

Nouveaux hémiindigoïdes sélectifs ciblant la tyrosinase humaine: détection et suppression de la mélanogenèse Brayan Roulier

▶ To cite this version:

Brayan Roulier. Nouveaux hémiindigoïdes sélectifs ciblant la tyrosinase humaine : détection et suppression de la mélanogenèse. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV049 . tel-03593768

HAL Id: tel-03593768 https://theses.hal.science/tel-03593768

Submitted on 2 Mar 2022

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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie-Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Brayan ROULIER

Thèse dirigée par **Basile PÉRÈS** et co-encadrée par **Romain HAUDECOEUR**

préparée au sein du **Département de Pharmacochimie Moléculaire – DPM** (Grenoble) dans l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant

Nouveaux hémiindigoïdes sélectifs ciblant la tyrosinase humaine : détection et suppression de la mélanogenèse

Thèse soutenue publiquement le **14 octobre 2021**, devant le jury composé de :

Madame Martine DEMEUNYNCK Directrice de Recherche, Université Grenoble-Alpes, Présidente du jury Madame Pascale MOREAU Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne, Rapporteur Monsieur Jean-Pierre LEPOITTEVIN Professeur des Universités, Université de Strasbourg, Rapporteur Monsieur Marc MARESCA Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille, Examinateur Monsieur Basile PÉRÈS Maître de conférences, Université Grenoble-Alpes, Directeur de thèse Monsieur Romain HAUDECOEUR Ingénieur de recherche, Université de Grenoble-Alpes, Co-encadrant de thèse, Invité



Cette thèse est dédiée à ma famille, à

mon grand-père.

Je souhaite remercier à travers ces quelques lignes les personnes impliquées de près ou de loin à l'accomplissement de ces trois années de thèse.

Tout d'abord, un grand merci à mon directeur de thèse Basile Pérès. Merci, pour ta bonne humeur, ta joie de vivre et pour tes conseils avisés. Ces trois années de thèse à tes côtés m'ont énormément apporté tant sur le plan moral que professionnel. Nos échanges vont me manquer et je pense que mes histoires vont à coup sûr laisser un petit vide. Par contre tes problèmes de PC le lundi matin à 9h ne vont eux, pas me manquer. Sache que sans toi cette thèse n'aurait pas été la même.

Je souhaite également remercier Romain Haudecoeur mon co-encadrant qui a piloté ce projet, sans qui toute cette thèse n'aurait pas pu être possible. Le déroulement de ce projet, son originalité, son financement, tout ça c'est grâce à toi. Je suis fier d'avoir été ton premier thésard et espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Merci pour ton encadrement, je n'aurais pas pu espérer mieux. Merci pour tes conseils avisés spécialement ceux sur la rédaction mais aussi sur mes présentations, ces conseils me serviront pour la suite. Oui, tu l'auras remarqué le français n'était pas ma matière préférée.

Je voudrais ensuite remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon manuscrit : Dr. Martine Demeunynck de l'Université de Grenoble-Alpes, Dr. Marc Maresca de l'Université d'Aix-Marseille et tout particulièrement les rapporteurs : Pr Jean-Pierre Lepoittevin de l'Université de Strasbourg et Dr. Pascale Moreau de l'Université Clermont Auvergne.

Un grand merci à l'Université d'Aix-Marseille, ainsi qu'à l'institut de Technologie d'Haifa -Technion en Israel pour leur collaboration.

Une énorme pensée aux personnels du DPM que j'ai côtoyé tout au long de cette thèse. Tout d'abord Isabelle et Marie-Carmen, toujours présentes pour partager une pause repas, qu'est-ce que serait une pause repas sans vous. Merci à Marie-Carmen pour m'avoir permis de découvrir le fonctionnement de la RMN de plus près. Yung, Ben, Marine, merci pour nos petites discussions. Merci à toi Marine, pour avoir accepté de m'encadrer pour le label mais surtout pour m'avoir permis d'enseigner tout au long de cette thèse. Corinne, Eric, j'ai beaucoup apprécié vos petits compliments à chaque fois qu'une nouvelle entrante arrivait au DPM.

Qu'est-ce que serait le DPM sans Angèle et Pascale « le cœur du DPM », toujours là pour écouter/discuter, nos conversations vont me manquer.

Bien évidemment qu'est ce que serait une thèse sans les sorties et les rencontres, je remercie tous les doctorants que j'ai pu côtoyer et que je côtoie encore. À mes acolytes du laboratoire, Emile, caractère bien trempé mais avec un cœur d'artichaut et bien sûr Mathieu « le corse ». Que dire sur toi mis à part ton accent chantonnant, tu es toujours partant pour aller boire une (des) pinte(s), toujours partant pour aller danser, toujours de bonne humeur, toujours à l'écoute. Tu as été LA rencontre de ces trois années.

Une pensée particulière pour Pierre et Philippe, mes amis, mes frères, d'abord la licence puis le master et enfin la thèse. Philippe, les séances de TP à tes côtés ont finalement portées leur fruit. Qui aurait cru qu'on en arriverait au Doctorat après notre classement en Médecine. A mes masseuses préférées rencontrées en Médecine : Fred, Valentin, Clément. A toi Igor, je me souviens les séances de TP ensemble au lycée, c'est sûr qu'à cette époque rien ne disait que la chimie était ma voie.

À ma famille, mes parents, qui ont été là durant ces 10 dernières années, pour m'avoir apporté un soutien moral et financier qui m'ont permis d'effectuer mes études à l'université et d'être là où j'en suis aujourd'hui.

Et enfin, merci à toi papy c'est en partie grâce à toi, ton éducation, tes idéaux mais surtout ta maladie qui a été l'élément déclencheur, la raison pour laquelle j'ai choisi de poursuivre mes études, d'abord en Médecine puis en Chimie. Ta carrière, tes valeurs, le modèle que tu étais sont des exemples à suivre, il en est de même de ton combat qui a duré plusieurs années contre Alzheimer et ton cancer du côlon. Tu as été et resteras une source d'inspiration, ma source d'inspiration.

« Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis. »

Victor Hugo

ABRÉVIATIONS

<i>ab</i> TYR	Tyrosinase de champignon Agaricus bisporus
AKU	Alkaptonuria
BQA	Acide acétique benzoquinone
CO	Catéchol oxidase
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
DTIC	Darcabazine
EDDA	Diacétate éthylènediamine
EGF	Facteur de croissance épidermique
EtOAc	Acétate d'éthyle
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et
	médicamenteux
Нс	Hémocyanine
HI	Hémiindigo
НМТА	Hexaméthylènetétramine
HOPNO	2-hydroxypyridine-N-oxide
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HQ	Hydroquinone
hsTRP1	Tyrosinase-related protein 1
hsTRP2	Tyrosinase-related protein 2
<i>hs</i> TYR	Tyrosinase Humaine
HTI	Hémithioindigo
LB	Body Lewy \rightarrow Corps de Lewy
<i>L</i> -DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LRO	Lysosome-related organites

MBC	Concentration bactericide minimal
MIC	Concentration minimale inhibitrice
NBS	N-Bromosuccinimide
NM	Neuromélanine
paTYR	Tyrosinase de champignon polyporus arcularius
PD	Maladie de Parkinson
PDT	Thérapie photodynamiques
PET	Transfert d'électron photoinduit
PHTI	Pyrrole Hémithioindigo
PPO	Polyphénol oxidase
PTU	N-Phénylthiourée
RAS	Relation structure activité
RNS	Espèces reactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAR	Staphylococcus aureus
satyr	Tyrosinase de bactérie
SNpc	Substance noire par compacta
Sf9	Spodoptera frugiperda
TFA	Acide trifluoroacétique
TLC	Chromatographie sur couche mince
UV	Ultraviolet

SOMMAIRE

CHAPITRE I : Introduction	23
I.D'Hippocrate à la pharmacologie moderne	25
II.La Pharmacologie clinique	26
III.Pharmacologie de la peau	27
IV.Processus biologique de la mélanogénèse	29
1. La mélanogénèse	29
2. La neuromélanine	
V.Désordres liés à la mélanogenèse	35
1. Maladie de Parkinson	35
2. Hyperpigmentation & utilisation cosmétique	
3. Alcaptonurie : Ochronose et mélanogénèse	
VI.Mélanome et résistances	40
VII.La tyrosinase (<i>hs</i> TYR) : enzyme clé de la mélanogénèse	
1. Généralités sur les tyrosinases	48
2. Tyrosinase humaine (<i>hs</i> TYR) et tyrosinase de champignon <i>bisporus</i> (<i>ab</i> TYR)	Agaricus 49
3. Expression et cristallisation de la tyrosinase humaine : un défi ?	52
4. Activité et inhibition de la tyrosinase	54
5. Inhibiteurs de la tyrosinase humaine (<i>hs</i> TYR)	56

VIII.Les aurones comme inhibiteurs potentiels de <i>hs</i> TYR	64
CHAPITRE II : Conception & Discussion	69
1. Travaux antérieurs	71
2. Premier objectif : Synthèse de nouvelles séries	73
I.Conception du test sur lysats MNT-1 pour orienter les synthèses	74
II.Générations successives d'inhibiteurs de la série principale : Résorcinol	75
1. Modulation du cycle A	75
2. Modulation du cycle C	78
III.Générations successives d'inhibiteurs de séries annexes	84
1. Série diméthylamino	85
2. Série halogénée	85
3. Série Catéchol/Résorcinol monomethoxylée	87
IV.Tests sur enzyme isolée des composés les plus prometteurs	88
V.Conclusion & Perspectives	90
3. Second objectif : Détermination des propriétés de fluorescences des auro préparées dans le but de les utiliser comme sondes pour la détection de <i>hs</i> TYR	ones 92
I.Détection de la tyrosinase	92
II.Évaluation préliminaire des propriétés fluorescentes des molécules actives	97
1. Les Aurones	99
2. Les Indanones	100
3. Les Hémithioindigos/Hémiindigos	101
4. Conclusion	102

4. Perspective : Vers la synthèse de photoswitches	103
I.Caractéristiques photophysiques des HTIs/HIs	104
II.Synthèse de nouveaux photoswitches	107
CHAPITRE III : Stratégie de synthèse	111
I.Généralités sur la synthèse des hémiindigoïdes	114
1. Les Aurones	114
2. Les Arylindan-1,3-diones	120
3. Les Phtalimides (Isoindoline-1,3-dione)	121
4. Les Hémiindigos (HIs)	122
5. Les Hémithioindigos (HTIs)	124
6. Les Indazoles	127
II.Synthèses réalisées	
1. Modulations du cycle A	129
2. Modulations du cycle C	138
3. Modulation du cycle B	164
CHAPITRE IV : Projet Helicobacter pylori	169
I.Des antibiotiques à la résistance des bactéries	171
II.Dérivés d'aurones comme agents antibactériens	172
III.Conception d'aurones contre <i>H. pylori</i>	175
1. Pathogénèse d'Helicobacter pylori	175
2. Relation Structure-Activité	176
3. Discussion	
	10

IV.Conclusion	
CHAPITRE V : Conclusion générale	
I.Projet tyrosinase (<i>hs</i> TYR)	
II.Projet <i>H. pylori</i>	
CHAPITRE VI : Partie expérimentale	
CHAPITRE VII : Annexe	256
CHAPITRE VIII : Bibliographie	261
I.Production scientifique	
II.Notes et références	

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1</i> : Représentation des différentes couches de la peau ainsi que des substituants qui
la constitue31
<u>Figure 2</u> : Fonctionnement du mélanocyte – transport des mélanosomes à travers les
dendrites
<i>Figure 3 : Options thérapeutiques pour les patients atteints de mélanome présentant une</i>
mutation ou non sur le gène BRAF
<u>Figure 4</u> : Modèle d'homologie de hsTYR ⁸⁴ (à gauche), structure cristalline de abPPO3 ⁸⁵ (à
droite)
<u>Figure 5</u> : Modèle d'homologie de hsTYR ⁸⁴ (à gauche) et la structure cristalline de
hsTYRP1 ⁸⁶ (à droite) 54
<u>Figure 6</u> : Courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk de hsTYR avec le L-DOPA
comme substrat et 82 comme inhibiteur. Concentrations en L-DOPA : 65-1375 μ M.
Concentration de 82 (μ M) : (a •) 0, (b ∇) 0.5, (c •) 2 et (d \Box). Toutes les mesures ont été
réalisées en triplicats92

TABLE DES SCHÉMAS

<u>Schéma 1</u> : Biosynthèse de l'eumélanine et de phéomélanine ^{16,17}	32
<u>Schéma 2</u> : Biosynthèse hypothétique de la neuromélanine ^{78–80}	34
<u>Schéma 3</u> : Shéma catalytique de la tyrosinase – activités mono- et diphénolase	55
<u>Schéma 4</u> : Structures et valeurs d'inhibition du Thiamidol 1 et du Rucinol 2 (testés hsTYR isolée)	s <i>sur</i> 57
<u>Schéma 5</u> : Structures et activités des inhibiteurs de hsTYR identifiés sur lysats cellulo de différentes lignées et sur hsTYR isolée (pointillés rouges) ⁹⁸	<i>ires</i> 60
<u>Schéma 6</u> : Exemples de mode de liaison du motif 2,4-résorcinol et d'autres motifs analo d'état de transition non oxydable	gues 62
<u>Schéma 7</u> : Inhibiteurs de hsTYR contenant le motif 2,4-résorcinol, testés sur lysat cellu exprimant hsTYR et sur hsTYR isolée (pointillés rouges)	<i>laire</i> 63
<u>Schéma 8</u> : Flavonoïdes naturels testés sur lysat cellulaire exprimant hsTYR	64
<u>Schéma 9</u> : Aurones géranyles : Altisilin H , I et J	65
<u>Schéma 10</u> : Aurones 50-52 testées sur enzyme purifiée, lysats de mélanome et cel entières	<i>lules</i> 71
<u>Schéma 11</u> : Aurone 50 (Z)-1-hydroxy-5-((6-hydroxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylid methyl)-pyridin-2-one en interaction avec les résidus éloignés du site actif et le cent cuivre	'ene) tre à 72
Schéma 12 : Squelette d'une aurone avec modifications du cycle A & B	73
Schéma 13 : Structure des composés 53-64 (Modification du cycle A)	75
Schéma 14 : Structure des composés 65-68 (Modifications du cycle A)	76
Schéma 15 : Structure des composés 69-71 (Modifications du cycle A)	77
<u>Schéma 16</u> : Structure des composés 72-80 (Modifications du cycle C)	78
<u>Schéma 17</u> : Structure des composés 81-88 (Modifications du cycle A & C)	81 13

<u>Schéma 18</u> : Structure des composés 89-90 (Modifications du cycle C)
<u>Schéma 19</u> : Structure des composés 91-93 (Modifications du cycle C)
<u>Schéma 20</u> : Structure des futurs composés 94 & 95 84
<u>Schéma 21</u> : Structure des composés 96 & 97 (Modifications du cycle B)
<u>Schéma 22</u> : Modélisation moléculaire du fluorobenzyle stabilisé par π -stacking avec l'histidine 208 dans le site actif de abTY ¹³⁹ 86
<u>Schéma 23</u> : Structure des composés 98-110 (Modification du cycle A & B)
<u>Schéma 24</u> : Structure des composés 59-66 (Modification du cycle A, B & C)
<u>Schéma 25</u> : Résumé de l'étude RSA91
<u>Schéma 26</u> : Fonctionnement des sondes fluorescentes : turn-on, turn-off, ratiométrique 92
<u>Schéma 27</u> : Mécanisme par clivage (à gauche). Mécanisme par interruption de PET (à droite)
<u>Schéma 28</u> : Transfert de charge par effet push-pull95
<u>Schéma 29</u> : Design de sondes sensibles à un environnement précis95
<u>Schéma 30</u> : Aurone 54, excitée à 423 nm dans un tampon Tris à pH 7.5, sans abTY (en bleu), avec abTY à 15 μM (rouge)96
<u>Schéma 31</u> : Design de sonde avec des groupements électroattracteurs en position 4, amplifiant l'effet push-pull
<u>Schéma 32</u> : Structure des composés testés en fluorescence (Modifications du cycle A & C) 98
<u>Schéma 33</u> : Types de photoswitches utilisés en biochimie ¹⁶⁸ 104
<u>Schéma 34</u> : Isomérisation Z/E de la partie stilbène des HTIs et HIs sous irradiation106
<u>Schéma 35</u> : Exemple de stabilisation de l'isomère E après isomérisation d'un PHTI (Pyrrole Hémithioindigo)107
<u>Schéma 36</u> : Exemple d'isomérisation par irradiation $E \rightarrow Z$, avec une configuration E supposée inactive stabilisée par liaison hydrogène vers une configuration Z supposée active

<u>Schéma 37</u> : Possibles modifications permettant d'optimiser les longueurs d'onde d'excitation des HI/HTI
<u>Schéma 38</u> : Méthodes de cyclisation oxydante de 2'-hydroxychalcone115
<u>Schéma 39</u> : Cyclisation intramoléculaire de type 6-endo-dig ou 5-exo-dig116
<u>Schéma 40</u> : Méthode de cyclisation via la formation d'une ynone cyclisée par des dérivés de sels d'or117
<u>Schéma 41</u> : Méthode de cyclisation one-pot en présence d'un catalyseur au Palladium.117
<u>Schéma 42</u> : Méthodes de synthèse des aurones via condensation aldolique119
<u>Schéma 43</u> : Méthode de synthèse d'aurones (bleu) ou de flavones (vert) via couplage de Suzuki-Miyaura
<u>Schéma 44</u> : Synthèse du dérivé 121 à partir de phtalate de diéthyle121
<u>Schéma 45</u> : Synthèse d'isoindoline-1,3-dione à partir d'anhydride phtalique en milieu acide ou d'un phtalimide en mileu basique121
<u>Schéma 46</u> : Synthèse de l'indigotine à partir du 2-nitrobenzaldéhyde122
<u>Schéma 47</u> : Mécanisme de la synthèse de l'indigotine122
<u>Schéma 48</u> : Synthèse d'un hémiindigo à partir d'une acétate indolin-3-yle/indolin-3-one
<u>Schéma 49</u> : Synthèse de l'hémiindigo (Z)-2-benzylidène-4,6-diméthoxyindolin-3-one à partir de la 3,5-diméthoxyaniline123
<u>Schéma 50</u> : Voies de synthèse A-C des hémithioindigos125
<u>Schéma 51</u> : Voie de synthèse D des hémithioindigos126
<u>Schéma 52</u> : Voies de synthèse E et F des hémithioindigos126
<u>Schéma 53</u> : Cyclisation de l'acide O-hydrazinocinnamique par chauffage pour obtenir le 1H-indazole ou l'2H-indazole127
<u>Schéma 54</u> : Cyclisation de l'acide o-hydrazino benzoïque par chauffage pour obtenir le 1H- indazole
<u>Schéma 55</u> : Mécanisme de Davis-Beirut proposé128

Schéma 56: Synthèse de benzofuran-3(2H)-one nitrée via 3 voies G/H/I - a) Acide chloroacétique, KOH, H ₂ O - b) 1.Chloroacétate d'éthyle, K ₂ CO ₃ , DMF. 2.LiOH, MeOH/THF/H ₂ O. c) 1. SOCl ₂ , CH ₂ Cl ₂ anhydre. 2. AlCl ₃ , DCM. d) Anhydride acétique, NaOH, AcOEt, 80 °C. e) AlCl ₃ , DCM, 40 °C
<u>Schéma 57</u> : Synthèse des dérivés 135 et 139 via cyclisation oxydante131
<u>Schéma 58</u> : Synthèse du dérivé 66 via cyclisation oxydante133
<u>Schéma 59</u> : Synthèse du dérivé 65 via cyclisation oxydante134
<u>Schéma 60</u> : Synthèse des dérivés 67 et 68 à partir des synthons clés 150 et 151135
<u>Schéma 61</u> : Mécanisme proposé pour la formation des intermédiaires aminés 148 et 149
<u>Schéma 62</u> : Synthèse complète du dérivé 71 à partir du synthon 157, obtenu via acylation de Friedel-Crafts
<u>Schéma 63</u> : Synthèse du dérivé 161 par condensation aldolique en milieu basique suivie d'une déprotection par BBr ₃ 139
<u>Schéma 64</u> : Synthèse du dérivé 163 par condensation aldolique en milieu basique suivie d'une déprotection par BBr ₃
<u>Schéma 65</u> : Synthèse des dérivés 82, 115-118 par condensation aldolique en milieu acide SOCl ₂ /MeOH
<u>Schéma 66</u> : Synthèse 2-(2,4-dihydroxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione 74 à partir dy synthon 1H-indene-1,3(2H)-dione en milieu basique141
<u>Schéma 67</u> : Synthèse de l'isoindoline-1,3-dione 75 à partir d'un anhydride phtalique dans l'acide acétique142
<u>Schéma 68</u> : Synthèse de l'hémiindigo (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)indolin-3-one 77 à partir de la 1-acétylindolin-3-one en milieu basique143
<u>Schéma 69</u> : Synthèse de la 1-acétyl-6-méthoxyindolin-3-one 169 à partir de la 3- méthoxyaniline
<u>Schéma 70</u> : Synthèse du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-6-hydroxyindolin-3-one 84 à partir de la 1-acétyl-6-méthoxyindolin-3-one en milieu basique144
<u>Schéma 71</u> : Fonctionnalisation des azotes du dérivé 55145

<u>Schéma 72</u> : Stratégie de synthèse des chalcones nitrés14	5
<u>Schéma 73</u> : Précurseurs 172-176 des chalcones nitrés14	6
<u>Schéma 74</u> : Synthèse du synthon 179 à partir du 3-nitrophénol14	7
<u>Schéma 75</u> : Tentative d'oxydation de l'alcool secondaire des dérivés 71 et 73 14	7
<u>Schéma 76</u> : Synthèse du précurseur 183 à partir du dimère 182 14	8
Schéma 77 : Synthèse du précurseur 187 par réaction palladocatalysée15	0
<u>Schéma 78</u> : Méthylation du dérivé 176 15	1
Schéma 79 : Synthèse des 2'-nitrochalcones 189-19215	1
Schéma 80 : Cyclisation des 2'-nitrochalcones nitrées 193-196	2
<u>Schéma 81</u> : Mécanisme de cyclisation des 2'-nitrochalcones15	3
<u>Schéma 82</u> : Synthèse du dérivé 197 à partir du 3-méthoxythiophénol154	4
<u>Schéma 83</u> : Synthèse du dérivé 200 à partir de l'acide 2,2'-disulfanediyldibenzoïque15	5
<u>Schéma 84</u> : Déprotection des dérivés 193 , 195 , 196-197 et 200 15	5
<u>Schéma 85</u> : Synthèse de l'indazolone 76 à partir du mécanisme de Davis-Beirut150	6
<u>Schéma 86</u> : Réduction de la cétone intracyclique du dérivé15	7
<u>Schéma 87</u> : Équation de formation de l'alane AlH ₃ 158	8
<u>Schéma 88</u> : Formation de la cétone 212 par deux voies différentes : réduction d'un acid carboxylique 213 ou déprotection par monodéméthylation du dérivé 214 159	е 9
<u>Schéma 89</u> : Mécanisme de réduction de l'acide carboxylique 213 en présence de 3éq d MeLi15	'e 9
<u>Schéma 90</u> : Mécanisme de synthèse du dérivé 208 en présence de DBU16	0
<u>Schéma 91</u> : Modifications envisagées du dérivé 208 16	1
Schéma 92 : Équation de formation de l'acide azothydrique162	2
<u>Schéma 93</u> : Formation du dérivé 224 par réaction de Schmidt162	2

<u>Schéma 94</u> : Mécanisme de la réaction de Schmidt	
<u>Schéma 95</u> : Mécanime de formation de l'intermédiaire 222	
<u>Schéma 96</u> : Réaction de formation de l'intermediaire 222	
Schéma 97 : Déprotection des dérivés 206, 208 et 222	
<u>Schéma 98</u> : Synthèse des dérivés 98-110 sous ultrasons	
<u>Schéma 99</u> : Synthèse des dérivés 101 et 104 en présence d'acide acétique	
<u>Schéma 100</u> : Synthèse des dérivés 127 et 128 en milieu basique	
Schéma 101 : Fonctionnalisation de la quinoléine 227	
<u>Schéma 102</u> : Composés naturels de type aurone avec une activité antibactérien	1e173
<u>Schéma 103</u> : SAR des dérivés dirigés contre H. pylori	
<u>Schéma 104</u> : Conditions de couplage des dérivés d'aurones en fonction d d'hydroxyle	u nombre 178
<u>Schéma 105</u> : Ligne directrice – étapes clés du projet	
<u>Schéma 106</u> : Inhibiteurs testés sous la forme d'un mélange R/S ou Z/E	
<u>Schéma 107</u> : Benzofuranes synthétisés	
<u>Schéma 108</u> : Réduction de la cétone des composés 92 et 93	
<u>Schéma 109</u> : Inhibiteurs testés sur enzyme isolée (hsTYR)	
<u>Schéma 110</u> : Composé à développer comme analogue de 77	

TABLE DES GRAPHIQUES

<u>Graphique 1</u> : IC50 des composés 53-64 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1
<u>Graphique 2</u> : IC50 des composés 65-68 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1 76
<u>Graphique 3</u> : IC50 des composés 69-71 déterminés sur lysats cellulaires MNT-177
<u>Graphique 4</u> : IC ₅₀ des composés 72-80 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1 79
<u>Graphique 5</u> : IC50 des composés 81-88 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1 81
<u>Graphique 6</u> : IC50 des composés 91-93 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1 84
<u>Graphique 7</u> : IC ₅₀ des composés 96 & 97 déterminés sur lysats cellulaires MNT-185
<u>Graphique 8</u> : IC50 des composés 98-110 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1 87
<u>Graphique 9</u> : IC50 des composés 111-118 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1 88
<u>Graphique 10</u> : Effet de la polarité sur l'intensité de la fluorescence
<u>Graphique 11</u> : Mesure des λ_{max} des composés 53-119 dans 4 solvants différents 99
<u>Graphique 12</u> : Mesure des λ_{max} des composés 72-83 dans 4 solvants différents 101
<u>Graphique 13</u> : Mesure des λ_{max} des composés 80, 84 et 86 dans quatre solvants différents
<u>Graphique 14</u> : Valeurs des MIC des dérivés 245-254179
<u>Graphique 15</u> : Différences d'absorbance des composés dans le dichlorométhane et le
<i>Lumpon</i> 1ris

<u>Graphique 10</u>	2 : Différences	d'absorbance	des	composés	dans	le	dichlorométhane	et le
tampon Tris								259
<u>Graphique 12</u>	: Différences	d'absorbance	des	composés	dans	le	dichlorométhane	et le
tampon Tris								259

TABLE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Valeurs d'IC ₅₀ de quatre inhibiteurs de abTYR ^{82,92} vs hsTYR ^{82,92} 51
<u>Tableau 2</u> : Différentes sources de lignée cellulaire exprimant hsTYR ⁹⁹ 53
<u>Tableau 3</u> : Comparaison des taux d'amélioration/d'aggravation de préparations à base de
thiamidol (0,2% en concentration) et d'hydroquinone (2% en concentration) ¹¹¹ 58
<u>Tableau</u> 4 : Première série de composés actifs (0,1mM) testés contre hsTYR sur des
mélanocytes humains
<u>Tableau 5</u> : Comportement d'aurones polyhydroxylées testées sur deux tyrosinases de
champignons (abTYR et paTYR) et une tyrosinase de bactérie (saTYR). N : Non-actif, A :
Activateur, I : Inhibiteur, S : Subtrat. Les pointillés rouges représentent la capacité générale
d'inhibition du motif résorcinol 67
<u>Tableau 6</u> : Valeur des IC ₅₀ et des K _i des dérivés 50-52 testées sur abTY/hsTY isolées et sur
lysat/cellule MNT-172
Iysat/cellule MNT-1 72 Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur
Iysat/cellule MNT-1 72 <u>Tableau 7</u> : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR. 89
Iysat/cellule MNT-1 72 Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR 89 Tableau 8 : Résistance de certains germes aux antibiotiques ces 80 dernières années 171
Tysat/cellule MNT-1 72 Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR 89 Tableau 8 : Résistance de certains germes aux antibiotiques ces 80 dernières années 171 Tableau 9 : Criblage de plusieurs aurones dont 1-3 sur différents micro-organismes
Tysat/cellule MNT-1 72 Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR 89 Tableau 8 : Résistance de certains germes aux antibiotiques ces 80 dernières années 171 Tableau 9 : Criblage de plusieurs aurones dont 1-3 sur différents micro-organismes 174 Tableau 10 : Valeurs de MIC de différentes aurones contre H. pylori 176
Tysat/cellule MNT-1 72 Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR 89 Tableau 8 : Résistance de certains germes aux antibiotiques ces 80 dernières années 171 Tableau 9 : Criblage de plusieurs aurones dont 1-3 sur différents micro-organismes 174 Tableau 10 : Valeurs de MIC de différentes aurones contre H. pylori 176 Tableau 11 : Comparaison des inhibiteurs 9 et 29 avec le thiamidol, l'aurone-HOPNO et un 176
Iysat/cellule MNT-1 72 Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR 89 Tableau 8 : Résistance de certains germes aux antibiotiques ces 80 dernières années 171 Tableau 9 : Criblage de plusieurs aurones dont 1-3 sur différents micro-organismes 174 Tableau 10 : Valeurs de MIC de différentes aurones contre H. pylori 176 Tableau 11 : Comparaison des inhibiteurs 9 et 29 avec le thiamidol, l'aurone-HOPNO et un inhibiteur de référence l'acide kojique 185
Iysat/cellule MNT-172Tableau 7 : Analyse cinétique des dérivés 9 et 29 – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR89Tableau 8 : Résistance de certains germes aux antibiotiques ces 80 dernières années171Tableau 9 : Criblage de plusieurs aurones dont 1-3 sur différents micro-organismes174Tableau 10 : Valeurs de MIC de différentes aurones contre H. pylori176Tableau 11 : Comparaison des inhibiteurs 9 et 29 avec le thiamidol, l'aurone-HOPNO et un inhibiteur de référence l'acide kojique185Tableau 12 : Différence des λ_{abs} et λ_{em} dans les différents solvants (en jaune les déplacements

CHAPITRE I : Introduction

I. D'Hippocrate à la pharmacologie moderne

La pharmacologie a vu le jour durant l'Antiquité, développée par Hippocrate de Cos, fondateur de la première école de médecine, et qui a révolutionné la médecine de la Grèce Antique. Il fût le premier à dissocier la médecine d'autres disciplines comme la philosophie ou les croyances religieuses. En effet, dans son livre *Sur la maladie sacrée*, Hippocrate inaugure la conception des quatre éléments : l'eau, l'air, le feu et la terre. Par principe de symétrie, Polibe (son gendre) inaugure dans la *Nature de l'homme* la théorie des quatre humeurs cardinales¹ : sang, phlegme, bile jaune, bile noir. De cette théorie découle l'hypothèse selon laquelle une maladie n'est pas un châtiment mais plutôt le résultat de facteurs environnementaux, liés aux modes de vies. La théorie humorale réunit la santé de l'âme tout comme celle du corps dans l'équilibre des humeurs. Les humeurs sont associées aux quatre éléments qui sont eux-mêmes caractérisés par leurs propres qualités.

On retrouve dans les écrits d'Hippocrate les premières observations du concept de relation dose/effets² qui n'apparaissent qu'au-delà d'un certain seuil. Il faudra attendre plus d'un millénaire au XVI^e siècle, pour que ce concept² soit repris par le médecin alchimiste suisse Paracelse, aujourd'hui considéré comme le père de la toxicologie³. Ce dernier comprit qu'il était possible d'extraire⁴ et de concentrer des principes actifs d'origines végétales dans le but de les rendre plus efficaces/toxiques, ce qui donna naissance à la relation entre substances chimiques et effets biologiques. Ces concepts sont restés au centre du principe de la toxicologie jusqu'à nos jours. De plus, ils nous ont permis d'établir une toxicologie réglementaire, pour définir une marge de sécurité pour tous les médicaments connus.

Ces connaissances entre l'action médicamenteuse et l'action toxique que les Grecs désignaient déjà par *pharmacon*⁵ dans les temps anciens ce sont accrues avec la découverte de multiples effets secondaires indésirables, qui a contribué au développement de la pharmacologie moderne. Ce concept regroupe le développement scientifique de plusieurs disciplines : la chimie, la biologie et la physiopathologie qui s'articulent pour une meilleure compréhension des effets d'un médicament.

II. La Pharmacologie clinique

La pharmacologie⁶ est le résultat de l'étude de l'interaction d'un médicament avec un organisme, permettant de mieux comprendre leurs mécanismes et modes d'action ainsi que leur devenir dans l'organisme. Cette discipline scientifique telle que nous la connaissons aujourd'hui n'est possible qu'à partir du XVIII^e siècle, lorsque les médicaments peuvent être purifiés⁷. C'est lors de cette période que les bases de la chimie analytique sont introduites. Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, un pharmacien allemand considéré comme l'un des pères fondateurs de la pharmacologie, isole le premier alcaloïde cristallisé à partir d'extrait d'opium en 1805². C'est par les effets observés après expérimentation sur son chien que Friedrich découvre les effets hypnotiques de cet alcaloïde que l'on utilise encore aujourd'hui, appelé morphium ou morphine pour ses effets qui rappellent le dieu des songes de la Grèce antique, Morphée. C'est après, durant la première moitié du XIX^e siècle, que la pharmacologie connaît son plus grand tournant, notamment à travers les travaux de François Magendie (1809) sur l'utilisation de strychnine extrait de Strychnos nux-vomica, connu pour être un stimulant du système nerveux central, qui lui permettra de démontrer que la moelle épinière est le siège de la transmission d'informations nerveuses. Des dizaines d'années plus tard, Claude Bernard (1842) découvre que le curare agit sur les jonctions neuromusculaires, entraînant une paralysie ainsi qu'une baisse du tonus musculaire. Ce n'est qu'en 1847 que la première chaire universitaire de pharmacologie est créée à l'université de Dorpat en Estonie. Cette initiative est suivie en 1890 par les Etats-Unis, et permettra 30 ans plus tard, en 1926^{7,8}, la première préparation d'insuline cristalline par Banting et Best, purifiée par le biochimiste J. B. Collip. L'insuline est testée pour la première fois en 1922 sur Léonard Thompson, un adolescent de 14 ans et est commercialisée la même année. L'accélération du développement de la pharmacologie clinique a eu lieu durant les années 50 et 60, où de nouveaux médicaments ont vu le jour. Cette explosion a nécessité une compréhension plus approfondie de l'action de la drogue, de l'efficacité thérapeutique et de la sécurité chez l'homme⁹. Les enjeux liés aux médicaments sont à la fois scientifiques, économiques et de santé publique. Le développement et la mise sur le marché de nouveaux principes actifs a ainsi mené à l'élaboration d'un cahier des charges strict qui intègre l'étude des mécanismes d'actions et des effets du médicaments sur l'organisme. Cette enquête est basée sur des preuves scientifiques axées autour de plusieurs points de contrôle de la pharmacologie moderne répartis dans 4 phases distinctes. Les essais de **phase 1** concernent l'administration d'un médicament avec l'objectif de déterminer la tolérance et la dose du médicament. Cette dose est confirmée durant la **phase 2** qui constitue l'étude préliminaire de l'activité clinique du médicament ; sa durée va dépendre du type de médicament et de la pathologie sélectionnée mais également du nombre de malades. Enfin la **phase 3** (qui dure environ 4 ans) mène à des essais comparatifs avec d'autres traitements qui vont être effectués pour déterminer l'efficacité des nouveaux composés. La **phase 4** se déroule après l'autorisation de mise sur le marché, où les médicaments vont faire l'objet d'un suivi strict de pharmacovigilance à long terme.

La finalité d'une étude pharmacologique est d'utiliser un médicament dans le but d'obtenir un bénéfice/risque favorable pour le malade, de déterminer la bonne dose/posologie à administrer pendant la bonne durée du traitement pour maximiser les effets thérapeutiques et minimiser les effets indésirables. Le développement et l'étude des effets d'un médicament chez l'homme demandent la connaissance spécifique d'une cible (récepteur membranaire, canal, enzyme, transporteur). Par conséquent, il est nécessaire d'étudier les processus responsables du déclenchement/développement d'une maladie donnée, en étudiant dans leur ensemble les parties du corps concernées.

III. Pharmacologie de la peau

La peau est composée de trois couches : la couche supérieure appelée épiderme, le derme, sous l'épiderme (plus épais), qui abrite les vaisseaux sanguins/lymphatiques, les glandes sudoripares et les fibres nerveuses et enfin l'hypoderme, composé de tissus adipeux. En tant qu'organe le plus extérieur du corps, la peau est dotée de multiples fonctions telles que la protection, la sécrétion, l'absorption et la thermorégulation. Ces fonctions sont essentielles tout au long de la vie. D'un individu à l'autre la diversité de la peau est marquée par les différences de couleur, qui constituent le trait phénotypique le plus visible chez l'homme résultant d'une variabilité de la pigmentation constitutive. La base génétique et l'évolution de ce trait polygénique n'ont pas encore été complétement élucidés. Les preuves actuelles suggèrent que la variation observée de ce caractère au sein des populations et entre elles a été façonnée par la sélection naturelle¹⁰.

La production de pigments de mélanines épidermiques produits par les mélanocytes est responsable la couleur de la peau¹¹. Parfois des lésions mélanocytaires peuvent se produire à la suite de dommages dans l'ADN. Ces dommages constituent une menace sérieuse et peuvent favoriser le développement de cancers. Les lésions mélanocytaires peuvent expliquer le risque plus élevé d'une peau plus claire de développer un cancer de la peau pour les raisons évoquées plus haut¹¹.

Le cancer de la peau regroupe le mélanome et les cancers non mélaniques (NMSC). L'incidence estimée du mélanome diagnostiqué en 2016 est à la hausse et représente 4,5% de tous les nouveaux cas de cancer avec une augmentation de 0,6% chez les plus de 50 ans. L'incidence du mélanome peut être encore plus élevée que celle indiquée, car certains pays ont signalé une sous-estimation de son incidence. D'autre part, les NMSC représentent une incidence 18 à 20 fois plus élevée que le mélanome chez les populations de type Caucasienne. Ces cancers regroupent, par exemple, la maladie de Bowen, le carcinome basocellulaire ou le carcinome épidermoïde. Ce type de cancer, bien que faiblement mortel, reste très couteux : en effet les cancers non mélaniques provoquent des dépenses annuelles allant jusqu'à 511 millions de dollars en Australie (2010) ou 650 millions de dollars aux Etats-Unis (2001)¹⁰.

L'augmentation des cancers de la peau est associée à plusieurs facteurs, mais dépend fortement d'une exposition prolongée aux rayons UVs. Certaines études suggèrent aussi l'implication d'un genre particulier de papillomavirus (HPV) dans la pathogénèse du NMSC appelé β-HPV dont l'association avec le NMSC a été génétiquement déterminée chez certains patients, mais son rôle reste jusqu'ici peu étudié¹⁰.

IV. Processus biologique de la mélanogénèse

1. La mélanogénèse

L'épiderme est constitué de kératinocytes et de mélanocytes en plus faible quantité (*Figure 1*). Ces cellules sont le lieu de formation de pigments appelés mélanines, qui définissent la couleur de la peau, des cheveux et des yeux, parmi d'autres pigments comme l'hémoglobine et les caroténoïdes. La mélanine représente le pigment prédominant : elle procure à la peau non seulement sa couleur mais également une photoprotection contre les rayonnements ionisants puisqu'elle est présente sur toute la surface du corps. La mélanine est aussi impliquée dans le développement du système nerveux optique et régule la fonction rétinienne. Sa concentration et sa couleur vont dépendre du type de mélanine présent dans la peau. Il existe deux types de mélanines cutanées qui se présentent sous forme de biopolymères, l'eumélanine brune et noire et la phéomélanine jaune et rouge. La synthèse de mélanine dans les mélanocytes épidermiques, oculaires et dans les épithéliums pigmentaires de la rétine se produit dans des mélanosomes selon un processus nommé mélanogenèse¹².



Figure 1 : Représentation des différentes couches de la peau ainsi que des organites qui la constituent

Les mélanosomes murissent à l'intérieur des mélanocytes qui sont des cellules de grande taille situées dans la couche basale de l'épiderme ou dans la partie inférieure des follicules

CHAPITRE I : Introduction

pileux. La maturation des mélanosomes se déroule à travers quatre stades morphologiquement distincts. Les deux premières étapes constituent les étapes majeures^{12,13} de formation des prémélanosomes de stade I et II, permettant d'obtenir des organites immatures non pigmentés. Ces premiers stades sont caractérisés par la formation des fibrilles protéiniques intraluminales achevée dans les prémélanosomes ellipsoïdaux de stade II. La formation de mélanine commence lorsque les stries fibreuses sont complètement formées au stade II et permettent à la mélanine de bourgeonner en se déposant le long des fibrilles. Le bourgeonnement entraine un épaississement et le noircissement des fibrilles qui viennent terminer le stade III et IV lorsque toute la structure interne des mélanosomes est masquée. Les mélanosomes de stade IV sont ensuite transloqués le long des microtubules grâce à des protéines, vers les pointes dendritiques riches en filaments d'actine puis adressés aux kératinocytes voisins des couches supérieures de l'épiderme. Cette association entre les mélanocytes et les kératinocytes constitue « une unité épidermique de mélanisation¹³ » (*Figure 2*). Les mélanosomes ont d'abord été imaginés comme étant issus du réticulum endoplasmique, or plusieurs travaux prouvent que leur origine est en réalité endosomale^{13,14}. Ils appartiennent à une classe d'organites associée aux lysosomes (LRO pour lysosome related organelles), avec qui ils partagent certaines caractéristiques comme les protéines lysosomales, leur pH acide et leur accessibilité par la voie d'endocytose. Les lysosomes et les mélanosomes remplissent des fonctions distinctes mais proviennent tous les deux de l'appareil de Golgi. La différenciation entre lysosome et prémélanosome de stade II est notamment due à des protéines transmembranaires appelée Pmell7¹³ qui permettent au prémélanosome d'adopter une forme ellipsoïdale en ballon de rugby et ainsi de différencier les deux organites.



Figure 2 : Fonctionnement du mélanocyte - transport des mélanosomes à travers les dendrites

La maturation des prémélanosomes de stades II et III est assurée par trois enzymes principales de la mélanogénèse qui ont été identifiées : la tyrosinase, et les tyrosinases related proteins 1 et 2 (hsTYRP1 & hsTYRP2). Ces enzymes sont produites par l'appareil de Golgi puis adressées aux prémélanosomes par des intermédiaires endosomaux en cours de maturation¹³. La tyrosinase est l'enzyme limitante impliquée dans la mélanogenèse, c'est elle qui assure les premières étapes de la biosynthèse de la mélanine. Au cours de cette biosynthèse, les phéomélanines et les eumélanines sont synthétisées via deux voies biochimiques distinctes (Schéma 1). Si les produits de synthèse sont différents, les deux processus émanent du même substrat qu'est la L-tyrosine, oxydée en L-DOPA puis en DOPAquinone par la tyrosinase sous un contrôle génétique complexe. Les protéines apparentées *hs*TYRP1 et *hs*TYRP2 sont non seulement importantes dans cette biosynthèse mais semblent également être impliquées dans le maintien de la stabilité de la tyrosinase à la membrane mélanosomale¹⁵. D'autre part, ces trois enzymes sont impliquées dans des stades avancés de la synthèse de l'eumélanine. La formation de ce pigment est d'abord assurée par la cyclisation de la dopaquinone en leucoDOPAquinone qui est un intermédiaire de type indole, puis par une succession d'oxydations menant à d'autres dérivés de la même famille a lieu, suivie par des polymérisations formant les eumélanines^{15,16}. La phéomélanogenèse a quant à elle lieu en présence de substrats présentant des thiols comme c'est le cas pour les cystéines ou le glutathion ; elle est initiée par la condensation de la DOPAquinone avec une cystéine pour former la 5-ScystéinylDOPA. Ce dernier intermédiaire est ensuite oxydé par plusieurs étapes complexes qui peuvent impliquer des réactions dépendantes de la tyrosinase ou nonenzymatiques pour former la phéomélanine¹⁵.



Schéma 1 : Biosynthèse de l'eumélanine et de phéomélanine^{16,17}

Certains intermédiaires de cette biosynthèse peuvent présenter un risque élevé pour l'organisme, en raison de la formation de quinones réactives qui sont susceptibles d'interférer avec des protéines et des acides nucléiques cellulaires. La séparation naturelle de ces espèces réactives par la compartimentation dans les mélanosomes constitue alors un élément de sécurité essentiel, jusqu'à la libération de la mélanine dans l'épiderme^{18,19}. La mélanine est un pigment produit par les mélanocytes. Ce polymère qui définit précisément la couleur de notre peau et de nos cheveux possèdent d'autres propriétés^{20,21} protectrices. Son fort pouvoir absorbant confère à la peau une protection contre les rayonnements UV : en effet une exposition prolongée au soleil stimule la production de mélanine dans les mélanocytes. Cette surproduction se manifeste naturellement par notre bronzage dans les mélanocytes normaux qui excrètent les pigments jusqu'au kératinocytes dans l'épiderme. En outre, ce pigment possède des propriétés antioxydantes lui permettant de neutraliser les dérivés réactifs de l'oxygène.

2. La neuromélanine

Un autre type de mélanine existe, et fait l'objet de nombreuses recherches depuis 1930. Elle est présente uniquement dans le cerveau humain, dans la substance noire de Sömmering, qui doit sa couleur au pigment qui compose son noyau, appelé neuromélanine (NM). Elle est également présente dans les neurones noradrénergiques du locus coeruleus qui est un noyau sous cortical du cerveau situé au niveau du tronc cérébral. Contrairement à la mélanine cutanée, celle-ci ne provient pas de l'activité des mélanocytes. Cependant, elle partage des propriétés semblables, comme sa production à partir de la L-tyrosine et sa structure macroscopique sous forme de granules pigmentés noirs et bruns insolubles. Elle est aussi présente dans des espèces phylogénétiquement proches de l'homme, comme le chimpanzé, le gibbon, le babouin mais aussi chez des espèces plus éloignées, comme les chevaux et les moutons²². Le processus de biosynthèse de la NM est encore flou et fait à l'heure actuelle l'objet de controverses. Elle est composée d'eumélanines et de phéomélanines, mais aussi de certains lipides et peptides liés de manière covalente. Sa composition pourrait résulter de la formation de dopaminequinone par oxydation de la dopamine. Ce dérivé est alors transformé à travers deux voies distinctes : la formation de dopaminechrome mène à l'eumélanine (encadré rouge) ; alors que la réaction avec des résidus de type cystéine produit des benzothiazines, dont la polymérisation mène à la phéomélanine (encadré vert)²²⁻²⁴ (Schéma 2). Plusieurs observations ont été rapportées qui installent l'hypothèse d'un rôle de la tyrosinase humaine, comme la présence de petites quantités d'ARNm codant²⁵ pour cette enzyme dans le système nerveux. Mais par ailleurs l'absence de détection de l'activité enzymatique correspondante dans le cerveau humain jette le doute sur cette théorie. D'autres pistes incluant l'intervention de diverses enzymes comme des lipoxygénases, la monoamine oxydase, la prostaglandine H synthase ou la xanthine oxydase pourraient expliquer l'oxydation de dopamine en dopaminequinone. Mais l'intervention de telles enzymes n'a pas été clairement démontrée. En revanche, la possibilité d'une autooxydation des catéchols en quinone avec l'ajout ultérieur de thiol pourrait être envisagée puisqu'il a été déjà été montré que de telles réactions pouvaient avoir lieu dans le cerveau²⁶.



Schéma 2 : Biosynthèse hypothétique de la neuromélanine⁷⁸⁻⁸⁰

À travers sa composition chimique, la NM semble avoir un double rôle : une capacité protectrice apportée par ses propriétés anti-oxydantes, mais également une capacité de piégeage des espèces nocives pour le système nerveux tels que les métaux et certains intermédiaires comme les quinones réactives. Ces avantages permettraient aux neurones
catécholaminergiques d'évoluer dans un environnement « sain », puisqu'ils sont particulièrement exposés au stress oxydant ainsi qu'à de fortes concentrations en fer. D'autre part, l'accumulation de NM et de fortes concentrations de fer pourraient causer une production de ROS et RNS, provoquant une dégénération des neurones dopaminergiques. De plus, l'accumulation de NM conduirait à une libération de celle-ci dans le milieu extracellulaire à cause des neurones mourant, accompagnée d'une réponse inflammatoire guidée par les cellules microglies. Ces cellules vont phagocyter la NM et en réponse libérer des médiateurs neurotoxiques tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), de l'oxyde nitrique, l'interleukine 6 ainsi que le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces médiateurs vont ainsi favoriser la perte des neurones dopaminergiques, qui vont eux-mêmes libérer plus de NM, induisant à nouveau l'activation des cellules microglies et pourrait être liée à la pathogénèse de la maladie de Parkinson, qui semble être une des conséquences de ce processus complexe²⁷.

V. Désordres liés à la mélanogenèse

1. Maladie de Parkinson

La pathogénèse de la maladie de Parkinson (MP) semble être liée à deux caractéristiques importantes. D'une part, l'accumulation de neuromélanine dans la substance noire pars compacta (SNpc), source principale de NM dans le cerveau humain, est responsable des symptômes moteurs (mouvement musculaire) qui perturbent la signalisation nigrostriatiale. Ces symptômes moteurs représentent le point cardinal de la maladie de Parkinson. À l'inverse, les symptômes non moteurs pourraient eux résulter de perturbations d'autres voies de neurotransmetteurs tels que les cholinergiques, les sérotoninergiques ou les GABA-ergiques²⁸. De plus, la protéine α -synucléine, dont la fonction exacte reste encore inconnue,²⁸ est exprimée de manière anormale dans le cerveau et d'autres tissus des patients atteints de MP, et pourrait être neurotoxique. Cette protéine serait contenue en grande partie dans les corps de Lewy²⁹ (LB), des corps d'inclusion intracytoplasmiques dont les précurseurs, les corps pâles, seraient étroitement liés à la NM. Cette cohabitation expliquerait le piégeage de la protéine avec la NM dans les stades précoces de la maladie. La cytotoxicité de l' α -synucléine semble être impliquée dans plusieurs mécanismes différents, notamment dans le stockage et la libération de dopamine dans les terminaisons nerveuses ; elle favoriserait la formation de ROS par interaction directe ou indirecte. Certaines études ont montré que la présence de ROS favoriserait la production et l'agrégation d' α -synucléine menant à une relation entre l' α -synucléine et le stress oxydant²⁸ pouvant conduire à la perte de neurones dopaminergiques. Cette accumulation d' α -synucléine associée à la libération du contenu des lysosomes dans le cytoplasme pourrait également conduire dans des conditions pathologiques à réagir avec la tyrosinase, induisant des modifications de l' α -synucléine qui altèrent ses fonctions physiologiques. Ainsi, cela pourrait fortement compromettre le métabolisme de régulation du niveau de production, de stockage et de libération de dopamine dans le cytoplasme, conduisant à des dommages neuronaux²⁸.

Le cancer et la maladie de Parkinson sont considérés comme deux maladies fondamentalement distinctes. Cependant, de nombreux épidémiologistes ont rapporté une co-occurrence importante, avec un risque de développement de mélanome pouvant être multiplié par 2 à 6 chez les patients atteints de MP. Plusieurs protéines communes ont été identifiées chez les patients atteints de mélanome et de la maladie de Parkinson, tels que les protéines Parkin, LRRK2, DK-1. Plusieurs études ont rapporté que l'α-synucléine était fortement exprimée dans les lignées cellulaires de mélanome, suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse du mélanome mais aussi entrainer une augmentation de la MP chez les patients atteints, confirmant le lien étroit entre mélanome et la maladie de Parkinson³⁰.

2. Hyperpigmentation & utilisation cosmétique

Les hyperpigmentations se produisent largement dans la population mondiale, et sont souvent liés à une activation mélanocytaire caractérisée par une prolifération en grande quantité des mélanocytes. Cette surproduction mène à une augmentation considérable de mélanine biosynthétisée, conduisant à la formation de dyschromies régionales telles que le mélasma qui se manifeste sous la forme de lésions symétriques sur le visage, et qui est principalement observé chez les femmes disposant d'une peau foncée. Il provoque également une sensibilité au soleil puisque les rayons UV peuvent participer à son développement. L'hyperpigmentation post-inflammatoire est une réponse inflammatoire probablement due à une surexposition aux UV, et se manifestant par un évènement inflammatoire aigu que l'on connait sous le nom de « coup de soleil ». Le lentigo solaire, aussi appelé lentigines, correspond à des tâches de vieillesse, d'aspect sombre. Il est également dû à une surexposition aux UV et apparait en particulier sur les mains, le visage et les bras³¹. L'érythromélanome folliculaire faciei et colli, plus rare, caractérisé par des taches brunes rougeâtres bien délimitées dans des zones pré-auriculaires et maxillaires, fait partie des maladies dont l'étiologie est encore inconnue³², tout comme l'érythème dyschromique persistant, caractérisé par le développement de macule bleu gris, plus fréquent chez les personnes à la peau foncée. Enfin, il existe le naevus mélanocytaire, qui se manifeste à cause d'une prolifération mélanocytaire bénigne, pouvant parfois être confondu avec le mélanome malin, qui possède une structure symétrique³³.

Il existe également des troubles liés à la dépigmentation, tel que le vitiligo, caractérisé par la perte de mélanocytes fonctionnels. De nombreux mécanismes ont été proposés pour la destruction des mélanocytes incluant des facteurs génétiques, une réponse auto-immune, du stress oxydant, des médiateurs inflammatoires ou des mécanismes liés au détachement des mélanocytes.

De manière générale, ces troubles souvent bénins causent d'importants problèmes de santé et peuvent aller jusqu'à la défiguration en touchant notamment l'esthétique du visage. Par conséquent, ils affectent considérablement la qualité de vie des patients par un fort impact psychologique négatif³⁴, d'où l'urgence de développer de nouveaux traitements.

Au-delà de l'aspect thérapeutique du traitement des hyperpigmentations, le blanchiment de la peau est une pratique cosmétique courante dans certains groupes ethniques, en particulier en Asie, en Afrique et au Moyen-Orient. Un teint plus clair est souvent associé à la beauté et à la santé, tandis que les peaux foncées sont assimilées à des conditions de vies sociales inférieures. Plusieurs exemples soulignent ce contraste, notamment dans les cultures asiatiques, où avoir la peau blanche était considéré comme synonyme de vertu et de beauté. En effet, la première dynastie coréenne (2333–108 av. J.-C.) montre qu'ils étaient en quête d'une « peau comme le jade blanc » mais également au Japon et en Chine où les femmes se poudraient le visage ou avalaient des perles écrasées dans leur quête d'un teint blanc laiteux³⁵. Au fil du temps, le teint a pris une importance religieuse, psychologique, économique et politique avec le désir de produits éclaircissants, et donc depuis les années 1980, l'intérêt pour le blanchiment de la peau n'a cessé d'augmenter. Aujourd'hui, près de 30% de la population mondiale a déjà pratiqué au moins une fois dans sa vie le blanchiment de la peau. Le marché mondial associé à ces cosmétiques est estimé à 13,7 milliards de dollars d'ici 2025^{36,37}. Cette quête de « peau blanche » peut mener à des problèmes de santé, principalement dus à l'utilisation de doses trop importantes de composés toxiques.

Ces dernières décennies, un large panel d'agents blanchissants de la peau ont été mis sur le marché à des fins cosmétiques et dermatologiques. Parmi les plus utilisés, on trouve l'acide kojique, l'arbutine, l'acide azélaïque, l'acide ellagique, le resvératol et surtout l'hydroquinone (HQ). Ces composés sont connus pour manquer d'efficacité mais également pour les effets secondaires qu'ils provoquent à haute dose. L'utilisation d'hydroquinone a notamment été interdite depuis 2001. L'exposition à l'HQ provoquerait l'apparition de dermatite de contact irritante ou allergique, d'hyperpigmentation postinflammatoire et d'hypopigmentation. Un contact répété provoquerait l'apparition de complications plus préoccupantes comme l'ochronose, une décoloration des ongles, une mélanose conjonctivale et enfin une dégénérescence cornéenne. Il a également été rapporté en 2010 que l'HQ pouvait après transformation par un facteur extérieur (oxygène ou enzyme) mener à la production de 1,4-benzoquinones, dont la réaction avec le glutathion peut mener à des composés délivrant une toxicité médullaire, une immunotoxicité, une néphrotoxicité, et un risque de mutagénicité et de carcinogénèse^{38,39}. Des risques de carcinogénèses sont également attestés avec l'acide kojique, dont l'application a toutefois été approuvée avec une concentration maximale de 1% dans les préparations cosmétiques dans l'UE.

De même il existe d'autres molécules cliniquement approuvées sur le marché, telles que l'acide ascorbique, l'arbutine, l'acide lactique, l'acide glycolique, l'aloésine, l'acide salicylique, l'acide α -lipoïque ou le nicotinamide : elles visent également à stopper la 38

production de mélanine en ciblant la tyrosinase⁴⁰. D'autres stratégies moins développées existent, comme l'inhibition de la glycosylation de la tyrosinase, du transfert des mélanosomes ou l'usage d'agents antioxydants et anti-inflammatoires³¹.

3. Alcaptonurie : Ochronose et mélanogénèse

L'alcaptonurie (AKU; OMIM 203500) est une maladie autosomique-récessive monogénique rare dans la plupart des groupes ethniques (1 cas sur 250 000 à 1 000 000), mais dans certains pays comme la Slovaquie ou plus récemment la Jordanie et l'Inde, elle présente une prévalence accrue. L'AKU est caractérisée par des mutations du gène codant pour l'homogentisate 1,2-dioxygénase (HGD ; EC 1.13.11.5). Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme de la tyrosine : en effet, elle est normalement responsable de la conversion de l'acide homogentisique (HGA), un p-diphénol métabolisé par les hépatocytes qui contiennent l'enzyme HGD, ce qui permet après clivage du cycle benzénique, de former l'acide maleylacetoacétique. L'HGA est normalement excrétée naturellement à travers les urines en petite quantité (quelques milligrammes par jour). Dès lors qu'un patient est atteint d'alcaptonurie, l'HGA s'accumule, provoquant une acidurie homogénistique qui se manifeste par l'assombrissement de l'urine. Des patients jeunes parviennent à excréter de grosse quantités, limitant l'impact de la maladie ; mais avec l'âge les fonctions rénales se détériorent, ce qui provoque une accumulation de HGA dans les tissus et déclenche le processus d'ochronose qui consiste en une oxydation de HGA en acide benzoquinone acétique (BQA) suivi d'une polymérisation ultérieure pour former les pigments ochronotiques. Ces pigments sont responsables d'une coloration bleu foncé qui peut survenir dans la peau, les cartilages, les tendons, les ligaments, les yeux, les oreilles, le cœur, les os et le système artériel. L'état de santé d'un patient varie selon les cas et l'espérance de vie est rarement diminuée, mais la qualité de vie est en revanche sévèrement affectée, principalement en raison de la destruction douloureuse des articulations qui nécessite souvent une intervention chirurgicale^{41,42}. Ce processus de pigmentation est remarquablement similaire à la mélanogénèse catalysée par hsTYR. Il ne serait pas exclu que hsTYR soit impliquée étant donnée son action non spécifique, susceptible de toucher une large variété de phénols et de catéchols. En effet GarciaCanovas & *al.*⁴³ suggèrent que les TYR sont susceptibles d'oxyder des substrats *p*diphénols comme l'hydroquinone (HQ) qui pourrait être un substrat dans certaines conditions et non un inhibiteur. Jusqu'à présent aucun traitement spécifique n'existe pour ce trouble. Néanmoins il a été montré que la nitisinone, un puissant inhibiteur de la 4hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (EC 1.13.11.27), l'enzyme qui produit HGA, pouvait stopper l'ochronose et diminuer le taux de progression de AKU. Bien que l'utilisation de nitisinone diminue les effets de l'AKU, le principal effet indésirable qui en résulte est la tyrosinémie provoquant des troubles de la vision. Si l'implication de *hs*TYR est confirmée dans le mécanisme d'ochronose dans un futur proche, cela permettrait d'élargir les options thérapeutiques pour mieux traiter la maladie ou ses symptômes.

VI. Mélanome et résistances

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde⁴⁴. Il a causé en 2020 10 millions de morts, les plus meurtriers étant le cancer du poumon avec 1,80 millions décès, le cancer colorectal avec 935 000 décès, le cancer du foie avec 830 000 décès, le cancer de l'estomac avec 769 000 décès et enfin le cancer du sein avec 685 000 décès.

Le cancer peut être décrit comme étant une cascade de modifications cellulaires incontrôlées⁴⁵ d'une large classe de cellules. Ces modifications cellulaires engendrent une prolifération et une distribution anormales dans le corps humain, qui peuvent favoriser son développement par le biais de métastases.

Les lésions de l'ADN correspondent à l'étape d'initiation de formation des tumeurs. Des anomalies génétiques majeures se produisent alors et s'accumulent au niveau du génome. Ces anomalies peuvent survenir à partir de facteurs environnementaux ou exogènes, comme c'est le cas des rayonnements UV et des radiations ionisantes (rayons X, radioactivité). D'autres facteurs endogènes⁴⁶ causent des lésions, comme le stress oxydant, produisant des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote. Toutes ces modifications sont permanentes dans la durée de vie de la cellule, et elles empêchent les mécanismes de réplication⁴⁷ de fonctionner normalement. C'est ici que les facteurs de

réparation⁴⁸ de l'ADN interviennent par différentes voies. Les déficits dans les mécanismes de réparation peuvent avoir des conséquences très variables en termes de symptomatologie clinique comme l'apparition de tumeurs.

Les tumeurs peuvent se développer localement et ainsi provoquer une compression sur les organes voisins, ou régionalement comme c'est le cas lorsqu'elles envahissent les ganglions lymphatiques. Lorsque les cellules cancéreuses ont la capacité de migrer vers d'autres organes, on parle de métastases. La transformation d'une tumeur bénigne en une tumeur maligne va dépendre de l'accumulation consécutive de cellules dont les gènes responsables du contrôle de la prolifération, de l'intégrité génétique et de la mort cellulaire ont été altérés.

Les premières thérapies remontent à la fin du XIX^e siècle, avec la découverte des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen en 1896. Les rayons étaient déjà utilisés la même année par Emil H. Grubbé dans le traitement du cancer du sein. Leur usage a été confirmé par Pierre et Marie Curie lorsqu'ils constatent que les rayons X sont nocifs au niveau cellulaire et pourraient finalement être employés à des fins thérapeutiques. Claudius Regaud confirme en 1920 l'intérêt du rayonnement dans le traitement de plusieurs cancers, en réduisant les effets secondaires grâce à une exposition fractionnée.

Ce n'est que plus tard que l'approche pharmacologique provoque une révolution au moyen d'agents chimiothérapeutiques. Cette approche reste utilisée malgré certaines contraintes majeures, telles que la forte toxicité pour les tissus sains mais également les mécanismes de résistances aux antitumoraux. C'est pendant la Seconde Guerre mondiale que le premier agent alkylant fut accidentellement découvert, connu sous le nom de gaz moutarde. La toxicité de la moutarde azotée tient à son activité alkylante de l'ADN se liant aux guanines, formant des réticulations inter-brins empêchant la duplication de l'ADN et entrainant la mort cellulaire. D'autres agents alkylants ont par la suite été développés, dont la dacarbazine qui est encore très largement utilisé pour les traitements anticancéreux tels que les lymphomes de Hodgkin, certains sarcomes, mélanomes, cancer de la vessie et de l'ovaire.

D'autres traitements sont développés, toujours basés sur la même stratégie : limiter la prolifération cellulaire. Les antimétabolites émergent avec l'apparition d'analogues de pyrimidine, de purine et de folate qui bloquent les chaînes enzymatiques essentielles dans la synthèse des purines et provoquent l'apoptose. En 1947, les premiers résultats sont visibles avec la première rémission complète d'une leucémie aiguë avec un traitement aux antifolates.

L'arrivée de nouveaux traitements à activité cytotoxique permet d'interférer avec la formation de microtubules et ainsi de bloquer la mitose pour stopper la prolifération cellulaire. Les premiers agents antimitotiques sont extraits de plantes telles que *Catharanthus roseus* (pervenche de Madagascar), *Podophyllum peltatum* (mayapple mandragore sauvage), *Camptotheca acuminate* (arbre heureux) ou encore le taxol extrait de l'arbre *Taxus brevifolia* (if du pacifique).

Viennent ensuite les médicaments plus classiques comme les inhibiteurs de la polyamine, les médicaments modulateurs du fer et enfin les antibiotiques qui peuvent présenter une activité cytotoxique⁴⁹.

L'étude des mécanismes biochimiques a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires. Cette approche développée à partir des années 80 consiste à développer de petites molécules obtenues par synthèse chimique ou des médicaments biotechnologiques comme les anticorps monoclonaux. Ces outils sont dirigés vers des oncogènes clés modifiés, des gènes suppresseurs de tumeur, des récepteurs cellulaires ou des protéines spécifiques impliquées dans des processus néoplasiques. La thérapie ciblée se différencie des traitements classiques qui agissent à la fois sur les cellules normales et les cellules cancéreuses. De cette manière, ces traitements intelligents limitent les effets secondaires et permettent de ne toucher que les cellules cancéreuses.

On retrouve également des traitements à base de rayonnements comme la radiothérapie ou thérapie aux radionucléides, utilisées notamment pour le traitement du cancer du foie. Elle se différencie de la radiothérapie externe par l'administration de radiopharmaceutiques (radio-isotopes tels que l'iode 131 ou le radium 223) par ingestion ou injection, permettant de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. À titre d'exemple, l'iode 131 est le premier et le plus courant des agents radiopharmaceutiques, utilisé dans le traitement des cancers de la thyroïde. Son mécanisme d'action se base sur la forte affinité de l'ion iodure pour la glande thyroïde¹.

Malgré toutes ces stratégies thérapeutiques, le traitement par chirurgie reste une des solutions les plus sûres dans le cas des tumeurs solides. Cependant, cette approche nécessite un diagnostic précoce et s'avère inefficace chez les patients dont la pathologie tumorale est trop avancée. Il existe toutefois des méthodes associant la chirurgie et la chimiothérapie⁵⁰.

Le mélanome est la forme la plus meurtrière de cancer de la peau, représentant environ 1 à 2% de ce type de cancer mais 60% des décès liés aux cancers de la peau (55 000 décès par an aux États-Unis)^{51,52}. Le mélanome est considéré comme l'un des cancers les plus agressifs après le cancer du poumon⁵³, et son incidence est en augmentation ces dernières années⁵⁴. Il présente un problème de santé publique mondial et un challenge thérapeutique^{55,56}. Le point de départ de ce type de cancer se situe dans les mélanocytes, contrairement aux carcinomes (~90% des cancers de la peau) qui se développent dans les kératinocytes⁵⁷. La cancérogenèse du mélanome est initiée par une surexposition aux rayonnements UV, qui en plus d'induire un effet mutagène sur l'ADN, conduit à la production de facteurs de croissance par le biais des cellules cutanées. En effet, contrairement aux mélanocytes normaux, les cellules de mélanome ne transfèrent pas leur production de mélanine vers les kératinocytes adjacent, ce qui augmente fortement leur concentration en mélanine intracellulaire, néfaste pour la survie du patient.

Environ 80% des mélanomes se développent à partir d'une peau saine sous la forme d'une tâche pigmentée, ressemblant à un grain de beauté (naevus) dans 20% des cas⁵⁷. Cette tâche s'étend d'abord dans l'épiderme puis jusqu'au derme, voir l'hypoderme, si aucun traitement n'est entrepris. On parle de cancer invasif, lorsque les cellules cancéreuses se détachent pour envahir d'autres parties du corps (ganglions lymphatique, organes, donnant lieu à des métastases) *via* le système lymphatique. Pour les mélanomes de stade précoce le taux de survie est de 85% ; il diminue drastiquement à 18% pour les mélanomes métastatiques⁵⁸. La survie des patients est dépendante du développement de la maladie au moment du diagnostic⁵⁹. On distingue quatre formes anatomocliniques de

mélanomes^{53,59} qui ont été décrites en fonction de leur croissance, de l'âge auquel ils apparaissent et des facteurs environnementaux :

- Le mélanome à extension superficielle extensif (le plus fréquent, ~70% des mélanomes) : apparait à la suite d'une exposition prolongée de la peau au soleil générant des coups de soleils importants.
- Le mélanome de Dubreuilh est essentiellement présent chez les personnes âgées, lié à l'exposition répétée au soleil, sur les parties les plus exposées (visage, cou et épaule).
- Le mélanome nodulaire se manifeste par des nodules : leur aspect est caractéristique puisqu'ils sont le plus souvent noirs ou couleur de « peau », pouvant suinter, saigner ou se couvrir d'une croûte. Il peut apparaitre sur toutes les parties du corps mêmes celles qui ne sont pas exposées au soleil
- Le mélanome acrolentigineux ou mélanome des extrémités n'est pas lié à une surexposition au soleil, il apparait le plus souvent sur la paume des mains, la plante des pieds et sous les ongles.

Ces mélanomes se différencient en particulier par leur croissance plus ou moins rapide. Du fait de leur vitesse de croissance, les médecins préconisent un diagnostic précoce. Bien que l'incidence du mélanome continue d'augmenter par rapport aux autres cancers, la mortalité a régulièrement diminué en raison des progrès majeurs dans le domaine médical. Les options thérapeutiques actuelles pour les patients atteints de mélanome consistent principalement en une excision chirurgicale, une chimiothérapie, une immunothérapie et une thérapie ciblée.

La chirurgie est le principal traitement curatif du mélanome cutané accessible et de stade précoce (stades I et II non métastasés). Il est cependant nécessaire que la tumeur soit diagnostiquée à temps ; une exérèse chirurgicale est alors pratiquée en deux temps, avec d'abord l'ablation complète du mélanome, puis une seconde opération avec des marges saines et parfois plus profondes⁵⁴. Cependant, il est très peu probable que le mélanome métastatique soit guéri par la chirurgie en raison du nombre souvent élevé de métastases, de la faible accessibilité et de la détection difficile des petites lésions métastatiques par les outils d'imagerie couramment utilisés⁶⁰.

Lorsque l'exérèse n'est pas praticable, elle est alors substituée par d'autres formes de traitements plus invasifs. Les différentes thérapies peuvent être administrées en tant qu'agents uniques ou en combinaison selon le stade de la maladie, la localisation et le profil génétique de la tumeur, ainsi que l'état de santé général et l'âge du patient⁶¹ (*Figure* <u>3</u>).



Figure 3: Options thérapeutiques pour les patients atteints de mélanome présentant une mutation ou non sur le gène BRAF

Le traitement de première intention des patients atteints de mélanome va fortement dépendre du statut de la mutation du gène BRAF (B-Raf). Deux groupes de mélanomes cutanés peuvent être distingués : ceux porteurs d'une mutation activatrice BRAF V600E (BRAF), qui représentent 40 à 50% de tous les patients atteints de mélanome, et ceux porteurs d'autres mutations que BRAF⁶². Les patients atteints de mélanomes BRAF peuvent recevoir des thérapies ciblées ou des immunothérapies en tant que traitement de première intention (*Figure 3* – à gauche), alors que les patients atteints de mélanome avec des tumeurs de type BRAF sauvage reçoivent généralement des immunothérapies (*Figure 3* – à droite). Des thérapies non ciblées peuvent être administrées en tant que traitement de deuxième intention en utilisant des agents chimiothérapeutiques tels que la dacarbazine ou le témozolomide. Le mélanome peut également être traité localement en utilisant une thérapie à base de virus oncolytique (T-VEC)⁶¹.

La chimiothérapie est le traitement standard utilisé en deuxième intention chez les patients présentant une maladie évolutive, réfractaire ou en rechute. Plusieurs agents chimiothérapeutiques ont été développés et testés avec l'utilisation de témozolomide et de dacarbazine (DTIC). Cette stratégie a montré des taux de réponses globaux variant de 10% à 20% avec des rémissions complètes dans seulement 5% des cas. Le DTIC est un agent alkylant utilisé contre les mélanomes de stades avancés (Stade IV), mais malheureusement des expériences ont confirmé une résistance des cellules de mélanomes au DTIC provenant de multiples mécanismes encore mal compris⁶³. Par la suite, des progrès majeurs ont surtout été réalisés en immunothérapie avec les traitements à base d'anticorps monoclonaux fonctionnant grâce à des points de contrôles immunitaires. L'ipilimumab utilisé comme traitement en immunothérapie, se présente comme un anticorps monoclonal de type IgG1 dirigé contre la protéine CTLA-4. D'autres inhibiteurs, tels que le pembroziuma ou le nivolumab ont également été développés. Ils sont dirigés contre la protéine PD-1, présente à la surface des cellules et particulièrement exprimée par les lymphocytes T activés. Cette protéine est impliquée dans l'inactivation des lymphocytes T lorsqu'ils sont au contact des protéines PDL-1 présentes à la surface des tumeurs. Ces anticorps se fixent spécifiquement sur PD-1 et empêchent les lymphocytes de se fixer sur la tumeur. Cette technique a permis d'améliorer les chances de survie chez 30% des patients avec un mélanome de stade avancé.

La **thérapie ciblée** a montré une efficacité sur la survie globale nettement supérieure à l'effet des agents chimiothérapeutiques. L'utilisation de plusieurs traitements⁶⁴ a été approuvée en 2011, dont le vémurafénib, premier inhibiteur utilisé pour inhiber le gène BRAFi^{61,64,65}. Puis le dabrafenib avec le même mode d'action, également approuvé par la FDA, qui a montré des effets plus puissants que son prédécesseur. L'effet de ces traitements est néanmoins rapidement limité par l'apparition de résistances comme c'est le cas pour le vémurafenib, mais aussi par l'apparition d'effets secondaires se manifestant sous la forme de lésions cutanées ou de carcinome. Des atteintes plus rares telles qu'une pancréatite, une hépatite, une hypophysite ou une photosensibilisation peuvent apparaitre⁶⁶.

Malgré l'efficacité encourageante des thérapies ciblées et immunitaires, la plupart des patients (~80%) atteints d'un mélanome avancé ne guérissent pas. L'insuffisance de 46

l'efficacité thérapeutique à long terme est largement attribuée à la manifestation de la résistance au traitement ciblé et à l'absence fréquente de réponse (due à une résistance innée ou à une toxicité) à l'immunothérapie⁶⁷.

À ces résistances viennent s'ajouter des différences phénotypiques d'un individu à l'autre pouvant être marquées par une faible absorption, une faible tolérance ou une excrétion trop rapide du médicament. La mélanine est également impliquée dans cette résistance : connue pour conférer des effets radioprotecteurs dans les cellules de mélanome métastatique, elle atténue l'efficacité de traitement à base de rayons ionisants⁶⁸ (X ou δ). De plus, les traitements à base d'irradiation à certaines longueurs d'ondes en thérapie photodynamiques (PDT) se montrent peu efficaces. En effet, le large spectre d'absorption de la mélanine confère au mélanome une transmittance opérationnelle à des longueurs d'onde supérieures à 700 nm, écartant les photosensibilisateurs classiques comme l'hypéricine (<600 nm) ou la photofrine (630 nm). Pour contourner cette limitation, des études ont montré que des agents photosensibilisants de deuxième génération avec une absorbance plus élevée (700-800 nm) tels que la naphtalocyanine ou la texapyrine pouvaient minimiser le risque d'interférence avec la mélanine⁶⁹. Viennent s'ajouter les propriétés chimiques des mélanines leur permettant de piéger les espèces ROS (radicaux libres, ions métalliques et divers xénobiotiques) prévenant ainsi le stress oxydant généré par certaines stratégies anticancéreuses^{70,71}. Et enfin, certains intermédiaires de la mélanogénèse comme le L-DOPA et les quinones réactives confèrent au mélanome des propriétés lymphotoxiques et/ou immunosuppressives.

À ce jour, aucun essai clinique lié à l'administration d'adjuvants (inhibiteurs de la mélanogenèse) avec des thérapies connues n'a été entrepris dans le but de sensibiliser le mélanome et ainsi améliorer le pronostic de la maladie. Cibler l'enzyme responsable de la synthèse de mélanine (*hs*TYR chez l'homme) semble cependant être une approche intéressante dans le cadre du traitement du mélanome. En effet, Huang & *al.*⁶⁹ ont montré qu'un traitement des cellules de mélanome *in vitro* par la *N*-phénylthiourée (PTU), un inhibiteur réversible de *hs*TYR ($K_i = 1.7 \mu$ M),⁷² couplé à l'utilisation de l'hypéricine et de PDT, a conduit à une sensibilité accrue des cellules de mélanomes humains aux rayons γ . D'autres preuves de ce concept dans le cadre d'immunothérapies ont été publiées avec l'utilisation de PTU, qui ont montré que les cellules de mélanome pouvaient être 47

sensibilisées aux lymphocytes. Dès lors, avec une concentration de 1 mM de PTU en présence de lymphocytes, ~50% de cellules de mélanome pigmentées sont détruites⁷³. Or en l'absence de PTU, ~4% des cellules non-pigmentées (saines) sont détruites et seulement ~0.1% des cellules pigmentés sont touchés. Ces premières études prometteuses sont un bon point de départ pour motiver la découverte de nouveaux inhibiteurs de *hs*TYR dans le cadre du développement de nouveaux essais cliniques alliant inhibiteurs de la mélanogenèse et thérapies anticancéreuses.

VII. La tyrosinase (hsTYR) : enzyme clé de la mélanogénèse

1. Généralités sur les tyrosinases

Le terme « tyrosinase » (EC 1.14.18.1) fait référence à son substrat naturel la L-tyrosine, présente dans plusieurs organismes vivants, notamment chez divers procaryotes ainsi que chez les plantes, les champignons, les arthropodes et les mammifères. La tyrosinase fait partie des polyphénol oxydases (PPO), elle catalyse deux réactions enzymatiques, l'*ortho*-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase ou créolase) et l'oxydation des *o*-diphénols (activité diphénolase ou catécholase) en quinones réactives correspondantes. Leur capacité à oxyder des petites molécules phénoliques ainsi que des peptides ou des protéines contenant des résidus tyrosine ont suscité un intérêt certain depuis les premières études biochimiques⁷⁴ sur le champignon *Russula nigricans* en 1895, dont la chair une fois coupée devient rouge puis noire à l'exposition à l'air⁷⁴.

Les tyrosinases les mieux caractérisées sont dérivées de bactéries comme *Streptomyces glauescens* mais aussi des champignons *Neurospora crassa* ou *Agaricus bisporus* (tyrosinase de champignon *ab*TYR). Chez les vertébrés et les animaux, la tyrosinase catalyse l'étape initiale de la formation de mélanine qui consiste en une double oxydation de la *L*-tyrosine en *L*-DOPA, puis de *L*-DOPA en DOPA-quinone. Une première résolution tridimensionnelle d'une tyrosinase recombinante de la bactérie *Streptomyces castaneoglobisporus* a été obtenue en 2006 par Matoba & *al.*⁷⁵. Cette première structure a permis de confirmer l'existence d'un centre binucléaire de cuivre, ainsi que la présence de plusieurs états⁷⁴ *oxy-* : Cu^{II}-O2²⁻-Cu^{II}, *met-* : Cu^{II}-OH-Cu^{II} et *deoxy-* : Cu^I Cu^I que peuvent

adopter les deux cuivres au cours du cycle catalytique. Les tyrosinases appartiennent à la famille des métalloenzymes ainsi que des protéines transmembranaires de type I contenant un centre à cuivre de type 3, comme les catéchols oxydases (CO) qui eux n'exercent qu'une activité diphénolase, et les hémocyanines (Hc), en charge du transport de l'oxygène de l'hémolymphe des mollusques et des arthropodes. Les tyrosinases partagent un site actif conservé contenant deux ions cuivre Cu_A et Cu_B coordinés par six résidus histidines. Chez *hs*TYR, les histidines (H180, H202, H211 pour Cu_A, H363, H367, H390 pour Cu_B) sont situées dans un réseau hélicoïdal. L'enzyme est constituée de 529 acides aminés, contenant une séquence N-terminale de 18 résidus et 6 ou 7 sites de *N*-glycosylation avec un poids moléculaire d'environ 67 kDa⁷⁶. Différentes études spectroscopiques et mécanistiques ont confirmé que les propriétés spectroscopiques des ions cuivre sont similaires, suggérant que les différences d'activités sont liées à l'accessibilité du substrat et à l'architecture des résidus dans le site actif⁷⁷.

Malgré les avancées majeures obtenues récemment^{76,78,79,80} sur la résolution structurelle des tyrosinases et le développement d'inhibiteurs ces dernières décennies, la structure de *hs*TYR n'a toujours pas été résolue.

2. Tyrosinase humaine (*hs*TYR) et tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus* (*ab*TYR)

La faible efficacité clinique des inhibiteurs de la tyrosinase humaine actuellement utilisés est largement due au fait que ces composés ont été testés en utilisant uniquement des tyrosinases de champignon (*m*TYR) et plus particulièrement *ab*TYR, qui ne possède qu'une faible homologie avec l'enzyme humaine. L'enzyme *ab*TYR (existant sous 6 isoenzymes différentes partageant une homologie de 60%)⁸¹ est facilement accessible dans le commerce à faible coût depuis plusieurs décennies, alors que *hs*TYR est plus compliquée à isoler et donc plus coûteuse. Ainsi, *ab*TYR est la seule tyrosinase active disponible facilement dans le commerce, expliquant que la grande majorité des composés ciblant *hs*TYR ont été identifiés sur la base exclusive de l'activité contre *ab*TYR⁸². De ce fait, plusieurs milliers d'inhibiteurs de *ab*TYR avec des structures très diverses (composés naturels inclus) sont connus⁸³. Néanmoins, *ab*TYR et *hs*TYR sont très différentes, que ce

soit au niveau de l'activité catalytique des enzymes elles même ou de la spécificité du substrat (*Figure 4*).

D'un point de vue général, hsTYR est une enzyme monomérique hautement glycosylée ancrée dans la membrane du mélanosome à travers 21 acides aminés formant un domaine transmembranaire, contrairement à *ab*TYR qui est une enzyme oligomérique soluble, produite dans le cytosol⁷². En effet, la tyrosinase humaine subit une étape de maturation, un processus complexe qui implique des modifications post-traductionnelles essentielles pour son activité⁸⁴. Le passage à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi où intervient la glycosylation semblent être des modifications essentielles au repliement tridimensionnel de la protéine. Ces processus sont contrôlés par la présence de sept Nglycanes (glycosylation des asparagines N86, N111, N161, N230, N290, N337, N371) spécifiques et par la captation du cuivre⁷². Malgré la présence de trois histidines similaires coordinées à chaque atome de cuivre, les tyrosinases de mammifère n'ont qu'une identité globale de 22 à 24% avec les tyrosinases de champignon dans une région de 48 à 49% de séquence couverte⁷². Cette faible identité est de plus marquée par la présence d'un domaine transmembranaire ainsi qu'un sous domaine riche en cystéine situé au niveau intramélanosomale (appelé domaine EGF) uniquement présent chez hsTYR et hsTYR1 et absente chez abTYR⁷⁸.



Figure 4: Modèle d'homologie de hsTYR⁸⁵ (à gauche), structure cristallographique de abPPO3⁸⁶ (à droite)

D'autres divergences entre *ab*TYR et *hs*TYR, localisées notamment au niveau des cuivres, ont d'abord été observées à travers les séquences peptidiques, et ont ensuite été confirmées par comparaison de la structure cristalline d'isoenzymes de *ab*TYR avec un modèle d'homologie de *hs*TYR⁷⁹. En effet, pour *ab*TYR, une liaison thioéther covalente se forme entre un résidu histidine chélatant l'atome de cuivre Cu_A et une cystéine. Cette liaison est précisément observée chez *ab*PPO3⁸⁶ entre les résidus C83 et H85 ainsi que chez *ab*PPO4⁸⁷ entre les résidus C80 et H82. Le rôle de ce pont thioéther chez *ab*TYR n'est pas clair, mais il ne semble pas concerner l'activité catalytique, sa présence n'étant pas conservée chez les hémocyanines et chez *hs*TYR. À l'inverse, cette caractéristique est conservée chez les tyrosinases provenant des plantes et des champignons. Cette liaison pourrait être impliquée dans des contraintes structurales forçant un repliement spécifique de l'enzyme^{86,88}.

Plus loin du centre à cuivre, dans la seconde sphère de coordination, des études sur les interactions entre *hs*TYR et inhibiteurs ont révélé que certains résidus n'étaient pas conservés. En effet, I368, R308, K306, H304, S375, S380, ainsi que T343 et T352 sont présents chez *hs*TYR mais totalement absents de *ab*PPO3 et *ab*PPO4. Ces variations expliquent les différences observées entre les valeurs d'activité d'une tyrosinase à une autre^{82,89,90}. À titre d'exemple, les résidus 302 à 310, engagés dans une hélice α rigide dans *ab*PPO3, *ab*PPO4 ou *hs*TRP1, forment une boucle flexible dans *hs*TYR aux interactions potentielles différentes. Le résidu S380, absent chez *ab*PPO3 et *ab*PPO4 et conservé chez *hs*TYRP1 (S394), se situe très proche du centre à cuivre, et pourrait être impliqué dans l'activation du substrat, comme le suggèrent Lai & *al*.⁸⁰ En effet, les mutants S380P et S380A, impliqués dans certaines formes d'albinisme, conduisent à une chute drastique de l'activité enzymatique.

Ainsi, même les inhibiteurs de référence comme l'acide kojique, l'hydroquinone, ou encore l'arbutine sont globalement inefficaces sur *hs*TYR. Cette inactivité conduit à l'utilisation de fortes concentrations dans les préparations dermatologiques, responsable de nombreux effets indésirables. Le <u>Tableau 1</u> résume la différence d'activité entre *ab*TYR et *hs*TYR : les valeurs d'IC₅₀ varient d'un facteur 100 à 1000 selon l'inhibiteur.

	IC ₅₀ <i>ab</i> TYR (μM)	IC ₅₀ hsTYR (μM)
Acide kojique	6.0	500
Arbutine	40	6500
Hydroquinone	1.1	4400
4-Butylrésorcinol	0.6	21

Tableau 1 : Valeurs d'IC50 de quatre inhibiteurs de abTYR^{82,91} vs hsTYR^{82,91}

Cette différence est moins marquée avec l'utilisation du 4-butylrésorcinol (rucinol) qui inhibe *hs*TYR (IC₅₀ = 21 μ M) plus efficacement que la plupart des inhibiteurs connus. Néanmoins il semble possible d'obtenir des inhibiteurs plus de *hs*TYR bien plus efficaces. Dans ce contexte, la découverte du Thiamidol (IC₅₀ = 1.1 μ M chez *hs*TYR *vs* IC₅₀ = 108 μ M *ab*TYR) a représenté une avancée majeure.⁸².

3. Expression et cristallisation de la tyrosinase humaine : un défi?

Un des problèmes majeurs rencontrés lors de la détermination de la structure cristalline de *hs*TYR est l'obtention d'une protéine hautement pure et active en quantité suffisante. Plusieurs travaux à partir des années 70 ont montré qu'il était possible de purifier hsTYR à partir de tissus provenant de mélanome malin humain. Cependant cette technique nécessite des tissus biologiques provenant de patients atteints de mélanomes malins, et la forme native de la protéine reste discutable notamment à cause des procédés de purifications qui peuvent interférer sur l'activité de la tyrosinase^{92,93} (Lignes 1-2, *Tableau* 2). Plus récemment, Kong & al.^{94,95} ont été les premiers à rapporter deux expressions de hsTYR dans un système bactérien impliquant E. coli (Lignes 3-4, Tableau 2), avec une bonne activité, tout en ayant recourt à une purification rapide. Néanmoins, comme le soulignent les auteurs, les valeurs de K_m obtenues pour la L-tyrosine sont nettement inférieures à la valeur attendue (1.32 \pm 0.12 μ M). Par la suite, Chen & *al.*⁹⁶ et d'autres groupes^{72,84} ont tenté d'exprimer hsTYR dans le même système d'expression mais sans succès. En outre, l'état de glycosylation de cette protéine recombinante est inconnu, mais il semble exclu qu'elle accède à des *N*-glycanes complexes comme ceux produits chez les mammifères.

En 2014, Dolinska & *al.*⁹⁷ proposent un système de baculovirus menant à une glycosylation plus fidèle. Il a été montré que certains sites de glycosylation présents sur *hs*TYR étaient en effet essentiels pour maintenir une activité enzymatique, comme N86 et N371. Certains *N*-glycanes sur N230 et N337 semblent en revanche ne pas être essentiels pour l'activité enzymatique, car la double mutation N230Q/N337Q permet de conserver l'activité de l'enzyme sauvage. La production de *hs*TYR dans des larves d'insectes

Trichoplusia ni a permis d'exprimer la protéine sur toute sa longueur en générant le domaine intramélanosomique de *hs*TYR avec un peptide signal N-terminal hétérologue sous une forme entièrement active. Cette technique est reproductible et permet une glycosylation de la protéine mais l'expression dans les larves d'insectes est lente et nécessite des purifications en plusieurs étapes, qui impactent le rendement (Lignes 5, *Tableau 2*).

	Système d'expression	Masse (kDa)	Longueur (en AA)	K _m (mM), L-DOPA	K _m (mM), L-tyrosine	Rendement (mg/L)
1	métastase de mélanome humain ⁹³	~67	Native	-	-	0,2
2	métastase de mélanome humain ⁹²	~53	Native	0.20	-	1.1
3	E. coli ⁹⁵	~66	1-529	0.36	0.17	1
4	E. coli ⁹⁴	~52	19-474	0.34	0.0013	3.8
5	larves d' insectes T. ni ⁹⁷	~57	19-469	0.46	0.16	>1
6	cellules d' insectes S. frugiperda Sf972	~66	1-513	0.34	0.22	8
7	cellules HEK humaines ⁸⁴	~70	1-511	0.51	-	-
	cellules HEK humaines ⁸⁴	~57	1-438	0.50	-	-
8	insecte <i>T. ni</i> High Five cellules ⁷⁸	~60	19-456	-	-	4-6

Tableau 2 : Différentes sources de lignée cellulaire exprimant hsTYR⁹⁸

Fogal & $al.^{72}$ utilisent un système d'expression similaire avec des cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda* (Sf9) et parviennent à exprimer *hs*TYR (séquence complète) avec des étapes de purification optimisées permettant d'accroitre le rendement et d'approcher des valeurs de *K*_m de *hs*TYR native (Lignes 6, *Tableau 2*). En outre, l'expression de *hs*TYR dans des systèmes de mammifères non mélanogéniques a souvent été associée à une accumulation intracellulaire de mélanine, entraînant l'arrêt et la mort de la cellule, limitant ainsi les rendements d'expression. En effet, les cellules HEK 293 (cellules humaines non mélanogéniques) (Lignes 7, *Tableau 2*) utilisées dans l'étude de Cordes & *al.*⁸⁴, sécrètent une enzyme dépourvue de domaine C-terminal et de partie transmembranaire, dont la longueur optimale est normalement de 440 résidus. Au total, huit constructions enzymatiques ont été produites avec des longueurs variables intégrant une partie du domaine intramélanosomique et la présence de sites glycosylés qui ont montré une activité similaire aux valeurs cinétiques proches de celles de la littérature.

Enfin, reprenant le système d'expression de baculovirus, Lai & *al.*⁷⁸ ont élaboré un protocole permettant de produire *hs*TYR à grande échelle. Dérivées des cellules de *T. ni*, les cellules High Five (Lignes 8, *Tableau 2*) permettent de produire de la tyrosinase pure

après seulement deux étapes de purification. Le procédé a permis d'obtenir des rendements d'expression de 4 à 6 mg/L, ouvrant la voie à la réalisation d'essais de cristallisation et de criblage à haut débit d'inhibiteurs. Des cristaux de *hs*TYR ont été obtenus et ont conduit à une résolution de 3.5 Å. Bien que ces résultats préliminaires soient prometteurs, ils ne permettent pas une détermination structurale à l'échelle atomique. Toutefois, le protocole de déglycosylation élaboré par cette équipe pourrait permettre d'obtenir de nouveaux cristaux.

Actuellement, nous disposons de la structure de *hs*TRP1, qui possède une bonne homologie avec *hs*TYR (40% d'identité) (*Figure 5*). Cette structure a été révélée en 2017 par Lai & *al.*⁷⁹ et plusieurs études ont d'ores et déjà utilisé le modèle de *hs*TRP1 comme base pour la compréhension du mécanisme de la tyrosinase⁸⁰ ou pour le développement de nouveaux inhibiteurs à travers la construction de modèles d'homologie robustes⁹⁰.



Figure 5 : Structure cristalline de hsTYRP1⁷⁹ (à gauche) et le modèle d'homologie de hsTYR⁸⁵ (à droite)

4. Activité et inhibition de la tyrosinase

a) Cycle catalytique de la tyrosinase : Activités monophénolase et diphénolase

Le mécanisme catalytique implique les trois états précisés plus haut : *oxy-, met-* et *désoxy*de la tyrosinase. L'activité monophénolase de l'enzyme est responsable de l'oxydation de la *L*-tyrosine en *L*-DOPA : la *désoxy*-tyrosinase ($E_{désoxy}$) se lie à l'oxygène et forme l'*oxy*tyrosinase (E_{oxy}) qui oxyde la *L*-tyrosine. L'enzyme est ensuite recyclée sous la forme $E_{désoxy}$ (*Schéma 3*) :



<u>Schéma 3</u> : Shéma catalytique de la tyrosinase – activités mono- et diphénolase

L'activité monophénolase dépend fortement de l'activité diphénolase. En effet, un retard est observé pour l'activité monophénolase qui dépend de la concentration en *o*-diphénol, produit par l'activité diphénolase.

Dans l'activité catalytique de type diphénolase, l'*oxy*-tyrosinase est réduite en *mét*tyrosinase ($E_{mét}$), les deux centres de cuivre étant pontés par un pont aqua-hydroxo. La forme $E_{mét}$ permet d'oxyder le *L*-DOPA en quinone et de générer la forme $E_{désoxy}$.

b) Mécanisme d'inhibition

En raison du rôle critique de la tyrosinase dans le processus de la mélanogénèse, de nombreuses études sur le développement d'inhibiteurs visant cette enzyme ont été réalisées. De manière générale, les inhibiteurs de la tyrosinase se classent selon trois catégories principales : compétitif, non compétitif et mixte (non compétitif/compétitif). L'inhibiteur compétitif se lie à l'enzyme libre et empêche la liaison du substrat au site actif de l'enzyme (analogie clé/serrure).

L'inhibiteur non compétitif ne peut se lier qu'au complexe enzyme-substrat, et l'inhibiteur mixte peut se lier à la fois aux formes d'enzyme libre et au complexe enzyme-substrat. Ces deux modes d'inhibition sont par exemple fréquemment observés sur *m*TY⁹⁹.

D'autres inhibiteurs sont connus pour être des substrats suicides, présentant par exemple un motif monophénolique ou *o*-diphénolique, qui vont nécessairement subir une étape d'oxydation et provoquer l'inactivation de la tyrosinase. C'est le cas du resvératrol qui subit une double oxydation puis provoque l'inactivation de la tyrosinase¹⁰⁰.

5. Inhibiteurs de la tyrosinase humaine (hsTYR)

Parmi les inhibiteurs de la tyrosinase de champignon, certains des plus emblématiques, comme l'hydroquinone, l'arbutine et l'acide kojique, ont déjà été testés sur tyrosinase humaine (*Tableau 1*). Ces inhibiteurs actifs sur tyrosinase de champignon se révèlent généralement peu efficaces contre *hs*TYR avec des $IC_{50} > 500 \mu M^{82}$.

Toutefois, ces valeurs d'IC₅₀ sont parfois difficiles à comparer en raison des conditions des tests établis par les auteurs qui peuvent varier d'une étude à l'autre (concentration et nature du substrat, temps d'incubation et origine de la tyrosinase). C'est pourquoi un contrôle positif/négatif à l'aide d'inhibiteurs connus (l'acide kojique, l'arbutine ou l'hydroquinone) permet de comparer plus facilement les résultats.

Une autre manière d'évaluer la force d'un inhibiteur serait de mesurer le K_i , la constante d'équilibre de la dissociation du complexe enzymatique qui est indépendant de la concentration en substrat. Cette valeur est plus précise et rigoureuse, mais elle demande un test biologique plus complexe et coûteux.

Néanmoins, étant donné le coût de production de *hs*TYR isolée, les chercheurs ont le plus souvent recours à des tests sur systèmes cellulaires humains en première intention. Les composés peuvent être évalués sur différentes lignées cellulaires qui expriment naturellement la tyrosinase provenant de différentes cellules :

- De mélanomes malins humains : G-361¹⁰¹, HBL¹⁰², MNT-1¹⁰³, HMV-II¹⁰⁴ ou SKMEL1¹⁰⁵;
- De mélanocytes humains : HEM¹⁰⁶ provenant d'adulte ou de nouveau-né ;

De cette manière les composés actifs sont sélectionnés pour être ensuite testés sur enzyme isolé, obtenue *via* les systèmes d'expression cités précédemment.

Les études plus récentes sur enzyme isolée sont effectuées le plus souvent grâce à l'expression de *hs*TYR dans des cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* (Sf9) ou dans des cellules HEK293 transfectées.



<u>Schéma 4</u> : Structures et valeurs d'inhibition du Thiamidol 1 et du Rucinol 2 (testés sur hsTYR isolée)

Seuls deux inhibiteurs ont été évalués (*Schéma 4*) à ce jour dans des essais cliniques. D'abord, au début des années 2000, le rucinol, un dérivé du résorcinol, est commercialisé sous le nom d'Iklen[®]. Sa commercialisation a été approuvée grâce à plusieurs études qui soulignent son efficacité dans des préparations à 0,3% ou 0,1% (utilisant une méthode d'encapsulation liposomique) de rucinol **2** (*Schéma 4*), bien moins concentrées que les préparations d'hydroquinone (3–5%) couramment utilisées dans les formulations classiques. Une concentration aussi basse en rucinol a permis de limiter les effets secondaires, comme une sécheresse de la peau accentuée, une desquamation ou des érythèmes. Le rucinol a permis de réduire l'hyperpigmentation induite ou non par les UVB (tâches de vieillesse, de rousseur, hépatique), mais aussi des lésions pigmentées survenues après l'utilisation de laser. Après 2 mois de traitement, cette crème s'est avérée efficace chez plus de 70% des patients présentant des mélasmas faciaux modérés. En effet, une diminution de 40% des tâches pigmentées a été observée^{107,108}.

Le thiamidol **1** identifié par Beiersdorf en 2018 est un puissant inhibiteur de *hs*TYR avec une efficacité remarquable in vitro et in vivo. Il est strictement compétitif, a montré in vitro des valeurs d'inhibition nettement inférieures aux inhibiteurs fréquemment utilisés, avec un IC₅₀ de 1,1 µM et un Ki de 0,25 µM sur hsTYR isolée et 9 µM sur des modèles cutanés MelanoDerm¹⁰⁹. Cette découverte a conduit à l'étude clinique du thiamidol afin d'évaluer son efficacité in vivo. Un traitement sur une période de 12 semaines a montré une efficacité continue permettant d'atteindre des résultats significatifs dès 4 semaines (35,5% d'amélioration) avec une faible concentration $(0,1\%)^{82}$. Ces résultats ont mené au développement de formulations plus concentrées (0,2%) de thiamidol pour évaluer son efficacité et sa tolérance, et pour permettre une comparaison avec une préparation d'hydroquinone à 2,0%. Les résultats évalués sur le traitement d'un mélasma n'ont montré aucune aggravation du côté du thiamidol contrairement au traitement à base d'hydroquinone (Tableau 3). Après 8 semaines, 46,4% des sujets ont montré une amélioration tandis que 3,6% ont montré une aggravation, et après 12 semaines, une amélioration a pu être observée chez 60,7% contre 10,7% qui ont montré une aggravation¹¹⁰.

Semaines	% d'amélioration après traitement au thiamidol	% d'aggravation après traitement au thiamidol	% d'amélioration après traitement à l'hydroquinone	% d'aggravation après traitement à l'hydroquinone
4	21,4%	0%	21,4%	-
8	67,9%	0%	46,4%	3,6%
12	78,6%	0%	60,7%	10,7%

<u>Tableau 3</u> : Comparaison des taux d'amélioration/d'aggravation de préparations à base de thiamidol (0,2% en concentration) et d'hydroquinone (2% en concentration)¹¹⁰

L'efficacité du thiamidol **1** a été confirmée par un essai clinique¹¹¹ sur un panel de 200 patients en avril 2019. Puis en mai 2020, une étude publiée par Philipp-Dormston & *al*.¹¹² a confirmé l'efficacité du thiamidol sur les hyperpigmentations légères à modérées situées au visage. Une utilisation quotidienne de 2 à 4 fois par jour a été bien tolérée par les

patients, et a permis de diminuer l'hyperpigmentation et la rugosité de la peau après 12 semaines de traitement¹¹². C'est à l'heure actuelle l'inhibiteur le plus prometteur identifié sur *hs*TYR.

La découverte du thiamidol et de ses dérivés résultent d'un criblage de plus de 50 000 molécules^{82,112}, dont certaines seront présentées ici (IC₅₀ < 100 μ M). Les premiers composés à avoir été testés sur lysats cellulaires humains ou sur hsTY isolée sont ceux ayant une activité sur tyrosinase de champignon décrite dans le Tableau 1. Seuls la Lmimosine **12** ($K_i = 10.3 \,\mu\text{M}$) et la phénylthiourée **14** ($K_i = 1.7 \,\mu\text{M}$) ont exercé une influence significative contre *hs*TYR, à l'inverse des composés comme l'hydroquinone, l'arbutine ou l'acide kojique (*Tableau 1* – *Schéma 5*). La grande majorité des inhibiteurs identifiés se sont avérés être des dérivés phénoliques ou des analogues structuraux de la *L*-tyrosine (4-phénol) ou de la L-DOPA (3,4-catéchol). Le catéchol¹¹³ lui-même est en effet connu pour avoir un IC₅₀ de 22 µM (en comparaison avec l'arbutine) dans des cellules de type HEMn. C'est le cas de composés phénoliques comme l'acide *p*-coumarique **3** ainsi que ses dérivés 4-6 ou d'autres dérivés comme le composé 7 ou l'hydroxyindole 8, qui présentent des IC₅₀ relativement bas (IC₅₀ < 40 μ M) (*Schéma* 5). D'autres composés plus gros contenant cette fois-ci des motifs 3,4-catéchols ont également été décrits, comme c'est le cas pour la *N*-feruloyldopamine¹¹⁴ **21** (IC₅₀ = 50 μ M), des 3,4-catéchols mono-méthylés comme la curcumine¹¹⁵ **22** (IC₅₀ = 50 μ M) ou le *N*-feruloyl-*N*'-cis-feruloylputrescine¹¹⁶ **26** $(IC_{50} = 85 \mu M)$. Des dérivés de l'acide caféique ont également été décrits, tels que l'acide 2-S-lipoylcaféique¹¹⁷ 23 (IC₅₀ = 76 μM) ou l'acide 2-S-lipoylcaféique méthylester¹¹⁷ 24 (IC₅₀ = 30 μ M). Enfin, le Kinobeon¹¹⁸ A **25**, extrait du safran, avec un IC₅₀ = 2.5 μ M, ou le linderanolide¹¹⁹ B **27** (IC₅₀ = 1 μ M) et le subamolide¹¹⁹ **28** (IC₅₀ = 1 μ M) provenant du Cinnamomum subavenium, un arbre à feuilles persistantes présent en Asie, ont été identifiés (Schéma 5).

Cependant, les molécules contenant ces types de motifs (phénol ou catéchol) peuvent se comporter comme substrats, compte-tenu de la nature non spécifique de *hs*TYR. C'est le cas par exemple de l'acide *p*-coumarique¹²⁰ **3**, du resvératrol¹²¹ **30**, de la lutéoline **43**, de l'hispidol^{122,123} **47** et de l'acide caféique¹²⁰ (contenant un motif catéchol, non représenté ici) et de manière générale de tous les 4-phénols¹²⁴ et les 3,4-catéchols <u>Schéma 7</u> et <u>Schéma 8</u> – <u>Tableau 5</u>).



<u>Schéma 5</u> : Structures et activités des inhibiteurs de hsTYR identifiés sur lysats cellulaires de différentes lignées et sur hsTYR isolée (pointillés rouges)⁹⁸

Cette oxydation, parfois difficile à détecter dans les conditions de test mises en place, pourrait générer des quinones réactives et déclencher la formation de polymères ou d'autres agents potentiellement toxiques comme c'est le cas pour l'hydroquinone⁴³. Ce risque d'oxydation a poussé les scientifiques à se tourner vers la synthèse de nouveaux motifs de chélation du cuivre non-oxydables.

La recherche de nouveaux groupements non oxydables et chélateurs du cuivre a conduit à l'élaboration de nouveaux motifs contenant des fragments de type 3-hydroxy-2*H*-pyran-2-one, 3-hydroxypyridin-4(1*H*)-one (motif présent dans la *L*-mimosine) ou 3-hydroxy-4*H*-pyran-4-one (motif de l'acide kojique). Les composés présentant ces motifs^{125,126} sont représentés ci-dessus, et ont pour certains été testés sur l'enzyme *hs*TYR isolée (pointillés rouges – *Schéma 5*). L'introduction de chaînes aliphatiques simples sur les motifs 3hydroxypyridin-4(1*H*)-one et 3-hydroxy-4*H*-pyran-4-one, soit par formation de liaison thioéther soit directement sur le cycle, n'a donné que des molécules faiblement actives, avec cependant quelques différences notables, comme le montrent les composés **12, 13, 15** et **16-20** avec des *K_i* variant de 10.3 µM à 100 µM. Les travaux de Yoshimori & *al.*¹²⁷ ont également permis d'isoler de nouveaux inhibiteurs sur la base du groupement tropolone, donnant deux isomères **10** et **11** avec des IC₅₀ < 10 µM.

Ces différents motifs peuvent se lier de trois manières principales au centre à cuivre^{83,128} à l'état met. Les motifs de type analogues d'état de transitions qui miment les catéchols peuvent s'associer aux deux cuivres sous la forme $\underline{\eta^{1}}$ - $\underline{\eta^{2}}$ -pontant où seul un des oxygènes est lié au centre à cuivre. Dans le cas du mode **pontant** les deux oxygènes sont tous les deux liés à un cuivre à l'inverse du dernier mode de <u>chélatant</u> où seul à un des cuivres est ponté par les deux oxygènes (<u>Schéma 6</u>).

Un autre motif capable de lier le site actif (*Schéma* <u>6</u>) de la même manière que la *L*tyrosine a retenu notre attention dans le cadre de cette thèse : il s'agit du motif résorcinol^{91,129}. En effet, même si d'après Garcia-Jimenez & *al.* les résorcinols ne sont pas considérés comme des inhibiteurs mais comme des substrats alternatifs, ils subissent une oxydation lente en présence d'additifs spécifiques. Mann & *al.*⁸² ont confirmé récemment que ce type de motif se comporte essentiellement comme un inhibiteur dans des conditions physiologiques, comme le montrent les résultats de certains dérivés qui ont été testés sur *hs*TYR isolée : le Thiamidol **1** (*K_i* = 0.25 µM) (*Schéma* <u>4</u>) ; le 4phényléthylrésorcinol **29** ($K_i = 24 \ \mu$ M) le 4-hexylrésorcinol **33** ($K_i = 39 \ \mu$ M) ou le 4butylrésorcinol ($K_i = 9.1 \ \mu$ M) (<u>Schéma 7</u>).



<u>Schéma 6</u> : Exemples de mode de liaison du motif 2,4-résorcinol et d'autres motifs analogues d'état de transition non oxydable

L'introduction du motif 2,4-résorcinol s'est par exemple avérée bénéfique pour l'oxyrésveratrol **31** testé sur lysats (IC₅₀ = 0.09-7.6 μ M) en comparaison à son analogue **30** ne contenant qu'un seul hydroxyle en *para*. Par ailleurs, l'introduction de ce motif sur des composés linéaires plus volumineux s'est avérée intéressante comme l'indiquent les IC₅₀ des composés **32** et **34** (IC₅₀ = 2 et 9.1 μ M, respectivement - <u>Schéma 7</u>). En revanche, la présence du motif 3,4-catéchol (proche du motif 2,4-résorcinol) sur les composés linéaires **21**, **23**, **24** (<u>Schéma 5</u>) se révèle moins favorable, menant à des IC₅₀ nettement supérieurs (IC₅₀ = 50, 76 et 30 μ M, respectivement).



<u>Schéma 7</u> : Inhibiteurs de hsTYR contenant le motif 2,4-résorcinol, testés sur lysat cellulaire exprimant hsTYR et sur hsTYR isolée (pointillés rouges)

Le thiamidol⁹⁰ **1** a été conçu à partir du dérivé **40** (IC₅₀ = 40 μ M) sur lequel l'alkylation ou l'acylation de l'amine primaire a engendré toute une série de dérivés **35-41** contenant à la fois un cycle résorcinol et un cycle thiazole (plus efficace que des analogues contenant un cycle imidazole, phénylique ou thiazole inversé). La fonctionnalisation de l'amine avec de petits groupements (par exemple **36** et **37**) a conduit à des valeurs parfois 4 à 20 fois supérieures à celles obtenues avec des groupements plus volumineux et plus hydrophobes.

D'autres familles de molécules, appartenant aux flavonoïdes (<u>Schéma 8</u>), ont également été identifiées comme inhibiteurs potentiels de *hs*TYR avec des activités modérées et contenant un motif catéchol sur leur cycle B. Parmi elles, il existe deux flavones¹³⁰ **43** et **44** (IC₅₀ = 60 μ M et 16 μ M, respectivement) naturellement présentes dans des extraits de *Reseda luteola* (présente sur le pourtour du bassin méditerranéen) pour **43** et de 63 *Phyllospadix iwatensis* (présente au Japon) pour **44**, et enfin une chalcone¹¹³ **45** (IC₅₀ = 32 μ M) qui est présente dans des extraits de pomme Formosan.



<u>Schéma 8</u> : Flavonoïdes naturels testés sur lysat cellulaire exprimant hsTYR

Au milieu des années 2000, une autre sous-classe appartenant aux flavonoïdes, les aurones, a également été identifiée comme inhibitrice de tyrosinase, d'abord d'origine humaine puis bactérienne ou fongique. Ces molécules, possédant plusieurs activités biologiques, ont ensuite largement été étudiées pour leur potentiel à inhiber *hs*TYR isolée quelques années plus tard¹³¹.

VIII. Les aurones comme inhibiteurs potentiels de hsTYR



Les aurones (benzylidènebenzofuran-3(*2H*)-ones) ont été étudiées seulement à partir des années 2000 pour leur potentiel biologique, et se sont révélées intéressantes pour l'inhibition d'aromatase, de topoisomérase, ou de kinases. Les aurones sont des métabolites secondaires d'origine naturelle. Ce sont des isomères de flavones, principalement présents dans les plantes, jouant un rôle majeur dans la pigmentation de certaines espèces de fleur. Okombi & *al.*^{131,132} ont rapporté en 2006 le potentiel d'inhibition d'aurones polyhydroxylées d'inspiration naturelle en tant qu'inhibiteurs de

la mélanogenèse humaine. Les premières relations structure-activité ont montré l'importance de la présence de groupements hydroxyles, notamment en position 4'. Ces

recherches ont conduit à l'identification de trois aurones, dont le cycle B est mono- ou polysubstitué (**46-49**) particulièrement intéressantes qui ont été testées *in vivo* sur des mélanocytes humains (*Tableau 4*).



Tableau 4 : Première série de composés actifs (0,1mM) testés contre hsTYR sur des mélanocytes humains

Les dérivés **46-48** induisent une inhibition de 71-75% à une concentration de 0,1 mM, et se révèlent bien plus actifs que l'acide kojique. L'absence d'hydroxyle en position 4' conduit à une perte d'activité comme le montre le dérivé **49** comparé à son analogue **48** (respectivement 3% et 75% d'inhibition). Bien que ces premiers résultats aient permis la découverte des premiers inhibiteurs de la tyrosinase humaine, ils n'ont pas été testés sur enzyme isolée. Néanmoins, les tests de cytotoxicité *in vivo* ont révélé que les aurones n'altéraient pas la viabilité cellulaire, ce qui a permis de poursuivre le développement d'inhibiteur de *hs*TYR sur la base du squelette aurone¹³¹.



<u>Schéma 9</u> : Aurones géranyles : Altisilin **H**, I et J

Quelques années plus tard, en 2012, Mai & al^{133} identifient trois nouvelles aurones géranylées d'origine naturelle (respectivement Altisilin **H**, **I** et **J** - <u>Schéma 9</u>) provenant d'extraits méthanoliques de feuilles d'*Artocarpus altilis* (Moracées, plante présente dans les régions tropicales d'Asie) et qui possèdent une activité anti-tyrosinase sur *m*TYR associée à une IC₅₀ de 80–100 μ M.

La même année Dubois & al.124 étudient les effets de substitution des aurones sur l'activité de tyrosinase de champignon (*ab*TYR). Cette série d'aurones contient un hydroxyle fixe sur le cycle A en position 6 ainsi que la présence d'un ou deux hydroxyles sur les positions 2', 3' et 4' sur le cycle B, permettant de générer entre autres des motifs monophénol, catéchol ou résorcinol. Cette étude montre que les aurones peuvent adopter plusieurs comportements (substrat coopératif, activateur hyperbolique et inhibiteur mixte). En effet, les composés de type 4'-hydroxy ou 3',4'-hydroxy se comportent comme des substrats et non des inhibiteurs puisqu'ils sont progressivement oxydés en quinone au contact de *ab*TYR. Ils parviennent également à produire un premier composé « hybride » comme inhibiteur potentiel de *ab*TYR (IC₅₀ = $1,5 \mu$ M) sur la base du squelette aurone en ajoutant un motif 2-hydroxypyridine N-oxide (HOPNO) sur le cycle B. Cette étude est complétée deux ans plus tard avec une librairie de 24 composés synthétisés et testés sur deux cibles différentes, l'une provenant de champignon (abTYR) et l'autre d'origine bactérienne (saTYR, issue de Streptomyces antibioticus)¹²². Certains de ces composés sont également testés sur paTYR (Polyporus arcularius) qui est présente sous une seule forme d'isoenzyme à l'inverse de *ab*TYR (précisé plus haut)¹²³. (*Tableau 5*).

Les résultats ont montré que les aurones avaient un comportement de substrat ou d'inhibiteur d'une cible à l'autre, avec une différence importante concernant les activateurs. Les valeurs obtenues (non présentées) pour les aurones en tant que substrats ou inhibiteurs varient significativement, mettant en lumière des différences d'affinité entre enzymes issues d'espèces proches. Ces études ont également permis de mettre en avant la capacité d'inhibition des aurones contenant un motif résorcinol contre les tyrosinases de champignons et de bactéries, ainsi que la forte influence de la substitution du cycle A sur le niveau d'activité¹²². (*Schéma 7 – pointillés rouges*).



<u>Tableau 5</u> : Comportement d'aurones polyhydroxylées testées sur deux tyrosinases de champignons (abTYR et paTYR) et une tyrosinase de bactérie (saTYR). N : Non-actif, A : Activateur, I : Inhibiteur, S : Substrat. Les pointillés rouges représentent la capacité générale d'inhibition du motif résorcinol.

Toutes ces recherches ont conduit le laboratoire à étudier d'une part les capacités d'inhibition de la tyrosinase humaine par des aurones « hybrides » contenant le motif HOPNO ; et d'autre part, à évaluer les capacités de chélation du motif résorcinol comme cycle B non oxydable sur les aurones.

CHAPITRE II : Conception & Discussion
1. Travaux antérieurs

Basé sur les travaux menés au laboratoire dans le cadre du doctorat du Dr. Romain Haudecoeur sur la conception et l'étude de nouveaux inhibiteurs potentiels de la tyrosinase, de nombreux inhibiteurs ont à ce jour été testés sur tyrosinase de champignon *ab*TY (issue d'*Agaricus bisporus*). L'enzyme étant particulièrement difficile à exprimer et à purifier, les tests sur tyrosinase humaine sont rares et coûteux. Des travaux réalisés via une collaboration entre l'université d'Aix Marseille avec le Dr. Marius Réglier et l'université Grenoble Alpes avec le Dr. Catherine Belle ont permis d'identifier le motif 2hydroxypyridine-*N*-oxyde (HOPNO) (*Schéma 10*), qui est un nouveau motif chélateur du centre binucléaire à cuivre mimant l'état de transition de l'oxydation des catéchols et par conséquent qui ne peut pas être oxydé par la tyrosinase. Ce motif seul est un bon inhibiteur compétitif de la tyrosinase de champignon (IC₅₀ = 1,16 μ M et *K*_i = 1,8 μ M), mais ne saurait représenter un inhibiteur en raison de sa faible sélectivité due à sa taille, et de sa faible activité sur l'enzyme humaine ($K_i = 128 \mu M$). Dans cette optique le Dr. Haudecoeur a réalisé la synthèse d'un hybride aurone-HOPNO, en couplant une 6hydroxybenzofuran-3(2H)-one et le motif HOPNO. Ce même composé a été testé^{21,89} sur abTY ainsi que sur enzyme isolée hsTYR, sur lysat de cellule de mélanome humain MNT-1 lysées et sur cellules entières (*Schéma 10* et *Tableau 6*).



<u>Schéma 10</u> : Aurones 50-52 testées sur enzyme purifiée, lysats de mélanome et cellules entières

Ces résultats montrent la meilleure activité contre la *hs*TYR obtenue au laboratoire avec le composé **50**. Actuellement, le composé **50** et le thiamidol sont les seules molécules 71 ayant atteint des valeurs de *K_i* de l'ordre de la centaine de nanomolaire contre *hs*TYR. Néanmoins, ces résultats suggèrent une faible capacité du composé hybride **50** à traverser les membranes cellulaires, s'expliquant par l'équilibre tautomérique entre la *N*-hydroxy-2-pyridinone et la 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde, qui produit un caractère partiellement zwitterionique.

	50		51		52	
	IC ₅₀ (μM)	<i>Κ</i> _i (μΜ)	IC50 (μM)	<i>Κ</i> _i (μΜ)	IC50 (μM)	<i>K</i> i (μM)
abTY	-	9	-	-	-	-
hsTYR purifiée	-	0.35 ± 0.04	-	1.02 ± 0.04	-	1.2 ± 0.2
MNT-1 lysats	16.6 ± 0.3	-	30 ± 2	-	34 ± 3	-
MNT-1 cellules entières	85.3 ± 0.6	-	120 ± 10	-	119 ± 1	-

<u>Tableau 6</u>: Valeur des IC₅₀ et des K_i des dérivé **50-52** testées sur abTY/hsTY isolées et sur lysat/cellule MNT-1

Il souffre aussi d'une faible solubilité dans l'eau. Les résultats obtenus combinés à des études de QM/MM ont permis de mettre en évidence des interactions entre les aurones et les tyrosinases¹²², conduisant le laboratoire à se tourner vers la synthèse de nouveaux composés. Cette nouvelle série sera centrée sur la modification de motifs non oxydables sur le cycle B, capables d'induire un ancrage solide dans le site actif (*Schéma 11*).



<u>Schéma 11</u>: Aurone 50 (Z)-1-hydroxy-5-((6-hydroxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene)methyl)-pyridin-2-one en interaction avec les résidus éloignés du site actif et le centre à cuivre

Elle inclura des groupements sur le cycle A favorisant les interactions localisées dans une boucle distante et flexible 302-310 du site actif (spécifique de *hs*TYR) composée 72

notamment des résidus polaires His304, Lys306 et Arg308. D'autres modifications sont en outre prévues sur le cycle C, à proximité du résidu Ile368, afin d'explorer l'impact de squelettes voisins des aurones (*Schéma 11*).

Comme indiqué dans le **Chapitre I**, la littérature contient de nombreux inhibiteurs d'*ab*TY, une enzyme facilement accessible commercialement. En revanche, le développement d'inhibiteurs de *hs*TYR est encore une thématique balbutiante. Seule une poignée d'études récentes s'appuient sur ce type d'évaluation. C'est pourquoi nous souhaitons explorer le site actif de *hs*TYR en vue de développer des molécules plus spécifiques et plus actives, en favorisant les interactions avec les résidus éloignés du centre à cuivre.

2. Premier objectif : Synthèse de nouvelles séries

En premier lieu, sur la base des résultats obtenus, **le premier objectif** sera de réaliser une série d'analogues, dans la continuité du développement de dérivés contenant un motif commun de type « résorcinol » présent sur le cycle B. Il s'agira de la série principale de notre chimiothèque (*Schéma 12*). Ce motif est bien connu pour être difficilement oxydable par l'enzyme. En outre, il constitue le groupement de fixation au centre à cuivre dans le cas du thiamidol, le meilleur inhibiteur actuellement décrit. Des motifs alternatifs seront conçus et constitueront de petites séries annexes.



<u>Schéma 12</u> : Squelette d'une aurone avec modifications du cycle A & B

Les tests biologiques seront d'abord réalisés sur lysats de cellule de mélanome humain MNT-1 au laboratoire, puis les premiers résultats permettront de déterminer les IC₅₀ de tous nos composés. Ces investigations orienteront nos synthèses vers des composés plus sélectifs/actifs et plus prometteurs, évalués à travers une batterie de tests sur cellules, enzyme isolée et test de cytotoxicité, en collaboration avec l'Université d'Aix-Marseille et avec le Technion – Israel Institute of Technology d'Haifa (Israel). De manière générale, les aurones ne représentent pas une classe de composés cytotoxiques¹³⁴. Okombi & *al*.¹³¹ ont également montré que plusieurs dérivés d'aurones, testés chez le rat *via* ingestion oral et chez le lapin pour des tests d'irritations oculaire et dermatologique aiguë¹³¹ se sont révélés peu toxiques. Aucun effet nocif n'a été relevé, ce qui fait des aurones *a priori* des candidats viables pour ce projet.

I. Conception du test sur lysats MNT-1 pour orienter les synthèses

Les tests *in vitro* ont été réalisés sur des lysats cellulaires de mélanome neuroectodermique humain MNT-1 (fournis par Marc Maresca de l'Université Aix-Marseille). En plus d'être facilement cultivables, ces cellules sont d'origine humaine et surexpriment *hs*TYR, à l'inverse d'autres lignées cellulaires qui expriment la tyrosinase à des niveaux plus faibles comme les cellules NHEK/NHEM.

Dans un premier temps, les cellules MNT-1 congelées sont lysées dans un tampon de lyse PBS/Triton 1X, puis le surnageant, séparé du culot *via* une centrifugation, est récupéré puis dilué, de façon à obtenir un volume suffisant pour réaliser une plaque 96 puits. Les inhibiteurs sont ensuite dilués à partir d'une solution mère de façon à obtenir une courbe à sept points permettant de déterminer les IC₅₀.

L'absorption de la lumière à 600 nm par les molécules formées dans les puits est mesurée. Elle est dépendante de la transformation du substrat, le L-DOPA, en mélanine et intermédiaires de la mélanogenèse : ainsi, la formation de ces espèces est quantifiée en temps réel. Il est également possible de réaliser les lectures à 475 nm en mesurant la formation de dopachrome, ce qui avait été envisagé initialement, mais certaines aurones et autres indigoïdes absorbent à cette longueur d'onde et interfèrent avec les mesures. La lecture à 600 nm nous a permis d'observer la formation de mélanine et de nous affranchir de cette contrainte. Lorsqu'un inhibiteur est peu ou pas actif, il est possible d'observer la formation de mélanine à l'œil nu, qui provoque un noircissement des puits. Ces résultats sont traités par GraphPad Prism afin de déterminer les IC₅₀.

II. Générations successives d'inhibiteurs de la série principale : Résorcinol

1. Modulation du cycle A

En accord avec les travaux antérieurs, des modifications avaient déjà été effectuées permettant d'introduire des substituants capables de former des liaisons hydrogènes avec les résidus polaires du site actif. Pour cela, des aurones hydroxylées, polyhydroxylées, méthoxylées ou *o*-alkylés sur les positions du cycle A, avaient déjà été synthétisées. Ces aurones (*Schéma 13*) ont par la suite été testées lors d'une première campagne.



<u>Schéma 13</u>: Structure des composés 53-64 (Modification du cycle A)

À première vue, en cohérence avec les observations réalisées sur le composé **50**, il semblerait que la présence d'un hydroxyle sur le cycle A en position 6 soit bénéfique pour l'activité. En effet, contrairement à l'aurone **53** (IC₅₀ = 18 ± 2 μ M), sans hydroxyle, l'analogue **56** fait partie des composés les plus actifs de la série (IC₅₀ = 6,4 ± 0,8 μ M) (*Graphique 1*).



Graphique 1 : IC50 des composés 53-64 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

C'est également le cas pour l'analogue **57** méthoxylé dans la même position (IC₅₀ = 6,9 ± 0,4 μ M), à l'inverse du composé **58** alkylé par un butyle (IC₅₀ > 100 μ M), laissant supposer que la taille de la chaîne à cette position joue un rôle crucial dans l'activité. Les dérivés **54** et 5**5** présentant un hydroxyle en positions 4 (IC₅₀ = 25 ± 2 μ M) et 5 (IC₅₀ = 19 ± 1 μ M) ont été écartés. Les composés dihydroxylés en position 4,6 ou 6,7, respectivement **61** (IC₅₀ = 7,7 ± 0,8 μ M) et **62** (IC₅₀ > 100 μ M), se sont avérés moins actifs que leurs analogues monohydroxylés **56** et **59** (*Schéma 14*).



IC50 (µM) 120 100 100 80 60 37 40 18,4 9 20 0 65 66 67 68

<u>Schéma 14</u> : Structure des composés 65-68 (Modifications du cycle A)

<u>Graphique 2</u> : IC₅₀ des composés **65-68** déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

Ces résultats préliminaires nous ont permis de guider nos premières modulations, en particulier sur la position 6 avec des groupements : diméthylamino et amino, pouvant former des liaisons hydrogènes avec des résidus à proximité.

Ces modifications prévues pour favoriser les liaisons hydrogènes entre l'azote et les résidus éloignés de la boucle His304, Lys306 et Arg308, se sont révélées peu efficaces, excepté pour **66** (IC₅₀ = 9 ± 0,7 μ M), qui présente une amine primaire plus polaire que les amines alkylées. L'activité de **67** provient probablement de la contribution de l'hydroxyle en position 4, dont la valeur d'IC₅₀ (18,4 ± 0,7 μ M) est proche de celle du composé **54** ; l'évaluation du dérivé **65** confirme cette tendance, puisque le groupement *N*-diméthylamino seul sur le cycle A en position 6 n'apporte pas d'activité. Un groupement morpholino a également été introduit à la même position. En effet, ce groupement a été identifié comme capable de cibler spécifiquement les mélanosomes grâce à son caractère acido-basique lui permettant de s'accumuler spécifiquement¹³⁵. Néanmoins l'activité du dérivé **68** (IC₅₀ = 37 ± 2 μ M) reste faible (*Graphique 2*).

Ces résultats nous indiquent que la présence de groupements polaires et protiques (hydroxyle ou amine primaire) est favorable pour interagir avec les résidus à proximité du cycle A, ce qui reste cohérent avec l'hypothèse d'une interaction avec la boucle flexible 302–310 (*Schéma 14*).

Il a également été envisagé d'introduire des groupements halogénures (fluor et iode) sur ce même cycle à différentes positions. Cette approche se base sur l'analogie qui existe entre une liaison hydrogène et une liaison halogène : il s'agit là aussi d'une interaction entre un donneur et un accepteur d'électron. À l'inverse d'une liaison classique où l'hydrogène joue le rôle d'accepteur d'électron, en acceptant une densité électronique provenant d'un atome plus électronégatif, comme l'oxygène ou l'azote, ici l'accepteur d'électron¹³⁶ est l'halogène. C'est dans cette optique que trois composés ont été synthétisés (<u>Schéma 15</u>).





<u>Schéma 15</u> : Structure des composés 69-71 (Modifications du cycle A)



Parmi les trois dérivés halogénés **69-71** ci-dessus, seul le dérivé **69** présente une faible activité ($IC_{50} = 32 \pm 1 \mu M$). Néanmoins la présence de l'hydroxyle en position 6, indique que l'iode pourrait ne pas être un choix judicieux car sans présence d'iode sur le cycle A, les valeurs d'inhibition sont meilleures avec le composé **56**. La synthèse de composés halogénés sur le cycle A n'a donc pas été poursuivie (*Graphique 3*).

La structure du composé **59** (IC₅₀ = 1,57 ± 0,09 μ M), avec un hydroxyle en position 7, s'est enfin avérée particulièrement intéressante. Elle a servi de point de départ pour la synthèse de nouveaux composés avec des hydroxyles en position 6 ou 7. L'identification de ces substituants optimaux sur le cycle A ont constitué un jalon important pour élargir le champ de recherche vers de nouveaux composés modifiés sur le cycle C, incluant notamment le remplacement de l'oxygène intracyclique par d'autres hétéroatomes et la suppression du carbonyle.

2. Modulation du cycle C

a) Sans substituant sur le cycle A

Ces modulations ont été réalisées à titre exploratoire, sans substituant sur le cycle A pour des raisons de facilité de synthèse. C'est dans cette optique qu'une série de composés présentant divers hétéroatomes sur le cycle C a été conçus (<u>Schéma 16</u>).



<u>Schéma 16</u> : Structure des composés 72-80 (Modifications du cycle C)

Parmi les composés testés jusqu'ici, aucune modification n'a été effectuée sur le cycle C : en effet, l'oxygène intracyclique ainsi que la double liaison étaient présents sur la totalité des aurones **53**-7**1**. La présence d'atomes moins volumineux et sans doublet électronique libre comme le carbone s'est avérée être une excellente piste pour poursuivre nos investigations comme l'indique le dérivé **72** (IC₅₀ = 5,8 ± 0,6 μ M), plus actif que son analogue **53** (*Graphique 4*). À partir du synthon 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one, la synthèse des dérivés **73** (IC₅₀ = 8,2 ± 0,3 μ M) et **74** (IC₅₀ >100 μ M) a été réalisée. Il semblerait que la présence d'un carbonyle supplémentaire sur **74** fasse diminuer l'activité ; cela pourrait s'expliquer par le caractère polaire, aprotique du groupement et sa géométrie plane, mais aussi par la conjugaison de la double liaison avec les deux carbonyles, pouvant générer une charge supplémentaire cette fois-ci en position 1 de l'indanone. Cette tendance s'est confirmée avec le composé **75**, contenant lui aussi un carbonyle en position 1 (>100 μ M). Il contient également un azote intracyclique, permettant de s'affranchir de la double liaison et ainsi permettre la rotation du cycle B, ce qui est impossible avec les aurones classiques. Cette libre rotation que l'on retrouve également avec **76** (IC₅₀ >100 μ M), confirme les résultats précédents : elle ne semble pas être bénéfique, même avec **76** qui présente un azote intracyclique à la place de l'oxygène (*Schéma 16*).



Graphique 4: IC₅₀ des composés 72-80 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

Le composé **73** (IC₅₀ = 8.2 ± 0,3 μ M), qui contient cette fois-ci un carbone asymétrique portant un méthyle en position 1, a été testé en mélange racémique. Initialement envisagée, la séparation des deux énantiomères pour évaluer l'impact des configurations *R* et *S* n'a pas été réalisée faute de temps. Néanmoins, ces premières informations nous montrent que la présence d'un groupement apolaire aprotique sortant du plan de la molécule, ici porté par un carbone, pourrait être bénéfique pour l'activité et permettre d'augmenter les interactions hydrophobes avec des résidus du site actif comme Ile368, supposément proche du cycle C.

Nos recherches nous ont ensuite menés vers les familles des hémithioindigos (HTI) et hémiindigos (HI), des alternatives respectivement soufrées et azotées des aurones. Ces familles de composés présentent certaines particularités photochimiques intéressantes pour notre projet, détaillées plus bas dans « Caractéristiques et Fluorescences », mais surtout leurs propriétés biologiques sont encore peu connues et pourraient présenter un potentiel pour le développement d'inhibiteurs de la *hs*TYR.

Le premier HI testé, **77** (IC₅₀ = 12,7 ± 0,7 μ M), s'est montré un peu plus actif que son analogue **53**. Ces résultats ainsi que les observations précédentes ont abouti à la synthèse des composés **78** et **79** sur lesquels l'azote a été méthylé (composé **78**, IC₅₀ = 55 ± 6 μ M) et propylé (composé **79**, IC₅₀ > 100 μ M) (*Graphique 4*). La longueur de la chaîne alkyle est un facteur sensible pour l'activité puisqu'une chaîne trop longue semble diminuer l'activité, comme le montre le composé **79** comparé à **78**. La baisse d'activité de **78** comparé à **73** peut se justifier par la position du méthyle dans l'espace. En effet, la valeur de l'angle dièdre du composé **73** est de ± 109,8° dû au carbone asymétrique, nettement différent de la valeur de l'angle dièdre de **78** égale à 0°.

Par la suite, les synthèses se sont axées vers le développement d'HTIs. En effet, le remplacement de l'oxygène par un soufre permet d'évaluer l'effet d'un atome plus volumineux (rayon de 100 pm contre 60 pm) et moins électronégatif (2,58 contre 3,44), avec un effet possible des orbitales 3d dans l'interaction.

Le premier HTI isolé (composé **80**) s'est montré tout aussi actif ($IC_{50} = 5,9 \pm 0,4$) que l'indanone **72** et plus actif que l'HI **77**. Ces nouvelles informations nous ont amené à modifier le cycle A de ces nouveaux hémiindigoïdes, en ajoutant des hydroxyles aux positions 6 et 7, qui se sont déjà révélés favorables (*Schéma 13*).

b) Avec substituants présents sur le cycle A

Sur la base des résultats précédents, trois séries d'hémiindigoïdes ont été préparées, contenant respectivement un carbone, un azote et un soufre intracyclique (*Schéma 17*).

Les synthons de départ pour la synthèse des indanones étant facilement accessibles commercialement, le composé **82** a été rapidement synthétisé puis comparé avec les composés **81** et **83** déjà disponibles au laboratoire (*Graphique 5*). Les résultats ont confirmé nos attentes : en effet les dérivés **81** et **82** (respectivement $IC_{50} = 3,4 \pm 0,2 \mu M$ et $1,6 \pm 0,2 \mu M$) se sont avérés plus actifs que l'analogue **72** sans substituant ; mais similaires aux aurones **56** et **59**. Ces résultats renforcent une nouvelle fois l'intérêt d'obtenir des dérivés substitués avec des hydroxyles en position 6 ou 7, y compris avec des cycles C modifiés. Quant au composé **83** également testé, on retrouve une valeur d'IC₅₀ (7,4 ± 0,6 μ M) quasi identique à son analogue **61** (*Schéma 13*).



Schéma 17 : Structure des composés 81-88 (Modifications du cycle A & C)



Graphique 5: IC50 des composés 81-88 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

L'introduction d'un hydroxyle en position 6, sur l'hemiindigo **84** (IC₅₀ = 2,3 ± 0,3) a permis de diviser par trois la valeur de l'IC₅₀ du dérivé **77.** L'introduction d'un hydroxyle en position 7 sur l'HI n'a malheureusement pas pu être effectuée par manque de temps, mais aurait constitué une perspective très prometteuse à court terme. Contrairement aux hémiindigos, les HTIs **85** et **86** contenant un hydroxyle en position 6 ou 7 (respectivement $IC_{50} = 48 \pm 3 \mu M$ et $IC_{50} = 5,8 \pm 0,4 \mu M$) n'ont pas permis d'améliorer l'activité de l'hemithioindigo **80** ($IC_{50} = 5,9 \pm 0,4$) qui ne présente aucun hydroxyle sur son cycle A. L'introduction d'un phénol en position 7 n'a pas mené à une meilleure activité, l' IC_{50} de **85** étant quasiment 10 fois supérieure à celle de **80**. L'introduction d'un phénol en position 5 sur l'hémiindigo n'a pas été effectuée étant donné le faible potentiel de l'hémithioindigo correspondant **87** ($IC_{50} = 37 \pm 2 \mu M$).

Également en position 7, l'introduction d'un acide carboxylique a été réalisée mais l'analogue **88** obtenu s'est révélé inactif. Ce composé **88** ouvre cependant la voie à des modulations ultérieures sous forme d'amine ou d'ester.

Ces résultats confirment la tendance des premières valeurs d'IC₅₀ obtenues sur les aurones monohydroxylées en position 6 et 7, ce qui nous a poussé à orienter nos synthèses vers des composés contenant un hydroxyle en position 7 préférentiellement. En effet, l'analyse des relations structure-activité montre clairement que ces positions semblent essentielles pour améliorer l'activité des composés contre *hs*TYR.

Jusqu'ici nous avions concentré nos efforts sur la synthèse de composés se rapprochant du squelette des aurones, alors que d'autres flavonoïdes se rapprochant de ce squelette pourraient également avoir une activité contre *hs*TYR.

c) Activité d'autres Flavonoïdes (chalcone/flavone)

Ces analogues s'inscrivent également dans la synthèse de composés contenant un cycle B avec le motif résorcinol mais dont le cycle central C est fortement modifié.

Les chalcones et les flavones font partie, comme les aurones, des flavonoïdes d'origine végétale. Une chalcone **89** et une flavone **90** ont été testées sur lysat de cellule MNT-1 afin de comparer leur potentiel avec celui des aurones et ainsi s'assurer de l'apport particulier de ce dernier squelette (*Schéma 18*).



<u>Schéma 18</u> : Structure des composés 89-90 (Modifications du cycle C)

Aucun des flavonoïdes **89** ou **90** n'a montré une quelconque activité. Néanmoins, ces résultats ont confirmé que les trois flavonoïdes, qui partagent des substitutions similaires, montrent des différences d'activité très importantes. Ainsi, seul le squelette aurone semble être actif contre *hs*TYR.

d) Activité des Benzofuranes

Ces composés se rapprochent fortement d'un squelette aurone, puisqu'ils contiennent trois cycles notés par analogie avec les aurones A, B et C, ainsi qu'un phénol en position 7, introduit sur la base des résultats collectés jusqu'ici (*Schéma 19*). À l'inverse des hémiindigoïdes de cette librairie, la cétone intracyclique n'est pas présente sur ces dérivés. En effet le but est de remplacer cette cétone par d'autres groupements : soit en la supprimant par une réduction comme sur **91** (IC₅₀ > 100), soit en synthétisant des composés comme **92** et **93** (IC₅₀ > 100), en greffant des groupements apolaires comme un méthyle ou polaire comme une amine primaire. La synthèse de ce type de composé entraîne non seulement la suppression de la cétone qui favorise l'aromaticité du cycle C mais aussi l'introduction d'un carbonyle à la place du proton vinylique des aurones, maintenant le caractère plan des indigoïdes. Ceci permet d'explorer de nouvelles interactions potentielles et de déterminer si la présence de la double liaison et de la cétone est nécessaire pour l'activité (*Graphique 6*).



<u>Graphique 6</u>: IC₅₀ des composés **91-93** déterminés sur lysats cellulaires MNT-1



<u>Schéma 19</u>: Structure des composés **91-93** (Modifications du cycle C)

Ces résultats préliminaires tendent à établir un lien défavorable entre les modifications proposées et l'activité. Cependant, pour établir un lien clair et direct, il faudrait poursuivre ces synthèses afin d'isoler des dérivés ne contenant pas de carbonyle en R₂ comme les exemples **94** et **95** qui permettraient de comparer directement les modifications en position 3 avec l'aurone correspondante (*Schéma 20*).

Pour cela, des essais de réduction des cétones des composés **92** et **93** sont en cours.



<u>Schéma 20</u> : Structure des futurs composés 94 & 95

III. Générations successives d'inhibiteurs de séries annexes

Ces nouvelles séries s'inscrivent dans la conception de nouveaux cycles B, afin d'obtenir de nouveaux motifs non oxydables comme chélateurs du cuivre, capables d'améliorer les capacités d'inhibition des composés actuels.

1. Série diméthylamino

Cette série a été développée pour plusieurs raisons : d'une part pour les capacités d'inhibition déjà connues contre la tyrosinase de champignon¹³⁷ de dérivés présentant un motif diméthylamino, et d'autre part pour mimer un motif aminé d'histidine pour favoriser les interactions avec le centre à cuivre¹³⁸ (*Schéma 21*).

Cette série s'est montrée inefficace contre *hs*TYR. En effet sur les deux composés synthétisés, aucun n'a montré une activité contre la cible (IC₅₀ >100 μ M) (*Graphique 7*).



R A C B 96 : R = H 97 : R = OH

<u>Graphique 7</u>: IC₅₀ des composés **96 & 97** déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

<u>Schéma 21</u> : Structure des composés 96 & 97 (Modifications du cycle B)

2. Série halogénée

Cette série a été imaginée à partir des travaux de Ferro & $al.^{139}$ portant sur l'inhibition de abTY, qui ont permis d'obtenir des cristaux montrant que le fluor se situait en interaction avec le centre à cuivre (<u>Schéma 22</u>). Cette position est favorisée par des interactions de π -stacking avec l'histidine 208 et le fluorobenzyle de la molécule co-cristallisée. D'après l'étude, le fluor permettrait de stopper l'activité enzymatique en empêchant l'oxygène de se lier au site actif.



<u>Schéma 22</u>: Modélisation moléculaire du fluorobenzyle stabilisé par π -stacking avec l'histidine 208 dans le site actif de abTY¹³⁹

Une nouvelle série de treize dérivés halogénés a ainsi été constituée avec différents atomes d'halogène, avec la présence ou non de substituants hydroxyle/méthoxyle sur le cycle A (<u>Schéma 23</u>).



<u>Schéma 23</u> : Structure des composés 98-110 (Modification du cycle A & B)

Toutes les positions du cycle B ont été explorées avec trois halogènes différents, le fluor (98-104), comme mentionné dans les travaux de Ferro *& al.*, mais également le brome (105-107) et le chlore (108-110). En effet, les atomes d'halogène présentent des rayons atomiques variés et peuvent par conséquent interagir différemment avec les centres à

cuivres de différentes tyrosinases, qui ne sont pas identiques. Les positions du cycle A ont également été fonctionnalisées avec des hydroxyles dans les positions 6 ou 7, uniquement pour les dérivés avec le fluor en position 4' (**101** et **104**). Le composé **102** contient quant à lui deux hydroxyles en positions 4 et 6.

Enfin, le composé **103**, déjà disponible au laboratoire et qui représente l'analogue méthoxylé du dérivé **102**, a également été évalué. Malheureusement, aucun des composés de cette série n'a montré une quelconque activité (IC₅₀ > 100 μ M) (*Graphique 8*).



Graphique 8 : IC50 des composés 98-110 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

3. Série Catéchol/Résorcinol monométhoxylée

Cette série poursuit l'étude de nouveaux groupements présent sur le cycle B à partir des motifs résorcinol et catéchol.

Ces motifs sont monohydroxylés en position 2' pour le résorcinol et en 3' pour le catéchol, le phénol en position 4 étant laissé libre pour interagir avec le centre à cuivre. Les composés **111-118** ont été synthétisés à partir de benzofuran-3(2*H*)-one, 6hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one, 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one et 5-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one. Néanmoins, aucun des huit composés obtenus n'a montré une quelconque activité (IC₅₀ > 100 μ M) (*Schéma 24* et *Graphique 9*).



<u>Schéma 24</u> : Structure des composés **59-66** (Modification du cycle A, B & C)

Il semblerait que la présence d'hydroxyle en position 2' présent sur le résorcinol soit fondamentale pour conserver l'activité. Les analogues 2'-méthoxy et 3'-méthoxy sont en effet inactifs.



Graphique 9: IC50 des composés 111-118 déterminés sur lysats cellulaires MNT-1

IV. Tests sur enzyme isolée des composés les plus prometteurs



Les résultats préliminaires obtenus sur lysat MNT-1 nous ont permis d'isoler deux molécules analogues, **59** et **82** (IC₅₀ = $1.57 \pm 0.09 \mu$ M et $1.6 \pm 0.2 \mu$ M, respectivement). Ces deux molécules ont été envoyées à l'institut de Technologie d'Haifa en Israël dans le but 88

de déterminer leurs propriétés cinétiques sur l'enzyme isolée *hs*TYR. Ce test réalisé en collaboration avec l'institut technologique Technion en Israël, a été effectué sur des cellules HEK-293TYR. Les résultats ont révélé que les dérivés 5**9** et **82** se comportaient comme des dérivés majoritairement compétitifs avec des K_i de 0.55 ± 0.09 µM et 0.25 ± 0.04 µM, respectivement (*Figure 6*). L'acide kojique a été utilisé comme référence. Les valeurs ont montré que le K_i sur *hs*TYR issue de cellules HEK-293TYR était trois fois supérieur ($K_i = 1100 \pm 300 \mu$ M) à celui relevé sur *hs*TYR issue de cellules Sf9 ($K_i = 350 \pm 70 \mu$ M). Cette particularité montre que les valeurs de K_i peuvent varier d'un système à un autre, en fonction du système d'expression de la tyrosinase (*Tableau 7*).

Inhibiteurs	Type d'inhibition	K _i (μM)	K _m (μΜ)	V _{max} (µmol min⁻¹ mg-¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	α
59	Compétitif (partiel)	0.55 ± 0.09	143 ± 7	4.86 ± 0.07	5.41	3.5 ± 0.2
82	Compétitif (partiel)	0.25 ± 0.04	161 ± 6	5.18 ± 0.06	5.78	3.0 ± 0.1
Acide kojique	Mixe	1100 ± 300	310 ± 20	5.2 ± 0.1	5.8	0.16 ± 0.05
Acide kojique testé sur <i>hs</i> TYR provenant de cellules sf9	Mixe	350 ± 7072				0.73 ± 0.19

<u>Tableau 7</u> : Analyse cinétique des dérivés **59** et **82** – Acide kojique en référence – Testés sur cellule HEK-293TYR

Les K_i des dérivés **59** et **82** sont du même ordre que celui du thiamidol¹⁰⁹ (K_i = 0.25 µM), le composé le plus actif identifié à ce jour. Ces valeurs sont nettement plus basses que celles du 4-butylrésorcinol, du 4-hexylrésorcinol ou encore du 4-phényléthylrésorcinol (K_i = 9.1, 39 et 24 µM, respectivement).



Figure 6 : Courbes de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk de hsTYR avec le L-DOPA comme substrat et **82** comme inhibiteur. Concentrations en L-DOPA : 65-1375 μM. Concentration de **82** (μM) : (a ●) 0, (b ∇) 0.5, (c ♦) 2 et (d □) 8. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicats

V. Conclusion & Perspectives

Parmi tous les inhibiteurs synthétisés depuis le début de ce projet, plusieurs motifs sur le cycle B ont été testés. À ce jour, seuls les composés contenant le motif 2,4-résorcinol (*Schéma 25* – en vert) sur le cycle B ont montré un IC₅₀ inférieur à 100 μ M contre notre cible, la tyrosinase humaine. Aucun autre motif chélateur du cuivre et non oxydable n'a permis jusqu'ici d'obtenir des molécules actives au laboratoire.

L'étude des relations structure-activité du cycle A a révélé que l'introduction d'hydroxyles en position 6 ou 7 conduisaient à des molécules plus actives (*Schéma 25* – en rouge). Au début de ce projet, seule la présence d'un hydroxyle en position 6 était connue pour être favorable à l'activité d'inhibition contre *hs*TYR, comme cela avait été observé avec l'aurone-HOPNO **50**, présentant un hydroxyle à cette position. À l'issue de ce travail, la position 7 semble très prometteuse, comme le montre le composé **59** (IC₅₀ = 1.57 ± 0.09 μ M et *K_i* = 0.55 ± 0.09 μ M) qui est l'une des aurones les plus actives de notre librairie. En effet, la présence d'un groupement de type polaire et protique semble favoriser les interactions avec certains résidus de la seconde sphère de coordination du site actif tels que la Lys306.

La modulation du cycle C a ensuite conduit au changement de l'oxygène intracyclique par un carbone et différents hétéroatomes : soufre et azote (*Schéma 25* – en orange). Ces modifications ont conduit à la découverte de l'inda-aurone **82** (IC₅₀ = 1.6 ± 0.2 μ M et K_i = 0.25 ± 0.04 μ M), qui contient également un hydroxyle en position 7. Par ailleurs, une importante tolérance a été observée quant à la nature de l'atome intracyclique.



Schéma 25 : Résumé de l'étude RSA

Cette librairie nous permet de dégager de nouvelles perspectives de structures pour de nouveaux composés susceptibles d'être plus actifs contre *hs*TYR. Pour confirmer ces premiers résultats, nous pourrions synthétiser d'autres composés présentant des groupements polaires et protiques en position 7 avec l'introduction d'une amine primaire ou secondaire, d'un acide carboxylique ou d'un thiol.

3. Second objectif : Détermination des propriétés de fluorescences des aurones préparées dans le but de les utiliser comme sondes pour la détection de *hs*TYR

I. Détection de la tyrosinase

Les premières méthodes de reconnaissance spécifique de la tyrosinase se basaient sur des tests colorimétriques traditionnels, mais ces techniques ont montré un seuil de sensibilité limité¹⁴⁰. Par la suite, d'autres méthodes de détection basées sur l'électrochimie ou des nanoparticules ont été développées. Ces techniques ont permis non seulement d'augmenter la sensibilité des tests colorimétriques mais également la polyvalence de détection^{141,142}. Parmi les sondes développées, plusieurs exemples s'appuient sur une stratégie de type *turn-off* (*Schéma 26*) qui consiste à mesurer l'extinction de fluorescence concomitante à la transformation d'un substrat fluorescent par l'enzyme, souvent de type phénol ou catéchol.



<u>Schéma 26</u> : Fonctionnement des sondes fluorescentes : turn-on, turn-off, ratiométrique

Des stratégies innovantes basées sur les propriétés de quantums dots semi-conducteurs (CdSe-ZnS) permettant de sonder l'activité de la tyrosinase ont ainsi fait leurs preuves dans le développement de sondes biologiques¹⁴³. Bien que ces techniques soient innovantes, d'autres sondes plus petites permettant d'augmenter la sensibilité, la spécificité et surtout la compatibilité des sondes envers leurs cibles ont permis de limiter la fluorescence résiduelle, qui reste importante avec cette approche.



<u>Schéma 27</u> : Mécanisme par clivage (à gauche). Mécanisme par interruption de PET (à droite)

Ces observations ont mené les chercheurs vers une stratégie inverse, dite *turn-on* (*Schéma 26*), qui mesure l'apparition de fluorescence après transformation d'un substrat fluorogénique par l'enzyme. Ce concept fonctionne selon deux mécanismes principaux. Un premier mécanisme par clivage est initié par oxydation du substrat (catéchol ou phénol) présent sur la sonde, provoquant la libération du fluorophore et permettant d'augmenter la fluorescence. Un second mécanisme d'interruption du PET (Photoinduced Electron Transfer) consiste en un transfert d'électron à l'état excité entre le groupement hydroxyphényle vers un autre motif. Ce transfert est interrompu lorsque le groupement est oxydé par la tyrosinase pour donner une *ortho-quinone*, permettant alors d'observer une fluorescence¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ (*Schéma 27*).

Cette approche présente quelques limitations liées aux motifs oxydables de type 3,4dihydroxyphényle ou 4-hydroxyphényle. Ces motifs peuvent également être oxydés par les ROS, des entités présentes en particulier dans le contexte cancéreux, et par conséquent poser des problèmes d'interférences. En effet, la détection de plusieurs espèces avec de tels motifs a été rapportée dans la littérature, telles que H₂O₂¹⁴⁷, O₂-¹⁴⁸ ou encore ONO₂-¹⁴⁹. Il existe des moyens permettant de s'affranchir de ce type de limitations en s'écartant des motifs présents sur les substrats des tyrosinases. C'est le cas par exemple du motif 3hydroxyphényle¹⁵⁰. Néanmoins, dans le cas du ciblage de *hs*TYR, la présence d'autres enzymes de type oxydase comme la glucose oxydase ou *hs*TYRP1 qui est structurellement proche de la *hs*TYR, peut amener à une compétition éventuelle avec l'oxydation du substrat par *hs*TYR. De plus, les constantes cinétiques des tyrosinases de mammifères sont plus lentes : *hs*TYR est ainsi peu efficace pour oxyder les substrats naturels (*L*tyrosine ou *L*-DOPA) comme non-naturels (autres catéchols et phénols). À titre d'exemple, la valeur du *K*_m de la *L*-dopa sur la tyrosinase humaine est presque 3 fois inférieure (0,34 ± 0,03 mM) à celle de champignon (0,80 ± 0,03 mM)⁷².

Une approche différente consiste à développer des sondes ratiométriques, se basant sur un rapport d'intensités indépendant de la concentration. Cette dernière permet de s'affranchir de l'intensité de fluorescence qui est l'un des paramètres les plus communément mesurés, parfois responsables de résultats artéfactuels, directement liés aux variations des concentrations locales. Certaines de ces sondes, à base de naphtalimide, ont été développées pour détecter la tyrosinase et ont montré une sélectivité et une sensibilité élevées : plusieurs d'entre elles ont été conçues pour être utilisées en milieu aqueux, mais peu en milieu membranaire. Ces sondes peuvent être utilisées sur des systèmes vivants pour l'étude de fonctions enzymatiques^{150,151}.

D'autres sondes possèdent des propriétés de fluorescence intrinsèque. Ces sondes sont sensibles aux changements que peut subir leur environnement local. Leur comportement se manifeste par une variation d'intensité de fluorescence et de couleur lorsque leur environnement est modifié, sans l'action extérieur d'une enzyme ou réaction chimique¹⁵². Elles associent souvent un groupement donneur et un groupement accepteur d'électrons. Ce dipôle crée un transfert de charge entre ces deux parties qui se produit à un état hautement photoexcité, qui génère un effet *push-pull* (*Schéma 28*). Cet effet est contrôlé par la polarité du solvant : souvent quenché dans des solvants protiques polaires en raison du transfert d'électrons et du *twisted intramolecular charge transfer* (TCIT), il a pleinement lieu dans des environnements apolaires et mène à l'émission de fluorescence.



Schéma 28 : Transfert de charge par effet push-pull

En raison de la sensibilité à la polarité des aurones, nous nous proposons de développer à partir de ce squelette des sondes permettant de détecter *hs*TYR. En effet certaines aurones possèdent une fluorescence résiduelle dans l'eau qui augmente sensiblement dans un milieu apolaire. Elles fournissent également un moyen simple et facile de détection, non invasif, et ne provoquent pas de dommages collatéraux, contrairement à certains fluorophores greffés (cytotoxicité, mauvaise pénétration cellulaire et/ou perte d'affinité pour la cible).^{153,154} (*Schéma 29*).



Schéma 29 : Design de sondes sensibles à un environnement précis

Nous avons obtenu des résultats préliminaires en exploitant les propriétés de l'aurone **54** connue comme ayant une activité contre *ab*TY ($IC_{50} = 9 \mu M$)¹¹⁹ dans une stratégie de type *turn-on*. Comme nous l'attendions, nous avons observé une faible intensité de fluorescence de l'aurone en solution (à 0,3 μ M) dans un tampon Tris (en bleu). Après addition d'*ab*TY, l'intensité observée est 6 fois plus importante, montrant que l'environnement de l'inhibiteur change lors de l'ajout d'*ab*TY (*Schéma 30*). En effet, le site

actif de l'enzyme étant hydrophobe, l'effet *push-pull* est observé à travers une augmentation de fluorescence. À noter que la structure et les propriétés photophysiques de l'aurone ne sont pas optimales : il s'agit d'un premier test.



<u>Schéma 30</u> : Aurone **54**, excitée à 423 nm dans un tampon Tris à pH 7.5, sans abTY (en bleu), avec abTY à 15 μM (rouge).

Diverses modifications des cycles A et B peuvent être envisagées pour améliorer cet effet *push-pull* et mieux observer la sonde à l'état « on ». Nous avons par conséquent synthétisé de nouveaux cycles B comme indiqué plus haut dans la discussion. Parmi ces optimisations, on retrouve notamment la présence de groupements amino ou hydroxyle en position 4' et méthoxyle en position 2' ou 3'. En effet, le groupement amino en position 4' est électrodonneur du fait de la disponibilité du doublet présent sur l'azote et permet ainsi de générer par mésomérie la base de l'effet *push-pull* grâce au caractère donneur- π -accepteur. Il a également été rapporté que le motif benzofuranone était fortement impliqué puisqu'il jouait le rôle d'accepteur et que son caractère électroattracteur pouvait être amplifié grâce à certains substituants, eux-mêmes électroattracteurs : F, CF₃, ou NO₂ par exemple, comme le montre le *Schéma 28*. Mais surtout ces groupements introduits spécifiquement en position 4 mèneraient à des dérivés fortement dipolaires conduisant à des déplacements de Stokes plus larges qu'avec les sondes conventionnelles, critère crucial pour des applications biologiques^{155,156} (*Schéma 31*).



<u>Schéma 31</u> : Design de sonde avec des groupements électroattracteurs en position 4, amplifiant l'effet pushpull

Ce deuxième objectif a pour but de produire de nouvelles sondes intelligentes capables de détecter la présence de *hs*TYR, en ciblant spécifiquement sa structure. Avec cette approche nous souhaitions éviter les nombreuses limitations évoquées plus haut des biocapteurs classiques consistant à détecter la capacité enzymatique d'une protéine et non sa présence. Le défi majeur consiste à maintenir l'affinité de nos composés les plus actifs en améliorant leurs paramètres photophysiques.

Avec les résultats préliminaires discutés précédemment, nous avons émis l'hypothèse que la présence du groupement phénol en position 4' sur le résorcinol pourrait conserver le potentiel donneur- π -accepteur présent avec les motifs amino. En effet, en plus de ses capacités de chélation, ce motif non oxydable subit une déprotonation lors de sa liaison aux atomes de cuivre, ouvrant la possibilité à une délocalisation de la densité électronique.

II. Évaluation préliminaire des propriétés fluorescentes des molécules actives.

Dans cette optique nous avons sélectionné quatorze de nos inhibiteurs les plus actifs (série résorcinol), qui ont été placés sous l'effet de quatre solvants (Tampon, MeOH, AcOEt, CH₂Cl₂) de polarité différente afin d'observer leur comportement. Leur longueur d'onde d'absorption (λ_{max}) a d'abord été déterminée à température ambiante dans chaque

solvant sur un spectromètre SpectraMax ABS Plus, puis les échantillons ont été excités à température ambiante aux λ_{max} sur un spectromètre de fluorescence Fluoromax-4 afin de déterminer les déplacements de Stokes et leur intensité de fluorescence.

Ces travaux restent préliminaires et s'effectuent sur des molécules non optimisées, afin d'évaluer leur potentiel. Parmi ces composés se trouvent six aurones et cinq indanones (<u>Schéma 32</u>).



<u>Schéma 32</u> : Structure des composés testés en fluorescence (Modifications du cycle A & C)



<u>Graphique 10</u> : Effet de la polarité sur l'intensité de la fluorescence

1. Les Aurones

De manière générale, l'absorption des aurones **53-119** a montré un effet bathochrome avec l'augmentation de la polarité du solvant (CH₂Cl₂ -> Tampon). On observe un déplacement de 5 à 20 nm selon les substitutions. Néanmoins, il subsiste quelques fluctuations, lorsqu'il s'agit de comparer les valeurs relevées dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂) et l'acétate d'éthyle (AcOEt). En effet, les valeurs enregistrées pour le dichlorométhane (solvant le plus apolaire de notre test) sont supérieures ou égales à celles relevées pour l'acétate d'éthyle, plus polaire (*Graphique 11*). Ces résultats sont similaires à l'étude d'Espinosa-Bustos & *al.*¹⁵⁶. Il en est de même pour les maxima d'absorbance, plus élevés pour les composés **53**, **59** et **60** dans le dichlorométhane et bien plus faibles dans le tampon (eau). À l'inverse, pour les composés **56** et **119** l'absorption augmente avec la polarité. (*Graphique 15 – Annexe p.259*).



<u>Graphique 11</u> : Mesure des λ_{max} des composés 53-119 dans 4 solvants différents

La présence de substituants joue un rôle majeur dans la capacité des aurones à absorber dans l'UV-visible. En effet, comme l'indiquent Espinosa-Bustos & *al*.¹⁵⁶ l'insertion de groupements de type méthoxyle sur le cycle A peut influencer l'absorption en fonction de sa position. C'est le cas ici, la comparaison du composé **53** sans substituant avec les dérivés **59** et **119** où un hydroxyle est présent en position 7 permet d'observer un effet

hyperchrome alors qu'avec les composés **56** et **60**, où respectivement un hydroxyle et un méthoxyle sont présents en positions 6, l'effet est inversé (*Graphique 15 – Annexe p.259*). La présence d'une amine primaire en position 6 sur le composé **66** a peu d'effet. Le comportement des aurones peut donc être modulé par le caractère polaire et électrodonneur de certains groupements qui élargissent la conjugaison π du squelette.

Ces substitutions ont un impact direct sur l'intensité de fluorescence, mais aussi sur les déplacements de Stokes et les longueurs d'émission. Toutes les aurones ont montré des déplacements de Stokes d'environ 50-60 nm dans les solvants apolaires contre des déplacements supérieurs dans le tampon d'environ 90-100nm, à l'opposé du composé **59** qui ne montre aucune fluorescence dans le tampon. La fluorescence la plus intense et le déplacement observé le plus large (109 nm dans le méthanol) sont atteints pour la molécule **119**. L'intensité de fluorescence semble très variable, et seuls les composés **53** et **59** adoptent le comportement attendu, même si la fluorescence semble plus importante dans l'acétate d'éthyle que dans le dichlorométhane. Ces mesures ont également été réalisées en présence de tyrosinase de champignon dans le tampon afin d'observer une éventuelle augmentation de fluorescence. (*Tableau 12 – Annexe p.259* et *Graphique 10*).

2. Les Indanones

Les indanones se comportent de façon similaire ; en effet on remarque qu'un effet bathochrome d'environ 5 à 15 nm est visible pour les composés **72-73**, **81** et **83** lorsque la polarité du solvant augmente. Cet effet est plus marqué sur le composé **82**, où l'on retrouve également un groupement hydroxyle en position 7 (*Graphique 12*). L'effet hyperchrome est également observé ici pour les composés **72** et **83** lorsque la polarité augmente ; à l'inverse aucun effet n'est visible pour les dérivés **81**, **73**, **82** (*Graphique 16* – *Annexe p.260*). La variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la polarité pour les composés est la présence d'un groupement hydroxyle en position 6. Pour les composés **72** et **73**, les intensités augmentent lorsque la polarité diminue (*Graphique 12* : *Mesure des Amax des composés 72-83 dans 4 solvants différents*), un comportement intéressant pour une sonde *turn-on* en milieu apolaire. De façon générale les indanones semblent plus fluorescentes dans le dichlorométhane et montrent d'importants déplacements de Stokes (*Tableau 12*)

<u>– Annexe p.259</u>), notamment pour les composés **72** et **81** dans le tampon (~100 nm) mais également dans des solvants plus apolaires (~50 nm) (<u>Tableau 12– Annexe p.259</u>).



<u>Graphique 12</u> : Mesure des λ_{max} des composés 72-83 dans 4 solvants différents

3. Les Hémithioindigos/Hémiindigos

Les dérivés **80**, **84** et **86** ont montré des longueurs d'ondes d'absorption bien supérieures à celles des dérivés précédents de type aurone et indanone.

De manière générale, les composés **80** et **86** se comportent de la même manière que les composés précédents selon la polarité du solvant, menant à un faible effet bathochrome (*Graphique 13*). La polarité des solvants n'a cependant que très peu d'influence sur le dérivé **84**, et aucune tendance franche n'apparait. L'augmentation d'absorption n'est que très peu visible dans la solution tampon pour les HTIs (**80** et **86**) et pour le dérivé **84** (*Graphique 17*). Aucun profil caractéristique n'est identifiable sur la variation de fluorescence de ces dérivés (*Graphique 10*) contrairement à certains composés présentés plus haut. De plus, les déplacements de Stokes apparaissent plus marqués pour ces

dérivés mais uniquement dans des solvants polaires (tampon + méthanol) (*<u>Tableau 12 –</u>* <u>Annexe p.259</u>).



<u>Graphique 13</u> : Mesure des λ_{max} des composés **80, 84 et 86** dans quatre solvants différents

4. Conclusion

Les aurones et les indanones possèdent de nombreuses similitudes en ce qui concerne leurs propriétés solvatochromiques, qui dépendent essentiellement des caractères électroniques des substituants présents sur les cycles A et B. Les résultats présentés ici sont à prendre avec du recul. Tout d'abord, les molécules testées ici n'ont pas été conçues de façon à être utilisées comme sonde fluorescente, et les substituants présents sur les cycles A et B ont d'abord pour but d'affiner les interactions avec le site actif de *hs*TYR. Nous savons qu'un motif 2,4-résorcinol sur le cycle B est essentiel pour interagir avec le centre à cuivre et que seules les positions 6 et 7 sur le cycle A sont essentielles pour l'activité anti-tyrosinase. La présence du groupement phénol en position 4' sur le 2,4résorcinol pourrait joue le rôle de donneur-**π** après déprotonation lors de sa liaison aux atomes de cuivre. Néanmoins, certaines modifications sur le cycle A semblent cruciales, notamment en position 4 pour augmenter l'effet électroattracteur du motif benzofuranone et accentuer l'effet *push-pull*. Or nous pouvons supposer que ces modifications diminueraient probablement l'affinité de ces nouveaux composés envers *hs*TYR.

Toutefois, certains composés se sont comportés comme nous l'attendions : c'est le cas des dérivés **72**, **81** et **83** pour lesquels nous observons une augmentation de la fluorescence lorsque la polarité du solvant diminue. Les effets de polarité sur les λ_{max} et l'absorbance sont également fonctions des groupements et de leurs positions sur le cycle A comme nous le montrent les dérivés **59** et **119** où un hydroxyle est présent en position 7 avec un effet hyperchrome. Un effet inverse est constaté sur les composés **56** et **60**, où respectivement un hydroxyle et un méthoxyle sont présents en positions 6.

Par conséquent, de nombreuses optimisations sont encore à réaliser au niveau des cycles A et B pour conserver au mieux l'affinité de nos meilleurs composés pour *hs*TYR tout en améliorant les paramètres (déplacement de Stokes, intensité de fluorescence) nous permettant d'obtenir des sondes avec des comportements qui se prêtent à cette étude.

4. Perspective : Vers la synthèse de photoswitches

Le troisième objectif de ce projet de recherche devra s'orienter vers le développement d'inhibiteurs, d'abord inactif contre la *hs*TYR, puis facilement isomérisable sous une irradiation qui produit la forme active. L'utilisation de photoswitches pour des applications cutanées paraît en outre particulièrement judicieuse. Il serait alors possible d'appliquer une lumière à une longueur d'onde donnée permettant d'isomériser *in situ* la molécule en présence de *hs*TYR, et ainsi éviter toute perturbation d'autres processus biologiques à proximité — l'enzyme étant impliquée dans de nombreux processus vitaux.

I. Caractéristiques photophysiques des HTIs/HIs

Les HIs et HTIs font l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années pour leurs applications en tant que photoswitches¹⁵⁷ grâce aux propriétés électromagnétiques¹⁵⁸ qu'ils possèdent, bien que principalement pour des applications non biologiques¹⁵⁹. Leur géométrie plane permet facilement de prédire la position de la partie stilbène après isomérisation¹⁵⁹. Ces modifications spatiales peuvent se révéler précieuses pour l'administration d'un composé *in vivo* puisqu'elles pourraient permettre d'activer ou d'inactiver son effet avec précision et ainsi obtenir un contrôle de l'activité dans le temps et l'espace, selon une approche appelée photopharmacologie. Cette gestion spatiotemporelle réversible¹⁶⁰ permettrait de diminuer l'exposition au principe actif et de réduire les éventuels effets secondaires.

Parmi les photoswitches les plus courants, on distingue les spiropyranes¹⁶¹, les hydrazones¹⁶², les stilbènes¹⁶³, les diaryltethenes¹⁶⁴ et les azobenzènes¹⁶⁵ (*Schéma 33*).



Schéma 33 : Types de photoswitches utilisés en biochimie¹⁶⁸

Parmi ces sondes, les azobenzènes ont joué un rôle majeur dans le développement de biosenseurs et de machines moléculaires depuis leur découverte en 1834 et celle de leurs propriétés optiques par Hartley¹⁶⁶ en 1937.

Les dérivés d'azobenzènes sont facilement synthétisables et possèdent une géométrie pouvant être photoinduite (cis (Z)/trans (E)) sous l'effet de la lumière selon un contrôle photochimique aisément contrôlable à l'aide de schémas de substitutions connus¹⁶⁷. Ces modulations peuvent avoir lieu sur les deux phényles, permettant de gérer et d'optimiser les longueurs d'onde d'irradiation des formes cis/trans.

Les applications en milieu biologique de ces composés sont restreintes en raison du caractère cancérogène des rayonnements UV sur les tissus biologiques. Toutefois, cet inconvénient peut être facilement surmonté par une minutieuse optimisation structurelle avec des groupements électrodonneurs en *ortho* et/ou *para* du noyaux azo, afin de déplacer les longueurs d'onde de travail¹⁶⁹. Néanmoins, des études ont montré que dans le cas des azobenzènes, des interactions avec le glutathion pouvaient avoir lieu provoquant leur réduction¹⁷⁰. Ainsi, les HTIs et les HIs sont de parfaits candidats pour le développement de photoswitches.

En effet, les hémithioindigos et les hémiindigos se démarquent par leur capacité à s'isomériser rapidement de l'état *Z* thermodynamiquement plus stable vers un état métastable E^{158} (*Schéma 34*), sous l'effet d'une irradiation à des longueurs d'ondes qui sont significativement plus hautes^{158,171} (>600 nm) que celles utilisées sur les photoswitches traditionnels. Leur comportement va dépendre de la polarité du solvant qui influe sur le rendement quantique (plus élevé que les photoswitches classiques), l'énergie d'absorption et de fluorescence¹⁵⁹. Il a également été montré que certains dérivés hémiindigos présentant un azote intracyclique fonctionnalisé et encombré pouvaient présenter des demi-vies supérieures à 3000 ans pour leur forme métastable. L'interconversion entre les deux formes est souvent réalisable dans le domaine du visible, ce qui constitue un avantage essentiel pour préserver les tissus biologiques¹⁵⁹, tout en facilitant la pénétration¹⁷².



Schéma 34 : Isomérisation Z/E de la partie stilbène des HTIs et HIs sous irradiation

Ils résistent également mieux à la photofatigue¹⁷³ que les chromophores actuels (*Schéma* 33) : ils peuvent subir plusieurs cycles d'isomérisation et conduisent à une meilleure réversibilité. Au même titre que les azobenzènes dont les possibilités de mouvement unidirectionnels^{174,175} sont bien connues, les HTIs sont étudiés pour le développement de nouveaux moteurs moléculaires qui utilisent la lumière du visible pour leurs mouvements. Dans le cas des HTIs, la lumière visible est convertie en énergie, permettant un mouvement bidirectionnel¹⁷⁶.

Ces recherches pourront permettre d'étendre les fonctions des HTIs dans des domaines comme la catalyse, l'interface biologique, la fixation de polymère, les interactions de surface et la reconnaissance moléculaire¹⁷⁷. Dans le cadre de cette étude nous avons sélectionné trois de nos HTIs/HIs les plus actifs sur lysats de cellules MNT-1 dans le but de déterminer leurs propriétés photochimiques.

Quelques travaux ont déjà été développés avec pour objectif ce type d'application. En 2006, Herre & $al.^{178}$ utilisent un HTI pour l'inhibition de la voie de la 12/15-lipoxygénase (12/15-LOX). Très peu actif sous sa forme stable *Z* (IC₅₀ = 700 µM), le dérivé se révèle bien plus efficace sous sa forme *E* après irradiation (IC₅₀ = 21 µM). Plus récemment, Sailer & $al.^{179}$ proposent l'utilisation de dérivés de HTI comme analogues de la colchicine, développés à des fins antimitotiques visant les microtubules avec une haute résolution spatiotemporelle. Dans cet exemple¹⁷⁹ la forme *E* après isomérisation est stabilisée par une liaison hydrogène entre le pyrrole et la cétone. Cette liaison hydrogène fait de l'isomère *E* le plus stable thermodynamiquement (*Schéma 35*).


<u>Schéma 35</u> : Exemple de stabilisation de l'isomère E après isomérisation d'un PHTI (Pyrrole Hémithioindigo)

Tous ces travaux, sélectionnés parmi d'autres,^{171,180,181} montrent la capacité des HIs et des HTIs, à investir des applications biologiques en tant qu'inhibiteurs « *photoswitchables* » permettant un contrôle rapide et précis en milieu biologique. Ces composés pourraient être « activés » *in situ* par irradiation à une longueur donnée, et ainsi permettre leur isomérisation de la forme *Z* (inactive) à la forme *E* (active). A l'inverse, des aurones qui ne possèdent pas cette particularité à pouvoir « *switcher* » entre la forme *Z* et *E*. En effet, elles sont difficilement isomérisables, naturellement stables sous la forme *Z*, avec des temps de demi-vie court (55 min) lorsqu'elles sont isomérisées¹⁸². Ce qui en fait de mauvais candidats pour le développement de phosotswitches.

II. Synthèse de nouveaux photoswitches

La synthèse de nouveaux composés contenant un motif *L*-mimosine basé sur un squelette HTI ou HI privilégiant la formation d'une liaison hydrogène en configuration *E* comme indiqué sur le <u>Schéma 35</u> pourrait être envisagée. Le changement de configuration $E \rightarrow Z$ du composé se faisant par irradiation le rendrait alors hypothétiquement actif. Nous pouvons imaginer plusieurs composés à partir des HIs et/ou HTIs contenant un cycle B modifié (dérivé de la *L*-mimosine) avec des hydroxyles présents sur le cycle A en position 6 ou 7 (<u>Schéma 36</u>).



<u>Schéma 36</u>: Exemple d'isomérisation par irradiation $E \rightarrow Z$, avec une configuration E supposée inactive stabilisée par liaison hydrogène vers une configuration Z supposée active

La forte analogie structurale des HI et HTI avec les aurones est une excellente opportunité de développer de nouveaux composés. L'ajout d'un hydroxyle en position 6 ou 7 serait un choix judicieux au vu des IC₅₀ obtenues. Les HTIs et HIs représentent également une classe de photoswitches ; par conséquent la fonctionnalisation du cycle A par des groupements électrodonneurs permettrait d'optimiser les propriétés photophysiques de ces composés, et de déplacer la lumière d'irradiation pour l'interconversion vers des longueurs d'onde supérieures à 600 nm : l'absorption photonique de la mélanine étant extrêmement forte en deçà de 500 nm, ce déplacement apparaît comme un objectif crucial.



<u>Schéma 37</u>: Possibles modifications permettant d'optimiser les longueurs d'onde d'excitation des HI/HTI

En effet, Kink & *al*.¹⁸³ rapportent la présence bénéfique de groupements électrodonneurs en position 5. L'introduction d'un groupement diméthylamino permet par exemple le 108 déplacement de la longueur d'onde d'interconversion $E \rightarrow Z$ à 625 nm contre 530 et 505 nm respectivement lorsqu'un méthoxyle est présent ou lorsque le cycle n'est pas substitué. (*Schéma 37*).

D'important travaux d'optimisation sont encore à prévoir pour la suite de ce projet, et une meilleure connaissance du site actif permettrait de développer de nouveaux composés toujours plus actifs et sélectifs. Les futurs inhibiteurs potentiels seront testés sur les lysats de cellules de mélanome humain MNT-1, et sur cellules entières (test anti-mélanogénique et cytotoxicité).

CHAPITRE III : Stratégie de synthèse

L'extraction d'aurones naturelles ne représente pas une solution durable pour explorer leurs propriétés bioactives. D'une part, elle ne permettrait d'isoler qu'une faible quantité de produits, insuffisante pour étudier le potentiel que peuvent offrir les aurones et impliquerait par conséquent un travail laborieux et coûteux. D'autre part, les aurones naturelles n'offrent qu'une faible hétérogénéité structurale, et seules certaines positions clés sont naturellement fonctionnalisées avec des phénols libres, glycosylés ou méthoxylés. Ainsi, ces raisons ont poussé les chimistes à développer des méthodes de synthèse d'aurones permettant d'obtenir diverses substitutions et ainsi approfondir le potentiel que possèdent ces composés. Les chimistes se sont inspirés du mécanisme de biosynthèse des aurones dans les plantes, qui utilisent des mécanismes d'oxydation, de cyclisation et de réarrangement à partir de chalcones.

Les aurones naturelles sont habituellement fonctionnalisées sur les positions 4, 6, 3' et 4' par des hydroxyles. De nombreuses voies de synthèse ont été développées afin d'accéder à des aurones différemment substituées, par le biais de l'oxydation de chalcones, ou par une étape de condensation entre une benzofuran-3(*2H*)-one et un aldéhyde par exemple. Certaines voies de synthèses doivent être adaptées en fonction des substituants présents ou des modifications apportées au squelette. Devant la diversité des structures et des modulations présentées dans ce manuscrit, un recours à de nombreuses variations de méthodes de synthèse a été nécessaire, qui sera présenté dans cette section.



 $X = O, CH_2, C=O, S, NH, NR$

Comme indiqué dans la partie Conception & Discussion, le but de ces modulations était de favoriser les interactions avec les résidus du site actif, en privilégiant les substitutions sur les positions 6 et 7 du cycle A, propices à l'obtention des composés actifs. Il était également prévu d'explorer de nouveaux motifs de chélation du cycle **C** et enfin d'apporter des modifications au cycle B en remplaçant l'atome d'oxygène ou la cétone intracyclique par d'autres atomes ou groupes fonctionnels.

I. Généralités sur la synthèse des hémiindigoïdes

1. Les Aurones

a) Synthèse via cyclisation oxydante de la 2'-hydroxychalcone

Les 2'-hydroxychalcones peuvent être utilisées pour la synthèse de quasiment tous les types de flavonoïdes connus aujourd'hui, en passant par des intermédiaires flavanones, formées par des réactions intramoléculaires entre le groupement phénol et la double liaison activée par des catalyseurs acides ou basiques. Ces intermédiaires peuvent en particulier conduire à des produits de type 3-hydroxyflavone, isoflavone et aurone ; les ratios vont d'une part dépendre de la structure des réactifs, suivant la présence ou non de groupements électroattracteurs ou électrodonneurs sur les cycles A et B, et d'autre part, du choix de l'oxydant permettant la cyclisation. L'un des premiers réactifs utilisés pour ce type de cyclisation est une solution alcaline de peroxyde d'hydrogène : cette voie de synthèse est plus connue sous le nom de réaction de Algar-Flynn-Oyamada¹⁸⁴ (AFO). Néanmoins, cette méthode de synthèse passe par un intermédiaire époxyde pouvant conduire à un flavonol, le ratio aurone/flavonol étant alors dépendant de la présence d'un groupement électrodonneur en position 6' (Schéma 38). La substitution de cette position par un groupement électrodonneur est aussi nécessaire avec l'utilisation d'agents bromants¹⁸⁵ comme Br₂, le bromure de bromodiméthylsulfonium¹⁸⁶ ou encore CuBr₂, qui conduisent à la formation de dibromure de chalcone. À l'inverse, si un groupe électroattracteur est présent avec un agent bromant, la réaction intramoléculaire mène à la formation de flavone après élimination de HBr. L'utilisation de dérivés métalliques comme le trinitrate de thallium (III) dans le méthanol (Schéma 38) en milieu acide permet d'obtenir des rendements modérés¹⁸⁷ avec la présence de groupements électroattracteurs ou électrodonneurs sur le cycle A avec de faibles quantités de flavones isolées. Il a toutefois été relevé par Thakkar & Cushman¹⁸⁸ qu'un groupement électroattracteur en position 5' de la chalcone pouvait être nécessaire, mais aussi que le mécanisme impliquait l'introduction d'un groupe méthoxyle provenant du solvant en position 4 sur l'aurone. Par conséquent, ces conditions limitent fortement les possibilités synthétiques liées à cette méthode. L'utilisation d'autres dérivés métalliques¹⁸⁹ comme l'acétate de mercure (II) est explorée depuis 1975 : la réaction de la 2'-hydroxychalcone

avec l'acétate de mercure (II) dans le DMSO, l'acide acétique et plus tard avec de la pyridine à reflux permettent d'obtenir de bons rendements¹⁸⁵ en aurone, mais l'emploi d'acétate de mercure (II) pose des problèmes liés à sa toxicité environnementale. Il est également possible de recourir à l'utilisation d'hexacyanoferrate (III) de potassium, qui peut aussi conduire à ce type de cyclisation oxydante avec des rendements moyens de 40%, et présente l'avantage de ne pas nécessiter de protection des phénols présents sur le cycle A (*Schéma 38*). Une autre alternative possible serait d'utiliser l'oxygène comme oxydant en présence de nanoparticules de Pd/Au avec de l'oxyde de césium comme catalyseur. L'utilisation de carbonate de césium et de CuI comme catalyseur avec du 1,10-phenanthroline comme ligand sous atmosphère inerte dans le DMF, permet de s'affranchir de la présence d'un phénol en 2' lorsque celui-ci est remplacé par un halogène¹⁹⁰. Enfin, l'utilisation d'oxydants comme le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) dans le 1,4-dioxane peuvent également conduire à la synthèse d'aurones, avec toutefois de faibles rendements et la formation de produits secondaires tels que des flavones et des flavanoes (*Schéma 38*).



<u>Schéma 38</u> : Méthodes de cyclisation oxydante de 2'-hydroxychalcone

b) Synthèse via des dérivés d'alcyne

La possibilité d'une cyclisation à partir de dérivés ynones¹⁹¹ a été explorée dès 1986. Cette première tentative basée sur les règles de Baldwin¹⁹², prédit une compétition entre la formation de deux dérivés. En effet, ce type de cyclisation intramoléculaire peut conduire à une attaque de type 6-*endo-dig*, ou de type 5-*exo-dig*, générant respectivement la flavone et l'aurone correspondantes (*Schéma 39*)



<u>Schéma 39</u> : Cyclisation intramoléculaire de type 6-endo-dig ou 5-exo-dig

Malgré cette compétition et les premiers essais qui ont mené à des rendements variant de 7 à 79%, la cyclisation 6-*endo-dig* reste la voie thermodynamiquement plus stable. D'autres méthodes ont depuis été développées afin de limiter la formation de flavone. Jong & Leu¹⁹³ ont rapporté en 1990 que des dérivés ynones pouvaient être cyclisés avec des sels d'argent comme AgNO₃ dans le méthanol avec des rendements allant de 85 à 95% et une diminution de la présence de flavones. Depuis, d'autres conditions avec des sels d'argent ont été testées, notamment avec AgOTf, Ag₂CO₃, Ag₂O, AgSbF₆ ou encore AgOAc, ces catalyseurs permettant de chélater le carbone adjacent du cycle aromatique de la triple liaison à l'aide de l'ion Ag(I), pour créer une charge partielle en α du carbonyle et ainsi forcer la cyclisation en *5-exo*^{193,194}. Les sels d'or, notamment AuCl, donnant l'ion Au(I), permettent de réaliser cette même cyclisation. L'utilisation de ces sels requière la synthèse des dérivés ynones au préalable par la réaction d'alcynation entre un 2hydroxybenzaldéhyde et un dérivé d'éthynylbenzène.



<u>Schéma 40</u> : Méthode de cyclisation via la formation d'une ynone cyclisée par des dérivés de sels d'or

Ce dérivé est ainsi mis en présence de sels d'or, menant à des réactions aux rendements variables selon les substituants mais supérieurs à 65% d'après la littérature^{193,194,195}. Une fois cyclisé, il est nécessaire d'oxyder l'alcool en position 3 de l'aurone avec MnO₂, permettant d'accéder facilement à une large gamme d'aurones substituées avec d'excellents rendements, la seule limite étant la disponibilité du benzaldéhyde et de l'éthynylbenzène (*Schéma 40*). Il est toutefois possible de réaliser ce type de cyclisation en *one-pot*¹⁹⁶ grâce à l'ajout de catalyseur au palladium comme Pd(PPh₃)₄ ou Pd(OAc)₂. Cette synthèse nécessite cependant la présence d'un halogène en position 2'. Certaines synthèses pour obtenir des dérivés ynones requièrent l'utilisation de gaz toxique comme source de monoxyde de carbone ; ici l'avantage de cette catalyse est d'éviter le recours à de ce type de source en privilégiant l'acide formique, et l'anhydride acétique comme activateur. Cette voie de synthèse offre une bonne sélectivité et une bonne tolérance des groupes fonctionnels sur le cycle B (*Schéma 41*).



Schéma 41 : Méthode de cyclisation one-pot en présence d'un catalyseur au Palladium

c) Synthèse *via c*ondensation aldolique d'une benzofuran-3(2H)-one sur un benzaldéhyde

La condensation aldolique de benzofuran-3(2H)-ones sur un benzaldéhyde est l'une des méthodes les plus simples pour préparer des aurones depuis les années 1950. Les conditions de synthèse dépendent essentiellement des substituants présents sur les cycles aromatiques A et B. En effet, les réactions de condensation aldolique peuvent être réalisées en milieu basique, acide, ou en présence d'oxyde d'alumine. Dès 1955, Geissman & Harborne¹⁹⁷ proposent une méthode de synthèse en milieu acide avec un mélange d'acide acétique glacial et d'acide chlorhydrique concentré, à température ambiante. D'autres méthodes utilisant des conditions similaires, mélangeant acide chlorhydrique concentré et éthanol ou chlorure de thionyle et éthanol, ont montré un avantage certain puisqu'en présence d'acide, il n'est pas nécessaire de protéger les groupements hydroxyles présents sur la benzofuran-3(2H)-one et l'aldéhyde¹⁹⁸. Néanmoins, avec ce type de conditions les rendements sont parfois faibles. Il est également possible d'utiliser des bases comme l'hydroxyde de potassium ou l'hydroxyde de sodium dilués dans du méthanol ou de l'éthanol pour réaliser cette condensation. Le milieu basique offre la possibilité d'obtenir des rendements élevés, ainsi qu'un champ large d'application. En effet, la présence de substituants sur les synthons ne semble pas être un facteur limitant^{198,199,200}. La concentration en base peut fluctuer de 10 à 50% en masse et les températures de réaction peuvent également évoluer de 20 °C jusqu'au reflux. De plus, il est aussi possible d'effectuer ces réactions sous irradiation micro-onde²⁰¹. Bien que la méthode KOH/MeOH, perfectionnée au laboratoire, s'utilise avec des dérivés méthoxylés ou hydroxylés, elle s'adapte moins sur des synthons présentant plus d'un groupement phénol par cycle¹³¹. Par ailleurs, Varma & *al.*²⁰² ont développé des conditions neutres sur alumine dans le dichlorométhane ou dans le chloroforme. Cette méthode est idéale lorsque des substituants sensibles nécessitent des conditions très douces, malgré une limitation à des composés solubles dans le dichlorométhane ou le chloroforme. Il est toutefois possible d'obtenir des rendements élevés (86 à 93%) pour des substitutions diverses. L'utilisation de conditions basiques en présence d'alumine a également été évaluée comme étant une méthode efficace, mais il est possible de substituer l'alumine neutre par de l'alumine basique comme KF-Al₂O₃, ou d'utiliser la combinaison de l'irradiation par micro-onde avec l'alumine sans solvant pour obtenir des rendements compris entre 57 à 96% dans des temps courts de l'ordre de quelques minutes^{189,203} (*Schéma 42*).



Schéma 42 : Méthodes de synthèse des aurones via condensation aldolique

d) Synthèse via couplage de Suzuki-Miyaura

Les conditions de couplage de Suzuki-Miyaura sont connues pour être relativement douces et les réactifs, comme les sous-produits borés, présentent l'avantage d'être peu toxiques. Il peuvent cependant présenter des problèmes de stabilité²⁰⁴. Kraus & *al.*²⁰⁵ ont rapporté en 2010 une méthode donnant accès à la synthèse d'aurones et de flavones substituées par des groupements méthoxyles. Ces flavonoïdes sont obtenus par couplage entre des dérivés phénoliques et des dérivés halogénés d'acide acrylique. Le couplage entre les deux synthons est effectué en présence de DMAP et de DCC dans un mélange CH₂Cl₂:DMF (5:1) suivi d'un réarrangement de Fries réalisé en présence de chlorure d'aluminium dans le dichloroéthane à reflux, donnant accès à un dérivé d'halogénocétone (*Schéma 43*). La cyclisation accompagnée d'une substitution de l'halogène, est effectuée en milieu basique avec de l'hydroxyde de sodium dans le THF à 0 °C pour former la 2-(halogénométhylène)-benzofuran-3(*2H*)-one, jouant le rôle d'électrophile.

Le couplage de Suzuki-Miyaura est alors réalisé en présence d'un acide phénylboronique, d'un catalyseur au palladium et de K₂CO₃ dans le dioxane. Il est possible, grâce à l'introduction d'un groupement *gem*-dichloro (en vert) à la place du *gem*-dibromo (en bleu), d'obtenir la formation de flavones comme l'ont indiqué les auteurs (<u>Schéma 43</u>).



<u>Schéma 43</u> : Méthode de synthèse d'aurones (bleu) ou de flavones (vert) via couplage de Suzuki-Miyaura

2. Les Arylindan-1,3-diones

Cette sous-famille des indanes comporte deux cétones intracycliques présentes sur le cycle à cinq carbones. Différentes méthodes de synthèse existent pour ce type de composés, soit directement par condensation²⁰⁶ à partir de dérivés de l'isobenzofuran-1(*3H*)-one en présence d'une base forte avec l'aldéhyde approprié, soit à partir de phtalate^{207,208} de diéthyle pour obtenir le dérivé **121** (*Schéma 44*). Le synthon **120** est obtenu en présence d'une base forte, le méthanolate de sodium, pour ensuite être couplé dans une étape de condensation supplémentaire avec un aldéhyde et ainsi obtenir des dérivés types de **121**.



<u>Schéma 44</u> : Synthèse du dérivé **121** à partir de phtalate de diéthyle

3. Les Phtalimides (Isoindoline-1,3-dione)

L'isoindoline-1,3-dione fait partie de la famille des phtalimides caractérisée par la présence d'une fonction imide aromatique (en bleu) (*Schéma 45*). La synthèse de ces composés peut être obtenue grâce à une réaction à chaud entre de l'anhydride phtalique et une amine primaire. Cette synthèse, une fois le phtalimide isolé, permet d'accéder facilement à des acides α -aminés en présence de potasse²⁰⁹ et de l'acide α -bromé adéquat. Cette synthèse peut également se faire directement à partir de l'anhydride phtalique en équilibre avec l'acide phtalique et d'une amine primaire correspondante (*Schéma 45*).



<u>Schéma 45</u> : Synthèse d'isoindoline-1,3-dione à partir d'anhydride phtalique en milieu acide ou d'un phtalimide en mileu basique</u>

L'hydrolyse du phtalimide par la potasse est possible en raison des différentes formes mésomères amenant à délocaliser la charge électronique. Cette délocalisation implique que le proton soit suffisamment acide pour former un anion stable en milieu basique. Lorsqu'il est traité avec de l'hydroxyde de potassium concentré, le phtalimide forme un sel de potassium qui est l'intermédiaire clé de la synthèse de Gabriel, qui nous permet d'accéder facilement au phtalimide substitué. L'intermédiaire est ensuite injecté avec un 121 halogénoalcane pour former le phtalimide alkylé. Les phtalimides alkylés sont facilement hydrolysables à chaud avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium, conduisant normalement à la formation d'une amine et d'un ion phtalate.

4. Les Hémiindigos (HIs)

La première synthèse de l'indigo (*Schéma 46*) a été publiée en 1882 par Adolf von Baeyer et Viggo Drewsen²¹⁰ et consiste en une crotonisation (*Schéma 47*) du 2-nitrobenzaldéhyde avec l'acétone en présence d'ammoniaque ou d'hydroxyde de sodium.



Schéma 46 : Synthèse de l'indigotine à partir du 2-nitrobenzaldéhyde



Schéma 47 : Mécanisme de la synthèse de l'indigotine

Les hémiindigos sont des analogues des indigos au sein desquels une unité indoxyle est remplacée par un motif de type stilbène. Quand aucun substituant n'est présent sur le cycle A, la synthèse de ces composés (*Schéma 48*)consiste en une condensation aldolique avec le benzaldéhyde correspondant, l'indoxyl-3-acétate étant commercial.



<u>Schéma 48</u> : Synthèse d'un hémiindigo à partir d'une acétate indolin-3-yle/indolin-3-one

L'introduction de substituants sur le cycle A nécessite la synthèse de l'indoxyle à partir d'un précurseur comme l'ont décrit Zhang & *al.*²¹¹ à partir de la 3,5-diméthoxyaniline (*Schéma 49*), par une réaction de Houben-Hoesch en présence de BCl₃, d'AlCl₃ et de chloroacétonitrile dans du dichlorométhane anhydre, puis après traitement par HCl à reflux. La cyclisation est obtenue en milieu basique, il est nécessaire d'ajouter de l'anhydride acétique pour protéger l'azote par un groupement acétyle qui sera déprotégé *in situ* lors de la condensation aldolique en milieu basique ou acide avec le benzaldéhyde correspondant.



<u>Schéma 49</u> : Synthèse de l'hémiindigo (Z)-2-benzylidène-4,6-diméthoxyindolin-3-one à partir de la 3,5diméthoxyaniline

5. Les Hémithioindigos (HTIs)

Les hémithioindigos ou 2-arylidenebenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-ones ont été décrits pour la première fois en 1906 par Friedländer ²¹². Analogues soufrés des aurones appartenant à la famille des flavonoïdes, les hémithioindigos sont composés d'un bicycle thioindigo¹⁵⁹ semblable aux hémi-indigos sur lesquels on retrouve également un fragment stilbène.

Les méthodes de synthèse des hémithioindigos sont bien décrites, simples et rapides. La première synthèse décrite par Friedländer²¹² consiste en la condensation d'une benzothiophénone et d'un benzaldéhyde. Cette voie de synthèse est ainsi limitée par la disponibilité de la benzothiophénone, rarement disponible commercialement. Il est donc nécessaire de les synthétiser.

Plusieurs méthodes sont présentées sur le *Schéma 50*. La benzothiophénone (*Z*)-2arylidenebenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one peut être obtenue (**voie A**) par condensation décarboxylative de Rössing²¹³, qui est une cyclisation intramoléculaire de l'acide 2-[(carboxyméthyl)thio]benzoïque (**voie A**)^{157,214} préparé à partir de l'acide thiosalicylique. Cependant, les benzothiophénones sont plus souvent obtenues par une réaction d'acylation intramoléculaire de Friedel-Crafts de l'acide 2-(phénylthio)acétique (**voie B**)²¹⁵. D'autres voies peuvent toutefois être envisagées comme la cyclisation de 2'methylthiochalcones développée par Kamila & *al.*²¹⁶ qui consiste à déprotoner un groupe méthylthio en *ortho* d'une benzamide puis de réaliser une cyclisation (**voie C**). Cette même réaction peut être réalisée en *one-pot* grâce aux travaux de Cabiddu & *al.*²¹⁷. L'utilisation d'un benzoate ou d'un acide carboxylique en remplacement d'un benzamide en *ortho* du méthylthio mène également à une cyclisation complète avec des rendements acceptables. La condensation aldolique permettant d'obtenir l'hémithioindigo à partir de la benzothiophénone peut, quant à elle, s'effectuer en conditions acides ou basiques, selon les groupements présents sur les cycles A et B.



<u>Schéma 50</u> : Voies de synthèse A-C des hémithioindigos

Il est aussi possible d'accéder à des dérivés hémithioindigos *via* le 4-acétyl-5-alkoxy-1,3benzoxathiol-2-one et un benzaldéhyde (**voie D**) par trois réactions consécutives (*Schéma 51*) : d'abord l'ouverture du cycle oxathiolone avec la pipéridine, suivie d'une oxydation avec le DMSO pour obtenir un intermédiaire disulfure, et enfin la condensation aldolique²¹⁸. Konieczny *& al.* proposent cette méthode de synthèse en *one-pot* avec des rendements supérieurs à 50%.



<u>Schéma 51</u> : Voie de synthèse **D** des hémithioindigos

Il a été montré par Ukai & *al.*²¹⁹ en 1975 puis par Zheng & *al.*²²⁰ qu'il était possible de réaliser une liaison carbone-soufre sur un carbone *sp*². En effet, cette cyclisation intramoléculaire sur un carbone *sp*² d'une chalcone (**voie E**) est possible en présence de I₂. Cette voie de synthèse (*Schéma 52*) permet d'une part de s'affranchir de l'utilisation de métaux comme Cu, Pd ou Fe, et, d'autre part, de prévenir et d'empêcher une quelconque désactivation du catalyseur métallique par des substrats contenant du soufre. L'ajout d'iode conduit à un pont iodonium qui est ouvert par le méthylthio *via* une attaque *exo* qui mène à la cyclisation intramoléculaire ; le méthyle présent sur le soufre est libéré suite à l'assistance d'un ion iodure qui résulte de la iodocyclisation. Cette dernière permet d'obtenir de bons rendements (40-70%) avec une certaine tolérance quant aux groupes fonctionnels présents et une très bonne sélectivité. Cependant, un régioisomère se forme avec un ratio de 90:10 (respectivement d'hémithioindigo et de régioisomère), ce qui rend nécessaire une étape de purification sur gel de silice.



<u>Schéma 52</u> : Voies de synthèse **E** et **F** des hémithioindigos

Plus récemment, Nguyen & Retailleau²²¹ ont développé une méthode directe pour obtenir des dérivés hémithioindigos à partir d'une 2'-nitrochalcone (**voie F**) en utilisant 5 équivalents de soufre (S₈) en présence d'une base et de DMSO (*Schéma 52*). L'addition de Michaël de type 1,4 de l'amine tertiaire (Et₃N) permet d'initier la cyclisation de l'intermédiaire 1,3-ammoniumcétone. Sous sa forme énolique, l'intermédiaire peut ensuite attaquer la fleur de soufre afin de donner, après cyclisation *via* une attaque nucléophile aromatique, un zwitterion stabilisé par l'effet électroattracteur du carbonyle. Enfin, l'élimination de l'ammonium quaternaire permet d'obtenir l'hémithioindigo souhaité.

6. Les Indazoles

Les indazoles sont des composés bicycliques, qui sont formés par la fusion d'un benzène et d'un pyrazole. La première voie de synthèse a été découverte par Emil Fisher²²² en 1883, par chauffage de l'acide *o*-hydrazinocinnamique pour obtenir l'indazole non substitué. Ce composé existant sous deux formes tautomères peut être sous la forme *1H*indazole ou *2H*-indazole (*Schéma 53*). C'est la forme *1H*-indazole qui est thermodynamiquement la plus stable^{223,224}.



<u>Schéma 53</u> : Cyclisation de l'acide O-hydrazinocinnamique par chauffage pour obtenir le 1H-indazole ou l'2H-indazole

Plusieurs méthodes²²⁵ permettent d'accéder facilement aux *1H*-indazoles à travers des synthèses multi-étapes. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur la synthèse d'un dérivé indazolone *N*-substitué (*Schéma 54*).



Schéma 54 : Cyclisation de l'acide o-hydrazino benzoïque par chauffage pour obtenir le 1H-indazole

Pour nous rapprocher au plus près du squelette des aurones, l'indazolone doit être substitué sur l'azote : la *N*-alkylation²²⁵ et *N*-arylation²²⁵ des indazolones comme des indazoles conduit le plus souvent à des mélanges avec différents ratios qui dépendent des conditions réactionnelles. En effet, la sélectivité des azotes *N1* et *N2* dépend uniquement des conditions, et un mélange d'isomères pourrait compliquer les étapes de purification, en raison des polarités proches des deux composés.

Enfin les conditions décrites par Kurth & $al.^{226}$ en 2005, s'appuient sur la réaction de Davis-Beirut (*Schéma 55*) pour former des liaisons *N-N* et obtenir des *1H*-indazolones N^1, N^2 -disubstituées à partir du 1-(bromométhyl)-2-nitrobenzene et d'un dérivé benzylamine.



Schéma 55 : Mécanisme de Davis-Beirut proposé

Le mécanisme de Davis-Beirut se produit lorsqu'une 2'-nitrobenzylamine *N*-substituée est placée en présence d'une base telle que KOH ou NaOH ainsi qu'un alcool. La première

étape de ce mécanisme est la formation d'un carbanion en α de l'amine secondaire. La réaction du carbanion sur le groupement nitro permet d'aboutir à l'intermédiaire nitroso et ainsi d'introduire un hydroxyle en α de l'amine secondaire. Ce même hydroxyle est ensuite éliminé grâce à la formation de l'imine correspondante. Le carbone de l'imine étant électrophile, il est attaqué par un alcool, induisant la cyclisation de l'indazole en créant une liaison entre les deux atomes d'azote, formant une hydroxylamine. Le groupement hydroxylamine est alors protoné pour former un bon nucléofuge qui est éliminé grâce à l'effet domino des électrons, déclenché par la perte d'un proton.

II. Synthèses réalisées

1. Modulations du cycle A

a) Synthèse des dérivés azotés

Les voies synthétiques choisies pour la synthèse des dérivés d'aurone diffèrent en fonction des substituants. En effet, certaines aurones ont été obtenues après cyclisation de chalcones, d'autres après condensation aldolique d'une benzofuran-3(2*H*)-one et d'un benzaldéhyde. Ces variations résultent de la faible disponibilité de certains dérivés de benzofuran-3(2*H*)-one. À l'inverse, les benzaldéhydes substitués sont massivement disponibles dans le commerce.



Les benzofuran-(*2H*)-ones azotés **122**, **123** et **124** n'étant pas disponibles commercialement, il a été nécessaire d'obtenir ces synthons à partir des acétophénones correspondantes, afin de pouvoir poursuivre la synthèse.

Trois voies de synthèse ont été entreprises à partir du 3-(*N*-diméthylamino)phénol et du 3-nitrophénol (*Schéma 56*). La première (**voie G**) débute par la réaction des phénols **125**

et **126** avec l'acide chloroacétique en présence de potasse. La formation des acides **127** et **128** (**voie G**) n'a pas été observée, probablement à cause du caractère acide du carboxylate. Pour corriger ce problème, nous avons utilisé du chloroacétate d'éthyle (**voie H**) en présence de K₂CO₃ pour obtenir les esters correspondants qui ont été hydrolysés en présence de LiOH dans un mélange MeOH/THF/H₂O. L'action du chlorure de thionyle sur les acides **127** et **128** est censée former *in situ* un chlorure d'acyle, cyclisé ensuite par une réaction de Friedel-Crafts avec du chlorure d'aluminium, menant aux dérivés de benzofuran-3(2*H*)-one **129** et **130**. Aucune cyclisation n'a cependant été observée. Cela peut s'expliquer pour l'acide **127** qui est désactivé en raison du caractère électroattracteur du groupement nitro qui appauvrit le cycle et compromet la substitution électrophile aromatique, comme pour l'acide **128** qui, dans ce milieu relativement acide, se protone probablement et empêche la cyclisation intramoléculaire d'avoir lieu, défavorisée par le caractère électroattracteur du groupement ammonium. Ces mêmes difficultés ont été rencontrées après la synthèse des synthons **131** et **132**, obtenus par réaction avec l'anhydride acétique en conditions basiques.



<u>Schéma 56</u>: Synthèse de benzofuran-3(2H)-one nitrée via 3 voies G/H/I - a) Acide chloroacétique, KOH, H₂O - b) 1.Chloroacétate d'éthyle, K₂CO₃, DMF. 2.LiOH, MeOH/THF/ H₂O. c) 1. SOCl₂, CH₂Cl₂ anhydre. 2. AlCl₃, DCM. d) Anhydride acétique, NaOH, AcOEt, 80 °C. e) AlCl₃, DCM, 40 °C

En effet, mis en présence de chlorure d'aluminium dans le dichlorométhane, le réarrangement de Fries attendu pour l'obtention des acétophénones **133** et **134**, pourtant

bien décrit dans la littérature, ne s'est pas produit (<u>Schéma 56</u>). Diverses conditions ont été expérimentées, en utilisant des solvants ayant un point d'ébullition plus élevé, tels que le dichloroéthane, le toluène ou le nitrobenzène, mais sans succès.

i. Synthèse du (*Z*)-*N*-(2-(2,4-diméthoxybenzylidène)-3-oxo-2,3-dihydrobenzo furan-6-yl)acétamide (135)



L'accès au dérivé **135** a initialement été imaginé à travers la cyclisation d'une chalcone présentant l'acétamide en *para* de la cétone (*Schéma 57*), qui aurait permis d'obtenir l'aurone cyclisée avec l'acétyle, clivable par hydrolyse.



<u>Schéma 57</u> : Synthèse des dérivés 135 et 139 via cyclisation oxydante

Ce précurseur aurait permis d'accéder à un dérivé d'aurone avec une amine primaire en position 6, pouvant être diméthylée, pour obtenir le composé final présentant un groupement *N*,*N*-diméthylamino en position 6.

Cette synthèse semblable à la **voie I** décrite jusqu'au composé **138** par Hu & *al*²²⁷, à partir du 3-aminophénol, s'est avérée efficace. Le réarrangement de Fries n'a pas été effectué dans les conditions décrites précédemment, puisqu'aucun solvant n'a été utilisé ici : l'acétate de 3-acétamidophénol **137** a été directement mis en présence de chlorure d'aluminium en large excès, puis chauffé à 135 °C. Le rendement relativement faible, de 36%, peut s'expliquer par la formation d'une pâte épaisse difficile à agiter, sous agitation magnétique.

Le composé **139** (voie J) (*Schéma 57*) a été préparé grâce à une condensation aldolique entre le dérivé **138** et le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde en milieu basique. Le choix de la base est ici primordial comme l'indiquent Eichberg & al.²²⁸. En effet, la condensation a d'abord été effectuée une première fois avec de la potasse à température ambiante ou en chauffant, et l'acétyle semble avoir été clivé, d'après les analyses RMN proton et carbone. En s'appuyant sur les conditions de Hu & *al.*²²⁷ avec LiOH, il a été possible de conserver l'acétamide. Ces conditions permettent l'étape du couplage dans l'éthanol à température ambiante pour obtenir la chalcone, non purifiée, précurseur du composé 139 par traitement à Hg(OAc)₂. Le composé **139**, difficilement purifiable, a tout de même été caractérisé par spectroscopie de masse ESI. L'obtention de l'intermédiaire 139 est une étape clé, mais le clivage de l'acétamide en condition basique en présence de potasse dans du méthanol qui devait permettre la synthèse de **140**, n'a pas fonctionné. La synthèse du dérivé **135** (voie K) (*Schéma 57*) a été effectuée en *one-pot* sans étape de purification à partir du dérivé 138 et de 3,4-diméthoxybenzaldéhyde dans les conditions décrites précédemment. L'étape de déprotection des méthoxyles avec BBr3 ne conduit à aucune hydrolyse/clivage de l'acétamide et permet d'identifier la présence du dérivé 15 en RMN. Cependant, bien que le produit 135 ait été purifié sur gel de silice, sa masse déterminée par spectrométrie est nettement supérieure à celle attendue. Cette voie d'accès ne nous a pas permis d'obtenir le composé **140** contenant une amine primaire ; nous avons alors envisagé une autre voie d'accès.

ii. Synthèse du (Z)-6-Amino-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)benzofuran-3(2H)-one (66)



En raison des difficultés rencontrées lors du clivage de l'acétamide, le composé **66** a été isolé à partir du synthon **138** selon une voie de synthèse équivalente, où l'acétamide est d'abord clivé en présence d'acide chlorhydrique (6N) à 50 °C. Ces conditions permettent d'obtenir le composé **141** avec un rendement de 87% (*Schéma 58*).



<u>Schéma 58</u> : Synthèse du dérivé 66 via cyclisation oxydante

À l'inverse de la chalone précédente contenant l'acétamide, **142** a été isolée et purifiée sur silice avec un rendement de 55% dans des conditions standards. Néanmoins, l'intermédiaire **140** après cyclisation n'a pas été obtenu pur, bien qu'il ait subi plusieurs purifications sur gel de silice. Il a cependant été utilisé tel quel dans l'étape de déprotection pour obtenir **66**. L'étape de purification s'est avérée difficile à cause de la

forte polarité du composé **20**, s'expliquant par la présence de l'amine primaire en position 6.

Afin de préparer un composé présentant un motif *N*,*N*-diméthylamine dans cette position, nous avons envisagé la méthylation directe de l'amine **140** en composé diméthylé **143**. Les conditions utilisées en présence d'iodométhane et NaHCO₃ dans le DMF n'ont pas permis cette réaction. Ainsi, nous avons envisagé une nouvelle voie d'accès pour la préparation du composé **143**.

iii. Synthèse du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-6-(diméthylamino)benzofuran -3(2H)-one (65)



Comme pour la synthèse précédente, celle-ci est effectuée à partir du synthon **141**, préparé puis acheté auprès d'une source commerciale pour économiser des étapes de synthèse et du temps. La *N*,*N*-diméthylation de l'amine primaire est réalisée par action du diméthylsulfate (*Schéma 59*). La chalcone est obtenue avec un rendement de 60%, cyclisée puis déméthylée avec BBr₃, pour obtenir le produit **65**, qui a été isolé avec seulement 6% de rendement.



Schéma 59 : Synthèse du dérivé 65 via cyclisation oxydante

 iv. Synthèse du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-6-(diméthylamino)-4-hydroxy benzofuran-3(2H)-one (67) et du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-4hydroxy-6-morpholinobenzofuran-3(2H)-one (68)



Le composé **147** a été obtenu par traitement du phloroglucinol par l'anhydride acétique en présence de BF₃•Et₂O à 50 °C dans l'acétate d'éthyle. Ces conditions permettent l'obtention du composé **147** avec un rendement de 72%. La synthèse de l'intermédiaire clé **150** est décrite par Liu & *al.*²²⁹ (*Schéma 60*) : l'introduction des groupements diméthylamino et morpholino est particulière puisqu'une substitution nucléophile semble a priori difficile. En effet, la réaction se fait avec la présence d'une forte concentration en NaHCO₃ (17éq) et d'une forte présence de l'amine chlorhydraté (20,6éq).



<u>Schéma 60</u> : Synthèse des dérivés 67 et 68 à partir des synthons clés 150 et 151

Ces conditions créent un milieu modérément acide favorable à l'introduction de tels groupement dont le mécanisme proposé est décrit dans le <u>Schéma 61</u>.

En effet, cette réaction pourrait avoir lieu grâce à l'intermédiaire **154** en équilibre avec **147**. Même si cet équilibre est fortement défavorisé, l'intermédiaire **154** peut réagir avec une cinétique lente, une journée dans notre cas. Ce mécanisme pourrait avoir lieu selon deux voies, par la **voie L** où les deux carbones électrophiles présents sur le composé **154** seraient substitués par les dérivés azotés, ou alors par la **voie M**, où seule l'attaque de la cétone intracyclique est réalisée.

Cette réaction a été réalisée dans les mêmes conditions en présence de diméthylamine non chlorhydratée, mais sans succès. Les synthons **148** et **149** permettent d'accéder aux chalcones **152** et **153** *via* l'étape de condensation en milieu basique dans l'éthanol. Ces produits se sont avérés particulièrement insolubles dans l'acétate d'éthyle.



<u>Schéma 61</u> : Mécanisme proposé pour la formation des intermédiaires aminés 148 et 149

Lors de l'étape d'extraction à l'acétate d'éthyle, les produits ont ainsi précipité, permettant d'effectuer une filtration suivie d'un lavage. Comme pour les chalcones précédentes, l'étape de cyclisation a été effectuée dans la pyridine à 110 °C en présence d'acétate de mercure pendant 15 heures.

Les dérivés **152** et **153** ont été extraits par l'acétate d'éthyle, ce qui a permis de favoriser leur précipitation et ainsi de les isoler avec des rendements respectifs de 90% et 57%. Après déprotection, le composé **67** a précipité dans l'acétate d'éthyle pour obtenir un rendement de 31% sans purification supplémentaire. En revanche, pour le composé **68**, plus soluble dans l'acétate d'éthyle que le composé **67**, il a été nécessaire d'effectuer une purification sur gel de silice.

b) Synthèse d'un dérivé halogéné

i. Synthèse du (*Z*)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-4,6-difluorobenzofuran-3(2*H*)-one (71)



La synthèse de cette aurone est basée sur celle d'autres dérivés fluorés obtenus antérieurement au laboratoire. La synthèse du fragment **157** (*Schéma 62*) avait déjà été décrite et préparée selon la méthode proposée par Brehm & *al.* correspondant à la **voie H** du *Schéma 56*. Le synthon **156** a été isolé et purifié par précipitation dans l'eau acide avec un rendement de 52%. L'étape de purification du composé **157** a été difficile, aucune autre purification intermédiaire n'ayant été effectuée, ce qui a favorisé la formation de nombreux produits secondaires, difficiles à séparer : ceci explique le faible rendement de 21%. La synthèse du composé difluoré **158** à partir du fragment **157**, n'a pas pu être réalisée dans des conditions classiques de couplage.



<u>Schéma 62</u> : Synthèse complète du dérivé 71 à partir du synthon 157, obtenu via acylation de Friedel-Crafts

En effet en milieu basique concentré, les fluors peuvent être sensibles à une substitution nucléophile aromatique en présence de méthanol et d'une base comme la potasse. Le mélange conduirait à la formation *in situ* de méthanolate et ainsi à la substitution des fluors par des méthoxyles comme cela a déjà été observé au laboratoire. Les conditions utilisées au laboratoire pour ce type de couplage sont décrites par Varma *& al.* qui utilisent une méthode très douce avec de l'oxyde d'alumine neutre dans le dichlorométhane à température ambiante. Les conditions de déprotection des méthoxyles auraient pu poser problème en présence des fluors, mais il s'est avéré que peu de produits secondaires ont été formés, facilitant l'étape de purification finale sur gel de silice.

2. Modulations du cycle C

a) Les Inda-aurones - Synthèse en milieu basique

i. Synthèse du 2-(*E*)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-2,3-dihydro-1*H*-indèn-1one (161)

Les indanes après condensation aldolique forment des analogues d'aurones contenant un carbone intracyclique qui remplace l'oxygène. Le squelette indane est ainsi constitué d'un cycle benzénique accolé à un cyclopentane. C'est sur ce deuxième cycle qu'a lieu l'aldolisation, les conditions pouvant être acides ou basiques. Les synthons de type 2,3-

dihydro-1*H*-inden-1-one **159** ont été achetés, et seules les étapes de condensation et de purification ont été effectuées (*Schéma 63*). La condensation aldolique a été menée en présence d'hydrure de sodium dans le méthanol à température ambiante pour la préparation du dérivé **160**, à partir du 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one. Ces conditions permettent de générer *in situ* du méthanolate de sodium, donnant lieu à une aldolisation en milieu basique. La précipitation du composé **160** après quelques heures a facilité l'étape de purification du produit avec un très bon rendement obtenu par simple lavage à l'eau et au méthanol.



<u>Schéma 63</u> : Synthèse du dérivé **161** par condensation aldolique en milieu basique suivie d'une déprotection par BBr₃

Les composés ont montré une pureté suffisante en RMN pour être mis en jeu dans la suite de cette synthèse. L'étape limitante est la déprotection des méthoxyles avec le tribromure de bore. Les rendements sont faibles, notamment à cause de la difficulté de l'étape de purification. L'utilisation du tribromure de bore implique la formation de nombreux produits secondaires. Le composé **161** peut être recristallisé dans l'acétate d'éthyle après une première purification sur colonne sur gel de silice.

ii. Synthèse du (*E*)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-3-méthyl-2,3-dihydro-1*H*-indèn-1-one (163)

Une autre modification sur une inda-aurones a été effectuée avec l'introduction d'un méthyle sur le cycle C (<u>Schéma 64</u>). Les conditions de réaction classiques KOH/MeOH ont été modifiées car elles n'ont pas permis d'isoler le produit attendu. Toujours en milieu basique, le composé **162** a été obtenu *via* l'utilisation de soude et d'éthanol permettant à

l'aldolisation d'avoir lieu. Cet intermédiaire a nécessité une étape de purification. Toutefois, il n'a pas été possible de recristalliser ce composé dans le méthanol ou l'éthanol comme pour d'autres intermédiaires de la même famille.



<u>Schéma 64</u>: Synthèse du dérivé **163** par condensation aldolique en milieu basique suivie d'une déprotection par BBr₃

L'inda-aurone **162** a ensuite été déprotégée avec du tribromure de bore pour obtenir le composé **163** sans purification avec un rendement quantitatif. L'étape de déprotection du résorcinol méthoxylé est celle qui génère habituellement le plus de produits secondaires. Or, pour ce composé, la RMN et les analyses de pureté sur HLPC ont montré que le produit était suffisamment pur pour être utilisé tel quel dans la suite de cette synthèse. Toutefois, cette préparation reste racémique : de futures étapes de séparation des énantiomères *R* et *S* peuvent être envisagées au regard des bons résultats obtenus avec le dérivé **163**.

b) Les Inda-aurones (82, 115-118) - Synthèse en milieu acide

D'autres modifications ont été effectuées sur les aurones de type indane (*Schéma 65*). D'une part, l'introduction d'un hydroxyle en position 6 sur le cycle A a été ajoutée. D'autre part, la modification du cycle B avec un méthoxyle en position 2' ou 4' a été réalisée. Les conditions des synthèses précédentes ont été testées mais n'ont pas été retenues puisqu'elles nécessitaient une étape de purification, qui n'a pas été nécessaire avec du chlorure de thionyle²³⁰ dans le méthanol à température ambiante, puisqu'après quelques minutes les produits ont tous précipité dans le milieu réactionnel. Un simple lavage à l'eau et au méthanol a suffi à obtenir des composés avec des rendements acceptables et une pureté supérieure à 95%.



<u>Schéma 65</u>: Synthèse des dérivés 82, 115-118 par condensation aldolique en milieu acide SOCl₂/MeOH

Le composé **82** a également été préparé avec succès *via* cette méthode.

c) Les Indan-1,3-dione-aurones

Synthèse du 2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-1*H*-indène-1,3(2*H*)-dione (74)

Tout comme la condensation aldolique des indanes (2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one) en milieu basique, celle des 1*H*-indene-1,3(2*H*)-diones avec l'aldéhyde approprié est possible. Le produit **164** précipite dans le milieu réactionnel et permet d'obtenir un excellent rendement. Il est ensuite engagé dans une étape de déprotection pour obtenir **74**. En effet, cette déprotection a conduit à obtenir de nombreux produits secondaires, nécessitant quatre purifications successives sur silice suivis d'une recristallisation dans l'acétate d'éthyle pour isoler et caractériser le produit **74** (*Schéma 66*).



<u>Schéma 66</u>: Synthèse 2-(2,4-dihydroxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione **74** à partir dy synthon 1Hindene-1,3(2H)-dione en milieu basique

d) Les Phtalimides (Isoindoline-1,3-dione)

Synthèse du 2-(2,4-dihydroxybenzyl)isoindoline-1,3-dione (75)

La synthèse du dérivé de phtalimide a été réalisée à partir de l'anhydride phtalique et de la 2,4-diméthoxybenzylamine. Plusieurs essais ont été nécessaires pour isoler notre composé (*Schéma 67*). D'après Singh & *al*²³¹, il est possible d'envisager la formation d'un phtalimide sans solvant en chauffant à 100 °C, avec l'addition d'une solution diluée d'acide chlorhydrique, après deux heures.



<u>Schéma 67</u> : Synthèse de l'isoindoline-1,3-dione 75 à partir d'un anhydride phtalique dans l'acide acétique

Dans notre cas, la formation du composé n'a pas été observée avec cette approche, et nous nous sommes tournés vers des protocoles utilisant un solvant. Holmes & *al.*²³² proposent plusieurs méthodes qui favorisent la formation de dérivés phtalimides en fonction des substituants présents sur l'amine primaire. L'ajout de toluène à reflux n'a pas apporté d'amélioration, et seule la réaction à reflux dans l'acide acétique a mené à la formation du phtalimide avec un rendement de 42%. Ainsi, une catalyse acide semble nécessaire pour favoriser la cyclisation du phtalimide. Après quatre jours de réaction, la réaction a été traitée, et le composé a été recristallisé dans un mélange méthanol/acétate d'éthyle/cyclohexane (7:2:1) pour donner **165**. L'étape de déprotection des groupements méthoxyles mène au composé **75**.
e) Les Hémiindigos (HIs)

i. Synthèse du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)indolin-3-one (77)

Le synthon **166** a d'abord été obtenu auprès d'une source commerciale, puis l'intermédiaire **167** a été préparé et purifié, malgré la présence de nombreux produits secondaires difficilement séparables. La pureté du composé **77** est néanmoins essentielle car l'étape de déprotection génère souvent un grand nombre de sous-produits, parfois difficiles à éliminer. De ce fait, nous avons opté pour des conditions de condensation aldolique classiques en présence de potasse à 50% dans le méthanol (*Schéma 68*).



<u>Schéma 68</u> : Synthèse de l'hémiindigo (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)indolin-3-one 77 à partir de la 1acétylindolin-3-one en milieu basique

ii. Synthèse du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-6-hydroxyindolin-3-one (84)

La fonctionnalisation du cycle A avec un hydroxyle en position 6 a été réalisée en s'appuyant sur les travaux de Zhang & *al.*²¹¹ ainsi que sur un brevet²³³, décrivant la caractérisation du composé **169**. Cette synthèse (*Schéma 69*) s'effectue à partir de la *m*-anisidine par action de deux acides de Lewis, BCl₃ et AlCl₃, en présence de chloroacétonitrile dans le nitrobenzène porté à 80 °C. L'ajout des deux acides de Lewis s'effectue après l'ajout de *m*-anisidine et de chloroacétonitrile, séquentiellement à 0 °C car l'addition des deux réactifs génère une réaction exothermique. Le chlorure de bore (1M) en solution dans le dichlorométhane et le chlorure d'aluminium permettent à la fois de chélater l'amine primaire pour diminuer son caractère nucléophile, et de chélater l'azote du chloroacétonitrile afin d'orienter la réaction de Houben-Hoesch sur le carbone du

nitrile en augmentant son électrophilie pour obtenir le composé **168** avec un rendement brut de 68%. La cyclisation est réalisée grâce à un traitement avec de l'anhydride acétique permettant d'acétyler l'amine primaire, la rendant facilement déprotonable par une base comme l'hydrure de sodium. L'anion ainsi généré dans le DMF permet la substitution du chlore et l'accès au dérivé **169** avec un rendement de 16%.



Schéma 69 : Synthèse de la 1-acétyl-6-méthoxyindolin-3-one 169 à partir de la 3-méthoxyaniline

Enfin, l'étape de condensation (<u>Schéma 70</u>) de **169** avec le 2,4-diméthoxybenzaldéhyde a été effectuée avec les conditions décrites précédemment permettant la précipitation de **84** avec un rendement de 40%.



<u>Schéma 70</u> : Synthèse du (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)-6-hydroxyindolin-3-one **84** à partir de la 1acétyl-6-méthoxyindolin-3-one en milieu basique

iii. Synthèse de (Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidène)indolin-3-ones N-fonctionnalisés (78 et 79)

Afin d'explorer les résidus éloignés du site actif, l'azote a été fonctionnalisé avec des chaînes alkyles de taille différentes. Les composés **78** et **79** ont été préparés en *one-pot* puisque les intermédiaires méthoxylés n'ont pas été isolés (*Schéma 71*), en s'appuyant sur les travaux de Velezheva & *al.*²³⁴. L'utilisation de l'hydrure de sodium et 144

d'halogénoalcanes implique la présence de groupements protecteurs sur le motif résorcinol. Les composés finaux **78** et **79** ont nécessité un long travail de purification. Malgré l'étape de purification, les deux isomères (*Z*) et (*E*) ont été observés en RMN mais n'ont pas été séparés comme le rapportent Petermayer & $al.^{235}$



<u>Schéma 71</u> : Fonctionnalisation des azotes du dérivé 55

f) Les Hémithioindigos (HTIs)

Le but est d'obtenir une série d'hémithioindigos en variant le groupement hydroxyle sur les positions 4, 5, 6 et 7 sur le cycle A. Pour ce faire, la **voie F** a été utilisée au laboratoire : elle offre l'avantage d'obtenir des intermédiaires faciles à isoler avec de bons rendements. En revanche, elle nécessite un accès aux précurseurs de type 2-nitroacétophénone hydroxylés ou méthoxylés afin d'obtenir les chalcones nitrées de type **172** nécessaire à la cyclisation (*Schéma 72*). Ces chalcones sont peu disponibles commercialement ou particulièrement coûteuses. C'est la raison pour laquelle la majorité des précurseurs ont été synthétisés au laboratoire.



Schéma 72 : Stratégie de synthèse des chalcones nitrés

À partir des précurseurs listés ci-dessous (**172-176**) (*Schéma 73*), il a été possible de former les intermédiaires de chalcones nitrés nécessaires aux différentes cyclisations finales. La régiosélectivité des nitrations²³⁶ est complexe puisqu'elle est dépendante de

plusieurs facteurs comme l'encombrement stérique, les interactions entre substituants, les effets électroniques et les effets de solvants²³⁷. Les dérivés hydroxylés ont tous nécessité une protection de l'hydroxyle sous forme méthoxyle, pour s'affranchir de tout problème lors de la cyclisation avec Et₃N/DMSO et faciliter les étapes de purifications.



Schéma 73 : Précurseurs 172-176 des chalcones nitrés

i. Synthèse du 2-hydroxy-6-nitroacétophénone (173)

Comme mentionné plus haut, nous avons choisi de ne pas effectuer de réactions de nitration ; le benzaldéhyde **177** (*Schéma 74*) a donc été formylé *via* la réaction de Duff sur le 3-nitrophénol en utilisant de l'hexaméthylènetétramine (HMTA) dans le TFA à 90 °C, selon le protocole de Jacobs *& al.*²³⁸ Après trois heures de réaction, de l'eau à 0 °C est ajoutée, le mélange est traité et le régioisomère **177** purifié et caractérisé en accord avec la littérature. Plusieurs régioisomères ont été formés au cours de cette réaction, expliquant le rendement de seulement 48%. L'intermédiaire **177** est ensuite engagé dans une étape de protection qui est réalisée par action de K₂CO₃, en présence de diméthylsulfate dans l'acétone à reflux. Après 5 heures à reflux, le mélange est filtré puis évaporé afin de mener à l'obtention du 2-méthoxy-6-nitrobenzaldéhyde de manière quantitative. Le composé **178** est ensuite engagé avec du triméthylaluminium (TMA), sous atmosphère inerte à température ambiante dans le toluène. Le TMA est utilisé pour

transformer l'aldéhyde et obtenir l'alcool secondaire sous la forme d'un mélange racémique qui sera ensuite oxydé afin d'isoler la cétone correspondante.



Schéma 74 : Synthèse du synthon 179 à partir du 3-nitrophénol

L'oxydation de l'alcool benzylique **179** en présence de MnO₂ à 40 °C n'a pas permis d'isoler le composé **180**, et d'autres tentatives avec différents lots de MnO₂ activé ou non ont été effectuées sans succès, malgré une description précise dans la littérature²³⁹ (*Schéma 75*). Nous avons donc choisi de changer de réactifs, et d'utiliser le réactif de Dess Martin, sans succès.



<u>Schéma 75</u> : Tentative d'oxydation de l'alcool secondaire des dérivés 71 et 73

L'oxydation de l'alcool secondaire en cétone n'a été possible qu'avec l'utilisation de MnO₂ sur le dérivé **181** (sans méthoxyle) pour isoler le produit **173** (*Schéma 75*).

ii. Synthèse du 5-hydroxy-2-nitroacétophénone (174)



Des essais de nitration directe de la 3-hydroxyacétophénone ont tout de même été effectués en présence d'acides sulfurique et nitrique, à différentes températures. Néanmoins, puisque la nitration en *ortho* de la cétone est fortement défavorisée par son effet électroattracteur, nous nous sommes heurtés à des problèmes de sélectivité. Griffin & Kasko²⁴⁰ proposent de réaliser cette nitration *en ortho* de la cétone (*Schéma 76*) en formant le dimère **182** à l'aide du chlorure d'oxalyle. La réaction a lieu en présence d'un excès de triéthylamine, l'ajout de chlorure d'oxalyle est lent et s'effectue en deux fois afin d'éviter une réaction trop violente. Après 10 heures d'agitation, le dimère précipite. Il est filtré puis lavé abondamment avec de l'eau, et directement engagé dans l'étape de nitration. Celle-ci s'effectue à -20 °C ; des températures proches de -10 °C diminueraient le rendement²⁴⁰ d'environ 65% d'après la littérature. L'agitation est aussi un facteur important : lors de l'ajout du dimère dans le milieu réactionnel, une pâte épaisse se forme, empêchant l'aimant de tourner. L'utilisation d'agitation mécanique aurait pu constituer une alternative, qui n'a pas pu être explorée faute de temps.



Schéma 76 : Synthèse du précurseur 183 à partir du dimère 182

Après traitement de l'intermédiaire **174**, l'hydroxyle est protégé dans les mêmes conditions décrites précédemment avec Me₂SO₄ et K₂CO₃. Le composé **183** a été isolé avec un rendement de 80% et a été utilisé tel quel.

iii. Synthèse de la 4-hydroxy-2-nitroacétophénone (175)



Pour des raisons de sélectivité, il n'a pas été envisagé d'isoler le composé **175** par nitration de l'acétophénone **184**. D'après Zhang & *al.*²⁴¹ il est possible de contourner les effets de sélectivité habituels pour forcer une *ipso*-nitration, qui implique une nitration de la liaison C-H en ortho de groupement directeur et facilement clivable, comme une *o*-méthyloxime préparée²⁴² à partir d'une acétophénone (*Schéma 77*). Cette réaction présenterait plusieurs avantages : d'abord la régiospécificité de la liaison libre C-H nitrée, et également la possibilité de mononitration sur une seule liaison C-H sans préfonctionnalisation et en conditions neutres. Nous avons ainsi préparé le composé **185** pour réaliser une nitration dirigée en *ortho* de l'oxime. La préparation de cette oxime s'effectue avec un rendement quantitatif, en présence d'acétate de sodium et de chlorhydrate de methoxylamine dans un mélange éthanol/eau, et le produit est directement engagé dans l'étape de nitration.

L'étape de nitration est réalisée avec l'assistance d'un catalyseur au palladium, ici Pd(OCOCF₃)₂ (choisi parmi plusieurs catalyseurs comme Pd(OAc) ou Pd(PPh₃)₂Cl₂), l'oxydant K₂S₂O₈ et une source de groupement nitro, ici AgNO₂, dans le dichloroéthane à 110 °C en cuve scellée. D'après Zhang & *al.*^{241,243-245}, la réaction de nitration se déroulerait *via* un mécanisme radicalaire mettant en jeu le nitrate d'argent (AgNO₂) dans un cycle catalytique Pd^{II}/Pd^{IV}. Le composé **187** n'a cependant pas été isolé malgré plusieurs tentatives (*Schéma 77*).



<u>Schéma 77</u>: Synthèse du précurseur 187 par réaction palladocatalysée

iv. Synthèse du 3-methoxy-2-nitroacétophénone (176)



Le composé **176** disponible commercialement a été protégé dans les conditions de méthylation décrites précédemment. Aucun traitement, ni aucune purification n'ont été requis (*Schéma 78*). Le composé **188** a ensuite été engagé dans l'étape de condensation pour obtenir la 2'-nitrochalcone.



Schéma 78 : Méthylation du dérivé 176

v. Synthèse & cyclisation des 2'-nitrochalcones (189-192)



Plusieurs méthodes sont disponibles pour réaliser une condensation aldolique. Lin *& al.*²⁴⁶ proposent des conditions permettant d'isoler les 2'-nitrochalcones (<u>Schéma 79</u>) puisqu'après quelques heures à 0 °C dans l'éthanol en présence de la soude, les 2'-nitrochalcones cristallisent dans le milieu réactionnel avec des rendements acceptables.



Schéma 79 : Synthèse des 2'-nitrochalcones 189-192

Ces cinq composés ont ensuite été cyclisés à l'aide de la méthode de Nguyen & Retailleau²²¹, en présence de DMSO, de soufre et de triéthylamine (*Schéma 80*). Basé sur des observations il semblerait que le mécanisme proposé par Nguyen & Retailleau²²¹

(*Schéma 81*) soit initié par une addition de Michael de la triéthylamine sur la nitrochalcone, donnant un intermédiaire céto-ammonium stabilisé par sa charge positive et en équilibre avec les formes énol/cétol. La cyclisation nait de l'attaque nucléophile de la forme énol sur le cyclooctasoufre (forme cyclisée de la fleur de soufre) formant un intermédiaire polysulfure. Elle est achevée par une attaque nucléophile du soufre sur le cycle aromatique, formant un zwitterion. La charge négative portée par le cycle aromatique serait stabilisée par l'effet électroattracteur du carbonyle, lui-même activé par la charge positive de l'ammonium formé plus tôt. L'élimination de cette amine tertiaire mène ensuite à l'hémithioindigo correspondant. L'effet du solvant reste flou d'après les auteurs, mais il pourrait stabiliser des intermédiaires polaires et accélérer le processus de cyclisation.



<u>Schéma 80</u>: Cyclisation des 2'-nitrochalcones nitrées 193-196

Lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle, les composés **195** et **196** ont précipité, et seul l'hémithioindigo **193** a nécessité une étape de purification sur gel de silice. Le composé **194** n'a quant à lui pas pu être cyclisé.



Schéma 81 : Mécanisme de cyclisation des 2'-nitrochalcones

vi. Synthèse du (Z)-2-(2,4-diméthoxybenzylidène)-6-méthoxybenzo[b]thiophèn-3(2H)-one (197)



La synthèse de la 4-hydroxy-2-nitroacétophénone n'ayant pas fonctionné, nous avons choisi d'isoler la 6-methoxybenzo[*b*]thiophen-3(*2H*)-one permettant un couplage avec le 2,4-diméthoxybenzaldéhyde pour préparer **197** (*Schéma 82*)²⁴⁷. La synthèse s'effectue à partir du synthon **198** avec une fonctionnalisation du thiol en présence de soude et d'acide chloroacétique dans l'eau à 60 °C pour obtenir l'acide **199**, isolé par précipitation à pH 1. Ensuite, le chlorure d'acyle est formé *in situ* par l'action du chlorure de thionyle sur l'acide **199**, qui est ensuite cyclisé par une réaction de Friedel-Crafts en présence de chlorure d'aluminium pour donner la 6-méthoxybenzo[*b*]thiophén-3(*2H*)-one. Celle-ci est directement engagée dans l'étape de condensation avec de l'oxyde d'aluminium neutre permettant d'obtenir **197**. Après purification sur colonne, le rendement sur trois étapes est de 11%. Les benzo[*b*]thiophen-3(*2H*)-one sont par ailleurs décrites²⁴⁷ comme instables.



Schéma 82 : Synthèse du dérivé 197 à partir du 3-méthoxythiophénol

vii. Synthèse de l'acide (Z)-2-(2,4-diméthoxybenzylidène)-3-oxo-2,3-dihydroben zo[b]thiophène-7-carboxylique (200)



La formation de l'acide 3-oxo-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophène-7-carboxylique **203** (*Schéma 83*) a été réalisée à partir du dimère **201**, réduit en milieu basique avec du dithionite de sodium, pour ensuite former l'acide 2-mercaptobenzoïque (non représenté) *in situ*. Celui-ci est aussitôt fonctionnalisé avec l'acide chloroacétique, pour former l'acide **202** qui est cyclisé en composé **203** après activation de la fonction acide par le chlorure de thionyle et réaction de Friedel-Crafts intramoléculaire. Les conditions de cyclisation sont semblables à celles décrites précédemment pour le dérivé **199**. Les conditions douces en présence d'oxyde d'aluminium pour l'étape de condensation de **203** n'ont pas fonctionné, probablement à cause de la présence de l'acide carboxylique. Des conditions classiques en présence d'hydroxyde de potassium à 50% dans le méthanol ont permis l'isolement de l'intermédiaire **200**.



Schéma 83 : Synthèse du dérivé 200 à partir de l'acide 2,2'-disulfanediyldibenzoïque

viii. Déprotection & Purification (80, 85-88)

Les composés **193**, **195**, **196**, **197** et **200** ont subi une étape de déprotection des groupements méthoxyles présents à la fois sur le cycle B et sur le cycle A (*Schéma 84*) Ces déprotections avec BBr₃ ont été réalisées à température ambiante sous agitation pendant 12h. Cette étape est particulièrement lente et génère de nombreux produits secondaires, impliquant une étape de purification sur gel de silice pour les dérivés **80** et **85-88**.



Schéma 84 : Déprotection des dérivés 193, 195, 196-197 et 200

g) Les Indazoles

Synthèse de la 2-(2,4-dihydroxybenzyl)-1,2-dihydro-3H-indazol-3-one (76)

Conrad & $al.^{248}$ exploitent le mécanisme présenté plus haut dans le <u>Schéma 55</u> pour former des liaisons *N*-*N* et obtenir des 1*H*-indazolones *N*¹,*N*²-disubstituées. L'avantage de cette voie de synthèse est qu'elle ne nécessite aucune étape de purification pour obtenir le composé (<u>Schéma 85</u>). L'intermédiaire **204** est obtenu par substitution nucléophile du

1-(bromométhyl)-2-nitrobenzene par la 2,4-diméthoxybenzylamine en présence de triéthylamine. La cyclisation est amorcée par une base, ici de l'hydroxyde de potassium, générant un carbanion en α de l'amine et permettant d'obtenir le composé **205** en chauffant à 60 °C dans le méthanol. La présence du méthoxyle en position 3 nous permet d'obtenir une cétone après déprotection.



<u>Schéma 85</u> : Synthèse de l'indazolone 76 à partir du mécanisme de Davis-Beirut

Le composé **205** est ensuite déprotégé avec le tribromure de bore pour conduire au composé **76**. Cette *2H*-indazolone peut s'isomériser en *1H*-indazolone **99**, thermodynamiquement plus stable. Celui-ci peut être recristallisé dans un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle ou purifié avec un système d'éluant dichlorométhane/méthanol. Isolé avec un rendement de 11% sur trois étapes, sa préparation a demandé une quantité de réactif de départ conséquente, à cause de la dégradation de l'intermédiaire **205** durant la déprotection.

Le mécanisme suggère que le composé **205** est une 2*H*-indazolone N^2 -substituée, moins stable, comme l'indiquent Conrad & *al.* Le composé **76** pourrait être le précurseur d'une plus large librairie de 1*H*-indazolones N^1 - N^2 disubstituées, par une addition électrophile

1,6 à partir de 2*H*-indazolones sur des dérivés électrophiles, avec de bons rendements généralement observés.

h) Les Benzo[b]furanes

i. Synthèse du 2-(2,4-diméthoxybenzyl)-7-méthoxybenzofurane (206)



Ce premier dérivé est obtenu par réduction partielle de l'aurone 2-(2,4dimethoxybenzyl)-7-methoxybenzofuran-3(2H)-one **207** obtenue au laboratoire par simple condensation aldolique entre la 7-méthoxybenzofuran-3(*2H*)-one et le 2,4diméthoxybenzaldéhyde dans le méthanol en présence de KOH (50%) à température ambiante. L'intermédiaire **207** est réduit dans un mélange d'éther avec 4 équivalents de LiAlH₄ et 4 équivalents de chlorure d'aluminium (*Schéma 86*). La réduction de ce carbonyle α , β -insaturé provoque la migration de double liaison, favorisant l'aromaticité du furane.



<u>Schéma 86</u> : Réduction de la cétone intracyclique du dérivé

La réduction uniquement en présence de LiAlH₄ aurait probablement conduit à un mélange comme l'indiquent Kurosawa & Morita²⁴⁹. L'association de ce réducteur et de cet acide de Lewis est connue²⁵⁰ pour générer un réducteur plus réactif que LiAlH₄, l'alane, d'après l'équation bilan suivante (<u>Schéma 87</u>) :

$$(3 \text{ LiAIH}_4 + \text{AICI}_3 \longrightarrow 4 \text{ AIH}_3 + 3 \text{ LiCI})$$

Schéma 87 : Équation de formation de l'alane AlH3

Le faible rendement de cette réduction s'explique par la très faible solubilité de **103** dans l'éther, compromettant la consommation du réactif dans son intégralité. Lancer la réaction sous ultrasons pourrait faciliter son avancement et ainsi augmenter le rendement en évitant une purification sur gel de silice.

ii. Synthèse du (2',4'-diméthoxyphenyl)(7-méthoxy-3-méthylbenzofuran-2-yl) méthanone (208)



Basée sur les travaux de Rangaswamy & *al.*²⁵¹ qui proposent une voie de synthèse permettant d'accéder facilement à des benzo[*b*]furanes en *one-pot*, à partir d'acétophénone hydroxylée en 2 et de bromoacétophénone, cette réaction est catalysée par une base organique comme le DBU. Le mécanisme (*Schéma 90*) implique tout d'abord la *o*-alkylation de **216** induite par l'addition nucléophile du DBU sur le dérivé **215** suivi par la formation d'un anion **219** permettant la cyclocondensation intramoléculaire qui d'après Rangaswamy & *al.*²⁵¹ conduit à des rendements supérieurs à 70%. Le rendement obtenu dans notre cas est cependant très inférieur (10%). La synthèse du réactif **212** a nécessité plusieurs essais à partir du composé **209** avec une mono-méthylation, suivi d'un réarrangement de Fries de son analogue acétylé **211**. Cette stratégie n'a pas permis d'isoler **212**. En effet, le réarrangement en présence de chlorure d'aluminium dans le xylène à 150 °C n'a pas fonctionné (*Schéma 88*).

Pour accéder au synthon **212**, deux voies peuvent être envisagées. La monodéméthylation du composé **214**, disponible dans le commerce, n'est pas une solution permettant d'accéder à de grosses quantités de **212**. En effet, l'acétophénone est relativement chère, et la déprotection peut toucher le deuxième groupement méthoxyle (*Schéma 88*). À l'inverse, la transformation de l'acide en cétone (*Schéma 89*) grâce au méthyllithium dans le THF à 65 °C permet d'accéder à des quantités plus importantes.



<u>Schéma 88</u> : Formation de la cétone **212** par deux voies différentes : réduction d'un acide carboxylique **213** ou déprotection par monodéméthylation du dérivé **214**



<u>Schéma 89</u> : Mécanisme de réduction de l'acide carboxylique **213** en présence de 3éq de MeLi

La réaction²⁵² se fait en présence de 3 équivalents de méthyllithium permettant de générer un intermédiaire acétal tétraédrique instable qui forme une cétone en éliminant de l'oxyde de lithium. Le composé **108** formé peut être purifié par extraction acidobasique.



Schéma 90 : Mécanisme de synthèse du dérivé 208 en présence de DBU

Nous avons ensuite imaginé des modifications du composé **208** (*Schéma 91*) avec l'oxydation du CH₃ en présence d'oxyde de sélénium dans un mélange (50/50) dioxane/H₂O. Cette réaction avait pour but de formyler le groupement méthyle ; en effet le caractère électrophile de l'aldéhyde aurait pu nous permettre de réaliser diverses fonctionnalisations pour explorer cette partie du site actif. Toujours dans la même optique, l'halogénation du CH₃ avec l'utilisation de NBS et de peroxyde de benzoyle dans le dichloroéthane devait normalement conduire à la bromation du méthyle afin de réaliser des substitutions nucléophiles pour y greffer de nouveaux groupements.



<u>Schéma 91</u> : Modifications envisagées du dérivé 208

La dernière modification envisagée devait permettre de réduire la cétone en présence d'hydrazine monohydrate dans le diéthylène glycol à 180 °C. Cependant les différentes transformations n'ont pas fonctionné.

iii.Synthèse de la (3-amino-7-méthoxybenzofuran-2-yl)(2,4-diméthoxyphényl) méthanone (222)



La synthèse de l'intermédiaire **225** nécessite la *o*-alkylation du nitrile **224** avec une bromoacétophénone (*Schéma 96*) en présence d'une base inorganique. Le nitrile a été conçu à partir de l'aldéhyde **223**, en utilisant ce que Rokade & Prabhu²⁵³ décrivent comme une réaction de Schmidt chimiosélective. En effet, elle permet d'isoler un seul produit, le nitrile, contrairement à une réaction de Schmidt classique menant à un mélange de formanilides et de nitriles à partir d'un aldéhyde. Cette sélectivité est due à l'utilisation de

NaN₃ en présence de l'acide trifluorométhanesulfonique qui permet de générer de l'acide

NaN₃ + CF₃SO₃H -

azothydrique, un puissant réducteur (<u>Schéma 92</u> : Équation de formation de l'acide azothydrique).



<u>Schéma 92</u> : Équation de formation de l'acide azothydrique

L'aldéhyde subit une addition nucléophile de l'acide azothydrique (*Schéma 94*), pour former l'azidoalcool correspondant. La libération d'une molécule d'eau conduit à la formation d'un intermédiaire, avant l'élimination de diazote qui génère le produit **224** avec un rendement de 35% (*Schéma 93*)



<u>Schéma 93</u> : Formation du dérivé 224 par réaction de Schmidt



Schéma 94 : Mécanisme de la réaction de Schmidt

Ð

 \rightarrow HN₃ + Na + CF₃SO₃

Θ



Schéma 95 : Mécanime de formation de l'intermédiaire 222

L'utilisation d'une base inorganique et de méthanolate de sodium dans cette voie de synthèse (*Schéma 95*) et (*Schéma 96*) permet d'éviter toute étape de purification sur colonne. En effet, l'intermédiaire *O*-alkylé est obtenu avec un rendement de 49% et simplement lavé avec de l'eau et de l'éthanol. L'anion formé par action du méthanolate permet d'initier la cyclisation intramoléculaire sur le nitrile pour former le produit **222** avec un rendement de 79% après lavage.



<u>Schéma 96</u> : Réaction de formation de l'intermediaire 222

iv. Déprotection des Benzo[b]furanes (91-93)

La purification des produits de déprotection des benzo[*b*]furanes **91**, **92**, **93** s'est avérée plus compliquée qu'avec les dérivés d'aurone présentant le même motif sur le cycle B. Le benzo[*b*]furane **92** a par exemple dû être purifié sur HPLC en phase inverse comme pour

les azaaurones *N*-fonctionnalisées. Pour les composés **91** et **92**, une élution lente avec des systèmes d'élution parfois très polaires a été nécessaire (<u>Schéma 97</u>).



Schéma 97 : Déprotection des dérivés 206, 208 et 222

3. Modulation du cycle B

a) Série Fluorée (98-99, 100 et 105-110)

Les composés halogénés ci-dessous (*Schéma 98*) et leur synthèse sont déjà connus dans la littérature. Nous avons opté pour une méthode de synthèse rapide ne nécessitant aucune étape de purification et permettant d'obtenir de bons rendements. Cette méthode décrite par Manjulatha & *al.*²⁵⁴ permet de réaliser des condensations aldoliques avec des dérivés de benzaldéhyde sous irradiation ultrasonique en présence du diacétate d'éthylènediamine (EDDA) dans l'acétonitrile. Les réactions durent 5 à 30 minutes avant la précipitation du produit, des durées avantageuses par rapport aux autres méthodes classiques. Les composés **98** à **110** ont été isolés très rapidement ; un simple lavage à l'eau chaude et à l'acétonitrile a permis d'éliminer les traces de réactif restant.



Schéma 98 : Synthèse des dérivés 98-110 sous ultrasons

La synthèse du composé **101** a également été testée sous ultrasons en présence de EDDA, sans succès (*Schéma 99*). La présence d'un groupement polaire tel que l'hydroxyle sur le cycle A semble en effet compromettre la réaction. Afin d'obtenir cette aurone, nous avons choisi les conditions décrites par Cheng & *al.*²⁵⁵. Ici le couplage est effectué à température ambiante en présence d'acide acétique et d'acide chlorhydrique concentré. Le composé **226** a été synthétisé à l'aide des deux méthodes décrites ci-dessus ; cependant la synthèse sous catalyse acide a mené à un meilleur rendement (*Schéma 99*).



<u>Schéma 99</u> : Synthèse des dérivés **101** et **104** en présence d'acide acétique

Le composé **104** a ensuite été obtenu par recristallisation dans l'acétonitrile après déprotection avec le tribromure de bore dans le dichlorométhane à température ambiante.

b) Série N-Diméthylamine (96-97)

La préparation des dérivés d'aurone **96** et **97** (*Schéma 100*) a été réalisée dans des conditions basiques en présence de KOH (50%) dans le méthanol à reflux. Si le composé **97** a été isolé après purification avec un rendement de 40%, l'aurone **96** n'a, quant à elle, pas été purifiée. En effet, un lavage au méthanol et à l'eau réalisé après précipitation a mené à l'obtention d'une pureté suffisante.



Schéma 100 : Synthèse des dérivés 127 et 128 en milieu basique

c) Série Quinoléine (230)

La synthèse proposée dans le (*Schéma 101*) est inspirée de plusieurs travaux menant au produit **230.** Néanmoins, le caractère acido-basique de certains intermédiaires comme **229** s'est révélé difficile à gérer dans la pratique. Le composé **228** est obtenu après une chlorométhylation du réactif **227** en présence de paraformaldéhyde à 37% dans l'acide chlorhydrique mais également en saturant le milieu réactionnel avec HCl gazeux à 0 °C durant 2 h, favorisant la précipitation de l'intermédiaire **228**. Cet intermédiaire permet de générer un accepteur de Michael de type quinone méthide favorable aux additions nucléophiles. Bien que l'hydrolyse dans l'ammoniaque à 30% dans l'eau soit rapide, l'extraction du composé **229** s'est révélée délicate. Après addition d'ammoniaque, le pH est de 9-10, et il est difficile d'isoler le produit soluble dans l'eau.



<u>Schéma 101</u> : Fonctionnalisation de la quinoléine 227

L'oxydation du composé **229** a été effectuée avec plusieurs types de réactifs, d'abord avec du dioxyde de manganèse activé ou non dans différent solvants comme le dichlorométhane et l'acétonitrile, puis avec du DMSO²⁵⁶ et de l'acide sulfurique, sans succès. L'utilisation de 3-nitrobenzènesulfonate de sodium dans l'eau avec de la soude à 5% a été décrite 1958²⁵⁷ pour l'oxydation de l'alcool primaire **229** en aldéhyde **230**, mais dans notre cas la réaction n'a pas aboutie.

CHAPITRE IV : Projet *Helicobacter pylori*

I. Des antibiotiques à la résistance des bactéries

Bien que les antibiotiques n'aient été introduits dans la pratique clinique qu'au milieu du siècle dernier, leur implication dans la gestion d'infections microbiennes est présente depuis l'Égypte ancienne ou en médecine antique chinoise. L'ère moderne des antibiotiques a commencé avec la découverte de la pénicilline par Sir Alexander Fleming en 1928, cultivée à partir d'un champignon nommé Penicillium notatum. Dès lors, les antibiotiques ont submergé et révolutionné le marché pharmaceutique. Le développement de nouveaux antibiotiques par voie semi-synthétique ou par fermentation microbienne a transformé la médecine moderne et sauvé des millions de vies. D'abord prescrit dans les années 1940 pour traiter les maladies graves, la pénicilline a largement été utilisée pour contrôler les infections bactériennes des soldats durant la Seconde Guerre Mondiale. Dès 1950, on constate une émergence et une propagation de souches bactériennes résistantes à tous les antibiotiques disponibles. La plupart des progrès de cette décennie ont ainsi été menacés, révélant la limitation des médicaments disponibles sur le marché à cette époque. En réponse, de nouveaux antibiotiques ont été développés comme les bêta-lactamines. Malheureusement, depuis maintenant 60 ans des résistances aux antibiotiques ne cessent d'être observées²⁵⁸ (*Tableau 8*). Ce processus de résistance avait déjà été souligné par Sir Alexandre Fleming, dès 1945.

Antibiotiques	Années de mise sur le marché	Année de découverte de résistance	Bactéries résistants
	1941	1942	Staphylococcus aureus
Pénicilline		1967	Streptococcus pneumoniae
		1976	Neisseria gonorrhoeae
Vancomycine	1958	1988	Enterococcus faecium r
Vancomyenie	1,00	2002	Staphylococcus aureus
Amphotéricine B	1959	2016	Candida auris
Méthicilline	1960	1960	Staphylococcus aureus
Céphalosporines (céfotaxime)	1980	1983	Escherichia coli
Azithromycine	1980	2011	Neisseria gonorrhoeae
Imipénem	1985	1996	Klebsiella pneumoniae carbapénémase (KPC)
Ciprofloxacine	1987	2007	Neisseria gonorrhoeae
Fluconazole	1990	1988	Candida
Caspofungine	2001	2004	Candida
Daptomycine	2003	2004	Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
Ceftazidime-avibactam	2015	2015	Klebsiella pneumoniae carbapénémase (KPC)

<u>**Tableau 8**</u> : Principales résistances de bactéries aux antibiotiques ces 80 dernières années

En effet, il atteste que la résistance aux antibiotiques est clairement liée à une surutilisation, et met en garde contre des recours abusifs à ces traitements. Ces abus ne sont pas uniquement dus à la prise d'antibiotiques chez l'humain. Dans les pays développés, les antibiotiques sont largement utilisés dans le secteur de l'agriculture. Chaque année ce sont en effet 17 000 tonnes d'antibiotiques qui sont utilisés aux Etats-Unis, dont 80% pour le bétail. La contamination environnementale qui en résulte contribue au développement de résistances bactériennes. Ce bétail, une fois ingéré par l'humain, contribue aux transferts de bactéries résistances chez l'homme^{259–261}.

Parmi ces bactéries, le transfert de différentes souches de *Staphylococcus aureus* (SAR) résistantes à la pénicilline, à la méthicilline et plus récemment à la daptomycine, est particulièrement préoccupant. Le SAR est une infection courante qui entraîne une mortalité importante en causant des lésions cutanées et des pneumonies potentiellement mortelles quel que soit l'âge et l'état de santé des personnes concernées. On impute à cette bactérie 11 000 décès chaque année sur 80 000 individus infectés, faisant de cette souche la bactérie la plus mortelle résistante aux antibiotiques¹³⁴. Pour les souches les plus résistantes, de nouveaux antibiotiques peuvent être prescrits, tels que le linézolide, la dalfospristine, la télavancine, la tigécycline, la ceftaroine, l'oritavancine, la dalbavancine ou le tédizolide. Malheureusement, la balance bénéfice/risque est incertaine, en raison des toxicités hors cibles de certaines de ces molécules. Le développement de nouveaux médicaments antibactériens permettant de contourner les mécanismes de résistance existants, est donc un enjeu majeur de santé publique mondiale²⁶².

II. Dérivés d'aurones comme agents antibactériens

Dans le cadre du développement de nouveaux antibactériens, certains flavonoïdes sont connus comme ayant une activité contre le SAR²⁶³. Parmi eux, les aurones représentent une classe mineure dont les propriétés antibactériennes sont également connues mais peu exploitées. Au sein de cette sous-famille, trois composés naturels (*Schéma 102*) particuliers ont montré une activité antibactérienne : la céphalocérone qui est extraite du cactus *Cephalocereus senilis*, connue pour inhiber la croissance d'*Erwinia cacticida*, une bactérie de type entérobactérales qui infecte principalement les plantes ; ainsi que

l'hispidol et son dérivé glycosylé l'hispidol-4'-O- β -d-glucoside. Ces derniers ont montré une activité antifongique en inhibant significativement *Ascochyta medicaginis* (ou *Phoma medicaginis*), pathogène qui infecte principalement la luzerne, la lentille et le pois chiche, causant ce qu'on appelle communément la tige noire de printemps.



Schéma 102 : Composés naturels de type aurone avec une activité antibactérienne

Dans le cadre du développement de nouveaux antibactériens, une large librairie d'aurones diversement substituées aux positions 4, 6, 7, 2', 3', 4', 5' et/ou 6' a d'abord été testée contre le S. aureus résistant à la méthicilline (SARM, à gram positif) et P. aeruginosa (gram négatif) afin de déterminer les valeurs de MIC (concentration minimal inhibitrice). Ces tests ont ensuite été réalisés sur un panel plus élargi de micro-organismes, d'origines bactérienne (gram positif/négatif) ou fongique. Parmi tous les composés testés, trois se sont révélés particulièrement actifs contre les bactéries à gram positif avec néanmoins quelques variations d'activité (*Tableau 9*). À l'inverse, ces trois composés se sont révélés inactifs sur toutes les bactéries à gram négatif à l'exception de H. pylori, avec les dérivés 231 et 233 et V. alginolyticus avec les dérivés 231-233. Des activités antifongiques n'ont été relevées que pour le composé **231** contre *A. niger* et *F. graminearum*, de même pour le composé 233 contre C. albicans. La détermination des valeurs de MBC (concentration bactéricide minimale) pour ces trois dérivés a démontré l'effet antimicrobien via une action bactéricide, les valeurs de MIC et MBC étant identiques. Les résultats obtenus concernant H. pylori et V. alginolyticus ont montré une bonne sélectivité vis-à-vis des souches à gram positif. Cette sélectivité est surprenante car les dérivés de flavonoïde ont souvent montré une activité similaire sur les bactéries à gram positif et à gram négatif, comme l'indiquent Echeverría & al.²⁶⁴ avec des flavones ou des flavanones. Cette approche est également prometteuse pour le traitement d'infections gastrointestinales puisque ce type de pathologies nécessitent une bonne sélectivité pour épargner la flore intestinale.

Cibles		HO CHO CONTRACTOR	HO, C,	HO, CHARACTER COMP		
		231	232	233		
	A. gandavensis	31.25	15.6	31.25		
	B. subtilis	62.5-125	62.5	7.8		
	B. subtilis (résistant à la nisine)	31.25	31.25	3.9		
	C. botulinum	500	500	62.5		
	C. coccoides	500	>500	250		
Bacteries a	C. difficile	62.5	62.5	31.25		
Grain posici	C. perfringens	7.8	31.25-62.5	31.25-62.5		
	E. faecalis	15.6	125-250	15.6-31.25		
	L. lactis	15.6	15.6	31.25		
	P. acnes	31.25	31.25	31.25		
	S. aureus SARM	15.6-31.25	7.8-15.6	15.6		
	S. thermophilus	31.25	31.25	125		
	A. baumannii	>500	>500	>500		
	A. baumannii MRS	>500	>500	>500		
	B. thetaioataomicron	>500	>500	>500		
	C. farmer	>500	>500	>500		
	C. corrosifs	>500	>500	>500		
	E. coli	>500	>500	>500		
Bactéries à	E. coli MRS	>500	>500	>500		
Gram négatif	E. coli EHEC K88	>500	>500	>500		
di uni negutii	H. pylori	15.6	>500	15.6		
	K. pneumoniae	>500	>500	>500		
	K. variicola	>500	>500	>500		
	S. enterica	>500	>500	>500		
	S. flexneri	>500	>500	>500		
	V. alginolyticus	31.25	125	3.9		
	V. diable	>500	>500	>500		
Mycobactérie	M. smegmatis	>500	>500	>500		
	A. flavus	>500	>500	>500		
	A. ochraceus	>500	>500	>500		
Champignons	A. niger	62.5	>500	>500		
	C. albicans	>500	>500	125		
	F. graminearum	31.25	>500	500		
	F. oxysporum	>500	>500	>500		
	F. verticillioides	>500	>500	>500		
	P. verrucosum	>500	>500	>500		
	S. chartarum	>500	>500	>500		

<u>**Tableau 9**</u> : Criblage de plusieurs aurones dont **231-233** sur différents micro-organismes

L'activité biologique des aurones **231** et **233** dépend essentiellement du nombre de groupes hydroxyles présents. Nous nous proposons ici d'explorer les capacités d'inhibition des aurones contre *H. pylori*, sur la base de ces résultats préliminaires.

III.Conception d'aurones contre H. pylori

1. Pathogénèse d'Helicobacter pylori

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est un bacille hélicoïdal microaérophile découvert en 1983. Touchant près de la moitié de la population mondiale, il est responsable de l'infection bactérienne la plus fréquente et la plus persistante au monde. Dans les pays développés, la prévalence d'infection est inférieure à 40%, contre 90% dans les pays en développement. Le mode de transmission de la bactérie peut se faire par voie oro-orale ou gastro-orale. En effet, cette bactérie a été isolée à partir de selles, de salives et de plaques dentaires. On constate qu'*Helicobacter pylori* est impliquée dans la gastrite chronique active, dans le développement d'ulcères gastro-duodénaux mais elle constitue surtout un facteur de risque dans le développement du cancer gastrique.

Plusieurs stratégies de traitement sont disponibles mais leur efficacité est compromise par l'émergence rapide de souches résistantes aux antibiotiques, ainsi que par la faible adhérence des patients aux traitement. Ces deux phénomènes réduisent l'efficacité des traitements d'environ 80%²⁶⁵.

Dans un premier temps lorsque *H. pylori*, elle est immédiatement éradiquée à l'aides d'antibiotiques. Les traitements de première intention sont scindés en deux groupes distincts dépendant de la résistance à la clarithromycine (antibiotique principalement pour cette bactérie). Selon le taux de résistance, les traitements vont être adaptés en associant plusieurs antibiotiques. On parlera alors de double, triple ou quadruple thérapie, ou encore de thérapie hybride ou concomitante. Viendront ensuite les traitements de deuxième et troisième intention basés sur la quadruple thérapie avec ou sans bismuth.^{265,266}

L'utilisation de probiotiques a également été suggérée pour diminuer les effets secondaires des antibiotiques actuels et pour améliorer le taux d'éradication de *H. pylori*. *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) a été identifiée comme étant le meilleur choix de souche pour l'utilisation de probiotique. Des études sur l'efficacité de *L. reuteri* utilisé en tant qu'adjuvant avec un antibiotique ont déjà été effectuées. En particulier, un essai sur 23 patients a été mené reposant sur l'utilisation de cette même souche couplée au pantoprazole, avec des taux d'éradication de 65%. D'autres études examinent la possibilité d'utiliser des probiotiques alternatifs (*Bifidobacterium animalis lactis, Enterococcus faecium* ou *Saccharomyces boulardii*) en tant qu'adjuvants dans le cadre de l'éradication de *H. pylori*².

Nombreuses sont les études publiées ces dernières années, relatives aux traitements d'éradication de *H. pylori*. Les résultats sont variables mais renforcent l'intérêt de développer de nouveaux traitements contre l'infection bactérienne la plus fréquente et la plus persistante dans le monde. C'est dans cette optique que nous souhaitons proposer une étude sur la relation structure-activité des aurones polysubstituées comme antibactériens contre *H. pylori*.

2. Relation Structure-Activité

Plusieurs dérivés d'aurones déjà disponibles au laboratoire ont été criblés sur *H. pylori,* dans le but d'établir une relation structure-activité à partir des MIC. Ces informations résumées dans le <u>Tableau 10</u> ont permis d'établir une ligne directrice pour la suite des synthèses.

	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244
	\square		OBn OMe	ОН	ОН	но он	ОН	,i-Pr		ОН	Et
CH ℃	-	-	-	100	-	-	-	25	25	-	-
HO CHO	15 ,6 -31,2	62,5- 500	7,8-15,6	-	-	-	62,5-125	-	-	62,5- 250	-
OH OH O	-	-	-	-	100	125-500	-	-	-	125	125- 500

Tableau 10 : Valeurs de MIC des aurones 234-244 contre H. pylori

En comparant les composés **234-236** avec le reste des molécules testées ci-dessus, on peut considérer que la présence de groupements hydroxyles en position 4 et 6 (cycle A) semble favoriser l'activité. Toutefois il est possible d'atteindre des valeurs voisines avec seulement un hydroxyle en position 4. À l'inverse, la fonctionnalisation de la position 7 par un hydroxyle n'est pas essentielle pour l'activité (MIC > 100 μ M). La position 6 n'a pas été explorée dans ces tests préliminaires. La présence d'un ou plusieurs hydroxyles sur le cycle B, n'a en revanche pas mené à une activité plus importante, comme l'attestent les dérivés **237**, **238**, **239** et **243** avec des MIC ≥ 125 μ M. Les composés **241** et **242** contenant des groupements volumineux en position 4' ont quant à eux conduit à une amélioration significative de la MIC avec des valeurs de 25 μ M. Ces valeurs se rapprochent de celles obtenues avec le composé **236** qui porte un groupement *o*-benzyle. Cette première librairie nous permet d'élaborer une première relation structure-activité, résumée cidessous (<u>Schéma 103</u>).



<u>Schéma 103</u> : SAR des dérivés dirigés contre H. pylori

3. Discussion

Sur la base des premières observations, nous avons synthétisé dix nouveaux composés, qui nécessitent une seule étape de synthèse, mais aux purifications parfois laborieuses. Les condensations aldoliques ont toutes été réalisées en milieu basique en présence d'hydroxyde de potassium à 50%. Deux méthodes de synthèse issues d'observations faites au laboratoire ont été mises en place suivant le nombre de groupements hydroxyles présents. En effet, lorsqu'il y a plus d'un hydroxyle présent en totalité sur les cycles A et/ou B, on préfèrera l'utilisation d'éthanol à reflux. À l'inverse, pour seulement un hydroxyle présent on choisira le méthanol à température ambiante. L'isolement de l'ensemble des composés a été effectué *via* une étape de purification sur gel de silice dont les gradients d'élution ont varié selon la polarité des produits et la présence d'impuretés. Seul le composé **246** a été recristallisé à partir du cyclohexane avec un rendement très faible de 3% (*Schéma 104*).

La détermination des MIC a révélé que la seule présence d'hydroxyle en position 4 des composés **245** et **246** n'était pas suffisante pour obtenir une activité proche des résultats déjà obtenus. En effet, les valeurs de MIC sont 5 fois supérieures à celles des analogues **231** et **233** qui contiennent un hydroxyle supplémentaire en position 6. Il en est de même lorsque l'hydroxyle est placé en position 6 comme le montrent les résultats des dérivés **247** et **248**. En somme, l'unique présence d'un seul hydroxyle sur le cycle A n'est pas suffisante pour améliorer l'activité.



<u>Schéma 104</u> : Conditions de couplage des dérivés d'aurones en fonction du nombre d'hydroxyle

Nous nous sommes alors intéressés à des composés contentant un hydroxyle en position 4 et 6, en vert sur le <u>Schéma 104</u>. La présence d'hydroxyle ou de méthoxyle en position 3', (respectivement composés **249** et **250**) a conduit à des valeurs de MIC de 125 μ M, nettement supérieures aux valeurs des dérivés **231** et **233**. De même, lorsque deux méthoxyles sont présents (composé **252**), aucune amélioration n'est décelable. Contrairement à ce qui était attendu, la seule présence du *o*-benzyle en position 4' sur le composé **251** n'a pas non plus mené à une amélioration de l'activité (MIC > 500 μ M). Puisque le composé **233** avec un MIC de 7,8-15,6 μ M contient également un *o*-benzyle (position 4') et un méthoxyle (position 3'), il est donc nécessaire que ces deux groupements soient présents sur le cycle B pour observer une activité intéressante (*Graphique 14*).
Dans notre recherche de nouveaux motifs sur le cycle B, nous avons souhaité introduire des groupements plus volumineux à la place du *o*-benzyle en position 4' : à cet effet nous avons synthétisé les dérivés **253** et **254**, avec des chaînes alkyl *tert*-butyle et *iso*-propyle, respectivement. Leurs valeurs de MIC ont chuté, montrant une amélioration de l'activité vis-à-vis de *H. pylori* (15,6 µM pour les deux composés) (*Graphique 14*). Grâce à ces résultats nous savons que la présence de groupement volumineux en position 4' est une piste à explorer pour le développement futur d'agents antibactériens contre *H. pylori*.



Graphique 14 : Valeurs des MIC des dérivés 245-254

IV. Conclusion

La synthèse de quelques composés a permis de dresser une première esquisse des positions vers lesquels orienter nos synthèses. La présence d'hydroxyles en positions 4 et 6 du cycle A, ainsi que celle d'un groupement volumineux en position 4' du cycle B, semblent nécessaires. Des dérivés pourraient être synthétisés en explorant les possibilités de greffer des blocs plus volumineux en position 4' ou de fonctionnaliser la position 3' avec les mêmes chaînes alkyles utilisées pour les dérivés **253** et **254**. La présence de groupements apolaires/aprotiques semble être une voie à explorer puisqu'aucun des dérivés contenant d'hydroxyle sur le cycle B n'a montré une bonne activité.

CHAPITRE V : Conclusion générale

I. Projet tyrosinase (*hs*TYR)

La conception d'inhibiteurs de la *hs*TYR est un domaine de recherche en pleine émergence, soutenu par les progrès récents réalisés dans la découverte de l'implication supposée de *hs*TYR dans plusieurs pathologies. Les premiers agents anti-*hs*TYR ont été rapportés au cours des dernières années avec l'utilisation de motifs de liaison au centre à cuivre non oxydable. Parmi ces motifs on retrouve : le 3-hydroxy-2*H*-pyran-2-one, le 3hydroxypyridin-4(*1H*)-one, le 3-hydroxy-4*H*-pyran-4-one, le 1-hydroxypyridin-2(*1H*)one ou le 2,4-résorcinol, qui ont fourni des inhibiteurs efficaces de *hs*TYR, comme l'aurone-HOPNO ou le thiamidol. Ces récentes études ont annoncé la fin de la prévalence historique des tests réalisés sur *ab*TYR et ont offert des données cliniques prometteuses contre le traitement de lésions cutanées telles que les tâches de vieillesses ou le mélasma. La connaissance du cycle catalytique et de la spécificité de substrat de l'enzyme est une avancée majeure et devrait conduire à un changement de paradigme dans le choix des groupes chélateurs du cuivre dans les années à venir.

Idéalement, une mesure directe de l'activité d'inhibition de hsTYR effectuée sur l'enzyme isolée fournirait des données cinétiques précieuses, révélant le mécanisme d'action et donnant des indices sur le site de liaison. Malheureusement, l'expression de hsTYR reste un défi perpétuel à cause de sa maturation complexe inaccessible dans des systèmes bactériens classiques et peu couteux tels que *E. coli*. Par conséquent des systèmes plus élaborés ont été développés comme l'expression dans des cellules d'insecte (Sf9). Ces nouvelles méthodes de production s'avèrent coûteuses et plus techniques, limitant ainsi les quantités d'enzymes produites. Par conséquent, le nombre de composés pouvant être engagés dans des tests est limité. Le temps de production de l'enzyme est également un facteur non négligeable dans le cadre de ce projet puisqu'il faut plusieurs mois pour produire l'enzyme et réaliser les expériences. De manière générale le développement d'inhibiteur de hsTYR portant sur des motifs 4-hydroxyle ou 3,4-dihydroxyle doit être évité, car ils pourraient se comporter comme des substrats alternatifs plutôt que comme des inhibiteurs, produisant des quinones toxiques, similaires à celles obtenues à partir de *L*-tyrosine et *L*-DOPA. Une attention particulière devrait être accordée aux interactions moléculaires avec la deuxième sphère de coordination du centre à cuivre et les résidus distants (E203, boucle flexible 302-310, H304, K306, R308, T343, T352, N364, I368, S375, V377 et S380) qui semblent cruciales pour leurs interactions potentielles avec les composés. La publication récente de la structure cristalline de *hs*TYRP1 offre une opportunité sans précédent, qui a permis la construction de modèles d'homologies plus robustes. Cependant, certaines lacunes subsistent, comme la modélisation des résidus H304, K306 et R308, tous absents de *hs*TYRP1.

Dans les limites de la réalisation de ce projet, le développement d'inhibiteurs (<u>Schéma</u> <u>105</u>) s'est d'abord orienté vers la pharmacomodulation du dérivé (*Z*)-2-(2,4- dihydroxybenzylidene)benzofuran-3(*2H*)-one **53** et de l'aurone - HOPNO **50**.



<u>Schéma 105</u> : Ligne directrice – étapes clés du projet

Nous disposons actuellement d'une librairie de plus de 70 dérivés. Tous ont d'abord été testés sur lysat de cellules MNT-1. Ce criblage sur lysats est une étape essentielle permettant de cibler les composés les plus actifs et ainsi permettre une première sélection. Ce test est rapide et facile à mettre en œuvre dans la mesure où les lysats cellulaires sont accessibles *via* une collaboration avec l'Université Aix-Marseille.

Au sein de notre librairie, 19 composés ont été sélectionnés pour être évalués sur cellules afin de déterminer leur activité et cytotoxicité. Seuls deux composés, **59** et **82** se sont révélés particulièrement actifs lors du test sur lysats ($IC_{50} = 1.57 \pm 0.09$ et 1.6 ± 0.2 , respectivement) et ont fait l'objet d'une évaluation pour déterminer leur activité sur l'enzyme isolée *hs*TYR, réalisée au Technion – Israel Institute of Technology d'Haïfa.

Inhibiteurs	Type d'inhibition	Κ _i (μΜ)
59	Compétitif (partiel)	0.55 ± 0.09
82	Compétitif (partiel)	0.25 ± 0.04
Acide kojique	Mixe	1100 ± 300
Aurone - HOPNO	Compétitif	0.35
Thiamidol	Compétitif	0.25

<u>Tableau 11</u> : Comparaison des inhibiteurs **59** et **82** avec le thiamidol, l'aurone-HOPNO et un inhibiteur de référence l'acide kojique

L'inhibiteur **82** s'est avéré être un bon candidat pour la suite du projet car son K_i (0.25 μ M) est identique à celui du thiamidol (*Tableau 11*) qui est déjà utilisé dans des crèmes de soin²⁶⁷ commercialisées par Eucerin[®]. Le composé **59** possède également un K_i relativement bas (0,55 μ M). Les constantes d'inhibition des dérivés **59** et **82** sont proches de celle de l'aurone-HOPNO ($K_i = 0,35 \mu$ M) connu comme étant avec le thiamidol l'inhibiteur le plus actif rapporté dans la littérature. Néanmoins, il faudra attendre les résultats des tests sur cellules pour évaluer leur capacité à pénétrer la membrane cellulaire et leur potentiel d'utilisation *in vivo*.

Perspectives :

Le travail entrepris durant cette thèse ouvre plusieurs perspectives.

Certains composés ont été testés sous la forme d'un mélange racémique, comme le dérivé 73, ou en mélange *Z/E* comme les hémiindigos 78 et 79. On pourrait envisager la séparation des énantiomères du dérivé 73, et favoriser l'isomérisation vers la forme

Z ou *E* pour les dérivés **25** et **26** en les irradiant à une longueur d'onde précise (<u>Schéma</u> <u>106</u>).



Schéma 106 : Inhibiteurs testés sous la forme d'un mélange R/S ou Z/E

La synthèse des benzofuranes est elle aussi en suspens : trois dérivés (*Schéma 107*) ont été synthétisés, dont 92 et 93 qui présentent une cétone à la place du proton vinylique présent sur les aurones. L'objectif du développement de ces composés est de s'écarter du squelette des aurones en conservant les éléments les plus favorables. Des dérivés réduits de 92 et 93 pourraient nous apporter des informations complémentaires quant au rôle du proton vinylique sur les aurones et les autres hémiindigoïdes.



Schéma 107 : Benzofuranes synthétisés

La réduction de la cétone a été réalisée d'après le (*Schéma 108*) dans le cadre d'un stage de M1 d'une durée de deux mois. La réduction a été réalisée *via* une réaction de Wolff-Kishner en présence d'éthylène glycol, d'hydrazine et de potasse. Cette étape ainsi que l'étape de déprotection sont limitantes. En effet, seul le composé **92** a été engagé dans l'étape finale de déprotection et n'a pas pu être purifié, au vu du nombre de produits secondaires formés. Il faudrait envisager une autre méthode de réduction

pour optimiser les quantités de produit formé et ainsi permettre d'optimiser l'isolement des produits finaux.



Schéma 108 : Réduction de la cétone des composés 92 et 93

 Les molécules synthétisées au laboratoire depuis janvier 2021, confirment l'intérêt d'une substitution sur la position 7 des aurones et des inda-aurones par des groupements polaires pouvant former des liaisons hydrogènes avec des résidus présents dans la seconde sphère de coordination (*Schéma 109*). Pour le moment aucune avancée n'a été faite concernant la coordination du centre à cuivre avec d'autres motifs que le résorcinol.



Schéma 109 : Inhibiteurs testés sur enzyme isolée (hsTYR)

La recherche autour de nouveaux motifs chélateurs du cuivre devra être poursuivie si les résultats sur cellule ne sont pas à la hauteur de nos attentes.

 Enfin, un des aspects originaux de ce projet est articulé autour du développement de photoswitches. Nous avons durant cette thèse concentré nos efforts sur la synthèse d'hémithioindigo et d'hémiindigo. Pour compléter cette série, il faudrait pourvoir connaitre l'activité du composé **257** (*Schéma 110*) qui confirmerait l'intérêt d'une substitution à cette position.



<u>Schéma 110</u> : Composé à développer comme analogue de 77

Ces composés pouvant être facilement irradiés, il pourrait être intéressant de les tester sur lysats sous leur forme *E*. Cette perspective pourrait conduire au développement de photoswitches dont les propriétés de fluorescences pourraient également être optimisées.

II. Projet H. pylori

Nous avons synthétisé 10 composés supplémentaires sur la base des informations préliminaires. Les molécules **253** et **254**, les plus actives (MIC = 15,6 μ M), partagent une similarité structurelle, un motif 4,6-dihydroxyle sur le cycle A. Il est important de noter que le squelette aurone elle-même porte l'activité, contrairement à certains dérivés incorporant des fragments antibactériens déjà connus couplés aux aurones (tels que le ferrocène, le nitroimidazole ou le nitrofurane). Les aurones non couplées aux antibactériens permettent de limiter la cytotoxicité car les composés incorporant des aurones et des fragments antibactériens, déjà présents dans la littérature, souffrent de cytotoxicités élevées. Ces résultats démontrent que les aurones sont adaptées pour la conception d'agents antibactériens et que la diversification du modèle de substitution pourrait être un moyen efficace de produire de nouveaux antibiotiques actifs contre les bactéries pathogènes et surtout sans danger pour les cellules humaines.

CHAPITRE VI : Partie expérimentale

Material and methods

<u>Cell culture for L-DOPA oxidase activity⁹⁰</u>: Human melanoma cells (MNT-1) were obtained from the National Institute of Health (NIH) and were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% antibiotics, in 75 cm² ventilated flask maintained at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Cells were routinely passed using trypsin-EDTA solution. Inhibition of tyrosinase by test compounds was first evaluated using cell lysate prepared from MNT-1 cells. Briefly, confluent MNT-1 cells cultivated on 75 cm² flasks were washed with phosphate buffer saline (PBS) and detached using trypsin-EDTA solution. Cells suspension was aliquoted in cryotubes (approximately 4.10⁶ cells per tube) and tubes were then centrifuged at 1200 rpm for 5 min. Supernatants were eliminated and cells pellets were snapfrozen in liquid nitrogen before being stored at -80 °C until tyrosinase assay.

L-DOPA oxidase activity of tyrosinase :

MNT-1 cells were washed and lysed with 1 mL of PBS/Triton 1X. The lysate was subsequently centrifuged three times at 3000 g for 3 min, spaced with a 2 min break in ice to maintain a temperature of 0 °C. The supernatant was then extract and diluted to get 10 mL, then 96 µL of supernatant was seeded on 96-well plates. Next, 4µL of inhibitors (6,4 mM) was added and incubated for 10 min. *L*-DOPA in PBS/Triton 1X (4 mM) diluted beforehand and placed at 37 °C was added to well plates and the melanin formation was evaluated by measuring absorbance at 600 nm using a SPECTRA MAX[®] ABS Plus microplate reader, results were presented as median inhibitory concentration (IC₅₀).

Statistical analysis :

All experiments were determined by using GraphPad Prism 8.0. Each experiment was performed three times, and the obtained data were normalized and presented as curves defined between 0% to 100%. The data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

Synthesis and Purification :

Chemicals, reagents and solvents were purchased from Aldrich, Merck, Alfa Aesar, TCI, or FluoroChem companies and used without any further purification. All reactions were controlled by using thin-layer chromatography (TLC) used Macherey-Nagel silica gel 60 with fluorescent indicator UV_{254} a thickness 0,20 mm. Purification were performed by flash chromatography used Macherey-Nagel silica gel 60 M, 0,04 – 0,063 or by reverse-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a Nucleosil C18 column (300 Å, 125 x 3 mm, 5 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm.

Characterization:

¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Brüker AC-400 instrument (400 MHz for ¹H and 101 MHz for ¹³C) at room temperature in deuterated solvent (Chloroform-*d*, Methanol-*d*₄ and DMSO-*d*₆). Chemical shifts (δ) are reported to the solvent in which the spectrum was recorded. Following standard abbreviations were used to interpret NMR spectra: s (singlet); br s (broad singlet); d (doublet); dd (doublet of doublets); ddd (doublet of doublets of doublets); t (triplet) dt (doublet of triplets); q (quartet). Interpretation of ¹H and ¹³C NMR spectra often needed the support of 2D spectrum (COSY and HMQC/HSQC) records. Protons and carbons of aurones and precursors were numbered as below when associated with ¹H and ¹³C NMR signals.



Mass spectra (Electrospray Ionization – ESI, High Resolution Mass Spectrum – HRMS and Gas chromatography – mass spectrometry – GC-MS) were acquired by the Institute of Molecular Chemistry of Grenoble (ICMG – FR 2607), on an Esquire 300 Plus Brüker Daltonis instrument with a nanospray inlet.

Glossaire

SYNTHESIS OF SYNTHONS (p202-212): 138, 141, 146, 148, 149, 156, 157, 169, 174 182, 199, 202, 203, 212, 224, 225.

MONO-METHOXYLATION OF HYDROXYL ANALOGS (<u>p212-214</u>) : 144, 150, 151, 188, 183.

DIRECT SYNTHESIS OF INDIGOID DERIVATIVES (p214-221) : 96, 101, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 160, 162, 164, 165, 226.

SYNTHESIS OF DERIVATIVES *VIA* ALUMINA-MEDIATED ALDOLIC CONDENSATION (<u>p221-</u> <u>222</u>) : 158, 197.

SYNTHESIS OF AURONE WITH KETONE MODULATION DERIVATIVES (p222-224) : 206, 208, 222.

AURONE SYNTHESIS FROM CHALCONE DERIVATIVES (p224-228) : 152, 153, 189, 192,

SYNTHESIS OF HEMITHIOINDIGO DERIVATIVES FROM NITROCHALCONE (p228-229) : 191, 193, 195, 196,.

AURONE SYNTHESIS BY ULTRASOUND COUPLING (p230-234) :, 98, 99, 100, 110, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 115.

SYNTHESIS OF AURONE *VIA* BASIC ALDOLIC CONDENSATION (<u>p235-242</u>) : 200, 248, 246, 245, 97, 167, 170, 207, 235, 252, 249, 250, 254, 253, 251.

SYNTHESIS OF DERIVATIVES *VIA* DEPROTECTION OF METHOXY ANALOGUES (<u>p244-255</u>) : 65, 66, 67, 68, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 80, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 104, 145.

SYNTHESIS OF *N*-FONCTIONALIZED AZA-AURONES AND DEPROTECTION OF METHOXY ANALOGUES (<u>p255-256</u>) : 78, 79

DIRECT SYNTHESIS OF INDAZOLE VIA DAVIS-BEIRUT REACTION (p257): 76

General procedures

General procedure A. To a solution of phenol derivative (1eq) in an aqueous sodium hydroxide solution (50%, 1 mL/mmol) was added chloroacetic acid (1,2eq) at room temperature and the mixture was stirred at 60 °C for 2h. An aqueous solution of hydrochloric acid was added to adjust the pH to 1. After cooling, the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude derivatives.

General procedure B. To a mixture of amine hydrochloride derivative (20,6eq) and NaHCO₃ (17eq) in H₂O (0,16 mL/mmol), 2,4,6-trihydroxyacetophenone (1eq) was added. The reaction mixture was heated to 70 °C and stirred for 10 h under an argon atmosphere. After cooling, the mixture was poured into water (10 mL) and then extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with saturated aqueous Na₂CO₃ and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude derivatives.

General procedure C. To a solution of a phenol derivative (1eq) in acetone (5 mL/mmol) was added K₂CO₃ (1.3eq) and dimethylsulfate (1.2eq) was added dropwise. The reaction mixture was heated to reflux for 5h. After completion of the reaction, the solution was filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude derivatives.

General procedure D. To a solution of 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one in methanol (3 mL/mmol) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1 to 2 eq). The solution was refluxed until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 5 hours). After cooling, methanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water (50 mL/mmol) and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust slowly the pH until full precipitation. The mixture was then extracted with EtOAc or 195

CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (Z)-2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-one derivative.

General procedure E. To a solution of benzofuran-3(2*H*)-one, 5-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one and 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (1eq) in methanol (5 mL/mmol) was added dropwise thionyl chloride (1.5eq) at room temperature. Benzaldehyde derivative (1eq) was then added and the mixture was stirred until precipitation appears (1 to 4 hours). After completion of the reaction, methanol was removed under reduce pressure, then the residue was washed with cold methanol and hot water to afford the corresponding crude derivative.

General procedure F. To solution of 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one, 1*H*-indene-1,3(2*H*)dione in methanol (3 mL/mmol) were added NaH (1eq) and 2,4-dimethoxybezaldehyde (1eq.). The solution was stirred until complete precipitation of the expected product (1 to 2 hours). The solid was then filtered and washed with cold methanol, and hot water to afford the corresponding pure product.

General procedure G. To a solution of a benzofuran-3(*2H*)-one or benzo[*b*]thiophen-3(*2H*)-one derivative in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL/mmol) were added 2,4-dimethoxybezaldehyde (1.5eq) and aluminum oxide (4 g/mmol). The suspension was stirred overnight under argon at 25 °C, and the solid was removed by filtration. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude derivative.

General procedure H. To a solution of acetophenone derivative in ethanol (3 mL/mmol) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 5 mL/mmol) and 2,4-dimethoxybezaldehyde (1.5eq.). The solution was refluxed until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 5 hours). After cooling, ethanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted with distilled water (few drops) and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust slowly the pH to 7 – 8. The mixture was then extracted with EtOAc. The combined organic layers were

washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude chalcone derivative.

General procedure I. To a solution of acetophenone derivative in ethanol (3 mL/mmol) were added NaOH (1.2eq) and 2,4-dimethoxybezaldehyde (1eq). The solution was stirred at 0 °C until the complete precipitation (overnight). The precipitate was filtered, washed with cold ethanol, water and brine to afford the corresponding crude nitrochalcone derivative.

General procedure J. To a solution of 2'-nitrochalcone derivatives in DMSO (3 mL/mmol) were added suffer (5eq) and triethylamine (5eq). The solution was heated at 100 °C until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 5 hours). After cooling, the mixture was extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude hemithioindigo derivatives.

General procedure K. To a solution of 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one or benzofuran-3(2*H*)-one in acetonitrile (15 mL/mmol) were added ethylenediamine diacetate (1.2eq) and the benzaldehyde derivative (1eq). The mixture was stirred under ultrasound until solid appearance (5 to 10 mins). The precipitate was then filtered, washed with acetonitrile, and hot water to afford the corresponding crude aurone derivatives.

General procedure L. To a solution of benzofuran-3(*2H*)-one, indolin-3-one or benzo[*b*]thiophe-3(*2H*)-one derivatives in methanol (10 mL) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 5 mL/mmol) and the benzaldehyde derivative (1eq). The mixture was stirred at 37 °C until solid appearrance. The precipitate was filtered, washed with cold methanol, and hot water to afford the corresponding crude aurone derivatives.

General Procedure M. To a solution of 4-hydroxy-, 6-hydroxy- or 4,6-dihydroxyfuran-3(2H)-one in ethanol (10 mL) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 5 mL/mmol) and the benzaldehyde derivative (1eq). The solution was refluxed 197 until complete disappearance of the starting material (2 to 5 hours). After cooling, ethanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted with distilled water and an aqueous solution of hydrochloric acid (1M) was added to adjust the pH to 1. The mixture was then extracted with EtOAc or CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(*2H*)-one derivative.

General procedure N. To a solution of chalcone derivatives in pyridine (16 mL/mmol) was added Hg(OAc)₂ (1eq) at room temperature, and the mixture was refluxed for 15 h. The cooled reaction mixture was poured into ice-cold water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude product.

General Procedure O. To a solution of a flavonoid derivatives in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL/mmol) was added pure boron tribromide (10 eq) at 0 °C. The solution was stirred at room temperature until TLC showed complete disappearance of the starting materials (2 to 4 days). Cold water was then added and the suspension was extracted three times with EtOAc, washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude derivatives.

General Procedure P. To a solution of 2-(2,4-dimethoxybenzylidene)indolin-3-one (1eq) in DMF (15 mL/mmol) was added NaH (1.5eq) followed by the addition of the corresponding halogenoalkane derivative (1.2eq). The solution was stirred at room temperature until TLC showed complete disappearance of the starting material (5 min). Cold water was then added and the suspension was extracted three times with EtOAc, washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure, and used without further purification. The crudes anhydrous intermediates were solubilized in CH₂Cl₂ (5 mL/mmol) and pure boron tribromide (5 to 10 eq) was added at 0 °C. The solution was stirred at room temperature until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 4 days). Cold water was then added and the suspension was extracted three times with EtOAc, washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude derivatives.

SYNTHESIS OF SYNTHONS



N-(4-Acetyl-3-hydroxyphenyl)acetamide (138). To a solution of 3-aminophenol (500 mg, 4.6 mmol) in anhydrous EtOAc (10 mL) was added NaOH (460 mg, 11.5 mmol), Ac₂O was added dropwise and the mixture was stirred at 80 °C for 3h. After completion of the reaction, the mixture was cooled to room temperature, water and brine were added and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the crude intermediate 3-acetamidophenyl acetate as a colorless oil used without purification. To a mixture of crude 3-acetamidophenyl acetate (888.3 mg 4.6 mmol), was added AlCl₃ (3.1 g 23.0 mmol) and the reaction was heated to 135 °C for 5h (no solvent). After the completion of the reaction, the mixture was poured in ice/water and stirred for another 1 h at 50 °C. The mixture was then extracted with EtOAc, the combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered off, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and the obtained residue was recrystallized from toluene to afford 138 as a pure white solid. (36%). C₁₀H₁₁NO₃. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.67 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H₅), 7.43 (s, **1H**, -NH), 7.17 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H₆), 7.07 (d, **1H**, *J* = 2.1 Hz, H₂), 2.58 (s, **3H**, CH_{3(2")}), 2.20 (s, **3H**, CH_{3(2")}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 203.05, 168.83, 163.70, 145.04, 132.07, 116.20, 110.29, 107.19, 26.34, 24.83. HRMS 194.0809 *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₀H₁₂NO₃, 194.0809).



4-Amino-2-hydroxyacetophenone (141). *N*-(4-acetyl-3-hydroxyphenyl)acetamide **138** (300 mg, 2 mmol) was dissolved in an aqueous solution of hydrochloric acid 6N (20 mL), the mixture was heated at 50 °C under stirring for 3h. After being cooled to room temperature, the mixture was diluted with water (20 mL) and neutralized with an aqueous solution of sodium hydroxide (5%) until pH 7-8. The mixture was extrated with EtOAc. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **141** as a pale yellow solid (87%). C₈H₉NO₂. **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.51 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆), 6.14 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.3 Hz, H₅), 6.11 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₃), 2.50 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 201.6, 165.4, 154.2, 133.1, 112.3, 106.6, 100.8, 25.9. **HRMS 152.07025** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₈H₁₀NO₂, 152.07061)



2,4,6-Trihydroxyacetophenone (147). To a solution of phloroglucinol **146** (10.00 g, 79.4 mmol) and acetic anhydride (18 mL, 190.0 mmol) dissolved in EtOAc (40 mL), BF₃·Et₂O (12 mL, 97.2 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was heated at 50 °C for 10 h. Water was then added and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and the obtained solid was recrystallized from H₂O to afford **147** as a pure yellow crystal (72%). C₈H₈O₄. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.80 (s, **2H**, H₃,H₅), 2.54 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C **NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 202.5, 164.8, 164.3, 104.1, 94.57, 32.40. **HRMS 169.04969** *m/z* [M + H]⁺ (calc for C₈H₉O₄, 169.04954).



4-(Dimethylamino)-2,6-dihydroxyacetophenone (148). The crude product was prepared according to the general procedure **B** starting from *N*,*N*-dimethylamine hydrochloride (10.00 g, 122.7 mmol), NaHCO₃ (8.49 g, 101.1 mmol) and 2,4,6-trihydroxyacetophenone **147** (1 g, 5.95 mmol) to afford **148** as a purple solid (60%). C₁₀H₁₃NO₃. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.65 (s, **2H**, H₃,H₅), 2.94 (s, **6H**, -NMe₂), 2.62 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 201.6, 155.5, 101.9, 91.2, 39.8, 32.1. HRMS **194.08281** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₀H₁₃NO₃, 194.08117).



2,6-Dihydroxy-4-morpholinoacetophenone (149). The crude product was prepared according to the general procedure **B** starting from morpholine hydrochloride (11.00 g, 122.6 mmol), NaHCO₃ (9.00 g, 101.1 mmol) and 2,4,6-trihydroxyacetophenone **147** (1.00 g, 5.95 mmol) to afford **149** as a white solid (47%). C₁₂H₁₅NO₄. ¹**H** NMR (400 MHz, DMSO*d*₆) δ 5.84 (s, **2H**, H₅,H₃), 3.66 (m, 4**H**, *J* = 5.0 Hz, H_{4b}), 3.19 (m, **4H**, *J* = 4.8 Hz, H_{4a}), 2.52 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³**C** NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 211.2, 173.5, 165.81, 112.5, 101.5, 75.5, 55.9, 41.8. HRMS **236.09312** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₂H₁₄NO₄, 236.09173).



2-(3',5'-Difluorophenoxy)acetic acid (156). The crude product was prepared according to general procedure **A** starting from 3,5-difluorophenol **155** (2.00 g, 15.4 mmol) and chloroacetic acid (2.00 g, 18.5 mmol). After acidification to pH 1, precipitation

appeared, the precipitate was filtered, washed with water and dried to afford **156** (52%) as a pure white solid. C₈H₆F₂O₃. **¹H NMR** (400 MHz, Methanol-*d4*) δ 6.51-6.61 (m, **3H**, H₂',H₄',H₆'), 4.69 (s, **2H**, H₂). **¹³C NMR** (100 MHz, Methanol-*d4*) δ 170.5, 163.8 (dd, *J* = 245.0, 15.8 Hz), 160.4, 98.4 (dd, *J* = 20.8, 7.9 Hz), 96.3 (t, *J* = 26.4 Hz) 64.9. **HRMS 187.0210** *m/z* [M - H]⁻ (calc for C₈H₅O₃F₂, 187.0201).



4,6-Difluorobenzofuran-3(2H)-one (157). То а solution of 2-(3,5difluorophenoxy)acetic acid 156 (1.00 g, 5.32 mmol) in toluene (10 mL) was added thionyl chloride (2 mL, 26.3 mmol) and the mixture was refluxed for 2h. After cooling, solvents were removed under reduced pressure then the residue was diluted into CH₂Cl₂ (10 mL). Then, aluminum chloride (709 mg, 5.32 mmol) was added, and the mixture was refluxed overnight. After cooling, ice/water was added, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid, which was purified by flash chromatography (eluent CH₂Cl₂) to afford **157** (21%) as a pure white solid. C₈H₄F₂O₂. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.65 (m, 1H, H₇), 6.49 (m, 1H, H₅), 4.69 (s, 2H, H₂). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 193.9, 175.2, 170.0 (dd, *J* = 259.0, 13.2 Hz), 159.0 (dd, *J* = 266.0, 16.8 Hz), 107.6, 98.7 (dd, *J* = 27.7, 22.9 Hz), 97.7 (dd, *J* = 26.3, 4.7 Hz), 76.0.



1-Acetyl-6-methoxyindolin-3-one (169). To a solution of *N*-(2-(2-chloroacetyl)-5-methoxyphenyl)acetamide (7.00 g, 33.6 mmol) in DMF (140 mL), sodium hydride (674 mg, 28 mmol) was added by small portions under inert atmosphere at room temperature 202

for 90 minutes until the complete disappearance of the starting material. Then, the mixture was concentrated by evaporation under reduced pressure, solubilized with DCM and washed with a saturated aqueous solution of ammonium chloride, water and brine. After drying over MgSO₄ and filtration, the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was stirring in ether to afford **169** as a pure yellow-brown solid (16%). C₁₁H₁₁NO₃. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.05 (d, **1H**, *J* = 2.2 Hz, H₇), 7.61 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₄), 6.72 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.2 Hz, H₅), 4.24 (s, **2H**, H₂), 3.89 (s, **3H**, CH₃₍₆₎), 2.28 (s, **3H**, CH_{3(Ac)}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 192.5, 168.4, 167.5, 156.2, 131.1, 118.2, 110.0, 104.2, 56.8, 56.0, 24.3. HRMS **206.08084** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₁H₁₂NO₃, 206.08117).



5-Hydroxy-2-nitroacetophenone (174). A solution of nitric acid (7 mL) and sulfuric acid (17 mL) was kept between -10 and -20 °C with an acetone/dry ice bath. Then, bis(3-acetylphenyl) oxalate **182** (1 g, 3.06 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 15 minutes, followed by a second addition of bis(3-acetylphenyl) oxalate (1.00 g, 3.06 mmol) stirring for 15 min. After which a solution of cold water (100 mL) was added, and stirred for 30 minutes until a precipitate appeared. The compound was filtered, and washed with water to afford **174** as a yellow solid (90%). C₈H₇NO₄. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.38 (s, **1H**, -OH), 8.08 (d, **1H**, *J* = 9.1 Hz, H₃), 6.98 (d, **1H**, *J* = 9.1 Hz, H₄), 6.84 (s, **1H**, H₆), 2.47 (s, **3H**, H_{2'}).¹³C **NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200.1, 163.5, 141.0, 136.3, 127.4, 116.5, 113.3, 30.2. **HRMS 218.04218** *m*/*z* [M+Na]⁺ (calc for C₉H₉O4NNa, 218.04238).



203

Bis(3-acetylphenyl) oxalate (182). To a solution of 3-hydroxyacetophenone (4.00 g, 27.5 mmol) and triethylamine (101 g, 147 mmol) in EtOAc (15 mL). Oxalyl chloride (2.00 g, 19.3 mmol) in EtOAc (15 mL) was then added dropwise. The reaction mixture was cold to 0 °C and stirred for 10 h under an argon atmosphere. The precipitate was filtered, washed with water and EtOAc to afford **182** as a white precipitate (34%). C₁₈H₁₄O₁₆. **1H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.97 (d, **2H**, *J* = 7.4 Hz, H4), 7.88 (s, **2H**, H2), 7.69 (t, **2H**, *J* = 7.7 Hz, H5), 7.59 (d, **2H**, *J* = 8.0 Hz, H6), 2.62 (s, **6H**, CH_{3(2')}). ¹³C **NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.0, 154.7, 150.4, 138.4, 130.4, 126.7, 126.0, 120.7, 26.8. **HRMS 327.08662** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₈H₁₅O₆, 327.08631).



2-(3'-Methoxythiophenol)acetic acid (199). The crude product was prepared according to general procedure **A** starting from 3-methoxythiophenol **198** (4.00 g, 28.6 mmol) and chloroacetic acid (3.00 g, 33.1 mmol) to afford **199** (92%) as a pure pale brown oil. C₉H₁₀O₃S. ¹**H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.16 (m, **1H**, H_{5'}), 6.96 – 6.92 (m, **2H**, H_{2'},H_{4'}), 6.73 (m, **1H**, H_{6'}), 3.74 (s, **3H**, CH₃), 3.64 (s, **2H**, H₂). ¹³**C NMR** (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 174.4, 159.4, 135.7, 129.6, 121.1, 114.3, 112.3, 54.8, 35.6. **HRMS 99.04237** *m*/*z* [M + H]⁺ (calc for C₉H₁₁O₃S, 199.04234).



2-((Carboxymethyl)sulfanyl)benzoic acid (202). To a solution of 2,2-dithiodisalicylic acid **201** (10.00 g, 32.6 mmol in an aqueous solution of water (15 mL) with Na₂CO₃ (20.00 g, 18.9 mmol) and Na₂S₂O₄ (15.00 g, 86.2 mmol). The mixture was refluxed for 30 min, and a solution of chloroacetic acid (15.00 g, 159 mmol) neutralized with sodium carbonate (5.00 g), was then added and the reaction mixture was kept under refluxed for another hour. The mixture was allowed to cooled to room temperature before acidified with HCl, until precipitation. The precipitate was filtered, washed with water and dried to 204

afford **202** (98%) as a pure white solid. C₉H₈O₄S. ¹**H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.99 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, **1H**, H₆), 7.50 (m, **1H**, H₄), 7.44 (dd, **1H**, *J* = 8.2, 1.2 Hz, H₃), 7.22 (ddd, **1H**, *J* = 8.2, 7.1, 1.3 Hz, H₅), 3.77 (s, **2H**, H₂). ¹³**C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 173.3, 169.7, 142.0, 133.6, 132.6, 129.4, 127.0, 125.5, 35.5. **HRMS 211.00623** *m/z* [M - H]⁻ (calc for C₉H₇O₄S, 211.00705).



3-Oxo-2,3-dihydrobenzo[b]thiophene-7-carboxylic acid (203). A solution of 2-((carboxymethyl)sulfanyl)benzoic acid **202** (6.00 g, 28 mmol) in thionyl chloride (40 mL) was refluxed for 2h. After cooling, SOCl₂ were removed under reduced pressure and the residue was diluted into dichloroethane (40 mL). Then, the solution was cooled to 0 °C and aluminum chloride (9.00 g, 70 mmol) was added by small portion. The mixture was stirred at room temperature for 12h. The reaction was quenched with ice and the orange mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **203** (90%) as a pure red solid. C₉H₆O₃S. **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, **1H**, H₆), 8.03 (dd, **1H**, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H₄), 7.40 (m, **1H**, H₅), 3.80 (s, **2H**, H₂). ¹³**C NMR** (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 198.8, 166.1, 158.2, 140.9, 133.1, 132.6, 128.6, 125.2, 39.8. **HRMS 192.99678** *m*/*z* [M - H]⁻ (calc for C₉H₅O₃S, 192.99649).



2-Hydroxy-3-methoxy-acetophenone (212). To a solution of 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid **213** (2.00 g, 11.9 mmol) in THF (60 mL). A solution of MeLi (957 μL, 36.8 mmol) in THF 20 mL was added dropwise to the reaction mixture at 0 °C. The

suspension was stirred at 0 °C for 15 h and heated at reflux for 17 h. After completion of the reaction, the mixture was concentrated under reduced pressure and was purified by column chromatography on silica gel (Eluant cyclohexane/EtOAc 7:3) to afford **212** as a pure white solid (64%). C₉H₁₀O₃. **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.27 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.4 Hz, **1H**, H₁), 6.99 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.4 Hz, H₅), 6.88 – 6.82 (m, **1H**, H₆), 3.83 (s, **3H**, CH₃₍₃₎), 2.57 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ^{**13**C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 205.1, 152.9, 149.0, 122.0, 119.8, 118.4, 117.1, 56.3, 27.1. HRMS **167.07003** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₉H₁₁O₃, 167.07027).}



2-Hydroxy-3-methoxybenzonitrile (224). To solution of ortho-vanillin (400 mg, 2.63 mmol) in acetonitrile (5 mL), sodium azide (254 mg, 3.9 mmol) and triflic acid (1 g, 7.9 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature until the reaction was completed. The solvent was removed under reduced pressure, the residue was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and was purified by column chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 7:3) to afford **224** as a white powder (35%). C₈H₇NO₂. **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.69 (s, **1H**, -OH), 7.31 – 7.26 (m, **1H**, H₆), 7.23 (m, **1H**, H₅), 6.98 (m, **1H**, H₄), 4.03 (s, **3H**, CH₃₍₃₎). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 152.9, 146.3, 144.5, 124.9, 123.1, 113.3, 111.0, 56.3. HRMS **150.055073** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₈H₈NO₂, 150.05496).



2-(2-(2,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxoethoxy)-3-methoxybenzonitrile (225). To a solution of 2-hydroxy-3-methoxybenzonitrile **224** (119 mg, 0.8 mmol) in DMF (10 mL) was added K₂CO₃ (166 mg, 1.2 mmol) and 2-bromo-(2,4-dimethoxyacetophenone) (158

mg, 0.88 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2h, then, water was added, the insoluble portion was removed by filtration, washed with water and methanol to afford **225** as a pure white solid (49%). C₁₈H₁₇NO₅. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform- $d \delta$ 7.99 (d, **1H**, *J* = 8.8 Hz, H₆), 7.15 (dd, **1H**, *J* = 7.1, 2.2 Hz, H₆), 7.07 – 6.99 (m, **2H**, H₄,H₅), 6.56 (dd, **1H**, *J* = 8.8, 2.3 Hz, H₅), 6.43 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₃), 5.42 (s, **2H**, CH₂), 3.88 (s, **3H**, CH₃(4')), 3.85 (s, **3H**, CH₃(2')), 3.76 (s, **3H**, CH₃(3)). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ 192.7, 165.2, 161.2, 151.6, 150.5, 133.2, 125.0, 123.5, 118.0, 117.2, 116.7, 106.6, 105.8, 98.2, 78.2, 56.3, 55.7, 55.6. HRMS **328.11737** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₈H₁₈NO₅, 328.11795).



2'-Bromo-(2,4-dimethoxyacetophenone). To a suspension of CuBr₂ (5.00 g, 21 mmol) in EtOAc (65 mL) a solution of 2,4-dimethoxyacetophenone (2.00 g, 10.0 mmol) in CHCl₃ (80 mL) was added at once. The reaction was complete after refluxing for 1h, the conversion of CuBr₂ (black) into CuBr (white) indicated a lack of HBr evolution which means the reaction was over. Then, the mixture was filtered, washed with NaHCO₃, brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the product as a pure white solid (98%). C₁₀H₁₁O₃Br. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.89 (d, **1H**, *J* = 8.9 Hz, H₆), 6.54 (dd, **1H**, *J* = 8.9, 2.3 Hz, H₅), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₃), 4.55 (s, **2H**, H₂⁻), 3.90 (s, **3H**, CH₃₍₄₎), 3.84 (s, **3H**, CH₃₍₂₎).¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 190.2, 165.4, 160.9, 133.8, 117.9, 105.9, 98.3, 55.7, 55.7, 38.0. HRMS **258.99645** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₀H₁₂O₃Br, 258.99643).



2'-Chloro-(2,4-dimethoxyacetophenone). To a solution of 1,3-dimethoxybenzene (2.00 g, 10.9 mmol) in DCM (15 mL), chloroacetyl chloride (1.00 g, 10.9 mmol) and AlCl₃ (2.00

g, 13.3 mmol) were added in one portion. The reaction was stirred at 0 °C for 2h until the disappearance of the starting material which was monitored by TLC. Water was added carefully and the mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and the obtained solid was recrystallized from methanol to afford the product as a pure white solid (45%). C₁₀H₁₁O₃Cl. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.93 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H₆), 6.55 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.3 Hz, H₅), 6.44 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H₃), 4.73 (s, 2H, H₂'), 3.90 (s, 3H, CH₃₍₄₎), 3.85 (s, 3H, CH₃₍₂₎). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 190.2, 165.5, 161.0, 133.7, 118.1, 106.0, 98.3, 55.7, 51.3. HRMS 215.04694 *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₀H₁₂O₃Cl, 215.0695).



N-(2-(Chloroacetyl)-5-methoxyphenyl)acetamide. To a solution of m-anisidine (10.00 g, 81.2 mmol) in nitrobenzene (100 mL), boron trichloride 1M in CH₂Cl₂ (89 mL, 89.3 mmol) was added. Then, chloroacetonitrile (6 mL, 97.4 mmol) were added dropwise at 0 °C under inert atmosphere. Aluminum chloride (12.00 g, 89.3 mmol) was also added by small portion and the mixture was left under stirring, warmed to room temperature and then heated at 80 °C for 4h. After cooling to room temperature, the mixture was stirred overnight. Then, aqueous solution HCl (1N, 150 mL) was added and the mixture was heated at 80 °C for 1 hour. After cooling to room temperature, the mixture was then extracted several times with DCM. The combined organic layers were dried distillation under reduced pressure. The crude intermediate 1-(2-amino-4-methoxyphenyl)-2chloroacetophenone, obtained as a brown solid was confirmed by NMR and used without further purification. The intermediate 1-(2-amino-4-methoxyphenyl)-2chloroacetophenone was solubilized in anhydride acetic (50 mL) and the mixture was heated to 80 °C for 90 minutes. Then the mixture was evaporated by under reduced pressure to afford a brown solid which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford the product as a pure brown solid (33%). C₁₁H₁₂NO₃Cl. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.42 (d, **1H**, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.71 (d, **1H**, *J* = 9.0 Hz, H₃), 6.60 (dd, **1H**, $J = 9.0, 2.7 \text{ Hz}, H_4$), 4.68 (s, **2H**, H_{2'}), 3.87 (s, **3H**, CH₃₍₅₎), 2.22 (s, **3H**, CH_{3(Ac)}).¹³**C NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 193.0, 169.9, 165.7, 144.8, 132.5, 112.3, 110.1, 104.2, 55.8, 46.8, 25.7. **HRMS 242.05771** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₁H₁₃NO₃Cl, 242.05785).

MONO-METHOXYLATION OF HYDROXYL ANALOGS



4-(Dimethylamino)-2-methoxyacetophenone (144). The crude product was prepared according to the general procedure **C** starting from 1-(4-(dimethylamino)-2-hydroxyphenyl)ethan-1-one (500 mg, 3.30 mmol) which was used without further purification to afford **144** as a white powder (64%). C₁₁H₁₅NO₂. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.72 (d, **1H**, *J* = 8.9 Hz, H₅), 6.16 (dd, **1H**, *J* = 8.9, 2.3 Hz, H₆), 5.95 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₂), 3.79 (s, **3H**, CH₃₍₃₎), 2.93 (s, **6H**, -NMe₂), 2.45 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 196.3, 161.41, 154.6, 132.2, 115.6, 103.9, 93.4, 54.8, 39.8, 31.5. HRMS **194.11727** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₁H₁₆NO₂, 194.11756).



4-(Dimethylamino)-2-hydroxy-6-methoxyacetophenone (150). The crude product was prepared according to the general procedure **C** starting from 4-(dimethylamino)-2,6-dihydroxyacetophenone **148** (666 mg, 3.4 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford **150** as a white powder (70%). C₁₁H₁₅NO₃. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.74 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₅), 5.60 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 3.84 (s, **3H**, CH₃₍₆₎), 3.01 (s, **6H**, -NMe₂), 2.54 (s, **3H**, CH_{3(2')}).¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 201.4, 167.0, 163.3, 155.7, 103.0, 92.0, 86.4, 55.3, 40.1, 32.6. HRMS **210.11184** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₁H₁₆NO₃, 210.11247).



2-Dydroxy-6-methoxy-4-morpholinoacetophenone (151). The crude product was prepared according to the general procedure **C** starting from 2,6-dihydroxy-4-morpholinoacetophenone **149** (1.00 g 5.95 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford **151** as a white powder (70%). C₁₃H₁₇NO₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 6.00 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 5.93 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₅), 3.89 (s, **3H**, CH₃₍₆₎), 3.78 (m, **4H**, H_{4b}), 3.34 (m, **4H**, H_{4a}), 2.54 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 203.3, 167.8, 164.7, 158.2, 105.0, 94.5, 89.5, 67.7, 56.0, 48.1, 32.7. HRMS **252.12273** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₃H₁₈NO₄, 252.12303).



5-Methoxy-2-nitroacetophenone (183). The crude product was prepared according to the general procedure **C** starting from 5-hydroxy-2-nitroacetophenone (1.00 g, 5.5 mmol) which was used without further purification to afford **183** as a white powder (80%). C₉H₉NO₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.02 (d, **1H**, *J* = 9.2 Hz, H₃), 6.92 (dd, **1H**, *J* = 9.2, 2.8 Hz, H₄), 6.71 (d, **1H**, *J* = 2.8 Hz, H₆), 3.83 (s, **3H**, CH₃₍₅₎), 2.43 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³**C NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 200.1, 164.4, 141.0, 137.9, 127.0, 114.8, 112.0, 56.3, 30.2. **HRMS 218.04218***m***/***z* [M+Na]⁺ (calc for C₉H₉NO₄Na, 218.04238).



3-Methoxy-2-nitroacetophenone (188). The crude product was prepared according to general procedure **C** starting from 3-hydroxy-2-nitroacetophenone (300 mg, 1.65 mmol),

which was used without further purification to afford **188** as a white powder (97%). C₉H₉NO₄. ¹**H** NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.52 (m, **1H**, H₅), 7.38 (d, **1H**, *J* = 7.9 Hz, H₄), 7.26 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₆), 3.88 (s, **3H**, CH₃₍₃₎), 2.54 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 195.8, 151.4, 139.0, 131.5, 131.2, 121.03, 117.1, 56.9, 28.1. **HRMS 196.06045** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for 196.06043 C₉H₁₀NO₄).

DIRECT SYNTHESIS OF INDIGOID DERIVATIVES



(*Z*)-2-(4'-(Dimethylamino)benzylidene)-benzofuran-3(2*H*)-one (96). To a solution of benzofuran-3(2*H*)-one (55 mg, 0.41 mmol) in water (10 mL) and 4- (dimethylamino)benzaldehyde (62 mg, 0.41 mmol). The mixture was stirred at room temperature until complete precipitation. The precipitate was filtered, washed with and hot water to afford **96** as pure red solid (7%). C₁₇H₁₅NO₂. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.90 – 7.84 (m, 2H, H₆',H₂'), 7.81 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 1.5, 0.7 Hz, H₄), 7.61 (ddd, 1H, *J* = 8.6, 7.3, 1.4 Hz, H₆), 7.35 – 7.29 (m, 1H, H₇), 7.19 (ddd, *J* = 7.4, 0.8 Hz, 1H, H₅), 6.93 (s, 1H, =CH), 6.77 – 6.73 (m, 2H, H₅',H₃'), 3.07 (s, 6H, -NMe₂). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 184.0, 165.4, 151.4, 145.1, 135.9, 133.7, 124.4, 122.9, 122.5, 120.1, 115.3, 112.8, 112.0, 40.1. HRMS 266.10951 *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₆NO₂, 266.11735).



(Z)-2-(4'-Fluorobenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (101). To a solution of 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (50 mg, 0.33 mmol) in acetic acid (10 mL) was added 211

4-fluorobenzaldehyde (50 mg, 0.39 mmol) and few drops of concentrated HCl. The mixture was stirred at 0 °C until precipitate appears. The mixture was poured into ice/water and the precipitate was filtered and washed with hot water to afford **101** as pure pale yellow solid (95%). C₁₅H₉FO₃. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.04 – 7.98 (dd, **2H**, *J* = 8.6, 5.6 Hz, H₅',H₃'), 7.62 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₄), 7.36 – 7.30 (d, **2H** *J* = 8.8 Hz, H₆',H₂'), 6.81 (s, **1H**, =CH), 6.79 (s, **1H**, H₇), 6.72 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₅). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.5, 168.1, 166.8, 162.6 (d, *J* = 248.8 Hz), 147.2, 133.5 (d, *J* = 8.7 Hz), 128.8 (d, *J* = 3.2 Hz), 126.1, 116.2 (d, *J* = 21.7 Hz), 113.3, 112.8, 109.3, 98.7. HRMS 255.04585 *m/z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₈FO₃, 255.04520).



(Z)-6-Hydroxy-2-(4'-hydroxy-2'-methoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one

(112). The crude product was prepared according to the general procedure **D** starting from 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.66 mmol) and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (100 mg, 0.66 mmol) to afford **112** as a pure yellow solid (48%). C₁₆H₁₂O₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.04 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆), 7.54 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H4), 6.98 (s, **1H**, =CH), 6.67 (s, **1H**, H7), 6.63 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H5), 6.55 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H5⁻), 6.51 (s, **1H**, H3⁻), 3.85 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (**101** MHz, DMSO-*d*₆) δ 180.6, 168.4, 167.6, 161.1, 159.8, 145.9, 132.3, 125.4, 113.7, 111.9, 111.6, 108.5, 104.0, 99.0, 98.6, 55.6. HRMS **307.05799** *m*/*z* [M+Na]⁺ (calc for C₁₆H₁₂O₅Na⁺, 307.05769).



(*Z*)-2-(4'-Hydroxy-3'-methoxybenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (113). The crude product was prepared according to the general procedure **E** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (200 mg, 1.49 mmol) and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (269 mg, 1.49 212

mmol) to afford **113** as a pure orange solid (76%). C₁₆H₁₂O₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.80 (ddd, **1H**, *J* = 7.7, 1.5, 0.7 Hz, H₄), 7.63 (ddd, **1H**, *J* = 8.3, 7.2, 1.5 Hz, H₆), 7.47 (m, **2H**, H_{6'},H_{2'}), 7.30 (dd, **1H**, *J* = 8.3, 0.7 Hz, H₇), 7.20 (dd, **1H**, *J* = 7.4 Hz, H₇), 6.98 (m, **1H**, H_{5'}), 6.85 (s, **1H**, =CH), 3.99 (s, **3H**, CH_{3(3')}). ¹³**C NMR (101 MHz,** Chloroform-*d*) δ 84.5, 165.7, 147.8, 146.7, 145.8, 136.5, 126.6, 124.9, 124.6, 123.3, 121.9, 115.0, 113.9, 113.3, 112.8, 56.0. **HRMS 269.08060** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₆H₁₃O4, 269.08084).



(Z)-6-Hydroxy-2-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one

(114). The crude product was prepared according to the general procedure **D** starting from 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (200 mg, 1.33 mmol) and 4-hydroxy-3methoxybenzaldehyde (240 mg, 1.33 mmol) to afford **114** as a pure yellow solid (89%). C₁₆H₁₂O₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.60 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.53 (d, **1H**, *J* = 2.0 Hz, H₂'), 7.48 (dd, **1H**, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H₆'), 6.90 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H₅'), 6.80 (d, **1H**, *J* = 1.9 Hz, H₇), 6.74 (s, **1H**, =CH), 6.71 (d, **1H**, *J* = 1.9 Hz, H₅), 3.84 (s, **3H**, CH_{3(3')}) ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.2, 167.4, 166.1, 148.8, 147.7, 145.8, 125.7, 125.4, 123.4, 116.0, 115.1, 113.1, 112.8, 111.7, 98.6, 55.6. HRMS **285.07526** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₆H₁₃O₅, 285.07575).



(*E*)-5-Hydroxy-2-(4'-hydroxy-2'-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1one (116). The crude product was prepared according to the general procedure *E* procedure starting from 5-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (100 mg, 0.67 mmol)

and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (122 mg, 0.67 mmol) to afford **116** as a pure yellow solid (6%). C₁₇H₁₄O₄. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.50 (s, **1H**, -OH_{4'}), 10.10 (s, **1H**, OH₆), 7.74 (s, **1H**, =CH), 7.63 – 7.57 (m, **2H**, H_{6'},H₅), 6.94 (s, **1H**, H₇), 6.83 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₄), 6.50 (m, **2H**, H_{5'},H_{3'}), 3.90 (s, **2H**, CH_{2(2a)}), 3.83 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C **NMR (101 MHz**, DMSO-*d*₆) δ 191.5, 163.4, 160.8, 160.3, 152.7, 131.7, 130.7, 129.7, 125.4, 125.3, 115.8, 114.9, 111.9, 108.0, 99.1, 55.5, 31.9. **HRMS 281.08193** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₇H₁₃O₄, 281.08193).



(*E*)-2-(4'-Hydroxy-3'-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (117). The crude product was prepared according to the general procedure **E** starting from 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (200 mg, 1.51 mmol) and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (273 mg, 1.51 mmol) to afford **117** as a pure yellow solid (69%). C₁₇H₁₄O₃. **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.88 (d, **1H**, *J* = 7.6 Hz, H₄), 7.62 – 7.50 (m, **3H**, =CH, H₆,H₇), 7.40 (m, **1H**, H₅), 7.26 (dd, **1H**, *J* = 8.3, 2.0 Hz, H₆'), 7.12 (d, **1H**, *J* = 2.0 Hz, H₂'), 6.99 (d, **1H**, *J* = 8.3 Hz, H₅'), 4.01 (m, **2H**, CH₂(2a)), 3.95 (s, **3H**, CH₃(3')). ¹³C **NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.4, 149.5, 147.6, 146.8, 138.3, 134.4, 134.3, 132.4, 128.1, 127.7, 126.1, 124.9, 124.4, 115.1, 113.4, 56.1, 32.5. **HRMS 267.10131** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₅O₃, 267.10157).



(*E*)-5-Hydroxy-2-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1one (118). The crude product was prepared according to the general procedure **E** starting from 5-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (200 mg, 1,35 mmol) and 4-hydroxy-3methoxybenzaldehyde (243 mg, 1.35 mmol) to afford **118** as a pure orange solid (84%). C₁₇H₁₄O₄. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.61 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.35 (s, **1H**, =CH), 214
7.30 (d, **1H**, *J* = 1.8 Hz H₇), 7.22 (dd, **1H**, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H₅), 6.96 (d, *J* = 1.8 Hz **1H**, H_{2'}), 6.89 (d, **1H**, *J* = 8.2 Hz, H_{5'}), 6.85 (dd, **1H**, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H_{6'}), 3.98 (s, **2H**, CH_{2(2a)}), 3.86 (s, **3H**, CH_{3(3')}). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 191.4, 163.6, 152.8, 148.5, 147.8, 132.5, 131.8, 129.6, 126.7, 125.5, 124.6, 116.0, 115.9, 114.5, 111.9, 55.7, 31.7. HRMS **283.09609** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₅O₄, 283.09649).



(*E*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (160). The product was prepared according to the general procedure **F** starting from 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (200 mg, 1.48 mmol) to afford **160** as a pure yellow solid (97%). C₁₈H₁₆O₃. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.08 (t, **1H**, *J* = 2.1 Hz, =CH), 7.87 (d, **1H**, *J* = 7.6 Hz, H₄), 7.61 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆'), 7.58 – 7.46 (m, **2H**, H₆,H₇), 7.37 (m, **1H**, H₅), 6.53 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅'), 6.45 (d, **1H**, *J* = 2.5 Hz, H₃'), 3.91 (d, **2H**, *J* = 2.1 Hz CH_{2(2a)}), 3.85 (s, **3H**, CH_{3(4'})), 3.82 (s, **3H**, CH_{3(2'})). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.2, 162.4, 160.7, 149.5, 138.4, 134.0, 132.1, 130.7, 128.2, 127.3, 125.9, 124.1, 117.5, 105.2, 98.2, 55.5, 55.4, 32.5. HRMS **281.1170** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₈H₁₇NO₃, 281.1172).



(*E*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-3-methyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (162). The product was prepared according to the general procedure I starting from 3-methyl-1-indanone and 2,4-dimethoxybenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 95:5) to afford 162 as a dark yellow solid (64%). C₁₉H₁₈O₃ ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, =CH), 7.84 (m, 1H, H₆'), 7.58 – 7.46 (m, 3H, H₇,H₆,H₄), 7.35 (m, 1H, H₅), 6.52 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅'), 6.43 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 4.25 (m, 1H, H₃), 3.81 (s, 3H, CH_{3(4')}), 3.79 (s, 215)

3H, CH_{3(2')}), 1.31 (m, **3H**, CH₃₍₃₎). ¹³**C NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.0, 162.5, 160.5, 155.8, 138.4, 137.3, 134.3, 131.5, 128.7, 127.5, 124.9, 123.9, 116.6, 105.2, 98.2, 55.6, 55.4, 36.8, 18.4. **HRMS 295.13271** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₉H₁₉O₃, 295.13287).



2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-1-indene-1,3(2*H***)-dione (164). The product was prepared according to the general procedure F** starting from 1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (100 mg, 0.71 mmol) to afford **164** as a pure yellow solid (95%). C₁₈H₁₄O₄. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.25 (d, **1H**, *J* = 9.0 Hz, H₆'), 8.48 (s, **1H**, =CH), 8.00 – 7.92 (m, **2H**, H₇,H₄), 7.80 – 7.71 (m, **2H**, H₅,H₄), 6.64 (dd, **1H**, *J* = 9.0, 2.4 Hz, H₅'), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.93 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.92 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.4, 163.0, 141.0, 140.0, 136.6, 134.8, 134.6, 125.5, 122.3, 116.1, 105.6, 97.7, 55.8, 55.7. HRMS **295.0960** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₈H₁₅O₄, 295.0965).



2-(2',4'-Dimethoxybenzyl)-isoindoline-1,3-dione (165). To a solution of phthalic anhydride (100 mg, 0.67 mmol) in acetic acid (5 mL) was added 2,4-dimethoxybenzylamine (124 mg, 0.74 mmol) and the reaction was refluxed for 4 days. After complete disappearance of the starting material, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was takin up with EtOAc and the organic layer was washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue from Methanol/EtOAc/cyclohexane (7:2:1) to afford **165** as a

pure white crystal (42%). C₁₇H₁₅NO₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.84 – 7.80 (m, **2H**, H₇,H₄), 7.70– 7.66 (m, **2H**, H₆,H₅), 7.15 (dd, **1H**, *J* = 8.1, 0.7 Hz, H₅'), 6.42 – 6.37 (m, **2H**, H_{3'},H_{6'}), 4.81 (s, **2H**, CH₂), 3.79 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.75 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³**C NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 168.1, 160.5, 158.2, 133.8, 132.3, 129.9, 123.2, 116.7, 103.9, 98.5, 55.5, 55.3, 36.6. **HRMS 320.0891** *m*/*z* [M+Na]⁺ (calc for C₁₇H₁₅NO₄, 320.0893).



(*Z*)-2-(4'-Fluorobenzylidene)-7-methoxybenzofuran-3(*2H*)-one (226). To a solution of 7-methoxybenzofuran-3(*2H*)-one (50 mg, 0.33 mmol) in acetic acid (10 mL) was added 4-fluorobenzaldehyde (50 mg, 0.39 mmol) and few drops of concentrated HCl. The mixture was stirred at 0 °C until precipitate appears. The mixture was poured into ice/water and the precipitate was filtered and washed with hot water to afford **226** as pure white solid (60%). C₁₆H₁₁FO₃. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.05 (dd, **2H**, *J* = 8.6, 5.8 Hz, H₅',H₃'), 7.47 (d, **1H**, *J* = 7.9 Hz, H₄), 7.40 (m, **2H**, H₆',H₂'), 7.34 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.2 Hz, H₆), 7.26 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 7.3 Hz, H₅), 7.02 (s, **1H**, =CH), 4.00 (s, **1H**, CH₃₍₇₎). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.7, 162.8 (d, *J* = 250.0 Hz), 154.3, 145.6, 133.7 (d, *J* = 8.6 Hz), 128.5, 124.7, 122.2, 119.6, 116.3 (d, *J* = 22.0 Hz), 115.1, 111.6, 56.3. HRMS **271.07647** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₆H₁₂FO₃, 271.07650).



2-(2',4'-Dimethoxyphenyl)-*4H***-chromen-4-one.** To a mixture of (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(2'-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (150 mg, 0.528 mmol) in DMSO (3 mL) was added I₂ (27 mg, 0.11 mmol). The suspension was stirred for 1 day at 145 °C, after the completion of the reaction, I₂ was removed by filtration and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over magnesium 217

sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the product as a pure yellow solid (74%). C₁₇H₁₄O₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.05 (ddd, **1H**, *J* = 8.0, 1.7, 0.5 Hz, H₅), 7.86 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆), 7.73 (m, **1H**, H₇), 7.56 (m, **1H**, H₈), 7.41 (m, **1H**, H₆), 7.06 (s, **1H**, =CH₍₃₎), 6.61 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅), 6.58 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 3.91 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.83 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 181.0, 165.4, 163.4, 161.5, 157.7, 135.3, 131.6, 126.3, 126.0, 124.2, 119.3, 113.6, 111.0, 107.1, 99.8, 56.3, 56.1. HRMS **283.0966** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₅O₄, 283.0965).

SYNTHESIS OF DERIVATIVES *VIA* ALUMINA-MEDIATED ALDOLIC CONDENSATION



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-4,6-difluorobenzofuran-3(2*H*)-one (158). The crude product was prepared according to the general procedure **G** starting from 4,6-difluorobenzofuran-3(2*H*)-one **157** (95 mg, 0.55 mmol). The crude compound was recrystallized from methanol to afford **158** as pure white crystals (47%). C₁₇H₁₂F₂O₄. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.15 (d, *J* = 8.8 Hz, **1H**, H₆'), 7.42 (s, **1H**, =CH), 6.81 (m, **1H**, H₇), 6.60 – 6.55 (m, **2H**, H₅,H₅'), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.87 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.86 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 179.0, 168.3 (d, *J* = 257.4, 12.8 Hz), 166.5 (dd, *J* = 17.1, 9.2 Hz), 163.2, 160.8, 159.3 (dd, *J* = 256.3, 16.3 Hz), 157.9 (d, *J* = 16.3 Hz), 145.6, 133.37, 113.9, 108.7, 105.9, 99.5 (dd, *J* = 27.4, 23.4 Hz), 98.1, 97.1 (dd, *J* = 26.7, 4.9 Hz), 55.7, 55.5. **HRMS 319.0769** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₃F₂O₄, 319.0776).



(Z)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-6-methoxybenzo[b]thiophen-3(2H)-one

(197). The crude product was prepared according to the general procedure **G** starting from 6-methoxybenzo[*b*]thiophen-3(*2H*)-one (297 mg, 1.65 mmol). The corresponding crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent DCM/EtOAc 95:5) to afford **197** as pure orange solid (11%). $C_{18}H_{16}O_4S$. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.28 (s, **1H**, =CH), 7.83 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₄), 7.65 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆), 6.90 (d, **1H**, *J* = 2.2 Hz, H₇), 6.77 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H₅), 6.56 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅'), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.86 (s, **6H**, CH_{3(2',4')}), 3.83 (s, **3H**, CH₃₍₆₎). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 187.0, 165.3, 162.9, 160.7, 148.8, 131.2, 128.3, 128.2, 127.6, 124.6, 116.8, 113.1, 107.5, 105.3, 98.4, 55.8, 55.6, 55.5. HRMS **329.08361** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₈H₁₇O₄S, 329.08421).

SYNTHESIS OF AURONE WITH KETONE MODULATION DERIVATIVES



2-(2',4'-Dimethoxybenzyl)benzofuran (206). To a mixture of lithium aluminum hydride (84 mg, 2.2 mmol) in anhydrous ether (20 mL) was added (*Z*)-2-(2,4-dimethoxybenzylidene)-7-methoxybenzofuran-3(*2H*)-one **207** (344 mg, 1.1 mmol) at room temperature and stirred for 50 min. Aluminum chloride (293 mg, 2.2 mmol) was added, the reaction mixture was stirred until complete conversion. The residue was removed by filtration and the reaction mixture was diluted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine and then dried over magnesium sulfate, filtered and the

filtrate was concentrated under reduced pressure. The corresponding crude product was purified by flash chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 8:2) to afford **206** as a pure colorless oil (35%). C₁₈H₁₈O₄. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.15 (d, **1H**, *J* = 8.3 Hz, H₆'), 7.11 (m, **1H**, H₅), 7.08 (m, **1H**, H₄), 6.75 (dd, **1H**, *J* = 7.5, 1.5 Hz, H₆), 6.52 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 6.47 (dd, **1H**, *J* = 8.3, 2.4 Hz, H₅'), 6.28 (s, **1H**, H₃), 4.11 (s, **2H**, CH₂), 4.01 (s, **3H**, CH₃₍₇₎), 3.82 (s, **3H**, CH_{3(4'})), 3.81 (s, **3H**, CH_{3(2'})). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.9, 158.6, 158.2, 144.9, 143.8, 130.7, 130.7, 123.0, 118.0, 112.7, 105.5, 104.1, 103.1, 98.5, 55.9, 55.3, 55.3, 28.3. HRMS **299.12805** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₈H₁₉O₄, 299.12779).



(2',4'-Dimethoxyphenyl)(3-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)methanone (208). To a mixture of 2-bromo-2,4-dimethoxyacetophenone (321 mg, 1.78 mmol) and 1,8-diaza bicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (543 mg, 3.57 mmol) in DCM (10 mL) with molecular sieves was added 2-hydroxy-3-methoxyacetophenone 212 (298 mg, 1.78 mmol). The mixture was stirred under argon at 25 °C overnight, after the completion of the reaction, 10% HCl solution (10 mL) was added followed by water and the molecular sieves was removed by filtration. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The corresponding crude product which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 7:3) to afford 208 as a pure white solid (10%). C19H18O5. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.51 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₆'), 7.22 – 7.15 (m, **2H**, H₅,H₆), 6.88 (dd, 1H, J = 7.2, 1.6 Hz, H₄), 6.54 (dd, 1H, J = 8.5, 2.3 Hz, H_{5'}), 6.50 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H_{3'}), 3.92 (s, 3H, CH_{3(4')}), 3.84 (s, 3H, CH_{3(2')}), 3.73 (s, 3H, CH₃₍₇₎), 2.49 (s, 3H, CH₃₍₃₎). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 185.4, 163.7, 160.2, 149.3, 145.8, 143.8, 132.0, 131.2, 124.9, 123.6, 121.8, 113.2, 109.5, 104.8, 99.1, 56.1, 55.9, 55.5, 9.8. HRMS 327.12237 m/z [M+H]+ (calc for C₁₉H₁₉O₅, 327.12270).



(3-Amino-7-methoxybenzofuran-2-yl)(2',4'-dimethoxyphenyl)methanone (222). To a mixture of 2-(2-(2,4-dimethoxyphenyl)-2-oxoethoxy)-3-methoxybenzonitrile 225 (128 mg, 0.39 mmol) in MeOH (10 mL), NaOMe (21 mg, 0.39 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 2h, after the completion of the reaction, water added, the insoluble portion was removed by filtration, washed with water and methanol to afford 222 as a pure white solid (79%). C₁₈H₁₇NO₅. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d* 7.60 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H6'), 7.15 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.3 Hz, H4), 7.10 (m, 1H, H5), 6.90 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H6), 6.55 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.3 Hz, H5'), 6.52 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H3'), 5.81 (bs, 2H, H₂(NH2)), 3.91 (s, 3H, CH_{3(4'})), 3.84 (s, 3H, CH_{3(2'})), 3.81 (s, 3H, CH_{3(7'})). ¹³C NMR (101 MHz Chloroform-*d*) δ 184.3, 163.0, 159.6, 146.1, 144.1, 140.7, 135.8, 131.6, 123.0, 122.8, 121.3, 112.0, 111.0, 104.5, 99.3, 56.2, 56.0, 55.5. HRMS 328.11749 *m*/z [M+H]⁺ (calc for C₁₈H₁₈NO₅, 328.11795).

AURONE SYNTHESIS FROM CHALCONE DERIVATIVES



(*E*)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(4'-(dimethylamino)-2'-hydroxy-6'-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (152). The product was prepared according to the general procedure H starting from 150 4-(dimethylamino)-2-hydroxy-6-methoxyacetophenone (106 mg, 0.51 mmol) and recrystallized from EtOAc to afford 152 as a pure yellow solid (36%). C₂₀H₂₃NO₅. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.03 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, H_β), 7.90 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, H_α), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H₆), 6.50 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.4 Hz, H₅), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 5.80 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₅'), 5.65 (d, **1H**, *J* = 2.5 Hz, H₃'), 3.90 (s, **3H**, CH₃₍₄₎), 3.86 (s, **3H**, CH₃₍₂₎), 3.83 (s, **3H**, CH_{3(6')}), 3.03 (s, **6H**, -NMe₂). ¹³C **NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.6, 168, 162.9, 162.6, 160.2, 155.6, 136.9, 130.3, 126.2, 118.4, 105.6, 103.5, 98.6, 92.5, 87.2, 55.7, 55.7, 40.1. **HRMS 358.16428** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₂₀H₂₄NO₅, 358.16490).



(*E*)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(2'-hydroxy-6'-methoxy-4-morpholinophenyl)prop-2-en-1-one (153). The product was prepared according to the general procedure **H** starting **151** 2-hydroxy-6-methoxy-4-morpholinoacetophenone (128 mg, 0.613 mmol) and was recrystallized from EtOAc to afford **153** as a pure yellow solid (36%). C₂₂H₂₅NO6. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.51 (s, **1H**, -OH_{2'}), 7.92 (d, **1H**, *J* = 15.7 Hz, H_β), 7.87 (d, **1H**, *J* = 15.7 Hz, H_α), 7.61 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₆), 6.65 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 6.62 (dd, **1H**, *J* = 8.5, 2.4 Hz, H₅), 6.07 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H_{5'}), 5.95 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H_{3'}), 3.92 (s, **3H**, CH₃₍₄₎), 3.90 (s, **3H**, CH₃₍₂₎), 3.83 (s, **3H**, CH_{3(6')}), 3.70 (t, **4H**, *J* = 4.9 Hz, H_{8'}), 3.36 (t, **4H**, *J* = 5.0 Hz, H_{7'}). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 190.8, 166.9, 162.8, 162.4, 159.9, 156.1, 137.2, 130.7, 125.0, 116.6, 106.5, 103.7, 98.5, 93.2, 89.0, 65.9, 56.0, 55.9, 55.6, 46.5. HRMS 400.17497 *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₂₂H₂₆NO₆, 400.17546).



(*E*)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(2'-nitrophenyl)prop-2-en-1-one (189). The product was prepared according to the general procedure **I** starting from 2-nitroacetophenone **172** (500 mg, 3.03 mmol) to afford **189** as a pure yellow solid. C₁₇H₁₅NO₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.16 (dd, **1H**, *J* = 8.2, 1.2 Hz, H₃'), 7.88 (dd, **1H**, *J* = 7.5, 1.2 Hz, H₅'), 7.79 (ddd, **1H**, *J* = 8.2, 7.5, 1.5 Hz, H₄'), 7.74 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₆), 7.71

(dd, **1H**, *J* = 7.5, 1.5 Hz, H₆'), 7.56 (d, **1H**, *J* = 16.3 Hz, H_{α}), 7.15 (d, **1H**, *J* = 16.3 Hz, H_{β}), 6.65 – 6.57 (m, **2H**, H₃,H₅), 3.83 (s, **3H**, CH₃₍₄₎), 3.82 (s, **3H**, CH₃₍₂₎). ¹³**C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192.0, 163.6, 160.0, 147.0, 141.1, 135.7, 134.2, 131.2, 130.7, 129.0, 124.5, 123.0, 115.1, 106.5, 98.3, 55.9, 55.6. **HRMS 314.1021** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₆NO₅, 314.1023).



(E)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(5'-methoxy-2'-nitrophenyl)prop-2-en-1-one

(191). The product was prepared according to the general procedure I starting from 5methoxy-2-nitroacetophenone **183** (864 mg, 4.4 mmol) to afford **191** as a pure yellow pale solid (70%). C₁₈H₁₇NO₆. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (d, **1H**, *J* = 9.1 Hz, H₃⁻), 7.70 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆), 7.49 (d, **1H**, *J* = 16.3 Hz, H_α), 7.25 (dd, **1H**, *J* = 9.1, 2.8 Hz, H₄⁻), 7.10 (d, **1H**, *J* = 2.8 Hz, H₆⁻), 7.07 (d, **1H**, *J* = 16.3 Hz, H_β), 6.61 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 6.59 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅), 3.93 (s, **3H**, CH_{3(5')}), 3.82 (s, **6H**, CH_{3(4,2)}). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192.2, 163.7, 163.5, 159.9, 140.6, 139.1, 139.0, 130.8, 127.2, 123.5, 115.5, 115.1, 113.7, 106.5, 98.4, 56.6, 55.9, 55.6. HRMS **344.11311** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₈H₁₈NO₆, 344.11286).



(E)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(3'-methoxy-2'-nitrophenyl)prop-2-en-1-one

(192). The product was prepared according to the general procedure **I** starting from 3methoxy-2-nitroacetophenone **188** (329 mg, 1.69 mmol) to afford **192** as a pure yellow solid (66%). C₁₈H₁₇NO₆. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.83 (d, **1H**, *J* = 16.1, H_α), 7.56 – 7.44 (m, **2H**, H₆,H_{5'}), 7.29 – 7.19 (m, **2H**, H_{4'},H_{6'}), 7.16 (d, **1H**, *J* = 15.3 Hz, H_β), 6.51 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 3.94 (s, **3H**, CH₃₍₃₎), 3.85 (s, **6H**, CH_{3(2,4)}). ¹³**C NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 190.4, 163.9, 160.9, 151.7, 143.4, 134.9, 131.9, 131.6, 122.0, 120.8, 116.6, 115.5, 105.8, 98.7, 76.9, 56.9, 55.8, 55.8. **MS (ESI)** *m/z* 344.11 (M+H)⁺.



(E)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(4'-(dimethylamino)-2'-hydroxyphenyl)prop-2-

en-1-one. The product was prepared according to the general procedure **H** starting from 1,4-(dimethylamino)-2-hydroxyacetophenone **145** (289 mg, 1.61 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford the product as a pure orange solid (60%). C₁₉H₂₁NO₄. ¹**H** NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.05 (d, **1H**, *J* = 15.5 Hz, H_β), 7.71 (d, **1H**, *J* = 9.2 Hz, H₆'), 7.61 – 7.51 (m, **2H**, H₆,H_α), 6.51 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅), 6.45 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 6.22 (dd, **1H**, *J* = 9.2, 2.6 Hz, H₅'), 6.11 (d, **1H**, *J* = 2.6 Hz, H₃'), 3.88 (s, **3H**, CH₃₍₄₎), 3.83 (s, **3H**, CH₃₍₂₎), 3.03 (s, **6H**, -NMe₂). ¹³**C** NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 190.9, 166.2, 162.8, 160.3, 155.7, 138.4, 131.2, 130.8, 118.9, 117.5, 110.8, 105.4, 103.8, 98.5, 98.2, 55.6, 55.5, 40.0. HRMS **328.15409** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₉H₂₂NO₄, 328.15433).



(*E*)-3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-1-(2'-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one. The product was prepared according to general procedure **H** starting from 2-hydroxyacetophenone (300 mg, 2.2 mmol) and recrystallized from cyclohexane to afford the product as a pure yellow solid (34%). C₁₇H₁₆O₄. ¹**H** NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.08 (s, 1**H**, -OH), 8.15 (d, 1**H**, *J* = 15.5 Hz, H_β), 7.89 (dd, 1**H**, *J* = 8.1, 1.6 Hz, H₆⁻), 7.68 (d, 1**H**, *J* = 15.5 Hz, H_α), 7.56 (d, 1**H**, *J* = 8.6 Hz, H₆), 7.45 (ddd, 1**H**, *J* = 8.1, 7.1, 1.6 Hz, H₄⁻), 6.99 (dd, 1**H**, *J* = 8.1, 1.2 Hz, H₃⁻), 6.91 (ddd, 1**H**, *J* = 8.1, 7.1, 1.2 Hz, H₅⁻), 6.53 (dd, 1**H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅), 6.46 (d, 1**H**, *J* = 2.4 Hz, H₃), 3.91 (s, 3**H**, CH₃₍₄)), 3.85 (s, 3**H**, CH₃₍₂)). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ

194.5, 163.7, 163.7, 160.9, 141.5, 136.1, 131.7, 129.8, 120.5, 118.8, 118.7, 118.3, 117.1, 105.8, 98.7, 55.8, 55.7. **MS (ESI)** *m/z* 284.97 (M+H)⁺.

SYNTHESIS OF HEMITHIOINDIGO DERIVATIVES FROM NITROCHALCONE



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)benzo[*b*]thiophen-3(*2H*)-one (193). The crude product was prepared according to the general procedure J starting from (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(2'-nitrophenyl)prop-2-en-1-one **189** (200 mg, 0.64 mmol), which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 7:3) to afford **193** as a pure yellow solid (67%). C₁₇H₁₄O₃S. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.41 (s, **1H**, =CH), 7.95 (ddd, **1H**, *J* = 7.7, 1.3, 0.7 Hz, H₄), 7.74 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆), 7.55 (ddd, **1H**, *J* = 8.2, 7.0, 1.3 Hz, H₆), 7.50 (dd, **1H**, *J* = 7.8, 1.0 Hz, H₇), 7.30 (m, **1H**, H₅), 6.62 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅·), 6.49 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃·), 3.91 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.88 (s, **3H**, CH_{3'(2')}). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 188.5, 163.2, 161.0, 146.1, 134.7, 131.4, 131.2, 128.7, 127.6, 126.9, 125.3, 123.8, 116.8, 105.4, 98.4, 55.7, 55.6. HRMS **299.0731** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₅O₃S, 299.0736).



(Z)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-5-methoxybenzo[b]thiophen-3(2H)-one(195). The crude product was prepared according to the general procedure J starting

from (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(5'-methoxy-2'-nitrophenyl)prop-2-en-1-one **191** (1.00 g, 2.91 mmol), which was purified by flash chromatography on silica gel eluent (cyclohexane/EtOAc 9:1) to afford **195** as a pure yellow solid (59%). C₁₈H₁₆O₄S. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.38 (s, **1H**, =CH), 7.71 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆'), 7.40 (d, **1H**, *J* = 2.7 Hz, H₄), 7.35 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₇), 7.15 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.7 Hz, H₆), 6.59 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅'), 6.46 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.89 (s, **3H**, CH₃(₅)), 3.86 (s, **3H**, CH₃(₄')), 3.85 (s, **3H**, CH₃(_{2'})).¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 188.5, 163.2, 161.0, 158.2, 137.9, 132.2, 131.5, 128.9, 128.7, 124.5, 124.2, 116.8, 108.9, 105.4, 98.4, 55.8, 55.7, 55.6. HRMS **329.08452** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₈H₁₇O₄S, 329.08421).



(Z)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-7-methoxybenzo[b]thiophen-3(2H)-one

(196). The crude product was prepared according to the general procedure J starting from (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(3'-methoxy-2'-nitrophenyl)prop-2-en-1-one **192** (386 mg, 1.12 mmol), which precipitate in EtOAc to afford **196** as a pure yellow solid (96%). C₁₈H₁₇O₄S. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (s, **1H**, =CH), 7.72 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆), 7.47 (d, **1H**, *J* = 7.0 Hz, H₆), 7.37 (m, **2H**, H₅,H₄), 6.78 (dd, **1H**, *J* = 8.5, 2.5 Hz, H₅·), 6.72 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₃·), 3.96 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.93 (s, **3H**, CH_{3(2')}), 3.87 (s, **3H**, CH₃₍₇₎).¹³C **NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187.4, 165.1, 163.4, 161.0, 160,7 154.2, 131.5, 130.9, 128.0, 127.4, 126.5, 118.1, 116.3, 106.8, 98.6, 56.2, 56.1, 55.7. **HRMS 329.08410** *m/z* [M+H]+ (calc for C₁₈H₁₇O₄S, 329.08421).

AURONE SYNTHESIS BY ULTRASOUND COUPLING



(*Z*)-2-(2'-Fluorobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (98). The product was prepared according to the general procedure **K** starting benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 2-fluorobenzaldehyde (93 mg, 0.75 mmol) to afford **98** as a yellow solid (41%). C₁₅H₉FO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.26 (dd, **1H**, *J* = 7.7, 1.8 Hz, H₄), 7.86 – 7.79 (m, **2H**, H₆,H₆'), 7.59 – 7.50 (m, **2H**, H₅,H₇), 7.42 – 7.31 (m, **3H**, H_{3'},H_{4'},H_{5'}), 6.90 (s, **1H**, =CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.5, 165.6, 160.8 (d, *J* = 252.0 Hz), 147.2 (d, *J* = 2.3 Hz), 138.0, 132.3 (d, *J* = 8.8 Hz), 131.4, 125.2 (d, *J* = 3.5 Hz), 124.4 (d, *J* = 23.5 Hz), 120.6, 119.7, 119.6, 115.9 (d, *J* = 21.5 Hz), 113.3, 102.1 (d, *J* = 7.3 Hz). **GC-MS** 239.1.



(*Z*)-2-(3'-Fluorobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (99). The product was prepared according to the general procedure **K** starting benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 3-fluorobenzaldehyde (93 mg, 0.75 mmol) to afford **99** as a yellow solid (41%). C₁₅H₉FO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.86 – 7.78 (m, 4H, H₄, H₆', H₆, H₅), 7.62 – 7.52 (m, 2H, H₇, H_{3'}), 7.36 – 7.27 (m, 2H, H_{2'}, H_{4'}), 6.97 (s, 1H, =CH).¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.7, 165.6, 162.2 (d, *J* = 243.6 Hz), 146.8, 137.9, 134.2 (d, *J* = 8.5 Hz), 131.0 (d, *J* = 8.4 Hz), 127.6 (d, *J* = 2.8 Hz), 124.4, 124.2, 120.7, 117.3 (d, *J* = 22.5 Hz), 116.9 (d, *J* = 21.3 Hz), 113.4, 110.64 (d, *J* = 3.0 Hz). **GC-MS** 239.1.



(*Z*)-2-(4'-Fluorobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (100). The product was prepared according to the general procedure **K** starting benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (93 mg, 0.75 mmol) to afford **100** as a yellow solid (43%). C₁₅H₉FO₂. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.96 – 7.89 (m, 2H, H_{6'},H_{2'}), 7.81 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.5 Hz, H₄), 7.66 (ddd, 1H, *J* = 8.5, 7.3, 1.5 Hz, H₆), 7.33 (m, 1H, H₇), 7.23 (m, 1H, H₅), 7.18 – 7.11 (m, 2H, H_{5'},H_{3'}), 6.86 (s, 1H, =CH). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 184.7, 166.1, 163.4 (d, *J* = 252.4 Hz), 146.5, 136.9, 133.5 (d, *J* = 8.4 Hz), 128.6 (d, *J* = 3.3 Hz), 124.7, 123.6, 121.6, 116.1 (d, *J* = 21.9 Hz), 112.9, 111.8. HRMS 241.06571 *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₀FO₂, 241.06593).



(*Z*)-2-(2'-Bromobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (105). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 2-bromobenzaldehyde (139 mg, 0.75 mmol) to afford **105** as a pure yellow solid (41%). C₁₅H₉BrO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (dd, **1H**, *J* = 7.9, 1.7 Hz, H₄), 7.87 – 7.76 (m, **3H**, H₆,H_{3'},H_{5'}), 7.59 – 7.53 (m, **2H**, H₇,H_{6'}), 7.41 – 7.29 (m, **2H**, H₅,H_{4'}), 7.06 (s, **1H**, =CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 183.7, 165.7, 147.2, 138.1, 133.4, 132.0, 131.6, 131.1, 128.4, 125.6, 124.5, 124.3, 120.6, 113.3, 108.8. HRMS **300.98508** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₀BrO₂, 300.98587).



(*Z*)-2-(3'-Bromobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (106). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 3-bromobenzaldehyde (139 mg, 0.75 mmol) to afford **106** as a pure yellow solid (47%). C₁₅H₉BrO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.17 (s, **1H**, H_{2'}), 8.02 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.2 Hz, H₄), 7.87 – 7.76 (m, **2H**, H₆,H_{4'}), 7.65 (m, **1H**, H₇), 7.60 (d, **1H**, *J* = 8.3 Hz, H_{6'}), 7.55 (m, **1H**, H₅), 7.39 – 7.31 (m, **1H**, H_{5'}), 6.95 (s, **1H**, =CH).¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.7, 165.6, 146.9, 138.0, 134.4, 133.4, 132.6, 131.1, 130.2, 124.5, 124.2, 122.2, 120.7, 113.36, 110.4. **GC-MS** 301.9.



(*Z*)-2-(4'-Bromobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (107). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 4-bromobenzaldehyde (139 mg, 0.75 mmol) to afford **107** as a pale yellow solid (75%). C₁₅H₉BrO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.97 – 7.91 (m, 2H, H₆',H₂'), 7.82 – 7.80 (m, 2H, H₆,H₄), 7.75 – 7.68 (m, 2H, H₅',H₃'), 7.56 (m, 1H, H₇), 7.33 (td, 1H, *J* = 7.5, 0.8 Hz, H₅), 6.95 (s, 1H, =CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.6, 165.5, 146.6, 137.8, 133.1, 132.1, 131.2, 124.4, 124.1, 123.6, 120.8, 113.2, 110.9. GC-MS 301.9.



(*Z*)-2-(2'-Chlorobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (108). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 2-chlorobenzaldehyde (124,5 mg, 0.75 mmol) to afford **108** as a pure white solid (58%). C₁₅H₉ClO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (dd, **1H**, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H₄), 7.86 – 7.80 (m, **2H**, H₆,H₆'), 7.62 (dd, **1H**, *J* = 7.8, 1.5 Hz, H₅), 7.60 – 7.45 (m, **3H**, H_{3'},H_{5'},H₇), 7.35 (m, **1H**, H_{4'}), 7.09 (s, **1H**, =CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.7, 165.7, 147.3, 138.1, 134.5, 131.9, 131.5, 130.1, 129.4, 127.9, 124.6, 124.3, 120.6, 113.3, 105.9. **GC-MS** 256.



(*Z*)-2-(3'-Chlorobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (109). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 3-chlorobenzaldehyde (124,5 mg, 0.75 mmol) to afford **109** as a pure yellow solid (30%). C₁₅H₉ClO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.06 – 7.96 (m, 2H, H₄,H₆), 7.86 – 7.80 (m, 2H, H₄',H₆'), 7.63 – 7.51 (m, 3H, H₇,H₂',H₅'), 7.35 (ddd, **1H**, *J* = 7.5, 0.8 Hz, H₅), 6.97 (s, **1H**, =CH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.7, 165.6, 146.9, 138.0, 134.1, 133.7, 130.9, 130.5, 129.8, 129.7, 124.4, 124.2, 120.7, 113.4, 110.4. GC-MS 256.



(*Z*)-2-(4'-Chlorobenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (110). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 4-chlorobenzaldehyde (124,5 mg, 0.75 mmol) to afford **110** as a pure yellow solid (72%). C₁₅H₉ClO₂. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.02 (m, 2H, H₆',H₂'), 7.83 – 7.79 (m, 2H, H₆,H₅), 7.64 – 7.52 (m, 3H, H₇,H₅',H₃'), 7.35 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H₄), 6.98 (s,

1H, =CH). ¹³**C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.6, 165.5, 146.5, 137.8, 134.7, 132.9, 130.9, 129.1, 124.4, 124.1, 120.8, 113.3, 110.8. **GC-MS** 256.



(Z)-2-(4'-Hydroxy-2'-methoxybenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (111). The crude product was prepared according to the general procedure **K** starting from benzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.75 mmol) and 4-hydroxy-2-methoxybenzaldehyde (113 mg, 0.75 mmol) to afford **111** as a pure color solid (76%). C₁₆H₁₂O₄. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.10 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆'), 7.80 – 7.73 (m, **2H**, H₄,H₆), 7.56 – 7.51 (m, **1H**, H₇), 7.30 (m, **1H**, H₅), 7.18 (s, **1H**, =CH), 6.55 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H₅'), 6.50 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₃'), 3.86 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.8, 164.7, 162.5, 160.6, 144.5, 136.8, 132.9, 124.0, 123.6, 121.4, 113.1, 111.1, 109.0, 107.0, 99.2, 55.7. HRMS **269.08128** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₆H₁₃O₄, 269.08084).



(*E*)-2-(4'-Hydroxy-2'-methoxybenzylidene)-2,3-dihydro-(1*H*)-inden-1-one (115). The crude product was prepared according to general procedure **K** starting from 2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (100 mg, 0.76 mmol) and 4-hydroxy-2-methoxybenzaldehyde (115 mg, 0.76 mmol) to afford **115** as a pure orange solid (76%). C₁₇H₁₄O₃. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 7.88 (m, **1H**, H₄), 7.75 (d, **1H**, *J* = 7.7 Hz, H₆), 7.71 – 7.63 (m, **3H**, =CH,H₆,H₇), 7.46 (ddd, **1H**, *J* = 8.1, 6.7, 1.6 Hz, H₅), 6.54 – 6.50 (m **2H**, H₃',H₅'), 4.02 (s, **2H**, CH₂(2a)), 3.85 (s, **3H**, CH₃(2')). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.2, 161.3, 160.6, 149.8, 137.7, 134.3, 131.1, 130.8, 127.5, 127.2, 126.5, 123.34, 114.7, 108.2, 99.2, 55.6, 32.0. HRMS **267.10141** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₅O₃, 267.10157).

SYNTHESIS OF AURONE VIA BASIC ALDOLIC CONDENSATION



(Z)-2-(4'-(Dimethylamino)benzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (97). The crude product was prepared according to general procedure L starting from benzofuran-3(2H)-one (54 mg, 0.36 mmol) and 4-(dimethylamino)benzaldehyde (55 mg, 0.36 mmol). The mixture was extracted with EtOAc (5 × 20 mL). The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 10:0.1) to afford **97** as pure red solid (40%). C₁₇H₁₅NO₃. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.79 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H₆',H₂'), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 6.84 – 6.75 (m, 3H, H₅',H₃',H₅), 6.75 – 6.65 (m, 2H, =CH,H₇), 3.01 (s, 6H, -NMe₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 180.7, 167.0, 165.8, 151.0, 145.0, 132.9, 125.4, 119.1, 113.5, 112.7, 112.5, 112.0, 98.4, 39.60. HRMS 282.11141 *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₆NO₃, 282.11247).



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)indolin-3-one (167). The crude product was prepared according to the general procedure L starting from the corresponding indoline-3-one 166 (50 mg, 0.29 mmol) and 2,4-dimethoxybenzaldehyde (47,4 mg, 0.29 mmol) to afford 167 as pure red solid. C₁₇H₁₅NO₃. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.73 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₆'), 7.56 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₄), 7.49 (m, 1H, H₆), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₇), 6.93 (s, 1H, =CH), 6.89 (m, 1H, H₅), 6.69 – 6,65 (m, 2H, H₅',H₃'), 3.89 (s, 3H, CH_{3(4'})), 3.84 (s, 3H, CH_{3(2'})). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 185.9, 161.5, 159.6, 153.9, 136.0, 133.2, 130.7, 232 124.1, 120.5, 119.5, 115.6, 112.7, 106.2, 105.0, 98.6, 56.0, 55.7. **HRMS 282.11233** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₆NO₃, 282.11247).



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)indolin-3-one (170). The crude product was prepared according to the general procedure L starting from the corresponding indoline-3-one 169 (872 mg, 4.3 mmol) and 2,4-dimethoxybenzaldehyde (706 mg, 4.3 mmol) to afford 170 as pure red solid (28%). C₁₈H₁₇NO₄. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.65 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H₆), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 6.90 (s, 1H, =CH), 6.56 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.4 Hz, H₅), 6.51 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H₄), 6.46 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.1 Hz, H₃'), 6.37 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₅'), 3.91 (s, 3H, CH₃₍₆₎), 3.85 (s, 3H, CH_{3(4'})), 3.84 (s, 3H, CH_{3(2'})).¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 181.7, 166.6, 161.7, 158.6, 154.8, 134.84, 132.5, 126.6, 117.0, 115.6, 108.3, 107.6, 105.9, 99.6, 95.4, 56.2, 55.7, 55.6. HRMS 312.12261 *m/z* [M+H]+ (calc for C₁₈H₁₈O₄N, 312.12303).



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-3-oxo-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophene-7-carboxylic acid (200). The crude product was prepared according to the general procedure L starting from the 3-oxo-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophene-7-carboxylic acid 203 (500 mg, 2.57 mmol) and 2,4-dimethoxybenzaldehyde (428 mg, 2.57 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford 200 as a pure orange solid (11%). C₁₈H₁₄O₅S. ¹H NMR (400 MHz,-DMSO-*d*₆) δ 8.29 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.4 Hz, H₆), 8.18 (s, 1H, =CH), 8.01 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.4 Hz, H₄), 7.79 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H₆'), 7.48 (m, 1H, H₅), 6.84 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅'), 6.73 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.95 (s, 3H, CH_{3(4')}), 3.89 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C **NMR** (101 MHz,-DMSO-*d*₆) δ 187.6, 172.9, 163.3, 160.7, 146.7, 138.3, 136.4, 131.6, 130.9, 129.0, 128.9, 127.5, 125.7, 115.5, 106.7, 98.6, 56.1, 55.7. **HRMS 341.04891** *m/z* [M-H]⁻ (calc for C₁₈H₁₃O₅S, 341.04892).



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)benzofuran-3(*2H*)-one (207). The crude product was prepared according to the general procedure L starting from 7-methoxybenzofuran-3(*2H*)-one (1.00 g, 6.1 mmol) and 2,4-dimethoxybenzaldehyde (1.00 g, 6.09 mmol) to afford **207** as pure yellow solid (40%). C₁₈H₁₆O₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.14 (d, **1H**, *J* = 8.8 Hz, H₆'), 7.42 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.2 Hz, H₄), 7.31 (dd, **1H**, *J* = 7.7, 1.2 Hz, H₆), 7.22 (t, **1H**, *J* = 7.8 Hz, H₅), 7.17 (s, **1H**, =CH), 6.77 (dd, **1H**, *J* = 8.8, 2.4 Hz, H₅'), 6.68 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.98 (s, **3H**, CH₃₍₇₎), 3.91 (s, **3H**, CH_{3(4'})), 3.86 (s, **3H**, CH_{3(2'})).¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.1, 163.0, 160.3, 154.4, 145.6, 145.0, 132.5, 124.4, 122.6, 119.0, 114.98, 112.9, 107.0, 106.7, 98.3, 56.3, 56.1, 55.6. HRMS **313.10732** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₈H₁₇O₅, **313.10705**).



(Z)-2-(4'-Fluorobenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (235). The crude product was prepared according to the general procedure **M** starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (100 mg, 0.60 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (74 mg, 0.60 mmol) and was concentrated under reduced pressure then water was added and few drops of HCl 6N until full precipitation. The precipitate was filtered, washed with hot water to afford **235** as pure yellow solid (95%). C₁₅H₉FO₄. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.00 (s, **1H**, -OH₄) 10.94 (s, **1H**, -OH₆), 7.95 (dd, **2H**, *J* = 8.5, 5.5 Hz, H_{6'},H_{2'}), 7.31 (dd, **2H**, 234

 $J = 8.5, 5.5 \text{ Hz}, \text{H}_5, \text{H}_3$), 6.63 (s, **1H**, =CH), 6.22 (s, **1H**, H₇), 6.08 (s, **1H**, H₅) ¹³**C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.0, 167.8, 167.5, 162.3 (d, J = 248.3 Hz), 158.5, 147.5, 132.9 (d, J = 8.4 Hz), 129.1 (d, J = 3.1 Hz), 116.0 (d, J = 21.7 Hz), 107.1, 102.5, 97.9, 90.7. **HRMS 273.05609** m/z [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₀F₄, 273.05576).



(*Z*)-2-Benzylidene-6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (245). The crude product was prepared according to the general procedure **L** starting from the corresponding 6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (100 mg, 0.66 mmol) and benzaldehyde (70 mg, 0.66 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 7:3) to afford **245** as pure yellow solid (71%). C₁₅H₁₀O₃. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.98 – 7.92 (m, 2H, H₂',H₆'), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H₄), 7.53 – 7.41 (m, 3H, H₃',H₄',H₅'), 6.81 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₇), 6.79 (s, 1H, =CH), 6.73 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H₅). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.5, 168.0, 166.6, 147.4, 132.1, 131.1, 129.6, 129.0, 126.0, 113.1, 112.8, 110.3, 98.7. HRMS 239.0703 *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₅H₁₁O₃, 239.0704).



(*Z*)-2-(4'-(Benzyloxy)-3'-methoxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (246). The crude product was prepared according to the general procedure L starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (100 mg, 0.66 mmol) and 4-(benzyloxy)-3methoxybenzaldehyde (160 mg, 0.66 mmol) and was recrystallized from cyclohexane to

afford **246** as a pure yellow solid (25%). C₂₃H₁₈O₅. ¹**H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.83 (s, **1H**, H₂'), 7.54 – 7.27 (m, **7H**, H₂",H ₃",H₄",H ₆,H₆'), 6.93 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H₇), 6.80 – 6.73 (m, **2H**, =CH,H₅'), 6.60 (d, **1H**, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.22 (s, **2H**, OCH₂*Ph*), 3.96 (s, **3H**, CH_{3(3')}). ¹³**C NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 185.4, 164.7, 156.7, 150.3, 149.7, 145.7, 138.9, 136.5, 128.7, 128.1, 127.3, 126.0, 125.4, 114.5, 113.8, 113.6, 109.8, 109.8, 103.6, 70.9, 56.2. **HRMS 373.1071** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₂₃H₁₇O₅, 373.1081).



(*Z*)-2-(4'-(Benzyloxy)-3'-methoxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (248). The crude product was prepared according to general procedure L starting from the corresponding 6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (100 mg, 0.66 mmol) and (benzyloxy)-3-methoxybenzaldehyde (160 mg, 0.66 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent cyclohexane/EtOAc 7:3) to afford **248** as pure yellow solid. C₂₃H₁₈O₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.63 – 7.53 (m, 3H, H₂',H₆',H₄''), 7.48 – 7.44 (m, 2H, H₃''), 7.42 – 7.38 (m, 2H, H₂''), 7.38 – 7.33 (m, 1H, H₅'), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H4), 6.80 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H7), 6.76 (s, 1H, =CH), 6.71 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H₅), 5.17 (s, 2H, OCH₂*Ph*), 3.84 (s, 3H, CH_{3(3'})). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.2, 167.6, 166.3, 149.3, 149.1, 146.3, 136.7, 128.5, 128.0, 127.9, 125.8, 125.1, 124.9, 114.6, 113.6, 113.0, 112.9, 111.1, 98.6, 69.8, 55.6. HRMS 375.1228 *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₂₃H₁₉O₅, 375.1227).



236

(*Z*)-4,6-Dihydroxy-2-(3'-hydroxybenzylidene)benzofuran-3(*2H*)-one (249). The crude product was prepared according to the general procedure **M** starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (100 mg, 0.60 mmol) and 3-hydroxybenzaldehyde (73 mg, 0.60 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **249** as a pure yellow solid (11%). C₁₅H₁₀O₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ δ 10.96 (s, **2H**, -OH_{4,6}), 9.63 (s, **1H**, -OH₃'), 7.37 – 7.24 (m, **3H**, H₂'H₅',H₆'), 6.80 (m, **1H**, H₄'), 6.51 (s, **1H**, =CH), 6.21 (d, **1H**, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.09 (d, **1H**, *J* = 1.7 Hz, H₅). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.0, 167.8, 167.5, 158.5, 157.5, 147.6, 133.4, 129.8, 122.0, 116.9, 116.6, 108.4, 102.5, 97.8, 90.5. HRMS **269.04490** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₉O₅, 269.04555).



(*Z*)-2-(3'-Methoxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (250). The crude product was prepared according to the general procedure **M** starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one and 3-methoxybenzaldehyde and was purified by column chromatography on silica gel (eluent $CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1) to afford **250** as a pure yellow solid (11%). C₁₆H₁₂O₅. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.42 – 7.36 (m, **2H**, H_{2'},H_{6'}), 7.30 (m, **1H**, H_{5'}), 6.90 (m, **1H**, H_{4'}), 6.58 (s, **1H**, =CH), 6.19 (s, **1H**, H₇), 6.02 (s, **1H**, H₅), 3.82 (s, **3H**, CH_{3(3')}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 182.7, 170.0, 169.8, 161.3, 160.1, 149.7, 135.1, 130.8, 124.7, 117.05, 116.3, 111.1, 104.4, 98.8, 91.9, 55.8. HRMS **285.0761** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₆H₁₃O₅, 285.0757).



237

(*Z*)-2-(4'-(Benzyloxy)benzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (251). The crude product was prepared according to general procedure **M** starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (50 mg, 0.30 mmol) and 4-(benzyloxy)benzaldehyde (64 mg, 0.30 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **251** as a pure yellow solid (25%). C₂₂H₁₆O₅. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.84 (m, **2H**, H_{2',6'}), 7.45 (m, **2H**, H_{2''}), 7.39 (m, **2H**, H_{3''}), 7.31 (m, **1H**, H_{4''}), 7.08 (m, **2H**, H_{3'},H_{5'}), 6.64 (s, **1H**, =CH), 6.21 (d, **1H**, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.03 (d, **1H**, *J* = 1.7 Hz, H₅), 5.15 (s, **2H**, OCH₂*Ph*). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.0, 167.6, 167.2, 159.1, 158.2, 146.5, 136.7, 132.4, 128.5, 128.0, 127.8, 125.1, 115.3, 108.3, 102.7, 97.7, 90.5, 69.3. HRMS **359.0915** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₂₂H₁₅O₅, 359.0925).



(Z)-2-(3',4'-dimethoxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (252). The crude product was prepared according to the general procedure **M** starting from 4hydroxybenzofuran-3(2H)-one (50 mg, 0.30 mmol) and 4-(benzyloxy)-3methoxybenzaldehyde (50 mg, 0.30 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **252** as a pure yellow solid. C₁₇H₁₄O₆. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.93 (s, 1H, -OH₄'), 10.87 (s, 1H, -OH₃'), 7.50 (m, 2H, H₂', H₆'), 7.06 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H₅'), 6.58 (s, 1H, =CH), 6.22 (d, 1H, J = 1.7 Hz, H₇), 6.07 (d, 1H, J = 1.7 Hz, H₅), 3.81 (s, 6H, CH_{3(3',4')}). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.1, 167.7, 167.2, 158.3, 150.0, 148.8, 146.6, 125.1, 124.5, 114.0, 112.0, 109.0, 102.8, 97.8, 90.6, 55.6, 55.5. HRMS 315.0865 *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₅O₆, 373.0863).



238

(*Z*)-2-(4'-(*Tert*-butyl)benzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (253). The crude product was prepared according to the general procedure **M** starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (100 mg, 0.60 mmol) and 4-(*tert*-butyl)benzaldehyde (82 mg, 0.60 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **253** as a pure yellow solid (20%). C₁₉H₁₈O₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.81 (d, **2H**, *J* = 8.0 Hz, H_{2',6'}), 7.49 (d, **2H**, *J* = 8.0 Hz, H_{3',5'}), 6.65 (s, **1H**, =CH), 6.23 (s, **1H**, H₇), 6.04 (s, **1H**, H₅), 1.35 (s, **3H**, CH_{3(butyl)}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 182.8, 169.9, 169.7, 160.1, 154.1, 149.3, 132.0, 131.1, 126.8, 111.4, 104.5, 98.7, 91.9, 35.7, 31.6. HRMS **309.11211** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₉H₁₇O₄, 309.11323).



(*Z*)-4,6-Dihydroxy-2-(4'-isopropylbenzylidene)benzofuran-3(*2H*)-one (254). The crude product was prepared according to the general procedure **M** starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (100 mg, 0.60 mmol) and 4-isopropylbenzaldehyde (90 mg, 0.60 mmol) and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **254** as a pure yellow solid (10%). C₁₈H₁₆O₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.16 (d, **2H**, *J* = 8.0 Hz, H₂',H₆'), 7.68 (d, **2H**, *J* = 8.0 Hz, H₃',H₅'), 7.02 (s, =**1H**, CH), 6.60 (d, **1H**, *J* = 1.3 Hz, H₇), 6.42 (d, **1H**, = 1.3 Hz, H₅), 3.31 (hept, **1H**, *J* = 7.0 Hz, CH_(propyl)), 1.66 (s, **6H**, CH_{3(propyl)}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 182.8, 169.9, 169.7, 160.1, 152.0, 149.2, 132.3, 131.5, 128.0, 111.5, 104.5, 98.7, 91.9, 35.4, 24.2. HRMS **295.09650** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₈H₁₅O₄, 295.09758).

SYNTHESIS OF AURONE BY CYCLISATION WITH Hg(OAc)2



(Z)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-6-(dimethylamino)-4-methoxybenzofuran-

3(2*H***)-one.** The crude product was prepared according to the general procedure **N** starting from (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(4'-(dimethylamino)-2'-hydroxy-6'-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one **152** (63 mg, 0.18 mmol), which was precipitate from EtOAc to afford the product as a pure yellow solid (90%). C₂₀H₂₁NO₅. ¹**H** NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.17 (d, **1H**, *J* = 8.8 Hz, H6'), 7.13 (s, **1H**, =CH), 6.55 (dd, **1H**, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H5'), 6.43 (d, **1H**, *J* = 2.5 Hz, H3'), 5.99 (d, **1H**, *J* = 1.9 Hz, H5), 5.71 (d, **1H**, *J* = 1.9 Hz, H7), 3.93 (s, **3H**, CH_{3(4')}), 3.85 (s, **3H**, CH_{3(2')}), 3.83 (s, **3H**, CH₃₍₄₎), 3.07 (s, **6H**, -NMe₂).¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 179.6, 168.6, 161.8, 159.9, 159.5, 158.0, 148.0, 132.6, 115.4, 105.5, 103.2, 101.8, 98.1, 89.3, 86.9, 56.0, 55.7, 55.6, 40.7. HRMS **356.14852** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₂₀H₂₂NO₅, 356.14925).



(*Z*)-2-(2',4'-Dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-6-morpholinobenzofuran-3(*2H*)on -e. The crude product was prepared according to the general procedure N starting from (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(2'-hydroxy-6'-methoxy-4'-morpholinophenyl)prop-2en-1-one **153** (244.9 mg, 0.61 mmol), which was precipitate from EtOAc to afford the product as a pure yellow solid (57%). C₂₂H₂₃NO₆. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.05 (d, **1**H, *J* = 8.5 Hz, H₆'), 6.81 (s, **1**H, =CH), 6.66 – 6.62 (m, **2**H, H₃',H₅'), 6.48 (s, **1**H, H₅), 6.20 (s, **1**H, H₇), 3.87 (s, **3**H, CH_{3(4'})), 3.86 (s, **3**H, CH_{3(2'})), 3.82 (s, **3**H, CH₃₍₄₎), 3.71 (t, **4**H, *J* = 4.9 Hz, H_{6b}), 3.60 (t, **4H**, *J* = 4.9 Hz, H_{6a}), ¹³**C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.0, 168.1, 162.0, 159.5, 159.1, 158.9, 147.0, 131.8, 113.7, 106.6, 101.8, 101.6, 98.3, 91.5, 88.6, 65.9, 56.0, 56.0, 55.7, 47.2. **HRMS 398.15957** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₂₂H₂₄NO₆, 398.15981).

SYNTHESIS OF DERIVATIVES VIA DEPROTECTION OF METHOXY ANALOGUES



(Z)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-6-(dimethylamino)benzofuran-3(2*H*)-one (65). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-6-morpholinobenzofuran-3(2*H*)-one isolated from the chalcone (301 mg, 0.92 mmol) cyclization *via* the general procedure **F**. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 95:5), then washed with acetone to afford **65** as a pure dark black solid (6%). C₁₇H₁₅NO4. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.17 (s, -1H, OH_(2')), 9.91 (s, 1H, -OH_(4')), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_{6'}), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H₇), 6.93 (s, 1H, =CH), 6.64 – 6.55 (m, 2H, H₄, H₅), 6.42 – 6.34 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 3.09 (s, 6H, -NMe₂).¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 180.1, 167.4, 160.3, 158.6, 156.5, 146.0, 132.1, 124.9, 111.0, 109.5, 108.6, 108.0, 104.0, 102.3, 92.7, 40.2. HRMS 298.00749 *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₆NO₄, 298.10738).



(Z)-6-Amino-2-(2',4'-dihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (66). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (Z)-6-amino-2-

(2',4'-dimethoxybenzylidene)benzofuran-3*(2H)*-one isolated from the chalcone (593 mg, 1.98 mmol) cyclization *via* the general procedure **F**. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 95:5) and washed with acetone to afford **66** as a pure brown solid (23%). C₁₅H₁₁NO₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.05 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆'), 7.45 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₄), 7.22 (s, **1H**, =CH), 6.48 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, **1H**, H₅), 6.43 – 6.38 (m, **2H**, H₇,H₅'), 6.34 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 183.5, 170.2, 162.1, 160.5, 159.8, 147.9, 134.0, 126.8, 113.2, 112.5, 111.7, 109.1, 107.8, 103.1, 94.9. HRMS **270.07611** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₂NO₄, 270.07608).



(*Z*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-6-(dimethylamino)-4-hydroxybenzofuran-3(2 *H*)-one (67). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from *((Z)*-2-(2,4-dimethoxybenzylidene)-6-(dimethylamino)benzofuran-3(*2H*)one (754 mg, 2.12 mmol), which was precipitate in EtOAc to afford **67** as a pure brown solid (31%). C₁₇H₁₅NO₅. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.43 (s, -**1H**, -OH₂'), 10.09 (s, **1H**, -OH₄'), 9.83 (s, **1H**, -OH₄), 7.90 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₆'), 6.78 (s, **1H**, =CH), 6.43 – 6.30 (m, **2H**, H_{3'},H_{5'}), 6.12 (d, **1H**, *J* = 1.9 Hz, H₅), 5.83 (d, **1H**, *J* = 1.9 Hz, H₇), 3.02 (s, **6H**, -NMe₂).^{**1**3}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.1, 167.4, 159.8, 158.2, 157.5, 157.3, 146.2, 131.8, 111.2, 107.9, 102.4, 102.1, 100.1, 92.8, 85.9, 40.1. **HRMS 314.10259** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₇H₁₆NO₅, 314.10230).



(Z)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-4-hydroxy-6-morpholinobenzofuran-3(2H)-

one (68). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-6-morpholinobenzofuran-3(2*H*)one (395 mg, 0.99 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 8:2) to afford **68** as a pure dark red solid (48%). C₁₉H₁₇NO₆. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.03 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H_{6'}), 7.11 (s, **1H**, =CH), 6.39 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.3 Hz, H_{5'}), 6.33 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H_{3'}), 6.11 (s, **1H**, H₇), 5.86 (s, **1H**, H₅), 3.77 (m, **4H**, H_{6b}). 3.57 (m, **4H**, H_{6a}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 211.6, 182.0, 169.3, 161.7, 160.1, 148.0, 133.9, 113.3, 109.0, 106.5, 103.1, 87.4 60.3, 56.0, 54.9, 29.6, 28.3. HRMS **354.09791** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₉H₁₆NO₆, 354.09831).



(*Z*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-4,6-difluorobenzofuran-3(2*H*)-one (71). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-4,6-difluorobenzofuran-3(2*H*)-one (64 mg, 0.2 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **71** as a pure yellow solid (90%). C₁₅H₈F₂O₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d4*) δ 8.05 (d, **1H**, *J* = 8.8 Hz, H₆'), 7.42 (s, **1H**, =CH), 7.08 (m, **1H**, H₇), 6.81 (m, **1H**, H₅), 6.41 (dd, **1H**, *J* = 8.8, 2.4 Hz, H₅'), 6.34 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d4*) δ 180.5, 173.02, 171.3 (d, *J* = 13.7 Hz), 168.7 (d, *J* = 12.9 Hz), 167.8 (d, *J* = 17.2 Hz), 163.6, 161.7, 146.1, 134.6, 112.3, 111.5, 109.6, 103.1, 100.3 (dd, *J* = 28.3, 23.7 Hz), 98.3 (dd, *J* = 27.3, 4.6 Hz). HRMS 289.0309 *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₇F₂O₄, 289.0307).



(*E*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (72). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*E*)-2-(2',4'dimethoxybenzylidene)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (200 mg, 0.71), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **72** as a pure red solid (20%). C₁₆H₁₂O₃. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 8.15 (t, **1H**, *J* = 2.0 Hz, =CH), 7.79 (d, **1H**, *J* = 7.7 Hz, H₇), 7.66 – 7.59 (m, **3H**, H_{6'},H₆,H₄), 7.42 (m, **1H**, H₅), 6.43 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅'), 6.37 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 3.98 (d, **2H**, *J* = 2.0 Hz, CH₂(2a)). δ ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 197.2, 163.0, 161.7, 151.9, 139.8, 135.9, 132.7, 131.6, 131.5, 128.9, 127.7, 125.0, 116.1, 109.4, 103.8, 33.8. HRMS **251.0708** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₆H₁₁NO₃, 251.0714).



(*E*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-3-methyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (73). The cru-de product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*E*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-3-methyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one (129 mg, 0.44 mmol), which was used without further purification to afford **73** as a dark yellow oil (96%). C₁₇H₁₄O₃. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 8.07 (d, **1H**, *J* = 1.8 Hz, =CH), 7.78 (m, **1H**, H₇), 7.66 – 7.59 (m, **2H**, H₄,H₆), 7.52 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆'), 7.41 (m, **1H**, H₅), 6.44 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅'), 6.38 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 4.34 (m, **1H**, H₃), 1.35 (m, **3H**, CH₃₍₃₎). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 196.5, 162.5, 161.2, 157.8, 138.2, 137.6, 135.9, 133.2, 131.6, 128.7, 126.3, 124.5, 114.8, 108.9, 103.4, 38.1, 19.0. HRMS **267.10136** *m*/*z* [M+H]+ (calc for C₁₇H₁₅O₃, 267.10157.10157).



2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-1*H***-indene-1,3(2***H***)-dione (74).** The crude product was prepared according to general procedure **0** starting from 2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (25 mg, 13 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent DCM/EtOAc 7:3) to afford **74** as a pure red solid (15%). C₁₆H₁₀O₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 9.12 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆'), 8.29 (s, **1H**, =CH), 7.90 – 7.88 (m, **4H**, H₄,H₅,H₆,H₇), 6.46 – 6.39 (m, **2H**, H_{3'},H_{5'}). ¹³**C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 190.6, 189.3, 166.1, 163.4, 141.5, 140.2, 139.1, 135.9, 135.2, 135.0, 122.5, 122.4, 122.4, 113.1, 108.7, 101.9. **HRMS 265.05060** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₆H₉O₄, 265.04954).



2-(2',4'-Dihydroxybenzyl)isoindoline-1,3-dione (75). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from 2-(2',4'-dimethoxybenzyl)-isoindoline-1,3-dione (84 mg, 0.28 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 96:4 then full MeOH) to afford **75** as a white solid (50%). C₁₅H₁₁NO4. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 7.85 – 7.65 (m, 4H, H₇,H₆,H₅,H₄), 6.91 (d, **1H**, *J* = 8.3 Hz, H₆), 6.29 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₅⁻), 6.22 (dd, **1H**, *J* = 8.3, 2.4 Hz, H₃⁻), 4.72 (s, **2H**, CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 169.9, 159.1, 157.2, 135.3, 133.3, 131.0, 124.09, 115.1, 107.6, 103.7, 37.5. HRMS **292.0576** *m*/*z* [M+Na]⁺ (calc for C₁₅H₁₁O₄NNa, 292.0580).



(*Z*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)indolin-3-one (77). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'- dimethoxybenzylidene)indolin-3-one (42 mg, 0.15 mmol), which was purified by column 245

chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **77** as a pure red solid (20%). C₁₅H₁₁NO₃ ¹**H** NMR (400 MHz, Methanol-*d4*) δ 7.62 (d, **1H**, *J* = 7.7 Hz, H₄), 7.53 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆), 7.49-7.44 (m, **1H**, H₆), 7.21 (s, **1H**, =CH), 7.10 (d, **1H**, *J* = 8.2 Hz, H₇), 6.89 (m, **1H**, H₅), 6.44 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅), 6.38 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃).¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d4*) δ 188.6, 161.8, 159.8, 155.0, 137.0, 134.1, 133.1, 125.1, 122.1, 120.4, 114.9, 113.5, 111.7, 109.2, 103.6. **HRMS 254.0808** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₂NO₃, 254.0812).



(*Z*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)benzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (80). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)benzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (2.00 g, 5.3 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **80** as a pure dark orange solid (14%). C₁₅H₁₀O₃S. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 8.25 (s, **1H**, =CH), 7.84 (dd, **1H**, *J* = 7.8, 1.3 Hz, H₄), 7.77 (d, **1H**, *J* = 7.8 Hz, H₆·), 7.68 (m, **1H**, H₆), 7.52 (m, **1H**, H₇), 7.40 (m, **1H**, H₅), 6.47 – 6.43 (m, **2H**, *J* = 7.4 Hz, H₃',H₅·). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 190.2, 163.6, 162.0, 147.6, 136.1, 132.6, 132.3, 131.5, 127.4, 126.5, 126.2, 125.1, 115.0, 109.3, 103.5. HRMS **269.02802** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₉O₃S, 269.02669).



(*Z*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-6-hydroxyindolin-3-one (84). The crude product was prepared according to the general procedure N starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-6-methoxyindolin-3-one (367 mg, 1.2 mmol). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford 246

77 as a pure red solid (43%). C₁₅H₁₁NO₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.50 – 7.46 (m, **2H**, H₆',H₄), 7.07 (s, **1H**, =CH), 6.44 – 6.40 (m, **2H**, H₅,H₇), 6.38 – 6.34 (m, **2H**, H₅',H₃'). ¹³**C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 186.6, 167.1, 161.4, 159.4, 157.7, 135.0, 132.9, 127.2, 115.0, 114.9, 110.5, 110.3 109.1, 103.6, 98.3. **HRMS 270.07596** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₂NO₄, 270.07608).



(*Z*)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-7-hydroxybenzo[*b*]thiophen-3(*2H*)-one (85). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-7-methoxybenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (368 mg, 1.12 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 96:4) to afford **85** as a dark orange solid (32%). C₁₅H₁₀O₄S. ¹H NMR (400 MHz, Methanold4) δ 8.44 (s, **1H**, =CH), 7.68 (dd, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆), 7.39 (dt, **1H**, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H₆), 7.17 (td, **1H**, *J* = 7.7, 1.4 Hz, H₅), 7.02 (dt, **1H**, *J* = 7.9, 1.3 Hz, H₄), 6.47 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅'), 6.38 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H_{3'}). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 191.0, 163.6, 162.0, 154.1, 134.5, 134.0, 132.6, 131.5, 127.7, 127.0, 120.5, 118.3, 115.1, 109.3, 103.4. HRMS **285.02241** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₉O₄S, 285.02270).



(Z)-2-(2',4'-Dihydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (86). The cru- de product was prepared according to the general procedure **O** starting from (Z)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-6-methoxybenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (348 mg, 1.1 mmol), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **86** as a dark red solid (11%). C₁₅H₁₀O₄S. ¹**H** NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.34 (s, **1H**, =CH), 7.73 (d, **1H**, *J* = 8.5 Hz, H₄), 7.56 (d, **1H**, *J* = 8.6 Hz, H₆), 6.92 (d, **1H**, *J* = 247 2.1 Hz, H₇), 6.74 (dd, **1H**, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H₅), 6.43 (dd, **1H**, *J* = 8.6, 2.4 Hz, H₅[,]), 6.37 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃[,]). ¹³**C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 189.0, 165.9, 163.1, 161.6, 150.6, 132.4, 130.0, 129.4, 127.1, 124.6, 115.4, 115.0, 110.5, 109.1, 103.5. **HRMS 287.03687** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₁O₄S, 287.03726).



(*Z*)-2-(2',4'-dihydroxybenzylidene)-5-hydroxybenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (87). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-5-methoxybenzo[*b*]thiophen-3(2*H*)-one (293 mg, 0.89 mmol) which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 96:4) to afford **87** as a pure dark orange solid (10%). $C_{15}H_{10}O_4S$. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 8.41 (s, 1H, =CH), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H₆·), 7.40 (dd, 1H, *J* = 8.5, 0.5 Hz, H₇), 7.25 (dd, 1H, *J* = 2.6, 0.5 Hz, H₄), 7.12 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.6 Hz, H₆), 6.44 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.6 Hz, H₅·), 6.37 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, H₃·). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 190.5, 163.6, 162.1, 157.4, 137.8, 133.6, 132.7, 131.3, 127.6, 125.9, 125.2, 115.2, 112.6, 109.4, 103.6. HRMS 285.02229 *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₁₉O4S, 285.02270).



(*Z*)-2-(2',4'-dihydroxybenzylidene)-3-oxo-2,3-dihydrobenzo[*b*]thiophene-7-carboxylic acid (88). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (3-amino-7-methoxybenzofuran-2-yl)(2',4'-dimethoxyphenyl)methanone (342 mg, 0.27 mmol). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 80:10) and washed with acetone to afford **88** as a pure yellow solid (72%). C₁₆H₁₀O₅S. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.44 (s, **1H**, =CH), 8.31 248 (dd, **1H**, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H₆), 8.02 (dd, **1H**, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H₄), 7.76 (d, **1H**, *J* = 8.7 Hz, H₆), 7.43 (m, **1H**, H₅), 6.46 (dd, **1H**, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅), 6.39 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃).¹³**C NMR** (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 190.4, 170.6, 163.7, 162.2, 149.4, 137.6 (2C) 133.9, 133.0, 131.9, 130.3, 128.3, 126.1, 115.2, 109.3, 103.5. **HRMS 313.01744** *m/z* [M-H]⁻ (calc for C₁₆H₉O₅S, 313.01762).



(*E*)-3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-(2'-hydroxyphenyl)prop-2-enone (89). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*E*)-3-(2',4'-dimethoxyphenyl)-1-(2'-hydroxyphenyl)prop-2-enone (210 mg, 0.74), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 99:1) to afford **89** as a pure yellow solid (39%). C₁₅H₁₂O₄. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 8.18 (d, **1H**, *J* = 15.4 Hz, H_β), 8.04 (dd, **1H**, *J* = 8.1, 1.7 Hz, H₆·), 7.81 (d, **1H**, *J* = 15.4 Hz, H_α), 7.55 (d, **1H**, *J* = 8.4 Hz, H₆), 7.48 (ddd, **1H**, *J* = 8.6, 7.2, 1.7 Hz, H₄·), 7.00 – 6.91 (m, **2H**, H₃·,H₅·), 6.38 (dd, **1H**, *J* = 8.4, 2.3 Hz, H₅), 6.36 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₃). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*4) δ 196.0, 164.4, 163.3, 161.2, 143.7, 136.8, 132.8, 131.0, 121.7, 120.0, 119.0, 117.3, 115.5, 109.3, 103.6. HRMS **255.0657** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₁O₄, 255.0652).



2-(2',4'-Dihydroxyphenyl)-4*H***-chromen-4-one (90).** The crude product was prepared according to the general procedure **0** starting from 2-(2,4-dimethoxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one (128 mg, 0.45 mmol), and was washed three times with water and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 98:2) to afford **90** as a pure yellow solid (25%). C₁₅H₁₀O₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 8.11 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.6 Hz, H₅), 7.86 (d, **1H**, *J* = 8.8 Hz, H₆'), 7.77 (m, **1H**, H₇), 7.66 (dd, **1H**, *J* = 8.5, 1.1 Hz, H₈), 7.45 (m, **1H**, H₆), 7.35 (s, **1H**, H₃), 6.48 (dd, **1H**, *J* = 2.3 Hz, H₅'), 6.44 (d, **1H**, *J* = 2.3 Hz, 249

H_{3'}).¹³**C NMR** (101 MHz, Methanol-*d4*) δ 181.5, 164.8, 163.7, 160.8, 158.1, 135.5, 131.5, 126.5, 126.3, 124.6, 119.5, 111.2, 110.5, 109.5, 104.5. **HRMS 255.0649** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₀O₄, 255.0652)



4-((7-hydroxybenzofuran-2-yl)methyl)benzene-1,3-diol (91). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from 2-(2',4'-dimethoxybenzyl)-7-methoxybenzofuran (441 mg, 1.48 mmol). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 97:3) to afford **91** as a pale yellow oil (38%). C₁₅H₁₂O₄. ¹**H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 6.95 – 6.90 (m, **3H**, H₆,H₄,H₆'), 6.64 (dd, **1H**, *J* = 7.1, 1.8 Hz, H₅), 6.38 (d, **1H**, *J* = 2.5 Hz, H₃'), 6.29 (dd, **1H**, *J* = 8.2, 2.5 Hz, H₅'), 6.24 (s, **1H**, H₃), 3.98 (s, **2H**, CH₂). ¹³**C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 159.9, 158.2, 157.1, 144.7, 142.9, 132.2, 132.0, 124.1, 116.4, 112.6, 110.6, 107.7, 104.0, 103.5, 29.0. **HRMS 257.08068** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₅H₁₃O₄, 257.08084).



(3-amino-7-hydroxybenzofuran-2-yl)(2',4'-dihydroxyphenyl)methanone (93). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (3-amino-7-methoxybenzofuran-2-yl)(2',4'-dimethoxyphenyl)methanone (101 mg, 0.31 mmol). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 97:3) and washed with acetone to afford **93** as a pure yellow solid (72%). C₁₅H₁₁NO₅. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.76 (d, **1H**, *J* = 9.0 Hz, H_{6'}), 7.32 (dd, **1H**, *J*
= 7.9, 1.1 Hz, H₄), 7.08 (m, 1H, H₅), 6.96 (dd, 1H, J = 7.8, 1.1 Hz, H₆), 6.45 (dd, 1H, J = 9.0, 2.5 Hz, H₅'), 6.29 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H₃'). ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 184.4, 167.1, 164.8, 146.4, 145.6, 144.4, 134.8, 134.5, 124.2, 123.8, 116.6, 113.5, 112.8, 108.7, 103.8.
HRMS 284.05645 *m/z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₁₁NO₅, 284.05645).



(2',4'-dihydroxyphenyl)(7-hydroxy-3-methylbenzofuran-2-yl)methanone (94). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (2',4'-dimethoxyphenyl)(7-methoxy-3-methylbenzofuran-2-yl)methanone (60 mg, 0.18 mmol). The crude product was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 100:1) and washed with acetone to afford **94** as a pure yellow solid (59%). C₁₆H₁₂O₅. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.46 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H₆'), 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.4 Hz, H₄), 7.16 – 7.11 (m, 1H, H₅), 6.92 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, H₆), 6.45 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.4 Hz, H₅'), 6.33 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H₃'), 2.56 (s, 3H, CH₃₍₃₎). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 188.0, 168.0, 166.5, 149.2, 144.9, 144.3, 136.2, 132.1, 128.3, 125.4, 114.7, 114.06, 112.9, 109.4, 103.8, 10.5. HRMS 283.06121 *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₆H₁₁O₅, 283.06120).



(*Z*)-2-(4'-Fluorobenzylidene)-7-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (104). The crude product was prepared according to the general procedure **O** starting from (*Z*)-2-(4'-fluorobenzylidene)-7-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (102 mg, 0.37 mmol), which was recrystallized from acetonitrile to afford **104** as a pure yellow solid (8%). C₁₅H₉FO₃. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.14 (m, 2H, H_{6'},H_{2'}), 7.38 (m, 2H, H_{5'},H_{3'}), 7.26 (dd, 1H, *J* =

7.8, 1.3 Hz, H₄), 7.22 (dd, **1H**, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H₆), 7.13 (t, **1H**, *J* = 7.8 Hz, H₅), 6.98 (s, **1H**, =CH). ¹³**C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 184.1, 164.0, 161.6, 154.2, 146.1, 145.0 (d, *J* = 254 Hz), 143.5, 133.9 (d, *J* = 8.5 Hz), 128.7, 124.6, 123.6, 122.4, 116.2 (d, *J* = 21.8 Hz), 113.9, 111.1 **HRMS 255.04607** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₅H₈FO₃, 255.04630).



4-(Dimethylamino)-2-hydroxyacetophenone (145). The crude product was prepared according to the general procedure **0** starting from 4-(dimethylamino)-2-methoxyacetophenone **144** (321 mg, 1.66 mmol) to afford **145** as a pure white solid (90%). C₁₀H₁₃NO₂. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.27 (dd, **1H**, *J* = 8.2, 1.4 Hz, H₃), 6.99 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.4 Hz, H₅), 6.78 (d, **1H**, *J* = 8.0 Hz, H₆), 3.83 (s, **6H**, -NMe₂), 2.57 (s, **3H**, CH_{3(2')}). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 205.1, 152.9, 149.0, 122.0, 119.8, 118.4, 117.1, 56.3, 27.1, 27.1. HRMS **180.10162** *m/z* [M+H]⁺ (calc for C₁₀H₁₄NO₂, 180.10191).

SYNTHESISOFN-FONCTIONALIZEDAZA-AURONESANDDEPROTECTION OF METHOXY ANALOGUES



(*Z*/*E*) **2-(2',4'-dihydroxybenzylidene)-1-methylindolin-3-one (78).** The crude product was prepared according to general procedure **P** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-1-methylindolin-3-one. The crude product was purified by HPLC in reverse phase (eluent Water/MeOH 50:50) to afford **78** as a pure red solid (6%). 252

C₁₆H₁₃NO₃. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.64 – 8.56 (m, **0.3H**), 7.80 – 7.74 (m, **0.7H**), 7.74 – 7.66 (m, **1H**), 7.65 – 7.58 (m, **0.3H**), 7.35 – 7.23 (m, **2H**), 7.19 – 7.12 (m, **0.6H**), 7.12 – 7.06 (m, **0.7H**), 6.58 – 6.52 (m, **0.7H**), 6.51 – 6.44 (m, **1.3H**), 3.54 – 3.41 (m, **3H**). ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 210.1, 185.6, 162.1, 161.4, 159.8, 159.6, 158.5, 153.7, 138.7, 137.5, 137.0, 134.2, 133.7, 125.0, 123.1, 122.7, 122.1, 121.2, 121.0, 119.2, 117.3, 115.1, 113.8, 113.4, 112.3, 110.1, 108.4, 108.0, 103.3, 103.2, 34.8, 29.3. HRMS 266.08218 *m/z* [M-H]⁻ (calc for C₁₆H₁₂NO₃, 266.08227).



(*Z/E*) 2-(2',4'-dihydroxybenzylidene)-1-propylindolin-3-one (79). The crude product was prepared according to general procedure **P** starting from (*Z*)-2-(2',4'-dimethoxybenzylidene)-1-propylindolin-3-one. The crude product was purified by HPLC in reverse phase (eluent Water/MeOH 50:50) to afford **79** as a pure dark red solid (9%). C₁₈H₁₇NO₃. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.46 (m, 0.4H), 7.67 – 7.61 (m, 0.7H), 7.61 – 7.43 (m, 1.4H), 7.22 – 7.09 (m, 2H), 7.09 – 7.01 (m, 0.8H), 6.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 0.7H), 6.84 – 6.78 (m, 0.4H), 6.43 – 6.31 (m, 2H), 3.85 (t, 0.8H), 3.74 (t, 1.2H), 1.77 (sept, *J* = 7.4 Hz), **0.8H**), 1.29 (sept, **1.2H**, *J* = 7.4 Hz), 0.98 (q, **1.2H**, *J* = 8.5, 7.9 Hz,), 0.56 (t, **1.8H**, *J* = 7.4 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 193.6, 185.9, 162.2, 161.3, 159.6, 157.7, 137.4, 137.0, 133.8, 133.7, 131.7, 131.6, 125.9, 125.32, 125.1, 124.2, 123.4, 122.6, 121.1, 120.9, 119.2, 117.6, 114.0, 113.8, 112.72, 112.26, 108.1, 108.0, 103.5, 103.4, 47.3, 46.0, 24.7, 24.3, 11.7, 11.4. HRMS **294.11297** *m*/*z* [M-H]⁻ (calc for C₁₈H₁₆NO₃, 294.11247).

DIRECT SYNTHESIS OF INDAZOLE VIA DAVIS-BEIRUT REACTION



2-(2',4'-dimethoxybenzyl)-1,2-dihydro-3H-indazol-3-one (76). To a solution of 2-4.75 nitrobenzyl bromide (1.00 g, mmol) in methanol (15 mL), 2.4dimethoxybenzylamine (2.00 g, 9.5 mmol) and DIPEA (2.45 g, 19 mmol) were added dropwise and the mixture was stirred overnight. After completion of the reaction, water (8 mL) and potassium hydroxide (1 g, 19 mmol) were added and the mixture was heated at 60 °C for 24 h. When the starting material had been consumed and monitored by TLC, 50 mL of water was added and the methanol was removed under reduced pressure. The aqueous layer was then extracted several times with DCM. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude intermediate 2-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-methoxy-2,3,3a,7a-tetrahydro-1*H*-indazole obtained as a brown oil was used without further purification. To a solution of the intermediate 2-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-methoxy-2,3,3a,7a-tetrahydro-1*H*-indazole in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL), was added pure boron tribromide (10 eq) at 0 °C. The solution was stirred at room temperature until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 4 days). Cold water was then added and the suspension was extracted three times with EtOAc, washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford 76 as pure white solid (11%). C₁₄H₁₂N₂O₃. ¹**H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*4) δ 7.76 (dd, **1H**, *J* = 8.0, 1.2 Hz, H₄), 7.51 (ddd, **1H**, *J* = 8.4, 7.0, 1.2 Hz, H₆), 7.24 (dd, **1H**, *J* = 8.4, 0.9 Hz, H₇), 7.15 (ddd, **1H**, *J* = 8.0, 7.0, 0.9 Hz, H₅), 6.97 (d, **1H**, *J* = 8.3 Hz, H₆[']), 6.33 (d, **1H**, *J* = 2.4 Hz, H₃[']), 6.26 (dd, **1H**, *J* = 8.3, 2.4 Hz, H₅'), 5.02 (s, 2H, CH₂).¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d4) δ 162.5, 159.9, 157.9, 146.9, 132.9, 131.9, 123.9, 122.5, 117.7, 114.4, 113.0, 107.9, 103.9, 44.0. HRMS **257.09145** *m*/*z* [M+H]⁺ (calc for C₁₄H₁₃O₃N₂, 257.09207).

CHAPITRE VII : Annexe

Inhibiteurs	Tampon		МеОН		AcOEt		CH ₂ Cl ₂	
	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{abs}	λ_{em}
53	425	517	420	502	420	480	425	490
56	415	501	410	494	400	455	405	462
59	440	-	430	493	425	464	430	485
60	410	507	410	496	405	461	410	468
66	415	506	415	493	400	454	405	463
119	425	502	390	499	405	451	405	465
72	390	502	390	486	375	424	385	437
73	390	451	390	442	375	424	385	435
81	390	491	385	482	365	409	375	435
82	490	561	450	520	465	579	460	578
83	385	478	385	471	380	429	385	435
80	470	558	460	559	455	491	460	510
84	390	451	465	538	450	492	455	507
86	435	527	440	521	435	465	440	487

Tableau 12 : Différence des λ_{abs} et λ_{em} dans les différents solvants (en jaune les déplacements de Stokes les
plus élevés)



Aurones

<u>Graphique 15</u> : Différences d'absorbance des composés dans le dichlorométhane et le tampon Tris

Indanones



<u>Graphique 16</u> : Différences d'absorbance des composés dans le dichlorométhane et le tampon Tris

HTIs & HI



<u>Graphique 17</u> : Différences d'absorbance des composés dans le dichlorométhane et le tampon Tris

CHAPITRE VIII : Bibliographie

I. Production scientifique

Articles scientifiques :

Olleik, H.; Yahiaoui, S.; Roulier, B.; Courvoisier-Dezord, E.; Perrier, J.; Pérès, B.; Hijazi, A.; Baydoun, E.; Raymond, J.; Boumendjel, A.; Maresca, M.; Haudecoeur, R. Aurone derivatives as promising antibacterial agents against resistant Gram-positive pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 165, 133–141.

Roulier, B.; Pérès, B.; Haudecoeur, R. Advances in the Design of Genuine Human Tyrosinase Inhibitors for Targeting Melanogenesis and Related Pigmentations. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (22), 13428-13443.

II. Notes et références

- Arveiller, J. Psychiatries dans l'histoire. *Science de l'éducation;* Université de Caen,
 2008, pp 99-112.
- Coumoul, X.; Massicot, F.; Pairon, J-C.; Andujar, P.; Baeza-Squiban, A.; Barouki, R.;
 Bodin, L.; Chevillard, L.; Decleves, X.; Garnier, R.; Marano, F. Toxicologie (Science de la vie); DUNOD : France, 2009.
- (3) Gerin, M.; Gosseln, P.; Cordier, S.; Viau, C.; Quenel, P.; Dewailly E. Toxicologie. In : *Environnement et santé publique - Fondements et pratique;* Edisem/Tec & Doc; Acton Vale : Paris, 2003; Vol. 5, pp. 119-143. https://espum.umontreal.ca/fileadmin/espum/documents/DSEST/Environnement_et_s ante_publique_Fondements_et_pratiques/11Chap05.pdf (accessed Apr 4, 2020).
- (4) Paracelse. https://agora.qc.ca/dossiers/paracelse (accessed May 4, 2021).
- (5) Toxicologie. https://www.universalis.fr/encyclopedie/toxicologie/ (accessed Apr 7, 2021).

- (6) Pharmacologie générale. http://www.pharmacologie.u-bordeaux2.fr/documents /enseignements/poly_pharmacologie_generale.pdf (accessed April 7, 2021).
- Hacker, M. History of pharmacology From Antiquity to the Twentieth Century. In Pharmacology; Elsevier, 2009; 1–7. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00001-4.
- (8) A brief history of pharmacology. http://pubsapp. acs.org/subscribe/journals/mdd/v04/i05/html/05timeline.html? (accessed Mar 30, 2021).
- (9) Dollery, C. T. Clinical Pharmacology The first 75 Years and a view of the future. *Br. J. Clin. Pharmacol.*2006, *61* (6), 650–665. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02672.x.
- (10) Apalla, Z.; Nashan, D.; Weller, R. B.; Castellsagué, X. Skin cancer: Epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatol. Ther*.2017, 7 (1), 5–19. https://doi.org/10.1007/s13555-016-0165-y.
- (11) Del Bino, S.; Duval, C.; Bernerd, F. Clinical and biological characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact. *Int. J. Mol. Sci.*2018, *19* (9), 2668. https://doi.org/10.3390/ijms19092668.
- (12) Raposo, G.; Marks, M. S. Melanosomes Dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*2007, 8 (10), 786–797. https://doi.org/10.1038/nrm2258.
- (13) Delevoye, C.; Giordano, F.; Van Niel, G.; Raposo, G. La biogenèse des mélanosomes.
 *Med. Sci. MS.*2011, 27 (2), 153–162. https://doi.org/10.1051/medsci/2011272153.
- (14) Raposo, G.; Tenza, D.; Murphy, D. M.; Berson, J. F.; Marks, M. S. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell Biol.*2001, *152* (4), 809–824. https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.809.

- (15) Tobin, D. J. Biochemistry of human skin Our brain on the outside. *Chem. Soc. Rev.*2006, 35 (1), 52–67. https://doi.org/10.1039/B505793K.
- (16) Aroca, P.; Urabe, K.; Kobayashi, T.; Tsukamoto, K.; Hearing, V. J. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.*1993, 268 (34), 25650–25655. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74439-1.
- (17) Passeron, T.; Ballotti, R.; Ortonne, J.-P. Mélanogenèse. *EMC Cosmétologie Dermatol. Esthét.*2006, 1 (1), 1–9. https://doi.org/10.1016/S1283-0143(05)41792-6.
- (18) Graham, D. G.; Tiffany, S. M.; Vogel, F. Stephen. The toxicity of melanin precursors.
 *J. Invest. Dermatol.*1978, 70 (2), 113–116. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12541249.
- (19) Les protéines de régulation de la mélanogenèse Génétique morecumüe des albinismes cutanés.
 http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2936/MS_1993_4_425.pdf?seque nce=1&isAllowed=y (accessed May 25, 2020).
- Mroz, P.; Huang, Y.; Szokalska, A.; Zhiyentayev, T.; Janjua, S.; Nifli, A.; Sherwood, M. E.; Ruzié, C.; Borbas, K. E.; Fan, D.; Krayer, M.; Balasubramanian, T.; Yang, E.; Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Diers, J. R.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy. *FASEB J.*2010, 24 (9), 3160–3170. https://doi.org/10.1096/fj.09-152587.
- (21) Buitrago, E.; Hardré, R.; Haudecoeur, R.; Jamet, H.; Belle, C.; Boumendjel, A.; Bubacco, L.; Réglier, M. Are human tyrosinase and related proteins suitable targets for melanoma therapy? *Curr. Top. Med. Chem.* 2016, *16* (27), 3033–3047. https://doi.org/10.2174/1568026616666160216160112.
- (22) Zecca, L.; Tampellini, D.; Gerlach, M.; Riederer, P.; Fariello, R. G.; Sulzer, D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol. Pathol.* 2001, 54 (6), 414–418.

- (23) Wakamatsu, K.; Fujikawa, K.; Zucca, F. A.; Zecca, L.; Ito, S. The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods: chemical structure of neuromelanin. *J. Neurochem.* 2003, 86 (4), 1015–1023. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01917.x.
- Ito, S.; Wakamatsu, K. Chemistry of mixed melanogenesis Pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* 2008, 84 (3), 582–592. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x.
- Greggio, E.; Bergantino, E.; Carter, D.; Ahmad, R.; Costin, G.-E.; Hearing, V. J.; Clarimon, J.; Singleton, A.; Eerola, J.; Hellstrom, O.; Tienari, P. J.; Miller, D. W.; Beilina, A.; Bubacco, L.; Cookson, M. R. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2005, *93* (1), 246– 256. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03019.x.
- (26) Fornstedt, B.; Rosengren, E.; Carlsson, A. Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology* 1986, 25 (4), 451–454. https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90242-X.
- (27) Zucca, F. A.; Basso, E.; Cupaioli, F. A.; Ferrari, E.; Sulzer, D.; Casella, L.; Zecca, L. Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox. Res.* 2014, 25 (1), 13–23. https://doi.org/10.1007/s12640-013-9435-y.
- (28) Xu, S.; Chan, P. Interaction between neuromelanin and α-synuclein in Parkinson's disease. *Biomolecules* 2015, 5 (2), 1122–1142. https://doi.org/10.3390/biom5021122.
- (29) Carballo-Carbajal, I.; Laguna, A.; Romero-Giménez, J.; Cuadros, T.; Bové, J.; Martinez-Vicente, M.; Parent, A.; Gonzalez-Sepulveda, M.; Peñuelas, N.; Torra, A.; Rodríguez-Galván, B.; Ballabio, A.; Hasegawa, T.; Bortolozzi, A.; Gelpi, E.; Vila, M. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 973. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08858-y.

- (30) Tessari, I.; Bisaglia, M.; Valle, F.; Samorì, B.; Bergantino, E.; Mammi, S.; Bubacco, L. The reaction of α-synuclein with tyrosinase: possible implications for Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* 2008, 283 (24), 16808–16817. https://doi.org/10.1074/jbc.M709014200.
- Ortonne, J.-P.; Bissett, D. L. Latest insights into skin hyperpigmentation. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2008, 13 (1), 10–14. https://doi.org/10.1038/jidsymp.2008.7.
- (32) Al-Saif, F. M.; Baqays, A. A.; AlSaif, H. F.; Alhumidi, A. A. Erythromelanosis follicularis faciei et colli with reticulated hyperpigmentation of the extremities. *Clin. Case Rep.* 2017, 5 (10), 1576–1579. https://doi.org/10.1002/ccr3.1095.
- (33) Gniadecki, R.; Mourad, A. La distinction entre le mélanome malin et d'autres lésions à l'aide de la dermoscopie. *Can. Fam. Physician* 2019, 65 (6), 261–263. https://wwwncbi-nlm-nih-gov.gaelnomade-2.grenet.fr/pmc/articles/PMC6738383/.
- Maymone, M. B. C.; Neamah, H. H.; Wirya, S. A.; Patzelt, N. M.; Secemsky, E. A.; Zancanaro, P. Q.; Vashi, N. A. The impact of skin hyperpigmentation and hyperchromia on quality of life: a cross-sectional study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2017, 77 (4), 775–778. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.05.009.
- (35) Naidoo, L.; Khoza, N.; Dlova, N. A fairer face, a fairer tomorrow? A review of skin lighteners. *Cosmetics* 2016, *3* (3), 33. https://doi.org/10.3390/cosmetics3030033.
- (36) Global skin lightening market to reach USD 13.7 billion by 2025. https://cosmetics.specialchem.com/news/industry-news/skin-lightening-productsmarket-report-000219549 (accessed Mar 28, 2021).
- (37) Sagoe, D.; Pallesen, S.; Dlova, N. C.; Lartey, M.; Ezzedine, K.; Dadzie, O. The global prevalence and correlates of skin bleaching: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Int. J. Dermatol.* **2019**, *58* (1), 24–44. https://doi.org/10.1111/ijd.14052.
- (38) Nordlund, J. J.; Grimes, P. E.; Ortonne, J. P. The safety of hydroquinone. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2006, 20 (7), 781–787. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01670.x.

- (39) Andersen, F. A.; Bergfeld, W. F.; Belsito, D. V.; Hill, R. A.; Klaassen, C. D.; Liebler, D. C.; Marks, J. G.; Shank, R. C.; Slaga, T. J.; Snyder, P. W. Final amended safety assessment of hydroquinone as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* 2010, 29 (6), 274-287. https://doi.org/10.1177/1091581810385957.
- (40) Desmedt, B.; Courselle, P.; Beer, J. O. D.; Rogiers, V.; Grosber, M.; Deconinck, E.; Paepe, K. D. Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2016, *30* (6), 943–950. https://doi.org/10.1111/jdv.13595.
- (41) Zatkova, A.; Ranganath, L.; Kadasi, L. Alkaptonuria: current perspectives. *Appl. Clin. Genet.* 2020, *13*, 37–47. https://doi.org/10.2147/TACG.S186773.
- (42) Taylor, A. M.; Kammath, V.; Bleakley, A. Tyrosinase, could it be a missing link in ochronosis in alkaptonuria? *Med. Hypotheses.* 2016, *91*, 77–80. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.04.001.
- (43) Deri, B.; Kanteev, M.; Goldfeder, M.; Lecina, D.; Guallar, V.; Adir, N.; Fishman, A. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. *Sci. Rep.* 2016, 6 (1), 34993. https://doi.org/10.1038/srep34993.
- (44) Cancer Organisation mondiale de la Santé. https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/cancer (accessed June 27, 2020).
- (45) Mrsny, R. Cancer cell biology. In *Biomaterials for Cancer Therapeutics*. Elsevier, 2013, 20–30. https://doi.org/10.1533/9780857096760.1.20.
- (46) Zeng, H.; Nanayakkara, G. K.; Shao, Y.; Fu, H.; Sun, Y.; Cueto, R.; Yang, W. Y.; Yang, Q.; Sheng, H.; Wu, N.; Wang, L.; Yang, W.; Chen, H.; Shao, L.; Sun, J.; Qin, X.; Park, J. Y.; Drosatos, K.; Choi, E. T.; Zhu, Q.; Wang, H.; Yang, X. DNA checkpoint and repair factors are nuclear sensors for intracellular organelle stresses inflammations and cancers can have high genomic risks. *Front. Physiol.* 2018, *9*, 516. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00516.

- (47) Köhler, K.; Ferreira, P.; Pfander, B.; Boos, D. Regulation of the initiation of DNA replication upon DNA damage in eukaryotes. In *The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes*. 2016, 443–460. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24696-3_22.
- (48) Liu, B.; K.H Yip, R.; Zhou, Z. Chromatin remodeling, DNA damage repair and aging.
 Curr. Genomics. 2012, *13* (7), 533–547.
 https://doi.org/10.2174/138920212803251373.
- (49) Falzone, L.; Salomone, S.; Libra, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front. Pharmacol.* 2018, 9. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300.
- (50) Bellone, G.; Novarino, A.; Vizio, B.; Brondino, G.; Addeo, A.; Prati, A.; Giacobino, A.; Campra, D.; Fronda, G. R.; Ciuffreda, L. Impact of surgery and chemotherapy on cellular immunity in pancreatic carcinoma patients in view of an integration of standard cancer treatment with immunotherapy. *Int. J. Oncol.* 2009, *34* (6), 1701–1715. https://doi.org/10.3892/ijo_00000301
- (51) American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2019. https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-andstatistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf (accessed Mar 30, 2020).
- (52) Schadendorf, D.; van Akkooi, A. C. J.; Berking, C.; Griewank, K. G.; Gutzmer, R.; Hauschild, A.; Stang, A.; Roesch, A.; Ugurel, S. Melanoma. *Lancet Lond. Engl.* 2018, *392* (10151), 971–984. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9.
- (53) Institut National Du Cancer. https://www.e-cancer.fr/ (accessed June 27, 2020).
- Bichakjian, C. K.; Halpern, A. C.; Johnson, T. M.; Foote Hood, A.; Grichnik, J. M.; Swetter, S. M.; Tsao, H.; Barbosa, V. H.; Chuang, T.-Y.; Duvic, M.; Ho, V. C.; Sober, A. J.; Beutner, K. R.; Bhushan, R.; Smith Begolka, W. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011, 65 (5), 1032–1047. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.04.031.

- (55) Houghton, A. N.; Polsky, D. Focus on melanoma. *Cancer Cell* 2002, 2 (4), 275–278. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00161-7.
- (56) Garbe, C.; Peris, K.; Hauschild, A.; Saiag, P.; Middleton, M.; Spatz, A.; Grob, J.-J.; Malvehy, J.; Newton-Bishop, J.; Stratigos, A.; Pehamberger, H.; Eggermont, A. M. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – update 2012. *Eur. J. Cancer* 2012, *48* (15), 2375–2390. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.06.013.
- (57) Le mélanome de la peau: points clés mélanome de la peau. https://www.ecancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanome-de-la-peau/Points-cles (accessed Mar 30, 2020).
- (58) Fourneaux, C.; Dubois, B. Mélanome métastatique: contribution des lymphocytes B à l'acquisition d'une résistance aux thérapies ciblées. *médecine/sciences* 2018, *34* (10), 875–878. https://doi.org/10.1051/medsci/2018219.
- (59) Stratégie de diagnostic précoce du mélanome HAS. https://www.hassante.fr/upload/docs/application/pdf/melanome_synthese.pdf (accessed Mar 25, 2020).
- (60) Bhatia, S.; Tykodi, S. S.; Thompson, J. A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncol. Williston Park N.* 2009, *23* (6), 488–496. S.; Tykodi, S. S.; Thompson, J. A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. *Oncol. Williston Park N* 2009, *23* (6), 488–496.
- (61) Kozar, I.; Margue, C.; Rothengatter, S.; Haan, C.; Kreis, S. Many ways to resistance: how melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Cancer.* 2019, *1871* (2), 313–322. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002.
- Ottaviano, M.; Giunta, E. F.; Tortora, M.; Curvietto, M.; Attademo, L.; Bosso, D.; (62) Cardalesi, C.; Rosanova, M.; De Placido, P.; Pietroluongo, E.; Riccio, V.; Mucci, B.; Parola, S.; Vitale, M. G.; Palmieri, G.; Daniele, B.; Simeone, E. BRAF gene and J. 2021, melanoma: back to the future. Int. Mol. Sci. 22 (7). https://doi.org/10.3390/ijms22073474.

- (63) Grossman, D.; Altieri, D. C. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev.* 2001, 20 (1-2), 3-11. https://doi.org/10.1023/a:1013123532723.
- (64) Jang, S.; Atkins, M. B. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol.* 2013, 14 (2), 60–69. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70539-9.
- (65) Martinez-Cardús, A.; Vizoso, M.; Moran, S.; Manzano, J. L. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. *Ann. Transl. Med.* 2015, 3 (15). https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.20.
- (66) Weber, J. S.; Kähler, K. C.; Hauschild, A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J. Clin. Oncol.* 2012, *30* (21), 2691–2697. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.6750.
- (67) Rebecca, V. W.; Herlyn, M. Nongenetic mechanisms of drug resistance in melanoma. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2020, 4 (1), 315–330. https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033533. V. W.; Herlyn, M. Nongenetic Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2020, 4 (1), 315–330. https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033533.
- (68) Brożyna, A. A.; Jóźwicki, W.; Roszkowski, K.; Filipiak, J.; Slominski, A. T. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. *Oncotarget*. 2016, 7 (14), 17844–17853. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7528.
- (69) Huang, Y.-Y.; Vecchio, D.; Avci, P.; Yin, R.; Garcia-Diaz, M.; Hamblin, M. R. Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biol. Chem.* 2013, *394* (2), 239–250. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0228.
- (70) Karlsson, O.; Lindquist, N. G. Melanin affinity and its possible role in neurodegeneration. J. Neural Transm. 2013, 120 (12), 1623–1630. https://doi.org/10.1007/s00702-013-1062-5.

- Kim, S. J.; Kim, H. S.; Seo, Y. R. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 2019, 5381692.
 https://doi.org/10.1155/2019/5381692.
- (72) Fogal, S.; Carotti, M.; Giaretta, L.; Lanciai, F.; Nogara, L.; Bubacco, L.; Bergantino, E. Human tyrosinase produced in insect cells: a landmark for the screening of new drugs addressing its activity. *Mol. Biotechnol.* 2015, 57 (1), 45–57. https://doi.org/10.1007/s12033-014-9800-y.
- (73) Slominski, A.; Zbytek, B.; Slominski, R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. *Int. J. Cancer.* 2009, *124* (6), 1470–1477. https://doi.org/10.1002/ijc.24005.
- (74) Chang, T.-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, *10* (6), 2440–2475. https://doi.org/10.3390/ijms10062440.
- Matoba, Y.; Kumagai, T.; Yamamoto, A.; Yoshitsu, H.; Sugiyama, M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* 2006, 281 (13), 8981–8990. https://doi.org/10.1074/jbc.M509785200.
- (76) Olivares, C.; Solano, F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009, 22 (6), 750–760. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00636.x.
- (77) Kanteev, M.; Goldfeder, M.; Fishman, A. Structure–function correlations in tyrosinases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2015, 24 (9), 1360–1369. https://doi.org/10.1002/pro.2734.
- (78) Lai, X.; Soler-Lopez, M.; Wichers, H. J.; Dijkstra, B. W. Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies. *PLOS ONE*. 2016, *11* (8), 0161697. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161697.
- (79) Lai, X.; Wichers, H. J.; Soler-Lopez, M.; Dijkstra, B. W. Structure of human tyrosinase related protein 1 reveals a binuclear zinc active site important for melanogenesis.

Angew. Chem. Int. Ed. **2017**, *56* (33), 9812–9815. https://doi.org/10.1002/anie.201704616.

- (80) Lai, X.; Wichers, H. J.; Soler-Lopez, M.; Dijkstra, B. W. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chem. – Eur. J.* 2018, 24 (1), 47–55. https://doi.org/10.1002/chem.201704410.
- Weijn, A.; Bastiaan-Net, S.; Wichers, H. J.; Mes, J. J. Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus Bisporus* mushrooms. *Fungal Genet. Biol.* 2013, 55, 42–53. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.10.004.
- Mann, T.; Gerwat, W.; Batzer, J.; Eggers, K.; Scherner, C.; Wenck, H.; Stäb, F.; Hearing, V. J.; Röhm, K.-H.; Kolbe, L. Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* 2018, *138* (7), 1601–1608. https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.019.
- (83) Pillaiyar, T.; Namasivayam, V.; Manickam, M.; Jung, S.-H. Inhibitors of melanogenesis: an updated review. J. Med. Chem. 2018, 61 (17), 7395–7418. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00967.
- (84) Cordes, P.; Sun, W.; Wolber, R.; Kolbe, L.; Klebe, G.; Röhm, K.-H. Expression in nonmelanogenic systems and purification of soluble variants of human tyrosinase. *Biol. Chem.* 2013, 394 (5), 685–693. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0300.
- (85)P14679HomosapiensTyrosinaseModel.https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P14679 (accessed Apr 5, 2021).
- (86) Ismaya, W. T., Rozeboom, H. J., Weijn, A., Mes, J. J., Fusetti, F., Wichers, H. J., & Dijkstra, B. W. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*. 2011, 50 (24), 5477–5486. doi:10.1021/bi200395t.
- (87) Pretzler, M.; Bijelic, A.; Rompel, A. Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (*abPPO4*). *Sci. Rep.* 2017, 7 (1), 1810. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01813-1.

- (88) Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (12), 1084– 1090. https://doi.org/10.1038/4193.
- (89) Haudecoeur, R.; Carotti, M.; Gouron, A.; Maresca, M.; Buitrago, E.; Hardré, R.; Bergantino, E.; Jamet, H.; Belle, C.; Réglier, M.; Bubacco, L.; Boumendjel, A. 2-Hydroxypyridine- N -oxide-embedded aurones as potent human tyrosinase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 2017, 8 (1), 55–60. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00369.
- (90) Mann, T.; Scherner, C.; Röhm, K.-H.; Kolbe, L. Structure-activity relationships of thiazolyl resorcinols, potent and selective inhibitors of human tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, *19* (3), 690. https://doi.org/10.3390/ijms19030690.
- Kolbe, L.; Mann, T.; Gerwat, W.; Batzer, J.; Ahlheit, S.; Scherner, C.; Wenck, H.; Stäb, F. 4-*n*-Butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013, 27 (1), 19–23. https://doi.org/10.1111/jdv.12051.
- Wood, J. M.; Schallreuter, K. U. Studies on the reactions between human tyrosinase, superoxide anion, hydrogen peroxide and thiols. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* 1991, *1074* (3), 378–385. https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90088-X.
- (93) Nishioka, K. Particulate tyrosinase of human malignant melanoma. Solubilization, purification following trypsin treatment, and characterization. *Eur. J. Biochem.* 1978, 85 (1), 137–146. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12221.x.
- Kong, J.-N.; Lee, H.-J.; Jo, D.-H.; Kong, K.-H. Characterization of human tyrosinase ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Pept. Lett.* 2010, *17* (8), 1026–1030. https://doi.org/10.2174/092986610791498957.
- Kong, K. H.; Park, S. Y.; Hong, M. P.; Cho, S. H. Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2000, 125 (4), 563–569. https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00163-2.

- (96) Chen, G.-H.; Chen, W.-M.; Huang, Y.-C.; Jiang, S.-T. Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (11), 2838–2843. https://doi.org/10.1021/jf205021g.
- (97) Dolinska, M. B.; Kovaleva, E.; Backlund, P.; Wingfield, P. T.; Brooks, B. P.; Sergeev, Y. V. Albinism-causing mutations in recombinant human tyrosinase alter intrinsic enzymatic activity. *PloS One* 2014, 9 (1), 84494. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084494.
- (98) Roulier, B.; Pérès, B.; Haudecoeur, R. Advances in the design of genuine human tyrosinase inhibitors for targeting melanogenesis and related pigmentations. *J. Med. Chem.* 2020, 63 (22), 13428–13443. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00994.
- (99) Zolghadri, S.; Bahrami, A.; Hassan Khan, M. T.; Munoz-Munoz, J.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Canovas, F.; Saboury, A. A. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2019, 34 (1), 279–309. https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767.
- (100) Satooka, H.; Kubo, I. Resveratrol as a kcat type inhibitor for tyrosinase: potentiated melanogenesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20 (2), 1090–1099. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.030.
- (101) Cellosaurus cell line G-361. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1220 (accessed Apr 13, 2021).
- (102)CellosauruscelllineHBL-100.https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_4362(accessed Apr 13, 2021).
- (103)CellosauruscelllineMNT-1.https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_5624(accessed Apr 13, 2021).
- (104) Cellosaurus cell line HMV-II. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1282 (accessed Apr 13, 2021).

- (105)CellosauruscelllineSK-MEL-1.https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0068(accessed Apr 13, 2021).
- (106) Normal Human Epidermal Melanocytes-Neonatal/Adult (HEMn/HEMna). http://www.shengbosi.com/uploadfile/201508/20150828182123751.pdf (accessed Apr 13, 2021).
- (107) Huh, S. Y.; Shin, J.-W.; Na, J.-I.; Huh, C.-H.; Youn, S.-W.; Park, K.-C. Efficacy and safety of liposome-encapsulated 4-*n*-butylresorcinol 0.1% cream for the treatment of melasma: a randomized controlled split-face trial. *J. Dermatol.* 2010, *37* (4), 311–315. https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.00787.x.
- (108) Khemis, A.; Kaiafa, A.; Queille-Roussel, C.; Duteil, L.; Ortonne, J. P. Evaluation of efficacy and safety of rucinol serum in patients with melasma: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 2007, *156* (5), 997–1004. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07814.x.
- (109) Mann, T.; Gerwat, W.; Batzer, J.; Eggers, K.; Scherner, C.; Wenck, H.; Stäb, F.; Hearing, V. J.; Röhm, K.-H.; Kolbe, L. Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* 2018, *138* (7), 1601–1608. https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.019.
- (110) Arrowitz, C.; Schoelermann, A. M.; Mann, T.; Jiang, L. I.; Weber, T.; Kolbe, L. Effective tyrosinase inhibition by thiamidol results in significant improvement of mild to moderate melasma. *J. Invest. Dermatol.* 2019, *139* (8), 1691-1698. https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.02.013.
- (111) Institute of Dermatology (Thailand) and Beiersdorf. Efficacy and Tolerability of an Isobutylamido-thiazolyl-resorcinol Cream 0.2% for Facial Hyperpigmentation (NCT03926845). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03926845 (accessed Apr 30, 2020).
- (112) Philipp-Dormston, W. G.; Echagüe, A. V.; Damonte, S. H. P.; Riedel, J.; Filbry, A.; Warnke, K.; Lofrano, C.; Roggenkamp, D.; Nippel, G. Thiamidol containing treatment regimens in facial hyperpigmentation: an international multi-centre approach consisting

of a double-blind, controlled, split-face study and of an open-label, real-world study. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42* (4), 377–387. https://doi.org/10.1111/ics.12626.

- (113) Lin, Y.-P.; Hsu, F.-L.; Chen, C.-S.; Chern, J.-W.; Lee, M.-H. Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry*. 2007, 68 (8), 1189–1199. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.001.
- (114) Leoty-Okombi, S.; Bonnet, S.; Rival, D.; Degrave, V.; Lin, X.; Vogelgesang, B.; André-Frei, V. *In vitro* melanogenesis inhibitory effects of *N*-Feruloyldopamine. *J. Cosmet. Sci.* 2013, 64 (2), 133–144.
- (115) Tu, C.-X.; Lin, M.; Lu, S.-S.; Qi, X.-Y.; Zhang, R.-X.; Zhang, Y.-Y. Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes. *Phytother. Res.* 2012, 26 (2), 174–179. https://doi.org/10.1002/ptr.3517.
- (116) Lo, Y.-H.; Lin, R.-D.; Lin, Y.-P.; Liu, Y.-L.; Lee, M.-H. Active constituents from *Sophora Japonica* exhibiting cellular tyrosinase inhibition in human epidermal melanocytes. *J. Ethnopharmacol.* 2009, *124* (3), 625–629. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.053.
- (117) Micillo, R.; Sirés-Campos, J.; García-Borrón, J.; Panzella, L.; Napolitano, A.; Olivares, C. Conjugation with dihydrolipoic acid imparts caffeic acid ester potent inhibitory effect on dopa oxidase activity of human tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, *19* (8), 2156. https://doi.org/10.3390/ijms19082156.
- (118) Kanehira, T.; Takekoshi, S.; Nagata, H.; Osamura, R. Y.; Homma, T. Kinobeon A as a potent tyrosinase inhibitor from cell culture of safflower: *in vitro* comparisons of Kinobeon A with other putative inhibitors. *Planta Med.* 2003, 69 (05), 457–459. https://doi.org/10.1055/s-2003-39708.
- (119) Wang, H.-M.; Chen, C.-Y.; Wen, Z.-H. Identifying Melanogenesis Inhibitors from *Cinnamomum Subavenium* with *in vitro* and *in vivo* screening systems by targeting the human tyrosinase. *Exp. Dermatol.* 2011, 20 (3), 242–248. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01161.x.

- (120) Haghbeen, K.; Wue Tan, E. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Anal. Biochem.* 2003, *312* (1), 23–32. https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00408-6.
- (121) Gonzálvez, A. G.; Ureña, Á. G.; Lewis, R. J.; van der Zwan, G. Spectroscopy and kinetics of tyrosinase catalyzed trans-resveratrol oxidation. J. Phys. Chem. B 2012, 116 (8), 2553–2560. https://doi.org/10.1021/jp209753q.
- (122) Haudecoeur, R.; Gouron, A.; Dubois, C.; Jamet, H.; Lightbody, M.; Hardré, R.; Milet, A.; Bergantino, E.; Bubacco, L.; Belle, C.; Réglier, M.; Boumendjel, A. Investigation of binding-site homology between mushroom and bacterial tyrosinases by using aurones as effectors. *ChemBioChem* 2014, 15 (9), 1325–1333. https://doi.org/10.1002/cbic.201402003.
- (123) Marková, E.; Kotik, M.; Křenková, A.; Man, P.; Haudecoeur, R.; Boumendjel, A.; Hardré, R.; Mekmouche, Y.; Courvoisier-Dezord, E.; Réglier, M.; Martínková, L. Recombinant tyrosinase from *Polyporus arcularius*: overproduction in *Escherichia coli*, characterization, and use in a study of aurones as tyrosinase effectors. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64 (14), 2925–2931. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00286.
- (124) Dubois, C.; Haudecoeur, R.; Orio, M.; Belle, C.; Bochot, C.; Boumendjel, A.; Hardré, R.; Jamet, H.; Réglier, M. Versatile effects of aurone structure on mushroom tyrosinase activity. *ChemBioChem* 2012, *13* (4), 559–565. https://doi.org/10.1002/cbic.201100716.
- (125) Schlich, M.; Fornasier, M.; Nieddu, M.; Sinico, C.; Murgia, S.; Rescigno, A. 3-Hydroxycoumarin loaded vesicles for recombinant human tyrosinase inhibition in topical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2018, 171, 675–681. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.008.
- (126) Mädel, A.Strukturbasierte entwicklung von inhibitoren der humanen tyrosinase und der farnesyltransferas. Thèse de doctorat. Philipps-Universität Marburg, 2009.

- (127) Yoshimori, A.; Oyama, T.; Takahashi, S.; Abe, H.; Kamiya, T.; Abe, T.; Tanuma, S. Structure–activity relationships of the thujaplicins for inhibition of human tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22 (21), 6193–6200. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.027.
- (128) Peyroux, E.; Ghattas, W.; Hardré, R.; Giorgi, M.; Faure, B.; Simaan, A. J.; Belle, C.; Réglier, M. Binding of 2-Hydroxypyridine-*N*-oxide on dicopper(II) centers: insights into tyrosinase inhibition mechanism by transition-state analogs. *Inorg. Chem.* 2009, *48* (23), 10874–10876. https://doi.org/10.1021/ic901593x.
- (129) Garcia-Jimenez, A.; Teruel-Puche, J. A.; Berna, J.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Tudela, J.; Garcia-Ruiz, P. A.; Garcia-Canovas, F. Characterization of the action of tyrosinase on resorcinols. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24 (18), 4434–4443. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.048.
- (130) Kwak, J. y.; Seok, J. k.; Suh, H.-J.; Choi, Y.-H.; Hong, S. s.; Kim, D. s.; Boo, Y. c. Antimelanogenic effects of luteolin 7-sulfate isolated from *Phyllospadix Iwatensis Makino*. Br. J. Dermatol. 2016, 175 (3), 501–511. https://doi.org/10.1111/bjd.14496.
- (131) Okombi, S.; Rival, D.; Bonnet, S.; Mariotte, A.-M.; Perrier, E.; Boumendjel, A. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. J. Med. Chem. 2006, 49 (1), 329–333. https://doi.org/10.1021/jm050715i.
- (132) Okombi, S.; Rival, D.; Bonnet, S.; Mariotte, A.-M.; Perrier, E.; Boumendjel, A. Analogues of *N*-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, *16* (8), 2252–2255. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.01.022.
- (133) Mai, N. T. T.; Hai, N. X.; Phu, D. H.; Trong, P. N. H.; Nhan, N. T. Three new geranyl aurones from the leaves of *Artocarpus altilis*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5* (3), 647–650. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.06.014.
- (134) Olleik, H.; Yahiaoui, S.; Roulier, B.; Courvoisier-Dezord, E.; Perrier, J.; Pérès, B.;Hijazi, A.; Baydoun, E.; Raymond, J.; Boumendjel, A.; Maresca, M.; Haudecoeur, R.

Aurone derivatives as promising antibacterial agents against resistant gram-Positive pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *165*, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.022.

- (135) Zhou, J.; Shi, W.; Li, L.; Gong, Q.; Wu, X.; Li, X.; Ma, H. Detection of misdistribution of tyrosinase from melanosomes to lysosomes and its upregulation under psoralen/ultraviolet A with a melanosome-targeting tyrosinase fluorescent probe. *Anal. Chem.* 2016, 88 (8), 4557–4564. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00742.
- (136) Gravel, J. Perturbation de la membrane cellulaire par des composés cationiques : transport transmembranaire contrôlé et applications biologiques. Thèse de doctorat. Université de Montréal, 2017.
- (137) Hamidian, H. Synthesis of novel compounds as new potent tyrosinase inhibitors. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/207181.
- (138) Narsinghani, T.; Sharma, M. C.; Bhargav, S. Synthesis, Docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. *Med. Chem. Res.* 2013, 22 (9), 4059–4068. https://doi.org/10.1007/s00044-012-0413-3.
- (139) Ferro, S.; Deri, B.; Germanò, M. P.; Gitto, R.; Ielo, L.; Buemi, M. R.; Certo, G.; Vittorio, S.; Rapisarda, A.; Pazy, Y.; Fishman, A.; De Luca, L. Targeting tyrosinase: development and structural insights of novel inhibitors bearing arylpiperidine and arylpiperazine fragments. *J. Med. Chem.* 2018, *61* (9), 3908–3917. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01745.
- (140) Gauillard, F.; Richardforget, F.; Nicolas, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Anal. Biochem.* 1993, 215 (1), 59–65. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1554.
- (141) Yildiz, H. B.; Freeman, R.; Gill, R.; Willner, I. Electrochemical, photoelectrochemical, and piezoelectric analysis of tyrosinase activity by functionalized nanoparticles. *Anal. Chem.* 2008, 80 (8), 2811–2816. https://doi.org/10.1021/ac702401v.

- (142) Freeman, R.; Elbaz, J.; Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. Analysis of dopamine and tyrosinase activity on ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) Devices. *Chem. Eur. J.* 2007, *13* (26), 7288–7293. https://doi.org/10.1002/chem.200700734.
- (143) Gill, R.; Freeman, R.; Xu, J.-P.; Willner, I.; Winograd, S.; Shweky, I.; Banin, U. Probing biocatalytic transformations with CdSe–ZnS QDs. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128 (48), 15376–15377. https://doi.org/10.1021/ja066636t.
- (144) Li, Z.; Wang, Y.-F.; Zhang, X.; Zeng, C.; Hu, L.; Liang, X.-J. A Tyrosinase-triggered oxidative reaction-based "Turn-on" fluorescent probe for imaging in living melanoma cells. *Sens. Actuators B Chem.* 2017, 242, 189–194. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.011.
- (145) Li, Q.; Yan, C.; Zhang, J.; Guo, Z.; Zhu, W.-H. Ratiometric and light-up near-infrared fluorescent DCM-based probe for real-time monitoring endogenous tyrosinase activity. *Dyes Pigments* 2018, *162*. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.11.019.
- (146) Zhan, C.; Cheng, J.; Li, B.; Huang, S.; Zeng, F.; Wu, S. A Fluorescent probe for early detection of melanoma and its metastasis by specifically imaging tyrosinase activity in a mouse model. *Anal. Chem.* 2018, 90 (15), 8807–8815. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00594.
- (147) Yu, F.; Li, P.; Song, P.; Wang, B.; Zhao, J.; Han, K. Facilitative functionalization of cyanine dye by an on-off-on fluorescent switch for imaging of H2O2 oxidative stress and thiols reducing repair in cells and tissues. *Chem. Commun.* 2012, *48* (41), 4980. https://doi.org/10.1039/c2cc30985h.
- (148) Zhang, W.; Li, P.; Yang, F.; Hu, X.; Sun, C.; Zhang, W.; Chen, D.; Tang, B. Dynamic and reversible fluorescence imaging of superoxide anion fluctuations in live cells and *in vivo. J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135 (40), 14956–14959. https://doi.org/10.1021/ja408524j.
- (149) Peng, T.; Wong, N.-K.; Chen, X.; Chan, Y.-K.; Ho, D. H.-H.; Sun, Z.; Hu, J. J.; Shen, J.; El-Nezami, H.; Yang, D. Molecular imaging of peroxynitrite with HKGreen-4 in live

cells and tissues. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (33), 11728–11734. https://doi.org/10.1021/ja504624q.

- (150) Qu, Y.; Zhan, Q.; Du, S.; Ding, Y.; Fang, B.; Du, W.; Wu, Q.; Yu, H.; Li, L.; Huang, W. Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application. *J. Pharm. Anal.* 2020, *10* (5), 414–425. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.07.004.
- M'Baye G. Sondes fluorescentes ratiométriques dérivées de la 3-hydroxyflavone. Etude spectroscopique de nouveaux dérivés et applications en biophysique membranaire. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur - Strasbourg, 2007.
- (152) Klymchenko, A. S. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications. *Acc. Chem. Res.* 2017, *50* (2), 366–375. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517.
- (153) Zhuang, Y.-D.; Chiang, P.-Y.; Wang, C.-W.; Tan, K.-T. Environment-sensitive fluorescent turn-on probes targeting hydrophobic ligand-binding domains for selective protein detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (31), 8124–8128. https://doi.org/10.1002/anie.201302884.
- (154) Ma, Z.; Lin, Y.; Cheng, Y.; Wu, W.; Cai, R.; Chen, S.; Shi, B.; Han, B.; Shi, X.; Zhou, Y.; Du, L.; Li, M. Discovery of the first environment-sensitive near-infrared (NIR) fluorogenic ligand for α₁-adrenergic receptors imaging *in vivo. J. Med. Chem.* 2016, *59* (5), 2151–2162. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01843.
- (155) Muñoz-Becerra, K.; Villegas-Escobar, N.; Zúñiga-Loyola, C.; Cortés-Arriagada, D.; Toro-Labbé, A. Substituent effects on the photophysical properties of amino-auronederivatives. *Mol. Phys.* 2019, *117* (9–12), 1451–1458. https://doi.org/10.1080/00268976.2018.1559372.
- (156) Espinosa-Bustos, C.; Cortés-Arriagada, D.; Soto-Arriaza, M. A.; Robinson-Duggon, J.;
 Pizarro, N.; Cabrera, A. R.; Fuentealba, D.; Salas, C. O. Fluorescence properties of aurone derivatives: an experimental and theoretical study with some preliminary biological applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2017, *16* (8), 1268–1276. https://doi.org/10.1039/C7PP00078B.

- (157) Gerwien, A.; Reinhardt, T.; Mayer, P.; Dube, H. Synthesis of double-bond-substituted hemithioindigo photoswitches. *Org. Lett.* 2018, 20 (1), 232–235. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03574.
- (158) Wiedbrauk, S.; Dube, H. Hemithioindigo an emerging photoswitch. *Tetrahedron Lett.* 2015, 56 (29), 4266–4274. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.05.022.
- (159) Petermayer, C.; Dube, H. Indigoid photoswitches: visible light responsive molecular tools. Acc. Chem. Res. 2018, 51 (5), 1153–1163. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00638
- (160) Fleming, C. L.; Grøtli, M.; Andréasson, J. On-command regulation of kinase activity using photonic stimuli. *ChemPhotoChem* 2019, *3* (6), 318–326. https://doi.org/10.1002/cptc.201800253.
- (161) Kortekaas, L.; Browne, W. R. The evolution of spiropyran: fundamentals and progress of an extraordinarily versatile photochrome. *Chem. Soc. Rev.* 2019, *48* (12), 3406–3424. https://doi.org/10.1039/C9CS00203K.
- (162) Su, X.; Aprahamian, I. Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43 (6), 1963–1981. https://doi.org/10.1039/C3CS60385G.
- (163) Abourashed, E. A. Review of stilbenes: applications in chemistry, life sciences and materials sciencestilbenes: applications in chemistry, life Sciences and materials science. *J. Nat. Prod.* 2017, 80 (2), 577–577. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00089.
- (164) Pu, S.-Z.; Sun, Q.; Fan, C.-B.; Wang, R.-J.; Liu, G. Recent advances in diarylethene-based multi-responsive molecular switches. *J. Mater. Chem. C* 2016, *4* (15), 3075–3093. https://doi.org/10.1039/C6TC00110F.
- (165) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41 (5), 1809–1825. https://doi.org/10.1039/C1CS15179G.

- (166) Hartley, G. S. The *cis*-form of azobenzene. *Nature* **1937**, *140* (3537), 281–281. https://doi.org/10.1038/140281a0.
- (167) Vapaavuori, J.; Bazuin, C. G.; Priimagi, A. Supramolecular design principles for efficient photoresponsive polymer–azobenzene complexes. *J. Mater. Chem. C* 2018, 6 (9), 2168–2188. https://doi.org/10.1039/C7TC05005D.
- (168) Pianowski, Z. L. Recent implementations of molecular photoswitches into smart materials and biological systems. *Chem. – Eur. J.* 2019, 25 (20), 5128–5144. https://doi.org/10.1002/chem.201805814.
- (169) Samanta, S.; Beharry, A. A.; Sadovski, O.; McCormick, T. M.; Babalhavaeji, A.; Tropepe, V.; Woolley, G. A. Photoswitching azo compounds *in vivo* with red light. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, *135* (26), 9777–9784. https://doi.org/10.1021/ja402220t.
- (170) Lei, H.; Mo, M.; He, Y.; Wu, Y.; Zhu, W.; Wu, L. Bioactivatable Reductive Cleavage of Azobenzene for Controlling Functional Dumbbell Oligodeoxynucleotides. *Bioorganic Chem.* 2019, *91*, 103106. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103106.
- (171) Lougheed, T.; Borisenko, V.; Hennig, T.; Rück-Braun, K.; Woolley, G. A. Photomodulation of ionic current through hemithioindigo-modified gramicidin channels. *Org Biomol Chem.* 2004, 2 (19), 2798–2801. https://doi.org/10.1039/B408485C.
- (172) Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Samanta, S.; Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Red-shifting azobenzene photoswitches for *in vivo* use. *Acc. Chem. Res.* 2015, 48 (10), 2662–2670. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00270.
- (173) Eggers, K.; Fyles, T. M.; Montoya-Pelaez, P. J. Synthesis and characterization of photoswitchable lipids containing hemithioindigo chromophores. *J. Org. Chem.* 2001, 66 (9), 2966–2977. https://doi.org/10.1021/jo0056848.
- (174) Kelly, T. R.; De Silva, H.; Silva, R. A. Unidirectional rotary motion in a molecular system. *Nature* **1999**, 401 (6749), 150–152. https://doi.org/10.1038/43639.

- (175) Klok, M.; Boyle, N.; Pryce, M. T.; Meetsma, A.; Browne, W. R.; Feringa, B. L. MHz unidirectional rotation of molecular rotary motors. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130 (32), 10484–10485. https://doi.org/10.1021/ja8037245.
- (176) Zweig, J. E.; Newhouse, T. R. Isomer-specific hydrogen bonding as a design principle for bidirectionally quantitative and redshifted hemithioindigo photoswitches. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (32), 10956–10959. https://doi.org/10.1021/jacs.7b04448.
- (177) Hoffmann, K.; Mayer, P.; Dube, H. A Hemithioindigo molecular motor for metal surface attachment. Org. Biomol. Chem. 2019, 17 (7), 1979–1983. https://doi.org/10.1039/C8OB02424C.
- (178) Herre, S.; Schadendorf, T.; Ivanov, I.; Herrberger, C.; Steinle, W.; Rück-Braun, K.; Preissner, R.; Kuhn, H. Photoactivation of an inhibitor of the 12/15-lipoxygenase pathway. *ChemBioChem* 2006, 7 (7), 1089–1095. https://doi.org/10.1002/cbic.200600082.
- (179) Sailer, A.; Meiring, J.; Heise, C.; Pettersson, L.; Akhmanova, A.; Thorn-Seshold, J.; Thorn-Seshold, O. Pyrrole hemithioindigo antimitotics with near-quantitative bidirectional photoswitching photocontrol cellular microtubule dynamics with singlecell precision. 2021. https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14130107.v1.
- (180) Ikegami, M.; Arai, T. Photochromic and fluorescence properties of a hemiindigo in the presence of bovine serum albumin. *Chem. Lett.* 2005, *34* (4), 492–493. https://doi.org/10.1246/cl.2005.492.
- (181) Cordes, T.; Heinz, B.; Regner, N.; Hoppmann, C.; Schrader, T. E.; Summerer, W.; Rück-Braun, K.; Zinth, W. Photochemical Z -> E isomerization of a hemithioindigo/hemistilbene omega-amino acid. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 2007, 8 (11), 1713–1721. https://doi.org/10.1002/cphc.200700223.
- (182) Shanker, N.; Dilek, O.; Mukherjee, K.; McGee, D. W.; Bane, S. L. Aurones: small molecule visible range fluorescent probes suitable for biomacromolecules. *J. Fluoresc.* 2011, *21* (6), 2173–2184. https://doi.org/10.1007/s10895-011-0919-y.

- (183) Kink, F.; Collado, M. P.; Wiedbrauk, S.; Mayer, P.; Dube, H. Bistable photoswitching of hemithioindigo with green and red light: entry point to advanced molecular digital information processing. *Chem. Eur. J.* 2017, 23 (26), 6237–6243. https://doi.org/10.1002/chem.201700826.
- (184) Shen, X.; Zhou, Q.; Xiong, W.; Pu, W.; Zhang, W.; Zhang, G.; Wang, C. Synthesis of 5-subsituted flavonols *via* the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction: the mechanistic implication. *Tetrahedron.* 2017, 73 (32), 4822–4829. https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.06.064.
- (185) Masesane, I. A comprehensive review of the oxidative cyclisation of 2'hydroxychalcones to aurones and flavones. *Int. J. Chem. Stud.* **2015**, *3*, 53–59.
- (186) Khan, A. T.; Choudhury, A.; Ali, S.; Musawwer Khan, Md. Regioselective monobromination of (*E*)-1-(2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-aryl-2-propen-1-ones using bromodimethylsulfonium bromide and synthesis of 8-bromoflavones and 7-bromoaurones. *Tetrahedron Lett.* 2012, 53 (36), 4852–4857. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.06.122.
- (187) Horie, T.; Kawamura, Y.; Sakai, C.; Akita, A.; Kuramoto, M. Oxidative rearrangement of chalcones without a hydroxy group by thallium(III) nitrate in methanol. *J. Chem. Soc. Perkin 1.* **1994**, No. 6, 753. https://doi.org/10.1039/p19940000753.
- (188) Thakkar, K.; Cushman, M. A novel oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones to 4,5-dialkoxyaurones by thallium(III) nitrate. *J. Org. Chem.* 1995, *60* (20), 6499–6510. https://doi.org/10.1021/jo00125a041.
- (189) Popova, A. V.; Bondarenko, S. P.; Frasinyuk, M. S. Aurones: synthesis and properties. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2019, 55 (4–5), 285–299. https://doi.org/10.1007/s10593-019-02457-x.
- (190) Weng, Y.; Chen, Q.; Su, W. Copper-catalyzed intramolecular tandem reaction of (2-halogenphenyl)(3-phenyloxiran-2-yl)methanones: synthesis of (*Z*)-aurones. *J. Org. Chem.* 2014, 79 (9), 4218–4224. https://doi.org/10.1021/jo500483u.
- (191) Garcia, H.; Iborra, S.; Primo, J.; Miranda, M. A. 6-Endo-dig vs. 5-exo-dig ring closure in *o*-hydroxyaryl phenylethynyl ketones. A new approach to the synthesis of flavones and aurones. *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (23), 4432–4436. https://doi.org/10.1021/jo00373a016.
- (192) Baldwin, J. E. Rules for ring closure. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1976, No. 18, 734.
 https://doi.org/10.1039/c39760000734.
- (193) Jong, T.-T.; Leu, S.-J. Intramolecular cyclisation catalysed by silver(I) ion; a convenient synthesis of aurones. J. Chem. Soc. Perkin 1. 1990, No. 2, 423. https://doi.org/10.1039/p19900000423.
- (194) Hwang, W.; Kim, H.; Choi, H.; Kim, J.; Jeon, W. H.; Lee, P. H.; Lee, K. Synthesis of Aurones through silver-catalyzed intramolecular cyclization from *o*-alkynonylphenols: synthesis of aurones through silver-catalyzed intramolecular cyclization from *o*-alkynonylphenols. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2018**, *39* (3), 397–400. https://doi.org/10.1002/bkcs.11384.
- (195) Harkat, H.; Blanc, A.; Weibel, J.-M.; Pale, P. Versatile and expeditious synthesis of aurones via Au^I-catalyzed cyclization. *J. Org. Chem.* 2008, 73 (4), 1620–1623. https://doi.org/10.1021/jo702197b.
- (196) Qi, X.; Li, R.; Wu, X.-F. Selective palladium-catalyzed carbonylative synthesis of aurones with formic acid as the CO source. *RSC Adv.* 2016, 6 (67), 62810–62813. https://doi.org/10.1039/C6RA13615J.
- (197) Geissman, T. A.; Harborne, J. B. Anthochlor pigments. X. aureusin and cernuoside. J. Am. Chem. Soc. 1955, 77 (17), 4622–4624. https://doi.org/10.1021/ja01622a054.
- (198) Shrestha, A.; Jo, H.; Kwon, Y.; Lee, E.-S. Design, synthesis, and structure-activity relationships of new benzofuro[3,2-b]pyridin-7-ols as DNA topoisomerase II inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018, 28 (4), 566–571. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.048.

- (199) Shin, S. Y.; Shin, M. C.; Shin, J.-S.; Lee, K.-T.; Lee, Y. S. Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE2 productions in LPS-induced raw 264.7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21 (15), 4520–4523. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.117.
- (200) Liew, K.-F.; Chan, K.-L.; Lee, C.-Y. Blood–brain barrier permeable anticholinesterase aurones: synthesis, structure–activity relationship, and drug-like properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 94, 195–210. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.055.
- (201) Lee, C.-Y.; Chew, E.-H.; Go, M.-L. Functionalized aurones as inducers of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 that activate AhR/XRE and Nrf2/ARE signaling pathways: synthesis, evaluation and SAR. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (7), 2957–2971. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.023.
- (202) Varma, R. S.; Varma, M. Alumina-mediated condensation. A simple synthesis of aurones. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33 (40), 5937–5940. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61093-6.
- (203) Villemin, D.; Martin, B.; Bar, N. Application of microwave in organic synthesis. Dry synthesis of 2-arylmethylene-3(2)-naphthofuranones. *Molecules* 1998, *3* (8), 88–93. https://doi.org/10.3390/30300088.
- (204) Bonin-Dubarle, H. Variations autour de la réaction de Suzuki-Miyaura: nouveaux partenaires et nouveaux ligands. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III, 2009.
- (205) Kraus, G. A.; Gupta, V. Divergent approach to flavones and aurones *via* dihaloacrylic acids. Unexpected dependence on the halogen atom. *Org. Lett.* **2010**, *12* (22), 5278–5280. https://doi.org/10.1021/ol1023294.
- (206) Mitka, K.; Kowalski, P.; Pawelec, D.; Majka, Z. Synthesis of novel indane-1,3-dione derivatives and their biological evaluation as anticoagulant agents. *Croat. Chem. Acta.* 2009, 82, 613.

- (207) Turek, M.; Szczęsna, D.; Koprowski, M.; Bałczewski, P. Synthesis of 1-indanones with a broad range of biological activity. *Beilstein J. Org. Chem.* 2017, *13*, 451–494. https://doi.org/10.3762/bjoc.13.48.
- (208) Csuk, R.; Barthel, A. Verfahren zur Herstellung von 2-[(4-Chlorphenyl)-phenylacetyl] 1,3-indandion (Chlorphacinon), DE 10 2005 055 528 (A1), 30/08/2006.
- (209) Ginsburg, D. Practical consideration in preparation of amine. In *Concerning Amines:* Elsevier. 1967; 17–62. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-011913-7.50013-6.
- (210) Baeyer, A.; Drewsen, V. Darstellung von indigblau aus orthonitrobenzaldehyd. Berichte Dtsch. Chem. Ges. 1882, 15 (2), 2856–2864. https://doi.org/10.1002/cber.188201502274.
- (211) Zhang, M.; Li, T.; Qian, M.; Li, K.; Qin, Y.; Zhao, T.; Yang, L.-Q. Synthesis and biological activities of 1-azaaurone derivatives: synthesis and biological activities of 1-azaaurone derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* 2018, 55 (7), 1574–1578. https://doi.org/10.1002/jhet.3190.
- (212) Friedländer, P. Ueber schwefelhaltige analoga der indigogruppe. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 1906, *39* (1), 1060–1066. https://doi.org/10.1002/cber.190603901167.
- (213) Rössing, A. Beobachtungen über innere condensationen bei abkömmlingen des salicylaldehyds. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 1884, 17 (2), 2988–3010. https://doi.org/10.1002/cber.188401702277.
- (214) Bakhouch, M.; Al Houari, G.; Daoudi, M.; El yazidi, M.; Kerbal, A. Michael addition of active methylene compounds to (Z)-2-arylidenebenzo[b]thiophen-3(2H)-ones. *Mediterr.* J. Chem. 2015, 4 (1), 9–17. https://doi.org/10.13171/mjc.4.1.2015.16.02.23/elyazidi.
- (215) Friedländer, P.; Woroshzow, N. Über thioindigofarbstoffe der naphthalinreihe. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1912**, *388* (1), 1–23. https://doi.org/10.1002/jlac.19123880102.

- Kamila, S.; Mukherjee, C.; De, A. Studies in sulfur heterocycles.Part 16: synthesis of (216)2,3-[1]benzothieno[3,2*b*]pyrans via tandem reactions from dihydrobenzo[b]thiophene-3(2H)-ones. **Synlett** 2003, No. 10, 1479–1481. https://doi.org/10.1055/s-2003-40825.
- (217) Cabiddu, M. G.; Cabiddu, S.; Cadoni, E.; De Montis, S.; Fattuoni, C.; Melis, S.; Usai, M. One-step synthesis of thioaurones. *Synthesis* 2002, 2002 (07), 875–878. https://doi.org/10.1055/s-2002-28523.
- (218) Konieczny, M. T.; Konieczny, W.; Wolniewicz, S.; Wierzba, K.; Suda, Y.; Sowiński, P. New domino reaction. One pot synthesis of 4,7-dihydroxythioaurone derivatives from benzaldehydes and 4-acetyl-2-oxo-benz[1,3]oxathiole. *Tetrahedron* 2005, *61* (36), 8648–8655. https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.06.107.
- (219) Ukai, S.; Hirose, K.; Kayano, M. Synthesis and biological activity of sulfur containing derivatives of chalcone. A novel method for the synthesis of thioaurones. *Yakugazu zasshi*. **1975**, *95* (3), 299–303. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.95.3_299
- (220) Zheng, G.; Ma, X.; Liu, B.; Dong, Y.; Wang, M. Iodine-catalyzed intramolecular oxidative thiolation of vinylic carbon-hydrogen bonds *via* tandem iodocyclization and dehydroiodination: construction of 2-methylene-3-thiophenones. *Adv. Synth. Catal.* 2014, *356* (4), 743–748. https://doi.org/10.1002/adsc.201300815.
- (221) Nguyen, T. B.; Retailleau, P. Cooperative activating effect of tertiary amine/DMSO on elemental sulfur: direct access to thioaurones from 2'-nitrochalcones under mild conditions. *Org. Lett.* 2018, 20 (1), 186–189. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03547.
- (222) Cossy, J. Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 26: Ketones; Thieme Chemistry: Stuttgart; New York, **2004**.
- (223) Gaikwad, D. D.; Chapolikar, A. D.; Devkate, C. G.; Warad, K. D.; Tayade, A. P.; Pawar, R. P.; Domb, A. J. Synthesis of indazole motifs and their medicinal importance: an overview. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 90, 707–731. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.029.

- (224) Mills, A. D.; Nazer, M. Z.; Haddadin, M. J.; Kurth, M. J. N, N -Bond-forming heterocyclization: synthesis of 3-alkoxy-2*H*-indazoles. J. Org. Chem. 2006, 71 (7), 2687–2689. https://doi.org/10.1021/jo0524831.
- (225) Essassi, E. M.; Rida, M.; Ghayati, L. Les 1,5-benzodiazépines : Synthèses et réactivités.
 J. Maroc. Chim. Hétérocyclique Moroc. J. Heterocycl. Chem. 2018, *17*, 42–82.
- (226) Kurth, M. J.; Olmstead, M. M.; Haddadin, M. J. Claimed 2,1-benzisoxazoles are indazalones. *J. Org. Chem.* 2005, 70 (3), 1060–1062. https://doi.org/10.1021/jo048153i.
- (227) Hu, Y.; Yang, Y.; Yu, Y.; Wen, G.; Shang, N.; Zhuang, W.; Lu, D.; Zhou, B.; Liang, B.; Yue, X.; Li, F.; Du, J.; Bu, X. Synthesis and identification of new flavonoids targeting liver X receptor β involved pathway as potential facilitators of Aβ clearance with reduced lipid accumulation. *J. Med. Chem.* 2013, *56* (15), 6033–6053. https://doi.org/10.1021/jm301913k.
- (228) Eichberg, M. J.; Dorta, R. L.; Lamottke, K.; Vollhardt, K. P. C. The formal total synthesis of (±)-strychnine *via* a cobalt-mediated [2+2+2] cycloaddition. *Org. Lett.* 2000, 2 (16), 2479–2481. https://doi.org/10.1021/ol006131m
- (229) Liu, Q.; Qiang, X.; Li, Y.; Sang, Z.; Li, Y.; Tan, Z.; Deng, Y. Design, Synthesis and evaluation of chromone-2-carboxamido-alkylbenzylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23 (5), 911–923. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.042.
- (230) Kadayat, T. M.; Banskota, S.; Gurung, P.; Bist, G.; Thapa Magar, T. B.; Shrestha, A.; Kim, J.-A.; Lee, E.-S. Discovery and structure-activity relationship studies of 2benzylidene-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-one and benzofuran-3(2*H*)-one derivatives as a novel class of potential therapeutics for inflammatory Bowel disease. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 137, 575–597. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.018.
- (231) Singh, J.; Singha, T.; Naskar, A.; Kundu, M.; Kumar, R.; Mondal, A.; Ghosh, T.; Maity, T. K. Synthesis and anti-proliferative activity of some isoindoline-1,3-dione derivatives

against Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice model. *Pharmacologyononline*. **2011**, 2, 976-987.

- (232) Holmes, B.; Lee, J.; Landon, K. A.; Benavides-Serrato, A.; Bashir, T.; Jung, M. E.; Lichtenstein, A.; Gera, J. Mechanistic target of rapamycin (MTOR) inhibition synergizes with reduced internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of cyclin D1 and c-MYC MRNAs to treat glioblastoma. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (27), 14146–14159. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726927.
- (233) Balavoine, F.; Batch, A.; Rolland, C., Composés hétérocycliques comme agents antinéoplasiques ou inhibiteurs de proliférations, WO 2008/107321 (Al), 12/09/2008.
- (234) Velezheva, V. S.; Brennan, P. J.; Marshakov, V. Yu.; Gusev, D. V.; Lisichkina, I. N.; Peregudov, A. S.; Tchernousova, L. N.; Smirnova, T. G.; Andreevskaya, S. N.; Medvedev, A. E. Novel pyridazino[4,3-b]indoles with dual inhibitory activity against *Mycobacterium Tuberculosis* and monoamine oxidase. *J. Med. Chem.* 2004, 47 (13), 3455–3461. https://doi.org/10.1021/jm030479g.
- (235) Petermayer, C.; Thumser, S.; Kink, F.; Mayer, P.; Dube, H. Hemiindigo: highly bistable photoswitching at the biooptical window. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (42), 15060– 15067. https://doi.org/10.1021/jacs.7b07531.
- (236) Zhang, Y.; Dan, W.; Fang, X. Metal nitrate mediated regioselective nitration of BN-substituted arenes. *Organometallics* 2017, 36 (9), 1677–1680. https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00120.
- (237) Baghernejad, B.; Heravi, M. M.; Oskooie, H. A.; Beheshtiha, Y. S. An efficient and regioselective nitration of phenols using NH4NO3, KHSO4. *G.U. Journal of Science*.
 2009, 22 (3), 169-173. https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/83042
- (238) Jacobs, L.; de Kock, C.; Taylor, D.; Pelly, S. C.; Blackie, M. A. L. Synthesis of five libraries of 6,5-fused heterocycles to establish the importance of the heterocyclic core for antiplasmodial activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26 (21), 5730–5741. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.029.

- (239) Zheng, M.; Wu, F.; Chen, K.; Zhu, S. Styrene as 4π-component in Zn(II)-catalyzed intermolecular Diels–Alder/ene tandem reaction. *Org. Lett.* **2016**, *18* (15), 3554–3557. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01511.
- (240) Griffin, D. R.; Kasko, A. M. Photodegradable macromers and hydrogels for live cell encapsulation and release. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134 (31), 13103–13107. https://doi.org/10.1021/ja305280w.
- (241) Zhang, W.; Lou, S.; Liu, Y.; Xu, Z. Palladium-catalyzed chelation-assisted aromatic C– H nitration: regiospecific synthesis of nitroarenes free from the effect of the orientation rules. J. Org. Chem. 2013, 78 (12), 5932–5948. https://doi.org/10.1021/jo400594j.
- (242) Yang, Y.; Zhou, B.; Li, Y. Rhodium-catalyzed oxidative *o*-acylation of aryl ketone *o*-methyl oximes with aryl and alkyl aldehydes. *Adv. Synth. Catal.* 2012, *354* (16), 2916–2920. https://doi.org/10.1002/adsc.201200401.
- (243) Dubost, E.; Fossey, C.; Cailly, T.; Rault, S.; Fabis, F. Selective *o*-bromination of substituted benzaldoximes using Pd-catalyzed C–H activation: application to the synthesis of substituted 2-bromobenzaldehydes. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (15), 6414– 6420. https://doi.org/10.1021/jo200853j.
- (244) Thirunavukkarasu, V. S.; Cheng, C.-H. Pd-catalyzed multiple C-H functionalization to construct biologically active compounds from aryl aldoxime ethers with arenes. *Chem. Eur. J.* 2011, *17* (52), 14723–14726. https://doi.org/10.1002/chem.201102996.
- (245) Thirunavukkarasu, V. S.; Parthasarathy, K.; Cheng, C.-H. Synthesis of fluorenones from aromatic aldoxime ethers and aryl halides by palladium-catalyzed dual C-H activation and Heck cyclization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47 (49), 9462–9465. https://doi.org/10.1002/anie.200804153.
- (246) Lin, Z.; Hu, Z.; Zhang, X.; Dong, J.; Liu, J.-B.; Chen, D.-Z.; Xu, X. Tandem synthesis of pyrrolo[2,3-b]quinolones via cadogen-type reaction. Org. Lett. 2017, 19 (19), 5284–5287. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02558.

- (247) Sailer, A.; Ermer, F.; Kraus, Y.; Lutter, F. H.; Donau, C.; Bremerich, M.; Ahlfeld, J.; Thorn-Seshold, O. Hemithioindigos for cellular photopharmacology: desymmetrised molecular switch scaffolds enabling design control over the isomer-dependency of potent antimitotic bioactivity. *ChemBioChem* 2019, 20 (10), 1305–1314. https://doi.org/10.1002/cbic.201800752.
- (248) Conrad, W. E.; Fukazawa, R.; Haddadin, M. J.; Kurth, M. J. The Davis–Beirut reaction: N¹,N²- disubstituted-1*H*-indazolones *via* 1,6-electrophilic addition to 3-alkoxy-2*H*indazoles. Org. Lett. 2011, 13 (12), 3138–3141. https://doi.org/10.1021/ol2010424.
- (249) Kurosawa, K.; Morita, Y. The reduction of 2-benzylidene-3(2*H*)-benzofuranones with lithium aluminium hydride aluminium chloride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1981, 54 (2), 635–636. https://doi.org/10.1246/bcsj.54.635.
- (250) Loewen, P. C.; Zajac Jr., W. W.; Brown, R. K. Hydrogenolysis by LiAlH₄ AlCl₃ of an ether solution of norcamphor isobutylene ketal. *Can. J. Chem.* **1969**, *47* (21), 4059–4069. https://doi.org/10.1139/v69-672.
- (251) J.; Kumar, H. V.; Harini, S. T.; Naik, N. An easy access to benzofurans *via* DBU induced condensation reaction of active 2-hydroxy acetophenones with phenacyl chlorides: a novel class of antioxidant agents. *J. Heterocycl. Chem.* 2015, *52* (3), 938–943. https://doi.org/10.1002/jhet.1971.
- (252) Genna, D. T.; Posner, G. H. Cyanocuprates convert carboxylic acids directly into ketones. Org. Lett. 2011, 13 (19), 5358–5361. https://doi.org/10.1021/ol202237j.
- (253) Rokade, B. V.; Prabhu, K. R. Chemoselective Schmidt reaction mediated by triflic acid: selective synthesis of nitriles from aldehydes. J. Org. Chem. 2012, 77 (12), 5364–5370. https://doi.org/10.1021/jo3008258.
- (254) Manjulatha, K.; Srinivas, S.; Mulakayala, N.; Rambabu, D.; Prabhakar, M.; Arunasree, K. M.; Alvala, M.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. Ethylenediamine diacetate (EDDA) mediated synthesis of aurones under ultrasound: their evaluation as inhibitors of SIRT1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22 (19), 6160–6165. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.017.

- (255) Cheng, H.; Zhang, L.; Liu, Y.; Chen, S.; Cheng, H.; Lu, X.; Zheng, Z.; Zhou, G.-C. Design, Synthesis and discovery of 5-hydroxyaurone derivatives as growth inhibitors against HUVEC and some cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 5950–5957. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.061.
- (256) Sheikhi, E.; Adib, M.; Karajabad, M.; Gohari, S. Sulfuric acid-promoted oxidation of benzylic alcohols to aromatic aldehydes in dimethyl sulfoxide: an efficient metal-free oxidation approach. *Synlett* **2018**, *29* (07), 974–978. https://doi.org/10.1055/s-0037-1609149.
- (257) Zinner, H.; Fiedler, H. Reaktionen von chinolin-derivaten mit formaldehyd. Arch.
 Pharm. (Weinheim). **1958**, 291 (10), 493–502.
 https://doi.org/10.1002/ardp.19582911004.
- (258) What Exactly is Antibiotic Resistance? https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html (accessed Mar 24, 2021).
- (259) Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis. *Pharm. Ther.* 2015, 40 (4), 277–283.
- (260) Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis. *Pharm. Ther.* **2015**, *40* (5), 344–352.
- (261) Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* 2013, *4*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047.
- (262) Abdeen, S.; Kunkle, T.; Salim, N.; Ray, A.-M.; Mammadova, N.; Summers, C.; Stevens, M.; Ambrose, A. J.; Park, Y.; Schultz, P. G.; Horwich, A. L.; Hoang, Q. Q.; Chapman, E.; Johnson, S. M. Sulfonamido-2-arylbenzoxazole GroEL/ES inhibitors as potent antibacterials against *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA). *J. Med. Chem.* 2018, 61 (16), 7345–7357. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00989.
- (263) Sarbu, L. G.; Bahrin, L. G.; Babii, C.; Stefan, M.; Birsa, M. L. Synthetic flavonoids with antimicrobial activity: A review. J. Appl. Microbiol. 2019, 127 (5), 1282–1290. https://doi.org/10.1111/jam.14271.

- (264) Echeverría, J.; Opazo, J.; Mendoza, L.; Urzúa, A.; Wilkens, M. Structure-activity and lipophilicity relationships of selected antibacterial natural flavones and flavanones of Chilean Flora. *Molecules* 2017, 22 (4), 608. https://doi.org/10.3390/molecules22040608.
- (265) Garza-González, E.; Perez-Perez, G. I.; Maldonado-Garza, H. J.; Bosques-Padilla, F. J. A review of *Helicobacter Pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J. Gastroenterol. WJG.* **2014**, *20* (6), 1438–1449. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1438.
- (266) O'Connor, A.; Furuta, T.; Gisbert, J. P.; O'Morain, C. Review Treatment of *Helicobacter Pylori* infection. *Helicobacter* 2020, 25 (S1), 12743. https://doi.org/10.1111/hel.12743.
- (267) Soin anti taches la gamme anti pigment au Thiamidol actif Eucerin. https://www.eucerin.fr/specials/anti-pigment-thiamidol-actif (accessed Jun 06, 2021).

New selective hemiindigoids targeting human tyrosinase: detection and suppression of melanogenesis

Abstract:

Skin is the first defense system against environmental aggressions. Precisely, melanins are skin pigments involved in the protection against UV radiations and free radicals. However, their overexpression leads to both skin disorders and melanoma multiresistance issues against all traditional anti-cancer therapies.

Inhibiting the human tyrosinase enzyme (*hs*TY) constitutes the simplest and most classical strategy to reduce the production of melanin, but the state of the art regarding dedicated inhibitors of isolated *hs*TY is only at its beginning. Therefore, in this work we investigate the effect of aurone derivatives on human tyrosinase, starting from a parent compound : 2-hydroxypyridine-*N*-oxide embedded 6-hydroxyaurone (aurone - HOPNO) previously identified ($K_i = 0.35 \mu$ M) that suffered from solubility and cell penetration issues. The identification of 4-butylresorcinol and thiamidol as powerful *hs*TY inhibitors inspired us for the development of a series of compounds with a resorcinol moiety B (orange) ring which is expected to chelate the dicopper center at the active site. Modifications on C (yellow) and A (blue) rings were made concomitantly to reach specific *hs*TY residues located further from the coppers, ensuring high selectivity profiles. The synthesized hemiindigoid compounds were assessed to evaluate their ability to inhibit melanin production from melanoma cells MNT-1. So far, it seems that polyphenolic substitutions on the A (blue) ring promotes interactions with key residues, thus improving activities. Overall, the study endorses the use of the hemiindigoid scaffolds for the development of new potent and selective inhibitors of tyrosinase.



Nouveaux hémiindigoïdes sélectifs ciblant la tyrosinase humaine : détection et suppression de la mélanogenèse

Résumé :

La peau est la première barrière de défense contre les agressions environnementales. En effet, la mélanine, un pigment cutané, est responsable de cette protection contre les rayons UV et les radicaux libres. Cependant, sa surexpression entraîne à la fois des troubles cutanés et des problèmes de multirésistance du mélanome contre toutes les thérapies anticancéreuses traditionnelles.

:

L'inhibition de la tyrosinase humaine (*hs*TY) constitue la stratégie la plus simple et la plus classique pour réduire la production de mélanine, mais l'état de l'art concernant le développement d'inhibiteurs de *hs*TY n'en est qu'à ses débuts. Par conséquent, dans cette étude, nous étudions l'effet de dérivés aurones sur la tyrosinase humaine, à partir d'un composé parent : le 2-hydroxypyridine-*N*-oxide-6-hydroxyaurone (aurone - HOPNO) précédemment identifié ($K_i = 0,35 \mu$ M) qui souffre cependant de problèmes de solubilité et de pénétration cellulaire. L'identification du 4-butylrésorcinol et du thiamidol en tant qu'inhibiteurs puissants de *hs*TY nous a inspiré pour le développement d'une série de composés avec un groupement résorcinol (cycle orange), capable de chélater le centre à cuivre du site actif. Des modifications sur les cycles C (jaune) et B (bleu) ont été effectuées simultanément pour interagir avec des résidus *hs*TY spécifiques éloignés du centre à cuivre, assurant une sélectivité élevée. Les composés synthétisés ont été évalués pour déterminer leur capacité à inhiber la production de mélanine à partir de cellules de mélanome MNT-1. Jusqu'à présent, il semble que les substitutions polyphénoliques sur le cycle A (bleu) favorisent les interactions avec des résidus clés, améliorant ainsi l'activité. Dans l'ensemble, cette étude montre l'intérêt de l'utilisation de squelettes de type hémiindigoïde pour le développement de nouveaux inhibiteurs plus actifs et sélectifs de la tyrosinase.