



Synthèse d'agonistes non-peptidiques du récepteur à la prokinétine PKR1

Marine Charavin

► To cite this version:

Marine Charavin. Synthèse d'agonistes non-peptidiques du récepteur à la prokinétine PKR1. Chimie thérapeutique. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAF047 . tel-02003517

HAL Id: tel-02003517

<https://theses.hal.science/tel-02003517>

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7200 – Laboratoire d’Innovation Thérapeutique

THÈSE

Présentée par

Marine CHARAVIN

pour obtenir le grade de

Docteur de l’Université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Chimie Thérapeutique

Soutenue le 22 Septembre 2014

**SYNTHÈSE D'AGONISTES NON-PEPTIDIQUES DU
RÉCEPTEUR DE LA PROKINETICINE PKR1.**

THÈSE dirigée par :

DESAUBRY Laurent

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

COLLOT Valérie

Professeur, Université de Caen

PELLEGRINI- MOISE Nadia

Maître de Conférences HDR, Université de Lorraine-Nancy

EXAMINATEUR INTERNE :

MIESCH Michel

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7200 – Laboratoire d’Innovation Thérapeutique

THÈSE

Présentée par

Marine CHARAVIN

pour obtenir le grade de

Docteur de l’Université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Chimie Thérapeutique

Soutenue le 22 Septembre 2014

SYNTHÈSE D'AGONISTES NON-PEPTIDIQUES DU RÉCEPTEUR DE LA PROKINETICINE PKR1.

THÈSE dirigée par :

DESAUBRY Laurent

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

COLLOT Valérie

Professeur, Université de Caen

PELLEGRINI- MOISE Nadia

Maître de Conférences HDR, Université de Lorraine-Nancy

EXAMINATEUR INTERNE :

MIESCH Michel

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

*The greatest glory in living lies not in never falling,
but in rising every time we fall.*

Nelson MANDELA

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires. Parmi eux, nous avons choisi d'étudier deux récepteurs apparentés : les récepteurs de la prokinéticine 1 et 2. Ces deux récepteurs ont pour ligands des hormones de nature peptidique, divisées en deux sous-groupes : les prokinéticines 1 et 2. Ces deux prokinéticines sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques en se liant à leurs récepteurs PKR1 et PKR2. Il a été récemment montré que la prokinéticine 2 pouvait stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches progénitrices cardiaques, via les récepteurs PKR1 et PKR2. Il a également été reporté que l'activation de PKR1 protège les cardiomyocytes et les cellules progénitrices cardiaques de l'apoptose. Afin d'étudier ces effets nous avons synthétisé des agonistes non-peptidiques du récepteur PKR1. Nous avons donc poursuivi les études de pharmacomodulation d'une première famille de composés et développé une seconde famille d'agonistes potentiels originaux, déterminée par des études de modélisation moléculaire. Une sonde fluorescente a été synthétisée afin d'évaluer la liaison de nouveaux composés. Au cours de ces travaux nous avons découvert une nouvelle réaction multi-composante permettant la synthèse d'un composé dihydropyrrole polyfonctionnel. Nous nous sommes alors intéressés à son mécanisme et à sa limitation chimique dans le but de former de nouveaux hétérocycles fonctionnalisés.

Mots clés : récepteurs couplés aux protéines G, prokinéticine, récepteur de la prokinéticine, agoniste non-peptidique, cellules progénitrices cardiaques, sonde fluorescente, quinoléine, composé dihydropyrrole, réaction multi-composante.

Abstract

The G protein-coupled receptors represent the largest family of membrane receptors. Among them, we choose to study two related receptors: prokineticin receptors 1 and 2. These two receptors have peptidic hormone ligands, divided in two sub-groups: prokineticins 1 and 2. Both prokineticins are involved in many physiological processes by binding to their receptors PKR1 and PKR2. It has recently been shown that prokineticin 2 could stimulate proliferation and differentiation of cardiac progenitor cells. It was also reported that activation of PKR1 protects cardiomyocytes and cardiac progenitor cells from apoptosis. To investigate these effects we synthesized non-peptidic receptor PKR1. We continued pharmacodulation studies of a first family of compounds and developed a second family of original potential agonists, determined by molecular modeling studies. A fluorescent probe was synthesized to access the binding of novel compounds. During this work we discovered a new multi-component reaction for the synthesis of a polyfunctional dihydropyrrol compound. We then interested in the mechanism and its chemical limitation in order to form new functionalized heterocycles.

Key words : G protein coupled-receptors, prokineticin, prokineticin receptor, non-peptidic agonist, cardiac progenitor cells, fluorescent probe, quinoline, dihydropyrrol compound, multi-component reaction.

Tables des matières

INTRODUCTION	1
1.1. LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (RCPG)	3
1.1.1. <i>Contexte historique</i>	3
1.1.2. <i>Description des RCPG</i>	3
1.1.2.1. Caractéristiques	3
1.1.2.2. Familles des RCPG	6
1.1.2.2.1. Classe A/ La famille des récepteurs Rhodopsine.....	8
1.1.2.2.2. Classe B/La famille des récepteurs Sécrétine.....	8
1.1.2.2.3. Classe B/La famille des récepteurs Adhésine.....	9
1.1.2.2.4. Classe C/La famille des récepteurs Glutamate.....	9
1.1.2.2.5. Les Classes D et E.	9
1.1.2.2.6. Classe F/La famille des récepteurs Frizzled et des récepteurs du goût.....	10
1.1.2.3. Les protéines G.....	11
1.1.2.3.1. Les sous-unités G_{α}	12
1.1.2.3.1.1. La famille $G_{\alpha s}$	12
1.1.2.3.1.2. La famille $G_{\alpha i/o}$	13
1.1.2.3.1.3. La famille $G_{\alpha q}$	13
1.1.2.3.1.4. La famille $G_{\alpha 12/13}$	14
1.1.2.3.2. Les sous-unités $G_{\beta\gamma}$	15
1.1.2.3.3. Interactions entre les RCPG et les protéines $G_{\alpha\beta\gamma}$	15
1.1.3. <i>Mécanisme d'activation des RCPG</i>	16
1.1.3.1. Différents modèles.....	16
1.1.3.1.1. Liaison simple et activation.....	17
1.1.3.1.2. Modèle simple du complexe ternaire	17
1.1.3.1.3. Modèle étendu du complexe ternaire	17
1.1.3.1.4. Modèle cubique du complexe ternaire.....	18
1.1.3.1.5. Modèle complexe incluant l'oligomérisation du récepteur	18
1.1.3.2. Les ligands des RCPG	18
1.1.3.3. Activation des RCPG	20
1.1.3.3.1. Mécanisme d'activation.....	20
1.1.3.3.2. Transduction du signal	21
1.1.3.3.2.1. Les protéines G_{α}	21
1.1.3.3.2.2. Les β -arrestines.....	22
1.1.3.3.3. Arrêt du signal.....	25
1.1.3.3.3.1. La désensibilisation du récepteur	25
1.1.3.3.3.2. L'internalisation du récepteur	25
1.1.3.3.3.3. Régulation et resensibilisation.....	26
1.1.4. <i>Voie de signalisation indépendante des protéines G : les β-arrestines</i>	27
1.1.4.1. Exemples de ligands biaisés	28

1.1.4.2.	Les récepteurs μ -opioïdes	30
1.1.4.3.	Les récepteurs Angiotensine II type 1A (AT1R)	31
1.1.4.4.	Les récepteurs β 1-adrénérique	32
1.1.4.5.	Le récepteur GPR109A	33
1.1.4.6.	Les récepteurs sérotonine 5-HT _{2A}	34
1.1.5.	<i>Les RCPG et le système cardiovasculaire</i>	34
1.2.	LA PROKINETICINE ET SES RECEPTEURS.....	35
1.2.1.	<i>La prokinéticine et ses récepteurs</i>	35
1.2.1.1.	Description de la prokinéticine et de ses récepteurs	35
1.2.1.2.	Fonctions physiologiques de la prokinéticine	37
1.2.1.2.1.	Les prokinéticines comme régulateurs de la motilité gastro-intestinale	39
1.2.1.2.2.	Activité hyperalgésique des prokinéticines.....	39
1.2.1.2.3.	Rôle des prokinéticines dans le développement et la fonction des cellules sanguines ...	41
1.2.1.2.4.	La fonction régulatrice de la prokinéticine 2 dans les systèmes circadiens	42
1.2.1.2.5.	La fonction de la prokinéticine 2 dans la neurogenèse.....	43
1.2.1.2.6.	Les fonctions de la prokinéticine 1 dans l'angiogenèse	44
1.2.1.2.7.	Les fonctions de la prokinéticine dans le système de reproduction	45
1.2.1.3.	Pathologies associées à la prokinéticine	46
1.2.1.3.1.	Le syndrome de Kallmann.....	46
1.1.1.1.1.	Maladie de Hirschsprung	46
1.1.1.1.2.	Rôle des prokinéticines dans les pathologies de l'appareil reproducteur	47
1.2.1.4.	Les prokinéticines dans différents cancers	48
1.2.1.4.1.	Dans le cancer colorectal	49
1.2.1.4.2.	Dans le cancer de l'endomètre	49
1.2.1.4.3.	Dans le carcinome hépatocellulaire.....	49
1.2.1.4.4.	Dans l'angiogenèse des tumeurs dépendantes des cellules myéloïdes.....	50
1.2.1.4.5.	Dans le neuroblastome	50
1.2.1.4.6.	Dans le carcinome ovarien.....	51
1.2.1.4.7.	Dans l'adénocarcinome pancréatique	51
1.2.1.4.8.	Dans le cancer de la prostate.....	51
1.2.1.4.9.	Dans le cancer des testicules	52
1.2.1.5.	Les prokinéticines et le cœur	52
1.2.1.5.1.	Les maladies cardiovasculaires	52
1.2.1.5.2.	Régulation cardio-vasculaire par la prokinéticine.....	55
1.2.1.5.3.	La signalisation de la prokinéticine dans l'infarctus du myocarde.....	55
1.2.1.5.4.	La signalisation de la prokinéticine dans l'activation des cellules souches/progénitrices cardiaques	57
1.2.1.6.	L'expression des récepteurs de la prokinéticine dans les cellules et les tissus cardiovasculaires	58
1.2.1.7.	Rôle du récepteur PKR1 dans les fonctions métaboliques, cardiovasculaires et rénales.....	58
1.2.1.8.	Le récepteur PKR2 dans la régulation du comportement circadien.....	60

1.2.1.9. Le récepteur PKR2 dans l'internalisation et l'activation des kinases régulant le signal extracellulaire	61
1.2.1.10. Rôle de la signalisation du récepteur PKR2 dans le système cardiovasculaire.....	62
1.2.1.11. Rôle du récepteur PKR2 dans les fonctions des cellules endothéliales et des cardiomyocytes	63
1.2.2. <i>Implication du récepteur PKR1 au niveau cardiovasculaire</i>	65
1.2.2.1. L'épicarde comme source de cellules progénitrices multipotentes.....	65
1.2.2.2. Rôle de la signalisation du récepteur PKR1 dans le système cardiovasculaire.....	66
1.2.2.3. Le récepteur PKR1 dans les pathophysiologies cardiaque et rénale	68
1.2.2.4. La signalisation du récepteur PKR1 dans les cellules progénitrices dérivées du cœur et du rein	68
1.2.2.5. Protection du cœur de l'infarctus du myocarde	69
1.2.3. <i>Ligands connus des récepteurs PKR1 et PKR2</i>	71
1.2.3.1. Les triazinediones.....	71
1.2.3.2. Les morpholines carboxamides	74
1.2.3.3. Les sulfonylpipéridines.....	75
1.2.4. <i>Les agonistes du récepteur PKR1 développés au laboratoire</i>	76
2. OBJECTIFS	82
3. RESULTATS	85
3.1. DERIVES DE LA DEHYDROTYROSINE ET DE LA TYROSINE	86
3.1.1. <i>Synthèse</i>	86
3.1.1.1. Remplacement d'un des amides d'IS20 par des amides cyclohexaniques	86
3.1.1.2. Passage d'IS20 à un dérivé de la Tyrosine.....	88
3.1.1.3. Remplacement de la partie amide d'IS 37 par des amides cyclohexaniques	89
3.1.2. <i>Etude pharmacologique</i>	93
3.1.2.1. Activité angiogénique.....	93
3.1.2.2. Cardioprotection des EPDC	95
3.1.2.3. Comparaison de l'activité <i>in vivo</i> avec un biomarqueur	96
3.2. SYNTHESE D'UNE SONDE FLUORESCENTE.....	97
3.2.1. <i>Synthèse</i>	98
3.2.1.1. Synthèse de la sonde fluorescente dérivée d'IS 1.....	98
3.2.1.2. Synthèse de la sonde fluorescente dérivée d'IS 37	101
3.2.1.3. Synthèse du groupement espaceur et fixation du motif peptidique	101
3.2.1.4. Couplage avec le fluorophore	102
3.2.1.5. Troisième stratégie	104
3.2.2. <i>Etude pharmacologique</i>	106
3.3. LES QUINOLEINES.....	108
3.3.1. <i>Synthèse</i>	108
3.3.1.1. Stratégie 1 : modification de la zone 1.....	110
3.3.1.1.1. La réaction de Doebner.....	110

3.3.1.1.2.	Le couplage peptidique.....	111
3.3.1.1.3.	Composés IS obtenus.....	112
3.3.1.2.	Stratégie 2 : modification des zones 2 et 3.	114
3.3.1.2.1.	Amidation	114
3.3.1.2.2.	Réaction de Doebner modifiée	114
3.3.2.	<i>Résultats pharmacologiques</i>	117
3.3.2.1.	Activation de ERK	117
3.3.2.2.	Mesure du signal calcique.....	120
3.3.2.3.	Effet sur l'angiogenèse	120
3.4.	DECOUVERTE D'UNE REACTION A 3 COMPOSANTES.....	123
3.4.1.	<i>Origine de la découverte d'une réaction à trois composantes</i>	123
3.4.2.	<i>Effet de la température et de l'atmosphère O₂ ou Ar</i>	127
3.4.3.	<i>Variations des conditions réactionnelles</i>	128
3.4.4.	<i>Variations des réactifs</i>	129
3.4.5.	<i>Etudes mécanistiques</i>	131
3.4.5.1.	Mécanisme proposé.....	131
3.4.5.2.	Détermination du mécanisme, validation de [I ₁] et [I ₂]	132
3.4.5.3.	Essais avec des amides pyruviques non énolisables	134
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	137
5.	PARTIE EXPERIMENTALE	140
6.	BIBLIOGRAPHIE	248

Remerciements

Au terme de ce travail de recherche, je souhaite, dans un premier temps, remercier le Dr. Laurent Désaubry pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir confié ce projet passionnant. Merci à Marcel Hibert pour son accueil et son aide.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de lire et de juger ce travail : Valérie Collot, Nadia Pellegrini-Moïse et Michel Miesch.

Je remercie également l'équipe du Dr. Canan Nebigil pour leur travail considérable dans le cadre de ce projet ainsi que Cyril Antheaume et Patrick Wehrung de la Plateforme d'Analyse Chimique Strasbourg Illkirch PACSI

Je tiens tout particulièrement à remercier Patrick Wagner pour son aide, ses conseils, son calme et son optimisme, et Séverine Schneider qui m'a grandement aidée, conseillée, écoutée et encouragée. Un immense merci.

Mes remerciements vont également à Pascale Buisine pour toutes ses analyses et sa disponibilité ainsi qu'à Barbara Schaeffer et Amélie Leick.

Je remercie également Christophe Salomé, Jean-Baptiste Gallé, Marc, Stéphanie et tous mes collègues de l'aquarium pour leur bonne humeur, leur convivialité et nos fameuses discussions du midi.

Un grand merci à Léa, ma coloc téléphonique, qui est là depuis le début et qui m'a aidée à chaque étape.

Merci à Sarah d'être là depuis toujours, tout simplement.

Un remerciement spécial pour Tabby pour sa présence et sa patience.

Je remercie Julie pour son amitié ainsi que Lorie, Antoine, Lucas, Cécile, Solène, Thierry (Poussin) et Seb pour nos quizz et leur présence.

Merci à Alice pour nos balades, parfois mouvementées.

Je remercie enfin ma famille et surtout mes parents pour leur soutien, leur encouragement. Merci à mes deux petits frères Paul et Timothé.

Une pensée particulière à Mamie, Papi, Maminou et Mémoune.

Liste des abréviations

AC: Adénylate Cyclase
 AcOEt : Acétate d'éthyle
 AcOH : Acide Acétique
 AcONa : Acétate de Sodium
 Akt : Protéine kinase B
 AMP: Adénosine mono-phosphate
 ARN : Acide ribonucléique
 AT1R : Récepteur Angiotensine II type 1A
 AVC : Accident vasculaire cérébrale
 AVIT : Séquence Alanine, Valine, Isoleucine et Thréonine
 α -MHC : Chaîne lourde α -myosine (α -myosin heavy chain)
 Bn : Benzyle
 Bv8 : Peptide amphibien *B. variegata* 8
 β -AR: β -Adrenergic Receptor
 cAMP: Adénosine mono-phosphate cyclique
 CASR: Récepteur de détection du calcium
 Cav-1 : Cavéoline-1
 Cbz : Carboxybenzyle
 CD68 : Cluster de différenciation 68
 CE : Cellules endothéliales
 CépiDC : Centre d'épidémiologies des causes médicales de décès
 CHO : Cellules d'ovaire d'hamster chinois
 CMR : Courant de migration rostrale
 CPC : Cellules progénitrices cardiaques (*Cardiac progenitor cells*)
 DAG : Diacylglycérole
 DCM : Dichlorométhane
 DEPBt : 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one
 DG : Gyrus denté
 DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine
 DMAP : 4-diméthylaminopyridine
 DMF : Diméthylformamide
 DMH : Noyau médial dorsal de l'hypothalamus
 DMN : Noyau médial dorsal
 DOI : 2,5-diméthoxy-4-iodoamphetamine
 DOXO : Doxorubicine
 DRG : Ganglions de la racine dorsale
 D2R : Récepteur 2 de la dopamine
 D2_LR : Isoforme long du récepteur 2 de la dopamine
 δ : Déplacement chimique exprimé en ppm
 e : boucle extracellulaire
 EDCI: 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
 EEDQ : *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline
 EGF : Facteur de croissance épidermique
 EGFR : Récepteur de Facteur de croissance épidermique
 EG-VEGF: Facteur de croissance vasculaire endothéliale de la glande endocrine (*Endocrine gland-derived vascular endothelial factor*)
 eNOS : Synthèse d'oxyde nitrique phospho-endothélial

ENS : Système nerveux entérique
 EPAC: Protéines d'échange activées directement par cAMP
 EPDC : Cellules progénitrices dérivées de l'épicarde (*Epicardal derivated progenitor cells*)
 ERK: Kinase régulant le signal extracellulaire
 EtOH: Ethanol
 Et₃N : Triéthylamine
 FCS : Sérum de fœtus de veau (*Fetal calf serum*)
 FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (*Förster resonance energy transfert*)
 GABA: Acide γ -aminobutyrique
 GDNF : Facteur neurotrophe dérivé de la glie
 GDP : Guanosine Diphosphate
 GEF : Facteur d'échange du nucléotidique guanosine
 GFP : Protéine fluorescent dans le vert (*Green fluorescent protein*)
 GIRK: G protein-regulated inward rectified potassium channel
 GRAFS: Glutamate, Rhodopsine, Adhésine, Frizzled, Sécrétine
 GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines
 GPR109A : Récepteur niacine
 GRK : Récepteurs kinases couplés aux protéines G
 GRM: Récepteurs glutamate métabotrope
 GSK-3 : Kinase Akt/Glycogène synthase 3
 GTP: Guanosine Triphosphate
 HAEC : Cellules endothéliales aortiques humaines
 HATU: 1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
 HCC : Carcinome hépatocellulaire
 HDL : Lipoprotéines de haute densité (*High-density lipoprotein*)
 HEK : Cellules embryonnaires de rein humain (*Human embryonic kidney*)
 HHSEC : Cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques humaines
 HIF: Facteur induisant l'hypoxie
 HOBt : Hydroxybenzotriazole
 HTD : Docking à haut débit (*High throughput docking*)
 H5V : Cellules endothéliales coronaires
 i : Boucle intracellulaire
 IBD : Maladie inflammatoire de l'intestin (*Inflammatory bowel disease*)
 IBS : Syndrome du côlon irritable (*Irritable bowel syndrome*)
 IM: Infarctus du myocarde
 InsP₃: Inositol-1, 4, 5-triphosphate
 IO₃: Inositol triphosphate
 kDa: kilo Dalton

LC-MS : Liquid chromatography mass spectrometry (*Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse*)
 LN : N-terminale longue
 LPA: Acide lysophosphatidique
 LS : Noyau latéral septale
 MAPK: Mitrogen-Activated Protein Kinase
 MeOH : Méthanol
 MIT-1: Mamba Intestina Toxin-1
 mmol : milli-mole(s)
 NCBI : National Center of Biotechnology Information
 NCC : Cellules de la crête neurale
 NC-IUPHAR : Union de Pharmacologie Internationale et le Comité de Classification et de Nomenclature des Récepteurs
 nM : nano-molaire
 NOS : Synthases d'oxyde nitrique
 NTSR : Récepteur de la Neurotensine
 OB : Bulbe Olfactif
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 OR : Récepteurs Olfactifs
 PCOS : Syndrome des ovaires polykystiques
 PDE: Phosphodiesterase
 PECAM : Molécule d'adhérence des cellules endothéliales plaquettaires
 Pi: Phosphate ionique
 PIP₂: Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate
 PK : Prokinéticine
 PKA: Protéine kinase A
 PKC: Protéine kinase C
 PK1 : Prokinéticine 1
 PK2 : Prokinéticine 2
 PKR1 : Récepteur couplé aux protéines G de la prokinéticine 1
 PKR2 : Récepteur couplé aux protéines G de la prokinéticine 2
PKR1 : Gène du récepteur prokinéticine 1
PKR2 : Gène du récepteur prokinéticine 2
 PKs : Prokinéticines
 PLC : Phospholipase C

PLCβ : Isoformes β des phospholipases C
 pM : pico-molaire
 PTH : Récepteurs de l'hormone parathyroïde
 PVN : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
 PVT/PT: Noyaux paraventriculaire et paraténiale du thalamus
 Quant. : Quantitatif
 Raf : Regulator of α-fetoprotein
 RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
 RET : Récepteur de la tyrosine kinase pour le GDNF
 RGS : Régulateur de la signalisation des protéines G
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RSA : Relation structure-activité
 RT: Room Temperature (*Température ambiante*)
 SCN: Noyaux suprachiasmatiques
 SVZ : Zone sous-ventriculaire
 TFA : Acide trifluoroacétique
 TFE : Trifluoroéthanol
 TGF-α : Facteur de croissance de transformation α
 THF : Tétrahydrofurane
 TNFα : Facteur α de nécrose tumorale
 TME : Transition épithélio-mésenchymateuse
 TRVP1: Récepteur transitoire potentiel vanilloïde 1
 TsCl : Chlorure de tosyle
 TSH: Hormone Thyroïde-Stimulante
 Tβ4 : Tymosine β-4
 VDC: Voltage-dependent Ca²⁺
 VEGF: Facteur de croissance vasculaire endothéliale (*Vascular endothelial growth factor*)
 vWF : Facteur de von Willebrand
 WT: Wild Type
 ZO-1 : Zonula occludens-1
 μM : micro-molaire
 °C : Degrés Celsius

INTRODUCTION

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires. Parmi eux, il existe deux récepteurs apparentés : les récepteurs de la prokinéticine 1 et 2 (PKR 1 et PKR 2). Ces deux récepteurs ont pour ligands des hormones de nature peptidique, divisées en deux sous-groupes : les prokinéticines 1 et 2. Ces deux prokinéticines sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques en se liant à leurs récepteurs PKR1 et PKR2. Il a été récemment montré que la prokinéticine 2 pouvait stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches progénitrices cardiaques, via les récepteurs PKR1 et PKR2. Il a également été reporté que l'activation de PKR1 protège les cardiomyocytes et les cellules progénitrices cardiaques de l'apoptose. Afin d'étudier ces effets nous avons synthétisé des agonistes non-peptidiques du récepteur PKR1. Des études de modélisation moléculaires et un criblage à haut débit ont été réalisés par Simone Brogi dans l'équipe du Pr Andrea Tafi à l'Université de Sienne. Les résultats ont identifié dix ligands putatifs. Ces derniers ont été achetés et étudiés pharmacologiquement. Deux chefs de file, **IS 1** et **IS 99** ont présenté les meilleurs résultats. Une étude de relation structure-activité a donc été faite au laboratoire. Pour ce projet de thèse, nous avons donc poursuivi les études de pharmacomodulation d'une première famille de composés et développé une seconde famille d'agonistes potentiels originaux, déterminée par des études de modélisation moléculaire. Une sonde fluorescente a été synthétisée afin d'évaluer la liaison de nouveaux composés. Au cours de ces travaux nous avons découvert une nouvelle réaction multi-composante permettant la synthèse d'un composé dihydropyrrole polyfonctionnel. Nous nous sommes alors intéressés à son mécanisme et à sa limitation chimique dans le but de former de nouveaux hétérocycles fonctionnalisés.

La première partie de ce manuscrit est une partie bibliographique présentant et décrivant les RCPG, dans un premier temps, puis les prokinéticines et leurs récepteurs. Les travaux de recherche sont décrits dans la deuxième partie de ce manuscrit.

1.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

1.1.1. Contexte historique

Paul Ehrlich (1854-1915) s'impliqua dans l'étude des nouvelles techniques de coloration, notamment dans celle utilisant les colorants d'anilines. Celles-ci lui ont permis d'observer qu'il y avait de fortes affinités entre des structures biologiques et certains colorants. En étudiant le bleu de méthylène il a découvert qu'il se fixait sur des tissus morts mais également vivants. Il a ainsi mis en évidence ses propriétés analgésiques et son utilité pour le traitement du paludisme. De ses travaux en ressort pour la première fois l'idée que les médicaments se lient à des récepteurs ou à des sites spécifiques à la surface des cellules¹.

A Cambridge John Langley (1852-1925) inventa le concept de « substance réceptive », développé ensuite par Sir Henry Dale (1875-1968), pharmacologiste anglais et prix Nobel de médecine en 1936.

Dans le domaine de la recherche sur les RCPG, des pionniers tels que Clark, Gaddum, Stephenson et Schild ont développé les principes d'affinité et d'efficacité. Ils ont également mis en place des méthodes quantitatives permettant d'évaluer les propriétés des agonistes, des agonistes partiels et des antagonistes en mesurant leurs réponses fonctionnelles sur des tissus isolés².

Lefkowitz (prix Nobel de chimie 2012) a mis en évidence l'existence des récepteurs couplés aux protéines G par la synthèse de ligands radioactifs. C'est en marquant l'hormone adrénocorticotropique avec de l'iode radioactif qu'il a pu observer sa fixation sur des préparations membranaires surrénales³.

1.1.2. Description des RCPG

1.1.2.1. Caractéristiques

La famille des RCPG est la plus commune des familles de protéines. Elle représente les récepteurs membranaires spécialisés dans la reconnaissance des molécules messagères intercellulaires (hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance et de développement) et de plusieurs messages sensoriels (lumière, molécules olfactives et gustatives). Les RCPG représentent plus de 1% du génome

chez les vertébrés. Plus de 400 d'entre eux codent pour des récepteurs olfactifs ou des récepteurs de phéromones⁴. Ils sont impliqués dans la reconnaissance et la transduction de divers messages (lumière, ions (Ca^{2+}), certaines protéines). Ils contrôlent également l'activité d'enzymes, de canaux ioniques et du transport de vésicules utilisant la catalyse de l'échange GDP-GTP via la protéine G hétérotrimère ($\text{G}_{\alpha,\beta,\gamma}$)⁴.

Les RCPG diffèrent par la longueur, la fonction des parties extracellulaire N-terminale, intracellulaire C-terminale et leurs boucles intracellulaires. Malgré leurs différences, les sous-familles présentent plusieurs similarités structurales. Elles possèdent toutes :

- 7 hélices transmembranaires (TM I à VII)
- 3 boucles intracellulaires (i1, i2 et i3)
- 3 boucles extracellulaires (e1, e2 et e3)

Elles conservent également, pour la plupart, deux cystéines sur e1 et e2 formant un pont disulfure. Ce dernier a un rôle important dans la structure et la stabilisation des 7 hélices transmembranaires (**Figure 1**)⁴.

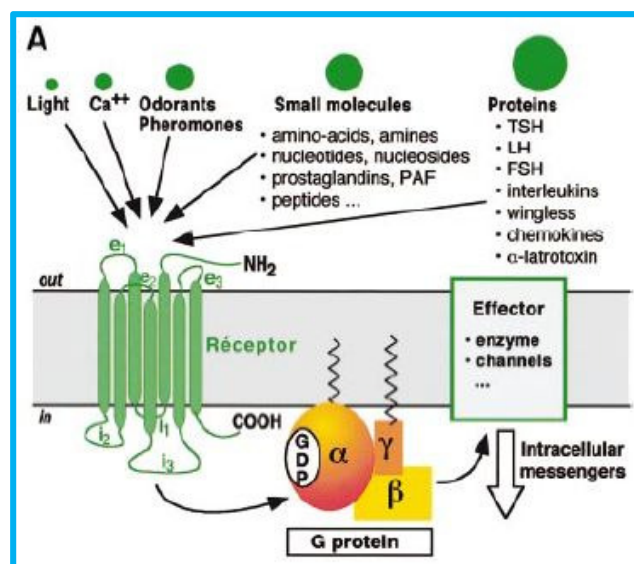


Figure 1: Représentation des RCPG (copiée de la référence 4)⁴.

Les premiers modèles tridimensionnels ont été établis par Hibert en 1991 et Baldwin en 1993^{5,6}.

La première structure cristallographique de RCPG obtenue est celle de la rhodopsine, en 2000. Cette dernière appartient à la plus large sous-famille des RCPG (environ 90% des RCPG) et est composée de la protéine opsine, liée de manière covalente au 11 *cis*-rétinal par la Lys²⁹⁶ (**Figure 2**)⁷.

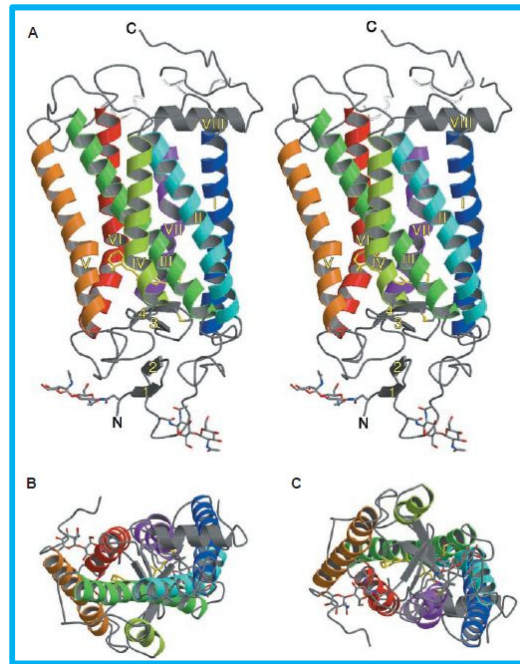


Figure 2: Structure cristallographique de la rhodopsine (copiée de la référence 7)⁷.

Au cours des 12 dernières années, plus de 75 structures de RCPG ont été déterminées par complexation avec des ligands variés. La plupart des structures cristallographiques de ces RCPG ont été obtenues dans des conformations inactives. Elles sont liées soit à des agonistes inverses soit à des antagonistes. Cependant, la rhodopsine bovine a été cristallisée avec un agoniste, permettant la visualisation du récepteur sous sa forme active⁸.

Une étape importante dans l'étude des RCPG a été la détermination du complexe ternaire à l'état actif de β_2 -AR complexée avec la protéine G hétérotrimérique⁹ (**Figure 3**).

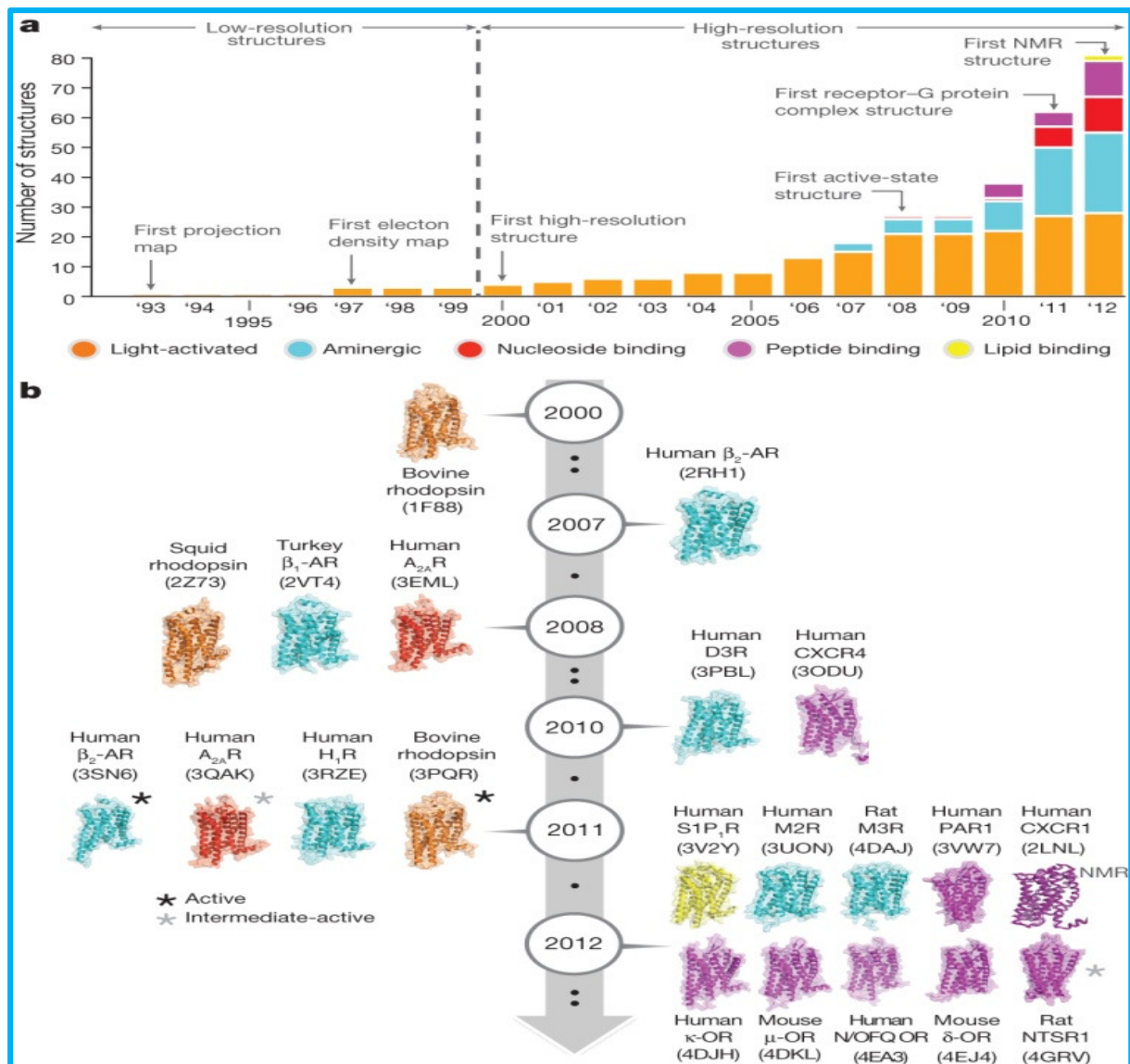


Figure 3: Evolution de la détermination des structures des RCPG (copiée de la référence 8)⁸.

1.1.2.2. Familles des RCPG

De récentes analyses du génome humain ont révélé l'existence de plus de 800 RCPG différents dont 460 seraient des récepteurs olfactifs.

Depuis Attwood et Findlay en 1993 plusieurs classifications des RCPG ont été établies, basées sur l'étude du domaine transmembranaire des RCPG. En 1994, Kolakowski regroupe les RCPG selon la classification A-F. Ce système de classification est utilisé par l'Union de Pharmacologie Internationale et le Comité de Classification et de Nomenclature des Récepteurs (NC-IUPHAR). En 1999, Bockaert et Pin propose une version plus étendue de ce système en séparant les RCPG en 5

familles, en fonction de la structure et du mode de liaison de leurs ligands. En 2003, Fredriksson *et al.* se basent sur des critères phylogénétiques pour classer 802 RCPG humains également en 5 familles¹⁰.

Ces 5 familles sont groupées dans le système de classification GRAFS (Glutamate, Rhodopsine, Adhésine, Frizzled, Sécrétine). Les nombreuses caractéristiques communes montrent que les RCPG du génome humain appartenant aux familles GRAFS partageraient un ancêtre commun. Ces membres des familles GRAFS sont représentés dans un arbre phylogénétique (**Figure 4**)¹¹.

La principale différence entre les classifications A-F de Kolakowki et GRAFS de Fredriksson repose sur la séparation des familles Adhésine et Sécrétine dans la classification GRAFS alors qu'elles sont regroupées dans la Classe B pour la classification A-F¹⁰.

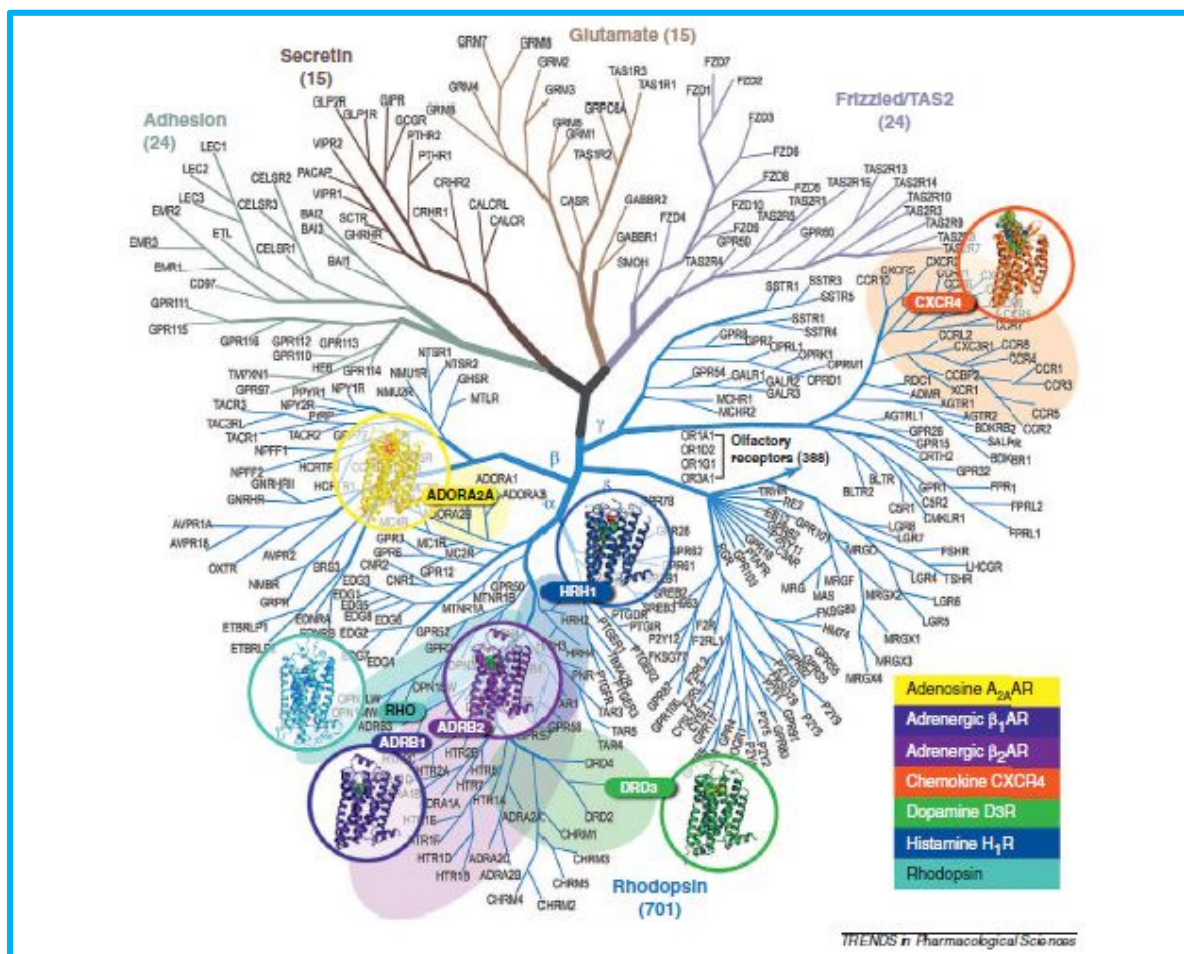


Figure 4 : Arbre phylogénétique des RCPG (copiée de la référence 12)¹².

Nous avons choisi de décrire les différentes familles de RCPG en fonction des classifications A-F et GRAFS.

1.1.2.2.1. Classe A/ La famille des récepteurs Rhodopsine

La famille des récepteurs Rhodopsine regroupe environ 670 RCPG chez l'homme. Elle peut être divisée en quatre sous-groupes : α , β , γ et δ (les récepteurs olfactifs sont classés dans le sous-groupe δ)¹⁰.

Cette famille est caractérisée par un motif NSxxNPxxY sur la TMVII, un motif DRY (Asp-Arg-Tyr) ou D(E)-R-Y(F) à la jonction entre TMIII et la boucle intracellulaire i2¹³. Les principales divergences structurales de cette famille sont situées au niveau de la région transmembranaire¹⁰.

Les récepteurs rhodopsine se distinguent des autres familles par une chaîne N-terminale courte. Malgré les similitudes et les relations phylogénétiques de cette famille, la diversité des ligands se liant aux récepteurs rhodopsine est vaste¹³. Ces récepteurs peuvent interagir avec des ligands variés, comme des peptides, des amines et des purines. De nombreux récepteurs de cette famille, tels que les récepteurs de la prokinéticine, décrits dans la partie 1.2, sont la cible de médicaments utilisés cliniquement¹⁰.

1.1.2.2.2. Classe B/La famille des récepteurs Sécrétine

Les récepteurs Sécrétine forment la plus petite famille (15 récepteurs). Leur site de liaison est extracellulaire et se lie à des hormones peptidiques¹⁰.

Les récepteurs sécrétine ont une similarité de séquence allant de 21% à 67%¹⁰. Les principales différences entre les récepteurs se trouvent sur la partie N-terminale, plutôt longue, constituée généralement de 60 à 80 acides aminés¹³.

Cette partie N-terminale est importante pour la liaison entre les ligands et les récepteurs. Ces derniers se lient à un large nombre de ligands peptidiques agissant souvent de manière paracrine¹³.

Leur importance dans les fonctions homéostatiques centrales leur confère un grand potentiel en tant que cibles pour le développement de médicaments¹⁰.

1.1.2.2.3. *Classe B/La famille des récepteurs Adhésine*

Cette famille a eu plusieurs noms dont notamment EGF-TM7 illustrant la présence d'un facteur de croissance épidermique (EGF) dans la partie N-terminale. Elle a également été nommée récepteur LN-TM7 dont LN signifie partie N-terminale longue. On lui a également attribué le nom de B2 pour leur vague ressemblance avec la famille des récepteurs sécrétine¹⁰.

Les RCPG adhésine présentent plusieurs caractéristiques uniques, suscitant un vif intérêt. De manière générale, leur longue partie N-terminale est constituée majoritairement de résidus Ser et de Thr servant de sites de O- et N-glycosylation¹³.

1.1.2.2.4. *Classe C/La famille des récepteurs Glutamate*

Les principaux membres de la classe C sont leurs huit récepteurs glutamate métabotropiques (GRM), leurs deux récepteurs acide γ -aminobutyrique (GABA), un récepteur de détection du calcium (CASR) et trois récepteurs du goût sucré et umami (TAS1R1-3)¹⁰. Le glutamate est un important neurotransmetteur présent dans les synapses des mammifères mais également dans les jonctions neuromusculaires des insectes.

Le domaine de reconnaissance des ligands de cette famille est situé dans la partie N-terminale des récepteurs¹³.

Cette famille de récepteurs conserve 9 cystéines dans la région extracellulaire formant trois ponts disulfures. Ces ponts disulfures serviraient de « ressort » entre le site de liaison du ligand et le mécanisme de signalisation intracellulaire relié au domaine transmembranaire¹⁰.

1.1.2.2.5. *Les Classes D et E.*

La Classe D : cette famille regroupe des récepteurs olfactifs (OR) et sont représentés par 60 gènes chez l'insecte. Ils sont responsables de la première étape de chémiosensation des neurones olfactifs des antennes¹⁴.

La Classe E : cette famille est caractérisée par quatre récepteurs cAMP (cAR 1-4) découverts chez *Dictyostelium discoideum* (amibe). Ces récepteurs ont, en première action, un rôle de messenger extracellulaire et, en deuxième action, un rôle

intracellulaire en réponse à cAMP extracellulaire. Il existe également trois récepteurs « cAMP receptor-like » (CrI A-C). Il n'a encore été trouvé aucun homologue de ces récepteurs chez les vertébrés¹⁵.

1.1.2.2.6. Classe F/La famille des récepteurs Frizzled et des récepteurs du goût.

Les récepteurs Frizzled, dont le nom fait référence à la forme frisée et torsadée de leur ligand (les glycoprotéines Wnt), n'ont été intégrés aux RCPG que très récemment¹⁰. C'est en montrant que la liaison du ligand Wnt au F2DR du rat induit un couplage aux protéines G qu'il a été mis en évidence que les récepteurs Frizzled appartiennent aux RCPG. Cette mise en évidence a été renforcée par la comparaison de leur structure avec celle des récepteurs Sécérétine. Les récepteurs Frizzled ont une partie extracellulaire constituée de 200 à 320 acides aminés. La principale différence au sein de cette famille est située au niveau de la région reliant la partie extracellulaire à la partie transmembranaire¹⁰. Les ligands Wnt se lient au récepteur au niveau de la région extracellulaire riche en cystéine, dont les 9 cystéines sont conservées¹⁰.

Les récepteurs Frizzled contrôlent le devenir, la prolifération et la polarité des cellules pendant le développement métazoaire par la médiation des signaux à partir des glycoprotéines Wnt sécrétées.

Il est surprenant de constater que les récepteurs Frizzled montrent une relation phylogénétique avec les récepteurs du goût alors que le doute persiste sur le fait qu'ils partagent une évolution commune¹³.

Les récepteurs du goût amer, découverts en 2000, sont des petits RCPG composés de 290 à 340 acides aminés, avec de courtes chaînes N- et C-terminales. Le pont disulfure entre les boucles extracellulaires, commun aux autres familles, n'est pas conservé¹⁰. Ces récepteurs peuvent être classés en 5 sous-groupes. La similarité de séquence entre ces groupes diffère énormément (entre 20% et 90%)¹⁰. Cette grande diversité au sein d'un même groupe peut expliquer le fait qu'un petit nombre de récepteurs peut percevoir un millier de composés amers détectables pour l'homme¹⁰.

1.1.2.3. Les protéines G

La signalisation des RCPG implique le couplage du récepteur activé avec une protéine G hétérotrimérique (protéine liant le GTP). Cet hétérotrimère est constitué de deux unités fonctionnelles : la sous-unité G_α , liant le nucléotide guanine, et le dimère $G_{\beta\gamma}$ (**Figure 5**)¹⁶. Au cours de l'activation, l'hétérotrimère se dissocie en unités fonctionnelles, modulant l'activité d'un grand nombre d'effecteurs en aval comme des enzymes et des canaux ioniques¹⁶.

La première structure du complexe RCPG-protéine G n'a été obtenue que très récemment par l'équipe de Kobilka⁹.

Chez l'homme, il a été dénombré 21 G_α encodées par 16 gènes, 6 G_β sous-unités encodées par 5 gènes et 14 sous-unités G_γ encodées par 12 gènes¹⁶.

Les différents hétérotrimères $G_{\alpha\beta\gamma}$ sont classés en quatre groupes principaux. Chaque groupe a une voie de signalisation bien distincte impliquant des molécules messagères secondaires telles que cAMP, inositol triphosphate (IP_3), diacylglycérol, Ca^{2+} intracellulaire et GTPase RhoA. La résolution et la détermination cristallographique de plusieurs de ces protéines ont montré qu'au moins un représentant de chaque groupe est lié au GTP et/ou au GDP¹⁶.

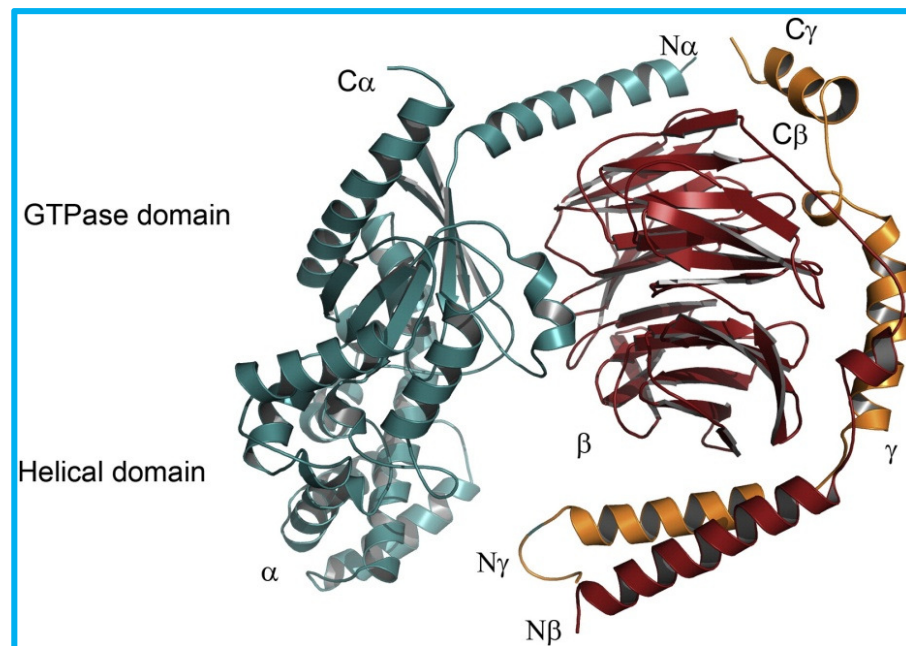


Figure 5: Représentation structurale d'une protéine G (la transducine). G_α , G_β , G_γ sont respectivement représentés en cyan, rouge et orange (copiée de la référence 16)¹⁶.

1.1.2.3.1. Les sous-unités G_α

Chez l'homme, les sous-unités G_α sont donc au nombre de 21 et classées en quatre principales catégories :

- La famille $G_{\alpha s}$ incluant $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha olf}$
- La famille $G_{\alpha i/0}$ incluant $G_{\alpha t}$ (la transducine), $G_{\alpha -gus}$ (la gustducine), $G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha i2}$, $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha o1}$, $G_{\alpha o2}$, $G_{\alpha \zeta}$
- La famille $G_{\alpha q}$ incluant $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 14}$, $G_{\alpha 15}$ et $G_{\alpha 16}$
- La famille $G_{\alpha 12/13}$ incluant $G_{\alpha 12}$ et $G_{\alpha 13}$

1.1.2.3.1.1. La famille $G_{\alpha s}$

La famille $G_{\alpha s}$ regroupe les familles de $G_{\alpha s}$ et de $G_{\alpha olf}$, couplant avec des récepteurs olfactifs.

Les protéines $G_{\alpha s}$ activent l'adénylate cyclase (AC), qui stimule la production de cAMP à partir de l'ATP. Les protéines kinase A (PKA) ou les protéines d'échange (EPAC), qui se sont révélées moduler les fonctions phagocytaires, sont activées par cAMP.

Les RCPG sont impliqués dans le contrôle de la phosphorylation de ERK 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*). Les effecteurs intracellulaires impliqués sont notamment les protéines G hétérotrimériques. Le contrôle de la phosphorylation de ERK 1/2 par $G_{\alpha s}$ implique l'activation de la protéin kinase A (PKA) dépendante de l'activation de cAMP. Elle peut également engager des protéines d'échange directement activées par cAMP (EPAC). Ainsi l'activation de GTP liant la protéine Rap1 peut permettre l'activation de B-Raf et l'inhibition de Raf-1. Ainsi, la phosphorylation de ERK 1/2 contrôlée par $G_{\alpha s}$ dépend de la nature des cellules (**Figure 6**)¹⁷.

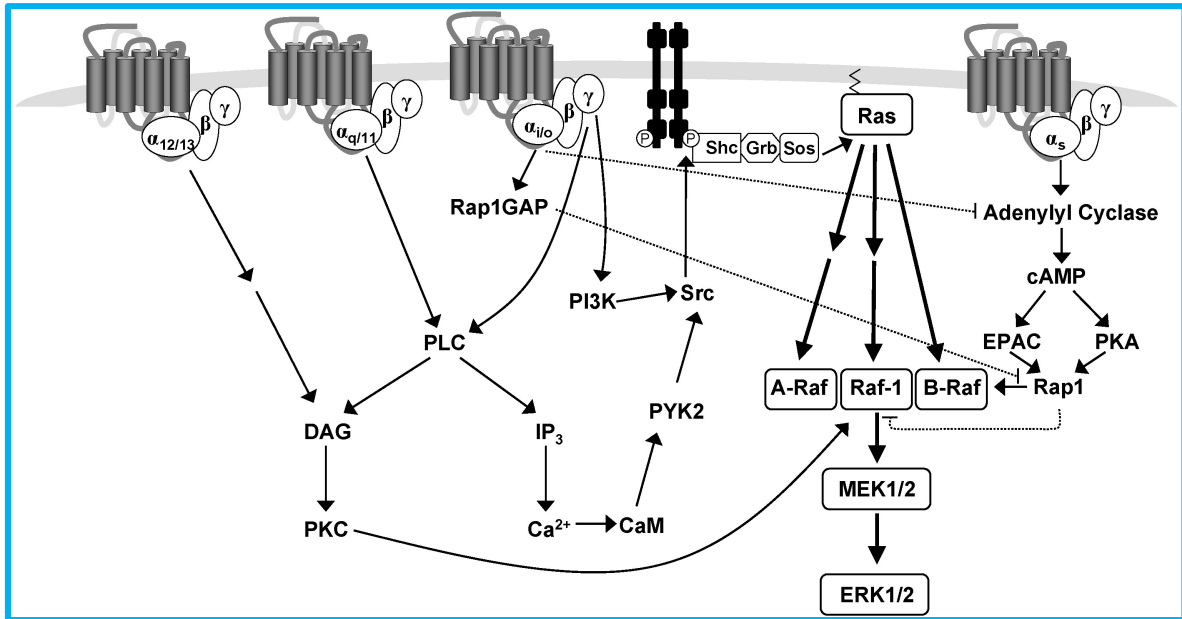


Figure 6: Phosphorylation de ERK 1/2 contrôlée par les RCPG (copiée de la référence 18)¹⁸.

1.1.2.3.1.2. La famille $G_{\alpha i/o}$

Les protéines $G_{\alpha i/o}$ sont impliquées dans la voie de signalisation de nombreuses hormones et de neurotransmetteurs comme l'épinéphrine, la dopamine, l'acétylcholine, la somatostatine et l'angiotensine.

Les protéines $G_{\alpha i}$ sont des inhibiteurs de l'isoforme $G_{\alpha s}$ supprimant l'activité de l'adénylate cyclase, conduisant à une diminution de l'accumulation de cAMP. D'autres effecteurs des protéines $G_{\alpha i}$ sont c-Src, ERK 1/2, la phospholipase C (PLC) et les GTPases monomériques¹⁸.

1.1.2.3.1.3. La famille $G_{\alpha q}$

Cette famille est divisée en sous-groupes : $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha 11}$, protéines omniprésentes, $G_{\alpha 14}$, localisée dans le rein, le foie et les poumons et $G_{\alpha 15}$ et $G_{\alpha 16}$, exprimées uniquement dans les cellules hématopoïétiques.

Classiquement, l'action de $G_{\alpha q}$ est un effecteur principal, en aval, de la liaison et de l'activation des isoformes β des phospholipases C ($PLC\beta$). Pourtant, à ce jour, $G_{\alpha q}$ est connu pour interagir avec plus de 20 protéines. Sa voie de signalisation complexe reste, actuellement, peu déterminée¹⁹.

1.1.2.3.1.4. La famille $G_{\alpha12/13}$

Les protéines $G_{\alpha12/13}$ sont impliquées dans la migration des cellules cancéreuses et dans l'angiogenèse stimulées soit par l'acide lysophosphatidique (LPA) ou activées par des récepteurs tyrosine kinase. La majorité des effets de la signalisation de $G_{\alpha12/13}$ est contrôlée par Rho (homologue de RAS), qui sont des petites GTPases hautement conservées dans de nombreuses espèces. Ce contrôle par Rho contribue à plusieurs processus cellulaires comme la dynamique du cytosquelette, le cycle de progression des cellules, la régulation de la transcription, la survie cellulaire et le trafic vésiculaire. Tous ces processus sont impliqués dans la progression du cancer²⁰.

Chaque famille de sous-unités G_{α} a ses propres fonctionnalités et ses propres effecteurs. Les différentes familles et leurs effecteurs sont résumés dans le **Tableau 1**.

Famille	Groupe	Effecteur
$G_{\alpha s}$	$G_{\alpha s}$	AC (tout type) ↑
$G_{\alpha i/o}$	$G_{\alpha olf}$	AC ↑
	$G_{\alpha i1}$	AC ↓
	$G_{\alpha i2}$	Plusieurs autres effecteurs sont régulés via $G_{\beta\gamma}$
	$G_{\alpha i3}$	Libérée à partir de l'activation de $G_{\alpha i1-3}$
	$G_{\alpha o}$	VDCC ↓ GIRK ↑ via $G_{\beta\gamma}$
$G_{\alpha q}$	$G_{\alpha t}$	cGMP phosphodiesterase ↑
	$G_{\alpha q}$	PLC- $\beta1-4$ ↑
	$G_{\alpha11}$	PLC- $\beta1-4$ ↑
	$G_{\alpha14}$	PLC- $\beta1-4$ ↑
	$G_{\alpha15/16}$	PLC- $\beta1-4$ ↑
$G_{\alpha12/13}$	$G_{\alpha12}$	PDZ-RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
	$G_{\alpha13}$	p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF/LARG, radixin

Tableau 1: Les familles des sous-unités G_{α} et leurs effecteurs (copié de la référence 22)²².

1.1.2.3.2. Les sous-unités $G_{\beta\gamma}$

Les sous-unités G_{β} et G_{γ} forment un dimère fortement associé²¹.

Les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ régulent plusieurs effecteurs à la surface des cellules, comme les isoformes de l'adényl cyclase, les canaux calciques voltage-dépendants, les isoformes de la phospholipase $C\beta$ et les isoformes de PI3K. Plus récemment, de nouvelles protéines ont été identifiées dans d'autres compartiments subcellulaires tels que les mitochondries et l'appareil de Golgi (Raf kinase, PKD). Il a été montré que la transduction de ces protéines dépend de la signalisation du dimère $G_{\beta\gamma}$ (**Figure 7**)²².

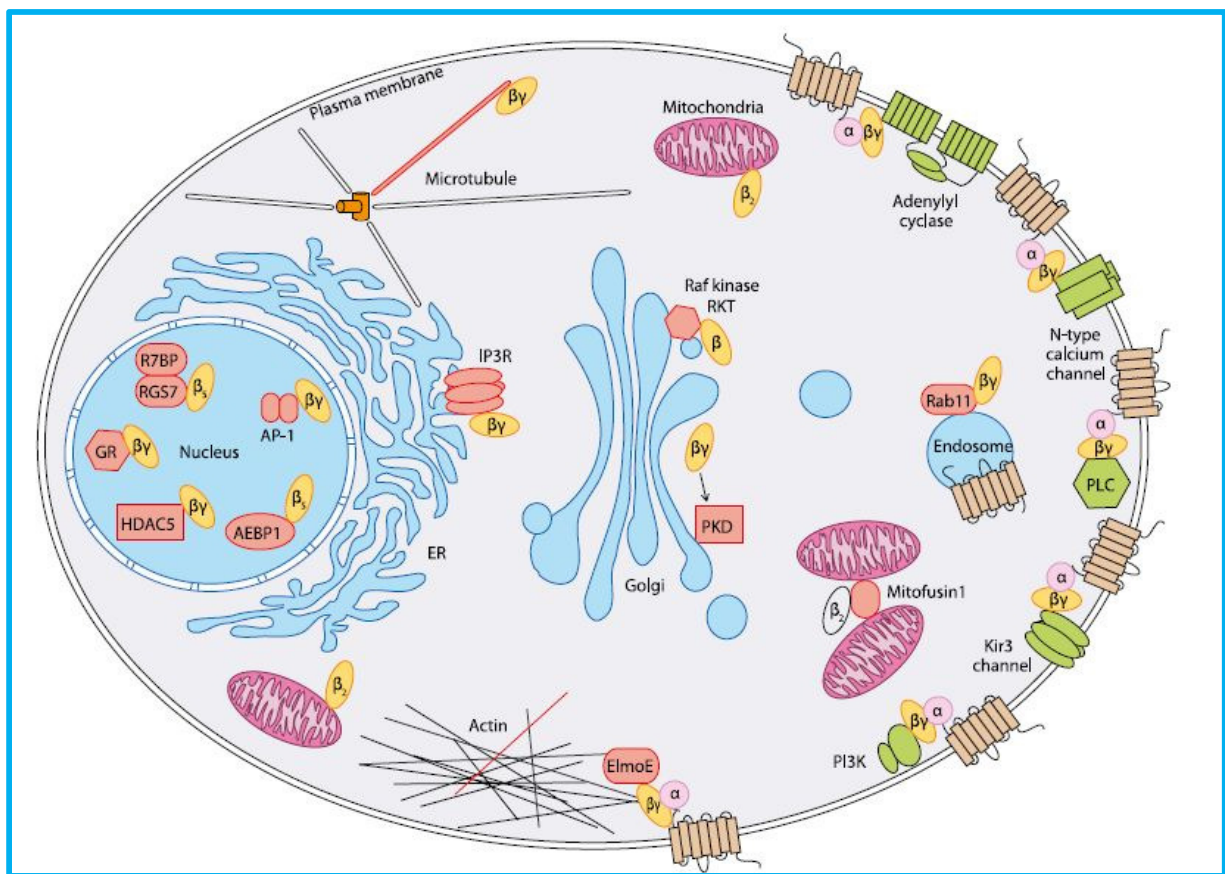


Figure 7: Effecteurs canoniques et non canoniques du dimère $G_{\beta\gamma}$ (copiée de la référence 22)²².

1.1.2.3.3. Interactions entre les RCPG et les protéines $G_{\alpha\beta\gamma}$

Lorsqu'un agoniste se lie au RCPG, cela induit un important réarrangement des hélices intracellulaires III et VI conduisant à l'activation de la sous-unité G_{α} , favorisant séquentiellement la dissociation de GDP et la fixation de GTP.

Cela entraîne la dissociation de l'hétérotrimère $G_{\alpha\beta\gamma}$ en une sous-unité G_α (liée au GTP) et en un dimère $G_{\beta\gamma}$. Les RCPG permettent donc l'activation des protéines G trimériques $G_{\alpha\beta\gamma}$ ¹⁹ (**Figure 8**).

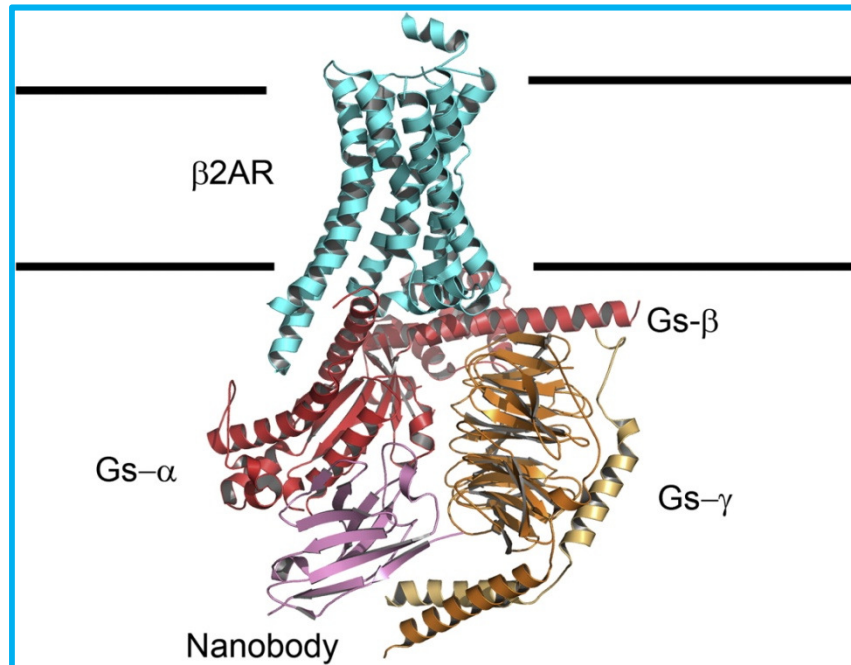


Figure 8 : Model structural entre $\beta 2AR$ et l'hétérotrimère Gs (copiée de la référence 16)¹⁶.

1.1.3. Mécanisme d'activation des RCPG

1.1.3.1. Différents modèles

C'est au milieu du XIXème siècle que le premier concept sur le mode de liaison des RCPG, basé sur la loi d'action de mass, est énoncé. Ce modèle repose sur la réversibilité de la liaison ligand-récepteur qui est fonction de constantes d'association et de dissociation.

La complexité du mode de liaison entre les récepteurs et leurs ligands a entraîné la conception de modèles de plus en plus élaborés au cours des années.

1.1.3.1.1. Liaison simple et activation

Dans ce premier modèle, un agoniste A se lie à la forme inactive R_i du récepteur pour former le complexe AR_i . La formation de ce complexe induit un changement conformationnel pour passer en forme activée AR_a ²³.



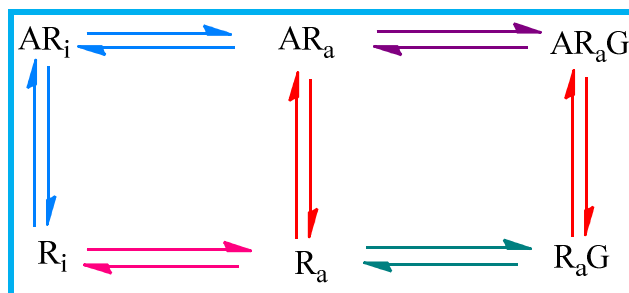
1.1.3.1.2. Modèle simple du complexe ternaire

L'activation du récepteur est suivie par la fixation du complexe AR_a à la protéine G. Il en résulte un complexe ternaire AR_aG activé²³.



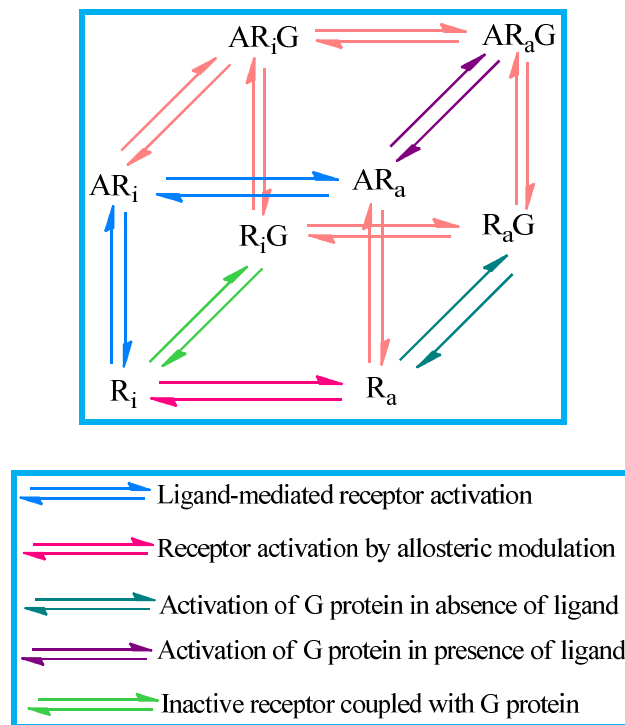
1.1.3.1.3. Modèle étendu du complexe ternaire

Dans ce modèle, les formes active (R_a) et inactive (R_i) du récepteur coexistent selon une constante allostérique. La protéine G se lie à la forme activée (R_a) produisant une réponse physiologique. Le récepteur peut se lier avec la protéine G et l'activer sans présence de ligand. Le ligand A se lie au récepteur (R_a ou R_i) ou au complexe récepteur-protéine G (R_aG)²⁴.



1.1.3.1.4. Modèle cubique du complexe ternaire

Ce modèle reprend les mêmes principes que précédemment en incluant la formation d'un complexe n'induisant pas de signalisation entre la forme inactive du récepteur et la protéine G (R_iG). Ce modèle est plus représentatif de la réalité²³.



1.1.3.1.5. Modèle complexe incluant l'oligomérisation du récepteur

Pour ce modèle la dimérisation possible du récepteur est prise en compte. Cette notion d'oligomérisation fait appel à des notions mathématiques complexes²⁵.

1.1.3.2. Les ligands des RCPG

Les ligands des RCPG sont divisés en trois catégories (**Figure 9**) :

- Les agonistes, qui augmentent la quantité de forme active du récepteur entraînant une réponse biologique. Les agonistes sont classés en deux sous catégories : les agonistes entiers et les agonistes partiels. Les premiers peuvent activer de manière maximale le récepteur alors que les deuxièmes ne peuvent activer que modérément le récepteur

- Les agonistes inverses, diminuant la quantité de forme active du récepteur et de ce fait réduisent l'activité basale du récepteur
- Les antagonistes qui, quant à eux, inhibent l'action du récepteur.

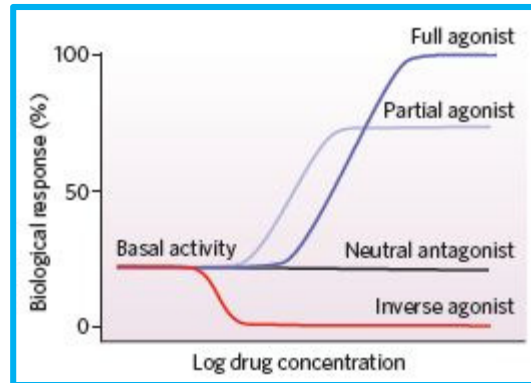


Figure 9: Différentes réponses fonctionnelles pouvant être induites par des ligands de RCPG (copiée de la référence 27)²⁷.

Dans des systèmes avec une activité faible voire inexistante du récepteur, un agoniste inverse va avoir un effet minime sur la réactivité basale tout en conservant la possibilité d'inhiber l'action des agonistes.

Cependant, dans un système avec une forte activité consécutive du récepteur, la même entité sera alors définie comme antagoniste alors que c'est en réalité un agoniste inverse. La plupart des antagonistes sont en fait des agonistes inverses²³. De plus, si un ligand inhibe l'action de la molécule sans avoir de réels effets sur la distribution des formes active/inactive du récepteur alors il sera plutôt défini comme un antagoniste neutre.

Les ligands des RCPG peuvent également être classés en fonction de leur mode de liaison avec le récepteur. La majorité des ligands des RCPG se lient au site reconnu par les agonistes endogènes des RCPG. Il est nommé site orthostérique.

Plusieurs RCPG ont des sites allostériques distincts. Cela conduit à l'identification de modulateurs allostériques. Les modulateurs allostériques peuvent indirectement réguler l'activité des ligands orthostériques et/ou directement servir de modulateurs pour des effets agonistes et agonistes inverses²³ (**Figure 10**).

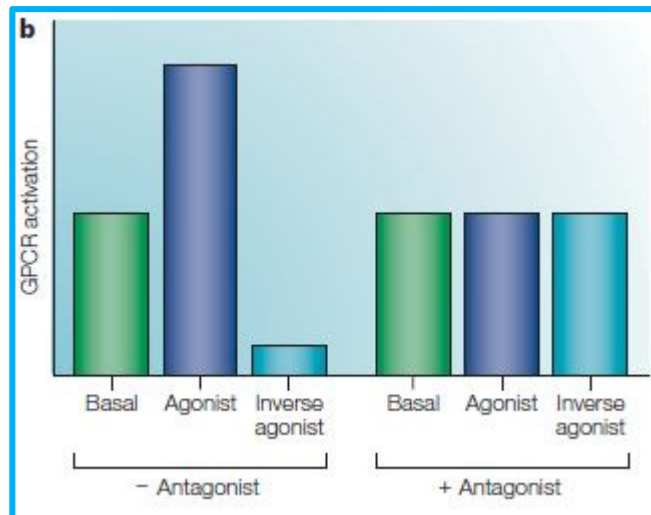


Figure 10: Effets des ligands sur l'activité des RCPG (copiée de la référence 24)²⁴.

1.1.3.3. Activation des RCPG

1.1.3.3.1. Mécanisme d'activation

La signalisation de la protéine G commence lorsque le RCPG devient actif en se liant avec un agoniste²⁶. Cela active ainsi la catalyse d'échange de GTP par GDP au niveau de la sous-unité G_α . Il en résulte un changement de conformation au niveau du RCPG conduisant à la dissociation de la sous-unité G_α et du dimère $G_{\beta\gamma}$, chacun activant de multiples protéines G, initiant des signalisations intracellulaires uniques. Après transduction du signal, le complexe G_α -GTPase hydrolyse la liaison G_α -GTP en GDP et en P_i . Cette hydrolyse entraîne la désactivation de la protéine G par réassociation de la sous-unité G_α avec le dimère $G_{\beta\gamma}$. Une molécule de GDP peut ainsi à nouveau se lier pour activer un nouveau cycle de signalisation²⁶ (**Figure 11**).

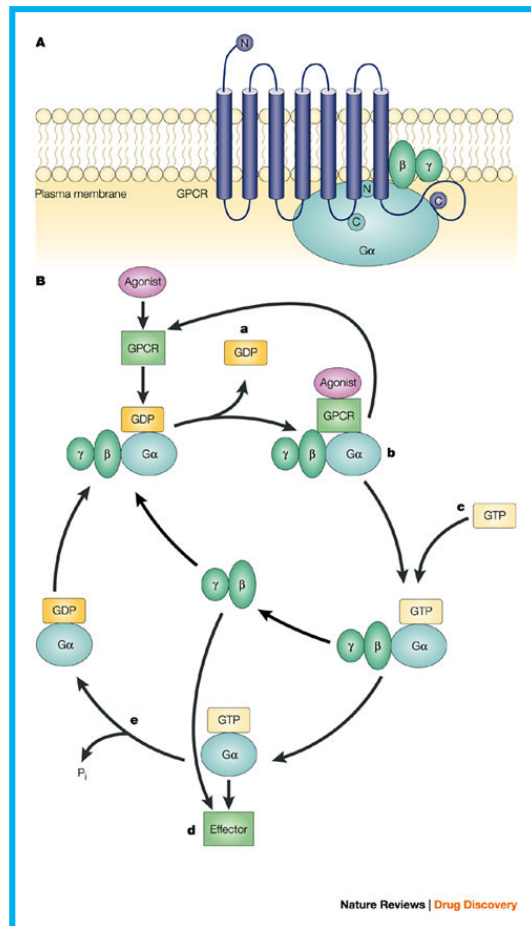


Figure 11: Activation des RCPG (copiée de la référence 24)²⁴.

1.1.3.3.2. Transduction du signal

1.1.3.3.2.1. Les protéines G_α

La protéine G_i/G_o , couplée au RCPG, inhibe l'adénylate cyclase (AC) ou les canaux calcium et active les canaux potassium²³ (**Figure 12. a**).

La phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$) est activée par la protéine G_q , couplée au RCPG²³ (**Figure 12. b**). Il en résulte l'hydrolyse intramembranaire de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en inositol-1,4,5-triphosphate ($InsP_3$) et en diacylglycérole (DAG). DAG augmente l'activité des protéines kinases C (PKC) et $InsP_3$ augmente la concentration intracellulaire en Ca^{2+} .

Le couplage de la protéine G_s au RCPG, quant à lui, active l'adénylate cyclase²³ (**Figure 12. c**).

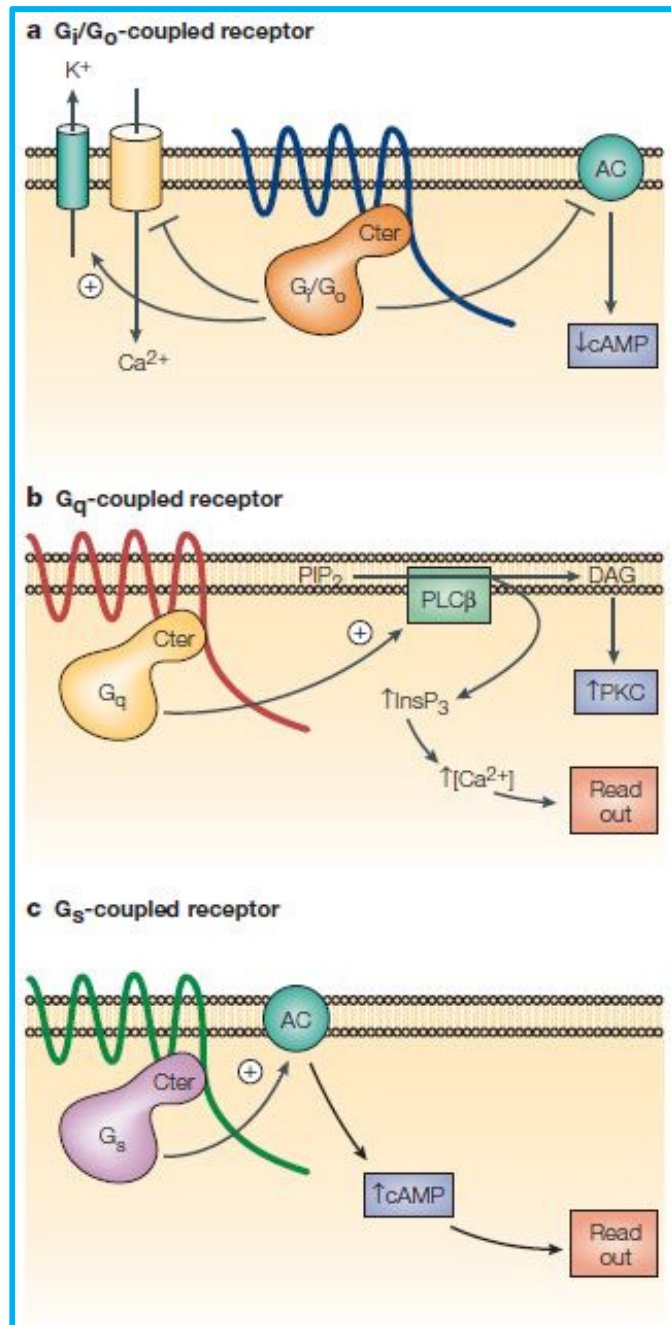


Figure 12: Les protéines G_α (copiée de la référence 23).²³

1.1.3.3.2.2. Les β-arrestines

L'identification, il y a une dizaine d'année, des β-arrestines en tant que protéines échafaudages pour les MAP kinase, représente un changement dans la compréhension de la signalisation des RCPG. Plus récemment, les β-arrestines ont démontré une signalisation indépendante des protéines G hétérotrimériques, suggérant une signalisation de transduction directe des RCPG (**Figure 13**).

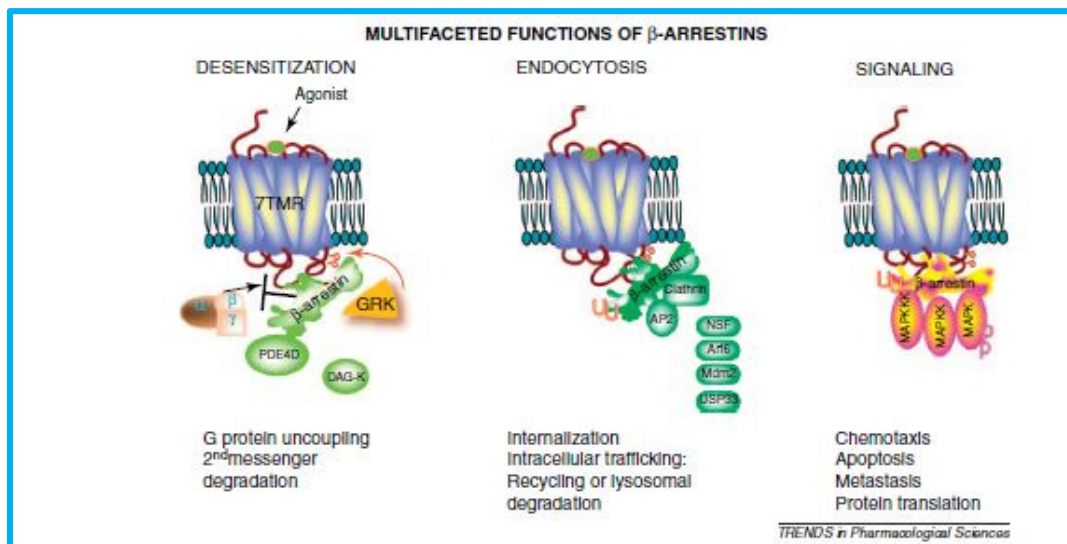


Figure 13: Fonctions multiples des β -arrestines (copiée de la référence 30)³⁰.

Avant ces découvertes, les seules fonctions attribuées aux β -arrestines étaient : l'arrêt du signal, le découplage de la signalisation de la protéine G hétérotrimérique initiale et la facilitation du transfert des récepteurs vers la surface²⁷. Elles interagissent avec plusieurs protéines entraînant des réponses fonctionnelles (**Tableau 2**).

Protéine se liant aux β -arrestines	Conséquences fonctionnelles
	<i>Protéines « de trafic »</i>
Clathrine	Endocytose
AP2	Endocytose
NSF	Endocytose, Recyclage
	<i>Petites G/GEF</i>
ARF6	Endocytose
ARNO	Endocytose
Ral-GDS	Modifications du cytosquelette contrôlée par Ral
RhoA	Formation de fibres de stress dépendante de l'angiotensine II
	<i>Protéines de signalisation</i>
Composants de la cascade MAPK	
ASK1	Activation de JNK3 et p38
c-Raf-1	Activation de ERK
JNK3	Stabilisation de pJNK dans les endosomes
ERK2	Stabilisation de pERK dans les endosomes
Tyrosines kinases non-receptrices	
c-Src	Endocytose, activation de ERK
Yes	Activation de $G_{\alpha q}$ et transport de GLUT4
Hck	Exocytose des granules dans les neutrophiles
Fgr	Exocytose des granules dans les neutrophiles
Autres	
Mdm2	Ubiquitination, endocytose
I κ B α	Stabilisation de I κ B α sur β AR2 et stimulation de TNFR
Famille des PDE4D	Dégradation de cAMP
Dishevelled	Augmente la transcription dans TCF/LEF et endocytose de Frizzled4
PP2A	Déphosphorylation de la Ser ⁴¹²

Tableau 2: Interactions entre les β -arrestines et des protéines et leurs conséquences fonctionnelles (copié de la référence 28)²⁸.

1.1.3.3.3. Arrêt du signal

Les récepteurs kinases couplés aux protéines G (GRK) et les β -arrestines sont impliqués dans cette étape. Schématiquement, les GRK et les β -arrestines orchestrent l'activité des RCPG à trois niveaux différents : la désensibilisation, l'internalisation et la signalisation²⁹ (**Figure 14**).

1.1.3.3.3.1. La désensibilisation du récepteur

La désensibilisation permet l'arrêt de la transmission du signal. La première étape est la phosphorylation du récepteur par les GRK. Dans une seconde étape, une β -arrestine vient se fixer au complexe afin d'empêcher le couplage du récepteur à une nouvelle protéine G²⁹.

1.1.3.3.3.2. L'internalisation du récepteur

L'internalisation, ou endocytose, des récepteurs ne semble pas nécessaire pour la « désensibilisation homologue » mais a cependant un rôle fondamental dans le fonctionnement des RCPG. L'internalisation peut conduire à

- Une déphosphorylation, la resensibilisation et le recyclage vers la surface de la cellule
- Le ciblage et la dégradation de lysosomes
- Ou l'activation de voies de signalisation intracellulaires additionnelles

Le contrôle par les GRK de la phosphorylation et de la liaison ultérieure des β -arrestines est essentiel pour l'internalisation dépendante des clathrines. Alors même que la voie utilisée pour l'endocytose, ainsi que le taux d'internalisation, sont dépendants du récepteur et du type de cellule.

L'internalisation, par les clathrines, dépendante des β -arrestines semble être utilisée par la majorité des RCPG. Au niveau du mécanisme, les β -arrestines servent d'adaptateurs de liaison pour les récepteurs des éléments de la machine endocytose²⁹.

1.1.3.3.3. Régulation et resensibilisation

La régulation négative ou « down regulation » se caractérise par la diminution du nombre total de récepteurs présents à la surface de la cellule. Cette diminution est un mécanisme de protection de la cellule lorsque celle-ci a été stimulée par un agoniste endogène, ou de manière prolongée ou répétée par certains médicaments dans le cas de traitement à long terme. Cette régulation est le processus le moins connu dans le contrôle des réactivités des RCPG. Le contrôle de la densité de récepteurs à la surface des cellules a lieu au moins partiellement au niveau transcriptionnel. L'élimination des complexes récepteurs-agonistes de la surface de la cellule et leur tri, soit pour la dégradation soit pour le recyclage vers la membrane, est important pour la régulation négative des récepteurs³⁰.

La resensibilisation des RCPG requiert leur déphosphorylation et la dissociation de leur ligand³⁰.

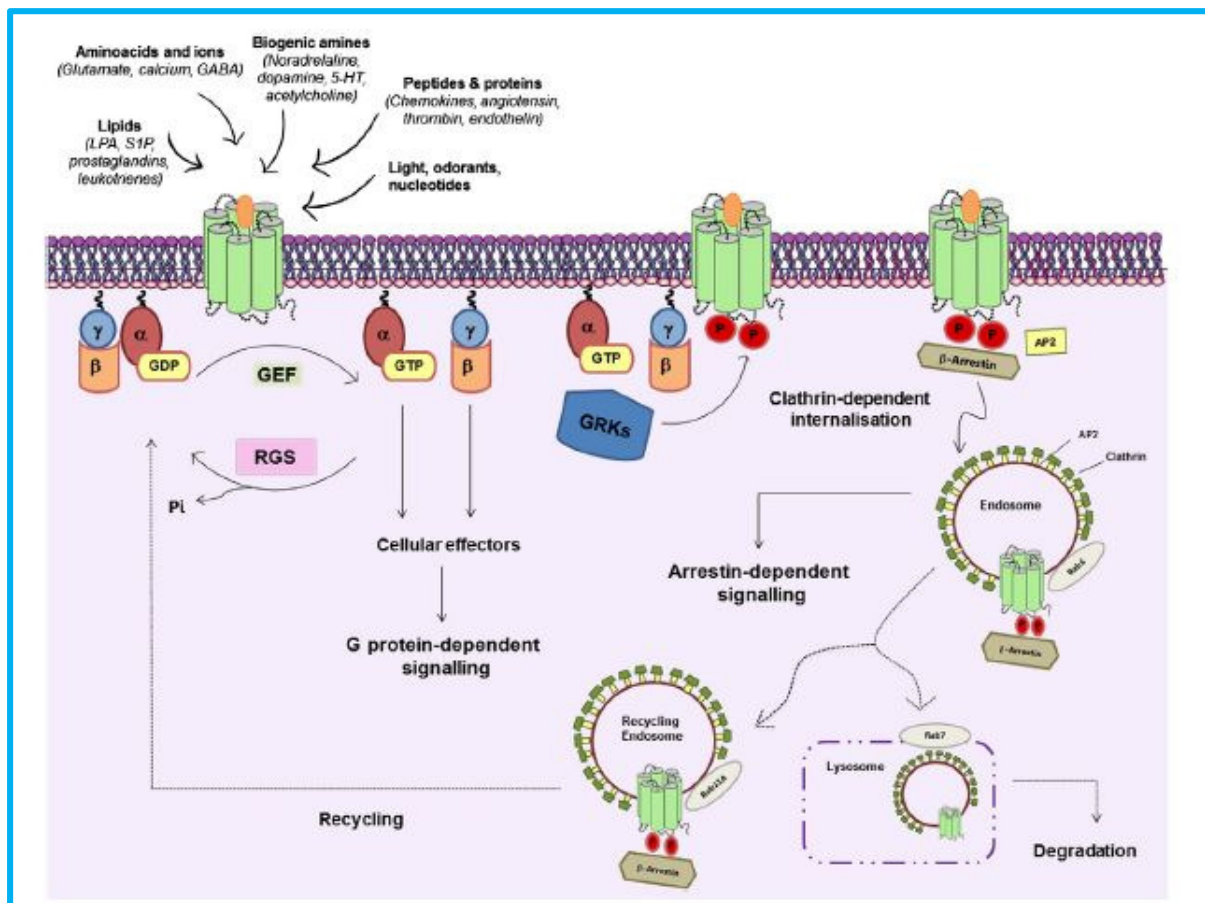


Figure 14: Cycle d'activation et de désactivation des RCPG (copiée de la référence 20)²⁰.

1.1.4. Voie de signalisation indépendante des protéines G : les β -arrestines

Les β -arrestines se présentent sous deux isoformes et ont été caractérisées en premier lieu comme un régulateur négatif des RCPG. Elles sont maintenant également connues pour promouvoir une signalisation positive. Les β -arrestines migrent du cytosol pour se lier au récepteur activé dans la membrane cellulaire et adoptent des états conformationnels différents par liaison avec ces récepteurs. La signalisation dépendante des β -arrestines, comme la signalisation des protéines G, est largement fonction du récepteur et du ligand. Cet ensemble de mécanismes permet une riche complexité des réponses pharmacologiques. Le nombre de voies de signalisation contrôlée par les β -arrestines est grandissant et inclut les MAP kinases et les phosphatases³¹.

Ces exemples montrent que la voie de signalisation des RCPG ne s'effectue pas qu'à travers un seul mode de signalisation mais à travers un vaste réseau. De ce fait, l'enrichissement des connaissances de la pharmacologie moléculaire a conduit à de nombreuses conclusions frappantes et inattendues qui ont posé un défi aux concepts pharmacologiques classiques³¹.

Traditionnellement, un même complexe agoniste-récepteur a été pensé pour activer, avec la même efficacité intrinsèque, toutes les voies de signalisations en aval. Ce paradigme classique est suffisant pour tenir compte des variations de puissance de l'agoniste et le maximum de réponse, dépendant de la mesure de l'amplification du signal et de la quantité de récepteur³².

Cependant plusieurs études contestent ce point de vue classique, suggérant que certains ligands peuvent activer les RCPG par des voies de signalisation d'efficacité intrinsèques différentes. Au niveau de la signalisation cellulaire, il est envisagé que des ligands ont la capacité de biaiser la réponse fonctionnelle et de favoriser la sélection de certaines voies de signalisation³². Le récepteur peut ainsi activer seulement un sous-ensemble d'effecteurs spécifiques et moduler les réponses cellulaires et les réponses physiologiques associées³².

Ce concept, nommé « trafic dirigé par le ligand », « sélectivité fonctionnelle » ou « agonisme biaisé », indique que les récepteurs sont capables de générer des

réponses plus complexes que les concepts agonistes ou antagonistes pharmacologiques classiques ne pouvaient le prédire³² (**Figure 15**).

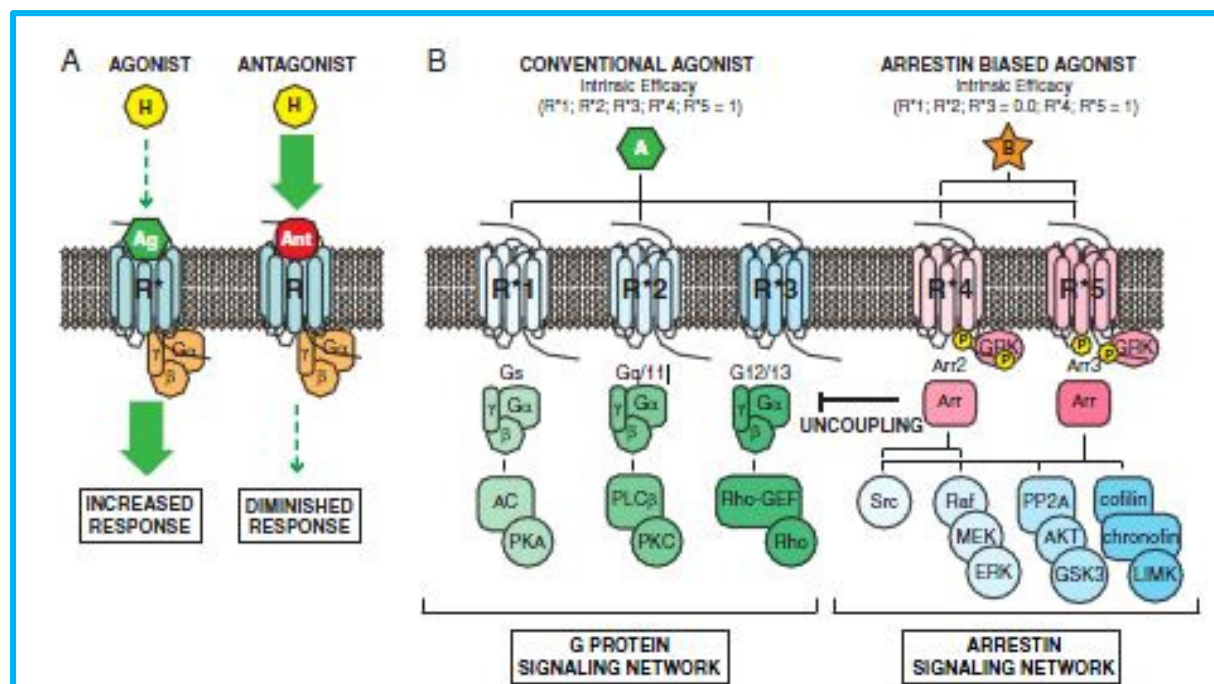


Figure 15: Effets des ligands sur les RCPG (copié de la référence 34)³⁴.

1.1.4.1. Exemples de ligands biaisés

Pour cette partie, nous avons choisi de décrire uniquement les agonistes biaisés agissant sur les β -arrestines, présentant un fort potentiel pour apporter de nouvelles opportunités pour le développement de nouvelles thérapies.

Les différents ligands biaisés agissant sur des cibles thérapeutiques sont représentés dans le **Tableau 3**. Certaines de leurs structures sont représentées **Figure 16**.

Tableau 3: Exemples choisis de RCPG et de leurs agonistes biaisés (copié de la référence 33)³³.

Récepteur	Ligand(s)
B _{1/2} -Adrénérrique	Carvedilol, ICI118551
Angiotensine AT ₁	Sar ¹ , Ile ⁴ , Ile ⁸ -AngII, TRV120027
α ₂ -adrénérrique	Desipramine
Hormone parathyroïde PTH ₁	[D-Trp12,Tyr34]-bPTH (7-34)
Dopamine D ₁	A-77636
Chémokine CCR5	AOP-RANTES
Cannabinoïde CB ₁	ORG27969
Acide nicotinique GPR109A	MK-0354
μ-opioïde	TRV 130
κ-opioïde	6'-Guanidinonaltrindole
Dopamine D ₂	Aripiprazole
Sérotonine 5-HT _{2A}	2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine
Glucagon-like peptide GLP-1	Oxyntomodulin

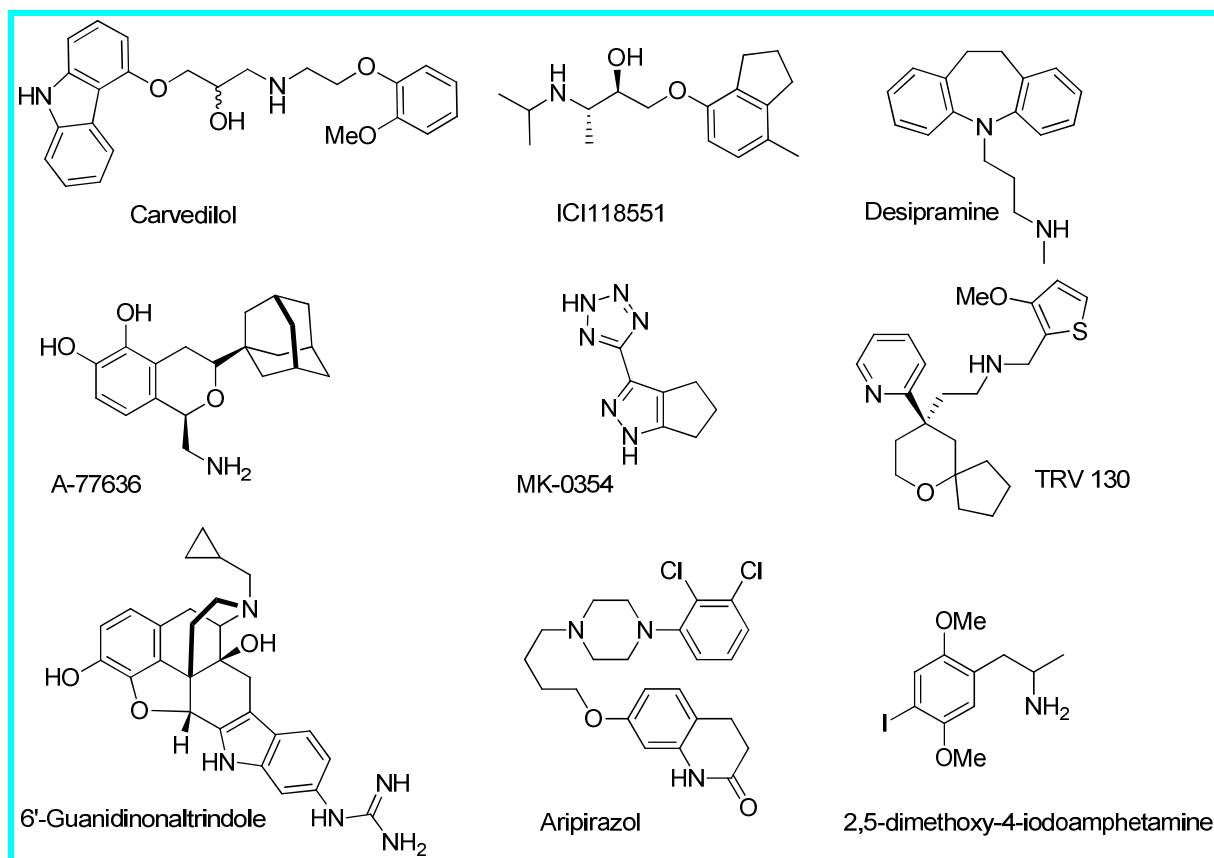


Figure 16: Structure des différents ligands biaisés.

1.1.4.2. Les récepteurs μ -opioïdes

L'influence des β -arrestines sur l'analgésie opioïde et la tolérance a été le sujet de plusieurs études. Il a été observé une augmentation et une prolongation de l'analgésie induite par la morphine chez des souris β -arrestine 2 KO (les effets ne sont pas observés chez les souris β -arrestine 1 KO), ainsi qu'une augmentation de réponses hypothermiques en comparaison aux souris sauvages. Fait intéressant, en addition avec la morphine, certains effecteurs tels que l'étorphine, le fentanyl et la méthadone n'augmentent pas l'efficacité analgésique chez les souris β -arrestine 2 KO, contrairement à l'héroïne. La synthèse de ces études montre que l'efficacité analgésique des agonistes du récepteur μ -opioïde peut être régulée de manière différentielle par les β -arrestines 2 *in vivo*. De plus, les souris β -arrestine 2 KO montrent une résistance aux effets de tolérance chronique induite par la morphine. Ces études montrent donc que les β -arrestines 2 sont impliquées dans la régulation de la désensibilisation des récepteurs μ -opioïde stimulés par la morphine ainsi que

dans la tolérance *in vivo*. Cela suggère fortement qu'un ligand biaisé produit une analgésie renforcée et prolongée induite par la morphine avec une tolérance réduite³⁴.

1.1.4.3. Les récepteurs Angiotensine II type 1A (AT1R)

Les récepteurs Angiotensine II type 1A stimulés par la signalisation des β -arrestines ont été le sujet de plusieurs études cardiovasculaires. Dans le cœur et dans les cardiomyocytes, la signalisation des récepteurs Angiotensine II type 1A, dépendante des β -arrestines et indépendante des protéines G, favorise la croissance et l'hypertrophie ainsi que la prolifération des myocytes et augmente leur contractibilité. De plus, les ligands des β -arrestines, récemment identifiés, Sar et D-Ala angiotensine II réduisent la pression artérielle, augmentent les performances cardiaques et préservent le volume systolique chez le rat anesthésié.

A l'inverse, les antagonistes non-biaisés réduisent les performances cardiaques. Dans les cellules de muscles lisses vasculaires, la signalisation des β -arrestines augmente la synthèse des protéines et est anti-apoptotique³⁴. Le premier ligand biaisé, et le plus largement utilisé, est Sar¹, Ile⁴, Ile⁸-AngII (SII). Il a été montré que ce peptide représente une efficacité positive des β -arrestines en absence de signalisation de protéine G favorisant la phosphorylation d'AT1R, l'internalisation et l'activation d'ERK. Les β -arrestines contrôlent la voie de signalisation d'AT1R, qui réduit l'apoptose, stimule la chimiotaxie, favorise la synthèse de protéine cellulaire, la croissance et la prolifération ainsi que la contractilité cardiaque. Un nouveau ligand biaisé a été découvert et développé : le TRV120027. Ce nouveau ligand bloque l'élévation de la pression sanguine induite par AngII et active simultanément la contractilité des myocytes dépendante des β -arrestines³¹ (**Figure 17**).

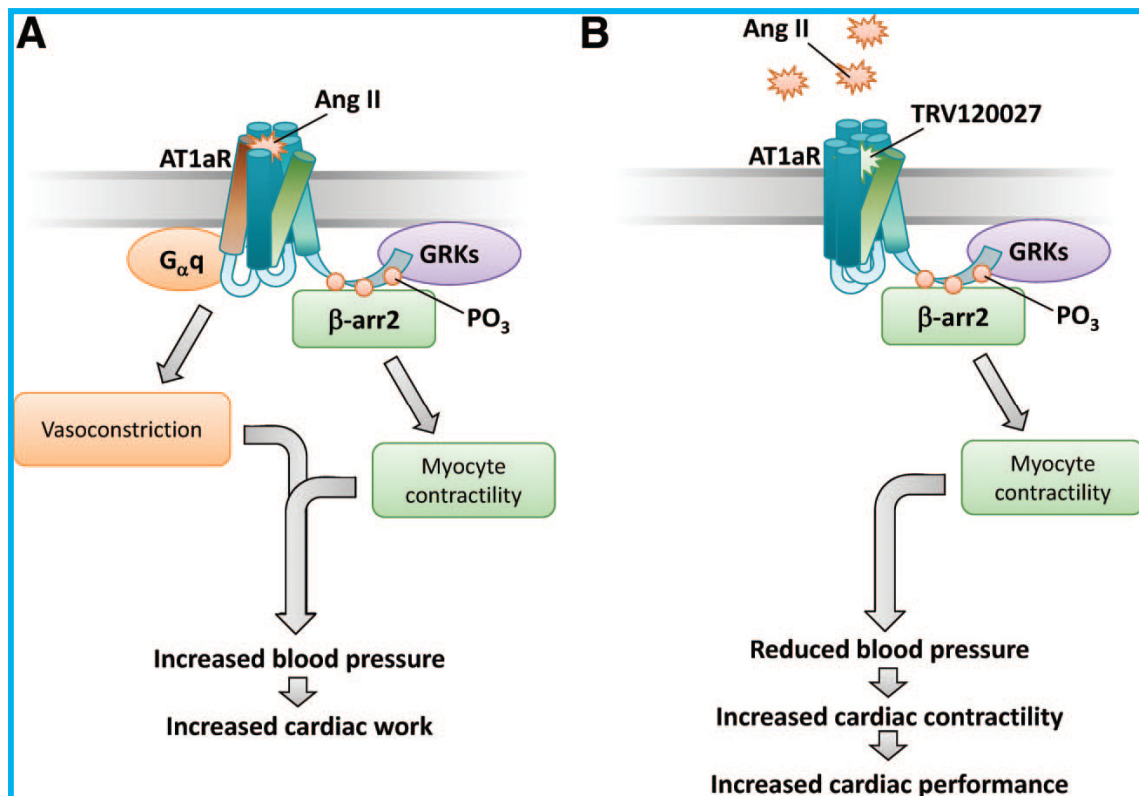


Figure 17: Effet de TRV12007 sur les récepteurs AT1R (copiée de la référence 31)³¹.

1.1.4.4. Les récepteurs β 1-adrénérrique

Des études récentes ont montré que les récepteurs β -adrénérriques 1 peuvent activer des signalisations dépendantes des β -arrestines 1 et 2 dans le cœur. Cela se traduit par la trans-activation cardio-protectrice des récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGFR). Un ligand biaisé des β -arrestines agit comme un antagoniste classique de la signalisation cardio-toxique des protéines G, tout en engageant la signalisation cardio-protectrice des β -arrestines. Cette voie pourrait être thérapeutiquement avantageuse.

De plus, les ligands biaisés des β -arrestines des récepteurs β -adrénérriques 1 et 2 ont récemment été identifiés, notamment le carvediol (un β -bloquant). Il présente une affinité pour les deux sous-types de ces récepteurs. Il reste à déterminer si la signalisation contrôlée par les β -arrestines joue un rôle dans la cardio-protection associée avec de tels composés³⁴ (**Figure 18**).

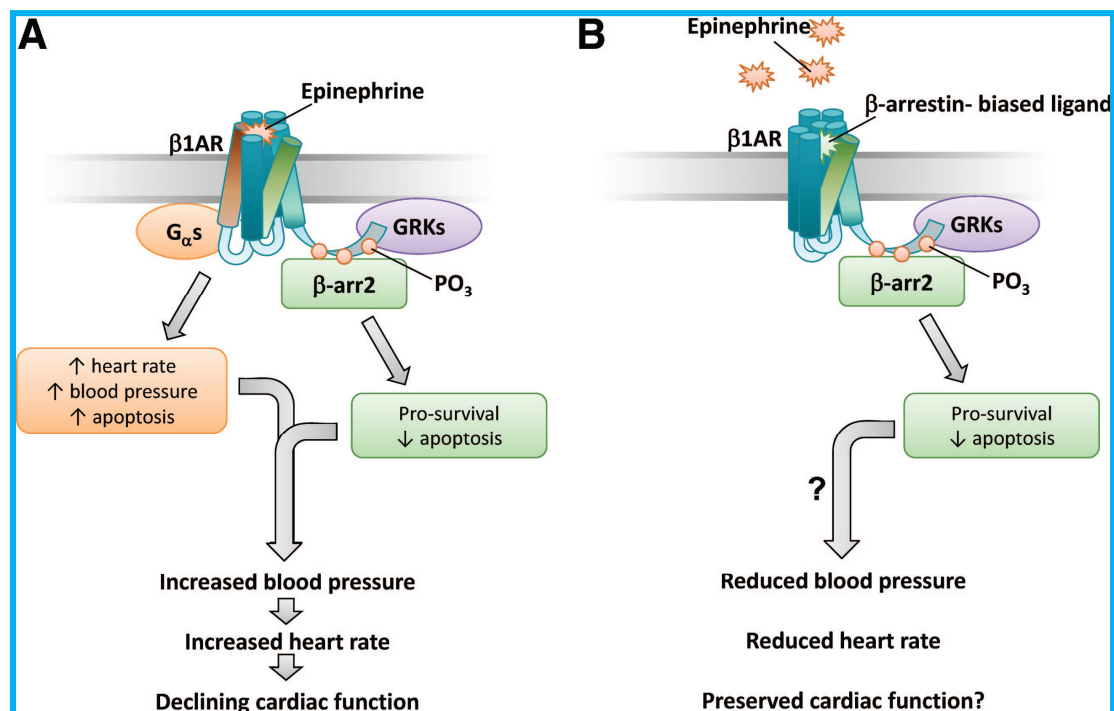


Figure 18: Actions supposées des ligands biaisés des β-arrestines sur le récepteur β-arrestine 1 (β1AR) (copiée de la référence 31)³¹.

1.1.4.5. Le récepteur GPR109A

Un rôle unique pour la signalisation contrôlée par les β-arrestines 1 a récemment été identifié, impliquant le récepteur niacine GPR109A. La niacine, ligand de ce récepteur, est l'un des traitements les plus efficaces pour la croissance du cholestérol HDL et la décroissance des triglycérides dans le traitement de la dyspléémie. Cependant, l'utilisation thérapeutique de niacine est limitée par un effet secondaire peu agréable : rougeissement cutané. Des études récentes ont montré que les rougeurs induites par la niacine sont considérablement réduites chez les souris β-arrestines 1 KO, alors que les effets lipolytiques bénéfiques restent intacts.

Cela soutient l'hypothèse qu'un ligand biaisé des protéines G maintiendrait des effets bénéfiques sur les lipides plasmatiques. Fait intéressant, certains agonistes de GPR109A ont été identifiés comme augmentant les actions anti-lipolytiques avec une réduction significative des rougeurs cutanées.

Certains de ces composés ont également montré une internalisation réduite des récepteurs et de l'activation de ERK, qui pourrait résulter du non-engagement des β-arrestines³⁴ (Figure 19).

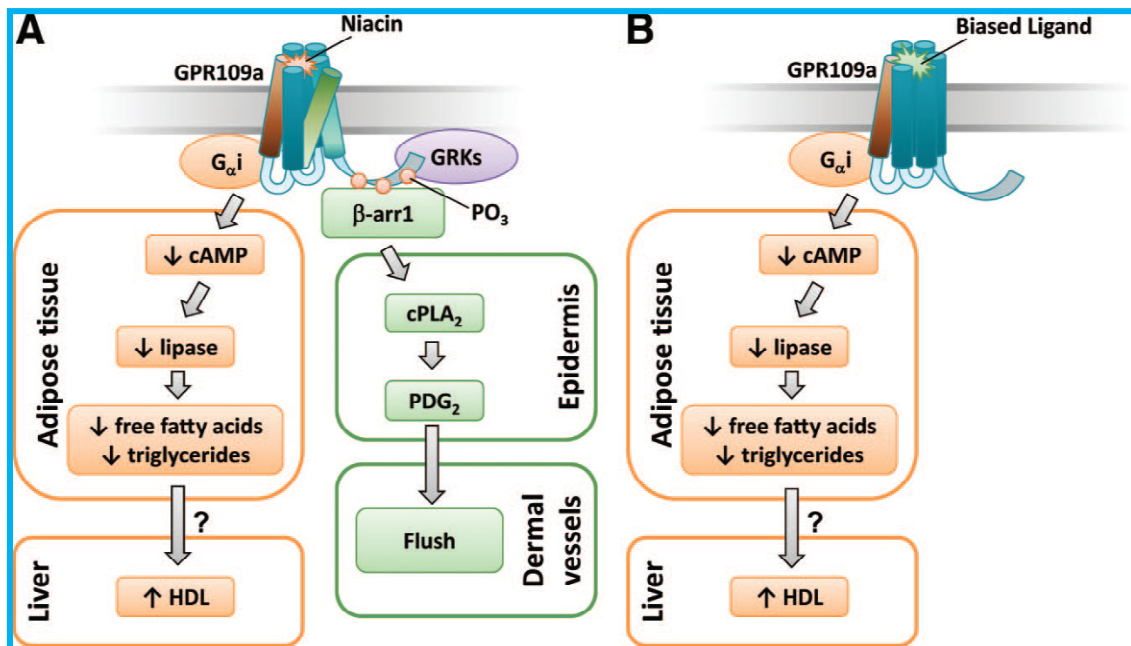


Figure 19: Actions supposées d'un ligand biaisé des protéines G sur GPR109a (copiée de la référence 31)³¹.

1.1.4.6. Les récepteurs sérotonine 5-HT $_{2A}$

Le récepteur sérotonine 5-HT $_{2A}$ a un agoniste biaisé : le 2,5-diméthoxy-4-iodoamphétamine (DOI). Il active la protéine G α_q mais ne permet pas l'internalisation du récepteur, dépendante des β -arrestines. En effet, la phosphorylation des ERK par la stimulation de DOI est complètement inhibée sous l'action de la phospholipase C. DOI est donc un agoniste biaisé envers G α_q par rapport au recrutement des β -arrestines pour le récepteur 5-HT $_{2A}$. Les effets physiologiques de la stimulation de DOI sont encore inconnus actuellement³⁵.

1.1.5. Les RCPG et le système cardiovasculaire

De nombreuses hormones et neurotransmetteurs utilisent les RCPG pour exercer leurs effets cardiovasculaires. Relativement peu d'informations sont disponibles concernant le rôle des RCPG dans les activités fonctionnelles des cellules souches/progénitrices cardiaques, dans des conditions normales ainsi que dans des conditions de maladies. Le rôle cardiaque des RCPG, via la signalisation de la protéine G α_q , est de favoriser l'hypertrophie cardiaque ou de protéger les cardiomyocytes contre l'agression hypoxique. La signalisation de la protéine G α_{12} peut interagir avec le domaine cytoplasmique des cadhérines, conduisant à la libération du transporteur β -caténine. La signalisation de la protéine G α_{13} est impliquée dans la

formation des vaisseaux. La signalisation de la protéine G_{α_s} régule le taux et la contractilité cardiaque en réponse à la stimulation des catécholamines, mais une signalisation excessive de la protéine G_{α_s} dans le cœur induit éventuellement une hypertrophie du myocarde, une fibrose et une nécrose. Compte tenu des rôles importants des RCPG dans la régulation cardiaque, une question clé serait: combien de RCPG différents existent dans le cœur et quelle est leur implication physiologique ? Comme 40% de ces RCPG représentent des cibles de médicaments viables et comme beaucoup de RCPG sont impliqués dans la régulation du système cardiovasculaire, trouver de nouveaux RCPG dans les cellules souches/progénitrices cardiaques est très important pour développer de nouvelles thérapies et lutter contre les maladies cardiovasculaires³⁶.

Les récepteurs les plus étudiés sont, au niveau cardiovasculaire, l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'angiotensine. Notre laboratoire s'est intéressé à de nouveaux récepteurs : les récepteurs de la prokinéticine. Nous allons décrire ces récepteurs, peu explorés et originaux dans la partie suivante.

1.2. La prokinéticine et ses récepteurs

1.2.1. La prokinéticine et ses récepteurs

1.2.1.1. Description de la prokinéticine et de ses récepteurs

Les chémokines sont des petites cytokines, ou protéines de signalisation, sécrétées par les cellules³⁷. Leur nom provient de leur capacité à induire le chimiotactisme dirigé dans les cellules sensibles: ce sont des cytokines chemotactiques³⁷. Les prokinéticines (PKs) appartiennent à cette famille³⁸.

Elles ont été découvertes au début des années 2000 dans les sécrétions cutanées du crapaud à ventre jaune (*Bombina variegata*) et dans le venin du Mamba noir (*Dendroaspis polyepis*). La caractérisation pharmacologique du peptide amphibien *B. variegata* 8 (Bv8) et son orthologue reptilien Mamba Intestinal Toxin-1 (MIT-1) a démontré une activité contractile intestinale que l'on retrouve chez les rongeurs. Par la suite, l'identification et la caractérisation de leurs orthologues humains montrent également une capacité à induire la motilité gastro-intestinale.

Ainsi, en se basant sur cette fonction commune présente à travers les espèces, cette nouvelle famille de protéines a été baptisée prokinétines (peptides qui induisent la motilité intestinale). Par conséquent MIT-1 a été renommé prokinétine 1 (PK1) et Bv8 est, quant à lui, renommé prokinétine 2 (PK2) chez les mammifères³⁸. PK1 et PK2 sont donc les deux sous-types de la prokinétine, leurs séquences d'acides aminés sont similaires à 85%³⁸.

Les PKs, tout comme MIT-1, Bv8 ou encore les facteurs de croissance vasculaire endothéliale de la glande endocrine (EG-VEGF, prokinétine), contiennent entre 80 et 90 acides aminés, dont 10 cystéines, et une séquence N-terminale identique. Cette chaîne N-terminale particulière caractérisant cette famille, est nommée AVIT (quatre premiers acides aminés conservés : Alanine (A), Valine (V), Isoleucine (I) et Thréonine (T))³⁹.

Lors de la décennie suivante, les recherches sur cette famille de peptides ont révélé un système complexe constitué de deux ligands (PK1 et PK2) se liant, avec une même affinité, à deux récepteurs couplés aux protéines G apparentés : PKR1 et PKR2³⁸. Les PKs et leurs récepteurs sont répartis dans un grand nombre de tissus humains, comme par exemple les ovaires, le placenta, les testicules, le cerveau, le bulbe olfactif, les reins, le tractus gastro-intestinal, les cellules hématopoïétiques et le cœur. Leur régulation et leur quantité varient considérablement en fonction des tissus. Les PKs, et ses récepteurs, peuvent coordonner plusieurs fonctions biologiques telles que l'alimentation, l'hydratation, le rythme circadien et l'hyperalgésie. Ils sont également impliqués dans l'angiogenèse, l'inflammation, la migration et la survie des neurones³⁸.

Les récepteurs PKR1 et PKR2 appartiennent à la famille de la Rhodopsine. Ce sont les uniques membres de cette famille à partager une similarité de séquence de 85%. La principale différence de séquence est située au niveau de la partie extracellulaire N-terminale : PKR1 contient neuf résidus d'acides aminés supplémentaires par rapport à PKR2⁴⁰.

PKR1 et PKR2 sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus des mammifères, incluant les tissus cardiaques. Cependant, ils jouent des rôles très différents, notamment dans le cœur. L'interaction de PK 2 avec PKR1 protège le

cœur contre l'apoptose induite par l'hypoxie. L'expression transitoire d'un transgène de PKR1 diminue la mortalité et préserve les fonctions du ventricule gauche, en favorisant l'angiogenèse et la survie des cardiomyocytes dans un modèle murin d'infarctus du myocarde. Les souris transgéniques surexprimant le récepteur PKR1 dans les cardiomyocytes présentent une angiogenèse coronaire postnatale et une vasculogenèse sous une régulation paracrine. A l'inverse, les souris transgéniques surexprimant PKR2, dans les cardiomyocytes, montrent une hypertrophie excentrique et une fuite vasculaire sous régulation paracrine⁴¹.

Ces résultats démontrent l'importance fonctionnelle des récepteurs de la prokinéticine et montrent que les voies de signalisation de PKR1 et PKR2 peuvent avoir des effets opposés dans le cœur. Ces récepteurs ne sont pas localisés et exprimés de manières similaires dans les cellules. En effet, PKR1 est fortement exprimé dans les cellules endothéliales des artérioles et des vaisseaux. PKR2 est, quant à lui, majoritairement exprimé dans les cellules endothéliales fenestrées⁴¹.

L'activation de la voie de signalisation PKR1-MAPK-Akt stimule la prolifération, la migration et l'angiogenèse dans les cellules endothéliales coronaires, dans lesquelles PKR1 prédomine sur PKR2. Lorsque PKR2 prédomine sur PKR1, ces cellules présentent un phénotype de cellules endothéliales fenestrées⁴¹.

Par ailleurs, PK2 induit la formation de vaisseau dans les cellules endothéliales aortiques humaines exprimant seulement PKR1, et désorganise les jonctions serrées dans les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques humaines exprimant uniquement PKR2. Cela confirme les rôles divergents de ces récepteurs⁴¹.

Les résultats de Guilini et al. montrent les caractéristiques fonctionnelles des cellules endothéliales coronaires dépendantes des niveaux d'expression de PKR1 et de PKR2 ainsi que des voies de signalisations divergentes utilisées par ces récepteurs⁴¹.

1.2.1.2. Fonctions physiologiques de la prokinéticine

Les récepteurs PKR1 et PKR2 sont couplés aux protéines $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha s}$. Par ce couplage ils contrôlent plusieurs fonctions comme la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de MAPK, des kinases Akt et de l'accumulation de cAMP.

Bien que la signalisation des PKs soit impliquée comme facteur de survie/mitogène pour plusieurs cellules incluant les cellules endothéliales, les cellules neuronales, les lymphocytes et les cellules souches hématopoïétiques, jusqu'à récemment, leur régulation de la fonction cardiovasculaire était peu connue³⁶.

Les PKs possèdent un large spectre de fonctions biologiques en modulant la différenciation, la prolifération et la migration des cellules cibles. La prokinétine 1 contrôle la prolifération et la différenciation des cellules de la crête neurale pendant le développement du système nerveux entérique (ENS). La prokinétine-2 favorise, dans le système nerveux central et périphérique, la survie et la migration des neurones, la morphogénèse du bulbe olfactif (OB), la nociception à des stimuli thermiques et certains rythmes circadiens.

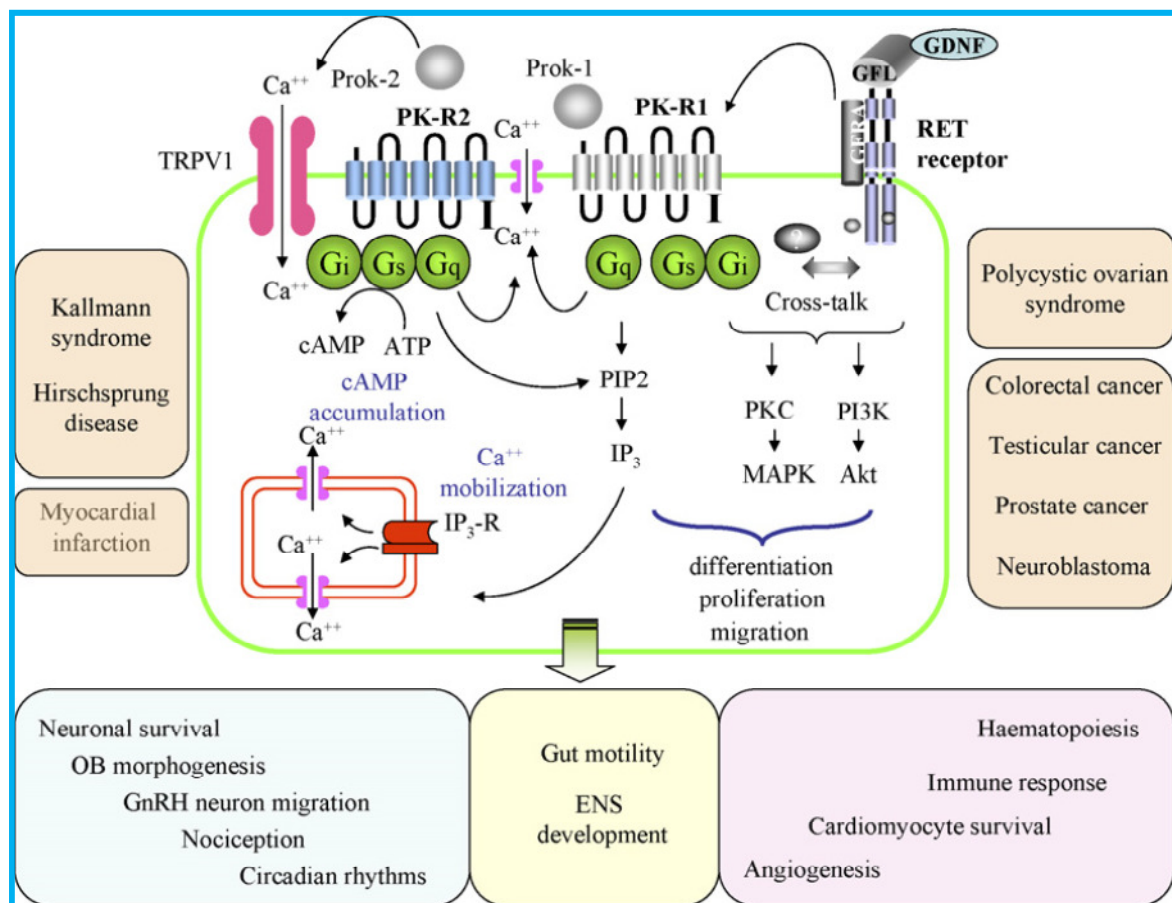


Figure 20 : Voie de signalisation de la prokinétine et ses implications physiologiques et pathologiques (copiée de la référence 41)⁴².

La prokinétine-2 est également impliquée dans la promotion de la survie des cardiomyocytes, ainsi que dans l'hématopoïèse et la régulation de la réponse immunitaire. De plus, les prokinétines et leurs récepteurs sont impliqués dans

certains cancers mais aussi dans des maladies congénitales telles que le syndrome de Kallmann et dans l'infarctus du myocarde⁴² (**Figure 20**).

Dans cette partie nous allons décrire l'implication des prokinétines dans diverses fonctions biologiques, différents cancers et maladies.

1.2.1.2.1. Les prokinétines comme régulateurs de la motilité gastro-intestinale

L'activité des PKs sur la contraction du muscle lisse gastro-intestinal a été la première activité biologique démontrée pour cette famille de peptides régulateurs. Considérant qu'il est encore difficile de savoir si les effets des PKs sur les cellules du muscle lisse gastro-intestinal sont pharmacologiques ou physiologiques, les études *in vivo* ont montré que les prokinétines 1 et 2 exogènes stimulent le transit gastro-intestinal. PK 2 accélère la vidange du repas liquide dans l'estomac du rat, mais cette observation n'a pas été confirmée par d'autres études. Dans le colon, la prokinétine 1 inhibe les contractions du muscle circulaire par la libération d'oxyde nitrique indiquant un effet indirect probable des PKs sur la motilité gastro-intestinale. Les PKs (1 ou 2) peuvent donc réguler la motilité gastro-intestinale directement par l'activation des cellules des muscles lisses, et indirectement par la régulation des activités des neurones entériques. Des études complémentaires, incluant l'utilisation de souris mutantes (KO PKR1 ou 2) ainsi que la synthèse d'outils pharmacologiques, notamment des petites molécules antagonistes, permettront une meilleure compréhension de leurs rôles dans la régulation du mouvement gastro-intestinale⁴³.

1.2.1.2.2. Activité hyperalgésique des prokinétines

Plusieurs études ont montré le rôle des PKs, ou de leurs homologues non mammifères, dans la sensibilité de la perception de la douleur. Une injection intraplantaire de PK 2 ou de Bv8 cause une forte hyperalgésie localisée et réduit les seuils nociceptifs à des stimuli thermiques et mécaniques. L'hyperalgésie causée par PK 2, ou par Bv8, est probablement due à l'activation des neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG).

Le récepteur transitoire potentiel vanilloïde 1 (TRVP1) est un canal ionique excitateur crucial pour la détection et l'intégration, par les neurones DRG, des stimuli chimiques et thermiques produisant la douleur. Il a été récemment identifié comme lien possible entre PKR1/PKR2 et l'activation du neurone DRG. Des expériences de co-localisation ont révélé que la majorité des neurones DRG positifs aux récepteurs de la prokinéticine expriment TRVP1. Il a été montré que la plupart des neurones DRG répondant à la prokinéticine 2 sont aussi activés par la capsaïcine (composant actif du piment). Les souris KO de PKR1 montrent une perception affaiblie de la douleur induite par des stimuli variés, incluant la chaleur ou la capsaïcine (sensation de brûlure dans la bouche). Ces résultats indiquent que PKR1 est probablement le récepteur dominant exerçant une activation tonique de TRVP1 dans les neurones DRG. La diminution de la réponse pronociceptive induite par l'action de Bv8 sur des souris TRVP1-null indique que TRPV1 est un composant crucial de la signalisation en aval de PKR1 dans la perception de la douleur⁴³.

Le modèle d'expression indique que la prokinéticine 2 pourrait être le ligand de PKR1 dans la perception de la douleur, spécialement dans la douleur inflammatoire. PK 2 est fortement exprimée dans les monocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Ainsi, PK 2 pourrait être libérée dans les sites d'inflammation par les neutrophiles afin d'activer les macrophages et d'induire la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 et l'interleukine 12. Les études génétiques sur les souris déficientes en PK 2 confirment l'implication cruciale de la prokinéticine 2 dans la douleur aiguë et inflammatoire. En effet, ces souris font preuve d'une réduction significative de la nociception induite par des stimuli thermiques ou chimiques. Donc le couple PK2-PKR1 apparaît être le complexe ligand-récepteur agoniste dominant dans la régulation de la sensation de douleur⁴³.

1.2.1.2.3. Rôle des prokinéticines dans le développement et la fonction des cellules sanguines

La détection des ARN messagers des PKs et de leurs récepteurs, dans la moelle osseuse et d'autres organes hématopoïétiques, implique un rôle potentiel dans le renouvellement des cellules sanguines. Les analyses d'expressions indiquent que PKR1 et PKR2 sont présents dans les cellules souches hématopoïétiques. Dorsch et al⁴³, en 2005, sont les premiers à étudier l'effet de PK 1 sur la différenciation cellulaire. Ils démontrent qu'elle favorise considérablement la différenciation des cellules de moelle osseuse de souris et de moelle osseuse humaine dans la lignée monocyte/macrophage. LeCouter et al⁴³, en 2004, montrent un effet similaire de PK 2 sur les lignées de monocytes, et démontrent également qu'elle favorise la survie et la différenciation des lignées granulocytaires dans les cultures de cellules souches hématopoïétiques humaines ou de souris. Ces études suggèrent un rôle possible des prokinéticines, et particulièrement de PK 2, dans l'hématopoïèse, qui pourrait être conservé au cours de l'évolution⁴³. PKR1 et PKR2 sont co-exprimés dans les cellules sanguines matures. Les PKs pourraient aussi réguler la fonctionnalité de cellules sanguines matures spécifiques en modifiant leur comportement⁴³.

De plus, la prokinéticine 1 est exprimée dans les cellules B, les cellules T et dans les tissus enflammés. La prokinéticine 2 est, quant à elle, détectée dans les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages. Elle est également fortement exprimée dans les cellules infiltrant les sites d'inflammation et est induite, avec ses récepteurs, dans les monocytes lors de l'exposition aux lipopolysaccharides. Ces résultats montrent que les prokinéticines 1 et 2 pourraient réguler la réponse immunitaire en modifiant l'activation des monocytes, la migration des granulocytes et des monocytes. Ainsi, il est probable que les prokinéticines soient des cytokines hématopoïétiques modulant les systèmes immunitaires innés et adaptés de l'évolution⁴³.

1.2.1.2.4. La fonction régulatrice de la prokinéticine 2 dans les systèmes circadiens

Les noyaux suprachiasmatiques (SCN) situés dans l'hypothalamus antérieur sont l'horloge principale chez les mammifères. Ils contrôlent le rythme circadien ainsi que diverses fonctions physiologiques et comportementales. Une première observation indiquant que l'ARN messager de PK 2, dans les noyaux suprachiasmatiques, affichant une oscillation circadienne, a mis en évidence la potentielle fonction régulatrice de PK 2 dans le rythme circadien. PKR2 est exprimé dans la majorité des cibles primaires des SCN connues comme le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN), le noyau médial dorsal de l'hypothalamus (DMH), les noyaux paraventriculaire et paraténial du thalamus (PVT/PT) et le noyau latéral septale (LS)⁴³.

Récemment, l'évidence génétique directe du rôle de PK 2 dans le contrôle du rythme circadien a été reportée⁴³. Le cycle journalier de sommeil/veille est probablement le processus physiologique le plus important, régulé par l'horloge circadienne des SCN. Cette régulation est supposée utiliser des processus homéostatique et circadien. Le processus homéostatique détermine la durée et l'intensité du sommeil, qui s'accumule en son absence et se dissipe au cours du sommeil. Le processus circadien, contrôlé par les SCN, détermine, quant à lui, le moment de sommeil. Cependant, la relation de ces deux processus est encore controversée. Des résultats montrent que le processus homéostatique est indépendant du processus circadien. En effet, la quantité et la récupération de sommeil après privation restent inchangées chez les rats ayant eu une lésion des SCN. Chez les souris PK2-null, le temps total de sommeil dans des conditions forcées d'obscurité et de lumière est réduit. La réduction du temps de sommeil se produit principalement au cours de la période de lumière, coïncidant avec l'expression de PK 2. PK 2 joue donc un rôle dans la régulation à la fois circadienne et homéostatique du sommeil⁴³.

Des études récentes ont identifié un mécanisme neurophysiologique possible de PK 2 dans le contrôle de la production de SCN, pour la régulation des rythmes circadiens. PK 2 a été identifiée pour exciter les neurones exprimant le récepteur PKR2, au niveau des neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. En effet, La première étude physiologique de PK 2 a révélé un lien possible entre son messenger oscillant et les taux de décharge neuronale. De plus, un antagoniste peptidique du récepteur PKR2 est capable de diminuer l'activité basale des neurones parvocellulaires, dans la tranche de l'hypothalamus, seulement pendant la phase de lumière, moment où la PK 2 est le plus fortement exprimée dans les SCN⁴³.

1.2.1.2.5. La fonction de la prokinéticine 2 dans la neurogenèse

Chez les mammifères, la neurogenèse commence principalement au stade embryonnaire, et se poursuit jusqu'aux premières étapes postnatales. Cependant, la neurogenèse persiste dans certaines régions du cerveau des mammifères adultes, comme le bulbe olfactif (OB) et le gyrus denté (DG) de l'hippocampe. En effet, de nouveaux neurones sont continuellement générés dans le bulbe olfactif à partir de cellules progénitrices de la zone sous-ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral. Récemment, il a été démontré que les fonctions et le signal de PK 2, en tant que chimioattirant pour les cellules progénitrices neuronales de la zone sous-ventriculaire, sont essentiels pour le développement normal de l'architecture du bulbe olfactif. Les essais de migration *in vitro* indiquent que PK 2 stimule la migration des cellules progénitrices neuronales de la zone sous-ventriculaire, que ce soit chez les rats adultes ou nouveaux nés. Cette migration est directionnelle et pourrait être inhibée par un antagoniste de la prokinéticine. Les deux récepteurs PKR1 et PKR2 sont exprimés, chez les mammifères, dans les couches épendymes et épendymaires du ventricule olfactif. Alors que le développement du bulbe olfactif est normal chez les souris déficientes en PKR1, les souris déficientes en PKR2 montrent un développement anormal de ce dernier. Ces études génétiques révèlent donc que la signalisation de PK2-PKR2 est essentielle pour une neurogenèse normale du bulbe olfactif⁴³.

1.2.1.2.6. Les fonctions de la prokinéticine 1 dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est cruciale pour de nombreux processus biologiques comme notamment le développement, la tumorigenèse et la cicatrisation des plaies. En criblant une librairie de molécules sécrétées, LeCouter et al. ont identifié que PK 1 est capable d'induire la prolifération des cellules primaires du cortex adrénale bovin dérivées des cellules endothéliales. Les PKs augmentent la prolifération et inhibent l'apoptose dans les cellules endothéliales dérivées d'une autre glande endocrinale : le corps jaune (corpus luteum). Cependant, les différents types de cellules endothéliales ont chacun un model distinct d'expression du récepteur de PK. Des études soulignent l'importance de l'action de PK 1 sur les cellules endothéliales stressées, suggérant que la présence du récepteur PKR2 équipe les cellules endothéliales lutéales d'un outil supplémentaire pour résister au stress induit par l'apoptose. En effet, en raison de leur microenvironnement tissulaire, les cellules endothéliales lutéales sont mieux préparées que les cellules du cortex adrénal (dérivées des capillaires endothéliales), à des conditions extrêmes telles qu'un niveau d'oxygène faible et un manque de nutriments⁴³.

En dehors de la mitogenèse, la perméabilité endothéliale joue un rôle important dans l'angiogenèse. En plus des fonctions mentionnées ci-dessus, la présence du récepteur PKR2 apparaît être indispensable pour la perméabilité des cellules endothéliales induites par PK 1. Ces effets sont observés seulement dans les cellules endothéliales lutéales exprimant le récepteur PKR2. Les cellules capillaires endothéliales du cerveau sont particulièrement intéressantes car, contrairement aux autres cellules endothéliales des macro-vaisseaux, elles servent de bouclier protecteur (ou de barrière) entre le sang et le tissu sous-jacent (le système nerveux central). A ce jour, seulement PKR2 a été identifiée dans les cellules endothéliales fenestrées telles que celles trouvées dans le cortex adrénal, les reins et le foie, en accord avec le fait que PKR2 joue un rôle dans la perméabilité des cellules endothéliales.

PK 1 est particulièrement présente dans l'aorte et le corps jaune. Elle est immunolocalisée au niveau de la couche du muscle lisse de la paroi des vaisseaux sanguins. Elle n'a pu être détectée dans les cellules endothéliales⁴³.

Par conséquent, PK 1, nécessaire pour l'activation des différentes cellules endothéliales via les récepteurs de la prokinéticine, est produite dans des cellules voisines, suggérant que la prokinéticine 1 a un mode d'action paracrine⁴³.

Le promoteur de PK1 possède des sites de liaison putatifs pour le facteur induisant l'hypoxie : HIF-1 et PK1 est induite par des conditions hypoxiques. L'injection d'un virus recombinant, exprimant la prokinéticine 1 dans les ovaires, provoque une forte angiogenèse. La prokinéticine 1 a été le premier exemple supposé de facteur angiogénique spécifique d'un tissu, bien que son effet angiogénique soit probablement plus étendu que le prétend son origine. Dans la majorité des essais angiogéniques *in vitro*, incluant la prolifération, la survie et la migration de différents types de cellules endothéliales (lutéales, cellules macro-vasculaires, cellules cortex adrénale dérivées des cellules endothéliales), PK 2 a un comportement similaire à celui de PK 1. L'expression de PK 2 est également induite par l'hypoxie. A ce jour, cependant, les études d'expression de PK 2 dans les tumeurs sont plutôt limitées⁴³.

1.2.1.2.7. Les fonctions de la prokinéticine dans le système de reproduction

Des études ont permis de montrer que PK 1 et ses récepteurs sont exprimés dans les ovaires, l'utérus, le placenta, les testicules et la prostate, avec des fonctions s'étendant au-delà du réseau vasculaire. Un rôle paracrine possible des PKs dans les fonctions de l'endomètre et le placenta a été suggéré par des études fonctionnelles et des analyses d'expressions. Battersby et al⁴³. ont démontré que l'expression de PK 1 est élevée dans l'endomètre pendant la phase de sécrétion du cycle menstruel (contrairement à 2). Cette augmentation de PK 1 est induite par un traitement à la progestérone. La présence de PKR1 et de PKR2 dans les cellules épithéliales glandulaires et les cellules du muscle lisse, ainsi que dans les cellules endothéliales, suggère que les prokinéticines auraient des fonctions angiogéniques comme la contraction du myomètre⁴³.

Hoffmann et al⁴³. ont montré que dans le placenta humain l'expression de PK 1 et de PKR1 atteint un pic au cours du premier trimestre de la grossesse,

correspondant à une période d'hypoxie du développement placentaire⁴³. Pendant les différentes étapes de la reproduction que ce soit dans les ovaires, dans le placenta ou dans l'utérus, PK1 est impliquée dans différentes fonctions telle que la vascularisation⁴³.

Le système de la prokinéticine est aussi indirectement impliqué dans le développement des organes reproductifs. Par exemple, les souris déficientes en PK 2 présentent un hypogonadisme hypogonadotrophique (ou gonadotrope), et sont essentiellement stériles⁴³.

1.2.1.3. Pathologies associées à la prokinéticine

1.2.1.3.1. *Le syndrome de Kallmann*

Le syndrome de Kallmann combine typiquement un sévère hypogonadisme hypogonadotrophique et une perte complète de l'odorat (anosmie). Les mutations de pertes de fonction putatives de *PKR2* ou *PK2*, encodant respectivement pour PKR2 et PK 2, ont été détectées chez approximativement 9% des patients atteints du syndrome de Kallmann. La plupart de ces mutations sont des mutations faux-sens (mutations ponctuelles), et beaucoup ont également été trouvées chez des individus apparemment sains. Cela soulève des questions au sujet de leur rôle pathogène dans la maladie. Les effets délétères sur la signalisation de la prokinéticine ont cependant été démontrés *in vitro* pour presque toutes les mutations faux-sens⁴⁴.

1.1.1.1.1. *Maladie de Hirschsprung*

La maladie de Hirschsprung est une anomalie de fonctionnement de la partie terminale de l'intestin se traduisant par une constipation ou une occlusion intestinale. Cette anomalie est le résultat de l'absence de développement congénital des cellules neuroganglionnaires assurant la transmission des informations nécessaires à la régulation intestinale. Cette maladie est considérée comme une neurocristopathie ou maladie dérivant des crêtes neurales⁴².

Ainsi, une taille appropriée du réservoir des cellules de la crête neurale (NCC) est cruciale pour la colonisation complète et normale de l'intestin pendant le développement du système nerveux entérique (ENS). L'échec dans la colonisation intestinale par les cellules de la crête neurale peut entraîner une aganglionose (absence de ganglions) du côlon congénitale, également connue sous le nom de maladie de Hirschsprung. La signalisation du complexe facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF)-RET (récepteur de la tyrosine kinase pour le GDNF) est une voie de signalisation indispensable, contrôlant la prolifération, la différenciation et la migration des cellules de la crête neurale entérique, pour le bon développement du système nerveux entérique. Chez les hommes, des mutations du récepteur de la tyrosine kinase pour le GDNF (RET) comptent pour approximativement 50% des cas de maladie de Hirschsprung⁴².

Des découvertes récentes ont révélé que la prokinéticine, dans une certaine mesure, peut compenser la perte de signalisation du complexe GDNF/RET en contrôlant la différenciation et la prolifération des cellules de la crête neurale. Par conséquent, le développement de petites molécules agonistes analogues de PK peut apporter un éclairage nouveau dans l'optique d'une nouvelle thérapie pour les patients ayant un défaut de signalisation du complexe GDNF/RET⁴².

1.1.1.1.2. Rôle des prokinéticines dans les pathologies de l'appareil reproducteur

L'hyperalgésie et l'hypervascularisation des cellules stromales sont des caractéristiques clés dans le développement du syndrome des ovaires polykystiques (PCOS). La recherche de facteurs responsables de ces caractéristiques a identifié une forte expression du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et de PK 1. Une forte corrélation entre l'expression de PK 1, l'hyperalgésie et l'angiogenèse a été reportée. Cela suggère que PK 1 pourrait être impliquée dans le développement de ce syndrome. Il a également été suggéré que PK 1 pourrait avoir un rôle dans le contrôle de la perméabilité vasculaire dérégulée se produisant dans le syndrome d'hyperstimulation ovarienne⁴⁵.

Dans la pré-éclampsie, la physiopathologie sous-jacente reste incertaine mais dans le placenta résultant, le facteur α de nécrose tumorale est relativement hypoxique, avec d'évidentes lésions inflammatoire et vaso-occlusions chroniques. Une étude menée par Chung et al.⁴⁵ rapporte aucune variation d'expression de PK1 au cours du troisième trimestre dans les placentas de grossesses pré-éclampsiques ou normaux. Cependant, de plus en plus d'observations suggèrent que l'origine d'une pré-éclampsie interviendrait au cours du premier trimestre, suite à une mauvaise adaptation entre le système vasculaire de la mère et de l'unité foeto-placentaire. Les changements dans l'expression des protéines après l'apparition de la maladie sont considérés comme étant la conséquence, plutôt que la cause, de son développement. Il a donc été suggéré que PK et PKR1 pourraient avoir un rôle dans le développement d'une pré-éclampsie, compte tenu de leur expression temporelle au cours de la période hypoxique cruciale de la placentation pendant le premier trimestre⁴⁵.

1.2.1.4. Les prokinétines dans différents cancers

Les prokinétines sont impliquées dans de nombreux cancers. Nous allons décrire dans cette partie différents cancers pour lesquels elles sont surexprimées.

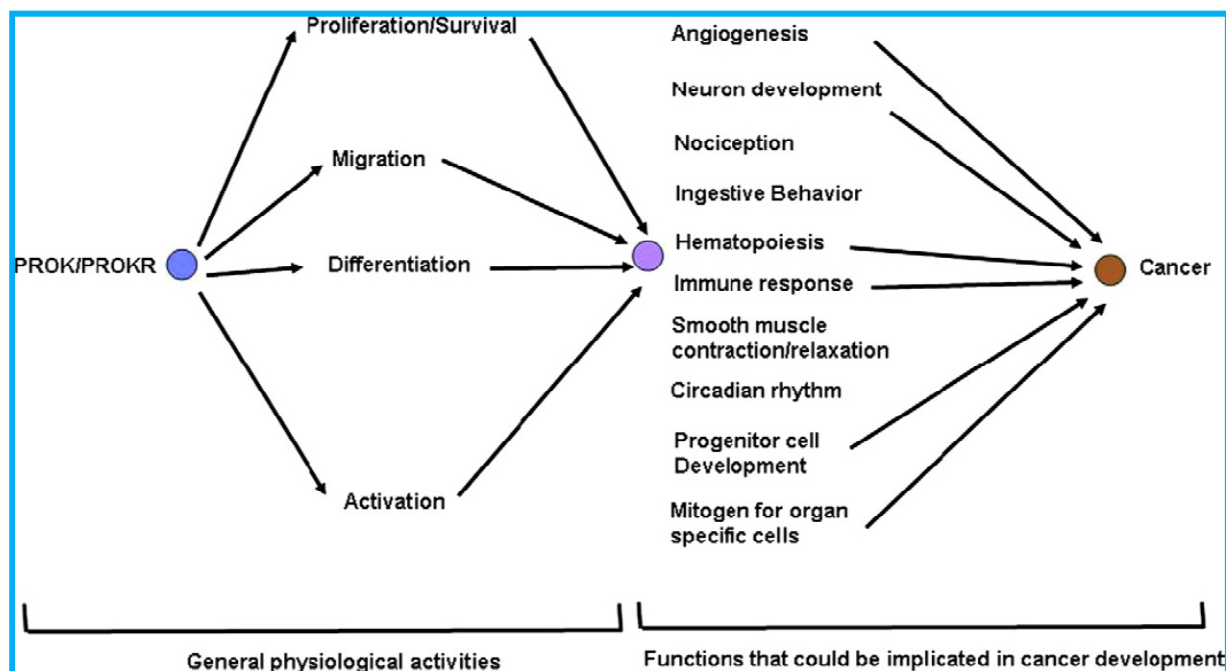


Figure 21: Vue générale des différentes fonctions des prokinétines et des différentes fonctions qui pourraient être impliquées dans le développement de cancer (copiée de la référence 38)³⁸.

1.2.1.4.1. Dans le cancer colorectal

L'étude d'un panel de 113 cancers colorectaux réséqués montre que PK 1 est exprimée dans seulement 31 cas. Des études complémentaires sur des lignées cellulaires de cancer colorectal ont montrés que PK 1 était exprimée de manière significative mais pas dans les muqueuses humaines normales. L'implantation de lignées de cellules cancéreuses (SW620) dans des souris transfectées avec PK 1, a pour résultat une augmentation de la néo-vascularisation et des métastases du foie par rapport au témoin³⁸.

1.2.1.4.2. Dans le cancer de l'endomètre

L'expression des prokinétines est corrélée avec l'angiogenèse dans l'endomètre et le placenta. Elles sont régulées par la progestérone au cours de la croissance de l'endomètre. PK 1 et ses récepteurs sont exprimés essentiellement par les cellules épithéliales et endothéliales. Ils ont une fonction paracrine dans le maintien de la fonction vasculaire normale de l'endomètre. Une étude récente a montré une faible implication de PK 1 dans le cancer de l'endomètre et en conclue qu'elle est peu susceptible d'être associée avec le développement du cancer de l'endomètre. PK 2 serait donc le ligand impliqué dans ce type de cancer³⁸.

1.2.1.4.3. Dans le carcinome hépatocellulaire

L'induction des gènes de PK 1 et PK 2 a été étudiée dans le foie normal, fibrotique et tumoral (nommé carcinome hépatocellulaire ou HCC). Leur expression a été comparée à l'expression du facteur de croissance vasculaire endothéliale VEGF (un marqueur de l'angiogenèse), au facteur de von Willebrand vWF (un marqueur des cellules endothéliales) et au cluster de différenciation CD68 (un marqueur monocyte-macrophage). Par ailleurs, les récepteurs PKR1 et PKR2 ont été évalués dans des populations de cellules hépatiques isolées. L'ARN messager de PK 2 (contrairement à PK 1) est exprimé dans tous les échantillons des types de cellules de foie normales examinés. Dans le cadre du développement d'une tumeur du foie, les auteurs rapportent que PK 2 corrèle uniquement avec le CD68 et montre une diminution significative de son expression lorsque la pathologie évolue vers un cancer. De plus, pour les cellules du foie isolées examinées, seules les cellules Kupffer (macrophages résidant dans le foie) expriment un niveau significatif de PK 2

et de ses récepteurs. Dans le foie normal, ils sont exprimés spécifiquement par les cellules Kupffer. L'expression de PK 2 diminue lorsque le foie évolue vers un cancer et n'est donc pas corrélée avec l'angiogenèse du carcinome hépatocellulaire³⁸.

1.2.1.4.4. Dans l'angiogenèse des tumeurs dépendantes des cellules myéloïdes

Les cellules de la moelle épinière participent activement à l'angiogenèse des tumeurs, notamment par la libération de facteurs angiogéniques, les protéases, dans le micro-environnement. L'incorporation des cellules myéloïdes CD11+ GR1+, exprimant des niveaux élevés de PK 2, est activée chez des souris implantées avec des cellules tumorales. PK 2 est impliquée dans la migration de ce sous-ensemble de cellules myéloïdes pour des tumeurs en croissance. L'utilisation d'anticorps bloquant PK 2 réduit considérablement le nombre de tumeurs associées aux cellules CD11+ GR1+, et réduit la mass tumorale et la néo-vascularisation. Les cellules CD11+ GR1+ sont impliquées dans la thérapie réfractaire anti-VEGF, ainsi que dans le traitement des souris avec des anticorps bloquant PK 2 en synergie avec l'effet anti-cancer d'anticorps anti-VEGF. Cependant, le traitement anti-PK2 est efficace seulement dans les premiers stades de développement tumoral, suggérant que soit les neutrophiles ne sont pas impliqués dans les derniers stades de développement tumoral, soit qu'il y a des facteurs compensatoires³⁸.

1.2.1.4.5. Dans le neuroblastome

Le neuroblastome est une tumeur, qui survient chez l'enfant, causée par des cellules de la crête neurale mal différenciées. Sachant que PK 1 est un facteur clé contrôlant la croissance et la différenciation des cellules de la crête neurale entérique au cours du développement, Ngan et al³⁸. ont étudié une implication éventuelle d'une signalisation anormale de PK 1 dans la progression du neuroblastome. Ils ont montré que le niveau d'expression de la prokinéticine 1 est corrélé avec les différents stades du neuroblaste et les métastases. Les transcriptions du récepteur PKR2 ont été observées comme étant supérieures à des stades avancés du neuroblastome. Des études *in vitro* ont démontré que PK 1 contrôle la survie, la prolifération et la migration/invasion des cellules neuroblastes par l'activation de la voie de signalisation Akt.

De plus, Ngan et al. ont observé que la prolifération des cellules neuroblastes contrôlée par PK 1 requière la présence des deux récepteurs. Ces résultats démontrent que PK 1 semble jouer un rôle central dans la progression du neuroblaste³⁸.

1.2.1.4.6. Dans le carcinome ovarien

La prokinéticine 1 est fortement exprimée dans les ovaires au cours des cycles menstruels. Il est supposé qu'elle sert à la fois de facteur mitogène pour les cellules stéroïdogènes et de facteur pro-angiogénique pour les cellules endothéliales dérivées du corps jaune (signalisation exprimée spécifiquement par le récepteur PKR1). L'expression de la prokinéticine 1 n'est pas augmentée au cours des différents stades du cancer ovarien. Cependant, un rôle putatif de PK 1 dans l'angiogenèse, pendant les premiers stades du carcinome ovarien, a été suggéré en se basant sur le fait que PK 1 est exprimée dans les cellules stromales non tumorales et dans les lymphocytes T infiltrant les tumeurs³⁸.

1.2.1.4.7. Dans l'adénocarcinome pancréatique

Les mesures de l'ARN messenger de PK 1 dans les tissus du pancréas ont montré que celle-ci sont plus abondantes dans l'adénocarcinome par rapport au tissu pancréatique normal. L'immunocoloration pour PK 1 a démontré un modèle dimorphique dans les tissus pancréatiques, où il apparaît chez les hommes une localisation prédominante dans les cellules des îlots pancréatiques (partie du pancréas endocrinien qui produit et sécrète les hormones). Chez les femmes, la coloration a été détectée principalement vers la partie exocrine (partie composée de cellules qui produit et sécrète les enzymes digestives). Une expression positive est aussi observée dans les vaisseaux sanguins du pancréas³⁸.

1.2.1.4.8. Dans le cancer de la prostate

PK 1 est faiblement exprimée dans la prostate normale. Une augmentation considérable est observée au même rythme que l'évolution de la malignité. De plus, PK 2 et ces récepteurs sont exprimés dans les cultures de cellules épithéliales primaires malignes de la prostate. Ainsi ces résultats montrent une implication éventuelle des PKs dans le cancer de la prostate via la néo-angiogénèse³⁸.

1.2.1.4.9. Dans le cancer des testicules

Une étude de plusieurs cancers des testicules, incluant les cellules tumorales de Leydig, le seminome et dans les tumeurs des cellules germinales non séminomateuses, montre que PK 1 est exprimée spécifiquement dans les cellules tumorales de Leydig. Les récepteurs de la prokinéticine étant exprimés dans l'endothélium testiculaire, les auteurs de ces études ont conclu que PK 1 pourrait être impliquée au niveau physiologique et dans l'angiogenèse néoplasique du testicule³⁸.

1.2.1.5. Les prokinéticines et le cœur

1.2.1.5.1. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'OMS, Organisation Mondiale de la Santé, a en 2012 évalué que 13.2% de la mortalité mondiale totale, soient 7.4 millions de décès, était due à une pathologie cardiovasculaire ischémique. Ainsi, l'OMS estime que d'ici 2030, 23.3 millions de décès seront causés par une atteinte cardiovasculaire ischémique⁴⁶ (**Figure 22**).

En France, le Centre d'épidémiologie des causes médicales de décès (CépiDC) a déclaré, suite à une étude des données (sur les causes de décès survenues entre 1979 et 2011), que les affections cardiovasculaires représentent l'une des principales causes de mortalité. Même si depuis ces trente dernières années une réduction constante de ces maladies dites cardiovasculaires est observée, elles restent cependant un facteur important de décès. Les cardiopathies ischémiques font parties des maladies cardiovasculaires et ont un taux de mortalité s'élevant à 7.4% chez les hommes et à 5.7% chez les femmes sur la période 2009-2011 en France métropolitaine⁴⁷.

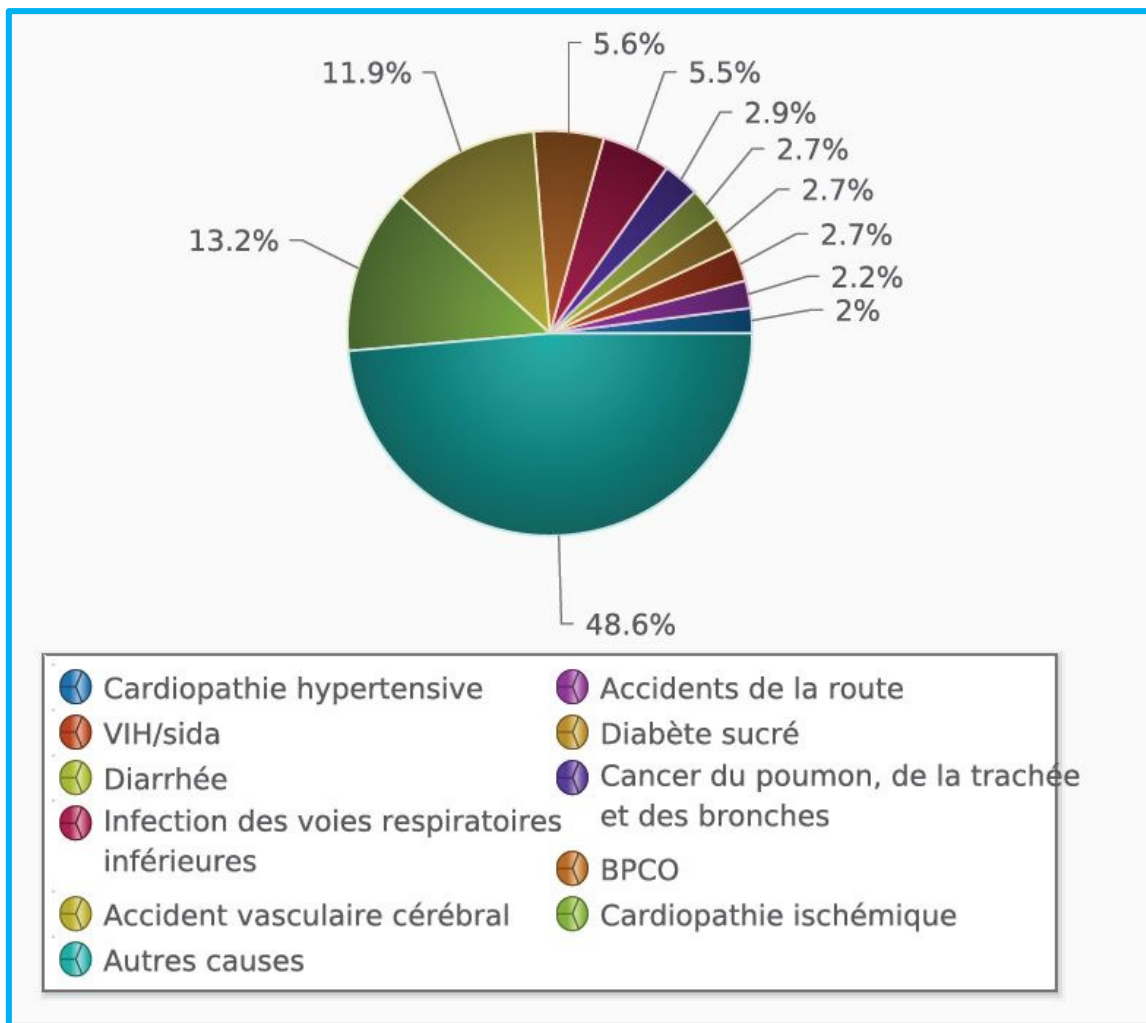


Figure 22: Les 10 principales causes de mortalité dans le monde en 2012 (%)(copiée de la référence 45)⁴⁶.

Les principaux facteurs de risques des maladies cardiovasculaires sont l'hypertension, les dyslipidémies, le diabète, le tabagisme et l'âge. Ces facteurs favorisent généralement la formation d'une plaque d'athérome provoquant une réduction du flux sanguin coronarien.

La rupture de la plaque entraîne la mise en contact de son noyau lipidique avec le sang. Il en résulte la formation d'un thrombus par coagulation sanguine. Ce thrombus évolue vers une occlusion partielle, dans un premier temps, puis totale de l'artère coronaire. L'occlusion de l'artère coronaire entraîne le développement d'une cardiopathie ischémique.

Lors d'une occlusion prolongée, les cardiomyocytes subissent une mort cellulaire. Cette dernière engendre une altération de la fonction systolique traduite par l'augmentation de troubles de la concentration et/ou par l'altération de la fonction diastolique qui provoque des anomalies du remplissage du ventricule gauche. En outre, une nécrose du myocarde atteignant au moins 20% du tissu peut être à l'origine des signes cliniques d'insuffisances du ventricule gauche. Si cette nécrose atteint au moins 45% du tissu, elle est considérée comme fatale. On parle de facteur α de nécrose tumorale dans ce cas de défaillance cardiaque^{48 49}.

Le cœur développe des mécanismes compensatoires afin de pallier cette défaillance cardiaque et pour maintenir une bonne perfusion. Ces mécanismes compensatoires sont plus communément appelés « remodelage cardiaque »^{48 49}. Le remodelage cardiaque se définit par une association simultanée d'hypertrophie pathologique, d'apoptose des cardiomyocytes, de la prolifération des myofibroblastes et d'une fibrose interstitielle. Ce processus entraîne irrémédiablement un changement architectural du ventricule^{48 49}. Ce changement architectural se traduit par une hypertrophie symétrique de type concentrique de la zone non infarctée se caractérisant par un épaississement de la paroi du myocarde accompagnée par le développement d'une fibrose interstitielle. Une zone est dite infarctée lorsqu'elle est amincie et forme une cicatrice fibreuse^{48 50} (**figure 23**).

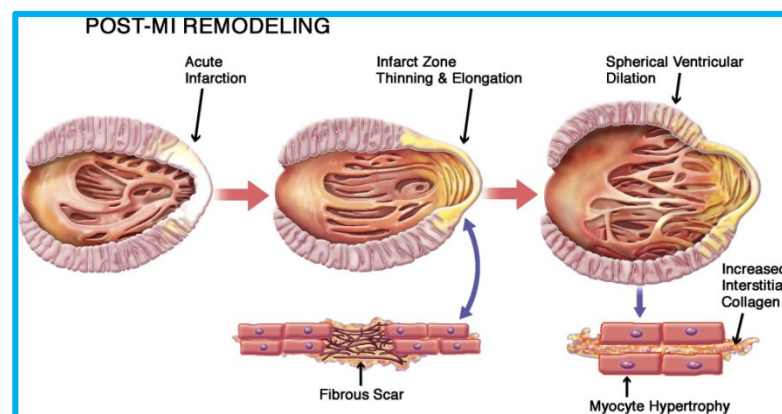


Figure 23: Représentation schématique du remodelage cardiaque suite à un infarctus (copiée de la référence 49)⁵⁰.

1.2.1.5.2. Régulation cardio-vasculaire par la prokinéticine

PK 2 apparait être un candidat hormonal idéal pour réguler la fonction cardio-vasculaire. Les PKs sont des facteurs angiogéniques puissants qui ont un effet bénéfique sur la réparation du tissu cardiaque, en induisant éventuellement l'angiogenèse pour améliorer la circulation coronaire. Les PKs utilisent principalement la signalisation des protéines G_q pour leurs effets biologiques. La signalisation des protéines $G_{\alpha_q/11}$ est une voie essentielle pour induire le développement cardiaque et l'hypertrophie. En outre, la signalisation des protéines $G_{\alpha_q/13}$ est impliquée dans la formation des vaisseaux, comme observé chez les souris VEGF-nulle, suggérant que la signalisation des récepteurs de la prokinéticine peut agir de concert avec d'autres facteurs angiogéniques dans la physiologie cardio-vasculaire. Les PKs ont des effets bénéfiques sur le remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde. Les différences de niveaux de PK 1 et de PKR2 entre un cœur humain non défaillant et un cœur humain défaillant ne sont pas significatives. Cependant, des réductions significatives de PK 2 et de PKR1 ont été observées. De plus, des boucles paracrines et autocrines ont été observées lors de la sécrétion de PK 2, par les cardiomyocytes. PK 2 se lie et stimule PKR1 sur des cardiomyocytes et les surfaces des cellules progénitrices épicaudiques. Ainsi la signalisation de PK2-PKR1 peut avoir un rôle important dans la fonction cardiaque⁵¹.

1.2.1.5.3. La signalisation de la prokinéticine dans l'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IM) induit une inflammation, la formation de cicatrice et le remodelage cicatriciel, cruciaux pour la réparation des tissus. Après un infarctus du myocarde, les chimiokines induisent la migration des monocytes du sang circulant dans le myocarde infarcté, où elles peuvent être différenciées en macrophages.

L'infiltration des macrophages dans le ventricule gauche favorise la phagocytose, le débridement des plaies, l'activation et la prolifération des fibroblastes, le métabolisme du collagène et l'angiogenèse, qui a un rôle majeur dans le processus de cicatrisation. Les macrophages sont impliqués dans la suppression des myocytes cardiaques nécrotiques et des neutrophiles apoptotiques. Ils sont également engagés dans la sécrétion des cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance, tout comme dans la modulation de la réponse angiogénique.

L'épuisement des macrophages altère la cicatrisation et augmente le remodelage du ventricule gauche suite à une lésion du myocarde chez les souris⁵¹.

Les prokinéticines et leurs récepteurs sont fortement exprimés dans les tissus enflammés associés aux cellules infiltrantes. En outre, PK 2 est régulée à la hausse sur le site de la rupture d'un anévrisme de l'aorte abdominale, dans les myocytes périphériques et dans les neutrophiles en réponse à un facteur de stimulation des colonies granulocytes. Il est intéressant de constater que l'expression de PK 2 et du récepteur PKR 1 a été augmentée de façon significative dans les 48 h et est restée élevée pendant une semaine après la ligature coronaire chez le modèle d'infarctus du myocarde de la souris. De plus, une augmentation de 30% de l'Akt phosphorylée est corrélée avec l'augmentation des niveaux de PK 2 dans les cœurs ischémiques, initialisant le processus endogène de cicatrisation par sa signalisation. Un transfert intracardiaque du gène *PKR1* utilisant un adéno-virus après un infarctus du myocarde chez la souris augmente encore les niveaux du récepteur PKR1 d'approximativement quatre fois en 24h. Un transfert du gène *PKR1* a entraîné la réduction de la taille de l'infarctus du myocarde, l'amélioration de la performance du ventricule gauche et, par conséquent, la réduction de la mortalité par rapport aux souris témoins non traitées. Ces résultats montrent clairement qu'une thérapie du gène *PKR1* induit la croissance du réseau capillaire sans diminuer les niveaux du VEGF. L'expression de la kinase Akt, augmente de 60% *in vivo* dans les cœurs des souris traitées par thérapie génique et dans les cardiomyocytes traités par PK2. Ces résultats suggèrent donc que la thérapie génétique transitoire *PKR1* a des effets bénéfiques sur la récupération de l'infarctus du myocarde⁵¹.

Quel est l'effet cardio-protecteur de la signalisation du récepteur PKR1 dans le cœur infarci ? La thérapie génétique transitoire avec *PKR1* accroît l'angiogenèse et réduit l'apoptose après un infarctus du myocarde. La prévention de l'apoptose dans les cardiomyocytes est un mécanisme possible des effets cardio-protecteur contrôlés par PKR1. Un deuxième mécanisme pour préserver la fonction myocardiale est de promouvoir la formation de vaisseaux collatéraux afin de surmonter l'oxygénation tissulaire insuffisante. Par conséquent, l'angiogenèse contrôlée par PKR1 peut être importante pour maintenir un nombre suffisant de cardiomyocytes vivant et pour permettre le succès de la cardio-protection suite à son effet anti-apoptotique dans les premiers stades. Un troisième mécanisme pourrait être que l'inflammation, elle-

même, pourrait contribuer à l'angiogenèse contrôlée par PKR1 dans les cœurs infarctés. En fait, la signalisation du PKR1 est impliquée dans l'inflammation, l'activation des monocytes et la différenciation des macrophages. De plus, les souris *PKR1*-null montrent une absence d'inflammation en réponse à la stimulation de PK 2. Cependant, le nombre de cellules infiltrées dans la zone de cicatrisation n'est pas significativement différent entre des souris traitées par thérapie génétique transitoire avec *PKR1* et les souris témoins, après un infarctus du myocarde plaçant contre un effet indirect de PKR1 grâce à la réponse inflammatoire. Un quatrième mécanisme pour PKR1 pour préserver la fonction myocardiale, par l'induction de la différenciation de cellules progénitrices reste à être étudié⁵¹.

1.2.1.5.4. La signalisation de la prokinétine dans l'activation des cellules souches/progénitrices cardiaques

L'exposition systémique par les prokinétines favorise la survie des cellules hématopoïétiques et améliore la mobilisation des cellules progénitrices. Récemment, Nebigil et al³⁶. ont montré que PK 2 induit une excroissance importante des explants épicaux de souris et des cellules progénitrices dérivées de l'épicaire (EPDC) quiescentes, la restauration de la pluri-potence épicaire et le déclenchement de la différenciation des cellules endothéliales et vasculaires du muscle lisse³⁶.

La co-culture des EPDC avec des cardiomyocytes surexprimant PKR1 augmente les niveaux de PK 2 en tant que facteur paracrine, favorisant la différenciation des EPDC, mimant le modèle de souris transgéniques PKR1 de Nebigil et al³⁶. Ces effets de PK 2 ont été supprimés dans les EPDC dérivées de cellules cardiaques de souris mutantes PKR1-null, démontrant ainsi l'implication de PKR1. La signalisation de PKR1 peut reprogrammer les EPDC adultes pour induire la néovascularisation. Ces études ont fourni un nouvel aperçu des stratégies thérapeutiques possibles visant à restaurer la pluripotence des EPDC pour favoriser la néovascularogénèse, par induction de la signalisation du complexe cardiomyocyte-PKR1³⁶.

Nous avons montré dans cette partie que les prokinétines sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques ainsi que dans certaines pathologies. Nous avons également pu montrer qu'elles sont impliquées dans les fonctions cardiaques, ce qui

concerne le sujet de notre étude. Les différentes implications des prokinéticines sont résumées dans le **Tableau 4**.

Système atteint	Organe touché	Maladie associée	Facteurs	Références
Cardiovasculaire	Aorte	Anévrisme de l'aorte abdominale	PK2	Choke et al. 2009
	Cœur	Insuffisance cardiaque	PKR1, PK2	Urayama et al. 2007
Gastro-intestinale	Colon	Cancer colorectale	PK1	Goi et al. 2004
Immunitaire	Moelle osseuse	Angiogenèse tumorale	PK2	Shojaei et al. 2007
Reproductif	Testicules	Tumeurs des cellules de Leydig	PK1	Samson et al. 2004
	Prostate	Carcinogenèse prostatique	PK1, PK2, PKR1, PKR2	Pasquali and Gambireni 2006
	Ovaire	Syndrome des ovaires polykystiques	PK1	Ferrara et al. 2003
Endocrinien	Glande adrénale	Neuroblastome	PK1, PK2, PKR1, PKR2	Ngan et al. 2007
		Syndrome de Kallmann	PK2, PKR2	Cole et al. 2008
		Hypogonadisme		
Nerveux	Bulbe olfactif	hypogonadotrophique idiopathique normosmique	PK2, PKR2	Cole et al. 2008

Tableau 4: Tableau résumant les différentes implications des prokinéticines dans diverses maladies humaines (copié de la référence 51)⁵².

1.2.1.6. L'expression des récepteurs de la prokinéticine dans les cellules et les tissus cardiovasculaires

Dans cette partie, nous allons présenter les différents rôles de PKR1 et de PKR2. Cependant, le rôle de PKR1 au niveau cardiovasculaire sera abordé en détail dans la partie *1.2.3 Implication du récepteur PKR1 au niveau cardiovasculaire*.

Les signalisations des prokinéticines sont très étendues et affectent notamment le cœur, les reins, et les tissus adipeux.

1.2.1.7. Rôle du récepteur PKR1 dans les fonctions métaboliques, cardiovasculaires et rénales

Dormishian et al⁵³. ont déterminé le rôle de PKR1 dans l'homéostasie cardiovasculaire, rénale et métabolique et plus particulièrement dans la prolifération endothéliale au cours de la première étape de l'angiogenèse ainsi que dans le transport transcapillaire de l'insuline. Leurs observations appuient les nouveaux concepts sur le fait que l'endothélium est une cible potentielle utile dans les traitements pour lutter contre la résistance à l'insuline, le diabète et les maladies cardiovasculaires⁵³.

La perte de PKR1 dans l'endothélium se traduit par une réfraction capillaire, la dépréciation de la relaxation dépendante de l'endothélium, l'apoptose, la fibrose et par des changements de la signalisation de l'insuline conduisant à une lipodystrophie, une résistance à l'insuline et des défaillances rénale et cardiaque⁵³. A l'inverse, une surexpression de PKR1 favorise l'absorption de l'insuline dans les cellules endothéliales et l'angiogenèse⁵³.

Le transport transcapillaire de l'insuline est l'étape cinétiquement limitante dans l'action périphérique de l'insuline. L'altération de ces processus contribue à une résistance à l'insuline. Une altération du transport de l'insuline endothéliale a été observée dans des cas de diabète de type 2 et l'obésité⁵³.

De plus, la cavéoline-1 (Cav-1) est nécessaire pour l'absorption de l'insuline par les cellules endothéliales et joue un rôle important dans le processus de l'angiogenèse. Les résultats *in vitro* et *in vivo* de Dormishian et al. ont clairement montré que PKR1 contrôle l'absorption de l'insuline endothéliale, via la signalisation de Cav-1⁵³.

Le « sauvetage » de l'expression de PKR1 par une injection d'adénovirus chez les souris *ec-PKR1*^{-/-} restaure la formation capillaire, l'absorption de l'insuline endothéliale et la sensibilité au glucose et à l'insuline, corrigeant ainsi la polyphagie, la polydipsie et la polyurie. PKR1 endothélial sert donc de régulateur positif pour la sensibilité à l'insuline⁵³ (**Figure 24**).

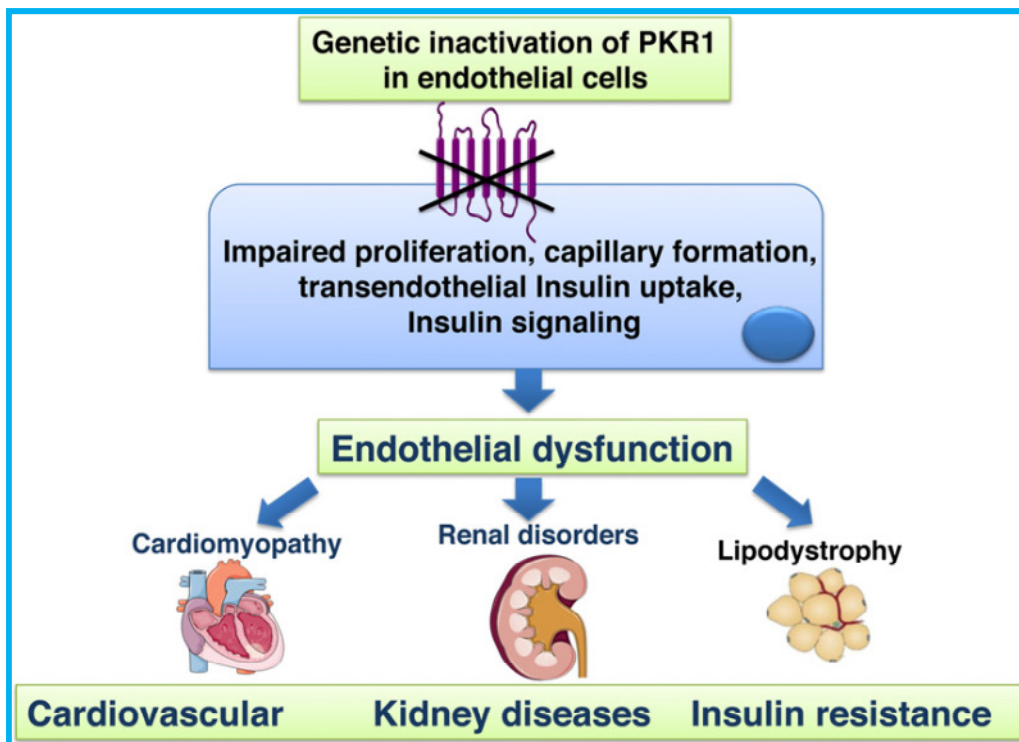


Figure 24: Illustration du phénotype des souris knock-out PKR1 spécifique de l'endothélium (souris ec-PKR1^{-/-}) (copiée de la référence 53)⁵³.

1.2.1.8. Le récepteur PKR2 dans la régulation du comportement circadien

Pour mesurer la contribution putative de la signalisation contrôlée par PKR2 du rythme circadien, Maywood et al. ont généré une mutation nulle du gène *PKR2*. Ils ont examiné son impact sur les cycles d'activité de course entraînée et les cycles activité/repos, les rythmes de la température corporelle et sur l'oscillateur moléculaire du SCN. La perte de la signalisation contrôlée par PKR2 n'a pas d'effet sur l'entraînement du cycle lumière/obscurité⁵⁴.

Cependant, elle perturbe profondément le cycle activité/repos tant sous des conditions entraînées que sous des conditions libres, avec une apparition d'activité imprécise, une perte de la consolidation et une redistribution relative de l'activité du début à la fin de la nuit circadienne⁵⁴.

De plus, l'augmentation nocturne de la température centrale corporelle est diminuée chez les mutants. Il est important de noter que la perte de PKR2 n'a pas

d'effet sur l'oscillateur moléculaire dans la mesure où les cycles circadiens de l'expression des gènes de bioluminescence dans le SCN ne sont pas compromis. Maywood et al. concluent donc que le récepteur n'est pas nécessaire pour le « pacemaker » circadien ni pour l'entraînement, mais il est un lien nécessaire dans la coordination suprachiasmatique du comportement avec un rôle spécifique dans la définition de l'apparition et de l'entretien de la nuit circadienne⁵⁴.

1.2.1.9. Le récepteur PKR2 dans l'internalisation et l'activation des kinases régulant le signal extracellulaire

La réactivité des RCPG aux stimuli extracellulaires, et particulièrement à leurs ligands naturels, est étroitement régulée par plusieurs mécanismes. Ces mécanismes empêchent la stimulation incontrôlée, qui pourrait autrement conduire à des dérégulations et des pathologies⁵⁵.

Yin et al. ont démontré que l'endocytose de PKR2 induite par PK2 est principalement contrôlée par GRK2 et est dépendante des clathrines mais indépendante des β -arrestines⁵⁵.

De plus, les récepteurs de la prokinéticine induisent l'activation de ERK1/2, mais les mécanismes sous-jacents induits par PKR2 ne sont pas clairs. La stimulation des RCPG est capable d'activer ERK 1/2 à travers diverses voies de signalisation, dont la mieux caractérisée implique la sous-unité dissociée $G_{\beta\gamma}$ de la protéine G. Dans cette voie, la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ libérée stimule les PLC β , conduisant à l'activation des protéines Ras. De plus, l'endocytose, où l'activation de la PKC est nécessaire pour certains RCPG, permet d'activer ERK1/2. L'étude de Yin et al. a démontré que l'endocytose et l'activation de la PKC ne sont pas nécessaires pour l'activation de ERK1/2 par PKR2. Cette étude indique également que PLC β et MEK sont impliquées dans cette signalisation induite par PKR2⁵⁵.

En conclusion, Yin et al. ont démontré que l'internalisation du récepteur PKR2 est dépendant de GRK2 et des clathrines, mais indépendante des β -arrestines. Ils ont également révélé que, dans les cellules HEK293, l'activation de ERK1/2 par le récepteur PKR2 dépend de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ libérée, de PLC β et de MEK⁵⁵.

1.2.1.10. Rôle de la signalisation du récepteur PKR2 dans le système cardiovasculaire

PKR2 pourrait contribuer à la croissance des cardiomyocytes et à la vascularisation. Les souris transgéniques surexprimant PKR2, spécifiquement dans le cœur, sous le contrôle de promoteurs cardiaques (promoteur de chaîne lourde α -myosine : α -MHC) présentent une hypertrophie excentrique via une régulation autocrine et un défaut dans l'intégrité endothéliale via une régulation paracrine sans induire l'angiogénèse. Ces souris PKR2 transgéniques peuvent fournir un nouveau modèle génétique pour les maladies cardiaques. Nebigil et al. ont constaté que dans les cellules endothéliales, le récepteur PKR2 couple avec la voie de signalisation de $G_{\alpha 12}$ et régule, à la baisse, le zonula occluden-1 (ZO-1), induisant ainsi une fenestration des cellules endothéliales et donc une hypertrophie cardiaque³⁶ (**Figure 25**).

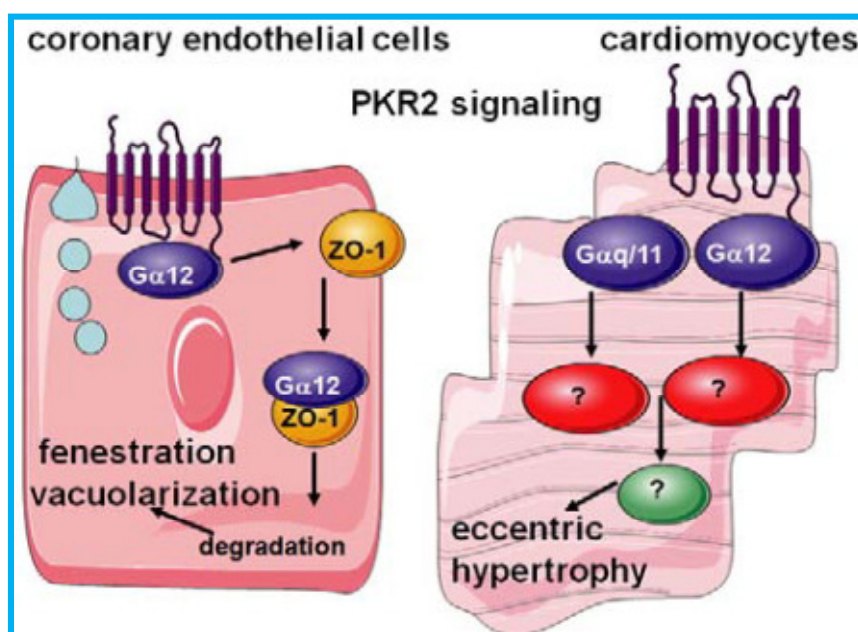


Figure 25: Signalisation de PKR2 dans les cellules endothéliales et dans les cardiomyocytes (copiée de la référence 51)⁵².

1.2.1.11. Rôle du récepteur PKR2 dans les fonctions des cellules endothéliales et des cardiomyocytes

Dans les cellules H5V, la signalisation de PKR2 induit la perméabilité des cellules endothéliales par activation de deux voies de fenestration : 1- la voie transcellulaire qui peut résulter d'une augmentation du trafic de vésicules dans les cellules endothéliales individuelles. La signalisation de PKR2 induit la formation d'invaginations plasmiques ou cavéoles, qui permettent le transport vésiculaire de petites protéines à travers le cytoplasme d'une seule cellule endothéliale, ce qui indique une induction de la perméabilité transcellulaire ; 2- la perméabilité paracellulaire est régulée par des protéines d'adhésion cellule-cellule dans des jonctions serrées et adhérentes telles que ZO-1⁵².

Les cardiomyocytes surexprimant PKR2 ont, quant à eux, augmenté la taille et le nombre de sarcomères. Cela suggère que l'élongation des cardiomyocytes, lors de la signalisation excessive de PKR2, peut contribuer à l'hypertrophie. Cela montre que les voies de signalisation de PKR1 et de PKR2 agissent différemment sur les cardiomyocytes, le premier étant impliqué dans la survie et le dernier dans la signalisation hypertrophique. Les effets différentiels de PKR1 et de PKR2 sur les cardiomyocytes restent à être élucidés. Une hypothèse est que PKR2 pourrait coupler avec plus d'une famille de protéines G, induisant des voies de signalisation hypertrophique⁵² (**Figure 26**).

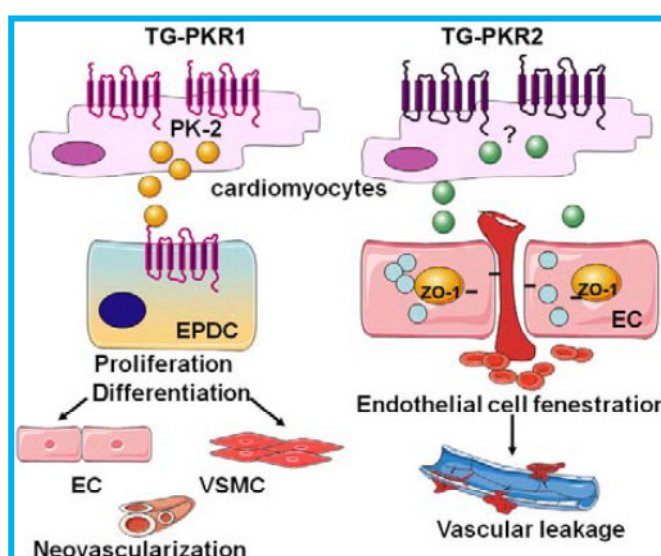


Figure 26: Expression de PKR1 et PKR2 dans les cardiomyocytes (copiée de la référence 51)⁵².

Les domaines d'expression et les rôles des récepteurs PKR1 et PKR2 sont résumés dans le **Tableau 5**.

Domaine	Récepteur	Rôle
Coeur	PKR1	- Protège contre l'apoptose - Favorise l'angiogenèse et la survie des cardiomyocytes - Favorise la néovascularisation - Favorise la différenciation des EPDC - Effet cardioprotecteur
	PKR2	- Hypertrophie cardiaque → Fenestration des cellules endothéliales → Régule à la baisse les protéines de jonction serrée
Cellules endothéliales des artérioles et des vaisseaux	PKR1	Prolifération, migration, angiogenèse
Cellules endothéliales	PKR2	- Formation de corps multivésiculaires et de clusters avéolaires - fenestration des protéines de jonction serrée
Fonction cardiaque, rénale et métabolique	PKR1	Survie, prolifération et absorption de l'insuline
Comportement circadien	PKR2	Contrôle du cycle activité/repos

Tableau 5: Tableau résumant les domaines d'expression et les rôles des récepteurs PKR1 et PKR2 (copié de la référence 51)⁵².

1.2.2. Implication du récepteur PKR1 au niveau cardiovasculaire

1.2.2.1. L'épicarde comme source de cellules progénitrices multipotentes

L'épicarde dérivé du proépicarde a un rôle modulateur essentiel pour la différenciation de la couche compacte ventriculaire du myocarde et le développement des vaisseaux cardiaques au cours de l'embryogenèse. La suppression de gènes sélectionnés exprimés dans l'épicarde entraîne de graves défauts dans le développement du cœur et dans sa vascularisation³⁶.

L'épicarde génère, via la transition épithélio-mésenchymateuse (TME), une population de cellules progénitrices dérivées de l'épicarde (EPDC), envahissant le myocarde sous-jacent et se différenciant en différentes lignées cardiaques. Les EPDC peuvent alors former des cellules endothéliales, en réponse à une combinaison de facteur de croissance endothéliale vasculaire du myocarde et de la signalisation de base des fibroblastes du facteur de croissance. Ils peuvent également se différencier en cellules musculaires lisses par exposition à un facteur de croissance dérivé des plaquettes, facteur transformant de croissance β et la protéine morphogénétique osseuse-2³⁶. Cependant, les signalisations de la Tymosine β -4 (T β 4) et du récepteur PKR1 apparaissent être un facteur de signalisation nécessaire et suffisant pour la différenciation des EPDC adultes dans les cellules endothéliales et celles du muscle lisse pour induire la néovascularisation³⁶. Le potentiel de régénération des EPDC a été testé dans le myocarde lésé. L'injection d'EPDC humain a été rapportée pour améliorer la réparation cardiaque. Lorsque les progéniteurs de cardiomyocytes ont été transplantés, avec les EPDC, dans les tissus du myocarde infarcté, ils ont amélioré la réparation fonctionnelle par rapport à la cellule seule de type supplémentation³⁶.

Ce résultat provient d'effets paracrines impliquant ces deux récepteurs (T β 4 et PKR1). Ainsi les signaux et les contributions cellulaires des EPDC sont indispensables pour l'établissement d'une vascularisation coronaire normale et pour l'architecture du myocarde³⁶.

1.2.2.2. Rôle de la signalisation du récepteur PKR1 dans le système cardiovasculaire

L'action ou la surexpression de PKR1 dans les cardiomyocytes isolés empêche l'apoptose induite par un stress oxydant en induisant la phosphorylation d'Akt. L'activation du récepteur couplé à la protéine $G_{\alpha q}$, dans les cardiomyocytes isolés, pourrait favoriser une voie de survie en activant la signalisation d'Akt. Une expression excessive de la protéine $G_{\alpha q}$, dans les cardiomyocytes, engendre une hypertrophie. Cependant, une augmentation de l'activité de la protéine $G_{\alpha q}$ induit des signaux anti-apoptotiques par transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique et par l'activation d'Akt indépendante de la capacité de signalisation de $G_{\alpha q}$ pour provoquer l'hypertrophie. Ces résultats montrent que la survie et les réponses hypertrophiques de $G_{\alpha q}$ sont contrôlées par différentes voies de signalisation. Etant donné les fonctions connues d'Akt, ces données sont cohérentes avec le fait qu'Akt ait un rôle central dans la signalisation de PKR1 pour la protection des cardiomyocytes contre l'apoptose⁵¹ (**Figure 27**).

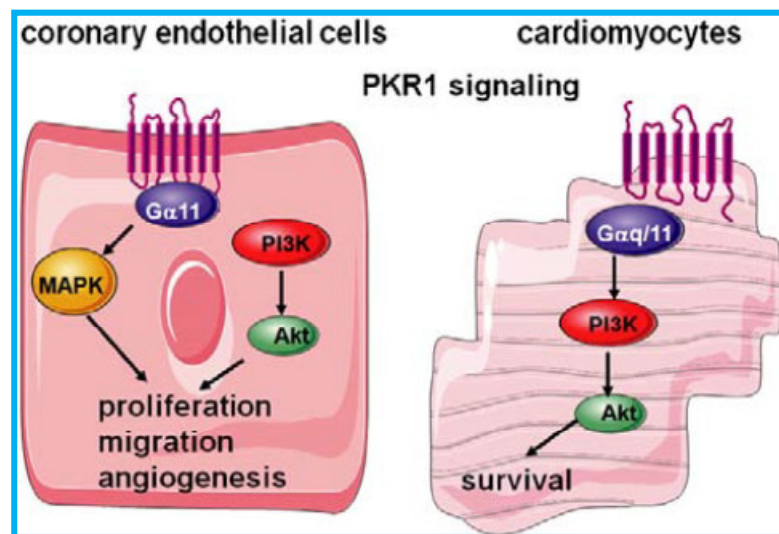


Figure 27: Activation de PKR1 via $G_{\alpha 11}$ dans les cellules endothéliales et via $G_{\alpha q/11}$ dans les cardiomyocytes (copiée de la référence 51)⁵².

Le transfert de gène de PKR1 transitoire, après la ligature coronaire chez le modèle murin d'infarctus du myocarde, réduit la mortalité et préserve la fonction cardiaque par la promotion de l'angiogenèse cardiaque et la survie des cardiomyocytes³⁶.

Ce résultat suggère que PKR1 peut représenter une nouvelle cible thérapeutique pour limiter les lésions du myocarde à la suite d'évènements ischémiques³⁶. Les souris transgéniques surexprimant PKR1, spécialement dans le cœur, sous contrôle d'un promoteur de chaîne lourde α -myosine cardiaque n'affichent aucune anomalie spontanée des cardiomyocytes, mais ont montré une augmentation de la néovascularisation. Ainsi, ces résultats suggèrent que PKR1 est impliqué dans la vascularisation post-natale *de novo*, plutôt que la vasculogenèse pendant l'embryogenèse³⁶. L'inactivation génétique de PKR1 chez les souris (souris « PKR1-knock out ») montre une cardiomyopathie dilatée et une angiogenèse réduite dans le cœur. La pathologie cardiaque chez les souris « PKR1-knock out » est due à l'apoptose augmentée dans les cardiomyocytes et à un nombre réduit de cellules progénitrices épicaudiales. Ce résultat est compatible avec un rôle endogène de la signalisation de PKR1 dans la stimulation de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices épicaudiales. Tous ces résultats montrent que la signalisation de PKR1 est impliquée dans la régulation de la signalisation de la survie des cardiomyocytes, dans la prolifération et dans la différenciation des cellules progénitrices³⁶ (**Figure 28**).

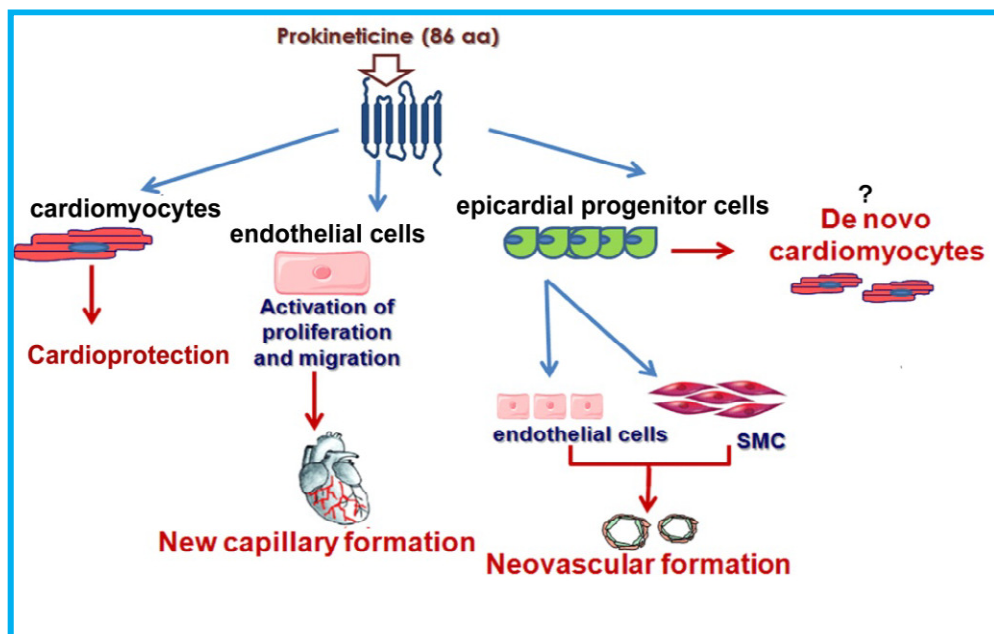


Figure 28: Rôle de la signalisation du récepteur PKR1 dans la régénération cardiaque. La signalisation du récepteur PKR1 protège les cardiomyocytes contre l'apoptose contrôlée par l'hypoxie, active les cellules endothéliales pour l'angiogenèse, active la différenciation des EPDC dans les cellules de type vasculogénique pour la formation néovasculaire et activerait la différenciation des EPDC dans les nouveaux cardiomyocytes (copiée de la référence 36)³⁶.

1.2.2.3. Le récepteur PKR1 dans les pathophysiologies cardiaque et rénale

Récemment, il a été démontré qu'une invalidation génétique conditionnelle par le système *Cre/Loxp* chez les souris provoque des désordres cardiaques et rénaux, comprenant une cardiomégalie, une fibrose interstitielle, la dysfonction cardiaque dans des conditions de stress, la dilatation des tubules rénaux, des capillaires glomérulaires anormaux, une augmentation de l'excrétion de phosphate urinaire et une protéinurie. Les souris mutantes *PKR1*-null présentent des anomalies morphologiques à la fois dans le cœur et dans les reins au stade néonatal, éliminant la possibilité d'un syndrome cardio-rénal⁵¹.

Les souris mutantes *PKR1*-null ont montré des mitochondries gonflées avec quelques crêtes et une apoptose accrue dans le cœur et les reins. La formation de capillaires affaiblis dans le cœur et les reins mutants à des âges précoces crée un environnement hypoxique qui régule à la hausse le facteur α -1 d'hypoxie et les facteurs pro-angiogéniques comme un mécanisme compensatoire pour restaurer la perturbation capillaire au stade adulte. Cette récupération compensatoire de la formation des capillaires est observée uniquement dans la zone extraglomérulaire. Cependant, un petit nombre de réseaux capillaires glomérulaires et épicaudiques est resté inchangé, en raison de l'augmentation de l'apoptose et des nombres de cellules progénitrices réduits trouvés dans les deux tissus. En résumé, la perte de PKR1 provoque des changements structuraux et fonctionnels rénaux et cardiaques en raison des déficits dans la signalisation de survie et des fonctions des cellules souches et des mitochondries dans le cœur et les reins⁵¹.

1.2.2.4. La signalisation du récepteur PKR1 dans les cellules progénitrices dérivées du cœur et du rein

Les EPCD adultes représentent une source *bona fide* de cellules progénitrices cardiovasculaires, qui ont la capacité de répondre à de multiples signaux. PK 2 est capable de stimuler ces EPDC. Cependant la signalisation du complexe PK2-PKR1 reprogramme les EPDC adultes pour les différencier uniquement dans les cellules endothéliales et celles du muscle lisse⁵¹. Les souris transgéniques surexprimant PKR1 dans le cœur présentent une croissance du nombre d'EPDC positives épicaudines, avec une augmentation de la densité capillaire et des vaisseaux

coronaires. Ce modèle de souris démontre une nouvelle voie de signalisation de PK2-PKR1 qui est impliquée dans la communication entre les cardiomyocytes et les EPDC, favorisant la néovascularisation cardiaque⁵¹. PK 2 favorise la différenciation des cellules progénitrices positives épicaudines rénales dans les cellules endothéliales positive à la molécule d'adhérence des cellules endothéliales plaquettaires (PECAM-1 ou cluster de différenciation 31 : CD31) et aux cellules musculaires lisses α à l'action positive sur les muscles lisses vasculaires⁵¹.

Cet effet est bloqué dans les cellules progénitrices positives épicaudines rénales chez les *PKR1*-null. Prises ensemble, ces données démontrent que PKR1 est impliqué dans la régulation de néovasculogenèse postnatale dans le cœur et le rein (**figure 29**). Il est à noter que les cellules progénitrices positives épicaudines résidant à la fois dans le cœur et le rein expriment le récepteur PKR1⁵¹.

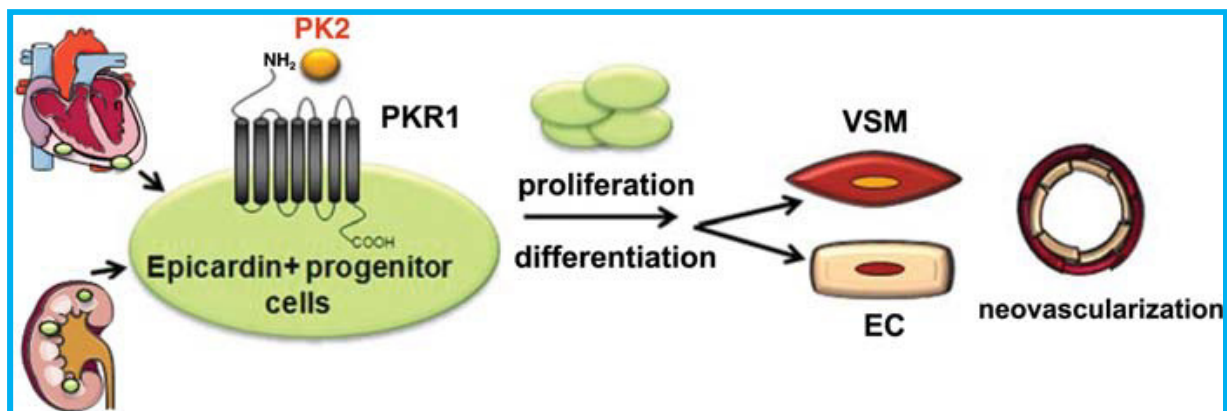


Figure 29: Les cellules progénitrices dérivées du cœur ou des reins peuvent se différencier en cellules de muscle lisse ou en cellules plaquettaires endothéliales par stimulation de PKR 1 par son ligand PK 2 (copiée de la référence 50)⁵¹.

1.2.2.5. Protection du cœur de l'infarctus du myocarde

Les effets de la surexpression du récepteur PKR1 favorisant la survie et l'angiogenèse sur les cellules cardiaques *in vitro* ont encouragé Nebigil et al. à étudier l'effet de la thérapie génique sur PKR1 pour protéger le cœur de l'infarctus du myocarde (IM). En utilisant la ligation coronaire du modèle d'infarctus du myocarde de la souris, Nebigil et al. ont trouvé que le transfert du gène *PKR1* engendre la réduction de la taille de l'infarctus du myocarde, par l'amélioration de la performance du ventricule gauche et induit la diminution de la mortalité. Ces résultats suggèrent

donc que le transfert du gène *PKR1* transitoire a des effets bénéfiques sur la récupération de l'infarctus du myocarde⁵².

Quel est le mécanisme de l'effet cardioprotecteur de la signalisation du récepteur PKR1 sur le cœur infarcté ? La thérapie génétique transitoire avec PKR1 accroît l'angiogenèse et réduit l'apoptose après un infarctus du myocarde. La prévention de l'apoptose dans les cardiomyocytes est un mécanisme possible des effets cardioprotecteurs contrôlés par PKR1. Un second mécanisme pour préserver la fonction du myocarde est de favoriser la formation des vaisseaux collatéraux afin de surmonter l'oxygénation insuffisante dans les tissus. Par conséquent, l'angiogenèse contrôlée par PKR1 peut réduire la mort cellulaire afin de maintenir en vie les cardiomyocytes pour permettre une cardioprotection réussie, suite à la première phase de son effet anti-apoptotique⁵² (**Figure 30**).

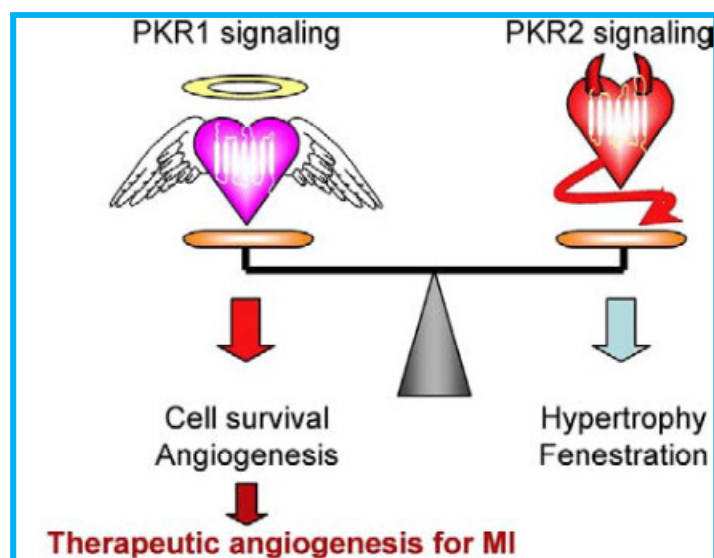


Figure 30: signalisations de PKR1 et PKR2 exercent des actions opposées dans le cœur postnatal (copiée de la référence 51)⁵².

Ainsi de nombreuses études biologiques ont été menées. Cependant il est nécessaire de trouver des agonistes et des antagonistes puissants et spécifiques des récepteurs PKR 1 et PKR2 afin de mieux cerner la pharmacologie *in vitro* et *in vivo* de ce système prokinéticinergique.

1.2.3. Ligands connus des récepteurs PKR1 et PKR2

A ce jour, aucun agoniste n'a encore été décrit. Cependant un certain nombre d'articles décrivent la synthèse d'antagonistes des récepteurs PKR 1 et PKR 2.

Actuellement, seulement deux articles décrivent la synthèse de triazinediones ayant une activité antagoniste pour le récepteur PKR 1 (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 2661–2663⁵⁶ ; *J. Med. Chem.* 2008, 51, 7635–7639⁵⁷). Un seul article a été publié sur les dérivés morpholines en tant qu'antagonistes pour les récepteurs de la prokinéticine (*PNAS* 2012 vol. 109 no. 14 5475-5480⁵⁸). Cependant de nombreux brevets ont été déposés relatant la synthèse et l'activité antagoniste de divers composés (par exemple *US007855201B2*⁵⁹). Un brevet a été déposé, fin 2013, par Takeda Pharmaceuticals décrivant la synthèse de dérivés sulfonylpipéridine (*WO2013/179024*^{60,61}).

Dans cette partie, nous allons décrire ces trois familles d'antagonistes des récepteurs de la prokinéticine.

1.2.3.1. Les triazinediones

Les triazinediones ont suscité plusieurs études RSA sur trois positions principales : R^1 , R^2 , R^3 . La structure générale de ces composés est représentée **figure 31**.

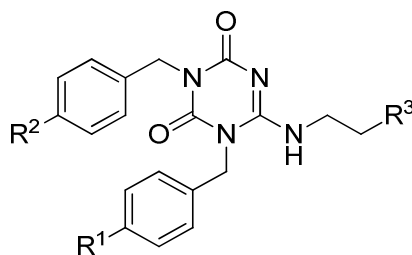


Figure 31: Structure générale des triazinediones (copiée de la référence 57)⁵⁷.

En 2008, Balboni et al ont réalisé une étude RSA sur le groupement R^3 (**Figure 32**). Ils ont synthétisé et testé trois composés ((1), (2), (3)). Les mesures de la constante d'inhibition (K_i) de ces antagonistes, par le déplacement de ^{125}I -MIT sur

les récepteurs PKR1 et PKR2, indiquent que l'analogue **(1)** est le plus affiné. En effet, pour PKR1, le composé **(1)** a une affinité 20 fois et 200 fois supérieure aux produits **(2)** et **(3)**, respectivement. Les constantes d'inhibition (K_i) pour PKR2 sont de l'ordre du micro-molaire pour ces trois composés. Ces dérivés ont donc une faible affinité vis-à-vis de PKR2. Ainsi ces résultats montrent l'importance du groupement guanidine en bout de chaîne pour l'affinité du ligand avec le récepteur PKR1⁵⁷.

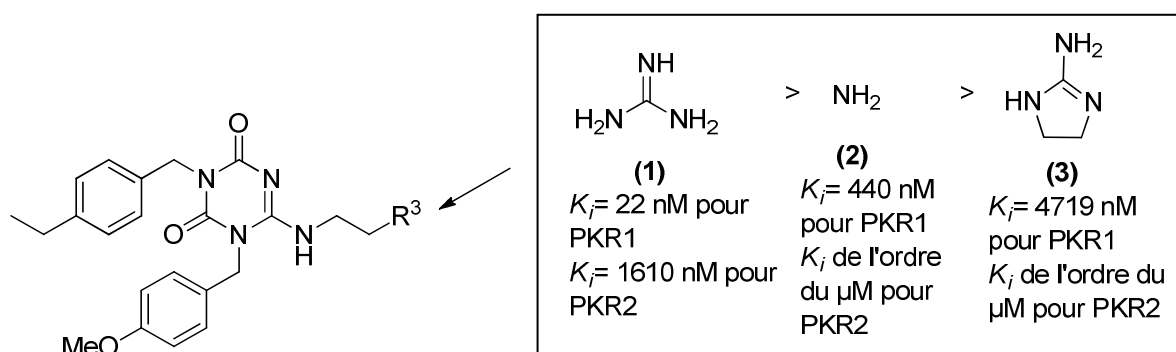


Figure 32: RSA sur le groupement R³ afin de déterminer l'importance du groupement guanidine et un caractère agoniste ou antagoniste des composés (copiée de la référence 57 avec modification)⁵⁷.

Ces composés leur ont permis d'identifier l'importance du groupement guanidine mais ils n'ont pas démontré le caractère agoniste ou antagoniste de ces composés.

Par contre, en 2014, Balboni et al. ont publié une nouvelle étude de ces composés. Leurs travaux portent sur la variation de la nature des groupements R¹ et R². Ils ont ensuite testé *in vivo* les triazinediones synthétisées pour une activité agoniste (EC_{50} mesurées). Ces triazinediones n'ayant montré aucune activité agoniste pour les récepteurs de la prokinéticine, elles ont été testées en tant qu'antagoniste sur l'effet hyperalgésique de Bv8. Bv8 est un ligand naturel sélectif des récepteurs PKR 1 et PKR 2 qui, en se liant à ces récepteurs augmente la sensibilisation des nocicepteurs (ou récepteurs nociceptifs), réduisant ainsi le temps de latence de retrait de la patte chez les souris testées. Les essais *in vivo* des triazinediones ont montré des EC_{50} de l'ordre du picomolaire (**Tableau 6**) et sont représentés dans la **Figure 33**⁶¹. Ces composés sont donc des antagonistes de Bv8.

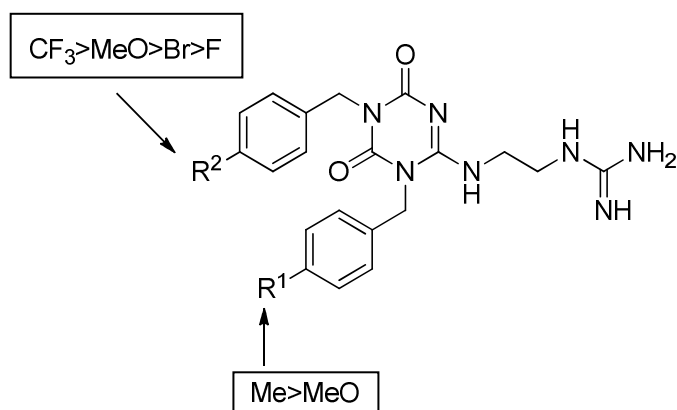


Figure 33: Dérivés triazinediones avec modification des groupements R¹ et R² afin de déterminer l'activité agoniste ou antagoniste des composés (copié de la référence 61 avec modification)⁶¹.

Composé	R ¹	R ²	EC ₅₀ (pmol) [intervalle de fluctuation au seuil de 95%]
PC-1 (référence)	OMe	Et	5.8 [3.6-9.1]
PC-7	OMe	F	0.31 [0.16-0.59]
PC-17	OMe	OMe	0.053 [0.038-0.067]
PC-25	OMe	Br	0.36 [0.17-0.78]
PC-27	Me	CF ₃	0.033 [0.018-0.061]

Tableau 6: Mesure d'EC₅₀ des dérivés triazinediones (copié de la référence 61 avec modification)⁶¹.

Les nocicepteurs périphériques des souris contiennent à la fois les récepteurs PKR1 et PKR2. Les tests réalisés par Balboni et al. ne permettent donc pas d'évaluer la sélectivité pour chaque récepteur. La nociception thermique étant principalement contrôlée par l'activation du récepteur PKR1, ils pourraient donc prédire la liaison de leurs composés triazidiones avec le récepteur PKR1 mais ils ne peuvent pas exclure une liaison possible avec le récepteur PKR2. Cette étude de sélectivité est actuellement un sujet de leurs travaux de recherche⁶¹.

La sécrétion de la prokinétine 2 accroît le volume infarci alors qu'un antagoniste du récepteur PKR2 diminue ce volume ainsi que l'inflammation centrale et améliore les résultats fonctionnels⁵⁸. Ainsi Sapolsky et al. ont étudié l'effet antagoniste d'un dérivé carboxamide de la morpholine : le composé nommé PKR-A (**Figure 35**).

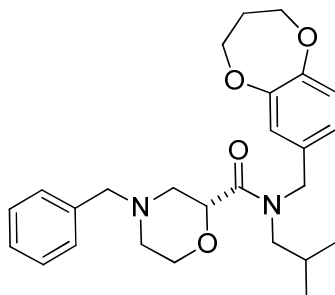


Figure 35: Composé PKR-A ($EC_{50}=48.1 \pm 4.6nM$) (copiée de la référence 58)⁵⁸.

Les résultats ont montré *in vivo* qu'une injection, 30 min après un AVC, du composé PKR-A réduit significativement le volume infarci⁵⁸. Ce composé présente donc un potentiel thérapeutique dans le traitement suite à un AVC.

1.2.3.3. Les sulfonylpipéridines

PKR 1 est exprimé dans différentes zones du cerveau comme les régions olfactives, le cortex cérébral et l'hippocampe. De plus les PKs modulent, entre autre, la neurogenèse mais également la réponse immunitaire. Or les PKs sont associées à des pathologies des systèmes nerveux et reproductif, dans l'infarctus du myocarde et dans la tumorigenèse⁶⁰. Par conséquent, des antagonistes des PKs pourraient être pharmacologiquement intéressants pour le traitement de pathologies tels que le diabète et la douleur⁶⁰. En 2013, Carroll et al. ont breveté une étude sur une nouvelle famille d'antagonistes pour le récepteur PKR1 : des dérivés de la sulfonylpipéridine⁶⁰ (**Figure 36**). Ces composés ont une sélectivité et/ou des propriétés pharmacocinétiques du récepteur PKR1 intéressantes. Ces dérivés de la sulfonylpipéridine pourraient être utilisés dans le traitement ou la prévention des états psychiatriques et neurologiques⁶⁰.

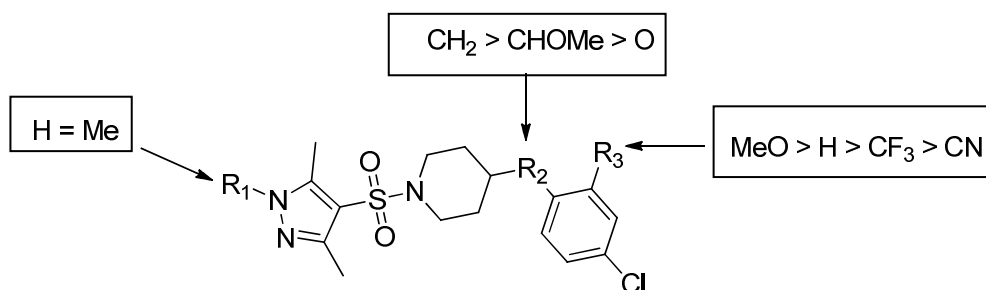


Figure 36: Etude RSA des dérivés de la sulfonypipéridine afin de déterminer l'activité agoniste ou antagoniste des composés (copiée de la référence 60 avec modification)⁶⁰.

Ces antagonistes sont efficaces pour le traitement et la prévention des maladies neurologiques et psychiatriques. Cependant, aucune étude ne décrit des composés efficaces au niveau cardiaque. Nous avons donc pour objectif de découvrir des agonistes du récepteur PKR1, favorables à l'angiogenèse et à la cardio-protection.

1.2.4. Les agonistes du récepteur PKR1 développés au laboratoire

Le récepteur PKR1 est cardio-protecteur et favorise l'angiogenèse. Nous avons donc cherché à découvrir des agonistes pour le traitement du cœur, suite à un infarctus du myocarde.

Pour mener à bien ce projet un partenariat pluridisciplinaire a été constitué rassemblant experts en modélisation, des pharmacochimistes et des biologistes.

Le récepteur PKR 1 n'a, à ce jour, été cristallisé. Il a été modélisé par homologie avec des récepteurs connus. Les études de modélisation montrent que le récepteur présenterait deux poches au sein de ces hélices transmembranaires. Une première poche (en vert) extracellulaire serait le site orthostérique de la prokinéticine. Une deuxième poche (en rouge), plus intracellulaire, serait un site allostérique pouvant accueillir de petites molécules (**Figure 37**).

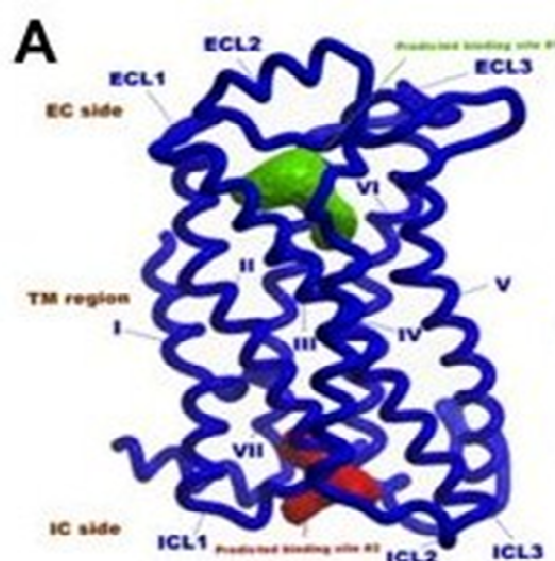


Figure 37: Modélisation du récepteur PKR1.

Simone Brogi dans l'équipe du Professeur Tafi, du laboratoire de chimoinformatique de l'Université de Sienne, a criblé une large base de données chimiques 3D par docking à haut débit (HTD) afin d'identifier des ligands activant le récepteur PKR 1. De ce criblage, dix ligands putatifs se sont distingués. Ils ont donc été achetés et testés *in vitro*. De ces essais deux (**IS 1** et **IS 99**) ont montré des résultats supérieurs. L'un d'eux (**IS 1**, **Figure 39**) a été validé comme agoniste sélectif du récepteur PKR1.

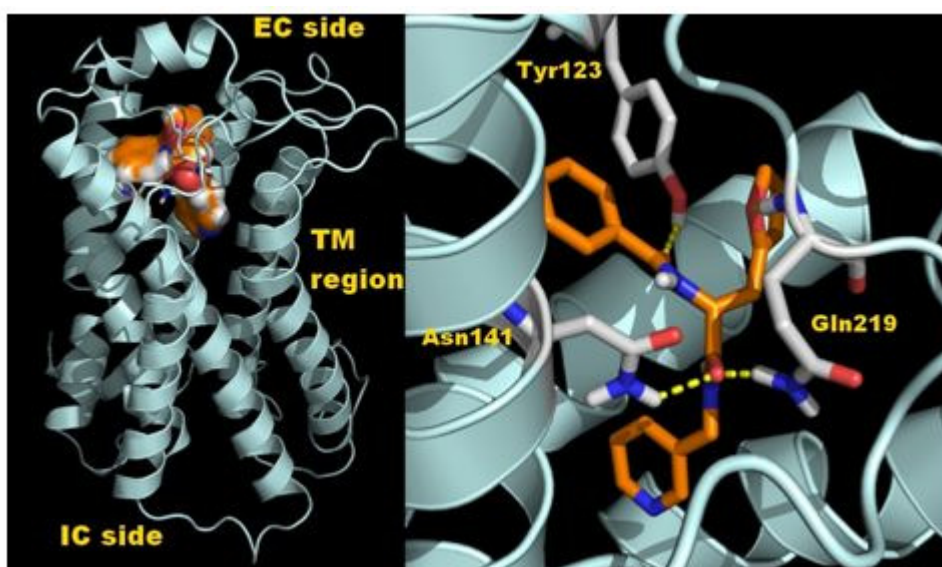


Figure 38: modèle de la touche identifiée par criblage virtuel, dockée dans le site actif du récepteur PKR1. A gauche : ligand lié au récepteur; à droite : zoom sur le ligand (en orange) dans son site actif.

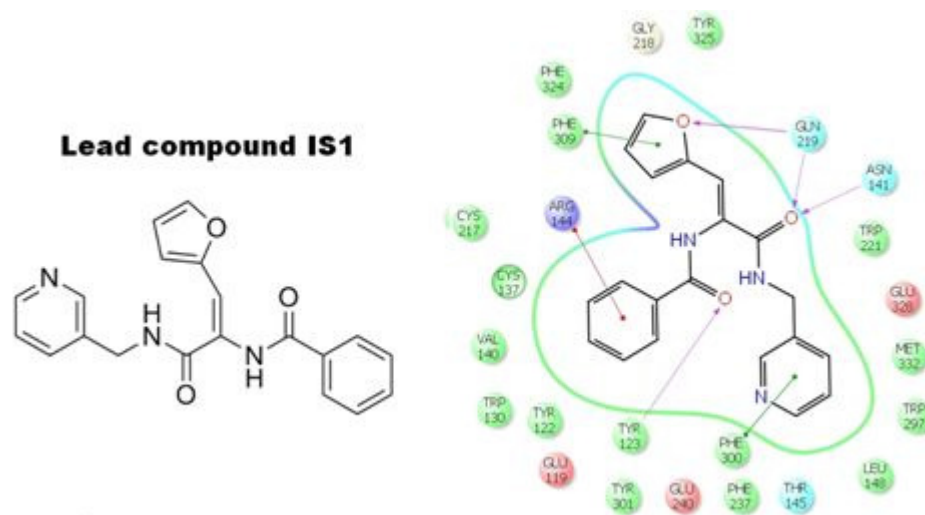


Figure 39: A gauche : Structure d'IS 1; à droite : Interactions principales d'IS 1 identifiées par docking.

L'activité agoniste PKR1 des composés **IS 1** et **IS 99** a été validée par l'équipe du Dr Canan Nebigil dans un test d'angiogenèse *in vitro* (**Figure 40**).

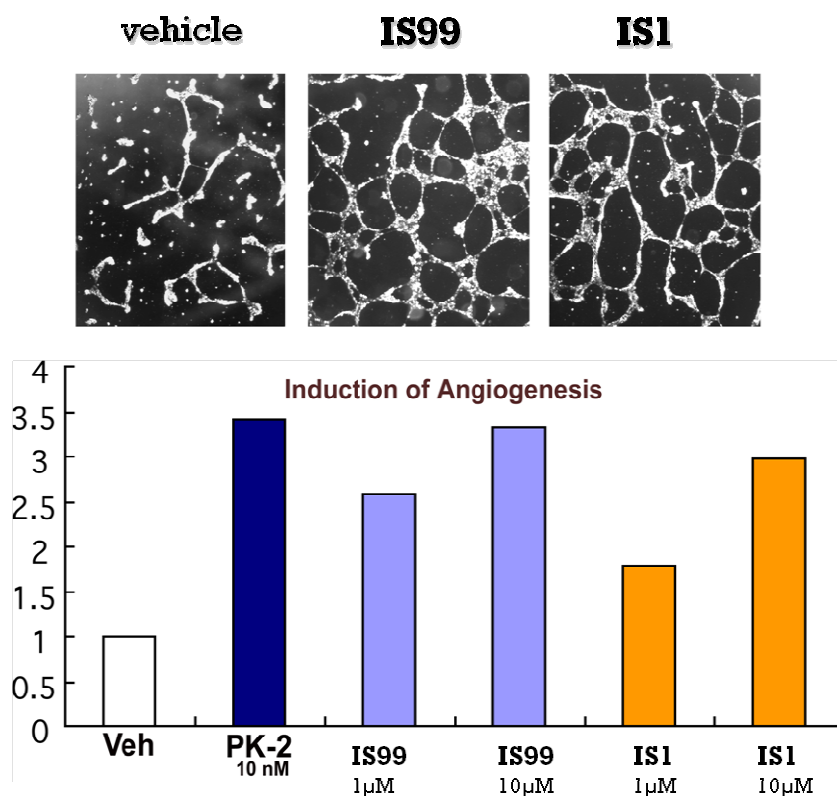
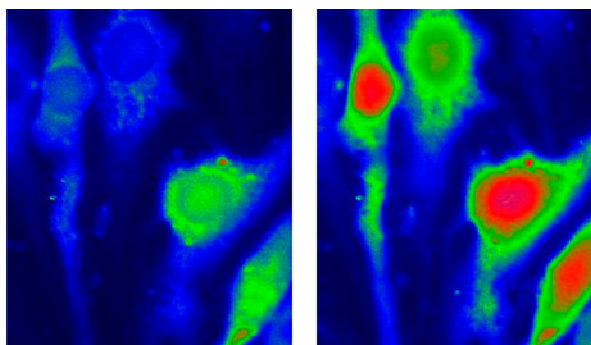


Figure 40: Acitivité angiogénique.

IS 1 a également été testé pour la libération intracellulaire du Ca^{2+} ainsi que pour l'internalisation du récepteur PKR1. **IS 1** montre une activité (**Figure 41**).

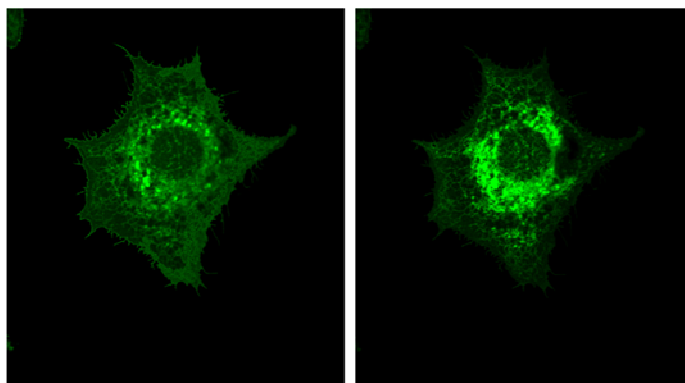
Avant après traitement par IS1



Libération intracellulaire de Ca^{2+}

Before

After IS1 treatment



PKR1 internalization

Figure 41: Libération intracellulaire du Ca^{2+} et internalisation du récepteur.

Dans notre laboratoire, Nigel Ribeiro et Marlette Kyssama ont réalisé une étude de relation Structure-Activité (RSA) du ligand **IS 1**. Un de ces analogues synthétisés (**IS 20**, **Figure 42**) a été identifié comme favorisant l'angiogenèse et activant ERK *in vitro* et Akt *in vivo*. De plus, les études menées par l'équipe de C. Nebigil révèlent qu'**IS 20** est un puissant agent cardio-protecteur contre les dommages causés par la ligature coronaire dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris.

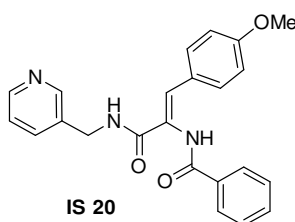


Figure 42: Composé IS 20

Une série d'analogues d'**IS 1** a été synthétisée au laboratoire par Nigel Ribeiro et Marlette Kyssama. Ces composés ont été testés *in vitro* et ont montré une activité pro-angiogénique sur les cellules endothéliales surexprimant PKR 1 pour une concentration de 100 nM (**Tableau 7**).

Cpd	R ¹	R ²	NH-R ³	Fold increase	Cpd	R ¹	R ²	NH-R ³	Fold increase
	Prokineticin-2 (10 nM)			1.48 ± 0.11		Prokineticin-2 (10 nM)			1.48 ± 0.11
IS 1	Ph			1.56 ± 0.16	IS18	2-OMe-Ph			1.23 ± 0.29
IS2	Ph			1.18 ± 0.19	IS19	3-OMe-Ph			1.36 ± 0.35
IS3	Ph			1.02 ± 0.09	IS10	Ph			1.21 ± 0.10
IS4	Ph			1.17 ± 0.27	IS11	Ph			1.10 ± 0.16
IS5	Ph			0.93 ± 0.09	IS12	Ph			1.32 ± 0.18
IS7	Ph			1.14 ± 0.17	IS20	Ph			1.56 ± 0.17
IS9	Ph			1.37 ± 0.12	IS21	Ph			1.28 ± 0.07
IS6	Ph			1.39 ± 0.06	IS22	Ph			1.34 ± 0.22
IS24	Ph		HN-NH ₂	1.32 ± 0.25	IS23	Ph			1.17 ± 0.10
IS14	<i>tert</i> -Bu			0.88 ± 0.30	IS30	Ph			1.16 ± 0.34
IS15	2-Cl-Ph			0.97 ± 0.09	IS26	Ph			1.21 ± 0.01
IS17	4-Cl-Ph			1.17 ± 0.28	IS29	Ph			0.92 ± 0.05

Tableau 7: Activité pro-angiogénique *in vitro* sur des cellules endothéliales à 100 nM sur Matrigel.

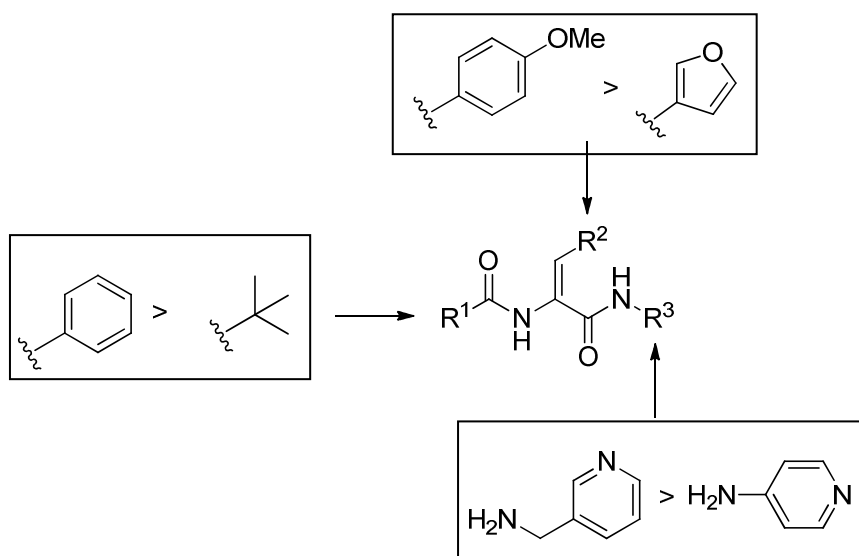


Figure 43: Dérivés de IS1 afin d'identifier agoniste de PKR 1.

D'après les résultats *in vitro* les composés **IS 1** et **IS 20** présentent les meilleurs résultats. Nous allons donc poursuivre l'étude de RSA sur le composé **IS 20**.

2. OBJECTIFS

Mon projet de recherche a eu pour objectif principal la synthèse d'agonistes non-peptidiques du récepteur PKR1 afin d'identifier des candidats potentiels pour la régénérescence cardiaque suite à un infarctus du myocarde. Cette étude est réalisée dans la continuité des travaux effectués précédemment au laboratoire. De plus, nous souhaitons produire une sonde fluorescente pour développer un test de liaison au récepteur PKR1 et accéder aux techniques d'imagerie par microscopie confocale.

Pour cela, mon travail de thèse s'est articulé autour des trois axes suivants :

- 1- la synthèse de dérivés déhydrotyrosine et tyrosine
- 2- la synthèse d'une sonde fluorescente d'un agoniste PKR1
- 3- la synthèse d'une nouvelle famille d'agonistes non-peptidiques : les quinoléines.

L'objectif de mon premier projet était de poursuivre l'étude de la relation structure activité (RSA) autour de la touche **IS 1** originellement identifiée par modélisation moléculaire. De précédentes études et synthèses de **IS1** et dérivés ont été réalisées au laboratoire par Nigel Ribeiro et Marlette Kyssama. Ces composés ont été testés *in vitro* et ont ainsi permis de déterminer une orientation plus ciblée du travail à effectuer.

Le second axe de mes travaux de recherche a été la synthèse d'une sonde fluorescente. Cette sonde permettra d'accéder à un test par transfert de fluorescence (FRET) dans lequel le récepteur PKR1 est fusionné à la protéine GFP afin d'évaluer la liaison de nouveaux composés. Cet outil permettra également d'isoler des cellules, en particulier d'EPDC, exprimant PKR1 à leur surface par cytométrie en flux (FACS) et d'évaluer la liaison de nouveaux composés par des études de compétition.

Suite à une étude de modélisation moléculaire, une nouvelle touche agoniste non-peptidique a été identifiée. Ce composé, dérivé de quinoléine, constitue mon troisième projet. Il a pour but la synthèse de la touche d'origine et l'étude de la relation structure-activité autour de cette quinoléine via la synthèse d'analogues.

Au cours de ce dernier projet, nous avons découvert, de manière fortuite, une nouvelle réaction donnant accès à des composés pentacycliques multi-fonctionnels. Nous avons donc eu pour objectif complémentaire de caractériser, développer et mettre au point cette réaction à trois composantes.

Ce projet de recherche a été mené en collaboration avec l'équipe du Pr Tafi du laboratoire de chémoinformatique de l'université de Sienne pour la modélisation moléculaire et l'équipe du Dr Canan Nebigil de l'UMR 7242 à Illkirch pour les tests biologiques.

3. RESULTATS

3.1. Dérivés de la déhydrotyrosine et de la tyrosine

3.1.1. Synthèse

3.1.1.1. Remplacement d'un des amides d'IS20 par des amides cyclohexaniques

Le premier projet de ma thèse a été de synthétiser un dérivé d'**IS 20** en remplaçant la partie benzoyle par un cycle saturé afin de terminer l'étude RSA précédemment entreprise. Cette étude nous permettra de déterminer l'importance de l'aromaticité portée par le composé **IS 20**.

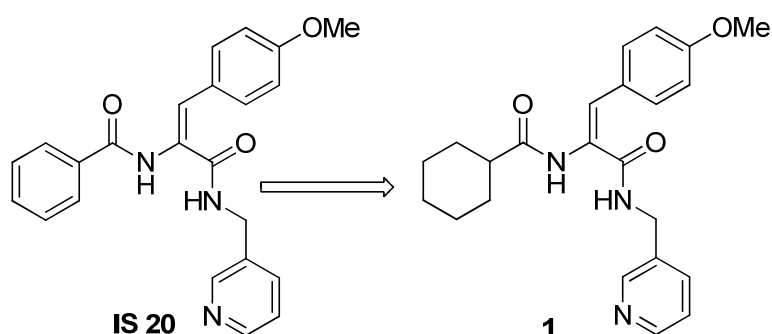


Figure 44 : Modification de IS 20

Synthèse modèle.

La synthèse de **1** commence par la condensation de la glycine avec le p-anisaldéhyde⁶² (**Schéma 1**). L'amine du composé **2** est ensuite protégée avec le chloroformate de benzyle⁶³. L'acide carboxylique **3** est ensuite couplé avec la 3-(aminométhyl)pyridine en utilisant les agents de couplage HOBt et EDCI⁶⁴. Après déprotection de l'amine⁶³ avec H₂,Pd/C, le composé **5** est mis en réaction, via un couplage peptidique, avec l'acide cyclohexanoïque⁶⁴ pour donner l'intermédiaire **6**.

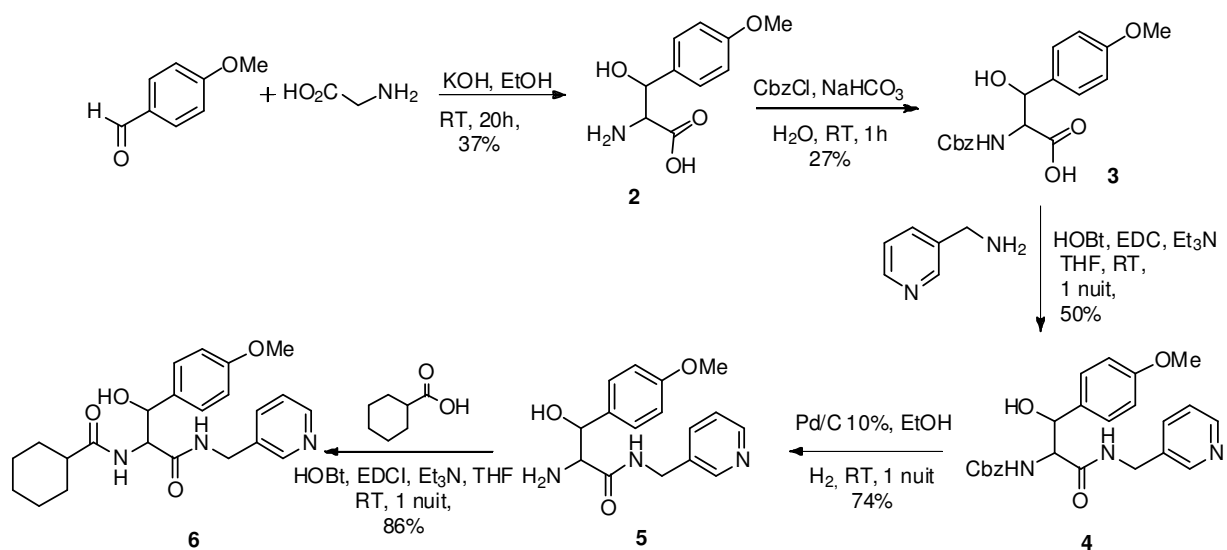


Schéma 1: Voie de synthèse du composé 1.

Pour déshydrater l'alcool **6**, nous l'avons préalablement benzoylé⁶⁴ avant de le traiter avec du DBU selon une stratégie décrite par Nobuharu Shigematsu et al⁶². Nous n'avons obtenu que des produits de dégradation (**Schéma 2**). Nous n'avons pas effectué d'autres essais pour cette voie de synthèse.

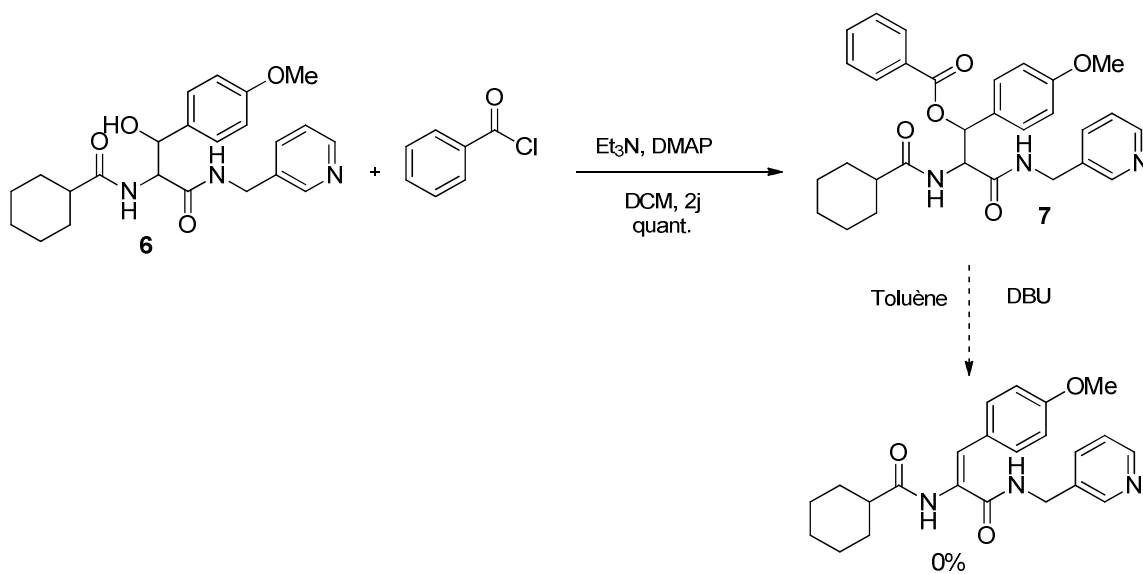


Schéma 2: Essai de déshydratation de l'alcool 6.

Notre deuxième stratégie de synthèse a été de benzoyler l'amine **2** directement (**Schéma 3**). Cependant, le produit isolé n'est pas le produit de couplage souhaité mais l'azalactone **8**.

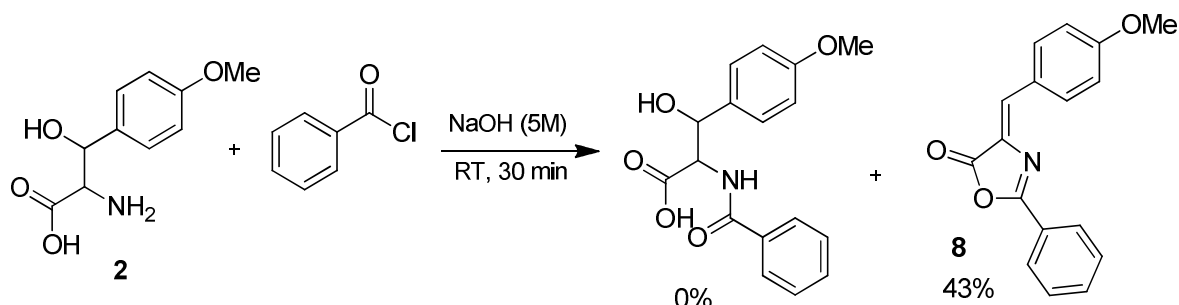


Schéma 3: Deuxième stratégie

En parallèle, nous avons effectué la synthèse de composés dérivés de la tyrosine, également déterminés par modélisation moléculaire et dont la synthèse est décrite dans la partie 3.1.1.2. Comme les premiers tests biologiques de ces composés ont révélé une activité supérieure à celle d'**IS 20**, nous avons privilégié la synthèse de cette famille et nous n'avons pas poursuivi la synthèse du composé **1**.

3.1.1.2. Passage d'**IS20** à un dérivé de la Tyrosine.

Une deuxième partie de mon travail a été d'améliorer le profil pharmacologique de notre ligand **IS 20** en préparant des dérivés de la *O*-méthyltyrosine (**Figure 45**).

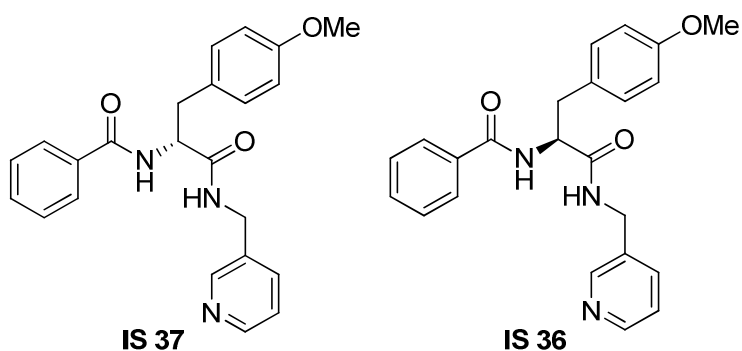


Figure 45: Dérivés de la tyrosine IS36 et IS37.

Pour cela, les (D ou L)-Boc-O-méthyl-tyrosine ont été couplées avec la 3-(aminométhylpyridine)⁶⁴ avant d'être benzoylées (dans les conditions de Schotten-Baumann) (**Schéma 4**). Les synthèses ont été réalisées en parallèle à partir des produits commerciaux mais sont représenté sur un même schéma.

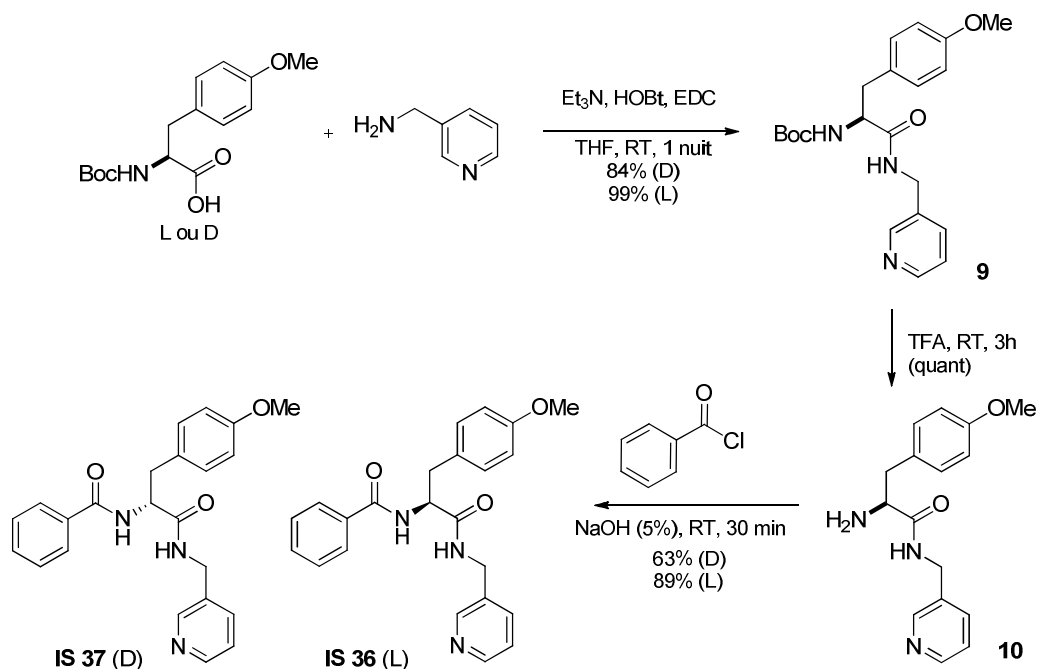


Schéma 4: Voie de synthèse des composés IS 36 et IS 37.

Les tests *in vitro* réalisés sont décrits dans 3.1.2 *Etude pharmacologique*. Ces résultats ont montré que le dérivé **IS 37** présente une activité supérieure à celle de **IS 20**. Nous allons donc poursuivre nos études à partir du composé **IS 37**.

3.1.1.3. Remplacement de la partie amide d'**IS 37** par des amides cyclohexaniques

Les résultats biologiques montrant que le composé **IS 37** a une forte activité (1.7 contre 1.4 pour **IS 36** pour une concentration de 10 nM), nous nous orientons donc vers la synthèse de dérivés d'**IS 37** avec des amides cyclohexaniques (**Figure 46**).

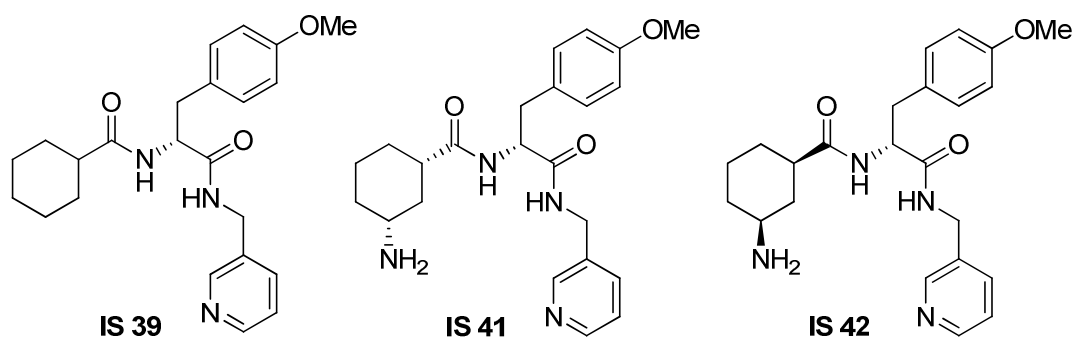


Figure 46: Composés portant des cyclohexaniques.

Nous avons commencé par la synthèse d'un premier dérivé : **IS 39**. Pour cela, nous utilisons la même synthèse que pour les composés **IS 36** et **IS 37** (Schéma 5).

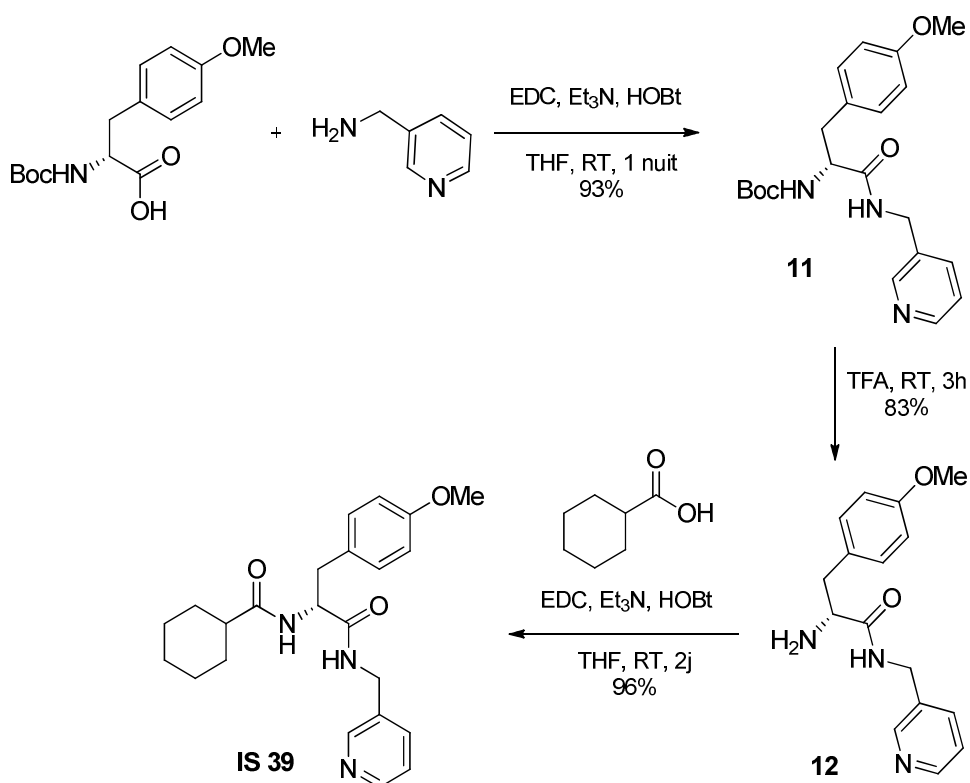


Schéma 5: Synthèse du composé **IS 39**.

Les études de modélisation moléculaires réalisées par l'équipe du Pr Tafi ont montré qu'une fonction amine libre en position 3 sur le cyclohexyle pourrait améliorer l'activité agoniste de nos dérivés. Les synthèses des composés **IS 41** et **IS 42** sont

similaires à celle du composé **IS 39**. Une étape de protection de l'amine de l'acide 3-aminocyclohexanecarboxylique est nécessaire avant le couplage avec l'amine **12**⁶⁵. La réaction de protection pour l'acide (1*S*,3*R*)-3-aminocyclohexanecarboxylique conduit à une épimérisation partielle de 10% de l'acide **13**. Pour l'acide (1*R*,3*S*)-3-aminocyclohexanecarboxylique, la réaction conduit au composé protégé mais également à un produit secondaire : l'anhydride **14** est obtenu avec un rendement de 34% (**Schéma 6**). Les rendements des mélanges **13** et **14** ont été déterminés par RMN.

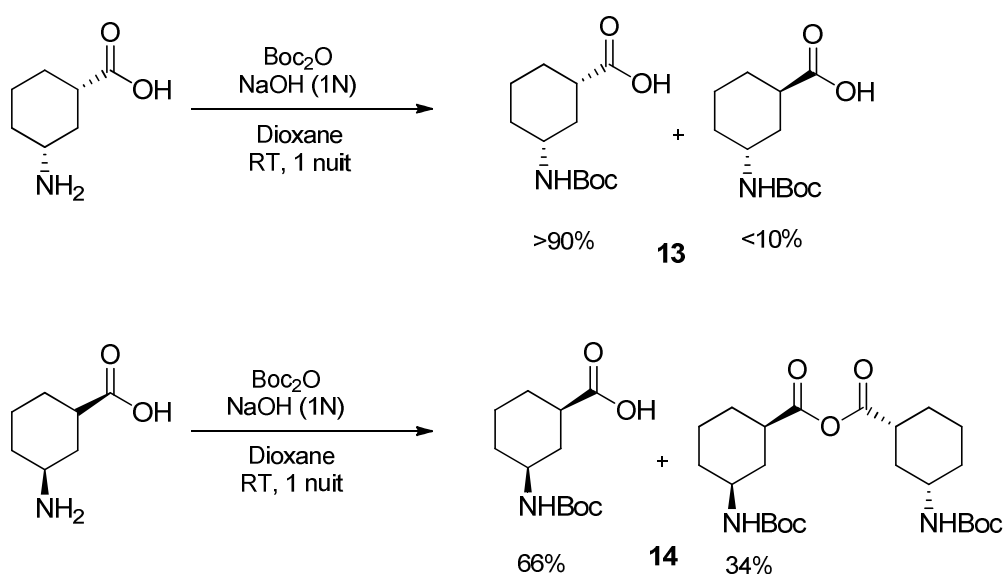


Schéma 6: Synthèse des composés 13 et 14.

Les mélanges **13** et **14** n'ont pas été séparés après purification. En effet, pour le mélange **13**, le produit d'épimérisation est en faible quantité et co-élue avec le produit voulu. Pour le mélange **14**, l'anhydride symétrique peut réagir afin de donner le produit de couplage souhaité. Les mélanges **13** et **14** sont donc couplés avec l'amine **12**⁶⁶ pour donner respectivement les composés **15** et **16** (**Schéma 7**). Ces composés sont ensuite déprotégés avec du TFA dans le DCM afin d'obtenir respectivement les composés finaux **IS 41** et **IS 42** (**Schéma 7**).

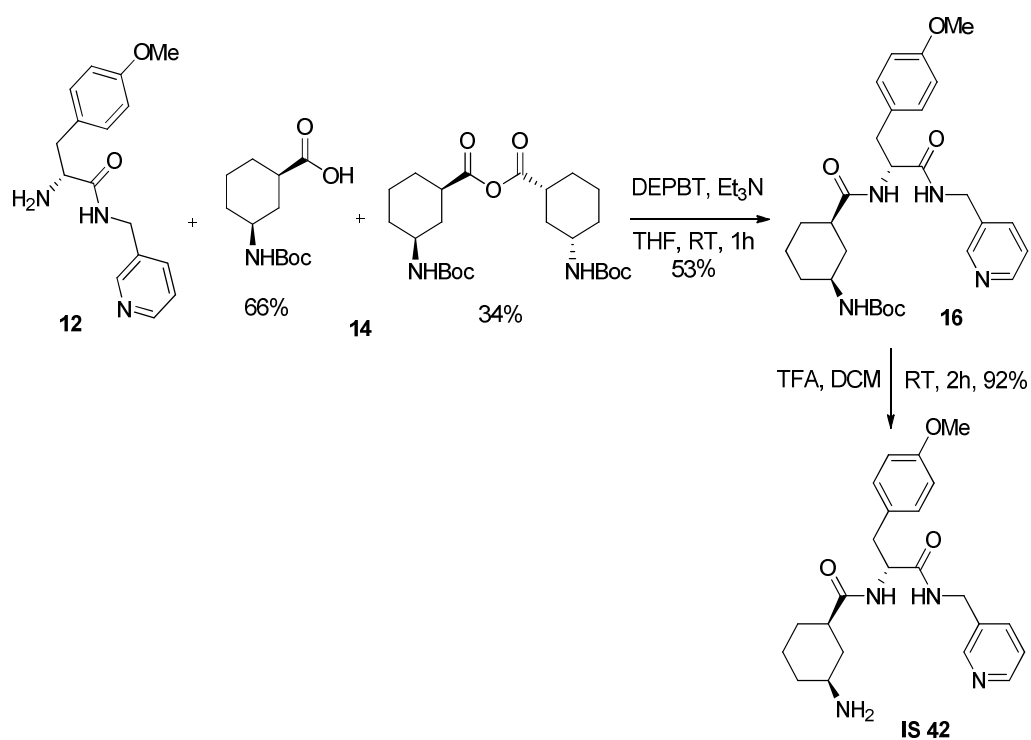
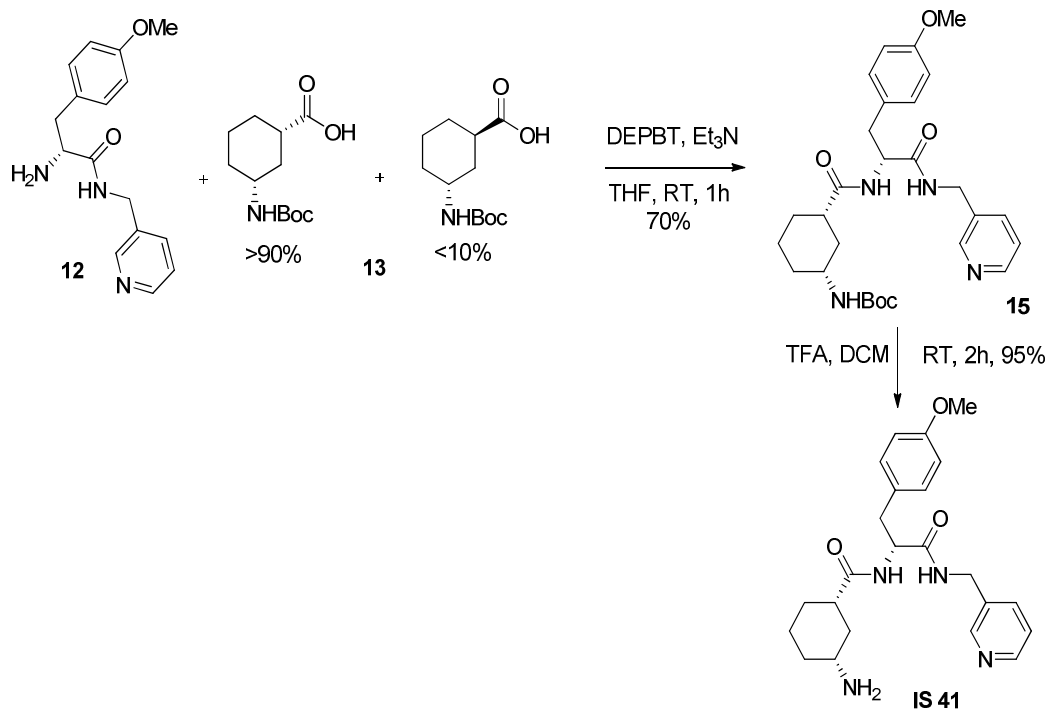


Schéma 7: Synthèse des composés IS 41 et IS 42.

Pour ces synthèses nous avons utilisé un nouvel agent de couplage : le DEPBT. Cet agent de couplage a pour avantage de diminuer le temps réactionnel et de plus il diminue les risques de racémisation. Le produit **16** n'est obtenu qu'avec 53% de rendement. Cependant, aucune présence d'anhydride n'a été observée. Ce rendement peut s'expliquer par une perte de produit lors de la purification et non par une réactivité plus faible de l'anhydride.

3.1.2. Etude pharmacologique

3.1.2.1. Activité angiogénique

Les composés **IS 36**, **IS 37**, **IS 38** et **IS 39** (**Figure 47**) ont été testés *in vitro* afin de comparer leurs effets pour la formation de tube des cellules endothéliales exprimant PKR1 sur support Matrigel. Le composé **IS 38** est issu de la synthèse de la sonde fluorescente décrite dans la partie 3.2 *Synthèse d'une sonde fluorescente*. Les dérivés **IS 41** et **IS 42** sont en cours de tests *in vitro*. Leurs résultats ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

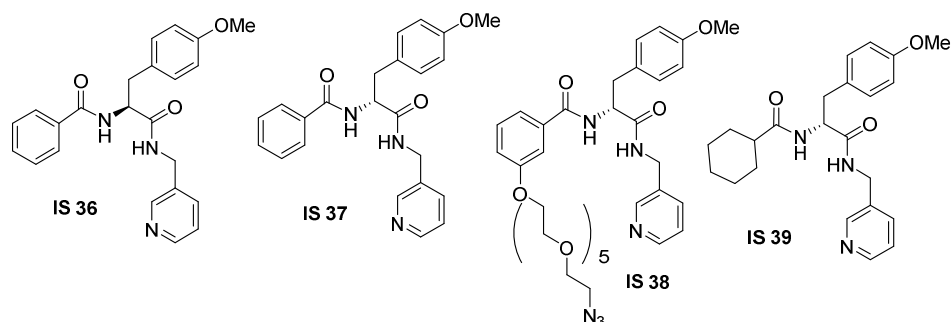


Figure 47: Structure des composés IS testés *in vitro*.

Ces études servent de modèle d'angiogenèse *in vitro*. Le support Matrigel permet la différenciation de plusieurs types de cellules et induit la formation et l'organisation des cellules endothéliales en capillaires. Les cellules H5V (cellules endothéliales coronaires), cultivées dans un milieu avec 0.05% FCS (Sérum de fœtus de veau), ont été traitées par différentes concentrations de composés. Les tubes formés sont caractérisés par leur structure en forme de ramification à deux dimensions. Après 18h de traitement, des images sont prises grâce à une caméra

digitale couplée au microscope optique inversé en contraste de phase. Les points de ramification sont quantifiés dans cinq domaines aléatoires de chaque échantillon⁶⁷.

Afin d'évaluer l'effet angiogénique de la signalisation de la prokinéticine sur le cœur, une lignée de cellules H5V est déposée sur un support Matrigel. Elles sont ensuite traitées par différentes concentrations de prokinéticine 2 (de 5 nM à 15 nM) ou de son véhicule pendant 24h.

Ce traitement permet de quantifier la formation de vaisseaux en tant que modèle *in vitro* de l'angiogenèse. Le traitement par la prokinéticine 2 induit une formation de vaisseaux sept fois plus importante que le traitement par le véhicule seul. De plus, une surexpression trois fois plus importante de PKR1 dans les cellules H5V infectées par un adénovirus portant le gène PKR1 induit la formation de vaisseaux huit fois supérieure à celle du témoin. Ces données montrent l'implication de PKR1 dans l'angiogenèse. Les cellules H5V surexprimant PKR1 sont ensuite traitées par les composés synthétisés afin de déterminer leur activité angiogénique⁶⁷.

Nos composés **IS** ont donc été testés sur Matrigel à différentes concentrations (10nM, 100nM et 1µM). Leurs activités ont été comparées à celle d'**IS 20**, précédemment évaluée. Les résultats indiquent que **IS 36** et **IS 37** sont plus actifs, avec une activité supérieure pour **IS 37**. **IS 38**, intermédiaire pour la sonde fluorescente et portant un espaceur, présente une légère diminution de l'activité. L'introduction d'un espaceur n'inhibe donc pas l'angiogenèse. L'activité est inchangée lors du test d'**IS 39**. Ainsi la substitution d'un groupement phényle par un cyclohexyle n'influence pas l'activité. Cela suggère donc que le caractère hydrophobe du site de liaison est plus important que son caractère aromatique. Les résultats sont représentés **Figure 48**.

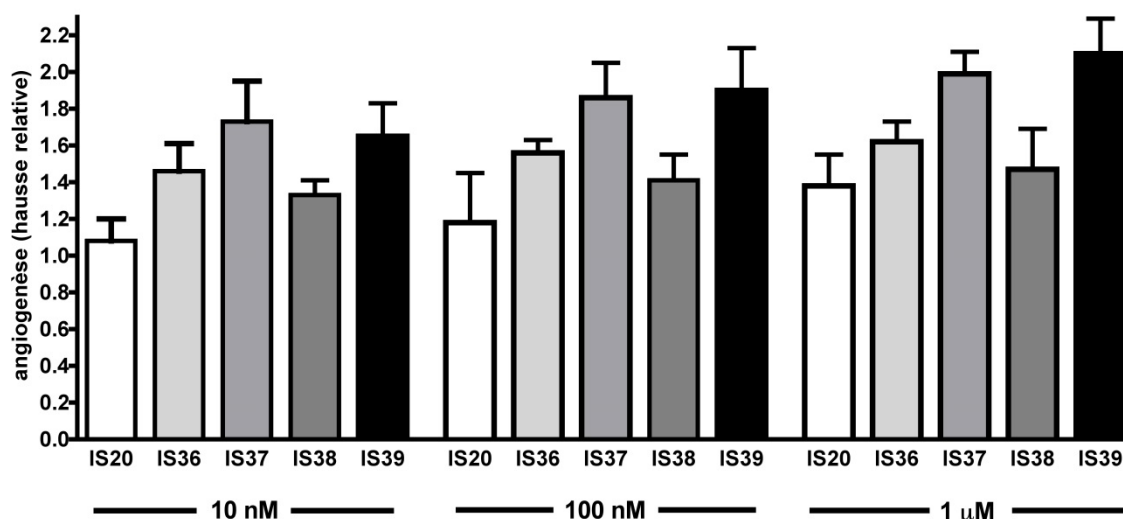


Figure 48: Effet des composés IS 20, 36-39 sur la formation de tubes par les cellules endothéliales H5V qui surexpriment PKR1 humain (par infection avec un adénovirus portant ce gène). Les tubes formés sont caractérisés par leur structure en forme de ramification à deux dimensions. Après 18h de traitement, des images sont prises au grossissement 5x grâce à une caméra digitale couplée au microscope optique inversé en contraste de phase.

3.1.2.2. Cardioprotection des EPDC

La doxorubicine (DOXO) est un anti-cancéreux très efficace de la famille des anthracycliques. Le facteur limitant de son utilisation thérapeutique est le fait qu'elle induit une cardiotoxicité. Les analyses de cardiomyopathies induites par DOXO sur le cœur humain montrent une rapide apoptose, un raccourcissement des télomères et un vieillissement prématuré des cellules progénitrices cardiaques (CPC). Les propriétés fonctionnelles de ces cellules sont également affectées ainsi que leurs lignées cellulaires différenciées. Ces altérations fonctionnelles et les lignées cellulaires issues des CPC traitées par DOXO peuvent induire des faiblesses dans la régénération cardiaque⁶⁸.

La signalisation de PKR1 induit une forte cytoprotection des EPDCs contre la toxicité de la doxorubicine (*Canan Nebigil and coll, données non-publiées*).

Les composés les plus actifs sont **IS 37** et **39**. Ils ont donc été sélectionnés pour les tests de cardioprotecteurs d'EPDC contre l'apoptose induite par la doxorubicine. Pour cela, l'équipe de C. Nebigil a isolé des EPDC humaines en collaboration avec le Pr P. Ohlmann et le Dr M. Kindo (Université et CHU de

Strasbourg). Des effets significatifs ont été observés dans ce test et **IS 39** semble être encore plus actif que **IS 37** (**Figure 49**).

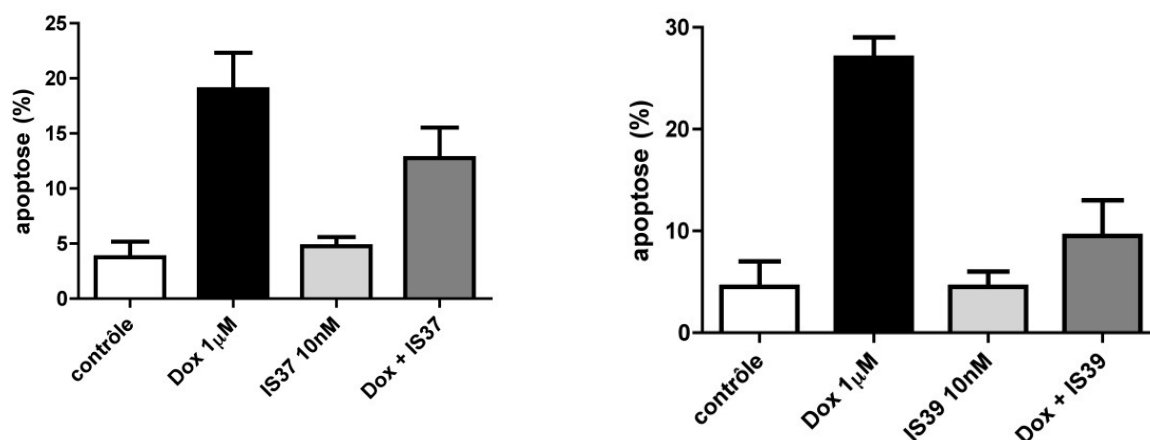


Figure 49: Effet protecteur de IS37 et IS39 sur la cardiotoxicité induite par DOXO sur des cellules hEPDC.

3.1.2.3. Comparaison de l'activité *in vivo* avec un biomarqueur

Ce test permet de démontrer que les composés **IS 37** et **IS 39** activent *in vivo* un biomarqueur chez la souris, plus spécifiquement l'activation d'Akt.

Le cœur et les poumons expriment PKR1. La signalisation de PKR1 induit une rapide phosphorylation d'Akt, activant cette kinase. Pour effectuer ce test, les souris sont tuées dix minutes après l'injection et leurs tissus sont récoltés pour l'extraction de protéines. Les échantillons de tissus sont ensuite homogénéisés dans un tampon de lyse. Les protéines en sont extraites puis sont analysées par Western blot avec des anticorps dirigés contre phospho-Akt Ser473, phospho-Akt Thr308 ou Akt. Les résultats du tableau montrent que dans ce test **IS 37** et **IS 39** agissent *in vivo* d'une manière similaire à celle de la PK2 (**Tableau 8**).

composés	cœur	poumons
véhicule	1	1
IS37	13.2	3.6
IS39	9.7	4.8

Tableau 8: hausse relative de la phosphorylation d'Akt dans le cœur et les poumons après injection d'IS37 et IS39 (50 mg/kg i.p.) (n=2, différentes souris). 10 minutes après l'injection, les souris sont sacrifiées, et après homogénéisation des tissus et extraction des protéines, le taux relatif d'Akt phosphorylé est quantifié par Western blot.

En résumé, nous avons découvert deux nouvelles molécules, **IS 37** et **IS 39**, qui protègent *in vitro* les cellules progénitrices humaines de type EPDC dans un modèle de cardiotoxicité induite par un médicament utilisé en oncologie : la doxorubicine. Il a également été démontré que ces deux composés peuvent activer Akt *in vivo* chez les souris.

3.2. Synthèse d'une sonde fluorescente

Considérant que les composés de la série IS se lient à un site allostérique différent de celui du site orthostérique, et qu'il n'y a pas de compétition entre le composé **IS 1** et le ¹²⁵I-MIT radiomarké pour la liaison au récepteur PKR1, nous avons cherché à développer une sonde de fluorescence susceptible d'évaluer la liaison de nos composés à ce récepteur fusionné à une protéine fluorescente verte (GFP) par transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET). Le FRET est décrit comme un transfert d'énergie sans émission de lumière (non radiatif). Ce transfert est le résultat d'une interaction dipôle-dipôle entre un accepteur et un donneur d'énergie. Pour cela il est nécessaire que le spectre d'émission du donneur recouvre, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur⁶⁹ (**Figure 50**).

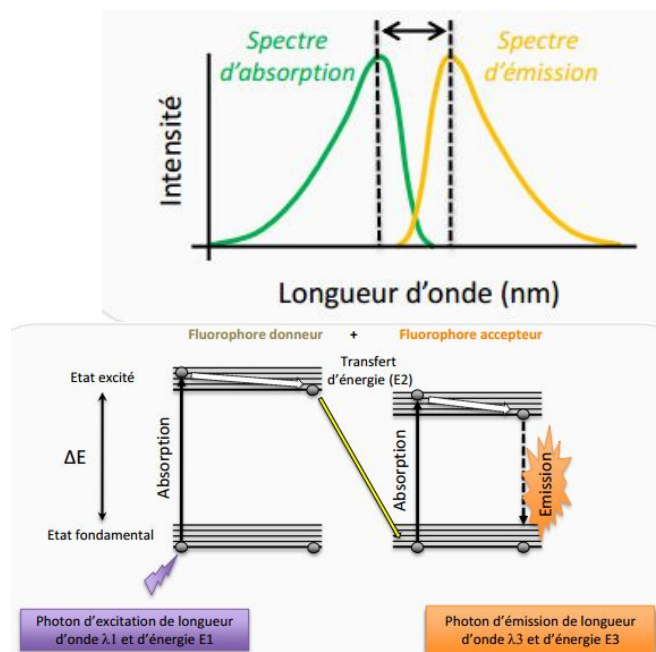


Figure 50: Principe du FRET (copiée de la référence 69)⁶⁹.

Le fluorophore choisi est compatible avec les expériences de FRET. Ce ligand fluorescent pourra par ailleurs être également utilisé dans des études de microscopie confocale pour suivre la liaison et le trafic cellulaire du ligand et de son récepteur. Une autre application concerne l'utilisation de cette sonde pour isoler par cytométrie en flux (FACS) des cellules exprimant PKR1, en particulier des EPDCs. On peut aussi envisager d'utiliser cette sonde pour évaluer la liaison de nouveaux composés par des études de compétition par FACS.

3.2.1. Synthèse

3.2.1.1. Synthèse de la sonde fluorescente dérivée d'IS 1

Le but de cette synthèse est de coupler la touche **IS 1**, précédemment préparé au laboratoire, avec un fluorophore émettant dans le rouge (**Figure 51**).

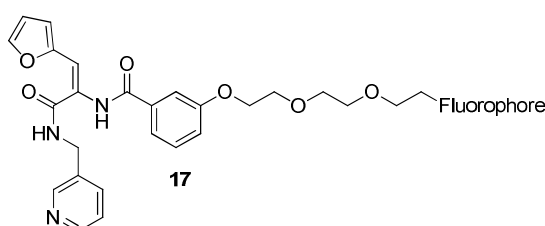


Figure 51: Première sonde fluorescente.

Nous avons choisi un fluorophore émettant dans le rouge car il présente plusieurs avantages. En effet, ce sont des fluorophores sensibles et sélectifs. De plus, le fait d'émettre dans le rouge permet de réduire le bruit de fond, les fluorophores sont moins chers et ont une faible autofluorescence. Ce sont également de bons outils pour le travail en milieu biologique notamment sur les cellules humaines car ils réduisent les dommages cellulaires. De plus il absorbe à la longueur d'émission de la GFP et permet ainsi le test de FRET. Il existe plusieurs familles de fluorophores émettant dans le rouge : les rhodamines, les naphtoxanthènes, les phénanthridines, les BODIPY, les cyanines. Cette dernière famille est notamment utilisée comme marqueur d'ADN et comme capteur potentiel de membrane.

De plus, les fluorophores cyanines sont couramment utilisés comme marqueurs biomoléculaires et sont actuellement des fluorophores standards dans différentes analyses biologiques. Ainsi, en dépit de leur faible rendement quantique, les cyanines ont été retenues et plus précisément la Cy3.

Afin que la sonde soit plus fonctionnelle, nous avons décidé d'introduire un groupement espaceur (triéthylèneglycol) entre la molécule **IS 1** et le fluorophore. La présence du triéthylèneglycol dans la molécule permettra d'éviter la formation d'agrégat lors de l'introduction de la sonde fluorescente en milieu aqueux. En effet, ce motif induit la formation de liaisons H avec l'eau, entraînant la linéarisation de l'espaceur de la sonde fluorescente.

La première étape est la formation de l'ester méthylique **18** à partir de l'acide m-hydroxybenzoïque⁷⁰. Ce dernier réagit avec le 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthanol pour donner le produit **19**⁷¹. La fonction alcool est substituée par un azoture⁷² (composé **21**), en passant par le tosyle⁷³ **20**. Après saponification⁷⁴, l'acide **22** est couplé au N-hydrosuccinimide⁷⁵ donnant le composé **23**. Cette activation permet l'introduction de la glycine **24**. Après la réaction de condensation avec la glycine⁷⁵, le composé **24** réagit avec le furaldéhyde dans la réaction d'Erlenmeyer⁷⁶ pour donner l'azalactone **25**. L'ouverture de celle-ci par la 3-aminométhylpyridine n'a pas été observée. Nous avons obtenu uniquement des produits de dégradation (**Schéma 8**).

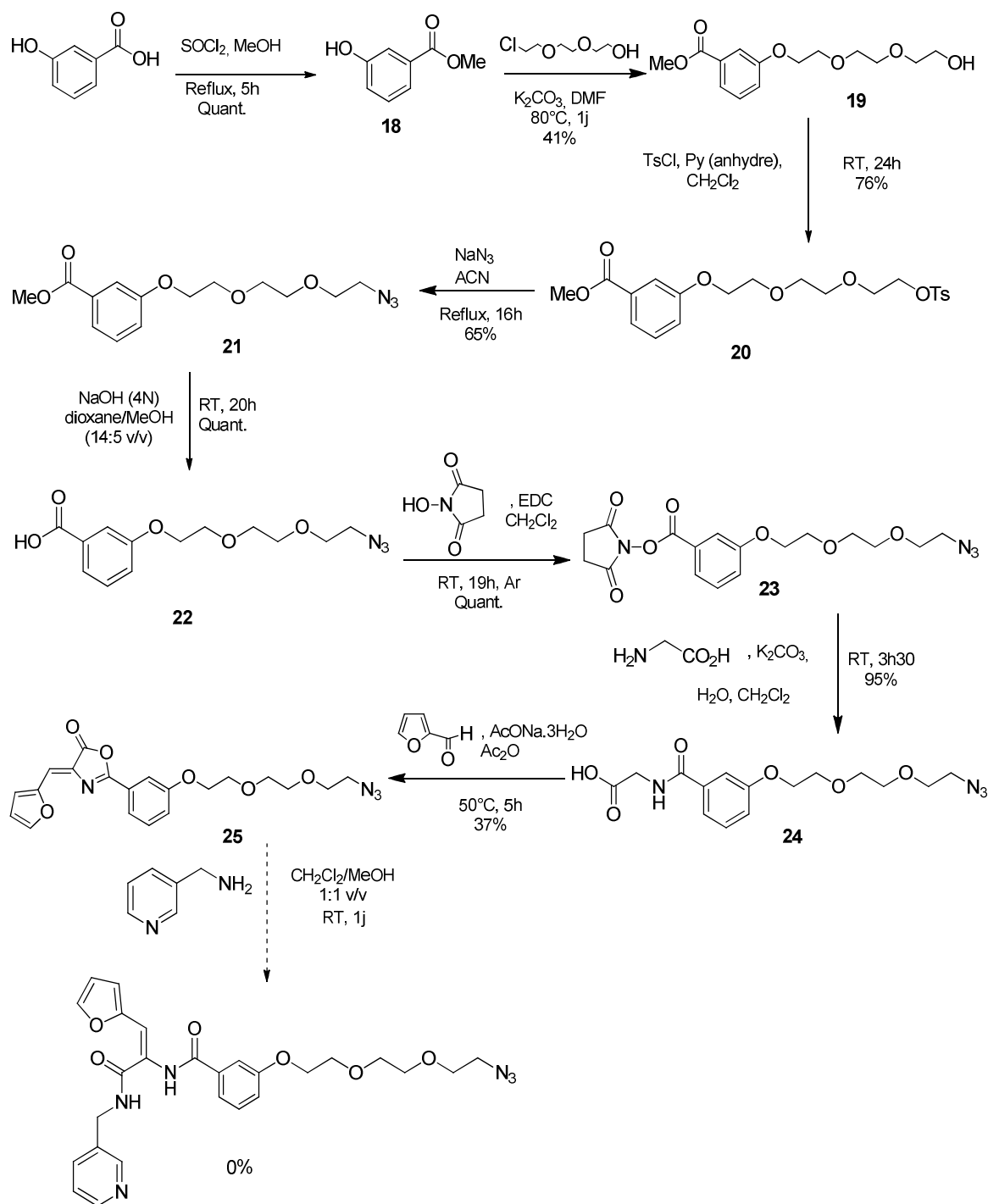


Schéma 8: Synthèse de la sonde fluorescente 17.

L'ouverture de l'azalactone n'a donné que des produits de dégradation. Le dérivé **IS 37** ayant une activité supérieure à celle de **IS 20**, nous n'avons pas poursuivi les études pour cette synthèse, mais nous avons essayé une nouvelle voie de synthèse à partir de **IS 37**.

3.2.1.2. Synthèse de la sonde fluorescente dérivée d'**IS 37**

Cette voie de synthèse n'étant pas concluante, nous avons donc opéré certains changements. La première modification de synthèse a été de prendre un groupement espaceur plus long : le pentaéthylèneglycol. Le deuxième changement concerne la partie peptidique. En effet, un dérivé de la tyrosine utilisé pour la synthèse de **IS 36** et **IS 37** a remplacé le dérivé furanoïque de **IS 1**. Le composé **IS 37** ayant montré de meilleurs résultats biologiques, il est donc plus intéressant pour constituer la partie peptidique de la sonde fluorescente (**Figure 52**).

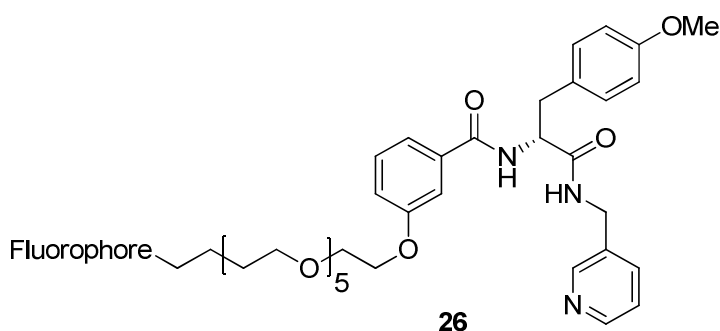


Figure 52: Deuxième sonde fluorescente

3.2.1.3. Synthèse du groupement espaceur et fixation du motif peptidique

Pour cette partie de la synthèse, nous avons fonctionnalisé l'alcool en bout de chaîne du composé **27** par un tosyle. Ce tosylate est ensuite conjugué à l'hydroxybenzoate de méthyle avec le même mode opératoire que pour l'alcool **19**⁷¹. Le composé **29** obtenu donne, après saponification⁷⁴, l'acide **30** qui est couplé avec l'amine **12**⁶⁴ (**Schéma 9**).

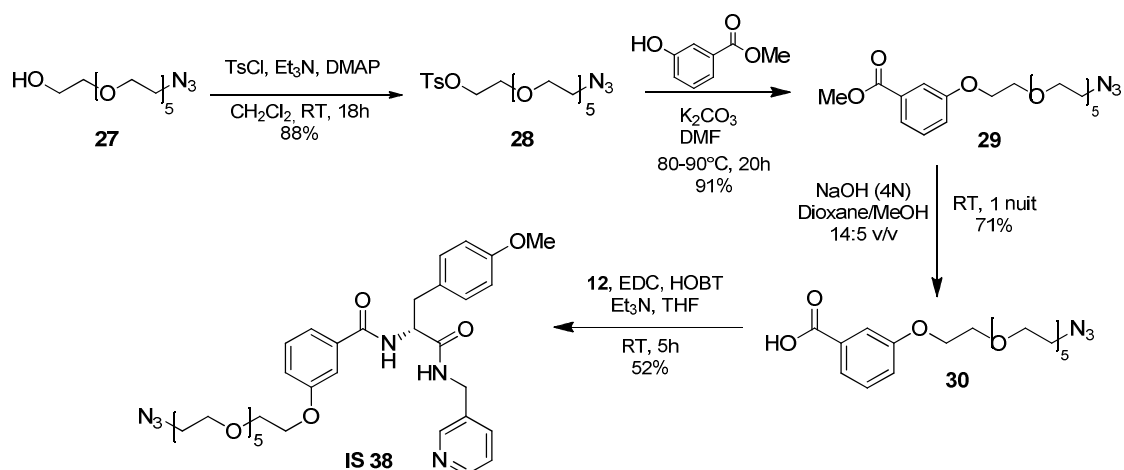


Schéma 9: Synthèse du composé IS 38.

Le produit **IS 38** a été testé pour l'activation de ERK (*partie 3.1.2.1*). Il a été démontré dans cette partie que **IS 38** n'inhibe pas l'angiogenèse et reste un bon candidat pour la sonde fluorescente.

3.2.1.4. Couplage avec le fluorophore

Le Fluorophore choisi est Cy3-NHS (**Figure 53**):

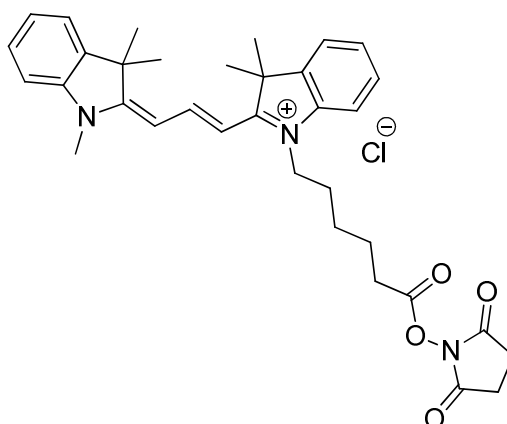


Figure 53: Fluorophore Cy3-NHS.

Initialement nous avons choisi le fluorophore Cy-3 portant un groupement NHS en bout de chaîne pour le coupler avec l'amine libre issue de la réduction du

composé **IS 38**. La réduction du groupement N_3 par hydrogénation a entraîné la réduction de la pyridine. Suite à ces résultats nous avons réorienté notre stratégie de synthèse en optant pour une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

Pour cela, nous avons, dans un premier temps, couplé Cy3-NHS avec la propargylamine⁷⁷. Le composé **31** a ensuite été engagé avec **IS 38** (**Schéma 10**).

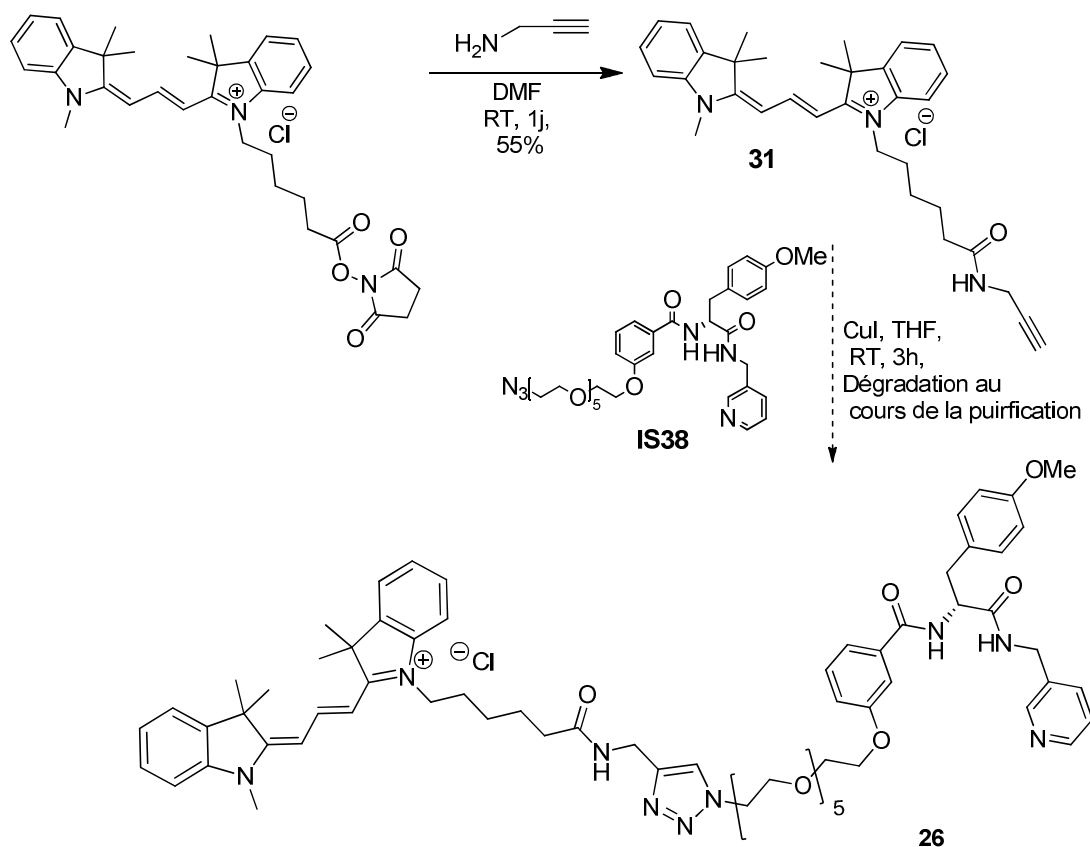


Schéma 10: Synthèse du composé 26.

Le produit final **26** a été observé par LC-MS mais n'a pu être isolé car il s'est dégradé lors des purifications. Il semble donc que la réaction de cycloaddition ne soit pas une bonne stratégie pour la synthèse de la sonde fluorescente car le fluorophore Cy3 est sensible en milieu très faiblement acide. En effet, une première partie du composé s'est dégradée au cours d'une première purification par HPLC dont la phase mobile contenait 0.1% de TFA.

Une seconde purification a été faite sur plaque de silice et le produit s'est totalement dégradé. Il apparaît donc que la simple acidité de la silice suffit à dégrader Cy3.

La totalité du produit **26** ayant été perdue au cours des purifications nous avons donc mis en œuvre une troisième stratégie. Pour cela, nous avons remplacé l'azoture par une amine protégée par un boc. Nous avons envisagé un couplage peptidique entre le groupement espaceur et Cy3-COOH.

3.2.1.5. Troisième stratégie

La première étape est la synthèse du composé **33** selon les conditions de Daval⁷⁸ (**Schéma 11**). Cela permettra de substituer l'alcool **35** par l'amine **37** protégée⁷⁸.

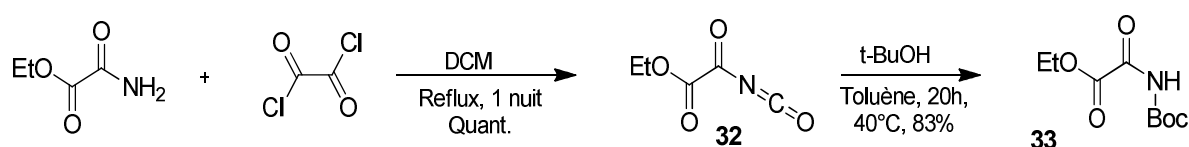


Schéma 11: Synthèse du composé 33⁷⁸.

Le composé **33** est obtenu après couplage de l'éthyl 2-amino-2-oxoacétate avec le chlorure d'oxalyle⁷⁸. Le produit **32** obtenu est ensuite engagé avec du t-butanol afin d'obtenir l'amine protégée **33**⁷⁸.

La première étape de la synthèse du groupement espaceur est la fonctionnalisation d'un des deux alcools terminaux de l'héxaéthylène glycol avec un tosyloxy (composé **34**). Le tosylate **34** est ensuite substitué par l'hydroxybenzoate de méthyle pour donner l'alcool **35**⁷¹. L'ester **36** est issu d'une réaction de Mitsunobu⁷⁸ entre l'alcool **35** et l'amine protégée **33**. Une méthanolyse⁷⁴ permet d'obtenir l'ester **37**. Après saponification, l'acide **38** est couplé avec l'amine **12** en utilisant l'agent de couplage DEPBT pour former le composé **39**⁶⁶.

Après déprotection du carbamate **39**, l'amine **40** est couplée avec le fluorophore Cy3-COOH en suivant le même protocole que pour le composé **39**⁶⁶. Le composé **IS 40** est obtenu après une synthèse en 12 étapes (**Schéma 12**).

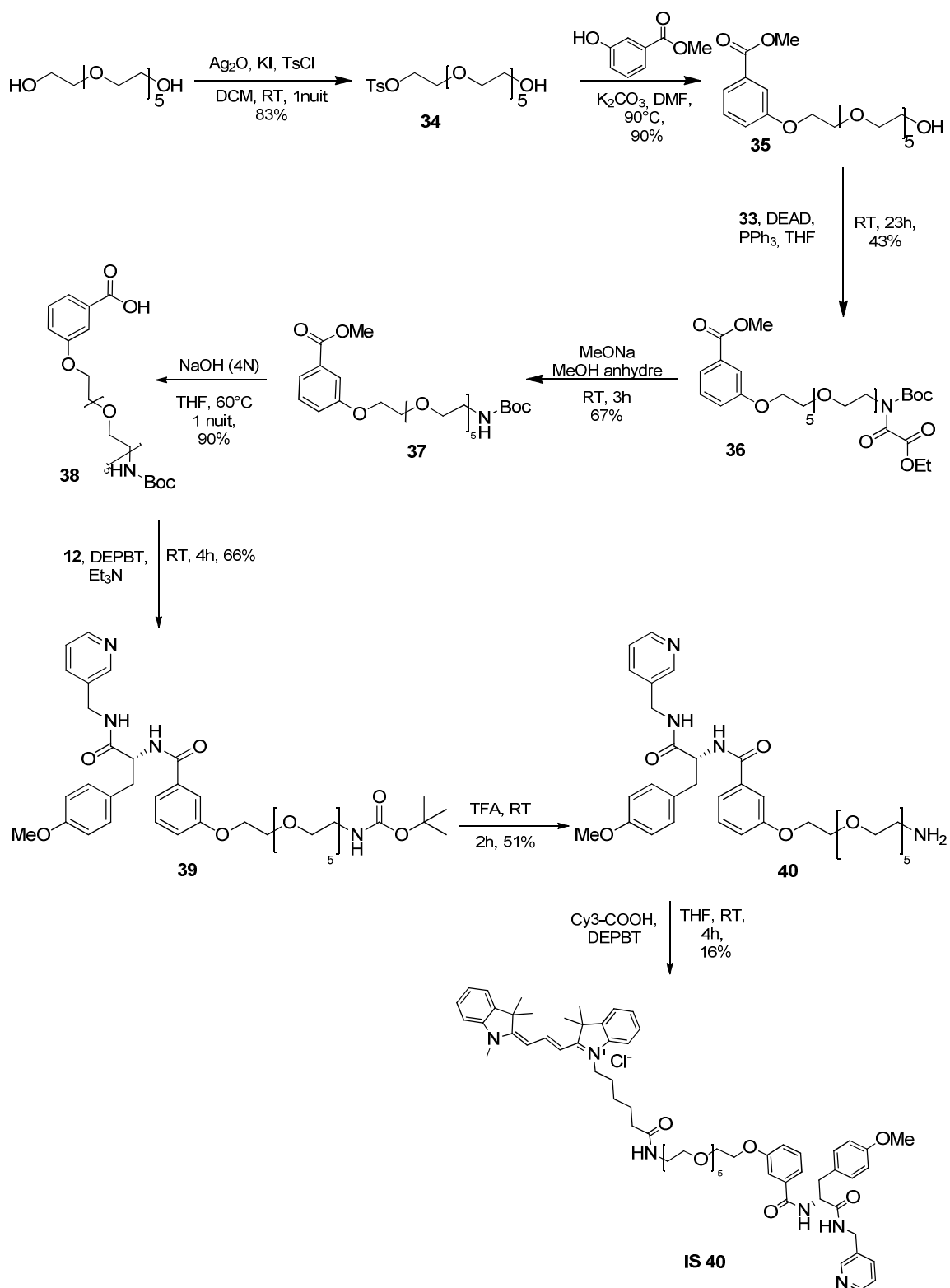


Schéma 12: Synthèse de IS 40.

3.2.2. Etude pharmacologique

La première étude réalisée sur le composé **IS 40** est une étude par microscopie confocale. Ce test montre une diffusion rapide de la sonde fluorescente **IS 40** au travers de la membrane plasmique de cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO) surexprimant le récepteur PKR1 humain (**Figure 54**). Cependant nous ne pouvons pas déterminer par de quelle manière la sonde fluorophore passe la membrane.

IS40 500 nM (*CHOK1-hPKR1*)

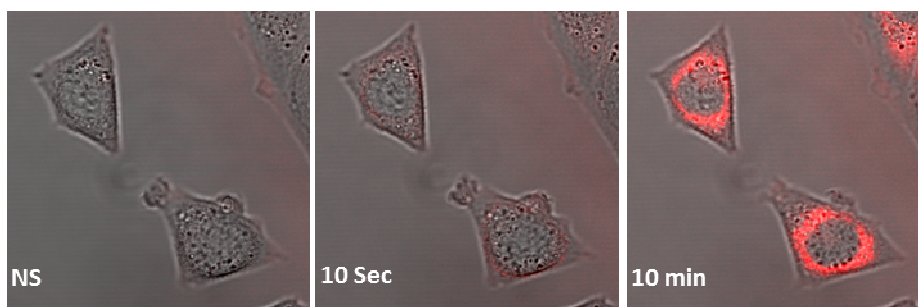


Figure 54: Etude au microscope confocale de la diffusion d'IS 40 à l'intérieur de cellules CHO surexprimant le récepteur PKR1 humain.

L'activation des kinases ERK dans la signalisation de l'angiogenèse est l'un des rôles de la prokinéticine⁵⁵. De ce fait, l'équipe de C. Nebigil a étudié si **IS 40** favorise la phosphorylation de ERK dans les cellules CHO exprimant PKR1 (**Figure 55**). L'incubation des cellules CHO exprimant de manière stable PKR1 avec des concentrations croissantes d'**IS 40** résultent de la phosphorylation des kinases ERK. Ces résultats suggèrent que **IS 40** active la voie de signalisation de PKR1. De plus, en absence de PKR1, des concentrations croissantes (de 15nM à 100 nM) d'**IS 40** n'influencent pas significativement l'activité de ERK.

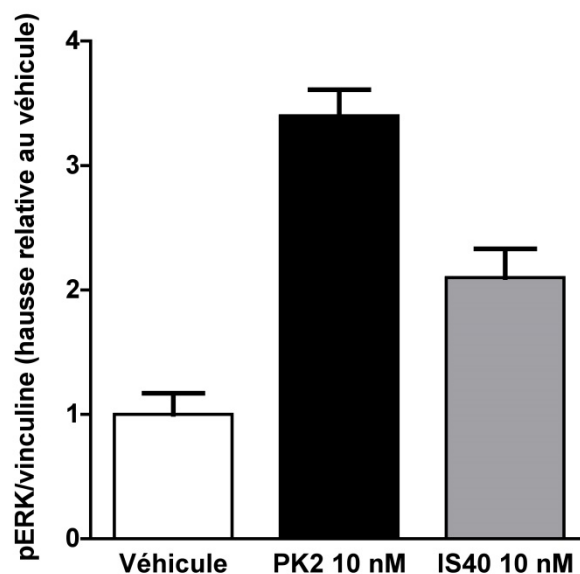


Figure 55: Activation de ERK par PK2 et IS40 dans des cellules CHO surexprimant le récepteur PKR1 humain suite au traitement à 5 et 10 min avec 100 nM d'IS40 et PK2.

D'après ce test *in vitro*, **IS 40** active ERK, mais plus faiblement que le ligand naturel PK-2. Nous pouvons en conclure que le composé **IS 40** est un agoniste du récepteur PKR1. L'ajout d'un espaceur et d'un fluorophore n'inhibe donc pas l'activité agoniste du composé.

Les essais d'évaluation de liaison avec le récepteur PKR1 fusionné à une Protéine fluorescent dans le vert (GFP) par mesure de FRET n'ont donné aucun signal. Il est fort probable le groupement fluorophore Cy3 de **IS 40** soit trop éloigné de la protéine GFP. Les tests de liaison ne pourront donc pas être effectués par cette approche.

Concernant les différentes études de **IS 40**, il sera très prochainement réalisé un isolement de cellules, notamment d'EPDC, exprimant PKR 1 à leur surface par cytométrie en flux (FACS). Une évaluation de la liaison de nouveaux composés sera également effectuée par des études de compétition par cytométrie en flux.

3.3. Les quinoléines

3.3.1. Synthèse

La deuxième partie de ma thèse concerne la synthèse d'une famille structuellement différente de la première famille. Il s'agit de dérivés et d'analogues de la quinoléine **IS 99** identifiée par criblage virtuel par l'équipe du Pr. Tafi et testé *in vitro* par l'équipe du Dr Canan Nebigil (**Figure 56**).

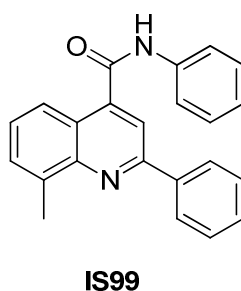


Figure 56: Composé IS 99

IS 99 a montré une activation de ERK, par phosphorylation du récepteur PKR1, à une concentration plus faible que pour PKR2. Ce composé a également montré une activité angiogénique. Nous avons donc choisi de réaliser une étude RSA de **IS 99** pour découvrir des ligands plus affins.

Pour cette nouvelle famille, nous souhaitons faire varier trois zones différentes : la partie amide (zone 1), la partie quinoléine (zone 2) et la partie aromatique (zone 3).

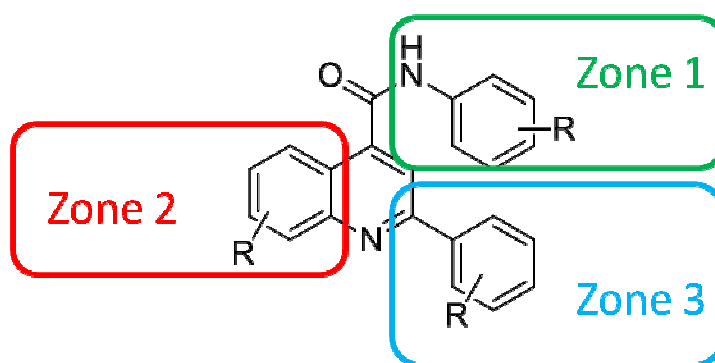


Figure 57: Différentes zones de travail pour l'étude RSA des quinoléines.

La stratégie adoptée consiste à fixer deux zones et de faire varier la troisième. Pour la variation de la partie amide (zone 1), la synthèse se fait en deux étapes : la synthèse de l'acide quinoléine-4-carboxylique en utilisant la réaction de Doebner⁷⁹ dans un premier temps, suivie d'un couplage peptidique.

Pour faire varier les zones 2 et 3, nous avons envisagé une synthèse en deux étapes : un couplage peptidique pour obtenir l'amide pyruvique, afin d'avoir la zone 1 fixe, puis une réaction de Doebner modifiée où l'acide pyruvique de la réaction de Doebner classique est remplacé par l'amide pyruvique. Les deux voies de synthèse sont représentées dans le **Schéma 13**.

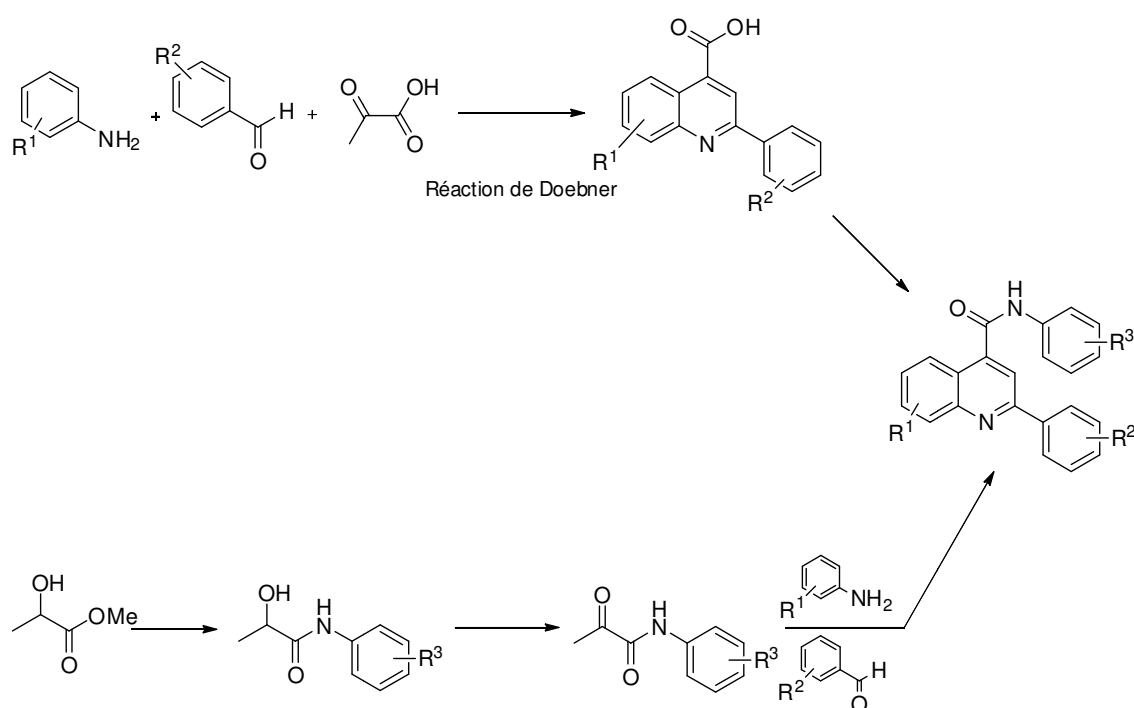


Schéma 13: Voies de synthèses des quinoléines.

Nous avons opté pour la réaction de Doebner car elle permet d'obtenir l'acide quinoléïque en une seule étape.

3.3.1.1. Stratégie 1 : modification de la zone 1.

3.3.1.1.1. La réaction de Doebner.

La réaction de Doebner est une réaction, élaborée en 1887 par Oscar Doebner, mettant en jeu une aniline, un aldéhyde et l'acide pyruvique⁸⁰ (**Figure 58**).

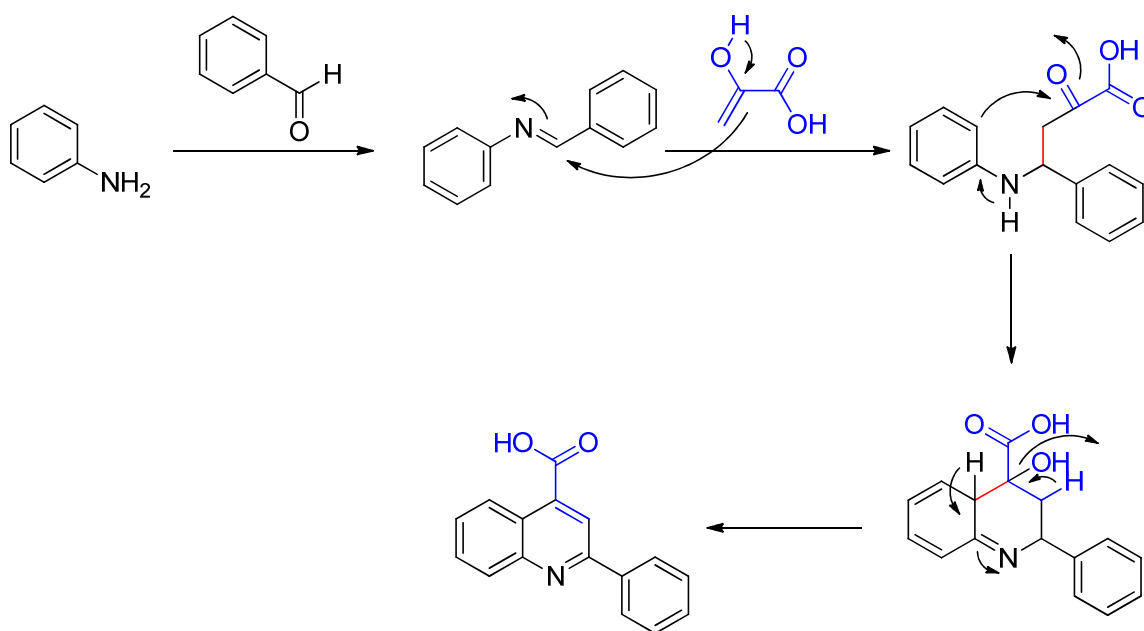


Figure 58: Mécanisme de la réaction de Doebner⁸¹.

La première réaction de Doebner que nous avons effectuée met en jeu l'acide pyruvique, l'*O*-tolualdéhyde et la *m*-toluidine⁷⁹. Nous avons choisi la *m*-toluidine car il résulte des expériences de modélisation moléculaire que la position 5 sur la quinoléine est la plus favorable à une substitution par un méthyle. L'*O*-tolualdéhyde a également été choisi suite aux résultats issus de la modélisation moléculaire. Afin d'établir un comparatif des conditions de la réaction, nous avons réalisé cette réaction avec et sans O₂.

La réaction, faite sans ajout d'O₂, conduit à un rendement de 27% alors que pour la réaction faite sous O₂ on obtient un rendement de 44%. Un excès d'O₂, dans le milieu réactionnel, favorise donc la réaction de Doebner. Les analyses HMBC et NOESY nous ont montré que nous n'avons pas obtenu l'acide 5-méthyl-2-(*o*-

tolyl)quinoline-4-carboxylique **40** attendu, mais l'acide 7-méthyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxylique **41**. Quelle que soit la stratégie adoptée, les quinoléines obtenues portaient toutes une substitution en position 7 et non en position 5 comme attendu (**Schéma 14**). Une gêne stérique induite par l'acide carboxylique pourrait empêcher la formation du composé **40**.

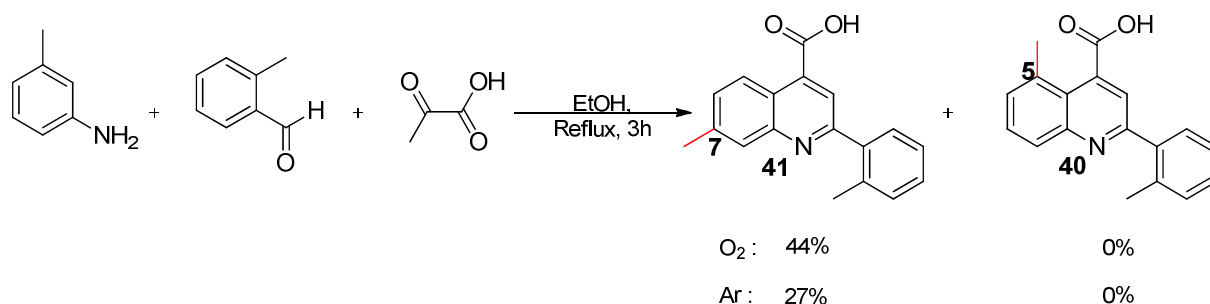


Schéma 14: Influence de O₂.

Nous avons donc poursuivi nos études de RSA avec l'acide quinoléique **41**.

3.3.1.1.2. Le couplage peptidique

Nous avons réalisé toutes les quinoléines en utilisant des agents de couplage peptidique car les essais pour obtenir la quinoléine finale en passant par un intermédiaire chlorure d'acyle ont été infructueux. Pour cela, nous avons réalisé trois essais avec la *m*-toluidine et trois agents de couplage différents : EEDQ⁸², HOBt/EDCI⁶⁴ et HATU afin d'obtenir les meilleures conditions réactionnelles

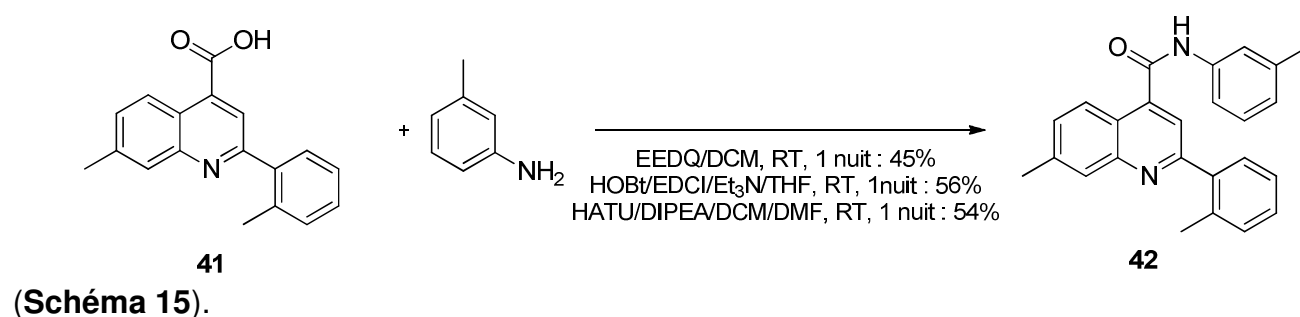
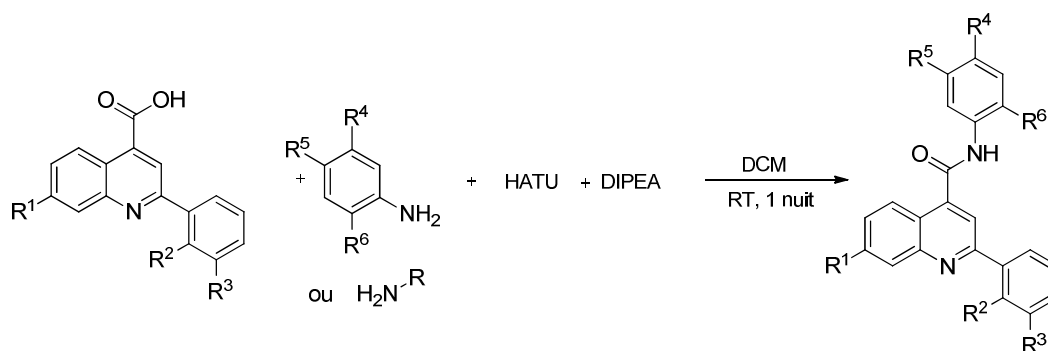


Schéma 15: Essais avec différents agents de couplage.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de choisir l'agent de couplage HATU pour synthétiser la série de molécules. Son rendement est similaire à celui obtenu avec le couple HOBt/EDCI, mais selon des études menées dans un précédent stage l'agent de couplage HATU est moins sensible aux substitutions de l'aniline.

3.3.1.1.3. Composés **IS** obtenus.

Les différents composés **IS** obtenus par ce couplage peptidique sont résumés dans le **Tableau 9**.



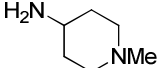
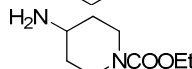
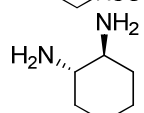
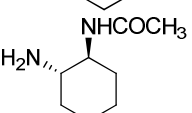
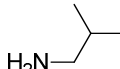
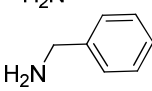
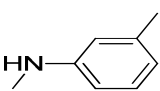
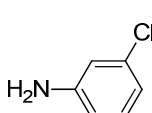
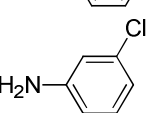
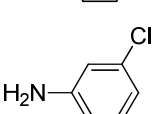
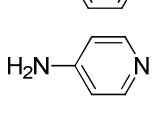
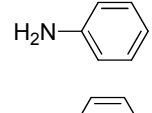
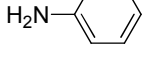
N° IS	R ¹	R ²	R ³	Aniline/Amine			Rendement (%)
				R ⁴	R ⁵	R ⁶	
104	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H	H	54
105	CH ₃	CH ₃	H	Cl	H	H	82
106	CH ₃	CH ₃	H		H	H	74
107	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	H	40
108	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H	27
109	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	36
111	CH ₃	CH ₃	H				4
112	CH ₃	CH ₃	H				77
113	CH ₃	CH ₃	H				29
114	CH ₃	CH ₃	H				8
116	CH ₃	CH ₃	H				67
117	CH ₃	H	CH ₃				58
118	CH ₃	H	CH ₃				43
119	H	H	CH ₃				24
120	CH ₃	H	H				46
121	CH ₃	H	CH ₃				86
122	CH ₃	H	CH ₃				20
123	CH ₃	H	CH ₃				88
124	H	Phényle substitué par un H					57

Tableau 9: Rendement du couplage peptidique: composés IS 104 à IS 124.

3.3.1.2. Stratégie 2 : modification des zones 2 et 3.

3.3.1.2.1. Amidation

Pour la stratégie 2, le but est de modifier les zones 2 et 3, tout en conservant la zone 1. Pour cela, nous avons dans un premier temps synthétisé un amide pyruvique (composé **44**). La 3-chloroaniline est couplée avec le méthyl-2-hydroxypropanoate pour donner l'amide **43**⁸³, qui est ensuite oxydé par le réactif de Jones pour donner le *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide **44** (**Schéma 16**).

Cet amide est ensuite engagé dans une réaction de Doebner modifiée. Il remplacera donc l'acide pyruvique de la réaction de Doebner initiale.

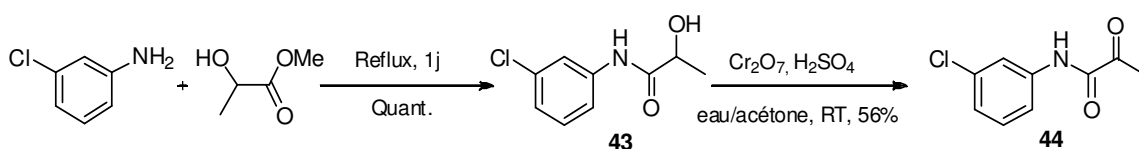


Schéma 16 : Synthèse du composé **44**.

3.3.1.2.2. Réaction de Doebner modifiée

Pour cela, nous faisons réagir *one-pot* une aniline, un aldéhyde et le *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide **44** synthétisé précédemment. La réaction de Doebner classique se fait en milieu acide, de par la présence de l'acide pyruvique⁷⁹. Mais comme pour cette réaction nous partons cette fois-ci d'un amide pyruvique, nous avons réalisé plusieurs essais engageant différents acides faibles afin de déterminer les meilleures conditions de réaction.

Les essais ont été réalisés avec la *m*-toluidine, le *m*-tolualdéhyde et le *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide sous atmosphère d' O_2 et au reflux de l'éthanol. La quinoléine voulue n'a pas été obtenue. Le produit synthétisé est un nouveau produit pentacyclique dont l'étude est décrite dans la *partie 3.4 Découverte d'une réaction à 3 composantes* (**Figure 59**).

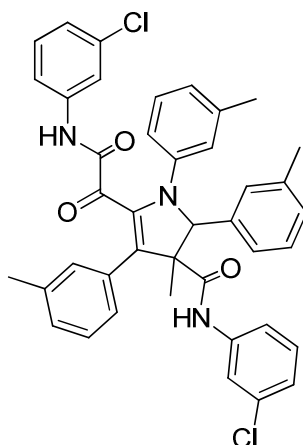


Figure 59: Composé dihydropyrrole obtenu.

Deux essais ont été réalisés avec des composés non aromatique : le N-cyclohexyl-2-oxopropanamide (composé **45** synthétisé par le même protocole que le composé **44**) et le cyclohexanecarboxaldéhyde. Dans ces deux cas, nous obtenons « uniquement » la quinoléine (**Schémas 17 et 18**).

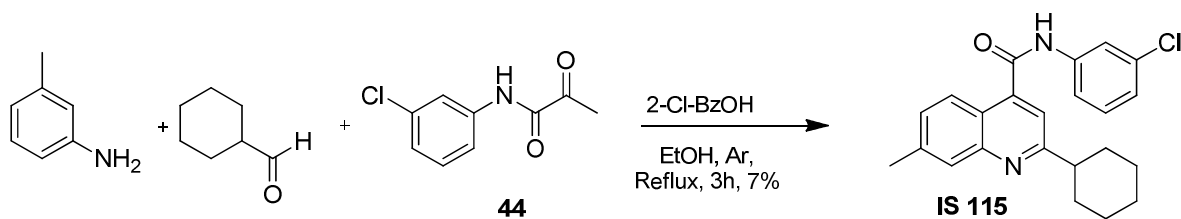


Schéma 17: Essai avec le cyclohexanecarboxaldéhyde.

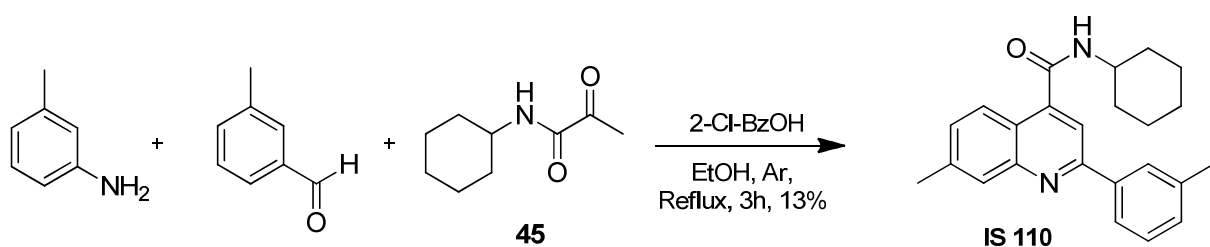


Schéma 18: Essai avec le N-cyclohexyl-2-oxopropanamide.

Nous avons donc obtenu deux quinoléines (**IS 110** et **IS 115**) par la réaction de Doebner modifiée. Ces deux réactions présentent de faibles rendements. Les seuls produits isolés sont les quinoléines. Les autres produits sont des produits de dégradation non caractérisables.

Ainsi par la réaction de Doebner nous avons pu obtenir une première famille de quinoléines. La réaction de Doebner modifiée nous a donné accès à un nouveau composé dihydropyrrole polyfonctionnalisé. Cependant, dans certaines conditions, nous avons obtenues des quinoléines par cette réaction de Doebner modifiée.

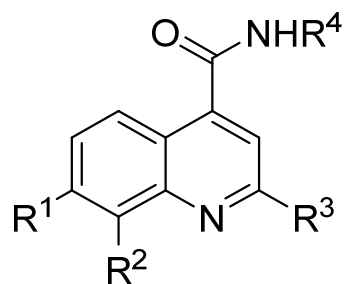
Les quinoléines synthétisées ont ensuite été testées *in vitro* par l'équipe du Dr Canan Nebigil.

3.3.2. Résultats pharmacologiques

3.3.2.1. Activation de ERK

L'activation de PKR1 permet d'induire la phosphorylation de ERK. C'est pourquoi les premiers tests réalisés sur les dérivés des quinoléines ont été des tests d'activation de ERK par Western blot. Pour effectuer ces tests il faut, dans un premier temps, établir des lignées de cellules CHOK1 exprimant stablement le récepteur PKR1 humain.

Ces cellules n'expriment pas de façon endogène le récepteur. Cela permet aussi de contrôler l'effet des composés testés en absence de récepteur. L'équipe de C. Nébigil a ainsi pu montrer que certains de nos composés activent effectivement ERK (**Tableau 10**). Ils ont également vérifié que cette action est bien due à une action sur le récepteur PKR1 (absence d'effet quand le récepteur est supprimé).



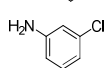
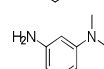
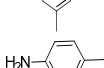
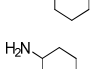
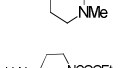
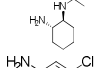
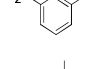
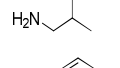
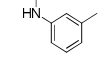
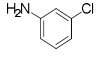
Composés	R ¹	R ²	R ³	NHR ⁴	Activation de ERK
Milieu de culture (contrôle négatif)					
Véhicule (DMSO) (contrôle négatif)					
PK2 (10 nM) (contrôle positif)					2,84 ± 0.31
IS 99	H	Me			1.83 ± 0.28
IS 104	Me	H			1.64 ± 0.26
IS105	Me	H			1,45 ± 0.33
IS106	Me	H			1,71 ± 0.31
IS107	Me	H			1,33 ± 0.43
IS108	Me	H			1,64 ± 0.47
IS109	Me	H			1,67 ± 0.48
IS110	Me	H			2,05 ± 0.15
IS111	Me	H			2,19 ± 0.15
IS112	Me	H			1,89 ± 0.26
IS113	Me	H			2,35 ± 0.58
IS114	Me	H			2,09 ± 0.38
IS115	Me	H			1,67 ± 0.22
IS116	Me	H			2,04 ± 0.19
IS117	Me	H			2,32 ± 0.05
IS118	Me	H			1,24
IS119	H	H			2,18 ± 0.55
IS120	Me	H			2,42 ± 0.33

Tableau 10: phosphorylation de ERK après 5 minutes de traitement dans des cellules CHO1 surexprimant PKR1 (mesure effectuée par Western Blot). Composés testés à 1 nM.

Ces premiers résultats pourraient donc suggérer que l'interaction hydrophobe est plus importante que l'interaction aromatique. Les autres produits s'avérant être également efficaces sont **IS 116** et **IS 117** qui ont, respectivement, une courte chaîne alkyle et un groupement benzyle comme substituant pour la partie amide. Les deux dernières molécules induisant une activité proche de celle induite par PK2 sont **IS 119** et **IS 120**. Les substituants R¹ et R² sont de simples hydrogènes pour **IS 119** et R³ est un phényle non substitué pour **IS 120**. L'absence de groupement méthyle pourrait donc favoriser l'activation de PKR1. Le composé **IS 120** est le plus efficace de cette série.

IS 107 et **IS 118** sont les produits les moins actifs. Les anilines utilisées pour la fonction amide sont respectivement la N,N-3-dimethylaniline et la *o*-toluidine. Ces deux anilines entraînent une gêne stérique au niveau de l'amide délétère pour l'activité pharmacologique (**Figure 60**).

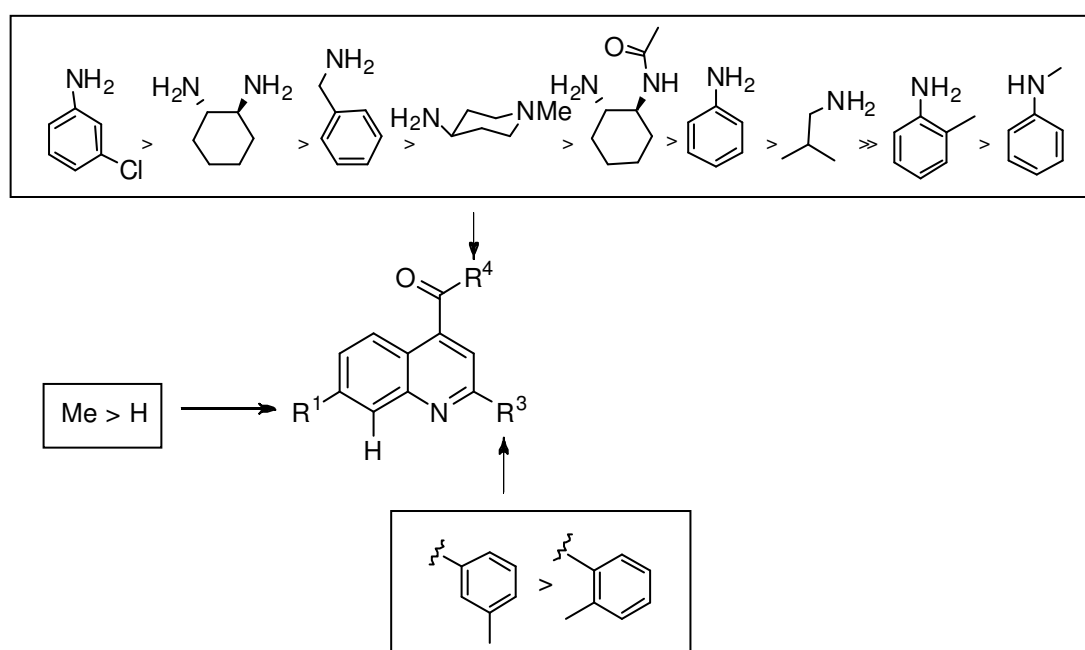


Figure 60: Requis structuraux pour l'activation du récepteur PKR1.

3.3.2.2. Mesure du signal calcique

L'équipe de C. Nebigil a également cherché à évaluer nos composés par une autre approche faisant appel à la mesure de l'entrée du calcium dans les cellules. Ainsi, des lignées de cellules embryonnaires de rein humain (HEK293) exprimant la protéine Gα15 ont été développées par l'équipe de C. Nebigil. Ces lignées sont ensuite utilisées après infection par un adénovirus, portant le gène du récepteur PKR1 murin. Cela permet d'avoir un meilleur contrôle du niveau d'expression du récepteur dans les cellules et ainsi d'augmenter la reproductibilité. Ces cellules infectées ont également été utilisées dans un test de mesure du calcium intracellulaire par fluorescence (Fluo4-No wash). Cela devait permettre d'évaluer l'effet des composés sur la signalisation calcique liée au récepteur PKR1 et de comparer la réponse avec le ligand naturel de ce récepteur, la prokinéticine 2.

De manière surprenante aucun des dérivés des quinoléines synthétisés n'induisaient de signal calcique à des concentrations significatives. Ces résultats suggèrent que nos composés seraient des agonistes biaisés du récepteur PKR1. Alors que les agonistes classiques des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent activer plusieurs voies de signalisation, les agonistes biaisés n'activent qu'une ou deux voies (par exemple les protéines kinases Akt et ERK, mais pas la voie du calcium). Cette découverte présente donc un intérêt thérapeutique potentiel.

3.3.2.3. Effet sur l'angiogenèse

Les composés les plus prometteurs ont été testés pour leur capacité à induire l'angiogenèse *in vitro* sur matrigel comme précédemment. Les premiers résultats confirment une activité pro-angiogénique. Ces résultats nous confortent dans le fait que nos composés sont potentiellement des agonistes biaisés. Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 11**.

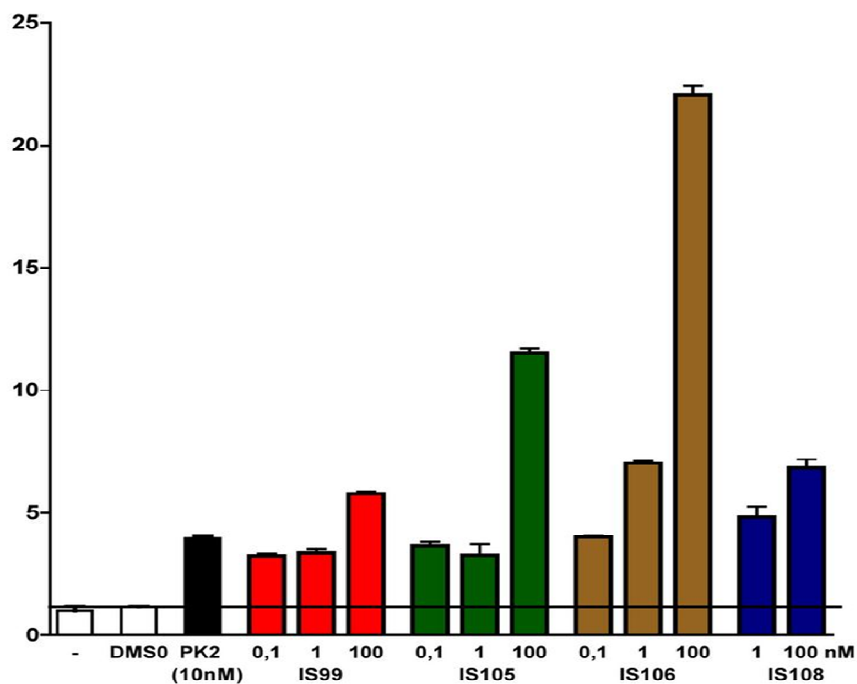


Tableau 11: nombre de ramifications induites par les composés IS.

D'après ces résultats tous les composés **IS** entraînent un nombre de ramifications supérieur à celui induit par PK2. **IS 105** à une concentration de 100 nM est le plus efficace. Tous les dérivés de la quinoléine induisent une angiogenèse et ont des substituants variés uniquement sur la partie amide (excepté **IS 99**). Nous pouvons donc en conclure que pour favoriser la ramification la nature de l'amide n'a pas d'influence (**Figure 61**).

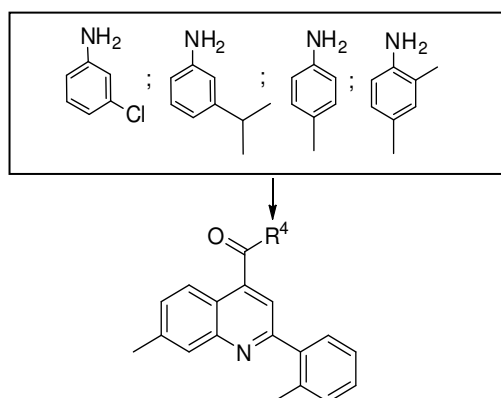


Figure 61: Molécules testées.

Ces études nous ont permis de montrer que nos composés ne sont pas de simples agonistes mais des agonistes biaisés. Ce sont les premiers agonistes biaisés décrits. Il s'agit là d'une découverte importante qui suggère que ces composés pourraient présenter un potentiel thérapeutique complémentaire à ceux de la première famille dans le cadre du traitement de l'infarctus du myocarde avec potentiellement moins d'effets secondaires.

3.4. Découverte d'une réaction à 3 composantes

3.4.1. Origine de la découverte d'une réaction à trois composantes

Alors que nous essayions de synthétiser des quinoléines par une réaction de Doebner⁷⁹ en utilisant un amide pyruvique au lieu de l'acide correspondant, nous avons eu la surprise d'observer la formation du dihydropyrrole **46a** au lieu de la quinoléine alternative **47** (Schéma 19).

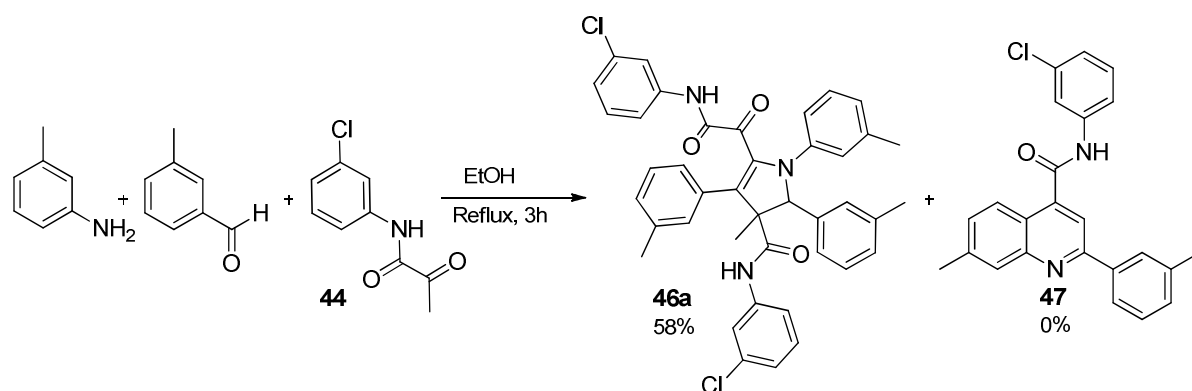


Schéma 19: Produits de la réaction de Doebner modifiée.

Nous avons donc cherché à caractériser cette réaction inédite permettant d'accéder à des dihydropyrroles en une seule étape.

Première étape : Synthèse des amides pyruviques

Nous avons synthétisé les amides pyruviques par deux approches différentes. La première débute par le couplage de la 3-chloroaniline avec le lactate de méthyle selon les conditions de Kaur⁸³. L'alcool **43** est ensuite oxydé selon l'oxydation de Jones (**Schéma 20**).

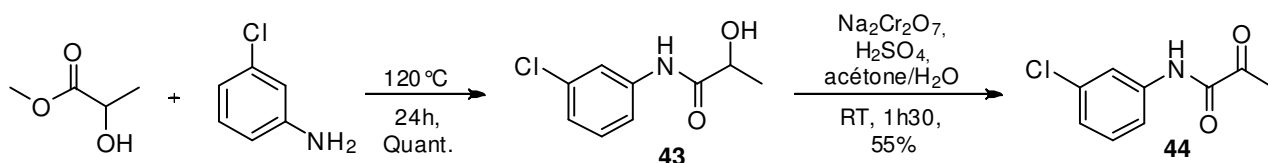


Schéma 20: Première voie de synthèse des amides pyruviques.

La seconde voie de synthèse est réalisée *one pot* selon les conditions de Parent⁸⁴ mettant en jeu l'activation de l'acide par le dichlorométhyl- méthyl éther. Nous avons opté pour cette seconde synthèse car les rendements obtenus (entre 50% et 99%) sont supérieurs à la première synthèse (**Schéma 21**).

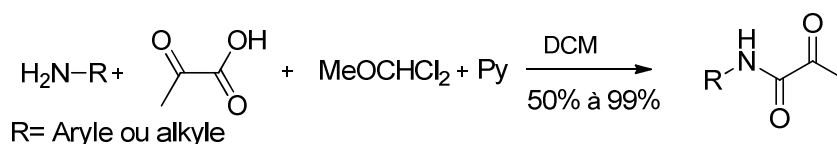


Schéma 21: Seconde voie de synthèse des amides pyruviques.

Deuxième étape : Réaction de Doebner modifiée

Dans un premier temps, nous avons examiné la réaction à 3 composants en présence d'un demi-équivalent d'acide acétique, et d'un demi-équivalent d'acétate de sodium. Le composé **48a** est obtenu avec un rendement de 19% (**Schéma 22**).

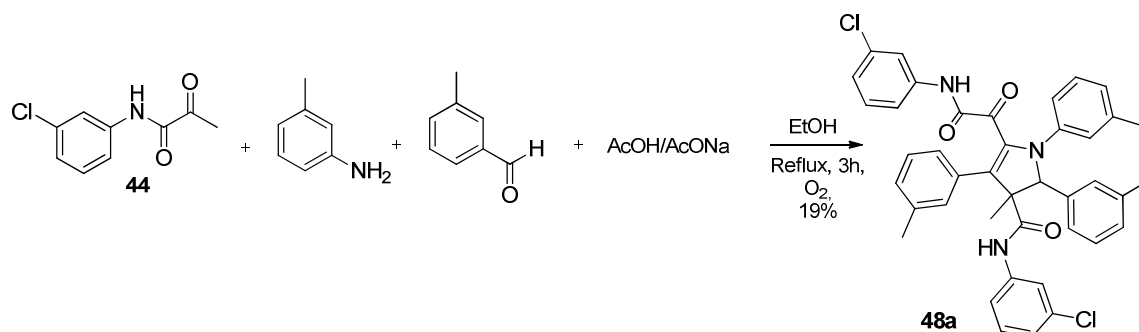


Schéma 22: Réaction de Doebner modifiée en présence d'acide acétique.

Le produit dihydropyrrole ayant été de nouveaux obtenu, nous avons engagé les mêmes produits de départ dans diverses conditions afin de déterminer les premières conditions optimales (**Tableau 12**).

N° molécule	Acide	Atmosphère	Solvant/Température	Rendement (%)
46a	Acide 2-Chlorobenzoïque	Normale	EtOH/Reflux	58
46b	Acide 2-Chlorobenzoïque	Normale	EtOH/Reflux	6
46c	Acide 2-Chlorobenzoïque	Normale	EtOH/Reflux	81
48a	AcOH/AcONa	O ₂	EtOH/Reflux	19
48b	Acide 2-Chlorobenzoïque	O ₂	EtOH/Reflux	58
48c	Acide 2-Chlorobenzoïque	Ar	EtOH/Reflux	76
48d	Acide 2-Chlorobenzoïque	Normale-Sans lumière	EtOH/Reflux	18

Tableau 12: Premières déterminations réactionnelles.

Nous pouvons donc conclure, dans un premier temps, que les meilleures conditions réactionnelles seraient en présence d'acide 2-chlorobenzoïque, sous atmosphère normale, dans l'éthanol à reflux.

Le composé a pu être cristallisé, malheureusement, les clichés de diffraction ne sont pas de qualité suffisante pour établir sans ambiguïté la structure de ce composé (**Figure 62**).

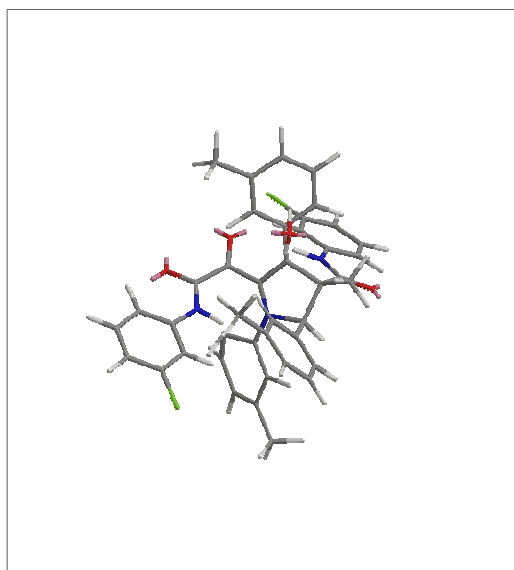


Figure 62: Structure RX du composé 2,3-dihydropyrrole.

Les analyses RX montrent que le cycle à 5 ne porte pas de double liaison. Mais la présence de la double liaison a été confirmée par des analyses RMN détaillées (**Figure 63**).

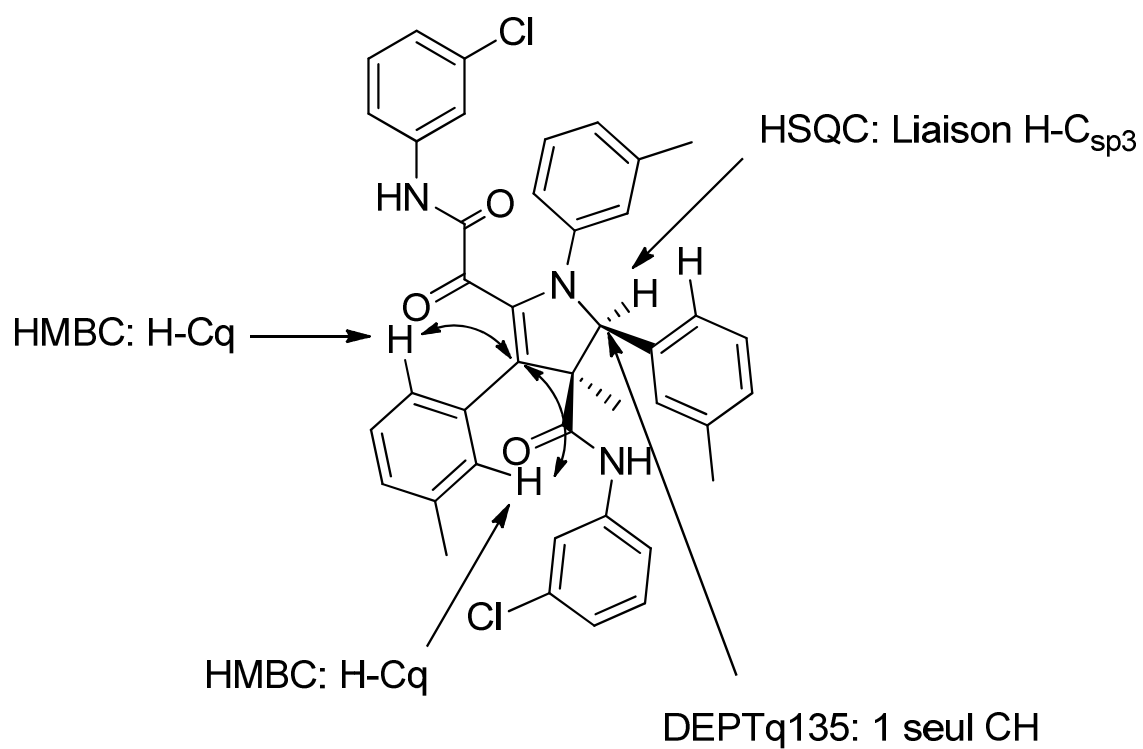
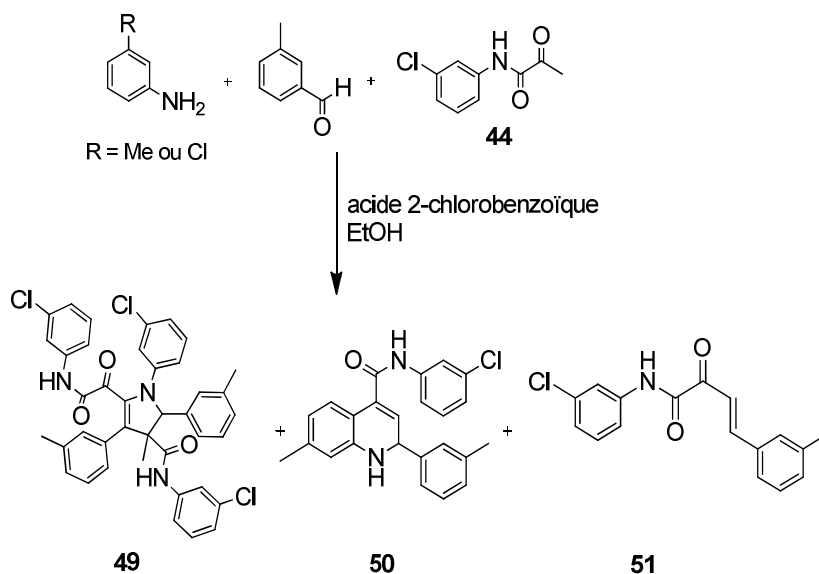


Figure 63: Analyses RMN.

3.4.2. Effet de la température et de l'atmosphère O₂ ou Ar

Afin de déterminer les conditions réactionnelles les plus favorables à la formation du dérivé dihydropyrrole, nous avons réalisé plusieurs essais en faisant varier les conditions réactionnelles (**Tableau 13**).



R	Ar/O ₂	Reflux/RT	Molécule obtenue
Cl	O ₂	Reflux	50 (53%)
Cl	Ar	Reflux	50 (40%) + 49 (44%)
Me	O ₂	RT	51 (42%)
Me	Ar	RT	51 (39%)

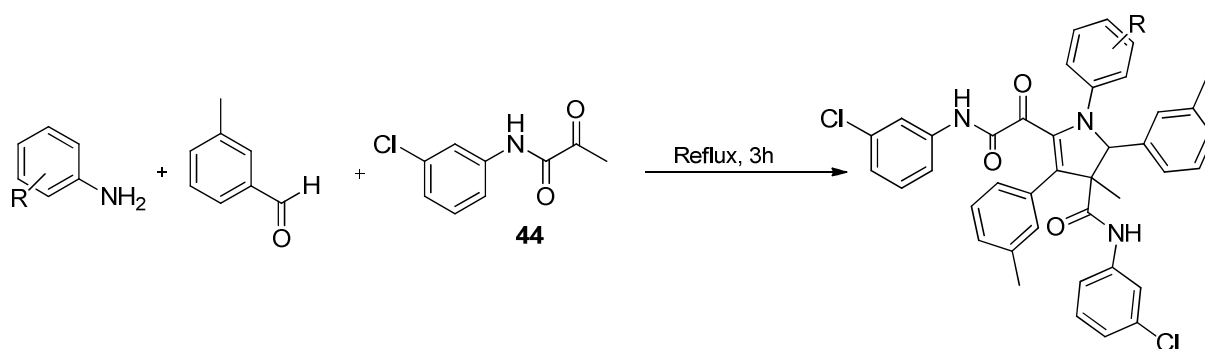
Tableau 13: Essais en variant la température et l'atmosphère.

Ces quelques essais nous permettent de voir que la température est essentielle pour la formation des composés dihydropyrrole et quinoléine. Sous atmosphère inerte, il y a compétition entre la formation du dihydropyrrole et de la quinoléine. L'oxygène inhibe la réaction menant aux quinoléines.

Il est intéressant de noter qu'à température ambiante, on forme uniquement le composé d'aldolisation/crotonisation qui n'est pas l'intermédiaire clé dans la réaction de Doebner. En effet, au cours de cette réaction, la réaction transite par une imine (aniline + aldéhyde).

3.4.3. Variations des conditions réactionnelles

Après avoir pu observer l'impact de la température, nous avons utilisé différents types de solvants qui impliquent également des températures d'ébullition différentes. Les essais réalisés sont résumés dans le **Tableau 14**.



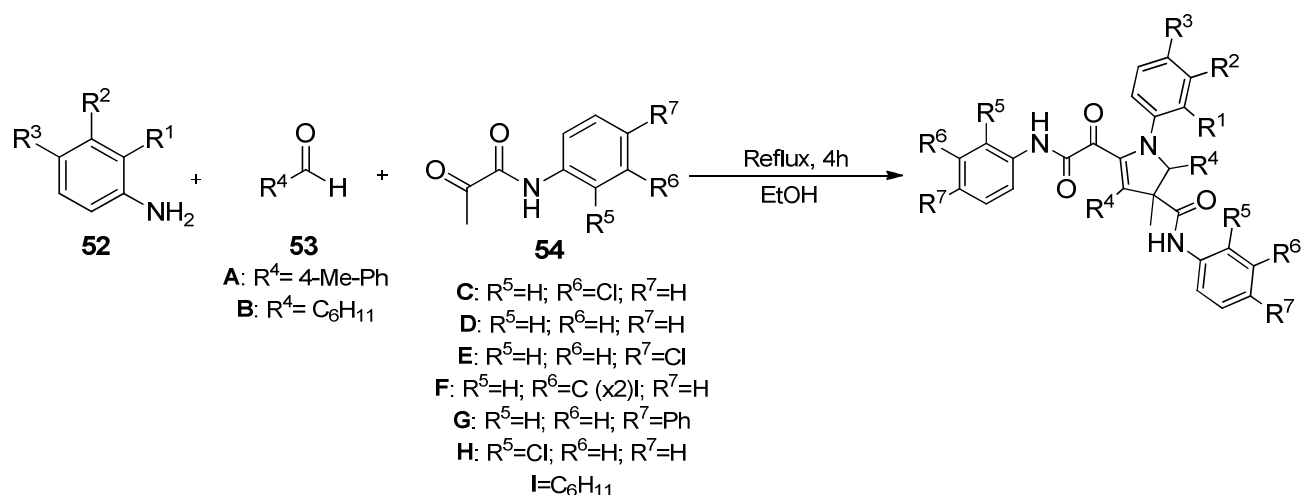
R	Solvant	Température (°C)	Acide	Rendement (%)
4-O-benzyle	Toluène	135	Sans acide	0
4-O-benzyle	THF	66	Sans acide	0
4-O-benzyle	TFE	75	Sans acide	36
4-O-benzyle	EtOH	78	Sans acide	54
3-Me	EtOH	95	AcOH/AcO Na	46

Tableau 14: Essais avec différents solvants.

Ces essais nous permettent de conclure que le composé 2,3-dihydropyrrole ne se forme pas dans un milieu aprotique polaire ou apolaire (THF/toluène, sans acide). L'addition d'acide dans la réaction n'est pas nécessaire, les conditions d'un solvant polaire protique suffisent à l'obtention du composé dihydropyrrole.

3.4.4. Variations des réactifs

Afin d'exemplifier cette nouvelle réaction, nous avons effectué une série d'essais en faisant varier les trois réactifs. Toutes les réactions sont réalisées dans les mêmes conditions soit dans l'éthanol, sans acide, à 78 °C pendant 4h puis une nuit à température ambiante sans agitation. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 15**.



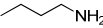
Composé dihydropyrrole	52			53	54	Rendement (%)
	R ¹	R ²	R ³			
65	H	Cl	H	A	C	38
66	H	H	Cl	A	C	53
67	Cl	H	H	A	C	6
68	H	H	Ph	A	C	70
69				A	C	49
70				A	C	60
71				A	C	0
72				A	C	17
73				A	C	42
74	H	H	OMe	A	C	84;56;99
75	H	H	OMe	A	D	68
76	H	H	OMe	A	E	48
77	H	H	OMe	A	F	72
78	H	H	OMe	A	G	79
79	H	H	OMe	A	H	82
80				A	C	8
81	H	H	Bn	A	C	0
82	H	H	OMe	B	C	25
R ⁴						
83	H	H	OMe		C	18
84	H	H	OMe		C	13
85	H	H	OMe		C	0
86	H	H	OMe		C	39
87	H	H	OMe		C	78
88	H	H	OMe		C	62
89	H	H	OMe		C	49
90	H	H	OMe		C	87
91	H	H	OMe		C	66
92	H	H	CCN-Ph	A	C	38
93	H	H	O-Bn	A	C	70;82;84;96;54; 72;96;72;26;60;
94	H	H	O-Bn	A	D	53
95	Cl	H	Me	A	C	4
96	H	Cl	H	A	C	6
97	H	Me	H	A	I	5

Tableau 15: Variations des réactifs (Les réactifs sont en quantité stœchiométrique (1 eq)).

Ces résultats nous montrent que cette réaction est sensible à la nature des substituants sur les différents réactifs. En effet pour l'aniline, plus la fonction amine est encombrée plus le rendement chute, notamment pour la 2-chloraniline, la 1-naphthylamine et la tertbutylamine. Pour l'aldéhyde, l'encombrement est important également, on peut comparer les composés 89 vs 90 ou 86 vs 87 notamment. Mais l'effet électronique a un impact bien plus important, en effet plus l'aldéhyde est riche en électrons plus les rendements réactionnels sont excellents (84 vs 90 : 13% vs 87%). Pour ce qui est de l'amide pyruvique, l'encombrement des aromatiques, qui sont trop loin des sites réactionnels, n'impacte pas la réaction.

De plus, nous constatons qu'en présence d'acide 2-chlorobenzoïque, la réaction engageant le cyclohexanaldéhyde donne la quinoléine (**IS 115**) alors qu'en absence d'acide, la même réaction donne le composé dihydropyrrole **82**.

3.4.5. Etudes mécanistiques

3.4.5.1. Mécanisme proposé

Muthusubramanian et al. ont réalisé une synthèse qui fait intervenir une cycloaddition non concertée [4+2] entre une nitronne et une enyne pour former un allène cyclique, peu stable, se réarrangeant immédiatement en 2,3-dihydro-1H-pyrrole⁸⁵ (**Schéma 23**)

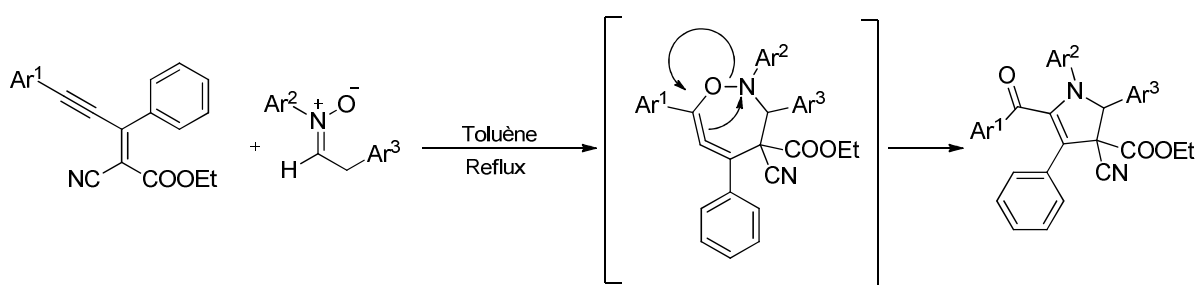


Schéma 23: Mécanisme proposé pour la formation du dérivé 2,3-dihydro-1H-pyrrole par cycloaddition d'une nitronne sur un enyne⁸⁵.

L'analyse de leurs résultats nous permet de proposer un mécanisme faisant appel à deux couplages électrophile-électrophile (représentés en rouge sur le **Schéma 24**) et un couplage nucléophile-nucléophile (représenté en bleu). Cette

hypothèse suppose donc une inversion de polarité au niveau du céto-amide (**Schéma 24**).

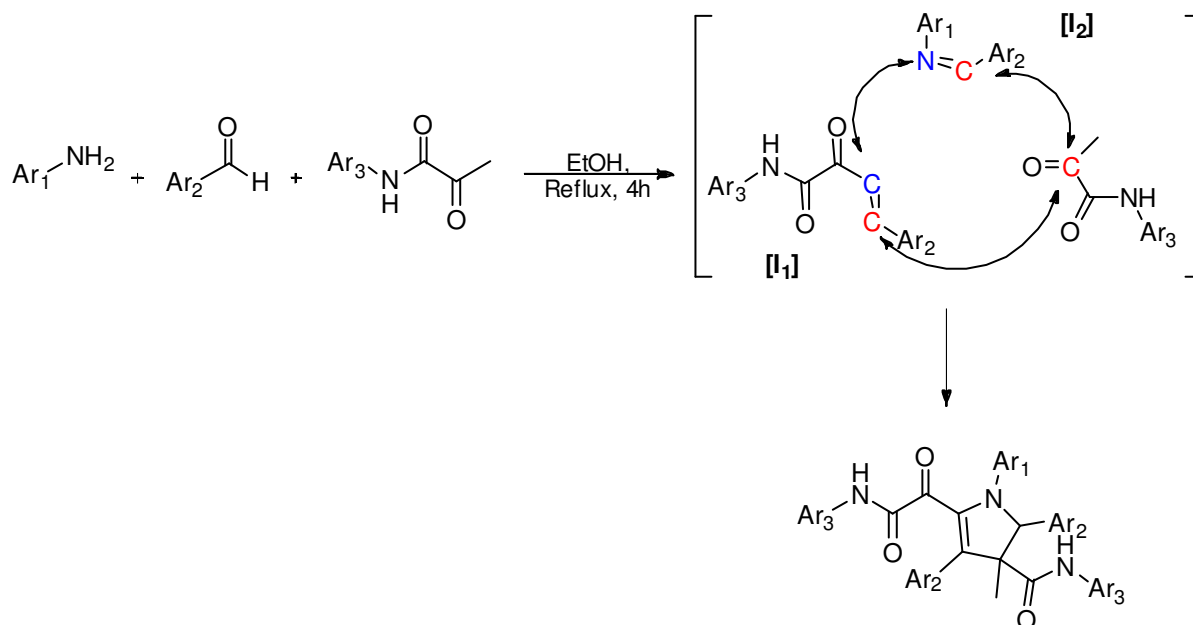


Schéma 24: Analyses mécanistiques de la réaction à trois composantes.

3.4.5.2. Détermination du mécanisme, validation de **[I1]** et **[I2]**

Pour valider ce mécanisme supposé nous avons réalisé plusieurs essais avec des modèles d'intermédiaires. Nous avons donc synthétisé une chalcone **55** mimant le produit intermédiaire de condensation entre l'amide pyruvique et l'aldéhyde **[I1]**.

La chalcone **55** a été engagée dans la réaction multi-composante (**Schéma 25**).

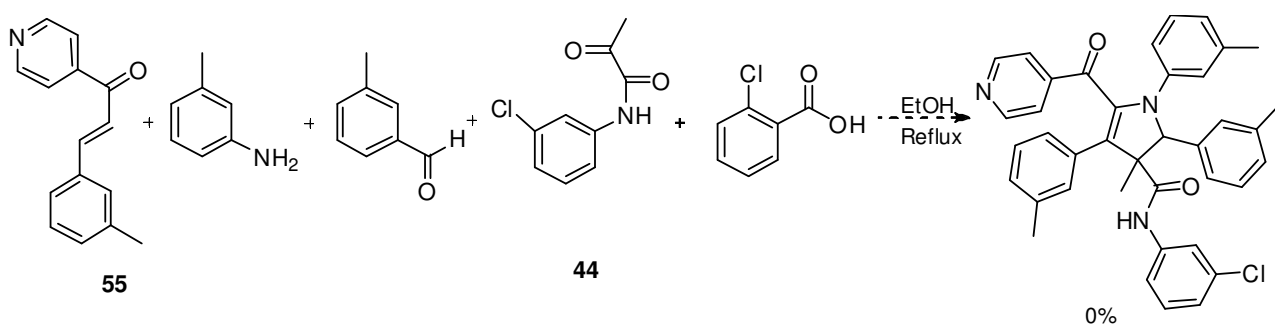


Schéma 25: Réaction engageant la chalcone **55**.

Aucun produit de multi-composante n'a été observé au cours de cette réaction. Les analyses nous permettent d'observer seulement les produits de départ et des produits de dégradation.

Le fait qu'il n'y ait pas eu de réaction peut être dû à la présence de la pyridine sur la chalcone **55**. D'autres essais ont donc été réalisés avec une chalcone **56** portant un simple aromatique (**Schéma 26** et **27**).

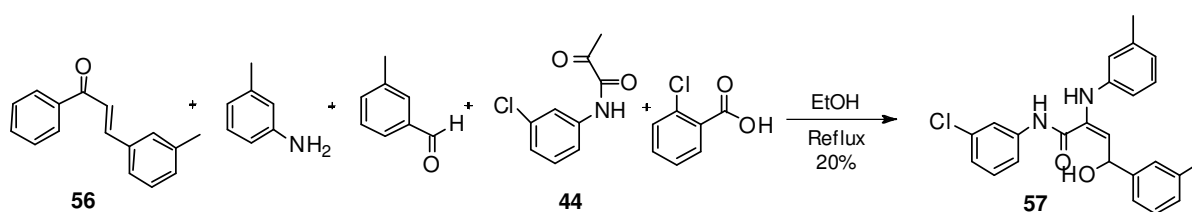


Schéma 26: Essai avec la chalcone **56**.

Pour cet essai, la chalcone **56** est engagée avec les réactifs de la multi-composante dans les mêmes conditions que pour l'essai précédent. Le seul produit observé **58** est le produit de condensation entre l'amide pyruvique, l'aniline et l'aldéhyde.

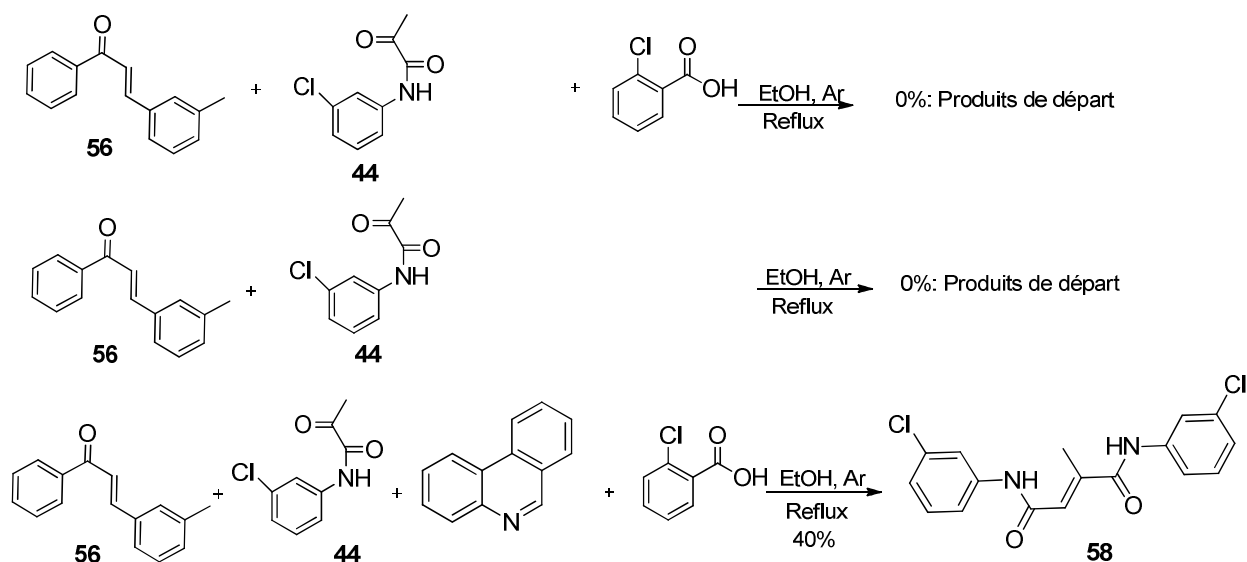


Schéma 27: Essais avec la chalcone **56**.

La réaction entre la chalcone **56**, l'amide pyruvique et la phenanthridine, en présence d'acide 2-chlorobenzoïque, conduit à la condensation entre deux molécules d'amide pyruvique.

Ces essais étant non concluants, nous avons essayé de mettre en évidence la formation de l'imine transitoire issue de la condensation entre l'aniline et l'aldéhyde **[I₂]** (Schéma 28).

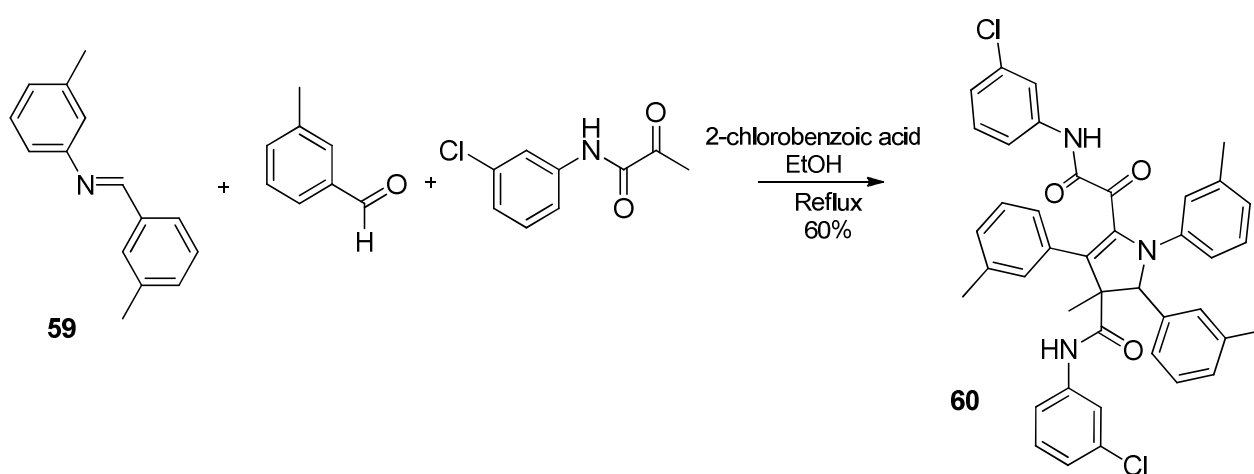


Schéma 28: Essai avec l'intermédiaire supposé **59**.

Nous l'avons donc engagé avec l'amide pyruvique, l'aldéhyde en présence d'acide 2-chlorobenzoïque. Nous avons obtenu le produit de la réaction à trois composantes. Cet essai nous permet de confirmer le passage par l'intermédiaire imine **[I₂]** au cours de la réaction multi-composante.

3.4.5.3. Essais avec des amides pyruviques non éno lisables

Nous avons également voulu déterminer l'importance de la partie éno lisable de l'amide pyruvique. En effet au cours de la réaction à trois composantes, deux molécules d'amide pyruvique sont engagées. La première est condensée avec une molécule d'aldéhyde. La deuxième, quant à elle, réagit au niveau de son carbonyle.

Pour pouvoir déterminer le mécanisme de formation du produit, nous avons synthétisé deux amides pyruviques non éno lisables. Ces deux composés sont synthétisés par la même voie de synthèse que les amides pyruviques précédents⁸⁴. Les deux amides pyruviques obtenus sont engagés avec une nouvelle chalcone **61**, la *p*-anisidine (2 eq), le *m*-tolualdéhyde (**Schéma 29**). Seuls les produits de départ ont été isolés. Ce résultat supporte l'hypothèse d'un passage par l'intermédiaire **[I₁]**.

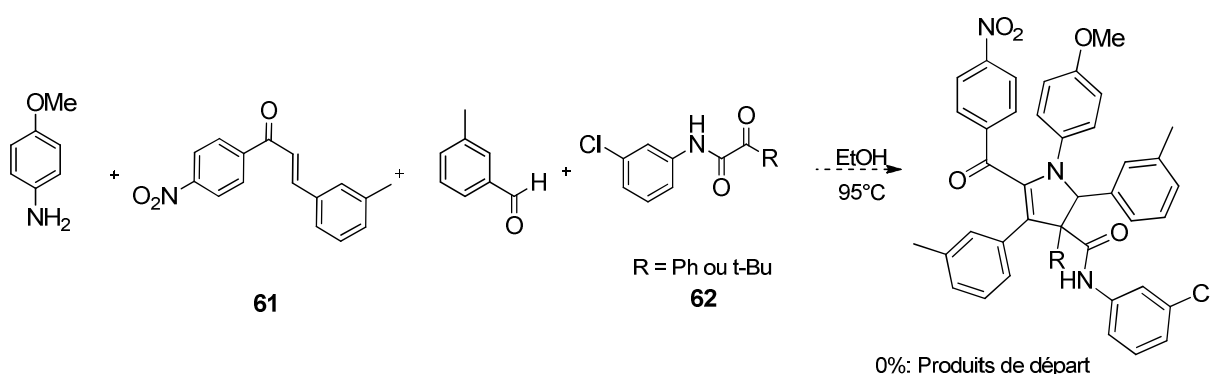


Schéma 29: Essai avec l'amide pyruvique 62.

Pour confirmer le passage par l'intermédiaire **[I₁]**, nous avons réalisé un dernier essai avec un amide pyruvique éno lisable muni d'une chaîne aliphatique. Cet amide pyruvique **63** a été synthétisé de la même manière que les amides pyruviques **62**⁸⁴. L'amide pyruvique **63** est ensuite engagé avec les mêmes réactifs et dans les mêmes conditions réactionnelles que pour les amides pyruviques **62** (**Schéma 30**).

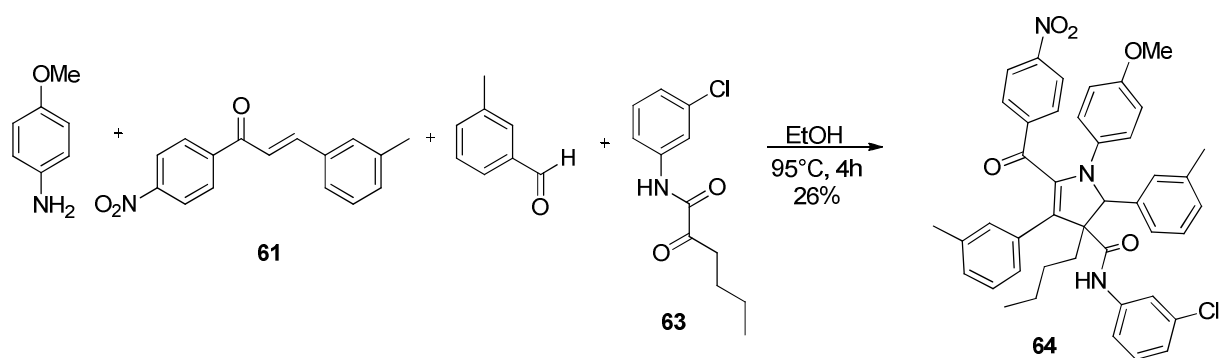


Schéma 30: Schéma réactionnel avec l'amide pyruvique 63.

Pour cet essai, nous avons obtenu le produit de multi-composante. Cet essai nous permet donc de conclure qu'il est nécessaire d'avoir un amide pyruvique énolisable pour obtenir le produit dihydropyrrole. Cette réaction nous permet de confirmer l'importance du deuxième intermédiaire clé issu de la réaction d'aldolisation/crotonisation.

En modifiant la réaction de Doebner, nous avons obtenu un composé dihydropyrrole polyfonctionnel inattendu. Ce produit original est ainsi synthétisé en une étape.

Nous avons pu déterminer les conditions optimales, l'étendue mais également les limites de cette réaction. Celle-ci est donc sensible aux effets électroniques et à l'encombrement stérique. Nous avons proposé une ébauche de mécanisme réactionnel passant par deux intermédiaires clés.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux de recherche, nous avons découvert de manière fortuite une nouvelle synthèse de composés dihydropyrroles. Cette réaction originale fait intervenir seulement trois réactifs : une aniline (ou amine), un aldéhyde et un amide pyruvique. La stéréochimie d'une première molécule a été caractérisée par RMN et diffraction aux rayons X. Nos travaux indiquent que cette réaction se fait avec diverses anilines et amines aliphatiques. Au niveau de l'aldéhyde, le choix est plus limité car le 1,2-dihydropyrrole n'est obtenu, dans le cas des aldéhydes non aromatiques, qu'avec le cyclohexanecarboxaldéhyde avec un rendement faible (25%). Le remplacement de l'amide pyruvique par des amides non-énolisables ne conduit pas à la formation de dihydropyrroles. Bien que le mécanisme de cette réaction demeure inconnu, il semble que celui-ci fasse intervenir une inversion de polarité au niveau de la cétone de l'amide pyruvique.

Ainsi, pour cette réaction multi-composante, nous devons poursuivre les études de son étendue et de ses limites. Des études sur le mécanisme réactionnel sont également à continuer. De plus, les composés obtenus sont actuellement en cours d'étude afin de déterminer leurs propriétés pharmacologiques.

Concernant la partie pharmacologique de ces travaux, nous avons complété l'étude de pharmacomodulation d'une première famille de petites molécules agonistes de PKR1 dérivées du composé **IS 1**. Ces dérivés présentent une importance potentielle en médecine régénérative. En effet, les cellules progénitrices de l'épicarde (EPDC) suscitent de grands espoirs dans ce domaine. L'obstacle principal, pour l'utilisation de ces cellules en thérapie, reste l'identification de facteurs endogènes ou de molécules de synthèse capables d'induire leur différenciation en cellules cardiaques fonctionnelles. Les études de cardioprotection réalisées par l'équipe de C. Nebigil ont démontré que les composés **IS 37** et **IS 39** protègent *in vitro* les cellules progénitrices humaines de type EPDC dans un modèle de cardiotoxicité induite par un médicament utilisé en oncologie : la doxorubicine. Il a également été démontré que ces deux composés peuvent activer Akt *in vivo* chez les souris.

Suite aux résultats *in vitro* obtenus pour le dérivé **IS 37**, nous avons développé la synthèse d'une sonde fluorescente qui sera utilisée dans des expériences de cytométrie en flux pour trier des cellules exprimant PKR1.

Enfin, nous avons synthétisé les premiers dérivés d'une deuxième famille d'agonistes non-peptidiques du récepteur PKR1 jamais décrite auparavant. L'équipe de C. Nebigil a démontré que ces composés présentent les attributs d'agonistes biaisés. Il s'agit là d'une découverte importante qui suggère que ces composés pourraient présenter un potentiel thérapeutique complémentaire à ceux de la première famille dans le cadre du traitement de l'infarctus du myocarde.

5. PARTIE EXPERIMENTALE

Indications générales

Solvants et réactifs

La verrerie pour les réactions anhydres est préalablement séchée. Les solvants anhydres utilisés sont commerciaux et conservés sur tamis moléculaire (Aldrich, Acros, Fluka). Les réactifs sont achetés auprès des fournisseurs suivant : Sigma-Aldrich, Acros, Fluka, Alfa-Aesar, TCI.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des spectromètres *Brucker Advance* à 300, 400 et 500 MHz pour la RMN ^1H et à 101 et 125 MHz pour la RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et les constantes de couplages en Hertz (Hz) par rapport aux solvants deutérés standards. Les abréviations suivantes sont utilisées:

s_l: singulet large

s: singulet

d : doublet

t : triplet

dd : doublet de doublet

ddd : doublet de doublet dédoublé

dt : doublet de triplet

td : triplet de doublet

q : quadruplet

m : multiplet

CH_{Ar} : CH aromatique

C_q : Carbone quaternaire

Spectrométrie de masse

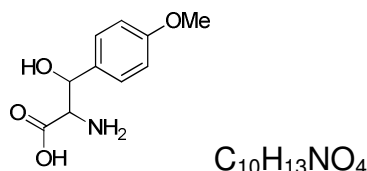
Les spectres de masse de basse résolution (LC-MS) sont réalisés à l'aide d'un spectromètre *Agilent Technologies MSD 1200 SL* simple quadripôle à source multimode ESI/APCI équipé d'une colonne *Thermo Hypersil GOLD* 1.9 μm , 1x30mm.

Chromatographie

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de gel de silice *Merck* 60 F254 sur feuilles d'aluminium.

Les purifications par chromatographie flash ont été effectuées sur un appareil *Armen Spot II*.

2 2-amino-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)propanoic acid



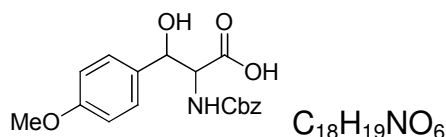
To a solution of KOH (53.6 g, 0.8 mol) in EtOH (1 L) were added glycine (29.2 g, 0.4 mol) and 4-methoxybenzaldehyde (97 g, 0.58 mol). After stirring at room temperature for 18h the solution was concentrated *in vacuo*. Diethylether and pentan were added to the obtained oil. A filtration afforded 2-amino-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)propanoic acid (31 g, 37% yield) as white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.61(s, 3H, CH₃O), 4.09 (d, J= 4.3 Hz, 1H, CH), 5.28 (d, J= 4.5 Hz, 1H, CH), 7.39 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.47 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 55.61 (CH₃), 61.00 (CH), 71.27 (CH), 114.45 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 131.86 (C_q), 159.16 (C_q), 172.45(C_q).

LC-MS : mass calculated: 211.08; mass obtained: 210.0 (M+H)⁺

3 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)propanoic acid



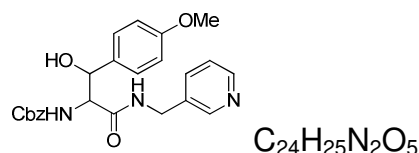
To a solution of compound **2** (5 g, 23.7 mmol) in H₂O (125 mL) were added NaHCO₃ (5 g, 59.3 mmol) and benzyl chloroformate (5 mL, 35.5 mmol). After stirring at room temperature for 1h the solution was washed with diethylether (three times). The aqueous phase was acidified with citric acid (10%) and extracted with ethyle acetate (four times), dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)propanoic acid (2.2 g, 27% yield) was obtained as white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.61(s, 3H, CH₃O), 4.09 (d, J= 4.3 Hz, 1H, CH), 5.19 (s, 2H, CH₂), 5.28 (d, J= 4.5 Hz, 1H, CH), 7.31 (t, J= 8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.39 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.42 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.47 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 55.61(CH₃), 61.00 (CH), 67.1(CH₂), 71.27 (CH), 114.45 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 131.86 (C_q), 1367.3 (C_q), 159.16 (C_q), 172.45 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 345.1; mass obtained: 346.2 (M+H)⁺

4 benzyl (1-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamate



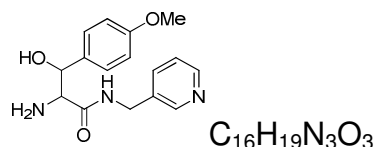
To a solution of compound **3** (500 mg, 1.45 mmol), 3-(methylamino)pyridine (177 μL, 1.74 mmol), triethylamine (23 μL, 1.6 mmol) and HOBt (235 mg, 1.74 mmol) in THF (22 mL) was added, at 0°C, EDC (556 mg, 2.9 mmol). After stirring at room temperature overnight the solution was purified by flash chromatography eluting with 5:95/10:90 iso-propanol : DCM affording benzyl (1-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamate (315 mg, 50% yield) as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.61(s, 3H, CH₃O), 4.09 (d, J= 4.3 Hz, 1H, CH), 5.19 (s, 2H, CH₂), 5.28 (d, J= 4.5 Hz, 1H, CH), 7.10-7.16 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.31 (t, J= 8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.32-7.39 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.39 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.42 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.47 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.40 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 40.72 (CH), 55.61(CH₃), 61.00 (CH), 67.1(CH₂), 71.27 (CH), 114.45 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 131.86 (C_q), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 136.3 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 159.16 (C_q), 172.45 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 435.1; mass obtained: 436.0 (M+H)⁺

5 **2-amino-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide**



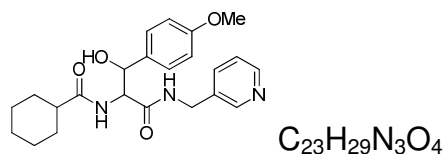
To a solution of compound **4** (70 mg, 0.23 mmol) in EtOH (12.5 mL) was added, under Ar, Pd/C. After stirring at room temperature, under H_2 , overnight the solution was filtered. Concentration *in vacuo* afforded 2-amino-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (51 mg, 74% yield) as a solid.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.61 (s, 3H, CH_3O), 4.09 (d, J = 4.3 Hz, 1H, CH), 5.28 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH), 7.10-7.16 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.32-7.39 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.40 (s, 1H, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 40.72 (CH), 55.61 (CH_3), 61.00 (CH), 71.27 (CH), 114.45 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 131.86 (C_q), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 159.16 (C_q), 172.45 (C_q).

LC-MS : mass calculated: 381.1; mass obtained: 381.0 ($M+H$)⁺

6 **N-(1-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide**



To a solution of compound **5** (51 mg, 0.17 mmol), cyclohexanecarboxylic acid (25.6 mg, 0.20 mmol), triethylamine (27 μ L, 0.19 mmol) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) in THF (2.6 mL) was added EDC (65.2 mg, 0.34 mmol). After stirring at room temperature overnight the solution was purified by flash chromatography eluting with 5:95/10:90 iso-propanol : DCM affording N-(1-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-

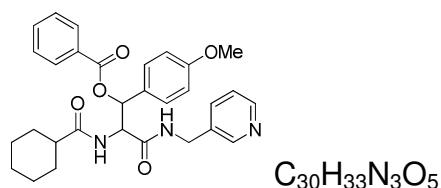
((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide (56 mg, 86% yield) as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.11-1.34 (m, 6H, 3xCH₂), 1.59-1.63 (m, 1H, CH₂), 1.70-1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.99-2.06 (m, 1H, CH), 3.61 (s, 3H, CH₃O), 4.09 (d, J= 4.3 Hz, 1H, CH), 5.28 (d, J= 4.5 Hz, 1H, CH), 7.10-7.16 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.32-7.39 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.42 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.40 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.60 (CH₂), 29.32 (CH₂), 29.45 (CH₂), 37.27 (CH₂), 40.76 (CH), 45.22 (CH₂), 40.72 (CH), 55.61 (CH₃), 61.00 (CH), 71.27 (CH), 114.45 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 131.86 (C_q), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 159.16 (C_q), 172.45 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 385.1; mass obtained: 386.0 (M+H)⁺

7 2-(cyclohexanecarboxamido)-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propyl benzoate



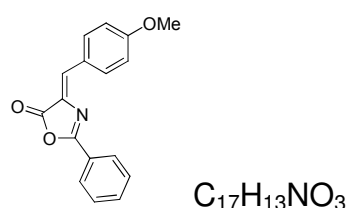
To a solution of compound **6** (133 mg, 0.3 mmol), benzoyl chloride (211 mg, 1.5 mmol), DMAP (36.6 mg, 0.3 mmol) in DCM (2.6 mL) was added Et₃N (200 μg, 1.5 mmol). After stirring at room temperature for 2 days the solution was concentrated *in vacuo*. 2-(cyclohexanecarboxamido)-1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propyl benzoate was obtained without purification (544 mg, Quant.) as a brown solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.11-1.34 (m, 6H, 3xCH₂), 1.59-1.63 (m, 1H, CH₂), 1.70-1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.99-2.06 (m, 1H, CH), 3.61 (s, 3H, CH₃O), 4.09 (d, J= 4.3 Hz, 1H, CH), 5.28 (d, J= 4.5 Hz, 1H, CH), 7.10-7.16 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.32-7.39 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.42 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.58 (t, J= 8.1 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.68 (t, J= 8.1 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.1 (d, J= 8.1 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.40 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.60 (CH₂), 29.32 (CH₂), 29.45 (CH₂), 37.27 (CH₂), 40.76 (CH), 45.22 (CH₂), 40.72 (CH), 55.61 (CH₃), 61.00 (CH), 71.27 (CH), 114.45 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 130.8 (C_q), 131.86 (C_q), 133.2 (CH_{Ar}), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 159.16 (C_q), 172.45 (C_q).

LC-MS : mass calculated: 515.1; mass obtained: 516.0 (M+H)⁺

8 (Z)-4-(4-methoxybenzylidene)-2-phenyloxazol-5(4H)-one

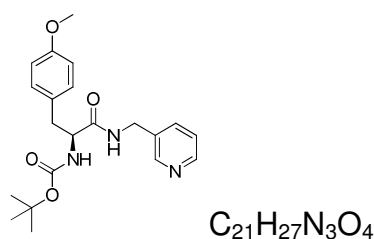


To a solution of compound **2** (3 g, 14.2 mmol) in NaOH (5M) (8.5 mL) was added, at 0°C, benzoyl chloride (2.4 g, 17.04 mmol). After stirring at 0°C for 1h30 the solution was acidified with HCl, extracted with diethylether, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. (Z)-4-(4-methoxybenzylidene)-2-phenyloxazol-5(4H)-one was obtained without purification (1.9 g, 43%) as a white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.90 (s, 3H, CH₃), 7.02 (d, J= 8.6Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.52-7.60 (m, 3H, CH_{Ar}), 8.17-8.22 (m, 4H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 55.4 (CH₃), 114.4 (CH_{Ar}), 125.8 (C_q), 126.5 (C_q), 128.0 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 132.9 (C_q), 134.5 (C_q), 162.1 (C_q).

9 Boc-(S)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide



To a solution of Boc-O-Me-L-Tyr (100 mg, 0.34 mmol), 3-(methylamino)pyridine (40 μL, 0.41 mmol), triethylamine (50 μL, 0.34 mmol) and HOBt (55.4 mg, 0.41 mmol) in

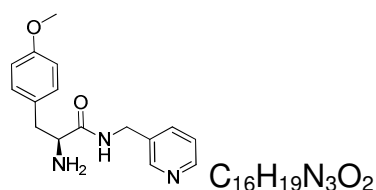
THF (5.1 mL) was added, at 0 °C, EDC (130.4 mg, 0.68 mmol). After stirring at room temperature overnight the solution was purified by Flash chromatography eluting with 5:95/10:90 iso-propanol : DCM affording Boc-(S)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (130 mg, 99% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.32 (s, 9H, 3xCH₃ Boc), 2.92 (d, J= 6.5 Hz, 2H, CH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.22-4.35 (m, 3H, CH+CH₂), 5.19 (s, 1H, NH), 6.71 (dd, J= 8.5-2.5 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 6.99 (dd, J= 9.2-2.3 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.10-7.16 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.32-7.39 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.40 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.18 (CH₃ Boc), 28.12 (CH₂), 37.31 (CH₂), 40.72 (CH), 45.67 (CH), 55.21 (CH₃), 114.1 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 128.46 (CH_{Ar}), 130.23 (CH_{Ar}), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 148.95 (C_q), 158.61 (C_q), 171.45 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 385.20; mass obtained: 386.21 (M+H)⁺

10 (S)-2-Amino-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide



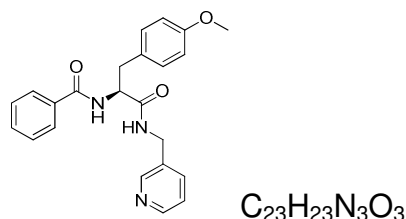
A solution of compound **9** (130mg, 0.34mmol) in 2.6mL TFA was stirred at room temperature for 6 h. The solution was concentrated with a Hickman. We obtained (S)-2-Amino-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (Quant.) as a brown oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.71 (dd, J= 14.1-8.7 Hz, 1H, CH₂), 3.16 (dd, J= 14.1-4.2 Hz, 1H, CH₂), 3.61 (dd, J= 8.9-4.2 Hz, 1H, CH), 3.77 (s, 3H), 4.42 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂), 6.80 (dt, J= 9.5-2.4 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.07-7.11 (m, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.54 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.70 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.48 (d, J= 2.6 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 39.91 (CH₂), 40.50 (CH₂), 55.31 (CH₃), 56.29 (CH), 114.02 (CH_{Ar}), 123.49 (CH_{Ar}), 129.32 (CH_{Ar}), 130.40 (CH_{Ar}), 134.05 (CH_{Ar}), 135.63 (C_q), 148.95 (CH_{Ar}), 149.25 (C_q), 158.62 (C_q), 174.41 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 285.15; mass obtained: 286.15 (M+H)⁺

IS36 (S)-N-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide



To a solution of compound **10** (230 mg, 0.8 mmol) in NaOH (5%, 5 mL) was added the benzoyl chloride (0.11 mL, 0.96 mmol).

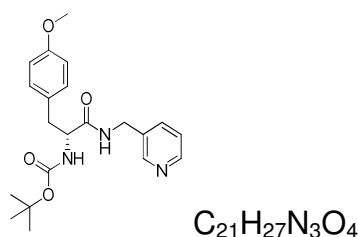
The mixture was vigorously stirred at room temperature during 30 min. After stirring vigorously at room temperature for 30 min, the solution was diluted in DCM, washed with water, dried ($MgSO_4$) and concentrated *in vacuo*. Crystallization in i-PrOH afforded (S)-N-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide (195 mg, 89% yield) as a white solid.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.06 (dd, J = 13.9-8.0 Hz, 1H, CH_2), 3.18 (dd, J = 13.3-6.4 Hz, 1H, CH), 3.74 (s, 3H, CH_3), 4.26 (dd, J = 14.4-4.8 Hz, 1H, CH_2), 4.41 (dd, J = 14.4-4.3 Hz, 1H, CH_2), 4.86 (q, J = 6.9 Hz, 1H, CH_2), 6.75 (d, J = 8.3 Hz, 2H, $2 \times CH_{Ar}$), 6.95 (d, J = 8.4 Hz, 2H, $2 \times CH_{Ar}$), 7.37 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_{Ar}), 7.48 (t, J = 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (d, J = 7.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.39 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 29.92 (CH_2), 37.96 (CH_2), 41.14 (CH), 55.44 (CH_3), 114.35 (CH_{Ar}), 123.72 (CH_{Ar}), 127.24 (CH_{Ar}), 128.53 (CH_{Ar}), 128.85 (CH_{Ar}), 130.57 (CH_{Ar}), 132.16 (CH_{Ar}), 133.73 (CH_{Ar}), 135.81 (C_q), 148.84 (CH_{Ar}), 149.21 (C_q), 158.89 (C_q), 167.55 (C_q), 171.38 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 389.17; mass obtained: 390.00 ($M+H$)⁺

9 Boc-(*R*)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide



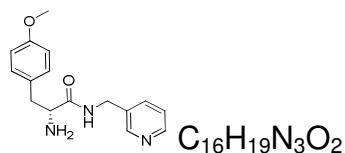
To a solution of Boc-O-Me-D-Tyr (100 mg, 0.34 mmol), 3-(methylanino)pyridine (40 μ L, 0.41 mmol), triethylamine (50 μ L, 0.34 mmol) and HOBt (55.4 mg, 0.41 mmol) in THF (5.1 mL) was added, at 0°C, EDC (130.4 mg, 0.68 mmol). After stirring at room temperature overnight the solution was purified by Flash chromatography eluting with 5 : 95/10 : 90 iso-propanol : DCM afforded Boc-(*R*)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (110 mg, 84% yield) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 1.36 (s, 9H, 3x CH_3 Boc), 2.91-3.09 (m, 2H, CH_2), 3.74 (s, 3H, CH_3), 4.24-4.29 (m, 1H, CH), 4.33 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH_2), 6.73-6.77 (m, 2H, 2x CH_{Ar}), 7.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 2x CH_{Ar}), 7.17 (dd, J = 7.7-4.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.36-7.47 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.45 (d, J = 4.6 Hz, 1H, CH_{Ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 25.18 (CH_2), 28.12 (CH_2), 37.31 (CH_2), 40.72 (CH), 45.67 (CH_2), 55.21 (CH_3), 114.1 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 128.46 (CH_{Ar}), 130.23 (CH_{Ar}), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 148.95 (C_q), 158.61 (C_q), 171.45 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 385.20; mass obtained: 386.21 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

10 (*R*)-2-Amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide



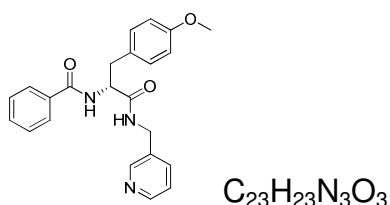
A solution of compound **9** (110 mg; 0.34 mmol) in TFA (2.2 mL) was stirred at room temperature for 3 h. The solution was concentrated with a Hickman. We obtained (*R*)-2-Amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (quant.) as a yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.71 (dd, J= 14.1-8.7 Hz, 1H, CH₂), 3.16 (dd, J= 14.1-4.2 Hz, 1H, CH₂), 3.61 (dd, J= 8.9-4.2 Hz, 1H, CH), 3.77 (s, 3H), 4.42 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂), 6.80 (dt, J= 9.5-2.4 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.07-7.11 (m, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.54 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.70 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.48 (d, J= 2.6 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 39.91 (CH₂), 40.50 (CH), 55.31 (CH₃), 56.29 (CH₂), 114.02 (CH_{Ar}), 123.49 (CH_{Ar}), 129.32 (CH_{Ar}), 130.40 (CH_{Ar}), 134.05 (CH_{Ar}), 135.63 (C_q), 148.95 (CH_{Ar}), 149.25 (C_q), 158.62 (C_q), 174.41 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 285.15; mass obtained: 286.15 (M+H)⁺

IS 37 (*R*)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide



To a solution of compound **10** (229 mg; 0.8 mmol) in NaOH (5%, 4.6 mL) was added the benzoyl chloride (0.11 mL; 0.96 mmol).

The mixture was vigorously stirred at room temperature during 30 min. After stirring vigorously at room temperature for 30 min, the solution was diluted in DCM, washed with water, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. We obtained (*R*)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide (196 mg, 63% yield) as a white solid.

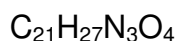
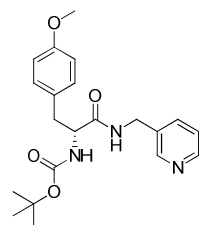
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.06 (dd, J= 13.7-8.3 Hz, 1H, CH₂), 3.18 (dd, J= 13.6-5.6 Hz, 1H, CH₂), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.25 (dd, J= 14.6-5.4 Hz, 1H, CH), 4.40 (dd, J= 14.9-5.9 Hz, 1H, CH₂), 4.86 (q, J= 6.9 Hz, 1H, CH₂), 6.75 (d, J= 8.0 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.10 (d, J= 8.8 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.15 (t, J= 6.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.37 (t, J= 7.5 Hz, 3H, 3x CH_{Ar}), 7.48 (t, J= 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (d, J= 7.5 Hz, 2H, 2x CH_{Ar}), 8.38 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.45 (d, J= 4.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 29.92 (CH₂), 37.96 (CH₂), 41.14 (CH), 55.44 (CH₃), 114.35 (CH_{Ar}), 123.72 (CH_{Ar}), 127.24 (CH_{Ar}), 128.53 (CH_{Ar}), 128.85 (CH_{Ar}), 130.57 (CH_{Ar}), 132.16 (CH_{Ar}), 133.73 (CH_{Ar}), 135.81 (C_q), 148.84 (CH_{Ar}), 149.21 (C_q), 158.89

(C_q), 167.55 (C_q), 171.38 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 389.17; mass obtained: 390.00 (M+H)⁺

11 Boc-(*R*)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide



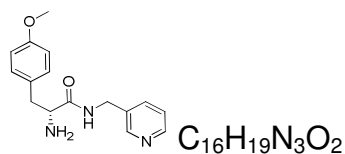
To a solution of Boc-O-Me-D-Tyr (100 mg, 0.34 mmol), 3-(methylamino)pyridine (40 μ L, 0.41 mmol), triethylamine (50 μ L, 0.34 mmol) and HOBt (55.4 mg, 0.41 mmol) in THF (5.1 mL) was added, at 0 °C, EDC (130.4 mg, 0.68 mmol). After stirring at room temperature overnight the solution was purified by Flash chromatography eluting with 5:95/10:90 iso-propanol : DCM affording Boc-(*R*)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (110 mg, 93% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.36 (s, 9H, 3xCH₃ Boc), 2.91-3.09 (m, 2H, CH₂), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.24-4.29 (m, 1H, CH), 4.33 (t, J= 5.9 Hz, 2H, CH₂), 6.73-6.77 (m, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.03 (d, J= 8.7 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.17 (dd, J= 7.7-4.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.36-7.47 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.45 (d, J= 4.6 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.18 (CH₂), 28.12 (CH₂), 37.31 (CH₂), 40.72 (CH), 45.67 (CH₂), 55.21 (CH₃), 114.1 (CH_{Ar}), 123.40 (CH_{Ar}), 128.46 (CH_{Ar}), 130.23 (CH_{Ar}), 133.53 (CH_{Ar}), 135.53 (C_q), 148.6 (CH_{Ar}), 148.95 (C_q), 158.61 (C_q), 171.45 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 385.20; mass obtained: 386.21 (M+H)⁺

12 (*R*)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide



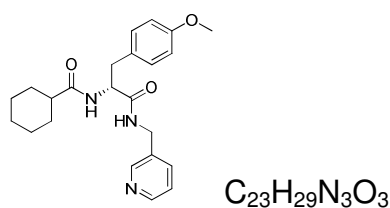
A solution of compound **11** (110 mg; 0.34 mmol) in TFA (2.2 mL) was stirred at room temperature for 3 h. The solution was concentrated with a Hickman. We obtained (*R*)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (83% yield) as a yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.71 (dd, *J* = 14.1-8.7 Hz, 1H, CH₂), 3.16 (dd, *J* = 14.1-4.2 Hz, 1H, CH₂), 3.61 (dd, *J* = 8.9-4.2 Hz, 1H, CH), 3.77 (s, 3H), 4.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 6.80 (dt, *J* = 9.5-2.4 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.07-7.11 (m, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.70 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.48 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 39.91 (CH₂), 40.50 (CH), 55.31 (CH₃), 56.29 (CH₂), 114.02 (CH_{Ar}), 123.49 (CH_{Ar}), 129.32 (CH_{Ar}), 130.40 (CH_{Ar}), 134.05 (CH_{Ar}), 135.63 (C_q), 148.95 (CH_{Ar}), 149.25 (C_q), 158.62 (C_q), 174.41 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 285.15; mass obtained: 286.15 (M+H)⁺.

IS 39 (*R*)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide



To a solution of compound **12** (60 mg, 0.21 mmol), cyclohexanoïque acid (32 mg, 0.25 mmol), triethylamine (32 μL, 0.23 mmol) and HOBt (57 mg, 0.42 mmol) in THF (3.15 mL) was added EDC (81 mg, 0.42 mmol). After stirring, at room temperature, for two days the mixture was washed, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography on silica gel eluting with Et₂O 100%, AcOEt 100%, AcOEt: MeOH 80: 20 afforded (*R*)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-

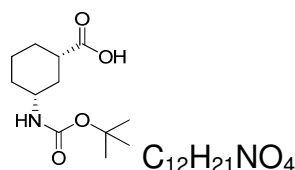
3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide (80 mg, 96% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.11-1.34 (m, 6H, 3xCH₂), 1.59-1.63 (m, 1H, CH₂), 1.70-1.73 (m, 4H, 2xCH₂), 1.99-2.06 (m, 1H, CH₂), 2.90-3.02 (m, 2H, CH₂), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.24-4.38 (m, 2H, CH₂), 4.59 (q, J= 8.0 Hz, 1H, CH), 6.09 (d, J= 7.7 Hz, 1H), 6.74 (t, J= 5.5 Hz, 1H), 6.74 (d, J= 8.7 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.03 (d, J= 8.5 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.17 (dd, J= 7.9-4.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.36 (dt, J= 7.9-1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (d, J= 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.46 (dd, J= 4.9-1.6 Hz, 1H_s).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.60 (CH₂), 29.32 (CH₂), 29.45 (CH₂), 37.27 (CH₂), 40.76 (CH), 45.22 (CH₂), 54.60 (CH₂), 55.32 (CH₃), 114.19 (CH_{Ar}), 123.69 (CH_{Ar}), 128.39 (CH_{Ar}), 130.20 (CH_{Ar}), 135.49 (C_q), 148.73 (CH_{Ar}), 149.21 (C_q), 176.41 (C_q), 176.53 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 395.22; mass obtained: 396.23 (M+H)⁺

13 (1S, 3R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexanecarboxylic acid



To a solution of (1S,3R)-3-aminocyclohexanecarboxylic acid (100 mg, 07 mmol) in dioxane (1 ml) was added a solution of NaOH (1N, 420 μL). After stirring for 10 min at room temperature, the Boc₂O (198 mg, 0.9 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night the mixture was concentrated *in vacuo*. Water was added and the mixture was acidified with concentrated HCl until pH = 4. After extraction with CH₂Cl₂, the combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. We obtained (1S, 3R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexanecarboxylic acid (130 mg, 77% yield with 10% of epimerization) as a white solid.

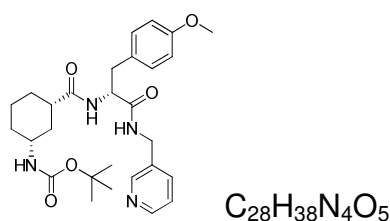
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.97-1.18 (m, 3H, CH₂), 1.21-1.32 (m, 1H, CH₂), 1.37 (s, 9H, 3xCH₃ Boc), 1.71 (d, J= 10.5 Hz, 2H, CH₂), 1.79 (d, J= 12.8 Hz, 1H, CH₂), 1.94 (td, J= 27.0-11.5 Hz, 1H, CH₂), 2.22 (tt, J= 12.2-2.7 Hz, 1H, CH), 3.16-

3.29 (m, 1H, CH), 6.76 (d, J= 7.8 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23.85 (CH₂), 27.93 (CH₂), 28.26 (CH₂), 31.98 (CH₂), 41.78 (CH), 48.51, 66.35 (CH), 77.41 (C_q), 154.76 (C_q), 176.07 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 243.15; mass obtained: 242.2 (M-H)⁻

15 tert-butyl ((1*R*, 3*S*)-3-(((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamoyl)cyclohexyl)carbamate



To a solution of compound **13** (100 mg, 0.4 mmol) in THF (6 mL) was added DEPBT (119.8 mg, 0.4 mmol) and triethylamine (108 μL, 0.8 mmol). After stirring, at room temperature for 1h30, compound **12** (114 mg, 0.4 mmol) was added. After stirring at room temperature for 1h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography on silica gel eluting with 90/10-CH₂Cl₂/iPrOH, 80/ 20-CH₂Cl₂/ MeOH afforded tert-butyl ((1*R*, 3*S*)-3-(((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamoyl)cyclohexyl)carbamate (141 mg, 70% yield) as a white solid.

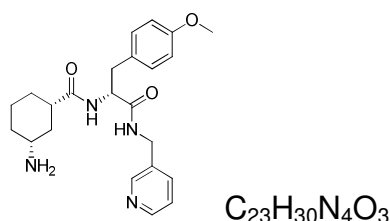
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.01-1.26 (m, 6H, CH₂), 1.38 (s, 9H, CH₃), 1.55-1.61 (m, 2H, CH₂), 1.64-1.70 (m, 2H, CH₂), 2.21 (t, J= 11.7 Hz, 1H, CH), 2.69-2.75 (m, 1H, CH₂), 2.88-2.93 (m, 1H, CH₂), 3.15-3.25 (m, 1H, CH), 3.70 (s, 3H, CH₃), 4.28 (d, J= 5.1 Hz, 2H, CH₂), 4.41 (hex, J= 5.6 Hz, 1H, CH), 6.72 (d, J= 8.2 Hz, 1H, NHBoc), 6.77 (d, J= 8.7 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.11 (d, J= 8.7 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.28-7.37 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.50(d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.98 (d, J= 8.3 Hz, 1H, NH), 8.46 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 11.01 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.85 (CH₂), 23.97 (CH₂), 27.94 (CH₂), 28.25 (3xCH₃), 30.67 (CH₂), 31.99 (CH₂), 32.00 (CH₂), 35.66 (CH₂), 35.67 (CH₂), 36.68 (CH₂), 36.70 (CH₂), 42.87 (CH), 48.57 (CH), 54.09 (CH), 54.89 (CH₃), 77.35 (C_q), 107.70 (CH_{Ar}), 113.38 (CH_{Ar}), 129.70 (CH_{Ar}), 130.13 (CH_{Ar}), 134.73 (C_q), 154.73

(CH_{Ar}), 157.73 (C_q), 171.42 (C_q), 174.21 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 510.28; mass obtained: 511.3 (M+H)⁺

IS 41 (1*S*, 3*R*)-3-amino-N-((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide



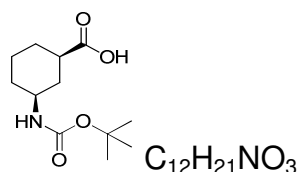
To a solution of tert-butyl compound **15** (100 mg, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added TFA (1 mL). After stirring for 2h at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The obtained product was dissolved in water, basified with NaOH (3N) until pH 10 and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. We obtained (1*S*, 3*R*)-3-amino-N-((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide (70 mg, 95% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.85-0.93 (m, 2H, CH₂), 1.10-1.17 (m, 2H, CH₂), 1.56-1.69 (m, 4H, CH₂), 2.18 (tt, J= 11.8-3.2 Hz, 1H, CH), 2.47 (CH in the DMSO pic), 2.73 (dd, J= 13.5-8.8 Hz, 1H, CH₂), 2.91 (dd, J= 13.5-5.7 Hz, 1H, CH₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 4.28 (d, J= 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.43 (dt, J= 8.8-5.7 Hz, 1H, CH), 6.81 (d, J= 8.5 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.12 (d, J= 8.5 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.30 (dd, J= 7.8-4.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.5 (dt, J= 7.8-1.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.94 (d, J= 8.8 Hz, NH), 8.42 (d, J= 1.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.44 (dd, J= 4.8-1.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.48 (t, J= 6.0 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 24.01 (CH₂), 28.2 (CH₂), 35.59 (CH₂), 36.73 (CH₂), 39.00 (CH₂), 39.56 (CH₂), 42.92 (CH), 49.69 (CH), 54.05 (CH), 54.92 (CH), 113.42 (2xCH_{Ar}), 123.27 (CH_{Ar}), 129.69 (CH_{Ar}), 130.11 (CH_{Ar}), 134.72 (C_q), 134.76 (CH_{Ar}), 147.93 (CH_{Ar}), 148.58 (CH_{Ar}), 157.73 (C_q), 171.47 (C_q), 174.59 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 410.28; mass obtained: 411.2 (M+H)⁺

14 (1*R*, 3*S*)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexanecarboxylic acid



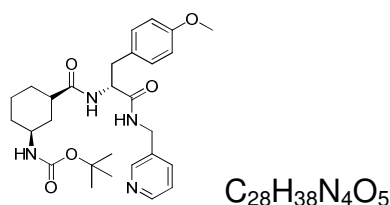
To a solution of (1*R*, 3*S*)-3-aminocyclohexanecarboxylic acid (100 mg, 0.7 mmol) in dioxane (1 ml) was added a solution of NaOH (1*N*, 420 μ L). After stirring for 10 min at room temperature, the Boc₂O (198 mg, 0.9 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night the mixture was concentrated *in vacuo*. Water was added and the mixture was acidified with concentrated HCl until pH = 4. After extraction with CH₂Cl₂, the combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. We obtained (1*R*, 3*S*)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexanecarboxylic acid (122 mg, 72% yield) and (1*R*, 3*S*)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexanecarboxylic anhydride (63 mg, 19%) as a not separated mixture.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.97-1.18 (m, 3H, CH₂), 1.21-1.32 (m, 1H, CH₂), 1.37 (s, 9H, 3xCH₃ Boc), 1.71 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H, CH₂), 1.79 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, CH₂), 1.94 (td, *J* = 27.0-11.5 Hz, 1H, CH₂), 2.22 (tt, *J* = 12.2-2.7 Hz, 1H, CH), 3.16-3.29 (m, 1H, CH), 6.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 23.85 (CH₂), 27.93 (CH₂), 28.26 (CH₂), 31.98 (CH₂), 41.78 (CH), 48.51, 66.35 (CH), 77.41 (C_q), 154.76 (C_q), 176.07 (C_q).

LC-MS : mass calculated: 243.15; mass obtained: 242.2 (M-H)⁻

16 tert-butyl ((1*S*, 3*S*)-3-(((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamoyl)cyclohexyl)carbamate



To a solution of compound **14** (100 mg, 0.4 mmol) in THF (6 mL) was added DEPBT (119.8 mg, 0.4 mmol) and triethylamine (108 μ L, 0.8 mmol). After stirring, at room

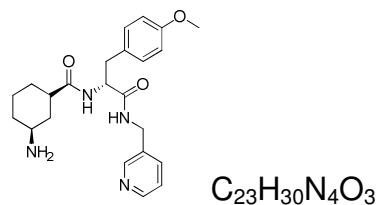
temperature for 1h30, compound **12** (114 mg, 0.4 mmol) was added. After stirring at room temperature for 1h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Trituration in Et₂O afforded tert-butyl ((1*S*, 3*S*)-3-(((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamoyl)cyclohexyl)carbamate (107 mg, 53% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.95-1.09 (m, 2H, CH₂), 1.10-1.26 (m, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9H, CH₃), 1.43 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, CH), 1.66 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H, CH₂), 1.76 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, CH), 2.20 (tt, *J* = 12.1-3.1Hz, 1H, CH), 2.63-2.73 (m, 1H, CH₂), 2.88-2.93 (m, 1H, CH₂), 3.15-3.27 (m, 1H, CH), 3.70 (s, 3H, CH₃), 4.28 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH), 4.41 (hex, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NHBoc), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.28-7.31 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.49 (dt, *J* = 7.8-1.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 8.41-8.45 (m, 2H, CH_{Ar}+NH), 8.48 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.85 (CH₂), 23.97 (CH₂), 27.94 (CH₂), 28.25 (3xCH₃), 30.67 (CH₂), 31.99 (CH₂), 32.00 (CH₂), 35.66 (CH₂), 35.67 (CH₂), 36.68 (CH₂), 36.70 (CH₂), 42.87 (CH), 48.57 (CH), 54.09 (CH), 54.89 (CH₃), 77.35 (C_q), 107.70 (CH_{Ar}), 113.38 (CH_{Ar}), 129.70 (CH_{Ar}), 130.13 (CH_{Ar}), 134.73 (C_q), 154.73 (CH_{Ar}), 157.73 (C_q), 171.42 (C_q), 174.21 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 510.28; mass obtained: 511.3 (M+H)⁺

IS 42 (1*S*, 3*S*)-3-amino-*N*-((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide



To a solution of compound **16** (100 mg, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added TFA (1 mL). After stirring for 2h at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The obtained product was dissolved in water, basified with NaOH (3N) until pH 10 and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. We obtained (1*S*, 3*S*)-3-amino-*N*-((*R*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-

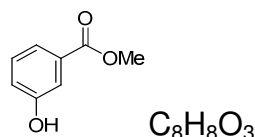
oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)cyclohexanecarboxamide (70 mg, 92% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.82-0.90 (m, 1H, CH₂), 0.97-1.0.6 (m, 2H, CH₂), 1.13-1.23 (m, 1H, CH₂), 1.45 (d, J= 10.5 Hz, 1H, CH₂), 1.62-1.76 (m, 3H, CH₂), 2.17 (tt, J= 11.8-3.2 Hz, 1H, CH), 2.47 (CH in the DMSO pic), 2.72 (dd, J= 13.6-8.6 Hz, 1H, CH₂), 2.90 (dd, J= 13.6-5.5 Hz, 1H, CH₂), 3.70 (s, 3H, CH₃), 4.28 (d, J= 5.9 Hz, 2H, CH₂), 4.43 (dt, J= 8.6-5.5 Hz, 1H, CH), 6.79 (d, J= 8.4 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.11 (d, J= 8.4 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.30 (dd, J= 7.8-4.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.5 (dt, J= 7.8-1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.94 (d, J= 8.6 Hz, NH), 8.42 (d, J= 1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.44 (dd, J= 4.7-1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.49 (t, J= 5.9 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24.59 (CH₂), 28.92 (CH₂), 35.78 (CH₂), 37.26 (CH₂), 38.77 (CH₂), 39.86 (CH₂), 43.28 (CH), 50.11 (CH), 54.56 (CH), 55.44 (CH), 113.9 (2xCH_{Ar}), 123.81 (CH_{Ar}), 130.22 (CH_{Ar}), 130.62 (CH_{Ar}), 135.24 (CHq), 135.27 (CH_{Ar}), 148.45 (CH_{Ar}), 149.10 (CH_{Ar}), 158.23 (Cq), 172.01 (Cq), 175.02 (Cq).

LC-MS: mass calculated: 410.28; mass obtained: 411.2 (M+H)⁺

18 methyl 3-hydroxybenzoate



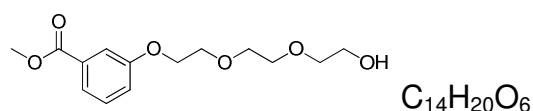
To a solution of 3-hydroxybenzoic acid (15 g, 108.7 mmol) in MeOH (163 mL) was added, at 0 °C, SOCl₂ (19.4 g, 163.1 mmol). After stirring under reflux for 5h, the solution was concentrated *in vacuo*, diluted with AcOEt, extracted with AcOEt, washed with brine, with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Methyl 3-hydroxybenzoate was obtained (16.5 g, quant.) as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.87 (s, 3H, CH₃), 7.06 (ddd, J= 8-2.5-0.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.25 (t, J= 8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.57 (t, J= 1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 51.5 (CH₃), 117.2 (CH_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 122.4 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 131.2 (Cq), 158.8 (Cq), 165.7 (Cq).

LC-MS : mass calculated: 165.2; mass obtained: 166.1 (M+H)⁺

19 Methyl 3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate



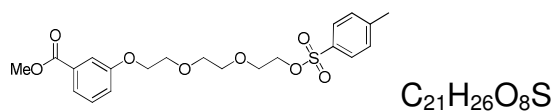
To a solution of compound **18** (16.5 g, 108.6 mmol) and 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (19.7 mL, 135.8 mmol) in DMF (271.5 mL) was added K_2CO_3 (30 g, 217.2 mmol). After stirring at 80 °C for 1 day, the solution was diluted with AcOEt, washed with water, with brine and dried ($MgSO_4$) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% ether and after 100% AcOEt afforded Methyl 3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate (12.9 g, 41% yield) as a light yellow oil.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.47 (d, J = 5.1 Hz, 2H, CH_2), 3.55 (d, J = 5.3 Hz, 2H, CH_2), 3.58 (d, J = 4.9 Hz, 2H, CH_2); 3.59 (d, J = 5.9 Hz, 2H, CH_2), 3.73 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH_2), 3.77 (s, 3H, CH_3), 4.04 (t, J = 4.5 Hz, 2H, CH_2), 6.98 (ddd, J = 8.3-2.5-1 Hz, 1H, CH_2), 7.21 (t, J = 8.1 Hz, 1H, CH_2), 7.44 (t, J = 3.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.49 (dd, J = 7.7-1 Hz, 1H, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 52.05 (CH_3), 61.55 (CH_2), 67.55 (CH_2), 69.53 (CH_2), 70.28 (CH_2), 70.59 (CH_2), 70.75 (CH_2), 72.54 (CH_2), 76.97 (CH_2), 77.29 (CH_2), 77.61 (CH_2), 114.76 (CH_{Ar}), 119.98 (CH_{Ar}), 122.11 (CH_{Ar}), 129.35 (CH_{Ar}), 131.33 (C_q), 158.67 (C_q), 166.77 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 284.13; mass obtained: 285.13 ($M+H$)⁺

20 Methyl 3-[2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]benzoate



To a solution of compound **19** (12 g, 42.3 mmol) and anhydrous pyridine (3.4 mL, 42.3 mmol) in anhydrous DCM (14.6 mL) was added dropwise a solution of tosyl chloride (8.5 g, 44.4 mmol) in anhydrous DCM (8.5 mL). After stirring at room temperature for 23h, the solution is mixed with water. Extraction with DCM, the organics layers are washed with water, dried ($MgSO_4$) and concentrated *in vacuo*. Chromatography on silica gel eluting with 1:4 diethyl ether: pentane, 100% diethyl

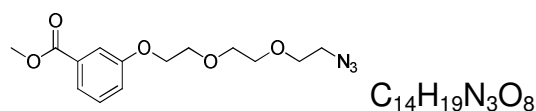
ether, 100% ethyl acetate, 8:2 ethyl acetate: methanol afforded methyl 3-[2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]benzoate (14.11 g, 76% yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.37 (s, 3H, CH₃), 3.56-3.68 (m, 4H, CH₂), 3.78 (t, J=4.9 Hz, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.11 (q, J=4.9 Hz, 4H, CH₂), 7.06 (dd, J=8.4-1.9 Hz, 1H, CH₂), 2.83 (t, J= 7.5 Hz, 1H, CH₂), 7.51 (t, J= 2.4 HZ, 1H, CH_{Ar}), 7.58 (d, J=7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.74 (d, J= 8 Hz, 2H, 2x CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.61 (CH₃), 52.16 (CH₃), 66.67 (CH₂), 68.76 (CH₂), 69.25 (CH₂), 69.71 (CH₂), 70.81 (CH₂), 70.88 (CH₂), 114.82 (CH_{Ar}), 120.07 (CH_{Ar}), 122.20 (CH_{Ar}), 127.96 (CH_{Ar}), 129.41 (CH_{Ar}), 129.82 (C_q), 131.44 (C_q), 133.82 (C_q), 144.79 (C_q), 158.76 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 438.13; mass obtained: 461.00 (M+Na)⁺

21 Methyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate



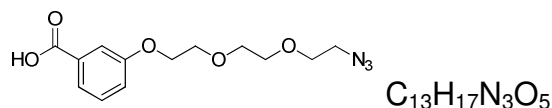
To a solution of compound **20** (2 g, 4.56 mmol) in DMF (47.5 mL) was added sodium azide (417 mg, 6.84 mmol). After stirring at reflux for 16h, the solution was concentrated by Hickman. The oil was diluted in ethyl ether, filtrated on Celite and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 8: 2 ether: pentane afforded Methyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate (903 m g, 65% yield) as an uncolored oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.39 (t, J= 4.9 Hz, 2H, CH₂), 3.67-3.71 (m, 4H, CH₂), 3.73-3.76 (m, 2H, CH₂), 3.87-3.89 (m, 2H, CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃), 4.18 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂), 7.12 (ddd, J= 8.5-3.6-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.34 (t, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.57 (t, J= 2.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.63 (dt,, J= 7.7-1.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 50.71 (CH₃), 52.15 (CH₂), 67.69 (CH₂), 69.77 (CH₂), 70.11 (CH₂), 70.77 (CH₂), 70.94 (CH₂), 114.85 (CH_{Ar}), 120.08 (CH_{Ar}), 122.19 (CH_{Ar}), 129.19 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 131.44 (C_q), 158.78 (C_q), 166.9 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 309.13; mass obtained: 282.2 (M+H)⁺

22 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoic acid



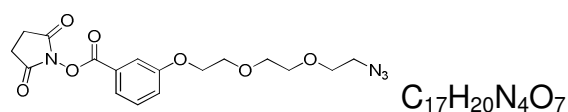
To a solution of compound **21** (5 g, 16.2 mmol) in dioxane: MeOH (80 : 28 v/v) was added a solution of NaOH (4N, 6.1 mL). After stirring at room temperature for 20 h, the solution was acidified with HCl until pH= 1, concentrated *in vacuo*. The aqueous phase was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine and dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. This treatment afforded Methyl 3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate (4.83 g, Quant.) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) : δ 3.37 (t, J= 4.8 Hz, 2H, CH₂), 3.66-3.68 (m, 2H, CH₂), 3.88 (t, J=4.8 Hz, 2H, CH₂), 4.18 (t, J= 4.4 Hz, 2H, CH₂), 7.15 (dd, J= 8.3-2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35 (t, J= 8.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.62 (t, J= 1.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.69 (dd, J= 7.7-2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 50.7 (CH₂), 67.70 (CH₂), 69.77 (CH₂), 70.12 (CH₂), 70.76 (CH₂), 70.95 (CH₂), 115.25 (CH_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 122.85 (CH_{Ar}), 129.57 (CH_{Ar}), 130.62 (C_q), 158.92 (C_q), 171.58 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 295.12; mass obtained: 294.2 (M+H)⁺

23 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate



To a solution of compound **22** (4g, 13.6 mmol) and N-hydroxysuccinamide (1.7 g, 14.96 mmol) in DCM (16.5 mL) was added EDCi (2.9 g, 14.96 mmol). After stirring at room temperature, under Ar, for 19 h, the solution was washed with water, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. We obtained 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate (5.45 g, Quant.) as a light yellow oil.

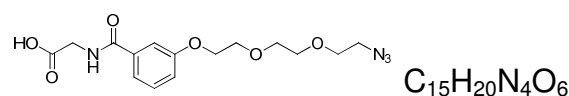
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.22 (s, 2H, CH₂), 3.35 (t, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂), 3.46 (s, 2H, CH₂), 3.64-3.68 (m, 4H, CH₂), 3.71-3.73 (m, 2H, CH₂), 3.86 (t, J= 4.7 Hz, 2H,

CH₂), 4.16 (t, J= 4.7 Hz, 2H, CH₂), 7.14 (ddd, J= 8.4-2.5-1.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.33 (t, J= 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.60 (t, J= 2.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.67 (dt, J= 7.5-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.93 (CH₂), 50.80 (CH₂), 67.85 (CH₂), 69.68 (CH₂), 70.11 (CH₂), 70.72 (CH₂), 70.93 (CH₂), 115.64 (CH_{Ar}), 122.24 (CH_{Ar}), 123.2 (CH_{Ar}), 126.29 (C_q), 129.91 (C_q), 158.98 (C_q), 161.76 (C_q), 169.22 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 392.13; mass obtained: 391.0 (M+H)⁺

24 2-(3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzamido)acetic acid



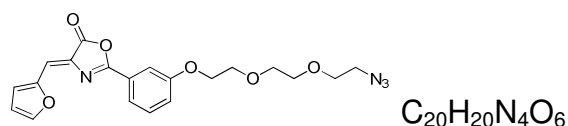
To a solution of compound **24** (4.2 g, 10.7 mmol) and glycine (803 mg, 10.7 mmol) in DCM (23 mL) was added a solution of K₂CO₃ (4.4 g, 32.1 mmol) in water (35 mL). After stirring at room temperature for 3h30 the mixture was concentrated *in vacuo*, the solution was extracted with diethyl ether, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. We obtained 2-(3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzamido)acetic acid (3.56 g, 95 % yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.82 (s, 2H, CH₂), 3.31 (t, J= 4.5 Hz, 2H, CH₂), 3.59-3.62 (m, 4H, CH₂), 3.64-3.68 (m, 2H, CH₂), 3.81 (t, J= 4.5 Hz, 2H, CH₂), 4.11 (t, J= 4.5 Hz, 2H, CH₂), 7.17 (ddd, J= 8.3-2.6-0.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.33 (t, J= 8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.56 (t, J= 2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (td, J= 7.7-1.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.7 (CH₂), 50.66 (CH₂), 69.67 (CH₂), 70.09 (CH₂), 70.71 (CH₂), 70.81 (CH₂), 70.92 (CH₂), 115.73 (CH_{Ar}), 122.28 (CH_{Ar}), 123.11 (CH_{Ar}), 129.99 (CH_{Ar}), 158.92 (C_q), 161.74 (C_q), 167.77 (C_q), 169.33 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 352.14; mass obtained: 351.00 (M+H)⁺

25 (Z)-2-(3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-4-(furan-2-ylmethylene)oxazol-5(4H)-one



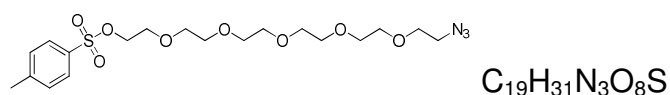
To a solution of compound **24** (1.5 g, 4.26 mmol) and furfural (340 mg, 3.55 mmol) in Ac₂O (1.08 g, 10.65 mmol) was added NaOAc.3H₂O (725 mg, 5.33 mmol). After stirring, at 50 °C, for 5h the mixture was neutralized with NaHCO₃, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography on silica gel eluting with 1:3 DCM: pentane, 100% DCM, 9: 1 DCM: acetone, 8:2 DCM: acetone afforded (Z)-2-(3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-4-(furan-2-ylmethylene)oxazol-5(4H)-one (540 mg, 37% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.4 (t, J= 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.68-3.73 (m, 4H, CH₂), 3.75-3.79 (m, 2H, CH₂), 3.92 (t, J= 5.0 Hz, 2H, CH₂), 4.24 (t, J= 4.7 Hz, 2H, CH₂), 6.67 (dd, J= 1.9-0.6 Hz, 1H, CH), 7.1-7.19 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.43 (t, J= 7.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.57 (d, J= 3.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.68-7.69 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.76 (dt, J= 7.8-0.9 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 17.47 (CH₂), 25.63 (CH₂), 50.68 (CH₂), 67.8 (CH₂), 69.78 (CH₂), 70.17 (CH₂), 70.82 (CH), 70.99 (CH₂), 113.4 (CH_{Ar}), 113.86 (CH_{Ar}), 118.46 (CH_{Ar}), 120.29 (CH_{Ar}), 120.48 (CH_{Ar}), 121.15 (CH_{Ar}), 130.14 (C_q), 146.80 (C_q), 165.55 (C_q), 169.10 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 412.14; mass obtained: 413.00 (M+H)⁺

28 17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate



To a solution of 17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol (500 mg, 0.19 mmol), triethylamine (1.15 g, 11.4 mmol), and DMAP (23 mg, 0.19 mmol) in DCM (75 mL) was cooled at 0 °C. A solution of Tosyl chloride (1.55 g, 8.15 mmol) in DCM (25 mL) was added dropwise. after stirring for 18h at room temperature the mixture was concentrated *in vacuo* and purified by Flash chromatography eluting with 50:50 to

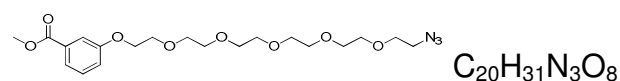
0:100 pentane : AcOEt affording 17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate (659mg, 88% yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.34 (t, J= 5.0 Hz, 2H, CH₂), 3.53 (s, 4H, CH₂), 3.56-3.590 (m, 4H, CH₂), 3.594-3.65 (m, 12H, CH₂), 4.09-4.12 (m, 2H, CH₂), 7.29 (dd, J= 8.5-0.5 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}), 7.54 (t, J= 8.5-2.0 Hz, 2H, 2xCH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.57 (CH₃), 50.55 (CH₂), 68.53 (CH₂), 69.12 (CH₂), 69.88 (CH₂), 70.36 (CH₂), 70.58 (CH₂), 127.80 (CH_{Ar}), 129.73 (CH_{Ar}), 132.89 (C_q), 144.66 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 461.18; mass obtained: 484.17 (M+Na)⁺

29 Methyl 3-[(17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy]benzoate

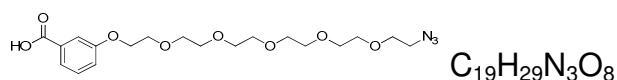


To a solution of compound **28** (650 mg, 1.41 mmol) and methyl 3-hydroxybenzoate (172 mg, 1.13 mmol) in DMF (2.83 mL) was added K₂CO₃ (312 mg, 2.26 mmol). After stirring at 80 °C for 1 day, water and AcOEt were added. The solution was extracted with AcOEt, with brine and dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. The product was purified by Flash chromatography eluting with 50:50 to 0:100 pentane : AcOEt affording Methyl 3-[(17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy]benzoate (452 mg, 91% yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.29-3.33 (m, 2H, CH₂), 3.58-3.64 (m, 16H, CH₂), 3.65-3.69 (m, 2H, CH₂), 3.78-3.83 (m, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.08-4.13 (m, 2H, CH₂), 7.06 (dd, J= 7.7-2.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.28 (t, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.49-7.52 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.54-7.58 (m, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 50.70 (CH₃), 67.75 (CH₂), 69.70 (CH₂), 70.02 (CH₂), 70.62 (CH₂), 70.66 (CH₂), 70.68 (CH₂), 70.71 (CH₂), 70.89 (CH₂), 115.29 (CH_{Ar}), 120.95 (CH_{Ar}), 122.80 (CH_{Ar}), 129.42 (C_q), 130.74 (C_q), 158.90 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 441.21; mass obtained: 464.20 (M+Na)⁺

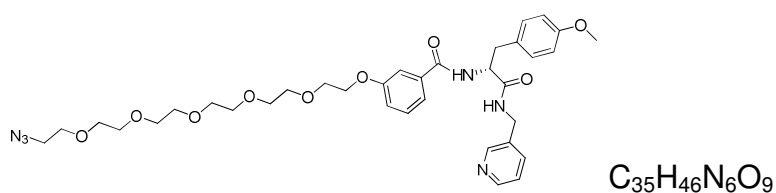
30 3-[(17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy]benzoic acid

To a solution of compound **29** (400 mg, 0.90 mmol) in dioxane: MeOH (4.5 : 1.5 v/v) was added a solution of NaOH (4N, 0.338 mL). After stirring at room temperature for one night, the solution was acidified with HCl until pH= 1, concentrated *in vacuo*. The aqueous phase was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine and dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. This treatment afforded 3-[(17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy]benzoic acid (274 mg, 71% yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.34 (t, J= 4.8 Hz, 2H, CH₂), 3.63-3.66 (m, 16H, CH₂), 3.69-3.71 (m, 2H, CH₂), 3.83-3.85 (t, J=5 Hz, 2H, CH₂), 4.14-4.16 (m, 2H, CH₂), 7.11-7.14 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.29-7.34 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.58 (d, J= 1.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (dd, J= 7.7-1.1 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 67.75 (CH₂), 69.70 (CH₂), 70.02 (CH₂), 70.62 (CH₂), 70.66 (CH₂), 70.68 (CH₂), 70.71 (CH₂), 70.89 (CH₂), 115.29 (CH_{Ar}), 120.95 (CH_{Ar}), 122.80 (CH_{Ar}), 129.42 (C_q), 130.74 (C_q), 158.90 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 427.2; mass obtained: 450.19 (M+Na)⁺

IS 38 (R)-3-((17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy)-N-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide

To a solution of compound **30** (100 mg, 0.23 mmol), (R)-2-amino-3-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (80 mg, 0.28 mmol), triethylamine (35 μ L, 0.31 mmol) and HOBt (40 mg, 0.28 mmol) in THF (3.5 mL) was added EDC (54 mg, 0.28 mmol). After stirring, at room temperature, for 5h the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography on silica gel eluting with DCM 100%, DCM: Acetone 8: 2, DCM: MeOH 90: 10-80: 20, CHCl₃: MeOH 8: 2 afforded

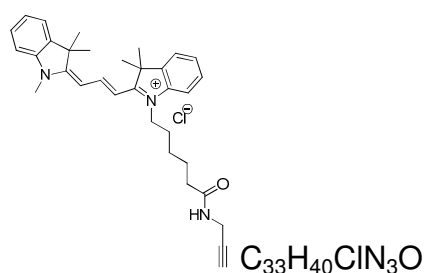
an impure product. Prep-TLC eluting with DCM : MeOH 90: 10 afforded (*R*)-3-((17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide (83 mg, 52% yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.04-3.08 (m, 2H, CH₂), 3.28-3.32 (m, 2H, CH₂), 3.54-3.61 (m, 16H, CH₂), 3.63-3.66 (m, 2H, CH₂+CH), 3.67 (s, 3H, CH₃), 3.75 (d, J= 3.5 Hz, 2H, CH₂), 4.01 (d, J= 4.9 Hz, 2H, CH₂), 4.15 (dd, J= 15.2-5.9Hz, 1H, CH₂), 4.34 (dd, J= 14.6-6.5 Hz, 1H, CH₂), 4.85-4.92 (m, 1H, CH₂), 6.63-6.69 (m, 2H, 2xCH_{Ar}), 6.93-6.98 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.99-7.08 (m, 3H, 3xCH_{Ar}), 7.17 (d, J= 13.1 Hz, 3H, 3xCH_{Ar}), 7.25-7.30 (m, 2H, 2xCH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.35 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 34.69 (CH₂), 40.86 (CH₂), 50.68 (CH₂), 55.19 (CH₃), 55.26 (CH), 67.64 (CH₂), 69.63 (CH₂), 69.99 (CH₂), 70.56 (CH₂), 70.58 (CH₂), 70.64 (CH₂), 70.67 (CH₂), 70.79 (CH₂), 113.12 (CH_{Ar}), 114.14 (CH_{Ar}), 118.54 (CH_{Ar}), 119.36 (CH_{Ar}), 123.45 (CH_{Ar}), 128.37 (CH_q), 130.42 (CH_{Ar}), 133.59 (CH_{Ar}), 134.91 (CH_q), 135.43 (CH_q), 148.53 (CH_{Ar}), 149.15 (CH_q), 158.46 (CH_q), 158.97 (CH_q), 167.26 (CH_q), 171.26 (CH_q).

LC-MS: mass calculated: 694.33; mass obtained: 695.34 (M+H)⁺

31 3,3-dimethyl-1-(6-oxo-6-(prop-2-yn-1-ylamino)hexyl)-2-((1*E*,3*E*)-3-(1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3*H*-indol-1-ium chloride



To a solution of 1-(6-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-2-((1*E*,3*E*)-3-(1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3*H*-indol-1-ium chloride (23.6 mg, 0.04 mmol) in DMF (1 mL) was added prop-2-yn-1-amine (6 μL, 0.1 mmol). After stirring, at room temperature, for 7h prop-2-yn-1-amine (6 μL, 0.1 mmol) was added. After stirring, at room temperature, overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography on silica gel eluting with DCM 100%, DCM: Acetone 8: 2,

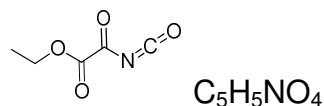
DCM: EtOH 90: 10-80: 20 afforded an impure product. Prep-TLC eluting with DCM : MeOH 90: 10 afforded 3,3-dimethyl-1-(6-oxo-6-(prop-2-yn-1-ylamino)hexyl)-2-((1*E*,3*E*)-3-(1,3,3-trimethylindolin-2-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3*H*-indol-1-ium chloride (11 mg, 55% yield) as a pink solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.58-1.66 (m, 9H, CH₂+2xCH₃), 2.08 (t, J= 2.4 Hz, 1H, CH₂), 2.15 (d, J= 5.4 Hz, 1H, CH₂), 2.33 (t, J= 7.5 Hz, 4H, CH₂+CH₃), 2.38-2.44 (m, 2H, CH₂), 3.61-3.65 (m, 1H, CH₂), 3.74-3.82 (m, 4H, CH+CH₃), 4.00 (dd, J= 5.4-2.5 Hz, 2H, CH₂), 4.08-4.15 (m, 3H, CH₂+CH₃), 7.08 (m, 4H, CH), 7.32-7.41 (m, 6H, CH_{Ar}), 8.41 (t, J= 13.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 22.69 (CH₂), 24.77 (CH₂), 26.43 (CH₃), 28.13 (CH₂), 28.21 (CH₂), 28.98 (CH₂), 29.09 (CH₂), 29.16 (CH₂), 29.26 (CH₂), 29.37 (CH₂), 29.45 (CH₂), 29.51 (CH₂), 29.57 (CH₂), 29.60 (CH₂), 29.71 (CH₂), 29.77 (CH₂), 31.93 (CH₃), 36.20 (CH₃), 44.87 (C_q), 61.62 (C_q), 70.49 (CH₂), 73.3 (CH), 110.21 (CH), 110.79 (CH_{Ar}), 110.97 (CH_{Ar}), 121.98 (CH_{Ar}), 122.08 (CH_{Ar}), 125.34 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 128.91 (CH_{Ar}), 132.26 (CH), 140.9 (C_q), 150.78 (C_q), 167.86 (C_q), 172.8 (C_q), 173.1 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 494.32; mass obtained: 495.2 (M+H)⁺

32 Ethyl 2-isocyanato-2-oxoacetate

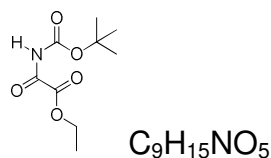


To a solution of ethyl oxamate (7.7 g, 66 mmol) in DCM (95 mL) was added oxalyl chloride (10 g, 79 mmol). After stirring, under reflux, overnight the mixture was concentrated *in vacuo*. We obtained ethyl 2-isocyanato-2-oxoacetate (9.4 g, Quant.) as white oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.39 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃), 4.41 (q, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 13.4 (CH₃), 60.3 (CH₂), 126.0 (C_q), 157.1 (C_q), 160.3 (C_q).

33 Ethyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-oxoacetate



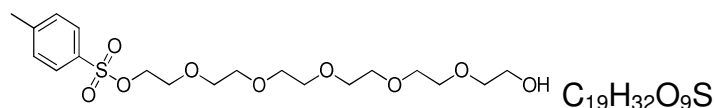
To a solution of compound **32** (9.4 g, 66 mmol) in toluene (66 mL) was added t-butanol (5 g, 66 mmol) in toluene (25 mL). After stirring, at 40 °C, for 22h the mixture was concentrated *in vacuo*. We obtained ethyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-oxoacetate (11.84 g, 83% yield) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.35 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.48 (s, 9H, 3x CH_3 Boc), 4.35 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 13.4 (CH_3), 28.4 (CH_3), 60.3 (CH_2), 84.6 (C_q), 151.7 (C_q), 158.8 (C_q), 159.5 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 217.10; mass obtained: 216.0 ($M+H$)⁺

34 17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate



To a solution of hexaethylene glycol (10 g, 35 mmol), tosyl chloride (7 g, 36.8 mmol) in dry DCM (352 mL) were added Ag_2O (9.7 g, 42 mmol) and KI (581 mg, 3.5 mmol). After stirring, at room temperature, overnight, the mixture was filtered over celite and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 AcOEt: MeOH afforded 17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate (12.72 g, 83% yield) as a colorless oil.

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.40 (s, 3H, CH_3), 3.53-3.55 (m, 4H, CH_2), 3.55-3.59 (m, 6H, CH_3), 3.60-3.63 (m, 8H, CH_3), 3.63-3.64 (m, 1H, CH_3), 3.65-3.68 (m, 3H, CH_3), 4.09-4.13 (m, 2H, CH_3), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2x CH_{Ar}), 7.75 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 2x CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 21.77 (CH_3), 61.86 (CH_2), 68.81 (CH_2), 69.41 (CH_2), 70.47 (CH_2), 70.65 (CH_2), 70.68 (CH_2), 70.69 (CH_2), 70.70 (CH_2), 70.74 (CH_2), 70.86

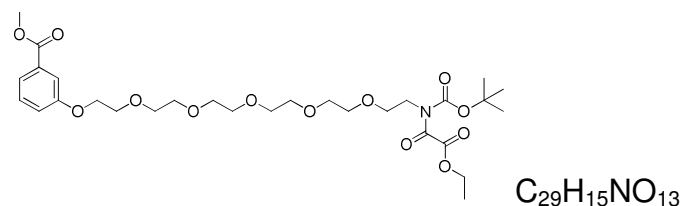
LC-MS: mass calculated: 436.18; mass obtained: 437.2 (M+H)⁺

COC(=O)c1ccc(OCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCO)cc1 $C_{20}H_{32}O_9$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 3.54 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂), 3.59-3.61 (m, 12H, CH₂), 3.62-3.64 (m, 2H, CH₂), 3.65-3.69 (m, 4H, CH₂), 3.82 (t, J = 4.6 Hz, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.12 (t, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂), 7.07 (ddd, J = 8.4-2.6-0.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.27 (t, J = 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.50-7.52 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.57 (dt, J = 7.5-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 52.26 (CH₃), 61.81 (CH₂), 67.77 (CH₂), 69.74 (CH₂), 70.43 (CH₂), 70.64 (CH₂), 70.67 (CH₂), 70.71 (CH₂), 70.73 (CH₂), 70.95 (CH₂), 72.66 (CH₂), 114.91 (CH_{Ar}), 120.18 (CH_{Ar}), 122.25 (CH_{Ar}), 129.49 (CH_{Ar}), 131.50 (C_q), 158.88 (C_q), 167.01 (C_q).

36 Ethyl 3-(*ter*-butoxycarbonyl)-20-(3-(methoxycarbonyl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-3-azaicosan-1-oate



170

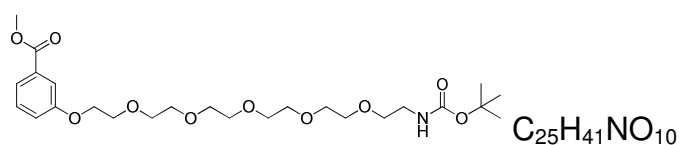
DEAD (680 mL, 3.9 mmol) in THF (2.05 mL). After stirring, at room temperature, for 23h the mixture was diluted with water (50 mL), extracted with DCM, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 95/05-80/20 DCM: AcOEt afforded ethyl 3-(*ter*-butoxycarbonyl)-20-(3-(methoxycarbonyl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-3-azaicosan-1-oate (1.03 g, 43 %) as a white slush solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.25 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, 3x CH₃ Boc), 3.32 (s, 2H, CH₂), 3.46-3.56 (m, 16H, CH₂), 3.58 (d, J= 4.8 Hz, 2H, CH₂), 3.75 (q, J= 5.0 Hz, 4H, CH₂), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.15 (t, J= 4.0 Hz, 2H, CH₂), 4.26 (q, J= 7.0 Hz, 2H, CH₂), 7.24 (dd, J= 8.2-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.42 (d, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.45 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (d, J= 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.57 (CH₃), 14.49 (CH₃), 27.17 (CH₃), 42.1 (CH₂), 52.15 (CH₂), 60.42 (CH₂), 61.86 (CH₂), 67.18 (CH₂), 67.43 (CH₂), 68.80 (CH₂), 69.59 (CH₂), 69.70 (CH₂), 69.73 (CH₂), 69.75 (CH₂), 69.77 (CH₂), 85.06 (C_q), 114.39 (CH_{Ar}), 119.81 (CH_{Ar}), 121.42 (CH_{Ar}), 129.91 (CH_{Ar}), 130.94 (C_q), 151.29 (C_q), 158.53 (C_q), 161.18 (C_q), 162.8 (C_q), 165.98 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 615.29; mass obtained: 616.4(M+H)⁺

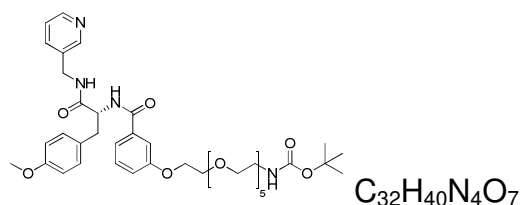
37 Methyl 3-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20-hexaoxa-5-azadocosan-22-yl)oxy)benzoate



To a solution of Na (44.85 mg, 1.95 mmol) in MeOH (8 mL) was added compound **36** (800 mg, 1.3 mmol). After stirring, at room temperature and under Ar, for 3h, KH₂PO₄ was added. After stirring for 5 min, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with water, extracted with DCM, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. We obtained methyl 3-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20-hexaoxa-5-azadocosan-22-yl)oxy)benzoate (446 mg, 67% yield) as a translucent white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (s, 9H, 3xCH₃ Boc), 3.22 (q, J= 4.9 Hz, 2H, CH₂), 3.45 (t, J= 5.0 Hz, 2H, CH₂), 3.51-3.62 (m, 14H, CH₂), 3.63-3.67 (m, 2H, CH₂), 3.79

39 (*R*)-*tert*-butyl (17-(3-((3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamoyl)phenoxy)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)carbamate



To a solution of compound **38** (180 mg, 0.4 mmol), compound **12** (14 mg, 0.4 mmol) in THF (6 mL) were added DEPBT (120 mg, 0.4 mmol), Et_3N (81 mg, 0.8 mmol). After stirring at room temperature, for 2h (*R*)-2-Amino-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)propanamide (14 mg, 0.4 mmol) was added. After stirring at room temperature, for 2h the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 95/05-80/20 DCM: MeOH (twice) afforded (*R*)-*tert*-butyl (17-(3-((3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamoyl)phenoxy)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)carbamate (201.0 mg, 66% yield) as a light yellow paste.

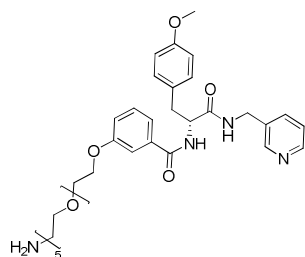
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.37 (s, 9H, 3xCH₃), 3.10 (d, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.23 (q, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂), 3.45 (t, J = 5.1 Hz, 2H, CH₂), 3.53-3.56 (m, 3H, CH₂), 3.57-3.59 (m, 7H, CH₂), 3.60-3.62 (m, 3H, CH₂), 3.63-3.64 (m, 2H, CH₂), 3.66 (s, 3H, CH₃), 3.75 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂), 4.01 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂), 4.24 (dd, J = 14.9-4.6 Hz, 1H, CH₂), 4.39 (dd, J = 15.1-6.0 Hz, 1H, CH), 4.90 (q, J = 7.0 Hz, 1H, CH₂), 5.12 (t, J = 4.6 Hz, 1H, CH₂), 6.5 (d, J = 8.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.90 (d, J = 7.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 2x CH_{Ar}), 7.10-7.16 (m, 2H, 2x CH_{Ar}), 7.18 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.20-7.23 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.33-7.43 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.48-7.63 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.68 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.88-8.14 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.39 (d, J = 4.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.48 (sl, 1H, NH).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 8.99 (CH₂), 18.81 (CH₂), 28.84 (CH₃), 37.98 (CH₂), 40.78 (CH), 41.17 (CH₂), 46.44 (CH₂), 55.58 (CH₃), 58.57 (CH₂), 67.97 (CH₂), 70.03 (CH₂), 70.61 (CH₂), 70.90 (CH₂), 70.96 (CH₂), 70.98 (CH₂), 71.17 (C_q), 113.51 (CH_{Ar}), 114.37 (CH_{Ar}), 118.89 (CH_{Ar}), 119.76 (CH_{Ar}), 124.14 (CH_{Ar}), 128.96 (CH_{Ar}), 129.91 (CH_{Ar}), 130.76 (CH_{Ar}), 135.41 (CH_{Ar}), 144.48 (CH_{Ar}), 147.90 (CH_{Ar}), 147.91 (CH_{Ar}), 147.94 (CH_{Ar}), 147.99 (CH_{Ar}), 148.71 (CH_{Ar}), 148.75 (C_q), 148.77 (C_q), 156.49 (C_q),

158.90 (C_q), 159.27 (C_q), 167.66 (C_q), 171.95 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 768.39; mass obtained: 669.2 (M+H-Boc)⁺

40 (*R*)-3-((17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide



C₃₅H₄₈N₄O₉

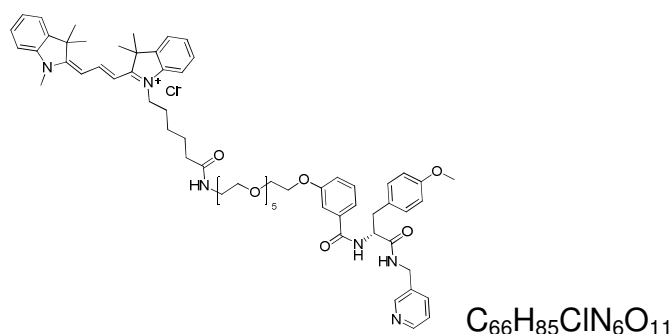
A solution of compound **39** (72 mg; 0.09 mmol) in TFA (583 μ L) was stirred at room temperature for 3 h30. The solution was concentrated with a Hickman. A solution of NaOH (3N) was added until pH = 9. The aqueous layer was extracted with DCM (x2). The organic layers were washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. We obtained (*R*)-3-((17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl)oxy)-*N*-(3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)benzamide (30 mg, 51 %) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.81 (t, J= 5.0 Hz, 2H, CH₂), 2.89 (s, 2H, CH₂), 3.05-3.2 (m, 2H, CH₂), 3.46 (t, J= 5.0 Hz, 2H, CH₂), 3.53-3.65 (m, 14H, CH₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.81 (t, J= 4.7 Hz, 2H, CH₂), 4.08-4.16 (m, 2H, CH₂), 4.21-4.43 (m, 2H, CH₂), 4.84 (q, J= 7.5 Hz, 1H, CH), 6.71 (s, 1H, CH_{Ar}), 6.74 (s, 1H, CH_{Ar}), 6.95-7.03 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.08 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.1-7.19 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.32-7.42 (m, 3H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.41 (d, J= 4.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 37.4 (CH₂), 41.6 (CH), 43.6 (CH₂), 55.8 (CH₃), 57.8 (CH₂), 69.3 (CH₂), 70.0 (CH₂), 70.4 (CH₂), 72.9 (CH₂), 113.3 (CH_{Ar}), 114.2 (CH_{Ar}), 117.8 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 123.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 135.5 (CH_{Ar}), 135.6 (CH_{Ar}), 135.9 (C_q), 147.3 (C_q), 148.7 (C_q), 157.8 (C_q), 164.6 (C_q), 167.5 (C_q), 172.0 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 668.34; mass obtained: 669.2 (M+H)⁺

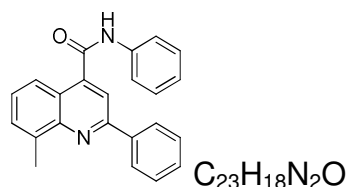
IS 40



To a solution of Cy3-COOH (15 mg, 0.03 mmol) in dry THF (450 μ L) were added DEPBT (9 mg, 0.03 mmol) and Et_3N (6 mg, 0.06 mmol). After stirring, at room temperature under Ar, for 1 h compound **40** (30 mg, 0.05 mmol) was added. After stirring, at room temperature under Ar, for 1 h the mixture was concentrated *in vacuo*. Prep-TLC eluting with DCM : MeOH 90: 10 afforded IS 40 (5 mg, 16% yield) as a pink solid.

LC-MS: mass calculated: 1142.59; mass obtained: 573.4 ($\text{M}+2\text{H}$)²⁺

IS 99 8-methyl-*N*,2-diphenylquinoline-4-carboxamide

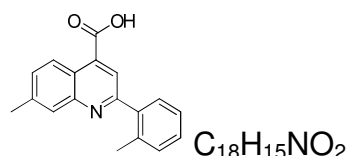


To a solution of 8-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxylic acid (150 mg, 0.57 mmol), HATU (202 mg, 0.53 mmol) in DCM (7 mL) were added DIPEA (79 mg, 0.61 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 minutes the *p*-toluidine (35 mg, 0.38 mmol) was added. After stirring at room temperature for 48 h, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO_3 saturated solution, dried (MgSO_4) and concentrated *in vacuo*. A crystallization in DCM afforded 8-methyl-*N*,2-diphenylquinoline-4-carboxamide (93 mg, 73% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.90 (s, 3H, CH_3), 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.47 (d, J = 7.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J = 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.61 (d, J = 6.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.05 (s, 2H, CH_{Ar}), 8.24 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 18.28 (CH₃), 115.81 (CH_{Ar}), 115.83 (CH_{Ar}), 115.91 (CH_{Ar}), 120.11 (CH_{Ar}), 120.18 (CH_{Ar}), 122.56 (CH_{Ar}), 123.06 (CH_{Ar}), 125.17 (CH_{Ar}), 127.33 (CH_{Ar}), 127.43 (CH_{Ar}), 128.92 (CH_{Ar}), 129.76 (CH_{Ar}), 130.47 (CH_{Ar}), 137.53 (C_q), 140.44 (C_q), 143.03 (C_q), 143.04 (C_q), 148.82 (C_q), 156.92 (C_q), 166.90 (C_q).
LC-MS: mass calculated: 338.14; mass obtained: 339.2 (M+H)⁺

41 **7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid**

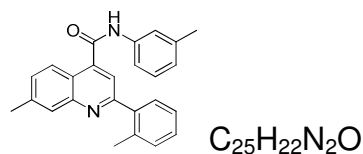


To a solution of 2-methylbenzaldehyde (2.25 g, 21 mmol) and pyruvic acid (1.87 g, 21.2 mmol) in EtOH (15 mL) was added drop wise a solution of *m*-toluidine (2.25 g, 21 mmol) in EtOH (15 mL). After stirring, under reflux and under O₂, for 3h, the mixture was concentrated *in vacuo*. A washing with Et₂O afforded 7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (2.44 g, 44% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.34-7.42 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.53 (d, J= 15.8, 1H, CH_{Ar}), 7.58 (d, J= 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.92 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.95 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.61 (d, J= 8.8 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.08 (CH₃), 21.15 (CH₃), 120.98 (CH_{Ar}), 121.85 (CH_{Ar}), 124.95 (CH_{Ar}), 125.02 (CH_{Ar}), 126.01 (CH_{Ar}), 128.49 (CH_{Ar}), 128.68 (CH_{Ar}), 128.97 (CH_{Ar}), 129.64 (C_q), 129.98 (C_q), 130.81 (C_q), 139.42 (C_q), 139.98 (C_q), 148.38 (C_q), 158.99 (C_q), 167.50 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 277.17; mass obtained: 278.2 (M+H)⁺

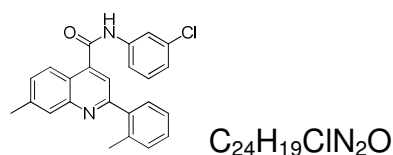
IS 104**7-methyl-*N*-(*m*-tolyl)-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**

To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (30.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the *m*-toluidine (50.4 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO_3 saturated solution, dried (MgSO_4) and concentrated *in vacuo*. A washing with Et_2O and a crystallization in EtOH afforded 7-methyl-*N*-(*m*-tolyl)-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (137 mg, 54% yield) as a white powder.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2.29 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.49 (s, 3H, CH_3), 6.92 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.15-7.24 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.35-7.43 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.50-7.55 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.86 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.07-8.10 (m, 1H, CH_{Ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 20.46 (CH_3), 21.42 (CH_3), 21.72 (CH_3), 117.34 (CH_{Ar}), 119.12 (CH_{Ar}), 120.87 (CH_{Ar}), 124.69 (CH_{Ar}), 125.66 (CH_{Ar}), 125.80 (CH_{Ar}), 125.96 (CH_{Ar}), 128.36 (C_q), 128.82 (C_q), 129.49 (C_q), 129.80 (C_q), 130.89 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 366.17; mass obtained: 367.2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

IS 105***N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**

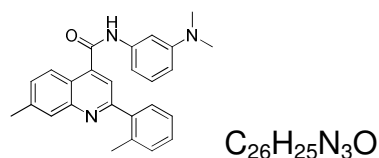
To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (30.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the *m*-chlorotoluidine (60 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO_3 saturated solution, dried (MgSO_4) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded *N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (220 mg, 82% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 7.03 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.14-7.22 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.31 (dd, J= 8.5-1.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35 (d, J= 7.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.51-7.53 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.80 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.85 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.03 (d, J= 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 9.65 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.41 (CH₃), 21.81 (CH₃), 118.29 (CH_{Ar}), 119.31 (CH_{Ar}), 120.36 (CH_{Ar}), 124.60 (CH_{Ar}), 124.72 (CH_{Ar}), 126.02 (CH_{Ar}), 128.77 (CH_{Ar}), 128.83 (CH_{Ar}), 129.66 (CH_{Ar}), 129.75 (CH_{Ar}), 129.94 (CH_{Ar}), 131.08 (CH_{Ar}), 134.52 (C_q), 136.17 (C_q), 139.49 (C_q), 139.84 (C_q), 140.57 (C_q), 141.71 (C_q), 148.55 (C_q), 159.63 (C_q), 166.07 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 386.12; mass obtained: 387.0 (M+H)⁺

IS 106 *N*-(3-(dimethylamino)phenyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide



To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (30.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the *N*1,*N*1-dimethylbenzene-1,3-diamine (98 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded *N*-(3-(dimethylamino)phenyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (138 mg, 74% yield) as a white powder.

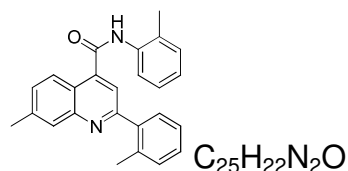
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.96 (s, 6H, 2x CH₃), 6.54 (dd, J= 8.4-2.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.89 (d, J= 7.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.18-7.22 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.25-7.31 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.42 (td, J= 8.4-1.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.60 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.87 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.95 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.16 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.40 (CH₃), 21.84 (CH₃), 40.54 (CH₃), 104.15 (CH_{Ar}), 108.16 (CH_{Ar}), 109.41 (CH_{Ar}), 118.87 (CH_{Ar}), 120.89 (CH_{Ar}), 124.64 (CH_{Ar}), 126.06 (CH_{Ar}), 128.78 (CH_{Ar}), 129.02 (CH_{Ar}), 129.64 (CH_{Ar}), 129.66 (CH_{Ar}), 129.86 (CH_{Ar}), 131.04 (C_q), 136.15 (C_q), 138.50 (C_q), 139.93 (C_q), 140.70 (C_q), 142.07 (C_q), 148.74

(C_q), 151.35 (C_q), 159.80 (C_q), 165.53 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 395.20; mass obtained: 396.2 (M+H)⁺

IS 107 **7-methyl-*N*,2-di-*o*-tolylquinoline-4-carboxamide**

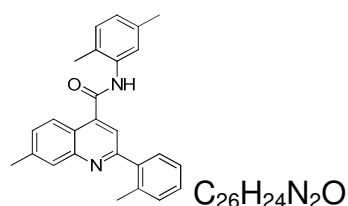


To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (30.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the *o*-toluidine (50.4 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM and crystallization in DCM/Et₂O afforded 7-methyl-*N*,2-di-*o*-tolylquinoline-4-carboxamide (68.8 mg, 40% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.25-7.35 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.45-7.50 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.58 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.98 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.10 (d, J = 8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.23 (d, J = 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 17.96 (CH₃), 20.43 (CH₃), 21.84 (CH₃), 118.83 (CH_{Ar}), 118.88 (CH_{Ar}), 120.95 (CH_{Ar}), 120.96 (CH_{Ar}), 123.27 (CH_{Ar}), 124.54 (CH_{Ar}), 126.05 (CH_{Ar}), 126.14 (CH_{Ar}), 127.00 (CH_{Ar}), 127.05 (CH_{Ar}), 128.85 (CH_{Ar}), 129.19 (CH_{Ar}), 129.42 (CH_{Ar}), 129.70 (CH_{Ar}), 129.99 (CH_{Ar}), 130.78 (CH_{Ar}), 131.09 (CH_{Ar}), 135.21 (C_q), 136.15 (C_q), 139.98 (C_q), 140.84 (C_q), 141.84 (C_q), 141.85 (C_q), 148.85 (C_q), 159.83 (C_q), 165.67 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 366.17; mass obtained: 367.2 (M+H)⁺

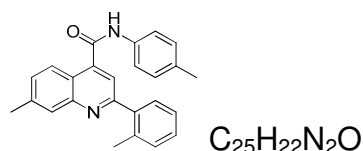
IS 108 *N*-(2,5-dimethylphenyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide

To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (30.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the 2,5-dimethylaniline (57 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for one night, the mixture was washed with HCl (1N), a $NaHCO_3$ saturated solution, dried ($MgSO_4$) and concentrated *in vacuo*. A crystallization in Et_2O /DCM afforded *N*-(2,5-dimethylphenyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (72 mg, 40% yield) as a white powder.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 6.97 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.12 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.29-7.37 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.45-7.52 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.66 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.87 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 17.51 (CH_3), 20.42 (CH_3), 21.18 (CH_3), 21.82 (CH_3), 118.86 (CH_{Ar}), 120.97 (CH_{Ar}), 123.75 (CH_{Ar}), 124.57 (CH_{Ar}), 126.15 (CH_{Ar}), 126.20 (CH_{Ar}), 126.80 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 129.14 (CH_{Ar}), 129.71 (C_q), 129.99 (C_q), 130.56 (C_q), 131.08 (C_q), 134.98 (C_q), 136.15 (C_q), 136.89 (C_q), 140.86 (C_q), 148.82 (C_q), 162.12 (C_q), 165.60 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 380.19; mass obtained: 381.2 ($M+H$)⁺

IS 109 7-methyl-2-(*o*-tolyl)-*N*-(*p*-tolyl)quinoline-4-carboxamide

To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (30.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the *p*-toluidine (50.4 mg, 0.47 mmol) was

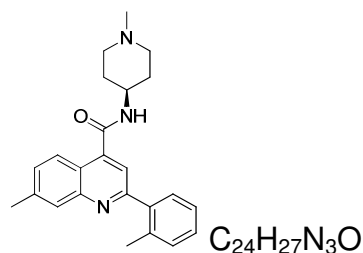
added. After stirring at room temperature for one night, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. A crystallization in Et₂O afforded 7-methyl-2-(*o*-tolyl)-*N*-(*p*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (62 mg, 36% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.57 (s, 3H, CH₃), 7.18 (d, J= 8.3 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.26-7.35 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.43-7.48 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.55 (d, J= 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.63 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.19 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.1 (CH₃), 20.95 (CH₃), 21.86 (CH₃), 118.98 (CH_{Ar}), 120.21 (CH_{Ar}), 124.64 (CH_{Ar}), 126.11 (CH_{Ar}), 128.92 (CH_{Ar}), 128.94 (CH_{Ar}), 129.69 (CH_{Ar}), 129.73 (C_q), 130.04 (C_q), 131.05 (C_q), 134.95 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 366.17; mass obtained: 367.2 (M+H)⁺

IS 111 **7-methyl-*N*-(1-methylpiperidin-4-yl)-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**



To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (96.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the 1-methylpiperidin-4-amine (53.7 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for 48h, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded 7-methyl-*N*-(1-methylpiperidin-4-yl)-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (7 mg, 4% yield) as a yellow powder.

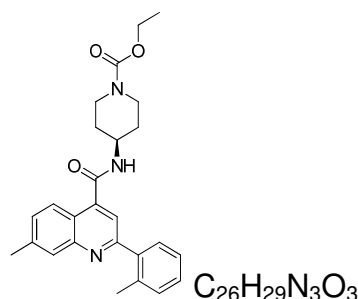
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.72-1.84 (m, 2H, CH₂), 2.09-2.13 (m, 1H, CH₂), 2.14 (s, 2H, CH₂), 2.32-2.35 (m, 1H, CH), 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 3H, CH₃), 3.00 (d, J= 11.3 Hz, 2H, CH₂), 4.09-4.20 (m, 1H, CH₂), 6.37 (d, J= 7.9 Hz, 1H,

CH_{Ar}), 7.26-7.34 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.41 (dd, J= 8.8-1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44-7.47 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.48 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.92 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.07 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.89 (CH₃), 22.35 (CH₃), 31.67 (CH₃), 45.87 (CH₂), 46.69 (CH), 54.72 (CH₂), 119.47 (CH_{Ar}), 121.47 (CH_{Ar}), 125.01 (CH_{Ar}), 126.58 (CH_{Ar}), 129.28 (CH_{Ar}), 129.56 (CH_{Ar}), 130.17 (CH_{Ar}), 130.27 (CH_{Ar}), 131.55 (CH_{Ar}), 136.69 (C_q), 140.55 (C_q), 141.12 (C_q), 142.32 (C_q), 149.26 (C_q), 160.28 (C_q), 167.70 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 373.22; mass obtained: 374.2 (M+H)⁺

IS 112 Ethyl 4-(7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamido)piperidine-1-carboxylate



To a solution of compound **41** (200 mg, 0.7 mmol), HATU (247 mg, 0.65 mmol) in DCM (5.8 mL) were added DIPEA (96.9 mg, 0.75 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the ethyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate (81 mg, 0.47 mmol) was added. After stirring at room temperature for 48h, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded Ethyl 4-(7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (157 mg, 77% yield) as a white powder.

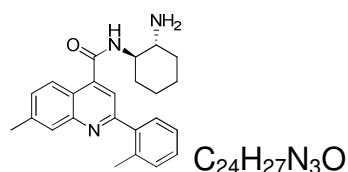
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.15 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.17 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (qd, J= 12.2-3.9 Hz, 2H, CH₂), 1.94 (s, 2H, CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.78-2.89 (m, 2H, CH₂), 3.96-4.04 (m, 4H, CH₂), 4.08-4.16 (m, 1H, CH₂), 6.50 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.17-7.28 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.31-7.33 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.33-7.35 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.39 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.84 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.44 (CH₃), 20.14 (CH₃), 21.59 (CH₃), 31.60 (CH₂), 42.53 (CH₂), 47.18 (CH), 61.24 (CH₂), 118.66 (CH_{Ar}), 124.31 (CH_{Ar}), 125.82 (CH_{Ar}),

128.56 (CH_{Ar}), 128.72 (CH_{Ar}), 129.34 (CH_{Ar}), 129.50 (CH_{Ar}), 130.82 (CH_{Ar}), 135.96 (CH_{Ar}), 139.76 (C_q), 140.38 (C_q), 141.64 (C_q), 148.32 (C_q), 155.18 (C_q), 159.50 (C_q), 166.87 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 431.22; mass obtained: 432.2 (M+H)⁺

IS 113 ***N*-((1*R*,2*R*)-2-aminocyclohexyl)-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**



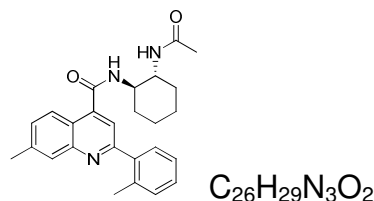
To a solution of compound **41** (400 mg, 1.4 mmol), HATU (494 mg, 1.3 mmol) in DCM (11.6 mL) were added DIPEA (194 mg, 1.5 mmol) and two drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the (1*R*,2*R*)-cyclohexane-1,2-diamine (480 mg, 4.2 mmol) was added. After stirring at room temperature for 48h, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded *N*-((1*R*, 2*R*)-2-aminocyclohexyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (138 mg, 29% yield) as a yellow powder.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.19-1.33 (m, 4H, CH₂), 1.47 (quint, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.69 (s, 2H, NH₂), 1.89-2.01 (m, 2H, CH₂), 2.17 (t, J= 7.2 Hz, 1H, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 3H, CH₃), 2.97 (sext, 6.7 Hz, 3H, CH₂+CH), 5.75-5.81 (m, 1H, CH), 7.33-7.41 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.56 (d, J= 6.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.87 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.12 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.62 (d, J= 8.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 15.69 (CH₂), 20.19 (CH₃), 21.26 (CH₃), 24.46 (CH₂), 24.67 (CH₂), 27.99 (CH₂), 31.69 (CH₂), 33.62 (CH₂), 34.01 (CH₂), 37.59 (CH₂), 45.15 (CH₂), 53.48 (CH), 56.77 (CH), 119.17 (CH_{Ar}), 120.89 (CH_{Ar}), 125.09 (CH_{Ar}), 125.91 (CH_{Ar}), 128.18 (CH_{Ar}), 128.54 (CH_{Ar}), 129.20 (CH_{Ar}), 129.22 (CH_{Ar}), 129.74 (CH_{Ar}), 130.78 (C_q), 135.84 (C_q), 139.77 (C_q), 139.82 (C_q), 142.50 (C_q), 159.04 (C_q), 166.65 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 373.22; mass obtained: 374.2 (M+H)⁺

IS 114 *N*-((1*R*, 2*R*)-2-acetamidocyclohexyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide

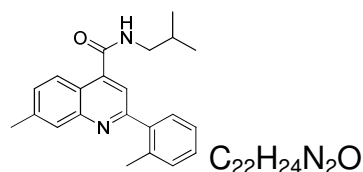


To a solution of *N*-((1*R*, 2*R*)-2-aminocyclohexyl)-5-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (100 mg, 0.3 mmol), DMAP (2.44 mg, 0.02 mmol) in DCM (2.5 mL) were added DIPEA (77.5 mg, 0.6 mmol) and acetic anhydride (61 mg, 0.6 mmol). After stirring at room temperature for 18h, the mixture was diluted with water, extracted with DCM, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded *N*-((1*R*, 2*R*)-2-acetamidocyclohexyl)-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (10 mg, 8% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.27-1.40 (m, 4H, CH₂), 1.76-1.83 (m, 2H, CH₂), 1.94 (s, 3H, CH₃), 2.04 (d, J= 9.4 Hz, 1H, CH₂), 2.21 (d, J= 8.2 Hz, 1H, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 3H, CH₃), 3.75-3.85 (m, 1H, CH₂), 3.89-3.99 (m, 1H, CH), 5.95 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH), 6.68 (d, J= 7.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.30 (t, J= 5.4 Hz, 3H, CH_{Ar}), 7.40 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.48-7.49 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.93 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.09 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.30 (CH₃), 21.71 (CH₃), 23.34 (CH₃), 24.55 (CH₂), 24.66 (CH₂), 32.24 (CH₂), 32.35 (CH₂), 53.31 (CH), 54.75 (CH), 118.79 (CH₂), 124.37 (CH₂), 125.96 (CH₂), 128.61 (CH₂), 129.01 (CH₂), 129.51 (CH₂), 129.63 (CH₂), 130.78 (C_q), 135.84 (C_q), 139.77 (C_q), 139.82 (C_q), 142.50 (C_q), 159.04 (C_q), 166.65 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 415.23; mass obtained: 416.2 (M+H)⁺

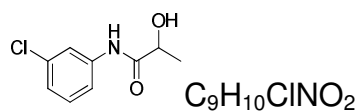
IS 116***N*-isobutyl-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**

To a solution of compound **41** acid (200 mg, 0.7 mmol), HOBt (113.5 mg, 0.84 mmol) in THF (10.7 mL) were added EDCi (161 mg, 0.84 mmol), Et₃N (78 mg, 0.77 mmol) and 2-methylpropan-1-amine (61.44 mg, 0.84 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded *N*-isobutyl-7-methyl-2-(*o*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (156 mg, 67% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 1.90 (hept, J = 6.9 Hz, 1H, CH), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 3.22 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 6.87 (t, J = 5.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.12 (dd, J = 8.4-1.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.21 (d, J = 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.30 (t, J = 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.45 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (d, J = 3.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.74 (d, J = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.78 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.71 (CH₃), 21.99 (CH₃), 22.17 (CH₃), 29.09 (CH₂), 47.79 (CH), 115.80 (CH_{Ar}), 121.64 (CH_{Ar}), 124.87 (CH_{Ar}), 124.99 (CH_{Ar}), 128.32 (CH_{Ar}), 129.05 (CH_{Ar}), 129.52 (CH_{Ar}), 130.81 (CH_{Ar}), 138.80 (C_q), 139.03 (C_q), 140.58 (C_q), 143.25 (C_q), 148.91 (C_q), 156.83 (C_q), 168.28 (C_q).

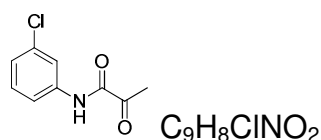
LC-MS: mass calculated: 332.19 ; mass obtained: 333.2 (M+H)⁺

43 *N*-(3-chlorophenyl)-2-hydroxypropanamide

A solution of 3-chloroaniline (21.7 g, 170 mmol) and methyl 2-hydroxypropanoate (17.7 g, 170 mmol) was stirred in reflux, during 7h. Concentration by Hickman afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-hydroxypropanamide (36.5 g, quant.) as a brown viscous oil, not pure.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.69 (d, J= 6.6 Hz, 3H, CH₃), 4.50 (q, J= 6.9 Hz, 1H), 7.03-7.09 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.21 (t, J= 7.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35-7.58 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (t, J= 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}).

44 *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide

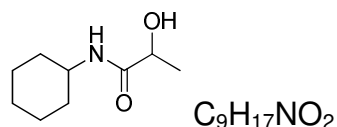


To a solution of compound **43** (27 g, 135 mmol) in acetone (84.6 mL) was added drop wise, at 0 °C, a solution of Na₂Cr₂O₇ (38.9 g, 148.8 mmol) and H₂SO₄ (25.65 mL) in water (85.5 mL). After stirring at room temperature during 30 min, the mixture was extracted with Et₂O, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Crystallization from Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (20 g, 56% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 7.10 (dq, J= 8.0-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.25 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (dq, J= 8.0-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.73 (t, J= 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.78 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.14 (CH₃), 117.94 (CH_{Ar}), 120.02 (CH_{Ar}), 125.48 (CH_{Ar}), 130.35 (CH_{Ar}), 135.05 (C_q), 137.58 (C_q), 157.78 (C_q), 197.05 (C_q).

***N*-cyclohexyl-2-hydroxypropanamide**



A solution of cyclohexamine (20 g, 201 mmol) and methyl 2-hydroxypropanoate (41.8 g, 402 mmol) was refluxed during 7h. Concentration by Hickman afforded *N*-cyclohexyl-2-hydroxypropanamide (42.5 g, quant.) as a brown viscous oil, not pure.

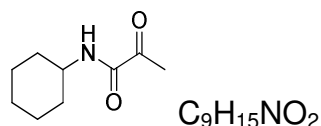
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (qd, J= 11.8-3.1 Hz, 3H, CH₃), 1.27 (d, J= 3.4 Hz, 1H, CH₂), 1.30 (qt, J= 11.8-3.3 Hz, 4H, CH₂), 1.54 (dt, J= 12.4-3.6 Hz, 1H, CH₂), 1.64 (dt, J= 13.3-3.3 Hz, 2H, CH₂), 1.80 (dd, J= 12.8-2.3 Hz, 2H, CH₂), 3.58-3.67 (m,

1H, CH), 4.08 (q, J= 6.8 Hz, 1H, CH), 6.67 (d, J= 8.3 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.98 (CH₃), 24.57 (CH₂), 25.25 (CH₂), 32.70 (CH₂), 47.61 (CH₂), 67.89 (CH), 174.20 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 171.13; mass obtained: 172.2 (M+H)⁺

45 ***N*-cyclohexyl-2-oxopropanamide**



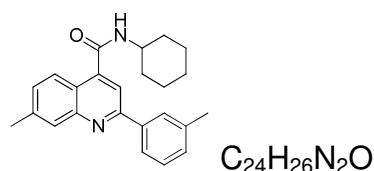
To a solution of *N*-cyclohexyl-2-hydroxypropanamide (42.5 g, 248 mmol) in acetone (155 mL) was added drop wise, at 0 °C, a solution of Na₂Cr₂O₇ (38.9 g, 148.8 mmol) and H₂SO₄ (25.65 mL) in water (84.6 mL). After stirring at room temperature during 30 min, the mixture was extracted with Et₂O, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Crystallization from Et₂O afforded *N*-cyclohexyl-2-oxopropanamide (17 g, 45% yield) as a white crystalline solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.15 (qd, J= 11.8-3.4 Hz, 3H, CH₃), 1.27 (d, 3.4 Hz, 1H, CH₂), 1.30 (qt, J= 11.8-3.3 Hz, 4H, CH₂), 1.54 (dt, J= 12.4-3.6 Hz, 1H, CH₂), 1.64 (dt, J= 13.3-3.3 Hz, 2H, CH₂), 1.80 (dd, J= 12.8-2.3 Hz, 2H, CH₂), 3.60-3.69 (m, 1H, CH), 6.81 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.98 (CH₃), 24.57 (CH₂), 25.25 (CH₂), 32.70 (CH₂), 47.61 (CH₂), 48.15 (CH), 158.97 (C_q), 197.38 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 169.11; mass obtained: 170.2(M+H)⁺

IS 110 ***N*-cyclohexyl-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**



To a solution of *N*-cyclohexyl-2-oxopropanamide (1 g, 6.5 mmol), 3-methylbenzaldehyde (780 mg, 6.5 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (500 mg, 3.25

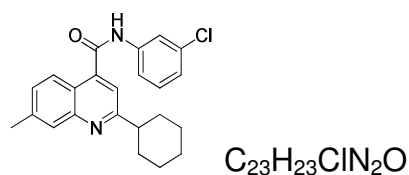
mmol) in EtOH (11 mL) was added drop wise, at room temperature under Ar, a solution of *m*-toluidine (700 mg, 6.5 mmol) in EtOH (0.5 mL). After stirring under reflux during 3h, the mixture was diluted with water, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM and a washing with Et₂O afforded *N*-cyclohexyl-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (300 mg, 13% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.21 (dt, J= 12.5-3.5 Hz, 1H, CH₂), 1.31 (qd, J= 11.9-3.1 Hz, 2H, CH₂), 1.46 (qt, J= 12.5-3.3 Hz, 2H, CH₂), 1.68 (dt, J= 12.4-3.3 Hz, 1H, CH₂), 1.79 (dt, J= 13.4-3.5 Hz, 2H, CH₂), 2.12 (dd, J= 10.8-3.0 Hz, 2H, CH₂) 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.54 (s, 3H, CH₃), 4.04-4.13 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.13 (s, 1H, NH), 7.26 (d, J= 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.32 (dd, J= 8.5-1.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.37 (t, J= 7.7Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.69 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.83 (d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.92 (s, 2H, CH_{Ar}), 7.95 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.57 (CH₃), 21.81 (CH₃), 24.94 (CH₂), 25.52 (CH₂), 33.21 (CH₂), 49.13 (CH), 115.68 (CH_{Ar}), 121.35 (CH_{Ar}), 124.52 (CH_{Ar}), 124.61 (CH_{Ar}), 128.11 (CH_{Ar}), 128.74 (CH_{Ar}), 128.97 (CH_{Ar}), 129.39 (CH_{Ar}), 130.42 (C_q), 138.55 (C_q), 138.90 (C_q), 140.44 (C_q), 143.03 (C_q), 143.04 (C_q), 148.82 (C_q), 156.92 (C_q), 166.90 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 358.20; mass obtained: 359.2 (M+H)⁺

IS 115 *N*-(3-chlorophenyl)-2-cyclohexyl-7-methylquinoline-4-carboxamide



To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (1 g, 5 mmol), cyclohexanecarbaldehyde (561 mg, 5 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (400 mg, 2.5 mmol) in EtOH (6 mL) was added drop wise, at room temperature, under Ar, a solution of *m*-toluidine (535 mg, 5 mmol) in EtOH (0.5 mL). After stirring under reflux during 3h, the mixture was diluted with water, extracted with AcOEt, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM and a washing

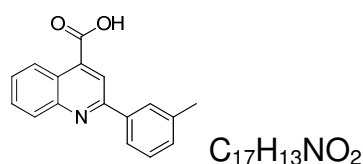
with Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-cyclohexyl-7-methylquinoline-4-carboxamide (126 mg, 7% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (tt, J= 12.4-3.1 Hz, 1H, CH₂), 1.42 (qt, J= 11.9-3.1 Hz, 2H, CH₂), 1.58 (qd, J= 12.4-2.5 Hz, 2H, CH₂), 1.76 (d, J= 12.3 Hz, 1H, CH₂), 1.86 (dt, J= 12.8-2.6 Hz, 2H, CH₂), 1.97 (d, J= 11.8 Hz, 2H, CH₂), 2.53 (s, 3H, CH₃), 2.88 (tt, J= 11.9-3.1 Hz, 1H, CH), 7.17 (d, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.31 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.36 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.52 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.83 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.87 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.92 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.01 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.80 (CH₃), 25.99 (CH₂), 26.44 (CH₂), 32.74 (CH₂), 47.29 (CH), 116.39 (CH_{Ar}), 118.05 (CH_{Ar}), 120.24 (CH_{Ar}), 120.84 (CH_{Ar}), 124.27 (CH_{Ar}), 125.18 (CH_{Ar}), 128.42 (CH_{Ar}), 129.33 (CH_{Ar}), 130.24 (C_q), 132.79 (C_q), 134.99 (C_q), 138.69 (C_q), 140.65 (C_q), 166.40 (C_q), 184.78 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 378.15; mass obtained: 379.2 (M+H)⁺

2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid



To a solution of 3-methylbenzaldehyde (2 g, 16.7 mmol) and pyruvic acid (1.56 g, 17.7 mmol) in EtOH (16.7 mL) was added drop wise a solution of aniline (1.6 g, 17.54 mmol) in EtOH (16.7 mL). After stirring, under reflux, for 3h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded 2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (805 mg, 19% yield) as a light orange solid.

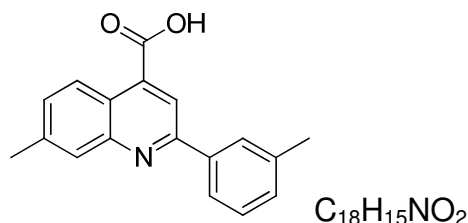
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 3H, CH₃), 7.26 (d, J= 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.38 (t, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.56 (t, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (t, J= 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.94 (d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.00 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.18 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.43 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.82 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.63 (CH₃), 120.73 (CH_{Ar}), 124.37 (CH_{Ar}), 124.70 (CH_{Ar}), 125.90 (CH_{Ar}), 127.50 (CH_{Ar}), 128.19 (CH_{Ar}), 128.85 (CH_{Ar}), 129.74 (CH_{Ar}), 130.15 (CH_{Ar}), 130.49 (C_q), 136.76 (C_q), 138.62 (C_q), 138.92 (C_q), 149.28 (C_q),

157.00 (C_q), 168.64 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 263.09; mass obtained: 264.0 (M+H)⁺

7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid

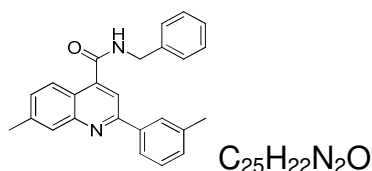


To a solution of 3-methylbenzaldehyde (6 g, 50 mmol) and pyruvic acid (4.66 g, 53 mmol) in EtOH (50 mL) was added drop wise a solution of 3-methylaniline (5.6 g, 52.5 mmol) in EtOH (50 mL). After stirring, under reflux, for 3h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Filtration afforded 7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (4.4 g, 32% yield) as an orange powder

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.34 (d, J= 7.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.45 (d, J= 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (d, J= 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.96 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.06 (d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.1 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.55 (d, J= 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}).

LC-MS: mass calculated: 277.1; mass obtained: 276.0 (M-H)⁻

IS 117 *N*-benzyl-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide



To a solution of 5-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (200 mg, 0.7 mmol), HOBT (113.5 mg, 0.84 mmol) in THF (10.7 mL) were added EDCi (161 mg, 0.84 mmol), Et₃N (78 mg, 0.77 mmol) and phenylmethanamine (90 mg, 0.84 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded *N*-benzyl-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (148 mg, 58% yield) as a white powder.

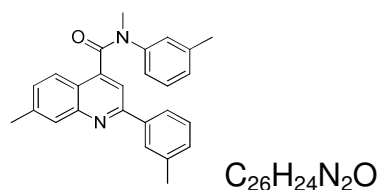
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 4.61 (d, J= 5.8 Hz, 2H, CH₂), 7.08 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.21 (d, J= 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.26 (d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.29-7.36 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.38 (s, 2H, CH_{Ar}), 7.42 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.65 (d, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.69 (d, J= 8.7

Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.72 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.70 (CH₃), 21.85 (CH₃), 115.44 (CH₂), 121.23 (CH_{Ar}), 124.54 (CH_{Ar}), 124.63 (CH_{Ar}), 127.86 (CH_{Ar}), 127.96 (CH_{Ar}), 128.23 (CH_{Ar}), 128.62 (CH_{Ar}), 128.77 (CH_{Ar}), 128.99 (CH_{Ar}), 129.26 (CH_{Ar}), 130.59 (C_q), 138.05 (C_q), 138.49 (C_q), 138.51 (C_q), 140.36 (C_q), 142.43 (C_q), 148.47 (C_q), 156.36 (C_q), 167.73 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 366.15; mass obtained: 367.2 (M+H)⁺

IS 118 ***N*,5-dimethyl-*N*,2-di-*m*-tolylquinoline-4-carboxamide**

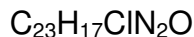
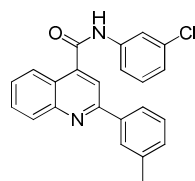


To a solution of 7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (200 mg, 0.7 mmol), HOBt (113.5 mg, 0.84 mmol) in THF (10.7 mL) were added EDCi (161 mg, 0.84 mmol), Et₃N (78 mg, 0.77 mmol) and *N*,3-dimethylaniline (101.8 mg, 0.84 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded *N*,7-dimethyl-*N*,2-di-*m*-tolylquinoline-4-carboxamide (113 mg, 43% yield) as a light yellow viscous oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.52 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 3H, CH₃), 6.76-6.82 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.87-6.93 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.20 (d, J= 7.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.31 (t, J= 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.38 (d, J= 8.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.43 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.63 (d, J= 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.86 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.95 (d, J= 8.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.15 (CH₃), 21.66 (CH₃), 21.91 (CH₃), 37.51 (CH₃), 117.09 (CH_{Ar}), 122.02 (CH_{Ar}), 123.77 (CH_{Ar}), 124.54 (CH_{Ar}), 124.91 (CH_{Ar}), 127.26 (CH_{Ar}), 128.15 (CH_{Ar}), 128.32 (CH_{Ar}), 128.72 (CH_{Ar}), 129.12 (CH_{Ar}), 129.14 (CH_{Ar}), 129.25 (CH_{Ar}), 130.18 (C_q), 138.18 (C_q), 139.33 (C_q), 139.41 (C_q), 140.21 (C_q), 142.87 (C_q), 143.41 (C_q), 148.73 (C_q), 156.46 (C_q), 168.53 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 380.18; mass obtained: 381.19 (M+H)⁺

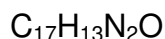
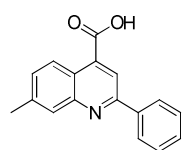
IS 119***N*-(3-chlorophenyl)-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide**

To a solution of 2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (200 mg, 0.76 mmol) in DMF (2 mL) was added CDi (184.9 mg, 1.14 mmol). After stirring, at 40 °C, for 20 min, the mixture was cooled at 5 °C. A solution of 3-chloroaniline (242 mg, 1.9 mmol) was added drop wise. After stirring, at room temperature, for 1 h DMAP was added. After stirring, at room temperature, overnight the mixture was concentrated *in vacuo*. The mixture was washed with HCl (1N), extracted with DCM, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Washing with Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (67 mg, 24% yield) as a white solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.42 (s, 3H, CH₃), 7.21 (dd, *J* = 8.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.28 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.37 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.50 (td, *J* = 7.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.73 (td, *J* = 7.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.81 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.92 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.11 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22.07 (CH₃), 116.93 (CH_{Ar}), 118.59 (CH_{Ar}), 120.81 (CH_{Ar}), 123.45 (CH_{Ar}), 125.10 (CH_{Ar}), 125.29 (CH_{Ar}), 125.79 (CH_{Ar}), 128.14 (CH_{Ar}), 128.60 (CH_{Ar}), 129.43 (CH_{Ar}), 130.50 (CH_{Ar}), 130.82 (CH_{Ar}), 131.02 (CH_{Ar}), 131.36 (C_q), 135.58 (C_q), 138.83 (C_q), 139.29 (C_q), 142.86 (C_q), 149.18 (C_q), 157.49 (C_q), 166.13 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 372.10; mass obtained: 373.0 (M+H)⁺

7-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxylic acid

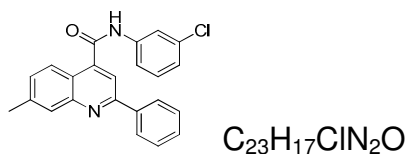
To a solution of benzaldehyde (2 g, 18.8 mmol) and pyruvic acid (1.75 g, 19.9 mmol) in EtOH (18.8 mL) was added drop wise a solution of *m*-toluidine (2.1 g, 19.74 mmol)

in EtOH (18.8 mL). After stirring, under reflux, for 3h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH afforded 7-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxylic acid (876 mg, 18% yield) as a light orange solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.56 (quint, J= 7.0 Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.97 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.27 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.39 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.56 (d, J= 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.16 (CH₃), 118.28 (CH_{Ar}), 121.49 (CH_{Ar}), 125.02 (CH_{Ar}), 127.09 (CH_{Ar}), 128.63 (CH_{Ar}), 128.92 (CH_{Ar}), 129.83 (CH_{Ar}), 129.89 (CH_{Ar}), 137.26 (C_q), 138.02 (C_q), 140.11 (C_q), 148.67 (C_q), 155.70 (C_q), 167.62 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 263.09; mass obtained: 264.0 (M+H)⁺

IS 120 *N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxamide

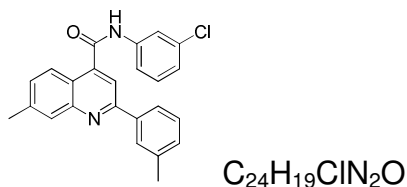
To a solution of 7-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxylic acid (200 mg, 0.76 mmol), HOBt (123 mg, 0.91 mmol) in THF (11.6 mL) were added EDCi (174 mg, 0.91 mmol), Et₃N (85 mg, 0.84 mmol) and 3-chloroaniline (115.9 mg, 0.91 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*.

Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: MeOH and washing with Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxamide (129 mg, 46% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.59 (s, 3H, CH₃), 7.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.299 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.35 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.97 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.26 (CH₃), 116.08 (CH_{Ar}), 118.37 (CH_{Ar}), 119.46 (CH_{Ar}), 121.08 (CH_{Ar}), 123.81 (CH_{Ar}), 124.68 (CH_{Ar}), 127.23 (CH_{Ar}), 128.51 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 129.57 (CH_{Ar}), 129.84 (CH_{Ar}), 130.50 (CH_{Ar}), 133.09 (C_q), 138.19 (C_q), 140.23 (C_q), 140.31 (C_q), 142.24 (C_q), 148.18 (C_q), 155.71 (C_q), 165.63 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 372.10; mass obtained: 373.0 (M+H)⁺

IS 121 *N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide

To a solution of 7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (1 g, 3.61 mmol), DEPBT (1.08 g, 3.61 mmol) in THF (54 mL) was added Et₃N (1 mL, 7.22 mmol). 3-chloroaniline (400 μL, 3.61 mmol) was added after 1 h of stirring at room temperature. After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*.

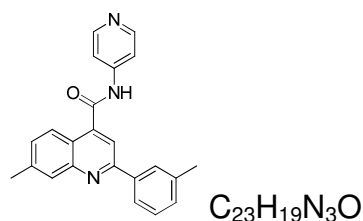
Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: Et₂O and washing with Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (1.2 g, 86% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.23 (d, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (t, J= 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.72 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.11 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.299 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.35 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.97 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.11 (CH₃), 21.27 (CH₃), 116.08 (CH_{Ar}), 118.37 (CH_{Ar}), 119.46 (CH_{Ar}), 121.08 (CH_{Ar}), 123.81 (CH_{Ar}), 124.68 (CH_{Ar}), 127.23 (CH_{Ar}), 128.51 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 129.57 (CH_{Ar}), 129.84 (CH_{Ar}), 130.50 (C_q), 133.09 (C_q), 138.19 (C_q), 140.23 (C_q), 140.31 (C_q), 142.24 (C_q), 148.18 (C_q), 155.71 (C_q), 165.63 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 386.10; mass obtained: 387.0 (M+H)⁺

IS 122 7-methyl-*N*-(pyridin-4-yl)-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide



To a solution of 7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (500 mg, 1.8 mmol), DEPBT (539 mg, 1.8 mmol) in THF (27 mL) was added Et₃N (502 μL, 3.6 mmol). Pyridin-4-amine (500 mg, 1.8 mmol) was added after 1 h of stirring at room temperature. After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: Et₂O and washing with Et₂O afforded 7-methyl-*N*-(pyridin-4-yl)-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (125 mg, 20% yield) as a white powder.

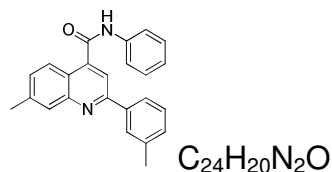
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.23 (d, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (t, J= 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.72 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.11 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.299 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.35 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.97 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.11 (CH₃), 21.27 (CH₃), 116.08 (CH_{Ar}), 118.37

(CH_{Ar}), 119.46 (CH_{Ar}), 121.08 (CH_{Ar}), 123.81 (CH_{Ar}), 124.68 (CH_{Ar}), 127.23 (CH_{Ar}), 128.51 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 129.57 (CH_{Ar}), 129.84 (CH_{Ar}), 133.09 (C_q), 138.19 (C_q), 140.23 (C_q), 140.31 (C_q), 142.24 (C_q), 148.18 (C_q), 155.71 (C_q), 165.63 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 353.10; mass obtained: 354.0 (M+H)⁺

IS 123 7-methyl-*N*-phenyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide



To a solution of 7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxylic acid (500 mg, 1.8 mmol), DEPBT (349 mg, 1.2 mmol) in THF (27 mL) was added Et₃N (335 μL, 2.4 mmol).

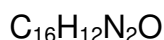
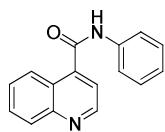
Aniline (110 μL, 1.2 mmol) was added after 1 h of stirring at room temperature. After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*.

Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: Et₂O and washing with Et₂O afforded 7-methyl-*N*-phenyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (372 mg, 88% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 7.23 (d, J= 7.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (t, J= 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.72 (d, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.11 (d, J= 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.299 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.35 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.97 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.11 (CH₃), 21.27 (CH₃), 116.08 (CH_{Ar}), 118.37 (CH_{Ar}), 119.46 (CH_{Ar}), 121.08 (CH_{Ar}), 123.81 (CH_{Ar}), 124.68 (CH_{Ar}), 127.23 (CH_{Ar}), 128.51 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 129.57 (CH_{Ar}), 129.84 (CH_{Ar}), 133.09 (C_q), 138.19 (C_q), 140.23 (C_q), 140.31 (C_q), 142.24 (C_q), 148.18 (C_q), 155.71 (C_q), 165.63 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 352.10; mass obtained: 353.0 (M+H)⁺

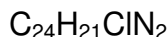
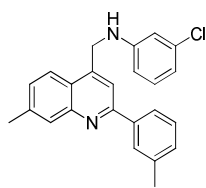
IS 124***N*-phenylquinoline-4-carboxamide**

To a solution of quinoline-4-carboxylic acid (2 g, 11.5 mmol), HOBt (1.86 g, 13.8 mmol) in THF (175.6 mL) were added EDCi (2.65 g, 13.8 mmol), Et₃N (1.78 mL, 12.7 mmol) and aniline (1.26 mL, 13.8 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 90/10-80/20 DCM: Et₂O and washing with Et₂O afforded *N*-phenylquinoline-4-carboxamide (1.62, 57% yield) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.38-7.42 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.67-7.88 (m, 5H, CH_{Ar}), 8.15 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 9.05 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH_{Ar}), 10.73 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 119.10 (CH_{Ar}), 119.91 (CH_{Ar}), 123.93 (CH_{Ar}), 124.09 (CH_{Ar}), 125.16 (C_q), 127.49 (CH_{Ar}), 128.76 (CH_{Ar}), 129.49 (CH_{Ar}), 129.84 (CH_{Ar}), 138.71 (C_q), 141.94 (C_q), 147.91 (C_q), 150.24 (CH_{Ar}), 165.2 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 248.09; mass obtained: 249.0 (M+H)⁺

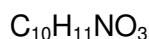
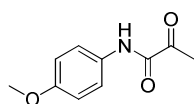
IS 125**3-chloro-*N*-((7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinolin-4-yl)methyl)aniline**

To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinoline-4-carboxamide (200 mg, 0.5 mmol) in THF (1.75 mL) was added drop wise a solution of LiAlH_4 (57 mg, 1.5 mmol) in THF (1 mL), After stirring under reflux for 2h, the mixture was cooled at room temperature and an excess of Glauber's salt was added. Filtration afforded 3-chloro-*N*-((7-methyl-2-(*m*-tolyl)quinolin-4-yl)methyl)aniline (150 mg, 80% yield) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 3.35 (s, 2H, CH_2), 7.23 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.11 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.299 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.35 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.97 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 21.11 (CH_3), 21.27 (CH_3), 43.59 (CH_2), 116.08 (CH_{Ar}), 118.37 (CH_{Ar}), 119.46 (CH_{Ar}), 121.08 (CH_{Ar}), 123.81 (CH_{Ar}), 124.68 (CH_{Ar}), 127.23 (CH_{Ar}), 128.51 (CH_{Ar}), 128.86 (CH_{Ar}), 129.57 (CH_{Ar}), 129.84 (CH_{Ar}), 130.50 (C_q), 133.09 (C_q), 138.19 (C_q), 140.23 (C_q), 140.31 (C_q), 142.24 (C_q), 148.18 (C_q), 155.71 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 372.10; mass obtained: 373.0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

***N*-(4-methoxyphenyl)-2-oxopropanamide**

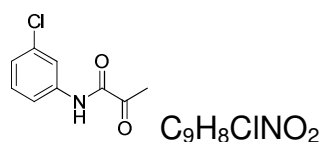
In a dry bottom flask were introduced pyruvique acid (1.55 mL, 22 mmol) and dichloromethyl methyl ether (4 mL, 44 mmol) in dry CH_2Cl_2 (163 mL), under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. Dry CH_2Cl_2 (80 mL) and p-anisidine (677 mg, 5.5 mmol) were added, under Ar, to the obtained

product. The mixture was cooled at 0°C and the pyridine (1.77 mL, 22 mmol) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-(4-methoxyphenyl)-2-oxopropanamide (497 mg, 47% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.53 (s, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃), 6.86 (dt, J= 9.0-3.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.53 (dt, J= 9.0-3.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.65 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.27 (CH₃), 55.65 (CH₃), 114.55 (CH_{Ar}), 121.43 (CH_{Ar}), 129.65 (C_q), 157.20 (C_q), 157.53 (C_q), 197.67 (C_q).

C ***N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide**

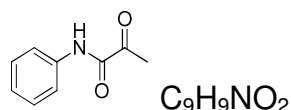


In a dry bottom flask were introduced pyruvic acid (3.1 mL, 44 mmol) and dichloromethyl methyl ether (8 mL, 88 mmol) in dry CH₂Cl₂ (325 mL), under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. Dry CH₂Cl₂ (160 mL) and 3-chloroaniline (1.2 mL, 11 mmol) were added, under Ar, to the obtained product. The mixture was cooled at 0°C and the pyridine (3.5 mL, 44 mmol) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (2.14 g, 99% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 7.10 (dq, J= 8.0-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.25 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.44 (dq, J= 8.0-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.73 (t, J= 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.78 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.14 (CH₃), 117.94 (CH_{Ar}), 120.02 (CH_{Ar}), 125.48 (CH_{Ar}), 130.35 (CH_{Ar}), 135.05 (C_q), 137.58 (C_q), 157.78 (C_q), 197.05 (C_q).

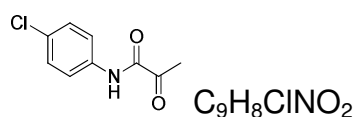
D 2-oxo-*N*-phenylpropanamide



In a dry bottom flask were introduced pyruvique acid (1.55 mL, 22 mmol) and dichloromethyl methyl ether (4 mL, 44 mmol) in dry CH₂Cl₂ (163 mL), under Ar. After stirring under relfux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. Dry CH₂Cl₂ (80 mL) and anilin (502 µL, 5.5 mmol) were added, under Ar, to the obtained 2-oxopropanoyl chloride. The mixtured was cooled at 0°C and the pyrridin (1.77 mL, 22 mmol) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combinated organic layers was washed with brine, dyed with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded 2-oxo-*N*-phenylpropanamide (422 mg, 47% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.55 (s, 3H, CH₃), 7.16 (t, J= 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35 (t, J= 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.61 (d, J= 8.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.71 (s, 1H, NH).
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.24 (CH₃), 119.92 (CH_{Ar}), 125.49 (CH_{Ar}), 129.44 (CH_{Ar}), 136.46 (C_q), 157.75 (C_q), 197.51 (C_q).

E *N*-(4-chlorophenyl)-2-oxopropanamide

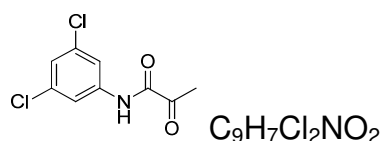


In a dry bottom flask were introduced pyruvique acid (606 µL, 8.6 mmol) and dichloromethyl methyl ether (850 µL, 9.4 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4.7 mL), under Ar. After stirring under relfux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. Dry CH₂Cl₂ (940 µL) and 4-chloroaniline (700 µL, 7.8 mmol) were added, under Ar, to the obtained product. The mixtured was cooled at 0°C and a solution of pyrridin (1.02 mL, 13.7 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combinated organic layers was washed with brine, dyed with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt

afforded *N*-(4-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (130 mg, 9% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.55 (s, 3H, CH₃), 7.32 (dt, J= 8.9-3.0 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.58 (dt, J= 8.9-3.0 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.70 (s, 1H, NH).
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.21 (CH₃), 121.14 (CH_{Ar}), 129.55 (CH_{Ar}), 130.65 (C_q), 135.04 (C_q), 157.70 (C_q), 197.19 (C_q).

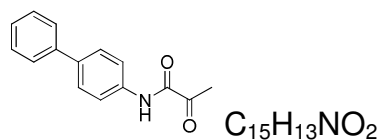
F *N*-(3,5-dichlorophenyl)-2-oxopropanamide



In a dry bottom flask were introduced pyruvic acid (480 μL, 6.8 mmol) and dichloromethyl methyl ether (680 μL, 7.5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3.75 mL), under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. Dry CH₂Cl₂ (750 μL) and 3,5-dichloroaniline (1 g, 6.2 mmol) were added, under Ar, to the obtained product. The mixture was cooled at 0°C and a solution of pyridine (877 μL, 10.9 mmol) in CH₂Cl₂ (32 mL) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-(3,5-dichlorophenyl)-2-oxopropanamide (199 mg, 14% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.55 (s, 3H, CH₃), 7.15 (t, J= 1.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.58 (d, J= 1.8 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.71 (s, 1H, NH).
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.11 (CH₃), 118.25 (CH_{Ar}), 125.55 (CH_{Ar}), 135.82 (C_q), 138.22 (C_q), 157.75 (C_q), 196.64 (C_q).

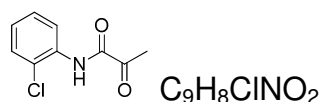
G *N*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxopropanamide



In a dry bottom flask were introduced pyruvique acid (1.7 mL, 23.6 mmol) and dichloromethyl methyl ether (4.2 mL, 47.2 mmol) in dry CH_2Cl_2 (175 mL), under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. Dry CH_2Cl_2 (85 mL) and [1,1'-biphenyl]-4-amine (1 g, 5.9 mmol) were added, under Ar, to the obtained product. The mixture was cooled at 0°C and the pyridine (1.9 mL, 23.6 mmol) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH_2Cl_2 (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxopropanamide (335 mg, 24% yield) as a light yellow solid.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2.57 (s, 3H, CH_3), 7.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.25 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.54-7.62 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.69 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.72 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.77 (s, 1H, NH).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 24.26 (CH_3), 120.25 (CH_{Ar}), 120.29 (CH_{Ar}), 120.31 (CH_{Ar}), 127.11 (CH_{Ar}), 127.58 (CH_{Ar}), 129.06 (CH_{Ar}), 135.71 (C_q), 138.43 (C_q), 140.44 (C_q), 157.76 (C_q), 197.47 (C_q).

H *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide



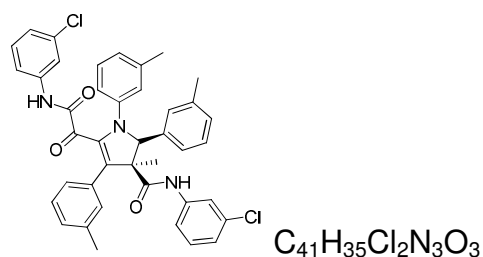
In a dry bottom flask were introduced pyruvique acid (2.7 g, 31.2 mmol) and dichloromethyl methyl ether (7.2 g, 62.4 mmol) in dry CH_2Cl_2 (230 mL), under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. 2-chloroaniline (1 g, 7.8 mmol) was added, under Ar, to the obtained product. The mixture was cooled at 0°C and a solution of pyridine (2.5 mL, 13.7 mmol) in CH_2Cl_2 (110 mL) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water

was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combined organic layers was washed with brine, dyed with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (1.30 g, 88% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.55 (s, 3H, CH₃), 7.07 (td, J= 6.4-1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.28 (dt, J= 7.7-1.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.38 (dd, J= 8.0-1.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.41 (dd, J= 8.3-1.5 Hz, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.12 (CH₃), 121.12 (CH_{Ar}), 123.97 (C_q), 125.82 (CH_{Ar}), 127.99 (CH_{Ar}), 129.55 (CH_{Ar}), 133.39 (C_q), 157.75 (C_q), 197.69 (C_q).

(3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



46a To a solution of 3-methylbenzaldehyde (2.3 mL, 20 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (4 g, 20 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (1.6 g, 10 mmol) in EtOH (33 mL), was added drop wise *m*-toluidine (2.1 mL, 20 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (801 mg, 58%) as a yellow solid.

46b To a solution of 3-methylbenzaldehyde (116 μL, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (82 mg, 0.51 mmol) in EtOH (1 mL) was added drop wise *m*-toluidine (55 μL, 0.51 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% of DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-

oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (113 mg, 66%) as a yellow solid.

46c To a solution of 3-methylbenzaldehyde (116 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (41 mg, 0.26 mmol) in EtOH (1 mL) was added drop wise *m*-toluidine (55 μ L, 0.51 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (142 mg, 81%) as a yellow solid.

48a To a solution of 3-methylbenzaldehyde (72 mg, 0.6 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (119 mg, 0.6 mmol), acetic acid (1.6 g, 10 mmol) and sodium acetate (50 mg, 0.6 mmol) in EtOH (1 mL), under Ar was added drop wise *m*-toluidine (65 mg, 0.6 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture was extracted with AcOEt, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (187 mg, 19%) as a yellow solid.

48b To a solution of 3-methylbenzaldehyde (2.3 mL, 20 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (4 g, 20 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (1.6 g, 10 mmol) in EtOH (33 mL), under O₂ was added drop wise *m*-toluidine (2.1 mL, 20 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (801 mg, 58%) as a yellow solid.

48c To a solution of 3-methylbenzaldehyde (116 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (41 mg, 0.26 mmol) in EtOH (1 mL), under Ar was added drop wise *m*-toluidine (55 μ L, 0.51 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-

chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (130 mg, 76%) as a yellow solid.

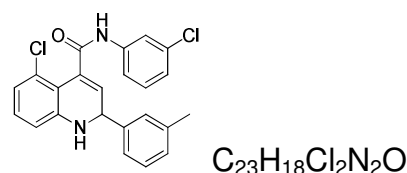
48d To a solution of 3-methylbenzaldehyde (1.15 mL, 10 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (2 g, 10 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (800 mg, 5 mmol) in EtOH (12 mL) was added drop wise *m*-toluidine (1.05 mL, 10 mmol). After stirring 3h under reflux and without light, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% of DCM afforded (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (563 mg, 18%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.63 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 5.05 (s, 1H, CH), 6.62-6.68 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.82-7.2 (m, 21H, CH_{Ar}), 7.94 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 21.23, 21.30, 21.35, 23.75, 61.65, 78.58, 111.8, 117.71, 117.73, 118.42, 118.43, 118.44, 118.45, 119.79, 119.83, 120.56, 120.57, 120.59, 124.36, 124.46, 124.72, 125.45, 126.39, 127.67, 127.91, 128.34, 128.43, 128.7, 128.95, 129.73, 129.75, 130.01, 130.95, 131.05, 134.41, 134.42, 137.12, 138.02, 138.05, 138.14, 138.18, 138.21, 139.23, 161.73, 165.72, 168.23.

LC-MS: mass calculated: 687.21; mass obtained: 688.2 (M+H)⁺

50 5-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)-2-(*m*-tolyl)-1,2-dihydroquinoline-4-carboxamide



To a solution of *m*-tolualdehyde (72, 0.6 mmol), compound **44** (119 mg, 0.6 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (47 mg, 0.6 mmol) in EtOH (33 mL), under O₂ was added drop wise 3-chloroaniline (65 mg, 0.6 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture was extracted with AcOEt, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in*

vacuo. Filtration afforded 5-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)-2-(*m*-tolyl)-1,2-dihydroquinoline-4-carboxamide (130 mg, 53%) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.28 (s, 3H, CH₃), 5.59 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.07 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.67 (s, 1H, NH), 6.89-6.92 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.96-7.00 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.03-7.07 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.16-7.21 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.36 (ddd, *J* = 8.3-2.1-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, CH_{Ar}).

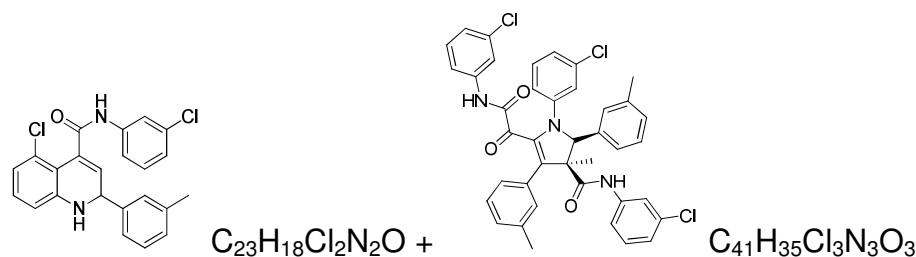
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.62 (CH₃), 64.39 (CH), 109.87 (CH), 115.25 (CH_{Ar}), 116.63 (CH_{Ar}), 121.51 (CH_{Ar}), 121.58 (CH_{Ar}), 123.93 (CH_{Ar}), 125.17 (CH_{Ar}), 127.30 (CH_{Ar}), 129.31 (CH_{Ar}), 129.54 (CH_{Ar}), 130.06 (C_q), 130.60 (C_q), 134.84 (C_q), 135.36 (C_q), 136.77 (C_q), 138.61 (C_q), 139.29 (C_q), 142.55 (C_q), 167.26 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 408.08; mass obtained: 409.09 (M+H)⁺

50 5-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)-2-(*m*-tolyl)-1,2-dihydroquinoline-4-carboxamide

+

49 (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of *m*-tolualdehyde (72, 0.6 mmol), compound **44** (119 mg, 0.6 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (47 mg, 0.6 mmol) in EtOH (33 mL), under O₂ was added drop wise 3-chloroaniline (65 mg, 0.6 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture was extracted with AcOEt, washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated *in*

vacuo. Filtration afforded 5-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)-2-(*m*-tolyl)-1,2-dihydroquinoline-4-carboxamide (93 mg, 40%) as a yellow solid and (3*S*)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-pyrrole-3-carboxamide (182 mg, 43%) as a yellow solid.

*Analyses of **50***

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.28 (s, 3H, CH₃), 5.59 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.07 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.67 (s, 1H, NH), 6.89-6.92 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.96-7.00 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.03-7.07 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.16-7.21 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.36 (ddd, *J* = 8.3-2.1-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, CH_{Ar}).
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.62 (CH₃), 64.39 (CH), 109.87 (CH), 115.25 (CH_{Ar}), 116.63 (CH_{Ar}), 121.51 (CH_{Ar}), 121.58 (CH_{Ar}), 123.93 (CH_{Ar}), 125.17 (CH_{Ar}), 127.30 (CH_{Ar}), 129.31 (CH_{Ar}), 129.54 (CH_{Ar}), 130.06 (C_q), 130.60 (C_q), 134.84 (C_q), 135.36 (C_q), 136.77 (C_q), 138.61 (C_q), 139.29 (C_q), 142.55 (C_q), 167.26 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 408.08; mass obtained: 409.09 (M+H)⁺

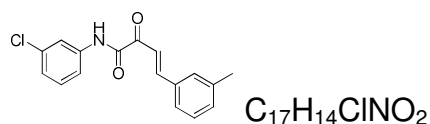
*Analyses of **49***

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.63 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 5.05 (s, 1H, CH), 6.62-6.68 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.82-7.2 (m, 21H, CH_{Ar}), 7.94 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 21.23, 21.30, 21.35, 23.75, 61.65, 78.58, 111.8, 117.71, 117.73, 118.42, 118.43, 118.44, 118.45, 119.79, 119.83, 120.56, 120.57, 120.59, 124.36, 124.46, 124.72, 125.45, 126.39, 127.67, 127.91, 128.34, 128.43, 128.7, 128.95, 129.73, 129.75, 130.01, 130.95, 131.05, 134.41, 134.42, 137.12, 138.02, 138.05, 138.14, 138.18, 138.21, 139.23, 161.73, 165.72, 168.23.

LC-MS: mass calculated: 687.21; mass obtained: 688.2 (M+H)⁺

51 (*E*)-*N*-(3-chlorophenyl)-2-oxo-4-(*m*-tolyl)but-3-enamide



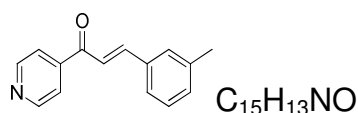
To a solution of *m*-tolualdehyde (72, 0.6 mmol), compound **44** (119 mg, 0.6 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (47 mg, 0.6 mmol) in EtOH (33 mL), under Ar was added drop wise *m*-toluidine (65 mg, 0.6 mmol). After stirring 16h under reflux the mixture was filtered to afford (*E*)-*N*-(3-chlorophenyl)-2-oxo-4-(*m*-tolyl)but-3-enamide (70 mg, 39%) as a yellow solid

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.15 (d, J= 7.9 Hz, 1H, CH=CH), 7.26-7.39 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.47-7.51 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.80-7.85 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.0 (d, J= 16.1 Hz, 1H, CH=CH), 8.98 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.5 (CH₃), 117.69 (CH_{Ar}), 118.01 (CH_{Ar}), 120.14 (CH_{Ar}), 125.49 (CH), 123.93 (CH_{Ar}), 126.93 (CH_{Ar}), 129.24 (C_q), 130.06 (C_q), 130.44 (C_q), 132.98 (C_q), 149.67 (CH), 134.84 (C_q), 185.02 (C_q), 203.7 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 299.5; mass obtained: 300.1 (M+H)⁺

55 (*E*)-1-(pyridin-4-yl)-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one

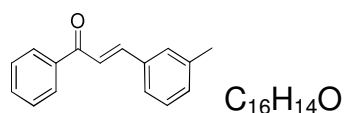


To a solution of *m*-tolualdehyde (10g, 83 mmol) in NaOH (10%, 130 ml) was added, at 0°C, drop wise 1-(pyridin-4-yl)ethanone (10 g, 83 mmol). After stirring at room temperature for 1h the mixture was filtered. Crystallization in Et₂O afforded (*E*)-1-(pyridin-4-yl)-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one (770 mg, 9%) as a white powder.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.83 (s, 3H, CH₃), 5.39 (d, J= 12 Hz, 1H, CH=CH), 6.84 (d, J= 10.3 Hz, 1H, CH=CH), 7.03-7.1 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.58-7.62 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.19-8.22 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.35-8.37 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.38-8.4 (m, 2H, CH_{Ar}).

LC-MS: mass calculated: 223; mass obtained: 224.1 (M+H)⁺

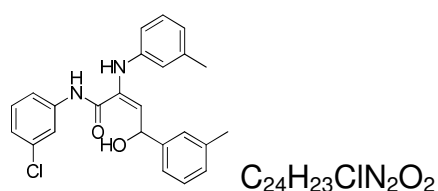
56 (*E*)-1-phenyl-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one



To a solution of *m*-tolualdehyde (5g, 52 mmol) in EtOH (84 ml) was added acetophenone (5 g, 42 mmol) and NaOH (2.5M, 34 mL). After stirring at room temperature for 2h30 the mixture was filtered. Trituration in Et₂O afforded (*E*)-1-phenyl-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one (7.7 g, 83%) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 7.15 (d, J= 7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.24 (t, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.36 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.42-7.47 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.72 (d, J= 15.7 Hz, 1H, CH=CH), 7.75 (t, J= 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.94-7.96 (m, 2H, CH_{Ar} + CH=CH).

57 (*E*)-*N*-(3-chlorophenyl)-4-hydroxy-4-(*m*-tolyl)-2-(*m*-tolylamino)but-2-enamide



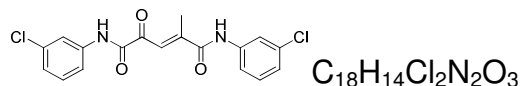
To a solution of 3-methylbenzaldehyde (540 mg, 4.5 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (889 mg, 4.5 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (352 mg, 2.25 mmol) in EtOH (6 mL) were added *m*-toluidine (483 mg, 4.5 mmol) and (*E*)-1-phenyl-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one (1g, 4.5 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (*E*)-*N*-(3-chlorophenyl)-4-hydroxy-4-(*m*-tolyl)-2-(*m*-tolylamino)but-2-enamide (340 mg, 20%) as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 5.58 (d, J= 2.5 Hz, 1H, CH), 6.04 (d, J= 2.5 Hz, 1H, CH), 6.58 (s, 1H, CH_{Ar}), 6.76 (d, J= 7.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.86-6.89 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.97-7.00 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.02-7.05 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.14-7.19 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.38 (ddd, J= 8.3-2.0-0.8 H, 1H, CH_{Ar}), 7.73 (s, 1H, CH_{Ar}).
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.61 (CH₃), 21.77 (CH₃), 64.30 (CH), 108.65 (CH_{Ar}), 114.04 (CH_{Ar}), 117.67 (CH_{Ar}), 119.18 (CH_{Ar}), 121.44 (CH_{Ar}), 122.47 (CH_{Ar}), 123.96 (CH_{Ar}), 124.96 (CH_{Ar}), 127.31 (C_q), 129.2 (CH_{Ar}), 129.37 (C_q), 129.42 (C_q), 129.99

(C_q), 137.22 (C_q), 139.16 (C_q), 139.53 (C_q), 167.6 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 388.0; mass obtained: 390.2 (M+H)⁺

58 (E)-N1,N5-bis(3-chlorophenyl)-2-methyl-4-oxopent-2-enediamide

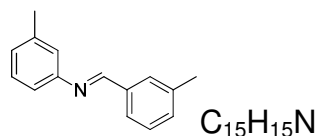


To a solution of (E)-1-phenyl-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one (200 mg, 0.9 mmol), N-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (178 mg, 0.9 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (0.7 mg, 0.45 mmol) in EtOH (1 mL) was added phenanthridine (161 mg, 0.9 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (E)-N1,N5-bis(3-chlorophenyl)-2-methyl-4-oxopent-2-enediamide (135 mg, 40%) as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 6.95 (s, 1H, CH=C), 7.20-7.24 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.35-7.38 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.45-7.47 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.96-8.01 (m, 2H, CH_{Ar}).

LC-MS: mass calculated: 376.1; mass obtained: 377.2 (M+H)⁺

59 (E)-3-methyl-N-(3-methylbenzylidene)aniline

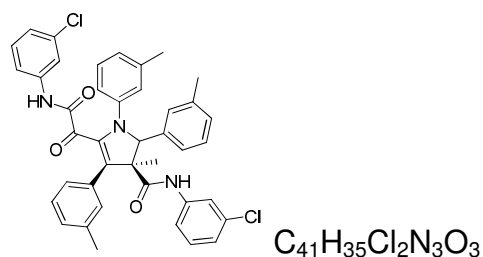


To a solution of *m*-toluidine (103 mg, 0.96 mmol) were added *m*-tolualdehyde (100 mg, 0.96 mmol) and MgSO₄ (23 mg, 0.2 mmol). After stirring at room temperature for 1h the mixture was filtered affording (E)-3-methyl-N-(3-methylbenzylidene)aniline (167 mg, Quant.) as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 6.95-7.00 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.19-7.25 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.30 (d, J=7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.59 (d, J=7.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.70 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.37 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.51 (CH₃), 118.03 (CH_{Ar}), 121.84 (CH_{Ar}), 121.84 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.84 (CH_{Ar}), 128.84 (CH_{Ar}), 129.14 (C_q), 129.16 (C_q), 132.37 (C_q), 160.62 (C_q).

60 (3S)-N-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



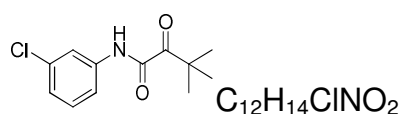
To a solution of 3-methylbenzaldehyde (100 mg, 0.8 mmol), N-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (158 mg, 20 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (62.6 mg, 10 mmol) in EtOH (1.3 mL) was added compound **59** (167 mg, 0.8 mmol). After stirring 3h under reflux the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% DCM afforded (3S)-N-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (330 mg, 58%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.63 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 5.05 (s, 1H, CH), 6.62-6.68 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.82-7.2 (m, 21H, CH_{Ar}), 7.94 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 21.23, 21.30, 21.35, 23.75, 61.65, 78.58, 111.8, 117.71, 117.73, 118.42, 118.43, 118.44, 118.45, 119.79, 119.83, 120.56, 120.57, 120.59, 124.36, 124.46, 124.72, 125.45, 126.39, 127.67, 127.91, 128.34, 128.43, 128.7, 128.95, 129.73, 129.75, 130.01, 130.95, 131.05, 134.41, 134.42, 137.12, 138.02, 138.05, 138.14, 138.18, 138.21, 139.23, 161.73, 165.72, 168.23.

LC-MS: mass calculated: 687.21; mass obtained: 688.2 (M+H)⁺

62 N-(3-chlorophenyl)-3,3-dimethyl-2-oxobutanamide



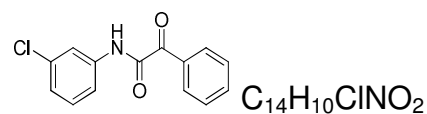
In a dry bottom flask were introduced 3,3-dimethyl-2-oxobutanoic acid (4 g, 31.2 mmol) and dichloromethyl methyl ether (7.2 g, 62.4 mmol) in dry CH₂Cl₂ (230 mL),

under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. 2-chloroaniline (1 g, 7.8 mmol) was added, under Ar, to the obtained product. The mixture was cooled at 0°C and a solution of pyridine (2.5 mL, 13.7 mmol) in CH₂Cl₂ (110 mL) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-(3-chlorophenyl)-3,3-dimethyl-2-oxobutanamide (1.08 g, 58% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.38 (s, 9H, 3xCH₃), 7.12 (ddd, J= 8.0-2.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.26 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.40 (ddd, J= 8.2-2.1-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.78 (t, J= 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.79 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 26.61 (CH₃), 43.36 (C_q), 117.98 (CH_{Ar}), 120.09 (C_q), 125.39 (CH_{Ar}), 130.32 (CH_{Ar}), 135.13 (C_q), 137.89 (C_q), 156.95 (C_q), 203.08 (C_q).

62 *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxo-2-phenylacetamide

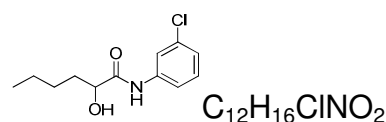


In a dry bottom flask were introduced 2-oxo-2-phenylacetic acid (4.7 g, 31.2 mmol) and dichloromethyl methyl ether (7.2 g, 62.4 mmol) in dry CH₂Cl₂ (230 mL), under Ar. After stirring under reflux for 1h the mixture was concentrated *in vacuo*. 2-chloroaniline (1 g, 7.8 mmol) was added, under Ar, to the obtained product. The mixture was cooled at 0°C and a solution of pyridine (2.5 mL, 13.7 mmol) in CH₂Cl₂ (110 mL) was added drop wise. After stirring at room temperature for one night, water was added and was extracted with CH₂Cl₂ (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 80/20-40/60 Pentane/AcOEt afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxo-2-phenylacetamide (1.64 g, 81% yield) as a light yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.11 (ddd, J= 8.0-2.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.25 (t, J= 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.45 (t, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.60 (tt, J= 7.0-1.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.80 (t, J= 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.33-8.37 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.90 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 118.13 (CH_{Ar}), 120.26 (CH_{Ar}), 125.60 (CH_{Ar}), 128.85 (CH_{Ar}), 130.43 (CH_{Ar}), 131.74 (CH_{Ar}), 133.12 (C_q), 135.03 (CH_{Ar}), 135.22 (C_q), 137.97 (C_q), 159.01 (C_q), 187.09 (C_q).

***N*-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyhexanamide**



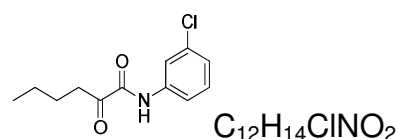
To a solution of 2-hydroxyhexanoic acid (500 mg, 3.8 mmol), HATU (1.3 g, 2.5 mmol) in DCM (46 mL) were added DIPEA (517 mg, 4 mmol) and four drops of DMF. After stirring, at room temperature, for 10 min the 3-chloroaniline (319 mg, 2.5 mmol) was added. After stirring at room temperature for 2h, the mixture was washed with HCl (1N), a NaHCO₃ saturated solution, dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 95/05-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyhexanamide (681 mg, 56% yield) as a light yellow oil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.23-1.34 (m, 3H, CH₂), 1.35-1.44 (m, 3H, CH₂), 1.63-1.74 (m, 1H, CH₂), 1.82-1.93 (m, 1H, CH₂), 4.16-4.21 (m, 1H, CH), 7.06 (ddd, J= 8.0-2.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.2 (t, J= 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35 (ddd, J= 8.2-2.0-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.65 (t, J= 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}) 8.60 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.07 (CH₃), 22.60 (CH₂), 27.09 (CH₂), 27.28 (CH₂), 34.60 (CH₂), 72.75 (CH), 117.98 (CH_{Ar}), 120.11 (CH_{Ar}), 124.76 (CH_{Ar}), 130.19 (CH_{Ar}), 134.86 (C_q), 138.51 (C_q), 172.76 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 241.09; mass obtained: 242.2 (M+H)⁺

63 *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxohexanamide



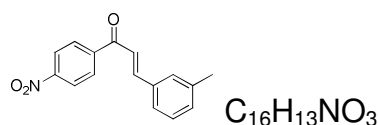
To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyhexanamide (200 mg, 0.8 mmol) in acetone (0.5 mL) was added drop wise, at 0 °C, a solution of Na₂Cr₂O₇ (231 mg, 0.88 mmol) and H₂SO₄ (152 µL) in water (0.5 mL). After stirring at 0 °C for 1h, the mixture was extracted with Et₂O, dried (Na₂SO₃) and concentrated *in vacuo*. *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxohexanamide (121 mg, 64% yield) was obtained as a solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.3-1.35 (m, 3H, CH₂), 1.53-1.65 (m, 3H, CH₂), 2.91-2.95 (m, 3H, CH₂), 7.08 (ddd, J= 8.0-2.0-1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.23 (t, J= 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.40 (ddd, J= 8.2-2.0-0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (t, J= 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}) 8.70 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.07 (CH₃), 22.60 (CH₂), 27.09 (CH₂), 27.28 (CH₂), 34.60 (CH₂), 117.98 (CH_{Ar}), 120.11 (CH_{Ar}), 124.76 (CH_{Ar}), 130.19 (CH_{Ar}), 134.86 (C_q), 138.51 (C_q), 172.76 (C_q), 198.76 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 239.09; mass obtained: 241.2 (M+H)⁺

61 (E)-1-(4-nitrophenyl)-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one

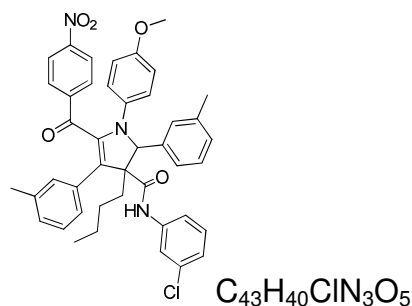


To a solution of 4-nitrobenzophenone (2.8 g, 17 mmol) in MeOH (16 mL) was added *m*-tolualdehyde (2 g, 17 mmol) and NaOH (6M) (152 µL). After stirring at room temperature for 2h, the mixture was filtered. (*E*)-1-(4-nitrophenyl)-3-(*m*-tolyl)prop-2-en-1-one (4.09 mg, 90% yield) was obtained as an orange solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.22 (s, 1H, CH=CH), 7.29 (t, J= 7.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.43 (t, J= 6.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.78 (d, J= 15.8Hz, 1H, CH=CH), 8.10 (d, J= 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.31 (d, J= 8.8 Hz, 2H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.54, 121.33, 124.06, 129.22, 129.5, 129.61, 132.34, 134.46, 139.06, 143.34, 147.30, 150.26, 189.31.

64 3-butyl-*N*-(3-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-5-(4-nitrobenzoyl)-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



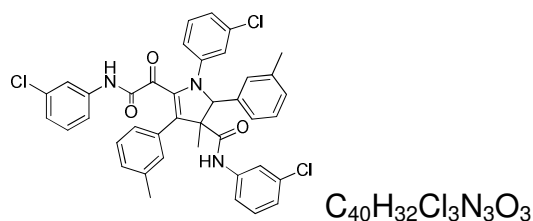
To a solution of p-anisidine (249 mg, 2.02 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added compound **61** (270 mg, 1.01 mmol), *m*-tolualdehyde (121.2 mg, 1.01 mmol) and compound **63** (241 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 3-butyl-*N*-(3-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-5-(4-nitrobenzoyl)-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (183 mg, 26% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.80-0.90 (m, 3H, CH₃), 1.16-1.25 (m, 2H, CH₂), 1.63-1.73 (m, 2H, CH₂), 1.86-1.96 (m, 2H, CH₂), 2.15 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 6H, CH₃), 6.47-6.53 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.60-6.66 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.68-6.72 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.08-7.10 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.74-6.78 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.86-6.93 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.13-7.18 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.20-7.26 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.30-7.37 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.75-7.80 (m, 2H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.29 (CH₃), 20.81 (CH₃), 21.5 (CH₃), 22.3 (CH₂), 22.47 (CH₂), 27.38 (CH₂), 72.05 (CH), 114.11 (CH_{Ar}), 114.98 (CH_{Ar}), 115.44 (CH_{Ar}), 118.52 (CH_{Ar}), 121.28 (CH_{Ar}), 122.51 (CH_{Ar}), 123.51 (CH_{Ar}), 124.45 (CH_{Ar}), 127.72 (CH_{Ar}), 127.97 (CH_{Ar}), 129.14 (CH_{Ar}), 129.31 (CH_{Ar}), 129.34 (CH_{Ar}), 129.64 (CH_{Ar}), 129.98 (CH_{Ar}), 130.73 (CH_{Ar}), 131.05 (CH_{Ar}), 131.84 (CH_{Ar}), 132.65 (CH_{Ar}), 136.87 (C_q), 136.93 (C_q), 139.43 (C_q), 142.76 (C_q), 147.42 (C_q), 147.80 (C_q), 151.16 (C_q), 157.48 (C_q), 164.02 (C_q), 169.08 (C_q), 174.09 (C_q), 187.97 (C_q).

LC-MS: mass calculated: 713.3; mass obtained: 715.8 (M+H)⁺

65 *N*,1-bis(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



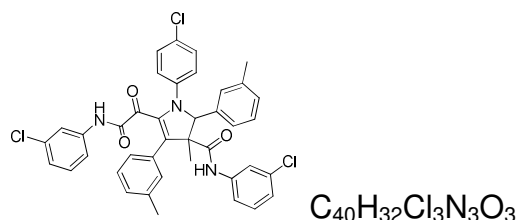
To a solution of 3-chloroaniline (107 μL , 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*,1-bis(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (135 mg, 38%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.87 (s, 3H, CH₃), 1.93 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 1H, CH), 6.86-6.92 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.95-7.04 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.06-7.12 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.13-7.23 (m, 10H, CH_{Ar}), 9.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.37 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.96, 58.70, 59.02, 78.4, 111.41, 117.71, 117.88, 118.91, 119.09, 120.26, 120.40, 121.56, 121.64, 122.93, 123.08, 123.09, 123.86, 124.01, 124.03, 126.61, 127.46, 129.66, 129.88, 129.89, 129.99, 120.14, 130.26, 132.25, 132.45, 132.55, 136.42, 136.78, 138.53, 138.84, 139.59, 140.32, 164.01, 165.06, 167.79, 184.54.

LC-MS: mass calculated: 708.1; mass obtained: 709.2 (M+H)⁺

66 *N*-(3-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of 4-chloroaniline (90 μL , 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at

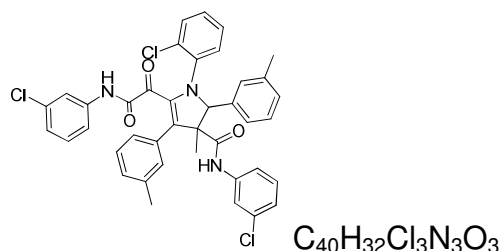
room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (190 mg, 53%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.86 (s, 3H, CH₃), 1.93 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 4.68 (s, 1H, CH), 6.86-6.91 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.98-7.04 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.05-7.1 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.13-7.18 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.2-7.24 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.27-7.33 (m, 2H, CH_{Ar}), 9.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.37 (s, 1H, NH).

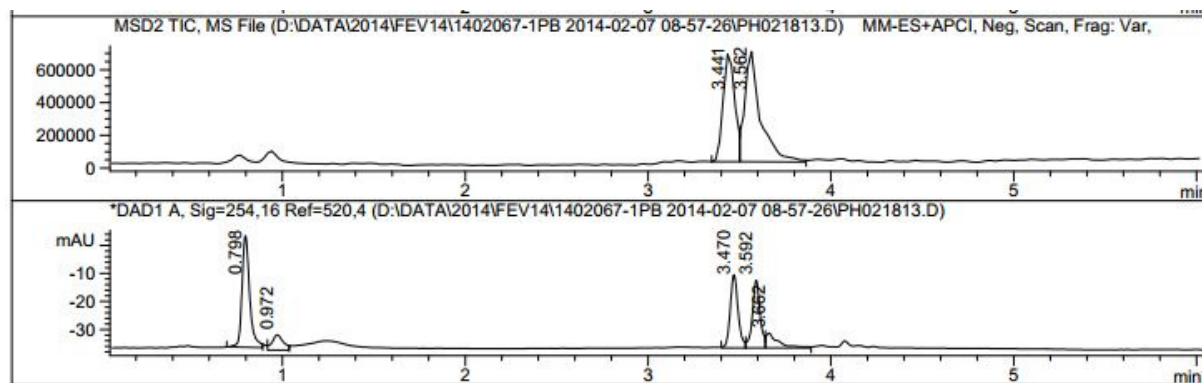
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.96, 24.27, 24.71, 58.70, 59.02, 76.79, 78.35, 111.17, 117.7, 117.87, 118.91, 119.1, 120.22, 120.36, 121.5, 121.65, 122.9, 123.04, 123.05, 123.79, 123.95, 127.45, 128.37, 128.54, 129.39, 129.59, 129.86, 129.87, 129.89, 130.06, 130.81, 130.92, 131.26, 132.25, 132.57, 136.41, 136.77, 137.78, 138.60, 138.91, 139.63, 164.36, 165.15, 167.81, 171.05, 172.31, 184.48.

LC-MS: mass calculated: 708.1; mass obtained: 709.2 (M+H)⁺

67 1-(2-chlorophenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of 2-chloroaniline (106 μL, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(2-chlorophenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (22 mg, 6%) as a mixture of two non-separable isomers.

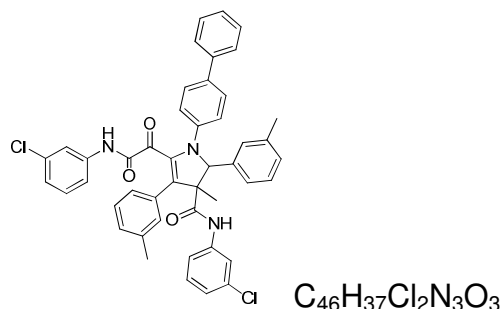


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.98 (s, 3H, CH_3), 2.18 (s, 3H, CH_3), 3.60 (s, 3H, CH_3), 3.61 (s, 3H, CH_3), 4.65 (s, 1H, CH), 6.52-6.56 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.63-6.67 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.69-6.73 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.84-6.89 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.03-7.31 (m, 12H, CH_{Ar}), 10.25 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 20.96, 24.27, 24.71, 58.70, 59.02, 76.79, 78.35, 111.17, 117.7, 117.87, 118.91, 119.1, 120.22, 120.26, 121.5, 121.65, 122.9, 123.04, 123.05, 123.79, 123.95, 127.45, 128.37, 128.64, 129.39, 129.59, 129.86, 129.87, 129.99, 130.06, 130.81, 130.92, 131.26, 132.25, 132.57, 136.41, 136.77, 137.78, 138.60, 138.91, 139.63, 164.36, 165.15, 167.81, 171.05, 172.31, 185.48.

LC-MS: mass calculated: 708.1; mass obtained: 709.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

68 1-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of [1,1'-biphenyl]-3-amine (171 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol) and *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% of DCM afforded 1-([1,1'-

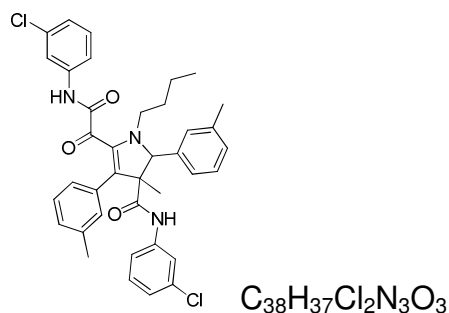
biphenyl]-4-yl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (267 mg, 70%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 6H, 2xCH₃), 4.65 (s, 1H, CH), 6.86-6.91 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.98-7.09 (m, 7H, CH_{Ar}), 7.17-7.23 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.29-7.34 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.36-7.42 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.47-7.51 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.54-7.58 (m, 3H, CH_{Ar}), 9.23 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.34 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.07, 20.74, 20.94, 58.93, 59.73, 78.32, 117.74, 118.93, 120.27, 121.53, 122.90, 123.82, 126.36, 126.39, 126.87, 127.39, 127.43, 127.57, 128.87, 128.89, 129.41, 129.52, 129.8, 129.84, 130.27, 130.4, 132.16, 132.48, 136.33, 136.62, 138.07, 138.65, 138.91, 139.65, 164.55, 165.17, 170.3.

LC-MS: mass calculated: 749.2; mass obtained: 750.2 (M+H)⁺

69 1-butyl-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of *n*-butylamine (100 μg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-butyl-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (162 mg, 49%) as a yellow solid.

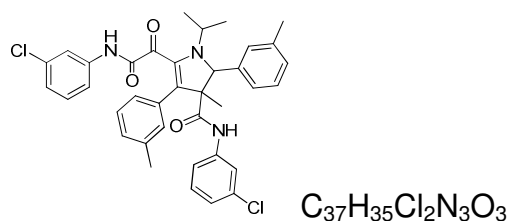
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.5-0.56 (m, 3H, CH₃), 0.85-0.93 (m, 2H, CH₂), 1.17 (t, *J*=7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.87 (d, *J*= 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.96-

3.19 (m, 2H, CH₂), 4.31 (s, 1H, CH), 6.86 (d, J= 7.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.99-7.26 (m, 14H, CH_{Ar}), 7.28-7.33 (m, 1H, CH_{Ar}), 9.1 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.15, 19.52, 20.75, 20.96, 31.60, 44.91, 56.59, 59.73, 117.53, 117.61, 118.74, 118.75, 118.88, 120.09, 120.19, 121.36, 121.48, 122.69, 123.69, 127.16, 127.34, 127.36, 127.67, 129.57, 129.73, 129.75, 132.18, 132.37, 132.45, 136.1, 137.00, 139.06, 139.42, 139.69, 139.72, 165.82, 168.09, 170.31.

LC-MS: mass calculated: 652.2; mass obtained: 653.2 (M+H)⁺

70 *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-isopropyl-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



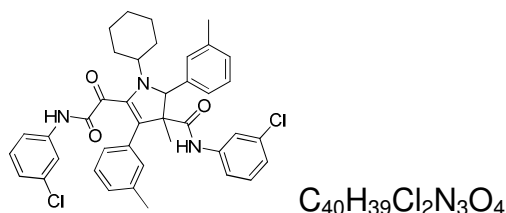
To a solution of isopropylamine (87 μg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-isopropyl-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (164 mg, 60%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.98-1.14 (m, 6H, 2xCH₃), 1.97 (s, 6H, 2xCH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.57-3.67 (m, 1H, CH), 4.35 (s, 1H, CH), 6.79-6.88 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.95-7.08 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.10-7.22 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.27-7.35 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.48-7.61 (m, 1H, CH_{Ar}), 9.06 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.11 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.00, 23.54, 23.59, 49.93, 54.89, 59.76, 117.36, 117.53, 117.69, 118.65, 118.82, 119.03, 120.10, 120.24, 120.39, 121.43, 121.54, 121.70, 122.54, 122.71, 123.65, 123.81, 126.98, 127.18, 129.60, 132.26, 132.43, 132.54, 136.03, 136.37, 139.06, 139.48, 139.87, 139.93, 165.86, 168.39, 183.35.

LC-MS: mass calculated: 639.6; mass obtained: 640.2 (M+H)⁺

72 ***N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-cyclohexyl-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



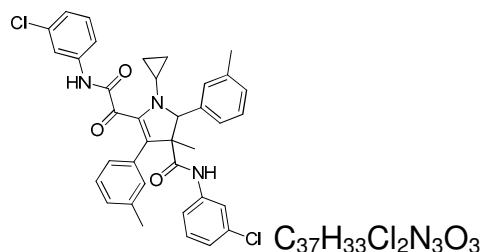
To a solution of cyclohexanamine (116 µg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 µL, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-cyclohexyl-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (59 mg, 17%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.49-0.64 (m, 1H, CH), 0.82-0.96 (m, 2H, CH₂), 1.25-1.39 (m, 4H, CH₂), 1.45-1.52 (m, 2H, CH₂), 1.67-1.85 (m, 3H, CH₃), 1.95 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃), 4.32 (s, 1H, CH), 6.88-7.23 (m, 17H, CH_{Ar}), 7.25-7.33 (m, 2H, CH_{Ar}), 9.07 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.34, 20.8, 24.85, 25.16, 54.91, 116.70, 117.51, 118.79, 118.80, 120.07, 120.21, 120.22, 121.35, 121.5, 122.54, 122.56, 123.8, 124.35, 124.55, 127.07, 127.09, 127.87, 129.65, 129.71, 130.28, 132.21, 132.24, 132.39, 132.5, 136.02, 136.31, 137.2, 139.05, 139.48, 139.86, 139.93, 142.12, 165.86, 165.87, 168.38.

LC-MS: mass calculated: 679.7; mass obtained: 680.6 (M+H)⁺

73 ***N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-cyclopropyl-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



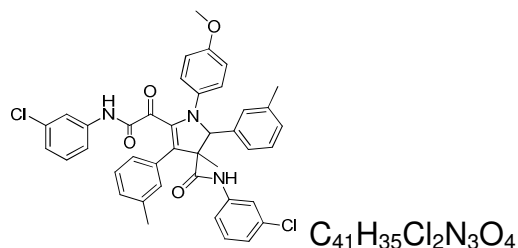
To a solution of cyclopropylamine (71 μ L, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-cyclopropyl-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (135 mg, 42%) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.13-0.27 (m, 1H, CH₂), 0.33-0.45 (m, 1H, CH₂), 0.51-0.63 (m, 1H, CH₂), 0.67-0.78 (m, 1H, CH₂), 0.84-0.93 (m, 1H, CH), 1.85 (s, 3H, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃), 3.34 (s, 3H, CH₃), 4.35 (s, 1H, CH), 6.79-6.94 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.98-7.13 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.17-7.35 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.54-7.85 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.86 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.86, 20.99, 21.02, 76.88, 118.92, 120.52, 120.61, 120.63, 121.90, 121.95, 122.77, 123.82, 123.98, 126.99, 127.16, 127.26, 127.34, 127.35, 129.34, 129.39, 129.51, 129.58, 129.62, 129.64, 129.7, 130.47, 132.12, 132.45, 132.52, 136.25, 138.63, 138.85, 139.62, 139.65, 165.42, 168.93, 169.22.

LC-MS: mass calculated: 637.6; mass obtained: 638.7 (M+H)⁺

74 ***N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



74a To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol) and *p*-anisidine (124 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% of DCM afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (292 mg, 84%) as a yellow solid.

74b To a solution of 3-methylbenzaldehyde (1.2 mL, 10.1 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (2 g, 10.1 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (790 mg, 5.05 mmol) in EtOH (12 mL) was added drop wise *p*-anisidine (1.05 mL, 10 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% of DCM afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (1.9 g, 56%) as a yellow solid.

74c To a solution of *p*-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (353 mg, 99%) as a yellow solid.

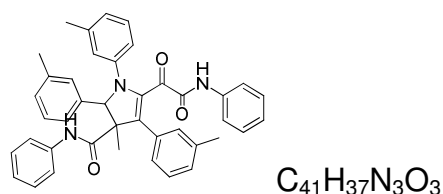
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.78 (s, 3H, CH_{Ar}), 2.17 (s, 3H, CH_{Ar}), 3.62 (s, 6H, 2xCH_{Ar}), 4.60(s, 1H, CH), 6.68-6.73 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.82-6.90 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.95-

7.15 (m, 9H, CH_{Ar}), 7.17-7.22 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.24-7.26 (m, 2H, CH_{Ar}), 9.17 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.29 (s, 1H, NH).

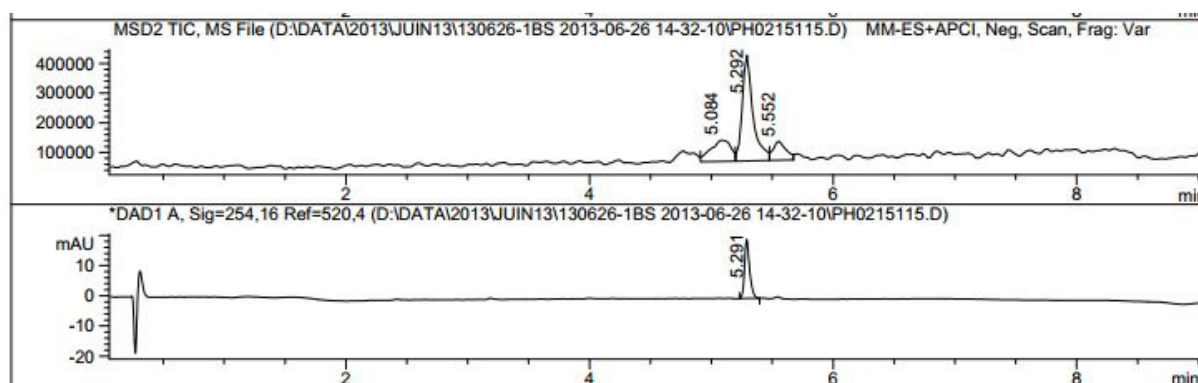
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.90, 24.48, 54.44, 55.68, 64.87, 78.19, 109.78, 112.95, 113.38, 113.54, 117.64, 117.80, 118.52, 119.00, 120.25, 120.38, 121.52, 121.64, 122.79, 122.99, 123.75, 126.81, 126.96, 127.28, 127.31, 127.35, 129.58, 130.32, 131.07, 131.21, 132.14, 132.47, 136.29, 136.4, 138.84, 138.90, 139.9, 157.82, 165.37, 165.76, 167.92.

LC-MS: mass calculated: 703.2; mass obtained: 704.2 (M+H)⁺

75 3-methyl-5-(2-oxo-2-(phenylamino)acetyl)-*N*-phenyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of *m*-toluidine (128 μL, 1.2 mmol) in EtOH (2.4 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (139 μL, 1.2 mmol) and 2-oxo-*N*-phenylpropanamide (200 mg, 1.2 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 Pentane/Et₂O afforded 3-methyl-5-(2-oxo-2-(phenylamino)acetyl)-*N*-phenyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (252 mg, 68% yield) as a non-separable mixture.

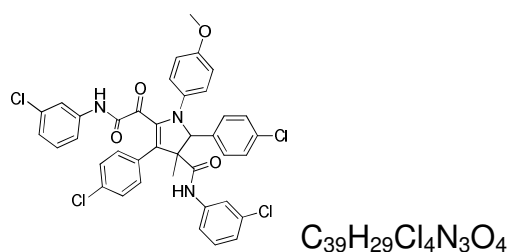


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.23 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.56 (s, 3H, CH₃), 5.76 (s, 1H, CH), 7.02-7.2 (m, 13H, CH_{Ar}), 7.72-7.85 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.96-8.27 (m, 4H, CH_{Ar}), 10.8 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.03, 21.22, 21.45, 29.07, 72.24, 115.99, 116.13, 119.91, 120.10, 121.27, 124.06, 124.42, 124.56, 124.73, 124.87, 126.37, 126.59, 127.11, 127.14, 127.35, 127.76, 127.89, 128.35, 128.50, 128.56, 128.75, 128.87, 128.93, 128.95, 129.34, 129.55, 129.66, 129.86, 130.50, 130.75, 130.93, 131.53, 131.62, 132.44, 132.67, 132.68, 133.36, 133.58, 137.53, 137.71, 137.91, 138.12, 138.26, , 138.66, 138.93, 139.25, 140.22, 142.75, 148.25, 155.87, 165.48, 166.77, 167.45.

LC-MS: mass calculated: 619.28; mass obtained: 620.2 (M+H)⁺

76 *N*-(3-chlorophenyl)-2,4-bis(4-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



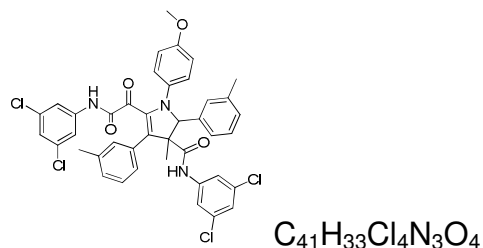
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 4-chlorobenzaldehyde (119 μL, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2,4-bis(4-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (234 mg, 62% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.61 (s, 6H, 2xCH₃), 4.59 (s, 1H, CH), 6.48-6.54 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.61-6.67 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.91-7.0 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.07-7.22 (m, 7H, CH_{Ar}), 7.22-7.31 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.39-7.44 (m, 4H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.54, 55.08, 55.25, 78.26, 113.66, 114.45, 114.90, 117.75, 118.89, 119.40, 120.34, 121.6, 123.16, 123.17, 124.09, 124.1, 127.29, 127.32, 127.51, 129.63, 129.9, 130.26, 131.31, 131.49, 132.31, 132.69, 134.06, 134.54, 137.89, 138.62, 139.41, 142.26, 150.62, 158.05, 165.07, 167.61.

LC-MS: mass calculated: 745.48; mass obtained: 746.0 (M+H)⁺

77 *N*-(3,5-dichlorophenyl)-5-(2-((3,5-dichlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



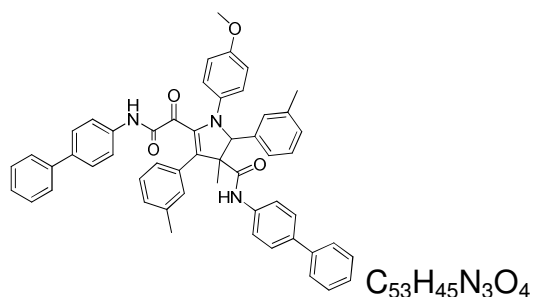
To a solution of p-anisidine (111 mg, 0.9 mmol) in EtOH (2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (106 μL , 0.9 mmol), *N*-(3,5-dichlorophenyl)-2-oxopropanamide (199 mg, 0.9 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3,5-dichlorophenyl)-5-(2-((3,5-dichlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (252 mg, 72%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.98 (s, 3H, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 3H, CH₃), 3.61 (s, 3H, CH₃), 4.65 (s, 1H, CH), 6.52-6.56 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.63-6.67 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.69-6.73 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.84-6.89 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.03-7.31 (m, 12H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.90, 54.65, 55.33, 55.78, 78.36, 113.59, 114.07, 114.34, 114.57, 114.59, 114.82, 114.84, 115.23, 117.47, 117.65, 119.78, 119.95, 122.31, 122.48, 123.14, 123.32, 127.38, 130.27, 130.62, 131.06, 131.20, 133.17, 133.53, 134.06, 134.20, 136.46, 138.65, 139.82, 140.54, 142.21, 150.73, 157.94, 165.58, 166.14, 168.28, 171.45.

LC-MS: mass calculated: 772.2; mass obtained: 773.7 (M+H)⁺

78 *N*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-5-(2-([1,1'-biphenyl]-4-ylamino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



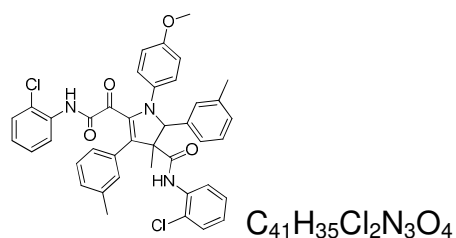
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-oxopropanamide (242 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-5-(2-([1,1'-biphenyl]-4-ylamino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (315 mg, 79%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.21 (s, 3H, CH₃), 3.60(s, 3H, CH₃), 3.63 (s, 6H, 2xCH₃), 4.75 (s, 1H, CH), 6.54-6.61 (m, 7H, CH_{Ar}), 6.65-6.71 (m, 7H, CH_{Ar}), 7.15-7.2 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.27-7.33 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.38-7.45 (m, 7H, CH_{Ar}), 7.50-7.54 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.59-7.68 (m, 2H, CH_{Ar}), 10.29 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 54.68, 55.26, 55.29, 55.86, 114.14, 114.41, 114.52, 114.54, 114.6, 114.64, 114.68, 114.86, 114.88, 114.90, 114.93, 114.97, 115.21, 115.24, 115.27, 115.28, 115.52, 122.38, 122.53, 126.03, 126.11, 126.23, 126.31, 126.44, 128.79, 128.86, 128.99, 130.58, 131.21, 134.86, 135.84, 137.11, 137.99, 139.66, 139.73, 142.27, 150.77, 150.78, 157.79, 165.21.

LC-MS: mass calculated: 786.9; mass obtained: 787.8 (M+H)⁺

79 ***N*-(2-chlorophenyl)-5-(2-((2-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



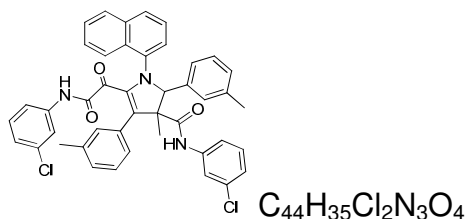
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-5-(2-([1,1'-biphenyl]-4-ylamino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (317 mg, 89%) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.69 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 3.61 (s, 3H, CH₃), 3.64 (s, 3H, CH₃), 4.59 (s, 1H, CH), 6.49-6.54 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.61-6.66 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.71-6.77 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.06-7.25 (m, 14H, CH_{Ar}), 9.07 (s, 1H, NH), 9.49 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.59, 20.92, 24.27, 54.87, 55.09, 55.25, 59.52, 77.93, 110.84, 113.71, 114.45, 114.9, 125.7, 126.46, 126.90, 127.13, 127.35, 127.57, 127.62, 129.05, 129.11, 129.89, 130.41, 130.75, 130.86, 133.73, 134.01, 136.48, 136.77, 142.26, 150.61, 157.76, 164.09, 165.05, 167.94, 172.62.

LC-MS: mass calculated: 703.6; mass obtained: 704.6 (M+H)⁺

80 ***N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1-(naphthalen-1-yl)-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



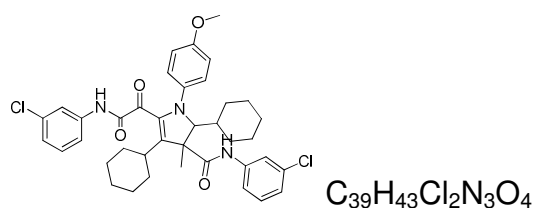
To a solution of naphthalen-1-amine (145 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1-(naphthalen-1-yl)-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (28 mg, 8%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.6 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 6H, 2xCH₃), 5.04 (s, 1H, CH), 6.9-7.01 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.07-7.25 (m, 14H, CH_{Ar}), 7.42-7.49 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.55-7.61 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.65-7.69 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.76-7.83 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.76 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.26 (s, 1H, NH).

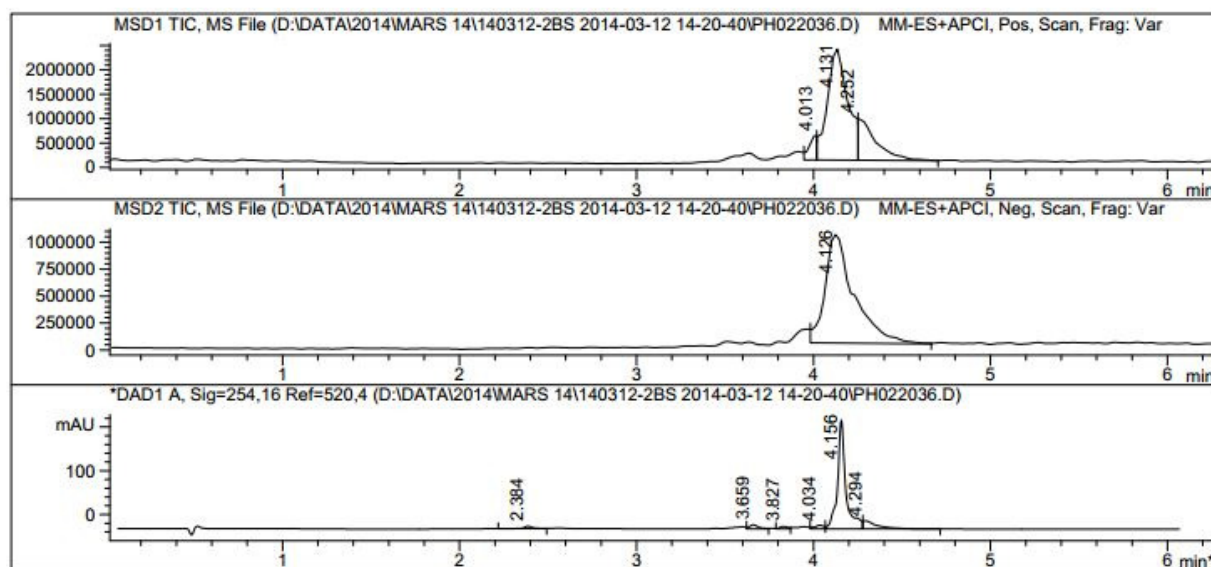
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.03, 60.03, 79.52, 109.99, 117.67, 117.85, 118.76, 119.00, 120.15, 120.28, 121.35, 121.52, 122.76, 122.89, 123.34, 123.46, 123.68, 123.83, 126.36, 127.47, 129.57, 129.99, 131.87, 132.17, 132.47, 133.77, 134.52, 135.88, 136.51, 137.69, 139.14, 139.69, 165.29, 166.43, 168.62.

LC-MS: mass calculated: 723.3; mass obtained: 724.2 (M+H)⁺

82 *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-2,4-dicyclohexyl-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added cyclohexanecarbaldehyde (122 μL , 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-2,4-dicyclohexyl-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (88 mg, 25%) as a non-separable mixture of quinoline and dihydropyrrole.



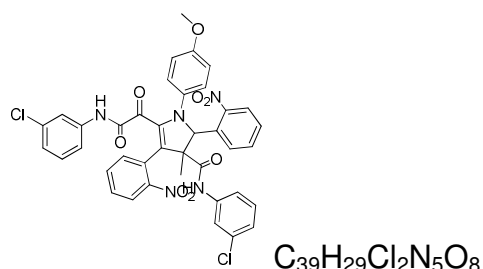
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.77-1.29 (m, 11H, CH₂+CH), 1.33-1.51 (m, 6H, CH₂+CH), 1.56-1.68 (m, 5H, CH₂), 3.35 (s, 1H, CH), 3.61 (s, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃), 6.62-6.73 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.82-7.14 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.25-7.4 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.43-7.46 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.66-7.72 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.99-8.03 (m, 1H, CH_{Ar}), 9.66 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.08, 18.49, 23.66, 24.65, 24.82, 24.98, 25.09,

25.48, 25.64, 25.76, 25.92, 26.03, 26.14, 26.19, 26.36, 26.80, 27.02, 27.19, 28.18, 28.4, 28.78, 32.0, 54.9, 55.03, 55.41, 59.74, 64.42, 79.19, 104.52, 113.79, 114.56, 114.61, 118.00, 118.22, 118.55, 118.77, 118.96, 118.97, 119.13, 119.61, 119.84, 123.16, 123.31, 138.76, 139.86, 140.12, 140.3, 152.46, 158.74, 165.98, 168.80, 172.72, 180.04.

LC-MS: mass calculated: 687.6; mass obtained: 688.2 (M+H)⁺

83 *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-bis(2-nitrophenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 2-nitrobenzaldehyde (153 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1,2,4-tris(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (70 mg, 18% yield) as a yellow solid.

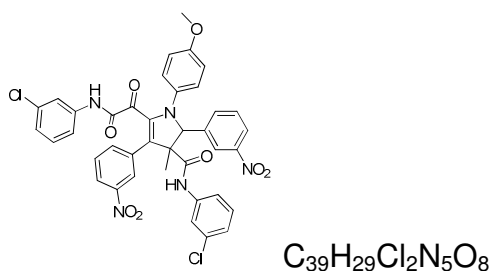
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.99 (s, 3H, CH₃), 3.61 (s, 3H, CH₃), 4.61 (s, 1H, CH₃), 6.49-6.53 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.662-6.66 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.70-6.75 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.00-7.09 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.16-7.23 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.26-7.41 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.6-7.83 (m, 9H, CH_{Ar}), 7.95-7.99 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.07-8.13 (m, 1H, CH_{Ar}), 9.15 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.24 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.05, 20.72, 55.12, 59.7, 113.7, 113.99, 114.46, 114.54, 115.2, 119.07, 120.07, 120.17, 120.23, 120.24, 120.34, 120.74, 121.23, 122.72, 123.43, 124.17, 128.13, 129.97, 129.99, 130.64, 130.75, 131.74, 132.35,

132.36, 132.63, 139.03, 146.9, 149.33, 149.70, 158.72, 160.29, 161.46, 166.63, 166.64, 170.27.

LC-MS: mass calculated: 766.58; mass obtained: 765.6 (M+H)⁺

84 **N-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-bis(3-nitrophenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



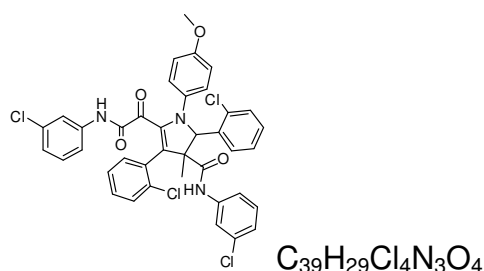
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-nitrobenzaldehyde (153 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,4-bis(3-nitrophenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (49 mg, 13% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.91 (s, 3H, CH₃), 3.64 (s, 3H, CH₃), 4.6 (s, 1H, CH), 4.95 (s, 1H, NH), 6.49-6.54 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.62-6.67 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.73 (s, 1H, CH_{Ar}), 6.76 (s, 1H, CH_{Ar}), 6.93-7.03 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.05-7.1 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.13-7.19 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.2-7.29 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.87-8.0 (m, 4H, CH_{Ar}), 8.31 (s, 1H, CH_{Ar}), 9.43 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.42 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 24.21, 55.11, 57.66, 59.70, 78.64, 113.84, 114.46, 114.92, 117.51, 118.57, 119.92, 121.08, 121.85, 123.29, 123.82, 124.16, 124.5, 129.00, 129.11, 129.55, 129.72, 129.94, 131.51, 132.33, 132.61, 136.37, 138.45, 139.05, 141.09, 142.23, 146.44, 147.21, 150.64, 158.32, 163.85, 164.92, 167.37, 182.81.

LC-MS: mass calculated: 766.58; mass obtained: 765.6 (M+H)⁺

86 2,4-bis(2-chlorophenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



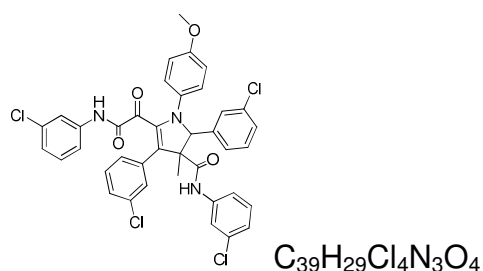
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 2-chlorobenzaldehyde (142 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 2,4-bis(2-chlorophenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (147 mg, 39% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.99 (s, 3H, CH₃), 3.64 (s, 3H, CH₃), 4.60 (s, 2H, CH, NH), 6.48-6.54 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.62-6.66 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.69-6.77 (m, 5H, CH_{Ar}), 6.79-6.86 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.93-6.97 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.0-7.04 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.07-7.12 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.23-7.29 (m, 12H, CH_{Ar}), 7.42-7.49 (m, 4H, CH_{Ar}), 9.15 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.24 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 55.07, 55.25, 59.7, 113.43, 113.53, 113.74, 113.83, 114.45, 114.91, 117.88, 119.03, 119.62, 120.45, 121.66, 123.07, 129.65, 129.83, 129.83, 129.84, 130.69, 131.47, 131.48, 131.74, 132.09, 132.22, 132.41, 132.47, 132.5, 138.55, 138.56, 139.34, 139.35, 142.21, 150.63, 158.32, 158.44, 166.80, 170.26.

LC-MS: mass calculated: 745.48; mass obtained: 743.06 (M+H)⁺

87 ***N*,2,4-tris(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



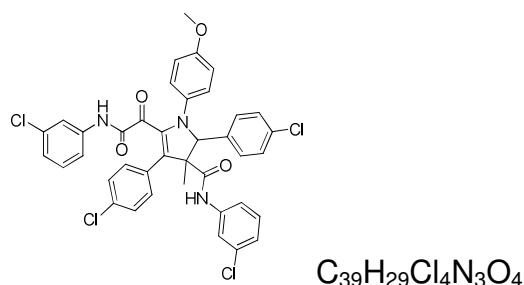
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-chlorobenzaldehyde (142 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 2,4-bis(2-chlorophenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (147 mg, 78% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.79 (s, 3H, CH₃), 3.63 (s, 3H, CH₃), 4.72 (s, 1H, CH), 6.73-6.78 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.99-7.06 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.08-7.12 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.14-7.25 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.29-7.31 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.34-7.38 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.46 (s, 1H, CH_{Ar}), 9.36 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.37 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 24.64, 54.99, 55.14, 59.69, 78.23, 109.59, 113.68, 114.45, 114.94, 117.85, 119.00, 120.39, 121.62, 123.14, 124.1, 126.73, 128.38, 128.89, 128.98, 129.0, 129.19, 129.39, 129.59, 129.84, 130.10, 131.31, 132.20, 132.28, 132.54, 138.58, 139.35, 141.35, 158.13, 164.32, 164.95, 167.54, 170.26, 183.32.

LC-MS: mass calculated: 745.48; mass obtained: 743.6 (M+H)⁺

88 *N*-(3-chlorophenyl)-2,4-bis(4-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



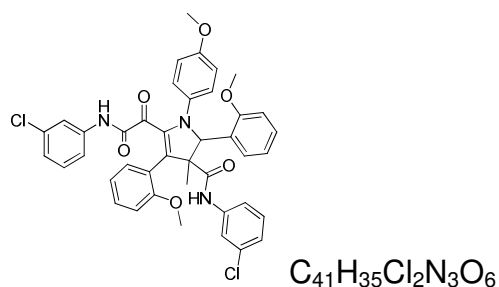
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 4-chlorobenzaldehyde (138 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-2,4-bis(4-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (234 mg, 62% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.75 (s, 3H, CH₃), 3.3 (s, 3H, CH₃), 4.62 (s, 1H, CH), 6.73-6.78 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.99-7.06 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.08-7.12 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.14-7.25 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.29-7.33 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.34-7.36 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.46 (s, 1H, CH_{Ar}), 9.36 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.37 (s, 1H, NH).

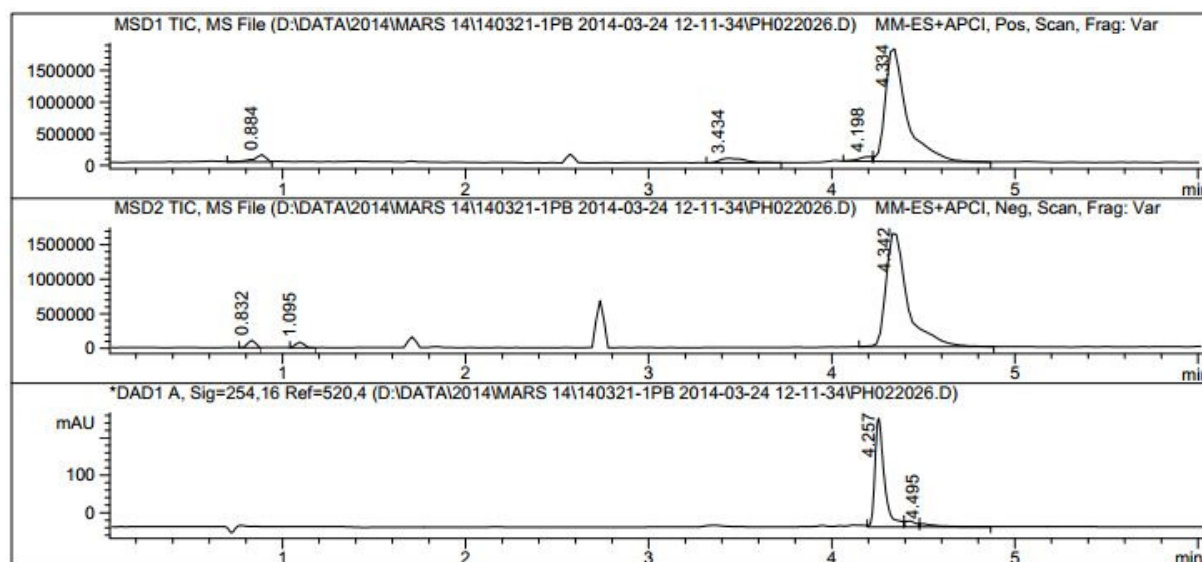
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 24.64, 54.99, 55.10, 59.69, 78.23, 109.59, 113.68, 114.45, 114.94, 117.85, 119.00, 120.39, 121.62, 123.14, 124.1, 127.73, 128.38, 128.89, 128.98, 129.0, 129.15, 129.39, 129.59, 129.84, 130.10, 131.31, 132.20, 132.38, 132.54, 138.58, 139.35, 141.35, 158.13, 164.32, 164.95, 167.54, 170.26, 183.32.

LC-MS: mass calculated: 745.48; mass obtained: 743.6 (M+H)⁺

89 *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-2,4-bis(2-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



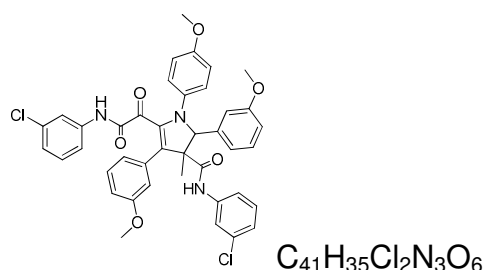
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 2-methoxybenzaldehyde (138 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-2,4-bis(2-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (182 mg, 49% yield) as an unseparable mixture.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.69 (s, 3H, CH₃), 1.89 (s, 3H, CH₃), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.59 (s, 1H, CH), 5.23 (s, 1H, NH), 6.49-6.55 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.59-6.89 (m, 6H, CH_{Ar}), 6.7-6.74 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.79-6.84 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.98-7.05 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.07-7.20 (m, 14H, CH_{Ar}), 7.24-7.26 (m, 4H, CH_{Ar}), 8.85 (s, 1H, CH_{Ar}), 9.1 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.15 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.23 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 22.82, 24.63, 55.03, 55.38, 113.14, 113.64, 114.45, 114.90, 117.68, 117.98, 118.59, 119.0, 119.19, 119.94, 120.06, 121.32, 122.70, 122.97, 123.64, 123.86, 127.59, 127.70, 128.43, 129.23, 129.46, 129.67, 129.77, 130.06, 130.31, 130.42, 130.50, 131.05, 132.14, 132.44, 132.88, 138.75, 139.0, 139.51, 139.75, 142.24, 150.63, 155.99, 156.21, 157.22, 157.55, 157.77, 157.97, 162.15, 163.48, 164.95, 167.47, 167.86, 170.26.
LC-MS: mass calculated: 736.64; mass obtained: 735.6 (M+H)⁺

90 *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-2,4-bis(3-methoxyphenyl)-1-(3-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methoxybenzaldehyde (138 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-2,4-bis(3-methoxyphenyl)-1-(3-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (324 mg, 87% yield) as a yellow solid.

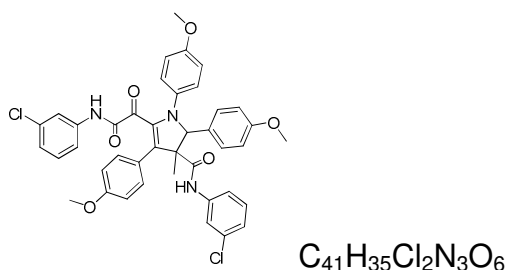
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.80 (s, 3H, CH₃), 3.47 (s, 3H, CH₃), 3.62 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 1H, CH), 6.58-6.62 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.65-6.69 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.70-6.74 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.05-7.10 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.13-7.16 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.28 (s, 1H, CH_{Ar}), 9.19 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.29 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 24.69, 54.76, 55.04, 58.27, 78.18, 109.89, 111.75, 113.47, 114.02, 114.45, 114.91, 115.85, 117.83, 119.01, 120.34, 121.6, 121.98, 122.86, 123.83, 128.35, 129.49, 129.74, 130.81, 131.16, 131.57, 132.17,

132.45, 138.9, 1395, 140.52, 142.24, 150.63, 157.85, 158.05, 158.72, 165.15, 165.25, 167.76, 170.26, 183.84.

LC-MS: mass calculated: 736.64; mass obtained: 735.6 (M+H)⁺

91 *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1,2,4-tris(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



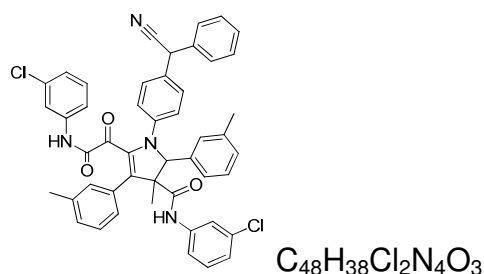
To a solution of p-anisidine (124 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 4-methoxybenzaldehyde (138 mg, 1.01 mmol), *N*-(2-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1,2,4-tris(4-methoxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (324 mg, 66% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.76 (s, 3H, CH₃), 3.46 (s, 3H, CH₃), 3.63 (s, 3H, CH₃), 3.64 (s, 3H, CH₃), 6.49-6.54 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.61-6.67 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.70-6.76 (m, 5H, CH_{Ar}), 6.91-6.93 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.97-7.16 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.18-7.23 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.28-7.37 (m, 6H, CH_{Ar}), 9.23 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.25 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.71, 24.74, 54.66, 55.04, 57.75, 59.71, 78.08, 110.23, 112.88, 113.53, 114.17, 114.46, 114.91, 117.81, 119.00, 120.47, 121.8, 122.14, 122.40, 122.77, 123.83, 129.48, 129.77, 130.08, 131.04, 131.08, 131.13, 131.27, 132.15, 132.50, 138.88, 139.85, 142.25, 150.63, 157.71, 158.17, 159.57, 165.44, 165.55, 168.05, 184.09.

LC-MS: mass calculated: 736.64; mass obtained: 735.6 (M+H)⁺

92 ***N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-(cyano(phenyl)methyl)phenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



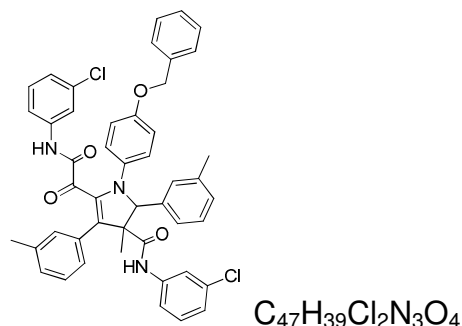
To a solution of 3-methylbenzaldehyde (595 μ L, 5.05 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (1 g, 5.05 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (396 mg, 2.5 mmol) in EtOH (6 mL) was added drop wise 2-(3-aminophenyl)-2-phenylacetonitrile (1.05 g, 5.05 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100% of DCM afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(4-(cyano(phenyl)methyl)phenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (727 mg, 38%) as a yellow solid.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*6): δ 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.15 (s, 6H, 2xCH₃), 4.6 (s, 1H, CH), 5.69 (s, 1H, CH), 6.86-6.90 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.94-6.98 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.01-7.12 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.12-7.26 (m, 13H, CH_{Ar}), 7.29-7.38 (m, 4H, CH_{Ar}), 9.18-9.26 (m, 1H, CH_{Ar}), 10.34 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-*d*6): δ 20.46, 20.75, 20.93, 58.86, 59.73, 78.25, 111.03, 117.76, 118.94, 120.09, 120.11, 120.32, 120.34, 121.57, 121.61, 122.93, 123.83, 126.87, 127.31, 127.36, 127.40, 127.43, 127.59, 127.61, 128.05, 129.13, 129.49, 129.64, 129.81, 129.84, 130.08, 130.39, 130.57, 130.75, 132.14, 132.48, 136.20, 136.26, 136.33, 136.60, 136.61, 138.61, 138.84, 139.6, 164.36, 165.11, 170.31.

LC-MS: mass calculated: 788.2; mass obtained: 789.2 (M+H)⁺

93 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-N-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



93a To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (1 g, 5.05 mmol) in EtOH (6 mL) were added *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (1 g, 5.05 mmol), 3-methylbenzaldehyde (595 μL , 5.05 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (396 mg, 2.5 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (1.4 g, 70%) as a yellow solid.

93b To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (1 g, 5.05 mmol) in EtOH (6 mL) were added 3-(benzyloxy)aniline (1 g, 5.05 mmol), 3-methylbenzaldehyde (595 μL , 5.05 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (396 mg, 2.5 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (1.6 g, 82%) as a yellow solid.

93c To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (80 mg, 0.5 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography

eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (330 mg, 84%) as a yellow solid.

93d To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (80 mg, 0.5 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (376 mg, 96%) as a yellow solid.

93e To a solution of *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol) and 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (212 mg, 54%) as a yellow solid.

93f To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol) and *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (284 mg, 72%) as a yellow solid.

93g To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol). After stirring 10 min at room temperature was added *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography

eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (381 mg, 96%) as a yellow solid.

93h To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol) and *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (287 mg, 72%) as a yellow solid.

93i To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol) and *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and Et₃N (77 μ L, 0.55 mol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (99 mg, 26%) as a yellow solid.

93j To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol) and *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (239 mg, 60%) as a yellow solid.

93k To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (158 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux and under O₂, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*.

Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (126 mg, 32%) as a yellow solid.

93l To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (316 mg, 2.02 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (389 mg, 98%) as a yellow solid.

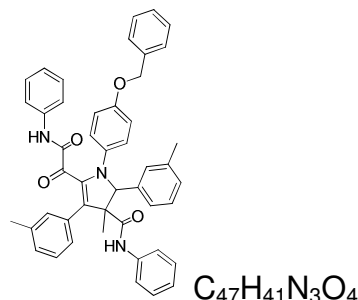
93m To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol) and APTS.H₂O (105 mg, 0.505 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (389 mg, 98%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 6H, 2xCH₃), 4.61 (s, 1H, CH), 4.94 (s, 2H, CH₂), 6.48-6.51 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.69-6.73 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.77-7.43 (m, 21H, CH_{Ar}), 9.17 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.3 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.03, 21.26, 21.47, 25.18, 59.02, 60.24, 69.78, 70.28, 78.7, 110.49, 114.78, 115.33, 116.19, 118.22, 119.42, 120.78, 122.05, 123.35, 124.30, 127.36, 127.65, 127.81, 128.03, 128.34, 128.38, 128.85, 129.99, 130.11, 130.28, 130.79, 131.56, 132.64, 132.97, 136.78, 136.90, 137.14, 138.3, 139.32, 139.40, 140.19, 143.1, 150.12, 157.5, 165.85, 166.18, 168.40, 170.81.

LC-MS: mass calculated: 778.2; mass obtained: 779.2 (M+H)⁺

94 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-N-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



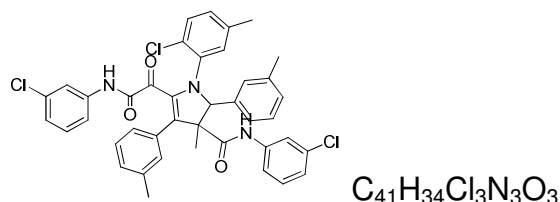
To a solution of 4-(benzyloxy)aniline (201 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), 2-oxo-*N*-phenylpropanamide (165 mg, 1.01 mmol) and 2-chlorobenzoic acid (86 mg, 0.505 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-3-methyl-5-(2-oxo-2-(phenylamino)acetyl)-*N*-phenyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (190 mg, 53%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 6H, 2xCH₃), 4.62 (s, 1H, CH), 4.94 (s, 2H, CH₂), 6.47-6.53 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.69-6.74 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.87-7.45 (m, 15H, CH_{Ar}), 7.71-7.8 (m, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.75, 20.79, 21.53, 59.73, 69.27, 69.78, 78.04, 114.23, 114.86, 115.37, 119.27, 122.72, 126.42, 127.19, 127.32, 127.52, 127.53, 127.66, 127.70, 127.82, 127.85, 128.04, 128.09, 128.23, 128.29, 128.34, 128.33, 128.37, 128.42, 128.6, 129.69, 130.56, 130.69, 130.74, 131.07, 131.35, 131.51, 132.49, 133.42, 136.65, 137.46, 137.78, 137.86, 142.53, 149.64, 166.71, 167.37.

LC-MS: mass calculated: 710.8; mass obtained: 711.2 (M+H)⁺

95 **1-(2-chloro-5-methylphenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



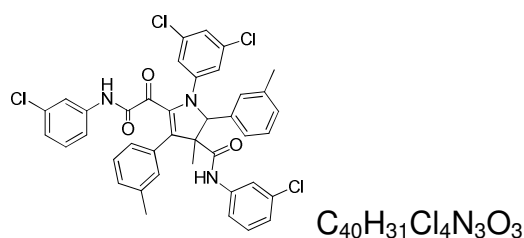
To a solution of 2-chloro-5-methylaniline (143 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μ L, 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded 1-(2-chloro-5-methylphenyl)-*N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (14 mg, 4%) as a yellow solid.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.7 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 4.82 (s, 1H, CH), 6.98-7.26 (m, 20H, CH_{Ar}), 10.51 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.72, 20.75, 55.56, 117.68, 118.75, 122.98, 128.00, 128.16, 129.62, 129.67, 129.80, 129.94, 130.14, 130.42, 130.52, 130.53, 130.57, 130.58, 130.69, 132.16, 132.51, 133.14, 135.40, 136.01, 136.12, 136.50, 136.64, 137.38, 139.1, 139.71, 140.47, 165.06, 169.96, 171.34.

LC-MS: mass calculated: 722.1; mass obtained: 723.2 (M+H)⁺

96 ***N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(3,5-dichlorophenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide**



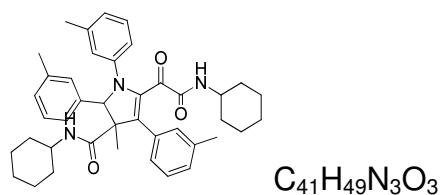
To a solution of 3,5-dichloroaniline (164 mg, 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol), *N*-(3-chlorophenyl)-2-oxopropanamide (200 mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 DCM/Et₂O afforded *N*-(3-chlorophenyl)-5-(2-((3-chlorophenyl)amino)-2-oxoacetyl)-1-(3,5-dichlorophenyl)-3-methyl-2,4-di-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (21 mg, 6%) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.67 (s, 3H, CH₃), 1.93 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 1H, CH), 6.86-6.92 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.85-7.04 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.06-7.12 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.13-7.23 (m, 9H, CH_{Ar}), 9.25 (s, 1H, CH_{Ar}), 10.87 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.96, 24.27, 24.71, 58.70, 59.02, 76.79, 78.35, 111.17, 117.7, 117.91, 119.1, 120.22, 120.36, 121.5, 122.9, 123.05, 123.79, 127.45, 128.37, 128.54, 129.09, 129.59, 129.76, 129.87, 130.06, 130.81, 131.26, 132.25, 132.57, 136.41, 136.77, 137.78, 138.91, 139.63, 164.36, 165.15, 167.81, 171.05, 172.31, 183.48.

LC-MS: mass calculated: 742.5; mass obtained: 743.5 (M+H)⁺

97 *N*-cyclohexyl-5-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide



To a solution of *m*-toluidine (108 μL , 1.01 mmol) in EtOH (1.2 mL) were added 3-methylbenzaldehyde (119 μL , 1.01 mmol) and *N*-cyclohexyl-2-oxopropanamide (155

mg, 1.01 mmol). After stirring 3h under reflux, the mixture stayed one night at room temperature without stirring. Then the mixture was concentrated *in vacuo*. Chromatography eluting with 100/0-40/60 Pentane/Et₂O afforded *N*-cyclohexyl-5-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoacetyl)-3-methyl-1,2,4-tri-*m*-tolyl-2,3-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (17 mg, 5% yield) as a yellow solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.22-1.38 (m, 10H, 5xCH₂), 1.61-1.76 (m, 10H, 5xCH₂), 2.13 (s, 6H, 2xCH₃), 2.33 (s, 6H, 2xCH₃), 4.38 (s, 1H, CH), 7.01-7.34 (m, 12H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.93, 21.05, 24.60, 25.11, 32.14, 32.18, 32.42, 43.02, 47.05, 47.55, 51.2, 54.3, 71.59, 72.69, 72.81, 114.33, 114.83, 116.74, 117.21, 119.75, 120.48, 122.01, 123.64, 123.85, 126.34, 127.35, 127.61, 127.76, 127.81, 128.26, 128.29, 129.11, 136.73, 137.25, 137.40, 143.93, 144.32, 145.79, 145.82, 173.56, 173.93.

LC-MS: mass calculated: 631.38; mass obtained: 632.4 (M+H)⁺

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Baumlér, E. Paul Ehrlich: Scientist for Life. (1984).
2. Hill, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S27–S37 (2006).
3. Lefkowitz, R. J. & Roth, J. Radioreceptor Assay of Adrenocorticotrophic Hormone: New Approach to Assay of Polypeptide Hormones in Plasma. *Science* 633–5 (1970).
4. Bockaert, J. & Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1723–1729 (1999).
5. Hibert, M. Three-Dimensional Models of Neurotransmitter G-Binding Protein-Coupled Receptors. *Mol. Pharmacol.* 8–15 (1991).
6. Baldwin, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 1693–1703 (1993).
7. Palczewski, K. *et al.* Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**, 739–745 (2000).
8. Venkatakrishnan, A. J. *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185–194 (2013).
9. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the B2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
10. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 339–357 (2008).
11. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).

12. Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 17–27 (2012).
13. Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *5th Int. Symp. Fish Endocrinology 5th ISFE* **142**, 94–101 (2005).
14. Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. Insect Sex-Pheromone Signals Mediated by Specific Combinations of Olfactory Receptors. *Science* **307**, 1638–1642 (2005).
15. Prabhu, Y. & Eichinger, L. The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors. *Spec. Issue Dedic. Guenter Gerisch Occas. His 75th Birthd.* **85**, 937–946 (2006).
16. Moreira, I. S. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 16–33 (2014).
17. May, L. T. & Hill, S. J. ERK phosphorylation: Spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2013–2017 (2008).
18. Appleton, K. M. *et al.* Development of inhibitors of heterotrimeric G α subunits. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 3423–3434 (2014).
19. Sánchez-Fernández, G. *et al.* G α q signalling: The new and the old. *Cell. Signal.* **26**, 833–848 (2014).
20. Lappano, R. & Maggiolini, M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 47–60 (2011).
21. Kimple, A. J., Bosch, D. E., Giguère, P. M. & Siderovski, D. P. Regulators of G-Protein Signaling and Their G α Substrates: Promises and Challenges in Their Use as Drug Discovery Targets. *Pharmacol. Rev.* **63**, 728–749 (2011).

22. Khan, S. M. *et al.* The Expanding Roles of G $\beta\gamma$ Subunits in G Protein–Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacol. Rev.* **65**, 545–577 (2013).
23. EllisClare. The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 577–626 (2004).
24. Kenakin, T. Principles: Receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 186–192 (2004).
25. Durroux, T. Principles: A model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 376–384 (2005).
26. Tuteja, N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal. Behav.* **4**, 942–947 (2009).
27. DeFea, K. A. Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold? *Cell. Signal.* **23**, 621–629 (2011).
28. Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of Receptor Signals by β -Arrestins. *Science* **308**, 512–517 (2005).
29. Reiter, E. & Lefkowitz, R. J. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 159–165 (2006).
30. Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **115**, 455–465 (2002).
31. DeWire, S. M. & Violin, J. D. Biased Ligands for Better Cardiovascular Drugs: Dissecting G-Protein-Coupled Receptor Pharmacology. *Circ. Res.* **109**, 205–216 (2011).
32. Sivertsen, B., Holliday, N., Madsen, A. N. & Holst, B. Functionally biased signalling properties of 7TM receptors – opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br. J. Pharmacol.* **170**, 1349–1362 (2013).

33. Luttrell, L. M. Minireview: More Than Just a Hammer: Ligand 'Bias' and Pharmaceutical Discovery. *Mol. Endocrinol.* **28**, 281–294 (2014).
34. Whalen, E. J., Rajagopal, S. & Lefkowitz, R. J. Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol. Med.* **17**, 126–139 (2011).
35. Luttrell, L. M. & Gesty-Palmer, D. Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling. *Pharmacol. Rev.* **62**, 305–330 (2010).
36. Nebigil, G. C. in *Curr. Basic Pathol. Approaches Funct. Muscle Cells Tissues - Mol. Hum.* ISBN 978-953-51-0679-1, (edited by Haruo Sugi).
37. Mélik-Parsadaniantz, S. & Rostène, W. Chemokines and neuromodulation. *Chemokines Chemokine Recept. Nerv. Syst.* **198**, 62–68 (2008).
38. Monnier, J. & Samson, M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett.* **296**, 144–149 (2010).
39. Kaser, A. W., Martina Lepperdinger, Günther Kreil, Günther. The AVIT protein family. *EMBO Rep.* **4**, 469–473 (2003).
40. Masuda, Y. *et al.* Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 396–402 (2002).
41. Guilini C., Urayama K., Turkeri G., Dedeoglu D. B., Kurose H., Messaddeq N., Nebigil C. G. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **298**, H844–H852 (2010).
42. Ngan, E. S. W. & Tam, P. K. H. Prokineticin-signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1679–1684 (2008).

43. Zhou, Q.-Y. & Meidan, R. in *Orphan G Protein-Coupled Recept. Nov. Neuropept.* (eds. Civelli, O. & Zhou, Q.-Y.) **46**, 181–199 (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
44. Dode, C. & Hardelin, J.-P. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* **17**, 139–146 (2008).
45. Maldonado-Pérez, D., Evans, J., Denison, F., Millar, R. P. & Jabbour, H. N. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 66–72 (2007).
46. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/>.
47. <http://www.cepidc.inserm.fr/cgi-bin/broker.exe>.
48. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–582 (2000).
49. Rumberger, J. A., Behrenbeck, T., Breen, J. R., Reed, J. E. & Gersh, B. J. Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **21**, 673–682 (1993).
50. Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S. & Udelson, J. E. Left Ventricular Remodeling in Heart Failure: Current Concepts in Clinical Significance and Assessment. *JACC Cardiovasc. Imaging* **4**, 98–108 (2011).
51. Boulberdaa, M., Urayama, K. & Nebigil, C. G. Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. *Cardiovasc. Res.* **92**, 191–198 (2011).
52. Nebigil, C. G. Prokineticin Receptors in Cardiovascular Function: Foe or Friend? *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 55–60 (2009).

53. Dormishian, M. *et al.* Prokineticin Receptor-1 Is a New Regulator of Endothelial Insulin Uptake and Capillary Formation to Control Insulin Sensitivity and Cardiovascular and Kidney Functions. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, (2013).
54. Prosser, H. M. *et al.* Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 648–653 (2007).
55. Yin, W. *et al.* Mechanisms that underlie the internalization and extracellular signal regulated kinase 1/2 activation by PKR2 receptor. *Cell. Signal.* **26**, 1118–1124 (2014).
56. Ralbovsky, J. L. *et al.* Triazinediones as prokineticin 1 receptor antagonists. Part 1: SAR, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2661–2663 (2009).
57. Balboni, G. *et al.* Triazine Compounds as Antagonists at Bv8-Prokineticin Receptors. *J. Med. Chem.* **51**, 7635–7639 (2008).
58. Cheng, M. Y. *et al.* Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5475–5480 (2012).
59. Wayne J. Thompson & Jeffrey Y. Melamed. Morpholine carboxamide prokineticin receptor antagonists, Patent US007855201B2, 2010.
60. Carroll C., Goldby A., Teall M. Sulfonyl Piperidine Derivatives and Their Use for Treating Prokineticin Mediated Diseases, Patent WO2013/179024 (A1). (2013).
61. Congiu, C. *et al.* A new convenient synthetic method and preliminary pharmacological characterization of triazinediones as prokineticin receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **81**, 334–340 (2014).

62. Shigematsu N., Kayakiri N., Okada S., Tanaka H. Total Synthesis of WS9326A, a Potent Tachykinin Antagonist from *Streptomyces violaceoniger*. *Chem Pharm Bull* 236–2342 (1997).
63. Dong, L. & Miller, M. J. Total Synthesis of Exochelin MN and Analogues. *J. Org. Chem.* **67**, 4759–4770 (2002).
64. Yang, K. *et al.* Design and synthesis of novel chloramphenicol amine derivatives as potent aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3810–3817 (2009).
65. Michael John Munchhof. Dérivés du benzamidazole.
66. Li, H. *et al.* 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3- benzotriazin-4(3H)-one (DEPBT): A New Coupling Reagent with Remarkable Resistance to Racemization. *Org. Lett.* **1**, 91–94 (1999).
67. Urayama, K. *et al.* The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J.* **21**, 2980–2993 (2007).
68. Piegari, E. *et al.* Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic Res. Cardiol.* **108**, 1–18 (2013).
69. http://www.arpege.cnrs.fr/IMG/pdf/Transfert_d_energie_par_resonance.pdf.
70. Soullère, L. *et al.* Synthesis of GTP-Derived Ras Ligands. *ChemBioChem* **5**, 1448–1453 (2004).
71. Bartkovitz, David Joseph *et al.* 4-amino-thieno[3,2-c]pyridine-7-carboxylic acid derivatives, US. Pat. Appl. Publ., 20070060607. (2007).
72. Zych, A. J. & Iverson, B. L. Synthesis and Conformational Characterization of Tethered, Self-Complexing 1,5-Dialkoxynaphthalene/1,4,5,8-Naphthalenetetracarboxylic Diimide Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8898–8909 (2000).

73. Zhang, L., Sun, L., Cui, Z., Gottlieb, R. L. & Zhang, B. 5'-Sulfhydryl-Modified RNA: Initiator Synthesis, in Vitro Transcription, and Enzymatic Incorporation. *Bioconjug. Chem.* **12**, 939–948 (2001).
74. Branderhorst, H. M., Ruijtenbeek, R., Liskamp, R. M. J. & Pieters, R. J. Multivalent Carbohydrate Recognition on a Glycodendrimer-Functionalized Flow-Through Chip. *ChemBioChem* **9**, 1836–1844 (2008).
75. Tadashi SHRIRAIWA, Reiichi SAIJOH, Masahiro SUZUKI, Kyosuke YOSHIDA, Satoshi NISHIMURA, and Hisashi NAGASAWA. Preparation of Optically Active threo-2-Amino-3-hydroxy-3-phenylpropanoic Acid (threo-B-Phenylserine) via Optical Resolution. *Chem Pharm Bull* 1363–1367 (2003).
76. Khan, K. M. *et al.* Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 6027–6033 (2006).
77. Kaczmarek, O. *et al.* 2'-Linking of Lipids and Other Functions to Uridine through 1,2,3-Triazoles and Membrane Anchoring of the Amphiphilic Products. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1579–1586 (2010).
78. Daval, S. B. *et al.* Fluorescent Derivatives of AC-42 To Probe Bitopic Orthosteric/Allosteric Binding Mechanisms on Muscarinic M1 Receptors. *J. Med. Chem.* **55**, 2125–2143 (2012).
79. Saeed, A. E. M. & Elhadi, S. A. Synthesis of Some 2-Aryl- and 2,3-Diaryl-quinolin-4-carboxylic Acid Derivatives. *Synth. Commun.* **41**, 1435–1443 (2011).
80. Doebner, O. Ann. 1887, 242 & 265.
81. http://ecompound.com/Reaction%20reference/reaction_index.htm.
82. Kakarla, R., Li, G. & Gerritz, S. W. Synthesis and Applications of a Novel Polymer-Supported EEDQ Reagent. *J. Comb. Chem.* **9**, 745–747 (2007).

83. Kaur, P., Singh, P. & Kumar, S. Regio- and stereochemical aspects in synthesis of 2-allyl derivatives of glycolic, mandelic and lactic acids and their iodocyclisations to 3-hydroxy-3,4-dihydrofuran-2(5H)-ones. *Tetrahedron* **61**, 8231–8240 (2005).
84. Parent, E. E. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of [18F]Bicalutamide, 4-[76Br]Bromobicalutamide, and 4-[76Br]Bromo-thiobicalutamide as Non-Steroidal Androgens for Prostate Cancer Imaging. *J. Med. Chem.* **50**, 1028–1040 (2007).
85. Saravanan, S., Azath, I. A. & Muthusubramanian, S. Synthesis of Highly Substituted 2,3-Dihydro-1H-pyrrole Derivatives via a Tandem Regioselective Addition of Nitrones to 1,3-Enynes with Subsequent Rearrangement. *J. Org. Chem.* **73**, 2323–2329 (2008).

Marine Charavin

SYNTHESE D'AGONISTES NON-PEPTIDIQUES DU RECEPTEUR A LA PROKINETICINE PKR1.

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires. Parmi eux, nous avons choisi d'étudier deux récepteurs apparentés : les récepteurs de la prokinéticine 1 et 2. Ces deux récepteurs ont pour ligands des hormones de nature peptidique, divisées en deux sous-groupes : les prokinéticines 1 et 2. Ces deux prokinéticines sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques en se liant à leurs récepteurs PKR1 et PKR2. Il a été récemment montré que la prokinéticine 2 pouvait stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches progénitrices cardiaques, via les récepteurs PKR1 et PKR2. Il a également été reporté que l'activation de PKR1 protège les cardiomyocytes et les cellules progénitrices cardiaques de l'apoptose. Afin d'étudier ces effets nous avons synthétisé des agonistes non-peptidiques du récepteur PKR1. Nous avons donc poursuivi les études de pharmacomodulation d'une première famille de composés et développé une seconde famille d'agonistes potentiels originaux, déterminée par des études de modélisation moléculaire. Une sonde fluorescente a été synthétisée afin d'évaluer la liaison de nouveaux composés. Au cours de ces travaux nous avons découvert une nouvelle réaction multi-composante permettant la synthèse d'un composé dihydropyrrole polyfonctionnel. Nous nous sommes alors intéressés à son mécanisme et à sa limitation chimique dans le but de former de nouveaux hétérocycles fonctionnalisés.

Mots clés : récepteurs couplés aux protéines G, prokinéticine, récepteur de la prokinéticine, agoniste non-peptidique, cellules progénitrices cardiaques, sonde fluorescente, quinoléine, composé dihydropyrrole, réaction multi-composante.

Abstarct

The G protein-coupled receptors represent the largest family of membrane receptors. Among them, we choose to study two related receptors: prokineticin receptors 1 and 2. These two receptors have peptidic hormone ligands, divided in two sub-groups: prokineticins 1 and 2. Both prokineticins are involved in many physiological processes by binding to their receptors PKR1 and PKR2. It has recently been shown that prokineticin 2 could stimulate proliferation and differentiation of cardiac progenitor cells. It was also reported that activation of PKR1 protects cardiomyocytes and cardiac progenitor cells from apoptosis. To investigate these effects we synthesized non-peptidic receptor PKR1. We continued pharmacodulation studies of a first family of compounds and developed a second family of original potential agonists, determined by molecular modeling studies. A fluorescent probe was synthesized to access the binding of novel compounds. During this work we discovered a new multi-component reaction for the synthesis of a polyfunctional dihydropyrrole compound. We then interested in the mechanism and its chemical limitation in order to form new functionalized heterocycles.

Keywords: G protein coupled-receptors, prokineticin, prokineticin receptor, non-peptidic agonist, cardiac progenitor cells, fluorescent probe, quinoline, dihydropyrrole compound, multi-component reaction.