

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNTHÈSE D'UN DÉRIVÉ BIOTINYLÉ DU LM98, UN INHIBITEUR DE TEAD

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

ANNABELLE YOAKIM

16 mars 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon superviseur, le professeur Alexandre Gagnon pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son groupe de recherche. Merci pour toutes les idées, les activités, les congrès, les opportunités et pour être resté derrière moi tout au long de ces deux ans.

Je voudrais souligner la contribution du groupe de Steve Bourgault, spécialement Trang Phuong Nguyen pour les analyses HPLC et MS.

Bien évidemment, j'aimerais souligner mes collègues qui m'ont épaulé tout au long de ma maîtrise. Léa, nous n'avons pas été au laboratoire ensemble bien longtemps, mais je suis très reconnaissante de ton écoute hors pair et de ta gentillesse. Yarelys, ta musique m'a toujours donné envie de danser et a égaillé mes journées. Hwai-Chien merci de m'avoir fait rire et d'avoir été de bon conseil, toujours utile et bien placé. Mon amie Bianca, tu m'as accueillie à bras ouverts dans le groupe et tu m'as aidé tout au long, peu importe les questions que j'avais. Suzanne, j'ai aimé ta compagnie et discuter avec toi de tout et rien, spécialement de notre cours! Sans oublier Ahmed, tu m'as été d'un support incommensurable, tu m'as toujours soutenue et aidé à terminer la tête haute.

Finalement, j'aimerais remercier mes amis et ma famille pour tout leur appui, spécialement mes parents qui m'ont encouragé sans cesse pendant ces deux dernières années et qui m'ont écouté me plaindre. Un gros merci aussi à mon amie Cynthia qui a été présente sans cesse dans les bons et les mauvais moments pour m'épauler.

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours et sans qui cette réalisation ne serait pas possible.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES SCHÉMAS	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xi
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCTION	1
1.1 Voie de signalisation Hippo.....	1
1.1.1 Structure des facteurs de transcription	4
1.1.2 Structure du complexe YAP-TEAD.....	5
1.2 Implication de la voie de signalisation dans les maladies	7
1.3 Approches thérapeutiques.....	9
1.3.1 Prévention de la migration de YAP dans le noyau	9
1.3.2 Prévention de l'interaction protéine-protéine	11
1.3.3 Prévention de l'interaction YAP-TEAD via la cavité centrale hydrophobe.....	15
1.4 Travaux de notre laboratoire	22
CHAPITRE 2 SYNTHÈSE D'UN COMPOSÉ BIOTINYLÉ.....	28
2.1 Synthèse d'un composé biotinylé	28
CONCLUSION.....	47
ANNEXE A Partie expérimentale	48
BIBLIOGRAPHIE.....	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Voie de signalisation Hippo sous forme activée (gauche) et inactivée (droite). ³	3
Figure 1.2 Régulation de la voie Hippo par les effecteurs en amont. ⁵	4
Figure 1.3 Schéma des domaines des protéines TEAD (en haut) et YAP (en bas). ⁴	5
Figure 1.4 Interaction entre YAP et TEAD. TEAD et les différentes composantes de YAP sont présentées en vert. Les interactions 1, 2 et 3 sont représentées respectivement en rouge, jaune puis bleu. ⁷	6
Figure 1.5 Foie de souris normal à 6 mois (gauche) et foie de souris mutant pour les double kinases MTS à 6 mois (droite). ³	8
Figure 1.6 Fonction cellulaire de YAP et TAZ dans le cas de cellules cancéreuses (gauche) et de cellules normales (droite). ³	8
Figure 1.7 Molécule de Vertéporfine 1 (gauche) et composé 2 (droite). ⁹	11
Figure 1.8 Domaine de VGLL4, soit TDU, qui agit comme inhibiteur de YAP pour la suppression de tumeur gastrique en perturbant l'interaction YAP-TEAD. ¹⁵	12
Figure 1.9 Poche centrale de TEAD (rouge) et les résidus polaires et chargés la tapissant (jaune). ⁸	16
Figure 1.10 Structure de l'acide flufénamique 12 (gauche) et de l'acide niflumique 13 (droite). ¹⁹	17
Figure 1.11 Structure du composé 17 , perturbateur d'interaction protéine-protéine. ²²	19
Figure 1.12 Division de l'acide flufénamique en quatre sections. ¹⁰	23
Figure 1.13 Structure du composé LM98 (gauche) et structure co-cristalline de TEAD2 et LM98 (droite). Le composé LM98 est en bâtonnets jaunes et la densité électronique est représentée par un maillage vert, TEAD2 est représenté en gris et les résidus importants sont en bâtonnets gris. L'interaction polaire est représentée en pointillé jaune. ¹⁰	26
Figure 1.14 Niveau d'expression des gènes CTGF et Cyr61 lorsque traité avec le DMSO, l'acide niflumique, le composé 18 et LM98 . ¹⁰	27
Figure 2.1 Structure de la biotine (gauche) et structure de la biotine avec un exemple de chaîne PEG (droite). ²⁵	29
Figure 2.2 Composé biotinylé dérivé de TED-347, synthétisé par Meroueh et ses collaborateurs. ²⁰	30
Figure 2.3 Stratégies possibles pour l'installation de la biotine : par amination réductrice (en haut), par couplage peptidique (au milieu) ou par la réaction de clic (en bas).....	31
Figure 2.4 Cycloaddition Huisgen 1,3-dipolaire d'azotures et d'alcyne terminaux, catalysée par CuI. ³⁰ ..	39

Figure 2.5 Ouverture de cycle nucléophile. ³⁰	39
Figure 2.6 Chimie du carbonyle non-aldol: formation d'éther d'hydrazone/oxime. ³⁰	40
Figure 2.7 Additions aux liaisons multiples de carbone: formation d'anneau à trois membres variés (en haut) et certaines additions de Michael (en bas). ³⁰	40

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 2.1 Synthèse de LM98 . ¹⁰	32
Schéma 2.2 Mécanisme de la réaction de Wittig.....	33
Schéma 2.3 Chemin synthétique pour la synthèse de la 3-hexylaniline 56 , caractérisée dans l'Annexe A.33	
Schéma 2.4 Route synthétique pour la synthèse du composé biotinylé par l'amination réductrice. Composés 65 et 66 caractérisés dans l'Annexe A.....	34
Schéma 2.5 Mécanisme de la protection de la fonction aldéhyde en acétal.....	35
Schéma 2.6 Routes possibles pour le couplage de Buchwald, par l'acétal (en haut), par une fonction alcool (au milieu), et par un alcool protégé (en bas). Composé 73 caractérisé dans l'Annexe A.	36
Schéma 2.7 Mécanisme de la réduction d'aldéhyde en alcool (en haut) et mécanisme de la formation de lactone (en bas).	37
Schéma 2.8 Chemin synthétique pour l'ouverture de la lactone et l'obtention de l'azoture. Composés 80 et 81 caractérisés dans l'Annexe A.	38
Schéma 2.9 Mécanisme de la cycloaddition Huisgen 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne terminal, catalysée par l'iodure de cuivre, un exemple de réaction de clic. ³⁰	41
Schéma 2.10 Route de synthèse pour le composé biotinylé par la réaction de clic. Composés 89 , 90 et 91 caractérisés dans l'Annexe A.	42
Schéma 2.11 Mécanisme de la réaction de couplage de Buchwald.....	43
Schéma 2.12 Optimisation des conditions de la réaction de clic sur le composé 90 . Composés 97 et 98 caractérisés dans l'Annexe A.	44
Schéma 2.13 Réaction de clic sur le composé 91 . Composé 99 caractérisé dans l'Annexe A.	45
Schéma 2.14 Réaction de saponification sur le composé 99	45
Schéma 2.15 Réaction de couplage de Buchwald entre 56 et 97	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 Molécules se liant à l'interface 2 du complexe YAP-TEAD. ⁸	13
Tableau 1-2 Molécules se liant à l'interface 3 du complexe YAP-TEAD.	14
Tableau 1-3 Molécules se liant dans la cavité centrale hydrophobe.	18
Tableau 1-4 Composés prévenant les interactions protéine-protéine en se liant dans la cavité centrale hydrophobe de manière non-covalente. ⁸	20
Tableau 1-5 Composés prévenant les interactions protéine-protéine en se liant dans la cavité centrale hydrophobe de manière covalente.	21
Tableau 1-6 Température d'aggrégation des dérivés de l'acide flufénamique pour la position R ₁ . ¹⁰	24
Tableau 1-7 Température d'aggrégation des dérivés de l'acide flufénamique pour la position R ₃ , R ₄ , R ₅ et R ₆ . ¹⁰	25

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN: acide désoxyribonucléique

CCM: chromatographie sur couche mince

CDP: de l'anglais « cysteine-dense peptide »

CTGF: de l'anglais « connective tissue growth factor »

Cyr61: de l'anglais « cysteine-rich protein 61 »

DCM: dichlorométhane

DSLS: de l'anglais « differential static light scattering »

EtOAc: acétate d'éthyle

FA: de l'anglais « flufenamic acid» pour l'acide flufénamique

FDA : de l'anglais « food and drug administration »

LATS1/2: de l'anglais « large tumor suppressor kinase ½ »

LiAlH₄: Tétrahydroaluminate de lithium

LxxLF: Lysine-x-x-Lysine-Phénylalanine

MAP4K: de l'anglais « mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase »

MEC: matrice extracellulaire

MeOH: méthanol

MOB1A/1B: de l'anglais « monopolar spindle-one-binder 1A/1B »

MST1/2: de l'anglais « macrophage stimulating ½ »

NA: de l'anglais « niflumic acid » pour l'acide niflumique

NaBH₄: tétrahydruroborate de sodium

NBS: N-Bromosuccinimide

NF2: de l'anglais « Neurofibromatosis type 2 »

PEG: polyéthylène glycol

RCPG: récepteurs couplés aux protéines G

SAR: de l'anglais « Structure Activity Relationship

SAV1: Salvador homolog 1

TAO: de l'anglais « thousand-and-one amino acids »

TAZ: de l'anglais « transcriptional co-activator with PDZ-binding motif »

TEAD: de l'anglais « transcriptional enhancer factor with TEA/ATTS domain »

TEM: transition épithélio-mésenchymateuse

VGL4: de l'anglais « vestigial-like protein 4 »

YAP: de l'anglais « yes-associated protein »

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

ΔT_{agg} : température d'agrégation

RÉSUMÉ

Il existe plusieurs chemins signalétiques qui régulent les procédés essentiels du corps. L'un d'eux est la voie de signalisation Hippo qui est responsable du développement normal des tissus et de la grosseur des organes. Lorsque dérégulée, elle mène à la surexpression de cellules menant à des caractères de tumorigenèse. Les effecteurs principaux, soit le cofacteur YAP (yes-associated protein) et le facteur de transcription TEAD (transcriptional enhancer factor with TEA/ATT domain), forment un complexe qui active la transcription de gènes cibles. Le composé **LM98** se lie dans la poche palmitique de TEAD inhibant son auto-palmitoylation et réduisant l'activité transcriptionnelle du complexe protéique. Dans le but d'élucider le mécanisme d'action et de prouver que l'inhibition provient vraiment de l'interaction de **LM98** avec TEAD, la synthèse d'un composé biotinylé impliquant une réaction de clic a été élaborée. Cette réaction ayant fonctionné avec d'autres alcynes contenant des caractéristiques similaires à la biotine, mais étant plus court, elle n'a pas été fructueuse avec la biotine choisie. De ce fait, la synthèse totale n'a pas pu être complétée, nécessitant davantage d'optimisation.

Mots clés: Voie de signalisation Hippo, tumorigenèse, YAP, TEAD, transcription, composé **LM98**, auto-palmitoylation, composé biotinylé.

ABSTRACT

Many pathways regulate processes in the human body. One of them is the Hippo signaling pathway, responsible for normal tissue development and organ growth. When dysregulated, overexpression of cells can occur, leading to tumorigenesis. The principal effectors are the cofactor YAP (yes-associated protein) and TEAD (transcriptional enhancer factor with TEA/ATT domain) the transcription factor. They form a complex responsible for the transcription of targeted genes. It's been shown that compound **LM98** binds to TEAD via the central hydrophobic cavity, inhibiting its auto-palmitoylation and resulting in a reduction of transcriptional activity. In order to elucidate the mechanism of action of **LM98** and confirm the activity of the compound a synthetic route to access a biotinylated homologue was designed via a click reaction. This reaction having worked with other alkynes with similar characteristics to the biotin, but being shorter in length, it was not successful with the chosen biotin. As a result, the total synthesis could not be completed, requiring further optimization.

Keywords: Hippo signaling pathway, tumorigenesis, YAP, TEAD, transcription, compound **LM98**, auto-palmitoylation, biotinylated homologue.

INTRODUCTION

1.1 Voie de signalisation Hippo

La voie de signalisation cellulaire Hippo permet la régulation de la prolifération cellulaire, la croissance des organes, la suppression de tumeurs et possède un rôle dans le fonctionnement des cellules souches chez les organismes multicellulaires. Elle a été découverte par l'entremise de criblages génétiques chez les mouches à fruit, plus particulièrement chez la *Drosophila melanogaster*¹, et est hautement conservée à travers les espèces en plus de contenir des protéines et gènes qui peuvent être retrouvés chez les mammifères.² Une altération de ce chemin signalétique peut mener à une dérégulation de la prolifération cellulaire et à l'apoptose, causant ainsi la formation et le développement de tumeurs. En effet, la multiplication, la différenciation et la survie cellulaire dépendent des signaux reçus du milieu extracellulaire par la membrane plasmique et relayés jusqu'au noyau tout au long de cette voie de signalisation. Les principales protéines responsables de cette voie de signalisation sont les différentes kinases situées dans le cytoplasme. Tout d'abord, les kinases sérine/thréonine MST1 et MST2 interagissent avec la protéine d'échafaudage SAV1 (« Salvador homolog 1 ») puis les kinases sérine/thréonine LATS1 et LATS2 interagissent à leur tour avec les protéines d'échafaudage MOB kinases activatrices 1A (MOB1A) et 1B (MOB1B), respectivement. Par la suite, l'information est transmise aux effecteurs situés en aval, soit les facteurs de transcription YAP (yes-associated protein) ou TAZ (« transcriptional co-activator with PDZ-binding motif »), qui est un paralogue de YAP, situés dans le cytoplasme, et TEAD1-4 (« transcriptional enhancer factor with TEA/ATTS domain »), situé dans le noyau.³ Les co-activateurs YAP1-2 et TAZ forment alors un complexe avec TEAD ou d'autres facteurs de transcription comme la protéine p73 afin de procéder à la transcription de gènes ou de facteurs de croissance, les plus importants étant ceux appartenant à la famille de protéines sécrétoires CCN CTGF et Cyr61, des récepteurs tyrosine kinase Axl, c-myc et survin et des protéines comme Ki67.⁴

La voie de signalisation Hippo peut se retrouver sous forme activée ou désactivée. Dans le premier cas, cette cascade est initiée soit par la kinase TAO qui phosphoryle MST1/2 et débute l'activation, ou soit par l'autophosphorylation de MST1/2, par sa dimérisation. Par la suite, MST1/2 et SAV1 phosphorylent les kinases LATS1/2 et leur cofacteur MOB1, ce qui les active. Le suppresseur de tumeur NF2/Merlin facilite la phosphorylation de LATS1/2 qui peut aussi être directement phosphorylé par MAP4K1/2/3/5 ou MAP4K4/6/7. Cela mène à la phosphorylation des co-activateurs YAP et TAZ, entraînant leur rétention dans le cytoplasme par leur liaison à la protéine 14-3-3.

YAP/TAZ peuvent aussi être dégradés par le processus d'ubiquitination ou d'autophagie.⁵ Ainsi, l'interaction avec TEAD ne se fait pas et ce dernier va plutôt former un complexe avec le cofacteur de transcription VGLL4 et inhiber la transcription des gènes cibles. Dans le cas où la voie Hippo est inactivée, YAP n'étant pas phosphorylé se déplace dans le noyau afin de former un complexe transcriptionnel actif avec TEAD et procéder à la transcription de gènes (Figure 1.1). Par conséquent, cette voie de signalisation a pour but d'empêcher les fonctions nucléaires de YAP et TAZ lorsque nécessaire.³

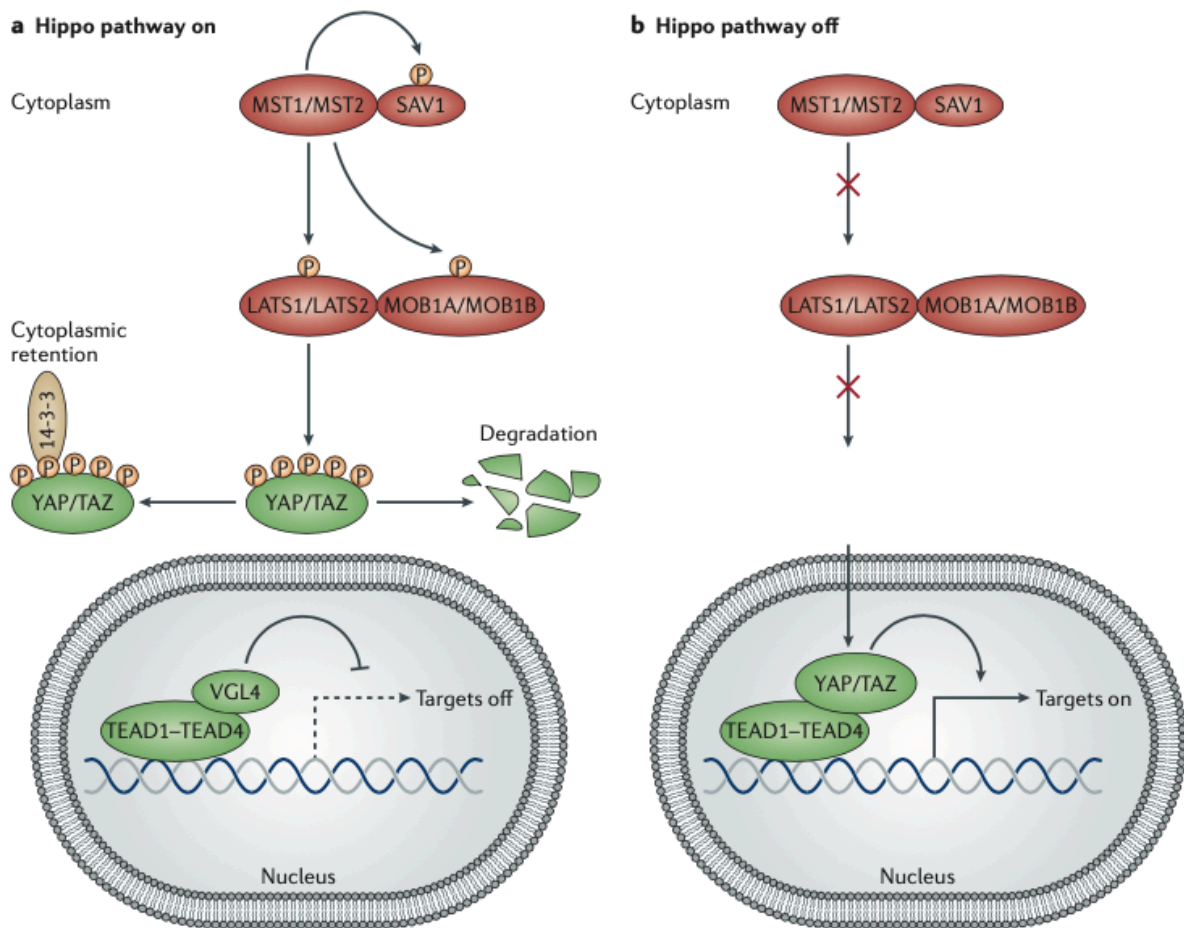


Figure 1.1 Voie de signalisation Hippo sous forme activée (gauche) et inactivée (droite).³

Au niveau des cellules saines, différents signaux régulent la voie de signalisation Hippo en modulant la phosphorylation des composants clés. Certains stimuli peuvent activer ou inactiver le chemin signalétique, comme un contact élevé entre les cellules dû à une haute densité de cellules où une augmentation des jonctions adhérentes active la kinase LATS1/2. Une diminution de la taille des cellules et leur propagation peuvent mener au même résultat puisque cela fait varier la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) qui régule la localisation de YAP. D'autres facteurs comme des hormones ou des facteurs de croissance peuvent contrôler le développement des tissus et l'homéostasie cellulaire. Cela peut être fait par l'entremise de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). De plus, plusieurs signaux de stress peuvent induire une modulation de la voie Hippo, comme le stress énergétique ou encore la privation de glucose (Figure 1.2).⁵

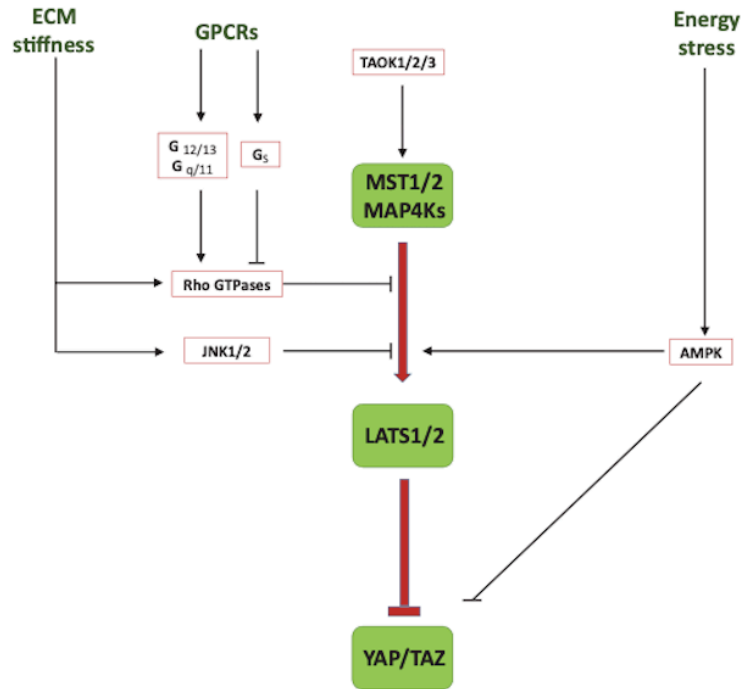


Figure 1.2 Régulation de la voie Hippo par les effecteurs en amont.⁵

1.1.1 Structure des facteurs de transcription

TEAD est une protéine nucléaire ayant la capacité d'activer la transcription de gènes lorsqu'elle est liée à un rehausseur ou un cofacteur, ce qui la rend centrale dans le développement des cellules et organes. Chez les mammifères, TEAD a quatre homologues appelés TEAD1-4 qui sont hautement conservés à travers les espèces. Ces homologues peuvent être présents seuls ou en groupes dans différents tissus.⁴

Les quatre homologues de TEAD possèdent la même architecture des domaines N et C terminaux, contenant tous douze feuillets bêta et quatre hélices alpha (Figure 1.3).⁴ Tout d'abord, TEAD comporte un domaine N-terminal qui se lie à l'ADN par une structure d'homéodomaine formée de trois hélices nommées alpha I, II et III jointes par deux boucles et une épingle.⁶ Également, le domaine C-terminal comporte une structure de repliement en sandwich bêta de type immunoglobine qui recrute les coactivateurs de transcription tels que YAP ou TAZ afin de procéder à l'expression de gènes cibles (domaine de transactivation), puisque TEAD ne peut pas le faire seul. Plusieurs coactivateurs ont été identifiés selon

trois groupes : YAP et son paralogue TAZ, les protéines VgLL et la famille des coactivateurs des récepteurs nucléaires p160.⁴

L'isoforme TAZ n'étant pas présent chez l'humain, la suite de ce mémoire se concentrera sur YAP. YAP, un coactivateur qui n'est pas en mesure de se lier à l'ADN, contient deux isoformes nommés YAP1 et YAP2. Ceux-ci possèdent un domaine N-terminal qui se lie à TEAD appelé TEAD binding domain, suivi par un ou deux motifs WW et un domaine C-terminal qui sert d'activateur (Figure 1.3).⁴ De plus, YAP1-2 sont composés d'un feuillet bêta, de deux hélices alpha et d'une bobine torsadée.^{7,8}

L'un des rôles de YAP est de promouvoir la prolifération cellulaire et du même fait de maintenir la taille des organes. La quantité de YAP varie selon les organes, celui qui en contient le plus étant le foie. Le cofacteur YAP est également un oncogène, ce qui signifie que sa régulation à la hausse peut mener à différents cancers chez l'humain.⁴

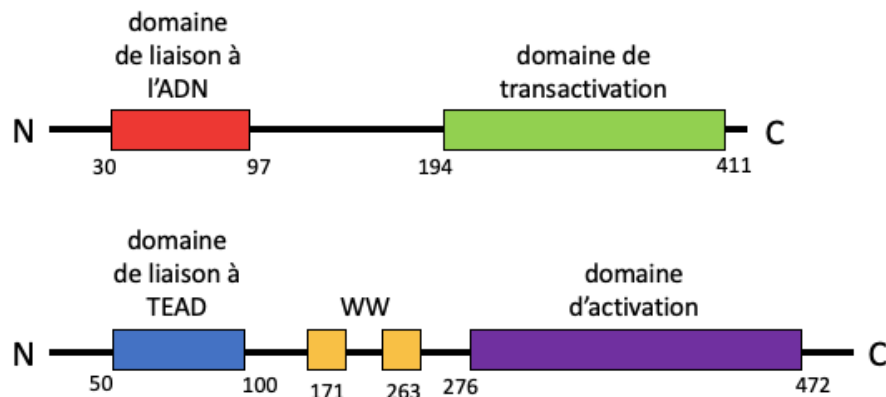


Figure 1.3 Schéma des domaines des protéines TEAD (en haut) et YAP (en bas).⁴

1.1.2 Structure du complexe YAP-TEAD

Les motifs de YAP et de TEAD sont préservés à travers les différents orthologues, donc la structure du complexe présentée s'applique pour chacun d'entre eux. L'interaction entre YAP et TEAD se fait via trois interfaces. La première est constituée de feuillets bêta anti parallèles qui se forment entre le brin bêta 1 du domaine N-terminal de YAP et le brin bêta 7 de TEAD. Cette interaction est possible dû aux sept liaisons hydrogène formées entre les résidus 52-58 du brin bêta 1 et les résidus 318-324 du brin bêta 7. La

deuxième interface se situe entre l'hélice alpha 1 de YAP, constituée par la présence du motif LxxLF, et plus particulièrement des trois résidus L65, L68 et F69, et les hélices alpha 3 et 4 de TEAD qui se lient via des interactions hydrophobes. Finalement, la troisième interface se trouve entre la région de bobines torsadées de YAP et les motifs de feuillets bêta 4, 11 et 12 et les hélices alpha 1 et 4 de TEAD par l'intermédiaire d'interactions de van der Waals hydrophobiques et de liens hydrogènes (Figure 1.4).⁷ Cette dernière est la plus critique pour la formation de l'hétérodimère et augmente l'affinité de liaison de l'interface 2.⁴ De plus, suite à une étude faite sur l'importance de la fonctionnalité des résidus de YAP pour sa liaison avec TEAD, il a été démontré que l'interaction entre les deux n'est pas dépendante de la liaison de TEAD avec l'ADN.⁷

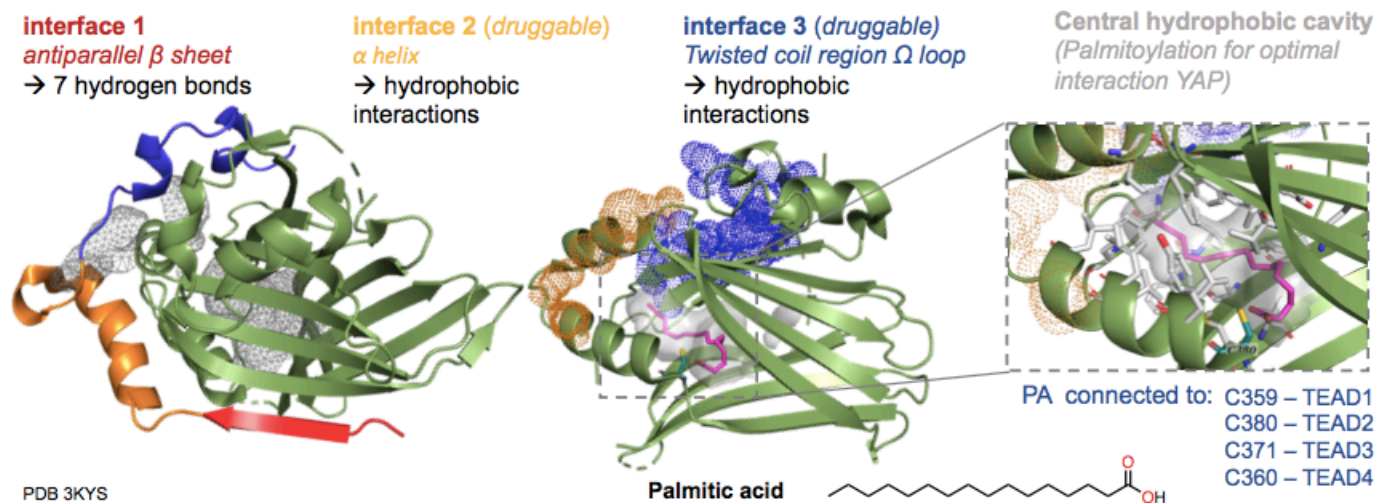


Figure 1.4 Interaction entre YAP et TEAD. TEAD et les différentes composantes de YAP sont présentées en vert. Les interactions 1, 2 et 3 sont représentées respectivement en rouge, jaune puis bleu.⁷

TEAD possède une cavité centrale hydrophobe qui a deux faces, dont une qui est exposée au solvant, mais qui est bloquée par l'interface 1 agissant comme barrière d'accès pour tout ligand. La deuxième face se trouve profondément à l'intérieur du domaine de TEAD et contient sept résidus polaires/chargés.⁸ Dans cette cavité se situe une molécule d'acide palmitique. Une réaction d'auto-palmitoylation mène à la formation d'une liaison covalente avec une cystéine de TEAD et le substrat palmitylCoA. L'auto-palmitoylation de TEAD est nécessaire afin d'obtenir un complexe transcriptionnellement actif. En effet, l'absence de cette palmitoylation engendre une diminution d'affinité avec YAP, ce qui mène à une

réduction de l'activité du complexe. De plus, la palmitoylation semble procurer de la stabilité à la structure de TEAD et moduler son niveau d'expression.¹⁰

1.2 Implication de la voie de signalisation dans les maladies

La voie Hippo, lorsque dérégulée, peut entraîner plusieurs formes de cancer. En effet, le complexe YAP-TEAD initie une transcription de type oncogénique qui mène à une prolifération cellulaire excessive, au développement de tumeurs et de métastases et à la résistance aux médicaments chimiothérapeutiques.⁸ La surexpression des facteurs YAP et TEAD est en lien avec la résistance thérapeutique et avec de mauvais pronostiques dans les cancers thoraciques, gastriques, cutanés, osseux, gynécologiques et cérébraux. Cependant, le mécanisme d'action de cette surexpression n'est pas connu. Plus précisément, la localisation de YAP dans le noyau et l'expression élevée de celui-ci dans des cancers du foie, des ovaires, des poumons, du côlon et de la prostate indique qu'il agit comme un proto-oncogène, un moteur clé de la tumorigenèse. Dans son cas, TEAD favorise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose. Sa surexpression peut mener à des niveaux élevés du gène mésothelin, un marqueur tumoral bien connu. En plus, sa régulation à la hausse est liée au cancer du sein, de la prostate et gastrique.⁴

La surcroissance d'organes due à une régulation déficiente de la voie Hippo a été démontrée avec un modèle de souris. En effet, la croissance aberrante des organes est due à deux défauts dans les cellules mutantes. Premièrement, la prolifération cellulaire est dérégulée, ce qui signifie que les cellules mutantes se multiplient plus rapidement que les cellules de type sauvage et ne cessent de proliférer, même lorsque les tissus ont atteint leur taille optimale. Deuxièmement, les cellules mutantes ont la capacité d'évader les signaux apoptotiques et de ce fait d'éviter l'élimination des cellules en excès. Ceci est possible à cause de la transcription à la hausse des facteurs pro-survie comme ceux de la famille du lymphome des cellules B 2 (BCL-2). Il a aussi été démontré que dans les cellules hépatiques, une cible de YAP, le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) et l'inducteur angionénique riche en cystéine 61 (Cyr61) inhibent l'apoptose. Ces anomalies combinées mènent à la surproduction de cellules et en outre à des organes de tailles aberrantes. Chez les souris mutantes, une surexpression de YAP ou une diminution d'activité des kinases MST ou LATS rend le foie ou le cœur de plus grosse taille. Cela a été démontré pour les kinases MST1 et MST2, où un niveau élevé de YAP a entraîné la surcroissance du foie avec l'apparition de carcinomes, chez les souris (Figure 1.5).³

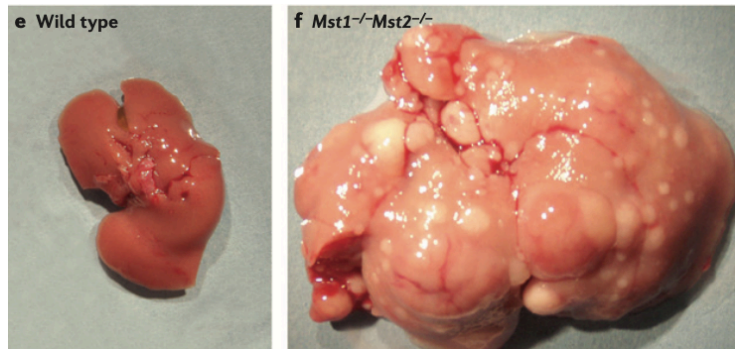


Figure 1.5 Foie de souris normal à 6 mois (gauche) et foie de souris mutant pour les double kinases MTS à 6 mois (droite).³

Il a été conclu que la voie de signalisation Hippo, chez les souris et les mouches à fruit, peut mener à la prolifération excessive de cellules et à la surcroissance de tissus due à la dérégulation de YAP. Cependant, les études génétiques ont aussi démontré que YAP ne stimule pas forcément la croissance chez tous les tissus, deux exemples étant la peau et l'intestin. La transformation de cellules normales en cellules tumorales, à cause du dérèglement de YAP, implique également d'autres phénotypes que ceux discutés plus haut, comme l'acquisition de caractéristiques de cellules souches cancéreuses, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), l'inhibition de la sénescence et la résistance aux médicaments (Figure 1.6).³

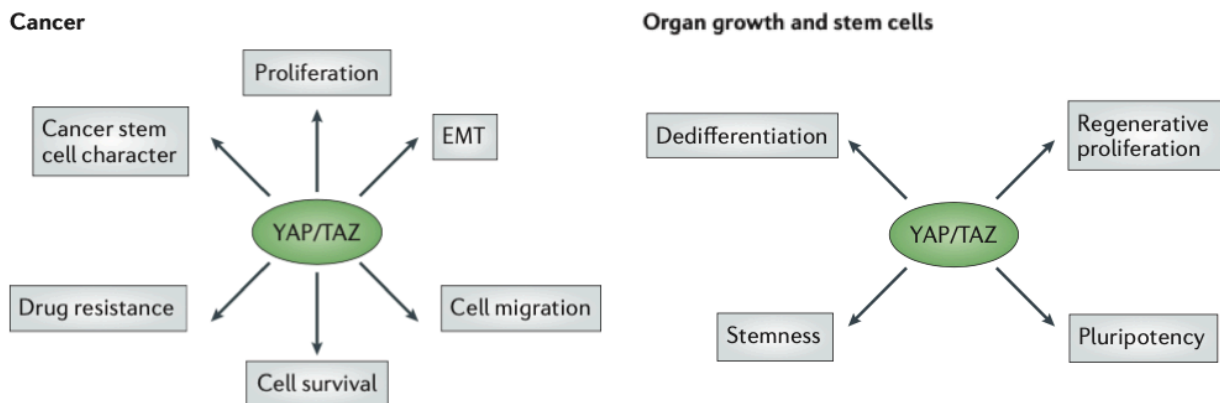


Figure 1.6 Fonction cellulaire de YAP et TAZ dans le cas de cellules cancéreuses (gauche) et de cellules normales (droite).³

La régulation aberrante de YAP se fait selon plusieurs mécanismes différents. Par exemple, la coamplification du remodeleur de chromatine ACTL6A et de p63 augmente l'expression de YAP qui peut aussi subir une monométhylation par SET1A qui bloque son exportation du cytoplasme et favorise la tumorigénèse. De plus, la localisation et l'activité du cofacteur peut être modulée par le transfert de signaux d'autres voies de signalisation, via les kinases PI3 (PI3K) et les kinases dépendantes des phosphoinositides qui inhibent la voie Hippo. La perturbation des régulateurs en amont, soit NF2 et LATS, peut également mener à l'activation de YAP puisqu'ils agissent comme des suppresseurs de tumeurs.⁹

Le silençage de la majorité des gènes induit par YAP et l'atténuation de la surcroissance induite par celui-ci suggère que TEAD est une cible de valeur pour le développement de médicaments. De plus, il a été démontré que TEAD n'est pas essentiel à l'homéostasie des tissus chez l'adulte, ce qui diminue le risque d'effets secondaires lors du ciblage de ce facteur de transcription. Pris en compte, ces résultats indiquent qu'empêcher la formation du complexe YAP-TEAD peut abolir la fonction oncogénique de YAP.¹⁰

1.3 Approches thérapeutiques

Tel que mentionné plus haut, la voie de signalisation Hippo est dérégulée dans plusieurs cancers. De ce fait, il est important d'investiguer différentes approches thérapeutiques afin de modifier le comportement des cellules pour prévenir le développement de la maladie. Pour ce faire, l'utilisation de composés pharmacologiques, comme des petites molécules, peut permettre la modulation de l'expression des gènes en ciblant les effecteurs clés de la voie de signalisation, par exemple les facteurs de transcription. Il existe plusieurs méthodes pour contrôler l'activité de la voie Hippo; trois seront abordées dans cette section. Dans un premier temps, nous aborderons la rétention de YAP dans le cytoplasme afin d'empêcher son interaction avec TEAD. Dans un second temps, nous regarderons l'utilisation de composés ciblant directement les interfaces entre YAP et TEAD pour prévenir les interactions protéine-protéine. Finalement, l'emphase de ce projet consistera à éviter l'union entre YAP et TEAD par la liaison de petites molécules dans la cavité centrale hydrophobe de la protéine TEAD.⁸

1.3.1 Prévention de la migration de YAP dans le noyau

Il a été démontré que réduire l'activité de YAP permet de limiter la croissance des cellules tumorales et donc de prévenir la formation de tumeurs. Inactiver complètement YAP affecte d'autres propriétés des cellules cancéreuses comme leur sensibilité à la chimiothérapie, leur potentiel métastatique et l'inhibition

de la formation de cellules souches cancéreuses. De ce fait cibler YAP pourrait moduler le fonctionnement, la survie, l'expansion et la propagation des cellules cancéreuses.³

Les kinases du cœur de la voie Hippo agissent comme des suppresseurs de tumeurs en phosphorylant YAP et en empêchant ainsi sa migration dans le noyau. Lorsqu'activées, NF2/Merlin, MST1/2 et LATS1/2 phosphorylent YAP et mènent à sa rétention dans le cytoplasme et ensuite à sa dégradation. Pour avoir un effet thérapeutique, il faudrait donc activer ces kinases. En effet, tenter de les inhiber aurait l'effet inverse en augmentant l'activité transcriptionnelle du chemin signalétique. Un autre problème avec l'inhibition de ces kinases est leur non-sélectivité dans la voie Hippo.⁹ Finalement, dans le but d'activer celles-ci, de petites molécules agonistes devraient être conçues, mais très peu d'options sont disponibles à cet effet.³ Il y existe quelques exemples de modulateurs qui phosphorylent YAP, comme l'épinéphrine et le glucagon qui augmentent l'activité des kinases LATS1/2, ce qui résulte en une augmentation de la phosphorylation du cofacteur. Ceci est fait à travers le signal au récepteur RCPG, tout comme la dihydrexidine, un agoniste pour les récepteurs de dopamine, qui mène au même effet.¹¹ Il est aussi possible de phosphoryler YAP directement par l'entremise de la dobutamine, qui cible les récepteurs agonistes bêta-adrénergiques et mène à son accumulation dans le cytoplasme.¹²

Certains médicaments peuvent générer un effet similaire. L'un d'eux est la Vertéporfine (**1**) (Figure 1.7), aussi appelé Visudyne, qui est une porphyrine ayant la capacité de se lier au cofacteur YAP, perturber son interaction avec TEAD et réduire l'expression des gènes CTGF, Cyr61 et axl.⁹ Cela se fait en régulant à la hausse une protéine chaperonne de YAP, soit la 14-3-3alpha qui empêche YAP de migrer vers le noyau et l'amène ainsi à se faire dégrader dans le cytoplasme.¹³ La Vertéporfine est un médicament approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) qui traite la dégénérescence maculaire humide liée à l'âge (AMD) en agissant comme un photostabilisant via l'action d'oxygène singulet à courte durée de vie et des radicaux oxygènes réactifs qui vont causer un dommage local aux vaisseaux, afin d'activer l'agrégation de plaquettes.¹⁴ Cependant, la Vertéporfine a plusieurs cibles. Elle oligomérisse des protéines impliquées dans des processus cellulaires majeurs comme l'autophagie et le maintien du cytosquelette. De ce fait, ce médicament peut être considéré seulement comme un point de départ dans la découverte d'inhibiteurs. On peut en dire autant du composé **2** (Figure 1.7) qui agit aussi sur YAP en diminuant son expression et l'activité transcriptionnelle du complexe. Par contre, son mode d'inhibition et son mécanisme restent inconnu.⁹

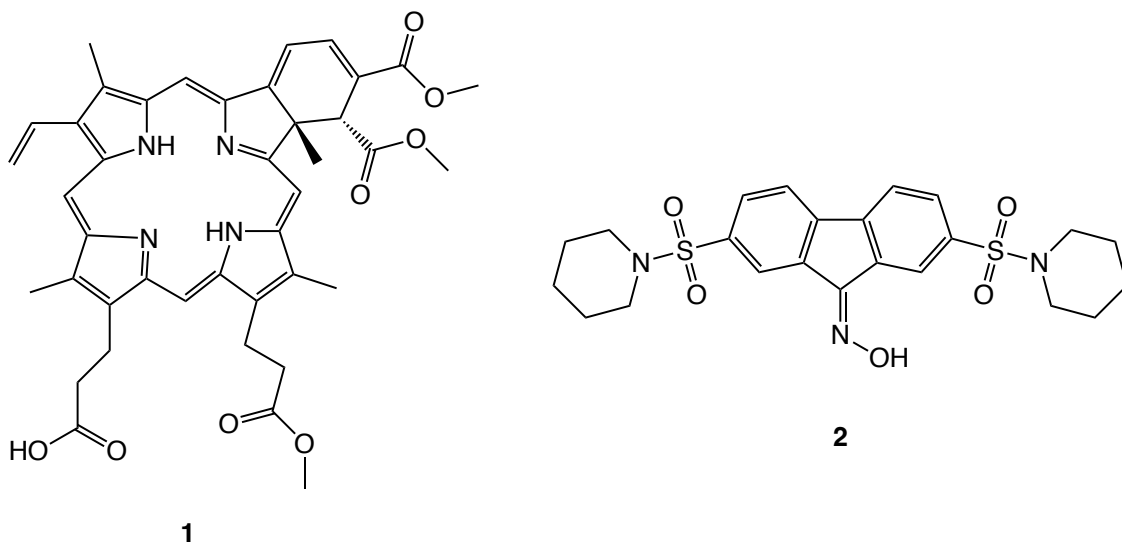


Figure 1.7 Molécule de Vertéporfine **1** (gauche) et composé **2** (droite).⁹

Finalement, il est possible de provoquer l'exportation nucléaire de YAP par l'utilisation de latrunculin A et B et de cytochalasin D. Ces composés sont des déstabilisateurs de la F-actine, qui est un important régulateur de la localisation de YAP, mais cette méthode est compliquée puisque le cytosquelette d'actine est nécessaire pour plusieurs fonctions cellulaires basiques. D'autres molécules mènent aussi à cette exportation tel que l'inhibiteur de la kinase de myosine à chaîne légère ML-7, l'inhibiteur non-musculaire de la myosine II blebbistain, l'inhibiteur de la kinase des ROH Y27632 et l'inhibiteur de ROH, la toxine botulique C3.³

1.3.2 Prévention de l'interaction protéine-protéine

La régulation de la transcription des gènes de la voie Hippo peut être modulée par des perturbateurs qui ciblent les interactions protéine-protéine entre YAP et TEAD. Cette stratégie peut mener au silençage de la transcription des gènes.

Il a été démontré que des peptides ou des petites molécules peuvent occuper l'interface 2 entre YAP et TEAD. Ce type de molécules imitent l'hélice alpha de YAP, l'empêchant ainsi de se lier à TEAD. La limite de cette méthode est le fait que la liaison de l'interface 2 faite entre l'hélice alpha de YAP et de TEAD est faible, ce qui rend l'élaboration d'un peptide efficace difficile.⁸ Cependant, pour pallier ce problème, l'utilisation d'une protéine hélice VGLL permet d'effectuer le design et la synthèse de peptides agrafes,

c'est-à-dire des peptides qui prennent la structure d'une hélice alpha tel que le composé **6** aussi appelé super-TDU (Tableau 1-1). Ce qui rend cette option différente est le fait que l'hélice de la protéine VGLL contient un motif VxxHF et non un motif LxxLF comme YAP, ce qui rend sa liaison avec TEAD plus forte. Les protéines VGLL sont des corégulateurs de liaisons avec TEAD qui imitent la structure des interfaces 2 et 3 de YAP. Ainsi, il est possible de combiner les résidus clés de ces deux interfaces pour synthétiser un peptide qui pourra interagir avec les deux interfaces, en considérant que l'interface 3 augmente la force de la liaison avec TEAD. Ce concept a été prouvé avec un modèle de souris où la prolifération cellulaire a été inhibée dans les cellules cancéreuses de l'estomac (Figure 1.8).¹⁵

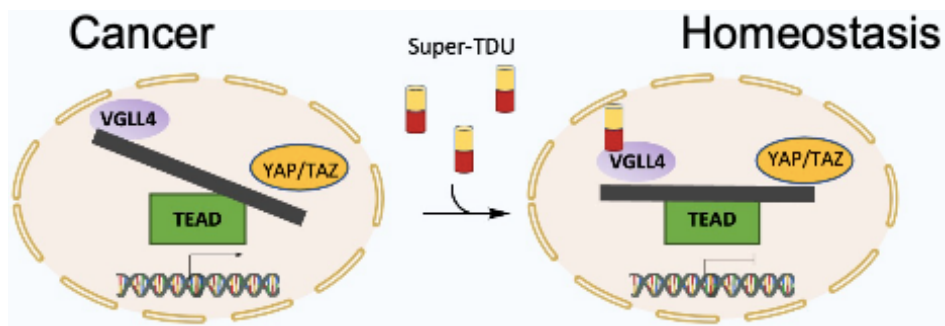
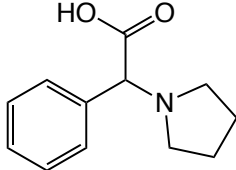
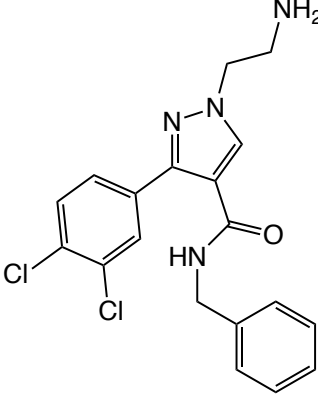


Figure 1.8 Domaine de VGLL4, soit TDU, qui agit comme inhibiteur de YAP pour la suppression de tumeur gastrique en perturbant l'interaction YAP-TEAD.¹⁵

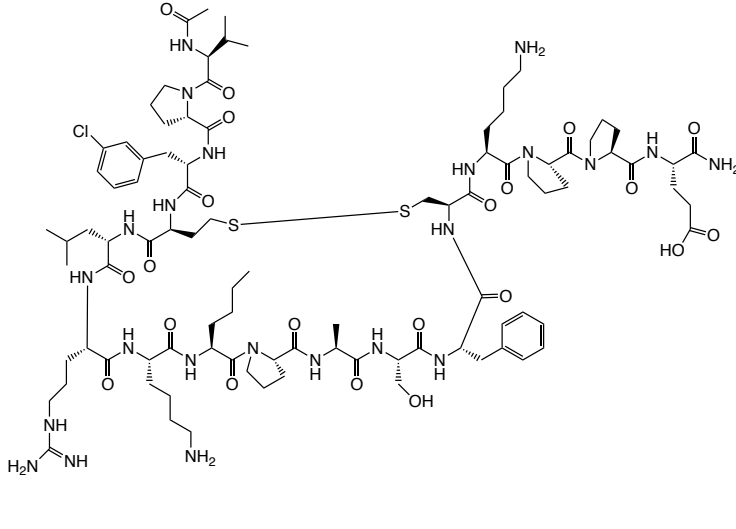
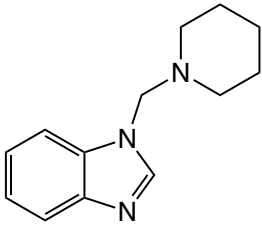
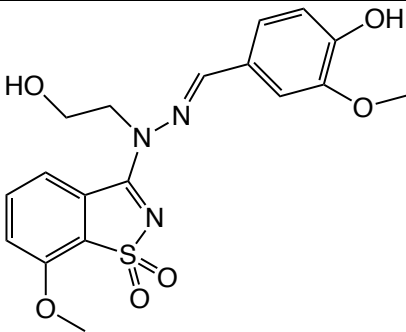
Une autre façon de perturber l'interaction entre les facteurs de transcription est l'utilisation de peptides denses en cystéine (CDP) tel que **3**. Comme dans l'exemple précédent, ceux-ci vont se lier à l'interface 2 de TEAD avec un motif LxxLF, alors que des ponts disulfures stabilisent la conformation de la protéine. D'autres petites molécules peuvent aussi se lier à l'interface 2 tel que présenté dans le tableau ci-dessous 1.1.⁸

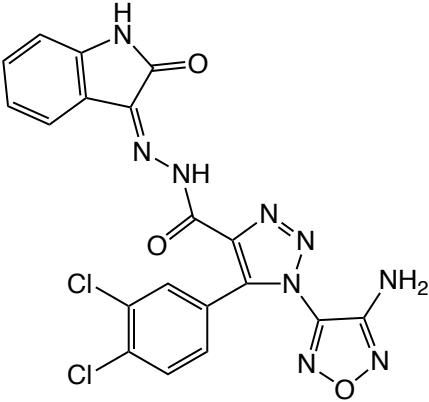
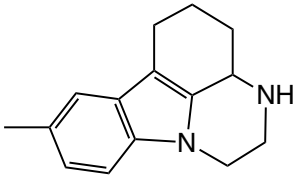
Tableau 1-1 Molécules se liant à l'interface 2 du complexe YAP-TEAD.⁸

Numéro de composé	Nom ou numéro du composé selon l'article de référence	Structure
3	TB2G1	Peptide dense en cystéine
4	-	
5	Pyrazole trisubstitué	
6	Super-TDU	Peptide de fusion YAP-VGLL4

Il est également possible de cibler l'interface 3 pour modifier la liaison YAP-TEAD. Cette technique s'avère plus efficace, car c'est l'interface la plus importante de toutes. Plusieurs molécules et certains peptides cycliques, tel que le composé **7**¹⁶, de structure bobine torsadée, dérèglent l'interaction YAP-TEAD par l'optimisation de liens disulfures et la modification de certains résidus de l'interface 3 de YAP.⁸ Plusieurs d'entre eux sont présentés dans le tableau ici-bas.^{8,17}

Tableau 1-2 Molécules se liant à l'interface 3 du complexe YAP-TEAD.

Numéro du composé	Nom ou numéro du composé selon l'article de référence	Structure
7 ¹⁶	-	
8 ⁸	Fragment de liaison TEAD	
9 ⁸	Dioxo-benzoisothiazole	

<p>10⁸</p>	<p>Triazole carbohydrazide</p>	
<p>11¹⁷</p>	<p>-</p>	
<p>6⁸</p>	<p>Super-TDU</p>	<p>Peptide de fusion YAP-VGLL4</p>

1.3.3 Prévention de l'interaction YAP-TEAD via la cavité centrale hydrophobe

TEAD possède une cavité centrale dans son domaine de transactivation qui peut lier des petites molécules, tel que démontré par Pobbati et collaborateurs. En effet, ceux-ci ont démontré la capacité de liaison de la poche via un criblage qui a montré que l'acide flufénamique **12** se lie à TEAD. Ils ont aussi effectué des études de dépistage de fragments qui ont déterminé que la cavité possède une géométrie et une hydrophobicité optimale pour la liaison de petits composés.¹⁸ De plus, l'importance de la présence d'une molécule d'acide palmitique a été confirmée en démontrant que l'inhibition de la palmitoylation de TEAD affecte son affinité avec YAP, entraînant une diminution de son activité transcriptionnelle.¹⁹

Cette cavité permet de cibler directement TEAD. De plus, les résidus présents étant conservés à travers les quatre homologues, il est en principe possible de tous les inhiber avec une seule molécule. Certaines caractéristiques des molécules se liant dans la poche hydrophobe sont communes. Par exemple, les composés sont flexibles et adoptent une conformation en forme de « L », celle-ci étant la même que celle du ligand naturel, c'est-à-dire l'acide palmitique. Ils sont également composés d'une portion hydrophobe et d'une portion hydrophile qui pointe vers l'ouverture de la poche qui est exposée au solvant. Les résidus

polaires et chargés sont situés dans ce même emplacement de la cavité et forment des liens H avec les petites molécules liées (Figure 1.9).⁸

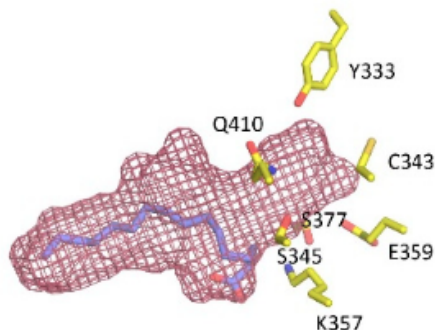


Figure 1.9 Poche centrale de TEAD (rouge) et les résidus polaires et chargés la tapissant (jaune).⁸

Tel que mentionné ci-dessus, l'un des inhibiteurs connus de TEAD, et rapporté par Pobbati, est l'acide flufénamique (FA) (Figure 1.10), un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien. Celui-ci se lie dans la cavité centrale hydrophobe empêchant la palmitoylation de TEAD par des interactions hydrophobes avec les résidus de la cavité centrale en plus de faire une liaison hydrogène entre l'acide carboxylique du FA et le groupe amide de la chaîne principale de la cystéine réactive de la poche. L'activité du complexe est affectée par cette liaison, mais ni l'interaction avec YAP, ni la conformation n'est changée. De plus, l'acide flufénamique réduit la prolifération cellulaire et la transcription de gènes associés à la voie Hippo.⁸ D'autre part, un analogue de FA, l'acide niflumique **13** (NA) (Figure 1.10), se lie aussi à TEAD, avec une plus grande affinité, mais sans perturber la formation du complexe protéique. Un test de luciférase a confirmé que l'acide niflumique compromet bien l'activité de TEAD.²⁰

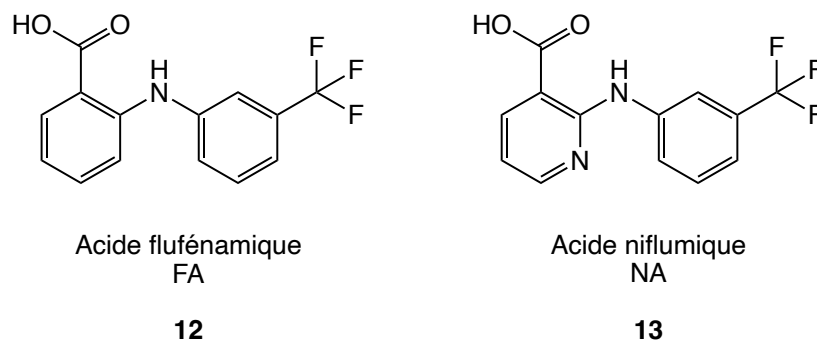
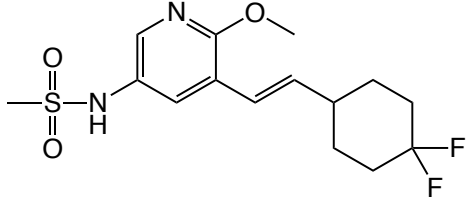
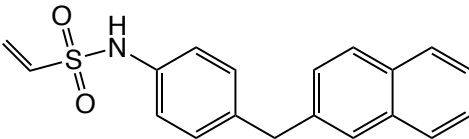
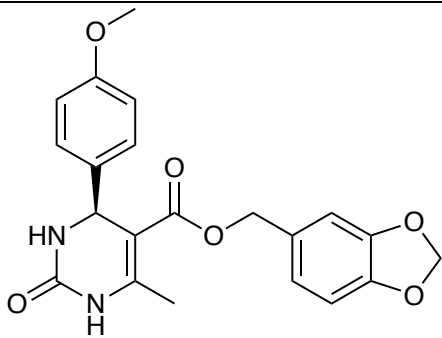


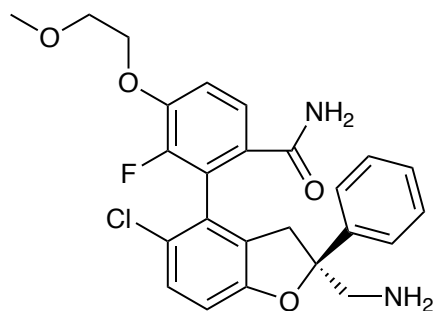
Figure 1.10 Structure de l'acide flufénamique **12** (gauche) et de l'acide niflumique **13** (droite).¹⁹

D'autres petites molécules peuvent aussi occuper la cavité centrale hydrophobe pour empêcher la palmitoylation et entraver l'activité de TEAD sans agir comme des perturbateurs d'interaction protéine-protéine. Un exemple est le composé **14** (Tableau 1-3) composé d'une sulfonamide exposée au solvant qui interagit avec la chaîne principale de la cystéine 380, connectée à une pyridine qui fait un lien hydrogène avec la chaîne latérale de la glutamine 410. Similaire à l'acide palmitique, le composé **14** occupe la poche centrale de TEAD, lui permettant d'agir comme un répresseur transcriptionnel et de réduire l'expression de gènes associés à YAP et par le fait même la croissance de tumeurs. La même chose peut être dite des vinylsulfonamides qui ont été employés avec succès pour cibler la cystéine présente dans la cavité de TEAD. Le plus puissant d'entre eux est le **15** (Tableau 1-3) qui inhibe l'auto-palmitoylation de TEAD avec un IC₅₀ de 200 nM, mais qui n'a qu'un effet minime sur l'interaction entre les deux protéines.⁸ Un autre composé, le **16** aussi appelé JM7 inhibe l'activité transcriptionnelle du complexe avec un IC₅₀ de 972 nM/L sans modifier la localisation de YAP-TEAD. Il empêche la palmitoylation de TEAD en se liant directement avec lui et de ce fait régulant négativement la stabilité du facteur de transcription. Gridnev et ses collaborateurs ont aussi démontré que JM7 inhibe la prolifération, la migration cellulaire et la formation de colonies dans les lignées cellulaires de cancer ovarien et de cancer du sein lorsque YAP est surexprimé.²¹

Tableau 1-3 Molécules se liant dans la cavité centrale hydrophobe.

Numéro de composé	Nom ou numéro du composé selon l'article de référence	Structure
14 ⁸	-	
15 ⁸	Vinylsulfonamide DC-TEADin02	
16 ²¹	JM7	

Plusieurs études effectuées au cours des dernières années ont mené à des molécules agissant comme perturbateurs allostériques en se liant dans la cavité hydrophobe de TEAD et en inhibant ainsi son auto-palmitoylation, troublant par conséquent l'interaction avec son cofacteur.⁸ Un des exemples est le composé **17** qui a un IC₅₀ de 2,7 nM suite à un test TR-FRET. Il se lie à TEAD, entre autres par l'entremise de liaison van der Waals entre les deux méthylènes et les chaînes latérales des résidus V266 et L296. **17** permet la diminution de l'expression des gènes associés au complexe protéique dans les cellules NCI-H2052 et diminue aussi la prolifération des cellules (Figure 1.11).²²

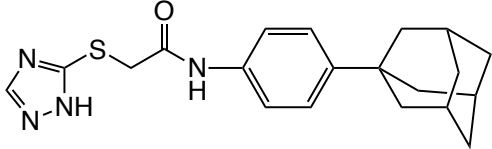
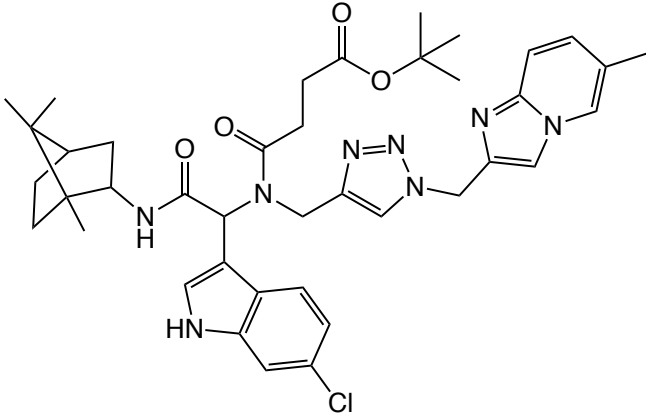
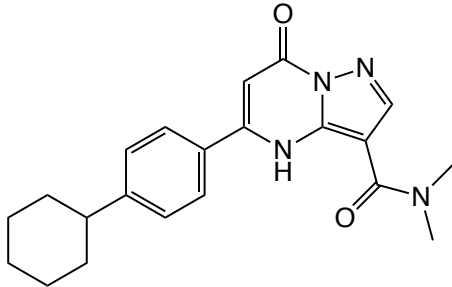


17

Figure 1.11 Structure du composé **17**, perturbateur d'interaction protéine-protéine.²²

Certains perturbateurs d'interaction protéine-protéine peuvent inhiber la palmitoylation de TEAD de manière non-covalente. L'un de ces composés est le MGH-CP1 (**18**) (Tableau 1-4), qui a été testé suite à un criblage et qui a en plus la capacité de troubler l'interaction YAP-TEAD. Il occupe la poche centrale en adoptant une conformation en « L », similaire à l'acide palmitique, et interagit selon des contacts hydrophobes. La fonction triazole de la molécule est située non loin de la cystéine réactive, proche de l'entrée de la cavité tandis que le groupement adamantyle se situe profondément dans la poche palmitique. Le groupe carbonyle, qui agit comme connecteur, fait un lien hydrogène avec la chaîne latérale de la glutamine 410. Il a été démontré que le MGH-CP1 réduit l'activation des gènes, plus particulièrement CTGF et Cyr61, avec un IC₅₀ de 83 nM lors d'un test cellulaire Gal4-TEAD1. Malheureusement, ce composé a de mauvaises propriétés pharmacocinétiques puisqu'il est rapidement éliminé lorsqu'ingéré.²³ Une autre molécule qui vient se lier dans la cavité centrale est le composé **19** (Tableau 1-4) identifié à partir d'une bibliothèque concentrée sur les indoles codées par l'ADN. Il agit comme perturbateur du complexe protéique via le résidu tryptophane qui médie les interactions entre les protéines et qui est présent dans la cavité de TEAD. Cependant, le composé **19** n'inhibe pas l'expression du gène CTGF, mais son efficacité est meilleure lorsqu'il est combiné avec une kinase inhibitrice de la voie Hippo. Également, les molécules avec un échafaudage dihydropyrazolo pyrimidine peuvent occuper la poche hydrophobe. Ils sont constitués d'une partie hydrophobe qui s'enfonce dans la cavité ainsi que d'une partie hydrophile exposée au solvant et sont assez flexibles pour adopter une conformation similaire à l'acide palmitique. L'un des exemples est le composé **20** (Tableau 1-4).⁸

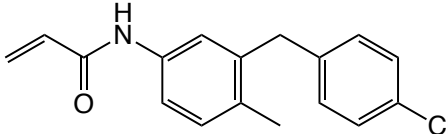
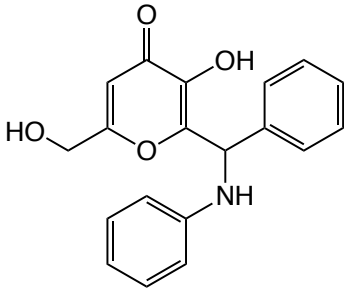
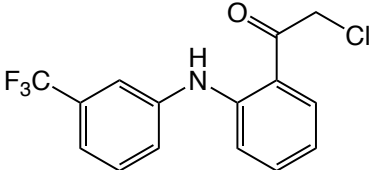
Tableau 1-4 Composés prévenant les interactions protéine-protéine en se liant dans la cavité centrale hydrophobe de manière non-covalente.⁸

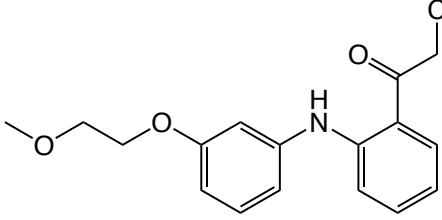
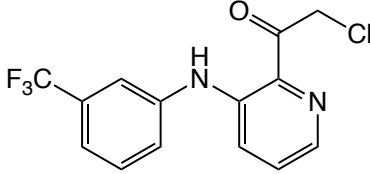
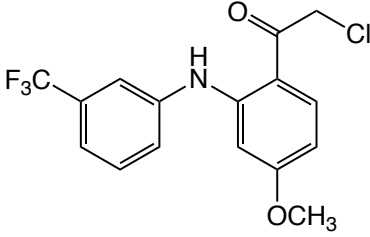
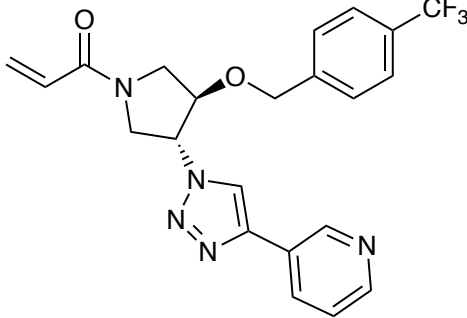
Numéro du composé	Nom ou numéro du composé selon l'article de référence	Structure
18	MGH-CP1	
19	-	
20	Dihydropyrazolo pyrimidine	

D'autres perturbateurs forment un lien covalent avec la cystéine dans la poche centrale. L'un d'eux est le composé **21** (Tableau 1-5) qui a la capacité de troubler l'interaction avec le cofacteur et d'inhiber la palmitoylation de TEAD. La molécule possède un groupe de tête acrylamide et ses propriétés anti-tumorigènes ont été vérifiées. Cependant, **21** aurait besoin d'un meilleur analogue puisqu'il présente une toxicité rénale. De plus, des analogues de l'acide Kojic **22** (Tableau 1-5) ont été identifiés comme ayant la

capacité de se lier de manière covalente à la cystéine dans la cavité et de ce fait déstabiliser TEAD. Cela pourrait prévenir son interaction avec YAP.⁸ Meroueh et ses collaborateurs ont aussi synthétisé un dérivé de l'acide flufénamique, soit le composé **23** (Tableau 1-5) qui forme un lien covalent avec la cystéine menant à une perte d'affinité de TEAD pour YAP. Plusieurs dérivés ont également été synthétisés pour mener à différents composés qui agissent comme inhibiteurs covalents, à des degrés variés, comme le **24**, **25** et **26** (Tableau 1-5).²⁰ Également, le composé **27**, qui adopte une forme en Y, a été rapporté comme étant un perturbateur de l'association entre YAP et TEAD en se liant de manière covalente dans la poche palmitique. Il inhibe la palmitoylation du facteur de transcription, ce qui mène à une diminution de la transcription des gènes CTGF et Cyr61. **27** peut aussi réduire l'activité transcriptionnelle des cellules de manière dose-dépendante avec un IC₅₀ de 56 nM.²⁴

Tableau 1-5 Composés prévenant les interactions protéine-protéine en se liant dans la cavité centrale hydrophobe de manière covalente.

Numéro du composé	Nom ou numéro du composé selon l'article de référence	Structure
21 ⁸	K-975	
22 ⁸	Analogue d'acide Kojic Composé 19	
23 ²⁰	TED-347	

24 ²⁰	TED-548	
25 ²⁰	TED-551	
26 ²⁰	TED-589	
27 ²⁴	MYF-03-69	

1.4 Travaux de notre laboratoire

Tel que discuté précédemment, puisque le complexe YAP-TEAD est impliqué dans de nombreux cancers, il y a un intérêt élevé pour des molécules inhibant son activité. Les travaux de Pobatti et de ses collaborateurs ont démontré que l'acide flufenamique peut inhiber l'autopalmitoylation de TEAD. Dans le but d'augmenter l'inhibition de l'acide flufenamique et dans l'espoir d'obtenir une sonde moléculaire, notre groupe a collaboré avec le SGC à Toronto afin de synthétiser des dérivés de l'acide flufenamique ayant une meilleure affinité avec TEAD et une activité inhibitrice supérieure. Des études sur la relation

entre la structure et l'activité (SAR) de l'acide flufénamique ont ainsi été réalisées pour obtenir un composé plus efficace. L'acide flufénamique a aussi été choisi à cause de ses propriétés de type médicamenteux, sa structure moléculaire simple et idéale pour des dérivatisations, son mode d'inhibition réversible et son affinité pour TEAD.

Pour faciliter l'étude de SAR, l'acide flufénamique a été divisé en quatre sections : 1) le cycle aromatique de gauche; 2) le connecteur central étant l'amine intercyclique dans le FA; 3) le cycle aromatique de droite; et 4) l'acide carboxylique (Figure 1.12). L'importance de l'acide carboxylique et de la fonction amine secondaire comme lien entre les deux cycles a été démontrée par la structure co-cristalline à haute résolution qui révèle un pont hydrogène entre ces deux fonctions. Les interactions faibles entre la fonction carboxylique et la cystéine 380 ainsi qu'avec la fonction amine terminale de la lysine 357 renforcent le caractère essentiel de l'acide carboxylique dans la liaison à TEAD. La superposition des structures co-cristallines de l'acide palmitique et de l'acide flufénamique montre la présence d'un espace vide non exploité appelé poche hydrophobe. De ce fait, il apparaît que le groupement trifluorométhyle en R₁ pourrait être substitué par d'autres groupements afin de remplir cette cavité lipophile.¹⁰

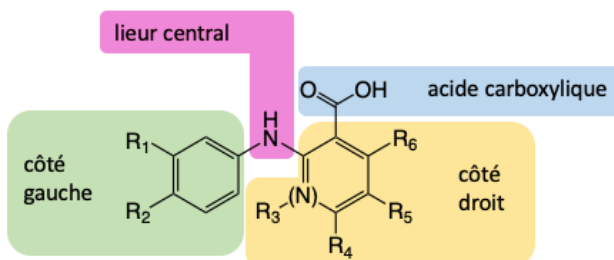
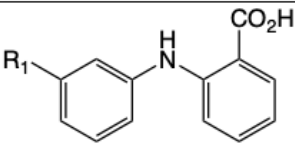


Figure 1.12 Division de l'acide flufénamique en quatre sections.¹⁰

L'utilisation d'une méthode de diffusion statique différentielle de la lumière (DLS) a été privilégiée afin d'évaluer l'affinité des composés synthétisés avec TEAD. Cette méthode consiste à suivre l'augmentation de la température d'agrégation lors de la liaison du composé à TEAD. En premier lieu, l'optimisation de l'aromatique de gauche a été réalisée en remplaçant le trifluorométhyle par un plus petit groupement, soit un hydrogène à la position R₁. S'en suit une augmentation de la taille de ce substituant par une chaîne alkyle allant de un jusqu'à sept carbones. L'hydrogène à la position R₁ ne stabilise pas le facteur de

transcription tout comme pour le méthyle et l'éthyle au vu de leur température d'agrégation très basse. Cependant, elle augmente lorsque la chaîne de carbones augmente de trois à sept carbones, ce qui montre que plus la molécule possède une taille similaire à la chaîne alkyle de l'acide palmitique, plus elle possède une forte affinité avec TEAD. En effet, plus la température d'agrégation augmente, plus le substituant est toléré et stabilise TEAD. Par exemple, la chaîne propyle a un ΔT_{agg} de 2,9 °C tandis que la chaîne heptyle a un ΔT_{agg} de 6,0 °C, soit environ deux fois plus élevé. L'insertion de groupements encombrants tels qu'un phényle ou un *tert*-butyle est aussi tolérée par la cavité palmitique.¹⁰

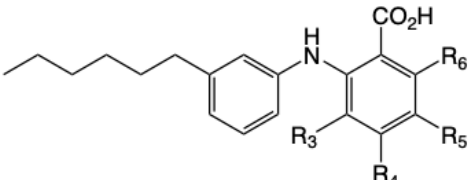
Tableau 1-6 Température d'agrégation des dérivés de l'acide flufénamique pour la position R₁.¹⁰

		
Numéro du composé	R ₁	ΔT_{agg} (°C)
28	H	0,2
29	Me	0,1
30	Et	-0,1
31	<i>n</i> -Pr	2,9
32	<i>n</i> -Bu	3,4
33	<i>n</i> -Pent	4,4
34	<i>n</i> -Hex	5,2
35	<i>n</i> -Hept	6,0
36	<i>i</i> -Pr	2,6
37	<i>t</i> -Bu	1,5
38	Ph	2,1

Considérant que le composé **34** a une des températures d'agrégation les plus élevées, il a été utilisé pour la suite des études sur l'aromatique de droite. L'espace étant limité dans la poche de ce côté de la molécule, un fluor a été placé aux positions R₃ jusqu'à R₆ et tel qu'indiqué par la température d'agrégation, il est bien toléré puisque le ΔT_{agg} est de 5,2 °C lorsque le fluor est en position R₃, augmente à 6,2 °C lorsque le fluor est en R₅ et finalement à 6,4 °C lorsqu'en position R₄ et R₆. Étant donné que la position R₆ pointe vers l'interface 1, celle-ci est d'intérêt particulier puisqu'une fonctionnalité pourrait perturber cette interface

en plus de sa liaison dans la cavité centrale. C'est pourquoi un méthyle a été placé en R₆ et est bien accepté avec une température d'agrégation de 5,2 °C (Tableau 1-7). Le composé clé à la suite de ces études est le **43** correspondant au **LM98** (Figure 1.13) pour lequel il a été démontré suite à plusieurs tests, dont un de spectrométrie de masse, qu'il inhibe la palmitoylation de TEAD.¹⁰

Tableau 1-7 Température d'agrégation des dérivés de l'acide flufénamique pour la position R₃, R₄, R₅ et R₆.¹⁰

					
Numéro du composé	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	ΔT_{agg} (°C)
39	H	H	H	H	5,2
40	F	H	H	H	5,2
41	H	F	H	H	6,4
42	H	H	F	H	6,2
43 (LM98)	H	H	H	F	6,4
44	H	H	H	Me	5,2

En effet, un co-cristal (Figure 1.13) du domaine de liaison à YAP de TEAD2 (résidus entre 221 et 451) et **LM98** a été obtenu, démontrant que le composé se lie bien dans la même poche palmitique que l'acide flufénamique ne causant pas de modification structurale. La chaîne hexyle de **LM98** étant ancrée dans la même poche que l'acide palmitique. De plus, l'interaction entre TEAD2 et **LM98** est principalement hydrophobe. Il y a également des liaisons H qui se forment entre le groupe carboxylate et l'amide de la Cys380 et aussi des interactions d'empilement entre le phényle de gauche de **LM98** et le Phe233 de TEAD2.¹⁰

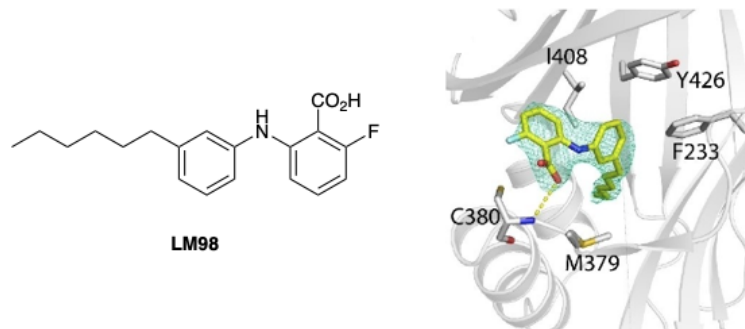


Figure 1.13 Structure du composé **LM98** (gauche) et structure co-cristalline de TEAD2 et **LM98** (droite). Le composé **LM98** est en bâtonnets jaunes et la densité électronique est représentée par un maillage vert, TEAD2 est représenté en gris et les résidus importants sont en bâtonnets gris. L'interaction polaire est représentée en pointillé jaune.¹⁰

Quelques tests ont été effectués, l'un d'eux permettant de démontrer l'inhibition de l'activation de TEAD dans les cellules. Pour ce faire, un test à double luciférase a été fait montrant que les cellules HEK293 traitées avec des concentrations croissantes de **LM98** durant 24 heures ont un niveau d'activation de TEAD inférieur comparativement aux cellules traitées avec l'acide niflumique. Finalement, dans le but de déterminer l'effet du composé sur l'expression de gènes cibles de la voie de signalisation Hippo, le niveau de CTGF et Cyr61 a été mesuré par RT-qPCR. Le composé **18** soit MGH-CP1, a été utilisé comme référence puisqu'il a été rapporté qu'il réduit l'expression de ces gènes et l'acide niflumique a été utilisé comme contrôle négatif. Le traitement de cellules cancéreuses du sein a révélé une réduction significative de la transcription de CTGF et Cyr61 après 48 heures lorsque traité avec **LM98**, un niveau comparable avec le composé **18**. Aucun effet n'a été observé, lorsque les cellules ont été en contact avec NA (Figure 1.14).¹⁰

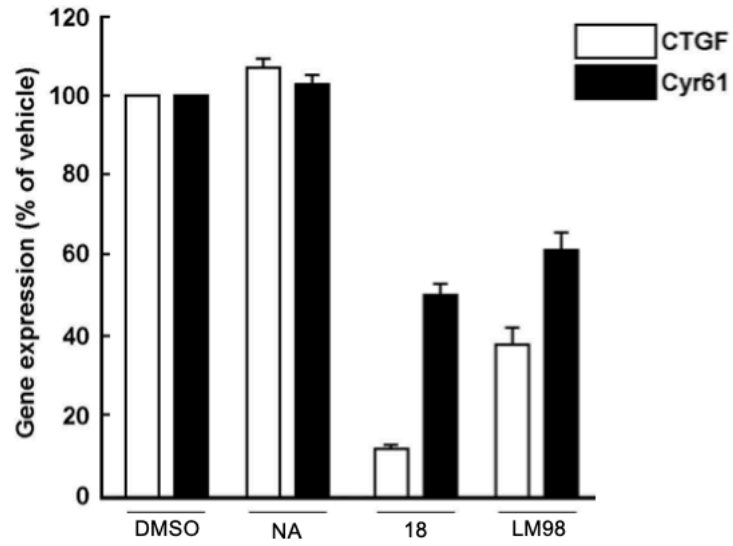


Figure 1.14 Niveau d'expression des gènes CTGF et Cyr61 lorsque traité avec le DMSO, l'acide niflumique, le composé 18 et **LM98**.¹⁰

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE D'UN COMPOSÉ BIOTINYLÉ

Ce chapitre rend compte des différentes méthodes élaborées afin d'insérer une biotine sur le composé **LM98** dans le but d'élucider son mécanisme d'action.

2.1 Synthèse d'un composé biotinylé

L'importance de trouver une petite molécule capable de se lier au complexe YAP-TEAD afin d'empêcher la transcription aberrante des gènes a été discuté plus haut. Les travaux effectués dans notre laboratoire ont mené au composé **LM98** qui se lie fortement à TEAD, tel que démontré par un test biophysique de DSLS et par des études de ¹⁹F-RMN. Des études de spectrométrie de masse ont par ailleurs démontré que le composé compétitionne directement avec l'acide palmitique, suggérant que celui-ci se lie dans la poche palmitique. Fait intéressant, malgré que le composé inhibe l'auto-palmitoylation de TEAD, un test de type nano-BRET a démontré que le complexe YAP-TEAD se forme néanmoins. Cependant, des études qPCR ont montré que **LM98** réduit l'expression des gènes associés à TEAD, tels que CTGF et Cyr61 tout en empêchant la migration de cellules cancéreuses MDA-MB-231.¹⁰ Au vu de ces expériences, il apparaît essentiel de prouver hors de tout doute que l'activité observée dans des cellules en présence du composé provient réellement d'une interaction avec la cible TEAD et non d'un mécanisme alternatif compensatoire de la cellule. Par ailleurs, l'élucidation du mécanisme d'action faciliterait la préparation de composés de seconde génération plus puissants et avec une meilleure activité cellulaire. Par conséquent, le but de ma maîtrise était de synthétiser un homologue biotinylé de **LM98** afin de démontrer, par des expériences de pull-down, que celui-ci interagit effectivement avec TEAD dans les cellules. Pour ce faire, une biotine serait attaché à **LM98** qui serait ensuite ajouté à un lysat cellulaire et via une analyse par immunotransfert dans le cadre d'un pull-down, TEAD serait détecté montrant qu'il y a bien une liaison entre TEAD et **LM98**.

La biotine est un composé souvent utilisé pour déterminer la cible d'action de molécules ayant une activité biologique, qu'elle soit de nature covalente ou non-covalente. Elle provient de la vitamine B7 et a la capacité de se lier, avec une constante de liaison très élevée de 10¹⁵M, aux protéines d'avidine, à la streptavidine et à la neutravidine. L'avidine lie les sondes biotinylées de manière non-covalente et très stable, mais dû au niveau élevé de glycosylation, entraîne beaucoup d'interactions non spécifiques, à cause de la charge élevée. Afin de les éviter, la streptavidine et la neutravidine sont utilisées puisque leur point isoélectrique est plus haut, ce qui résulte en une charge plus basse. Également, la streptavidine est plus

employée puisqu'elle abrite une plus large portion de la biotine, ce qui maximise la liaison entre les deux, comparativement à l'avidine qui subit une perte de liens hydrogènes, donc une conformation plus désordonnée.²⁵

Il existe plusieurs façons d'utiliser un composé biotinylé: 1) une incubation avec des cellules vivantes, lysées et extraites; 2) une incubation avec du lysat cellulaire directement et extrait avec de la neutravidine; 3) une incubation avec de l'avidine, de la streptavidine ou de la neutravidine immobilisée pour obtenir une matrice non covalente suivie de l'ajout du lysat cellulaire.²⁵

Un analogue biotinylé peut être utilisé dans plusieurs milieux différents, que ce soit dans des cellules vivantes dans le cadre d'une expérience ou dans un lysat cellulaire. Il est aussi possible de marquer, dans leur environnement natif, des biomolécules. L'un des défis de ce processus, suivant les études SAR et l'optimisation de la molécule, est de déterminer à quel endroit insérer la biotine. En effet, il peut s'avérer difficile puisqu'elle est volumineuse, ce qui peut interférer avec les interactions entre la cible et la petite molécule d'intérêt (Figure 2.1). De plus la biotine est peu soluble dans l'eau (22 mg/100 mL d'eau), ce qui peut entraîner des problèmes lorsque le composé est délivré dans le milieu physiologique. Afin de pallier ce problème, il est possible d'insérer un connecteur de polyéthylène glycol (PEG) qui peut augmenter la solubilité dans l'eau (Figure 2.1). Il existe deux méthodes pour ajouter un PEG, soit directement sur la petite molécule avant l'ajout de la biotine, soit connecté sur la biotine, avant de la lier à la petite molécule. L'ajout de la biotine sur la molécule d'intérêt vient souvent à la fin d'une synthèse afin de conserver la solubilité des intermédiaires.²⁵

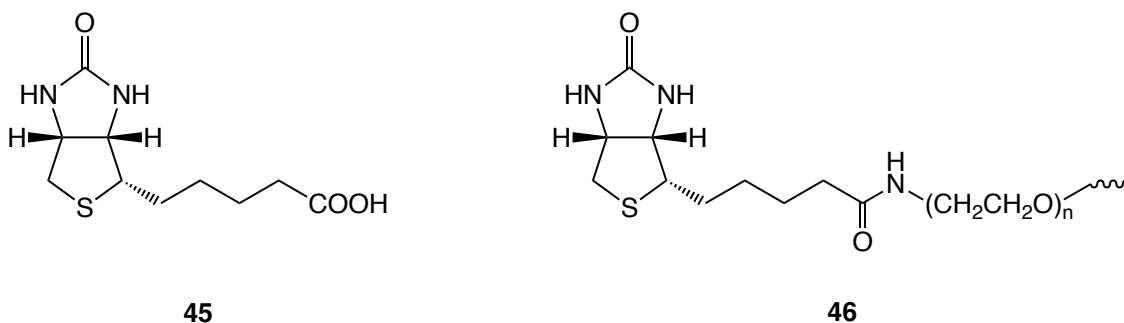


Figure 2.1 Structure de la biotine (gauche) et structure de la biotine avec un exemple de chaîne PEG (droite).²⁵

Il existe une large gamme de dérivés de biotine avec plusieurs fonctionnalités différentes qui sont commercialement disponibles. Les groupes fonctionnels qui sont généralement utilisés dans les molécules médicamenteuses et les sondes chimiques sont les plus populaires comme les fonctions amino, alcène, azoture, acide carboxylique, cétone, aldéhyde. De ce fait, il existe une multitude de méthodes pour conjuguer la biotine et le composé actif, comme par la formation d'une liaison ester, amide, imine, oxime, hydrazone, par la réaction de clic, par une Diels-Alder, par une addition [3+2], par une réaction de couplage croisé catalysée au palladium, etc.²⁵

Tel que discuté plus haut, la biotine doit être placée sur le composé à un endroit stratégique. Étant donné que l'amine centrale et l'acide carboxylique de **LM98** forment des ponts hydrogènes, entre autres entre le carbonyle et la cystéine 380, ces fonctions ne sont pas envisageables pour l'installation de la biotine. De plus, puisque la chaîne hexyle du côté gauche de l'aromatique mime l'acide palmitique, elle se retrouve profondément ancrée dans une poche lipophile de TEAD et n'est donc pas accessible pour installer la biotine. Par contre, Meroueh et ses collaborateurs ont essayé cette approche en synthétisant le composé biotinylé **47** sur l'aromatique de gauche. Celui-ci est dérivé du composé **23**, un alternatif de l'acide flufénamique, qui diminue l'affinité de TEAD pour YAP. La biotine a été installée afin de confirmer la liaison covalente formée entre **23** et TEAD par une expérience de pull-down de streptavidine (Figure 2.2).²⁰

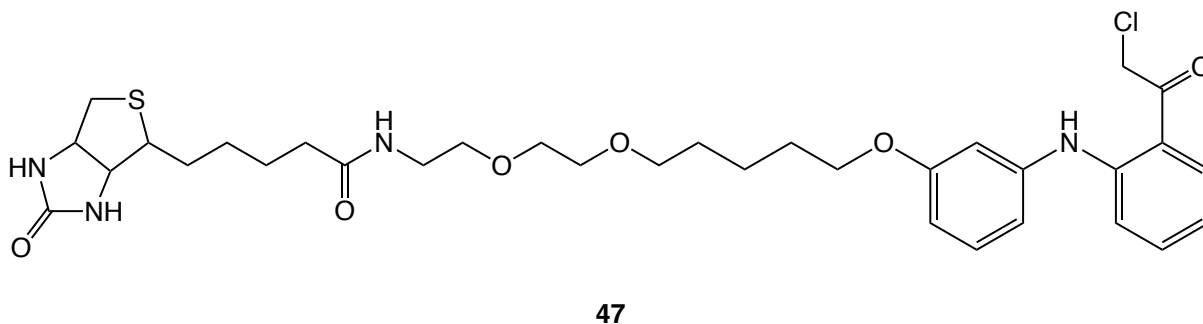


Figure 2.2 Composé biotinylé dérivé de TED-347, synthétisé par Meroueh et ses collaborateurs.²⁰

Dans notre cas, la position R₆ de l'aromatique de droite où se situe le fluor sur **LM98** apparaît être une cible plus intéressante puisqu'en plus de pointer vers l'interface 1, un méthyle est toléré à cette position. Avec ce choix stratégique, reste donc à déterminer par quelle connectivité la biotine sera greffée sur la molécule. Plusieurs choix sont possibles, mais trois sont présentés dans ce chapitre, soit l'amination

réductrice pour obtenir le composé **48**, le couplage peptidique pour générer le dérivé **49** et la réaction de clic pour fournir la molécule **50** (Figure 2.3).

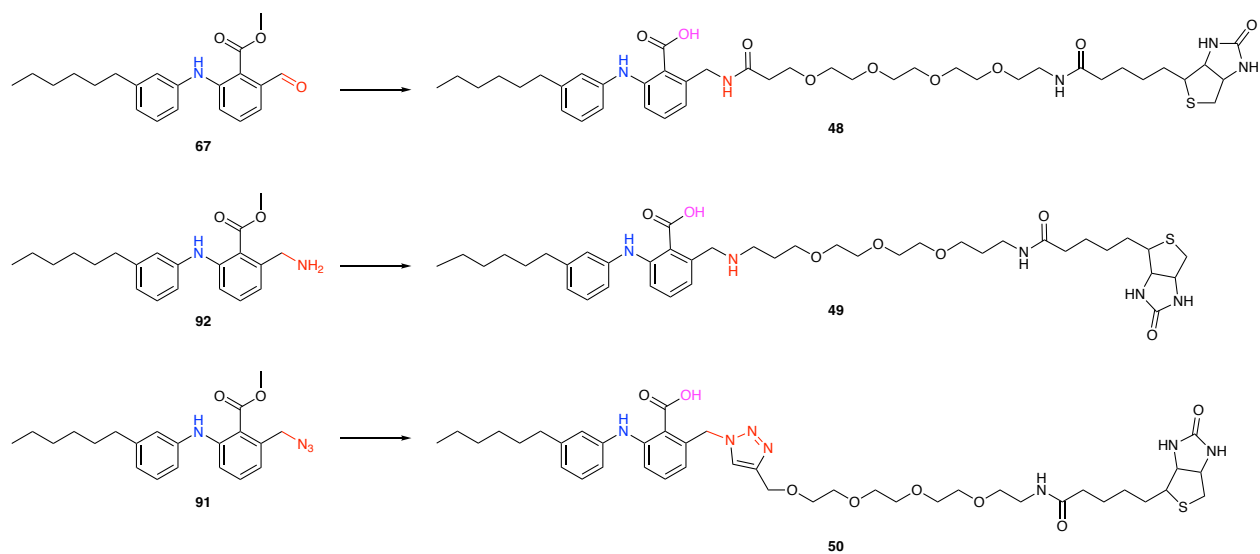


Figure 2.3 Stratégies possibles pour l'installation de la biotine : par amination réductrice (en haut), par couplage peptidique (au milieu) ou par la réaction de clic (en bas).

En premier lieu, il faut considérer que, lors de la synthèse de l'analogue biotinylé de **LM98**, la fonction d'acide carboxylique doit être protégée, dans ce cas-ci par un méthyle, et ensuite être relâchée à la toute fin par une réaction de saponification. Cette étape étant présente aussi lors de la synthèse de **LM98** présenté ci-bas (Schéma 2.1).¹⁰

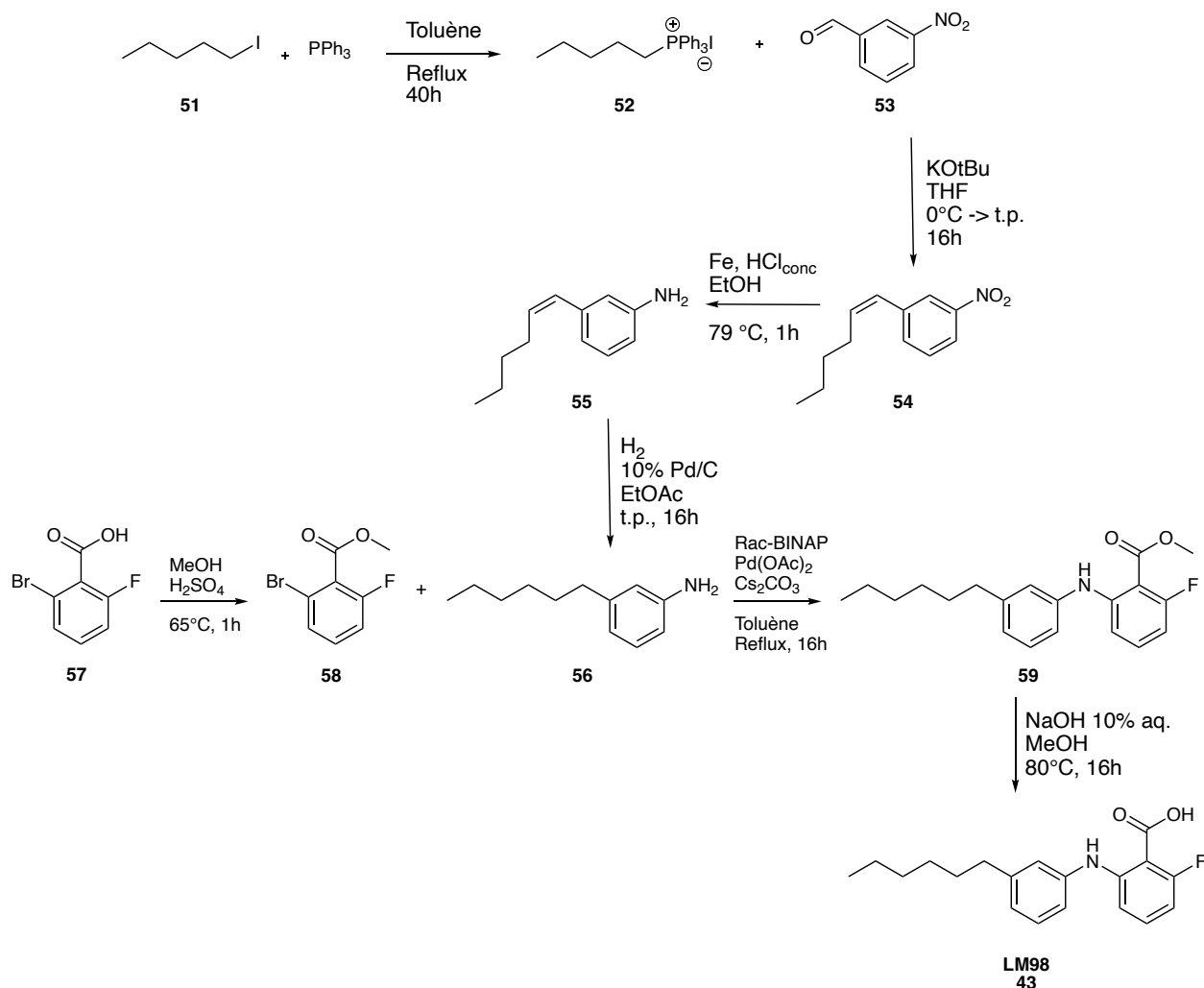


Schéma 2.1 Synthèse de **LM98**.¹⁰

Cela veut donc dire que la fonction liant la molécule à la biotine ne peut pas être de type ester puisqu'elle sera clivée lors de la saponification. Tenant en compte cette spécification, un premier chemin synthétique impliquant l'installation de la biotine par une réaction finale d'amination réductrice a été élaboré. Tout d'abord, mentionnons que toutes les synthèses débutent par la formation d'un ylure de phosphonium entre un iodopentane et une triphénylphosphine dans le toluène à reflux, pendant 18 heures. Par la suite, une réaction de Wittig est effectuée avec le 3-nitrobenzaldehyde (Schéma 2.2) afin d'obtenir un alcène et finalement une hydrogénation dans le méthanol avec du palladium activé au charbon et de l'hydrogène est faite pour obtenir la partie de gauche du produit, le composé **AY45** (Schéma 2.3).

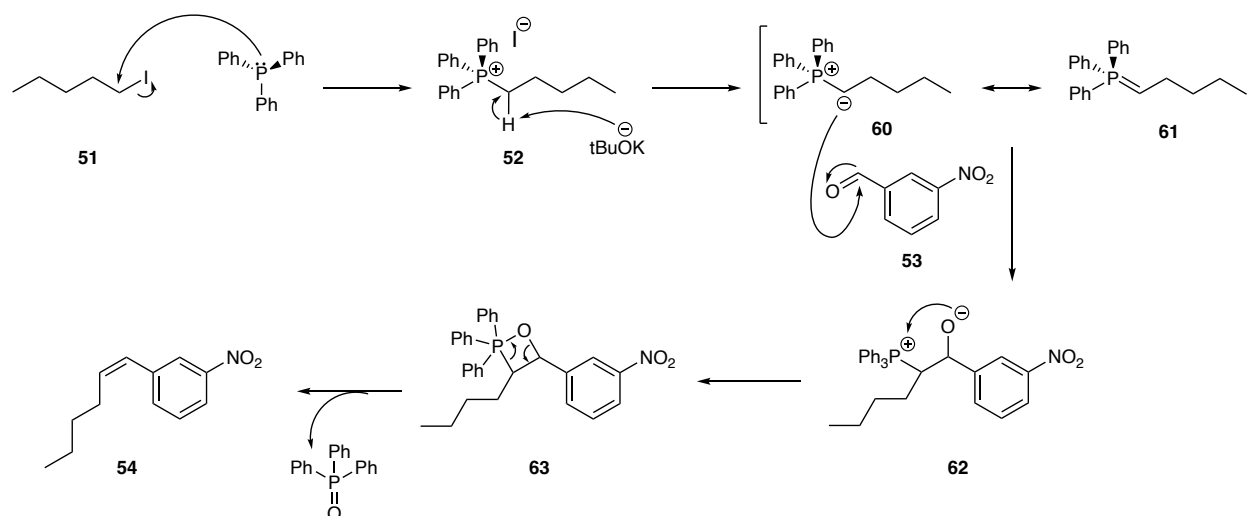


Schéma 2.2 Mécanisme de la réaction de Wittig.

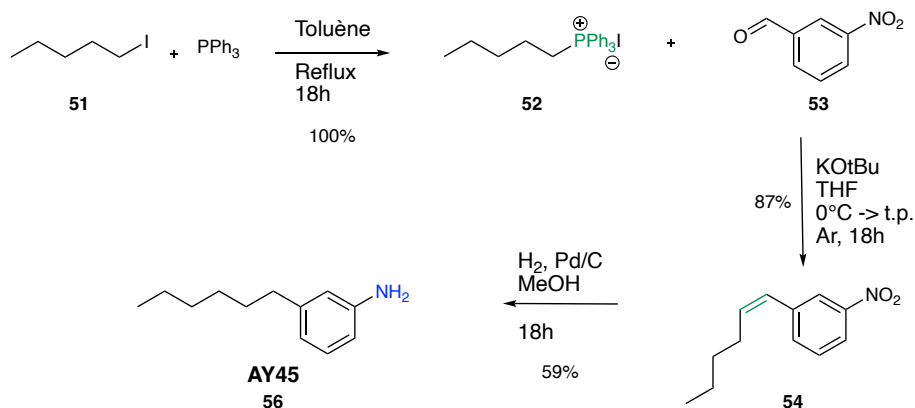


Schéma 2.3 Chemin synthétique pour la synthèse de la 3-hexylaniline **56**, caractérisée dans l'Annexe A.

Pour ce qui est de la partie de droite, elle est synthétisée en commençant avec le 2-bromo-6-méthylbenzoate de méthyle **64**, un composé commercialement disponible. Dans un premier temps, le méthyle benzylique est dibromé sous des conditions radicalaires en utilisant le NBS comme agent bromant et le benzoyle de peroxyde comme initiateur radicalaire. Le dibromo **65** ainsi obtenu est ensuite converti en aldéhyde par traitement avec le nitrate d'argent dans l'isopropanol à température pièce pendant 5 heures. Par la suite, il est projeté de réaliser l'assemblage de la partie de gauche **56** avec celle de droite **66** par un couplage de type Buchwald afin d'obtenir une molécule similaire à **LM98** en principe prête pour

une ligation avec la biotine via une réaction d'amination réductrice. Une réaction de saponification permettrait finalement de libérer l'acide carboxylique et d'obtenir la molécule biotinylée souhaitée. Toutefois, toutes les tentatives de couplage de Buchwald entre **56** et **66** ont été sans succès, possiblement dû à une interférence de la fonction aldéhyde avec la réaction (Schéma 2.4). En effet, la formation d'une imine entre l'amine et l'aldéhyde pourrait être la source du problème. Cependant dans ce cas-ci, ce sont les produits de départ qui ont été récupérés, soit le **56** et **66**. De plus, les spectres RMN ont indiqué qu'aucune autre liaison n'a eu lieu entre les substrats.

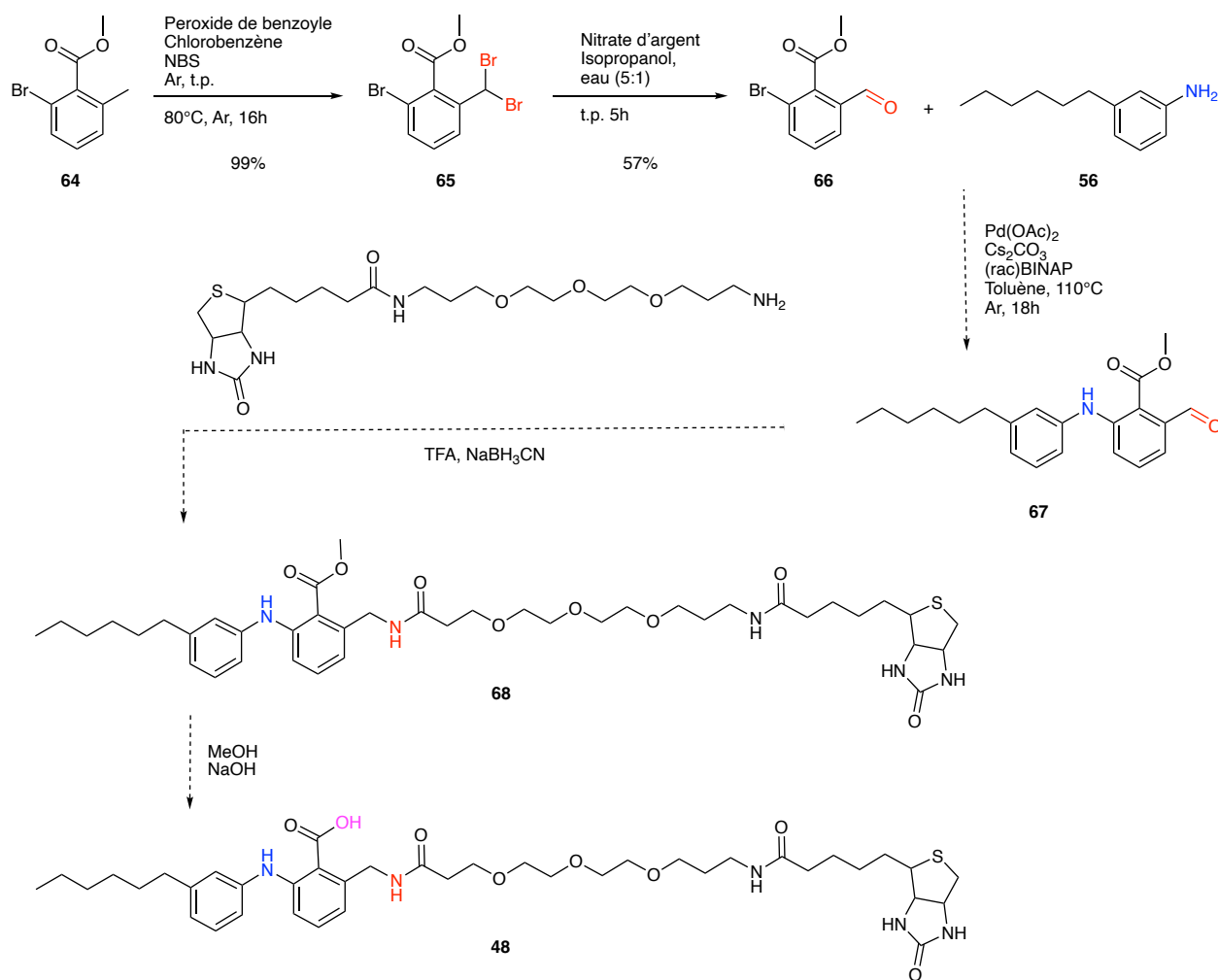


Schéma 2.4 Route synthétique pour la synthèse du composé biotinylé par l'amination réductrice. Composés **65** et **66** caractérisés dans l'Annexe A.

Alors, une nouvelle route impliquant la protection de l'aldéhyde sous forme d'acétal a été tentée. Pour ce faire, l'aldéhyde **66** a été converti en acétal **73** par un traitement avec l'éthylène glycol en présence d'acide *para*-toluène sulfonique à reflux de toluène (Schéma 2.5).

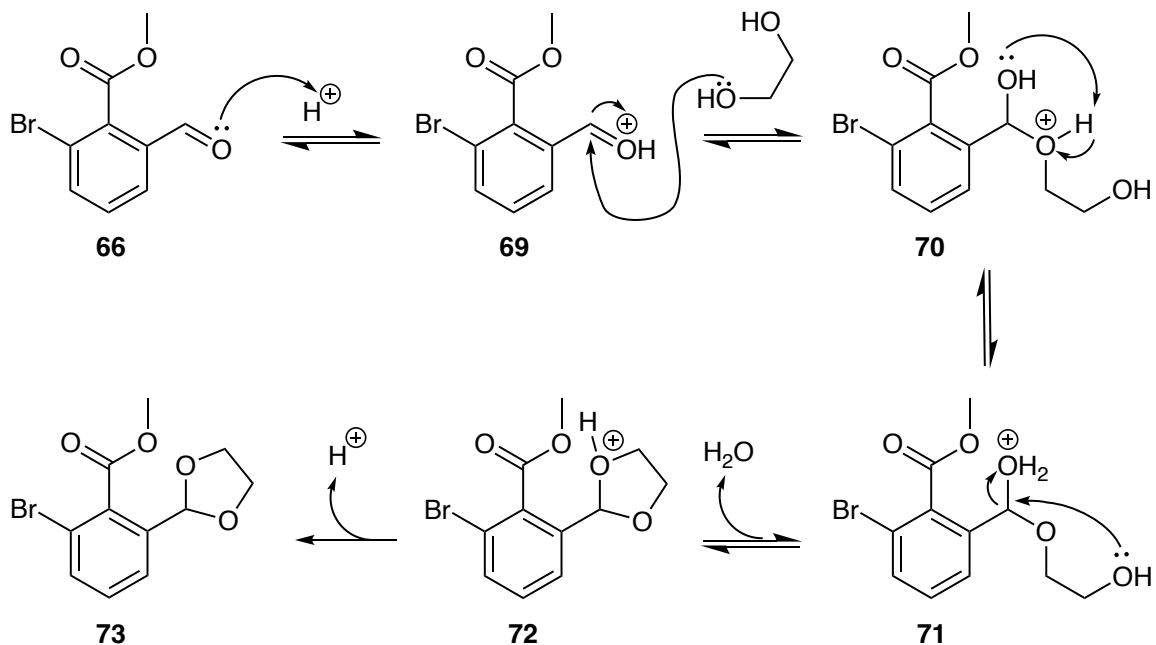


Schéma 2.5 Mécanisme de la protection de la fonction aldéhyde en acétal.

Malheureusement, la réaction de couplage entre l'acétal **73** et l'aniline **56** a été une fois de plus infructueuse. Puisque ces résultats semblent suggérer que la fonction aldéhyde serait problématique, nous avons pensé la remplacer par une fonction alcool qui serait, à un stade ultérieur, transformée en aldéhyde, par exemple, par traitement avec le réactif de Dess-Martin. Pour ce faire, une réduction de l'aldéhyde doit être performée pour obtenir l'alcool primaire **75** et ensuite faire le couplage de Buchwald pour obtenir le **76**. Dans l'éventualité où la fonction alcool interférerait avec le couplage au cuivre, celle-ci pourrait être protégée par un benzyle **77** et ensuite être déprotégée sous des conditions standard une fois le couplage au cuivre accompli (Schéma 2.6).

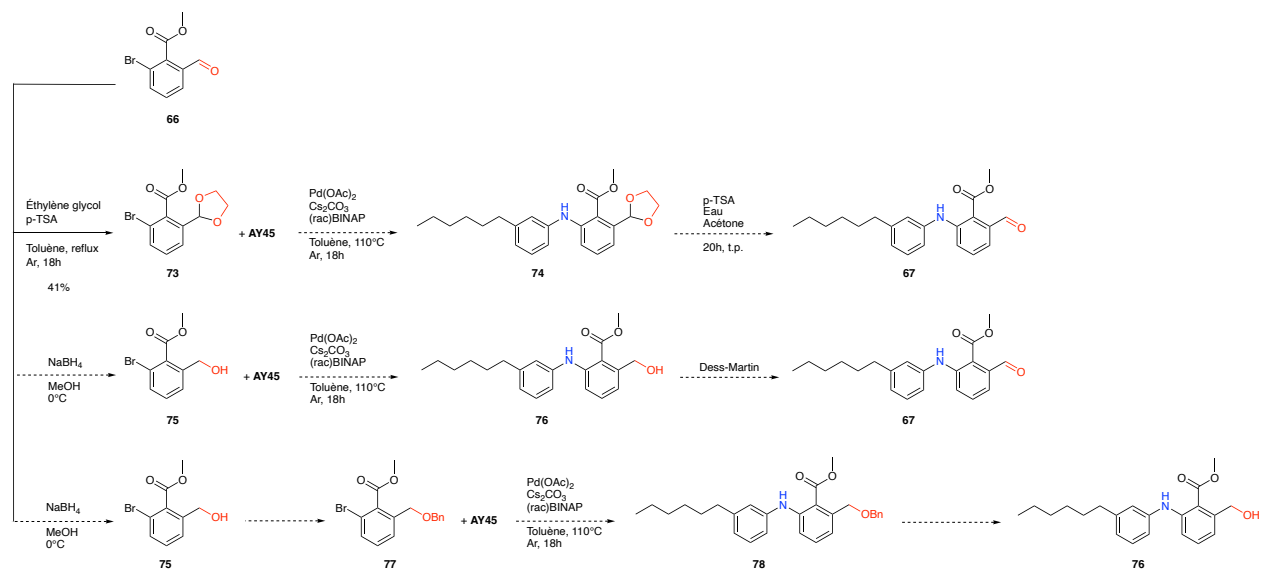


Schéma 2.6 Routes possibles pour le couplage de Buchwald, par l'acétal (en haut), par une fonction alcool (au milieu), et par un alcool protégé (en bas). Composé **73** caractérisé dans l'Annexe A.

Malheureusement, la réduction de l'aldéhyde **66** avec du tétrahydroborate de sodium n'a pas mené à l'alcool souhaité, mais plutôt au composé lactone **80** provenant de la réaction de l'alcool avec l'ester menant à la formation d'un cycle à cinq membres par une attaque de type 5-exo-trig (Schéma 2.7). En effet, l'oxygène chargé négativement n'est pas protoné par l'alcool du méthanol, mais réagit plutôt avec le carbonyle de l'ester. Il aurait été intéressant de tenter, ultérieurement, la réaction avec un autre agent réducteur comme le DIBAL-H, ce qui aurait permis de vérifier si la réduction fonctionne avec un agent différent et si la formation de la lactone provient donc de la réaction avec le NaBH_4 ou de l'interférence de l'ester. Dans ce cas-ci, l'utilisation du LiAlH_4 ne serait pas possible puisqu'il réduirait aussi, en théorie, la fonction ester ce qui n'est pas désiré dans cette situation.

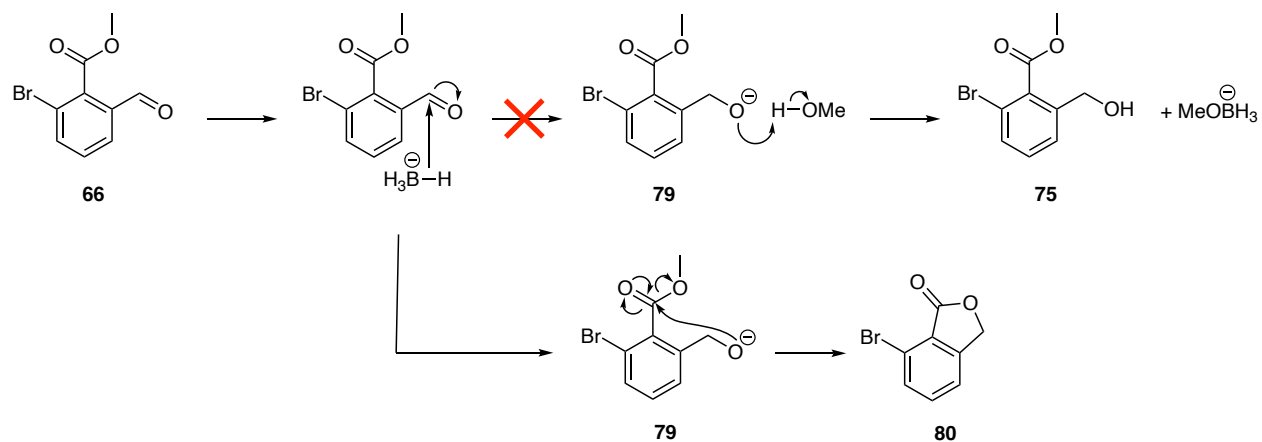


Schéma 2.7 Mécanisme de la réduction d'aldéhyde en alcool (en haut) et mécanisme de la formation de lactone (en bas).

Quoique ce composé ne soit pas celui qui était initialement désiré, il est tout de même intéressant puisque le couplage avec le **AY45** pourrait potentiellement mener au dérivé **81**. Il suffirait par la suite de procéder à l'ouverture du cycle avec le dichlorure de triphénylphosphine pour installer un chlore en R_6 . L'intermédiaire **82** serait ensuite transformé en azoture **83** après que l'acide eut été converti en ester méthylique (Schéma 2.8). L'azoture constituerait alors un groupe idéal pour l'installation de la biotine par une réaction de type clic. Cette route n'a toutefois pas été explorée au-delà du couplage de Buchwald puisqu'un autre chemin synthétique ayant moins d'étapes a été élaboré plus loin.

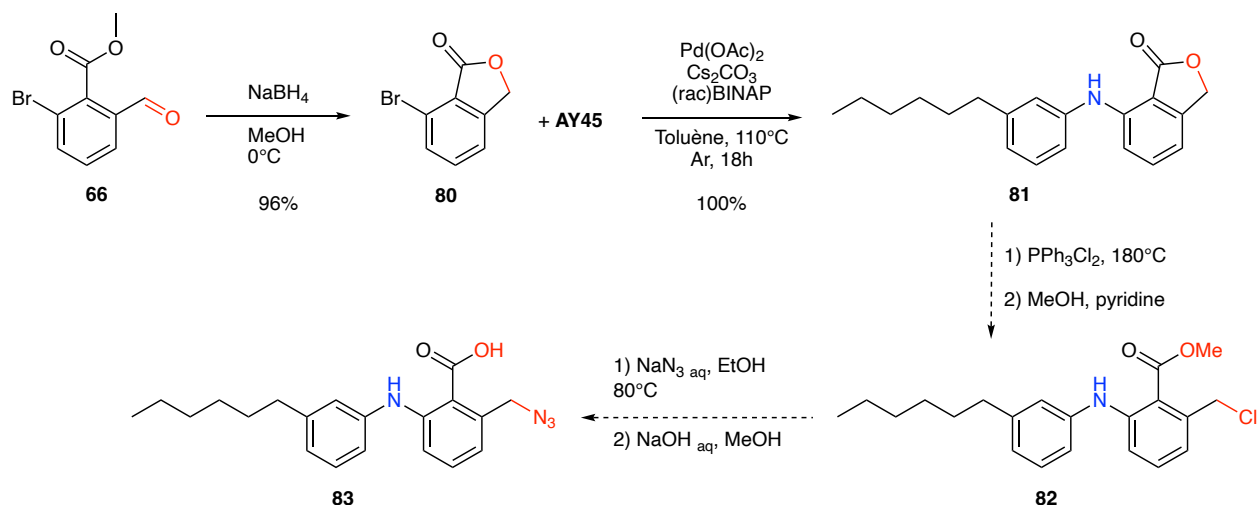


Schéma 2.8 Chemin synthétique pour l'ouverture de la lactone et l'obtention de l'azoture. Composés **80** et **81** caractérisés dans l'Annexe A.

La réaction clic a été développée dans le but de faciliter la synthèse de molécules qui peuvent être fastidieuses à obtenir selon des méthodes traditionnelles.²⁶ En effet, de nouvelles propriétés moléculaires sont toujours recherchées et celles-ci peuvent provenir de la jonction de différents blocs de construction. Cette chimie a aussi été développée pour des scientifiques qui ne possèdent pas les compétences ou le matériel requis pour performer des connexions de manière fiable.²⁷ De ce fait, la chimie clic est simple, fiable, rapide et ne génère pas de sous-produits.²⁶ Elle a été inventée par Barry Sharpless en 2001 pour permettre la combinaison de plusieurs molécules pour une large palette d'applications.²⁷ Il a gagné Le Prix Nobel de chimie en 2022 pour cette réaction au côté de Morten Meldal qui, tout comme Sharpless, a présenté la version la plus populaire à ce jour : la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre. Celle-ci étant largement utilisée, notamment dans le développement de produits pharmaceutiques, dans la cartographie de l'ADN et la création de matériaux plus adaptés à leur usage. Le Prix Nobel a aussi été remis à la chimiste Carolyn Bertozzi pour son utilisation de la clic afin de cartographier les glycanes, d'importantes biomolécules insaisissables situées à la surface des cellules. Elle a modifié la réaction pour qu'elle fonctionne à l'intérieur d'organismes vivants, et ce sans perturber les processus chimiques normaux de la cellule.²⁶ Cette chimie est appelée bioorthogonale, un terme qui a été inventé par la Pr. Bertozzi, ce qui veut dire qu'elle est compatible avec les systèmes vivants. Celle-ci permet le ciblage des médicaments, l'imagerie moléculaire et le suivi de processus biologiques.²⁸ L'approche de la clic permet aussi l'exploration d'une multitude de composés chimiques, à leur optimisation en passant par des études

SAR et à la découverte de médicaments. Cette technique fonctionne bien aussi lorsque la conception de molécules est basée sur leur structure et la chimie combinatoire. Elle permet également de synthétiser des dérivés de pharmacophores traditionnels, mais également de générer des structures nouvelles qui ne ressemblent pas à ceux-ci.²⁹

La clic est polyvalente pour joindre des structures variées, complémentaires, sans nécessiter de groupes protecteurs, et contient des énergies élevées qui entraînent des liaisons irréversibles et spontanées. Quatre grandes classifications de cette réaction ont été identifiées (Figure 2.4 à 2.7) :

1) Les cycloadditions, principalement les 1,3-dipolaires, mais aussi les cycloadditions hétéro-Diels-Alder

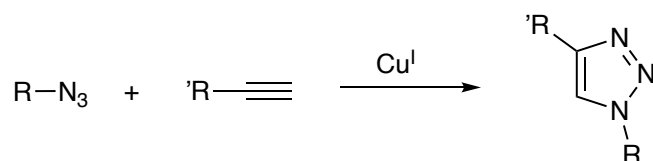


Figure 2.4 Cycloaddition Huisgen 1,3-dipolaire d'azotures et d'alcynes terminaux, catalysée par CuI.³⁰

2) L'ouverture de cycles nucléophiles, soit l'ouverture d'hétérocycles tendus électrophiles comme les époxydes, les aziridines et ions aziridinium, les sulfoniums cycliques, etc

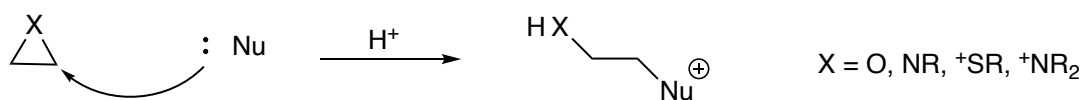


Figure 2.5 Ouverture de cycle nucléophile.³⁰

3) La chimie du carbonyle non-aldol, comme la formation d'amides, d'éthers d'oxime, d'hydrazones, d'urées, d'hétérocycles aromatiques, etc

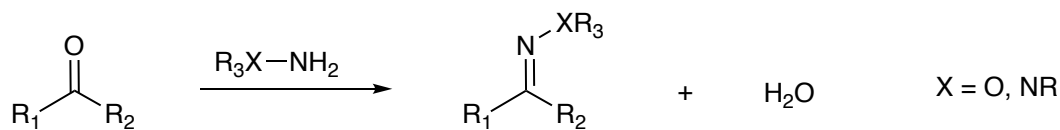


Figure 2.6 Chimie du carbonyle non-aldol: formation d'éther d'hydrazone/oxime.³⁰

4) Additions aux liaisons multiples de carbone-carbone, par exemple les dihydroxylations, les époxydations, les additions d'halogénure de sulfényle et de nitrosyle et certaines additions de Michael

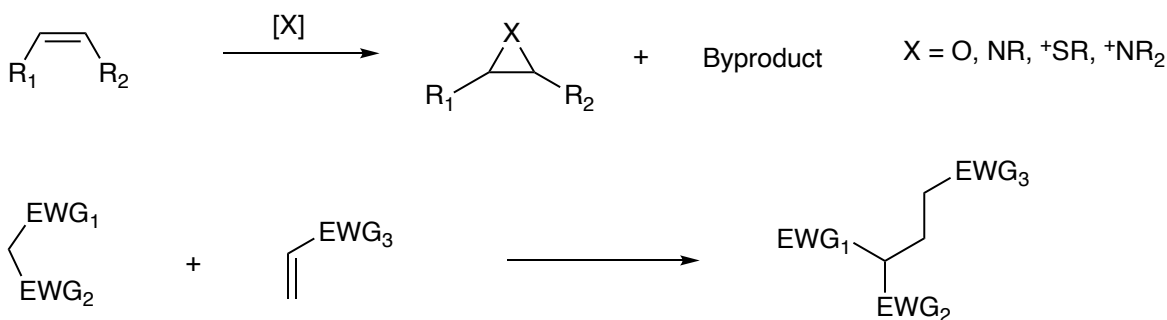


Figure 2.7 Additions aux liaisons multiples de carbone: formation d'anneau à trois membres variés (en haut) et certaines additions de Michael (en bas).³⁰

Parmi toutes ces classes de réaction, la plus utilisée est la cycloaddition Huisgen 1,3-dipolaire d'azoture et d'alcyne terminaux, catalysée par l'iodure de cuivre, pour former des 1,2,3-triazoles. Le résultat est exclusivement des produits 1,4-substitués. De plus, elle remplit tous les critères de la chimie clic, ne nécessitant pas d'élévation de température, tolérant différentes valeurs de pH et de solvants et n'étant pas affectée par des facteurs stériques. Également, une autre raison de sa popularité est le fait que les alcyne et les azotures terminaux sont très stables en conditions standard et relativement faciles à installer.

Le mécanisme de cette réaction n'est pas concerté comme la majorité des cycloadditions, mais procède plutôt via plusieurs étapes. La première étape implique la complexation π d'un dimère d'iodure de cuivre

à l'alcyne, qui mène à la diminution du pKa, suivie par une déprotonation de l'hydrogène terminal pour former un complexe d'acétylure de cuivre, qui peut varier selon les conditions utilisées. Par la suite, l'azote numéroté 1 déplace l'un des ligands du deuxième cuivre du complexe pour former l'intermédiaire **86**. Cela va activer l'azoture pour faire une attaque nucléophile qui est rendue possible à cause de la proximité et des facteurs électroniques, conduisant l'azote 3 à attaquer le carbone 4 de l'alcyne menant à un métallocycle. La paire d'électrons libres de l'azote 1 attaque le carbone 5 ce qui contracte le métallocycle et forme le triazole **87**. Le dimère de cuivre attaché va alors se complexer avec un deuxième alcyne terminal qui ne subira pas de cycloaddition à cause de sa structure défavorable et va donc se dissocier lors de la protonation pour reformer l'intermédiaire **87**. Finalement, le catalyseur de cuivre va être libéré par protonation pour effectuer un second cycle catalytique et conduire au produit final 1,2,3-triazole **88** (Schéma 2.9).³⁰

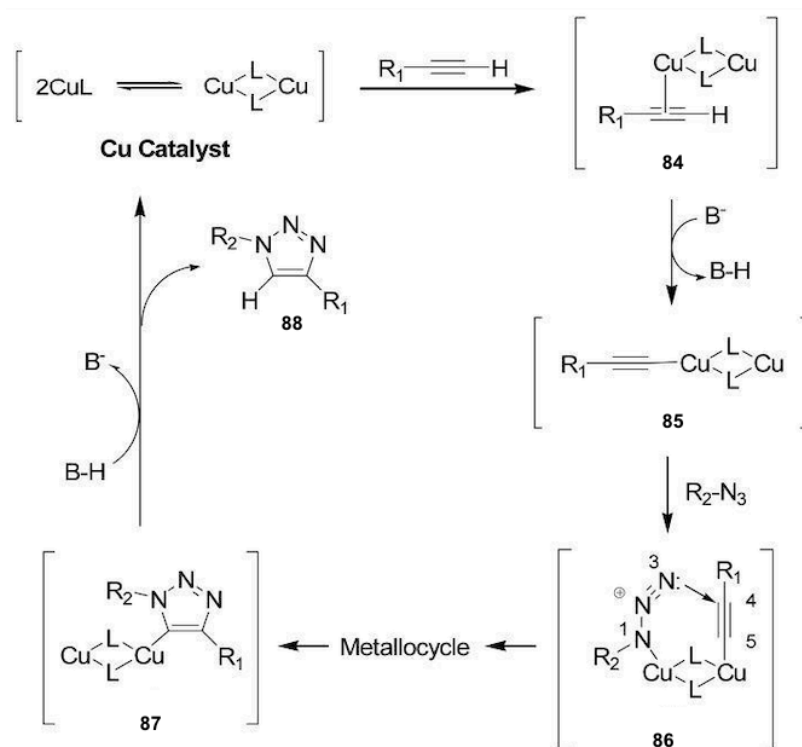


Schéma 2.9 Mécanisme de la cycloaddition Huisgen 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne terminal, catalysée par l'iodure de cuivre, un exemple de réaction de clic.³⁰

Le chemin synthétique final utilisé comprend la réaction de clic, mais débute par la bromination de l'ester méthylique **64** en position 6 avec les mêmes conditions mentionnées plus haut, mais avec une quantité

moindre de NBS. Ensuite une réaction SN2 est réalisée avec l'azoture de sodium dans un mélange d'acétone et d'eau afin d'obtenir l'azoture **90** en position R₆ (Schéma 2.10). Le couplage de Buchwald est ensuite fait avec **AY45** pour obtenir la molécule **AY130** selon un mécanisme en 4 étapes. Tout d'abord, il y a addition oxydante de l'halogénure sur le Pd(0), intermédiaire **94**, qui deviendra du Pd(II). S'en suit de la coordination du ligand amine, dans ce cas-ci **56** pour obtenir **95**. Ensuite, il y a un échange de ligand avec départ de l'halogène pour terminer avec une élimination réductrice menant au composé **91** et la régénération du catalyseur au palladium (Schéma 2.11).

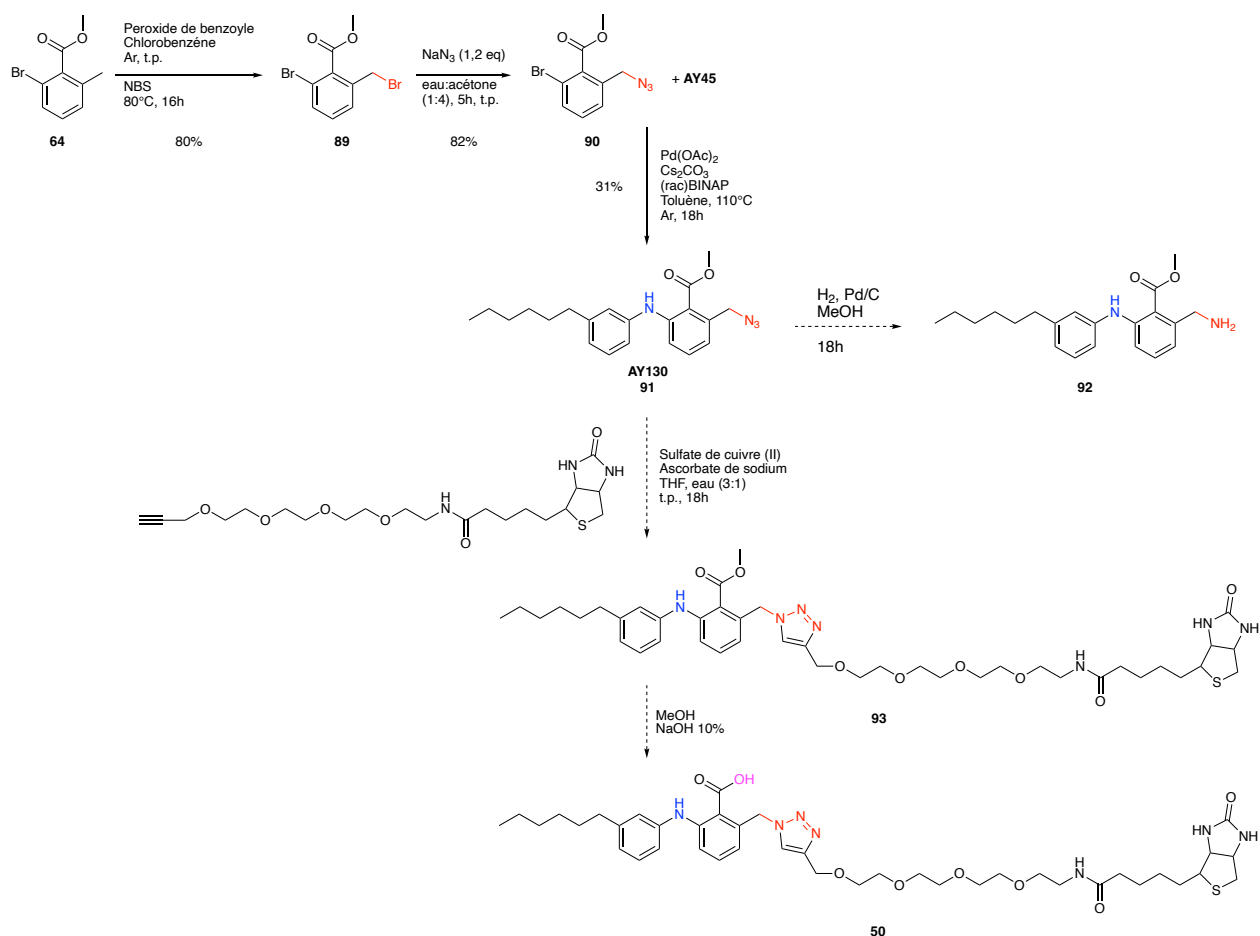


Schéma 2.10 Route de synthèse pour le composé biotinylé par la réaction de clic. Composés **89**, **90** et **91** caractérisés dans l'Annexe A.

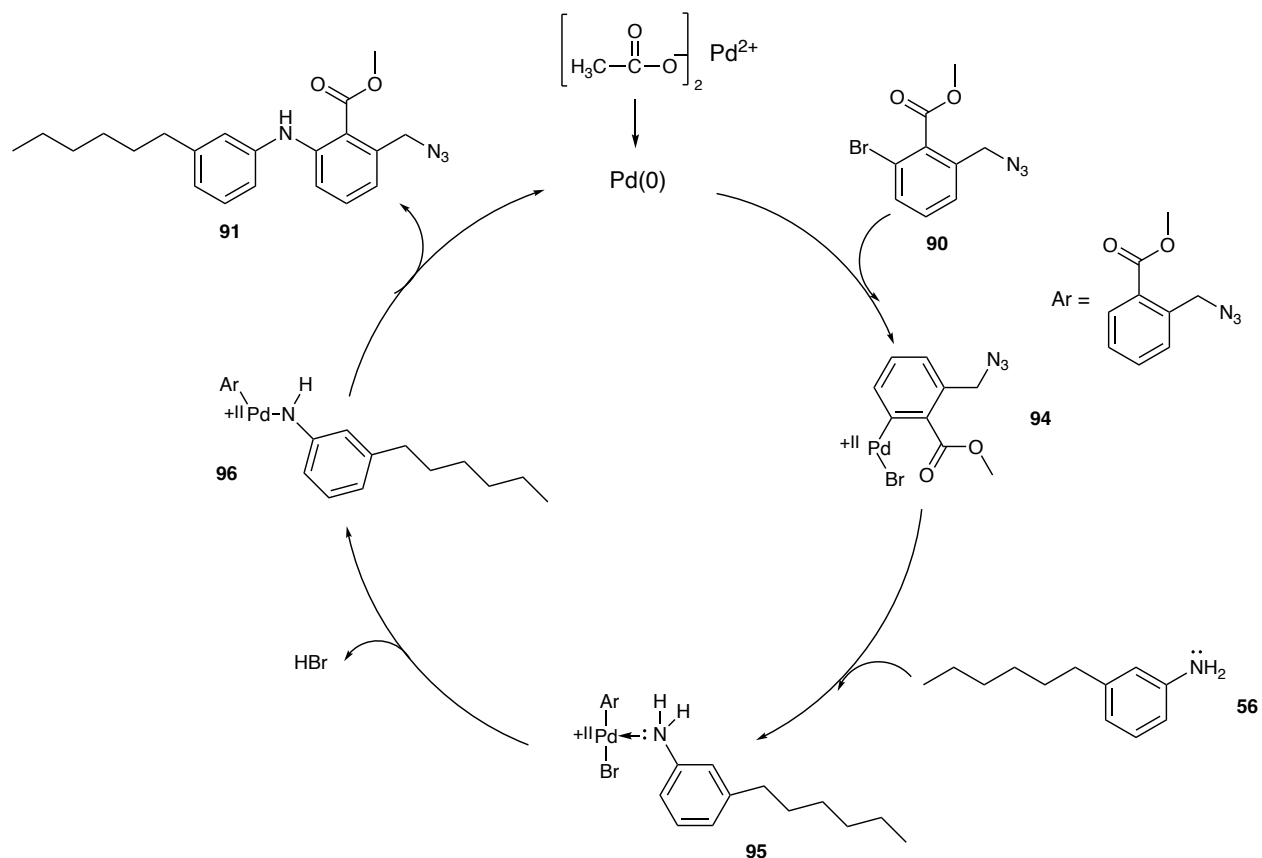


Schéma 2.11 Mécanisme de la réaction de couplage de Buchwald.

Avant d'essayer la réaction de clic, une réduction de l'azoture en amine primaire **91** a été essayé dans des conditions standard d'hydrogénation afin de faire un couplage peptidique avec une biotine (Schéma 2.10). Cette réaction n'a toutefois pas fonctionné donc cette route n'a pas été poursuivie. La réaction de clic a donc été effectuée avec la biotine en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium dans un mélange de THF et d'eau, mais la réaction n'a pas fonctionné, tel que confirmé en HPLC analytique qui a montré que tous les substrats de départ été récupérés.

Toutefois, avant de tenter la réaction de clic avec la biotine finale, plusieurs essais ont été faits afin de trouver des conditions optimales à utiliser. En effet, une clic a été performée entre le composé **90** et le 1-pentyne qui possède une alcyne terminal, tout d'abord dans du DCM et de l'eau dans un ratio de 3:1. 0,04 équivalents de sulfate de cuivre et 0,11 équivalents d'ascorbate de sodium ont ensuite été ajoutés pour obtenir le composé **97** (Schéma 2.12). Avec un rendement de seulement 15%, les conditions ont été

modifiées pour utiliser du THF plutôt que du DCM ainsi que 0,3 et 2,5 équivalents respectivement des substrats. Cela a fait augmenter le rendement à 28%, donc il était alors nécessaire d'essayer cette réaction avec un alcyne plus similaire à la chaîne PEG de la biotine utilisée. Le méthyl propargyl éther semblait être un bon choix puisqu'il contient un carbone primaire suivi d'un oxygène.

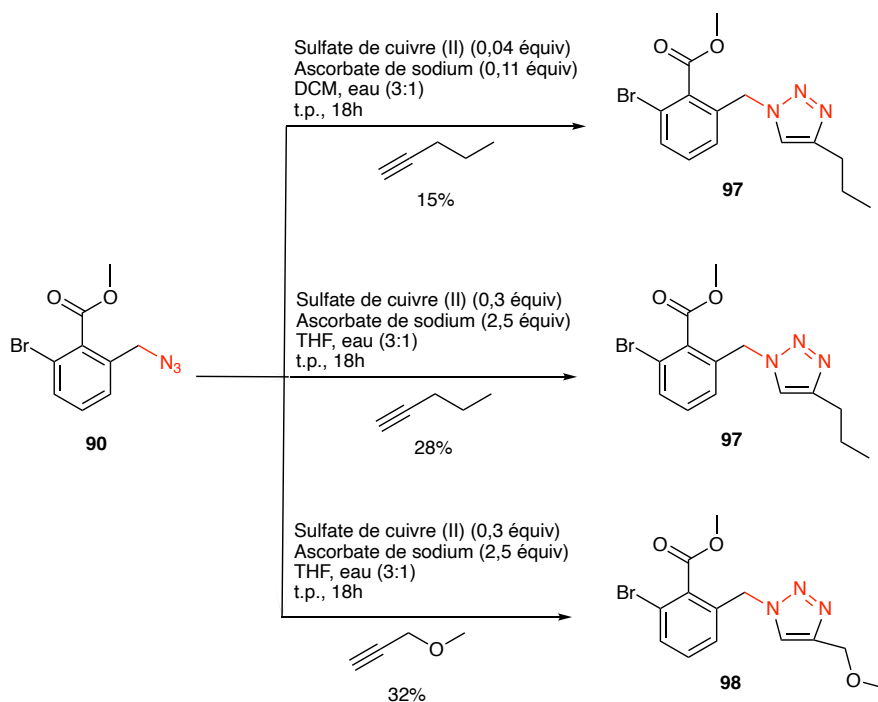


Schéma 2.12 Optimisation des conditions de la réaction de clic sur le composé **90**. Composés **97** et **98** caractérisés dans l'Annexe A.

Avec un rendement de 32% pour le **98**, la clic a été effectuée sur le composé **91** afin d'avoir une idée du comportement de la réaction sur l'analogue de **LM98** qui comporte un cycle aromatique additionnel avec une chaîne alkyle (Schéma 2.13). Celle-ci a été concluante, bien que le rendement ne soit pas très élevé à 15%, le rest étant le produit de départ **91**.

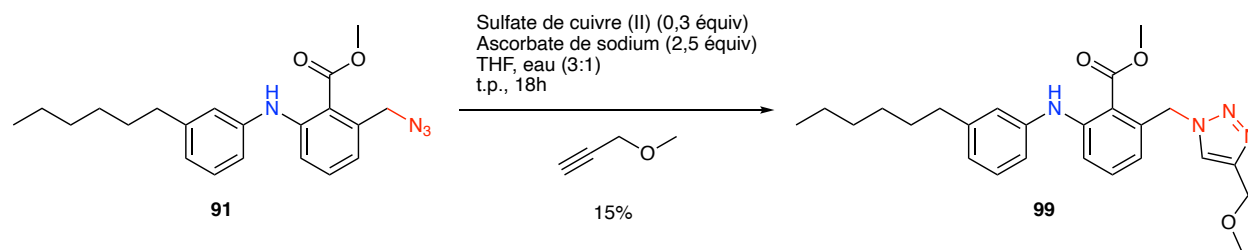


Schéma 2.13 Réaction de clic sur le composé **91**. Composé **99** caractérisé dans l'Annexe A.

Il aurait été nécessaire d'accomplir une plus grande optimisation sur les conditions dans le but d'obtenir un meilleur rendement, toutefois il fallait tenter la saponification (Schéma 2.14) qui semble être une réaction banale, mais qui peut s'avérer plus difficile avec une grande quantité de conditions possibles. Deux conditions ont été essayées, la première avec de l'hydroxyde de lithium dans du MeOH, de l'eau et du THF. La deuxième a été performée avec du MeOH et du NaOH 10% dans de l'eau. Les deux réactions ont été suivies par CCM et semblaient avoir été complétées, mais après lavage avec du Et_2O , acidification avec HCl et lavage au DCM, le composé **100** n'a pas été obtenu. Les spectres RMN ont déterminés que du produit de départ a été récupéré ainsi que le composé **100** dégradé.

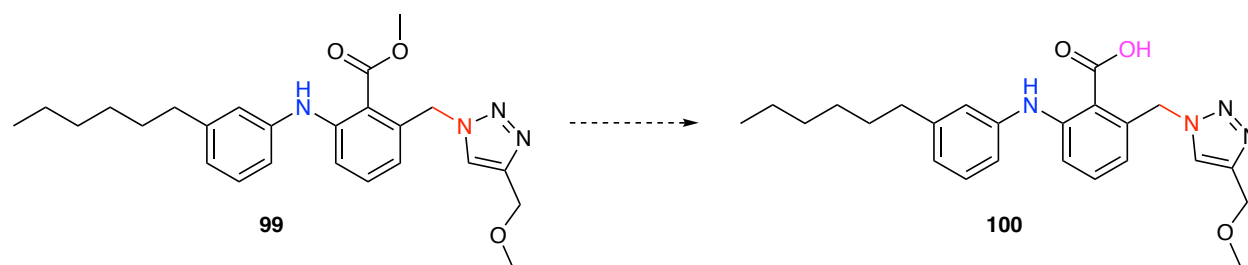


Schéma 2.14 Réaction de saponification sur le composé **99**.

Finalement, après avoir réalisé la clic sur l'azoture pour obtenir le composé **97**, un couplage de Buchwald a été tenté avec le composé **56** (Schéma 2.15). Cette réaction ayant fonctionné, elle a permis de démontrer que le clic peut bien supporter plusieurs conditions de réaction. Cependant, cette voie de synthèse impliquant la réaction de clic avant le couplage n'est pas très envisageable puisque la biotine a une mauvaise solubilité dans l'eau et certains solvants organiques de ce fait, rendraient le reste de la synthèse difficile. La route de synthèse montrée dans le schéma 2.10 est donc un meilleur choix pour arriver au composé biotinylé.

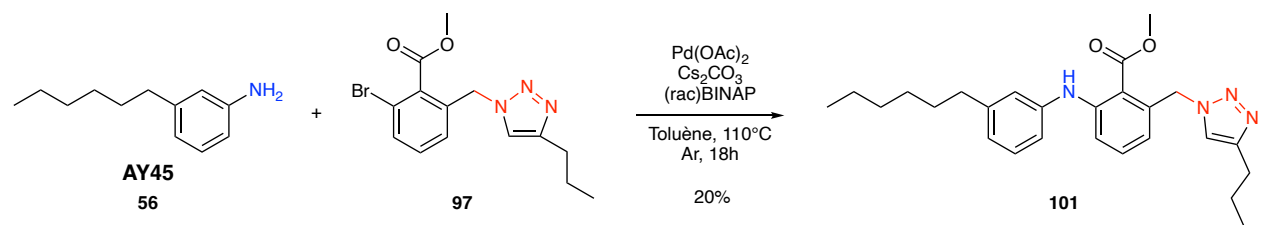


Schéma 2.15 Réaction de couplage de Buchwald entre **56** et **97**.

CONCLUSION

En conclusion, une voie de synthèse a été élaborée avec une réaction de clic dans le but d'installer une biotine sur le composé inhibiteur de TEAD, **LM98**. Cependant, la synthèse totale n'a pas pu être complétée, puisque la réaction de clic n'étant pas concluante avec la biotine, la saponification n'a pu être effectuée. Une plus grande optimisation permettra d'identifier des conditions menant à des rendements plus élevés. Ultiment, des expériences de pull down auraient été réalisées afin de démontrer que **LM98** interagit effectivement avec TEAD dans les cellules.

ANNEXE A

Partie expérimentale

A.I. Informations générales

Les réactifs commerciaux utilisés n'ont pas subi de purification supplémentaire. Les solvants anhydres ont été obtenus à partir d'un système de purification de solvant encapsulé. L'évolution des réactions a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des plaques pré-enduites de gel de silice et visualisées par rayonnement ultraviolet. La purification des composés a été faite par chromatographie flash avec de la silice de 230-400 mesh en utilisant le système de solvant indiqué selon les techniques standards. Les spectres RMN-H ont été enregistré sur un Bruker Avance-III 300 MHz. Les déplacements chimiques des RMN-H sont rapportés en parties par million (ppm) dans une solution de CDCl_3 . Les données des déplacements chimiques ont été indiquées selon la multiplicité suivante : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, m = multiplet, dd = doublet de doublet, dt = doublet de triplet, ddd = doublet de doublet de doublet. Les constantes de couplage J sont calculées en Hz.

A.II. Procédures expérimentales

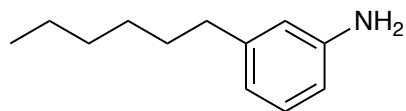
Procédure générale A : Couplage de Buchwald

À une solution de benzoate d'halogène approprié (1 équiv), d'amine appropriée (1 équiv) et de carbonate de césium (2 équiv) dans du toluène anhydre (9 mL par mmol de substrat), est barboté de l'argon. Ensuite est ajouté du *rac*-2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) (0,1 équiv) avec barbotage d'argon pendant 5 minutes et le même processus est répété avec l'acétate de palladium(II) (0,05 équiv). La réaction est agitée sous argon à 110°C pendant 18h. Le mélange est refroidi à température pièce, dissout avec de l'acétate d'éthyle, puis filtré sur célite. Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par un système chromatographique sur gel de silice pour obtenir les composés **81** et **91**.

Procédure générale B : Réaction de clic

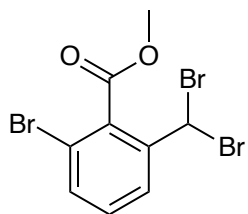
À une solution d'azoture appropriée (1 équiv), d'alcyne approprié (1,7 équiv) dans un mélange de THF et d'eau dans un ratio 1:3 est ajouté l'ascorbate de sodium (2,5 équiv) et le sulfate de cuivre (II) (0,3 équiv). Le mélange est agité à température pièce pendant 18 heures, puis extrait avec du dichlorométhane (DCM) et séché avec du sulfate de magnésium (MgSO₄). Le solvant est ensuite évaporé et le produit est purifié par un système chromatographique sur gel de silice pour obtenir les composés **97**, **98** et **99**.

3-Hexylaniline (56)



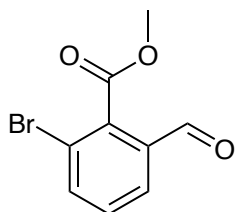
Composé 56 intervenant dans le schéma 2.3 : À une solution de (*E*)-1-(hex-1-en-1-yl)-3-nitrobenzene **54** (1,20 g, 5,8 mmol) est ajoutée une spatule de palladium activé au charbon dans du MeOH (15 mL) sous argon. Le vide est fait, puis la réaction est remise sous argon. Le cycle est répété trois fois. Le même processus est refait avec du dihydrogène. La réaction est agitée sous H₂ à température pièce pendant 18h. Le mélange est retourné à atmosphère d'argon, ensuite filtré sur célite avec du MeOH. Le solvant est évaporé, puis le produit purifié par un système chromatographique sur gel de silice (100% DCM) a permis d'obtenir la 3-hexylaniline **56** (0,608g, 59%); **RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃)** δ 7.12 – 6.99 (m, 1H), 6.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.63 (s(large), 2H), 2.51 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H), 1.65 – 1.48 (m, 2H), 1.39 – 1.21 (m, 6H), 0.98 – 0.80 (m, 3H); **RMN-C¹³ (151 MHz, CDCl₃)** δ 146.25, 144.30, 129.14, 118.93, 115.35, 112.57, 36.03, 31.80, 31.39, 29.11, 22.66, 14.15. Les données spectrales correspondent à celles de la littérature : Development of LM98, a Small-Molecule TEAD Inhibitor Derived from Flufenamic Acid.

2-Bromo-6-(dibromomethyl)benzoate de méthyle (65)



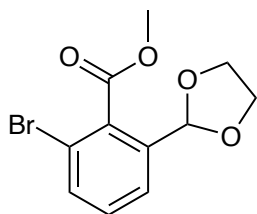
Composé 65 intervenant dans le schéma 2.4 : À une solution commerciale de 2-bromo-6-méthylbenzoate de méthyle **64** (0,5 g, 2,18 mmol) dans du chlorobenzène (2,5 mL), sous atmosphère d'argon, du peroxyde de benzoyle (0,159 g, 0,655 mmol) a été ajouté. À température pièce du NBS (1,16 g, 6,54 mmol) a été introduit, puis la réaction a été agitée à 80°C pendant 16h sous argon. La réaction est ramenée à température pièce, le solvant est évaporé puis le résidu est purifié par un système chromatographique sur gel de silice (20% EtOAc/Hexane) pour donner le 2-bromo-6-(dibromométhyl)benzoate de méthyle **65** (0,839 g, 99%); R_f : 0,26 (2% Et₂O/Hexane); **RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃)** δ 7.98 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.01 (s, 3H); **RMN-C¹³ (151 MHz, CDCl₃)** δ 163.09, 134.32, 129.82, 128.89, 125.66.

2-Bromo-6-formylbenzoate de méthyle (66)



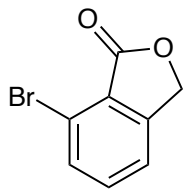
Composé 66 intervenant dans le schéma 2.4 : À une solution de 2-bromo-6-(dibromométhyle)benzoate de méthyle **65** (0,959 g, 2,48 mmol) dans de l'isopropanol (10 mL) et de l'eau (2 mL) dans un ratio de 5 :1, est ajouté du nitrate d'argent (0,797 g, 4,51 mmol). La réaction est agitée à température pièce, pendant 18h. Le mélange résultant est filtré sur célite avec du DCM puis lavé avec de l'eau. La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium (Na_2SO_4) et ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (20% EtOAc/Hexane) pour donner le produit 2-bromo-6-formylbenzoate de méthyle **66** (0,344 g, 57%); R_f : 0,45 (30% EtOAc/Hexane); **RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 9.88 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.2, 7.5$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H); **RMN- ^{13}C (151 MHz, CDCl_3)** δ 189.19, 138.05, 137.75, 131.02, 130.46, 130.37, 129.80, 53.20, 53.13.

2-Bromo-6-(1,3-dioxolan-2-yl)benzoate de méthyle (73)



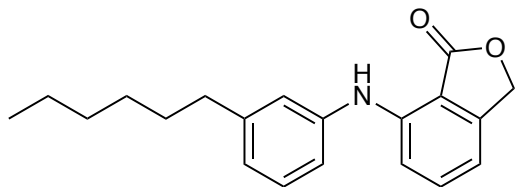
Composé 73 intervenant dans le schéma 2.6 : À une solution de 2-bromo-6-formylbenzoate de méthyle **66** (0,100 g, 0,41 mmol) dans du toluène anhydre (1 mL) est ajouté de l'éthylène glycol (0,245 mL, 4,1 mmol) et du p-TSA (1 mg, 0,00533 mmol) sous argon. La réaction est agitée à reflux sous argon pendant 18h puis ramenée à température pièce. Le mélange résultant est lavé avec de l'eau et de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée avec du MgSO₄ et concentré sous pression réduite. Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (30% EtOAc/Hexane) pour obtenir le methyl 2-bromo-6-(1,3-dioxolan-2-yl)benzoate **73** (0,048 g, 41%); **RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃)** δ 7.64 – 7.48 (m, 2H), 7.29 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 4.61 – 4.36 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.92 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H).

7-bromoisobenzofuran-1(3H)-one (**80**)



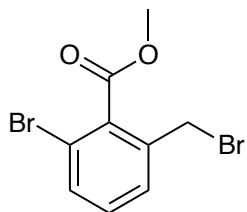
Composé 80 intervenant dans le schéma 2.8 : Le 2-bromo-6-formylbenzoate de méthyle **66** (0,050 g, 0,206 mmol) est dissout dans de l'éthanol 100% (2,5 mL) à 0°C. Le tétrahydruroborate de sodium (NaBH₄) est ajouté via spatule et la réaction est agitée et suivie par CCM. De l'acide chlorhydrique 10% est ajouté au mélange puis la phase organique est extraite avec de l'acétate d'éthyle et lavée avec de l'eau salée. Le mélange résultant est séché sur du Na₂SO₄, filtré et concentré sous pression réduite pour obtenir le 7-bromoisobenzofuran-1(3H)-one **80** (0,042 g, 96%); **RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃)** δ 7.68 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H); **RMN-C¹³ (151 MHz, CDCl₃)** δ 148.99, 134.98, 133.82, 121.12, 68.01.

7-((3-hexylphenyl)amino)isobenzofuran-1(3H)-one (81)



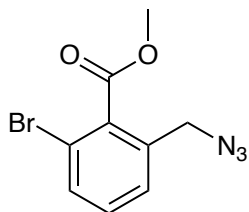
Composé 81 intervenant dans le schéma 2.8 : À une solution de 7-bromoisobenzofuran-1(3H)-one **80** (0,042 g, 0,197 mmol), de 3-hexylaniline **56** (0,035 g, 0,197 mmol) et de carbonate de césium (0,128 g, 0,394 mmol) dans du toluène anhydre (4 mL) est réagi selon la procédure A avec du *rac*-2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) (0,012 g, 0,0197 mmol) et de l'acétate de palladium(II) (0,0022 g, 0,0099 mmol). Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (15% EtOAc/Hexane) pour obtenir le 7-((3-hexylphényl)amino)isobenzofuran-1(3H)-one **81** (0,062 g, 100%); **RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃)** δ 8.16 (s, 1H), 7.40 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 – 7.20 (m, 1H), 7.17 – 7.01 (m, 3H), 6.94 (dt, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 6.72 (dd, $J = 7.3, 0.9$ Hz, 1H), 6.50 (dd, $J = 7.2, 1.1$ Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 2.60 (t, $J = 7.9, 7.5$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 7.9, 7.5$ Hz, 1H), 1.68 – 1.51 (m, 3H), 1.39 – 1.23 (m, 8H), 0.94 – 0.81 (m, 4H); **RMN-C¹³ (151 MHz, CDCl₃)** δ 172.75, 148.04, 145.12, 144.58, 139.46, 135.95, 129.24, 124.35, 122.09, 119.13, 110.84, 110.12, 108.86, 69.68, 35.93, 31.80, 31.75, 31.38, 29.10, 29.02, 22.66, 14.16, 14.15.

2-bromo-6-(bromomethyl)benzoate de méthyle (89)



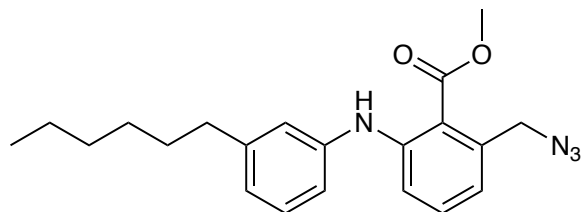
Composé 89 intervenant dans le schéma 2.10 : À une solution commerciale de 2-bromo-6-methylbenzoate de méthyle **64** (0,5 g, 2,18 mmol) dans du chlorobenzène (2 mL), sous atmosphère d'argon, du peroxyde de benzoyle (0,159 g, 0,655 mmol) a été ajouté. À température pièce du NBS (0,466 g, 2,62 mmol) a été introduit, puis la réaction a été agitée à 80°C pendant 16h sous argon. La réaction est ramenée à température pièce, puis purifié par un système chromatographique sur gel de silice (2% EtOAc/Hexane) pour donner le 2-bromo-6-(bromomethyl)benzoate de méthyle **89** (0,539 g, 80%); R_f : 0,33 (5% Et₂O/Hexane); **RMN-H¹ (300 MHz, CDCl₃)** δ 7.51 (dd, $J = 8.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.47 (s, 2H), 3.98 (s, 3H); **RMN-C¹³ (151 MHz, CDCl₃)** δ 167.40, 135.15, 135.11, 132.76, 132.73, 131.08, 127.88, 127.86, 120.11, 52.79, 52.44, 52.42.

2-(azidomethyl)-6-bromobenzoate de méthyle (90)



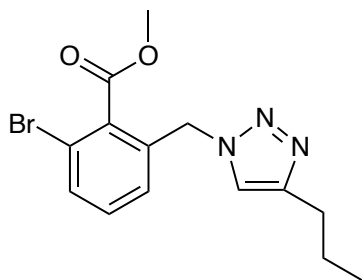
Composé 90 intervenant dans le schéma 2.10 : À une solution d'azoture de sodium (0,047 g, 0,729 mmol) dans de l'acétone (4 mL) et de l'eau (1 mL), dans un ratio 1:4, a été ajouté du 2-bromo-6-(bromométhyl)benzoate de méthyle **89** (0,187 g, 0,606 mmol). La réaction est agitée à température pièce pendant 5h. De l'eau est ajouté, puis le mélange est concentré sous pression réduite et extrait avec du DCM et lavé avec de la saumure. La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄ et concentré sous pression réduite. Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (4% EtOAc/Hexane) pour obtenir le 2-(azidométhyl)-6-bromobenzoate de méthyle **90** (0,135 g, 82%). **R_f**: 0,47 (10% EtOAc/Hexane); **RMN-H¹** (300 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.33 – 7.18 (m, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.93 (s, 3H); **RMN-C¹³** (151 MHz, CDCl₃) δ 167.34, 135.14, 135.06, 132.68, 131.09, 127.93, 120.02, 52.76, 52.37.

2-(azidomethyl)-6-((3-hexylphenyl)amino)benzoate de méthyle (91)



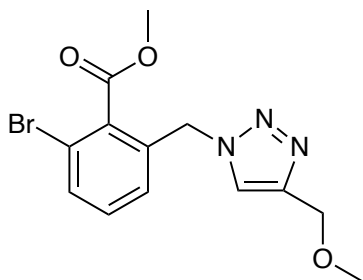
Composé 91 intervenant dans le schéma 2.10 : À une solution de 2-(azidométhyle)-6-bromobenzoate de méthyle **90** (0,060 g, 0,222 mmol), de 3-hexylaniline **56** (0,039 g, 0,222 mmol) et de carbonate de césium (0,145 g, 0,444 mmol) dans du toluène anhydre (4 mL), est réagi selon la procédure A avec du *rac*-2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) (0,014 g, 0,022 mmol) et de l'acétate palladium(II) (0,025 g, 0,011 mmol). Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (6% EtOAc/Hexane) pour obtenir le 2-(azidométhyle)-6-((3-hexylphényl)amino)benzoate de méthyle **91** (0,025 g, 31%); R_f : 0,68 (10% EtOAc/Hexane); **RMN- H^1 (300 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.31 (s, 1H), 7.25 – 7.16 (m, 3H), 6.99 – 6.93 (m, 2H), 6.85 (dt, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 6.77 (dd, $J = 6.3, 2.3$ Hz, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.9, 7.5$ Hz, 2H), 1.62 – 1.53 (m, 3H), 1.35 – 1.22 (m, 9H), 0.94 – 0.80 (m, 6H); **RMN- C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.85, 146.69, 144.52, 141.08, 137.06, 132.19, 129.22, 123.42, 121.57, 120.32, 118.68, 116.12, 115.09, 54.82, 52.25, 35.95, 31.76, 31.40, 29.04, 22.66, 14.14.

2-bromo-6-((4-propyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzoate de méthyle (97)



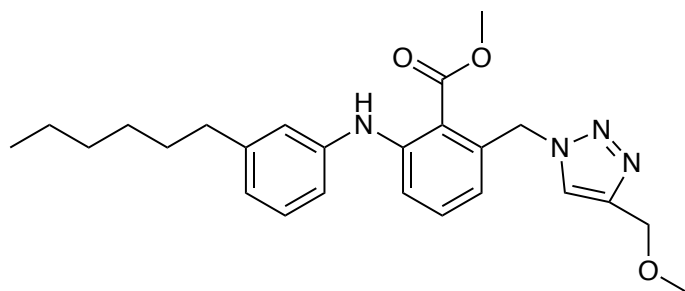
Composé 97 intervenant dans le schéma 2.12 : À une solution de 2-(azidométhyl)-6-bromobenzoate de méthyle **90** (0,074 g, 0,274 mmol), de 1-pentyne (0,032 g, 0,466 mmol) dans un mélange de THF (4,5 mL) et d'eau (1,5 mL) est ajouté l'ascorbate de sodium (0,136 g, 0,685 mmol) et le sulfate de cuivre (II) (0,021 g, 0,082 mmol) et réagi selon la procédure B. Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (30% EtOAc/Hexane) pour obtenir le 2-bromo-6-((4-propyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoate de méthyle **97** (0,026 g, 28%); **RMN- H^1 (300 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.57 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 2H), 7.21 – 7.16 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 2.64 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.72 – 1.58 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); **RMN- C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.18, 135.42, 133.80, 133.21, 131.62, 128.50, 125.67, 120.58, 53.07, 51.84, 32.88, 7.73.

2-bromo-6-((4-(methoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzoate de méthyle (98)



Composé 98 intervenant dans le schéma 2.12 : À une solution de 2-(azidométhyle)-6-bromobenzoate de méthyle **90** (0,050 g, 0,185 mmol), de méthyl propargyl éther (0,022 g, 0,315 mmol) dans un mélange de THF (4,5 mL) et d'eau (1,5 mL) est ajouté l'ascorbate de sodium (0,092 g, 0,463 mmol) et le sulfate de cuivre (II) (0,014 g, 0,056 mmol) et réagi selon la procédure B. Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (30% EtOAc/Hexane) pour obtenir le 2-bromo-6-((4-(methoxyméthyle)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyle)benzoate de méthyle **98** (0,020 g, 32%); **RMN- H^1 (300 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.57 – 7.51 (m, 2H), 7.24 – 7.16 (m, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.34 (s, 3H); **RMN- C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.35, 135.25, 133.96, 133.33, 131.49, 128.27, 120.25, 65.94, 58.38, 53.02, 51.53.

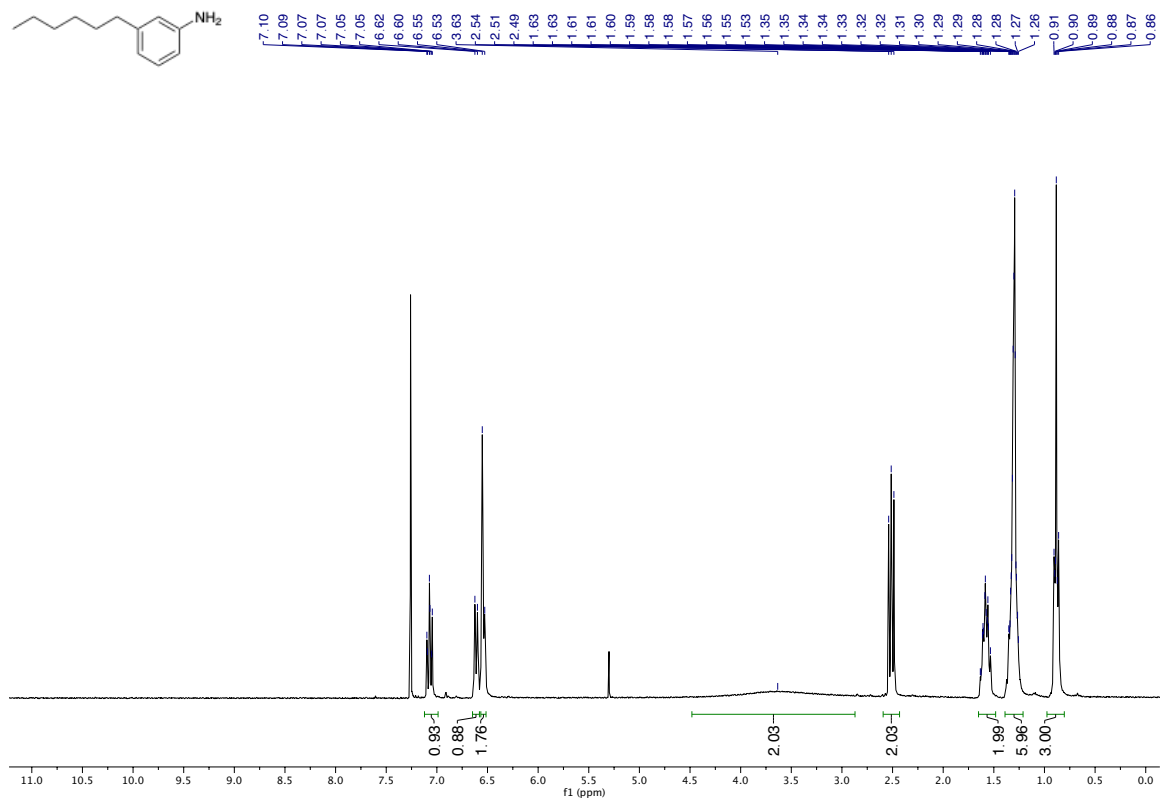
2-((3-hexylphenyl)amino)-6-((4-(methoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzoate de méthyle (99)

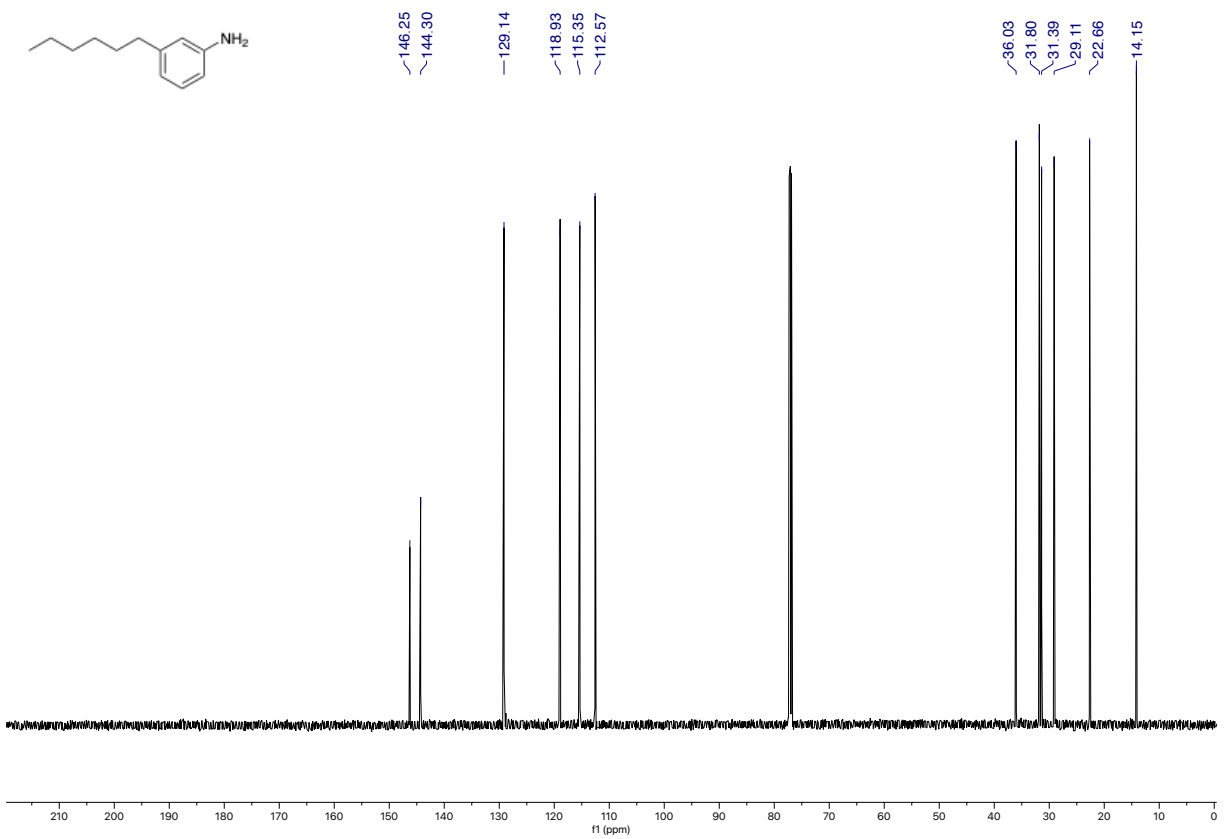
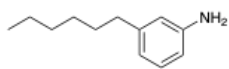


Composé 99 intervenant dans le schéma 2.13 : À une solution de 2-(azidométhyl)-6-((3-hexylphényl)amino)benzoate de méthyle **91** (0,040 g, 0,109 mmol), de méthyl propargyl éther (0,013 g, 0,186 mmol) dans un mélange de THF (4,5 mL) et d'eau (1,5 mL) est ajouté l'ascorbate de sodium (0,054 g, 0,272 mmol) et le sulfate de cuivre (II) (0,008 g, 0,033 mmol) et réagi selon la procédure B. Le produit est ensuite purifié par un système chromatographique sur gel de silice (30% EtOAc/Hexane) pour obtenir le 2-((3-hexylphényl)amino)-6-((4-(méthoxyméthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)méthyl)benzoate de méthyle **99** (0,007 g, 15%); **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 8.43 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.29 – 7.18 (m, 6H), 7.01 – 6.94 (m, 2H), 6.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 7.0, 1.6 Hz, 1H), 5.73 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 2.58 (t, *J* = 7.7, Hz, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.60 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.30 (d, *J* = 1.9 Hz, 7H); **RMN-¹³C (151 MHz, CDCl₃)** δ 168.37, 147.27, 144.60, 135.76, 132.59, 129.27, 123.82, 121.98, 120.37, 119.10, 116.34, 58.32, 52.29, 35.91, 31.72, 31.36, 29.72, 29.00, 22.62, 14.11.

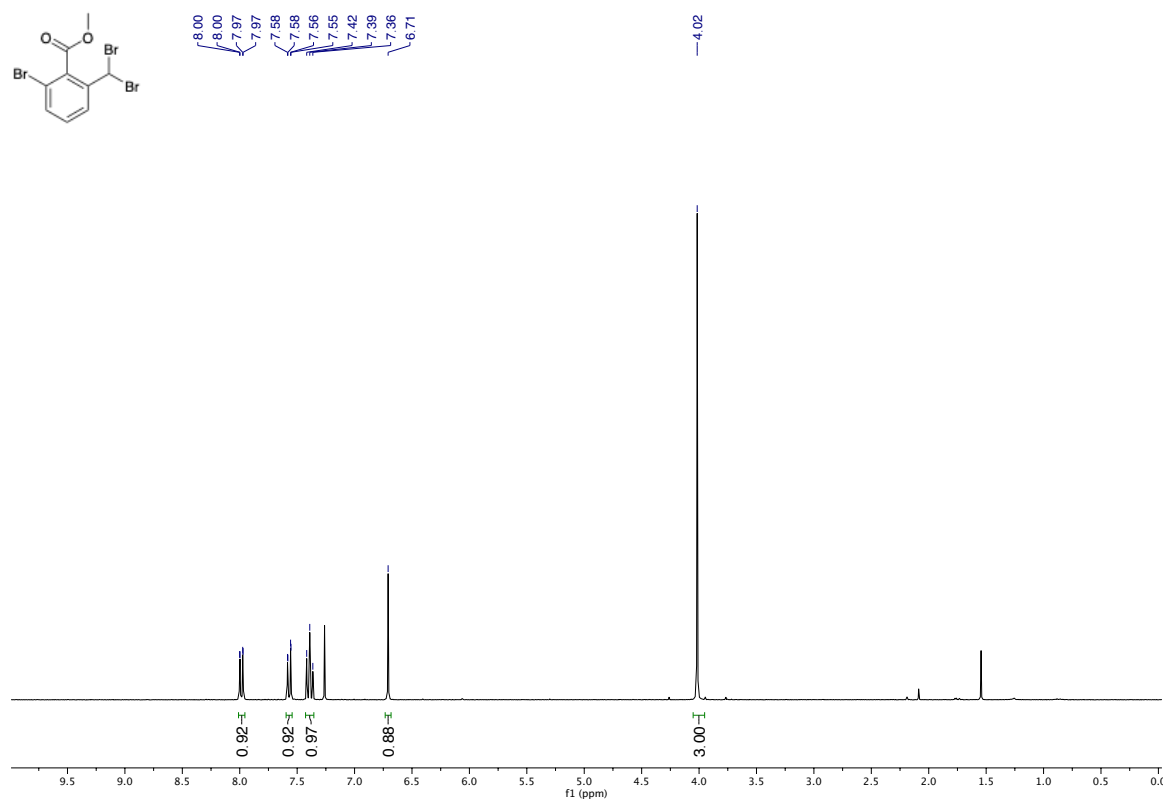
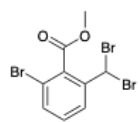
A.III. Spectres RMN-H

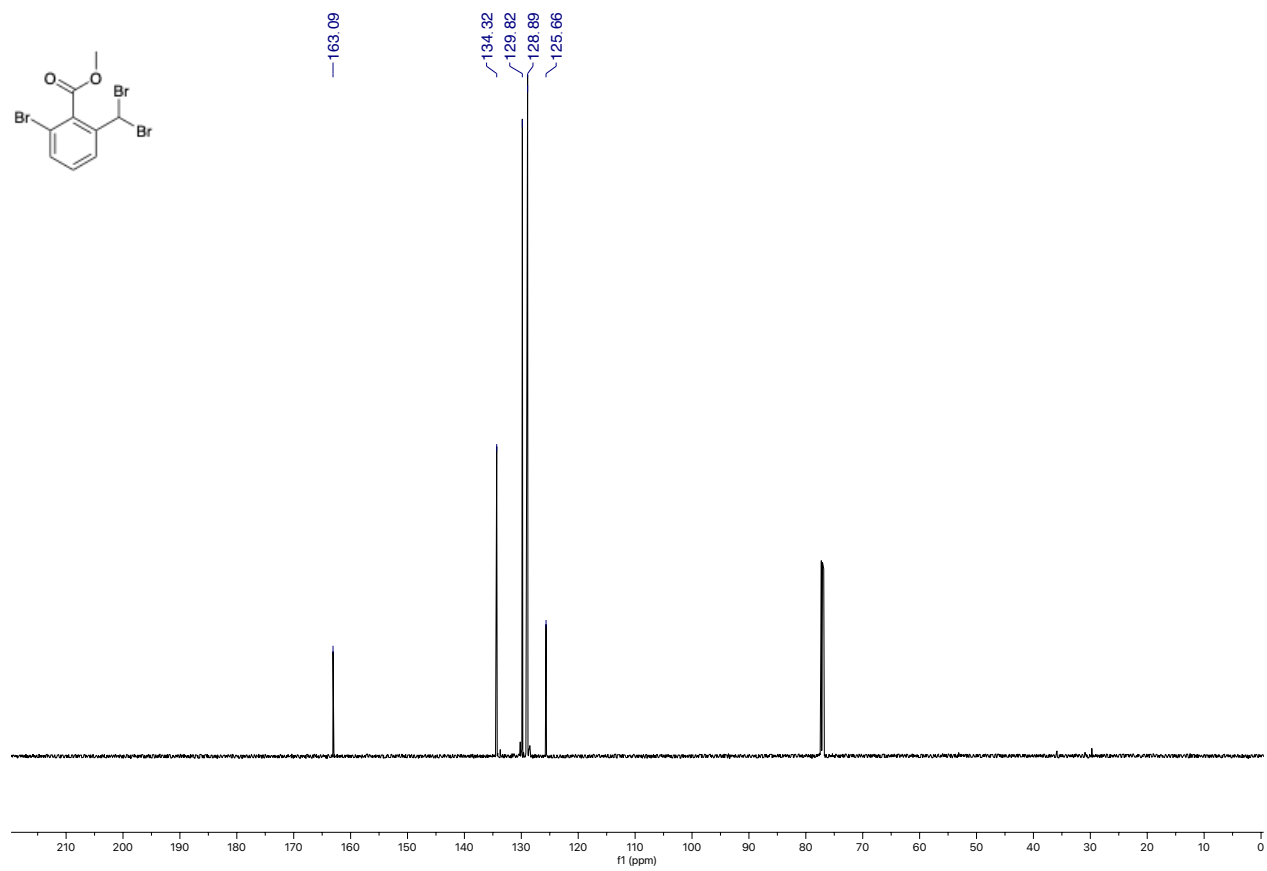
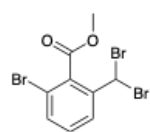
Composé 56



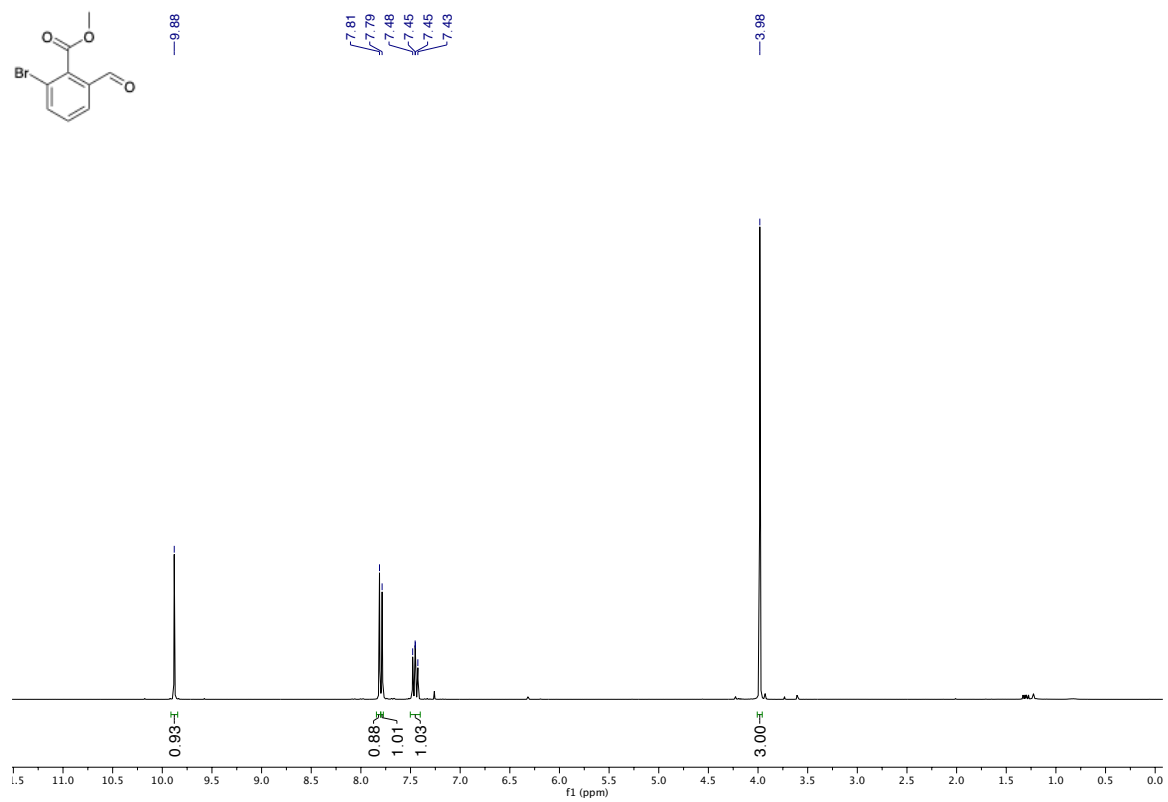
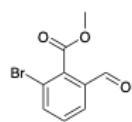


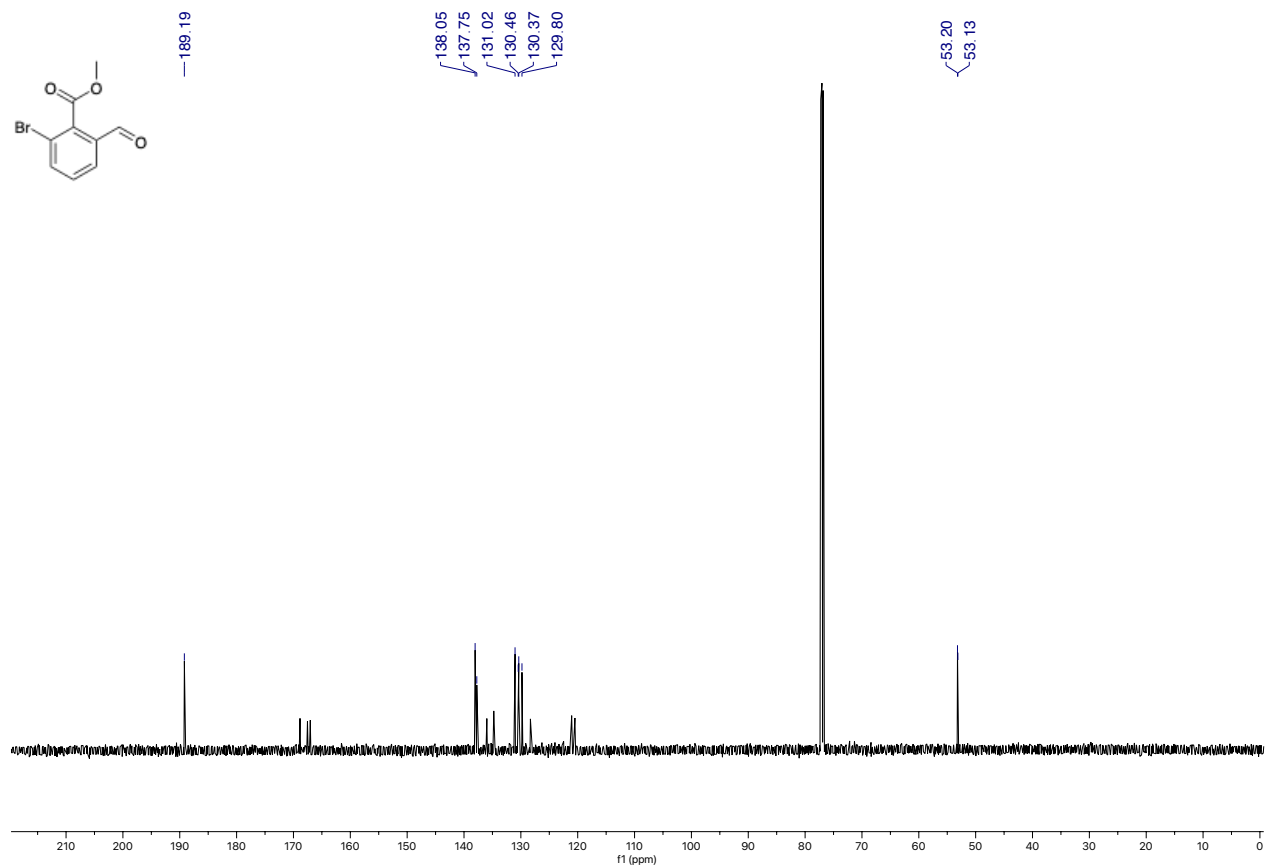
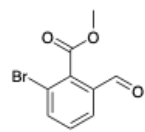
Composé 65



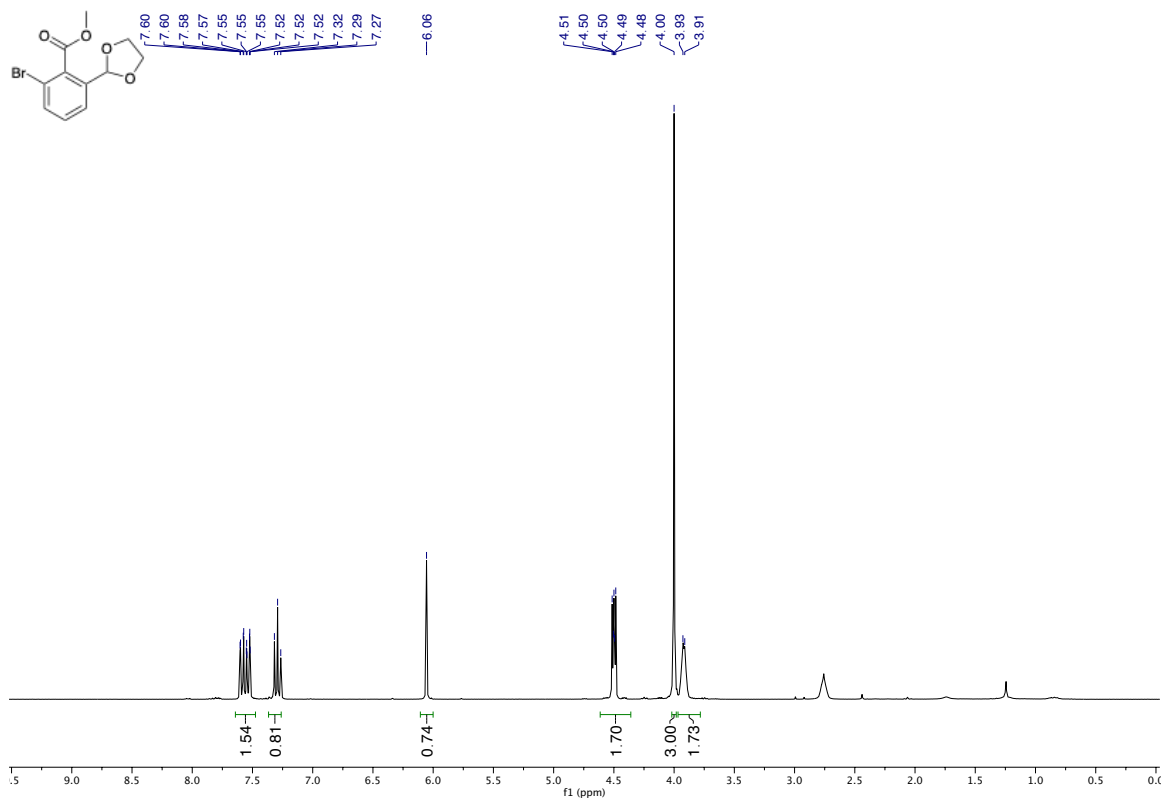


Composé 66

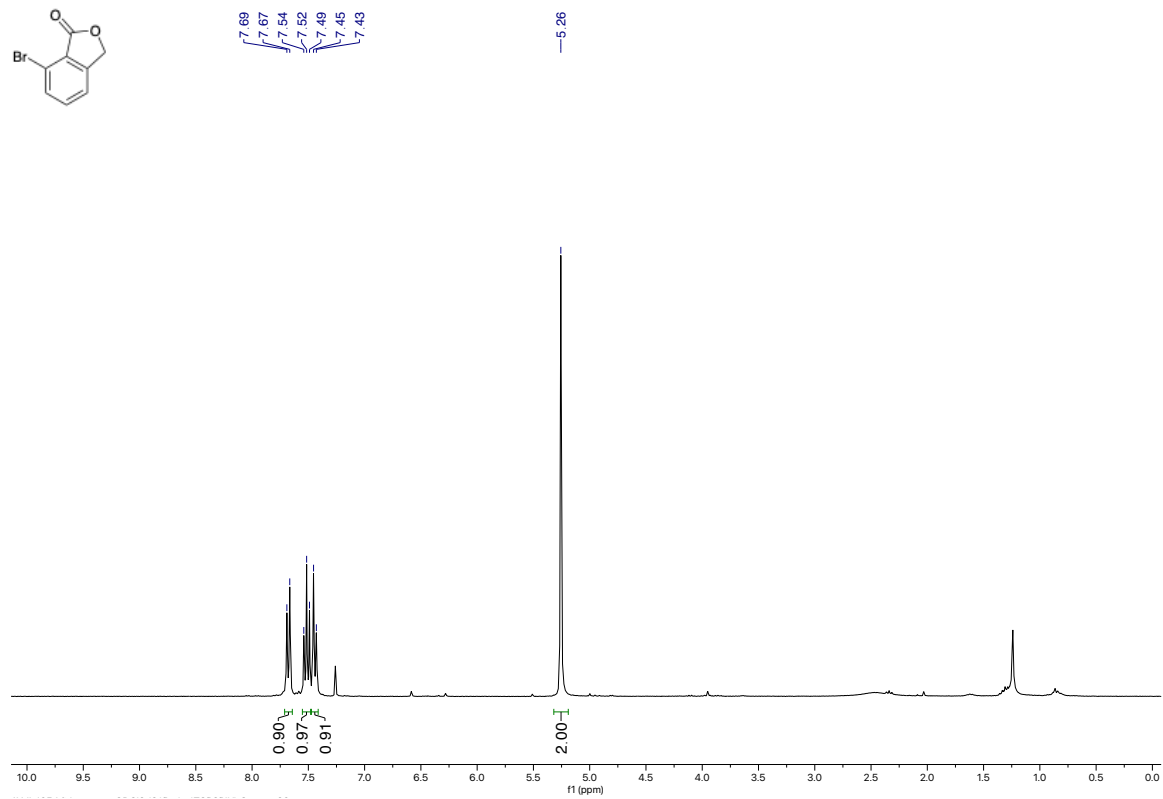
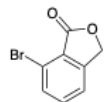


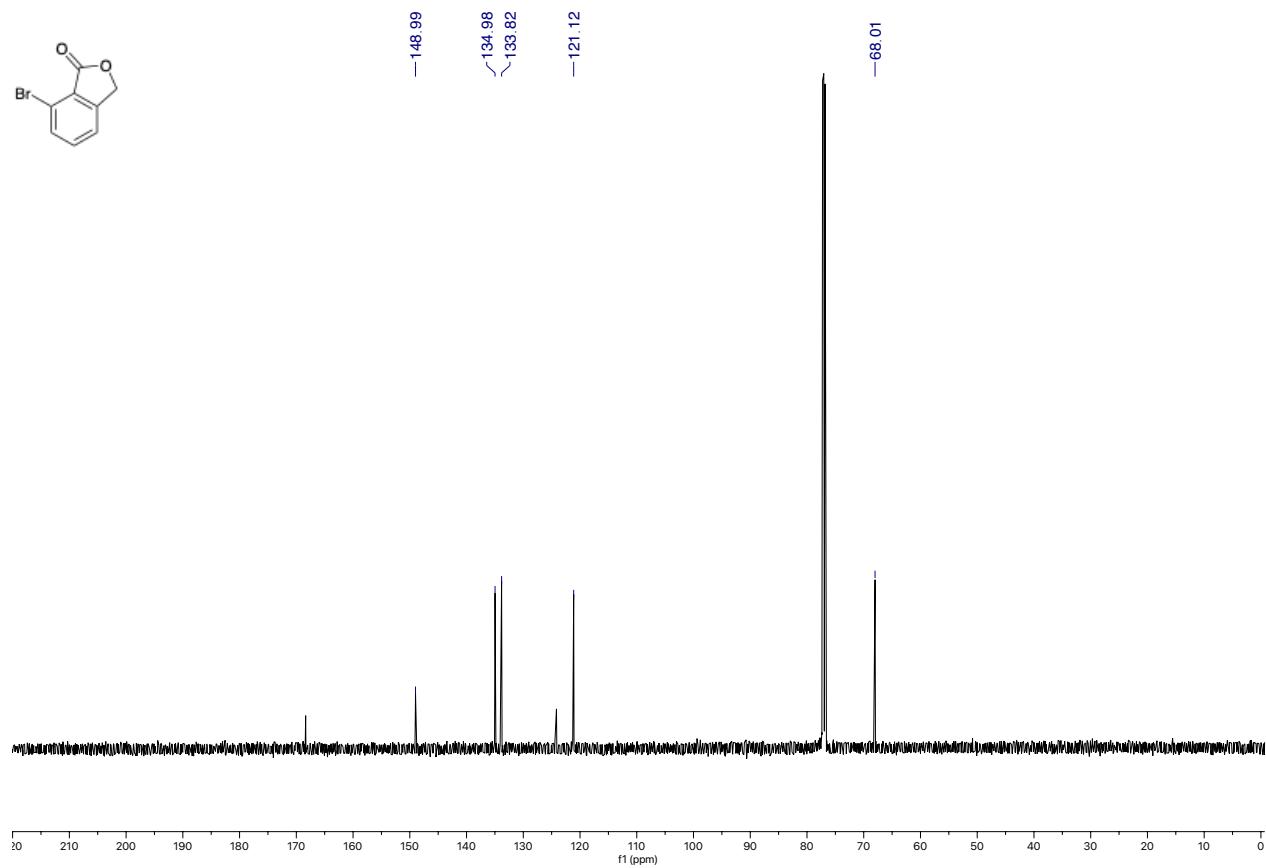
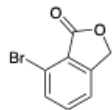


Composé 73

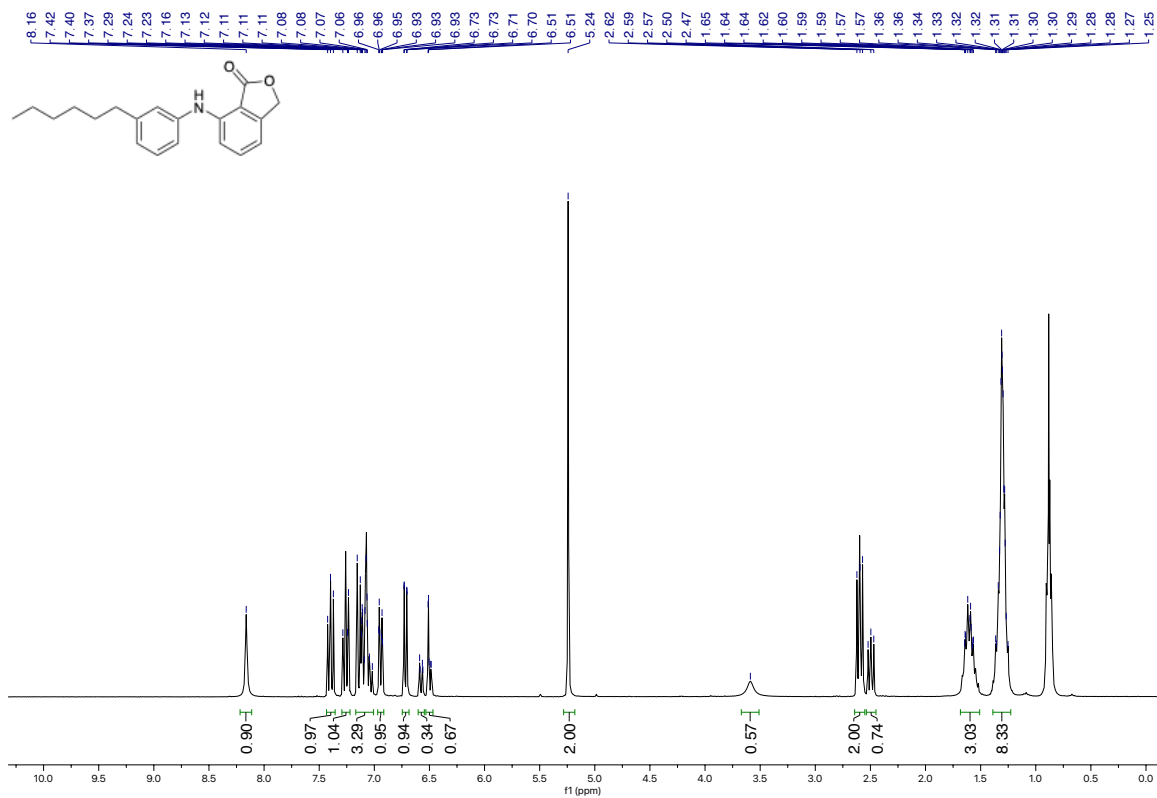


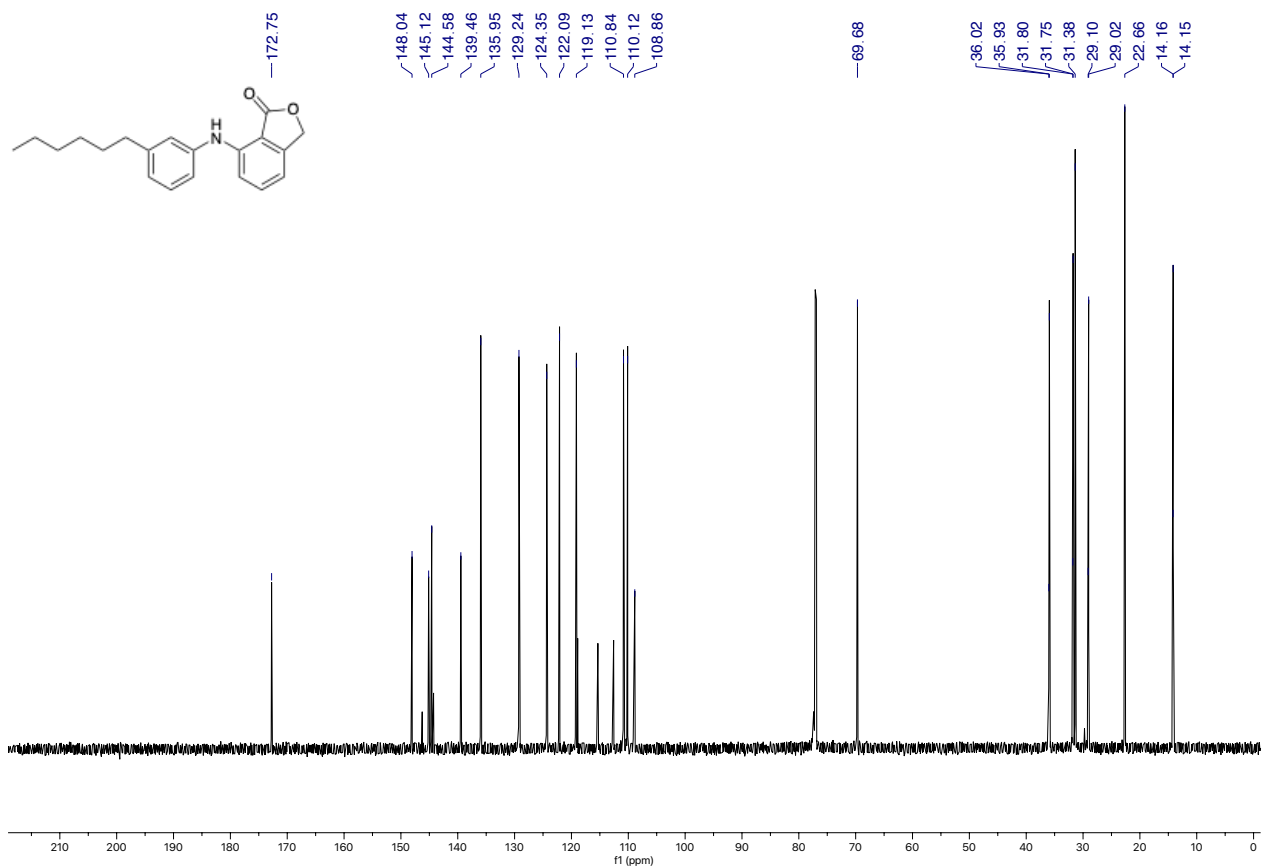
Composé 80



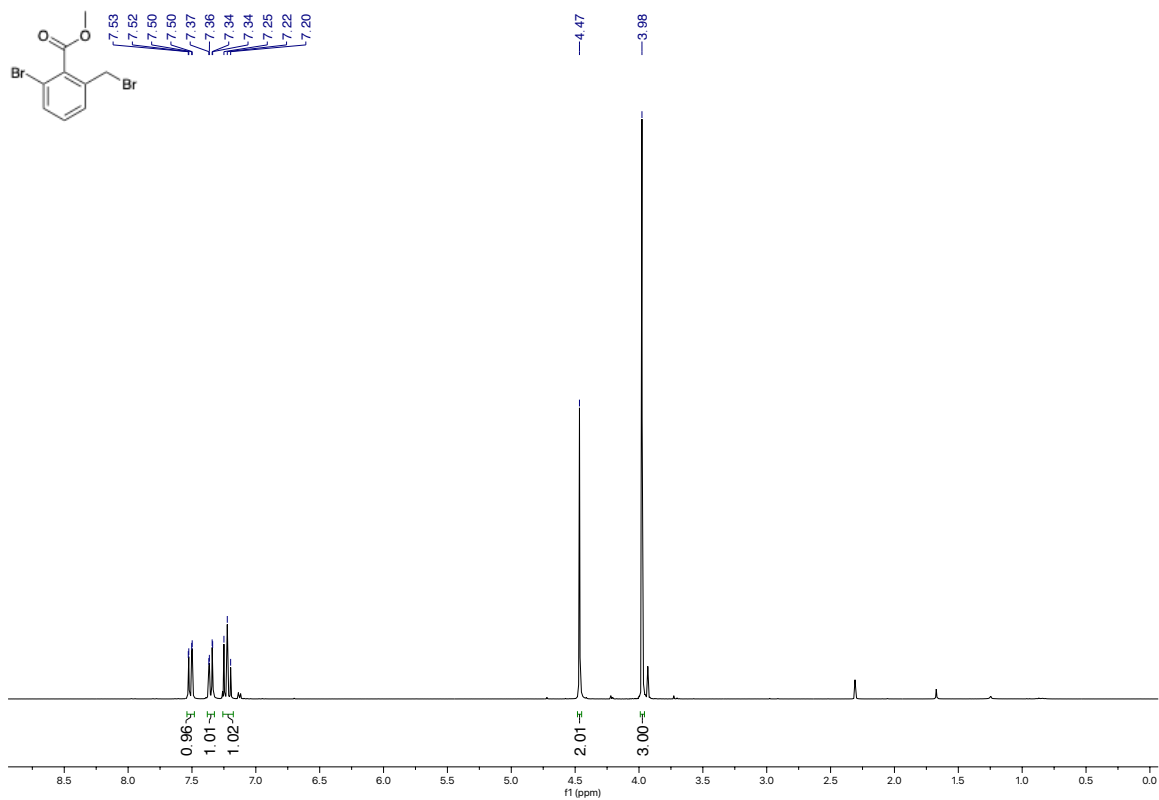


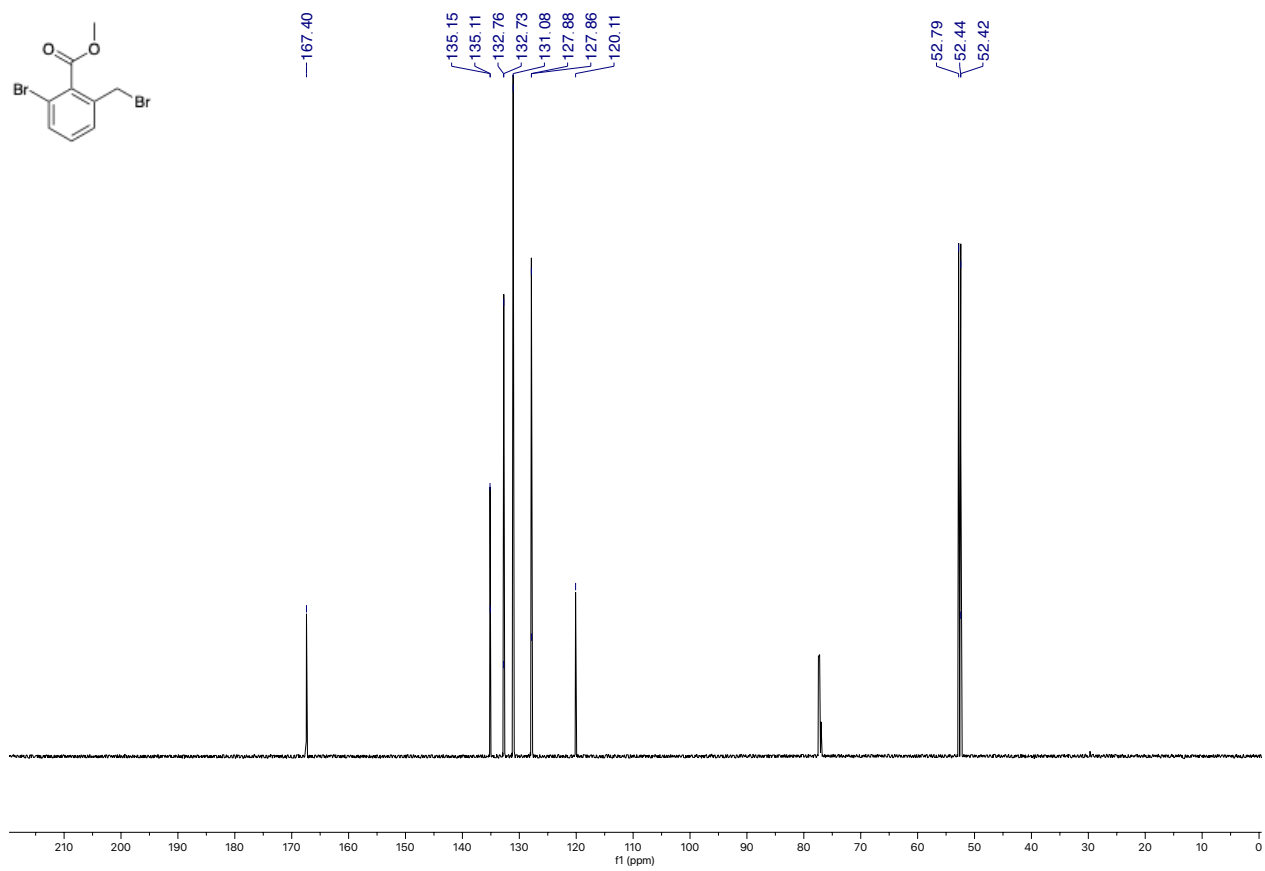
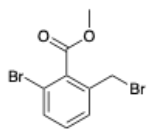
Composé 81



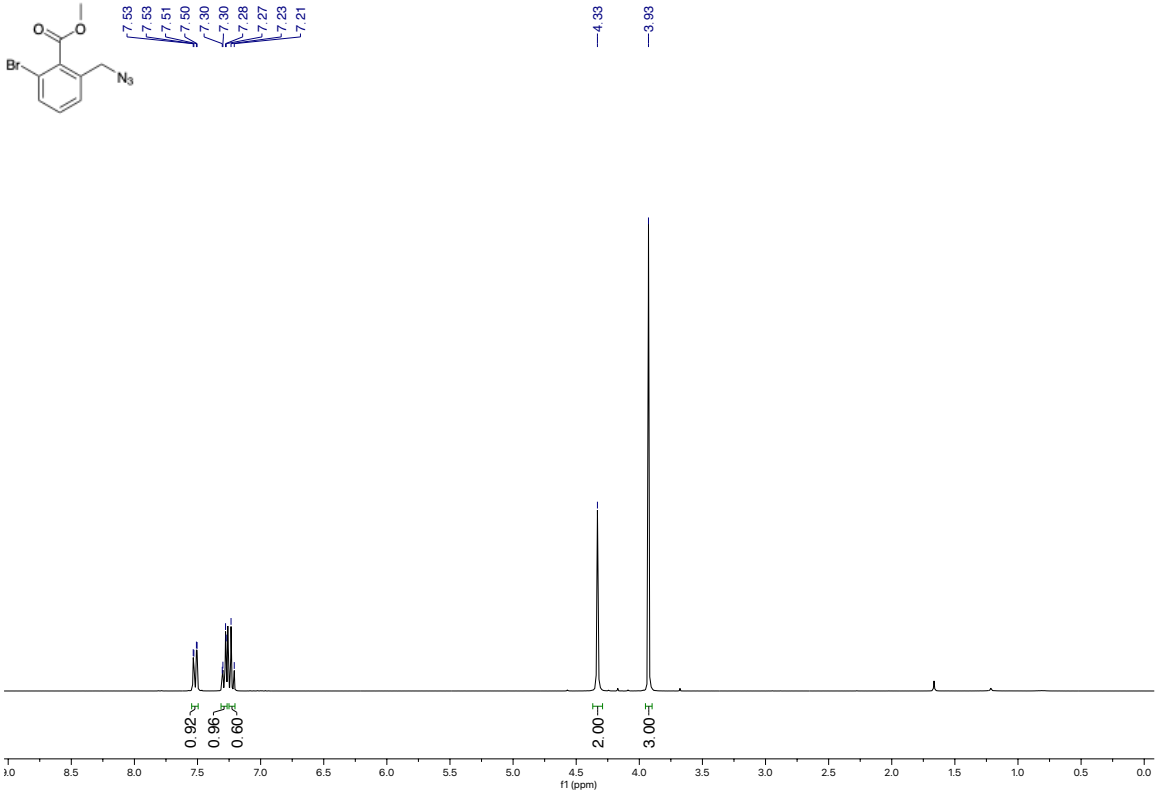
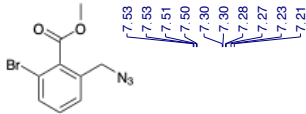


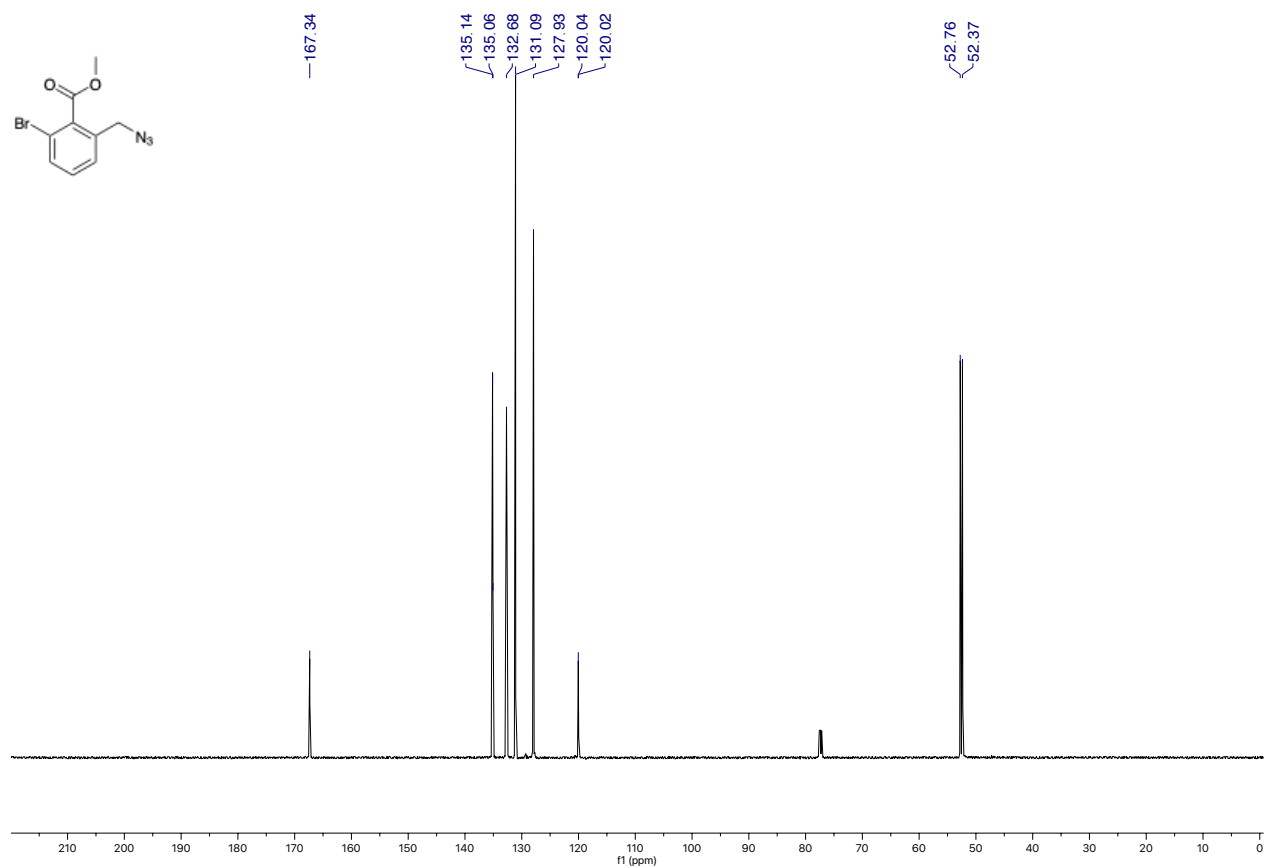
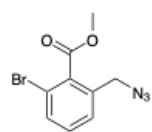
Composé 89



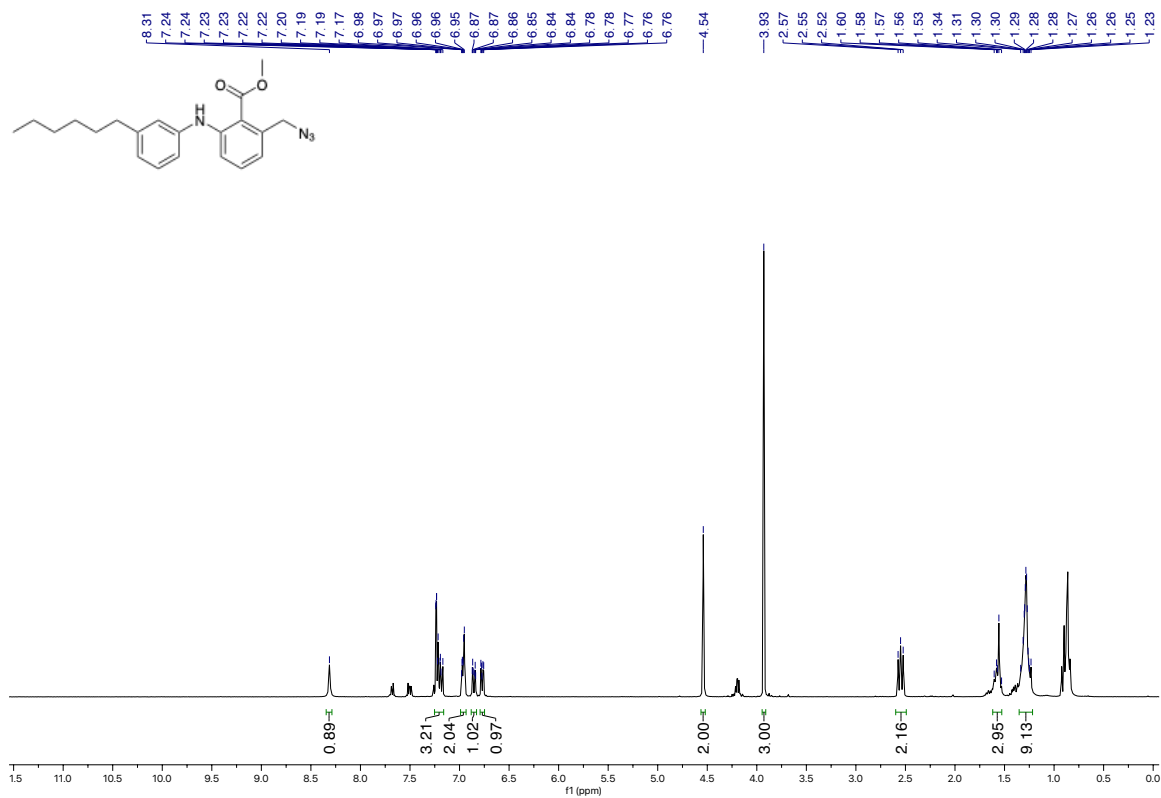


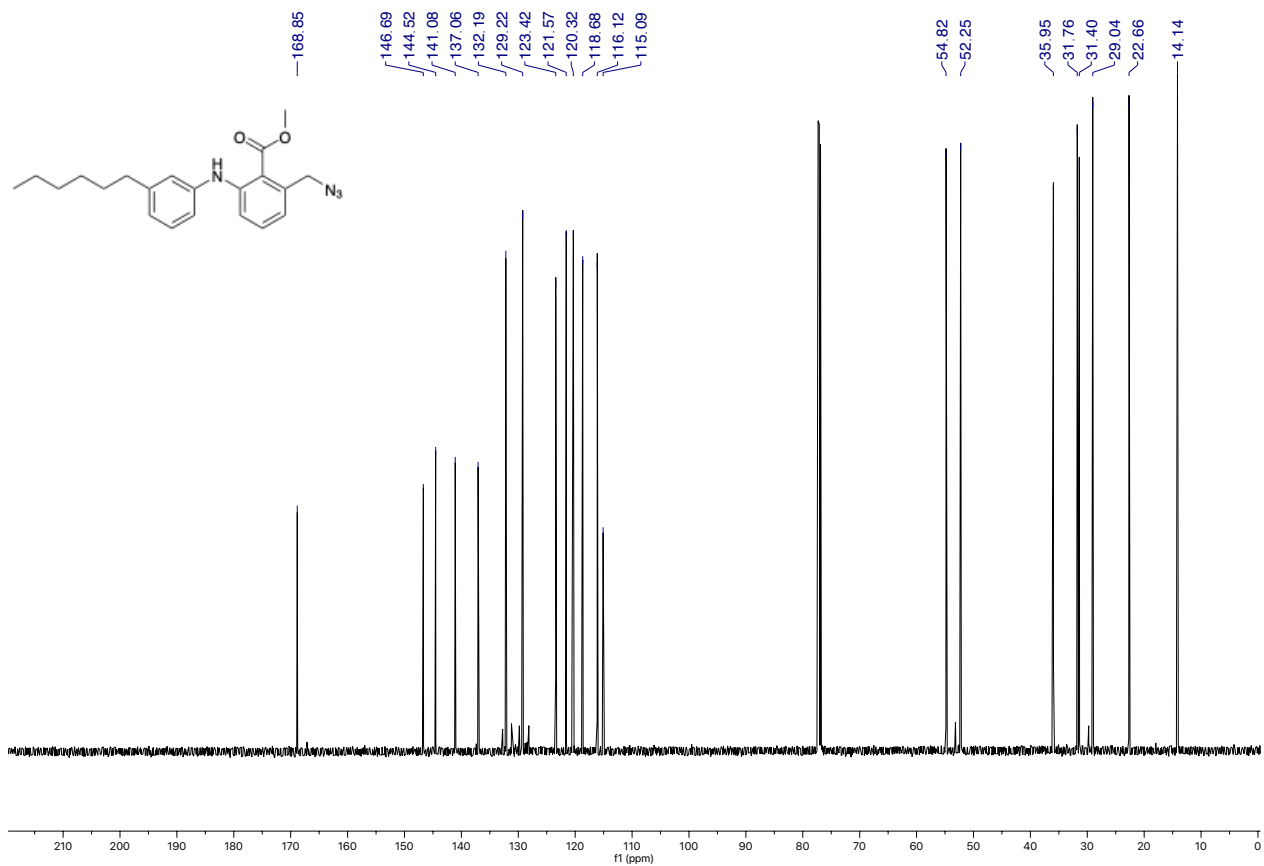
Composé 90



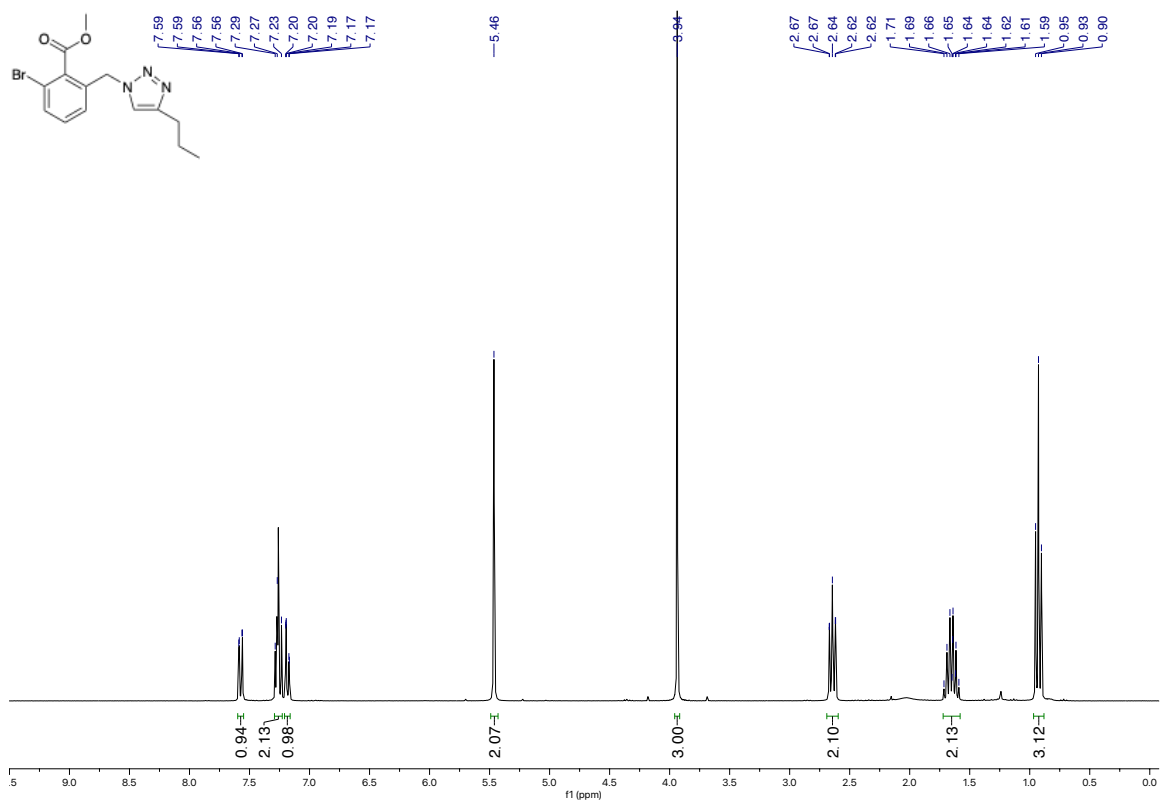


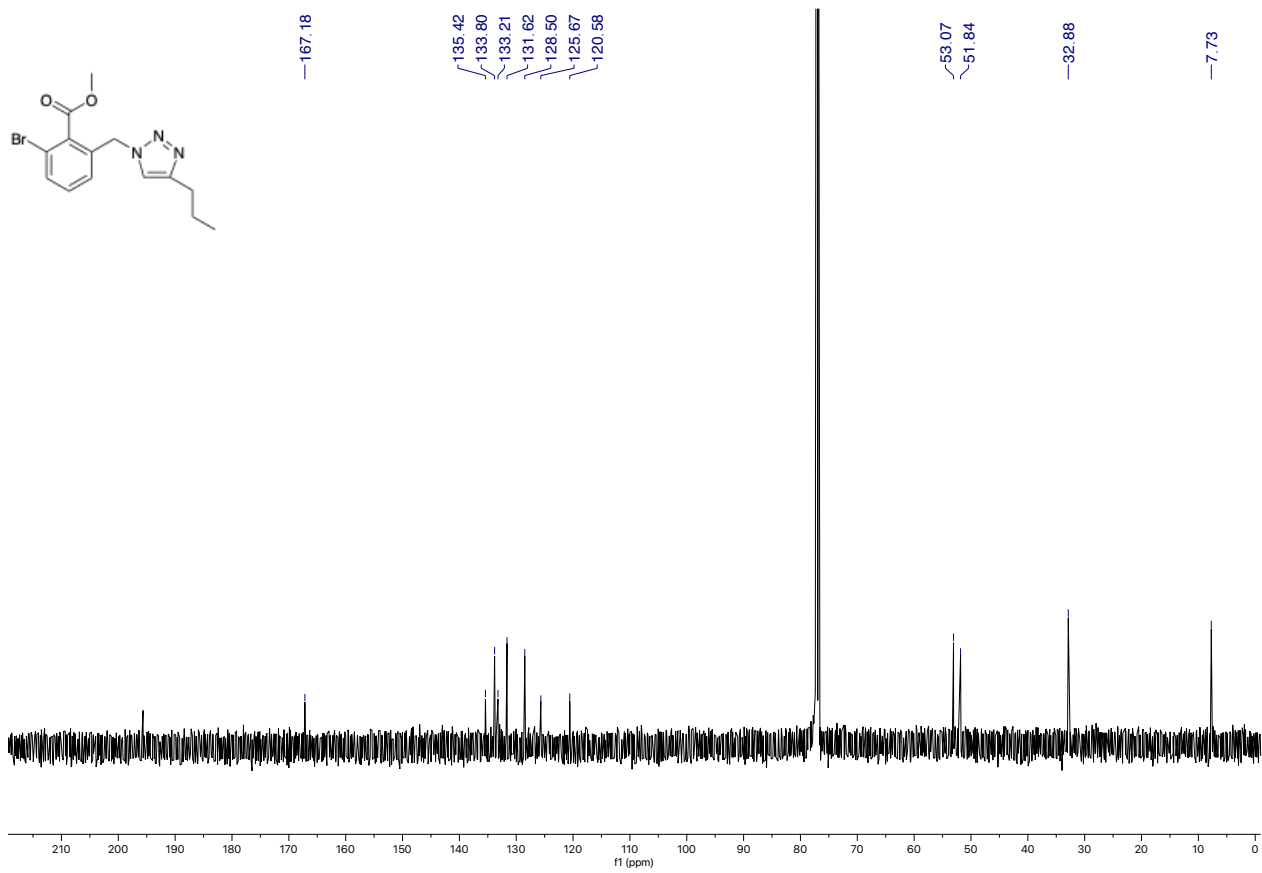
Composé 91



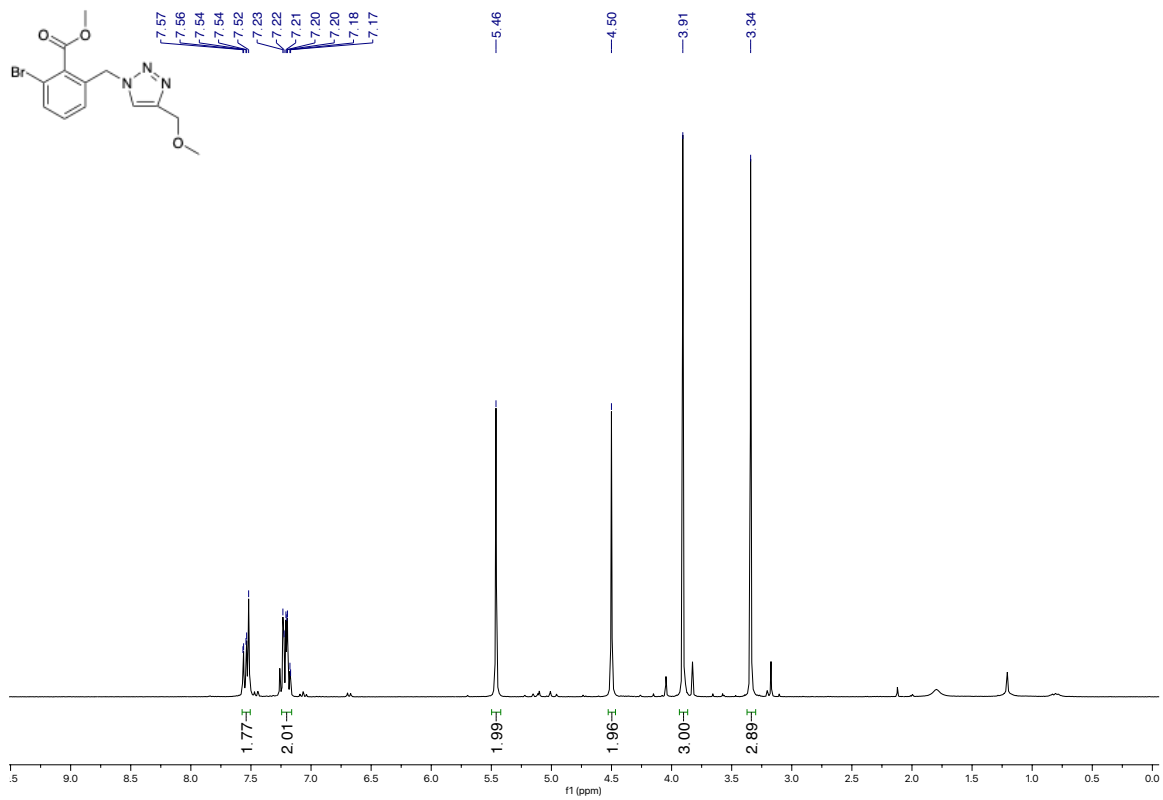


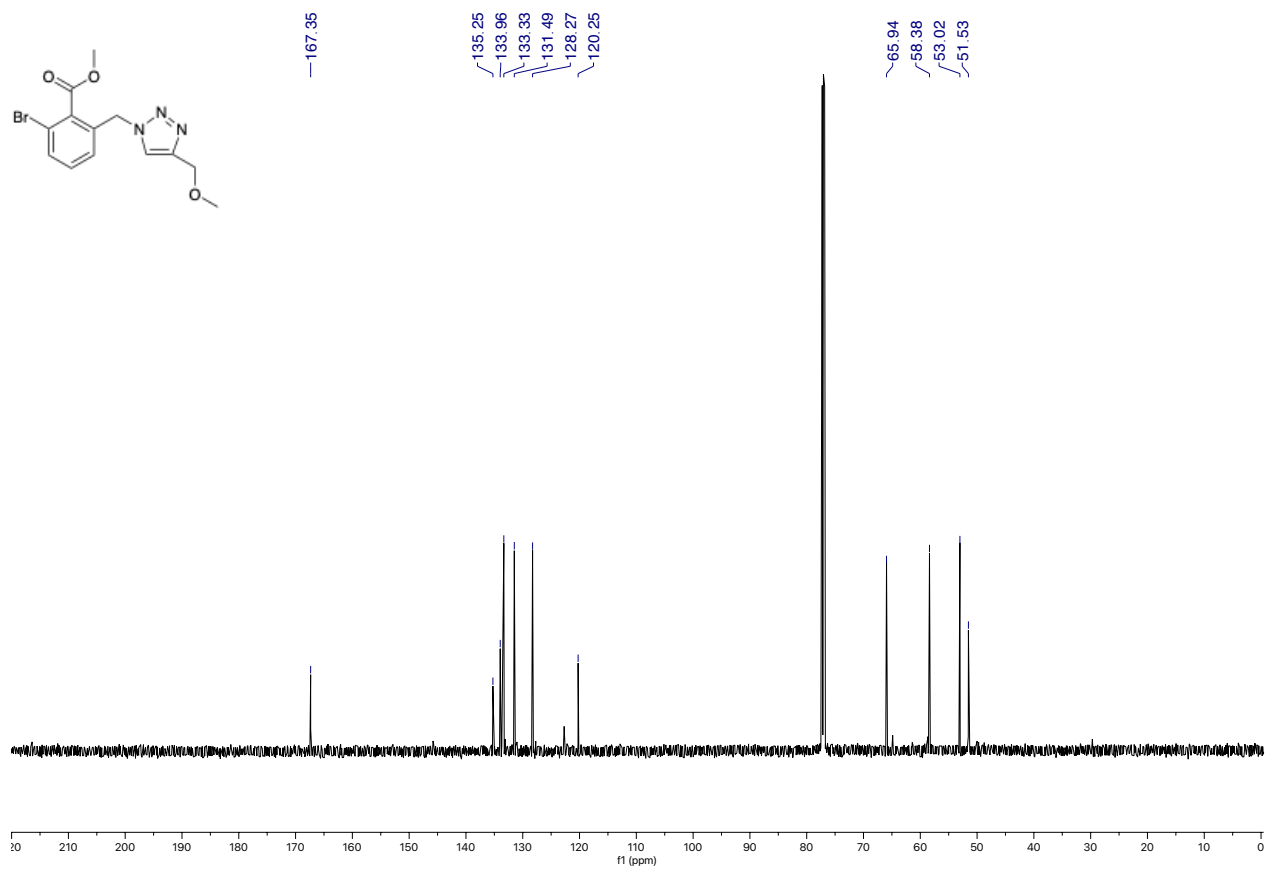
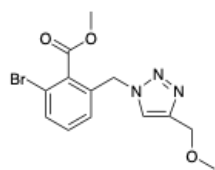
Composé 97



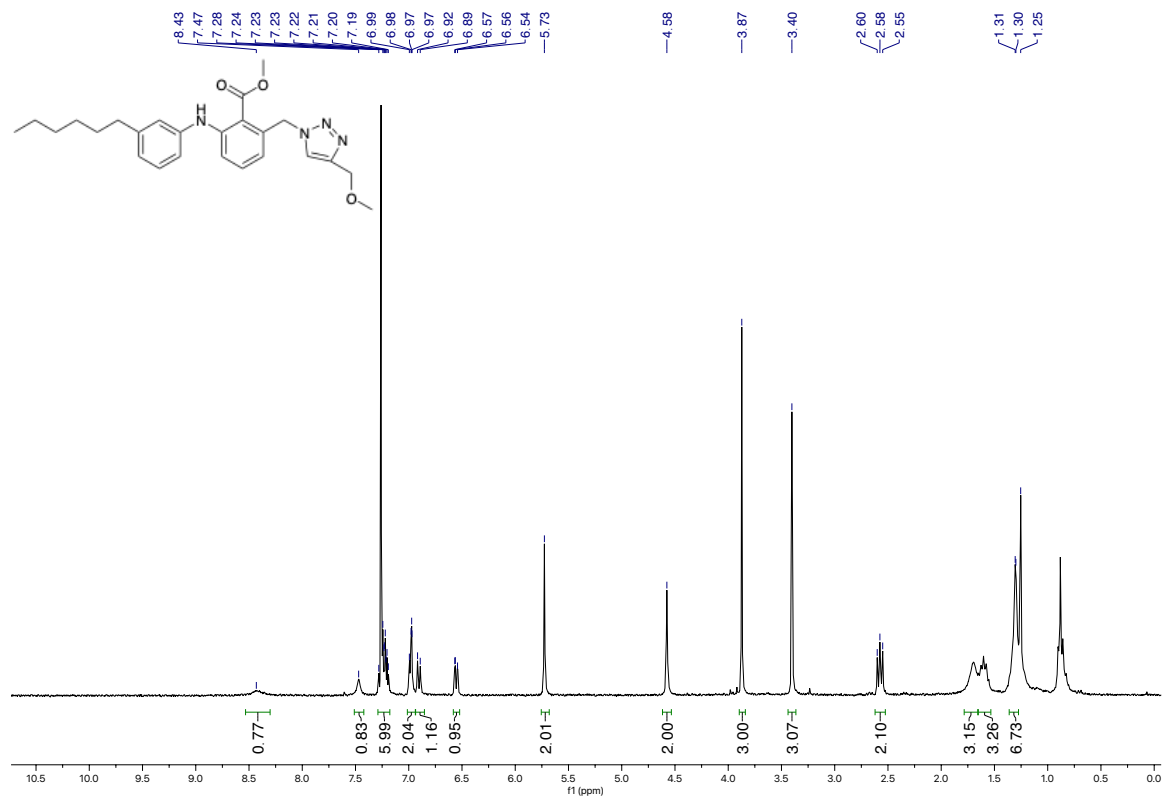


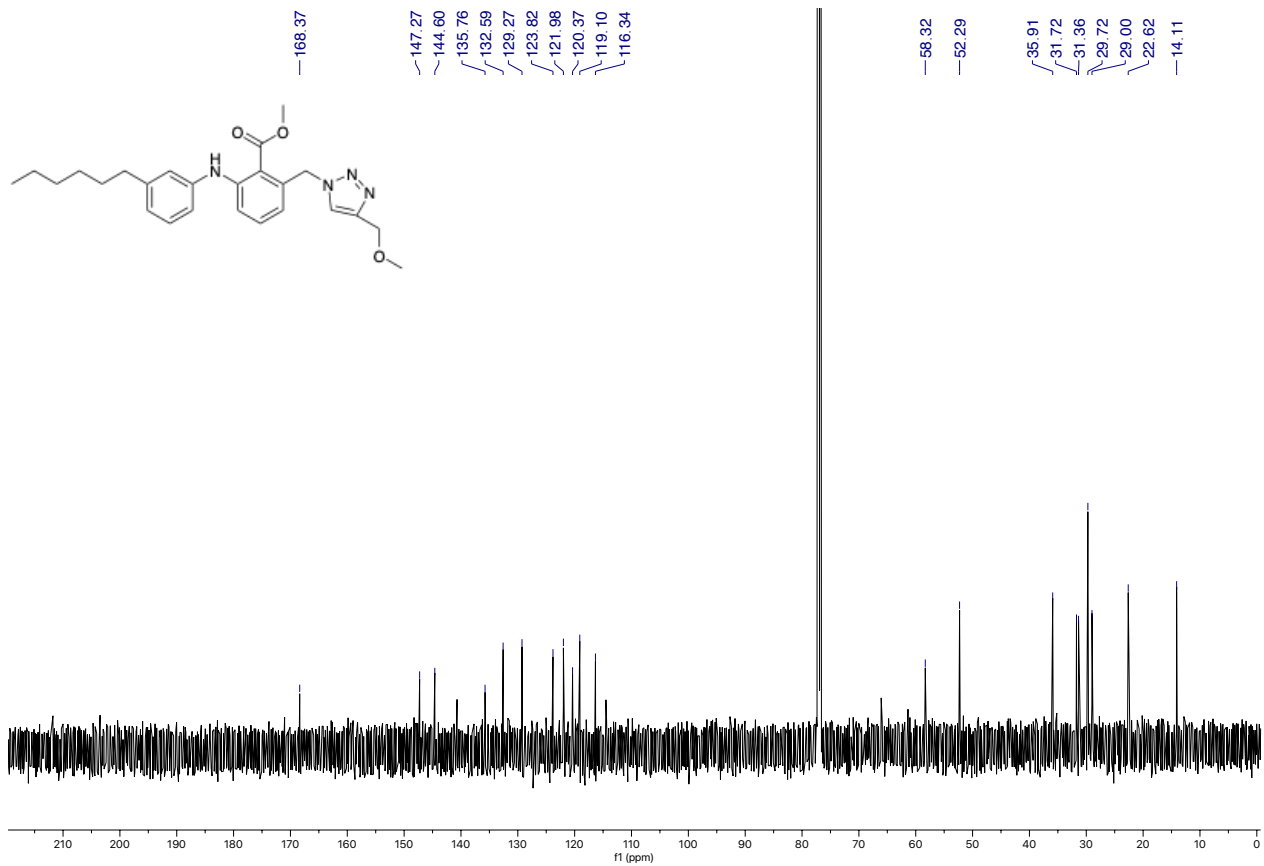
Composé 98





Composé 99





BIBLIOGRAPHIE

- (1) Snigdha, K.; Gangwani, K. S.; Lapalikar, G. V.; Singh, A.; Kango-Singh, M. Hippo Signaling in Cancer: Lessons From Drosophila Models. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*:85. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00085>.
- (2) Ma, S.; Meng, Z.; Chen, R.; Guan, K.-L. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Advance* **2018**, *88*: 577-604. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111829>.
- (3) Johnson, R.; Halder, G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for the regenerative medicine and cancer treatment. *Nature* **2014**, *13*, 63-79. <https://doi.org/10.1038/nrd4161>.
- (4) Pobbati, A. V.; Hong, W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biology & Therapy* **2013**, *14*:5, 390-398. <https://doi.org/10.4161/cbt.23788>.
- (5) Meng, Z.; Moroishi, T.; Guan, K.-L. Mechanisms of Hippo Pathway Regulation. *Genes Dev* **2016**, *30*:1, 1–17. <https://doi.org/10.1101/gad.274027.115>.
- (6) Capella, M.; Ribone, P. A.; Arce, A. L.; Chan, R. L. Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants. *Plant Transcription Factors* **2016**, *7*, 113-126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00007-5>.
- (7) Li, Z.; Zhao, B.; Wang, P.; Chen, F.; Dong, Z.; Yang, H.; Guan, K.-L.; Xu, Y. Structural insights into the YAP and TEAD Complex. *Genes Dev.* **2010**, *24*:3, 235-240. <https://doi.org/10.1101/gad.1865810>.
- (8) Pobbati, A. V.; Rubin, B. P. Protein-Protein Interaction Disruptors of the YAP/TAZ-TEAD Transcriptional Complex. *Molecules* **2020**, *25*, 6001–6017. <https://doi.org/10.3390/molecules25246001>.
- (9) Calses, P. C.; Crawford, J. J.; Lill, J. R.; Dey, A. Hippo Pathway in Cancer: Abberant Regulation and Therapeutic Opportunities. *Trends in Cancer* **2019**, *5*:5, 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.04.001>.
- (10) Mélin, L.; Abdullayev, S.; Fnaiche, A.; Vu, V.; Suarez, N. G.; Zeng, H.; Szewczyk, M. M.; Li, F.; Senisterra, G.; Allali-Hassani, A.; Chau, I.; Dong, A.; Woo, S.; Annabi, B.; Halabelian, L.; LaPlante, S. R.; Vedadi, M.; Baryte-Lovejoy, D. Santhakumar, V.; Gagnon, A. Development of LM98, a Small-Molecule TEAD Inhibitor Derived from Flufenamic Acid. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1-22. doi.org/10.1002/cmdc.202100432.
- (11) Yu, F.-X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J. L.; Lian, I.; Wang, L. H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; Fu, X.-D.; Mills, G. B.; Guan, K.-L. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **2012**, *150*:4, 791–780. doi:10.1016/j.cell.2012.06.037.

- (12) Bao, Y.; Nakagawa, K.; Yang, Z.; Ikeda M.; Withanage, K.; Ishigami-Yuasa, M.; Okuno, Y.; Hata, S.; Nishina, H.; Hata, Y. A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J. Biochem.* **2011**, 150:2, 199–208. doi:10.1093/jb/mvr063.
- (13) Crawford, J. J.; Bronner, S. M.; Zbieg, J. R. Hippo pathway inhibition by blocking the YAP/TAZ-TEAD interface: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2018**, 28:12, 867-873. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1549226>.
- (14) Messmer, K. J.; Abel, S. R. Verteporfin for age-related macular degeneration. *Annals of Pharmacotherapy* **2001**, 35:12, 1593-1598. <https://doi.org/10.1345/aph.10365>.
- (15) Jiao, S.; Wang, H.; Shi, Z.; Dong, A.; Zhang, W.; Song, X.; He, F.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wang, W.; Wang, X.; Guo, T.; Li, P.; Zhao, Y.; Ji, H.; Zhang, L.; Zhou, Z. A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell* **2014**, 25:2, 166-180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.010>.
- (16) Zhang, Z.; Lin, Z.; Zhou, Z.; Shen, H.C.; Yan, S.F.; Mayweg, A.V.; Xu, Z.; Qin, N.; Wong, J.C.; Zhang, Z.; Rong, Y.; Fry, D. C.; Hu, T. Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP-TEAD Protein-Protein Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5:9, 993–998. <https://doi.org/10.1021/ml500160m>.
- (17) Smith, S.A.; Sessions, R. B.; Shoemark, D. K.; Williams, C.; Ebrahimighaei, R.; McNeill, M. C.; Crump, M. P.; McKay, T. R.; Harris, G.; Newby, A. C.; Bond, M. Antiproliferative and Antimigratory Effects of a Novel YAP-TEAD Interaction Inhibitor Identified Using in Silico Molecular Docking. *J. Med Chem* **2019**, 62:3, 1291-1305. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01402>.
- (18) Pobbati, A. V.; Han, X.; Hung, A. W.; Luo, X.; Hong, W.; Poulsen, A. Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure* **2015**, 23, 2076-2086. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2015.09.009>.
- (19) Li, Y.; Liu, S.; Yihui, E.; Li, R.; Poulsen, A.; Hill, J.; Pobbati, A. V.; Hung, A. W.; Hong, W.; Keller, T. H.; Kang, C. Structural and ligand-binding analysis of the YAP-binding domain of transcription factor TEAD4. *Biochem J* **2018**, 475:12, 2043-2055. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180225>.
- (20) Bum-Erdene, K.; Zhou, D.; Gonzalez-Gutierrez, G.; Pollok, K. E.; Wells, C. D.; Meroueh, S. O. Small-Molecule Covalent Modification of Conserved Cysteine Leads to Allosteric Inhibition of the TEAD-Yap Protein-Protein Interaction. *Cell Chemical Biology* **2019**, 26, 378-389. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.11.010>.
- (21) Gridnev, A.; Maity, S.; Misra, J. R. Structure-based discovery of a novel small-molecule inhibitor of TEAD palmitoylation with anticancer activity. *Frontiers in Oncology* **2022**, 12, 1021823. <https://doi.org/10.1101/2022.06.09.495565>.

- (22) Furet, P.; Bordas, V.; Le Douget, M.; Salem, B.; Mesrouze, Y.; Imbach-Weese, P.; Sellner, H.; Voegtle, M.; Soldermann, N.; Chapeau, E.; Wartmann, M.; Scheufler, C.; Fernandez, C.; Kallen, J.; Guagnano, V.; Chène, P.; Schmelzle, T. The First Class of Small Molecules Potently Disrupting the YAP-TEAD Interaction by Direct Competition. *Chem Med Chem* **2022**, 17:19, e202200303. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200303>.
- (23) Li, Q.; Sun, Y.; Jarugumilli, G. K.; Liu, S.; Dang, K.; Cotton, J. L.; Xiol, J.; Chan, P. Y.; DeRan, M.; Ma, L.; Li, R.; Zhu, L. J.; Li, J. H.; Leiter, A. B.; Ip, Y. T.; Camargo, F. D.; Luo, X.; Johnson, R. L.; Wu, X.; Mao, J. Lats ½ Sustain Intestinal Stem Cells and Wnt Activation through TEAD-Dependent and Independent Transcription. *Cell Stem Cell* **2020**, 26:5, 675-692. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.03.002>.
- (24) Fan, M.; Lu, W.; Che, J.; Kwiatkowski, N. P.; Gao, Y.; Seo, H.-S.; Ficarro, S. B.; Gokhale, P. C.; Liu, Y.; Geffken, E. A.; Lakhani, J.; Song, K.; Kuljanin, M.; Ji, W.; Jiang, J.; He, Z.; Tse, J.; Boghossian, A. S.; Rees, M. G.; Ronan, M. M.; Roth, J. A.; Mancias, J. D.; Marto, J. A.; Dhe-Paganon, S.; Zhang, T.; Gray, N. S. Covalent disruptor of YAP-TEAD association suppresses defective Hippo signaling. *Elife* **2022**, 11, e78810. <https://doi.org/10.7554/eLife.78810>.
- (25) Trippier, P. C. Synthetic Strategies for the Biotinylation of Bioactive Small Molecules. *ChemMedChem* **2013**, 8, 190-203. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200498>.
- (26) The Royal Swedish Academy of Science. (2022, 5 octobre) The Nobel Prize in Chemistry 2022: It just says click - and the molecules are coupled together. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/>
- (27) Devaraj, N. K.; Finn, M. G. Introduction: Click Chemistry. *Chem. Rev.* **2021**, 121:12, 6697-6698. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00469>.
- (28) Stanford, Chemistry. Carolyn Bertozzi. <https://chemistry.stanford.edu/people/carolyn-bertozzi>.
- (29) Kolb, H. C.; Sharpless, B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* **2003**, 8:24, 1128-1137. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02933-7.
- (30) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm Res.* **2008**, 25:10, 2216-2230. doi:10.1007/s11095-008-9616-1.