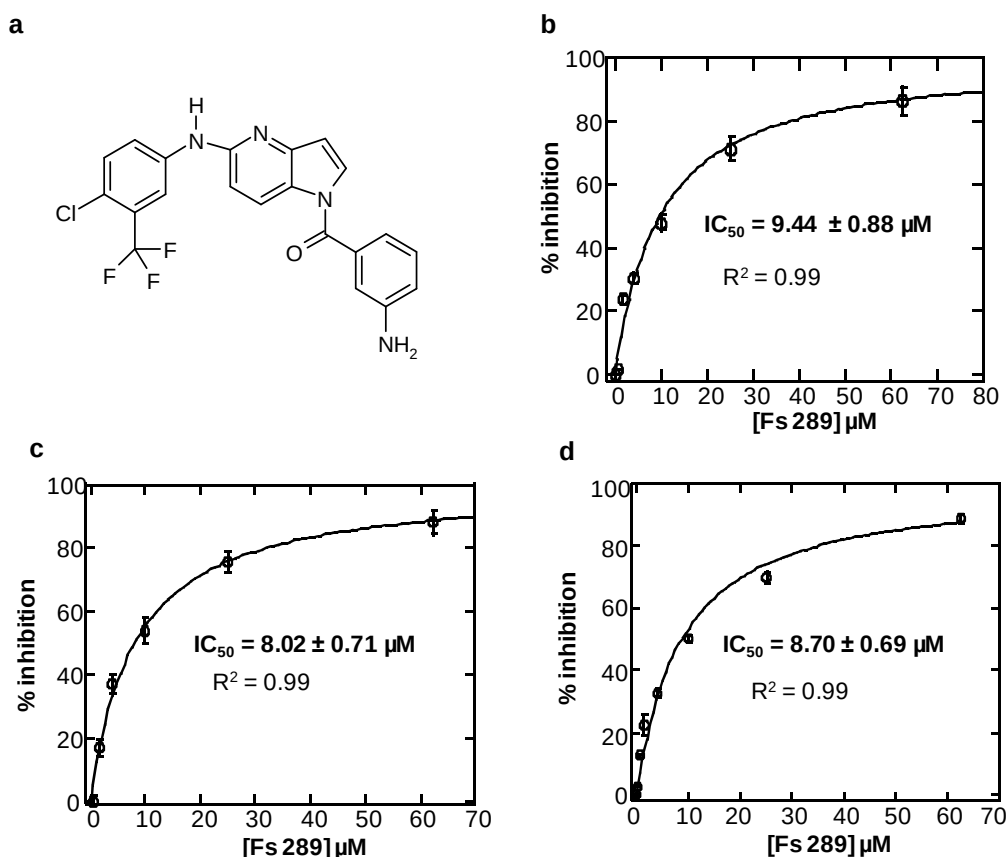


Figure 75 : Effet inhibiteur du produit synthétisé 64. (a) Formule chimique du composé 64. Les courbes d' IC_{50} ont été tracées suivant l'équation hyberbolique : $\% \text{ inhibition} = 100 * x / (IC_{50} + x)$. Les coefficients de détermination R^2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 3 essais sont indiqués. Les solutions de produit 64 ont été diluées en série dans du DMSO. **(b) Test direct sur Raf-1 avec la méthode Lanthascreen™.** **(c) Test direct sur Raf-1 avec la méthode PFBA.** **(d) Test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK avec la méthode Lance Ultra™.**

Les valeurs d' IC_{50} mesurées sur Raf-1 sont similaires pour les deux méthodes Lanthascreen™ (9,44 μM) et PFBA (8,02 μM). Elles sont aussi comparables avec la valeur obtenue pour le test sur la triple cascade (8,70 μM). Par conséquent, le produit **64** inhibe

spécifiquement Raf-1 et n'interfère pas avec les fluorophores des méthodes de TR-FRET LanthascreenTM et Lance UltraTM.

En conclusion, les tests mis au point sur Raf-1 et sur la triple cascade Raf/MEK/ERK, nous ont permis d'identifier parmi les composés synthétisés, un premier inhibiteur de Raf-1 avec une valeur d'IC₅₀ comprise entre 8 et 9 μ M. Aucune interférence avec les fluorophores des méthodes de TR-FRET LanthascreenTM et Lance UltraTM fut observée.

II-2 Etude la protéine PEBP/RKIP, inhibiteur naturel de la voie Raf/MEK/ERK

Parallèlement à l'évaluation biologique de nos composés organiques synthétisés, nous avons aussi appliqué les tests mis au point à l'étude de la protéine PEBP/RKIP inhibitrice de la voie Raf/MEK/ERK décrite comme interagissant directement avec Raf, puis MEK et ERK plus faiblement.^{306,375} Etant donné le rôle important que joue la PEBP/RKIP dans le cancer,³⁷⁶ développer des produits capables de mimer son effet serait d'un grand intérêt thérapeutique.³⁷⁷

A ce jour, seule une méthode a été décrite pour mesurer l'effet inhibiteur de PEBP/RKIP *in vitro* et consiste à mesurer la radioactivité incorporée par le substrat au cours de la réaction kinase en utilisant des gels électrophorèse soumis à une révélation par autoradiographie.^{333,306,375,376,378} Considérant l'intérêt d'avoir une méthode plus rapide et efficace pour étudier l'action de la PEBP (et ses mimes potentiels), l'effet inhibiteur de la PEBP a été mesuré sur tous nos tests mis au point et en particulier ceux développés avec les méthodes récentes de TR-FRET (Lance UltraTM et LanthascreenTM). Les tests développés avec la méthode classique PFBA nous servent de référence.

La PEBP/RKIP a été mise en solution dans les tampons kinase appropriés selon la méthode à la concentration mère de 1 mg/mL ou 50 μ M. La concentration maximale par essai est de 25 μ M quelque soit la méthode et le test. Les rapports stœchiométriques entre les kinases et PEBP/RKIP sont similaires à ceux trouvés dans plusieurs lignées cellulaires.^{376,378}

³⁷⁵ Yeung K., Janosch P., McFerran B., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W.: Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol. Cell. Biol.*, **2000**, 20, 3079-85.

³⁷⁶ Zeng L., Imamoto A., Rosner M.R.: Raf kinase inhibitory protein (RKIP): A physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2008**, 12, 1275-87.

³⁷⁷ Bonavida B., Baritaki S., Huerta-Yepez S., Vega M.I., Chatterjee D., Yeung K.: Novel therapeutic applications of nitric oxide donors in cancer: roles in chemo- and immunosensitization to apoptosis and inhibition of metastases. *Nitric Oxide*, **2008**, 19, 152-7.

³⁷⁸ Hagan S., Garcia R., Dhillon A., Kolch W.: Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods Enzymol.*, **2006**, 407, 248-59.

Les courbes d'inhibition obtenues avec la méthode de référence PFBA sont représentées dans la **Figure 76**. Ces courbes montrent que la plus forte inhibition de PEBP/RKIP est obtenue sur la triple cascade Raf/MEK/ERK (93 % d'inhibition à 25 μ M de PEBP). L'effet inhibiteur diminue sur la double cascade MEK/ERK (74 % à 25 μ M de PEBP). Il décroît encore sur les tests directs : 60 % d'inhibition de MEK-1, 56 % d'inhibition d'ERK-2 et 43 % d'inhibition de Raf-1. Par conséquent, PEBP/RKIP semble inhiber plus MEK et ERK que Raf-1. Ce résultat est en accord avec les résultats reportant que PEBP/RKIP a moins d'affinité pour la forme active de Raf-1 (celle utilisée dans les tests) que la forme inactive présente dans la cellule.³⁷⁵ De plus, il faut remarquer que toutes les formes commerciales de Raf-1 sont tronquées (306-fin) et seul le domaine catalytique est assez stable pour être purifié. Or ces mêmes travaux ont montré que PEBP/RKIP se fixerait en *N*-terminal du domaine kinase, cette partie est tronquée dans les sources commerciales de Raf.³⁷⁵ Par conséquent, il est vraisemblable que l'inhibition de PEBP/RKIP serait meilleure avec la forme entière de Raf-1 que celle observée avec la forme tronquée.

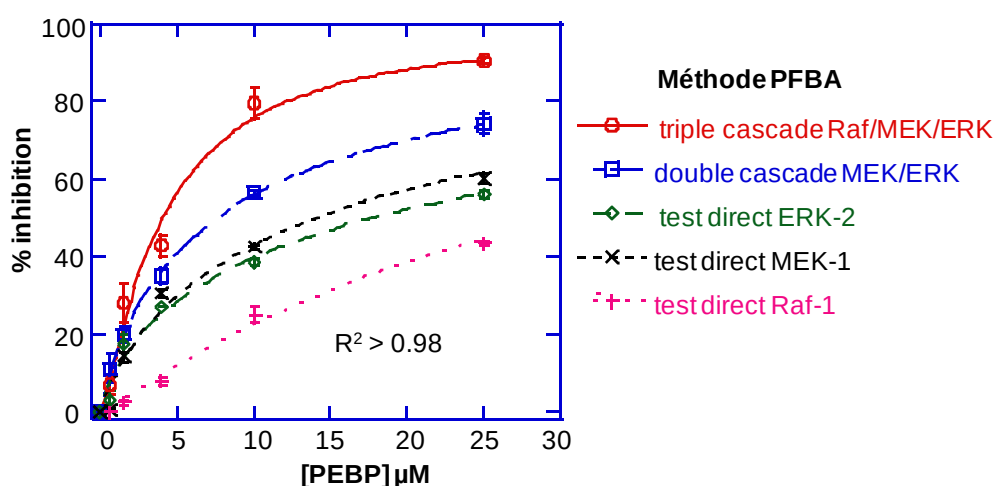


Figure 76 : Effet inhibiteur de la protéine PEBP/RKIP mesuré avec la méthode PFBA sur les trois tests directs (Raf-1, MEK et ERK), le test sur la double cascade MEK/ERK et le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK. Les courbes d' IC_{50} ont été tracées suivant l'équation sigmoïdale : $\% \text{ inhibition} = (100 \cdot x)^b / (IC_{50}^b + x^b)$, b = nombre de Hill. Les coefficients de détermination R_2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 6 essais sont indiqués.

La **Figure 77** illustre les courbes d'inhibition de PEBP/RKIP avec les deux méthodes utilisant la technologie TR-FRET : Lance UltraTM et LanthascreenTM. Les résultats obtenus pour ces deux méthodes sont en complète adéquation avec ceux obtenus avec la méthode PFBA.

Le fort effet inhibiteur observé sur la triple cascade Raf/MEK/ERK est probablement dû au fait que PEBP/RKIP agit sur les formes actives et inactives des trois kinases. Des précédents travaux avaient montré que PEBP/RKIP inhibe l'activité kinase de Raf mais aussi son activation par Ras.³⁰⁶ Nos résultats suggèrent que la protéine PEBP/RKIP inhibe l'activité catalytique et l'activation de chaque kinase de la cascade.

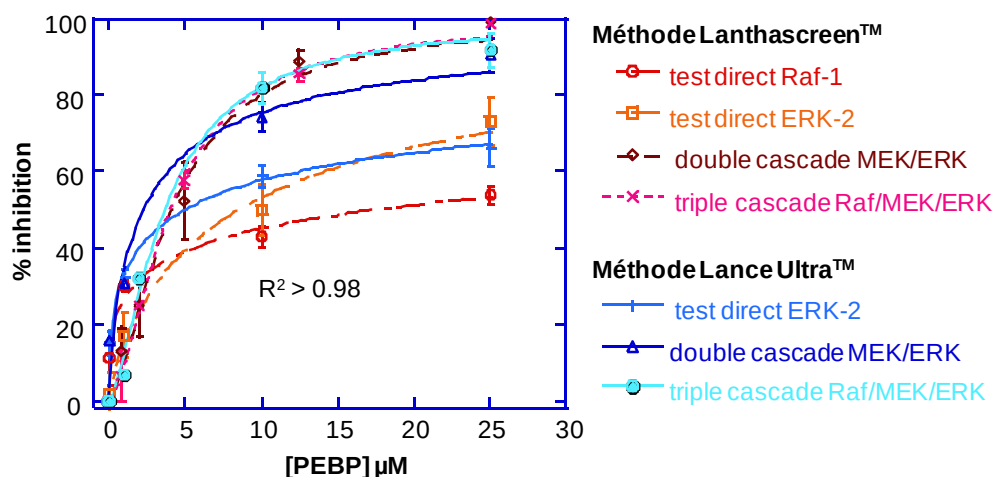


Figure 77 : Effet inhibiteur de la protéine PEBP/RKIP mesuré avec les méthodes utilisant la technologie TR-FRET : Lance Ultra™ et Lanthascreen™, sur deux tests directs (Raf-1 et ERK), le test sur la double cascade MEK/ERK et le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK. Les courbes d'IC₅₀ ont été tracées suivant l'équation sigmoïdale : % inhibition = $(100 \cdot x)^b / (IC_{50}^b + x^b)$, b = nombre de Hill. Les coefficients de détermination R_2 et les barres d'erreurs représentant l'écart type obtenus après 6 essais sont indiqués.

En conclusion, nous avons mis au point une nouvelle méthode plus facile et plus rapide utilisant la technologie TR-FRET pour mesurer l'effet inhibiteur de la protéine PEBP/RKIP sur les enzymes de la voie Raf/MEK/ERK. La mise au point de tous les tests enzymatiques, nous a permis de montrer que PEBP/RKIP inhibe *in vitro* toutes les enzymes de la voie Raf/MEK/ERK. Son effet inhibiteur augmente avec le nombre de partenaires et atteint son maximum sur la triple cascade, indiquant que PEBP/RKIP inhibe les formes inactives et les formes actives des kinases Raf, MEK et ERK. Par conséquent, ces tests pourront être appliqués à l'évaluation des futurs inhibiteurs mimant l'interaction de PEBP/RKIP avec toutes les enzymes de la voie Raf/MEK/ERK.

II-3 Activité biologique des produits synthétisés

Trente produits finaux ont été évalués *in vitro*, sur quatre protéines kinases purifiées : Raf-1, DYRK1A, CDK5 et GSK3 et sur 6 lignées de cellules cancéreuses humaines représentatives de différents organes sein, foie, poumon, prostate, côlon. Raf-1 et CDK5 sont des cibles thérapeutiques anticancéreuses tandis que DYRK1A est étudiée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. GSK3 est une cible impliquée dans les deux pathologies.

II-3.1 Activité biologique des produits substitués en position C-5 et N-1 du 4-azaindole

Les résultats concernant l'évaluation biologique de la première série de composés substitués en position C-5 et N-1 du 4-azaindole sont indiqués dans le **Tableau 32**. Les résultats des tests sur les kinases purifiées sont colorés en bleu, les valeurs d'IC₅₀ représentent les concentrations de produits conduisant à 50 % d'inhibition de l'activité enzymatique. Pour les enzymes CDK5, DYRK1A et GSK3, les composés ont été testés à une concentration maximale de 10 µM. Pour Raf-1, ils ont été testés avec une concentration maximale de 25 µM. Les résultats des tests sur les cellules sont colorés en rose et les valeurs d'IC₅₀ représentent les concentrations de produits conduisant à la mort de 50 % des cellules. Les produits ont été testés avec une concentration maximale de 25 µM. Les valeurs d'IC₅₀ inférieures à 10 µM sont indiquées en rouge.

Activité *in vitro* sur enzymes purifiées : Les produits possédant en C-5 le groupement 4-chloro-3-trifluorométhyl-phénylamine (cycle **C**) et en N-1 un groupement phénylcétone (cycle **A**) fonctionnalisés en *para* (**R1**) par des groupements accepteurs de liaison hydrogène, éther méthylique, ester, nitrile (**50**, **52**, **53**) ou donneur et accepteur de liaison hydrogène de type amide (**55**) ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis des 4 kinases testées. Le remplacement du cycle **A** par un hétérocycle azoté : la 3-chloro-4-pyridine (**57**) ou la 4-chloro-3-pyridine (**54**) n'a pas permis d'améliorer l'activité inhibitrice.

La fonctionnalisation en *méta* (**R2**) du cycle **A** notamment par des groupements accepteurs de liaison hydrogène nitrile (**56**), pyrazine (**58**) et nitro (**59**) s'est avérée inefficace sur l'activité inhibitrice des différentes kinases. Par contre pour le produit **64**, la fonctionnalisation en *méta* du cycle **A** par un groupement amino accepteur de liaison hydrogène a permis d'obtenir un début d'inhibition de Raf-1 avec une valeur d'IC₅₀ égale à

9,8 μM . La protection de la fonction amine en C-5 par le groupement Boc conduit à la perte de l'activité vis-à-vis de Raf-1 (**65**).

Activité *in vitro* sur cellules cancéreuses : Les produits **50**, **53**, **54**, **56** et **60** inactifs sur les kinases étudiées, se sont avérés avoir une activité antitumorale modérée avec des valeurs d' IC_{50} comprises entre 2 et 9 μM . Les produits **56**, **50** et **54** ont une activité cytotoxique comparable à celle de la Roscovitine et ne montrent pas de sélectivité marquée vis-à-vis d'une lignée cellulaire contrairement aux produits **53**, **60** et **64** qui sont plus sélectifs. Le produit **53** est actif sur les cellules du foie et du côlon, le produit **60** sur les cellules du poumon et **64** sur les cellules du foie. Cependant, les produits **50**, **53**, **54** et **56** sont peu sélectifs des cellules tumorales (facteur de sélectivité inférieur à 3) car ils tuent aussi 50 % des fibroblastes sains à des concentrations comprises entre 10 et 20 μM .

De façon intéressante, le produit le plus actif sur Raf-1 (**64**) est spécifiquement cytotoxique vis-à-vis des cellules de foie ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$) et peu toxique envers les cellules saines ($\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{M}$).

La comparaison du produit **53** (nitrile en *para*) et son analogue **56** (nitrile en *méta*) montre que ce dernier est plus cytotoxique et moins spécifique. La comparaison des produits **54** et **57** indique que la présence de l'azote (Y) en *méta* (**54**) améliore d'au moins un facteur 3, l'activité cytotoxique vis-à-vis de toutes les lignées.

La protection de la fonction amine en C-5 par le groupement Boc (**65**) conduit à la perte de l'activité cytotoxique. La comparaison des activités cytotoxiques entre les produits **54** et **62** montre que le remplacement du cycle C, 4-chloro-3-trifluorométhyl-phénylamine, par un groupement méthoxy entraîne la perte de l'effet cytotoxique.

En conclusion, la présence d'une fonction amine en position C-5 du noyau 4-azaindole (cycle B) ainsi que la substitution en *méta* du cycle A par un groupement accepteur ou donneur de liaison hydrogène est favorable pour l'activité cytotoxique. De plus, la fonctionnalisation en *méta* par un groupement accepteur de liaison hydrogène favorise l'activité inhibitrice de vis-à-vis Raf-1.

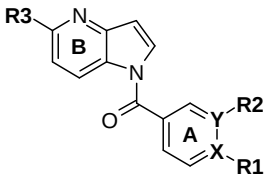
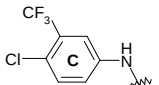
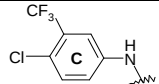
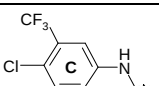
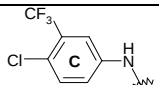
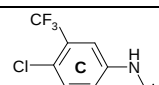
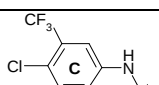
																
						$IC_{50} \mu M^a$				$IC_{50} \mu M^b$						
Produit	X	Y	R1	R2	R3	Raf-1	DYRK1A	CDK5	GSK3	Huh7	Caco	MDA-MB 231	HCT 116	PC3	NCI	fibroblaste
50	C	C	OCH ₃	H		>25	>10	>10	>10	4	8	10	6 ^c	6	6	15
52	C	C	COOCH ₃	H		>25	>10	>10	>10	>25	15	20	>25	20	>25	>25
53	C	C	CN	H		>25	>10	>10	>10	5	7	15 ^c	12 ^c	12	15	20
55	C	C	CONHEt	H		>25	>10	>10	>10	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25
57	N	C	-	Cl		>25	>10	>10	>10	15	20	>25	>25	25	>25	>25
54	C	N	Cl	-		>25	>10	>10	>10	5	3	5 ^c	5 ^c	6	6	15 ^c

Tableau 32 : Activité biologique des produits substitués en position C-5 et N-1 du 4-azaindole. ^a IC_{50} = concentration de produit conduisant à 50 % d'inhibition de l'activité enzymatique, ^b IC_{50} = concentration de produit conduisant à la mort de 50 % des cellules, ^cMort brutale des cellules. Les six lignées de cellules cancéreuses humaines sont originaires de différents organes : les seins (MDA-MB 231), le foie (Huh7), les poumons (NCI), la prostate (PC3) et le côlon (Caco et HCT 116)

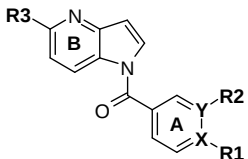
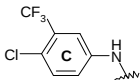
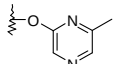
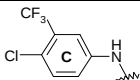
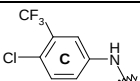
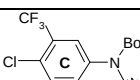
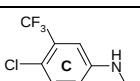
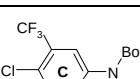
																
						$IC_{50} \mu M^a$				$IC_{50} \mu M^b$						
Produit	X	Y	R1	R2	R3	Raf-1	DYRK1A	CDK5	GSK3	Huh7	Caco	MDA-MB 231	HCT 116	PC3	NCI	fibroblaste
56	C	C	H	CN		>10	>10	>10	>10	2	5	9	5 ^c	10	7	10
58	C	C	H			>25	>10	>10	>10	20	20	>25	>25	>25	>25	>25
59	C	C	H	NO ₂		>25	>10	>10	n.d.	15	15	>25	12	20	>25	>25
60	C	C	H	NO ₂		>25	>10	>10	n.d.	20	15	25	20	8	25	>25
64	C	C	H	NH ₂		9,8	>10	>10	n.d.	3	10	>25	10	12	20	>25
65	C	C	H	NH ₂		>25	>10	>10	n.d.	12	15	15	15	>25	>25	>25
62	C	N	Cl	-	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	12	15	15	15	>25	>25	>25

Tableau 32 (suite) : Activité biologique des produits substitués en position C-5 et N-1 du 4-azaindole. ^a IC_{50} = concentration de produit conduisant à 50 % d'inhibition de l'activité enzymatique, ^b IC_{50} = concentration de produit conduisant à la mort de 50 % des cellules, ^cMort brutale des cellules. Les six lignées de cellules cancéreuses humaines sont originaires de différents organes : les seins (MDA-MB 231), le foie (Huh7), les poumons (NCI), la prostate (PC3) et le côlon (Caco et HCT 116)

II-3.2 Activité biologique des produits substitués en position C-5 et C-2 du 4-azaindole

Les résultats concernant l'évaluation biologique de la deuxième série de composés substitués en position C-5 et C-2 du 4-azaindole sont indiqués dans le **Tableau 33**. Le même code couleur que le tableau précédent a été conservé.

Activité *in vitro* sur enzymes purifiées : Pour synthétiser la deuxième série de composés, nous avons fait varier les groupements **R1**, **R2**, **R3** et le lien **X** (**Tableau 33**). Les produits sont *N*-protégés ou non par le groupement phénylsulfonyl (**R1**), le lien (**X**) entre le cycle **A** et le cycle **B** est soit un alcool secondaire soit une cétone. Le cycle **A** est soit un phényle ou une 3-pyridine fonctionnalisée en *para* par différents types de groupements (**R2**) un brome, un nitrile ou un amide. Concernant le groupement en C-5 (**R3**), il s'agit soit d'un méthoxy soit d'un hétérocycle, la 3-pyridine. Nous avons aussi déprotégé le groupement 5-méthoxy des produits **72**, **75**, **83**, **84** conduisant aux produits **74**, **76**, **85**, **86** permettant d'introduire un groupement donneur/ accepteur de liaison hydrogène. Malgré nos efforts pour exemplifier cette série, aucun produit ne s'est avéré actif vis-à-vis de Raf-1.

Activité *in vitro* sur cellules cancéreuses : Les produits **11**, **80**, **72**, **74**, **68**, **79** inactifs sur les kinases testées, montrent une activité antitumorale intéressante avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 1,2 et 8 µM. La meilleure activité cytotoxique est obtenue avec le produit **11** avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du µM pour les cellules du sein et du côlon.

La comparaison des produits **69** et **72** montre que l'oxydation du lien alcool en cétone augmente d'au moins un facteur 5 la cytotoxicité vis-à-vis des cellules du foie, du côlon, du sein et du poumon. Le phénomène inverse est observé pour les produits **68** et **71** où le dérivé alcool **68** est le plus cytotoxique, cependant, il est peu sélectif vis-à-vis des cellules tumorales.

La déprotection de l'azote indolique *N*-1 a entraîné la chute du pouvoir cytotoxique des produits **74** et **68** (comparaisons **74** et **85**, **68** et **81**).

Dans le cas des produits **11**, **72**, **79**, la déprotection de l'azote permet de changer le profil de sélectivité du produit vis-à-vis des lignées cellulaires (comparaisons **11** et **80**, **72** et **83**, **78** et **79**).

La comparaison des produits **84** et **79** indique que la fonctionnalisation du sommet C-5 par une pyridine a permis d'augmenter l'activité cytotoxique par rapport au groupement 5-méthoxy. De façon intéressante, le produit **79** inhibe spécifiquement la prolifération des cellules du colôn Caco et ne présente pas de toxicité vis-à-vis des cellules saines.

La déprotection du groupement 5-méthoxy n'a pas permis d'améliorer l'activité cytotoxique (74, 85, 76, 86).

En conclusion, malgré nos efforts aucun produit de la série 2 ne s'est avéré actif vis-à-vis des kinases étudiées. Cependant des activités cytotoxiques intéressantes de l'ordre du μM ont été obtenues pour les cellules du sein (MDA-MB 231) et du côlon (Caco). Mais à ce stade, il n'est pas possible d'établir une relation claire entre la structure des produits et leur activité biologique. Des études complémentaires sont actuellement en cours sur deux des produits les plus cytotoxiques : 64 (série 1) et 11 (série 2) en collaboration avec l'équipe de Christaine Guillouzo pour tenter de comprendre leur mécanisme d'action au niveau cellulaire et d'identifier la ou leurs cible(s).

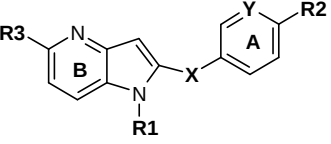
																
						$IC_{50} \mu M^a$				$IC_{50} \mu M^b$						
Produit	X	Y	R1	R2	R3	Raf-1	DYRK1A	CDK5	GSK3	Huh7	Caco	MDA-MB 231	HCT 116	PC3	NCI	fibroblaste
11	CO	C	SO ₂ Ph	H	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	3	1,2	1,5	>25	3	5	10
80	CO	C	H	H	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	20	3	15	5	12	25	>25
69	CHOH	N	SO ₂ Ph	Br	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	10	15	>25	12	>25	>25	>25
72	CO	N	SO ₂ Ph	Br	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	2	5	8	10	10	4	12
83	CO	N	H	Br	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	>25	12	>25	5	>25	>25	>25
74	CO	N	SO ₂ Ph	Br	OH	>25	>10	>10	n.d.	6	8	12	12	15	5	20
85	CO	N	H	Br	OH	>25	>10	>10	n.d.	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
68	CHOH	C	SO ₂ Ph	CN	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	4	6	20	2	>25	>25	5
71	CO	C	SO ₂ Ph	CN	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	15	12	20	>25	25	>25	>25
81	CHOH	C	H	CN	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
82	CO	C	H	CN	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

Tableau 33 : Activité biologique des produits substitués en position C-5 et C-2 du 4-azaindole. ^a IC_{50} = concentration de produit conduisant à 50 % d'inhibition de l'activité enzymatique, ^b IC_{50} = concentration de produit conduisant à la mort de 50 % des cellules. Les six lignées de cellules cancéreuses humaines sont originaires de différents organes : les seins (MDA-MB 231), le foie (Huh7), les poumons (NCI), la prostate (PC3) et le côlon (Caco et HCT 116)

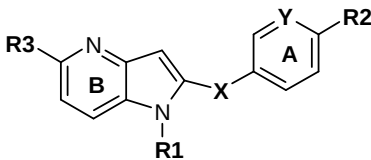
																
						IC ₅₀ μM ^a				IC ₅₀ μM ^b						
Produit	X	Y	R1	R2	R3	Raf-1	DYRK1A	CDK5	GSK3	Huh7	Caco	MDA-MB 231	HCT 116	PC3	NCI	fibroblaste
75	CO	C	SO ₂ Ph	NHCOCH ₃	OCH ₃	>25	n.d.	n.d.	n.d.	>25	>25	>25	>25	20	>25	>25
76	CO	C	SO ₂ Ph	NHCOCH ₃	OH	>25	n.d.	n.d.	n.d.	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25
84	CO	C	H	NHCOCH ₃	OCH ₃	>25	>10	>10	n.d.	>25	12	>25	20	>25	>25	>25
86	CO	C	H	NHCOCH ₃	OH	>25	>10	>10	n.d.	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
78	CO	C	SO ₂ Ph	NHCOCH ₃		>25	>10	>10	n.d.	20	25	>25	25	>25	>25	>25
79	CO	C	H	NHCOCH ₃		>25	>10	>10	n.d.	>25	5	>25	25	>25	>25	>25

Tableau 33 (suite) : Activité biologique des produits substitués en position C-5 et C-2 du 4-azaindole. Les six lignées de cellules cancéreuses humaines sont originaires de différents organes : les seins (MDA-MB 231), le foie (Huh7), les poumons (NCI), la prostate (PC3) et le côlon (Caco et HCT 116)

III/ Synthèse de peptides issus de Raf-1 pour l'étude de l'interaction Raf/PEBP

Afin d'élucider le mécanisme moléculaire d'inhibition de Raf par la PEBP, nous avons entrepris la synthèse de 3 peptides de 19 résidus correspondant à la région (331-349) de Raf-1 qui est phosphorylée lors de l'activation de la voie de signalisation. Il s'agit des peptides notés **P1** à **P3** (**Figure 78**). Ces peptides serviront pour l'étude de leur interaction avec PEBP/RKIP par RMN et par spectrométrie de masse. Le but est de comparer la liaison entre le peptide non phosphorylé **P1** et les peptides phosphorylés **P2** et **P3** pour identifier précisément les résidus de la PEBP impliqués dans l'interaction. Ces peptides ont été synthétisés au sein de l'équipe d'Agnès Delmas au CBM.

P1 : RPRGQRDSSYYWEIEASEV P2 : RPRGQRDpSSYpYWEIEASEV P3 : RPRGQRDpSpSYpYWEIEASEV
--

Figure 78 : Peptides synthétisés (pS = sérine phosphorylée, pY = tyrosine phosphorylée)

III-1 Synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc

La synthèse des trois peptides **P1**, **P2**, **P3** a été réalisée dans des conditions classiquement utilisées en synthèse peptidique. Nous avons utilisé la synthèse sur support solide (SPPS, Solid-Phase Peptide Synthesis) en stratégie Fmoc (9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl).

Le bon déroulement de la synthèse peptidique dépend du choix de la résine selon sa polarité et ses caractéristiques physiques. Elle doit présenter une bonne solvation dans les solvants organiques employés au cours de la synthèse. La résine doit gonfler et être bien perméable pour exposer tous les sites aux réactifs de synthèse. Elle doit aussi être résistante aux conditions d'agitation. Il existe différents types de résine par exemple de la moins polaire à la plus polaire : la résine PS, PEG-PS, PEGA.

Le premier acide aminé est lié de façon covalente à la résine par l'intermédiaire d'un bras ou « linker ». Le choix du bras se fait en fonction de l'extrémité C-terminale désirée pour le peptide (acide, amide, ester, alcool). Il existe différents types de bras compatibles avec la stratégie Fmoc, les plus fréquemment utilisés sont les bras HPMA ou Rink pour avoir une

terminaison acide ou amide respectivement (**Figure 79**). La fonction acide de ces bras est greffée facilement à des amino-méthyle résines par exemple PS ou PEGA (**Figure 80**).

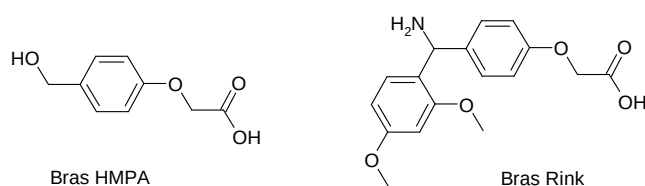


Figure 79 : Exemples de bras utilisés en SPPS

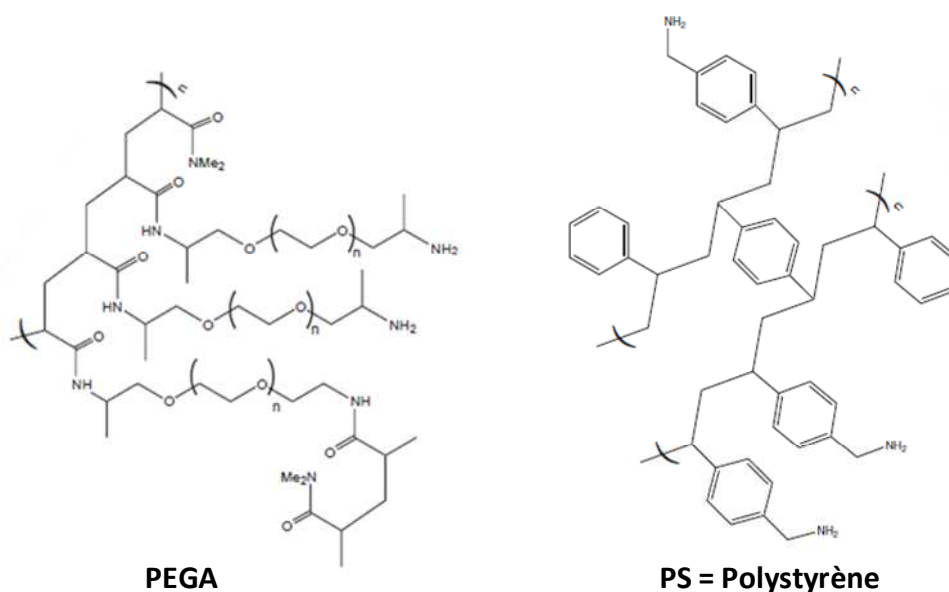


Figure 80 : Amino-méthyle résines utilisées pour la synthèse des peptides P1, P2, P3

Le principe de la synthèse sur support solide en stratégie Fmoc est détaillé dans la **Figure 81**. L'élongation de la chaîne peptidique se fait de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. La réaction de couplage peptidique permet de former la liaison peptidique (CONH) entre l'acide aminé 1 (**AA 1**) et l'acide aminé 2 (**AA 2**). Cette réaction de couplage a lieu entre l'extrémité NH_2 libre (non protégée) de l'**AA 1** et l'extrémité acide (COOH) de l'**AA 2**. La stratégie Fmoc implique l'utilisation d'acides aminés protégés au niveau de leur extrémité N-terminale par le groupement Fmoc. Ce groupement est ensuite coupé en condition basique par exemple en utilisant la pipéridine 20% dans le DMF (**Schéma 44**).

Les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par des groupements sensibles au milieu acide. Les groupements protecteurs les plus couramment utilisés sont :

- Le groupe *tert*-butyle pour la sérine, la thréonine, la tyrosine, l'acide aspartique et l'acide glutamique ;
- Le groupe trityle pour la cystéine, l'asparagine, la glutamine et l'histidine ;
- Le groupe Boc pour la lysine et le tryptophane ;
- Le groupe Pbf pour l'arginine.

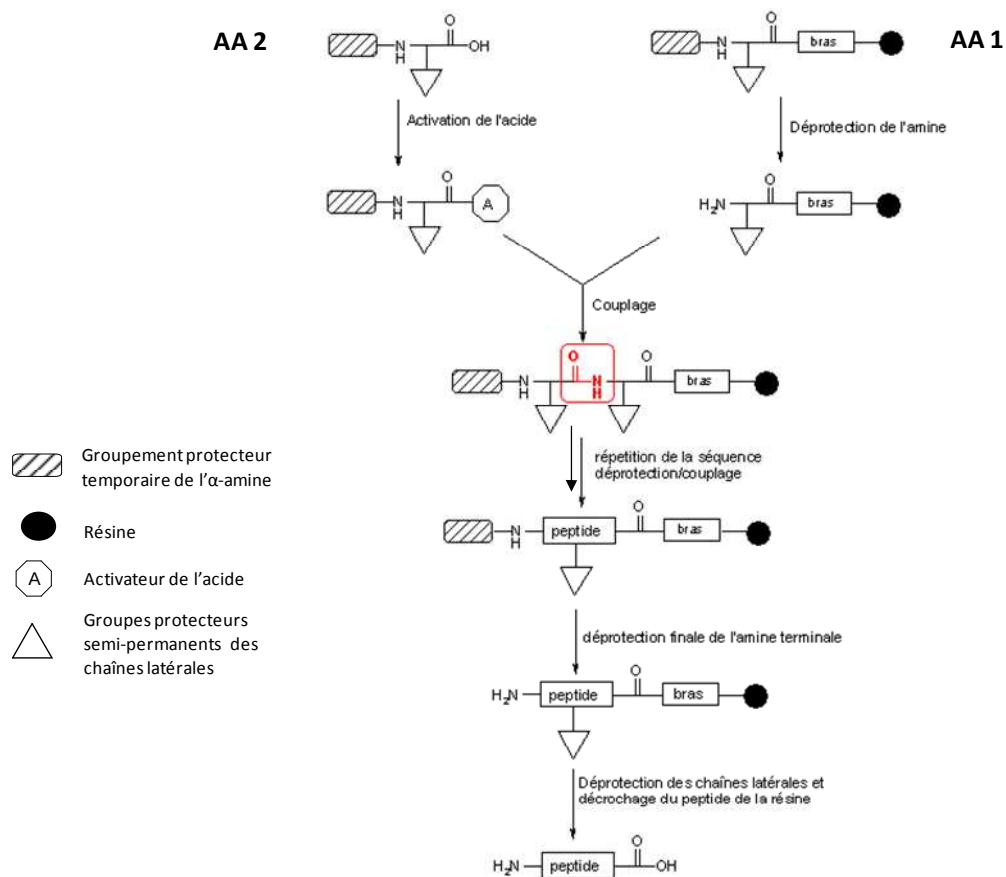


Figure 81 : Principe de la synthèse peptidique sur support solide

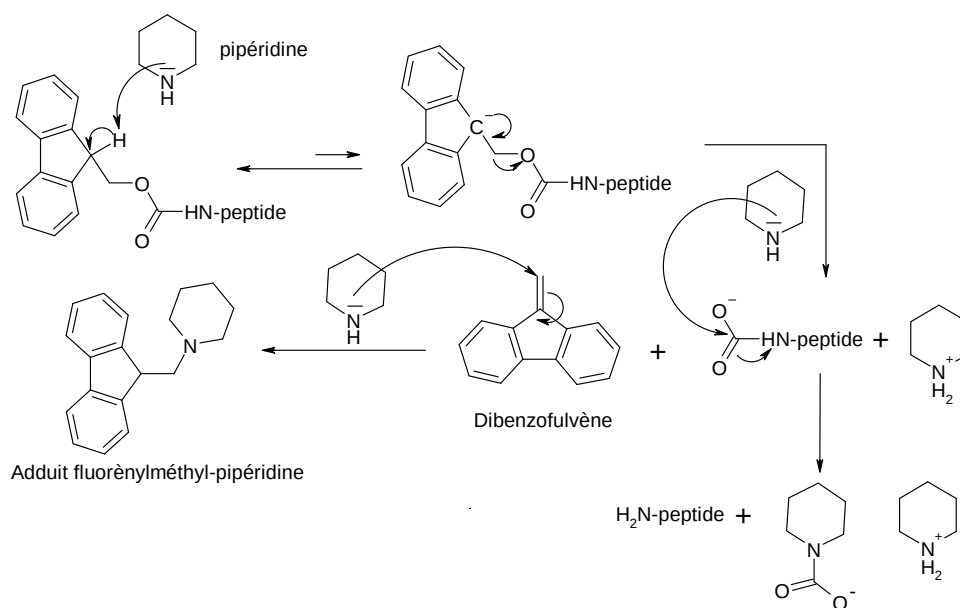


Schéma 44 : Déprotection du groupement Fmoc par la pipéridine

La réaction de couplage nécessite l'activation de la fonction acide en fonction ester activée pour favoriser l'attaque nucléophile de l'extrémité NH_2 . Parmi les agents de couplage les plus couramment utilisés en SPPS, on peut citer : le DCC/HOBt, l'HBTU et l'HATU. HBTU et HATU existent sous deux formes isomères uronium et aminium. La forme aminium est majoritaire en présence d'amine tertiaire (**Schéma 45**).³⁷⁹

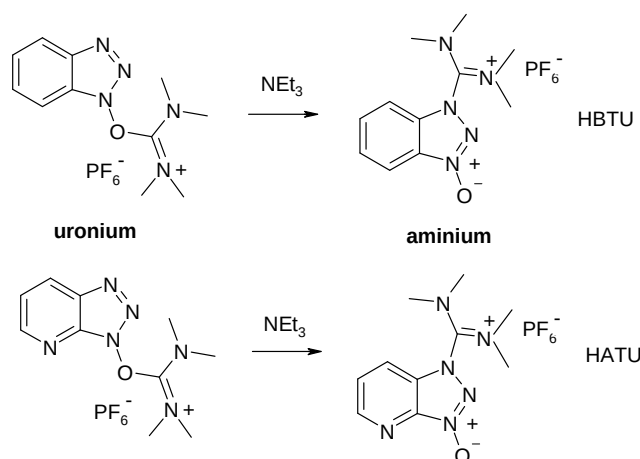


Schéma 45 : Formes uronium et aminium des agents de couplage HBTU et HATU.

Au cours de la réaction de couplage, l'acide carboxylique de l'**AA 2** préalablement déprotonné par la DIPEA va attaquer le carbone électrophile du sel d'aminium d'HBTU ou

³⁷⁹ Carpino L.A., Imazumi H., El-Faham A., Ferrer F.J., Zhang C., Lee Y., Foxman B.M., Henklein P., Hanay C., Mügge C., Wenschuh H., Klose J. Beyermann M., Bienert M.: The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 441-45.

d'HATU pour donner un intermédiaire très réactif de type *O*-isoacyluronium qui va se faire rapidement attaquer par l'oxyanion de HOBT, pour donner un ester activé. Cet ester va ensuite se faire attaquer par l'extrémité NH₂ libre de l'AA **1** pour former la liaison peptidique (**Schéma 46**). Plusieurs cycles déprotection/couplage peptidique sont effectués jusqu'à la synthèse totale du peptide.

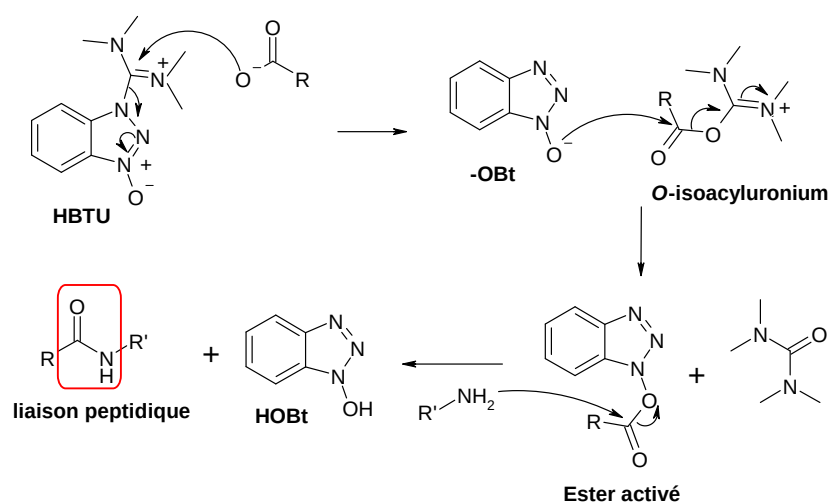


Schéma 46 : Mécanisme du couplage peptidique induit par HBTU

L'étape finale réalisée en milieu acide (TFA) permet la déprotection des chaînes latérales et le décrochage du peptide de la résine. Cette étape nécessite d'utiliser un cocktail de « scavengers » qui piègent les carbocations libérés au cours de la déprotection des chaînes latérales (**Figure 82**). En effet, les carbocations sont de puissants agents alkylants électrophiles pouvant réagir avec les groupements nucléophiles des chaînes latérales de certains acides aminés tels que la tyrosine ou le tryptophane. Nous avons utilisé 85 % de TFA en présence d'un mélange de « scavengers » composé d'eau, de phénol et de TIS dans un rapport 5:5:5.³⁸⁰

³⁸⁰ Solé N.A., Barany G.: Optimization of Solid-Phase Synthesis of [Ala8]-dynorphin A. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 5399-403.

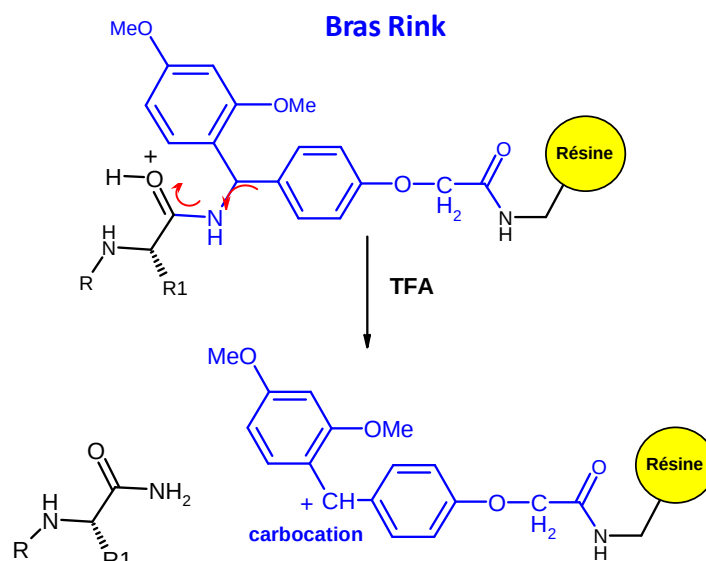


Figure 82 : Déprotection finale au TFA

XI-2 Stratégies de synthèse pour les peptides multiphosphorylés

La synthèse des peptides multiphosphorylés représente un challenge au niveau de leur synthèse chimique, leur purification et leur analyse par spectrométrie de masse.^{381,382}

En ce qui concerne la synthèse des peptides multiphosphorylés, deux stratégies chimiques sont utilisées : 1) la synthèse globale où les résidus sont phosphorylés à la fin de la synthèse, 2) l'approche « building block » où sont incorporés dans la synthèse les résidus phosphorylés. Nous avons opté pour la deuxième approche qui est plus adaptée à la synthèse de peptides multiphosphorylés.

Les résidus phosphorylés (sérine, tyrosine, thréonine) sont commercialisés sous plusieurs formes (**Figure 83**) : mono-protégé sous forme de mono benzyl diester, di-protégé sous forme de di benzyl triester ou non protégé.

³⁸¹ McMurray J.S., Coleman D.R., Wang W., Campbell M.L.: *Biopolymers*, **2001**, 60, 3-31.

³⁸² O'Brien-Simpson N.M., Attard T.J., Loganathan A., Huq N.L., Cross K.J., Riley P.F., Reynolds E.C.: Synthesis and Characterisation of a multiphosphorylated phosphophoryn repeat motif; H-[Asp-(Ser(P))₂]₃-Asp-OH. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2007**, 13, 469-78.

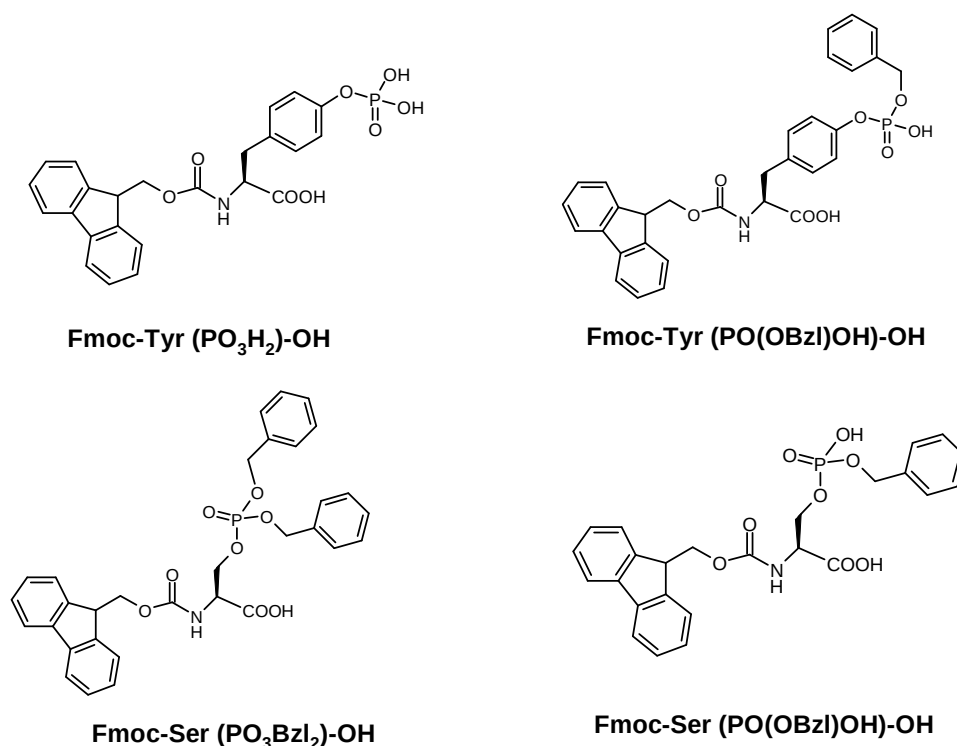


Figure 83 : Formes commerciales des résidus sérine et tyrosine phosphorylés

En 1994, les travaux d'Ottinger *et al.* ont montré que l'utilisation du résidu tyrosine phosphorylé non protégé induit la formation de pyrophosphate lorsque les 2 tyrosines phosphorylées sont consécutives.³⁸³ D'autres travaux ont observé une réaction secondaire de β -élimination conduisant à la perte du groupement phosphate du résidu sérine en présence de pipéridine lors de l'utilisation du résidu sérine phosphorylé di-protégé sous forme de di-benzyl triester ce qui rendait ce résidu incompatible avec la stratégie Fmoc.³⁸⁴ Par la suite d'autres auteurs ont montré que l'utilisation du résidu sérine mono-protégé sous forme de mono benzyl diester supprime la réaction secondaire en présence de pipéridine.³⁸⁵

Perich *et al.* ont montré que la réaction de couplage peptidique impliquant les résidus phosphorylés mono-protégés serine, thréonine et tyrosine était performante en présence d'HBTU/DIPEA.³⁸⁶ De plus en cas de synthèse difficile, ils ont montré que l'utilisation d'HATU au lieu de HBTU pouvait encore améliorer le rendement de couplage.

³⁸³ Ottinger E.A., Shekels L.L., Bernlohr D.A., Barany G.: Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides and their use as substrates for protein tyrosine phosphatases. *Biochemistry*, **1993**, 32, 4354-61.

³⁸⁴ Lacombe J.M., Andriamanampisoa F., Pavia A.A.: Solid-phase synthesis of peptides containing phosphoserine using phosphate tert.-butyl protecting group. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1990**, 36, 275-80.

³⁸⁵ Wakamiya T., Saruta K., Yasuoka J., Kusumoto S.: An efficient procedure for solid-phase synthesis of phosphopeptides by the Fmoc strategy. *Chemistry Letters*, **1994**, 1099-102.

³⁸⁶ Perich J.W., Edeb N.J., Eagleb S., Brayb A.M.: Synthesis of phosphopeptides by the Multipin_ method: Evaluation of coupling methods for the incorporation of Fmoc-Tyr(PO₃Bzl,H)-OH, Fmoc-Ser(PO₃Bzl,H)-OH and Fmoc-Thr(PO₃Bzl,H)-OH. *Lett. Pept. Sci.*, **1999**, 6, 91-7.

Pour toutes ces raisons, nous avons utilisé pour nos synthèses les résidus serine et tyrosine mono-protégés sous forme de mono benzyl diester (Fmoc-Tyr (PO(OBzl)OH)-OH et Fmoc-Ser (PO(OBzl)OH)-OH) et comme agents d'activation HBTU ou HATU selon les difficultés observées.

Pour ne pas apporter de charges supplémentaires, ces peptides ont été acétylés en *N*-terminal et se termine par une fonction amide.

Les peptides ont été purifiés par HPLC en phase inverse (RP-HPLC) puis analysés par spectrométrie de masse sur un appareil MALDI-TOF autoflex Brucker. Les peptides ont été synthétisés soit de manière automatisée *via* le synthétiseur de peptide (ABI 433A, Applied Biosystems) soit manuellement étape par étape.

III-3 Synthèse du 19mères non phosphorylé P1

Le **Tableau 34** ci-dessous résume les différentes conditions testées pour la synthèse du peptide **P1** non phosphorylé. Il indique les conditions utilisées concernant la synthèse (manuelle ou automatique), la méthode de couplage (simple ou double couplage), les agents de couplage, la résine, le temps de la réaction de clivage final au TFA et le résultat de la synthèse estimée par le pourcentage d'élongation de la chaîne peptidique.

On entend par simple couplage, le fait de réaliser la réaction de couplage une fois avant l'étape de déprotection du groupement Fmoc. Lorsqu'on réalise un double couplage, on effectue la réaction de couplage 2 fois avant de déprotéger le groupement Fmoc. Cette précaution permet d'améliorer le rendement de la réaction en cas de couplage difficile. Le synthétiseur de peptide utilise 10 équivalents d'acides aminés, d'HBTU et d'HOBT pour les réactions de couplage.

Stratégie	Méthode de synthèse / Méthode de couplage	Agents de couplage	Résine	Temps de clivage	Résultat % d'élongation
1	automatique / simples couplages	HBTU/HOBt (10 éq.)	PS	3 h	16 ^a
2	automatique / simples couplages	HBTU/HOBt (10 éq.)	PEGA	3 h	68 ^b

^aUn mélange de produits non purifiable a été obtenu. ^bLe bon peptide a pu être isolé.

Tableau 34 : Stratégies de synthèse du peptide P1 et résultats obtenus

Le pourcentage d'élongation de la chaîne peptidique se calcule en mesurant l'absorbance à 301 nm de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine (**Schéma 44**) libéré lors de la déprotection du Fmoc. Le pourcentage d'élongation est obtenu en faisant le rapport entre l'absorbance à 301 nm après la déprotection du dernier AA et l'absorbance à 301 nm après la déprotection du premier AA.

Le premier essai de synthèse du peptide **P1** lancé avec la résine polystyrène apolaire et uniquement avec des simples couplages, a donné un mauvais rendement d'élongation de 16 %. L'analyse du brut réactionnel par HPLC a montré un mélange de plusieurs peptides tronqués non purifiable. Les difficultés d'élongation apparaissent au niveau du résidu E₃₄₅ avec une première chute de 50 % au niveau de l'élongation, cette diminution se poursuit jusqu'au dernier résidu additionné R₃₃₁. Cette chute du rendement d'élongation peut s'expliquer par le fait que le peptide se structure à l'intérieur de la résine ce qui rend difficile son élongation ou par le fait qu'il se replie car trop polaire par rapport à la résine trop hydrophobe.

Pour remédier à cela, nous avons relancé une synthèse automatique avec uniquement des simples couplages en remplaçant la résine PS (polystyrène) par la résine PEGA plus polaire et connue pour améliorer la synthèse de « séquence difficile ».³⁸⁷ L'utilisation de cette résine a permis d'obtenir un bien meilleur pourcentage d'élongation de 68 %. Cependant une chute du rendement d'élongation apparaît au milieu de la synthèse à partir du résidu D₃₃₇. Par conséquent, nous sommes dans un cas de synthèse difficile avec probablement un peptide structuré. Néanmoins, cette stratégie nous a permis d'isoler le bon peptide (MH⁺ = 2369,11).

III-4 Synthèse du 19mères diphosphorylé P2

Pour la synthèse du peptide diphosphorylé, nous avons découpé le peptide en 3 parties : A, B, C (**Figure 84**). Les parties A (V₃₄₉-W₃₄₂) et C (D₃₃₇-R₃₃₁) ont été synthétisées automatiquement. La partie B (pY₃₄₁-pS₃₃₈) a été synthétisée manuellement pour faciliter et contrôler l'introduction des résidus phosphorylés en utilisant pour la réaction de couplage : 3 équivalents d'HATU, 3 équivalents d'AA et 6 équivalents de DIPEA dans le DMF, 2 h à température ambiante. D'après les résultats obtenus pour le peptide **P1**, nous avons utilisé la résine PEGA et nous avons programmé des doubles couplages pour certains résidus pour

³⁸⁷ Cremer G.A., Tariq H., Delmas A.F.: Combining a polar resin and a pseudo-proline to optimize the solid-phase synthesis of a "difficult sequence". *J. Pept. Sci.*, **2006**, 12, 437-42.

éviter les chutes du rendement d'élancement en cours de synthèse. Le **Tableau 35** résume les différentes stratégies utilisées pour la synthèse du peptide **P2**.

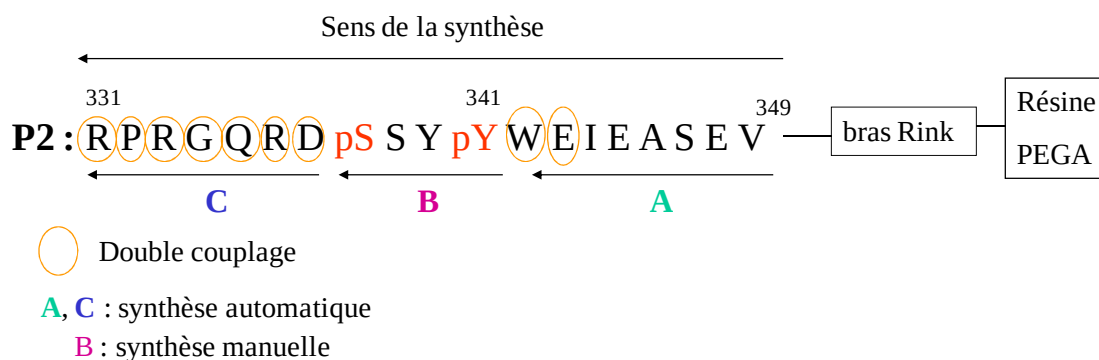


Figure 84 : Stratégie de synthèse du peptide diphosphorylé P2. La numérotation des résidus correspond à leur position dans la séquence de Raf-1

Pour la première stratégie, nous avons programmé des doubles couplages pour les résidus E₃₄₃, W₃₄₂, D₃₃₇, R₃₃₆ et Q₃₃₅. Cette stratégie a conduit à la formation d'un peptide diphosphorylé tronqué N-acétylé Q₃₃₅-V₃₄₉ (MH⁺ = 2062,81) due à une forte chute du rendement d'élancement après le résidu Q₃₃₅.

Stratégie	Méthode de synthèse / Méthode de couplage	Agents de couplage	Résine	Temps de clivage	Résultat % d'élancement
1	Automatique et manuelle / doubles couplages (E ₃₄₃ , W ₃₄₂ , D ₃₃₇ , R ₃₃₆ , Q ₃₃₅)	HBTU/HOBt (10 éq.)	PEGA	6h, t.a.	0 ^a
2	Automatique et manuelle / doubles couplages (E ₃₄₃ , W ₃₄₂ , D ₃₃₇ , R ₃₃₆ , Q ₃₃₅ , G ₃₃₄ , R ₃₃₃ , P ₃₃₂ , R ₃₃₁)	HBTU/HOBt (10 éq.)	PEGA	nuit, t.a.	79 ^b

^aSeul le peptide tronqué N-acétylé 335-345 a été isolé. ^bLe bon peptide a été isolé.

Tableau 35 : Stratégies de synthèse du peptide diphosphorylé P2 et résultats obtenus

Par conséquent, la deuxième stratégie a été d'étendre les doubles couplages jusqu'à la fin de la synthèse c'est à dire pour les résidus : E₃₄₃, W₃₄₂, D₃₃₇, R₃₃₆, Q₃₃₅, G₃₃₄, R₃₃₃, P₃₃₂, R₃₃₁. Cette stratégie nous a permis d'isoler le peptide désiré **P2** (MH⁺ = 2529,09) avec un bon rendement d'élancement de 79 %.

Concernant la déprotection finale au TFA, la présence de résidus phosphorylés protégés par des groupements benzyles, nécessite d'allonger le temps de la réaction. Même après 6 h de clivage au TFA, il reste encore un peu de peptide benzylé. Par conséquent, pour déprotéger tous les groupements benzyles, la réaction de clivage a été réalisée sur la nuit à température ambiante.

III-5 Synthèse du 19mères triphosphorylé P3

Pour la synthèse du triphosphorylé, nous avons découpé le peptide en 2 parties : A et B (**Figure 85**). La partie A (V₃₄₉-W₃₄₂) a été synthétisée automatiquement. La partie B (pY₃₄₁-R₃₃₁) a été synthétisée manuellement en utilisant pour la réaction de couplage : 5 équivalents d'HATU, 5 équivalents d'AA et 10 équivalents de DIPEA dans le DMF, 2 h à température ambiante. Des doubles couplages ont été effectués pour les résidus : E₃₄₃, W₃₄₂, pS₃₃₈ et D₃₃₇.

La réaction de clivage au TFA a été réalisée sur la nuit à température ambiante. Cette stratégie nous a permis d'isoler le bon peptide **P3** (MH⁺ = 2609,05) avec un bon rendement d'élongation de 75 %.

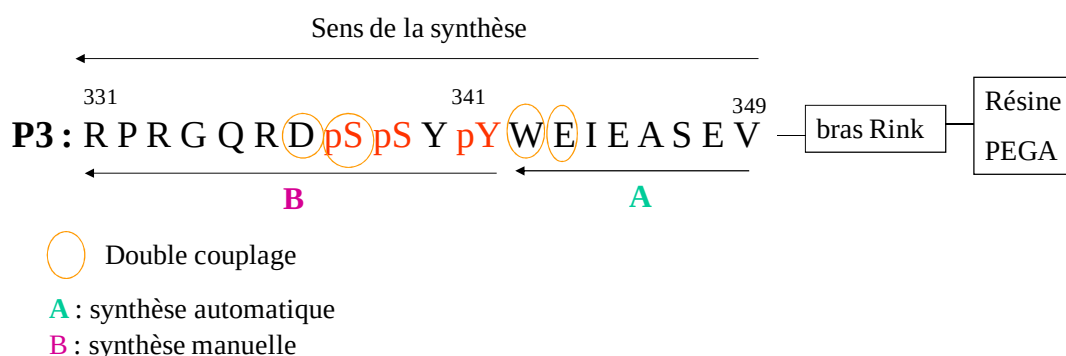


Figure 85 : Stratégie de synthèse du peptide triphosphorylé P3. La numérotation des résidus correspond à leur position dans la séquence de Raf-1

III-6 Purification des peptides P1, P2, P3

Pour les 3 peptides, nous avons rencontré des difficultés de solubilisation du brut réactionnel en milieu acide (pH 2,0) dans le système de solvants **A/B**=95/5 à 1 mg/mL de peptide avec **A** = H₂O/TFA 0,1 % et **B** = acétonitrile/TFA 0,1 %. Néanmoins, ce système de solvant nous a permis de purifier les peptides **P1** et **P2** contrairement au peptide **P3**. Pour le

peptide **P3**, la solubilité à pH 2,0 est encore plus difficile car il possède 3 groupements phosphates.

III-6.1 Purification du peptide P1

La **Figure 86** représente le chromatogramme obtenu pour l'analyse en RP-HPLC du peptide brut **P1** dissous en condition acide H₂O/TFA 0,1 % en présence de 5 % d'acétonitrile/TFA 0,1 %. Seuls les pics représentant au moins 10 % du brut réactionnel ont été prélevés puis analysés par spectrométrie de masse. Le pic 1 largement majoritaire correspond au peptide désiré (**Tableau 36**). Les autres pics 2 et 3 correspondent à des peptides tronqués acétylés.

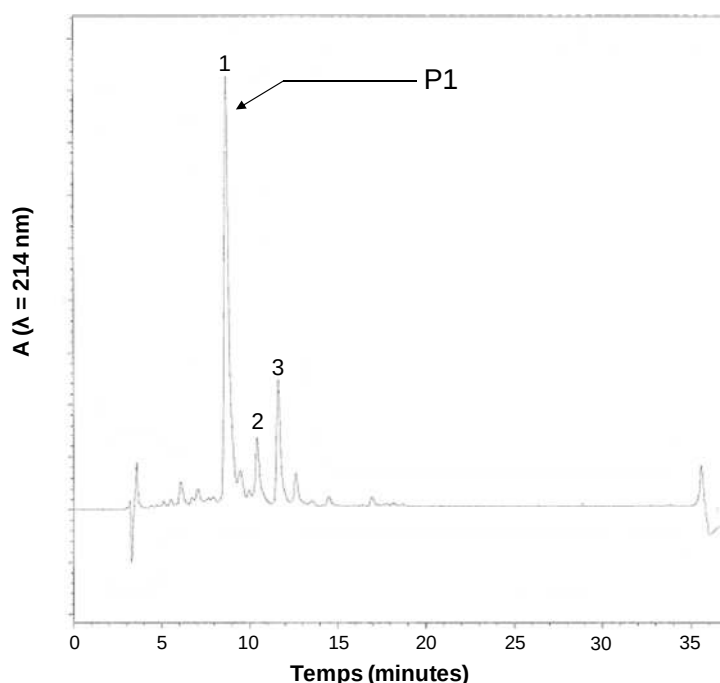


Figure 86 : Chromatogramme en RP-HPLC analytique du peptide P1 brut. Colonne C18 ; éluants : A = H₂O/TFA 0,1 %, B = acétonitrile/TFA 0,1 % ; gradient linéaire : 25 à 40 % de B en 30 minutes à 1 mL/min.

	Temps de rétention (minutes)	Aire du pic (%)	Masse observée	Séquence peptidique
Pic 1	8,63	56,1	2369,11 [M+H] ⁺	N-Ac-331-349 (P1)
Pic 2	10,43	9,7	1774,77 [M+H] ⁺	N-Ac-336-349
Pic 3	11,62	17,1	1640,71 [M+Na] ⁺	N-Ac-337-349

Tableau 36 : Analyse des pics prélevés au cours de la chromatographie du peptide brut P1

III-6.2 Purification du peptide diphosphorylé P2

La **Figure 87** illustre le chromatogramme obtenu par analyse en HPLC phase inverse du peptide brut **P2** dissous en condition acide H₂O/TFA 0,1 % en présence de 5 % d'acétonitrile/TFA 0,1 %. Seuls les pics représentant au moins 10 % du brut réactionnel ont été prélevés puis analysés par spectrométrie de masse. Le pic 1 largement majoritaire correspond au peptide désiré (**Tableau 37**). Le pic 2 correspond à son analogue monophosphorylé.

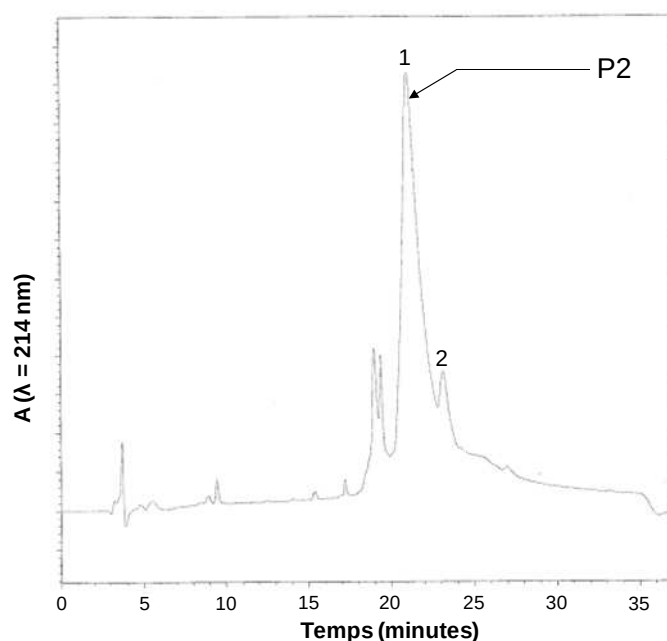


Figure 87 : Chromatogramme en RP-HPLC analytique du peptide brut P2. Colonne C18 ; éluants : A = H₂O/TFA 0,1 %, B = acétonitrile/TFA 0,1 % ; gradient linéaire : 5 à 65 % de B en 30 minutes à 1 mL/min.

	Temps de rétention (minutes)	Aire du pic (%)	Masse observée	Séquence peptidique
Pic 1	20,97	65,4	2516,16 [M+H] ⁺	N-Ac-331-349 diphosphorylé (P2)
Pic 2	23,12	20,6	2449,10 [M+H] ⁺	N-Ac-331-349 monophosphorylé

Tableau 37 : Analyse des pics prélevés au cours de la chromatographie du peptide brut P2

III-6.3 Purification du peptide triphosphorylé P3

La **Figure 88** correspondant au chromatogramme de la partie soluble du peptide brut **P3** en milieu acide, montre 3 pics majoritaires. L'analyse de chacun des pics par spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier le bon peptide.

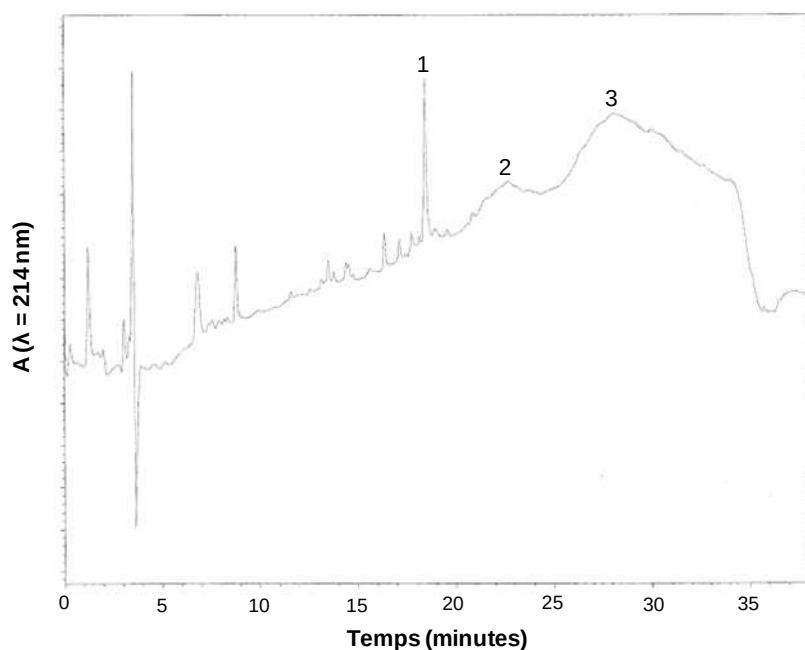


Figure 88 : Chromatogramme en RP-HPLC analytique du peptide brut P3 solubilisé à pH 2,0 avec un mélange H₂O/TFA 0,1 % : acétonitrile (95:5). Colonne C18, éluants : A = H₂O/TFA 0,1 % et B = acétonitrile/TFA 0,1 % ; gradient linéaire : 5 à 65 % de B pendant 30 minutes à 1 mL/min.

Le peptide **P3** n'étant pas soluble en condition acide, nous l'avons solubilisé à pH basique dans une solution aqueuse à pH 7,6 de bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Nous avons observé une très bonne solubilité du peptide à pH 7,6. Nous avons ensuite confirmé par spectrométrie de masse de la présence du bon peptide **P3** dans le mélange peptide brut.

Trois conditions ont été testées pour analyser le peptide **P3** brut en solution dans le bicarbonate d'ammonium : **1**) à pH 2,0 avec les solvants **A** (H₂O/TFA 0,1 %) et **B** (acétonitrile/TFA 0,1 %) ; **2**) à pH 8,0 avec les solvants **A** (H₂O/TEAA 0,1 M pH 8,0) et **B** (acétonitrile/ TEAA 0,1 M pH 8,0) (TEAA = Triéthylammonium acétate) ; **3**) à pH 6,6 avec les solvants **A** (H₂O/acétate d'ammonium 0,1 M pH 6,6) et **B** (acétonitrile/acétate d'ammonium 0,1 M pH 6,6).

La **Figure 89** illustre le chromatogramme obtenu pour le peptide brut **P3** solubilisé à pH 7,6 puis chromatographié en condition acide à pH 2,0. Ce chromatogramme est

complètement différent par rapport à celui représenté en **Figure 88** où le peptide **P3** a été solubilisé à pH 2,0. L'analyse des différents pics notés de 1 à 3 par spectrométrie de masse a montré l'existence du bon peptide dans chacun des pics ce qui indique une mauvaise séparation des produits dans le système d'éluant utilisé.

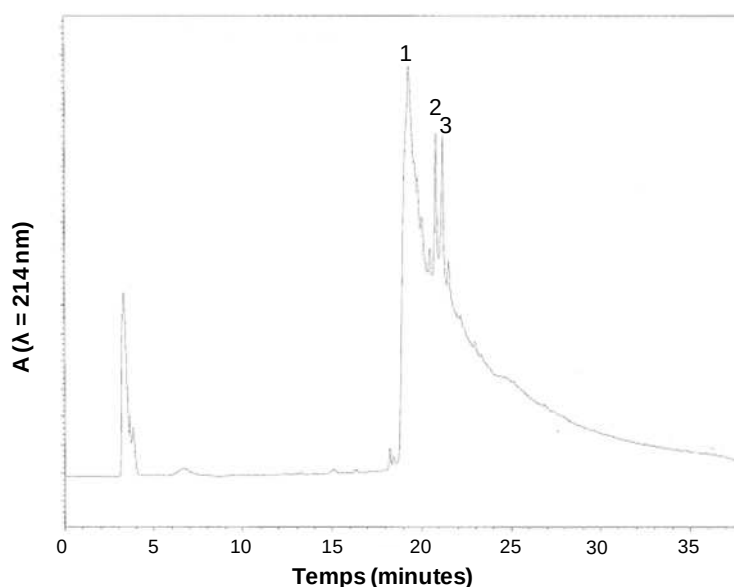


Figure 89 : Chromatogramme en RP-HPLC analytique du peptide brut P3 solubilisé à pH 7,6 en présence de bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Colonne C18 ; éluants : A = H₂O/TFA 0,1 % et B = acétonitrile/TFA 0,1 % ; gradient linéaire : 5 à 65 % de B pendant 30 minutes à 1 mL/min.

L'analyse du peptide brut **P3** solubilisé à pH 7,6 puis chromatographié en condition basique avec les solvants **A** (H₂O/TEAA 0,1 M pH 8,0) et **B** (acétonitrile/ TEAA 0,1 M pH 8,0) montre un chromatogramme bien résolu (**Figure 90**). Seuls les pics représentant au moins 10 % du brut réactionnel ont été prélevés puis analysés par spectrométrie de masse. Le pic 1 largement majoritaire correspond au peptide désiré **P3** (**Tableau 38**). Cependant l'utilisation de l'acétate de triéthylammonium (TEAA) nécessite une étape supplémentaire de dessalage avant l'étape de lyophilisation.

Pour éviter cette étape, nous avons testé une troisième condition qui utilise l'acétate d'ammonium qui est un sel plus volatile que le TEAA. La **Figure 91** illustre le chromatogramme obtenu dans ces conditions. De même que pour les conditions précédentes à pH 8,0, les conditions de purification à pH 6,6 ont permis d'obtenir un chromatogramme bien résolu. Seuls les pics représentant au moins 10 % du brut réactionnel ont été prélevés puis analysés par spectrométrie de masse. Le pic 3 largement majoritaire correspond au peptide désiré **P3**. Le peptide **P3** a été lyophilisé sans étape de dessalage.

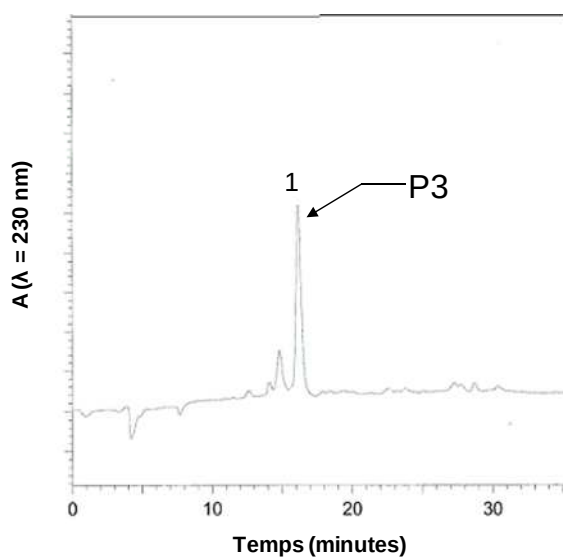


Figure 90 : Chromatogramme en RP-HPLC semi-préparative du peptide brut P3 en condition basique (pH 8,0). Colonne C8 ; éluants : A = H_2O /TEAA 0,1 M pH 8,0 ; B : acétonitrile/TEAA 0,1 M pH 8,0 ; gradient linéaire : 5 à 20 % de B pendant 30 minutes à 3 mL/min.

	Temps de rétention (minutes)	Aire du pic (%)	Masse observée	Séquence peptidique
Pic 1	16,13	85,4	2609,15 $[\text{M}+\text{H}]^+$	N-Ac-331-349 (P3)

Tableau 38 : Analyse des pics prélevés au cours de la chromatographie du peptide brut P3 à pH 8,0

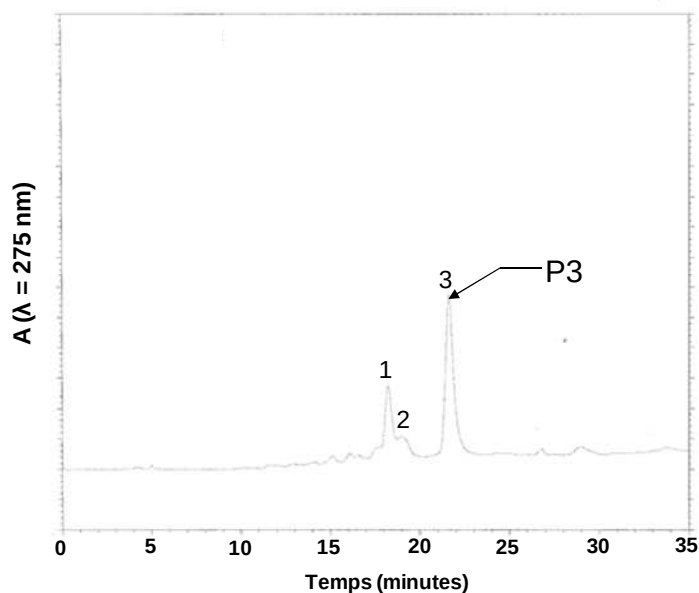


Figure 91 : Chromatogramme en RP-HPLC semi-préparative du peptide brut P3 obtenu à pH 6,6. Colonne C8 ; éluants : A = H_2O /acétate d'ammonium 0,1 M pH 6,6 ; B : acétonitrile/acétate d'ammonium 0,1 M pH 6,6 ; gradient linéaire : 0 à 15 % de B pendant 30 minutes à 3 mL/min.

	Aire du pic (%)	Temps de rétention (minutes)	Masse observée $[M+H]^+$	Séquence peptidique
Pic 1	27,5	17,53	2609,15	n.d.
Pic 2	10,3	17,71	2255,95	n.d.
Pic 3	62,2	20,21	2609,15 $[M+H]^+$	N-Ac-331-349 (P3)

n.d. = non déterminé

Tableau 39 : Analyse des pics prélevés au cours de la chromatographie du peptide brut P3 à pH 6,6

En conclusion, nous avons mis au point avec succès la synthèse et la purification des trois peptides de 19 résidus correspondants à la séquence R₃₃₁-V₃₄₉ de Raf-1. Le peptide P1 est non phosphorylé, le peptide P2 diphosphorylé et le peptide P3 triphosphorylé. Les trois peptides ont été obtenus avec une pureté de plus de 95 % pour permettre leur analyse en RMN avec la PEBP. Le peptide P3 s'est avéré le plus difficile à purifier puisque seulement des conditions basiques ont permis de l'isoler. L'ensemble de ce travail fera l'objet d'une publication.

Chapitre III

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chapitre III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I/ Synthèses chimiques

Pour remédier à la suractivation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK observée dans 30 % des cancers chez l'homme, nous avons choisi d'inhiber la protéine kinase Raf-1. Pour y parvenir, deux stratégies ont été étudiées ; premièrement, la synthèse de molécules inhibitrices de l'activité kinase et deuxièmement, la synthèse de peptides issus de Raf-1 pour l'étude de l'interaction Raf/PEBP afin de concevoir des mimes peptidiques de son inhibiteur naturel, la PEBP ou RKIP.

La première approche nous a conduit à concevoir des inhibiteurs de Raf-1 possédant un cycle central original 4-azaindole en prenant pour modèle le mode d'interaction entre Raf et l'inhibiteur Sorafenib. Notre but était d'obtenir des inhibiteurs plus sélectifs vis-à-vis de Raf que le Sorafenib. Notre stratégie a consisté 1) à utiliser le noyau 4-azaindole comme hétérocycle central **B**, 2) à greffer le cycle **C** du Sorafenib en position C-5 du 4-azaindole, 3) à positionner alternativement le cycle aromatique **A** en position N-1, C-2 ou C-3 du noyau 4-azaindole et 4) à fusionner la fonction urée du Sorafenib. Pour atteindre ces objectifs, nous avons optimisé avec succès deux nouvelles méthodologies pour fonctionnaliser le noyau 4-azaindole régiosélectivement au niveau du sommet C-2 par des réactions de lithiation d'une part et au niveau du sommet C-5 par des réactions de couplage pallado-catalysées d'autre part (**Figure 92**). Récemment, ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Tetrahedron*.³⁸⁸ La fonctionnalisation du sommet C-3 du noyau 4-azaindole par des réactions d'échange halogène-métal est encore en cours d'optimisation.

La fonctionnalisation du sommet C-2 s'est faite selon une réaction de lithiation suivie de la condensation de différents électrophiles. Nos travaux constituent la première étude exhaustive sur la réactivité du dérivé lithié en C-2 du 4-azaindole *N*-protégé **6** vis-à-vis de divers électrophiles (aldéhydes, chlorures d'acides, méthylchloroformate, DMF, chlorure de triméthylsilyle, chlorure de tributylétain et le triméthylborate). Les rendements de condensations sont bons (62-95 %) sauf avec les chlorures d'acides (32-51 %).

³⁸⁸ Saab F., Bénéteau V., Schoentgen F., Mérour J-Y., Routier S.: Convenient access to C-2 or C-5 substituted 4-azaindole derivatives. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 102-10.

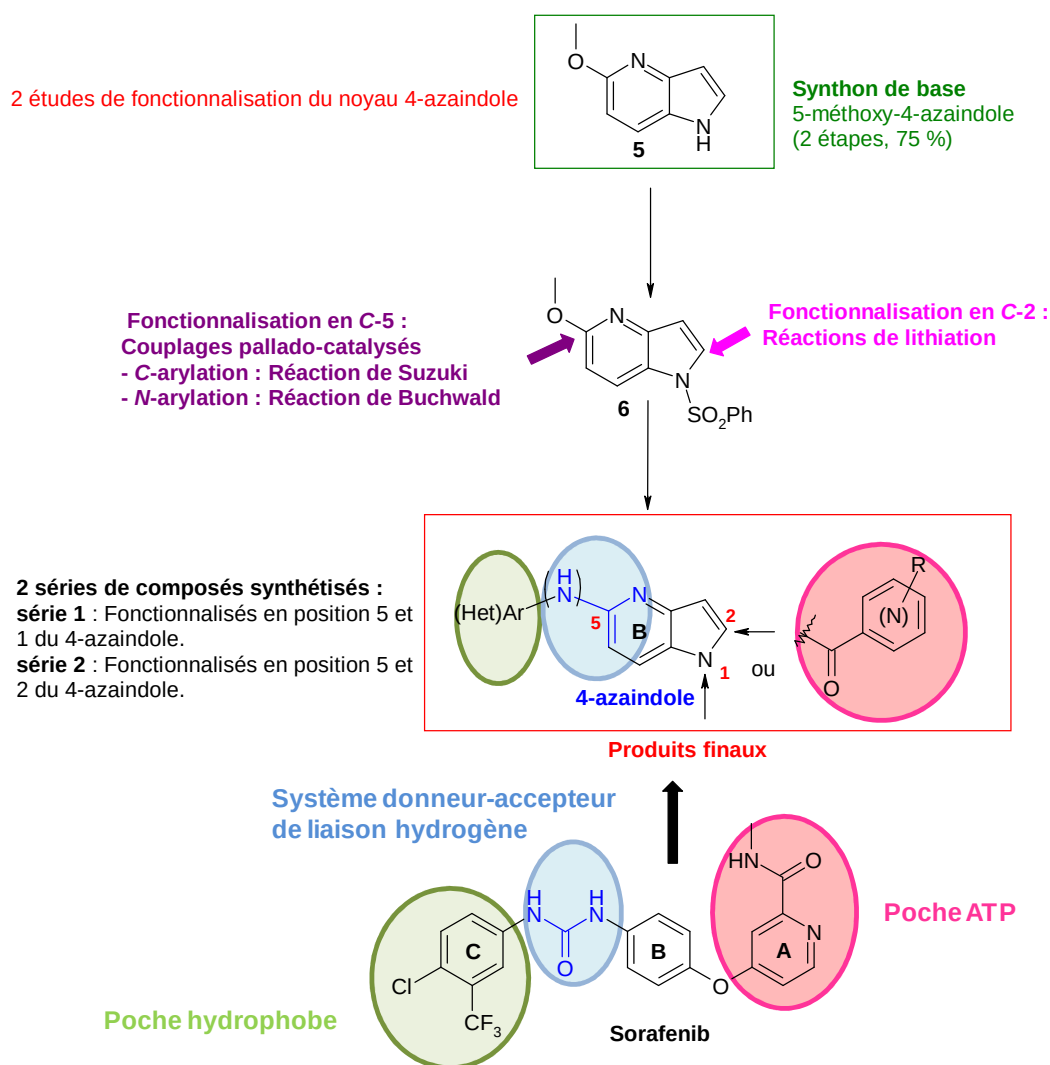


Figure 92 : De l'élaboration du pharmacophore à la synthèse des produits finaux

Concernant la fonctionnalisation du sommet C-5, la stratégie de synthèse a consisté à former un dérivé triflate en C-5 puis à l'engager dans les réactions de couplages catalysées au palladium de type Suzuki pour les C-arylations et de type Buchwald pour les N-arylations.

De très bons rendements ont été obtenus pour les couplages de Suzuki quelque soit les acides boroniques engagés dans la réaction : aromatiques, hétéroaromatiques, monosubstitués en *ortho*, *para* ou *méta*, disubstitués ou trifluoroborate de potassium (BF₃K). La seule limite fut observée avec des acides boroniques très encombrés.

De même, la N-arylation du sommet C-5 s'est avérée très efficace pour le couplage des amines primaires aromatiques et hétéroaromatiques, des amines secondaires, des amides aromatiques et aliphatiques, des carbamates, des urées et des imines.

Par conséquent, les réactions choisies pour fonctionnaliser les sommets C-2 et C-5 du noyau 4-azaindole sont très efficaces pour introduire de la diversité fonctionnelle, elles sont donc très utiles pour la conception de molécules à fort potentiel biologique.

Par la suite, ces études de réactivité ont été particulièrement appliquées à la synthèse d'inhibiteurs potentiels de Raf-1. Une première voie de synthèse multi étapes à partir du synthon **6** a permis de synthétiser avec succès une première série de composés disubstitués en N-1 et C-5 du noyau 4-azaindole. Ces produits sont fonctionnalisés en N-1 par un groupement hétéroaryle ou aryle cétone substitué en *para* ou *méta* par des groupements variables électrodonneurs, électroattracteurs ou accepteurs et/ou donneurs de liaison hydrogène dans le but d'interagir avec la poche ATP de Raf-1 et mimer le cycle **A** du Sorafenib. Pour mimer le cycle **C** du Sorafenib, la majorité des produits possède le substituant 4-chloro-3-trifluorométhyl-phénylamine accroché au sommet C-5 *via* la méthodologie mise au point pour les N-arylations.

Une deuxième voie de synthèse multi étapes à partir du synthon **6** a permis d'obtenir la seconde série de composés en appliquant la méthodologie mise au point sur les réactions de lithiation en C-2. Les produits synthétisés sont substitués en position C-2, C-5 et/ou en N-1 du noyau 4-azaindole. La première étape de synthèse est la réaction de lithiation en C-2 suivie de la condensation de différents aldéhydes aromatiques pour accrocher le cycle **A**. Cette étape permet d'introduire de la diversité fonctionnelle au niveau du sommet C-2 dans le but d'interagir avec la poche ATP de Raf-1. Pour accrocher le cycle **C**, la méthodologie mise au point sur les N-arylations a été appliquée notamment pour introduire le cycle 3-pyridinyle.

Concernant la réactivité du sommet C-3, nous avons initié une étude méthodologique sur la réaction d'échange halogène-métal pour fonctionnaliser le sommet C-3 à partir du dérivé iodé **89**. Pour introduire le cycle **A** avec un lien cétone, la réaction d'échange est suivie de l'addition d'un aldéhyde aromatique comme électrophile (**Figure 93**). Nous avons montré que l'échange iode-lithium était très rapide avec une durée de moins de 5 minutes à - 78°C et nous avons observé environ 15 à 20 % d'isomérisation du lithien de la position C-3 à la position C-2. Par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires pour optimiser la réaction d'échange et étudier la réactivité du dérivé lithié en position C-3 vis-à-vis de différents électrophiles.

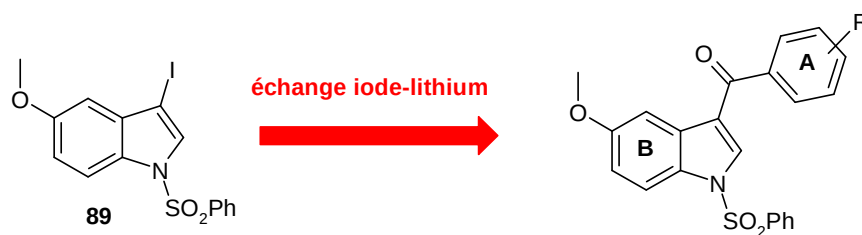


Figure 93 : Fonctionnalisation du sommet C-3 du noyau 4-azaindole par une réaction d'échange halogène-métal

II/ Tests d'activité enzymatique

Afin de détecter de nouveaux inhibiteurs de la voie Raf/MEK/ERK parmi les composés synthétisés, nous avons optimisé et validé des tests d'activité *in vitro* sur chaque enzyme de la voie et sur la voie entière. Ces tests sont maintenant disponibles pour l'ensemble des chimistes du Cancérôpole Grand Ouest.

Pour mettre au point des tests kinases fiables et rapides, notre choix s'est porté sur la technologie TR-FRET qui est décrite comme sensible, performante, reproductible et adaptée pour le criblage haut débit.^{326,336} D'autres technologies sont compatibles avec le criblage haut débit³²⁶ telles que le SPA (Scintillation Proximity Assays),³⁸⁹ le FRET³⁹⁰ ou la luminescence.³⁹¹ Nous n'avons pas choisi le FRET ni la luminescence principalement parce que les tests d'activité kinases sont couplés avec une autre enzyme ; une protéase est nécessaire dans le cas du FRET et une luciférase est utilisée pour la luminescence. L'utilisation d'une enzyme en plus de la ou des kinase(s) présente(s) dans l'essai peut être une source supplémentaire d'interférences.³²⁶

Etant donné que la technique SPA a été décrite comme une bonne méthode pour le dosage de la cascade Raf/MEK/ERK,³³⁵ nous l'avons testée pour les essais directs sur Raf-1 car, dépourvue d'étapes de lavage, elle présentait l'avantage d'être moins coûteuse en temps que la méthode PFBA.

³⁸⁹ von Ahsen O., Schmidt A., Klotz M., Parczyk K.: Assay Concordance between SPA and TR-FRET in High-Throughput Screening. *J. Biomol. Screen.*, **2006**, *11*, 606-16.

³⁹⁰ Rodems S.M., Hamman B.D., Lin C., Zhao J., Shah S., Heidary D., Makings L., Stack J.H., Pollok B.A.: A FRET based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases. *Assay Drug Dev. Technol.*, **2002**, *1*, 9-19.

³⁹¹ Schröter T., Minond D., Weiser A., Dao C., Habel J., Spicer T., Chase P., Baillargeon P., Scampavia L., Schürer S., Chung C., Mader C., Southern M., Tsinoremas N., LoGrasso P., Hodder P.: Comparison of miniaturized time-resolved fluorescence resonance energy transfer and enzyme-coupled luciferase high-throughput screening assays to discover inhibitors of Rho-kinase II (ROCK-II). *J. Biomol. Screen.*, **2008**, *13*, 17-28.

La technique SPA est basée sur l'interaction entre des billes greffées de scintillant, recouvertes de différentes substances telles que la streptavidine, le glutathion ou Cu^{2+} et le substrat marqué avec le ligand correspondant (la biotine, le GST ou l'étiquette histidine). La phosphorylation du substrat au ^{33}P au cours de la réaction kinase, suivie de l'accrochage du substrat aux billes, entraînent l'excitation des molécules de scintillant qui émettent alors une lumière bleue détectée par le compteur à scintillation. Une étape de centrifugation remplace les étapes de lavage nécessaires à l'élimination de l'ATP radioactif non consommé et permet de s'affranchir du bruit fond lié à la proximité entre les billes et l'ATP radioactif ^{33}P libre (Figure 94).

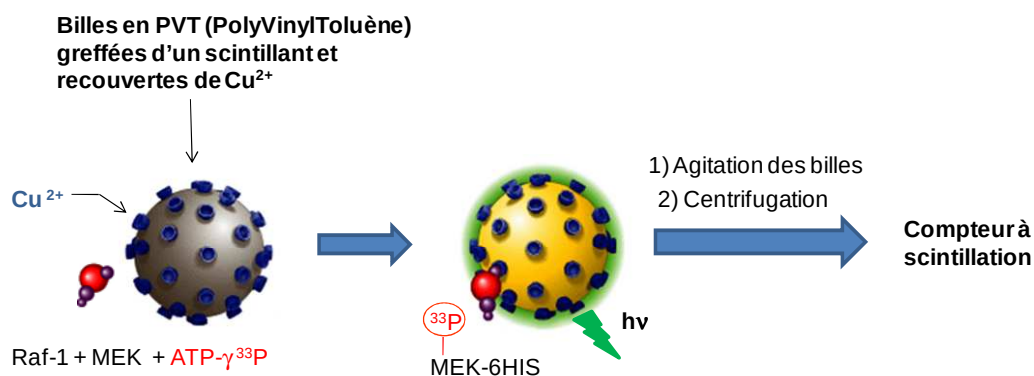


Figure 94 : Test direct sur Raf-1 réalisé avec la méthode SPA

La principale difficulté a été le choix d'un substrat compatible avec la technique et la kinase Raf. Le premier substrat testé avec des billes streptavidine fut un peptide biotinylé issu de MEK-1 (biotine-DSMANSF) mais il s'est avéré être un mauvais substrat puisqu'aucun signal fut mesuré. Le deuxième substrat testé avec les billes Cu^{2+} fut la protéine entière MEK-1 portant une étiquette 6 x histidines. Ce substrat conduisant à un signal, nous avons optimisé le test d'activité direct sur Raf-1 selon la même approche utilisée pour la méthode PFBA. Cependant, nous n'avons pas poursuivi les études d'inhibition sur Raf-1 et la voie Raf/MEK/ERK avec cette technique car nous avons constaté au cours de l'optimisation un manque de reproductibilité des résultats. Le signal mesuré variait selon le temps d'incubation des billes avec le substrat, soulevant la question du choix du temps d'agitation correspondant à une interaction spécifique entre les billes et le substrat.

Nous avons optimisé deux méthodes récentes qui utilisent la technologie du TR-FRET, il s'agit de la méthode Lance UltraTM (Perkin Elmer) et de la méthode LanthascreenTM (Invitrogen). Etant donné que ces méthodes requièrent l'emploi d'anticorps et de substrats

spécifiques, marqués par des fluorophores plus ou moins volumineux, nous les avons comparées avec une méthode qui utilise la radioactivité PFBA car elle plus directe et ne nécessite pas l'utilisation de substrats marqués.

La comparaison de ces différentes techniques a montré que la technologie TR-FRET est plus sensible et plus facile à utiliser en routine que la méthode PFBA. De plus, les méthodes basées sur la technologie TR-FRET sont moins coûteuses en temps car dépourvues d'étapes de lavage et plus économes en enzymes et en substrats que la méthode PFBA. Par ailleurs, nous avons montré que pour certaines kinases en particulier Raf et MEK les substrats peptidiques ne peuvent pas être utilisés à la place de la protéine substrat physiologique ce qui a limité notre choix parmi les différentes méthodes disponibles pour les tests kinases. Les peptides substrats développés pour la méthode Lance UltraTM, Ulight-Histone H3 pour Raf-1 et Ulight-p70S6K pour MEK, n'ont pas permis de valider les tests d'activité directs de Raf-1 et MEK.

Lors de l'étape de validation des différents tests avec les trois méthodes PFBA, Lance UltraTM et LanthascreenTM, nous avons observé plusieurs cas d'interférences entre les inhibiteurs de référence et le fluorophore marquant le substrat, conduisant à une sous-estimation ou à une sur-estimation des valeurs d'IC₅₀.

Par exemple, la mesure de l'effet inhibiteur du composé de référence U0126 sur le test direct sur Raf-1 avec la méthode TR-FRET LanthascreenTM a donné une valeur d'IC₅₀ sous-estimée par rapport à la valeur attendue. Ce résultat est en complète adéquation avec d'autres travaux décrits précédemment sur le test direct de Raf-1 avec la même méthode LanthascreenTM.³³⁹ Ce résultat erroné n'a pas été observé avec la méthode PFBA (**Tableau 23**, chapitre II : Résultats, II-1.1.1). Par conséquent, il s'expliquerait par le fait qu'une ou plusieurs molécules de fluorescéines marquant le substrat MEK-1 bloqueraient le site allostérique de fixation d'U0126 à MEK-1.

Lors de la validation du test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK, nous avons obtenu une valeur d'IC₅₀ sur-estimée pour l'inhibiteur ZM336372 avec la méthode LanthascreenTM qui n'a pas été observée avec les autres méthodes PFBA et Lance UltraTM (**Tableau 31**, chapitre II : Résultats, II-1.3). Par conséquent, ce résultat peut s'expliquer par une interaction du composé ZM336372 avec le substrat volumineux GFP-ATF2 conduisant à une modification du signal de fluorescence. De la même façon, la valeur d'IC₅₀ sous-estimée observée pour l'inhibiteur MEK inhibiteur II sur le test de la triple cascade uniquement avec

la méthode LanthascreenTM, peut aussi s'expliquer par l'interaction de cet inhibiteur avec le substrat GFP-ATF2 (**Tableau 31**, chapitre II : Résultats, II-1.3).

Par conséquent, nous avons conclu que ces phénomènes d'interférences observés en particulier avec la méthode LanthascreenTM s'expliquent par le fait que cette méthode utilise des fluorophores plus volumineux (fluorescéine et GFP) que la méthode Lance UltraTM (Ulight) pour marquer les substrats.

Pour les deux techniques de TR-FRET, un phénomène de quenching de fluorescence a été observé pour la plupart des composés organiques au-delà d'une concentration finale de 10 à 25 μM . Par conséquent, ces méthodes sont adaptées pour l'identification de molécules inhibitrices avec des valeurs d' IC_{50} de l'ordre du nM au μM . La méthode PFBA, quant à elle, reste utile en tant que méthode de référence en cas de problèmes d'interférences observés avec les méthodes de TR-FRET.

A ce jour, nous disposons de 3 tests d'activité directs sur Raf-1, MEK-1 et ERK-2, d'un test sur la double cascade MEK/ERK et d'un test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK (**Figure 95**). A l'issue de ces mises au point, nous sommes capables de détecter un inhibiteur de la voie Raf/MEK/ERK et de remonter à la ou aux enzyme(s) inhibée(s). Pour chaque test à l'exception du test direct sur MEK, nous avons validé au moins une méthode de TR-FRET plus adaptée pour les tests en routine. Le test sur la double cascade MEK/ERK peut être utilisé à la place du test direct sur MEK pour détecter les inhibiteurs de MEK compétitifs de l'ATP. Par contre, nous avons montré que le test sur la triple cascade est le plus adapté pour détecter des inhibiteurs de MEK aussi bien allostériques qu'ATP compétitifs. A notre connaissance, c'est la première fois que la méthode Lance UltraTM est utilisée en routine sur l'ensemble de la cascade Raf/MEK/ERK.

Nous avons montré que le test direct sur MEK-1 et le test sur la double cascade MEK/ERK qui utilise une forme active de MEK-1, ne sont pas en mesure de détecter l'inhibition des produits U0126, MEK inhibitor II et PD98059 quelque soit la méthode utilisée PFBA ou Lance UltraTM puisqu'une différence d'au moins un facteur 10 est observée entre les IC_{50} reportées et celles mesurées. Ces résultats s'expliquent par le fait que ces composés n'inhibent pas la forme active de MEK-1. En effet, des travaux antérieurs ont montré que les produits U0126 et PD98059 bloquent l'activation de MEK-1 par Raf-1 en agissant sur la forme inactive de MEK, ils ne bloquent pas l'activité kinase de MEK.³⁷¹

Les résultats obtenus pour les tests d'activité sur MEK-1 montrent que l'utilisation des kinases sous formes actives dans les tests directs favorise la détection d'inhibiteurs ATP

compétitifs de type I ou II. Par contre, les inhibiteurs allostériques, affins pour la forme inactive et qui entraînent le blocage de l'activation de la kinase ne sont détectés que sur la triple cascade.

Avoir un test capable de détecter des inhibiteurs allostériques est très avantageux pour plusieurs raisons.¹⁸² Premièrement, les inhibiteurs allostériques interagissent avec des résidus moins conservés que ceux ciblés par les inhibiteurs ATP compétitifs de type I ou II ce qui permet d'obtenir des inhibiteurs plus sélectifs. Deuxièmement, en ciblant un site différent de la poche ATP, ils sont moins sensibles à l'apparition des résistances. A ce jour, les résistances aux traitements observées en clinique touchent les inhibiteurs de kinases de type ATP compétitifs de type I ou II et résultent de la mutation du résidu « gatekeeper » situé à l'entrée du site ATP. Troisièmement, l'identification d'un inhibiteur allostérique offre la possibilité de concevoir des inhibiteurs avec une plus grande diversité structurale que les inhibiteurs ATP compétitifs.

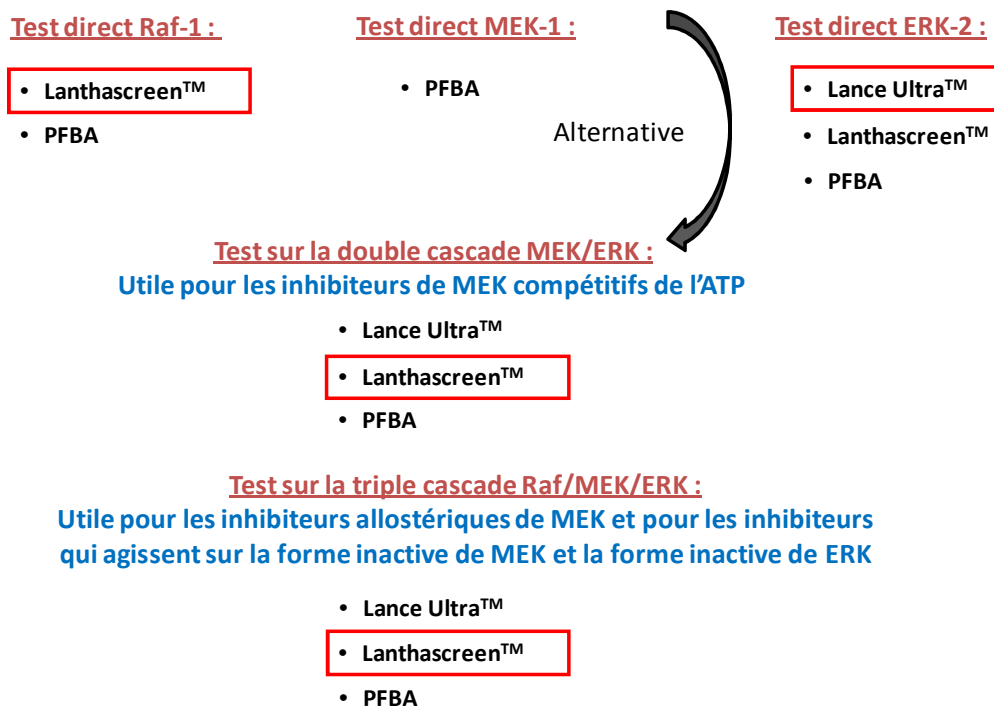


Figure 95 : Bilan sur les méthodes validées disponibles au laboratoire. Les méthodes encadrées en rouge sont utilisées en routine.

III/ Caractérisation des inhibiteurs par les tests d'activité enzymatique

Les tests mis au point ont été appliqués à la mesure des effets inhibiteurs des molécules synthétisées et de la protéine PEBP/RKIP, inhibiteur naturel de la voie Raf/MEK/ERK. A ce jour, seule une méthode a été décrite pour mesurer l'effet inhibiteur de PEBP/RKIP *in vitro* et consiste à mesurer la radioactivité incorporée par le substrat au cours de la réaction kinase en utilisant des gels électrophorèse soumis à une révélation par autoradiographie.^{333,306,375,376,378} Par conséquent, nous avons mis au point une nouvelle méthode plus efficace que les méthodes précédemment utilisées pour mesurer son effet inhibiteur. Nous avons montré qu'à une concentration de 25 μ M, PEBP/RKIP inhibe partiellement les kinases isolées Raf-1 (43 %), MEK-1 (60 %) et ERK-2 (56 %). Son effet inhibiteur augmente avec le nombre de partenaires protéiques puisque l'inhibition atteint 74-80 % sur la double cascade MEK/ERK et 93-95 % sur la triple cascade Raf/MEK/ERK. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment reportés, décrivant la capacité de PEBP/RKIP à former un complexe ternaire avec Raf, MEK et ERK.³⁷⁵ Cependant les auteurs n'ont pas observé un effet inhibiteur majeur de PEBP/RKIP sur MEK active et ERK active et ont conclu que PEBP/RKIP était un inhibiteur sélectif de Raf.³⁰⁶ Au contraire, nos résultats montrent que PEBP/RKIP peut inhiber *in vitro* significativement toutes les enzymes de la voie Raf/MEK/ERK. De plus, PEBP/RKIP semble capable de se lier aux formes actives des kinases Raf-1, MEK et ERK mais aussi aux formes inactives de MEK et ERK utilisées dans le test sur la triple cascade. Par conséquent, PEBP/RKIP bloquerait l'activité kinase mais aussi l'activation des enzymes de la voie.

Au total, 30 produits finaux ont été évalués *in vitro* sur Raf-1 avec la méthode LanthascreenTM que nous avons optimisée. En collaboration avec Laurent Meijer, ces produits ont été testés *in vitro* sur les kinases CDK5 et GSK3 impliquées dans le cancer et la kinase DYRK1A impliquée dans la maladie d'Alzheimer. En collaboration avec Christiane Guillouzo, le potentiel cytotoxique de nos produits a été mesuré *in vitro* sur 6 lignées de cellules cancéreuses : MDA-MB 231 (sein), Huh 7 (foie), NCI (poumon), PC3 (prostate), HCT 116 (côlon) et Caco (côlon).

Aucun produit de la série 2 ne s'est avéré actif vis-à-vis des kinases étudiées (**Figure 96**).

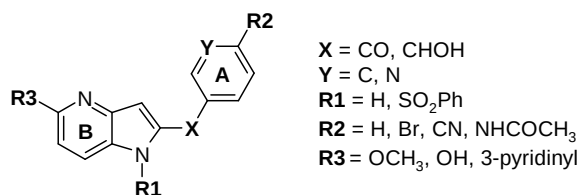


Figure 96 : Composés synthétisés de la série 2

Cependant des activités cytotoxiques intéressantes de l'ordre du μM ont été obtenues pour les cellules du sein (MDA-MB 231) et du côlon (Caco). La meilleure activité cytotoxique est obtenue avec le produit **11** ci-dessous avec des valeurs d' IC_{50} de 1,2 μM envers les cellules du côlon, 1,5 μM envers les cellules du sein et 3 μM vis-à-vis des cellules du foie et de la prostate (**Figure 97**). Mais à ce stade, il n'est pas possible d'établir une relation claire entre la structure des produits et leur activité biologique.

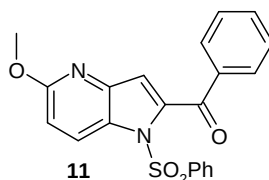


Figure 97 : Structure chimique du composé 11

Concernant la première série de composé, seul le composé **64**, a été identifié comme inhibiteur de Raf-1 avec une valeur d' IC_{50} de 9,8 μM . Ce produit est cytotoxique vis-à-vis des cellules du foie ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$) et peu toxique vis-à-vis des cellules saines ($\text{IC}_{50} < 25 \mu\text{M}$) mais pour l'instant il est trop tôt pour dire si cette activité antitumorale est liée à la seule inhibition de Raf-1. La comparaison de l'activité inhibitrice vis-à-vis de Raf-1 entre le composé **64** et les composés **65**, **66** et **59** montre que la présence d'une fonction amine en position C-5 du noyau 4-azaindole ainsi que la substitution en *mé*ta du cycle **A** par un groupement accepteur de liaison hydrogène favorise l'activité inhibitrice (**Figure 98**).

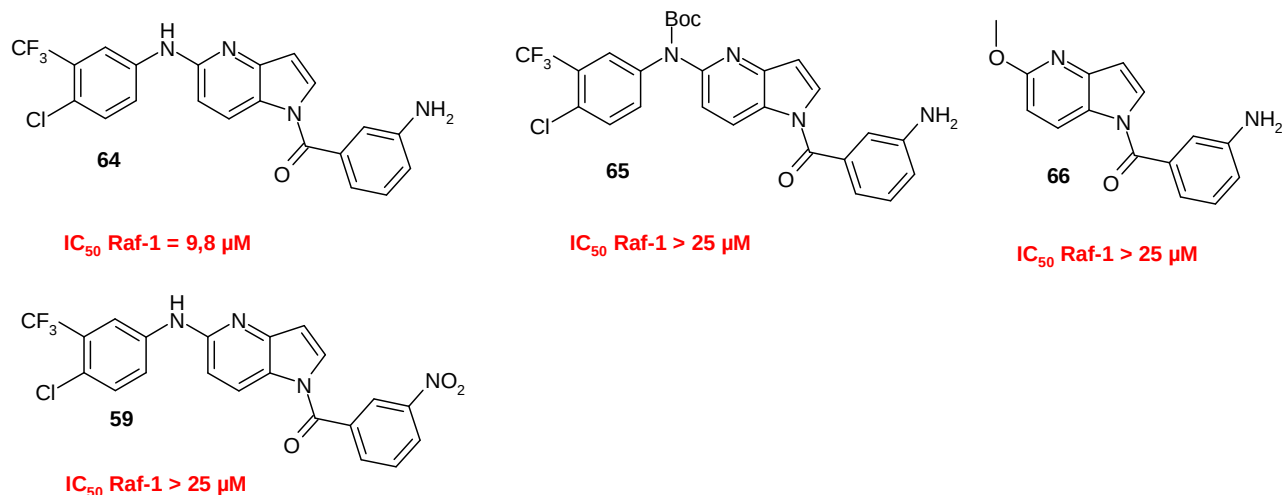


Figure 98 : Structures chimiques des composés 59, 64, 65 et 66

L'ensemble des résultats traitant de la mise au point des tests, de leur validation et de leur application à l'étude des produits synthétisés et de la PEBP/RKIP a fait l'objet d'une publication qui a été soumise à la revue « International Journal of High Throughput Screening ».

IV/ Modélisation moléculaire des inhibiteurs synthétiques

Afin de nous assister dans la synthèse de nos inhibiteurs de Raf, une collaboration avec Stéphane Bourg en modélisation moléculaire a été initiée au début de la thèse. Cette collaboration a abouti à la construction d'un modèle *in silico* de Raf qui a ensuite été utilisé pour le docking de nos inhibiteurs dans le site actif de Raf. Les résultats du docking prévoyaient une meilleure interaction des produits de la série 1 disubstitués en position C-5 et N-1 par rapport à ceux de la série 2 fonctionnalisés en position C-5 et C-2 du 4-azaindole. L'évaluation biologique de nos composés est en corrélation avec les résultats du docking puisque seul un produit de la série 1 a donné un début d'activité vis-à-vis de Raf-1.

Contrairement à ce qui était attendu, la superposition du Sorafenib tel qu'il est dans le site actif de B-Raf avec le composé **56** a montré que le cycle 4-azaindole **B** vient se superposer avec le cycle **A** du Sorafenib au lieu du cycle **B** (**Figure 99**). La figure montre aussi que le groupement nitrile se superpose bien avec le carbonyle de la fonction urée du Sorafenib et que le cycle **C** trifluorophényle est mal orienté.

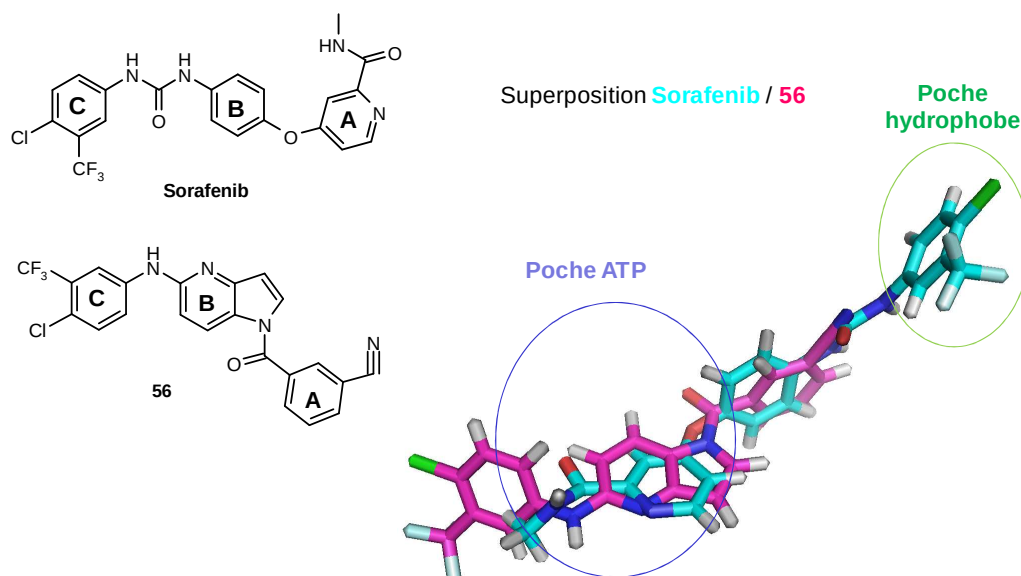


Figure 99 : Superposition réalisée *in silico* du composé 56 sur le Sorafenib dans le site active de B-Raf

Ainsi, les études de docking ont montré que le noyau 4-azaindole pouvait être un bon ligand de la poche ATP. Ce résultat est en corrélation avec l'identification récente en 2008 de dérivés 7-azaindoliques tels que le PLX-4032 (actuellement en phase I), le PLX 4720 et le PLX 3203 comme inhibiteurs puissants de Raf (**Figure 100**).²¹⁶ La résolution de la structure du complexe PLX 4720/B-Raf a permis de montrer que le cycle 7-azaindole se fixe dans la poche ATP.²¹⁶

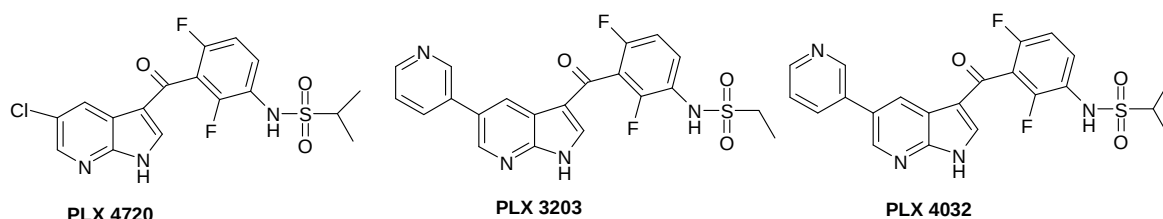


Figure 100 : Structures chimiques des inhibiteurs de Raf à structure 7-azaindolique : les PLX 4720, PLX 3203 et PLX 4032

V/ Etude de l'interaction Raf/PEBP

La deuxième stratégie envisagée pour inhiber Raf-1 serait de concevoir des mimes peptidiques de son inhibiteur naturel, la PEBP/RKIP. Or, il n'existe à ce jour aucune structure cristallographique de PEBP/RKIP en complexe avec Raf ou d'autres de ses partenaires protéiques. Par conséquent, la conception de ce type d'inhibiteur nécessite d'avoir plus de connaissances structurales sur la zone d'interaction entre Raf et PEBP/RKIP.

Des études de résonance plasmonique de surface reportées dans la littérature ont mesuré l'affinité entre la PEBP/RKIP et plusieurs peptides de Raf-1 dont la séquence 331-349 correspond à la séquence minimale de Raf-1 impliquée dans l'interaction avec PEBP/RKIP.³²⁵ De façon intéressante, les auteurs ont montré une augmentation de l'affinité entre le peptide Raf et la PEBP/RKIP lorsque plusieurs résidus de sérine et de tyrosine étaient phosphorylés. La meilleure affinité (K_d de 2×10^{-5} M) étant obtenue pour le peptide triphosphorylé au niveau des sérines 338 et 339 et de la tyrosine 341.³²⁵

A la suite de ces études, nous avons synthétisé avec succès trois peptides de Raf-1 correspondant à la séquence 331-349 de Raf-1 : un peptide non phosphorylé **P1**, un peptide diphosphorylé **P2** et le peptide triphosphorylé **P3** avec lequel on attend la meilleure affinité avec PEBP/RKIP (**Figure 101**).³²⁵ Le but de ces travaux est de compléter les informations structurales et moléculaires sur le mécanisme d'inhibition de Raf par la PEBP pour permettre par la suite la conception de nouveaux inhibiteurs capables de mimer la PEBP.

P1 : RPRGQRDSSYYWEIEASEV P2 : RPRGQRDpSSYpYWEIEASEV P3 : RPRGQRDpSpSYpYWEIEASEV

Figure 101 : Peptides de Raf-1 (331-349) synthétisés (pS = sérine phosphorylée, pY = tyrosine phosphorylée)

Nous avons observé que l'augmentation de l'encombrement stérique due à l'introduction d'un résidu phosphorylé rend plus difficile la réaction de couplage peptidique, la déprotection du groupement Fmoc et la déprotection du benzyle protégeant le groupement phosphate. Nous avons constaté que ces problèmes sont accentués lorsqu'on introduit plusieurs résidus phosphorylés consécutivement. De plus, l'apport de charges négatives par les groupements phosphates complique leur purification par HPLC en phase inverse. Pour surmonter ces difficultés, nous avons choisi d'introduire manuellement les résidus phosphorylés afin de mieux contrôler chaque étape de synthèse.

Nous avons montré que l'usage du réactif HATU est essentiel pour former avec un bon rendement la liaison peptidique entre les deux résidus sérine phosphorylés consécutifs du peptide **P3**.

Les trois peptides ont été obtenus avec une pureté de plus de 95 %, cette pureté permettant leur analyse en RMN avec la PEBP/RKIP. Ce travail fera prochainement l'objet

d'une publication car jusqu'à présent aucune voie de synthèse n'a été décrite pour ces peptides issus de Raf-1.

Les premiers résultats de l'analyse de l'interaction de ces peptides avec la PEBP/RKIP par RMN semblent confirmer que le peptide triphosphorylé se lie avec la meilleure affinité que les 2 autres peptides. Il faut encore vérifier si tous les peptides se lient au même site de la PEBP/RKIP. En effet, nous avons montré que PEBP/RKIP contrôle Raf et les autres enzymes de la cascade aussi bien sous leurs formes actives qu'inactives, il sera donc important de savoir si l'interaction entre PEBP/RKIP et Raf est susceptible de s'effectuer de la même façon suivant le niveau de phosphorylation de Raf. Les données spectrales sont en cours d'attribution pour définir précisément la zone d'interaction au niveau de la PEBP.

VI/ Perspectives

Le composé **64** identifié à l'issue de ces travaux de thèse comme un inhibiteur potentiel de Raf-1 avec une activité antitumorale vis-à-vis des cellules du foie intéressante, constitue notre tête de série. A partir de ce composé, les études de docking vont nous permettre d'améliorer le design des inhibiteurs en nous guidant pour la fonctionnalisation du cycle 4-azaindole afin d'augmenter l'affinité pour le site actif (**Figure 102**). La première modification envisagée est de changer la nature du groupement **R1** étant donné que les études de docking ont montré que le cycle trifluorophényle du composé **64** est mal orienté. La fonction amine en 5 est à conserver car elle est importante pour maintenir l'activité inhibitrice. Dans ce but, la méthodologie mise au point pour les *N*-arylations pourra être utilisée pour greffer en 5 d'autres types d'amines ou amides. La deuxième modification concernera le remplacement du lien cétone entre le cycle 4-azaindole **B** et le cycle **A** par un lien méthylène CH₂, acétyle CH₂CO ou sulfonyle SO₂ car nous avons observé que la fonction amide formée en *N*-1 du 4-azaindole est peu stable. D'après la modélisation moléculaire, il est préférable de greffer le cycle **C** trifluorophényle en *méta* du cycle **A**. Nous envisageons donc de substituer le cycle **A** par des fonctions arylamides ou arylurées dans un premier temps.

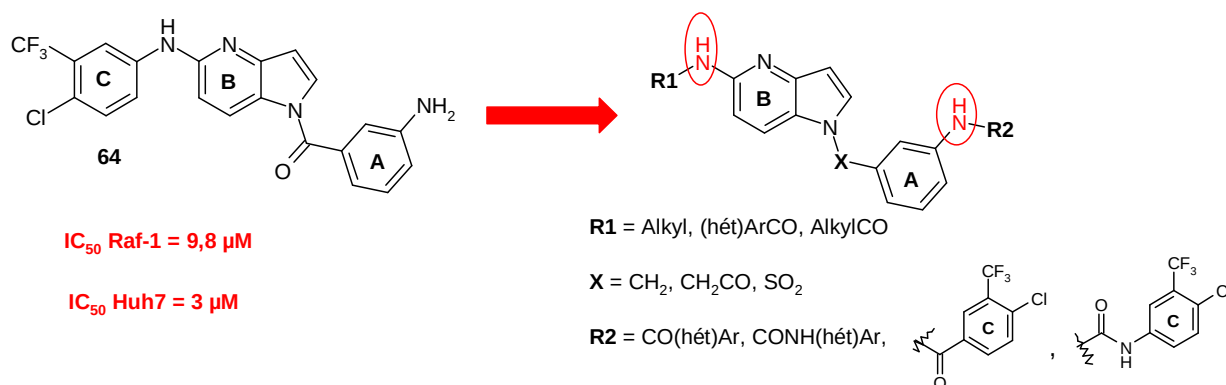


Figure 102 : Perspectives envisagées pour améliorer l'activité inhibitrice du composé 64

En collaboration avec l'équipe de Christiane Guillouzo, des études complémentaires sont actuellement en cours sur deux des produits les plus cytotoxiques : le produit **64** (série 1) qui présente une activité inhibitrice de 9,8 μM sur Raf-1 et le produit **11** (série 2) qui n'a pas d'effet sur la voie Raf/MEK/ERK. Cette équipe possède notamment un test cellulaire capable d'identifier des inhibiteurs de la voie Raf/MEK/ERK en mesurant la phosphorylation de ERK dans la cellule. Ce test permettrait de savoir si l'inhibition observée pour le produit **64** sur l'enzyme Raf-1 isolée est confirmée par une inhibition de la voie Raf/MEK/ERK dans la cellule. D'autres études complémentaires permettraient de savoir comment ces produits sont cytotoxiques c'est-à-dire s'ils bloquent le cycle cellulaire, ou induisent un phénomène de nécrose ou d'apoptose. Ces informations permettraient de s'orienter vers la ou les cible(s) des produits **64** et **11**.

A partir des données structurales disponibles pour les inhibiteurs de Raf-1 ATP compétitifs SB-590885 et son analogue SM51,^{219,209} une autre stratégie explorée au laboratoire a été de remplacer l'hétérocycle central imidazole ou pyrazole par le 4-azaindole. Une série de composés 4-azaindoliques disubstitués en C-2 et C-3 a été synthétisée par le Dr Frédéric Pin puis évaluée. Le produit **FP05** a été identifié comme un bon inhibiteur ATP compétitif de Raf avec une valeur d' IC_{50} égale à 0,29 μM corrélée avec une activité cytotoxique intéressante submicromolaire de 0,6 μM envers les cellules du côlon Caco et de l'ordre du micromolaire pour les cellules du côlon HCT 116 et du poumon (**Figure 103**). Ce produit est notre deuxième tête de série et nous envisageons d'explorer la fonctionnalisation du sommet C-5 et de l'azote N-1 pour améliorer son activité inhibitrice.

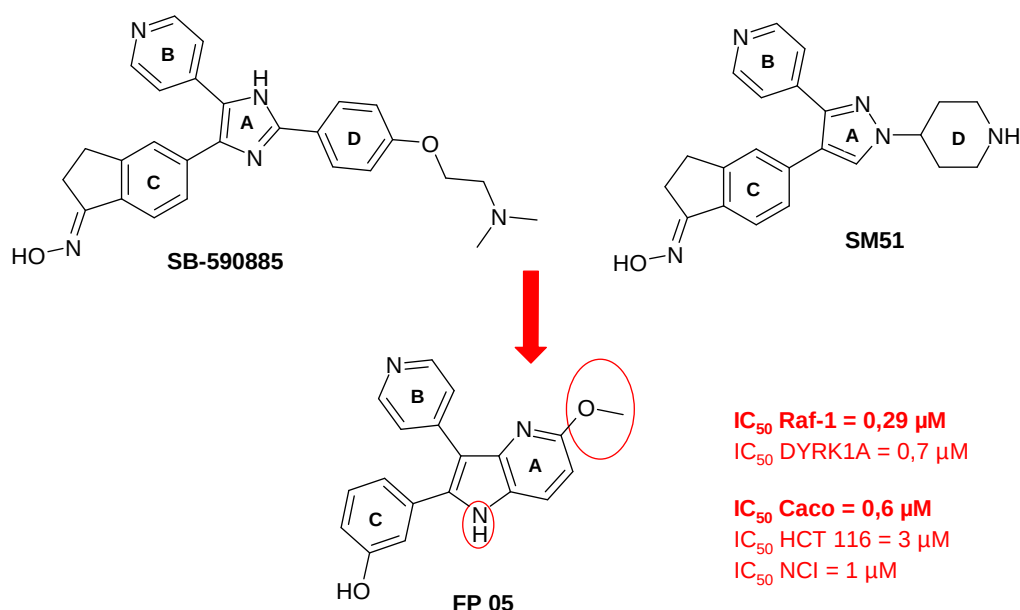


Figure 103 : Structure du composé FP 05 inhibiteur de Raf ATP compétitif

Grâce aux études par RMN, l'identification des résidus de PEBP/RKIP impliqués dans l'interaction avec le peptide de Raf-1 triphosphorylé devrait aboutir à l'élaboration d'un modèle tridimensionnel de fixation du peptide à PEBP/RKIP. A partir de ce modèle, il sera possible d'élaborer des mimes (peptidiques ou non) de PEBP/RKIP en vue de concevoir des inhibiteurs de Raf. De tels inhibiteurs pourraient être particulièrement efficaces contre le cancer³⁷⁶ si on considère que l'action anticancéreuse de la PEBP/RKIP en tant que suppresseur de métastase³¹²⁻³¹⁸ et inducteur de l'apoptose,³¹⁹⁻³²² résulte notamment de l'inhibition de la voie Raf/MEK/ERK.

Nous avons montré que le test sur la triple cascade Raf/MEK/ERK permet l'identification d'inhibiteurs de Raf ; MEK ou ERK. Ce test s'est aussi avéré être le plus adapté pour la détection d'inhibiteurs ATP compétitifs de type I ou II et allostériques (type III). De plus, il est aussi compatible avec la détection d'inhibiteurs capables d'agir sur plusieurs kinases la voie Raf/MEK/ERK comme la protéine PEBP/RKIP. Ainsi, l'évaluation des futurs mimes de PEBP/RKIP pourra être menée aisément grâce au test sur la triple cascade.

Considérant le fait que la combinaison des thérapies cancéreuses est bénéfique pour la plupart des cancers,^{392,393} nous envisageons d'utiliser le test sur la triple cascade

³⁹² Dancey J.E., Chen H.X.: Strategies for optimising combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5, 649–59.

³⁹³ Zimmermann G.R., Lehár J., Keith C.T.: Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today*, **2007**, 12, 34-42.

Raf/MEK/ERK pour détecter des nouveaux types d'inhibiteurs capables d'inhiber plusieurs kinases de cette voie. Dans cet objectif, nous envisageons de réaliser le criblage de la chimiothèque de l'ICOA sur le test de la triple cascade avec la méthode Lance UltraTM. Comme argument supplémentaire à l'intérêt ce projet, un article publié dans la revue médicale *British Journal of Cancer*, suggère l'utilisation d'inhibiteurs de Raf et MEK pour le traitement des mélanomes.³⁹⁴

³⁹⁴ Smalley K.S.M., Flaherty K.T.: Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for melanoma. *Br. J. Cancer*, **2009**, *100*, 431-35.

Chapitre IV

MATERIELS ET METHODES

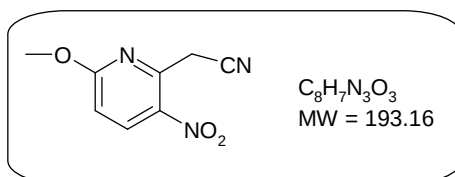
Chapitre IV : MATERIELS ET METHODES

I/ Synthèse organique des dérivés 4-azaindoliques

I-1 Généralités

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics and Alfa Aesar. We used distilled DIPA, TMP and TMEDA. LDA 2M in THF/Heptane/ethylbenzene and *n*-BuLi 1.6 M in hexane were purchased from Sigma-Aldrich. Melting points are uncorrected. ^1H RMN and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DPX 250 spectrometer (^1H , 250.19 MHz; ^{13}C , 62.89 MHz) or a Bruker Avance II 400 spectrometer (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz) using tetramethylsilane as the internal standard. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm). Coupling constants are reported in Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as s: singulet, bs = broad singulet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, ddd = doublet of doublets of doublets, q = quadruplet, quint = quintuplet and m = multiplet. IR absorption spectra were recorded on a Nicolet iS10 smart iTR apparatus and values were reported in cm^{-1} . MS (Mass Spectra) were recorded on Perkin-Elmer SCIEX API 300 using ion spray methodology. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a TOF spectrometer in the electrospray ionization (ESI) mode or with a Finnigan MAT 95 XL spectrometer in the chemical ionization (CI) mode at the "Centre Régional de Mesures Physiques", Blaise Pascal University. Column chromatography was carried out using silica gel 60 (spherical, neutral, 40-63 μM , Merck) on a BÜCHI pomp C-610 supplied with the pump module C-601. Thinlayer chromatography was carried out on Merck silica gel 60F254 precoated plated. Visualization was made with UV light. Microwave reactions were carried out using a Biotage InitiatorTM 2.5.

I-2 Modes opératoires et caractérisations structurales

(6-Methoxy-3-nitro-pyridin-2-yl)-acetonitrile (**3**)²⁵⁸

To a suspension of potassium *tert*-butoxide (3.84 g, 0.0342 mol, 2.2 equiv.) in dry THF (30 mL) under an atmosphere of argon at - 10 °C, was transferred dropwise a solution of 2-methoxy-5-nitropyridine **1** (3 g, 0.0155 mol, 1.0 equiv.) and 4-chlorophenoxyacetonitrile **2** (2.86 g, 0.0171 mol, 1.1 equiv.) in dry THF (50 mL). The mixture was stirred at - 10 °C for 4 h. The reaction was stopped by addition of HCl 5 % (70 mL). The crude product was extracted with EtOAc (3 x 80 mL) and the combined organic layers were washed with brine (70 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **3** as a brown solid (2.44 g, 81 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.34.

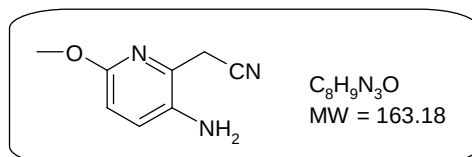
Mp: 117 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) v 2340, 1586, 1505, 1336, 1286, 1067, 1011, 950, 841.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.13 (s, 3H, OCH₃); 4.43 (s, 2H, CH₂); 6.87 (d, 1H, H-5, *J*_{5,4} = 8.0 Hz); 8.41 (d, 1H, H-4, *J*_{4,5} = 8.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 27.3 (CH₂); 55.3 (CH₃); 111.7 (CH-5); 115.2 (CN); 136.6 (CH-4); 138.4 (Cq); 146.0 (Cq); 165.5 (Cq).

MS (IS): *m/z* = 194.0 [MH]⁺.

(3-Amino-6-methoxy-pyridin-2-yl)-acetonitrile (**4**)

To a solution of **3** (2.4 g, 12.4 mmol) in EtOH (40 mL), was added Pd/C 10 % (0.340 g). The mixture was stirred at r.t. under 45 psi H₂ pressure for 7 h. The mixture was filtered over Celite and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography. The first product eluted with petroleum ether/EtOAc 7/3 yielded the 5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine **5** (0.175 g, 9 %). The second product eluted with petroleum ether/EtOAc 5/5 afforded **4** as a brown solid (1.35 g, 66 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.11.

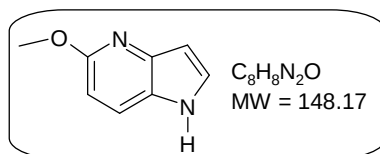
Mp: 112 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) v 3429, 3357, 2974, 2243, 1481, 1043, 833.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.35 (bs, 2H, NH₂); 3.74 (s, 2H, CH₂); 3.88 (s, 3H, OCH₃); 6.61 (d, 1H, H_{Ar}, *J* = 8.5 Hz); 7.05 (d, 1H, H_{Ar}, *J* = 8.5 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃): δ = 23.0 (CH₂); 53.5 (CH₃); 111.1 (CH_{Ar}); 116.5 (CN); 129.5 (CH_{Ar}); 131.7 (Cq); 134.0 (Cq); 157.6 (Cq).

MS (IS): *m/z* = 164.0 [MH]⁺.

5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (5)²⁵⁸

Procedure 1: The catalytic reduction was achieved with the intermediate product **4** (1.3 g, 8.0 mmol) dissolved in EtOH (20 mL). Pd/C 10 % was added (0.184 g) and the mixture was stirred at r.t. under a 45 psi H₂ pressure for 7 h. The mixture was filtered over Celite and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **5** as a light brown solid (1.06 g, 89 %).

Procedure 2 : To a solution of **3** (3.66 g, 0.019 mol) in EtOH (60 mL) and acetic acid (10 mL, 15 %), was added Pd/C 10 % (0.500 g). The mixture was stirred at r.t. under 45 psi H₂ pressure overnight. The mixture was filtered over Celite and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) to afford **5** as a brown solid (2.61 g, 93 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.27.

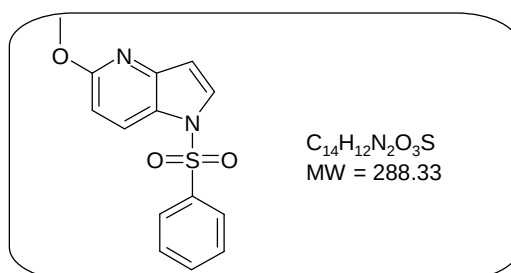
Mp: 117 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3140, 1578, 1403, 1260, 1028, 721.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.01 (s, 3H, OCH₃); 6.60 (bs, 1H, H-3); 6.62 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 10.0$ Hz); 7.32 (dd, 1H, H-2, $J = J' = 2.5$ Hz); 7.61 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 10.0$ Hz); 8.48 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.4 (CH₃); 102.5 (C-3); 105.7 (C-6); 121.9 (C-7); 124.3 (Cq); 126.5 (C-2); 142.7 (Cq); 160.2 (Cq).

MS (IS): $m/z = 149.0$ [MH]⁺.

1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (6)²⁷⁶

A solution of **5** (3.0 g, 0.02 mol) in dry CH₂Cl₂ (50 mL) was cooled to 0 °C under an atmosphere of argon. Sodium hydroxyde (2.43 g, 0.0607 mol, 40 equiv.) and benzyltriethylammonium chloride (0.091 g, 0.40 mmol, 0.02 equiv.) were added successively. The mixture was stirred at 0 °C for 10 min, followed by the slow addition of benzenesulfonyl chloride (2.1 mL, 0.025 mol, 1.25 equiv.). After 15 min stirring at 0 °C then 2h30 at r.t., the mixture was poured into H₂O (40 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **6** as a white solid (5.7 g, 98 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.49.

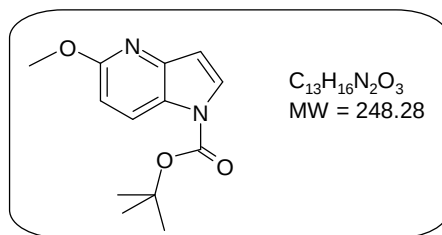
Mp: 128 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 1580, 1477, 1399, 1256, 1131, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.94 (s, 3H, OCH₃); 6.70 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.7$ Hz); 6.72 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.9$ Hz); 7.44 (dd, 2H, 2 x CH_{Ar}, $J = J' = 7.8$ Hz); 7.55 (dd, 1H, CH_{Ar}, $J = J' = 7.8$ Hz); 7.66 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.9$ Hz); 7.83 (d, 2H, 2 x CH_{Ar}, $J = 7.8$ Hz); 8.15 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.7$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.4 (CH₃); 107.8 (C-6); 109.7 (C-3); 123.9 (C-7 + Cq); 126.5 (2 x CH_{Ar}); 128.3 (C-2); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 133.9 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 145.7 (Cq); 161.9 (Cq).

MS (IS): $m/z = 289.0$ [MH]⁺.

Methoxy-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (7)³⁴³

To a solution of **5** (0.50 g, 3.37 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (8 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (0.884 g, 4.05 mmol, 1.2 equiv.) and DMAP (41.2 mg, 0.337 mmol, 0.1 equiv.). The mixture was stirred for 16 h at r.t. The reaction was stopped by addition of H₂O (8 mL). The crude product was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) and the organic layers were washed with brine (10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 95/5) to afford **7** a colorless oil (0.751 g, 90 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 9/1): 0.54.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2972, 1735, 1403, 1290, 1122, 1021, 759.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.67 (s, 9H, CH₃); 3.99 (s, 3H, OCH₃); 6.63 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.0 Hz); 6.68 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 5.0 Hz); 7.69 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 3.0 Hz); 8.21 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 5.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 27.8 (3 x CH₃); 53.0 (CH₃); 83.7 (Cq); 106.8 (C-6); 107.3 (C-3); 123.9 (Cq); 125.1 (C-7); 127.4 (C-2); 145.3 (Cq); 148.8 (Cq); 161.1 (Cq).

MS (IS): m/z = 249.0 [MH]⁺.

General procedures for the preparation of the 2-lithiated derivative from 6 and 7:**General procedure A:**

Di-isopropyl amine (2.6 eq) in dry THF (5 mL) was cooled to - 78 °C under an atmosphere of argon and treated with a solution of *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 2.5 eq). The mixture was stirred at - 78 °C for 20 min, then a solution of **6** or **7** (200 mg, 1.0 eq) in dry THF (7 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at - 78 °C for 60 min, followed by the slow addition of the electrophile (2.0 eq) dissolved in dry THF (2 mL). The mixture was stirred at - 78 °C for at least 3 h before being warmed to room temperature overnight. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography.

General procedure B:

2,2,6,6-Tetramethylpiperidine (1.6 eq) in dry THF (TMP, 5 mL) was cooled to - 78 °C under an atmosphere of argon and treated with a solution of *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 1.5 eq). The mixture was stirred at - 78 °C for 20 min, then a solution of **6** or **7** (200 mg, 1.0 eq) in dry THF (7 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at - 78 °C for 60 min, followed by the slow addition of the electrophile (2.0 eq) dissolved in dry THF (2 mL). The mixture was stirred at - 78 °C for at least 3 h before being warmed to room temperature overnight. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography.

General procedure C:

A solution of *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TMEDA, 1.4 eq) and **6** or **7** (0.200 g, 1.0 eq) in dry THF (7 mL) was cooled to - 78 °C under an atmosphere of argon. After 20 min stirring at - 78 °C, a solution of LDA (2M in THF/heptane/ethylbenzene, 1.5 eq) was added slowly. The mixture was stirred at - 78 °C for 60 min, followed by the addition of the electrophile (2.0 eq) dissolved in dry THF (2 mL). The mixture was stirred at - 78 °C for at least 3 h before being warmed to room temperature overnight. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography.

C-5 demethylation of 5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine derivatives³⁴⁴**General procedure D:**

To a solution of the 5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine derivative (1.0 equiv.) in CH₃CN (0.0424 M) was added sodium iodide (0.051 g, 0.339 mmol, 1.6 equiv.). The mixture was cooled to 0 °C and stirred for 5 minutes. Chlorotrimethylsilane (0.043 mL, 0.339 mmol, 1.6 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The mixture was refluxed for the indicated time, then, cooled to 0 °C and the reaction was stopped by the slow addition of 10 mL MeOH. After 15 min stirring at 0 °C, the solvents were removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography.

C-5 fonctionnalisation of 23 with Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions**General procedure E:**

A solution of **23** (100 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.), boronic acid (0.369 mmol, 1.5 equiv.) and a solution of K₂CO₃ in water (1M, 0.738 mL, 0.738 mmol, 3.0 equiv.) in a mixture of toluene (5 mL) and EtOH (3 mL) was degassed by argon bubbling for 30 min. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0): Pd(PPh₃)₄ (0.01 equiv., 0.00246 mmol, 3.0 mg) was added and the mixture was immediately plunged in a pre-heated oil bath then refluxed for the indicated time. The solvents were removed under reduced pressure followed by the addition of H₂O (3 mL). The crude material was extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL) then dried over MgSO₄ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography.

C-5 fonctionnalisation of 23 with Buchwald Cross-Coupling Reactions**General procedure F:**

A solution of **23** (100 mg, 0.246 mmol, 1.0 equiv.), amine (0.295 mmol, 1.2 equiv.), cesium carbonate (0.369 mmol, 1.5 equiv.) and Xantphos (0.045 equiv., 0.0111 mmol, 6.4 mg) in a mixture of toluene (7 mL) was degassed by argon bubbling for 30 min. Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0): Pd₂dba₃ (0.03 equiv., 0.00738 mmol, 7.0 mg) was added and the mixture was immediately plunged in a pre-heated oil bath then refluxed for the indicated time. The mixture was cooled to room temperature and toluene was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography.

Deprotection of the benzenesulfonyl group^{357,358}**General procedure G:**

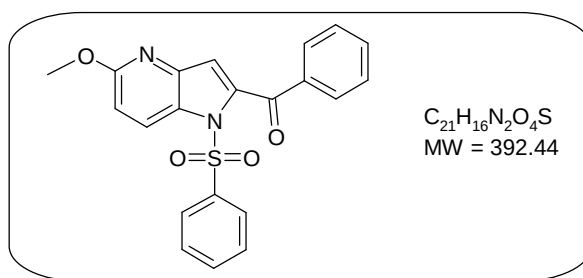
To a solution of the *N*-benzenesulfonyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine derivative (1.0 equiv.) in dry THF (0.080 M) under argon, was added dropwise a solution of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) 1M in THF (6.42 mmol, 10.0 equiv.). The mixture was refluxed for 16 h. After cooling to r.t., the mixture was hydrolysed with H₂O (20 mL) and extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL) then dried over MgSO₄ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography.

Condensation of acyl chlorides on the 1*H*-Pyrrolo[3,2-*b*]pyridine core**General procedure H:**

To a suspension of sodium hydride (NaH) 60 % in mineral oil (1.3 equiv.) in dry THF (0.21 M) at 0 °C, was transferred dropwise a solution of 1*H*-Pyrrolo[3,2-*b*]pyridine (1.0 equiv.) in dry THF (0.11 M). The mixture was stirred at 0 °C for 60 minutes and a solution of the acyl chloride (1.5 equiv.) in THF (0.18 M) was transferred dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at r.t. for 16 h then hydrolysed with H₂O (10 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography.

Oxidation of secondary alcohol into ketone³⁶⁰**General procedure I:**

To a solution of the secondary alcohol derivative (1.0 equiv.) in dry THF (0.0323 M) was added manganese (IV) oxide 88 % (10.0 equiv.) and sodium chloride (4.0 equiv.). The mixture was refluxed for 16 h. After hydrolysis with a saturated aqueous solution of NaCl for 30 minutes, the mixture was filtered over Celite. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL) then dried over MgSO₄ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-phenyl-methanone (11)

The reaction was carried out as described in general procedures **B** and **C** using benzoyl chloride as the electrophile (0.161 mL, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **11** as a yellow solid (139 mg, 51 %, procedure **B**; 155 mg, 57 %, procedure **C**).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.51.

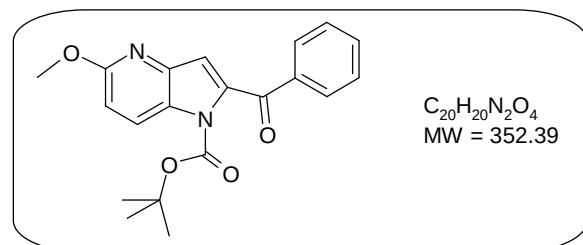
Mp: 184 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 1660, 1403, 1241, 1182, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.96 (s, 3H, OCH₃); 6.85 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.0 Hz); 6.96 (s, 1H, H-3); 7.52 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.62 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.97 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.0 Hz); 8.04 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.0 Hz); 8.33 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.7 (CH₃); 110.6 (C-6); 116.4 (C-3); 125.8 (C-7); 127.4 (Cq); 127.5 (2 x CH_{Ar}); 128.6 (2 x CH_{Ar}); 129.1 (2 x CH_{Ar}); 130.1 (2 x CH_{Ar}); 133.8 (CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 137.1 (Cq); 138.2 (Cq); 139.2 (Cq); 143.4 (Cq); 162.6 (Cq); 187.2 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₁H₁₇N₂O₄S (MH⁺): 393.0909; found 393.0918.

2-Benzoyl-5-methoxy-pyrrolo[3,2-b]pyridine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (12)

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using benzoyl chloride as the electrophile (0.161 mL, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 95/5) yielded **12** as a white solid (54 mg, 19 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 9/1): 0.30.

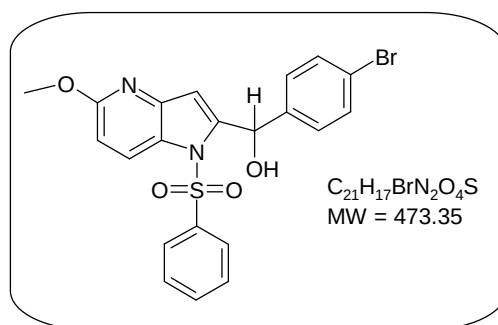
Mp: 143 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 1724, 1660, 1354, 1233, 1154, 1128, 726.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (s, 9H, CH₃); 4.0 (s, 3H, CH₃); 6.82 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 7.5 Hz); 6.93 (s, 1H, H-3); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.61 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.92 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.35 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 7.5 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 27.4 (3 x CH₃); 53.5 (CH₃); 85.5 (Cq); 109.9 (C-6); 113.2 (C-3); 125.9 (C-7); 126.7 (Cq); 128.5 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 133.5 (CH_{Ar}); 137.0 (Cq); 138.1 (Cq); 142.8 (Cq); 148.5 (Cq); 162.1 (Cq); 187.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₀H₂₁N₂O₄ (MH⁺): 353.1501; found 353.1490.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-2-yl)-(4-bromo-phenyl)-methanol (13)

The reaction was carried out as described in general procedures **B** and **C** using 4-bromo-benzaldehyde as the electrophile (257 mg, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **13** as a colorless oil (250 mg, 76 %, procedure **B**; 296 mg, 90 %, procedure **C**).

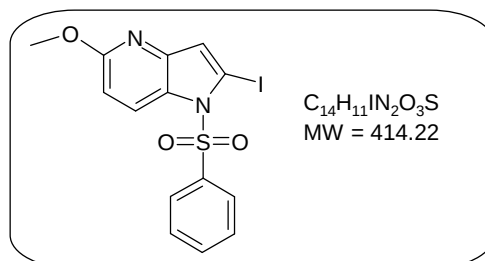
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.36.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3250, 1586, 1480, 1162, 724.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.73 (d, 1H, OH, $J = 3.0$ Hz); 3.89 (s, 3H, OCH_3); 6.32 – 6.33 (m, 2H, H-3 + CH); 6.68 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.22 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 7.36 – 7.44 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.55 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.65 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.24 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.5 (CH_3); 68.5 (CHOH); 108.3 (C-6); 112.4 (C-3); 121.9 (Cq); 125.3 (C-7); 126.1 (2 x CH_{Ar}); 126.4 (Cq); 128.7 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 131.4 (2 x CH_{Ar}); 134.1 (CH_{Ar}); 138.1 (Cq); 139.4 (Cq); 143.9 (Cq); 145.6 (Cq); 162.2 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{21}H_{18}BrN_2O_4S$ (MH^+): 473.0171; found 473.0164.

1-Benzenesulfonyl-2-iodo-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine (15)

The reaction was carried out as described in general procedures **B** and **C** using iodine as the electrophile (353 mg, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **15** as a yellow solid (181 mg, 63 %, procedure **B**; 212 mg, 74 %, procedure **C**).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.54.

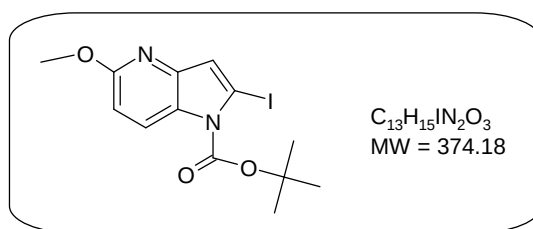
Mp: 142 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 1574, 1452, 1395, 1373, 1024, 809, 723.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.94 (s, 3H, OCH_3); 6.68 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 7.5$ Hz); 7.04 (s, 1H, H-3); 7.46 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.59 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.86 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.40 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 7.5$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.6 (CH_3); 78.3 (Cq); 108.0 (C-6); 124.5 (C-3); 125.7 (C-7); 127.2 (2 x CH_{Ar}); 128.2 (Cq); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 134.3 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 146.2 (Cq); 162.0 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{14}H_{12}IN_2O_3S$ (MH^+): 414.9613; found 414.9626.

2-Iodo-5-methoxy-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (16)

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using iodine as the electrophile (102 mg, 0.403 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 98/2) yielded **16** as a yellow oil (202 mg, 67 %).

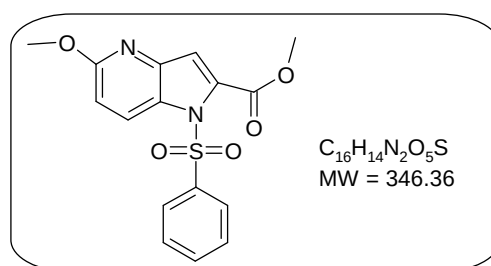
Rf (petroleum ether/EtOAc 9/1): 0.46.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2480, 1727, 1586, 1400, 1348, 1142, 822.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.69 (s, 9H, CH_3); 3.96 (s, 3H, OCH_3); 6.56 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.0$ Hz); 7.01 (s, 1H, H-3); 8.15 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 28.0 (3 x CH_3); 53.2 (CH_3); 77.2 (Cq); 85.4 (Cq); 106.8 (C-6); 121.9 (C-3); 125.4 (C-7); 126.8 (Cq); 145.3 (Cq); 148.2 (Cq); 161.0 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{13}H_{16}IN_2O_3$ (MH^+): 375.0206; found 375.0199.

1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-carboxylic acid methyl ester (17)

The reaction was carried out as described in general procedure **C** using methyl chloroformate as the electrophile (0.107 mL, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **17** as a white solid (150 mg, 62 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.46.

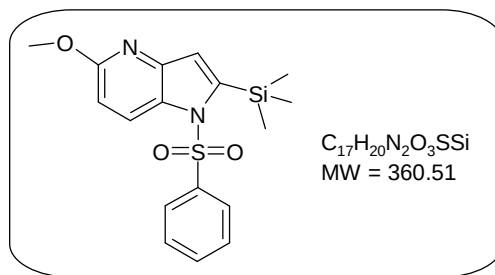
Mp: 156°C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2942, 2361, 1730, 1535, 1354, 1166, 1123, 725.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.92 (s, 3H, OCH_3); 3.96 (s, 3H, OCH_3); 6.83 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.20 (s, 1H, H-3); 7.50 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.61 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.99 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.34 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 52.8 (CH_3); 53.6 (CH_3); 110.8 (C-6); 116.7 (C-3); 126.0 (C-7); 127.2 (2 x CH_{Ar}); 128.1 (Cq); 129.0 (2 x CH_{Ar}); 132.6 (Cq); 134.0 (CH_{Ar}); 138.5 (Cq); 142.7 (Cq); 161.0 (Cq); 162.4 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{16}H_{15}N_2O_5S$ (MH^+): 347.0702; found 347.0704.

1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-2-trimethylsilyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (18)

The reaction was carried out as described in general procedure **C** using trimethylsilyl chloride as the electrophile (0.175 mL, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **18** as a white solid (212 mg, 85 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.56.

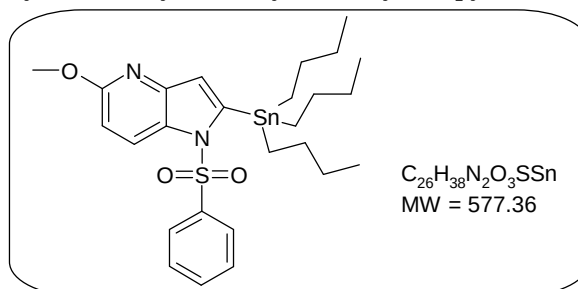
Mp: 126°C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2950, 1588, 1402, 1260, 1162, 1030, 845, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 0.43 (s, 9H, 3 x CH₃); 3.92 (s, 3H, OCH₃); 6.62 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.0 Hz); 7.04 (s, 1H, H-3); 7.36 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.49 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.60 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.05 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 0.3 (3 x CH₃); 53.5 (CH₃); 108.2 (C-6); 121.9 (C-3); 124.6 (C-7); 126.0 (2 x CH_{Ar}); 128.0 (Cq); 129.1 (2 x CH_{Ar}); 133.6 (CH_{Ar}); 139.1 (Cq); 145.8 (2 x Cq); 162.0 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₇H₂₁N₂O₃SSi (MH⁺): 361.1042; found 361.1061.

1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-2-tributylstannanyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (19)

The reaction was carried out as described in general procedures **C** using tributyltin chloride as the electrophile (0.4 mL, 1.39 mmol, 2.0 eq). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **19** as a colorless oil (332 mg, 83 %).

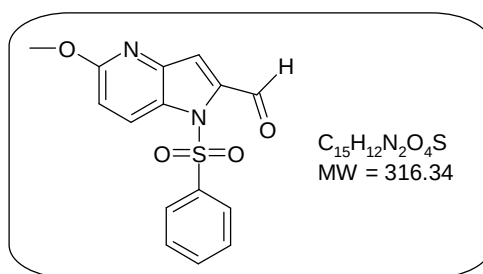
Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.73.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2954, 2913, 2843, 1587, 1361, 1258, 1398, 1160, 815, 724.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 0.437 (t, 9H, 3 x CH₃, J = 7.5 Hz); 1.15 - 1.41 (m, 12 H, 6 x CH₂); 1.50 - 1.60 (m, 6 H, 3 x CH₂); 3.95 (s, 3H, OCH₃); 6.57 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.0 Hz); 6.92 (s, 1H, H-3); 7.39 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.51 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.59 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 7.99 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 11.8 (3 x CH₂); 13.6 (3 x CH₃); 27.3 (3 x CH₂); 28.9 (3 x CH₂); 53.4 (CH₃); 106.9 (C-6); 120.8 (C-3); 123.9 (C-7); 126.0 (2 x CH_{Ar}); 127.7 (Cq); 129.1 (2 x CH_{Ar}); 133.5 (CH_{Ar}); 139.2 (Cq); 147.0 (Cq); 147.1 (Cq); 161.8 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₆H₃₉N₂O₃SSn (MH⁺): 519. 1702; found 519.1700.

1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-carbaldehyde (20)

The reaction was carried out as described in general procedure **C** using *N,N*-dimethylformamide as the electrophile (0.108 mL, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded an inseparable mixture of two products: **20** and the starting material **6**. We failed to purify **20** even after several attempts of recrystallisation. The yield of the reaction was estimated by 1H NMR (52.8 mg, 42 %).

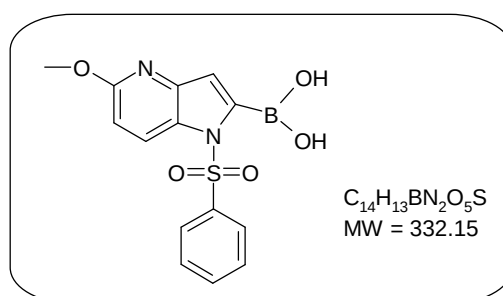
Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.31.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3097, 2954, 2365, 1669, 1522, 1397, 1173, 723.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.96 (s, 3H, OCH_3); 6.92 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.45 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.46 (s, 1H, H-3); 7.58 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.84 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.04 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz); 10.5 (s, 1H, CHO).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.8 (CH_3); 113.0 (C-6); 118.3 (C-3); 126.0 (C-7); 126.5 (2 x CH_{Ar}); 128.5 (Cq); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 134.6 (CH_{Ar}); 137.5 (Cq); 138.6 (Cq); 142.9 (Cq); 162.9 (Cq); 182.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{15}H_{13}N_2O_4S$ (MH^+): 317.0596; found 317.0602.

1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-boronic acid (21)

The reaction was carried out as described in general procedure **C** using trimethyl borate as the electrophile (0.155 mL, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). The crude product was obtained without purification by flash chromatography to afford **21** as a brown product (219 mg, 95 %).

Rf (EtOAc): 0.

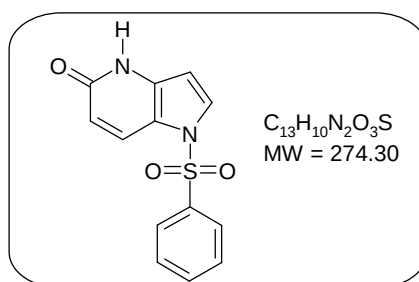
Mp: 176 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3101, 2921, 2357, 1736, 1637, 1347, 1139, 951, 725.

1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ 3.87 (s, 3H, OCH_3); 6.53 (s, 1H, H-3); 6.68 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.50 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.60 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 8.02 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.04 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $DMSO-d_6$) δ 53.8 (CH_3); 104.1 (C-6); 112.9 (C-3); 125.8 (C-7); 126.1 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.0 (2 x CH_{Ar}); 133.5 (CH_{Ar}); 138.9 (2 x Cq); 144.9 (Cq); 160.1 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{14}H_{14}BN_2O_5S$ (MH^+): 333.0716; found 333.0703.

1-Benzenesulfonyl-1,4-dihydro-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-one (22)²⁷⁶

The reaction was carried out as described in general procedure **D** from a solution of **6** (1.0 g, 3.47 mmol, 1.0 equiv.) in 40 mL of CH₃CN. The mixture was refluxed for 3.5 h. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) yielded **22** as a brown solid (0.838 g, 88 %).

Rf (EtOAc): 0.16.

Mp: 223 °C.

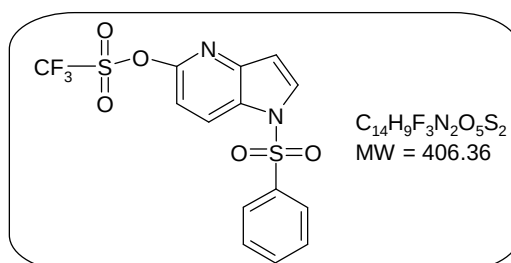
IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3653, 1654, 1148, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.48 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.0 Hz); 6.49 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 4.0 Hz); 7.48 – 7.52 (m, 3H, H-2, 2 x H_{Ar}); 7.61 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 8.0 Hz); 7.84 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.0 Hz); 8.11 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.0 Hz); 13.56 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 103.2 (CH_{Ar}); 115.7 (CH_{Ar}); 118.6 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 127.6 (C-2); 128.8 (C-7); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 134.4 (CH_{Ar}); 135.7 (Cq); 137.8 (Cq); 164.6 (Cq).

MS (IS): m/z = 275.0 [MH]⁺.

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₃H₁₁N₂O₃S (MH⁺): 275.0490; found 275.0506.

Trifluoro-methanesulfonic acid 1-benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl ester (23)

A solution of **22** (1.8 g, 6.56 mmol, 1.0 equiv.) in CH₂Cl₂ (40 mL) was cooled to 0 °C. *N,N*-Diisopropylethylamine (1.5 mL, 8.53 mmol, 1.3 equiv.) was added and the mixture was stirred at 0 °C for 10 min. Trifluoromethanesulfonic anhydride (1.2 mL, 7.22 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise then the reaction was stirred at 0 °C for 25 min. The reaction was stopped by addition of a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL). The crude material was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (40 mL) then dried over MgSO₄ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 8/2) to afford **23** as a yellow oil (3.0 g, 99 %).

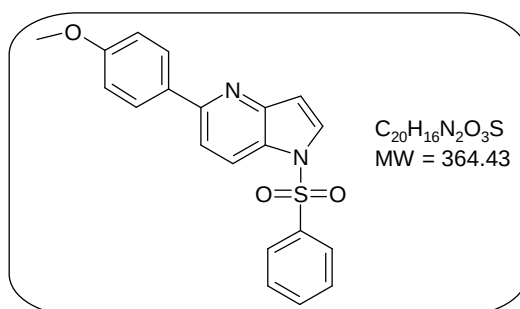
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.56.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 1603, 1562, 1404, 1384, 1211, 1128, 867, 724.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.86 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 4.0 Hz); 7.12 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.0 Hz); 7.51 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.63 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.88 – 7.92 (m, 3H, 2 x H_{Ar}, H-2); 8.43 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 109.5 (C-3); 110.4 (C-6); 118.6 (q, CF₃, J = 1280 Hz); 125.0 (C-7); 126.8 (2 x CH_{Ar}); 127.8 (Cq); 129.7 (2 x CH_{Ar}); 131.5 (C-2); 134.8 (CH_{Ar}); 137.5 (Cq); 146.7 (Cq); 152.4 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₄H₁₀F₃N₂O₅S₂ (MH⁺): 406.9983; found 406.9972.

1-Benzenesulfonyl-5-(4-methoxy-phenyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (24)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 4-methoxyphenylboronic acid (56.1 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 2 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 8/2) to afford **24** as a brown oil (85.2 mg, 95 %).

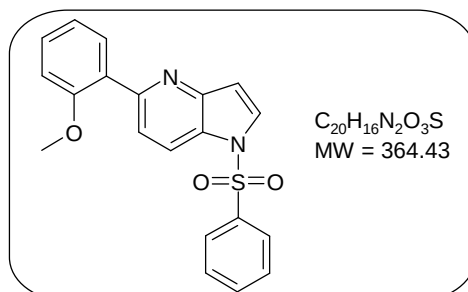
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.27.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2954, 1587, 1403, 1365, 1248, 1128, 815, 724.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.84 (s, 3H, OCH₃); 6.91 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.7 Hz); 6.98 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 9.0 Hz); 7.45 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.55 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.62 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.77 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 3.7 Hz); 7.88 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 7.93 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 9.0 Hz); 8.28 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 55.3 (CH₃); 110.7 (C-3); 114.1 (2 x CH_{Ar}); 116.2 (C-6); 121.4 (C-7); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 127.1 (Cq); 128.3 (2 x CH_{Ar}); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 129.6 (C-2); 132.1 (Cq); 134.2 (CH_{Ar}); 137.9 (Cq); 148.8 (Cq); 154.4 (Cq); 160.3 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₂₀H₁₇N₂O₃S (MH⁺): 365.0960; found 365.0968.

1-Benzenesulfonyl-5-(2-methoxy-phenyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (25)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 2-methoxyphenylboronic acid (56.1 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 2 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **25** as a white solid (62.5 mg, 70 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.37.

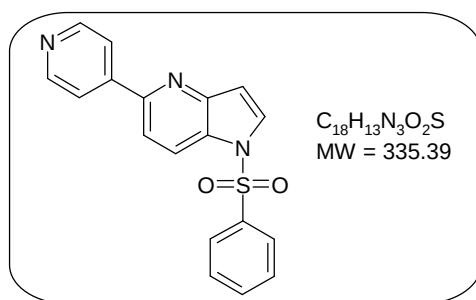
Mp: 134 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3146, 3060, 2925, 2852, 1375, 1128, 733.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.83 (s, 3H, OCH₃); 6.93 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 4.0 Hz); 7.0 (d, 1H, H_{Ar}, J = 7.6 Hz); 7.07 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.6 Hz); 7.36 (ddd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz, J'' = 2.0 Hz); 7.47 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.6 Hz); 7.56 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.6 Hz); 7.71 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 7.6 Hz, J' = 2.0 Hz); 7.75 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.79 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 4.0 Hz); 7.92 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.6 Hz); 8.28 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 55.5 (CH₃); 110.6 (C-3); 111.3 (CH_{Ar}); 120.2 (C-7); 121.0 (C-6 + CH_{Ar}); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 127.0 (Cq); 129.1 (C-2); 129.2 (Cq); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 129.8 (CH_{Ar}); 131.2 (CH_{Ar}); 134.1 (CH_{Ar}); 138.0 (Cq); 148.5 (Cq); 153.2 (Cq); 156.7 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₂₀H₁₇N₂O₃S (MH⁺): 365.0960; found 365.0971.

1-Benzenesulfonyl-5-pyridin-4-yl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (26)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 4-pyridineboronic acid (47.9 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 2 h. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) to afford **26** as a yellow solid (80 mg, 97 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.43.

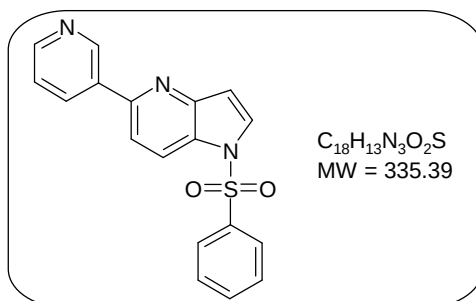
Mp: 145 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3113, 1597, 1372, 1170, 1136, 752, 722.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.59 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.76 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.86 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.89 – 7.92 (m, 4H, 4 x H_{Py}); 8.38 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 8, 71 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 6.3$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 110.5 (C-3); 116.8 (C-6); 121.3 (2 x CH_{Ar}); 121.5 (C-7); 126.8 (2 x CH_{Ar}); 128.2 (Cq); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 130.5 (C-2); 134.4 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 146.5 (Cq); 149.2 (Cq); 150.4 (2 x CH_{Ar}); 151.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₁₈H₁₄N₃O₂S (MH⁺): 336.0807; found 336.0824.

1-Benzenesulfonyl-5-pyridin-3-yl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (27)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 3-pyridineboronic acid (47.9 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 2 h. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) to afford **27** as a yellow solid (64.4 mg, 78 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.50.

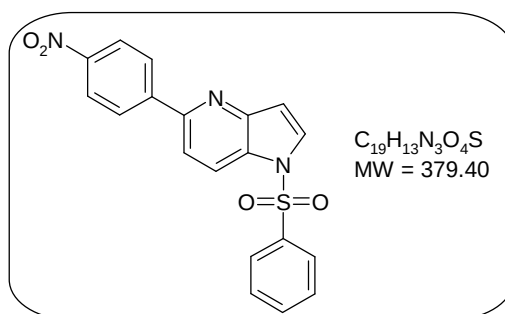
Mp: 145 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3146, 3105, 2357, 1573, 1407, 1168, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.93 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 7.37 (dd, 1H, H_{Py}, $J = 8.0$ Hz, $J' = 4.8$ Hz); 7.45 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.55 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.69 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.85 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 7.91 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.6$ Hz); 8.31 (dd, 1H, H_{Py}, $J = 8.0$ Hz, $J' = 2.0$ Hz); 8.36 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 8.63 (dd, 1H, H_{Py}, $J = 4.8$ Hz, $J' = 2.0$ Hz); 9.22 (dd, 1H, H_{Py}, $J = J' = 2.0$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 110.3 (C-3); 116.4 (C-6); 121.4 (C-7); 123.3 (CH_{Ar}); 126.5 (2 x CH_{Ar}); 127.4 (Cq); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 130.0 (C-2); 134.1 (CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 134.7 (Cq); 137.5 (Cq); 148.1 (CH_{Ar}); 148.9 (Cq); 149.4 (CH_{Ar}); 151.4 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₁₈H₁₄N₃O₂S (MH⁺): 336.0807; found 336.0802.

1-Benzenesulfonyl-5-(4-nitro-phenyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (28)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 4-nitrophenylboronic acid (62.0 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 1.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **28** as a yellow solid (85 mg, 91 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.27.

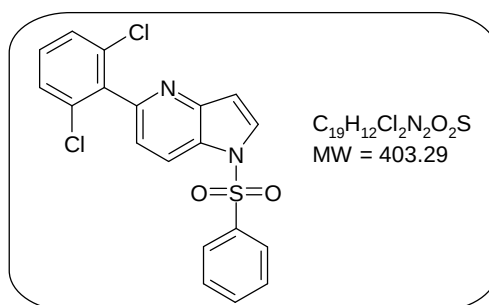
Mp: 196 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3138, 2929, 2353, 1512, 1345, 1133, 751.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.94 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.7$ Hz); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.59 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.75 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.86 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.7$ Hz); 7.91 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.5$ Hz); 8.16 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 8.8$ Hz); 8.29 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 8.8$ Hz); 8.37 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 110.5 (C-3); 117.1 (C-6); 121.5 (C-7); 123.9 (2 x CH_{Ar}); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 127.8 (2 x CH_{Ar}); 127.9 (Cq); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 130.6 (C-2); 134.4 (CH_{Ar}); 137.7 (Cq); 145.4 (Cq); 147.9 (Cq); 149.2 (Cq); 151.6 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₉H₁₄N₃O₄S (MH⁺): 380.0705; found 380.0689.

1-Benzenesulfonyl-5-(2,6-dichloro-phenyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (29)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 2,6-dichlorophenylboronic acid (70.0 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **29** as a white solid (17 mg, 17 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.38.

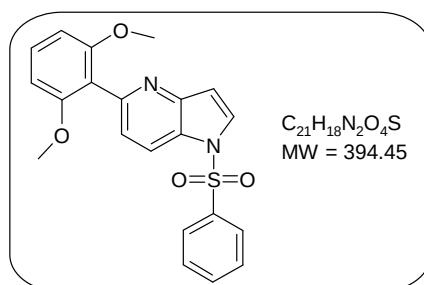
Mp: 158 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3101, 1585, 1565, 1434, 1373, 1142, 782, 724.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.93 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.8$ Hz); 7.24 - 7.307 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.39 - 7.42 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.52 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.63 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.86 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.8$ Hz); 7.96 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.5$ Hz); 8.38 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 110.4 (C-3); 120.6 (C-6); 121.1 (C-7); 126.9 (2 x CH_{Ar}); 127.5 (Cq); 128.1 (2 x CH_{Ar}); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 129.8 (CH_{Ar}); 129.9 (C-2); 134.4 (CH_{Ar}); 134.9 (2 x Cq); 138.0 (Cq); 138.4 (Cq); 148.4 (Cq); 152.0 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₉H₁₃Cl₂N₂O₂S (MH⁺): 403.0075; found 403.0096.

1-Benzenesulfonyl-5-(2,6-dimethoxy-phenyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (30)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 2,6-dimethoxyphenylboronic acid (67.2 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 2.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 3/7) to afford **30** as a white solid (85 mg, 88 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 3/7): 0.43.

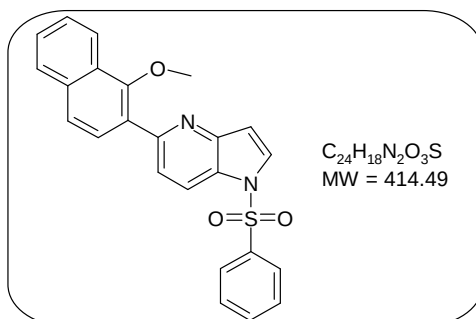
Mp: 174 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3105, 2950, 2921, 2839, 1585, 1365, 1247, 1108, 726.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.66 (s, 6H, 2 x CH₃); 6.63 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 6.91 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.8 Hz); 7.27 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.4 Hz); 7.30 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.46 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.55 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.77 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 3.8 Hz); 7.93 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.28 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.4 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 55.8 (2 x CH₃); 104.0 (2 x CH_{Ar}); 110.5 (C-3); 118.7 (Cq); 120.4 (C-7); 121.9 (C-6); 126.8 (2 x CH_{Ar}); 126.9 (Cq); 128.6 (C-2); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 129.6 (CH_{Ar}); 134.1 (CH_{Ar}); 138.1 (Cq); 148.3 (Cq); 151.1 (Cq); 158.0 (2 x Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₁H₁₉N₂O₄S (MH⁺): 395.1066; found 395.1061.

1-Benzenesulfonyl-5-(1-methoxy-naphthalen-2-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (31)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the 1-methoxynaphthalene-2-boronic acid (74.6 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 4 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **31** as a white solid (94 mg, 92 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.35.

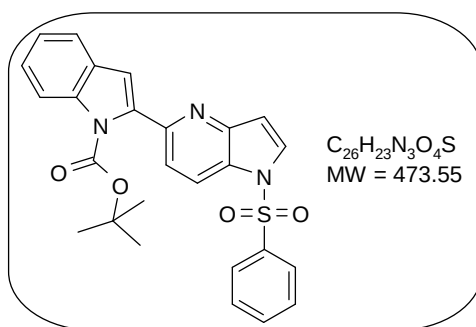
Mp: 173 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3142, 2938, 2827, 1368, 1167, 1126, 737, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.96 (s, 3H, CH₃); 6.98 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.6 Hz); 7.25 (s, 1H, H_{Ar}); 7.35 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 8.0 Hz); 7.46 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 8.0 Hz); 7.50 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.60 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.75 – 7.83 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.93 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.14 (s, 1H, H_{Ar}); 8.31 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.4 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 55.6 (CH₃); 106.1 (CH_{Ar}); 110.7 (C-3); 120.4 (C-7); 121.3 (CH_{Ar}); 124.0 (CH_{Ar}); 126.3 (CH_{Ar}); 126.8 (CH_{Ar}); 126.9 (2 x CH_{Ar}); 127.3 (Cq); 128.3 (CH_{Ar}); 128.8 (Cq); 129.3 (CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 130.8 (Cq); 131.2 (CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 134.5 (Cq); 138.1 (Cq); 148.6 (Cq); 153.1 (Cq); 155.1 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₄H₁₉N₂O₃S (MH⁺): 415.1116; found 415.1126.

2-(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-indole-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (32)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using the *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-indole-2-trifluoroborate³⁵¹ (119 mg, 0.369 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 6 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **32** as a colorless oil (81 mg, 69 %).

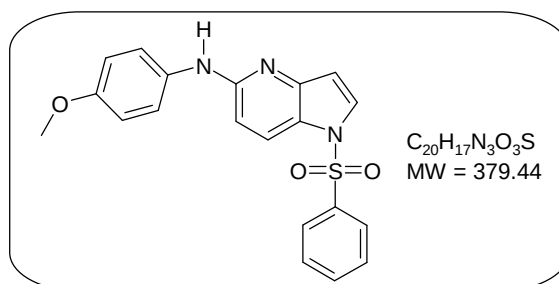
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.42.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2974, 2353, 1730, 1327, 1127, 728.

¹H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.1 (s, 9H, 3 x CH_3); 6.75 (s, 1H, H_{Ind}); 6.89 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.24 (dd, 1H, H_{Ind} , $J = J' = 8.4$ Hz); 7.34 (dd, 1H, H_{Ind} , $J = J' = 8.4$ Hz); 7.45 – 7.49 (m, 3H, H-6 + 2 x H_{Ar}); 7.55 – 7.59 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.84 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.90 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.19 (d, 1H, H_{Ind} , $J = 8.4$ Hz); 8.31 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 27.3 (3 x CH_3); 83.1 (Cq); 110.4 (C-3); 111.0 (CH_{Ar}); 115.0 (CH_{Ar}); 119.3 (C-6); 120.7 (C-7); 120.8 (CH_{Ar}); 122.9 (CH_{Ar}); 124.9 (CH_{Ar}); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 127.1 (Cq); 128.8 (Cq); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 130.1 (C-2); 134.2 (CH_{Ar}); 137.7 (Cq); 137.8 (Cq); 139.0 (Cq); 148.1 (Cq); 149.9 (Cq); 150.1 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{26}H_{24}N_3O_4S$ (MH⁺): 474.1488; found 474.1473.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-(4-methoxy-phenyl)-amine (33)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the 4-methoxy-phenylamine (36.3 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 1 hour. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) to afford **33** as a brown oil (91.4 mg, 98 %).

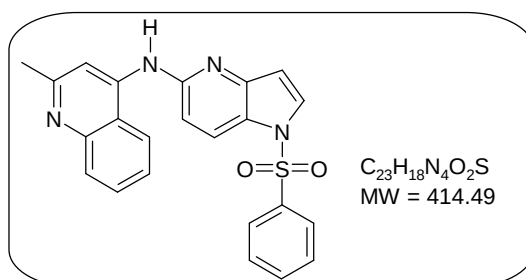
Rf (petroleum ether/EtOAc 5/5): 0.45.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3179, 3105, 3007, 2933, 2835, 1591, 1509, 1409, 1168, 1120, 723.

¹H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.78 (s, 3H, CH_3); 6.57 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 6.62 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 6.87 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.26 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.41 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.52 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.59 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.80 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.02 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 55.4 (CH_3); 105.3 (C-6); 109.9 (C-3); 114.5 (2 x CH_{Ar}); 122.9 (Cq); 123.2 (C-7); 123.7 (2 x CH_{Ar}); 126.6 (2 x CH_{Ar}); 128.6 (C-2); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 133.5 (Cq); 133.9 (CH_{Ar}); 137.9 (Cq); 147.3 (Cq); 155.1 (Cq); 156.1 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{20}H_{18}N_3O_3S$ (MH⁺): 380.1069; found 380.1077.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-(2-methyl-quinolin-4-yl)-amine (34)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the 2-methyl-quinolin-4-ylamine (46.7 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 3 h. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford **34** as a light brown solid (93 mg, 91 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.39.

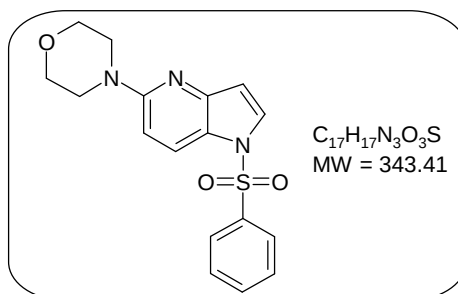
Mp: 123 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3166, 1569, 1365, 1165, 1136, 754, 722.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 2.65 (s, 3H, CH₃); 6.75 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.12 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.38 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.46 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.57 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.61 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.74 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.83 (s, 1H, H_{Ar}); 7.87 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.5$ Hz); 7.94 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 8.0$ Hz); 7.97 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 8.0$ Hz); 8.22 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 25.7 (CH₃); 106.2 (CH_{Ar}); 109.4 (C-6); 109.9 (C-3); 118.9 (Cq); 119.8 (CH_{Ar}); 123.3 (C-7); 124.4 (Cq); 125.0 (CH_{Ar}); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.1 (C-2); 129.4 (CH_{Ar}); 129.5 (3 x CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 137.9 (Cq); 144.4 (Cq); 147.3 (Cq); 148.5 (Cq); 151.6 (Cq); 159.6 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₃H₁₉N₄O₂S (MH⁺): 415.1229; found 415.1223.

1-Benzenesulfonyl-5-morpholin-4-yl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (35)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the morpholine (0.026 mL, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 2.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **35** as a light brown solid (68 mg, 80 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 5/5): 0.43.

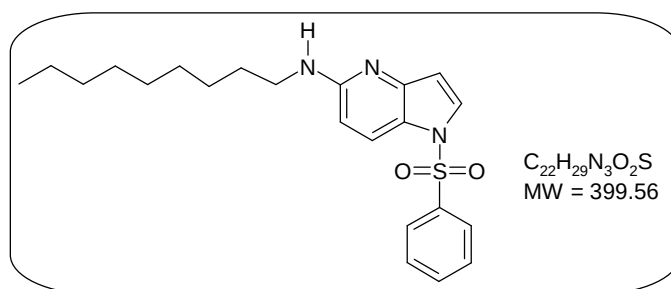
Mp: 130 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3093, 2856, 1574, 1362, 1247, 1168, 724.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.50 (t, 4H, 2 x CH₂, $J = 4.8$ Hz); 3.82 (t, 4H, 2 x CH₂, $J = 4.8$ Hz); 6.64 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 6.66 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.43 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.53 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.62 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 7.81 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 8.10 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 46.3 (2 x CH₂); 66.8 (2 x CH₂); 104.6 (C-6); 110.2 (C-3); 122.7 (Cq); 123.1 (C-7); 126.6 (2 x CH_{Ar}); 128.8 (C-2); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 133.9 (CH_{Ar}); 138.0 (Cq); 147.4 (Cq); 157.8 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₇H₁₈N₃O₃S (MH⁺): 344.1057; found 344.1069.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-nonyl-amine (36)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the nonylamine (0.054 mL, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 7 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 8/2) to afford **36** as a brown oil (20 mg, 23 %).

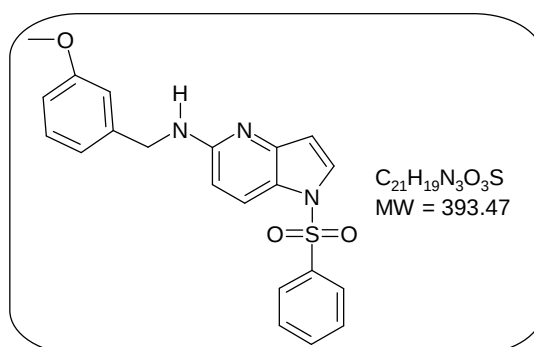
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.43.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2924, 2856, 1593, 1370, 1168, 1131, 723.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 0.87 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz); 1.26 – 1.38 (m, 12H, 6 x CH_2); 1.60 (quint, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 3.28 (q, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 4.44 (t, 1H, NH, $J = 7.2$ Hz); 6.36 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 6.58 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 7.43 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.53 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.56 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 7.80 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.01 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 14.1 (CH_3); 22.6 (CH_2); 27.0 (CH_2); 29.2 (CH_2); 29.4 (CH_2); 29.5 (CH_2); 29.6 (CH_2); 31.8 (CH_2); 42.5 (CH_2); 104.7 (C-6); 110.0 (C-3); 122.2 (Cq); 123.3 (C-7); 126.6 (2 x CH_{Ar}); 128.3 (C-2); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 133.8 (CH_{Ar}); 138.1 (Cq); 147.5 (Cq); 157.0 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{22}H_{30}N_3O_2S$ (MH+): 400.2059; found 400.2073.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-(3-methoxy-benzyl)-amine (37)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the 3-methoxy-benzylamine (0.040 mL, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 7 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **37** as a brown oil (24 mg, 25 %).

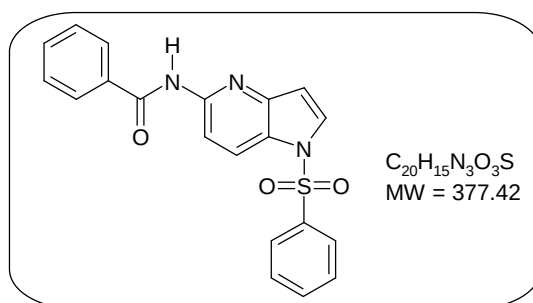
Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.39.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3428, 2954, 1588, 1367, 1167, 1130, 723.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.84 (s, 3H, CH_3); 4.52 (d, 2H, CH_2 , $J = 6.0$ Hz); 4.97 (t, 1H, NH, $J = 6.0$ Hz); 6.38 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 6.60 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 6.86 – 6.90 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.23 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 9.0$ Hz, $J' = 1.6$ Hz); 7.31 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 9.0$ Hz, $J' = 1.6$ Hz); 7.42 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.53 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.56 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 7.80 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 7.98 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$): δ = 42.0 (CH_3); 55.3 (CH_2); 105.1 (C-6); 110.0 (CH_{Ar}); 110.2 (C-3); 120.5 (CH_{Ar}); 122.3 (Cq); 123.2 (C-7); 126.6 (2 x CH_{Ar}); 127.1 (Cq); 128.2 (C-2); 128.5 (CH_{Ar}); 129.1 (CH_{Ar}); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 133.8 (CH_{Ar}); 138.1 (Cq); 147.4 (Cq); 156.9 (Cq); 157.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{21}H_{20}N_3O_3S$ (MH+): 394.1219; found 394.1225.

***N*-(1-Benzenesulfonyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl)-benzamide (**38**)**

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the benzamide (36 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 3 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **38** as a light brown solid (87 mg, 94 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.39.

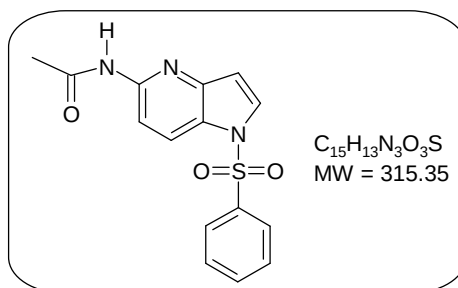
Mp: 134 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3134, 3105, 1661, 1533, 1406, 1349, 1287, 1168, 1131, 723, 686.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 6.61 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 7.42 – 7.59 (m, 6H, 6 x H_{Ar}); 7.74 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 7.86 – 7.92 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 8.33 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz); 8.44 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 8.92 (d, 1H, NH, $J = 7.2$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 109.2 (C-3); 110.7 (C-6); 123.2 (C-7); 125.9 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 127.2 (2 x CH_{Ar}); 128.7 (2 x CH_{Ar}); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 129.9 (C-2); 132.2 (CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 134.2 (Cq); 137.7 (Cq); 146.6 (Cq); 148.9 (Cq); 165.7 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{20}H_{16}N_3O_3S$ (MH⁺): 378.0912; found 378.0912.

***N*-(1-Benzenesulfonyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl)-acetamide (**39**)**

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the acetamide (14 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 1.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 4/6) to afford **39** as a colorless oil (78 mg, 99 %).

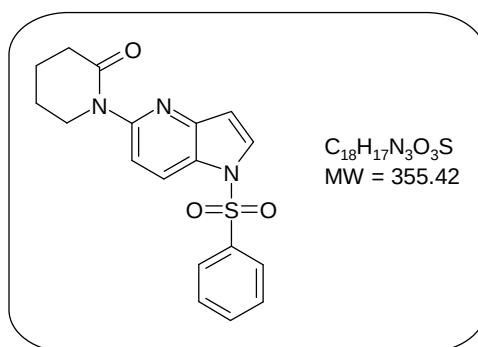
Rf (CH_2Cl_2 /MeOH 98/2): 0.3.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3412, 3277, 3097, 1674, 1532, 1405, 1376, 1129, 726.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 2.14 (s, 3H, CH_3); 6.63 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.8$ Hz); 7.43 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.54 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.74 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.8$ Hz); 7.84 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 8.22 – 8.28 (m, 2H, H-6, H-7); 8.77 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 24.6 (CH_3); 108.8 (C-6); 110.6 (C-3); 123.6 (C-7); 125.7 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 130.0 (C-2); 134.3 (CH_{Ar}); 137.7 (Cq); 145.7 (Cq); 148.7 (Cq); 168.8 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{15}H_{14}N_3O_3S$ (MH⁺): 316.0756; found 316.0765.

1-(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-piperidin-2-one (40)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the piperidin-2-one (29.3 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 6.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 2/8) to afford **40** as a brown oil (69 mg, 79 %).

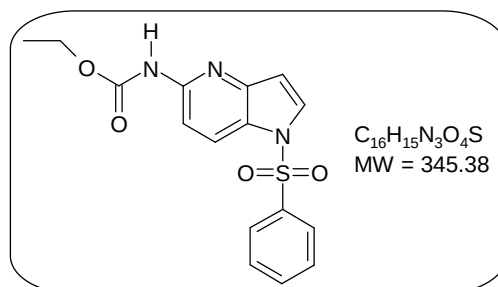
Rf (EtOAc): 0.30.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3105, 2954, 2864, 1651, 1401, 1373, 1167, 1127, 728.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.91 – 1.96 (m, 4H, 2 x CH_2); 2.59 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Hz); 3.91 (t, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Hz); 6.79 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.47 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.57 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 7.6$ Hz); 7.60 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.2$ Hz); 7.77 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.88 (d, 2H, 2 x CH , $J = 7.6$ Hz); 8.25 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.2$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 21.0 (CH_2); 23.1 (CH_2); 33.3 (CH_2); 48.6 (CH_2); 109.8 (C-3); 117.1 (C-6); 121.9 (C-7); 126.1 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (C-2); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 146.9 (Cq); 151.9 (Cq); 170.9 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{18}H_{18}N_3O_3S$ (MH+): 356.1069; found 356.1063.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-carbamic acid ethyl ester (41)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the ethyl carbamate (26.3 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 2.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **41** as a white solid (61 mg, 72 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 5/5): 0.58.

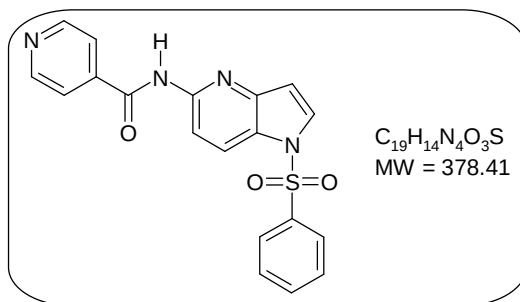
Mp: 153 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2987, 2361, 1714, 1556, 1373, 1172, 725.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.30 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz); 4.23 (q, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 6.68 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 7.46 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.57 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.60 (bs, 1H, NH); 7.72 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 7.85 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.6$ Hz); 8.0 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 8.26 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 14.5 (CH_3); 61.5 (CH_2); 108.9 (C-6); 109.5 (C-3); 123.3 (C-7); 125.5 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 129.6 (C-2); 134.2 (CH_{Ar}); 137.9 (Cq); 146.7 (Cq); 149.0 (Cq); 153.4 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{16}H_{16}N_3O_4S$ (MH+): 346.0862; found 346.0848.

***N*-(1-Benzenesulfonyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl)-isonicotinamide (42)**

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using dioxane instead of toluene and the isonicotinamide (60 mg, 0.493 mmol, 2.0 equiv.). The mixture was stirred for 24 h at 80 °C. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) to afford **42** as a light brown solid (51 mg, 55 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.54.

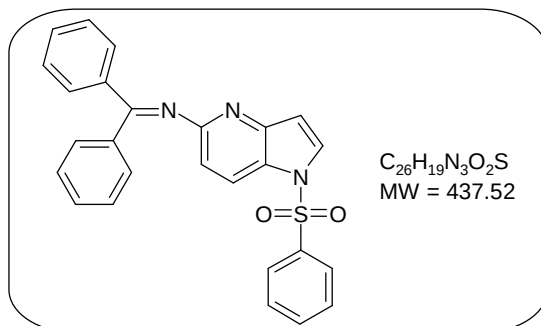
Mp: 200 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3105, 1700, 1542, 1408, 1350, 1288, 1172, 1123, 727.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.65 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.59 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 7.76 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 6.0$ Hz); 7.79 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.89 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.5$ Hz); 8.35 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz); 8.39 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 8.78 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 6.0$ Hz); 9.04 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 109.1 (C-3); 110.8 (C-6); 120.9 (2 x CH_{Ar}); 123.3 (C-7); 126.1 (Cq); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 130.2 (C-2); 134.3 (CH_{Ar}); 137.7 (Cq); 141.3 (Cq); 146.6 (Cq); 148.2 (Cq); 150.8 (2 x CH_{Ar}), 163.7 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₉H₁₅N₄O₃S (MH⁺): 379.0865; found 379.0845.

1-(1-Benzenesulfonyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl)-3-phenyl-urea (44)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the phenyl-urea (40 mg, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 1 hour. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) to afford **44** as a white solid (74 mg, 77 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 98/2): 0.11.

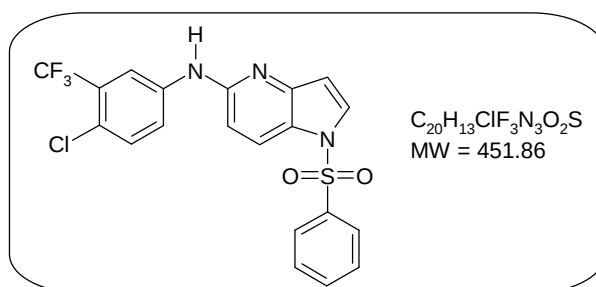
Mp: 240 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3215, 3023, 2966, 1690, 1564, 1275, 729, 676.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.96 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.6$ Hz); 7.03 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.32 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.50 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.56 – 7.64 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.73 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.5$ Hz); 8.03 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.5$ Hz); 8.07 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.6$ Hz); 8.33 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz); 8.74 (bs, 1H, NH); 9.71 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 108.8 (C-6); 109.5 (C-3); 118.8 (2 x CH_{Ar}); 122.4 (CH_{Ar}); 123.5 (Cq); 123.6 (C-7); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 128.8 (2 x CH_{Ar}); 129.8 (2 x CH_{Ar}); 130.2 (C-2); 134.8 (CH_{Ar}); 136.7 (Cq); 138.9 (Cq); 145.2 (Cq); 150.4 (Cq); 152.0 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₀H₁₇N₄O₃S (MH⁺): 393.1021; found 393.1032.

1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-benzhydrylidene-amine (45)

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using the benzophenone imine (0.05 mL, 0.295 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was refluxed for 5.5 h. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **45** as a yellow oil (71 mg, 66 %).

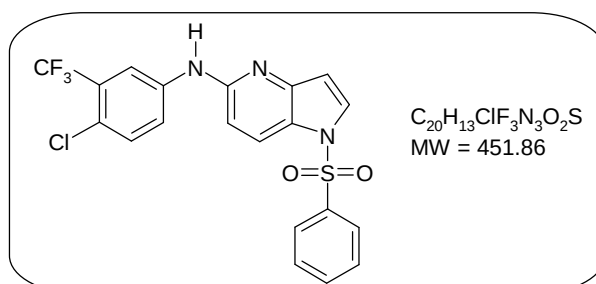
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.18.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3060, 1736, 1568, 1372, 1127, 725, 685.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.50 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 6.70 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.6 Hz); 7.12 – 7.19 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.24 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.2 Hz); 7.37 – 7.44 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.47 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.2 Hz); 7.55 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.6 Hz); 7.65 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 3.6 Hz); 7.76 – 7.81 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 8.01 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 110.5 (C-3); 112.0 (C-6); 122.4 (C-7); 125.0 (Cq); 126.5 (4 x CH_{Ar}); 127.8 (CH_{Ar}); 128.0 (C-2); 128.8 (CH_{Ar}); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (4 x CH_{Ar}); 129.6 (CH_{Ar}); 131.2 (CH_{Ar}); 134.0 (CH_{Ar}); 136.0 (Cq); 137.8 (Cq); 138.7 (Cq); 147.6 (Cq); 160.7 (Cq); 170.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₂₆H₂₀N₃O₂S (MH⁺): 438.1276; found 438.1277.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-amine (46)

A microwave vial containing a stirring bar was charged with **23** (0.120 g, 0.295 mmol, 1.0 equiv.), 4-chloro-3-trifluoromethyl-phenylamine (90 mg, 0.443 mmol, 1.5 equiv.), DBU (0.110 mL, 0.738 mmol, 2.5 equiv.), xantphos (4 mg, 0.00591 mmol, 0.02 equiv.) and Pd₂dba₃ (8 mg, 0.00886 mmol, 0.03 equiv.) in toluene (2 mL). The mixture was submitted to microwave irradiation with stirring at 150 °C for 30 minutes, then cooled to room temperature and toluene was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **46** as a light brown solid (0.128 g, 96 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.53.

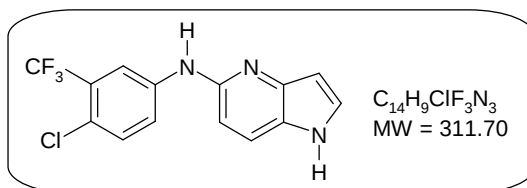
Mp: 130 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3510, 1592, 1424, 1134, 725, 683.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.68 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.5 Hz); 6.71 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 6.95 (bs, 1H, NH); 7.35 (d, 1H, H_{Ar}, J = 8.8 Hz); 7.45 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.56 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.68 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 3.5 Hz); 7.74 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 8.8 Hz, J' = 2.5 Hz); 7.85 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 7.92 (d, 1H, H_{Ar}, J = 2.5 Hz); 8.13 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 107.8 (C-6); 109.9 (C-3); 117.2 (CH_{Ar}); 122.0 (CH_{Ar}); 122.7 (q, CF₃, J = 1080 Hz); 123.1 (Cq); 123.3 (C-7); 123.4 (Cq); 126.5 (2 x CH_{Ar}); 128.4 (Cq); 128.9 (C-2); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 131.6 (CH_{Ar}); 134.0 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 139.9 (Cq); 146.7 (Cq); 152.3 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₂₀H₁₃ClF₃N₃O₂S (MH⁺): 452.0447; found 452.0464.

(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-amine (47)

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from a solution of **46** (0.290 g, 0.642 mmol) in dry THF (8 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) yielded **47** as a light brown solid (0.193 g, 96 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.25.

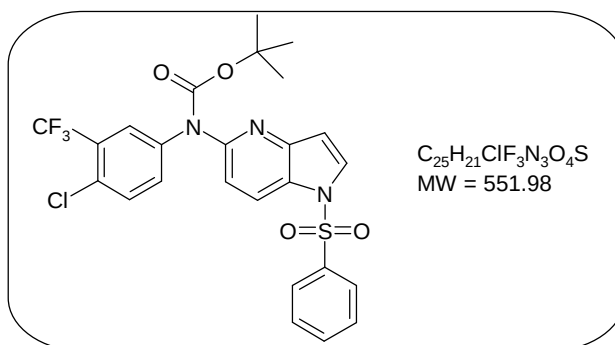
Mp: 144 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3188, 2450, 1577, 1478, 1322, 1114, 740.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 6.56 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 2.5$ Hz); 6.67 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 6.79 (bs, 1H, NH); 7.31 - 7.35 (m, 2H, $H_{Ar} + H-2$); 7.55 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 7.62 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 7.78 (bs, 1H, H_{Ar}); 8.54 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 102.5 (C-3); 106.3 (C-6); 116.5 (CH_{Ar}); 121.0 (C-7); 121.4 (CH_{Ar}); 122.4 (Cq); 122.8 (q, CF_3 , $J = 1080$ Hz); 124.4 (Cq); 127.5 (C-2); 128.3 (Cq); 131.8 (CH_{Ar}); 141.0 (Cq); 144.1 (Cq); 149.8 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{14}H_{10}ClF_3N_3$ (MH^+): 312.0515; found 312.0515.

(1-Benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (48)

To a solution of **46** (0.500 g, 1.11 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (8 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (0.290 g, 1.33 mmol, 1.2 equiv.) and 4-dimethylaminopyridine (13.5 mg, 0.111 mmol, 0.10 equiv.). The mixture was stirred for 16 h at r.t. The reaction was stopped by addition of H_2O (8 mL). The crude product was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) and the organic layers were washed with brine (10 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **48** as a white solid (0.550 g, 90 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.29.

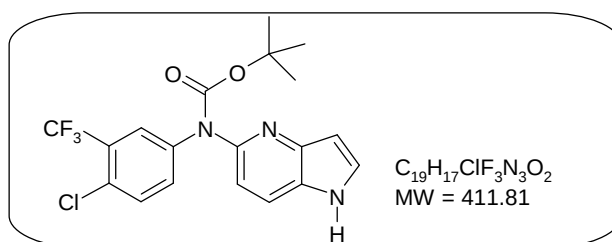
Mp: 178 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2384, 1731, 1380, 1289, 1157, 1135, 728.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.43 (s, 9H, 3 x CH_3); 6.75 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.28 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 8.4$ Hz, $J' = 2.4$ Hz); 7.41 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 7.42 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.57 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.4$ Hz); 7.60 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.78 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.88 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.31 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 29.1 (3 x CH_3); 82.7 (Cq); 110.1 (C-3); 117.6 (C-6); 122.5 (C-7); 125.2 (q, CF_3 , $J = 1080$ Hz); 126.3 (CH_{Ar}); 126.5 (Cq); 126.8 (2 x CH_{Ar}); 128.1 (Cq); 128.6 (Cq); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 130.0 (C-2); 131.2 (CH_{Ar}); 131.6 (CH_{Ar}); 134.4 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 140.6 (Cq); 147.6 (Cq); 151.1 (Cq); 153.1 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{25}H_{22}ClF_3N_3O_4S$ (MH^+): 552.0972; found 552.0957.

(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (49)

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from a solution of **48** (0.100 g, 0.181 mmol) in dry THF (5 mL). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) yielded **49** as a white solid (0.074 g, 99 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.27.

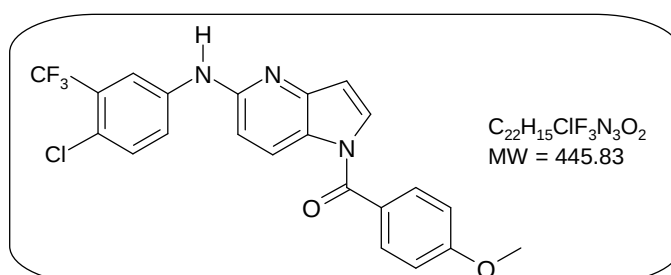
Mp: 202 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3105, 1717, 1314, 1299, 1146, 733.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.45 (s, 9H, 3 x CH_3); 6.64 (bs, 1H, H-3); 7.15 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.34 - 7.36 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.40 (dd, 1H, H-2, $J = J' = 3.2$ Hz); 7.64 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.4$ Hz); 7.66 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 8.77 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 28.2 (3 x CH_3); 82.2 (Cq); 103.6 (C-3); 116.2 (C-6); 120.2 (C-7); 122.8 (q, CF_3 , $J = 1120$ Hz); 125.2 (CH_{Ar}); 127.1 (Cq); 128.2 (Cq); 128.5 (Cq); 128.9 (C-2); 130.1 (CH_{Ar}); 131.4 (CH_{Ar}); 141.3 (Cq); 145.3 (Cq); 148.3 (Cq); 153.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{19}H_{18}ClF_3N_3O_2$ (MH^+): 412.1040; found 412.1049.

[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-b]pyridin-1-yl]-(4-methoxy-phenyl)-methanone (50)

Procedure 1: The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.190 g, 0.610 mmol) and the 4-methoxy-benzoyl chloride (0.124 mL, 0.915 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **50** as a light brown solid (0.200 g, 73 %).

Procedure 2: To a solution of **49** (0.090 g, 0.165 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) at r.t., was added TFA (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. for 7 h. The reaction was stopped and neutralized by addition of a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (10 mL). The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure to afford **50** as a light brown solid (0.065 g, 88 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.47.

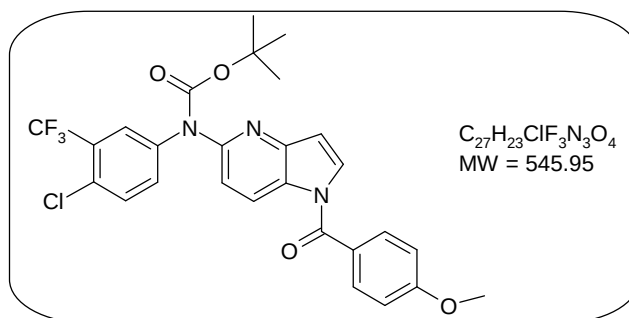
Mp: 139 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3380, 1658, 1604, 1479, 1327, 1264, 1170, 1109, 887.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.91 (s, 3H, OCH_3); 6.66 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.7$ Hz); 6.69 (bs, 1H, NH); 6.75 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.04 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 9.0$ Hz); 7.41 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.53 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.7$ Hz); 7.70 - 7.77 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.93 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.8$ Hz); 8.46 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$): δ = 55.5 (CH_3); 107.4 (C-6); 108.4 (C-3); 114.0 (2 x CH_{Ar}); 117.2 (CH_{Ar}); 124.1 (q, CF_3 , $J = 1084$ Hz); 122.1 (CH_{Ar}); 123.3 (Cq); 124.9 (Cq); 125.3 (Cq); 125.9 (C-7); 128.4 (Cq); 130.4 (C-2); 131.7 (2 x CH_{Ar}); 131.8 (CH_{Ar}); 140.1 (Cq); 147.1 (Cq); 152.1 (Cq); 163.0 (Cq); 167.8 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{22}H_{16}ClF_3N_3O_2$ (MH^+): 446.0883; found 446.0892.

(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-[1-(4-methoxy-benzoyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl]-carbamic acid *tert*-butyl ester (51)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **49** (0.100 g, 0.242 mmol) and the 4-methoxy-benzoyl chloride (0.049 mL, 0.362 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 85/15) yielded **51** as a colorless oil (0.124 g, 94 %).

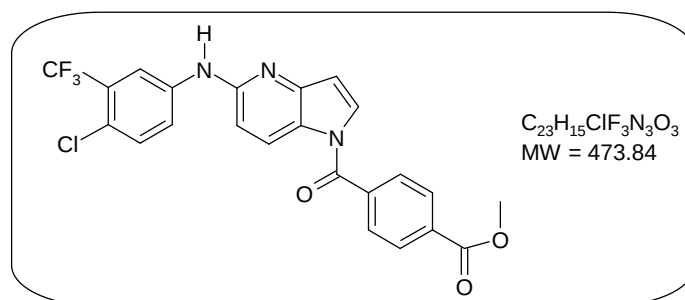
Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.17.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 1715, 1604, 1410, 1390, 1257, 1170, 1141, 884.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.47 (s, 9H, 3 x CH_3); 3.92 (s, 3H, OCH_3); 6.73 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.7$ Hz); 7.05 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.34 - 7.46 (m, 3H, H-6 + 2 x H_{Ar}); 7.63 - 7.66 (m, 2H, H-2 + H_{Ar}); 7.77 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 8.63 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.5$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 28.2 (3 x CH_3); 55.6 (CH_3); 82.5 (Cq); 108.7 (C-3); 114.2 (2 x CH_{Ar}); 118.2 (C-6); 123.9 (q, CF_3 , $J = 1080$ Hz); 125.0 (Cq); 125.2 (C-7); 125.8 (CH_{Ar}); 127.9 (Cq); 128.3 (Cq); 128.6 (Cq); 130.7 (CH_{Ar}); 131.5 (C-2); 131.6 (CH_{Ar}); 131.9 (2 x CH_{Ar}); 141.0 (Cq); 148.0 (Cq); 151.1 (Cq); 153.1 (Cq); 163.2 (Cq); 167.8 (Cq).

MS (IS): $m/z = 546.5$ [MH] $^+$.

4-[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-b]pyridine-1-carbonyl]-benzoic acid methyl ester (52)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.150 g, 0.481 mmol) and the methyl 4-chlorocarbonylbenzoate (0.143 g, 0.722 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **52** as a light green solid (0.166 g, 73 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.30.

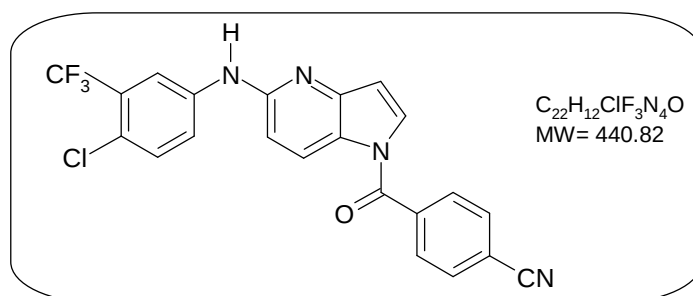
Mp: 220 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3384, 2406, 1712, 1481, 1323, 1283, 1129, 732.

1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ 3.92 (s, 3H, OCH_3); 6.71 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.7$ Hz); 6.90 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.53 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.7$ Hz); 7.58 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 9.2$ Hz); 7.90 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 8.11 - 8.15 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 8.40 - 8.42 (m, 2H, H-7 + H_{Ar}); 9.70 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $DMSO-d_6$) δ 52.4 (CH_3); 108.7 (C-6); 108.9 (C-3); 115.6 (CH_{Ar}); 119.7 (Cq); 121.6 (CH_{Ar}); 123.4 (Cq); 124.3 (Cq); 125.4 (C-7); 126.3 (Cq); 129.3 (4 x CH_{Ar}); 130.3 (C-2); 131.6 (CH_{Ar}); 132.3 (Cq); 137.1 (Cq); 141.2 (Cq); 146.2 (Cq); 152.7 (Cq); 165.4 (Cq); 166.9 (Cq).

HRMS (TOF ES $^+$): m/z calculated for $C_{23}H_{16}ClF_3N_3O_3$ (MH^+): 474.0832 found 474.0821.

4-[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-1-carbonyl]-benzonitrile (53)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.100 g, 0.321 mmol) and the 4-cyano-benzoyl chloride (0.080 g, 0.481 mmol). The yield estimation from the ¹H NMR of the crude product was 67 %. Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **53** as a yellow solid (0.0325 g, 23 %). This yield is due to the product degradation during the purification.

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.59.

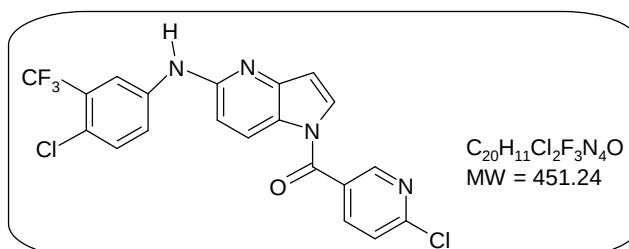
Mp: 224 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3384, 2927, 2471, 2316, 1668, 1482, 1393, 1320, 1149, 886.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.70 (d, 1H, H-3, *J*_{3,2} = 3.7 Hz); 6.78 (d, 1H, H-6, *J*_{6,7} = 9.0 Hz); 6.87 (bs, 1H, NH); 7.30 (d, 1H, H-2, *J*_{2,3} = 3.7 Hz); 7.42 (d, 1H, H_{Ar}, *J* = 8.5 Hz); 7.73 (dd, 1H, H_{Ar}, *J* = 8.5 Hz, *J'* = 2.5 Hz); 7.85 (bs, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.95 (d, 1H, H_{Ar}, *J* = 2.5 Hz); 8.50 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 9.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 107.8 (C-6); 110.1 (C-3); 115.8 (Cq); 117.6 (CH_{Ar}); 124.1 (q, CF₃, *J* = 1084 Hz); 122.4 (CH_{Ar}); 123.7 (Cq); 124.6 (Cq); 126.1 (C-7); 128.4 (Cq); 128.8 (Cq); 129.4 (C-2); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 131.9 (CH_{Ar}); 132.5 (2 x CH_{Ar}); 137.4 (Cq); 139.8 (Cq); 147.4 (Cq); 152.7 (Cq); 166.3 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): *m/z* calculated for C₂₂H₁₃ClF₃N₄O (MH⁺): 441.0730 found 441.0747.

(6-Chloro-pyridin-3-yl)-[5-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl]-methanone (54)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.100 g, 0.321 mmol) and the 6-chloro-nicotinoyl chloride (84.7 mg, 0.481 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **54** as a yellow solid (0.114 g, 79 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.36.

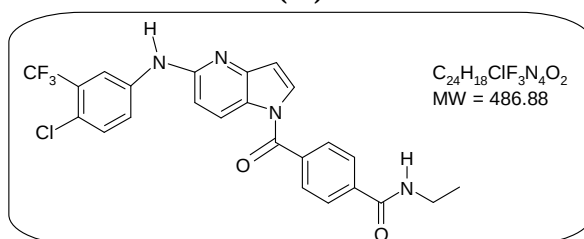
Mp: 194 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3344, 1653, 1586, 1487, 1418, 1406, 1173, 1111, 886.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.73 (d, 1H, H-3, *J*_{3,2} = 4.0 Hz); 6.91 (d, 1H, H-6, *J*_{6,7} = 8.8 Hz); 7.58 (d, 1H, H_{Ar}, *J* = 8.8 Hz); 7.66 (d, 1H, H-2, *J*_{2,3} = 4.0 Hz); 7.76 (d, 1H, H_{PyT}, *J* = 8.4 Hz); 8.12 (dd, 1H, H_{Ar}, *J* = 8.8 Hz, *J'* = 2.4 Hz); 8.25 (dd, 1H, H_{PyT}, *J* = 8.4 Hz, *J'* = 2.4 Hz); 8.40 (d, 1H, H_{Ar}, *J* = 2.4 Hz); 8.44 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 8.8 Hz); 8.80 (d, 1H, H_{PyT}, *J* = 2.4 Hz); 9.71 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 108.7 (C-6); 109.0 (C-3); 115.7 (CH_{Ar}); 119.7 (Cq); 121.6 (CH_{Ar}); 124.1 (Cq, CF₃, *J* = 1084 Hz); 124.3 (CH_{Ar}); 125.4 (C-7); 126.3 (Cq); 126.6 (Cq); 128.8 (Cq); 130.6 (C-2); 131.7 (CH_{Ar}); 140.2 (CH_{Ar}); 141.2 (Cq); 146.3 (Cq); 150.0 (CH_{Ar}); 152.8 (Cq); 153.1 (Cq); 165.1 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): *m/z* calculated for C₂₀H₁₂Cl₂F₃N₄O (MH⁺): 451.0340; found 451.0342.

4-[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-1-carbonyl]-*N*-ethyl-benzamide (55)

To a solution of ethylamine 2M in THF (0.35 mL, 0.696 mmol, 3.3 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) at 0 °C, was added dropwise a solution of trimethylaluminium 2M in toluene (0.38 mL, 0.760 mmol, 3.6 equiv.). The mixture was stirred at 0 °C for 2 h. A solution of **52** (0.100 g, 0.211 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was transferred dropwise into the reaction mixture. The reaction was refluxed for 16 h. The reaction was stopped by addition of H_2O (10 mL). The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc (4/6) to afford **55** as a yellow solid (0.019 g, 18 %).

Rf (EtOAc): 0.27.

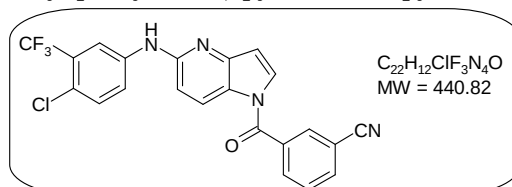
Mp: 209 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3564, 3323, 2410, 1651, 1588, 1489, 1423, 1112, 727.

1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ 1.15 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz); 3.32 (quint, 2H, CH_2 , $J = 7.2$ Hz); 6.72 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 3.7$ Hz); 6.90 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.55 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 3.7$ Hz); 7.60 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 7.86 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 8.04 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 8.12 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz, $J' = 2.5$ Hz); 8.40 - 8.42 (m, 2H, H-7 + H_{Ar}); 8.70 (t, 1H, NH, $J = 4.8$ Hz); 9.71 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $DMSO-d_6$) δ 14.6 (CH_3); 34.1 (CH_2); 108.6 (C-6); 108.7 (C-3); 115.4 (CH_{Ar}); 122.5 (Cq); 121.6 (CH_{Ar}); 123.5 (Cq); 125.5 (C-7); 127.3 (2 x CH_{Ar}); 129.0 (2 x CH_{Ar}); 130.5 (C-2); 131.7 (CH_{Ar}); 135.2 (Cq); 135.8 (Cq); 137.6 (Cq); 141.3 (Cq); 146.2 (Cq); 149.2 (Cq); 152.7 (Cq); 164.9 (Cq); 167.3 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{24}H_{19}ClF_3N_4O_2$ (MH^+): 487.1149; found 487.1136.

3-[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-1-carbonyl]-benzonitrile (56)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.100 g, 0.321 mmol) and the 3-cyano-benzoyl chloride (0.080 g, 0.481 mmol). The yield estimation from the 1H NMR of the crude product was 81 %. Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **56** as a yellow solid (0.030 g, 21 %). This yield is due to the product degradation during the purification.

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.45.

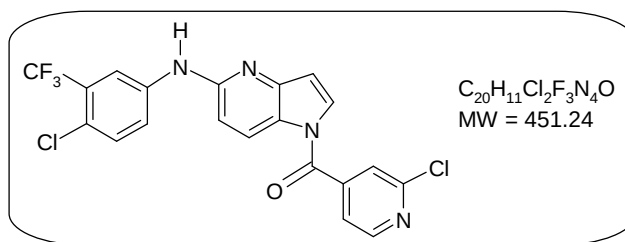
Mp: 214 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3082, 2234, 1682, 1591, 1487, 1424, 1389, 1126, 737, 679.

1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ 6.72 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 6.91 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.2$ Hz); 7.58 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.59 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 9.2$ Hz); 7.81 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 8.0$ Hz); 8.08 - 8.16 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 8.26 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 1.2$ Hz); 7.59 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.8$ Hz); 8.43 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.2$ Hz); 9.71 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $DMSO-d_6$) δ 108.7 (C-6); 109.0 (C-3); 111.9 (Cq); 115.7 (CH_{Ar}); 117.9 (Cq); 119.7 (Cq); 121.6 (CH_{Ar}); 124.1 (q, CF_3 , $J = 1084$ Hz); 125.5 (C-7); 126.3 (Cq); 126.6 (Cq); 129.9 (CH_{Ar}); 130.7 (CH_{Ar}); 131.7 (CH_{Ar}); 132.6 (CH_{Ar}); 133.5 (CH_{Ar}); 134.4 (Cq); 135.4 (CH_{Ar}); 141.3 (Cq); 146.3 (Cq); 152.8 (Cq); 166.0 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{22}H_{13}ClF_3N_4O$ (MH^+): 441.0730; found 441.0745.

2-Chloro-pyridin-4-yl)-[5-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl]-methanone (57)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.150 g, 0.481 mmol) and the 2-chloro-isonicotinoyl chloride (0.127 g, 0.722 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **57** as a yellow solid (0.134 g, 62 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.51.

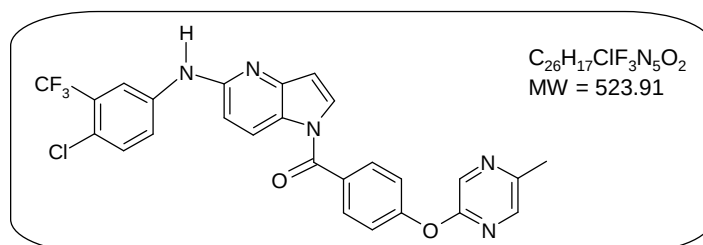
Mp: 167 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2931, 2850, 1688, 1593, 1491, 1423, 1403, 1170, 1128, 814.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.73 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 4.0 Hz); 6.74 (bs, 1H, NH); 6.78 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.28 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 4.0 Hz); 7.43 (d, 1H, H_{Ar}, J = 8.8 Hz); 7.51 (dd, 1H, H_{Py}, J = 5.0 Hz, J' = 1.2 Hz); 7.63 (s, 1H, H_{Py}); 7.74 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 8.8 Hz, J' = 2.5 Hz); 7.96 (d, 1H, H_{Ar}, J = 2.5 Hz); 8.53 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz); 8.64 (d, 1H, H_{Py}, J = 5.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 107.9 (C-6); 110.9 (C-3); 117.6 (CH_{Ar}); 121.0 (CH_{Ar}); 122.5 (CH_{Ar}); 123.3 (CH_{Ar}); 123.8 (Cq); 124.1 (Cq, CF₃, J = 1084 Hz); 124.5 (Cq); 126.2 (C-7); 128.7 (Cq); 128.9 (C-2); 131.9 (CH_{Ar}); 139.6 (Cq); 143.6 (Cq); 147.5 (Cq); 150.6 (CH_{Ar}); 152.6 (Cq); 152.9 (Cq); 164.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₀H₁₁Cl₂F₃N₄O (MH⁺): 451.0340; found 451.0337.

[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl]-[4-(5-methyl-pyrazin-2-yloxy)-phenyl]-methanone (58)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.150 g, 0.481 mmol) and the 4-(5-methyl-pyrazin-2-yloxy)-benzoyl chloride (0.179 g, 0.722 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **58** as a white solid (0.145 g, 58 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 98/2): 0.57.

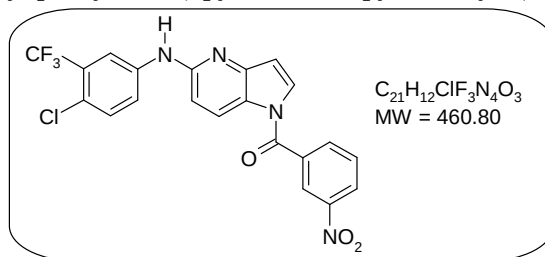
Mp: 138 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3209, 2351, 1682, 1584, 1485, 1420, 1401, 1299, 1118, 814.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 2.45 (s, 3H, CH₃); 6.66 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 3.7 Hz); 6.75 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 6.79 (bs, 1H, NH); 7.39 - 7.46 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.56 - 7.61 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.72 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 8.8 Hz, J' = 2.5 Hz); 7.94 (d, 1H, H_{Ar}, J = 2.5 Hz); 8.21 (s, 1H, H_{Ar}); 8.27 (s, 1H, H_{Ar}); 8.52 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 21.0 (CH₃); 107.6 (C-6); 109.2 (C-3); 117.3 (CH_{Ar}); 124.1 (q, CF₃, J = 1084 Hz); 122.0 (CH_{Ar}); 122.2 (CH_{Ar}); 123.5 (Cq); 124.7 (CH_{Ar}); 125.6 (CH_{Ar}); 126.1 (CH_{Ar}); 128.8 (Cq); 130.2 (C-7); 130.3 (Cq); 131.9 (CH_{Ar}); 132.4 (CH_{Ar}); 134.6 (Cq); 138.8 (2 x CH_{Ar}); 140.0 (Cq); 147.3 (Cq); 151.1 (Cq); 152.4 (Cq); 153.2 (Cq); 158.4 (Cq); 167.2 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₆H₁₈ClF₃N₅O₂ (MH⁺): 524.1101; found 524.1116.

[5-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl]-(3-nitro-phenyl)-methanone (59)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **47** (0.150 g, 0.481 mmol) and the 3-nitro-benzoyl chloride (0.094 mL, 0.721 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **59** as a white solid (0.159 g, 72 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.50.

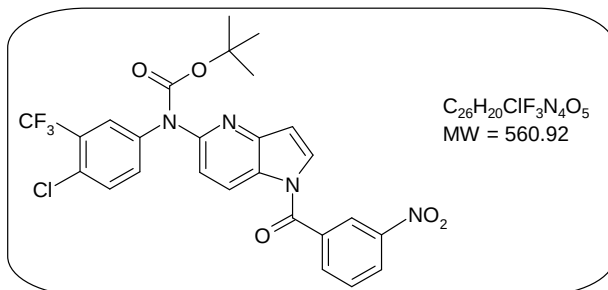
Mp: 164 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3399, 3089, 1687, 1585, 1473, 1318, 1121, 714.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 6.77 (bs, 1H, NH); 6.79 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.34 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.43 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 8.5$ Hz); 7.74 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = 8.5$ Hz, $J' = 2.8$ Hz); 7.78 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.95 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 2.8$ Hz); 8.08 (ddd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz, $J'' = 1.7$ Hz); 8.48 (ddd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz, $J'' = 1.7$ Hz); 8.52 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz); 8.61 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 1.7$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 107.8 (C-6); 110.4 (C-3); 117.5 (CH_{Ar}); 121.9 (q, CF₃, $J = 960$ Hz); 122.4 (CH_{Ar}); 123.8 (Cq); 124.2 (CH_{Ar}); 124.7 (Cq); 126.2 (CH_{Ar}); 126.7 (C-7); 128.8 (Cq); 129.3 (C-2); 130.1 (CH_{Ar}); 131.9 (CH_{Ar}); 134.7 (CH_{Ar}); 135.1 (Cq); 139.8 (Cq); 147.4 (Cq); 148.2 (Cq); 152.7 (Cq); 165.6 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₁H₁₃ClF₃N₄O₃ (MH⁺): 461.0628; found 461.0647.

(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-[1-(4-nitro-benzoyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl]-carbamic acid *tert*-butyl ester (60)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **49** (0.115 g, 0.278 mmol) and the 3-nitro-benzoyl chloride (0.054 mL, 0.417 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **60** as a white solid (0.128 g, 82 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.47.

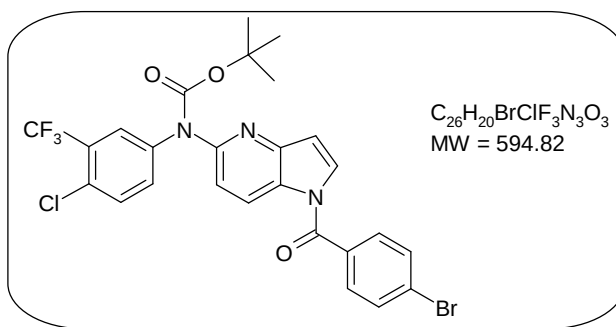
Mp: 210 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2928, 2357, 1723, 1534, 1415, 1168, 728.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (s, 9H, 3 x CH₃); 6.78 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.37 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = 8.8$ Hz, $J' = 2.8$ Hz); 7.44 - 7.46 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.50 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.61 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 2.8$ Hz); 7.80 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 8.09 (ddd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz, $J'' = 1.6$ Hz); 8.52 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 8.8$ Hz); 8.62 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 1.6$ Hz); 8.70 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 28.1 (3 x CH₃); 82.7 (Cq); 110.6 (C-3); 118.6 (C-6); 123.9 (q, CF₃, $J = 1120$ Hz); 124.2 (CH_{Ar}); 125.4 (C-7); 126.1 (CH_{Ar}); 126.9 (CH_{Ar}); 127.7 (Cq); 128.4 (Cq); 128.9 (Cq); 130.3 (CH_{Ar}); 131.0 (2 x CH_{Ar}); 131.6 (CH_{Ar}); 134.7 (C-2); 134.7 (Cq); 140.8 (Cq); 148.1 (Cq); 148.2 (Cq); 151.9 (Cq); 153.0 (Cq); 165.8 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₆H₂₁ClF₃N₄O₅ (MH⁺): 561.1153; found 561.1161.

[1-(4-Bromo-benzoyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl]-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (61)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **49** (0.150 g, 0.362 mmol) and the 4-bromo-benzoyl chloride (0.119 g, 0.544 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 8/2) yielded **61** as a light brown solid (0.144 g, 67 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.83.

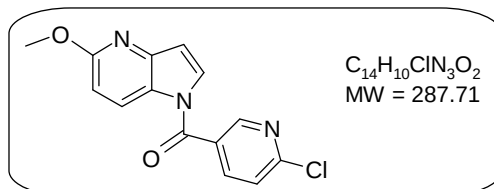
Mp: 163 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2913, 1713, 1695, 1412, 1315, 1299, 833, 751.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 1.47 (s, 9H, 3 x CH_3); 6.74 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 7.36 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz, $J' = 2.8$ Hz); 7.43 - 7.45 (m, 2H, H-6 + H_{Ar}); 7.52 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.61 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.8$ Hz); 7.63 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.72 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 8.65 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 28.1 (3 x CH_3); 82.6 (Cq); 109.6 (C-3); 118.4 (C-6); 123.9 (q, CF_3 , $J = 1120$ Hz); 125.3 (C-7); 125.9 (CH_{Ar}); 127.6 (Cq); 127.8 (Cq); 128.4 (Cq); 128.9 (Cq); 130.8 (2 x CH_{Ar}); 130.9 (2 x CH_{Ar}); 131.6 (C-2); 131.9 (Cq); 132.2 (2 x CH_{Ar}); 140.9 (Cq); 148.1 (Cq); 151.5 (Cq); 153.1 (Cq); 167.4 (Cq).

MS (IS): $m/z = 596.0$ [MH] $^+$.

(6-Chloro-pyridin-3-yl)-(5-methoxy-pyrrolo[3,2-b]pyridin-1-yl)-methanone (62)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **5** (0.250 g, 1.69 mmol) and the 6-chloro-nicotinoyl chloride (44.6 mg, 2.53 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **62** as a light brown solid (0.410 g, 84 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.56.

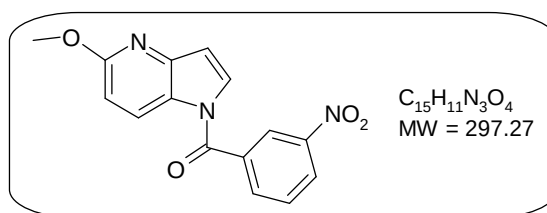
Mp: 170 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2353, 1675, 1582, 1401, 1290, 1108, 1020, 736.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 4.01 (s, 3H, OCH_3); 6.74 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 6.77 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.32 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.53 (d, 1H, H_{Pyr} , $J = 8.3$ Hz); 8.03 (dd, 1H, H_{Pyr} , $J = 8.3$ Hz, $J' = 2.5$ Hz); 8.49 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz); 8.76 (d, 1H, H_{Pyr} , $J = 2.5$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.6 (CH_3); 108.3 (C-6); 110.3 (C-3); 124.5 (CH_{Ar}); 125.1 (Cq); 126.7 (C-7); 128.5 (C-2); 139.3 (CH_{Ar}); 142.6 (Cq); 146.3 (Cq); 150.0 (CH_{Ar}); 155.0 (Cq); 162.5 (Cq); 165.0 (Cq).

HRMS (TOF ES $^+$): m/z calculated for $C_{14}H_{11}ClN_3O_2$ (MH^+): 288.0540; found 288.0542.

5-Methoxy-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)-(3-nitro-phenyl)-methanone (63)

The reaction was carried out as described in general procedure **H** from **5** (0.250 g, 1.69 mmol) and the 3-nitro-benzoyl chloride (0.33 mL, 2.53 mmol). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **63** as a white solid (0.309 g, 62 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.30.

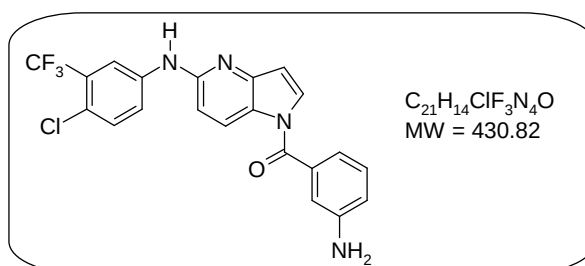
Mp: 164 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3132, 3101, 1682, 1528, 1402, 1349, 1289, 1167, 711.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 4.02 (s, 3H, OCH_3); 6.74 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 6.77 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 7.32 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 7.77 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 8.0$ Hz); 8.08 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 8.0$ Hz); 8.46 - 8.51 (m, 2 H, H-7 + H_{Ar}); 8.59 (s, 1H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.6 (CH_3); 108.2 (C-6); 110.1 (C-3); 125.0 (Cq); 126.6 (CH_{Ar}); 126.7 (C-7); 128.6 (C-2); 130.0 (CH_{Ar}); 134.7 (CH_{Ar}); 135.0 (Cq); 146.2 (Cq); 148.0 (Cq); 162.4 (Cq); 165.6 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{15}H_{12}N_3O_4$ (MH^+): 298.0828; found 298.0822.

(3-Amino-phenyl)-[5-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenylamino)-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl]-methanone (64)

To a solution of **59** (0.100 g, 0.217 mmol) in EtOH (15 mL), was added Pd/C 10 % (0.030 g). The mixture was stirred at r.t. under a 50 psi H_2 pressure for 4 h. The mixture was filtered over Celite and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **64** as a light yellow solid (0.074 g, 79 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.20.

Mp: 197 °C.

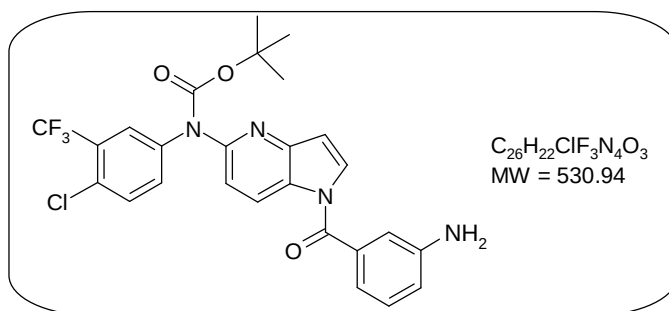
IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3391, 3302, 3211, 3138, 1670, 1577, 1477, 1124, 805, 740.

1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ 5.51 (bs, 2H, NH_2); 6.69 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 4.0$ Hz); 6.83 - 6.89 (m, 3H, H-6 + 2 x H_{Ar}); 6.92 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 2.0$ Hz); 7.23 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 8.0$ Hz); 7.59 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.61 (d, 1H, H-2, $J_{2,3} = 4.0$ Hz); 8.12 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz, $J' = 2.8$ Hz); 8.36 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 8.41 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.8$ Hz); 9.68 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $DMSO-d_6$) δ 108.0 (C-3); 108.5 (C-6); 113.6 (CH_{Ar}); 115.6 (CH_{Ar}); 116.0 (CH_{Ar}); 117.3 (CH_{Ar}); 119.0 (Cq); 121.5 (CH_{Ar}); 123.4 (q, CF_3 , $J = 960$ Hz); 125.3 (C-7); 126.3 (Cq); 126.6 (Cq); 129.1 (CH_{Ar}); 130.5 (C-2); 131.7 (CH_{Ar}); 133.6 (Cq); 141.3 (Cq); 146.0 (Cq); 149.0 (Cq); 152.5 (Cq); 168.3 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{21}H_{15}ClF_3N_4O$ (MH^+): 431.0886; found 431.0888.

[1-(4-Amino-benzoyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl]-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (65)



To a solution of **60** (0.100 g, 0.217 mmol) in EtOH (15 mL), was added Pd/C 10 % (0.030 g). The mixture was stirred at r.t. under a 50 psi H₂ pressure for 4 h. The mixture was filtered over Celite and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) to afford **65** as a white solid (0.076 g, 81 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 5/5): 0.47.

Mp: 140 °C.

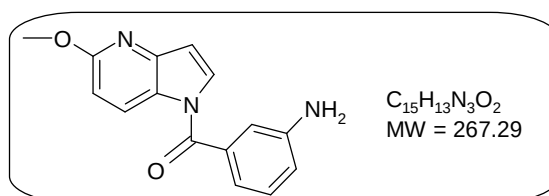
IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3352, 2624, 1697, 1409, 1319, 1157, 744.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃); 3.94 (bs, 2H, NH₂); 6.68 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 4.0 Hz); 6.89 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 8.0 Hz, J' = 2.0 Hz); 7.0 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 2.0 Hz); 7.04 (d, 1H, H_{Ar}, J = 8.0 Hz); 7.28 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 8.0 Hz); 7.35 (ddd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 8.8 Hz, J'' = 2.8 Hz); 7.41 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.42 (d, 1H, H_{Ar}, J = 8.8 Hz); 7.62 - 7.63 (m, 2H, H-2 + H_{Ar}); 8.65 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 28.1 (3 x CH₃); 82.5 (Cq); 108.8 (C-3); 115.0 (CH_{Ar}); 118.1 (C-6); 118.7 (CH_{Ar}); 118.9 (CH_{Ar}); 123.9 (q, CF₃, J = 1120 Hz); 125.3 (C-7); 125.8 (CH_{Ar}); 127.8 (Cq); 128.3 (Cq); 128.6 (Cq); 129.6 (CH_{Ar}); 130.7 (CH_{Ar}); 131.5 (C-2); 131.6 (CH_{Ar}); 134.0 (Cq); 140.9 (Cq); 147.0 (Cq); 148.1 (Cq); 151.1 (Cq); 153.1 (Cq); 168.6 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₆H₂₃ClF₃N₄O₃ (MH⁺): 531.1411; found 531.1405.

(3-Amino-phenyl)-(5-methoxy-pyrrolo [3,2-b]pyridin-1-yl)-methanone (66)



To a solution of **63** (0.250 g, 0.841 mmol) in EtOH (15 mL), was added Pd/C 10 % (0.075 g). The mixture was stirred at r.t. under 50 psi H₂ pressure for 7 h. The mixture was filtered over Celite and the solvent was evaporated *in vacuo*. The crude material was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) to afford **66** as a white solid (0.188 g, 83 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.23.

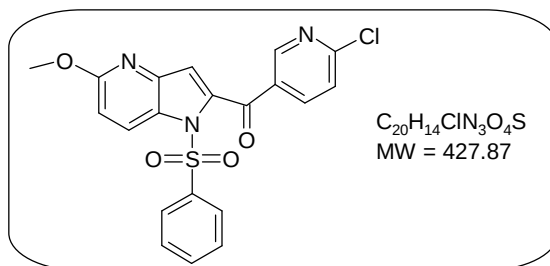
Mp: 132 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3415, 3321, 3215, 1674, 1585, 1474, 1397, 1368, 1273, 742.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.95 (bs, 2H, NH₂); 4.00 (s, 3H, OCH₃); 6.64 (d, 1H, H-3, $J_{3,2}$ = 4.0 Hz); 6.72 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 6.87 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 8.0 Hz, J' = 1.6 Hz); 6.98 (s, 1H, H_{Ar}, J = 8.0 Hz); 7.26 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 8.0 Hz); 7.47 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 4.0 Hz); 8.47 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.4 (CH₃); 107.5 (C-6); 108.4 (C-3); 115.0 (CH_{Ar}); 118.4 (CH_{Ar}); 118.9 (CH_{Ar}); 125.0 (Cq); 126.6 (C-7); 129.4 (C-2); 129.8 (CH_{Ar}); 134.4 (Cq); 146.1 (Cq); 146.8 (Cq); 162.0 (Cq); 168.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₅H₁₄N₃O₂ (MH⁺): 268.1086; found 268.1090.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-(6-chloro-pyridin-3-yl)-methanone (67)

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 6-chloro-nicotinoyl chloride as the electrophile (0.244 g, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **67** as a yellow solid (94 mg, 32 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.37.

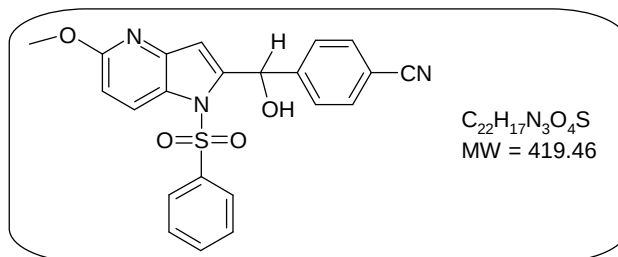
Mp: 138 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2341, 1660, 1356, 1268, 723.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.96 (s, 3H, OCH₃); 6.88 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 10.0 Hz); 7.04 (s, 1H, H-3); 7.47 - 7.55 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.63 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.97 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.21 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 10 Hz, J' = 2.5 Hz); 8.33 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 10.0 Hz); 8.91 (d, 1H, H_{Ar}, J = 2.5 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.7 (CH₃); 111.5 (C-6); 117.6 (C-3); 124.4 (CH_{Ar}); 125.9 (C-7); 127.4 (2 x CH_{Ar}); 127.8 (Cq); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 131.8 (Cq); 134.4 (CH_{Ar}); 137.5 (Cq); 138.0 (Cq); 139.3 (CH_{Ar}); 143.3 (Cq); 151.3 (CH_{Ar}); 156.0 (Cq); 162.8 (Cq); 184.4 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₀H₁₅ClN₃O₄S (MH⁺): 428.0472; found 428.0474.

4-[(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-hydroxy-methyl]-benzonitrile (68)

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 4-cyano-benzaldehyde as the electrophile (0.182 g, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) yielded **68** as a light brown solid (0.232 g, 80 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.25.

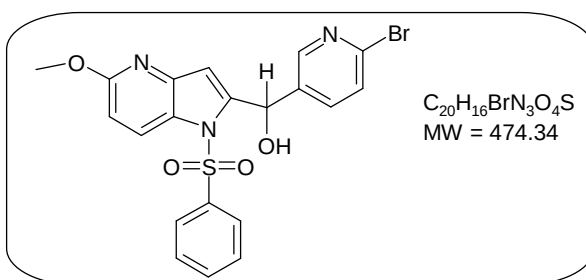
Mp: 162 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3506, 2228, 1590, 1364, 1150, 1028, 817, 724.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.89 (s, 3H, OCH₃); 4.76 (bs, 1H, OH); 6.24 (s, 1H, H-3); 6.42 (d, 1H, CH, J = 4.3 Hz); 6.71 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.0 Hz); 7.41 - 7.51 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.57 - 7.64 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.72 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.25 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.5 (CH₃); 68.4 (CHOH); 108.8 (C-6); 111.7 (Cq); 112.8 (C-3); 118.5 (Cq); 125.3 (C-7); 126.1 (2 x CH_{Ar}); 126.4 (Cq); 127.6 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 132.1 (2 x CH_{Ar}); 132.2 (Cq); 134.3 (CH_{Ar}); 138.1 (Cq); 143.8 (Cq); 144.8 (Cq); 162.3 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₂H₁₈N₃O₄S (MH⁺): 420.1018; found 420.1015.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-2-yl)-(6-bromo-pyridin-3-yl)-methanol (69)

The reaction was carried out as described in general procedure **B** using 6-bromo-pyridine-3-carbaldehyde as the electrophile (0.258 g, 1.39 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 6/4) yielded **69** as a orange oil (0.164 g, 50 %).

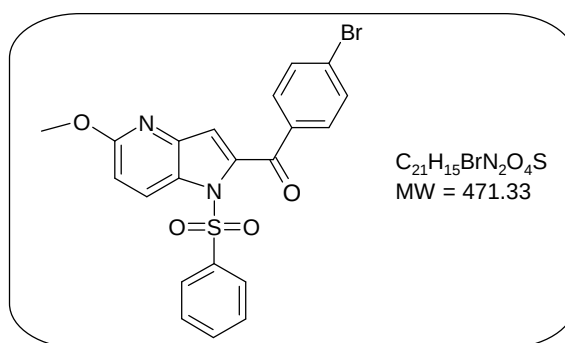
Rf (petroleum ether/EtOAc 5/5): 0.39.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3519, 2357, 1586, 1405, 1372, 1164, 1088, 820, 756.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.88 (s, 3H, OCH_3); 3.99 (d, 1H, OH, $J = 5.0$ Hz); 6.34 (s, 1H, H-3); 6.37 (d, 1H, CH, $J = 5.0$ Hz); 6.69 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 10.0$ Hz); 7.40 - 7.44 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.56 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.67 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.23 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 10.0$ Hz); 8.31 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.5$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.6 (CH_3); 66.7 (CHOH); 108.9 (C-6); 112.9 (C-3); 125.4 (C-7); 126.1 (2 x CH_{Ar}); 126.6 (Cq); 127.8 (CH_{Ar}); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 134.4 (CH_{Ar}); 135.4 (Cq); 137.2 (CH_{Ar}); 138.2 (Cq); 141.7 (Cq); 143.8 (Cq); 144.6 (Cq); 149.0 (CH_{Ar}); 162.4 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): calculated for $C_{20}H_{17}BrN_3O_4S$ (MH^+): 474.0123; found 474.0138.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-2-yl)-(4-bromo-phenyl)-methanone (70)

The reaction was carried out as described in general procedure **I** from a solution of **13** (0.150 g, 0.323 mmol) in 10 mL of dry THF. The solvents were removed under reduced pressure to afford **70** as brown solid without flash chromatography purification (0.182 g, quantitative).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.62.

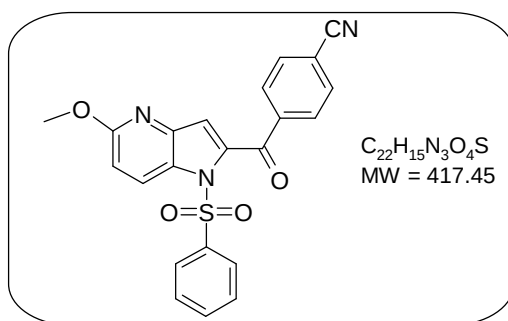
Mp: 170 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2453, 1664, 1580, 1354, 1264, 1172, 945, 748, 726.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.95 (s, 3H, OCH_3); 6.85 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$ Hz); 6.95 (s, 1H, H-3); 7.51 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.2$ Hz); 7.61 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.2$ Hz); 7.64 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 7.83 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.5$ Hz); 8.0 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.2$ Hz); 8.31 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.6 (CH_3); 110.8 (C-6); 116.5 (C-3); 125.7 (C-7); 127.3 (Cq); 127.4 (2 x CH_{Ar}); 129.1 (2 x CH_{Ar}); 129.1 (Cq); 131.4 (2 x CH_{Ar}); 131.9 (2 x CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 135.9 (Cq); 137.8 (Cq); 138.6 (Cq); 143.3 (Cq); 162.6 (Cq); 186.1 (Cq).

MS (IS): $m/z = 473.0$ [MH]⁺.

4-(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-2-carbonyl)-benzonitrile (71)

The reaction was carried out as described in general procedure **I** from a solution of **68** (0.380 g, 0.906 mmol) in 15 mL of dry THF. Purification by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **71** as a light brown oil (0.265 mg, 70 %).

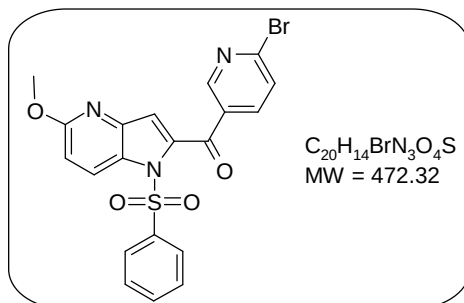
Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.25.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3064, 2941, 2231, 1665, 1234, 1168, 725.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.96 (s, 3H, OCH_3); 6.88 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.2$ Hz); 7.01 (s, 1H, H-3); 7.52 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.62 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.80 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 7.96 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.6$ Hz); 8.04 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.4$ Hz); 8.32 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.2$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.8 (CH_3); 111.4 (C-6); 116.8 (Cq); 117.5 (C-3); 117.9 (Cq); 125.9 (C-7); 127.4 (2 x CH_{Ar}); 127.7 (Cq); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 130.2 (2 x CH_{Ar}); 132.4 (2 x CH_{Ar}); 134.4 (CH_{Ar}); 137.5 (Cq); 138.2 (Cq); 140.4 (Cq); 143.3 (Cq); 162.8 (Cq); 185.7 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{22}H_{15}N_3O_4S$ (MH^+): 418.0862; found 418.0877.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-(6-bromo-pyridin-3-yl)-methanone (72)

The reaction was carried out as described in general procedure **I** from a solution of **69** (0.616 g, 1.43 mmol) in 30 mL of dry THF. The solvents were removed under reduced pressure to afford **72** as light brown solid without flash chromatography purification (0.606 g, 90 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.66.

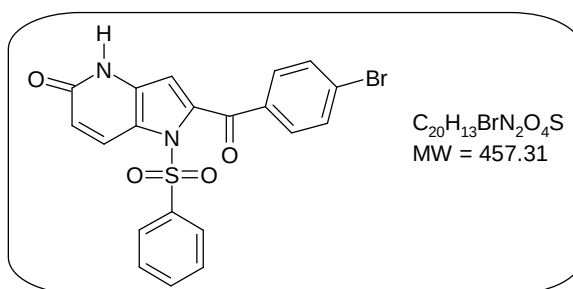
Mp: 145 °C.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 2410, 1660, 1574, 1356, 1087, 723.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 3.92 (s, 3H, OCH_3); 6.85 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 10.0$ Hz); 7.01 (s, 1H, H-3); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.59 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.5$ Hz); 7.62 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 10.0$ Hz); 7.94 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.5$ Hz); 8.06 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = 10$ Hz, $J' = 2.5$ Hz); 8.29 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 10.0$ Hz); 8.84 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 2.5$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 53.6 (CH_3); 111.4 (C-6); 117.7 (C-3); 125.8 (C-7); 127.3 (2 x CH_{Ar}); 127.7 (Cq); 128.2 (CH_{Ar}); 129.1 (2 x CH_{Ar}); 132.0 (Cq); 134.3 (CH_{Ar}); 137.4 (Cq); 137.9 (Cq); 138.8 (CH_{Ar}); 143.2 (Cq); 147.2 (Cq); 151.4 (CH_{Ar}); 162.7 (Cq); 184.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for $C_{20}H_{15}^{79}BrN_3O_4S$ (MH^+): 471.9967; found 471.9972.

1-Benzenesulfonyl-2-(4-bromo-benzoyl)-1,4-dihydro-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-one (73)

The reaction was carried out as described in general procedure **D** from a solution of **70** (0.100 g, 0.212 mmol, 1.0 equiv.) in 3 mL of CH₃CN. The mixture was refluxed for 2.5 h. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) yielded **73** as a yellow solid (0.080 g, 82 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 98/2): 0.16.

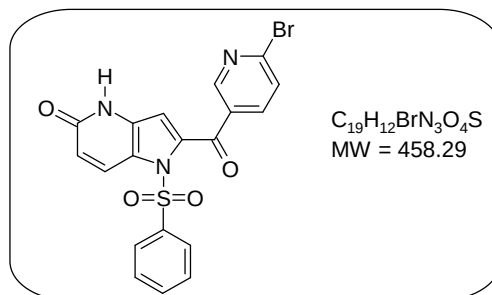
Mp: 262 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 1666, 1651, 1170, 746.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 6.62 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.6$ Hz); 6.67 (s, 1H, H-3); 7.57 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.64 - 7.67 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.78 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 8.0$ Hz); 8.05 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.6$ Hz); 8.29 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 108.9 (C-3); 118.8 (C-6); 122.2 (Cq); 127.7 (2 x CH_{Ar}); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 129.4 (Cq); 130.1 (C-7); 131.4 (2 x CH_{Ar}); 132.1 (2 x CH_{Ar}); 133.0 (Cq); 134.7 (CH_{Ar}); 135.6 (Cq); 137.6 (Cq); 137.8 (Cq); 162.6 (Cq); 185.2 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₂₀H₁₄⁷⁹BrN₂O₄S (MH⁺) 456.9858 found 456.9871.

1-Benzenesulfonyl-2-(6-bromo-pyridine-3-carbonyl)-1,4-dihydro-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-one (74)

The reaction was carried out as described in general procedure **D** from a solution of **72** (0.100 g, 0.212 mmol, 1.0 equiv.) in 3 mL of CH₃CN. The mixture was refluxed for 3.5 h. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) yielded **74** as a light brown solid (0.087 g, 90 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 98/2): 0.13.

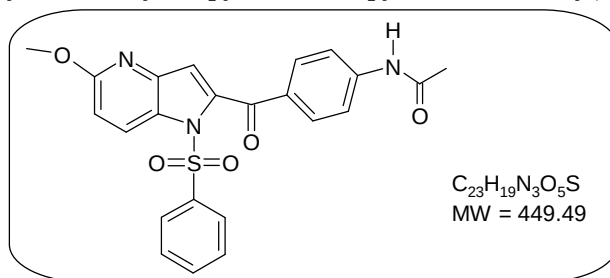
Mp: 256 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 2453, 1650, 1573, 1169, 757.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.56 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.6$ Hz); 6.94 (s, 1H, H-3); 7.68 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.74 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 8.4$ Hz); 7.79 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 7.6$ Hz); 7.98 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 7.6$ Hz); 8.21 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.6$ Hz); 8.29 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = 8.4$ Hz, $J' = 2.4$ Hz); 8.87 (d, 1H, H_{Ar}, $J = 2.4$ Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 112.7 (C-3); 118.1 (C-6); 122.2 (Cq); 124.7 (CH_{Ar}); 127.1 (2 x CH_{Ar} + Cq); 128.3 (C-7); 129.7 (2 x CH_{Ar}); 131.8 (Cq); 135.1 (CH_{Ar}); 136.2 (Cq); 136.6 (Cq); 140.2 (CH_{Ar}); 150.9 (CH_{Ar}); 154.6 (Cq); 161.5 (Cq); 183.5 (Cq).

HRMS (TOF ES+): m/z calculated for C₁₉H₁₃⁷⁹BrN₃O₄S (MH⁺): 457.9810; found 457.9822.

***N*-[4-(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-carbonyl)-phenyl]-acetamide (**75**)**

The reaction was carried out as described in general procedure **F** using a mixture of **70** (0.630 g, 1.34 mmol, 1.0 equiv.), acetamide (94.7 mg, 1.60 mmol, 1.2 equiv.), cesium carbonate (0.653 g, 2.01 mmol, 1.5 equiv.), xantphos (35 mg, 0.0602 mmol, 0.045 equiv.) and Pd₂dba₃ (36.7 mg, 0.0401 mmol, 0.03 equiv.). Dioxane (15 mL) was used as solvent instead of toluene. The mixture was refluxed for 2.5 h. The residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) to afford **75** as a yellow solid (0.548 g, 91 %).

Rf (EtOAc): 0.55.

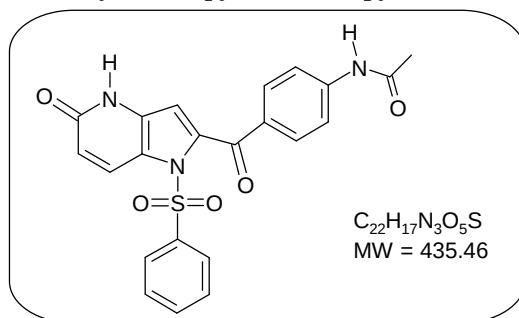
Mp: 114 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3160, 1664, 1591, 1523, 1171, 682.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 2.16 (s, 3H, CH₃); 3.94 (s, 3H, OCH₃); 6.83 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.0 Hz); 6.92 (s, 1H, H-3); 7.48 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.6 Hz); 7.58 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.6 Hz); 7.64 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.8 Hz); 7.88 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.8 Hz); 8.0 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.6 Hz); 8.29 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.0 Hz); 8.41 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 24.6 (CH₃); 53.6 (CH₃); 110.4 (C-6); 116.0 (C-3); 118.8 (2 x CH_{Ar}); 125.6 (C-7); 127.1 (Cq); 127.3 (2 x CH_{Ar}); 129.1 (2 x CH_{Ar}); 130.7 (Cq); 131.4 (2 x CH_{Ar}); 132.2 (Cq); 134.3 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 139.1 (Cq); 143.4 (Cq); 162.5 (Cq); 169.2 (Cq); 185.9 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₃H₂₀N₃O₅S (MH⁺): 450.1124; found 450.1115.

***N*-[4-(1-Benzenesulfonyl-5-oxo-4,5-dihydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-carbonyl)-phenyl]-acetamide (**76**)**

The reaction was carried out as described in general procedure **D** from a solution of **75** (0.548 g, 1.22 mmol, 1.0 equiv.) in 20 mL of CH₃CN. The mixture was refluxed for 2.5 h. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9/1) yielded **76** as a yellow solid (0.460 g, 86 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.30.

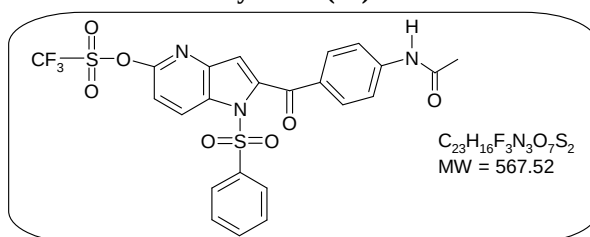
Mp: 176 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3095, 1647, 1594, 1534, 1329, 1173, 726.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.11 (s, 3H, CH₃); 6.50 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.5 Hz); 6.70 (s, 1H, H-3); 7.70 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.79 - 7.85 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.87 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.7 Hz); 8.01 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.18 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.5 Hz); 10.41 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24.1 (CH₃); 101.6 (C-6); 109.7 (C-3); 118.2 (2 x CH_{Ar}); 123.3 (Cq); 127.1 (2 x CH_{Ar}); 127.5 (C-7); 128.2 (Cq); 129.7 (2 x CH_{Ar}); 130.9 (Cq); 131.1 (2 x CH_{Ar}); 135.0 (CH_{Ar}); 136.9 (Cq); 137.4 (Cq); 144.5 (Cq); 161.5 (Cq); 169.0 (Cq); 184.6 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₂H₁₈N₃O₅S (MH⁺): 436.0967; found 436.0974.

Trifluoro-methanesulfonic acid 2-(4-acetyl-amino-benzoyl)-1-benzenesulfonyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl ester (77)

To a solution of **76** (0.100 g, 0.230 mmol, 1.0 equiv.) in pyridine (5 mL) at 0°C, was added dropwise trifluoromethanesulfonic anhydride (0.045 mL, 0.275 mmol, 1.2 equiv.). First, the mixture was stirred for 10 minutes at 0 °C then 12 h at room temperature. The pyridine was removed under reduce pressure. The crude product was taken up in EtOAc (5 mL), then washed 2 times with HCl 10 % (3 mL). The product was extracted 3 times with EtOAc (5 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 4/6) to afford **77** as a orange oil (0.135 g, 98 %).

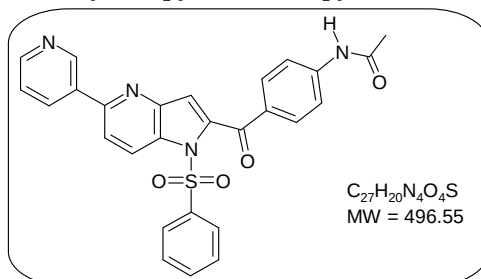
Rf (CH_2Cl_2 /MeOH 98/2): 0.53.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3277, 3101, 1662, 1590, 1522, 1209, 1137, 945, 724.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 2.21 (s, 3H, CH_3); 6.97 (s, 1H, H-3); 7.24 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.57 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.66 - 7.71 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.92 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 8.11 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 7.6$ Hz); 8.35 (bs, 1H, NH); 8.58 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 24.6 (CH_3); 112.1 (C-6); 113.3 (C-3); 118.6 (q, CF_3 , $J = 1280$ Hz); 118.9 (2 x CH_{Ar}); 126.7 (C-7); 127.7 (2 x CH_{Ar}); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 130.1 (Cq); 131.5 (Cq); 131.6 (2 x CH_{Ar}); 134.9 (CH_{Ar}); 137.6 (Cq); 141.7 (Cq); 143.9 (Cq); 144.4 (Cq); 152.9 (Cq); 169.1 (Cq); 185.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{23}H_{17}F_3N_3O_7S_2$ (MH^+): 568.0460; found 568.0479.

N-[4-(1-Benzenesulfonyl-5-pyridin-3-yl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-2-carbonyl)-phenyl]-acetamide (78)

The reaction was carried out as described in general procedure **E** using **77** (0.123 g, 0.217 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of toluene (5 mL) and EtOH (3 mL) treated with the 3-pyridineboronic acid (42.2 mg, 0.325 mmol, 1.5 equiv.), K_2CO_3 1M (0.650 mL, 0.650 mmol, 3.0 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (0.01 equiv., 0.00217 mmol, 2.50 mg). The mixture was refluxed for 2 h. The residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH 95/5) to afford **78** as a brown oil (86.0 mg, 80 %).

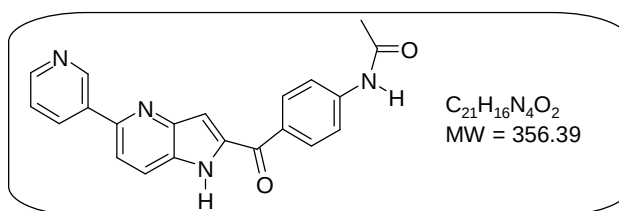
Rf (CH_2Cl_2 /MeOH 9/1): 0.42.

IR (ATR diamond, cm^{-1}) ν 3273, 3105, 2921, 2852, 1659, 1590, 1524, 1260, 1147, 684.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 2.20 (s, 3H, CH_3); 7.10 (s, 1H, H-3); 7.43 (dd, 1H, H_{Pyr} , $J = 7.6$ Hz, $J' = 4.8$ Hz); 7.55 (dd, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.64 (dd, 1H, H_{Ar} , $J = J' = 7.6$ Hz); 7.69 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.83 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.97 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 7.99 (bs, 1H, NH), 8.11 (d, 2H, 2 x H_{Ar} , $J = 8.8$ Hz); 8.36 (dd, 1H, H_{Pyr} , $J = 7.6$ Hz, $J' = 1.6$ Hz); 8.52 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 8.66 (dd, 1H, H_{Pyr} , $J = 4.8$ Hz, $J' = 1.6$ Hz); 9.23 (dd, 1H, H_{Pyr} , $J = J' = 1.6$ Hz).

^{13}C NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ 24.7 (CH_3); 115.4 (C-3); 118.2 (C-6); 118.8 (2 x CH_{Ar}); 123.3 (C-7); 123.7 (CH_{Ar}); 127.6 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 130.3 (Cq); 131.7 (2 x CH_{Ar}); 132.1 (Cq); 134.5 (CH_{Ar}); 134.6 (CH_{Ar}); 134.7 (Cq); 137.9 (Cq); 140.8 (Cq); 143.5 (Cq); 146.9 (Cq); 148.3 (CH_{Ar}); 149.8 (CH_{Ar}); 152.6 (Cq); 168.7 (Cq); 185.9 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for $C_{27}H_{21}N_4O_4S$ (MH^+): 497.1284; found 497.1303.

N-[4-(5-Pyridin-3-yl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-2-carbonyl)-phenyl]-acetamide (79)

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from a solution of **78** (0.080 g, 0.161 mmol) in dry THF (3 mL). Purification (CH₂Cl₂/MeOH 9/1) yielded **79** as a yellow solid (0.042 g, 74 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.30.

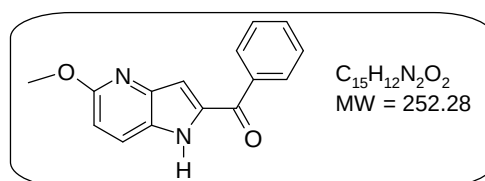
Mp: 257 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3264, 2978, 1630, 1519, 1261, 1172, 776.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.12 (s, 3H, CH₃); 7.34 (d, 1H, H-3, $J_{3,2} = 2.4$ Hz); 7.52 (dd, 1H, H_{pyr}, $J = 8.0$ Hz, $J' = 4.8$ Hz); 7.83 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 8.8$ Hz); 8.0 - 8.04 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 8.47 (dd, 1H, H_{pyr}, $J = 8.0$ Hz, $J' = 2.0$ Hz); 8.61 (dd, 1H, H_{pyr}, $J = 4.8$ Hz, $J' = 2.0$ Hz); 9.31 (dd, 1H, H_{pyr}, $J = J' = 2.0$ Hz); 10.36 (bs, 1H, NH); 12.26 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24.1 (CH₃); 110.4 (C-3); 117.7 (C-6); 118.2 (2 x CH_{Ar}); 124.3 (C-7); 123.7 (CH_{Ar}); 130.3 (Cq); 130.6 (2 x CH_{Ar}); 131.5 (Cq); 133.8 (CH_{Ar}); 134.8 (Cq); 136.9 (Cq); 143.5 (Cq); 144.6 (Cq); 147.7 (CH_{Ar}); 149.1 (CH_{Ar}); 149.1 (Cq); 168.9 (Cq); 185.1 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₁H₁₇N₄O₂ (MH⁺): 357.1352; found 357.1364.

(5-Methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-phenyl-methanone (80)

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from a solution of **11** (0.100 g, 0.255 mmol) in dry THF (5 mL). Purification (petroleum ether/EtOAc 5/5) yielded **80** as a light brown solid (0.059 g, 92 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.66.

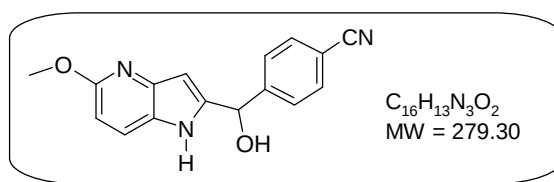
Mp: 184 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3288, 3056, 2999, 2958, 2931, 1612, 1516, 1257, 1225, 821, 728.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.0 (s, 3H, OCH₃); 6.82 (d, 1H, H-6, $J_{6,7} = 8.8$ Hz); 7.22 (d, 1H, H-3, $J = 1.2$ Hz); 7.53 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.63 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J' = 8.0$ Hz); 7.73 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.8$ Hz); 8.02 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = 8.0$ Hz); 9.56 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.4 (CH₃); 111.5 (C-3); 111.8 (C-6); 123.3 (C-7); 127.4 (Cq); 128.5 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 132.6 (CH_{Ar}); 134.8 (Cq); 137.6 (Cq); 141.4 (Cq); 161.0 (Cq); 186.9 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₅H₁₂N₂O₂Na (MNa): 275.0796; found 275.0796.

4-[Hydroxy-(5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3, 2-*b*]pyridin-2-yl)-methyl]-benzonitrile (81)

To a solution of **68** (0.110 g, 0.262 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (5mL), was added an aqueous solution of sodium hydroxyde 2M (0.210 mL, 0.419 mmol, 1.6 equiv.). The mixture was refluxed for 3 h. The mixture was cooled to room temperature and MeOH was removed under reduced pressure. The crude product was taken up in H₂O (3 mL) and extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 5/5) to afford **81** as a colorless oil (0.070 g, 95 %).

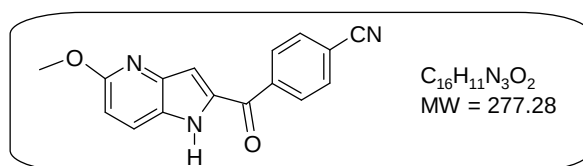
Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.36.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3230, 2223, 1581, 1405, 1284, 1209, 1028, 802.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.82 (s, 3H, OCH₃); 5.97 (d, 1H, CH, *J* = 4.3 Hz); 6.22 (s, 1H, H-3); 6.42 (d, 1H, OH, *J* = 4.3 Hz); 6.49 (d, 1H, H-6, *J*_{6,7} = 8.8 Hz); 7.60 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 8.8 Hz); 7.66 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, *J* = 8.0 Hz); 7.80 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, *J* = 8.0 Hz); 11.14 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.5 (CH₃); 68.6 (CHOH); 98.6 (C-3); 104.1 (C-6); 109.7 (Cq); 118.8 (Cq); 122.0 (C-7); 124.6 (Cq); 127.1 (2 x CH_{Ar}); 132.1 (2 x CH_{Ar}); 142.1 (Cq); 143.8 (Cq); 149.2 (Cq); 158.8 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): *m/z* calculated for C₁₆H₁₄N₃O₂ (MH⁺): 280.1086; found 280.1096.

4-(5-Methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-carbonyl)-benzonitrile (82)

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from **71** (0.050 g, 0.120 mmol) in dry THF (3 mL). Purification (petroleum ether/EtOAc 7/3) yielded **82** as a yellow solid (0.059 g, 92 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 6/4): 0.69.

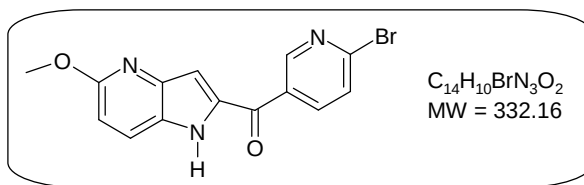
Mp: 220 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3301, 2945, 2231, 1741, 1622, 1520, 1266, 814, 750.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.88 (s, 3H, OCH₃); 6.85 (d, 1H, H-6, *J*_{6,7} = 8.8 Hz); 6.22 (s, 1H, H-3); 7.83 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 8.8 Hz); 8.04 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, *J* = 8.4 Hz); 8.08 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, *J* = 8.4 Hz); 12.22 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.9 (CH₃); 110.8 (C-3); 111.4 (C-6); 114.4 (Cq); 118.2 (Cq); 124.4 (C-7); 128.3 (Cq); 129.6 (2 x CH_{Ar}); 132.6 (2 x CH_{Ar}); 134.1 (Cq); 140.3 (Cq); 141.2 (Cq); 160.1 (Cq); 184.9 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): *m/z* calculated for C₁₆H₁₂N₃O₂ (MH⁺): 278.0930; found 278.0928.

(6-Bromo-pyridin-3-yl)-(5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-methanone (83)

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from a solution of **72** (0.100 g, 0.212 mmol) in dry THF (5 mL). Purification (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) yielded **83** as a yellow solid (0.051 g, 72 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.34.

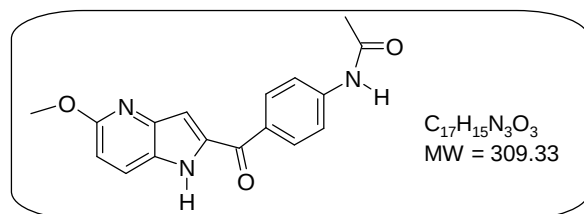
Mp: 264 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3252, 3105, 3011, 2946, 1619, 1516, 1279, 1085, 809.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.89 (s, 3H, OCH₃); 6.86 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.17 (d, 1H, H-3, J = 1.6 Hz); 7.84 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz); 7.87 (d, 1H, H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 8.25 (dd, 1H, H_{Ar}, J = 8.4 Hz, J' = 2.5 Hz); 8.89 (d, 1H, H_{Ar}, J = 2.5 Hz); 12.23 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.9 (CH₃); 110.7 (C-3); 111.4 (C-6); 124.4 (C-7); 128.1 (CH_{Ar}); 128.3 (Cq); 132.8 (Cq); 134.2 (Cq); 139.6 (CH_{Ar}); 140.3 (Cq); 144.8 (Cq); 150.3 (CH_{Ar}); 160.1 (Cq); 183.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₄H₁₁⁷⁹BrN₃O₂ (MH⁺): 332.0035; found 332.0045.

***N*-[4-(5-Methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-2-carbonyl)-phenyl]-acetamide (84)**

The reaction was carried out as described in general procedure **G** from a solution of **75** (0.100 g, 0.222 mmol) in dry THF (5 mL). Purification (petroleum ether/EtOAc 4/6) yielded **84** as a yellow solid (0.060 g, 84 %).

Rf (EtOAc): 0.45.

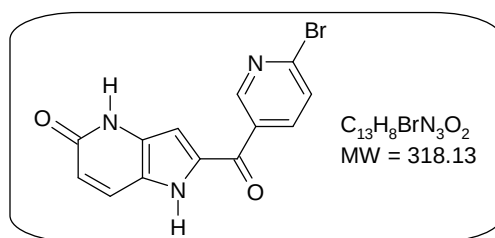
Mp: 262 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3710, 3308, 1670, 1597, 1524, 1262, 1174, 775.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.11 (s, 3H, CH₃); 3.88 (s, 3H, OCH₃); 6.80 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.08 (d, 1H, H-3, J = 1.2 Hz); 7.80 (d, 2H, H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 7.81 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz); 7.97 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 10.32 (bs, 1H, NH); 12.03 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24.1 (CH₃); 52.9 (CH₃); 109.2 (C-3); 110.4 (C-6); 118.2 (2 x CH_{Ar}); 124.1 (C-7); 127.4 (Cq); 130.4 (2 x CH_{Ar}); 131.8 (Cq); 134.9 (Cq); 140.5 (Cq); 143.3 (Cq); 159.9 (Cq); 168.9 (Cq); 184.7 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₇H₁₆N₃O₃ (MH⁺): 310.1192; found 310.1211.

2-(6-Bromo-pyridine-3-carbonyl)-1,4-dihydro-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-one (85)

To a solution of **74** (0.050 g, 0.109 mmol) in dry THF (3 mL), was added a solution of TBAF 1M (1.1 mL, 1.09 mmol). The reaction was stopped by the addition of H₂O (10 mL). As the crude product is not soluble in water neither THF, the mixture was filtered. The crude product was washed with Et₂O to afford **85** as a yellow solid (0.024 g, 69 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.43.

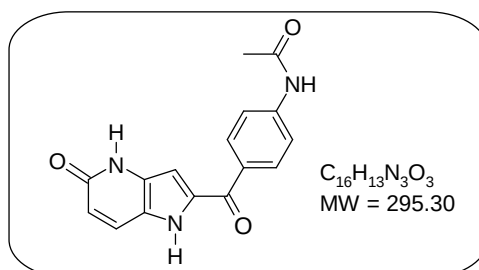
Mp: > 264 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3281, 2925, 2790, 1669, 1612, 1583, 1449, 1105, 828, 763.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.36 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.6 Hz); 6.45 (s, 1H, H-3); 7.64 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.6 Hz); 7.72 (d, 1H, H_{pyr}, J = 8.4 Hz); 8.25 (dd, 1H, H_{pyr}, J = 8.4 Hz, J' = 2.0 Hz); 8.82 (d, 1H, H_{pyr}, J = 2.0 Hz); 11.55 (bs, 1H, NH); 12.35 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 102.5 (C-3); 120.6 (C-6); 123.3 (Cq); 124.4 (CH_{Ar}); 128.2 (C-7); 130.5 (Cq); 132.9 (Cq); 139.7 (CH_{Ar}); 149.7 (CH_{Ar}); 153.1 (Cq); 161.7 (Cq); 182.1 (Cq); 206.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₃H₇⁷⁹BrN₃O₂ (MH⁺): 317.9873; found 317.9885.

***N*-[4-(5-Oxo-4,5-dihydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-2-carbonyl)-phenyl]-acetamide (86)**

To a solution of **76** (0.100 g, 0.230 mmol) in dry THF (5 mL), was added a solution of TBAF 1M (2.3 mL, 2.30 mmol). The reaction was stopped by the addition of H₂O (15 mL). As the crude product is not soluble in water neither THF, the mixture was filtered. The crude product was washed with Et₂O to afford **86** as a yellow solid (47.5 mg, 70 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9/1): 0.

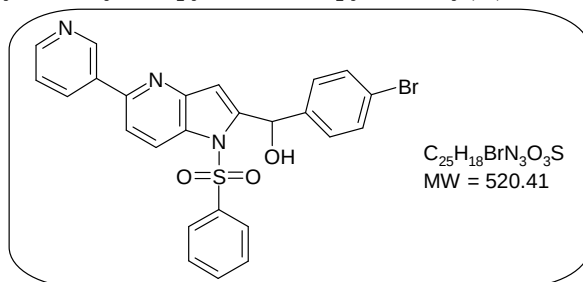
Mp: > 264 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3101, 2978, 2360, 2325, 2161, 1644, 1594, 1437, 1268, 1132, 821, 763.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.10 (s, 3H, CH₃); 6.36 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 9.5 Hz); 6.54 (s, 1H, H-3); 7.70 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 9.5 Hz); 7.75 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.5 Hz); 7.85 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.5 Hz); 10.37 (bs, 1H, NH); 11.62 (bs, 1H, NH); 12.18 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24.3 (CH₃); 102.0 (C-3); 118.6 (2 x CH_{Ar}); 119.5 (C-6); 122.6 (Cq); 128.8 (C-7); 130.3 (2 x CH_{Ar}); 130.6 (Cq); 132.3 (Cq); 133.0 (Cq); 143.2 (Cq); 162.3 (Cq); 169.5 (Cq); 184.2 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₁₆H₁₄N₃O₃ (MH⁺): 296.1035; found 296.1047.

(1-Benzenesulfonyl-5-pyridin-3-yl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-yl)-(4-bromo-phenyl)-methanol (87)

The reaction was carried out as described in general procedure **C** from **27** (0.150 g, 0.447 mmol, 1.0 equiv.) using the 4-bromo-benzaldehyde as the electrophile (0.165 g, 0.894 mmol, 2.0 equiv.). Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) yielded **87** as a yellow solid (180 mg, 77 %).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 98/2): 0.11.

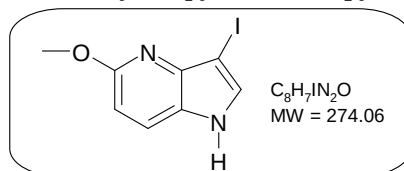
Mp: 198 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3244, 3089, 1583, 1407, 1370, 1161, 1051, 723, 685.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.14 (bs, 1H, OH); 6.42 (s, 1H, CH); 6.63 (s, 1H, H-3); 7.27 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 7.38 (dd, 1H, H_{Pyr}, J = 8.0 Hz, J' = 4.8 Hz); 7.42 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.6 Hz); 7.46 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 7.57 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.6 Hz); 7.67 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.70 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.6 Hz); 8.30 (dd, 1H, H_{Pyr}, J = 8.0 Hz, J' = 2.0 Hz); 8.45 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz); 8.59 (dd, 1H, H_{Pyr}, J = 4.8 Hz, J' = 2.0 Hz); 9.12 (dd, 1H, H_{Pyr}, J = J' = 2.0 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 68.7 (CH_{Ar}); 112.8 (C-3); 116.9 (C-6); 122.3 (Cq); 122.8 (C-7); 123.6 (CH_{Ar}); 126.4 (2 x CH_{Ar}); 128.9 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 130.4 (Cq); 131.6 (2 x CH_{Ar}); 134.3 (CH_{Ar}); 134.5 (CH_{Ar}); 134.8 (Cq); 138.2 (Cq); 139.3 (Cq); 147.4 (Cq); 147.9 (Cq); 148.2 (CH_{Ar}); 149.6 (CH_{Ar}); 152.0 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated for C₂₅H₁₉⁷⁹BrN₃O₃S (MH⁺): 520.0330; found 520.0342.

3-Iodo-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (88)

Procedure 1:²⁵⁹ To a solution of **5** (0.250 g, 1.69 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (10 mL) under argon atmosphere, was added *N*-iodosuccinimide (0.455 g, 1.86 mmol, 1.1 equiv.). After 1 hour stirring at r.t., the mixture was poured into a saturated solution of Na₂S₂O₅ (10 mL). The crude product was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **88** as a brown solid (0.354 g, 77 %).

Procedure 2:³⁶³ To a solution of **5** (0.250 g, 1.69 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (2 mL), was added KOH (0.360 g, 6.41 mmol, 3.8 equiv.). The reaction mixture was stirred for 10 minutes at r.t. and then a solution of iodine (0.429 g, 1.69 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added. After 1 hour stirring at r.t., the mixture was poured into a saturated solution of Na₂S₂O₅ (10 mL). The crude product was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were washed with an aqueous solution of NH₄OH 10 % (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford **88** as a brown solid (0.363 g, 78 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.26.

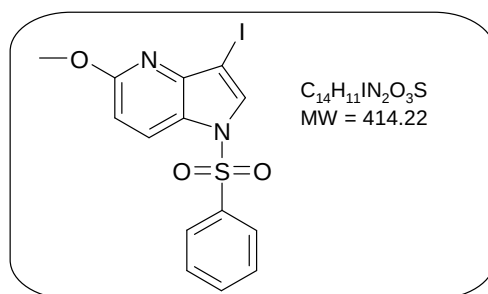
Mp: 124 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3115, 1574, 1405, 1289, 988, 790.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (s, 3H, OCH₃); 6.65 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.38 (d, 1H, H-2, $J_{2,3}$ = 2.7 Hz); 7.54 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz); 8.62 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.5 (CH₃); 58.5 (Cq); 106.8 (C-6); 122.3 (C-7); 124.0 (Cq); 130.3 (C-2); 142.6 (Cq); 160.9 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated C₈H₈IN₂O (MH⁺): 274.9681; found 274.9681.

1-Benzenesulfonyl-3-iodo-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (89)

A solution of **88** (2.0 g, 7.30 mmol) in dry CH₂Cl₂ (40 mL) was cooled to 0 °C under an atmosphere of argon. Sodium hydroxide (1.17 g, 29.2 mmol, 4.0 equiv.) and benzyltriethylammonium chloride (0.0831 g, 0.365 mmol, 0.05 equiv.) were added successively. The mixture was stirred at 0 °C for 10 min, followed by the slow addition of benzenesulfonyl chloride (0.920 mL, 10.95 mmol, 1.5 equiv.). After 15 min stirring at 0 °C then 16 h at r.t., the mixture was poured into H₂O (40 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 9/1) to afford **89** as a light brown solid (2.74 g, 91 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.53.

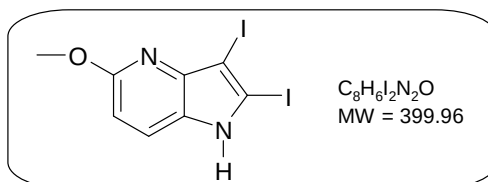
Mp: 162 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 1397, 1365, 1177, 1138, 725.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.00 (s, 3H, OCH₃); 6.74 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.45 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.56 (dd, 1H, H_{Ar}, J = J' = 7.5 Hz); 7.80 (s, 1H, H-2); 7.85 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.13 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.7 (CH₃); 69.2 (Cq); 109.1 (C-6); 123.3 (Cq); 124.2 (C-7); 126.7 (2 x CH_{Ar}); 129.5 (2 x CH_{Ar}); 131.3 (C-2); 134.2 (CH_{Ar}); 137.7 (Cq); 145.4 (Cq); 162.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated C₁₄H₁₂IN₂O₃S (MH⁺): 414.9613; found 414.9632.

2,3-Diiodo-5-methoxy-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine (90)

To a solution of **5** (0.250 g, 1.69 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (10 mL) under argon atmosphere, was added *N*-iodosuccinimide (1.45 g, 5.91 mmol, 3.5 equiv.). After 5 h stirring at r.t., the mixture was poured into a saturated solution of Na₂S₂O₅ (10 mL). The crude product was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification (petroleum ether/EtOAc 9/1) yielded **90** as a brown solid (0.466 g, 69 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 8/2): 0.37.

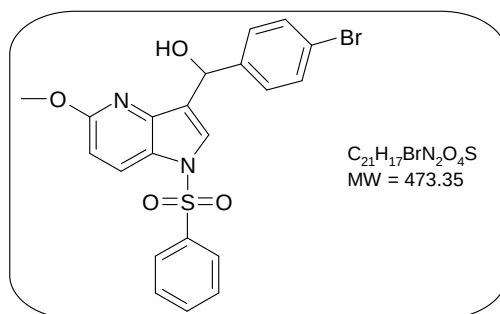
Mp: 210 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3324, 1385, 1271, 1021, 807.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.89 (s, 3H, OCH₃); 6.53 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.63 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz); 12.22 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52.7 (CH₃); 72.3 (Cq); 93.1 (Cq); 105.7 (C-6); 122.1 (C-7); 127.7 (Cq); 143.0 (Cq); 159.7 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated C₈H₇I₂N₂O (MH⁺): 400.8648; found 400.8649.

(1-Benzenesulfonyl-5-methoxy-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-3-yl)-(4-bromo-phenyl)-methanol (91)

To a solution of 89 (0.100 g, 0.241 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (5 mL) under an argon atmosphere at - 78 °C, was added a solution of *n*-BuLi 1.6 M in hexane (0.181 mL, 0.289 mmol, 1.2 equiv.). The iodine-lithium exchange reaction was performed at - 78 °C for 5 minutes followed by the addition of a solution of 4-bromo-benzaldehyde (89.2 mg, 0.482 mmol, 2.0 equiv.) in dry THF (1 mL). The mixture was stirred at - 78 °C for at least 3 h before being warmed to room temperature overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (5 mL) and extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc 7/3) to afford **91** as a yellow solid (0.058 g, 51 %).

Rf (petroleum ether/EtOAc 7/3): 0.38.

Mp: 140 °C.

IR (ATR diamond, cm⁻¹) ν 3530, 1584, 1401, 1166, 722.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 3.91 (s, 3H, OCH₃); 4.45 (bs, 1H, OH); 6.05 (s, 1H, CH); 6.72 (d, 1H, H-6, $J_{6,7}$ = 8.8 Hz); 7.24 (s, 1H, H-2); 7.35 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 7.45 (dd, 2H, 2 x H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.49 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 8.4 Hz); 7.57 (dd, 1H, H_{Ar}, $J = J'$ = 7.5 Hz); 7.79 (d, 2H, 2 x H_{Ar}, J = 7.5 Hz); 8.13 (d, 1H, H-7, $J_{7,6}$ = 8.8 Hz).

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃) δ 53.6 (CH₃); 69.6 (CH_{Ar}); 108.5 (C-6); 121.7 (Cq); 124.4 (Cq); 124.6 (C-7); 124.7 (C-2); 125.4 (Cq); 126.6 (2 x CH_{Ar}); 128.3 (2 x CH_{Ar}); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 131.5 (2 x CH_{Ar}); 134.2 (CH_{Ar}); 137.8 (Cq); 141.0 (Cq); 143.9 (Cq); 161.5 (Cq).

HRMS (TOF ES⁺): m/z calculated C₂₁H₁₈⁷⁹BrN₂O₄S (MH⁺): 494.9990; found 494.0009.

II/ Mise au point des tests d'activité enzymatique de la voie Raf/MEK/ERK

II-1 Les enzymes et les réactifs

Most of the human enzymes were purchased from Upstate (Millipore), *i.e.* constitutively active Raf-1 (306-end, mutated Y340Y341D, specific activity 81414 U/mg), full-length active MEK-1 (specific activity 3272 U/mg), inactive MEK-1, full-length active ERK-2 (specific activity 1410 U/mg) and inactive ERK-2. Myelin Basic Protein (MBP) used as an ERK-2 substrate was also purchased from Upstate.

The γ - ^{32}P ATP used for the PFBA method was purchased from Amersham or from Perkin Elmer and incorporated radioactivity was measured using a Victor 14120 multilabel Wallac counter. To perform the TR-FRET tests, the Lance UltraTM from Perkin Elmer and the LanthascreenTM method from Invitrogen were used. Consequently, for the Lance UltraTM assays, the ERK-2 substrate Ulight-MBP peptide (TRF0109), the Europium-labeled antibody anti-phosphorylated MBP [pThr²³²] (TRF0201), the Raf-1 substrate Ulight-Histone H3 peptide (TRF0125), the Europium-labeled antibody anti-phosphorylated Histone H3 [pThr³] (TRF0211), the MEK-1 substrate Ulight-p70S6K peptide (TRF0126) and the Europium-labeled antibody anti-phosphorylated p70S6K [pThr³⁸⁹] (TRF0214) were supplied by Perkin Elmer. Concerning the LanthascreenTM assays, inactive fluorescein-labeled MEK-1 (PV4812) and Terbium-labeled antibody anti-phosphorylated MEK-1 [pSer 217/221] (PV4817), needed for the direct Raf-1 assay were purchased from Invitrogen as GFP-ATF2 (PV4445), as well as the Terbium-labeled antibody anti-phosphorylated ATF2 [pThr 71] (PV4451) needed for the direct ERK, the double cascade MEK/ERK and the triple cascade Raf/MEK/ERK assays. All TR-FRET assays were performed in low-volume white 384-well plates from Corning and time-resolved fluorescence was measured using a plate reader Victor V from Perkin Elmer.

Staurosporine, GW5074, ZM336372, U0126, MEK inhibitor II, PD98059, FR180204 were purchased from Calbiochem while Sorafenib was provided by COMPISTO Company. Human PEBP/RKIP was prepared as previously described³² and was lyophilized; for each method, it was dissolved in the appropriate kinase buffer (1mg/mL).

II-2 Les tests avec la méthode PFBA

Five different tests were developed : 1) Raf-1 assay was performed with active Raf-1 and inactive MEK-1, 2) MEK-1 assay, using active MEK-1 and inactive ERK-2, 3) ERK-2 assay with active ERK-2 and MBP, 4) MEK/ERK double cascade performed with active MEK-1, inactive ERK-2 and MBP and 5) Raf/MEK/ERK triple cascade using active Raf-1, inactive MEK-1, inactive ERK-2 and MBP.

The kinases were diluted to a suitable concentration in the PFBA reaction buffer 1X: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM Na₃VO₄, 0.1 % mercaptoethanol, 0.01 % Brij-35. The ATP solution was prepared from a concentrated stock solution composed of 1 mM ATP, 500 mM MOPS pH 7.2, 50 mM MgCl₂. ^{32}P ATP was added at a final concentration of 0.05 to 0.5 μCi by assay.

The assays were performed in a final volume of 25 μL in 1.5 mL microtubes. First, 5 μL of PFBA reaction buffer 5X containing 250 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM Na₃VO₄, 0.5 % mercaptoethanol, 0.05 % Brij-35 was added to each microtube. Then the active enzyme and inactive enzymes were incubated with chemical inhibitor or PEBP/RKIP at optimal concentrations and the MBP at Km concentrations. The reaction was started by adding ATP. To test compound inhibition, 0.5 μL of compound was used at a final

concentration of 2 % DMSO. The positive control was run with 2 % DMSO and the negative control was run in the absence of the active kinase. To measure the inhibitory effect of PEBP/RKIP, a mother solution (1 mg/mL (50 μ M)) was prepared with a PFBA reaction buffer. It was then diluted to final concentrations of 0.64 to 25 μ M by the addition of 12.5 μ L of the reaction buffer. The positive control was run with 12.5 μ L of reaction buffer instead of the PEBP/RKIP solution and the negative control was run in absence of the active kinase.

The kinase reaction was terminated by the addition of 5 μ L of 50 % phosphoric acid in each tube and 15 μ L of the terminated reaction was transferred to a phosphocellulose filter (P81 Whatman®), which has the ability to absorb proteins or peptides. Each filter was washed twice for 5 minutes with 5 mL of 75 mM phosphoric acid to wash away unreacted γ - 32 P ATP and once for 2 minutes with 2 mL methanol to remove traces of phosphoric acid. The washes were performed in 15 mL conical tubes using a roller shaker. The filter was introduced in a scintillation vial and the filter-bound radioactivity was quantified using a Victor 14120 multilabel Wallac counter without the addition of scintillation cocktail.

II-3 Les tests avec la méthode Lance Ultra™ (Perkin Elmer)

Five different tests were developed, as described above for PFBA method. The assays were performed in a final volume of 10 μ L in low-volume white 384-well plates. The kinases were diluted at the suitable concentration in the Lance reaction buffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.01 % Brij-35. The ATP solution was prepared from a concentrated stock solution composed of 1 mM ATP, 500 mM MOPS pH 7.2, 50 mM MgCl₂. All the Europium-labeled antibodies were diluted in the TR-FRET detection buffer 1X (CR97-100, Perkin Elmer).

Optimal concentrations of the active enzyme and the inactive enzymes (intermediate substrates) were incubated with a chemical inhibitor or PEBP/RKIP for 20 min at room temperature. The enzyme reaction was initiated by adding final Ulight-substrate and ATP at Km concentrations and was run at room temperature. To test compound inhibition, 0.5 μ L of the compound was used at a final concentration of 5 % DMSO. The positive control was run with 5 % DMSO and the negative control was run in absence of the active kinase. To measure the inhibitory effect of PEBP/RKIP, the protein was solubilised in the Lance reaction buffer to final concentrations of 0.64 to 25 μ M when 5 μ L of PEBP/RKIP solution was added. The positive control was run with 5 μ L of Lance reaction buffer instead of PEBP/RKIP and the negative control was run in absence of the active kinase.

A preparation of 10 μ L, containing 5 μ L of 40 mM EDTA and 5 μ L of 8 nM Europium-labeled antibody directed against the phosphorylated Ulight-substrate, was added to terminate the kinase reaction. The final concentrations of EDTA and antibodies in the assays were 20 mM and 4 nM, respectively. The plate was allowed to incubate at room temperature for 20 minutes. The fluorescence signal was then measured using a Perkin Elmer Victor V™ plate reader using an excitation wavelength of 340 nm and emission wavelengths of 615 nm and 665 nm.

PFBA assay	Enzyme Final conc. Volume	Substrate 1 Final conc. Volume	Substrate 2 Final conc. Volume	Substrate 3 Final conc. Volume	ATP Final conc.* Volume**	³² P ATP Final conc.	Incubation Time, temp.	Reaction Time, temp.
Direct Raf-1	Raf-1 18.7 nM 3 µl	MEK-1 0.25 µM 3 µl			0.25 µM 13.5 µl, <u>6.5 µl</u>	0.5 µCi	20 min, RT	20 min, 30 °C
Direct MEK-1	MEK-1 0.25 µM 5 µl	ERK-2 1.2 µM 5 µl			0.47 nM 9.5 µl, <u>2.5 µl</u>	0.05 µCi	20 min, RT	10 min, 30 °C
Direct ERK-2	ERK-2 0.25 µM 5 µl	MBP 38 µM 5 µl			0.8 nM 9.5 µl, <u>2.5 µl</u>	0.1 µCi	20 min, RT	10 min, 30 °C
MEK/ERK Double cascade	MEK-1 7.55 nM 5 µl	ERK-2 50 nM 2.4 µl	MBP 28.2 µM 2.6 µl		19.5 nM 10 µl, <u>2.5 µl</u>	0.1 µCi	20 min, RT	20 min, 30 °C
Raf/MEK/ERK Triple cascade	Raf-1 1.4 nM 2 µl	MEK-1 7.55 nM 2.5 µl	ERK-2 50 nM 2.1 µl	MBP 28.2 µM 2.9 µl	0.33 µM 10 µl, <u>3 µl</u>	0.5 µCi	20 min, RT	20 min, 30 °C

Each assay was performed in a final volume of 25 µl. The kinases were diluted at the suitable concentration in the PFBA reaction buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.01 % Brij-35). The ATP solution was prepared from a stock solution composed of 1 mM ATP, 500 mM MOPS pH 7.2, 50 mM MgCl₂. Inhibitory compounds were dissolved in DMSO and PEBP/RKIP in PFBA reaction buffer. Conc. = concentration; temp. = temperature; RT = room temperature

* The final ATP concentration includes ³²P ATP.

** The first volume was used for chemical inhibitors; the second volume (underlined) was used for PEBP/RKIP.

Tableau 40 : Conditions expérimentales pour les tests réalisés avec la méthode PFBA

Lance Ultra™ assay	Enzyme Final conc. Volume*	Substrate 1 Final conc. Volume*	Substrate 2 Final conc. Volume*	Substrate 3 Final conc. Volume*	ATP Final conc. Volume*	Incubation Time, temp.	Reaction Time, temp.
Direct Raf-1	Raf-1 20 nM 5 μ l, <u>nd</u>	Ulight-Histone H3 0.119 μ M 2.5 μ l, <u>nd</u>			17 μ M 2 μ l, <u>nd</u>	20 min, RT	60 min, RT
Direct MEK-1	MEK-1 100 nM 5 μ l, <u>nd</u>	Ulight- p70S6K 0.334 μ M 2.5 μ l, <u>nd</u>			24.7 μ M 2 μ l, <u>nd</u>	20 min, RT	30 min, RT
Direct ERK-2	ERK-2 187 nM 5 μ l, <u>2 μl</u>	Ulight-MBP 100 nM 2.5 μ l, <u>2 μl</u>			354 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	30 min, RT
MEK/ERK Double cascade	MEK-1 2.56 nM 5 μ l, <u>2 μl</u>	ERK-2 187 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	Ulight-MBP 100 nM 1.5 μ l, <u>1 μl</u>		5.5 μ M 1 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	60 min, RT
Raf/MEK/ERK Triple cascade	Raf-1 0.615 nM 4 μ l, <u>1 μl</u>	MEK-1 2.56 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	ERK-2 187 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	Ulight-MBP 100 nM 1 μ l, <u>1 μl</u>	5 μ M 0.5 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	50 min, RT

Each assay was performed in a final volume of 10 μ l. The kinases were diluted at the suitable concentration in the Lance Ultra™ reaction buffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.01 % Brij-35. The ATP solution was prepared from a stock solution composed of 1 mM ATP, 500 mM MOPS pH 7.2, 50 mM MgCl₂. Inhibitory compounds were dissolved in DMSO and PEBP/RKIP in Lance reaction buffer.

Conc. = concentration; RT = room temperature.

* The first volume was used for chemical inhibitors and the second volume (underlined) was used for PEBP/RKIP.

Nd; not determined because the assay was not sensitive enough to measure the inhibitory effect of PEBP/RKIP.

Tableau 41 : Conditions expérimentales pour les tests réalisés avec la méthode Lance Ultra™

II-4 Les tests avec la méthode LanthascreenTM (Invitrogen)

Four different assays were developed: Raf-1, ERK-2, MEK/ERK double cascade and Raf/MEK/ERK triple cascade. LanthascreenTM MEK-1 kinase assay was not tested because the fluorescein-ERK2 or GFP-ERK2 needed as the MEK-1 substrate was not commercially available.

LanthascreenTM kinase assays were performed in a final volume of 10 μ L in low-volume white 384-well plates. All the kinases were diluted at the suitable concentration in the LanthascreenTM reaction buffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.01 % Brij-35. The ATP solution was prepared from a concentrated stock solution composed of 1 mM ATP, 500 mM MOPS pH 7.2, 50 mM MgCl₂. All the Terbium-labeled antibodies were diluted in the TR-FRET detection buffer (PV3574, Invitrogen).

Active enzyme and inactive enzymes (intermediate substrates) at optimal concentrations were incubated with a chemical inhibitor or PEBP/RKIP for 20 min at room temperature. The enzyme reaction was started by adding ATP and the final fluorescent substrate labeled with fluorescein or GFP at K_m concentrations, followed by the kinase reaction run at room temperature. To test compound inhibition, 0.5 μ L of compound was used at a final concentration of 5 % DMSO; the positive control was run with 5 % DMSO and the negative control was run in the absence of the active kinase. To measure the inhibitory effect of PEBP/RKIP, the protein was diluted in the Lanthascreen reaction buffer to final concentrations of 0.64 to 25 μ M when adding 5 μ L of the PEBP/RKIP solution; the positive control was run with 5 μ L of Lanthascreen reaction buffer instead of protein solution and the negative control was run in absence of the active kinase.

All kinase reactions were stopped by adding 10 μ L of a solution containing 5 μ L of 40 mM EDTA and 5 μ L of 8 nM Terbium-labeled antibody. The plate was allowed to incubate at room temperature for at least 20 minutes. The fluorescence detection was performed with a Perkin Elmer Victor VTM plate reader using an excitation wavelength of 340 nm and emission wavelengths of 445 nm and 520 nm.

LanthascreenTM assay	Enzyme Final conc. Volume*	Substrate 1 Final conc. Volume*	Substrate 2 Final conc. Volume*	Substrate 3 Final conc. Volume*	ATP Final conc. Volume*	Incubation Time, temp.	Reaction Time, temp.
Direct Raf-1	Raf-1 3.8 nM 5 μ l, <u>2 μl</u>	Fluorescein-MEK-1 0.04 μ M 2.5 μ l, <u>2 μl</u>			0.075 μ M 2 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	45 min, RT
Direct ERK-2	ERK-2 50 nM 5 μ l, <u>2 μl</u>	GFP-ATF2 40 nM 2.5 μ l, <u>2 μl</u>			421 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	50 min, RT
MEK/ERK Double cascade	MEK-1 1.13 nM 5 μ l, <u>2 μl</u>	ERK-2 50 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	GFP-ATF2 40 nM 1.5 μ l, <u>1 μl</u>		4.4 μ M 1 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	80 min, RT
Raf/MEK/ERK Triple cascade	Raf-1 0.2 nM 4 μ l, <u>1 μl</u>	MEK-1 1.13 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	ERK-2 50 nM 2 μ l, <u>1 μl</u>	GFP-ATF2 40 nM 1 μ l, <u>1 μl</u>	27 μ M 0.5 μ l, <u>1 μl</u>	20 min, RT	80 min, RT

Each assay was performed in a final volume of 10 μ l. The kinases were diluted at the suitable concentration in the LanthascreenTM reaction buffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.01 % Brij-35. The ATP solution was prepared from a stock solution composed of 1 mM ATP, 500 mM MOPS pH 7.2, 50 mM MgCl₂. Inhibitory compounds were dissolved in DMSO and PEBP/RKIP in LanthascreenTM reaction buffer.

Conc. = concentration; RT = room temperature.

* The first volume was used for chemical inhibitors; the second volume (underlined) was used for PEBP/RKIP.

Tableau 42 : Conditions expérimentales pour les tests réalisés avec la méthode LanthascreenTM

II-5 Analyse des données expérimentales

All the experiments, *i.e.* titration of enzymes and substrates, ATP, time course of kinase reactions, inhibition curves, were performed in triplicate. All data were plotted and analyzed using Kaleidagraph Software. For each well, the percent of inhibition was calculated using the following equations (1) for the TR-FRET assays and (1') for the radioactive assay.

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (((\text{Em. Ratio} - \mu_{100}) \times 100) / (\mu_0 - \mu_{100})) \quad (1)$$

in which *Em. Ratio* is the *ratio* of Ulight/Europium (665 nm/615 nm) emission signal intensities for the Lance UltraTM assay or the *ratio* Fluorescein or GFP/Terbium (520 nm/495 nm) for the LanthascreenTM assay.

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (((\text{cpm} - \mu_{c-}) \times 100) / (\mu_{c+} - \mu_{c-})) \quad (1')$$

in which cpm is the counts per minute signal intensity measured in the radioactive assay PFBA; μ_{c-} is the average of the negative control (100 % inhibition); μ_{c+} is the average of the positive control (0 % inhibition).

To obtain the IC₅₀ curves, the data were fitted using an hyperbolic equation (2) or a sigmoidal equation (3) according the type of inhibitors:

$$Y = 100 * x / (b + x); b = IC_{50} \quad (2)$$

$$Y = (100 * x)^b / (C^b + x^b); b = \text{Hill number}; c = IC_{50} \quad (3)$$

Z' factors were calculated according to the equation (4) where σ is the standard deviation and μ is the mean of the positive (c+) or the negative (c-) controls³³. The negative controls (c-) were calculated in the presence of 2 μ M of Sorafenib, corresponding to 100 % inhibition, whereas the positive controls (c+) were calculated in the absence of the inhibitor Sorafenib, corresponding to 0 % inhibition.

$$Z' = 1 - [(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}) / (\mu_{c+} - \mu_{c-})] \quad (4)$$

The Z'-factor is an attempt to quantify the suitability of a particular assay for use in a full-scale, high-throughput screen. A Z' factor between 0.5 and 1 indicates a high signal difference between positive and negative controls that is favourable for suitable assay reproducibility.

III/ Synthèse des peptides issus de Raf-1

III-1 Méthodes générales

Resins, the Rink linker and amino acids were purchased from Novabiochem and others reagents were purchased from Sigma Aldrich. Phosphoamino acids: Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH and Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH were purchased from Novabiochem. Mass spectra were measured on a MALDI-TOF autoflex Brucker spectrometer. Analytical and semi-preparative reverse-phase HPLC separations were performed using Nucleosyl[®] (Merck) C-18, (250 x 4.6 mm) and C-8 (250 x 10.5 mm) columns with a flow rate of 1 and 3 ml/min respectively. Purification under basic conditions were performed on a C8 (250 x 10.5 mm) pH-stable column (Vydac, Cat. 228TP1010). Products were eluted using a linear gradient and detected with a diode array detector. The peptide bonds were monitored by UV at 214 nm as tyrosines and tryptophanes were monitored at 275 nm. DMF used for amide couplings was purchased from Applied Biosystems (certificated without residual amines).

Procedure A: Coupling reaction between the NH₂-PEGA resin and the Fmoc-Rink-OH linker

The amino-methyl PEGA[®] resin (3.3 g, 0.4 mmol/g, 0.1 mmol) was loaded into a polypropylene syringe fitted with a polypropylene frit, then was swollen with several solvents: 1) methanol, 2) dichloromethane, 3) dichloromethane/ DIPEA (5 %), 4) dichloromethane, 5) dichloromethane/TFA (1 %), 6) dichloromethane and 7) anhydrous DMF. The Rink linker (2.5 equiv., 0.25 mmol, 0.135 g) and HATU (2.5 equiv., 0.25 mmol, 0.0951 g) was added to the resin in DMF (5 mL), then DIPEA (5.0 equiv., 0.5 mmol, 0.087 mL) was added. The reaction mixture was stirred by rotation for 2 h at R.T., then excess of reactants was eliminated by filtration. The Fmoc-Rink-PEGA resin was washed with DMF (5 times) and CH₂Cl₂ (5 times). The completion of this coupling reaction was checked using the Kaiser test prepared as described in the general procedure F.

Procedure B: Automated solid phase peptide synthesis

Syntheses were realized with a ABI 433A synthesizer (Applied Biosystem) according to the Fmoc strategy on 0.1 mmol of resin with 10.0 equivalents of HBTU/HOBt as coupling agent, 10.0 equivalents of Fmoc-amino acids and 20.0 equivalents of DIPEA. The used program (Fastmoc), supplied by the constructor consists in a Fmoc deprotection step of the resin with piperidine 20 % in NMP, followed by the coupling reaction of the first amino acid, then an acetylation step of free amines with an acetylation solution, then a deprotection step of the Fmoc group of the AA1. This cycle (Fmoc deprotection, coupling, acetylation) is repeated for each AA.

Preparation of the acetylation solution: For a final volume of 100 mL, HOBt (1.0 equiv., 1.48 mmol, 0.2 g) was dissolved in NMP (40 mL). Then, acetic anhydride (35.0 equiv., 50.3 mmol, 4.75 mL) and DIPEA (8.7 equiv., 12.9 mmol, 2.25 mL) were successively added. The volume was completed to 100 mL with NMP.

Procedure C: Manual deprotection of a Fmoc groupement

The resin was introduced in a syringe fitted with a frit and was swollen with DCM then DMF. Piperidine (20 % in DMF) was added in the syringe and left for 10 seconds then piperidine treatment was repeated 3 times for 3 minutes. All the eluate piperidine fractions were pooled in a 100 ml measuring cylinder. The resin was washed with DMF (5 x 5 ml) then with DCM (5 x 5 ml). The solvents were drained-off into the same 100 ml measuring cylinder. Its volume was completed to 100 ml with DCM, the solution was diluted 10 times and an aliquot was transferred into an UV quartz cuvette. Absorbance of the fluorenylmethyl-piperidine adduct was measured at 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

Procedure D: Cleavage of the peptide under acidic conditions

Peptide-resin was introduced into a syringe fitted with a frit and a mixture of TFA/water/TIS/phenol 85/5/5/5 was added. The reaction was stirred by rotation overnight for the phosphorylated peptides **P2** and **P3** and for 3 h for the non phosphorylated peptide **P1**. The supernatant was then poured in cold diethyl ether. The white precipitate was recovered which by centrifugation and washed with diethyl ether 3 times. The peptide was then dried under vacuum (1 mbar) for 15 minutes.

Procedure E: Manual amino acid couplings

The appropriate Fmoc-protected amino acid (3.0 equiv.) was added to the resin bed in a syringe fitted with a frit and covered by a small amount of DMF (4 mL). HATU (3.0 equiv., 0.3 mmol, 0.114 g) and DIPEA (6.0 equiv., 0.6 mmol, 0.105 mL) were successively added. The reaction mixture was stirred for 2 h at R.T., then supernatant was eliminated by filtration. Then peptide-resin was washed with DMF (5 times) and DCM (5 times). The completion of the coupling reaction was checked using the Kaiser test prepared as described in the general procedure F.

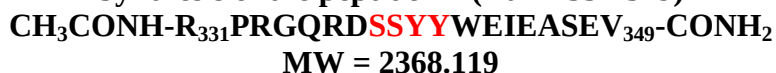
Procedure F: Kaiser test³⁹⁵

Completion of the amino acid coupling reaction was checked using the Kaiser test. A few beads of resin were transferred into a tube (5 ml), a 8/2 mixture of phenol/ethanol (40 μ L), KCN (0.02 mol/L) in pyridine (40 μ L) and 5 % ninhydrine in ethanol (40 μ L) were successively added. Then, the mixture was heated at 100 °C for 5 minutes. A positive test, indicates the presence of free primary amines and corresponds to a dark blue color.

For the detection of secondary amine after a coupling reaction with proline, another test has to be used.³⁹⁶ A few beads of resin were transferred into a tube (5 ml), one drop of 2 % acetaldehyde in DMF v/v then one drop of 2 % chloranil in DMF v/v were added. The mixture was allowed to react at R.T. for 5 minutes. A positive test, indicates the presence of free secondary amines and corresponds to a blue color.

Procedure G: Manual N-acetylation of free amines groups

The acetylation solution (5 mL) used for the automated synthesis, was added into the syringe fitted with a frit containing the NH₂-Peptide-resin. The peptide resin was stirred by rotation for 15 minutes at R.T. and the excess of solution was eliminated by filtration. Then the acetylated peptide-resin was washed with DMF (5 times) and DCM (5 times).

III-2 Modes opératoires**Synthesis of the peptide **P1** (Raf-1 331-349)**

First, the Fmoc-Rink-resin was synthesized according to the general procedure **A**. In the second step, the Fmoc-Rink-resin was transferred into a Teflon reactor to run the automated synthesis according to the procedure **B** to afford the CH₃CO-peptide **P1**-resin. Absorbance of the fluorenylmethyl-piperidine adduct was measured at 301 nm after the first Fmoc deprotection ($A_{301} = 0.78$) and after the last one ($A_{301} = 0.53$) in order to calculate the yield of elongation (68 %). The CH₃CO-peptide **P1**-resin was transferred into a syringe fitted with a frit to undergo the final acidic deprotection step according to the general procedure **D** which affords the crude peptide **P1**.

The crude peptide **P1** was purified with a C8 semi-preparative RP-HPLC using 0.1 % TFA in water v/v (solvent A) and 0.1 % TFA v/v in acetonitrile (solvent B). The peptide **P1** was eluted using a linear gradient of 25-30 % (solvent B) over 15 minutes. The collected fractions were pooled and acetonitrile was evaporated under vacuum. The aqueous phase was lyophilized 2 times to afford **P1** as a white powder (7 mg, 95 % of purity, **Figure 104**).

MS (MALDI+): $m/z = 2369.15$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 2369.11).

RP-HPLC, t_R (25-40 % B): 8.57 minutes.

³⁹⁵ Kaiser E., Colecott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.: Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-98.

³⁹⁶ Vojkovsky T.: Detection of secondary amines on solid phase. *Peptide Res.*, **1995**, 8, 236-37.

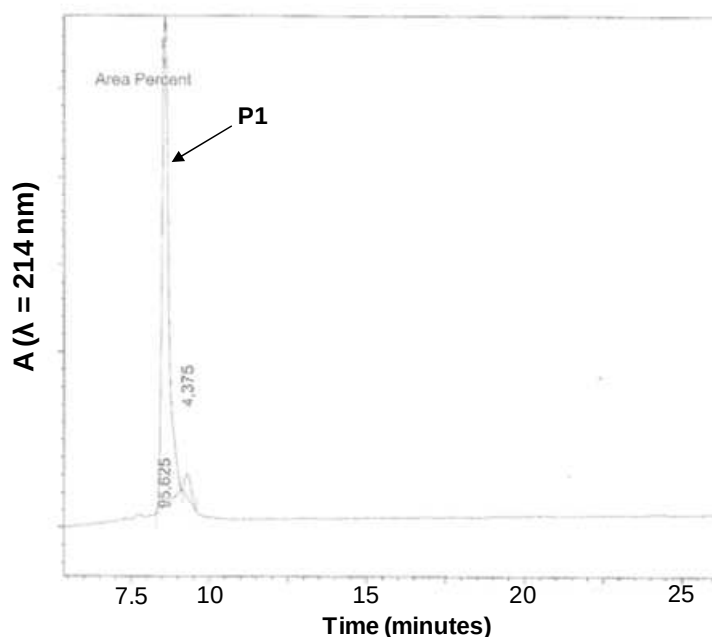


Figure 104 : RP-HPLC chromatogram of the purified peptide P1. C18 column ; solvent A: 0.1 % TFA in water v/v, solvent B: 0.1 % TFA in acetonitrile v/v ; linear gradient of 25-40 % (solvent B) over 30 minutes at 1 mL/min. The indicated numbers correspond to the area percent of each pic.

Synthesis of the diphosphorylated peptide **P2** (Raf-1 331-349)



MW = 2528.052

First, the Fmoc-Rink-resin was synthesized according to the general procedure **A**. In the second step, the Fmoc-Rink-resin was transferred into a Teflon reactor to run the automated synthesis according to the procedure **B** for the sequence V₃₄₉-W₃₄₂. For the amino acids W₃₄₂ and E₃₄₃, double coupling reactions were performed. The Fmoc groupement of the Fmoc-peptide V₃₄₉-W₃₄₂-resin obtained was deprotected manually according to the procedure **C**.

The sequence pS₃₃₈SYpY₃₄₁ was synthesized manually according to the general procedures **E** for the coupling reactions and **C** for the Fmoc deprotection of each AA. The Fmoc-peptide pS₃₃₈-V₃₄₉-resin was transferred into a Teflon reactor in order to finish the synthesis automatically according to the general procedure **B**. Amino acids R₃₃₁-D₃₃₇ were introduced with double coupling reactions. An elongation yield of 79 % was calculated.

Half of the CH₃CO-peptide **P2**-resin obtained was transferred into a syringe fitted with a frit to undergo the final acidic deprotection step according to the general procedure **D** to afford the crude peptide **P2**.

The crude peptide **P2** was purified with a C8 semi-preparative RP-HPLC using 0.1 % TFA in water v/v (solvent A) and 0.1 % TFA in acetonitrile v/v (solvent B). The peptide **P2** was eluted using a linear gradient of 15-31 % (solvent B) over 8 minutes. The collected fractions were pooled and acetonitrile was evaporated under vacuum. The aqueous phase was lyophilized 2 times yielded to **P2** as a white powder (11 mg, 99 % of purity, **Figure 105**).

MS (MALDI+): $m/z = 2529.09$ [M+H]⁺ (calc. 2529.05).

RP-HPLC, t_R (5-65 % B): 20.97 minutes.

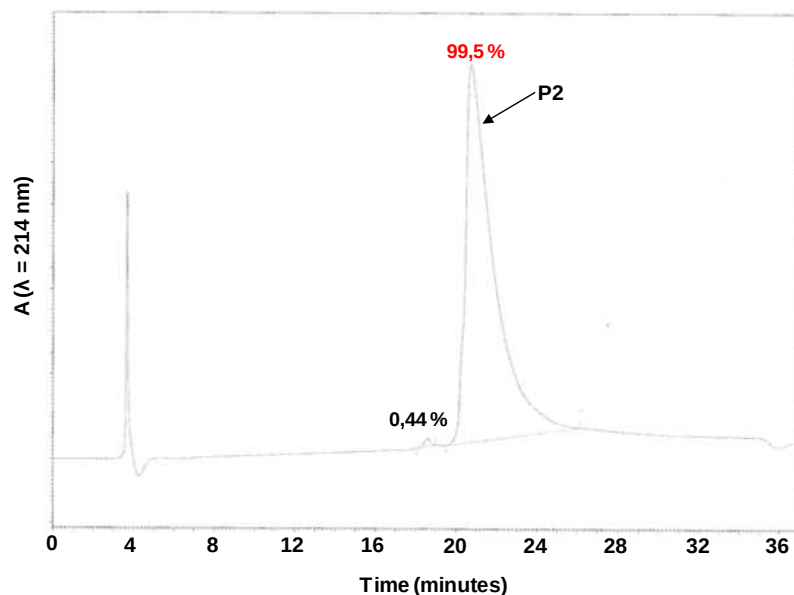


Figure 105 : RP-HPLC chromatogram of the purified peptide P2. C18 column ; solvent A: 0.1 % TFA in water v/v and solvent B: 0.1 % TFA in acetonitrile v/v ; linear gradient of 5-65 % (solvent B) over 30 minutes at 1 mL/min. The indicated percentages correspond to the area percent of each pic.

Synthesis of the triphosphorylated peptide **P3** (Raf-1 331-349)



MW = 2608.019

First, the Fmoc-Rink-resin was synthesized according to the general procedure **A**. In the second step, the Fmoc-Rink-resin was transferred into a Teflon reactor to run the automated synthesis according to the procedure **B** for the sequence V₃₄₉-W₃₄₂. For amino acids W₃₄₁ and E₃₄₂, double coupling reactions were performed. The Fmoc-peptide V₃₄₉-W₃₄₂-resin was deprotected manually according to the procedure **C**. The rest of the sequence R₃₃₁-Y₃₄₁ was synthesized manually according to the general procedures **E** for the coupling reactions, then **C** for the Fmoc deprotection and **G** for the *N*-acetylation of the free NH₂-terminal groups. For the amino acids pS₃₃₈ and D₃₃₇ a first coupling reaction was performed according to **E**.

As the Kaiser test was positive, a second coupling reaction was performed with the Fmoc amino acid (5.0 equiv.), HATU (5.0 equiv., 0.50 mmol, 0.189 g) and DIPEA (12.0 equiv., 1.2 mmol, 0.209 mL) in DMF (4 mL).

Coupling reactions of the sequence R₃₃₁-R₃₃₆ were performed manually with 5.0 equivalents of Fmoc amino acid, 5.0 equivalents HATU, 12.0 equivalents DIPEA in DMF (4 mL) and were checked by the Kaiser test according to the general procedure **F**. A final elongation yield of 65 % was calculated. The final acidic deprotection step of the CH₃CO-peptide **P3**-resin was performed according to the general procedure **D** to afford the crude peptide **P3**.

The crude peptide **P3** was splitted in two parts because it was purified according two different methods.

Purification method 1: The crude peptide **P3** was purified using a C8 semi-preparative RP-HPLC and eluted with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), pH 8.0, in water (solvent A) and 0.1 M TEAA, pH 8.0, in acetonitrile (solvent B). The peptide **P3** was eluted using a linear

gradient of 5-13 % (solvent B) over 15 minutes. The collected fractions were pooled and acetonitrile was evaporated under vacuum. After lyophilisation, the peptide **P3** was recovered as a colorless oil.

The peptide **P3** was desalted using a C18 solid phase extraction column purchased from GracePureTM (bed size 1 g, sorbent retention capacity 50 mg, volume 6 mL, reference: 5138764). First, the lyophilized peptide **P3** was solubilized at a final concentration of 2 mg/mL in a 0.01 M ammonium acetate, pH 6.6, in water.

The desalting procedure was composed of four steps: 1) The conditioning step of the sorbent: the sorbent was washed with methanol (5 x 4 mL), then with water (5 x 4 mL) ; 2) The load step: 3.5 mL of the solubilized peptide **P3** was loaded ; 3) The washing step: the sorbent was washed with 0.01 M ammonium acetate, pH 6.6, in water (10 x 4 mL) ; 4) The elution step: the peptide **P3** was eluted with 5 x 4 mL of 70 % acetonitrile containing 0.01 M ammonium acetate, pH 6.6, in water then with 5 x 4 mL of acetonitrile without ammonium acetate.

The eluted fractions were pooled and acetonitrile was evaporated under vacuum. The aqueous phase was lyophilized 3 times to afford the peptide **P3** as a white solid (5 mg, 99 % of purity, **Figure 106**).

MS (MALDI+): $m/z = 2609.15$ $[M+H]^+$ (calc. 2609.01).

RP-HPLC, t_R (5-20 % B): 13.60 minutes

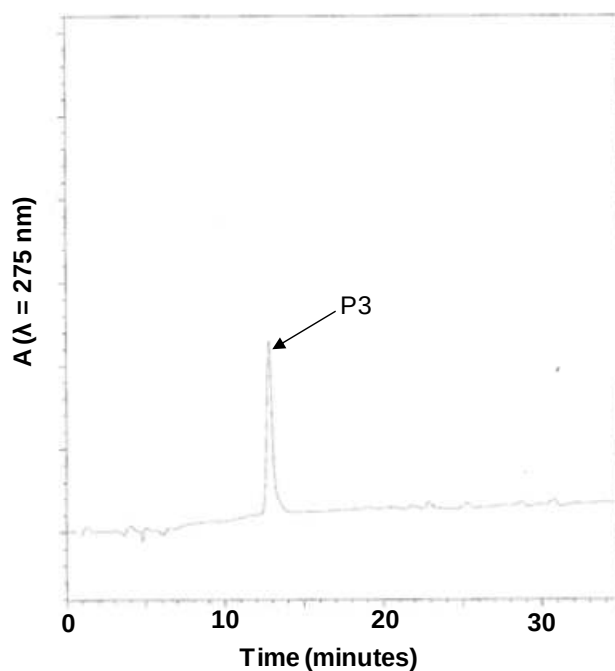


Figure 106 : RP-HPLC chromatogram of the purified peptide P3. C8 column ; solvent A: 0.1 M triethylammonium acetate, pH 8.0, in water (TEAA), solvent B: 0.1 M TEAA, pH 8.0, in acetonitrile; linear gradient of 5-20 % (solvent B) over 30 minutes at 3 mL/min.

Purification method 2: The crude peptide **P3** was purified with a C8 semi-preparative RP-HPLC using 0.1 M ammonium acetate, pH 6.6, in water (solvent A) and 0.1 M ammonium acetate, pH 6.6, in acetonitrile (solvent B). The peptide **P3** was eluted using a linear gradient of 3-10 % (solvent B) over 14 minutes. The collected fractions were pooled and acetonitrile was evaporated under vacuum. The aqueous phase was lyophilized 3 times to afford the peptide **P3** as a white powder (7 mg, 99 % of purity, **Figure 107**).

MS (MALDI+): $m/z = 2609.07$ $[M+H]^+$ (calc. 2609.01).

RP-HPLC, t_R (5-20 % B): 14.64 minutes

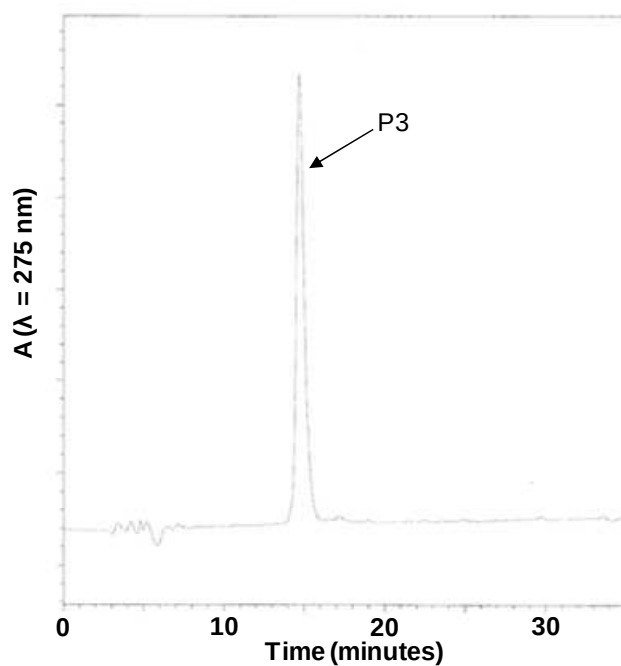


Figure 107 : *RP-HPLC chromatogram of the purified peptide P3. C8 column ; solvent A: ammonium acetate 0.1 M in water pH 6.6, solvent B: ammonium acetate 0.1 M in acetonitrile pH 6.6 ; linear gradient of 5-20 % (solvent B) over 30 minutes at 3 mL/min.*

Inhibiteurs de la voie Raf/MEK/ERK : Synthèse de composés à structure 4-azaindole et évaluation de leur efficacité par la mise au point de tests TR-FRET

Résumé :

Afin de corriger la suractivation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK observée dans 30 % des cancers, nous avons choisi d'inhiber la kinase Raf-1. Les inhibiteurs potentiels de Raf-1 ont été conçus avec un cycle central original 4-azaindole. Pour apporter de la diversité fonctionnelle au niveau des sommets C-2 et C-5 lors de la synthèse, nous avons optimisé deux méthodes à partir du synthon 5-méthoxy-4-azaindole-*N*-phénylsulfonyl. La première est une réaction de lithiation du sommet C-2 suivie de la condensation de différents électrophiles et la deuxième est la C-arylation ou *N*-arylation du sommet C-5 à partir du dérivé triflate en 5 via des réactions de couplage pallado-catalysées de type Suzuki et Buchwald, respectivement. Ces deux méthodes ont permis d'aboutir à 2 séries de composés : une première série fonctionnalisée en position *N*-1 et C-5 du noyau 4-azaindole et une deuxième série substituée en position C-5 et C-2.

Pour tester les nouveaux inhibiteurs synthétisés et un inhibiteur naturel appelé PEBP, nous avons mis au point des tests d'activité *in vitro* sur l'ensemble de la cascade Raf/MEK/ERK et sur chacune des 3 kinases. Les tests ont été développés avec 2 méthodes de TR-FRET, Lance UltraTM et LanthascreenTM, et ont été validés avec des inhibiteurs commerciaux et comparés par rapport à la méthode radioactive PFBA.

Au total, 30 produits finaux ont été évalués *in vitro* sur la kinase Raf-1. Grâce aux plateformes du Cancéropôle GO, les produits ont aussi été testés sur 6 lignées de cellules cancéreuses et sur les kinases du cycle cellulaire DYRK1A, GSK3 et CDK5. Plusieurs molécules ont montré une activité antitumorale encourageante de l'ordre du μM et un composé a été identifié comme inhibiteur de Raf-1 avec une valeur d' IC_{50} de 9,8 μM et une cytotoxicité sélective vis-à-vis des cellules du foie Huh7 ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$).

Mots clés : cancer, Raf/MEK/ERK, inhibiteurs, 4-azaindole, lithiation, couplages pallado-catalysés, tests d'activité kinases, TR-FRET.

Inhibitors of the Raf/MEK/ERK pathway: Synthesis of 4-azaindole derivatives and evaluation of their efficiency through TR-FRET kinase assays

Summary :

Considering the implication of the Raf/MEK/ERK pathway deregulation in 30 % of human cancers, we decided to synthesize potential Raf-1 inhibitors. They were synthesized using the original 4-azaindole as the central core. To introduce various types of substituents in C-2 and C-5, we developed two methodologies from the building block *N*-benzenesulfonyl-5-methoxy-4-azaindole. The first one is the C-2 lithiation followed by the addition of various electrophiles. The second methodology is the C-5 C-arylation or the *N*-arylation using palladium-catalysed cross-couplings from the C-5 triflate derivative through Suzuki or Buchwald cross coupling reactions, respectively. The two methodologies ended up to the synthesis of two series of compounds. The first one is functionalized in *N*-1 and C-5 of the 4-azaindole core. The second one is substituted in C-2 and C-5.

In order to test the newly synthesized inhibitors as well as the natural inhibitor PEBP, we have developed several tests to measure *in vitro* the effect of inhibitors on the activity of the complete cascade Raf/MEK/ERK and also on the activities of each individual kinase. The assays were developed by using 2 TR-FRET methods, Lance UltraTM and LanthascreenTM, and were validated with commercially available inhibitors and compare to the radioactive PFBA method.

Finally, 30 compounds were evaluated through *in vitro* Raf-1 assays. By using the facilities offered by the Cancéropôle GO platforms, the compounds were also tested on six different tumor cell lines and on the kinases DYRK1A, GSK3 and CDK5. Several compounds displayed encouraging antitumoral activity and one compound was identified as a Raf-1 inhibitor with an IC_{50} value of 9.8 μM and a selective cytotoxicity activity towards liver tumor cells Huh7 ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$).

Keywords: cancer, Raf/MEK/ERK pathway, inhibitors, 4-azaindole, lithiation, palladium-catalysed cross-couplings, kinase activity assays, TR-FRET.

