

# Thèse de Doctorat

David MONTOIR

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Spécialité : Chimie Thérapeutique

Unité de recherche : Laboratoire IICiMed - EA 1155

Soutenu le 08 Octobre 2015

Thèse N° :

## Synthèse de nouveaux analogues de la novobiocine, inhibiteurs potentiels de la Hsp90

### JURY

Rapporteurs :	<b>Mouâd ALAMI</b> , Directeur de Recherche, CNRS, Université Paris Sud <b>Philippe URIAC</b> , Professeur, Université de Rennes 1
Examineurs :	<b>Olivier DUVAL</b> , Professeur, Université d'Angers <b>Régis MILLET</b> , Professeur, Université de Lille 2 <b>Cyrille GARNIER</b> , Maître de Conférences, Université de Rennes 1
Directeur de Thèse :	<b>Muriel DUFLOS</b> , Professeur, Université de Nantes
Co-encadrant :	<b>Marc-Antoine BAZIN</b> , Maître de Conférences, Université de Nantes

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES .....</b>	<b>1</b>
<b>PRÉAMBULE .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
I - La Hsp90 : une cible potentielle dans la découverte de nouvelles thérapies anticancéreuses.....	6
A - Les protéines de choc thermique et la réponse au stress.....	6
B - La famille Hsp90.....	7
1 - Structure, conformations dynamiques et cycle ATPasique .....	8
2 - La Hsp90 et ses co-chaperons.....	11
a) Les co-chaperons permettant le recrutement de protéines clientes.....	12
b) Les co-chaperons agissant sur le « remodelage » de la Hsp90 au travers des différents états conformationnels .....	14
c) Les co-chaperons intervenant à la fin du cycle chaperon.....	15
3 - Le cycle chaperon de la Hsp90 .....	16
4 - Régulation de la Hsp90 par modifications post-traductionnelles .....	17
a) La phosphorylation.....	17
b) L'acétylation .....	18
c) La nitrosylation .....	18
d) La méthylation .....	19
5 - Les protéines clientes de la Hsp90 et leur reconnaissance au sein du chaperon.....	19
6 - Rôle de la Hsp90 dans la dégradation des protéines.....	21
7 - La Hsp90 et son implication en pathologie.....	22
a) La Hsp90 dans les maladies neurodégénératives .....	22
b) La Hsp90 dans le cancer .....	25
II - Les inhibiteurs de la Hsp90.....	26
A - Les inhibiteurs du domaine <i>N</i> -terminal.....	26
1- Les dérivés de la geldanamycine .....	26
a) Le 17-allylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17-AAG).....	27
b) Le 17-diméthylaminoéthylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17-DMAG).....	28
c) La rétaspiimycine (IPI-504) .....	28
d) L'IPI-493.....	29
2 - Les dérivés du résorcinol .....	29
a) Le KW-2478.....	30
b) Le NVP-AUY922 .....	30
c) Le ganetespib (STA-9090).....	31

## Table des matières

d) L'AT-13387 .....	31
3 - Les analogues des bases puriques .....	31
a) Le BIIB021 .....	32
b) Le MPC-3100.....	32
c) Le NVP-HSP990.....	33
d) Le PU-H71 .....	33
e) Le Debio-0932 .....	33
4 - Autres structures .....	33
B - Interactions des inhibiteurs <i>N</i> -terminaux avec la Hsp90.....	34
C - Les inhibiteurs du domaine <i>C</i> -terminal .....	38
<b>OBJECTIFS DE RECHERCHE .....</b>	<b>45</b>
<b>PARTIE THÉORIQUE : TRAVAUX RÉALISÉS.....</b>	<b>48</b>
<b>PARTIE A : TRAVAUX DE SYNTHÈSE.....</b>	<b>49</b>
I - Synthèses en série 1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-one .....	50
A - Aperçu bibliographique.....	50
1 - Intérêt en chimie thérapeutique.....	50
2 - Synthèse du noyau 1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-one.....	50
a) Par cyclisation intramoléculaire à partir d'un noyau pyridinique .....	50
b) Par cyclisation intramoléculaire à partir d'un noyau pyridin-2-one .....	51
c) Par réaction de Friedländer .....	52
3 - Réactivité du noyau 1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-one .....	52
a) Réaction d'halogénéation.....	52
b) Réaction d'alkylation .....	53
c) Réaction d'aminolyse.....	53
B - Stratégie de synthèse .....	53
C - Accès au 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde.....	55
D - Accès aux dérivés amidiques analogues de la novobiocine (Voie A) .....	56
1 - Synthèse de la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-one .....	56
2 - Synthèse d'amides dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-one...	57
3 - Fonctionnalisation en position 7 des amides dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-one .....	60
a) Accès par une amination palladocatalysée de Buchwald / Hartwig.....	60
b) Accès par une substitution nucléophile aromatique.....	62
4 - Synthèse des chlorhydrates .....	66
5 - Conclusion .....	67
E - Etude de couplages palladocatalysés sur des 3,7-dihalogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones (Voie B).....	67
1 - Approche synthétique .....	67

## Table des matières

2 - Synthèse des 7-chloro-3-halogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones .....	69
3 - Fonctionnalisation des 3,7-dihalogéno-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones en position 3	72
a) Par couplage de Suzuki-Miyaura .....	72
b) Par couplage de Buchwald-Hartwig .....	77
4 - Accès aux 1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones 3,7-disubstituées.....	80
a) Par couplage de Suzuki-Miyaura sur les 3-aryl-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones.....	80
b) Par couplage de Suzuki-Miyaura sur les 7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones 3- <i>N</i> -substituées .....	81
c) Par couplage de Buchwald-Hartwig sur les 7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones 3- <i>N</i> -substituées .....	82
5 - Accès aux 1,6-naphtyridin-2(1 <i>H</i> )-ones 3,7-disubstituées « one-pot » .....	83
a) Par couplage séquentiel de type Suzuki / Suzuki.....	84
b) Par couplage séquentiel de type Buchwald / Suzuki .....	86
c) Par couplage séquentiel de type Buchwald / Buchwald.....	89
d) Par couplage de Buchwald-Hartwig puis par S <sub>N</sub> Ar .....	92
6 - Conclusion .....	94
II - Synthèses en série 1,6-naphtyridin-4(1 <i>H</i> )-one .....	95
A - Aperçu bibliographique.....	95
1 - Intérêt en chimie thérapeutique.....	95
2 - Synthèse du noyau 1,6-naphtyridin-4(1 <i>H</i> )-one.....	95
a) Par fermeture de la liaison 1-8a .....	95
b) Par fermeture de la liaison 4-4a .....	96
B - Stratégie de synthèse .....	96
C - Synthèse de l'acide 7-chloro-1-méthyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridine-3-carboxylique.....	97
D - Accès aux analogues de la novobiocine à partir des 1,6-naphtyridin-4(1 <i>H</i> )-ones halogénées en 3 (Voie A) .....	99
1 - Synthèse des 7-chloro-3-halogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-4(1 <i>H</i> )-ones .....	99
2 - Synthèse d'amines et d'amides dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-4(1 <i>H</i> )-one .....	100
a) Par couplage palladocatalysé de type Buchwald-Hartwig.....	100
b) Par couplage cuprocatalysé de type Ullmann .....	101
E - Accès aux analogues de la novobiocine à partir de la 3-amino-7-chloro-1,6-naphtyridin-4(1 <i>H</i> )-one (Voie B) .....	104
1 - Par couplage avec la benzophénone imine puis clivage .....	104
2 - Par génération <i>in situ</i> d'ammoniac et réaction cuprocatalysée.....	105
3 - Par réaction cuprocatalysée en présence d'azoture de sodium .....	106
4 - Par réarrangement de Curtius à partir de l'acide carboxylique.....	107

## Table des matières

F - Conclusion .....	108
<b>PARTIE B : ETUDE BIOLOGIQUE.....</b>	<b>109</b>
I - Introduction .....	109
II - Etude de la solubilité .....	110
III - Détermination de l'interaction molécule / Hsp90 par fluorescence.....	120
A - Sur la Hsp90 entière .....	120
B - Sur chacun des domaines <i>N</i> - et <i>C</i> -terminaux .....	127
C - Etude de la liaison des composés 18 et 10 à la Hsp90 .....	130
1 - Calcul du $K_d$ pour le composé 18.....	130
2 - Calcul du $K_d$ pour le composé 10.....	132
IV - Etude de la viabilité et de la mort cellulaire et analyse par Western Blot de l'expression de protéines clientes de la Hsp90 .....	133
A - Lignées cellulaires.....	133
B - Etude de la viabilité cellulaire par test MTT .....	134
1 - Principe .....	134
2 - Résultats biologiques et discussion.....	134
C - Evaluation de la mort cellulaire par marquage à l'annexine V-FITC .....	138
1 - Principe .....	138
2 - Résultats biologiques et discussion.....	139
D - Analyse du cycle cellulaire par marquage IP .....	140
1 - Principe .....	140
2 - Résultats biologiques et discussion.....	140
E - Analyse par Western Blot du niveau d'expression des protéines clientes de la Hsp90 après traitement des cellules cancéreuses par les molécules d'intérêt .....	143
1 - Principe .....	143
2 - Résultats biologiques et discussion.....	144
V - Conclusion .....	145
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE .....</b>	<b>147</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>151</b>
I - General methods .....	152
II - General procedures.....	152
III - Protocols and characterizations.....	157
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>241</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

17-AAG 17-Allylamino-17-déméthoxygeldanamycine

### A

Ac Acétyle  
Ac<sub>2</sub>O Anhydride acétique  
AcOH Acide acétique  
AcONH<sub>4</sub> Acétate d'ammonium  
ADN Acide désoxyribonucléique  
ADP Adénosine diphosphate  
Aha1 Activator of heat shock protein 90  
Anh Anhydre  
AV-FITC Annexine V couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine  
Ar Aryle  
ARN Acide ribonucléique  
ATP Adénosine triphosphate  
aUC Ultracentrifugation analytique

### B

(±)BINAP (±)2,2'-Bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle  
Boc *tert*-Butoxycarbonyle

### C

CCM Chromatographie sur couche mince  
Cdc37 Cell division cycle 37 homolog  
CHIP Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein  
CI<sub>50</sub> Concentration d'inhibition 50%  
CMF Cytométrie en flux  
CuTC Thiophène-2-carboxylate de cuivre(I)

### D

DCC *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide  
DIEA *N,N*-Diisopropyléthylamine  
17-DMAG 17-Diméthylaminoéthylamino-17 déméthoxygeldanamycine  
DMAP 4-Diméthylaminopyridine  
DME 1,2-Diméthoxyéthane  
DMEDA *N,N'*-Diméthyléthylènediamine

## Liste des abréviations

DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Diméthylsulfoxyde deutéré
DO	Densité optique
DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
dppf	1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène

### **E**

EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
équiv	Equivalent(s)
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
EtONa	Ethanolate de sodium

### **G**

Grp94	94 kDa glucose-regulated protein
-------	----------------------------------

### **H**

Hop	Hsp70-Hsp90
HRI	Heme-regulated inhibitor kinase
Hsc	Heat shock cognate
HSE	Heat shock elements
HSF-1	Heat shock transcription factor-1
Hsp	Heat shock protein

### **I**

IP	Iodure de propidium
----	---------------------

### **K**

Kd	Constante de dissociation
kDa	Kilodalton

### **L**

L	Ligand
LiOAc	Acétate de lithium

*Liste des abréviations*

**M**

MeOH	Méthanol
Me	Méthyle
Mp	Melting point
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tétrazolium

**N**

NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NMP	<i>N</i> -méthylpyrrolidin-2-one

**P**

Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	Tris(dibenzylidène acétone) dipalladium
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Tétrakis(triphénylphosphine) palladium
Pd(OAc) <sub>2</sub>	Acétate de palladium
Ph	Phényle
Pih1	Protein interacting with Hsp90
Pp5/Ppt1	Protein phosphatase 5 / protein phosphatase T
PPIases	TPR containing peptidyl-prolyl isomerases
PyBOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidinophosphonium

**R**

R <sub>f</sub>	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSA	Relations structure-activité

**S**

S1P1	Sphingosine 1 Phosphate receptor 1
Sgt1	Suppressor of G2 allele of skp1
S <sub>N</sub> Ar	Substitution nucléophile aromatique
SPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diméthoxybiphényle
Sti1	Stress inductible 1

**T**

ta	Température ambiante
Tah1	TPR-containing protein associated with Hsp90

*Liste des abréviations*

<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -Butanolate de potassium
THF	Tétrahydrofurane
TMEDA	Tétraméthyléthylènediamine
TPR	Tetratricopeptide repeats
TRAP1	Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1

**U**

UPLC-MS	Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
---------	--

**X**

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

## PRÉAMBULE

Ce rapport présente les travaux réalisés au sein du département de Chimie Thérapeutique de l'équipe IICiMed de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes.

Le projet de thèse développé ici, porte sur la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues structuraux de la novobiocine à visée antiproliférative, inhibiteurs potentiels de la Hsp90.

La protéine de choc thermique Hsp90 constitue une cible prometteuse pour le traitement de nombreuses pathologies cancéreuses. Responsable de la maturation conformationnelle de nombreuses oncoprotéines, l'inhibition de son activité chaperon représente un enjeu important dans la découverte de nouvelles molécules anticancéreuses.

Aujourd'hui son activité peut être inhibée par deux classes d'inhibiteurs, les inhibiteurs *N*-terminaux d'une part, ayant commencé à montrer leur limite dans différents essais cliniques, et les inhibiteurs *C*-terminaux d'autre part, représentant une alternative encourageante à la découverte de nouveaux agents chimiothérapeutiques.

Cette nouvelle classe d'inhibiteurs, ciblant spécifiquement la région *C*-terminale, fait l'objet d'une attention plus particulière ces dernières années, et a permis l'émergence de nouveaux composés présentant des activités antiprolifératives intéressantes résultant d'une inhibition de la Hsp90.

C'est au deuxième cas de figure que nous nous intéressons et notre travail porte sur la synthèse de nouvelles molécules originales en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one et 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one potentiellement inhibitrices du domaine *C*-terminal. Les évaluations biologiques sont menées en parallèle au sein de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR) de l'Université de Rennes 1 et de l'équipe 8 « Survie cellulaire et échappement tumoral dans les cancers du sein » du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers.

D'autre part, ce travail de recherche a dès lors permis d'aboutir à la publication de deux articles dans des revues scientifiques à comité de lecture (*Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7, 1487-1495 ; *Tetrahedron*, **2015**, 71, 3303-3313), une communication orale et neuf communications par affiches.

# INTRODUCTION

## I - La Hsp90 : une cible potentielle dans la découverte de nouvelles thérapies anticancéreuses

### A - Les protéines de choc thermique et la réponse au stress

C'est au début des années 1960 que le Professeur Ferruccio Ritossa publie ses premières observations selon lesquelles des cellules voient leur activité transcriptionnelle augmentée lorsqu'elles sont exposées à de fortes températures. Il nomme ce phénomène « la réponse au choc thermique ». Cette découverte a conduit à l'identification des protéines de choc thermique impliquées de manière importante en biologie et en médecine faisant toujours l'objet de recherches importantes.<sup>1,2</sup>

Lorsque la cellule est soumise à différents stress (inflammation, infection ou encore carence nutritive), elle va pouvoir y répondre en induisant une réponse de choc thermique ou de stress. D'un point de vue transcriptionnel, certains gènes vont pouvoir coder pour des protéines spécifiques appelées « protéines de choc thermique » ou « heat shock proteins ». Ces protéines de choc thermique ou Hsp sont regroupées en six familles différentes selon leur poids moléculaire (en kDa) et possèdent un haut degré d'homologie entre elles. Elles sont ubiquitaires et abondantes dans tous les compartiments cellulaires.

Chez l'homme, les Hsps 110, 90, 70, 60, 47 et la famille des Hsps de faible poids moléculaire (small Hsps) représentent les protéines de choc thermique les plus abondantes. De plus, pour les Hsp de 70 kDa, une distinction est faite entre les protéines inductibles répondant au choc thermique (Hsp70) et celles exprimées de façon constitutive, peu affectées par le stress (Hsc70). Bien que ces protéines partagent des propriétés communes, chaque famille présente des particularités concernant leur expression basale, leur localisation intracellulaire, leur mécanisme d'action, leur dépendance vis-à-vis de l'ATP ou encore le type de pathologies dans lesquelles elles interviennent. Les protéines de choc thermique appartiennent à la famille des « chaperons moléculaires », elles vont ainsi pouvoir interagir avec des protéines anormalement formées ou immatures en favorisant leur repliement et « remise en forme » dans une conformation tridimensionnelle adéquate.<sup>3</sup>

La réponse au choc thermique va se traduire par l'activation du facteur de transcription HSF-1 (heat shock transcription factor-1). Dans les cellules non stressées, ce facteur de transcription se retrouve séquestré sous forme de monomère dans des complexes multi-protéiques au sein du cytoplasme où l'on y retrouve les Hsps 90 et 70.

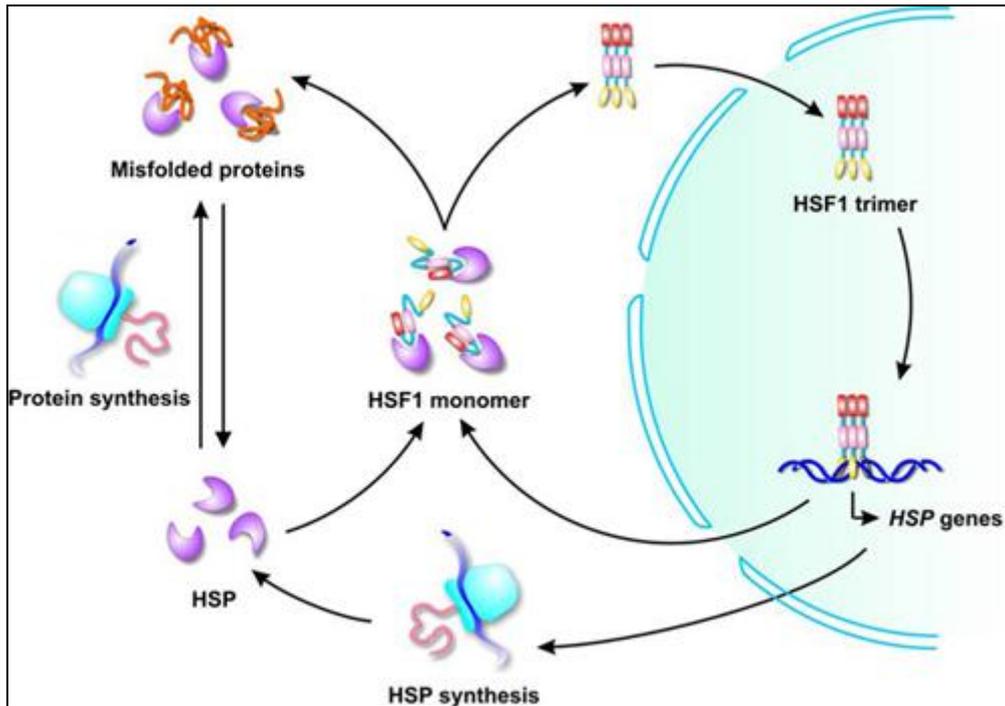
---

<sup>1</sup> Ritossa, F. *Cell Stress Chaperones* **1996**, *1*, 97-98.

<sup>2</sup> De Maio, A. *et al.*, *Cell Stress Chaperones* **2012**, *17*, 139-143.

<sup>3</sup> Burel, C. *et al.*, *Experientia* **1992**, *48*, 629-634.

En condition de choc thermique, HSF-1 va pouvoir se détacher du complexe protéique puis subir une trimérisation et une phosphorylation. Il va ensuite migrer dans le noyau et se fixer à l'ADN au niveau de séquences particulières : les HSE (Heat Shock Elements), déclenchant ainsi la transcription des gènes codant pour les Hsps qui vont pouvoir participer à la renaturation des protéines en même temps que la Hsp90 et la Hsp70 nouvellement libérées. Une fois les protéines renaturées, la grande quantité de Hsp produite va permettre un retour à la normale en agissant négativement sur HSF-1 et en le maintenant à nouveau inactif au sein du cytoplasme (**Figure 1**).<sup>4</sup>



**Figure 1** : Activation de HSF-1 permettant une transcription des gènes codant pour les Hsps.<sup>5</sup>

### ***B - La famille Hsp90***

La protéine de choc thermique 90 (Hsp90) est une protéine à activité chaperon constitutive et hautement conservée. Dans les cellules eucaryotes, elle est très abondante puisqu'elle représente 1 à 2% des protéines totales solubles.<sup>6</sup> La Hsp90 existe sous quatre isoformes :<sup>7,8</sup>

- deux localisées au sein du cytosol correspondant à la **Hsp90 $\alpha$**  (inductible en conditions de stress / forme majeure) et à la **Hsp90 $\beta$**  (constitutive / forme mineure) essentielles à la survie de la cellule eucaryote,

<sup>4</sup> Arrigo, A. P. *Medecine/Science* **2005**, *21*, 619-625.

<sup>5</sup> Image issue du site : <http://qian.human.cornell.edu>.

<sup>6</sup> Borkovich, K. A. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 3919-3930.

<sup>7</sup> Frey, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35612-35620.

## Introduction

- **TRAP1** (tumor necrosis factor receptor-associated protein 1) localisée dans la matrice mitochondriale, dont la fonction reste méconnue mais semblant avoir des fonctions antioxydantes et antiapoptotiques,<sup>9</sup>
- **Grp94** (94 kDa glucose-regulated protein) présente au sein du réticulum endoplasmique. Elle est impliquée dans la maturation des protéines et semble avoir une influence au sein du système immunitaire.<sup>10</sup>

Dans les cellules eucaryotes, la Hsp90 joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie protéique aussi bien dans des conditions normales que dans des conditions de stress telle qu'une élévation de température. En présence de la Hsp70, de co-chaperons (protéines assistant les chaperons), d'immunophilines et d'autres partenaires protéiques, elle va pouvoir assurer la maturation et le repliement dans l'espace de plus de deux cents protéines nommées « protéines clientes » avec lesquelles elle va pouvoir interagir au sein de cycles ATP-dépendants. Ces protéines clientes sont impliquées dans différents phénomènes tels que la transcription, la traduction, le fonctionnement mitochondrial, l'assemblage du kinétochore, l'organisation des microtubules ou encore le bon déroulement du cycle cellulaire. La Hsp90 intervient également dans les mécanismes contrôlant les voies sécrétoires et est associée au trafic membranaire.<sup>11,12,13</sup>

Un nombre important des protéines clientes de la Hsp90 est impliqué dans différentes voies de signalisation et de réponses au stress dans les cellules saines mais aussi cancéreuses.<sup>14,15,16</sup> Par conséquent, l'inhibition de la Hsp90 va engendrer une dégradation de ces « protéines clientes » par blocage de son activité chaperon. Ce complexe multi-protéique devenant alors instable va être détruit par le système ubiquitine-protéasome.

Ainsi, la Hsp90 représente une cible prometteuse dans le développement de nouveaux anticancéreux, son inhibition permettant le blocage de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des processus de cancérisation.

### 1 - Structure, conformations dynamiques et cycle ATPasique

La Hsp90 se présente sous la forme d'un homodimère dont chaque protomère contient trois régions :

- un domaine *N*-terminal permettant la fixation de l'ATP,

---

<sup>8</sup> Leskovar, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 11677-11688.

<sup>9</sup> Felts, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3305-3312.

<sup>10</sup> Binder, R. J. *et al.*, *J. Immunol.* **2007**, 179, 7254-7261.

<sup>11</sup> Kang, B. H. *et al.*, *Cell* **2007**, 131, 257-270.

<sup>12</sup> Stemmann, O. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 8585-8590.

<sup>13</sup> McClellan, A. J. *et al.*, *Cell* **2007**, 131, 121-135.

<sup>14</sup> Toft, D. O. *Trends Endocrinol. Metab.* **1998**, 9, 238-243.

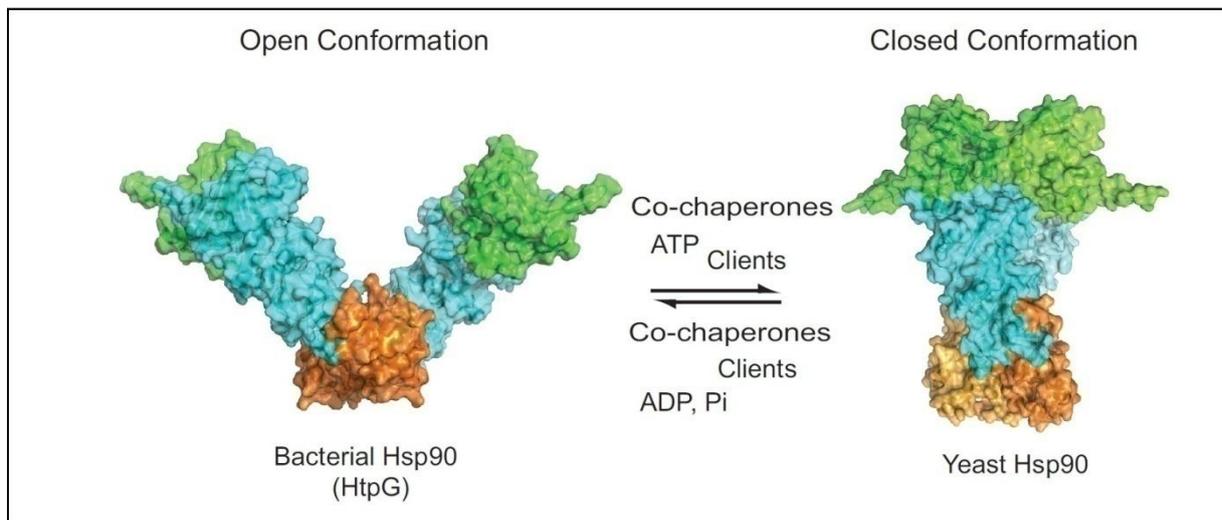
<sup>15</sup> Buchner, J. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 136-141.

<sup>16</sup> Walter, S.; Buchner, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1098-1113.

## Introduction

- un domaine médian où vont pouvoir venir s'y fixer des protéines clientes et des co-chaperons,
- un domaine C-terminal responsable de la dimérisation de la Hsp90. Il existe aussi sur ce domaine un second site de fixation de l'ATP pouvant servir lorsque celui présent sur la région N-terminale est occupé.

Des études structurales ont par la suite révélé que la protéine Hsp90 était capable d'adopter spontanément différents états conformationnels distincts permettant d'apprécier en détail chacune des étapes du cycle ATPasique (**Figure 2**).



**Figure 2** : Conformation ouverte et fermée de la Hsp90. Structures cristallines de la Hsp90 chez *E. coli* (HtpG) dans la conformation ouverte (à gauche, PDB 2IOQ) et dans la conformation fermée liée à un nucléotide chez la levure (à droite, PDB 2CG9). Le domaine N-terminal est représenté en vert, le domaine médian en bleu et le domaine C-terminal en orange.<sup>17</sup>

Cette activité ATPasique est importante puisqu'elle contribue au maintien de l'homéostasie protéique en assurant le « refolding » des protéines clientes. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs interagissant avec l'ATP perturbe grandement la fonction chaperon de la Hsp90 montrant ainsi que la liaison de la Hsp90 avec ses protéines clientes est dépendante de l'ATP.<sup>18</sup> En absence d'ATP, c'est la conformation « ouverte » ou conformation en « V » qui prédomine. Lorsque l'ATP se lie à la Hsp90, l'état conformationnel « fermé » devient majoritaire. La liaison de l'ATP sur l'extrémité N-terminale va être conditionnée par le segment « lid », pouvant être comparé à une sorte de « couvercle ».

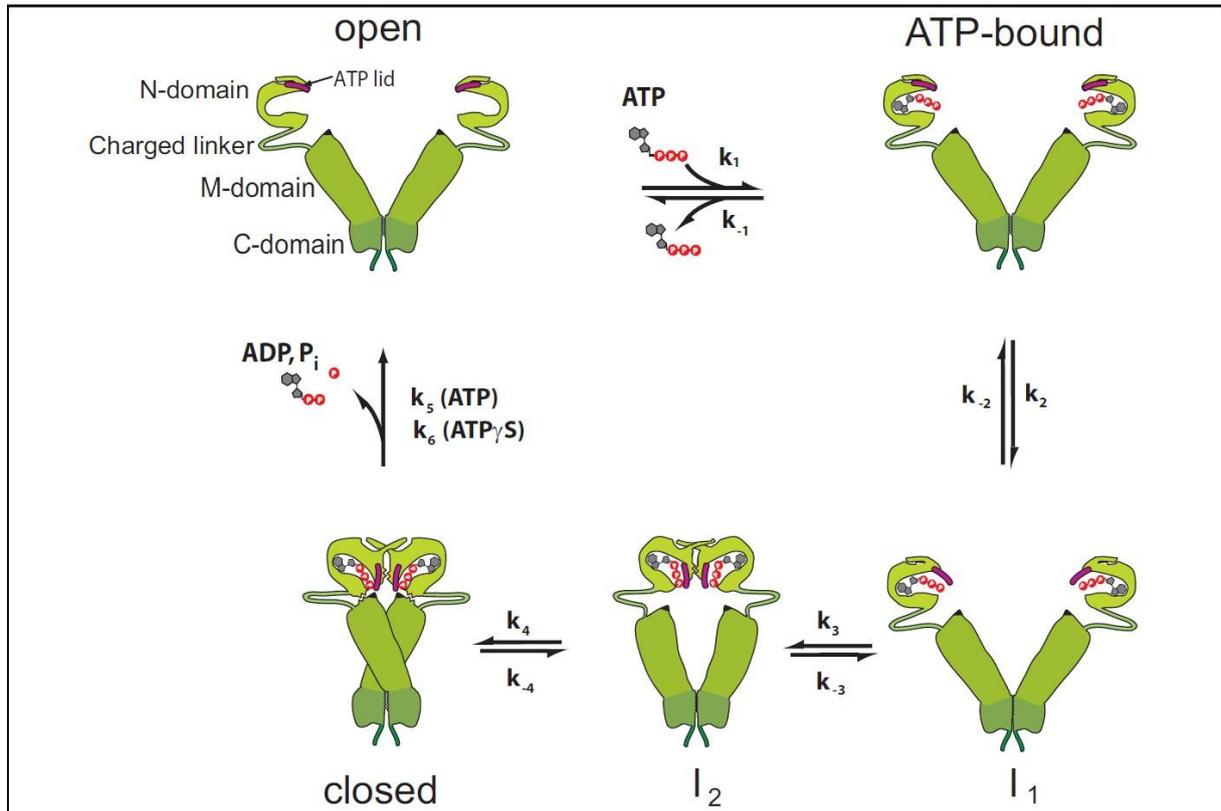
Le cycle ATPasique de la Hsp90 illustré (**Figure 3**)<sup>17</sup> peut être expliqué comme suit.

<sup>17</sup> Li, J.; Buchner, J. *Biomed. J.* **2013**, *36*, 106-107.

<sup>18</sup> Goetz, M. P. *et al.*, *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 1169-1176.

## Introduction

Au cours d'une première étape, l'ATP va se fixer rapidement sur le domaine *N*-terminal, permettant à la Hsp90 d'évoluer lentement vers un premier état de transition ( $I_1$ ) au cours duquel le segment « lid » va se refermer. Les fragments *N*-terminaux sont alors toujours en position « ouverte ». Ce complexe va ensuite évoluer vers un second état ( $I_2$ ) où les domaines médians vont se repositionner pour pouvoir interagir avec les régions *N*-terminales. Puis la Hsp90 va adopter une conformation « fermée », pendant laquelle l'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique (Pi) va avoir lieu. Les domaines *N*-terminaux vont alors se dissocier permettant à la Hsp90 de retrouver une forme « ouverte ».<sup>19</sup>



**Figure 3** : Cycle ATPasique de la Hsp90.<sup>17</sup>

Le site de fixation nucléotidique sur la région *N*-terminale est particulier puisque l'ATP se lie dans une conformation « coudée ». Ceci présente l'avantage de pouvoir concevoir des inhibiteurs spécifiques de ce domaine et explique en partie la grande spécificité des inhibiteurs déjà découverts. L'activité ATPasique de la Hsp90 est extrêmement lente : à titre d'exemple, la levure hydrolyse environ une molécule d'ATP par minute, chez l'homme cette activité est dix fois plus lente.<sup>20</sup> Il semblerait que l'étape limitante de ce processus soit dûe aux nombreux changements d'états conformationnels et non à l'hydrolyse de l'ATP elle-même.<sup>21</sup>

<sup>19</sup> Li, J. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1823, 624-635.

<sup>20</sup> Ratzke, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, 107, 16101-16106.

<sup>21</sup> Hessling, M. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 287-293.

## Introduction

De récentes études ont mis en avant que, dans la cellule eucaryote, la liaison de l'ATP au niveau de l'extrémité *N*-terminale n'était pas le seul facteur influant sur les changements d'états conformationnels, mais que ce serait les différents co-chaperons interagissant avec la Hsp90 qui constitueraient la principale « force motrice » permettant le passage d'un état conformationnel à un autre et assurant leur stabilisation.<sup>22</sup>

## 2 - La Hsp90 et ses co-chaperons

Dans les cellules eucaryotes, plus de vingt co-chaperons ont été répertoriés comme régulateurs de la fonction de la Hsp90 (**Tableau 1**) ; ceux-ci exerçant leur action aussi bien dans l'activation ou l'inhibition du cycle ATPasique que dans le recrutement de diverses protéines clientes.<sup>23,24,25,26,27</sup>

Co-chaperones		Function		
TPR co-chaperones				
		Mammals	Yeast	Plant
protein	Gene name (human)			
Hop	STIP1	Sti1	Hop	Scaffold for Hsp90/Hsp70 interaction; involved in client protein maturation; inhibition of Hsp90 ATPase
Fkbp52	FKBP4	None	AT5G48570 <sup>a</sup>	Peptidyl-prolyl-isomerase; chaperone; involved in client protein maturation
Fkbp51	FKBP5	None	ROF1	Peptidyl-prolyl-isomerase; chaperone; involved in client protein maturation
Cyp40	PPID	Cpr6/Cpr7	SQN	Peptidyl-prolyl-isomerase; chaperone; involved in client protein maturation
AIP	AIP	None	None	Complex with AhR (aryl hydrocarbon receptor), PPAR $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ ), Hlx (Hepatitis B virus X protein)
CHIP	STUB1	None	CHIP	Ubiquitin ligase, tagging protein for degradation
PP5	PPP5C	Ppt1	PP5.2	Phosphatase
Tpr2	DNAJC7	None	ATP581PK <sup>a</sup>	Tpr2 recognizes both Hsp70 and Hsp90 through its TPR domains. It may mediate the retrograde transfer of substrates from Hsp90 onto Hsp70
Sgt1	SUGT1	Sgt1	SGT1B	Forms complex with Hsp90 and CHORD proteins; involved in the function of NLR receptors in plant and animal innate immunity
Unc45	UNC45B	She4	None	Assembly of myosin fibers
Ttc4	TTC4	Cns1	AT1G04130 <sup>a</sup>	Nuclear transport protein; putative tumor suppressor involved in the transformation of melanocytes
Tom70	TOMM70A	Tom70p	None	Mitochondrial protein import
None		None	Toc64	Chloroplast protein import
Tah1	RPAP3/FIJ21908	Tah1	AT1G56440 <sup>a</sup>	Forms complex with Pih1 and Hsp90
Non-TPR co-chaperones				
Aha1	AHSA1	Aha1	AT3G12050 <sup>a</sup>	Stimulates ATPase activity; induces conformation changes in Hsp90
p23	PTGES3	Sba1	AT3G03773 <sup>a</sup>	Involved in client protein maturation; inhibition of Hsp90 ATPase; chaperone
Cdc37	CDC37	Cdc37	None	Kinase-specific co-chaperone; inhibition of Hsp90 ATPase, chaperone
Chp1/Melusin	CHORDC1	None	Rar1	Forms complex with Hsp90 and Sgt1; involved in the function of NLR receptors in plant and animal innate immunity
NudC	NUDC	NudC	AT4G27890 <sup>a</sup>	CHORD domain-containing chaperone; dynein-associated nuclear migration protein; plays multiple roles in mitosis and cytokinesis

<sup>a</sup> Several homologues are uncharacterized in plants. The listed gene names are for *Arabidopsis thaliana*.

**Tableau 1** : Principaux co-chaperons interagissant avec la Hsp90.<sup>19</sup>

Généralement, ces co-chaperons dirigent le cycle chaperon en stabilisant les diverses conformations adoptées par la Hsp90. Ils vont pouvoir se lier à la Hsp90 de façon séquentielle pendant le cycle de telle manière que la liaison d'un co-chaperon va pouvoir conduire à un

<sup>22</sup>Street, T. O. *et al.*, *Mol. Cell* **2011**, 42, 96-105.

<sup>23</sup>Prodromou, C. *et al.*, *EMBO J.* **1999**, 18, 754-762.

<sup>24</sup>Panaretou, B. *et al.*, *Mol. Cell* **2002**, 10, 1307-1318.

<sup>25</sup>Richter, K. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 1403-1413.

<sup>26</sup>Roe, S. *et al.*, *Cell* **2004**, 116, 87-98.

<sup>27</sup>Chen, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 35194-35200.

## Introduction

nouvel état de conformation constituant une condition préalable à la fixation d'un autre co-chaperon.

Parmi les différents sites d'interaction retrouvés sur les co-chaperons, le domaine tétratricopeptide TPR (Tetratricopeptide repeats) constitue l'un des plus importants. Il se présente sous la forme d'un assemblage de 7 hélices anti-parallèles capables de reconnaître des motifs peptidiques EEVD (Glu-Glu-Val-Asp) hautement conservés présents sur l'extrémité C-terminale des Hsps 90 et 70. D'autres sites de liaison ont été identifiés, ils sont présentés dans le **tableau 2** et seront discutés par la suite.

Co-chaperone	Interaction site in co-chaperone	Interaction site in Hsp90	Effect on Hsp90 conformation	Effect on Hsp90 ATPase activity
Hop/Sti1	TPR2A, TPR2B	N, M, C	Stabilizes open state	Inhibition
Cdc37	M, C	N	Stabilizes open state	Inhibition
Sgt1	CS domain	N	Not determined	No effect
Tah1	TPR	C	Not determined	Weak inhibition by Tah1-Pih1 complex
Aha1	N, C	N, M	Stabilizes closed state	Acceleration
Ppt1/PP5	TPR1, TPR2, TPR3	C	Not determined	No effect
Cpr6,Cpr7/Cyp40	TPR	C	Not determined	Weak acceleration
FKBP51/FKBP52	TPR	C	Not determined	No effect
p23/Sba1	N	N, M	Stabilizes closed state	Inhibition

**Tableau 2** : Principaux sites d'interaction co-chaperon / Hsp90 et effets sur l'activité de la Hsp90.<sup>28</sup>

En raison de leur influence sur la Hsp90 et sur la maturation des protéines clientes, les co-chaperons peuvent être classés en trois catégories :

- ceux permettant le recrutement des protéines clientes,
- ceux agissant sur le « remodelage » de la Hsp90 au travers des différents états conformationnels,
- ceux intervenant à la fin du cycle chaperon.

Dans la mesure où aujourd'hui encore la classification des co-chaperons reste ambiguë, ces différentes classes peuvent se chevaucher.

### *a) Les co-chaperons permettant le recrutement de protéines clientes*

**Sti1 / Hop** (Stress inductible 1 / Hsp70-Hsp90) est actuellement le co-chaperon dont le mécanisme d'action est le mieux compris. Il va se lier et stabiliser la forme ouverte de la Hsp90 et ainsi inhiber son activité ATPasique. Dans la majorité des organismes, cette protéine est composée de deux modules comprenant chacun respectivement un et deux domaines TPR suivis par un domaine DP (aspartate-proline-rich) : TPR1-DP1 et TPR2A-TPR2B-DP2. Elle va pouvoir simultanément se lier et moduler les Hsps 90 et 70 facilitant le transfert de la protéine cliente.

Des études cristallographiques réalisées sur ces domaines TPR en complexe avec des peptides C-terminaux des Hsps 70 et 90 ont révélé que le domaine TPR2 était spécifique de la Hsp90, tandis que le premier et le troisième domaine se liaient plutôt à la Hsp70 (**Figure 4a**).<sup>29,19</sup> En plus de ces complexes formés au sein de la région C-terminale, d'autres interactions sont évoquées avec les régions médianes et N-terminales de la Hsp90 permettant une stabilisation de l'état ouvert. Ainsi Sti1 / Hop permet non seulement de relier « physiquement » la Hsp90 et la Hsp70 mais aussi d'assurer le transfert de protéines clientes en stabilisant une conformation ouverte.

**Cdc37** (Cell division cycle 37 homolog) est un autre co-chaperon inhibant l'activité ATPasique de la Hsp90 et impliquée dans le recrutement des protéines clientes. Tout comme Sti1 / Hop, Cdc37 semble agir en amont du cycle chaperon et stabiliser la forme ouverte de la Hsp90. Différentes études ont montré qu'il semblait agir spécifiquement avec les domaines N-terminaux des protéines kinases et se liait à la région N-terminale de la Hsp90 via son domaine C-terminal (**Figure 4c**).<sup>30</sup> Cdc37 inhiberait l'activité ATPasique en prévenant la fermeture du segment « lid » agissant comme un couvercle, ainsi que l'association des domaines N-terminaux de la Hsp90.<sup>31</sup>

Le co-chaperon **Sgt1** (Suppressor of G2 allele of *skp1*) a été largement étudié dans le domaine végétal.<sup>32</sup> L'interaction se fait au niveau de l'extrémité N-terminale non pas par le fragment TPR semblant plus impliqué dans le recrutement de protéines clientes, mais par le fragment p23-like CHORD and Sgt1 (CS) du co-chaperon (**Figure 4g**). Cette interaction ne perturbe pas l'activité ATPasique de la Hsp90. Pour fonctionner, Sgt1 et la Hsp90 s'associent avec un autre co-chaperon, **Rar1**, pour former un complexe ternaire, Rar1 semblant jouer un rôle dans l'immunité des végétaux.<sup>33</sup>

Enfin, **Tah1** (TPR-containing protein associated with Hsp90) et **Pih1** (Protein interacting with Hsp90) sont également deux co-chaperons agissant sur le recrutement de protéines clientes pour la Hsp90. Tah1 interagit avec la Hsp90 via son domaine TPR et se lie à Pih1 par son extrémité C-terminale permettant la stabilisation du complexe formé (**Figure 4h**). Ce complexe agit comme inhibiteur du cycle ATPasique.<sup>34</sup>

Ainsi ces co-chaperons préparent la Hsp90 au recrutement de ses protéines clientes selon deux méthodes : ils favorisent la conformation « ouverte » de la Hsp90 et ils ralentissent l'activité ATPasique de la Hsp90, excepté Sgt1.

Au final, la Hsp90 se retrouve bloquée en conformation « ouverte », prête à accueillir une protéine cliente et d'autres co-chaperons.

---

<sup>28</sup> Röhl, A. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* **2013**, 38, 253-262.

<sup>29</sup> Scheuffler, C. *et al.*, *Cell* **2000**, 101, 199-210.

<sup>30</sup> Taipale, M. *et al.*, *Cell* **2012**, 150, 987-1001.

<sup>31</sup> Gaiser, A. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 40921-40932.

<sup>32</sup> Kadota, Y. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, 35, 199-207.

<sup>33</sup> Takahashi, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2003**, 100, 11777-11782.

<sup>34</sup> Eckert, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 31304-31312.

*b) Les co-chaperons agissant sur le « remodelage » de la Hsp90 au travers des différents états conformationnels*

Le passage d'états « ouverts » à « fermés » se produit de manière aléatoire au sein de la Hsp90 sur la base de fluctuations conformationnelles spontanées. Là où les co-chaperons « remodelants » vont être importants, c'est qu'ils vont pouvoir apporter l'énergie nécessaire pour permettre le basculement d'un état conformationnel à un autre.<sup>35</sup>

À ce titre, **Aha1** (Activator of heat shock protein 90) est un des co-chaperons ayant un effet activateur du cycle ATPasique des plus importants. Il va ainsi pousser la Hsp90 à adopter une conformation « fermée » où les domaines *N*-terminaux se rejoignent, accélérant ainsi la progression du cycle chaperon (**Figure 4d**).<sup>36</sup> Aha1 se lie à la Hsp90 par deux points d'accroche : une liaison au niveau de la région médiane de la Hsp90 et une autre au niveau de la région *N*-terminale. Une molécule d'Aha1 par dimère de la Hsp90 est suffisante pour stimuler l'activité ATPasique. Cette stimulation permet de réguler le temps de séjour des protéines clientes au sein de la Hsp90.<sup>37</sup>

**Pp5 / Ppt1** (Protein phosphatase 5 / protein phosphatase T) est un co-chaperon qui va pouvoir s'associer de part son domaine TPR à la Hsp90 (**Figure 4f**). Après liaison, l'auto-inhibition de cette phosphatase va être levée permettant ainsi une déphosphorylation de la Hsp90 par Ppt1. Cette déphosphorylation perturbe grandement les processus de maturation des protéines clientes en inactivant les fonctions activatrices de la Hsp90.<sup>38,39</sup>

D'autres co-chaperons de « remodelage » sont regroupés dans la famille des **PPIases** (TPR containing peptidyl-prolyl isomerases). On peut citer les protéines Fkbp51 et Fkbp52 ou encore la cyclophiline Cyp40 retrouvée chez les mammifères.<sup>40</sup> Outre leur activité peptidyl-prolyl isomérase,<sup>41</sup> ces PPIases possèdent leur propre activité chaperon<sup>42,43</sup> laissant supposer qu'elles pourraient interagir directement avec les protéines clientes présentes au sein du complexe Hsp90, et ainsi joueraient un rôle clé dans le recrutement des « clients ». Ils se lient à la région *C*-terminale de la Hsp90 de par leur domaine TPR (**Figure 4e**). Ce groupe des PPIases est aujourd'hui encore mal compris bien que ces co-chaperons semblent être importants pour l'activation des protéines clientes.<sup>44</sup>

---

<sup>35</sup> Mickler, M. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 281-286.

<sup>36</sup> Retzlaff, M. *et al.*, *Mol. Cell* **2010**, *37*, 344-354.

<sup>37</sup> Koulov, A. V. *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 871-884.

<sup>38</sup> Wandinger, S. K. *et al.*, *EMBO J.* **2006**, *25*, 367-376.

<sup>39</sup> Soroka, J. *et al.*, *Mol. Cell* **2012**, *45*, 517-528.

<sup>40</sup> Pirkl, F.; Buchner, J. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 795-806.

<sup>41</sup> Fanghanel, J.; Fischer, G. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 3453-3478.

<sup>42</sup> Bose, S. *et al.*, *Science* **1996**, *274*, 1715-1717.

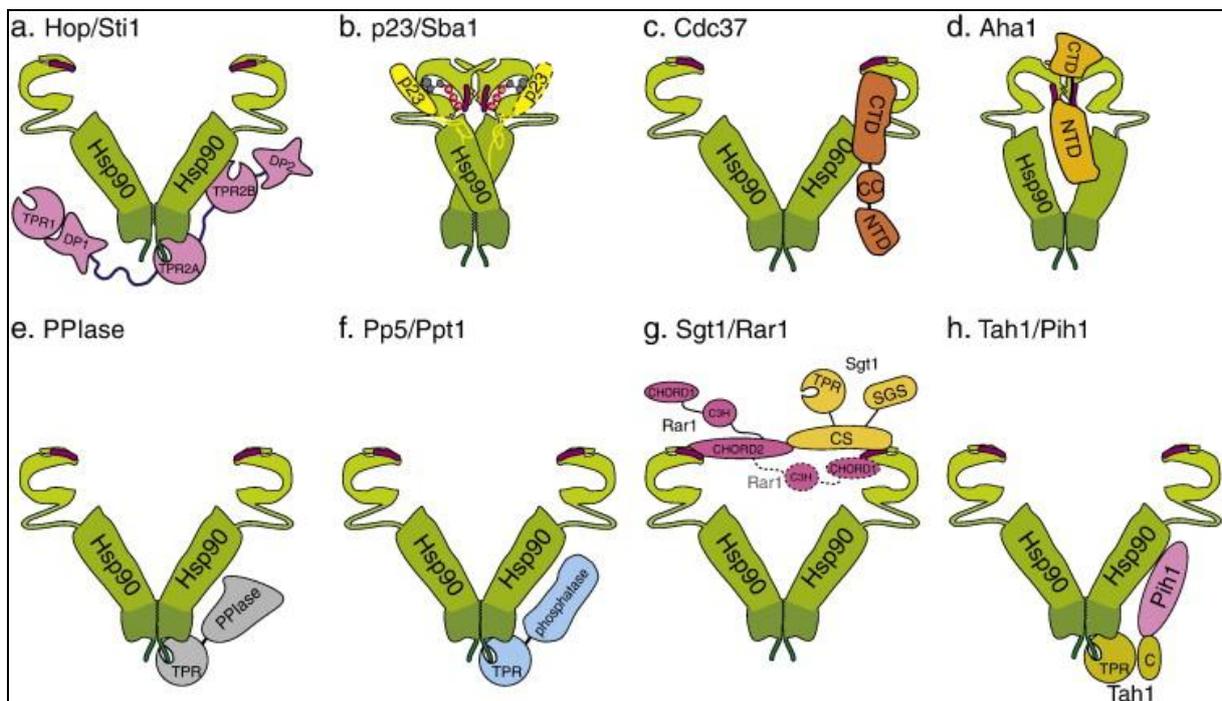
<sup>43</sup> Freeman, B. C. *et al.*, *Science* **1996**, *274*, 1718-1720.

<sup>44</sup> Riggs, D. L. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 8658-8669.

c) Les co-chaperons intervenant à la fin du cycle chaperon

**p23 / Sba1** (increased sensitivity to benzoquinone ansamycins) va agir à la fin du cycle ATPasique. Des études structurales menées sur des complexes Hsp90-p23 ont montré que la liaison s'effectuait majoritairement sur les sites *N*-terminaux de la Hsp90 mais qu'il existait aussi une interaction au niveau de la région médiane (**Figure 4b**).<sup>45</sup> Cette interaction permet de stabiliser la conformation « fermée » de la Hsp90 et facilite la maturation des protéines clientes. En conséquence, l'étape d'hydrolyse de l'ATP, indispensable au relargage de la protéine cliente, est partiellement inhibée en présence de p23 / Sba1.<sup>25</sup> La protéine cliente est ensuite libérée une fois sa maturation réalisée par hydrolyse de l'ATP et dissociation de p23.<sup>46</sup> p23 possède aussi sa propre fonction chaperon et est capable d'exercer son activité dans la cellule indépendamment de la Hsp90.<sup>47</sup>

Chez les eucaryotes, le co-chaperon **CHIP** (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein) peut interagir avec la Hsp90 et 70 via son domaine TPR. Il contient de plus une ubiquitine ligase qui va permettre d'activer la dégradation des protéines clientes lorsqu'il est lié aux protéines chaperons. Lors de sa liaison à la Hsp90, Hop et p23 sont déplacés de la Hsp90 et les protéines clientes sont alors ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome. C'est pourquoi CHIP peut être considéré comme un facteur de libération d'autres co-chaperons.<sup>48</sup>



**Figure 4** : Localisation des interactions des co-chaperons avec la Hsp90.<sup>19</sup>

<sup>45</sup> Ali, M. M. *et al.*, *Nature* **2006**, 440, 1013-1017.

<sup>46</sup> McLaughlin, S. H. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 746-758.

<sup>47</sup> Echtenkamp, F. J. *et al.*, *Cell* **2011**, 43, 229-241.

<sup>48</sup> Kundrat, L.; Regan, L. *Biochemistry* **2010**, 49, 7428-7438.

### 3 - Le cycle chaperon de la Hsp90

Tout au long de la maturation de la protéine cliente, la Hsp90 interagit avec un large éventail de co-chaperons. Ceux-ci vont jouer un rôle crucial sur le fonctionnement du cycle chaperon. De récentes études de fluorescence (FRET) et d'ultracentrifugation analytique (aUC) associées à des méthodes spectrales de RMN ont permis de mieux appréhender le fonctionnement du cycle chaperon et de mieux comprendre les différents principes gouvernant sa régulation par les co-chaperons.<sup>21,49,50</sup>

Au cours d'une première étape, le co-chaperon Sti1 / Hop va se lier sur la Hsp90 en conformation « ouverte » et inhiber l'activité ATPasique. Pendant ce temps, la Hsp70 apporte la protéine cliente en attente de « refolding » (**Figure 5**).<sup>28</sup> L'autre extrémité C-terminale laissée vacante va pouvoir elle être occupée par un co-chaperon PPIase aboutissant à un complexe asymétrique. Puis, l'arrivée de l'activateur Aha1 va permettre d'affaiblir la liaison de Sti1 à la Hsp90 ayant pour conséquence le relargage de ce co-chaperon et de la Hsp70. C'est à cette étape qu'a lieu le transfert de la protéine cliente de la Hsp70 à la Hsp90. Les domaines N-terminaux de la Hsp90 vont alors pouvoir se rejoindre, forçant la Hsp90 à adopter une conformation « fermée ». À cette étape un autre co-chaperon peut venir se fixer sur l'extrémité C-terminale laissée vacante.<sup>51</sup>

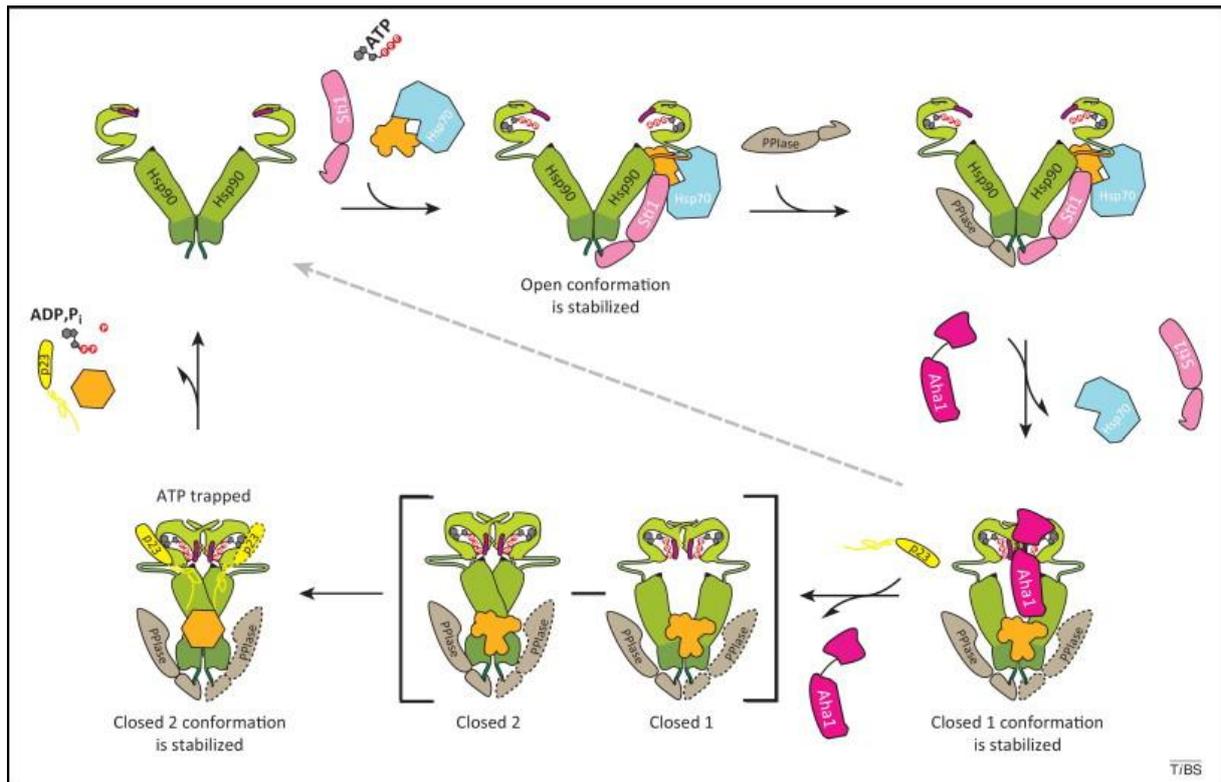
L'arrivée de p23 va ensuite déplacer Aha1 permettant à la Hsp90 d'adopter un état de conformation complètement clos dans lequel le nucléotide est piégé, prêt à être hydrolysé (closed 2). Après hydrolyse de l'ATP, p23, le co-chaperon PPIase ainsi que la protéine cliente « refoldée » sont libérés. La Hsp90 retrouve son état de conformation initial et est prête à recevoir une nouvelle protéine cliente en attente de maturation. En l'absence de co-chaperons additionnels, le complexe Aha1 peut évoluer vers une hydrolyse rapide de l'ATP (flèche grise, **Figure 5**).

---

<sup>49</sup> Mickler, M. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 281-286.

<sup>50</sup> Li, J. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 326-331.

<sup>51</sup> Li, J. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 61-66.



**Figure 5** : Fonctionnement du cycle chaperon de la Hsp90 en présence de ses co-chaperons.<sup>28</sup>

#### 4 - Régulation de la Hsp90 par modifications post-traductionnelles

Bien que les co-chaperons soient importants pour la régulation de la Hsp90, les modifications post-traductionnelles ont émergé depuis quelques années comme un système additionnel de régulation tout aussi important. Différentes modifications telles que la phosphorylation, l'acétylation, la nitrosylation ou encore la méthylation influencent l'activité chaperon de la Hsp90 et ainsi la maturation des protéines clientes, permettant à la Hsp90 de s'adapter aux divers besoins de la cellule.<sup>52</sup>

##### a) La phosphorylation

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus fréquemment détectée chez la Hsp90. Plus d'une douzaine de sites de phosphorylation ont été localisés sur les trois domaines de la Hsp90.<sup>39</sup> Par exemple, seule la Hsp90 phosphorylée va pouvoir activer la protéine cliente HRI (Heme-regulated inhibitor kinase), tandis qu'une déphosphorylation va inactiver ses fonctions de stimulation pour cette protéine cliente.<sup>53</sup> La phosphorylation semble aussi agir sur les interactions co-chaperons / Hsp90 et ainsi sur la fonction chaperon de la Hsp90.<sup>54</sup> Une phosphorylation sur un motif tyrosine de la Hsp90 va

<sup>52</sup> Mollapour, M.; Neckers, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1823, 648-655.

<sup>53</sup> Shao, J. *et al.*, *Biochemistry* **2002**, 41, 6770-6779.

<sup>54</sup> Mollapour, M. *et al.*, *Mol. Cell* **2011**, 41, 672-681.

par exemple détruire son interaction avec son co-chaperon Cdc37 et permettre le recrutement de Aha1.<sup>55</sup> Différentes kinases vont pouvoir phosphoryler la Hsp90 et certaines d'entre elles sont mêmes clientes de la Hsp90 (Raf-1, Akt, c-Src).<sup>52</sup> Ceci implique qu'un changement d'état de phosphorylation de la Hsp90 va conditionner leur maturation.

### b) L'acétylation

L'acétylation est une autre modification post-traductionnelle, elle va inhiber l'activité chaperon de la Hsp90. Elle est médiée par deux groupes d'enzymes dont les actions s'opposent : les acétyltransférases et les désacétylases.<sup>56</sup>

Ainsi, il a été montré que p300 était l'acétyltransférase pouvant réaliser l'acétylation de la Hsp90, tandis que HDAC6 était la désacétylase désacétylant la Hsp90.<sup>57,58</sup> Des travaux ont montré que la désacétylation par HDAC6 était importante pour la régulation de la fonction chaperon de la Hsp90<sup>59</sup> mais aussi que le blocage de son activité avec des inhibiteurs spécifiques par exemple, entraînait une hyperacétylation et une diminution des interactions Hsp90 / protéines clientes, ces dernières alors non fonctionnelles étaient par la suite dégradées. Un nombre important des protéines clientes retrouvées ici sont des oncoprotéines.<sup>60,61</sup>

### c) La nitrosylation

Une troisième modification possible sur la Hsp90 est la S-nitrosylation. Celle-ci s'effectue sur l'extrémité C-terminale où un groupement nitroso (-NO), produit par une de ses protéines clientes (eNOS), va pouvoir venir se fixer sur la fonction thiol d'une cystéine aboutissant à un dérèglement de l'activité chaperon.<sup>62,63</sup> La S-nitrosylation agit ainsi comme régulateur négatif en inhibant l'activité ATPasique de la Hsp90.<sup>64</sup> Retzlaff *et al.*<sup>65</sup> ont montré par ailleurs qu'une mutation ou une nitrosylation sur le résidu cystéine de l'extrémité C-terminale de la Hsp90 conduisait à un état non fonctionnel de l'activité ATPasique dans lequel les domaines N-terminaux restaient bloqués en position ouverte. Ces résultats indiquent que la nitrosylation a un impact important sur la communication inter-domaine de la Hsp90.

---

<sup>55</sup> Xu, W. *et al.*, *Mol. Cell* **2012**, *47*, 434-443.

<sup>56</sup> Aoyagi, S.; Archer, T. K. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 565-567.

<sup>57</sup> Yang, Y. *et al.*, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4833-4842.

<sup>58</sup> Kekatpure, V. D. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7436-7445.

<sup>59</sup> Kovacs, J. J. *et al.*, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 601-607.

<sup>60</sup> Bali, P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26729-26734.

<sup>61</sup> de Zoeten, E. F. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 2066-2078.

<sup>62</sup> Scroggins, B. T.; Neckers, L. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1093-1094.

<sup>63</sup> Hess, D. T. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 150-166.

<sup>64</sup> Martínez-Ruiz, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2005**, *102*, 8525-8530.

<sup>65</sup> Retzlaff, M. *et al.*, *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1147-1153.

d) La méthylation

La méthylation jouerait un rôle sur l'activité de la Hsp90, mais celui-ci reste encore insuffisamment connu aujourd'hui. Des travaux ont montré que la Hsp90 était impliquée dans le remodelage de la chromatine (assemblage d'ADN et de protéines situées dans le noyau). Hamamoto *et al.*<sup>66</sup> ont identifié une de ces protéines appartenant à la famille des histones : la SMYD2. Cette histone serait surexprimée dans différents types de cancers et jouerait un rôle clé dans la régulation des cellules cancéreuses. SMYD2 serait capable d'inactiver des gènes suppresseurs de tumeur en les méthylant tels que p53 permettant ainsi la survie de la cellule cancéreuse.<sup>67</sup> SMYD2 va pouvoir méthyler la Hsp90 au niveau de sa région C-terminale. Cette méthylation accélérerait la prolifération de cellules cancéreuses.

## 5 - Les protéines clientes de la Hsp90 et leur reconnaissance au sein du chaperon

À ce jour plus de deux cents protéines clientes ont été identifiées comme dépendantes de la Hsp90.<sup>68</sup> Elles sont retrouvées dans presque tous les événements physiologiques cellulaires tels que la transduction du signal, la progression du cycle cellulaire ou encore la régulation transcriptionnelle (**Figure 6**). Leur interaction avec la Hsp90 au sein du cycle chaperon est essentielle puisqu'elle permet d'assurer leur repliement, leur activation, leur transport ou encore leur dégradation.<sup>69</sup>

Les premiers travaux sur les clients de la Hsp90 se sont basés essentiellement sur deux catégories : les protéines kinases et les récepteurs nucléaires.<sup>70,71,72</sup> À côté de ces deux groupes déjà bien étudiés, beaucoup d'autres, liés par exemple aux infections virales, à l'immunité innée ou encore aux modifications transcriptionnelles ont été découverts ces dernières années.<sup>73,74,75</sup> Ainsi, certains virus tels que les virus de l'hépatite B et C ont été identifiés comme clients de la Hsp90, leur repliement et assemblage nécessitant l'intervention de la Hsp90.<sup>76,77</sup> D'autres études récentes ont montré que la Hsp90 était vitale dans la stabilisation des protéines NLR (NOD-like receptors) présentes chez les plantes et les mammifères jouant un rôle important dans la reconnaissance de pathogènes par le système immunitaire.<sup>74</sup> Certains travaux ont aussi mis en avant le rôle essentiel des co-chaperons Sgt1 et Rar1 dans la maturation des protéines NLR.<sup>78</sup>

---

<sup>66</sup> Hamamoto, R. *et al.*, *Cancer Lett.* **2014**, *351*, 126-133.

<sup>67</sup> Huang, J. *et al.*, *Nature* **2006**, *444*, 629-632.

<sup>68</sup> <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>.

<sup>69</sup> Pratt, W. B. *et al.*, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2010**, *235*, 278-289.

<sup>70</sup> Smith, D. F. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1350-1356.

<sup>71</sup> Ziemiecki, A. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *138*, 1298-1307.

<sup>72</sup> Xu, Y.; Lindquist, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**, *90*, 7074-7078.

<sup>73</sup> Momose, F. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45306-45314.

<sup>74</sup> Mayor, A. *et al.*, *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 497-503.

<sup>75</sup> Boulon, S. *et al.*, *Mol. Cell* **2010**, *39*, 912-924.

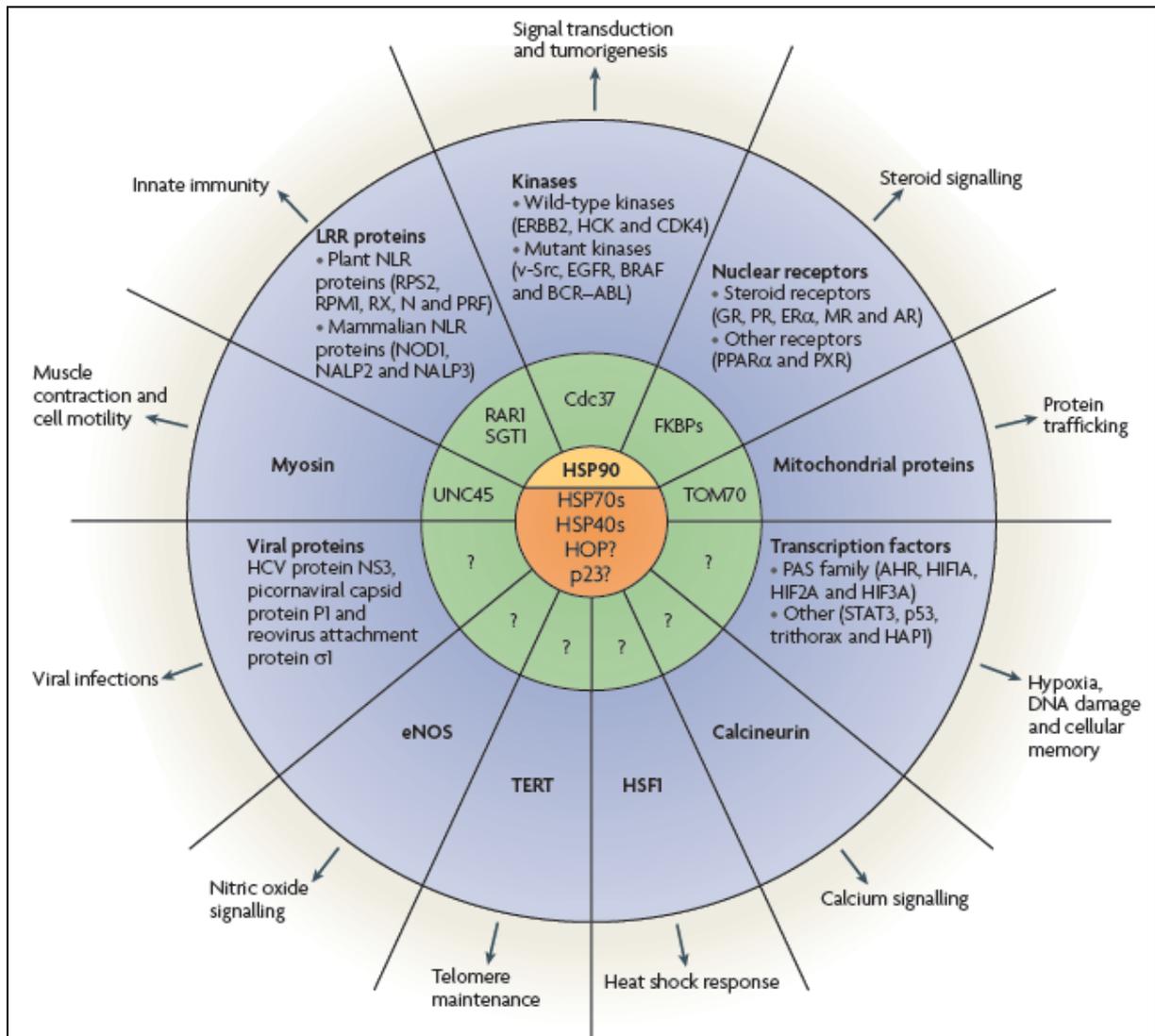
<sup>76</sup> Shim, H. Y. *et al.*, *Virology* **2011**, *410*, 161-169.

<sup>77</sup> Ujino, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 6841-6846.

<sup>78</sup> Liu, Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2101-2108.

## Introduction

La Hsp90 chaperone également les protéines nucléaires et est ainsi impliquée dans la réplication, la réparation ou le métabolisme de l'ADN mais aussi dans la transcription de l'ARN.<sup>75,79</sup>



**Figure 6** : Régulation de divers processus cellulaires par la Hsp90 et son interaction avec ses protéines clientes.<sup>80</sup>

Le fonctionnement de la machinerie Hsp90 est aujourd'hui bien compris grâce aux avancées de la recherche dans ce domaine ces dernières années. Malheureusement certaines questions fondamentales restent encore en suspens. Par exemple, la localisation de certains sites de liaison des clients sur la Hsp90 restent inconnus bien qu'ils semblent localisés dans chacun des domaines du chaperon.<sup>81</sup>

<sup>79</sup> Toogun, O. A. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **2008**, 28, 457-467.

<sup>80</sup> Taipale, M. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, 11, 515-528.

<sup>81</sup> Buchner, J. *Mol. Microbiol.* **2010**, 76, 540-544.

Une autre question intrigante concerne la façon dont la Hsp90 reconnaît ses clients. En effet, ces différents clients appartiennent à diverses familles ne partageant aucune séquence ou motifs structuraux communs. Certaines régions ont cependant été identifiées comme importantes pour la reconnaissance de familles de protéines clientes. On peut citer la boucle  $\alpha$ C- $\beta$ 4 dans les kinases,<sup>82,83</sup> bien que celle-ci ne constitue pas à elle seule l'unique point d'amarrage et que d'autres régions adjacentes à cette boucle influencent aussi la liaison à la Hsp90.<sup>84,85</sup> De ce fait, il est raisonnable de penser que la Hsp90 reconnaît certaines conformations de protéines clientes plutôt que leur séquence primaire.

La kinase Src constitue un autre exemple. L'oncogène v-Src et son homologue c-Src (proto-oncogène) partagent plus de 95% d'homologie entre leurs séquences mais leur dépendance à la Hsp90 est bien distincte. L'activation de v-Src est entièrement dépendante de la Hsp90 tandis que celle de c-Src va être indépendante ; v-Src étant une protéine sujette à l'agrégation et beaucoup plus sensible à la dénaturation thermique que c-Src.<sup>86</sup>

## 6 - Rôle de la Hsp90 dans la dégradation des protéines

Bien que la Hsp90 soit surtout connue pour son rôle dans la stabilisation et le bon repliement dans l'espace de ses protéines clientes, ce chaperon est également impliqué dans la dégradation des protéines. La découverte des ubiquitines ligases E3 capables d'interagir directement avec les chaperones Hsp70 et Hsp90, laisse penser que la Hsp90 est activement impliquée dans la dégradation des protéines mal repliées via le système ubiquitine / protéasome.<sup>87</sup> La plupart des recherches se sont focalisées sur une ubiquitine ligase E3 particulière : la protéine CHIP (ou STUB1) capable d'ubiquitinyler les protéines mal formées.<sup>88</sup> Elle interagit avec l'extrémité C-terminale de la Hsp70 et de la Hsp90 par son domaine TPR. De plus, dans les cellules, de bas niveaux d'expression de CHIP vont aider à la stabilisation de certaines protéines clientes, tandis qu'une surexpression va aboutir à leur dégradation.<sup>89</sup>

Récemment, des travaux ont montré que d'autres ligases E3, Ubr1 et Cul5, pouvaient s'associer à la Hsp90 et qu'elles jouaient un rôle dans le « contrôle qualité » et la dégradation de protéines clientes.<sup>90,91</sup>

---

<sup>82</sup> Li, R. *et al.*, *FASEB J.* **2006**, *20*, 1218-1220.

<sup>83</sup> Citri, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2006**, *28*, 14361-14369.

<sup>84</sup> Gould, C. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4921-4935.

<sup>85</sup> Terasawa, K. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 3378-3389.

<sup>86</sup> Falsone, S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 281-291.

<sup>87</sup> McClellan, A. J. *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 736-741.

<sup>88</sup> Ballinger, C. A. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **1999**, *19*, 4535-4545.

<sup>89</sup> Fan, M. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 2901-2914.

<sup>90</sup> Ehrlich, E. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2009**, *106*, 20330-20335.

<sup>91</sup> Mandal, A. K. *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *2*, 1439-1448.

## 7 - La Hsp90 et son implication en pathologie

Actuellement deux grands axes de recherche en thérapeutique sont développés autour de la Hsp90. Le premier cherche à comprendre son implication dans diverses pathologies neurodégénératives, le second beaucoup plus étendu, étudie le rôle de la Hsp90 dans les cancers. Bien que nous nous soyons intéressés au développement de molécules à activité antiproliférative, un bref aperçu de l'implication de la Hsp90 dans la neurodégénération sera développé.

### a) La Hsp90 dans les maladies neurodégénératives

La plupart des maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, Huntington...) se traduisent par des dépôts intra- ou extracellulaires de protéines agrégées. Ceci résulte bien souvent d'une déficience de dégradation d'une protéine neuronale devenue anormale, souvent à la suite d'une mutation.

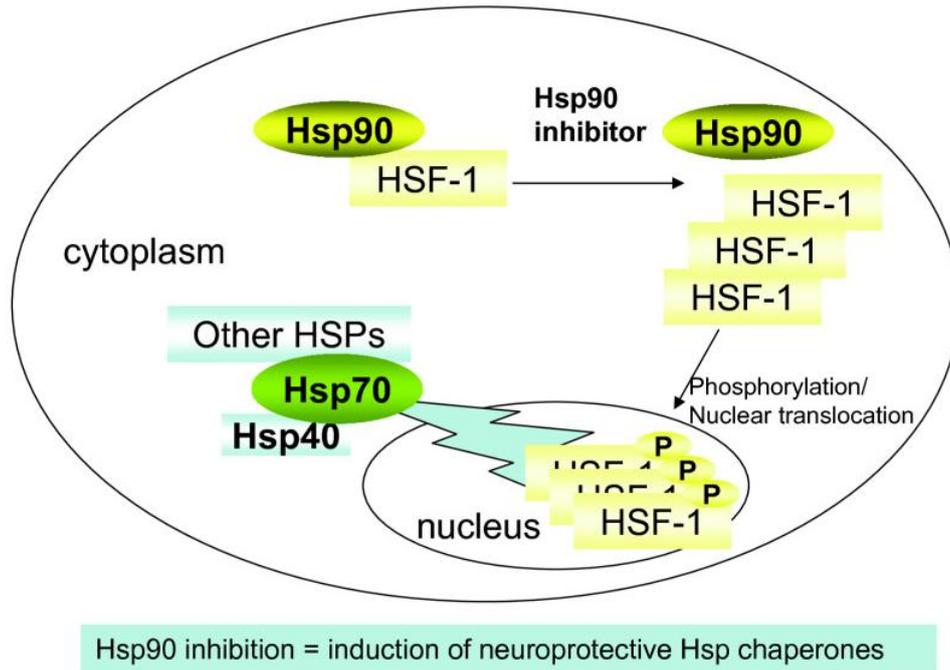
Précédemment nous avons vu que le facteur HSF-1 était régulé par la Hsp90 et qu'en conditions normales de stress, ce facteur était lié à la Hsp90. En condition de stress ou d'inhibition de la Hsp90, HSF-1 est relargué pour pouvoir initier la réponse de choc thermique qui se traduit par l'induction d'autres protéines chaperons : la Hsp70 et la Hsp40. Les cellules neuronales pathologiques ont montré qu'elles étaient résistantes à l'induction des Hsps produites lors d'une réponse de choc thermique conventionnelle, et que l'utilisation pharmacologique d'inhibiteurs de la Hsp90 provoquait l'activation de HSF-1 aboutissant à la destruction des agrégats neurotoxiques (**Figure 7**).<sup>92,93,94</sup>

---

<sup>92</sup> Brown, I. R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 147-158.

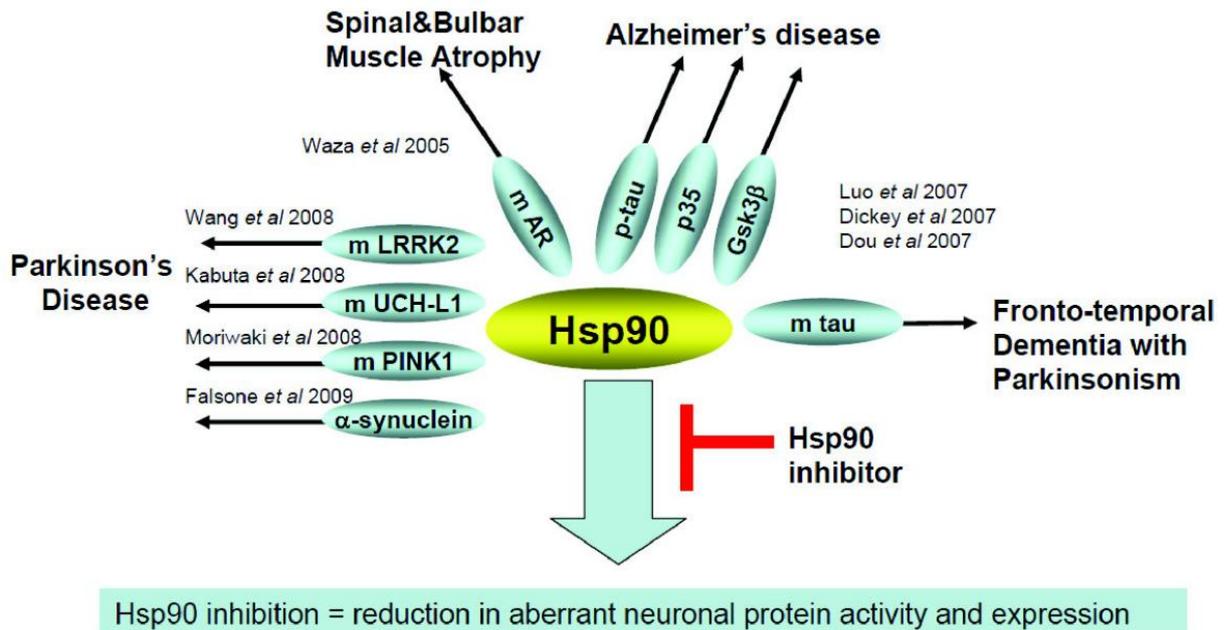
<sup>93</sup> Muchowski, P. J.; Wacker, J. L. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 11-22.

<sup>94</sup> Luo, W. *et al.*, *Mol. Neurodegener.* **2010**, *5*, 24.



**Figure 7** : Régulation de HSF-1 par la Hsp90 et son activation par des inhibiteurs de la Hsp90.<sup>94</sup>

À côté de cette voie passant par l'activation du facteur HSF-1, de récents travaux ont mis en avant le rôle que pourrait jouer la Hsp90 dans le maintien de la stabilité de nombreuses protéines clientes neuronales aberrantes (**Figure 8** et **Figure 9**).<sup>95</sup>



**Figure 8** : Protéines neuronales aberrantes régulées par la Hsp90.<sup>94</sup>

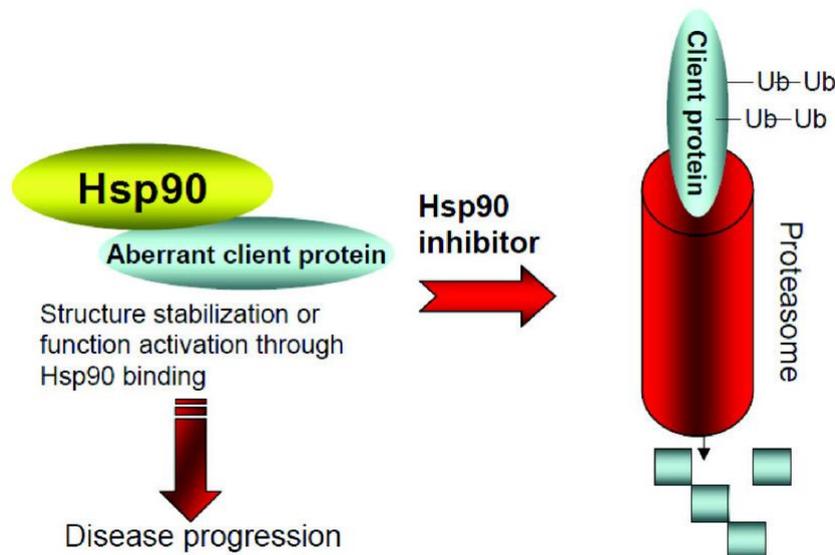
<sup>95</sup> Waza, M. *et al.*, *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 635-646.

## Introduction

La maladie de Parkinson est caractérisée par un nombre important d'évènements pathologiques, dont un bon nombre ont été reliés à la machinerie Hsp90.<sup>96</sup> Wang *et al.*<sup>97</sup> ont ainsi remarqué que la kinase LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2), principalement mutée dans les formes familiales de Parkinson, formait un complexe stable avec la Hsp90. L'inhibition de la Hsp90 par un analogue des bases puriques, le PU-H71, permet la dislocation du complexe Hsp90 / LRRK2 et conduit à l'élimination de cette kinase par le protéasome. PU-H71 limite ainsi la toxicité neuronale induite par le mutant LRRK2 et permet de rétablir le retard de la croissance des axones.

La maladie d'Alzheimer, elle, est la conséquence d'un défaut de la protéine tau, celle-ci se retrouvant hyper-phosphorylée, s'accumulant et s'agréant dans les tissus neuronaux.<sup>98</sup> L'hyperphosphorylation de la protéine tau est la conséquence d'une cascade d'activation aberrante de plusieurs kinases, dont la kinase cycline-dépendante de type 5 (CDK5). Luo *et al.*<sup>99</sup> ont ainsi mis en avant que les protéines neuronales p35 et p25, en activant CDK5, permettaient une hyperphosphorylation de la protéine tau et que celle-ci était stabilisée par la Hsp90. En même temps, l'inhibition de la Hsp90 dans des modèles de tauopathies a permis la réduction de l'activité de ces protéines permettant l'élimination des agrégats de protéines tau.

Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de la Hsp90 pourrait offrir une double approche thérapeutique dans le traitement des maladies neurodégénératives : par l'activation du facteur HSF-1 permettant l'induction des protéines de stress neuroprotectrices d'une part, et, d'autre part, par l'inactivation de protéines neuronales aberrantes clientes de la Hsp90.



**Figure 9** : Inactivation et dégradation des protéines aberrantes par la voie du protéasome.<sup>94</sup>

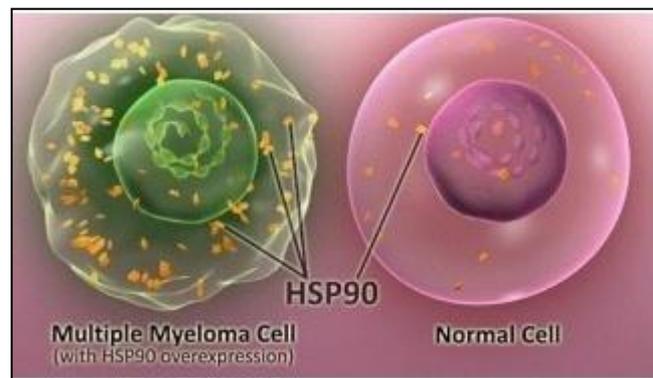
<sup>96</sup> Westerlund, M. *et al.*, *Progress. Neurobiol.* **2010**, *90*, 146-156.

<sup>97</sup> Wang, L. *et al.*, *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 3384-3891.

<sup>98</sup> Kosik, K. S.; Shimura, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1739*, 298-310.

b) La Hsp90 dans le cancer

La Hsp90 est responsable de l'homéostasie d'un bon nombre de kinases oncogènes (Raf-1, Bcr-Abl, ErbB2...). Celles-ci sont impliquées dans le contrôle de plusieurs étapes de la progression tumorale tels que l'immortalisation (synthèse de la télomérase par les cellules cancéreuses), les troubles de l'apoptose, l'angiogénèse, l'invasion cellulaire ou encore l'induction de métastases, faisant de ce chaperon une cible privilégiée dans le traitement du cancer.<sup>100,101</sup> Dans les cellules tumorales, l'expression de la Hsp90 peut être jusqu'à dix fois plus importante que dans les cellules saines (**Figure 10**).<sup>102</sup>



**Figure 10** : Différence d'expression de la Hsp90 entre une cellule tumorale et une cellule saine.<sup>102</sup>

La Hsp90 va aussi pouvoir se retrouver altérée au sein des cellules tumorales aboutissant à des défauts d'interaction de ses co-chaperons mais aussi à des modifications post-traductionnelles aberrantes. Ceci a pour conséquence une inactivation de son activité chaperon facilitant le développement de cellules malignes.<sup>103</sup> Une autre fonction de la Hsp90 est de contribuer au maintien de la survie d'une tumeur en tolérant un grand nombre d'altérations génétiques chez ces cellules qui, en condition classique, seraient normalement létales pour celles-ci.<sup>100</sup>

La Hsp90 va pouvoir également exercer son rôle protecteur vis-à-vis des protéines oncogènes en inhibant le phénomène d'apoptose. L'isoforme mitochondriale TRAP-1, localisée dans la mitochondrie des cellules cancéreuses est d'une importance capitale dans la régulation de l'intégrité mitochondriale. Comme preuve, les inhibiteurs de la Hsp90 ciblant spécifiquement la mitochondrie causent une mort sélective de la cellule tumorale.<sup>11</sup>

<sup>99</sup> Luo, W. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 9511-9516.

<sup>100</sup> Whitesell, L.; Lindquist, S. L. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761-772.

<sup>101</sup> Zuehlke, A.; Johnson, J. L. *Biopolymers* **2010**, *93*, 211-217.

<sup>102</sup> Revathi, B.; Prashanth, K. *Chemotherapy* **2015**, doi:10.4172/2167-7700.1000146.

<sup>103</sup> Kamal, A. *et al.*, *Nature* **2003**, *425*, 407-410.

Les inhibiteurs de la Hsp90 se répartissent en deux classes selon qu'ils se fixent sur la région *N*-terminale (les plus étudiés) ou la région *C*-terminale, aboutissant à la déstabilisation de la fonction chaperon de cette protéine.

Ces dernières années, un effort considérable dans la découverte de nouveaux inhibiteurs de la Hsp90 a été réalisé, depuis la première génération de molécules dérivées de produits naturels jusqu'à l'apparition de la seconde génération représentée par des molécules synthétiques. Bien qu'actuellement aucune de ces molécules ne soit sur le marché, dix-sept inhibiteurs de la Hsp90 sont entrés en phase d'essais cliniques et ont permis une amélioration considérable sur différents aspects incluant l'optimisation des doses ou des formes galéniques plus appropriées. Elles ont montré une capacité à pouvoir déstabiliser les protéines clientes de la Hsp90 et induire l'apoptose, trouvant ainsi une implication dans le traitement d'un large panel de tumeurs (cancer du sein, cancer de la prostate, myélome multiple...).<sup>104,105</sup>

Ces inhibiteurs sont résumés dans les **figures 12** et **14** et classés selon leur structure chimique en produits d'origine naturelle (analogues de la geldanamycine), dérivés du résorcinol et analogues des bases puriques.<sup>106</sup>

## II - Les inhibiteurs de la Hsp90

### A - Les inhibiteurs du domaine *N*-terminal

#### 1- Les dérivés de la geldanamycine

La geldanamycine est une ansamycine à benzoquinone isolée pour la première fois en 1970 de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*.<sup>107</sup> Des travaux ultérieurs ont montré qu'elle inhibait l'activité ATPasique de la Hsp90 en se liant sur l'extrémité *N*-terminale de cette protéine et entrant en compétition avec l'ATP.<sup>108</sup> Malgré son activité anti-tumorale, la geldanamycine n'a jamais fait l'objet d'essais cliniques en raison de ses faibles propriétés « drug-like » : faible solubilité, stabilité *in vivo* limitée, hépatotoxicité.<sup>109</sup> Des études de RSA ont permis de montrer que le motif benzoquinone contribuait à la toxicité hépatique (représenté en bleu, **Figure 11**) tandis que le carbamate (en vert, **Figure 11**) était important pour la liaison à la protéine. La geldanamycine contient également un groupement méthoxy non essentiel en position C17 sur la benzoquinone qui peut être substituée par différentes amines (en rouge, **Figure 11**).<sup>110</sup>

<sup>104</sup> Trepel, J. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 537-549.

<sup>105</sup> Neckers, L.; Workman, P. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64-76.

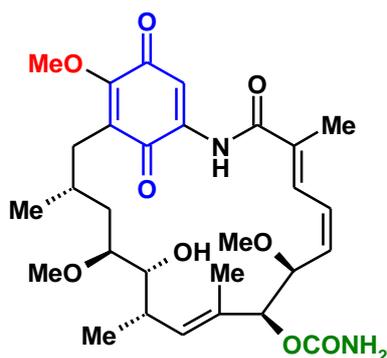
<sup>106</sup> Soga S. *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 366-376.

<sup>107</sup> DeBoer, C. *et al.*, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 442-447.

<sup>108</sup> Grenert, J. P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23843-23850.

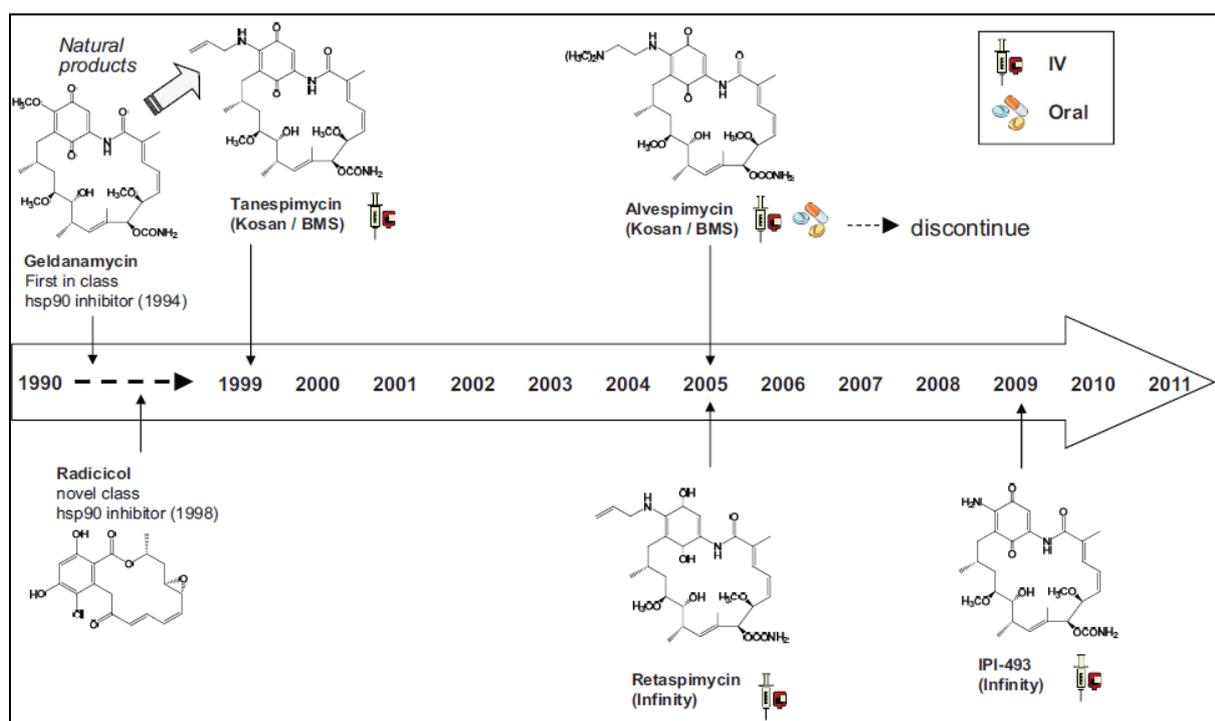
<sup>109</sup> Supko, J. G. *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *36*, 305-315.

<sup>110</sup> Jhaveri, K. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 742-755.



**Figure 11** : Structure chimique de la geldanamycine.<sup>110</sup>

Par la suite, et en tenant compte de ces observations, un nombre conséquent d'analogues dérivés de la geldanamycine ont été préparés dont certains ont pu entrer en phases d'essais cliniques (tanespimycine, alvespimycine, rétaspiamycine, IPI-493, **Figure 12**).



**Figure 12** : Historique du développement des inhibiteurs de la Hsp90. Première génération : analogues de la geldanamycine.<sup>106</sup>

a) *Le 17-allylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17-AAG)*

La substitution du groupement méthoxy sur la geldanamycine par un groupement allylamine permet d'obtenir le 17-AAG ou tanespimycine. Le 17-AAG est doté d'une activité biologique similaire à la geldanamycine mais d'un profil pharmacocinétique amélioré.<sup>111</sup>

<sup>111</sup> Schulte, T. W.; Neckers, L. M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, *42*, 273-279.

## Introduction

Cette molécule a été la première à rentrer en phase d'essais cliniques comme agent chimiothérapeutique inhibiteur de la Hsp90. Cependant en raison de sa faible solubilité en milieu aqueux, son succès a été limité. Pour tenter de contourner ce problème de nouvelles formulations impliquant l'utilisation de diluants (DMSO) ou de phospholipides ont été mis au point pour permettre une utilisation par voie intraveineuse. Malheureusement les effets secondaires retrouvés (asthénie, nausées, anorexie, hépatotoxicité...) ont été du même ordre que ceux observés avec le 17-AAG utilisé en agent simple.

L'amélioration des formes galéniques combinées avec l'utilisation de médicaments déjà approuvés ont par la suite conduit à des résultats plus encourageants. La première étude significative a été observée chez des patients présentant un cancer du sein avec surexpression de Her2 traités par une association 17-AAG / trastuzumab.<sup>112</sup> Dans une étude de phase II, chez des patients présentant un cancer du sein métastatique Her2+ et chez lesquels la maladie progressait sous traitement par trastuzumab, l'utilisation de cette bithérapie a montré une bonne tolérance au traitement et une efficacité tumorale intéressante. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude combinant le 17-AAG et le bortézomib (inhibiteur du protéasome) chez des patients atteints de myélome multiple réfractaire ou en rechute.<sup>113</sup>

Cependant, malgré ces résultats prometteurs, les études de phase III du 17-AAG ont été arrêtées suite à l'acquisition en 2008 de *Kosan* par *Bristol-Myers-Squibb* pour des raisons non cliniques (production, formulation, brevets en cours d'expiration).<sup>114</sup>

### b) Le 17-diméthylaminoéthylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17-DMAG)

Un autre analogue de la geldanamycine, le 17-diméthylaminoéthylamino-17-déméthoxygeldanamycine ou alvespimycine, a été développé par le laboratoire *Kosan* en 2005. Ce dérivé présente une fonction ionisable en position C17 améliorant son hydrosolubilité et sa biodisponibilité par voie orale. Il présente aussi une plus faible toxicité et une meilleure activité antitumorale comparée au 17-AAG.<sup>115</sup> Cependant, en raison de résultats cliniques jugés insuffisants, son développement a été arrêté.

### c) La rétaspimycine (IPI-504)

Dans une approche différente le laboratoire *Infinity Pharmaceuticals* a développé l'IPI-504 ou rétaspimycine, un autre analogue de la geldanamycine. Il s'agit d'un dérivé hydrosoluble du 17-AAG où le noyau benzoquinone est remplacé par une hydroquinone. Ces deux composés constituent un équilibre redox *in vivo* entre l'hydroquinone et la benzoquinone interagissant sous l'action d'oxydoréductases. La forme hydroquinone inhibe la Hsp90 de manière plus efficace que le 17-AAG et est la forme la plus retrouvée *in vivo*. De plus, le

---

<sup>112</sup> Modi, S. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5132-5139.

<sup>113</sup> Richardson, P. G. *et al.*, *Br. J. Haematol.* **2011**, *153*, 729-740.

<sup>114</sup> <http://www.myelomabeacon.com/news/2010/07/22/tanespimycin-development-halted/>.

<sup>115</sup> Hollingshead, M. *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 115-125.

noyau benzoquinone ayant été identifié comme une cause primaire d'hépatotoxicité, sa réduction en hydroquinone a entraîné une baisse de toxicité.<sup>116</sup>

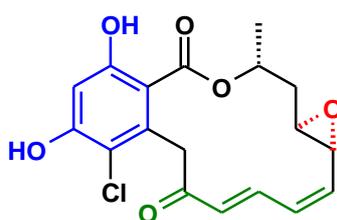
L'étude clinique la plus avancée de ce composé a été celle de phase III RING (Retaspimycin IN Gastrointestinal stromal tumor). Cependant cette étude a été arrêtée en 2009 à cause d'une trop grande mortalité dans le groupe traité par la rétaspiimycine.<sup>117</sup>

#### d) L'IPI-493

L'IPI-493 est le principal métabolite à longue demi-vie du 17-AAG et a été développé par le laboratoire *Infinity Pharmaceuticals*. Cependant, les premières études ont rapidement montré que ce composé possédait de mauvaises propriétés pharmacologiques incluant une faible solubilité et des difficultés à l'administration des doses. Pour ces raisons et devant le fait qu'à l'époque l'IPI-504 semblait supérieur en termes d'effet thérapeutique à l'IPI-493, *Infinity Pharmaceuticals* avait décidé de stopper le développement de cette molécule et de se focaliser exclusivement sur la rétaspiimycine.<sup>118</sup>

## 2 - Les dérivés du résorcinol

Le radicicol est une lactone macrocyclique à propriétés antibiotiques isolée pour la première fois en 1953 du champignon *Monosporium bonorden*.<sup>119</sup> Le radicicol est composé d'un motif résorcinol (représenté en bleu, **Figure 13**), d'un époxyde réactif (en rouge, **Figure 13**) et d'une cétone  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturée (en vert, **Figure 13**). Le radicicol présente une activité antiproliférative *in vitro* mais est dépourvu d'activité *in vivo* en raison de son instabilité chimique et métabolique.<sup>120</sup> La stabilité du noyau résorcinol a cependant permis le développement de molécules entrées en phase d'essais cliniques. Bien que ces molécules n'aient pas été découvertes à partir de modifications directes du radicicol, elles s'y apparentent fortement en conservant le fragment résorcinol permettant une fixation à la cible.



**Figure 13** : Structure chimique du radicicol.<sup>110</sup>

<sup>116</sup> Sydor, J. R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2006**, *103*, 17408-17413.

<sup>117</sup> <http://www.bloomberg.com/apps/news?pid=newsarchive&sid=anazIh94sWgc>.

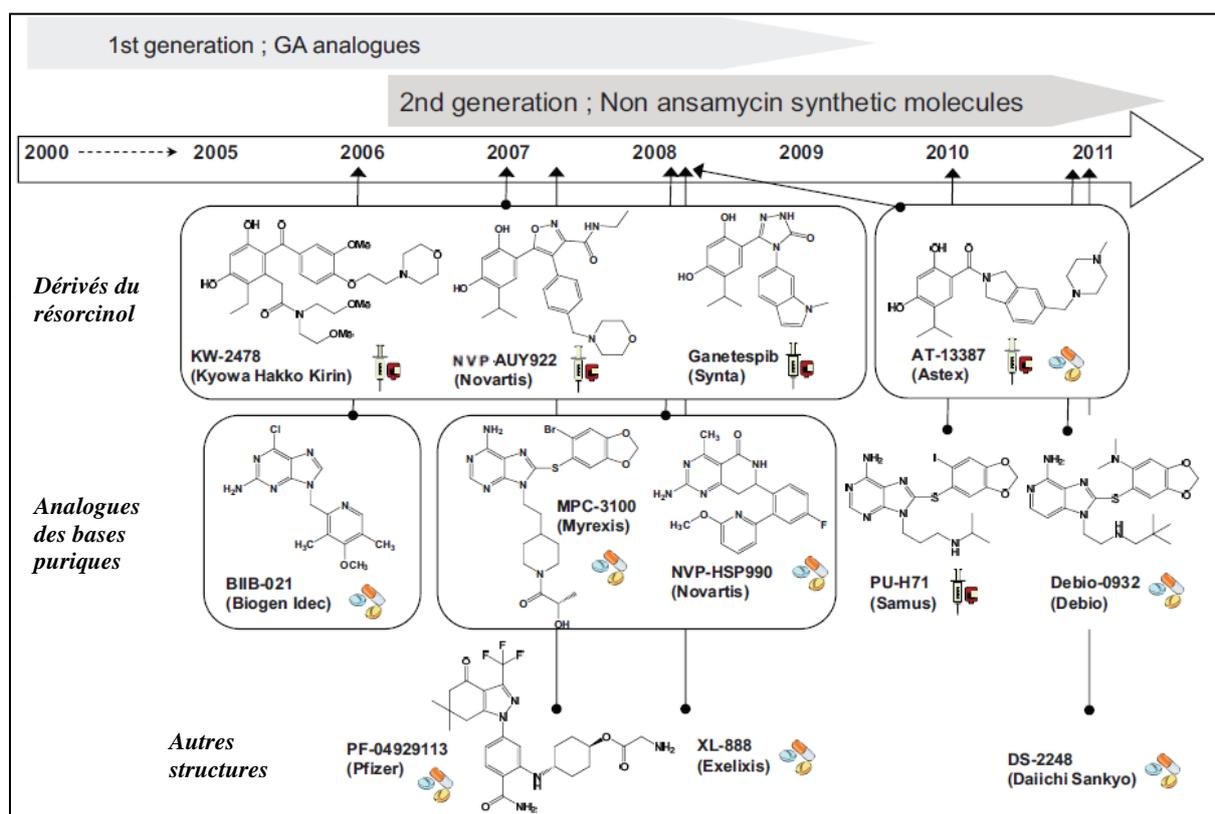
<sup>118</sup> <https://www.clinicaltrials.gov/>.

<sup>119</sup> Delmotte, P.; Delmotte-Plaqué, J. *Nature* **1953**, *171*, 344.

<sup>120</sup> Soga, S. *et al.*, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 359-369.

## a) Le KW-2478

Ce dérivé du résorcinol a été découvert par la firme japonaise *Kyowa Hakko Kirin* à travers « a unique lead optimization » incluant un screening microbien, des études de cristallographie aux rayons X ou encore des études sur modèles *in vivo* (Figure 14).<sup>121</sup> Deux essais cliniques ont pour l'instant été conduits : un premier de phase I chez des patients présentant un myélome multiple, une leucémie lymphoïde chronique ou un lymphome non hodgkinien, et un second de phase I / IIa en combinaison avec le bortézomib chez des patients atteints de myélome multiple réfractaire ou en rechute. Ces deux études sont aujourd'hui terminées et en attente de résultats.<sup>122,123</sup>



**Figure 14** : Historique du développement des inhibiteurs de la Hsp90. Seconde génération : molécules synthétiques non dérivées de l'ansamycine.<sup>106</sup>

## b) Le NVP-AUY922

Le NVP-AUY922 a été développé à partir d'un dérivé du résorcinol contenant un cycle pyrazole : le CCT018159. Ce dernier est issu d'un criblage à haut débit d'une bibliothèque de 56 000 composés capables d'inhiber la fonction ATPasique de la Hsp90.<sup>124</sup> Le remplacement du cycle pyrazole par un cycle isoxazole a permis d'obtenir le NVP-AUY922

<sup>121</sup> Kanda, Y. *et al.*, *brevet*, **2006**, WO 2006088193.

<sup>122</sup> Cavenagh, J. *et al.*, *50th ASH Annual Meeting and Exposition 2008*, **112**, 958-959.

<sup>123</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01063907>.

<sup>124</sup> Cheung, K. M. J. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, **15**, 3338-3343.

développé par *Novartis* et entré en phases d'essais cliniques en septembre 2007. Ce composé est toujours à l'étude dans moins d'une dizaine d'essais cliniques chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules.<sup>118</sup> Jusqu'à présent, ce composé a montré un profil de sécurité acceptable, les effets secondaires les plus retrouvés sont à titre de désordres oculaires (77%), de diarrhées (74%) et de nausées (46%).<sup>125</sup>

### c) *Le ganetespib (STA-9090)*

Le ganetespib ou STA-9090 est un dérivé triazolé développé par *Synta Pharmaceuticals* qui a été testé lors d'essais cliniques incluant des tumeurs solides (cancer du poumon non à petites cellules, cancer colorectal, cancer du pancréas...) et des tumeurs hématologiques. Les études de phase I ont mis en évidence un profil toxicologique similaire au NVP-AUY922, avec cependant une toxicité oculaire moindre.<sup>126</sup> Moins d'une quinzaine d'études cliniques sont actuellement en cours dans différentes pathologies cancéreuses (cancer du sein, cancer de l'œsophage...) où, dans la plupart des cas, le ganetespib est associé à d'autres agents chimiothérapeutiques.<sup>118</sup>

### d) *L'AT-13387*

L'AT-13387 est un dérivé du résorcinol découvert par une « approche par fragments » combinant des techniques de RMN et de cristallographie aux rayons X.<sup>127</sup> Deux essais cliniques sont actuellement en cours : un premier en phase II dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules en association avec le crizotinib,<sup>128</sup> et un second de phase I débuté en juillet 2015 en association avec une radiothérapie et le cisplatine chez des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou.<sup>129</sup>

## 3 - Les analogues des bases puriques

La conception rationnelle d'inhibiteurs de la Hsp90 est devenue plus accessible depuis que les structures cristallines de la Hsp90 en complexe avec des ligands tels que l'ATP ou la geldanamycine ont été élucidées. Chiosis *et al.*<sup>130</sup> ont décrit en 2001 le premier inhibiteur de la Hsp90 basé sur un squelette purine et adoptant une conformation coudée : le PU3 (**Figure 15**).

---

<sup>125</sup> Felip, E. *et al.*, *Ann. Oncol.* **2012**, 23, 152-154.

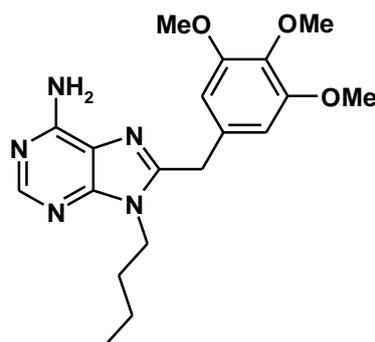
<sup>126</sup> Ying, W. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* **2012**, 11, 475-484.

<sup>127</sup> Woodhead, A. J. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5956-5969.

<sup>128</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01712217>.

<sup>129</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02381535>.

<sup>130</sup> Chiosis, G. *et al.*, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 289-299.



**Figure 15** : Structure chimique du PU3.<sup>106</sup>

Depuis, de nombreuses optimisations ont été entreprises sur ce composé et ont permis d'obtenir de nouveaux inhibiteurs plus sélectifs et plus puissants. Cinq molécules ont ainsi pu entrer en essais cliniques : trois comportant un squelette purine (BIIB021, MPC-3100 et PU-H71) et deux analogues puriques (NVP-HSP990 et Debio-0932). Ces molécules ont en commun un groupement amino -NH<sub>2</sub> lié à un squelette purine ou purine-like.

a) *Le BIIB021*

Le BIIB-021 est la première molécule synthétique inhibitrice de la Hsp90 administrée par voie orale à être entrée en phase d'essais cliniques. Elle est développée par la compagnie *Biogen Idec* et a fait l'objet jusqu'à présent d'études de phases I et II. En combinaison avec le trastuzumab, ce composé a montré de bons résultats dans une étude de phase I sur le cancer du sein<sup>131</sup> qui ont conduit à évaluer ce composé dans des essais de phase II en association avec l'exémestane (inhibiteur de l'aromatase), toujours dans le cancer du sein.<sup>132</sup> Par la suite, des changements stratégiques chez *Biogen Idec* associés à une évolution des axes de recherches (s'éloignant de l'oncologie) ont conduit la compagnie à arrêter le développement du BIIB-021.<sup>133</sup>

b) *Le MPC-3100*

Le MPC-3100 est développé par *Myrexix Inc* et a fait l'objet d'une étude de phase I terminée en 2011.<sup>134</sup> Cependant en raison de sa faible solubilité, une prodrogue a été développée. Il s'agit de l'ester de L-alanine du MPC-3100 : le MPC-0767. Des études préliminaires chez l'animal ont montré que ce composé présentait des propriétés pharmacocinétiques et une efficacité comparables au MPC-3100 permettant une régression de la tumeur.

<sup>131</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00412412>.

<sup>132</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01004081>.

<sup>133</sup> Mitchell, P. *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29, 7-8.

c) *Le NVP-HSP990*

Le NVP-HSP990, un inhibiteur oral de la Hsp90 considéré comme un “follow-up compound”, a été développé par *Novartis* et a fait l’objet de deux études en phase I mais celles-ci ont été stoppées, le NVP-HSP990 n’ayant pas montré de résultats cliniques significatifs à la dose maximale tolérée.<sup>118</sup>

d) *Le PU-H71*

Ce composé a été développé par le groupe du Dr Chiosis également à l’origine de la découverte du PU3 (premier inhibiteur de la Hsp90 basé sur un squelette purine).<sup>135</sup> Les premières études de phase I conduites chez des patients atteints de tumeurs solides (lymphome non hodgkinien) se sont terminées en 2014 et ont permis d’évaluer la sécurité d’emploi et l’efficacité du composé.<sup>136</sup> Une seconde étude visant à évaluer le PU-H71 est actuellement en phase de recrutement chez des patients présentant des tumeurs malignes avancées.<sup>137</sup>

e) *Le Debio-0932*

En remplaçant l’azote en position 3 de la purine par un carbone, les scientifiques de chez *Curis* ont mis au point un nouveau composé : le Debio-0932.<sup>138</sup> En 2010, le laboratoire *Debiopharm* initie la phase I d’un essai clinique visant à évaluer l’efficacité et la tolérance du produit chez des patients atteints de tumeurs solides ou de lymphomes.<sup>139</sup> Cette étude a mis en avant une activité antiproliférative importante.<sup>140</sup> Le laboratoire a par la suite lancé une seconde étude chez des patients présentant un cancer du poumon non à petites cellules qui s’est terminée en avril 2015. Les résultats sont en attente.<sup>141</sup>

#### 4 - Autres structures

Le PF-04929113 ou SNX-5422 est une prodrogue développée par le laboratoire *Serenex* et acquis par *Pfizer*. Il s’agit d’un dérivé indazolone 2-aminobenzamide.<sup>142</sup> Ce composé est entré en essais cliniques en mai 2007 et est toujours en cours d’évaluation. Malheureusement une toxicité oculaire avec des lésions rétinienne potentiellement irréversibles ont été rapportées freinant le développement de ce candidat-médicament.<sup>143</sup>

---

<sup>134</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00920205>.

<sup>135</sup> Caldas-Lopes, E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2009**, *106*, 8368-8373.

<sup>136</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01581541>.

<sup>137</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01393509>.

<sup>138</sup> Cai, X. *et al.*, *brevet*, **2008**, WO 2008115719.

<sup>139</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01168752>.

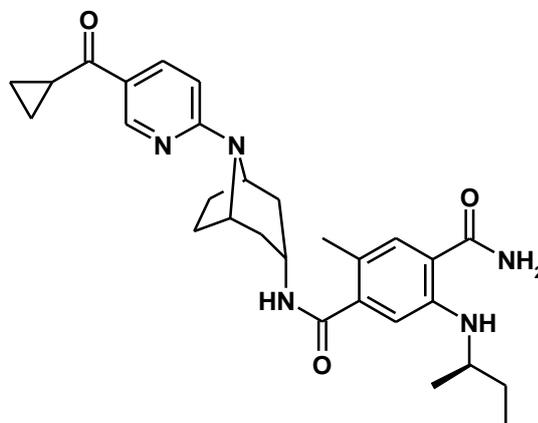
<sup>140</sup> Fumoleau, P. *et al.*, **2014**, *American Society of Clinical Oncology - 50<sup>th</sup> annual meeting, Chicago, USA*.

<sup>141</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01714037>.

<sup>142</sup> Huang, K. H. *et al.*, *brevet*, **2008**, WO 2008024970.

<sup>143</sup> Rajan, A. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6831-6839.

Le XL-888 est un dérivé tropanique (**Figure 16**) développé par le laboratoire *Exelixis* dont les études précliniques ont montré qu'il était capable d'induire la dégradation de protéines clientes de la Hsp90 et qu'il inhibait la prolifération d'un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses humaines.<sup>144</sup>



**Figure 16** : Structure chimique du XL-888.<sup>145</sup>

Des études de pharmacocinétiques visant à évaluer la sécurité d'emploi du composé chez des patients présentant des tumeurs solides ont débuté en novembre 2008 et se sont terminées en mars 2011.<sup>146</sup> Une étude de phase I évaluant l'efficacité du XL-888 en combinaison avec le vemurafenib est actuellement en cours dans le traitement du mélanome.<sup>147</sup> Les premiers résultats ont montré que la résistance au vemurafenib pouvant apparaître dans le mélanome est la conséquence d'une up-régulation des protéines clientes de la Hsp90. La co-administration de XL-888, entraîne une down-régulation de ces protéines clientes et permet de diminuer le délai d'apparition de cette résistance.<sup>148</sup>

Enfin, une étude de phase I concernant le DS-2248 développé par le laboratoire *Daiichi Sankyo Inc* vient de se terminer en mars 2015. Celle-ci visait à évaluer la sécurité et la tolérance du composé dans les tumeurs solides. Sa structure chimique n'est toujours pas connue.<sup>149</sup>

### ***B - Interactions des inhibiteurs N-terminaux avec la Hsp90***

C'est en 1997 que Prodromou *et al.*<sup>150</sup> identifient et caractérisent pour la première fois le site de liaison de l'ATP à la protéine Hsp90. Aujourd'hui, le domaine N-terminal est le plus étudié et le plus connu. Sa structure a pu être élucidée par étude cristallographique chez la

<sup>144</sup> Bussenius, J. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 5396-5404.

<sup>145</sup> Peyrat, J. F. *et al.*, *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **2010**, 15, 89-105.

<sup>146</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00796484>.

<sup>147</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01657591>.

<sup>148</sup> <http://www.exelixis.com/pipeline/xl88>.

<sup>149</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01288430>.

<sup>150</sup> Prodromou, C. *et al.*, *Cell* **1997**, 90, 65-75.

Hsp90 de levure et humaine.<sup>150,151</sup> Depuis, les co-cristallisations de nombreux inhibiteurs *N*-terminaux avec cette protéine chaperon ont permis de mieux comprendre sa structure et les interactions mises en jeu.

L'ADP et l'ATP effectuent de nombreuses interactions avec la protéine Hsp90 en présence de molécules d'eau. L'adénine, base nucléique les constituant, va pouvoir pénétrer dans la poche de fixation de la protéine et effectuer une seule liaison hydrogène directe avec la Hsp90. C'est son amine libre exocyclique située en position 6 qui va pouvoir se lier avec le carbonyle de l'aspartate 79 (Asp79) en bas de la poche (**Figure 17-A**).<sup>152</sup> Toutes les autres liaisons hydrogènes possibles de l'adénine font intervenir une molécule d'eau. Ainsi la seconde liaison effectuée par l'amine en 6 est réalisée grâce à une molécule d'eau servant de relais avec le carbonyle de la leucine 34. Les azotes situés en position 1, 3 et 7 vont aussi pouvoir interagir avec d'autres acides aminés de la protéine en exploitant des molécules d'eau. De même, le ribose va pouvoir aider à l'ancrage du nucléotide au sein de la poche de fixation. Dans la partie supérieure de la poche, ce sont les phosphates qui pourront interagir avec différents motifs de la protéine, que ce soit par liaison hydrogène, ou par liaison ionique. Une autre interaction possible inclut les oxygènes des groupements phosphates, l'asparagine 37 et trois autres molécules d'eau. Ce complexe prend part à la coordination octaédrique d'un site actif à ion  $Mg^{2+}$ . Aucune liaison de l'ADP ou de l'ATP n'a été observée en absence d'ion  $Mg^{2+}$ . De manière similaire, la geldanamycine va se comporter comme un mime de l'ADP et de l'ATP en reproduisant un nombre important d'interactions retrouvées chez ces nucléotides. Le macrocycle et le carbamate vont s'orienter vers le bas de la poche de fixation tandis que le noyau benzoquinone va interagir avec la partie haute. Le macrocycle comportant le carbamate et la benzoquinone s'orientent dans deux plans parallèles l'un à l'autre.

L'interaction réalisée entre l'amine en position 6 du nucléotide et la chaîne latérale de l'aspartate 79 est d'une importance cruciale. De plus, l'aspartate 79 permet aussi un deuxième ancrage sur l'azote en position 1 de l'adénine par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Ces deux interactions sont critiques et une seule mutation réalisée sur le résidu aspartate est suffisante pour abolir la fonction *in vivo* de la Hsp90.<sup>153</sup> La geldanamycine reproduit ces deux interactions clés grâce au  $-NH_2$  de son carbamate et permet aussi une interaction via une molécule d'eau avec la glycine 83 et la thréonine 171. La liaison mettant en jeu l'azote N3 du nucléotide avec l'asparagine 92 est également retrouvée avec un groupement méthoxy du macrocycle de la geldanamycine. Concernant la partie haute de la poche de fixation, la présence du noyau benzoquinone et du macrocycle permet de remplacer une grande partie du réseau d'interactions formé par les molécules d'eau avec l'ADP. La quinone effectue ainsi deux interactions principales grâce à ses oxygènes avec les résidus aspartate 40 et lysine 98. Le méthoxy de la benzoquinone apporte aussi sa contribution. Une interaction de type van der Waals avec le cycle aromatique du résidu phénylalanine 124 participe aussi à stabiliser le complexe (**Figure 17-B**).

Le radicol s'oriente de manière opposée à la geldanamycine puisque son noyau aromatique se positionne vers le bas de la poche de fixation tandis que le macrocycle

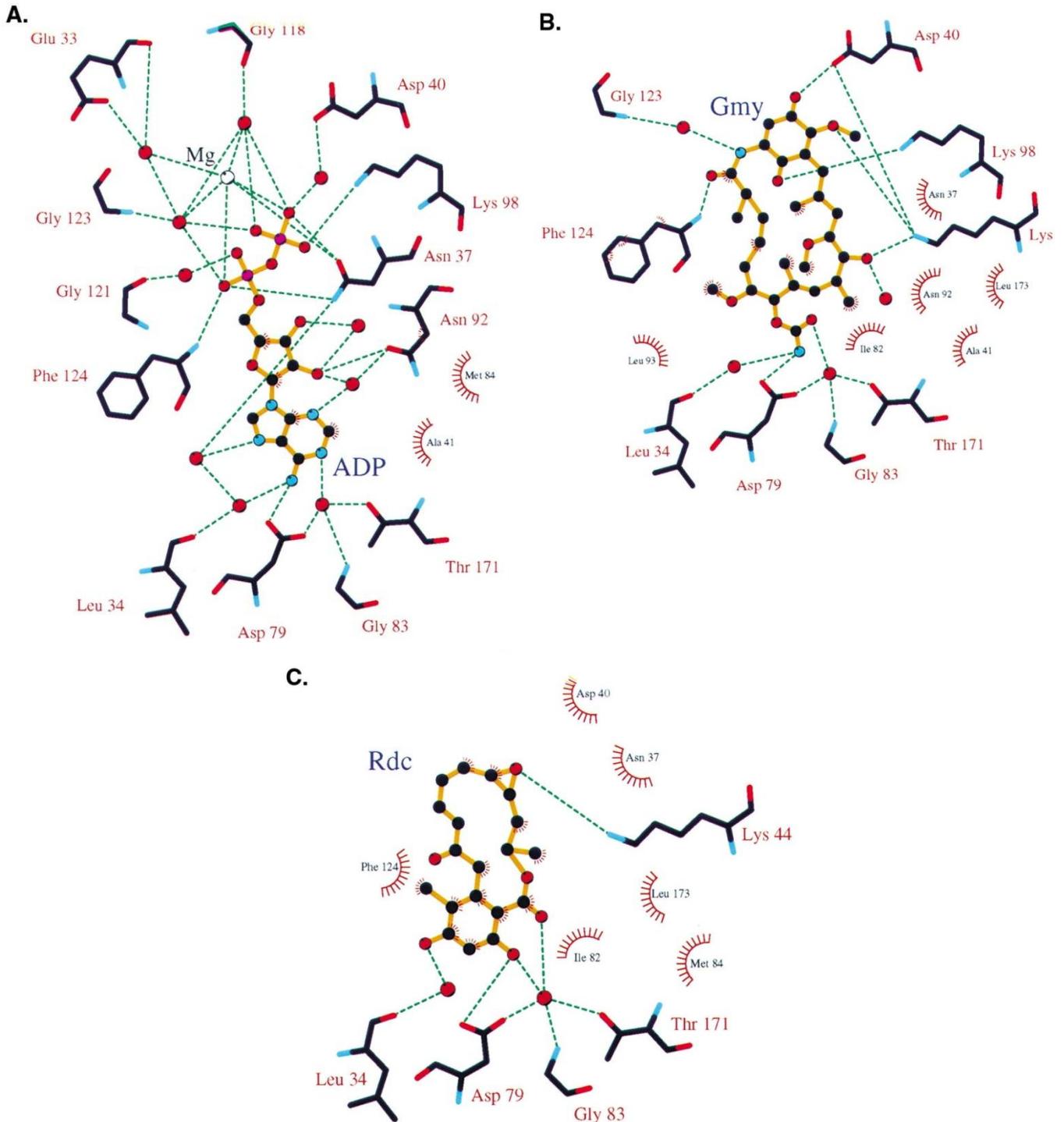
<sup>151</sup> Stebbins, C. E. *et al.*, *Cell* **1997**, 89, 239-250.

<sup>152</sup> Roe, S. M. *et al.*, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 260-266.

<sup>153</sup> Panaretou, B. *et al.*, *EMBO J.* **1998**, 17, 4829-4836.

## Introduction

comportant les doubles liaisons conjuguées et l'époxyde s'orientent vers le haut de la poche. Le radical reproduit également les interactions fondamentales avec l'hydroxy en position 3 permettant de lier l'Asp79. L'ester du macrocycle participe aussi à renforcer cette interaction par le biais d'une molécule d'eau. Dans la partie haute de la poche, c'est l'époxyde qui permet de stabiliser le complexe par liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la lysine 44 (**Figure 17-C**).



**Figure 17** : Interactions de l'ADP (A), de la geldanamycine (B) et du radical (C) avec la poche de fixation du domaine *N*-terminal de la Hsp90.<sup>152</sup>

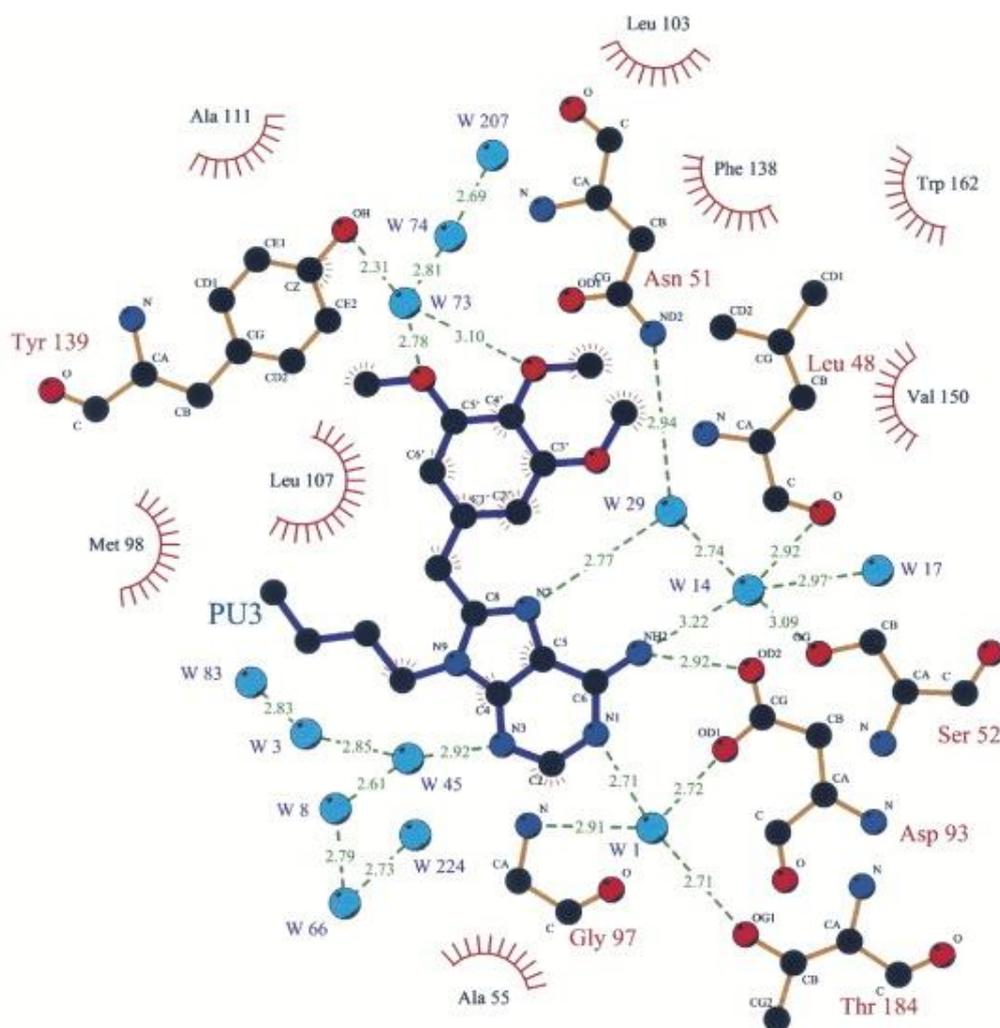
## Introduction

Les analogues des bases puriques ont aussi pu être co-cristallisés avec la Hsp90. Le PU3 a ainsi été conçu comme un analogue de l'ADP et de l'ATP avec un noyau purine mimant l'adénine des nucléotides. Son noyau aromatique trisubstitué par des groupements méthoxy remplace les phosphates et occupe la partie haute du site de fixation. Le PU3 se fixe également sur la région *N*-terminale de la Hsp90, mais contrairement à la geldanamycine et au radicicol, il induit un léger changement conformationnel de la poche à l'approche de celle-ci permettant l'ouverture d'une poche lipophile supplémentaire. Ainsi, malgré un mode de fixation commun avec ces deux inhibiteurs, les acides aminés impliqués dans les interactions sont différents.<sup>154</sup> L'amine extracyclique du cycle purine permet une interaction directe avec l'aspartate 93 et participe, grâce à un réseau de molécules d'eau, à des interactions avec deux autres résidus : la leucine 48 et l'asparagine 51. L'azote en position 1 effectue également une interaction avec trois autres acides aminés en présence d'une autre molécule d'eau. Le noyau aromatique trisubstitué se retrouve piégé entre les chaînes latérales de la phénylalanine 138 et de la leucine 107 formant des interactions hydrophobes avec celles-ci. Deux groupements méthoxy, quant à eux, établissent une liaison avec la tyrosine 139 via un relais par une molécule d'eau. Enfin la chaîne alkyle présente sur l'azote en position 9 apporte des liaisons hydrophobes supplémentaires avec les résidus leucine 107 et méthionine 98 (**Figure 18**).

Les études cristallographiques de la protéine en présence d'un inhibiteur de la région *N*-terminale ont ainsi montré que le site de fixation de l'ATP était très modulable et pouvait facilement s'adapter à un large panel de structures chimiques de différentes tailles et conformations. En exploitant les interactions moléculaires décrites ici, ces travaux ouvrent la voie à la découverte de nouveaux agents anticancéreux inhibiteurs de la Hsp90.

---

<sup>154</sup> Taldone, T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2225-2235.



**Figure 18** : Interactions du PU3 avec la poche de fixation du domaine *N*-terminal de la Hsp90.<sup>155</sup>

### *C - Les inhibiteurs du domaine C-terminal*

De nombreux inhibiteurs *N*-terminaux qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, ont été développés ces dernières années. Bien que certains d'entre eux aient montré d'excellentes activités antiprolifératives et soient entrés en essais cliniques, seule une minorité d'entre eux semblent exploitables par la suite.<sup>156,157</sup> La découverte d'un second site de fixation sur la région *C*-terminale a ouvert par la suite le chemin à la découverte de nouvelles structures chimiques ciblant ce domaine. L'existence d'un second site de fixation de l'ATP sur l'extrémité *C*-terminale a été reportée au début des années 2000.<sup>158,159,160</sup>

<sup>155</sup> Wright, L. *et al.*, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 775-785.

<sup>156</sup> Kim, Y. S. *et al.*, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1479-1492.

<sup>157</sup> Bhat, R. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8718-8728.

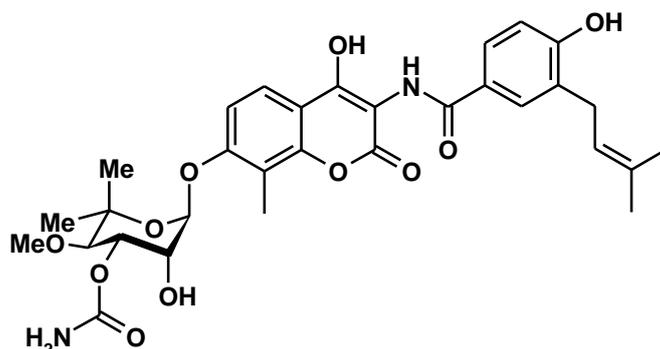
<sup>158</sup> Garnier, C. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12208-12214.

<sup>159</sup> Marcu, M. G. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37181-37186.

<sup>160</sup> Soti, C. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7066-7075.

Contrairement aux inhibiteurs *N*-terminaux qui ont montré de nombreux inconvénients en clinique (concentration élevée pour observer un effet biologique, faible solubilité, effets secondaires importants...),<sup>105</sup> les inhibiteurs *C*-terminaux se présentent comme une alternative thérapeutique prometteuse dans le traitement des cancers, en grande partie dû au fait qu'ils n'induisent pas une réponse de choc thermique délétère permettant la survie des cellules cancéreuses.<sup>161,162</sup>

La novobiocine (**Figure 19**), un antibiotique de la famille des aminocoumarines agissant par inhibition de l'ADN gyrase,<sup>163</sup> a été par la suite la première molécule d'origine naturelle identifiée comme inhibiteur de la région *C*-terminale de la Hsp90.<sup>164</sup>



**Figure 19** : Structure chimique de la novobiocine.<sup>164</sup>

Bien que la novobiocine manifeste de faibles propriétés antiprolifératives ( $CI_{50} = 700 \mu M$  sur SKBr3, lignée cancéreuse mammaire) et est capable de dépléter de nombreuses protéines clientes de la Hsp90 (Her2, vSrc, Raf-1...), elle ne rentre pas en compétition avec les dérivés de la geldanamycine ou du radicicol pour la liaison au niveau du domaine *N*-terminal. Ainsi, il a été déterminé qu'en se liant sur la région *C*-terminale, la novobiocine induisait la déstabilisation de la Hsp90 en complexe avec ses co-chaperons aboutissant *in fine* à la dégradation des protéines clientes.

Depuis la découverte de la novobiocine, seul un faible nombre d'inhibiteurs *C*-terminaux ont été révélés, incluant le taxol, le gallate d'épigallocatechine, le cisplatine, le célestrol ou encore des dérivés du sansalvamide A.<sup>165,166,167,168</sup> Bien qu'aujourd'hui le mode de liaison des inhibiteurs *N*-terminaux à la Hsp90 soit bien compris,<sup>152</sup> les éléments structuraux requis pour une interaction avec le domaine *C*-terminal de la Hsp90 sont très peu caractérisés puisqu'à ce jour, aucune co-cristallisation d'un inhibiteur avec cette extrémité *C*-terminale de la Hsp90 n'a été publiée.

<sup>161</sup> Conde, R. *et al.*, *Biochem. Cell Biol.* **2009**, 87, 845-851.

<sup>162</sup> Wang, Y.; McAlpine, S. R. *Chem. Commun.* **2014**, 51, 1410-1413.

<sup>163</sup> Maxwell, A., *Mol. Microbiol.* **1993**, 9, 681-686.

<sup>164</sup> Marcu, M. G. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92, 242-248.

<sup>165</sup> Donnelly, A.; Blagg, B. S. *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 2702-2717.

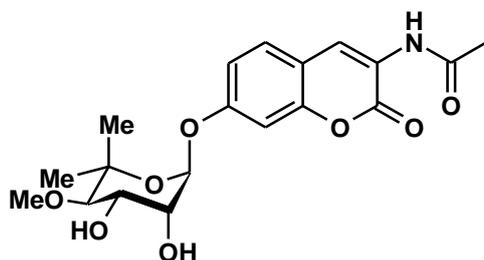
<sup>166</sup> Ardi, V. C. *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 1357-1366.

<sup>167</sup> Koay, Y. C. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 771-776.

Récemment, des travaux de dynamique moléculaire réalisés sur des analogues de la novobiocine ont permis de mieux comprendre les variations structurales du domaine de liaison C-terminal. Cependant, la grande flexibilité conformationnelle de la Hsp90 rend aujourd'hui encore difficile la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs sélectifs de ce domaine.<sup>169</sup>

Ainsi, c'est en s'inspirant de la structure de la novobiocine que différentes équipes ont pu proposer des pharmacomodulations adéquates dans le but d'améliorer la faible activité inhibitrice de cette molécule sur la Hsp90.<sup>170,171,172</sup> La novobiocine est composée de trois parties distinctes sur lesquelles des modifications structurales peuvent être effectuées : un noyau coumarinique, une fonction benzamide en position 3 et un squelette osidique en position 7.

En 2005, l'équipe de Blagg propose une première série d'analogues de la novobiocine.<sup>173</sup> Ils présentent ainsi la synthèse et l'identification d'un analogue simplifié plus actif que la novobiocine : le composé A4, possédant une chaîne N-acylée latérale raccourcie et l'absence de motifs hydroxy et carbamate. Plus important encore, cette étude souligne que le noviose en position 7 et la fonction amide en position 3 sont critiques pour une activité sur la Hsp90. Le composé A4 est capable d'induire une dégradation des protéines clientes de la Hsp90 à des concentrations de l'ordre du micromolaire (**Figure 20**).



**Figure 20** : Structure chimique du composé A4.<sup>173</sup>

En 2006, ce même groupe publie les résultats de deux nouveaux analogues de la novobiocine : le DHN-1 et le DHN-2 (**Figure 21**).<sup>174</sup>

<sup>168</sup> Peng, B. *et al.*, *Mol. Cancer*, **2010**, 9, 79.

<sup>169</sup> Moroni, E. *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 195-208.

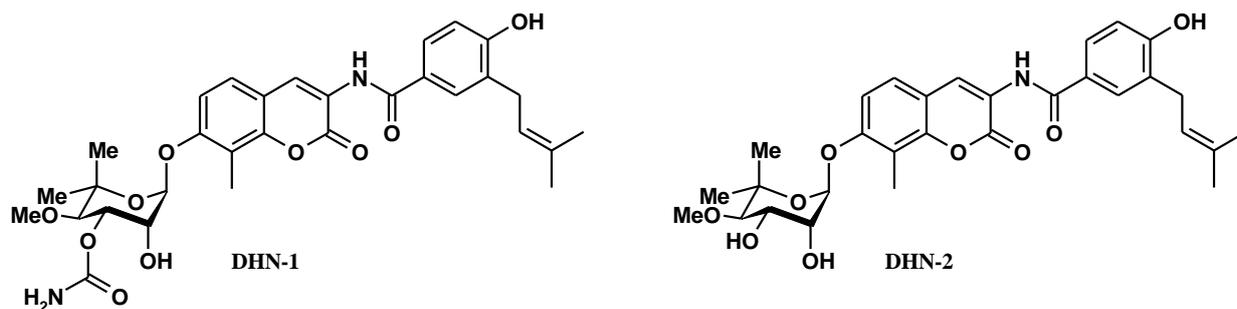
<sup>170</sup> Marcu, M. G.; Neckers, L. M. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, 3, 343-347.

<sup>171</sup> Blagg, B.S. *Brevet*, **2009**, US20090187014.

<sup>172</sup> Blagg, B.S. *et al.*, *brevet*, **2006**, WO 2006050501.

<sup>173</sup> Yu, X. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12778-12779.

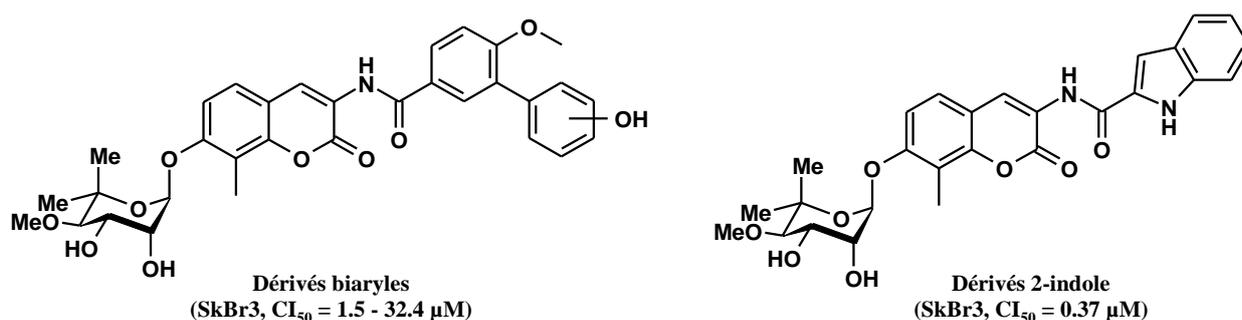
<sup>174</sup> Burlison, J. A. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15529-15536.



**Figure 21** : Structures chimiques du DHN-1 et du DHN-2.<sup>174</sup>

Le DHN-1, l'analogue déshydroxylé de la novobiocine, induit ainsi la dégradation de deux protéines clientes de la Hsp90 : ErbB2 et p53 entre 5 et 10  $\mu\text{M}$ . En revanche, le DHN-2, ne portant plus de fonction carbamate sur le sucre, induit la dégradation des protéines clientes entre 0.1 et 1.0  $\mu\text{M}$ , indiquant que ce dernier est plus actif que le DHN-1 et environ 70 fois plus puissant que la novobiocine. Ils montrent également que ces composés n'exercent qu'une très faible action inhibitrice sur l'ADN gyrase par comparaison à la novobiocine. Les groupements hydroxy et carbamate semblent ainsi préjudiciables à l'inhibition de la Hsp90 et primordiales pour une action sur l'ADN gyrase.

Par la suite, leurs travaux suivants de pharmacomodulations les ont amenés à obtenir de nouveaux composés plus actifs en série biaryle et 2-indole. Des groupements polaires sur les biaryles augmentent l'activité antiproliférative. La série 2-indole a elle mis en avant que le caractère donneur de liaison hydrogène du NH et la rigidité du carbone 2 contribuait aussi à améliorer cette activité. Ils montrent aussi que le noyau coumarine ne semble pas primordial et qu'il participe à l'interaction avec la Hsp90 par liaisons hydrogènes (**Figure 22**).<sup>175,176,177</sup>



**Figure 22** : Structures chimiques des analogues biaryles et 2-indole de la novobiocine.<sup>175</sup>

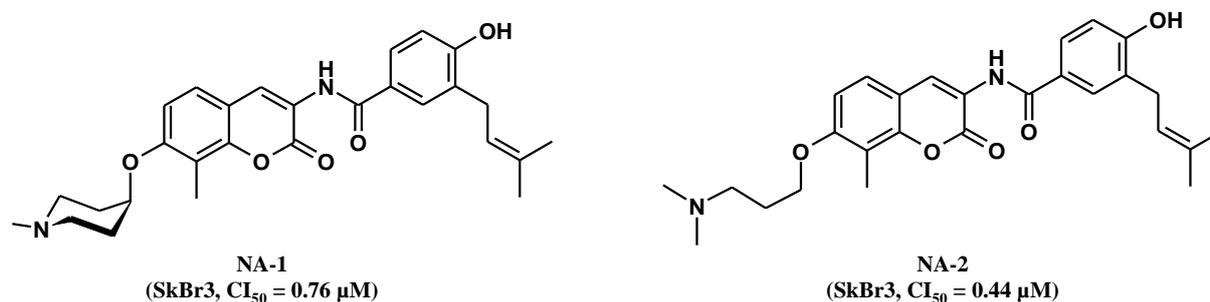
La position 7 a ensuite été travaillée et investiguée par cette même équipe. La préparation fastidieuse en plusieurs étapes du noviose les a conduits à synthétiser de nouveaux

<sup>175</sup> Burlison, J. A. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2130-2137.

<sup>176</sup> Donnelly, A. C. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8901-8920.

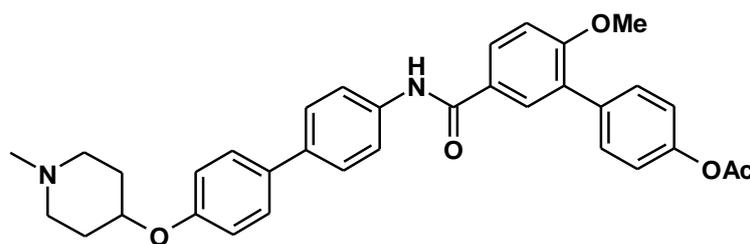
<sup>177</sup> Zhao, H. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3839-3853.

analogues simplifiés comportant des résidus amines. Ces nouveaux composés se sont montrés plus solubles et pourvus d'une meilleure activité antiproliférative (**Figure 23**).<sup>178,179,180</sup>



**Figure 23** : Structures chimiques du NA-1 et du NA-2.<sup>179</sup>

Leurs derniers travaux se sont focalisés sur l'étude du noyau coumarinique. Ils ont ainsi montré que ce noyau n'était pas primordial pour l'activité et qu'il pouvait être substitué par d'autres noyaux plus flexibles tout en améliorant ou conservant l'activité antiproliférative. De nouveaux composés partant d'un motif biphenyle ont ainsi été synthétisés. Ce groupement permettant à la molécule d'adopter de multiples conformations au sein de la poche de fixation et permettant plus d'interactions avec le site d'intérêt de la protéine (**Figure 24**).<sup>181,182,183,184</sup>



**Dérivé du noyau biphenyle**  
 (SkBr3,  $CI_{50} = 0.14 \mu\text{M}$ )

**Figure 24** : Structure chimique d'un dérivé biphenyle.<sup>183</sup>

À ce jour, peu d'équipes se sont intéressées au développement de nouveaux analogues de la novobiocine à visée antiproliférative. Néanmoins, en 2007, l'équipe d'Alami publie leurs premiers travaux sur la synthèse d'analogues simplifiés de la novobiocine non osidiques. Deux « lead compounds » se montrent intéressants : le 4- et le 7-tosylcyclonovobiocine (4-TCNA et 7-TCNA) avec des  $CI_{50}$  s'échelonnant de 40 à 90  $\mu\text{M}$  sur plusieurs lignées cellulaires (**Figure 25**).<sup>185,186</sup>

<sup>178</sup> Zhao, H. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1, 311-315.

<sup>179</sup> Zhao, H.; Blagg, B. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 552-557.

<sup>180</sup> Zhao, H. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 57-62.

<sup>181</sup> Zhao, H. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 84-88.

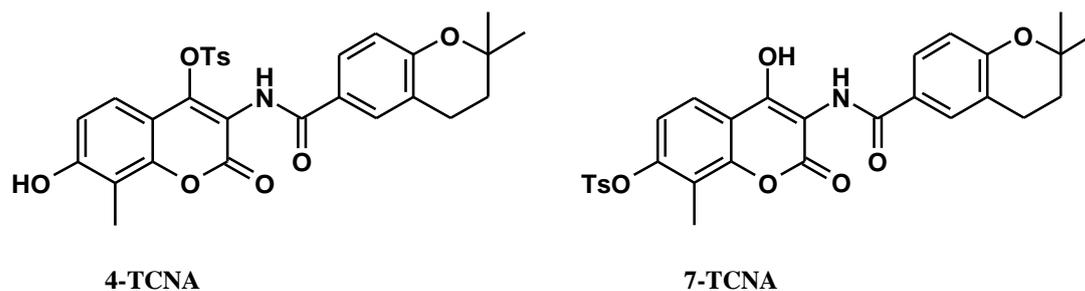
<sup>182</sup> Zhao, J. *et al.*, *MedChemComm.* **2014**, 5, 1317-1323.

<sup>183</sup> Zhao, H. *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 442-466.

<sup>184</sup> Garg, G. *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6, 204-209.

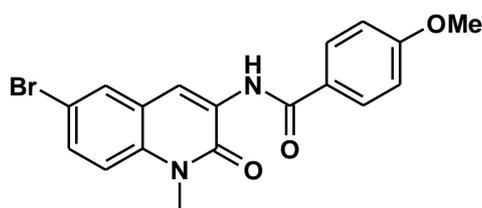
<sup>185</sup> Le Bras, G. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6189-6200.

<sup>186</sup> Radanyi, C. *et al.*, *Cancer Lett.* **2009**, 274, 88-94.



**Figure 25** : Structures chimiques du 4-TCNA et du 7-TCNA.<sup>185</sup>

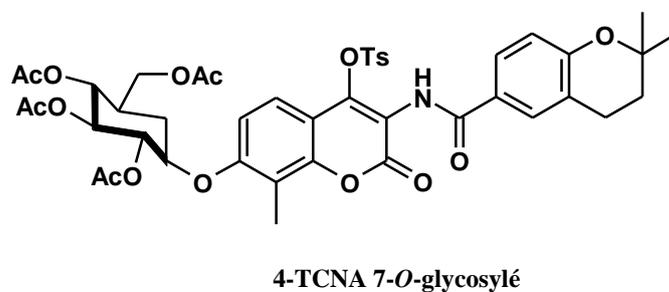
Par la suite, et dans la continuité de leurs travaux de recherches, ils développent de nouveaux analogues de la novobiocine en série quinoléin-2-one. Le 6BrCaQ ressort comme le dérivé le plus intéressant avec une  $CI_{50}$  de 7  $\mu\text{M}$  sur MCF-7, une lignée cancéreuse mammaire analogue à SKBr3 (**Figure 26**).<sup>187</sup>



**6BrCaQ**  
(MCF-7,  $CI_{50}$  = 7  $\mu\text{M}$ )

**Figure 26** : Structure chimique du 6-BrCaQ.<sup>187</sup>

Récemment, la synthèse de dérivés substitués du 4-TCNA leur a permis d'isoler le 4-TCNA 7-*O*-glycosylé actif sur un large panel de lignées cellulaires et présentant la même activité que le 6-BrCaQ sur la lignée MCF-7. Ce composé semblant cibler différentes familles de protéines clientes, non seulement dans les cas de cancer du sein mais aussi dans dans d'autres cancers tel que le myélome multiple (**Figure 27**).<sup>188</sup>



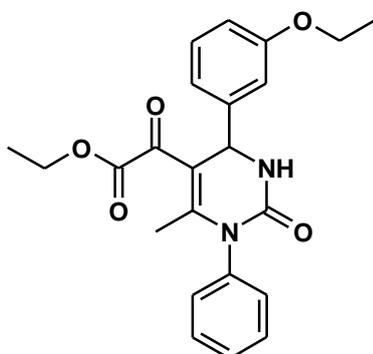
**Figure 27** : Structure chimique du 4-TCNA 7-*O*-glycosylé.<sup>188</sup>

<sup>187</sup> Audisio, D. *et al.*, *ChemMedChem*. **2011**, 6, 804-816.

<sup>188</sup> Audisio, D. *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 498-507.

## Introduction

Dernièrement, l'équipe du Pr. Bifulco en Italie a identifié de nouvelles dihydropyrimidinones semblant spécifiques du domaine C-terminal et induisant une dégradation de protéines clientes de la Hsp90.<sup>189</sup>



**Dihydropyrimidinone "lead compound"**

**Figure 28** : Structure chimique de la dihydropyrimidinone « lead compound ». <sup>189</sup>

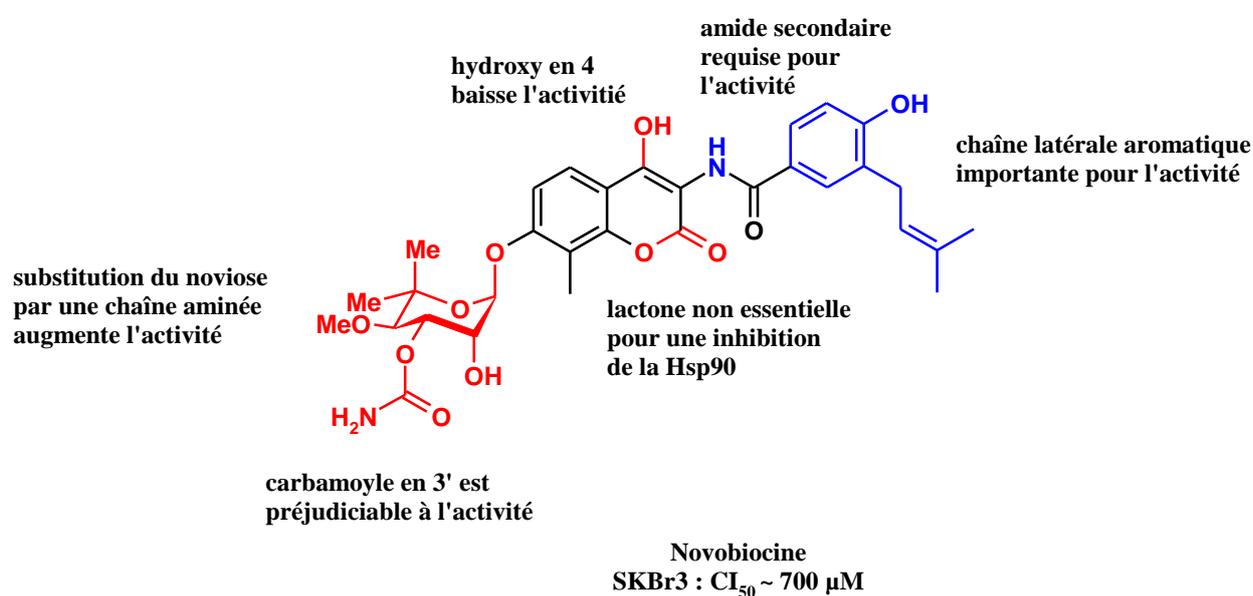
Ainsi, les inhibiteurs ciblant spécifiquement le domaine C-terminal apparaissent comme une stratégie intéressante dans la modulation du fonctionnement de la Hsp90 dans le sens où ils présentent une activité antiproliférative similaire aux inhibiteurs N-terminaux et qu'ils n'induisent pas cette fameuse réponse de choc thermique délétère provoquée par ces derniers. Ils se présentent ainsi comme une alternative intéressante et leur développement constitue donc une approche thérapeutique prometteuse. Et c'est dans cette optique que nous avons décidé d'axer nos travaux de recherche.

---

<sup>189</sup> Strocchia, M. *et al.*, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 3850-3853.

## **OBJECTIFS DE RECHERCHE**

Depuis une dizaine d'années la synthèse de nouveaux composés analogues de la novobiocine ciblant spécifiquement le domaine C-terminal connaît un essor important. Les différents travaux de pharmacomodulations ont permis de mettre en évidence des motifs structuraux importants pour améliorer l'activité antiproliférative (**Figure 29**). Ces études de relation structure-activité ont ainsi montré que la lactone présente sur le noyau coumarinique n'était pas indispensable pour conserver une inhibition de la Hsp90, tandis que l'hydroxy en position 4 baissait l'activité. Le squelette osidique (noviose) en position 7, quant à lui, pouvait être remplacé par une chaîne aminée hydrophile tout en maintenant ou augmentant l'activité antiproliférative. Enfin la fonction amide en position 3 et la présence d'une chaîne latérale aromatique sont essentielles à l'activité biologique. En appui de ces études, le développement de nouveaux composés plus actifs a été entrepris afin d'obtenir des activités submicromolaires sur diverses lignées cancéreuses.<sup>183</sup>



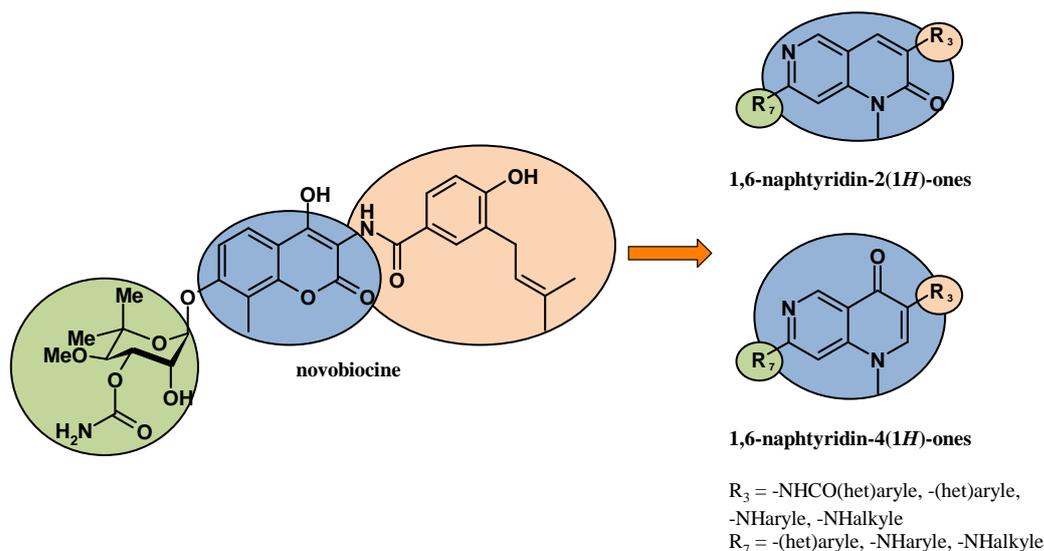
**Figure 29** : Relations structure-activité (RSA) établies lors des précédentes études.<sup>180</sup>

En s'appuyant sur ces travaux, nous nous sommes proposés de synthétiser de nouveaux analogues de la novobiocine et de procéder à leur évaluation biologique. Pour ce faire, et dans un souci d'originalité, une modification du squelette coumarinique par un noyau 1,6-naphtyridin-2-(1*H*)-one est envisagée. L'objectif principal est de proposer des pharmacomodulations en positions 3 et 7 de l'hétérocycle afin de mimer le modèle naturel (**Figure 30**). Dans la mesure où la lactone est non essentielle à l'activité biologique, le cycle pyran-2-one est remplacé par un bioisostère : la pyridin-2-one. Un noyau pyridine est accolé afin de compléter le scaffold et former le bicyclic. Pour contourner les éventuels problèmes de solubilité et faciliter les étapes de synthèse, les travaux de synthèse sont réalisés uniquement sur le bicyclic *N*-méthylé.

Une large variété d'amides est envisagée en position 3 en partant soit d'une amine primaire, soit d'un halogène, tandis que des motifs polaires de type amine sont introduits en position 7. Le noyau pyridine sélectionné doit nous permettre de fonctionnaliser aisément cette dernière position tenant compte du fait que l'atome d'azote augmente la réactivité en  $\alpha$ .

Un travail de méthodologie mettant en jeu des couplages palladocatalysés sera réalisé sur des précurseurs dihalogénés afin d'étudier la réactivité de cet hétérocycle et de permettre un accès simple et rapide à des composés hautement fonctionnalisés substitués en positions 3 et 7.

Une autre série chimique analogue sera étudiée, il s'agit de la série 1,6-naphtyridin-4-(1*H*)-one. La réactivité de cet azahétérocycle étant assez similaire à la première série chimique développée, nous devons être en mesure de réaliser le même type de fonctionnalisations en adaptant les motifs chimiques qui auront montré une bonne activité en série 1,6-naphtyridin-2-(1*H*)-one. Les réactions mises en jeu devront nous permettre d'accéder rapidement à de nouveaux analogues prêts à être évalués biologiquement.



**Figure 30** : Pharmacomodulations d'analogues de la novobiocine.

Des évaluations biologiques seront réalisées. La solubilité des composés sera testée, étant donné que celle-ci constitue un pré-requis indispensable à la poursuite des tests. Puis, les molécules sélectionnées seront criblées en fonction de leur capacité à se lier à la Hsp90. Pour ce faire, des mesures de variations de fluorescence seront réalisées sur le complexe molécule / Hsp90. Les meilleurs candidats seront ensuite testés par rapport à leur spécificité à interagir avec chacun des domaines *N*- et *C*-terminaux de la Hsp90 pour espérer mettre en avant des composés spécifiques du domaine *C*-terminal.

Afin de mettre en évidence une activité antiproliférative, des mesures de viabilité cellulaire seront réalisées sur deux lignées cellulaires cancéreuses mammaires connues pour surexprimer la Hsp90 : la lignée MCF-7 et la lignée MDA-MB-468.

Des études de mort cellulaire viendront en complément de ces résultats, ils auront pour but d'évaluer le potentiel cytotoxique des composés sur ces deux lignées cellulaires. Enfin des analyses Western Blot seront réalisées afin de mesurer le niveau d'expression de certaines protéines clientes de la Hsp90 en présence des composés les plus prometteurs.

## **PARTIE THÉORIQUE : TRAVAUX RÉALISÉS**

## **PARTIE A : TRAVAUX DE SYNTHÈSE**

## I - Synthèses en série 1,6-naphtyridin-2(1H)-one

### A - Aperçu bibliographique

#### 1 - Intérêt en chimie thérapeutique

Les naphtyridinones constituent une classe importante de composés hétérocycliques trouvant des applications biologiques diverses et variées. En particulier, les 1,8-naphtyridinones sont étudiées comme agents anticancéreux, anti-inflammatoires<sup>190,191</sup> mais aussi antibactériens avec la large famille des fluoroquinolones.<sup>192,193,194,195</sup>

Les 1,6-naphtyridin-2(1H)-ones constituent une autre famille analogue dont des propriétés antibactériennes,<sup>196</sup> cardiotoniques et neurodégénératives ont été établies.<sup>197,198</sup> Ces dérivés peuvent également être utilisés comme inhibiteurs de kinases.<sup>199,200</sup>

#### 2 - Synthèse du noyau 1,6-naphtyridin-2(1H)-one

Pour réaliser la synthèse de cet hétérocycle, deux approches principales peuvent être envisagées. La première consiste à construire l'hétérocycle à partir d'un noyau pyridinique, tandis que la seconde est réalisée à partir du noyau pyridin-2-one. Ces deux méthodes font intervenir une cyclisation intramoléculaire. Enfin une dernière voie possible mettant en jeu des réactions de Friedländer peut être appliquée à la synthèse du noyau 1,6-naphtyridin-2(1H)-one. C'est cette dernière que nous avons exploitée pour accéder à nos molécules cibles.

##### a) Par cyclisation intramoléculaire à partir d'un noyau pyridinique

En choisissant un noyau pyridine convenablement substitué, celui-ci peut être converti en 1,6-naphtyridinone par cyclisation intramoléculaire. Une réaction d'aminolyse intramoléculaire à partir du 3-(4-aminopyridin-3-yl)prop-2-énoate d'éthyle en présence d'éthanolate de sodium dans l'éthanol permet d'obtenir la 1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**Schéma 1**).<sup>201</sup>

---

<sup>190</sup> Kumar, V. *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3356-3362.

<sup>191</sup> Lucchesi, V. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8777-8791.

<sup>192</sup> Sriram, D. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6232-6239.

<sup>193</sup> Dang, Z. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4523-4526.

<sup>194</sup> Lv, K. *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 619-625.

<sup>195</sup> Feng, L. *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 125-136.

<sup>196</sup> Naik, M. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 753-66.

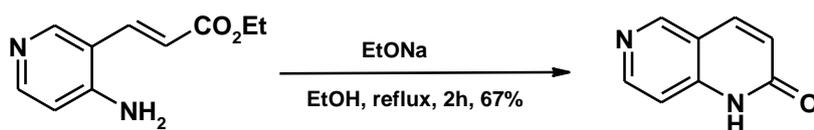
<sup>197</sup> Hashimoto, T. *et al.*, *Neuroscience* **2014**, *256*, 352-359.

<sup>198</sup> Singh, B. *et al.*, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4856-4865.

<sup>199</sup> Liu, Q. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1473-1480.

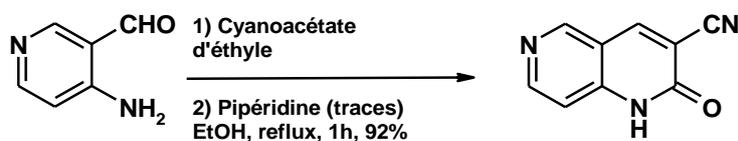
<sup>200</sup> Lin, S., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 790-793.

<sup>201</sup> Sakamoto, T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4764-4768.



**Schéma 1** : Accès au noyau 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one par aminolyse intramoléculaire.<sup>201</sup>

La seconde cyclisation met en jeu le 2-amino-3-pyridinecarbaldéhyde en présence de cyanoacétate d'éthyle apportant les carbones en positions 2 et 3. La réaction débute par la formation de l'amide. Puis en présence de traces de pipéridine, la réaction va évoluer favorablement vers la cyclisation (**Schéma 2**).<sup>202</sup>

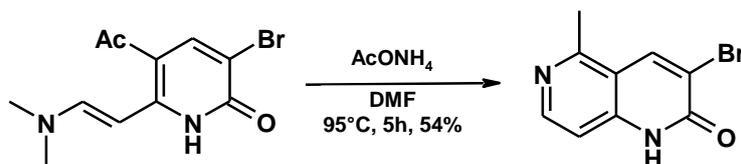


**Schéma 2** : Accès à la 3-cyano-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one.<sup>202</sup>

### b) Par cyclisation intramoléculaire à partir d'un noyau pyridin-2-one

Le noyau pyridinique peut être condensé avec un synthon clé pour donner l'azahétérocycle 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one. De nombreuses synthèses chimiques sont envisageables dans la mesure où le synthon peut apporter de un à quatre atomes nécessaires à la construction de l'hétérocycle.

La voie d'accès décrite ici fait intervenir une pyridinone trisubstituée et de l'acétate d'ammonium fournissant un atome : l'azote en position 6. La réaction est conduite dans le DMF pendant 5 h et permet d'observer la formation du 3-bromo-5-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one (**Schéma 3**).<sup>203</sup>



**Schéma 3** : Accès à la 3-bromo-5-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one.<sup>203</sup>

D'autres méthodes non décrites ici permettent l'accès au noyau 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one en partant d'une pyridine substituée et de deux synthons clés ou plus. Cependant celles-ci restent anecdotiques.

<sup>202</sup> Hawes, E. M. *et al.*, *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 849-853.

<sup>203</sup> Singh, B. *et al.*, *Heterocycles* **1993**, *36*, 133-144.

## c) Par réaction de Friedländer

La réaction de Friedländer dans sa version originale résulte de la réaction entre un 2-aminobenzaldéhyde et un dérivé carbonyle et permet l'accès à des noyaux quinoléines. Elle a été largement décrite dans la littérature.<sup>204,205,206</sup> En 2011,<sup>207,208</sup> une équipe publie une nouvelle voie d'accès à des dérivés de type benzo[3,4-*h*][1,6]naphtyridine par condensation de Friedländer entre des *o*-aminoaldéhydes hétérocycliques et différents composés carbonyles activés (benzoylacétonitrile,  $\beta$ -cétoester, malonate de diéthyle...) (Schéma 4).

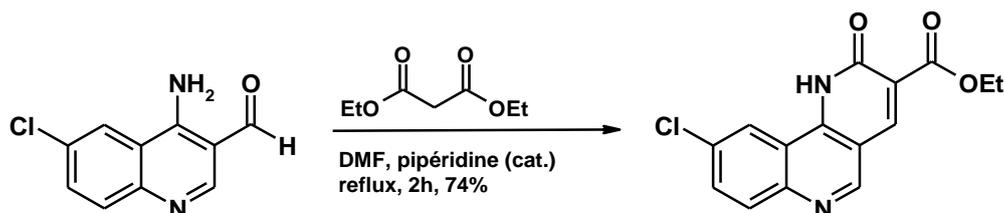


Schéma 4 : Accès à des structures de type benzo[3,4-*h*][1,6]naphtyridine.<sup>208</sup>

3 - Réactivité du noyau 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one

La réactivité du noyau 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one repose essentiellement sur la partie pyridin-2-one de l'hétérocycle. C'est cette réactivité qui sera développée dans les paragraphes suivants. Le noyau pyridine de ce bicyclic a, quant à lui, été peu travaillé à cause de sa faible réactivité. Peu de travaux le concernant ont ainsi été décrits dans la littérature. Cependant, dans un souci d'originalité et dans le but d'accéder à nos molécules cibles, celui-ci a fait l'objet d'une étude particulière au cours de nos travaux de synthèse.

## a) Réaction d'halogénéation

La conversion d'une 1,6-naphtyridinone en halogéno-1,6-naphtyridinone est traditionnellement réalisée au reflux de l'oxychlorure de phosphore (Schéma 5).<sup>209</sup> Lors de cette réaction, le carbonyle fixé en position 5 n'est pas touché.

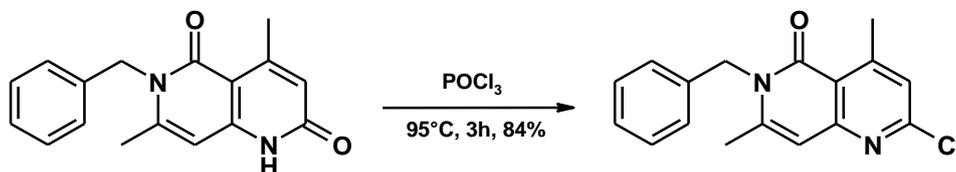


Schéma 5 : Accès à la 6-benzyl-2-chloro-4,7-diméthyl-1,6-naphtyridin-5(6*H*)-one.<sup>209</sup>

<sup>204</sup> Manske, R. H. *Chem. Rev.* **1942**, *30*, 113-144.

<sup>205</sup> Bu, X. *et al.*, *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 143-147.

<sup>206</sup> Hazeldine, S. T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2462-2467.

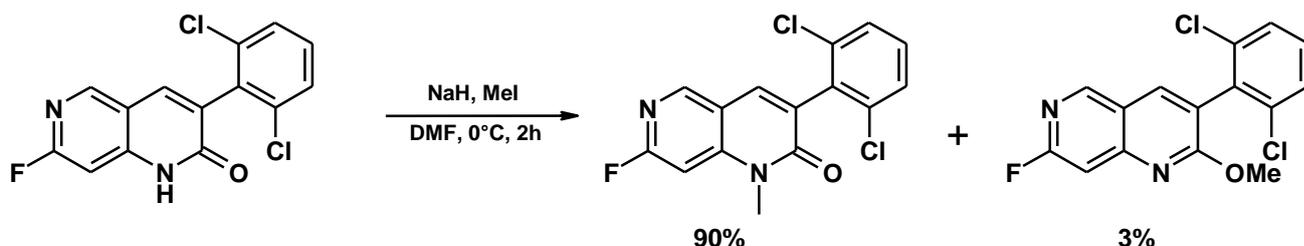
<sup>207</sup> Jachak, M. N. *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, *48*, 295-300.

<sup>208</sup> Rote, R. V. *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, *48*, 301-307.

<sup>209</sup> Atkinson, J. D.; Johnson, M. C. *J. Chem. Soc. C*, **1968**, 1252-1258.

## b) Réaction d'alkylation

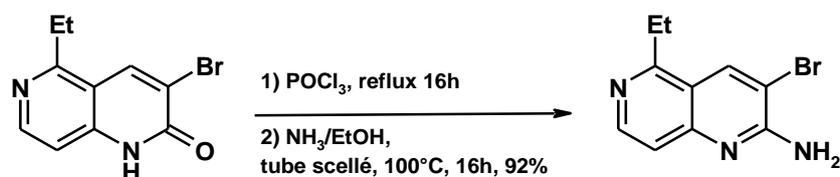
Les réactions d'alkylation peuvent donner un mélange de dérivés *O*- et *N*-alkylés, mais, de façon générale, c'est souvent le dernier qui prédomine. Après déprotonation de la 3-(2,6-dichlorophényl)-7-fluoro-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one par de l'hydruire de sodium, l'attaque nucléophile sur l'iodure de méthyle fournit la 3-(2,6-dichlorophényl)-7-fluoro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one avec 90% de rendement. L'analogue méthoxylé en 2 est lui isolé avec un rendement de 3% (**Schéma 6**).<sup>210</sup>



**Schéma 6** : Accès à la 3-(2,6-dichlorophényl)-7-fluoro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one et à la 3-(2,6-dichlorophényl)-7-fluoro-2-méthoxy-1,6-naphtyridine.<sup>210</sup>

## c) Réaction d'aminolyse

Une réaction d'aminolyse peut être réalisée en position 2 de l'hétérocycle. La 3-bromo-5-éthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one chauffée au reflux de l'oxychlorure de phosphore permet d'observer la formation du dérivé chloré en position 2. Non isolé, il est chauffé à 100°C en tube scellé dans une solution d'éthanol saturée en ammoniac et donne la 3-bromo-5-éthyl-1,6-naphtyridin-2-amine (**Schéma 7**).<sup>211</sup>



**Schéma 7** : Synthèse de la 3-bromo-5-éthyl-1,6-naphtyridin-2-amine.<sup>211</sup>

**B - Stratégie de synthèse**

Toutes les structures envisagées possèdent un noyau central de type 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one. L'accès aux molécules cibles peut s'envisager selon l'approche rétrosynthétique présentée sur le **schéma 8**. Pour synthétiser les 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones disubstituées **IV** et **VII**, nous avons choisi deux voies de synthèses partant du 3-oxopentanedioate de diéthyle commercial. La première partie de notre stratégie a été commune aux deux méthodes

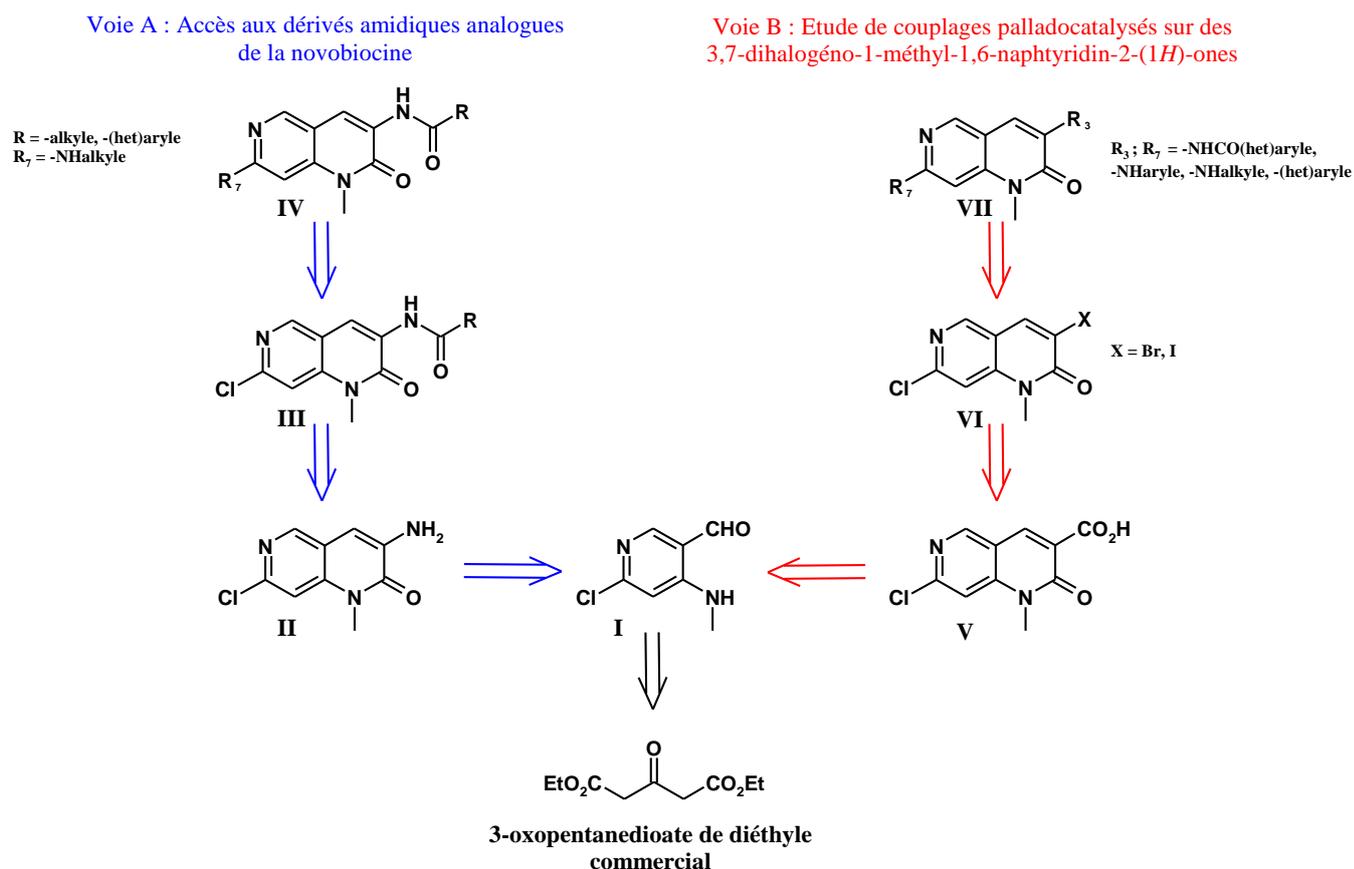
<sup>210</sup> Thompson, A. M. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3134-3147.

<sup>211</sup> Singh, B. *et al.*, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2546-2550.

envisagées car elle nous a permis d'obtenir l'intermédiaire clé : le 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde **I** décrit dans la littérature, et obtenu en quatre étapes à partir du diester commercial.<sup>212</sup>

Pour la voie A, les molécules cibles **IV** peuvent être obtenues en trois étapes à partir du 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde **I**. La fonctionnalisation en position 7 des composés **III** est effectuée par substitution nucléophile aromatique après formation de l'amide en position 3. Ce dernier peut être synthétisé à partir de l'amine clé **II**, isolée après cyclisation entre le 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde **I** et le glycinate d'éthyle.

Concernant la voie B, c'est un travail de méthodologie qui a été réalisé sur des 3,7-dihalogéno-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones dans le but d'étudier leur réactivité. Cette voie d'accès étant développée afin d'accéder plus rapidement et de manière simple aux dérivés souhaités. Les molécules cibles **VII** peuvent être isolées par couplages séquentiels palladocatalysés sur un dérivé 3,7-dihalogéné **VI**. L'halogène en position 3 du squelette hétérocyclique provient d'une réaction d'halogénodécarboxylation de l'acide carboxylique **V**, ce dernier pouvant être obtenu par cyclisation de l'aldéhyde **I** avec l'acide de Meldrum.

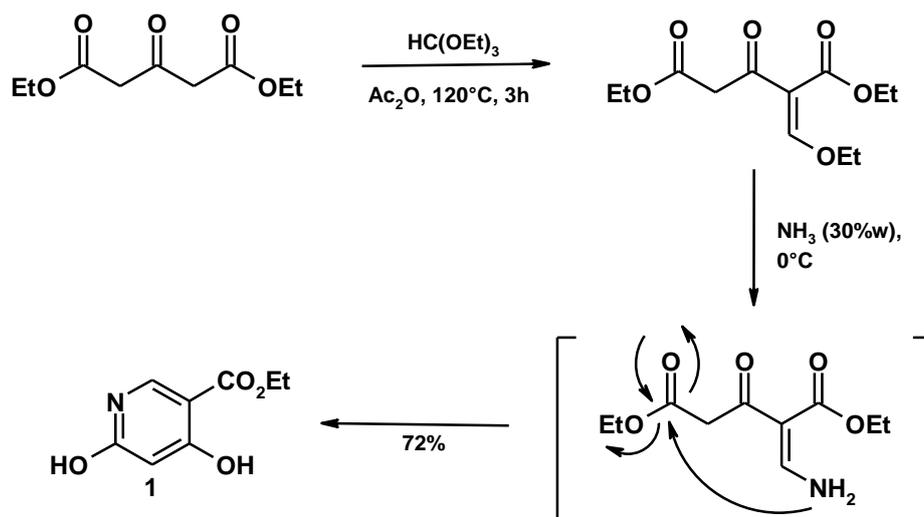


**Schéma 8** : Schéma rétrosynthétique menant aux 1,6-naphtyridin-2(1H)-ones disubstituées **IV** et **VII**.

<sup>212</sup> Ding, Q. *et al.*, brevet, **2005**, WO 2005034869.

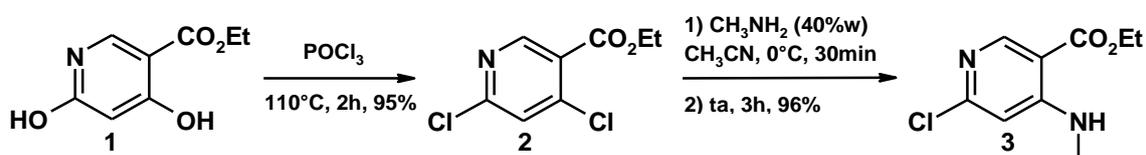
**C - Accès au 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde**

L'accès au 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde (**4**) constitue le premier palier dans notre schéma de synthèse. La première étape consiste en une condensation d'une quantité équimolaire de 3-oxopentanedioate de diéthyle et d'orthoformiate de triéthyle en présence d'anhydride acétique. L'intermédiaire formé est ensuite cyclisé après ajout d'une solution aqueuse d'ammoniaque au milieu réactionnel pour donner l'ester (**1**) avec un rendement de 72% (Schéma 9).<sup>212</sup>



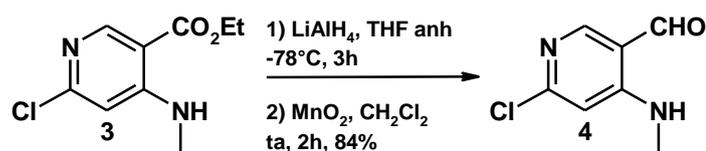
**Schéma 9** : Mécanisme réactionnel de la formation du 4,6-dihydroxypyridine-3-carboxylate d'éthyle **1**.

Au cours d'une seconde étape, la chloration de (**1**) effectuée au reflux de l'oxychlorure de phosphore permet d'isoler le composé (**2**), puis une substitution nucléophile aromatique régiosélective en position 4 par la méthylamine conduit à l'obtention du dérivé (**3**) monochloré avec un rendement de 96% (Schéma 10).

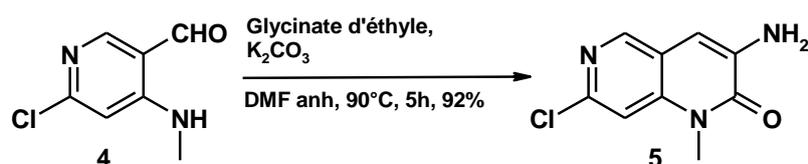


**Schéma 10** : Synthèse du 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carboxylate d'éthyle **3**.

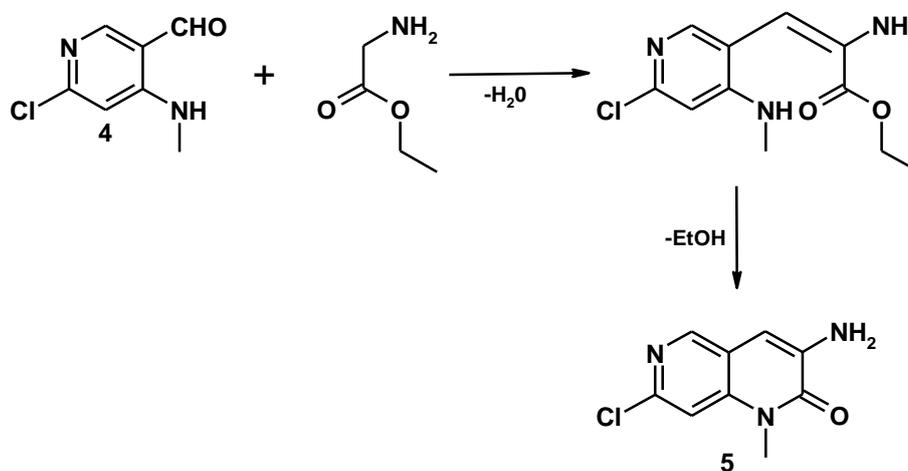
Le composé (**3**) est ensuite réduit dans un premier temps en alcool primaire par l'aluminohydrure de lithium puis oxydé en aldéhyde par le dioxyde de manganèse pour conduire au composé (**4**) avec un rendement de 84% (Schéma 11).

Schéma 11 : Synthèse du 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde **4**.**D - Accès aux dérivés amidiques analogues de la novobiocine (Voie A)****1 - Synthèse de la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one**

Pour réaliser la synthèse de la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**5**) par cyclisation à partir de l'intermédiaire (**4**), nous nous sommes appuyés sur des réactions de Friedländer précédemment décrites (page 52, paragraphe **I-A-2**). Ainsi, le 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carbaldéhyde (**4**) réagit avec le glycinate d'éthyle (présent sous forme de chlorhydrate) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre pour donner après cyclisation la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**5**) avec un très bon rendement de 92% (Schéma 12).

Schéma 12 : Synthèse de la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one **5**.

Le mécanisme suivant est proposé : au cours d'une première étape, la déprotonation du glycinate d'éthyle en  $\alpha$  du carbonyle est réalisée en présence de carbonate de potassium. Puis, l'addition nucléophile sur le composé aldéhydique (**4**) produit l'ester  $\alpha,\beta$ -insaturé après déshydratation. Enfin l'attaque nucléophile de l'amine *N*-méthylée sur l'ester permet la cyclisation avec départ d'éthanol (Schéma 13).

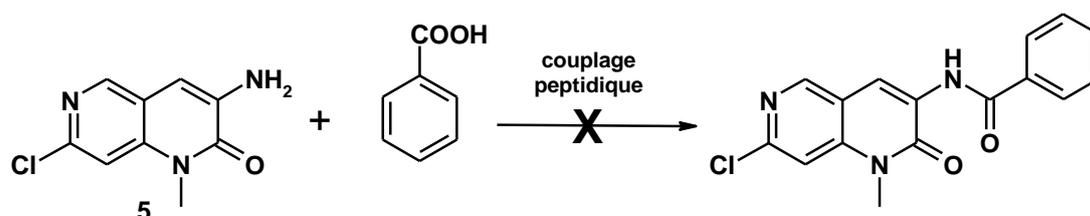
Schéma 13 : Formation de la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one **5**.

Dans un premier temps la protection de l'amine libre du glycinate d'éthyle par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) a été envisagée afin d'éviter l'addition nucléophile parasite de l'amine sur la fonction aldéhyde. Celle-ci n'ayant jamais été observée, la protection n'a pas été nécessaire.

## 2 - Synthèse d'amides dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one

Dans un premier temps, la formation de l'amide en 3 est essentielle avant de fonctionnaliser la position 7 de l'hétérocycle. Deux méthodes sont principalement décrites dans la littérature afin de former la liaison amide. Une première met en jeu des couplages peptidiques entre une amine et un acide carboxylique, et une seconde, plus classique, mais aussi plus efficace, passe par l'usage de chlorures d'acides. C'est la première méthode qui a tout d'abord été envisagée.

Pour ce faire, divers essais de couplages peptidiques entre l'amine (**5**) et l'acide benzoïque ont été réalisés,<sup>213,187</sup> malheureusement, aucun d'entre eux n'a permis d'observer la formation du benzamide correspondant (**Tableau 3**).



**Schéma 14** : Essais de couplages peptidiques sur la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one **5**.

Essai	Méthode	Observations
1	DCC, DMAP, THF anh, N <sub>2</sub> , 50°C	pas de réaction
2	PyBOP, DIEA, DMF, N <sub>2</sub> , ta ou Δ	pas de réaction
3	EDCI, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Pyridine anh (70/30), N <sub>2</sub> , ta ou Δ	pas de réaction

**Tableau 3** : Conditions utilisées pour les essais de couplages peptidiques.

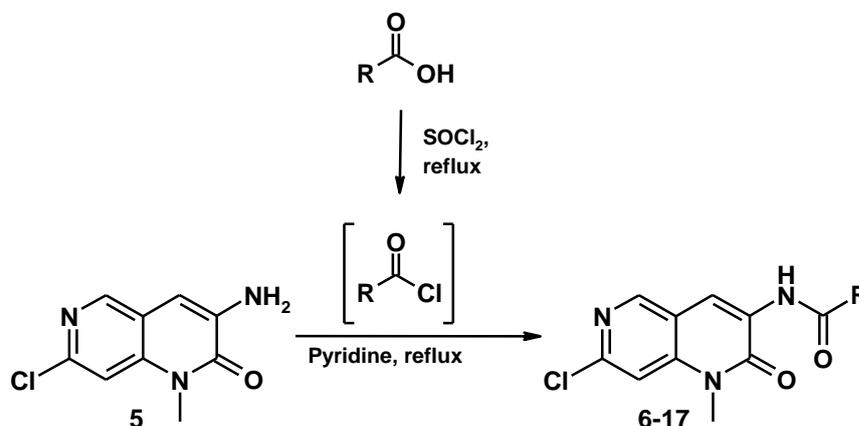
La deuxième méthode a consisté à faire réagir l'amine en 3 sur un chlorure d'acide commercial ou fonctionnalisé et préalablement préparé en faisant réagir du chlorure de thionyle avec l'acide carboxylique correspondant. Non isolé, il est engagé en réaction avec la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**5**) au reflux de la pyridine anhydre.<sup>214</sup> Un premier essai concluant avec le chlorure de benzoyle nous a motivé à étendre cette réaction à d'autres chlorures d'acides.

L'amine (**5**) a ainsi été mise en réaction avec divers chlorures d'acides fonctionnalisés qui ont permis d'obtenir douze nouvelles molécules (**6**) à (**17**) avec des rendements variant de

<sup>213</sup> Kusuma, B. R. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6234-6253.

<sup>214</sup> Cowden, W. B. *et al.*, *brevet*, **2005**, WO 2005021547.

33 à 84% (**Schéma 15, tableau 4**). Les faibles rendements observés pour les composés (**16**) et (**17**) s'expliquent par la faible solubilité de ces produits dans les solvants organiques usuels (dichlorométhane, acétate d'éthyle...), ce qui a rendu les étapes d'extraction et de purification plus délicates. Un essai avec le chlorure de 1*H*-indole-2-carbonyle n'a pas permis d'isoler le composé désiré, une dégradation du milieu réactionnel est observée après 4 h de chauffage.



**Schéma 15** : Synthèse des amides **6** à **17** dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one **5** selon les procédures A et B.

Produit	R	Temps de réaction	Rendement (%)
<b>6</b>	CH <sub>3</sub>	3 h	63
<b>7</b>	CH=CHPh	3 h	59
<b>8</b>	Ph	3 h	71
<b>9</b>	Ph-( <i>p</i> )OCH <sub>3</sub>	4 h	76
<b>10</b>	Ph-( <i>m</i> )OCH <sub>3</sub>	1 h 30	56
<b>11</b>	Ph-( <i>m,m',p</i> )OCH <sub>3</sub>	3 h	58
<b>12</b>	Ph-( <i>m</i> )Ph	1 h	84
<b>13</b>	Ph-( <i>p</i> )OH *	5 h	63
<b>14</b>	Ph-( <i>p</i> )NO <sub>2</sub>	1 h 30	79
<b>15</b>	Ph-( <i>p</i> )Cl	3 h	53
<b>16</b>	4-pyridyl	2 h	39
<b>17</b>	2-Benzothiényl	3 h	33
	2-indolyl	4 h	dégradation

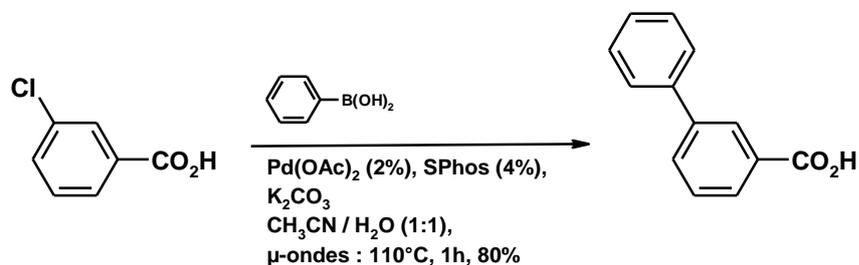
\* ClCOPh-(*p*)OAc, pyridine, reflux, 3h puis NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), ta, 2h.

**Tableau 4** : Conditions utilisées pour la synthèse des amides **6** à **17**.

Les composés (**12**) et (**13**) ont nécessité quelques étapes supplémentaires. Tout d'abord la synthèse de l'amide (**12**) a pu être envisagée après la réalisation d'un coupage de Suzuki-Miyaura (dont le mécanisme réactionnel sera détaillé dans le paragraphe **I-E-3-a**, page 60) sur l'acide 3-chlorobenzoïque comme décrit dans les travaux de K. W. Anderson et S. L. Buchwald.<sup>215</sup> Celui-ci est réalisé en présence d'acide phénylboronique, d'acétate de

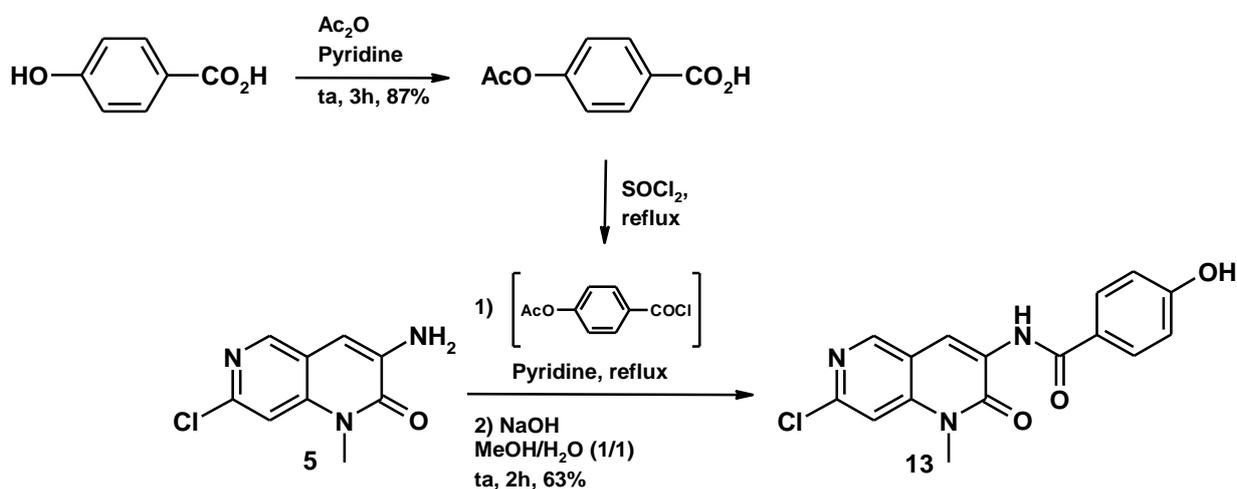
<sup>215</sup> Anderson, K. W.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6173-6177.

palladium, de SPhos et de  $K_2CO_3$  sous irradiation micro-ondes à  $110^\circ C$  pendant 1 h dans un mélange  $CH_3CN / H_2O$  (1:1) (**Schéma 16**). L'acide 3-phénylbenzoïque est isolé avec un rendement de 80% puis le chlorure d'acide correspondant est préparé en chauffant à  $80^\circ C$  dans un excès de chlorure de thionyle avant d'être engagé avec l'amine (**5**).



**Schéma 16** : Accès à l'acide 3-phénylbenzoïque par couplage de Suzuki-Miyaura.

Concernant l'accès au composé (**13**), la protection préalable de la fonction phénol de l'acide 4-hydroxybenzoïque a été effectuée avant de préparer le chlorure d'acide correspondant.<sup>216</sup> L'acylation est réalisée en présence d'anhydride acétique dans la pyridine pendant 3 h à température ambiante et permet d'isoler l'acide 4-acétyloxybenzoïque avec un bon rendement de 87%. Cette protection s'est avérée nécessaire puisqu'un mélange réactionnel complexe est observé lorsque la chloration est réalisée directement sur le produit de départ. Enfin, l'amine (**5**) réagit avec le chlorure de 4-acétyloxybenzoyle pour donner après hydrolyse alcaline le dérivé (**13**) avec 63% de rendement (**Schéma 17**).



**Schéma 17** : Accès au *N*-(7-chloro-1-méthyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphtyridin-3-yl)-4-hydroxybenzamide **13**.

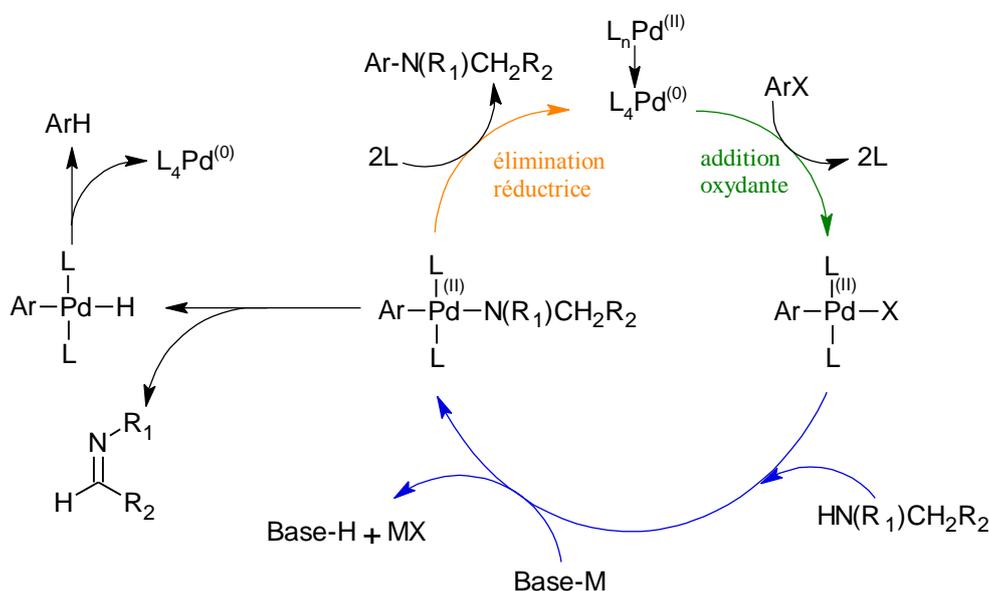
<sup>216</sup> Elsinghorst, P. W. *et al. J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5685-5695.

### 3 - Fonctionnalisation en position 7 des amides dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one

La fonctionnalisation de la position 7 du noyau 1,6-naphtyridin-2(1H)-one par une amine primaire peut être envisagée de deux manières différentes selon la réactivité de l'atome de chlore. La réalisation d'une substitution nucléophile aromatique est généralement appropriée sur ce type de noyau. L'atome de chlore situé en  $\alpha$  de l'azote pyridinique doit posséder une certaine labilité. Étonnamment, les premiers essais de substitution nucléophile aromatique ont mis en avant le faible pouvoir nucléofuge de celui-ci. C'est pourquoi une réaction d'amination palladocatalysée de type Buchwald / Hartwig a été envisagée dans un premier temps.

#### a) Accès par une amination palladocatalysée de Buchwald / Hartwig

En 1995, S. L. Buchwald et J. F. Hartwig publient leurs premiers travaux sur l'amination d'halogénures d'aryles permettant la formation d'une liaison C-N grâce à une combinaison appropriée d'un complexe de palladium, d'un ligand, d'une base et d'un solvant.<sup>217, 218</sup> Le mécanisme proposé comporte trois étapes (**Figure 31**)<sup>219</sup> et peut s'appliquer à de nombreux dérivés azotés (amines, amides, azahétérocycles...) et dérivés halogénés en présence d'une grande variété de groupements fonctionnels.



**Figure 31** : Cycle catalytique du couplage de Buchwald / Hartwig.

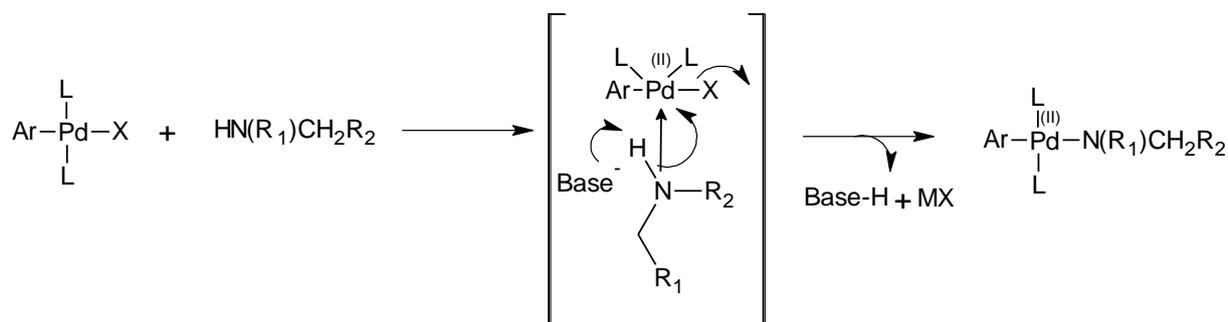
Une première étape d'addition oxydante s'effectue par réaction du complexe de palladium (0) avec le dérivé halogéné. La seconde étape consiste en la coordination et la

<sup>217</sup> Louie, J.; Hartwig, J. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612.

<sup>218</sup> Guram, A. S. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1348-1350.

<sup>219</sup> Corbet, J. P.; Mignani, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2651-2710.

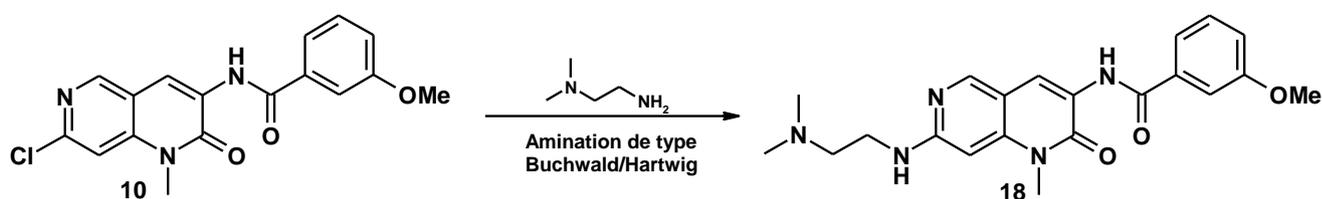
déprotonation de l'amine. Un intermédiaire de type amine tertiaire au palladium est obtenu par arrachement du proton de l'amine coordonnée (**Figure 32**). Lors de cette étape, la capacité de la base à arracher le proton est un paramètre primordial.



**Figure 32** : Mécanisme réactionnel de la seconde étape du cycle catalytique.

La troisième étape est l'élimination réductrice au cours de laquelle l'amine souhaitée est obtenue et le palladium (0) régénéré. Il est à noter qu'au cours de ce cycle catalytique une élimination supplémentaire peut avoir lieu. Cette réaction secondaire (formant une imine et un complexe palladium-H) peut ensuite conduire à la formation d'un sous produit Ar-H par  $\beta$ -élimination réductrice. L'utilisation de ligands chélatants (en général des phosphines) peut réduire fortement l'impact de cette réaction secondaire. Les ligands riches en électrons augmentent la densité électronique autour du palladium facilitant l'addition oxydante. Les ligands encombrés eux, favorisent l'élimination réductrice. Actuellement, il existe une large variété de ligands permettant ces réactions de couplage, notamment des ligands phosphines bidentés ou aminophosphines.

Dans le cadre de nos travaux, différentes tentatives de couplages de type Buchwald-Hartwig ont été entreprises en position 7 sur le composé (**10**) avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine (**Schéma 18**). Malheureusement, ce couplage est resté sans succès quelles que soient les conditions utilisées. Les différents essais réalisés sont résumés dans le **tableau 5**.



**Schéma 18** : Essais d'amination de type Buchwald-Hartwig avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine.

Des conditions classiques de couplage,<sup>220</sup> à l'aide de Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, de BINAP, de *tert*-butanolate de sodium et de *N,N*-diméthyléthylènediamine dans le toluène ont tout d'abord été employées (**tableau 5**, essai 1). Cependant, ce premier essai a abouti à la dégradation de l'amide de départ sans formation du composé de couplage. De même, l'utilisation de carbonate de césium comme base (essai 2) ou le changement de ligand (essai 3) n'a conduit qu'à la dégradation du milieu réactionnel. Lors de l'utilisation d'acétate de palladium comme catalyseur, aucune réaction n'a eu lieu et seul le composé (**10**) a été retrouvé (essai 4). Le même résultat est observé lors du changement de ligand, de base ou de solvant (essais 5-7). Un chauffage micro-ondes permet seulement d'observer des traces du produit de couplage après 30 minutes de réaction.

Essai	Catalyseur	Ligand	Base	Solvant	Conditions de chauffage	Observations
1	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	BINAP	<i>t</i> -BuONa	toluène	reflux, 24 h	dégradation
2	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	BINAP	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluène	reflux, 24 h	dégradation
3	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	SPhos	<i>t</i> -BuONa	toluène	reflux, 3 h	dégradation
4	Pd(OAc) <sub>2</sub>	BINAP	<i>t</i> -BuONa	toluène	reflux, 3 h	pas de réaction
5	Pd(OAc) <sub>2</sub>	Xantphos	<i>t</i> -BuONa	toluène	reflux, 3 h	pas de réaction
6	Pd(OAc) <sub>2</sub>	Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	toluène	reflux, 3 h	pas de réaction
7	Pd(OAc) <sub>2</sub>	Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,4-dioxane	reflux, 3 h	pas de réaction
8	Pd(OAc) <sub>2</sub>	Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,4-dioxane	μ-ondes, 30 min	traces

**Tableau 5** : Conditions employées pour les essais d'amination de type Buchwald-Hartwig avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine.

Devant ces échecs, nous avons décidé de ne pas poursuivre nos travaux sur cette voie, privilégiant un second schéma de synthèse *via* une substitution nucléophile aromatique.

#### b) Accès par une substitution nucléophile aromatique

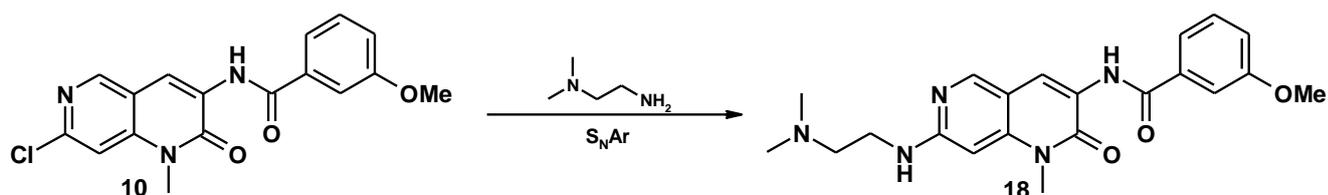
Des essais de substitutions nucléophiles aromatiques avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine ont été réalisés en position 7.<sup>220,221,222,223</sup> Comme cités précédemment, ceux-ci ont mis en avant la difficulté à déplacer l'atome de chlore sur cette position (**Schéma 19**, **tableau 6**).

<sup>220</sup> Dreyer, M. *et al.*, *brevet*, **2005**, WO 2007000240.

<sup>221</sup> Tabarrini, O. *et al.*, *ChemMedChem*. **2011**, *6*, 1249-1257.

<sup>222</sup> Emond, R. *et al.*, *brevet*, **2010**, WO 2010064020.

<sup>223</sup> Noe, C. R. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 845-848.



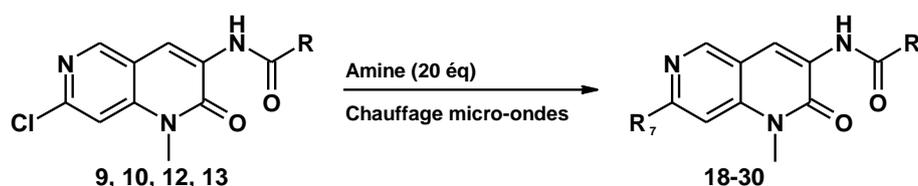
**Schéma 19** : Essais de substitutions nucléophiles aromatiques avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine.

Deux premiers essais promouvant un chauffage en tube scellé dans la NMP (essai 1) et sous irradiation micro-ondes dans le DMF (essai 2) ne permettent d'observer que des traces du produit fonctionnalisé en 7. Au final, seule l'utilisation d'un large excès d'amine et d'un chauffage micro-ondes permettent d'obtenir le produit désiré (essai 3). Bien que l'ajout de CuI dans l'essai 4 ait permis de réduire le temps de réaction par rapport à l'essai 3, le rendement s'est avéré plus faible.

Essai	Réactifs	Conditions de chauffage	Observations
1	<i>N,N</i> -Diméthyléthylènediamine (3 éq)	NMP, tube scellé, 130°C, 72 h	traces
2	<i>N,N</i> -Diméthyléthylènediamine (1,1 éq) Triéthylamine (3 éq)	DMF, $\mu$ -ondes, 130°C, 3 h	traces
3	<i>N,N</i> -Diméthyléthylènediamine (20 éq)	$\mu$ -ondes, 130°C, 6 h	50%
4	<i>N,N</i> -Diméthyléthylènediamine (20 éq) CuI (1,5 éq)	$\mu$ -ondes, 130°C, 2 h 30	37%

**Tableau 6** : Conditions employées pour les essais de substitutions nucléophiles aromatiques avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine.

Pour la suite des fonctionnalisations en 7, ce sont les conditions de Dreyer *et al.*<sup>220</sup> utilisées dans l'essai 3 qui ont été retenues. Dans le but d'augmenter la solubilité de nos molécules, nous avons retenu cinq amines hydrophiles pour réaliser cette substitution. En dépit du long temps de réaction avec certaines amines, celles-ci donnent un mélange réactionnel facile à purifier, associées à de meilleurs rendements. La fonctionnalisation par la *n*-propylamine a nécessité l'ajout de CuI pour permettre à celle-ci d'arriver à son terme (**Schéma 20**, **tableau 7**).



**Schéma 20** : Fonctionnalisation de la position 7 des amides **9**, **10**, **12** et **13** selon la procédure C.

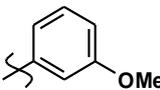
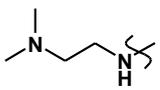
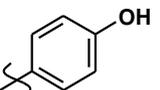
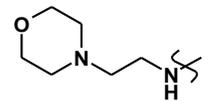
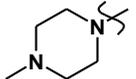
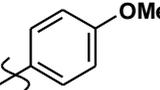
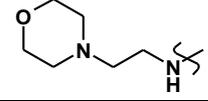
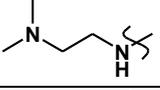
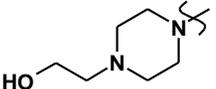
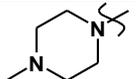
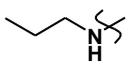
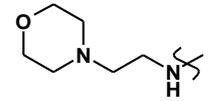
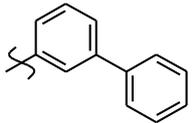
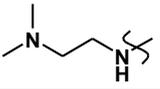
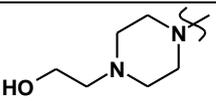
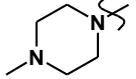
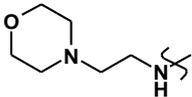
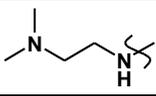
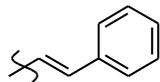
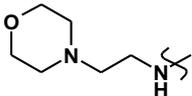
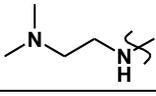
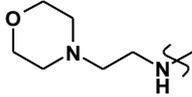
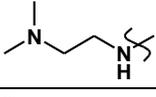
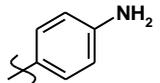
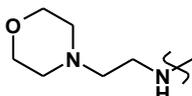
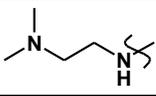
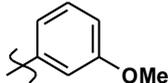
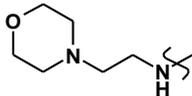
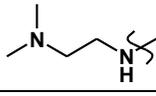
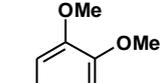
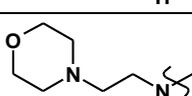
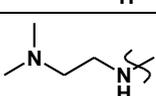
Produit	Amine	R	R <sub>7</sub>	Conditions de chauffage	Rendement (%)
18	<i>N,N</i> -diméthyléthylènediamine			130°C, 6 h	50
19	<i>N</i> -(2-aminoéthyl)morpholine			170°C, 1 h 30	53
20	1-méthylpipérazine			150°C, 1 h 15	39
21	<i>N</i> -(2-aminoéthyl)morpholine			170°C, 1 h 45	40
22	<i>N,N</i> -diméthyléthylènediamine			130°C, 2 h 30	53
23	(2-hydroxyéthyl)pipérazine			130°C, 1 h	70
24	1-méthylpipérazine			150°C, 1 h	51
25	<i>n</i> -propylamine			CuI (0,5 éq), NMP, 130°C, 5 h	70
26	<i>N</i> -(2-aminoéthyl)morpholine			170°C, 1 h	71
27	<i>N,N</i> -diméthyléthylènediamine			130°C, 1 h 30	64
28	(2-hydroxyéthyl)pipérazine			130°C, 1 h	61
29	1-méthylpipérazine			150°C, 1 h	95
30	<i>n</i> -propylamine			CuI (0,5 éq), NMP, 130°C, 5 h	57

Tableau 7 : Synthèse des molécules finales 18 à 30.

Treize molécules finales ont été synthétisées avec des rendements divers allant de 39 à 95%. Cinq motifs aminés différents ont été introduits en position 7 sur les composés (9), (10), (12) et (13). Les tests de solubilité réalisés sur cette première batterie de molécules (Page 112, tableau 27, partie B, II) ont montré que sur les cinq motifs aminés engagés, seules les réactions mettant en jeu la *N*-(2-aminoéthyl)morpholine et la *N,N*-diméthyléthylènediamine permettaient d'améliorer grandement la solubilité des molécules et ainsi de pouvoir les

évaluer plus facilement. Ce sont donc ces deux amines qui ont été utilisées par la suite pour fonctionnaliser la position 7 des précurseurs chlorés (**Tableau 8**).

Dix-sept nouveaux composés finaux obtenus avec des rendements hétérogènes de 19 à 93% sont ainsi venus compléter la première série. Le faible pouvoir nucléofuge du chlore a nécessité un temps de réaction assez long associé à une température de chauffage élevée. Des réactions secondaires de déshalogénéation ou d'aminolyse sur la position 3 apparaissent dans des proportions plus ou moins importantes expliquant les faibles rendements observés avec certains benzamides. Concernant les produits (**37**) et (**38**), une réduction complète du groupement nitro a été observée de façon surprenante pendant la réaction et a permis d'isoler exclusivement les dérivés 4-aminobenzamidinyles.

Produit	R	R <sub>7</sub>	Conditions de chauffage	Rendement (%)
31			170°C, 1 h	19
32			CuI (0,5 éq), 130°C, 5 h	48
33			150°C, 4 h	38
34			130°C, 3 h	24
35			170°C, 1 h	93
36			130°C, 6 h	66
37			170°C, 1 h	62
38			130°C, 8 h	19
39			170°C, 1 h 15	86
18			130°C, 6 h	50
40			170°C, 1 h	55
41			130°C, 3 h 30	60

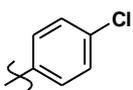
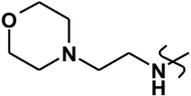
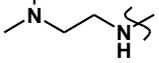
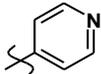
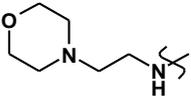
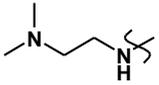
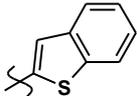
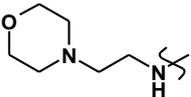
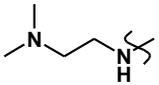
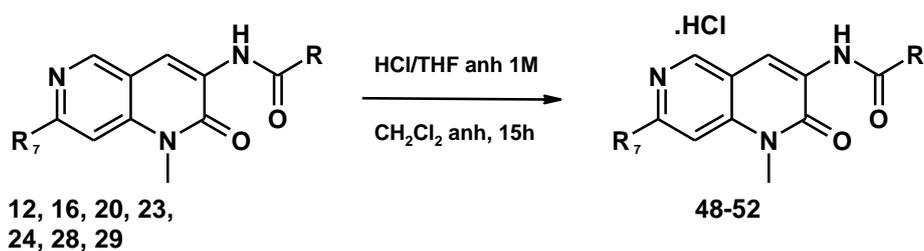
42			170°C, 1 h	79
43			130°C, 5 h	70
44			170°C, 1 h	45
45			130°C, 3 h	60
46			170°C, 1 h	77
47			130°C, 3 h	42

Tableau 8 : Synthèse des molécules finales **31** à **47**.

#### 4 - Synthèse des chlorhydrates

Devant les problèmes de solubilité rencontrés par certaines molécules finales et leurs intermédiaires chlorés en 7, la formation de chlorhydrates a été envisagée sur certains d'entre eux afin d'améliorer la solubilité en milieu aqueux et de pouvoir procéder à leur évaluation biologique (**Schéma 21**, **tableau 9**). Deux intermédiaires chlorés, les composés (**12**) et (**16**) ont d'abord été dissous dans du dichlorométhane anhydre avant l'ajout d'un mélange HCl / THF 1M. Après 15 h d'agitation à température ambiante, seul le produit de départ est récupéré. Finalement l'accès aux chlorhydrates a pu être réalisé seulement à partir des composés fonctionnalisés en 7 et présentant un azote plus basique.

Schéma 21 : Préparation des chlorhydrates **48** à **52** selon la procédure D.

Produit	R	R <sub>7</sub>	Rendement (%)
		Cl	pas de réaction
		Cl	pas de réaction
48			36
49			70
50			84
51			69
52			44

Tableau 9 : Synthèse des chlorhydrates 48 à 52.

## 5 - Conclusion

Au total, trente amides analogues de la novobiocine, dérivés du noyau 1,6-naphtyridin-2-(1*H*)-one et fonctionnalisés en 3 et 7 ont été synthétisés. L'amidification en 3 à partir de l'amine et d'un chlorure d'acide convenablement choisi a permis d'obtenir douze intermédiaires dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one avec des rendements allant de 33 à 84%. La dernière étape de fonctionnalisation en position 7 s'est avérée plus compliquée à mettre en œuvre et a mis en évidence la grande difficulté à substituer le chlore sur cette position. Malgré l'usage de conditions drastiques (large excès d'amine et temps de réaction allongé), cette méthode a permis d'isoler un grand nombre d'analogues disponibles pour une évaluation biologique. L'accès à des chlorhydrates a été envisagé afin de contourner les problèmes de solubilité rencontrés dans les tests biologiques préliminaires.

## *E - Etude de couplages palladocatalysés sur des 3,7-dihalogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones (Voie B)*

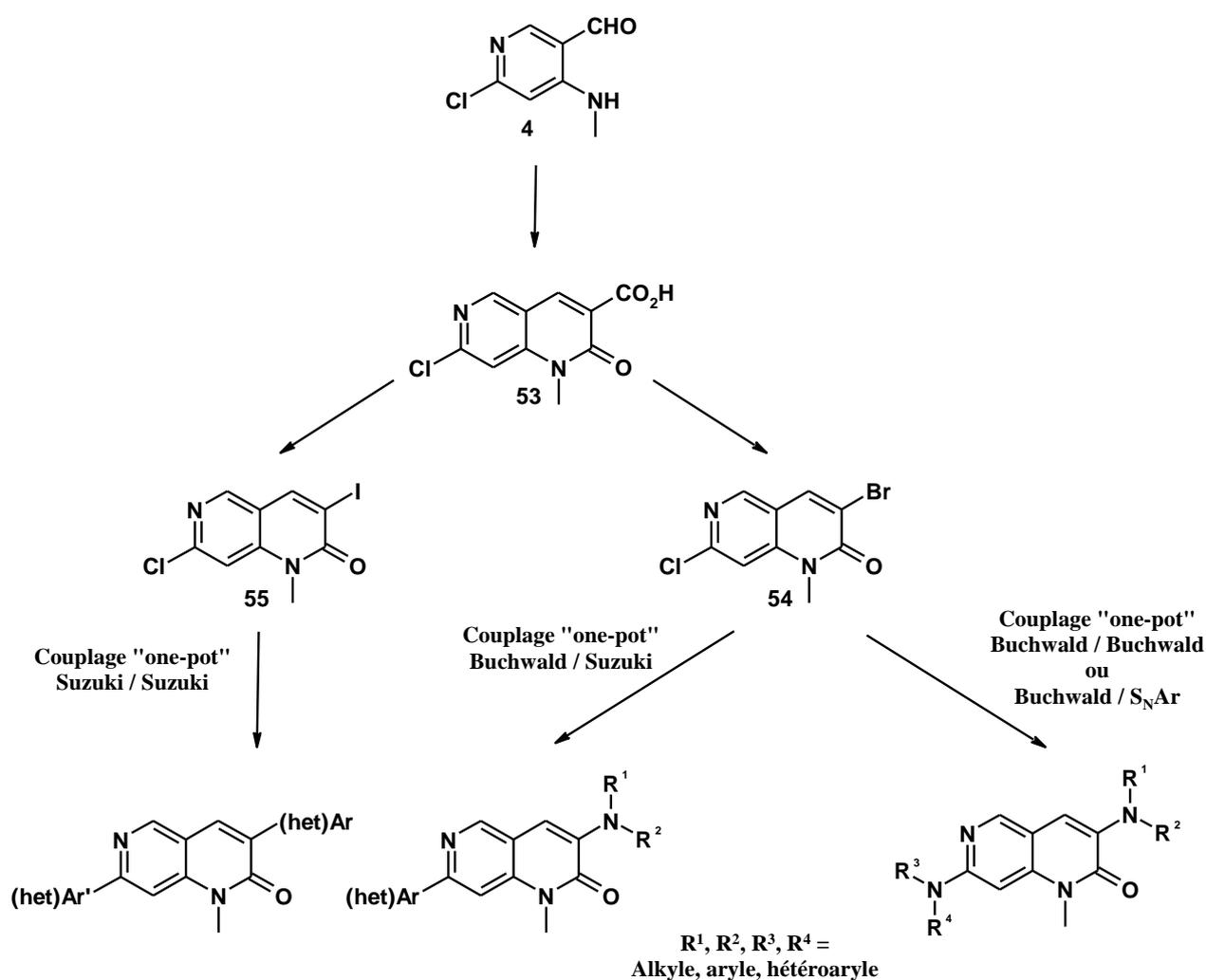
### 1 - Approche synthétique

Le travail de méthodologie mis en jeu consiste à exploiter des couplages séquentiels palladocatalysés de type Suzuki-Miyaura ou Buchwald-Hartwig sur un dérivé 3,7-dihalogéné afin de mettre en marche une voie de synthèse simplifiée permettant l'accès à nos molécules

cibles. De plus, ceux-ci doivent aussi nous aider à explorer la réactivité du chlore en position 7 présent sur le cycle pyridinique et encore peu étudiée. Une fois celle-ci travaillée, elle nous permettra d'accéder, grâce à ce jeu de couplage, à des molécules originales hautement fonctionnalisées.

Concernant l'halogène en position 3 du dérivé dihalogéné, il est obtenu par réaction d'halogénéodécarboxylation de l'acide carboxylique (**53**), ce dernier pouvant être obtenu par cyclisation de l'aldéhyde (**4**) avec l'acide de Meldrum (**Schéma 22**).

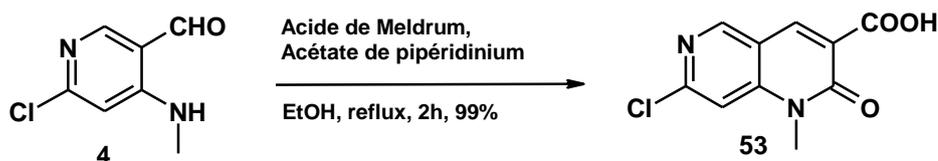
La réactivité des précurseurs dihalogénés est mise à profit dans divers couplages séquentiels palladocatalysés. Trois jeux de couplages ont ainsi été travaillés. Un premier mettant en œuvre deux couplages successifs de type Suzuki-Miyaura en position 3 puis 7. Un second de type Buchwald-Hartwig en 3 puis Suzuki-Miyaura en 7, un troisième de type Buchwald-Hartwig en 3 puis en 7. Enfin, une dernière séquence mettant en jeu un couplage de type Buchwald-Hartwig en 3 suivi d'une substitution nucléophile aromatique en 7 a été mise en œuvre.



**Schéma 22** : Approche synthétique envisagée pour l'accès à des 1,6-naphtyridin-2(1H)-ones 3,7 disubstitués obtenues par couplages palladocatalysés.

## 2 - Synthèse des 7-chloro-3-halogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones

Le composé 3,7-dihalogéné est synthétisé en deux étapes à partir du composé (**4**). Une première étape de cyclisation en présence de l'acide de Meldrum (2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione) et d'une quantité substœchiométrique de pipéridine et d'acide acétique conduit au noyau 1,6-naphtyridin-2(1H)-one. Cette réaction est effectuée au reflux de l'éthanol et permet d'isoler l'acide (**53**) correspondant avec un excellent rendement de 99%.

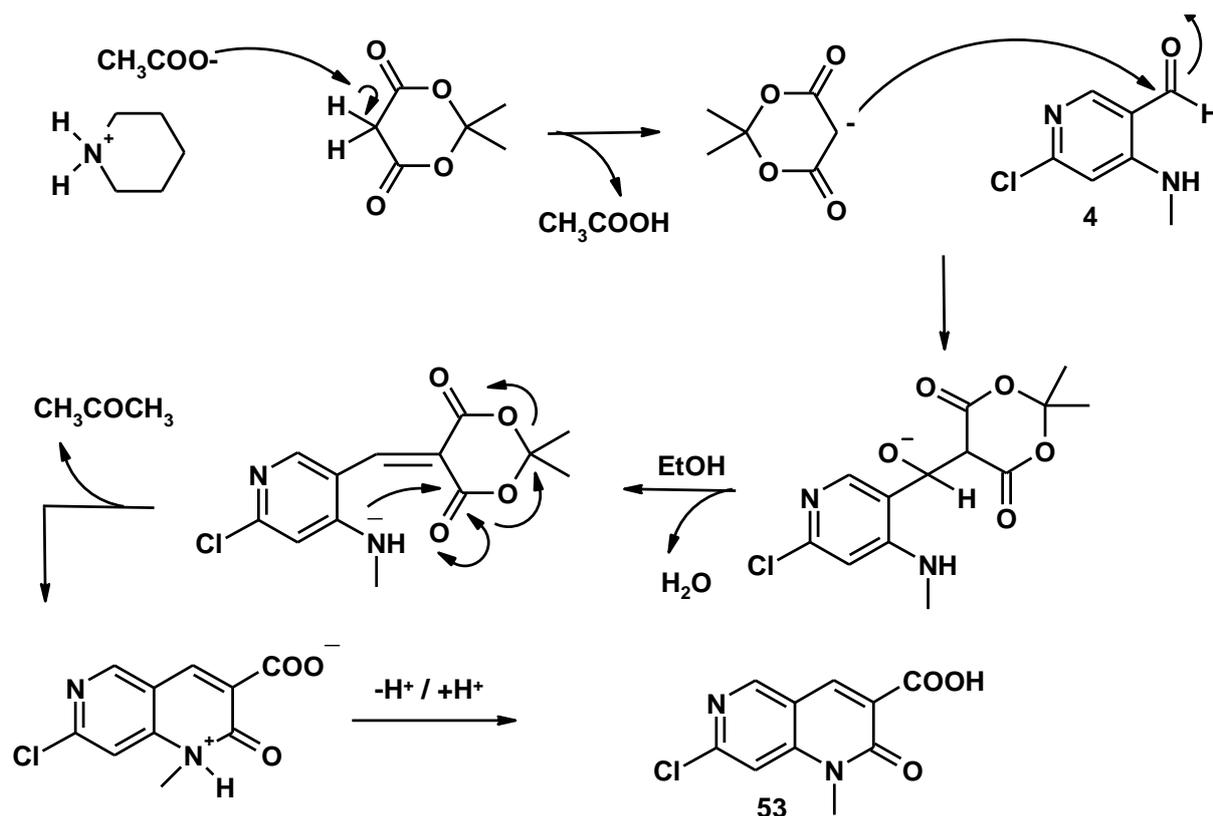


**Schéma 23** : Accès à l'acide (**53**) par réaction de cyclisation en présence d'acide de Meldrum et d'acétate de pipéridinium.

Cette synthèse s'appuie sur des travaux de Song *et al.*<sup>224</sup> décrivant l'accès à des acides 3-coumarine carboxyliques résultants d'une condensation de Knoevenagel à partir de 2-hydroxybenzaldéhydes et d'acide de Meldrum.<sup>225</sup> Le mécanisme suivant peut être proposé (**Schéma 24**) : en se basant sur le mécanisme classique de la condensation de Knoevenagel, l'énolate formé après déprotonation de l'acide de meldrum par l'acétate de pipéridinium peut s'additionner sur le composé (**4**) qui après élimination d'une molécule d'eau donne l'intermédiaire carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé. Enfin l'addition de l'amine sur le carbonyle permet d'obtenir l'acide (**53**) après élimination d'acétone et reprotonation du carboxylate.

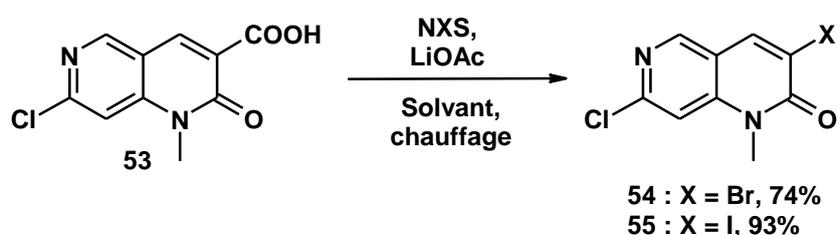
<sup>224</sup> Song, A. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1755-1758.

<sup>225</sup> Jones, G. *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, **1967**, *15*, 204-599.



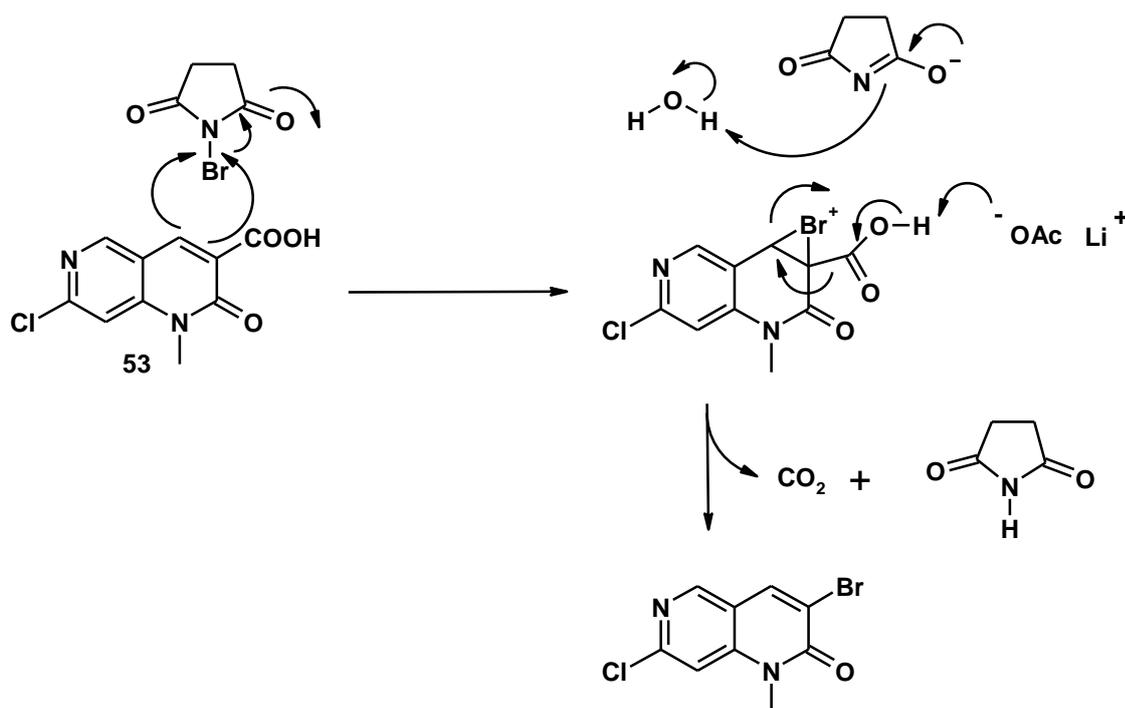
**Schéma 24** : Mécanisme réactionnel proposé pour l'accès à l'acide **53**.

Enfin une réaction d'halogénéodécarboxylation de l'acide en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) ou de *N*-iodosuccinimide (NIS) a été envisagée afin d'obtenir le dérivé dihalogéné (**Schéma 25**).



**Schéma 25** : Halogénéodécarboxylation de l'acide **53** selon la procédure E.

Le mécanisme réactionnel qui suit peut être proposé en utilisant le *N*-bromosuccinimide comme réactif halogénant (**Schéma 26**). Une première étape d'addition électrophile conduit à la formation d'un ion bromonium ponté. Puis, celui-ci va pouvoir s'ouvrir après déprotonation de l'acide carboxylique par l'acétate de lithium et libération de dioxyde de carbone qui constitue la force motrice de cette seconde étape.



**Schéma 26** : Mécanisme réactionnel proposé pour la bromodécarboxylation de l'acide **53**.

La mise au point des conditions réactionnelles optimales (solvant, chauffage, équivalents de réactifs) s'est avérée indispensable (**Tableau 10**).

Essai	NXS (équiv.)	LiOAc (équiv.)	Solvant <sup>(a)</sup>	Chauffage	Temps de réaction	Conversion (%) <sup>(b)</sup>	Rendement (%)
1	NBS (1.2)	1.2	A	classique (100 °C)	5 h	0%	non déterminé
2	NBS (2.2)	1.2	B	classique (100 °C)	2 h	7%	non déterminé
3	NBS (2.2)	1.2	B	μ-ondes (100 °C)	10 min	59%	non déterminé
4	NBS (2.2)	2.2	B	μ-ondes (100 °C)	10 min	65%	non déterminé
5	NBS (3.2)	3.2	B	μ-ondes (100 °C)	10 min	90%	non déterminé
6	NBS (3.2)	3.2	C	μ-ondes (100 °C)	20 min	85%	64
7	NBS (3.2)	3.2	C	μ-ondes (150 °C)	20 min	48%	non déterminé
8	NBS (3.2)	3.2	C	μ-ondes (110 °C)	30 min	64%	52
9	NBS (3.2)	1.2	C	μ-ondes (110 °C)	10 min	76%	63
10	<b>NBS (4.2)</b>	<b>1.2</b>	<b>C</b>	<b>μ-ondes (110 °C)</b>	<b>10 min</b>	<b>91%</b>	<b>74</b>
11	NIS (1.2)	1.2	C	μ-ondes (110 °C)	10 min	68%	non déterminé
12	<b>NIS (3.2)</b>	<b>1.2</b>	<b>C</b>	<b>μ-ondes (110 °C)</b>	<b>10 min</b>	<b>100%</b>	<b>93</b>

(a) Solvants : A = CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 97:3, B = CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 9:1, C = DMF/H<sub>2</sub>O 9:1. (b) Le pourcentage de conversion est déterminé par UPLC-MS.

**Tableau 10** : Optimisation des conditions d'halogénéodécarboxylations de l'acide (**53**).

Un premier essai de bromodécarboxylation selon la procédure de Chowdhury *et al.*<sup>226</sup> n'a pas permis d'observer la formation du produit désiré. Une légère amélioration est observée en augmentant la quantité de NBS et d'eau (essai 2). Par la suite, il a été intéressant de constater que l'utilisation du chauffage micro-ondes rendait plus efficace la bromodécarboxylation (essai 3) mais aussi que l'augmentation des quantités de NBS et d'acétate de lithium permettaient une meilleure conversion observée en chromatographie liquide haute performance couplée à une spectrométrie de masse (UPLC-MS) (essais 4-5). Lorsque la réaction est conduite dans un mélange DMF / H<sub>2</sub>O (9:1) (essai 6), une bonne conversion est observée et permet un traitement plus facile du milieu réactionnel que l'utilisation du système CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O. L'augmentation de la température (essai 7) ou du temps de réaction (essai 8) résultent en une conversion incomplète et la formation de produits secondaires. Dans la suite de l'optimisation des conditions réactionnelles, nous avons voulu vérifier si l'utilisation de 3,2 équivalents d'acétate de lithium était justifiée. Nous avons ainsi pu remarquer qu'en ajustant ces quantités à 1,2 équivalents (essai 9), nous obtenions le produit désiré avec un rendement similaire à celui obtenu avec 3,2 équivalents. Enfin, les meilleures conditions retenues ont été celles utilisant 4,2 équivalents de NBS et 1,2 équivalents d'acétate de lithium, permettant d'observer un haut taux de conversion avec un très bon rendement (essai 10).

Ensuite, nous avons investigué la réaction d'iododécarboxylation dans le but d'obtenir le dérivé iodé correspondant, généralement plus réactif dans la plupart des transformations palladocatalysées. L'utilisation de 1,2 équivalents de NIS en conditions classiques permet d'observer une bonne conversion (essai 11), cependant en ajustant la quantité de NIS à 3,2 équivalents (essai 12) nous observons une conversion quantitative et le dérivé iodé est isolé avec un excellent rendement de 93%. Finalement nous avons retenu l'usage d'un excès de NXS et de 1,2 équivalents d'acétate de lithium dans un mélange DMF / H<sub>2</sub>O (9:1) sous irradiation micro-ondes pendant dix minutes comme conditions optimales pour l'obtention des dérivés halogénés (**54**) et (**55**).

La réactivité de ces deux intermédiaires a ensuite été étudiée sur différents couplages séquentiels palladocatalysés mettant en jeu des réactions de Suzuki-Miyaura et de Buchwald-Hartwig. Pour contourner les problèmes de solubilité et de réactivité pouvant exister avec les 1,6-naphtyridinones contenant un NH libre, nous avons décidé de nous focaliser sur leurs analogues *N*-méthylés.<sup>227</sup>

### 3 - Fonctionnalisation des 3,7-dihalogéno-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones en position 3

#### a) Par couplage de Suzuki-Miyaura

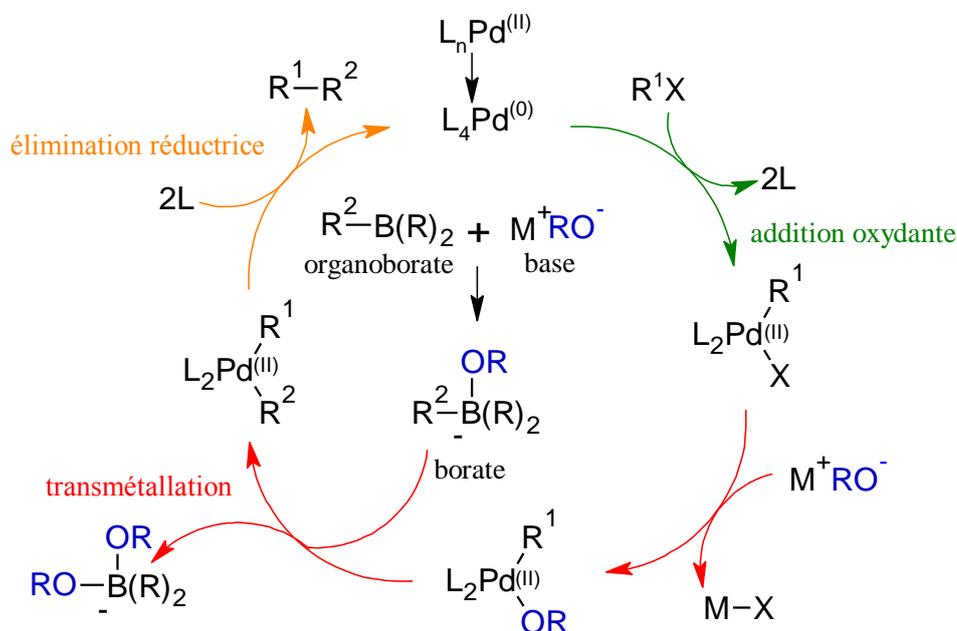
Le couplage de Suzuki<sup>228</sup> permet la synthèse de composés le plus souvent biaryliques par formation d'une liaison carbone-carbone. Ce couplage met en jeu un dérivé halogéné, un acide boronique, une base et un complexe de palladium au degré d'oxydation 0. Cette réaction

<sup>226</sup> Chowdhury S.; Roy, S. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 199-200.

<sup>227</sup> Cross, R. M.; Manetsch, R. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8654-8657.

<sup>228</sup> Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.

tolère la présence d'une large variété de groupes fonctionnels et conduit généralement à de bons rendements avec une bonne sélectivité. Les autres avantages de ce couplage sont la faible quantité de catalyseur requise et l'utilisation possible de nombreux solvants à différentes températures.<sup>219</sup> Le cycle catalytique proposé pour cette réaction de couplage est décrit sur la **figure 33**.<sup>229</sup>



**Figure 33** : Cycle catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura.

Ce couplage implique des catalyseurs au palladium (0) (par exemple  $Pd(PPh_3)_4$ ) commerciaux ou alors générés *in situ* à partir d'un sel de palladium (II) (par exemple  $PdCl_2$  ou  $Pd(OAc)_2$ ) facilement réduit en complexe Pd (0) actif.

Le cycle catalytique débute par l'addition oxydante du dérivé halogéné (ou de son analogue) sur le complexe de palladium (0) pour générer un intermédiaire de palladium (II). Cette étape s'effectue concomitamment avec un échange de deux ligands autour de la sphère de coordination du complexe de palladium. La vitesse de l'addition oxydante va dépendre de la nature de l'halogène sur l'aromatique :  $I > OTf > Br \gg Cl$ . L'encombrement stérique de l'halogénure d'aryle n'est pas un facteur déterminant. Par contre, les aryles substitués par un groupement électroattracteur seront plus réactifs que ceux possédant un groupement électrodonneur. De plus, l'addition oxydante est également influencée par la nature des phosphines entourant le complexe de palladium.

La base joue ensuite un rôle majeur : elle permet d'activer le complexe de palladium en formant, par substitution de l'halogénure, un complexe  $R^1Pd(II)L_2OR$  qui accélère l'étape de transmétaallation. Elle permet aussi la formation d'un « ate » complexe par association avec l'acide boronique, augmentant ainsi la nucléophilie du groupe porté par le bore et accélérant

<sup>229</sup> Moreno-Manas, M. *et al.*, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2346-2351.

son transfert au palladium. Lors de l'étape de transmétallation, l'atome d'halogène est remplacé par un résidu organique au sein du complexe  $R^1Pd(II)XL_2$ .

Enfin, le cycle catalytique se termine par une élimination réductrice, cette étape permet la formation de la liaison  $R^1-R^2$  et la régénération du catalyseur palladié. L'élimination ne peut s'opérer que si les résidus  $R^1$  et  $R^2$  sont en position *cis* dans le complexe plan carré. Cette isomérisation s'effectue juste avant la formation de la liaison carbone-carbone.

Depuis la publication des premiers travaux de Suzuki et Miyaura en 1979,<sup>230</sup> de nombreuses applications et variantes de cette réaction ont été développées pour conduire à différents produits de couplage. Ainsi différents systèmes de catalyseurs ont été développés. Nous citerons par exemple  $Pd(PPh_3)_4$ ,  $(PPh_3)_2PdCl_2$ ,  $(CH_3CN)_2PdCl_2$ ,  $(dppf)PdCl_2$ ,  $Pd(dba)_2$ ,  $Pd(OAc)_2$ ,  $Pd(OAc)_2 / dppf$ ,  $Pd/C$ , le palladium supporté, ou encore des catalyseurs au nickel comme  $(PPh_3)_2NiCl_2$  ou  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ . Les trialkyles phosphines moins onéreuses sont aussi utilisées lors de certains couplages. Une autre alternative aux ligands phosphines (sensibles à l'air) est l'emploi de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), une amine tertiaire stable et peu chère.<sup>231</sup> De même, lors de ce couplage, plusieurs bases, minérales ou organiques, peuvent être employées suivant les conditions opératoires mises en place ( $Na_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$ ,  $NaOH$ , *t*-BuOK,  $K_3PO_4$ ,  $CS_2CO_3$ ,  $Et_3N \dots$ ). Ce couplage peut aussi se réaliser à partir de sels de bore. Ainsi, Darses et Genêt ont décrit le couplage d'acides arylboroniques avec des sels de diazonium tétrafluoroborates aromatiques.<sup>232</sup> De même, par la suite le couplage d'(hétéro)aryltrifluoroborates de potassium avec des halogénures d'aryles ou d'hétéroaryles est rapporté par Molander.<sup>233</sup> En général, les sels de trifluoroborates sont plus nucléophiles que les analogues acides boroniques, et plus stables lors de leur stockage.

L'arylation en 3 des dérivés halogénés est réalisée selon les conditions réactionnelles décrites par Wu *et al.*<sup>234</sup> appliquées à des 3-bromopyridopyridazin-2(1*H*)-ones. Elle implique un acide boronique, du palladium tétrakis(triphénylphosphine) comme catalyseur et le carbonate de sodium comme base. La chimiosélectivité entre le dérivé bromé (**54**) et le dérivé iodé (**55**) est ainsi étudiée (Schéma 27, tableau 11).

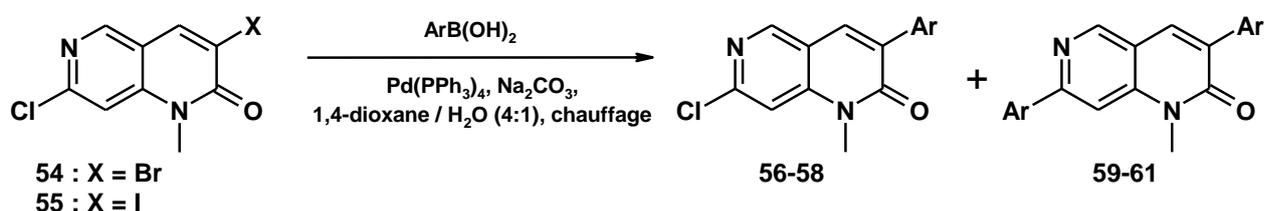


Schéma 27 : Schéma réactionnel des essais d'arylation en position 3.

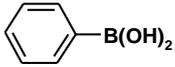
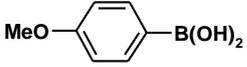
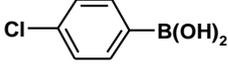
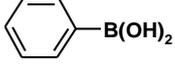
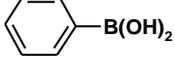
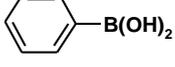
<sup>230</sup> Miyaura, N. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440.

<sup>231</sup> Li, J. H.; Liu, W. J. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2809-2811.

<sup>232</sup> Darses, S. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3857-3860.

<sup>233</sup> Molander, G. A.; Biolatto, B. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1867-1870.

<sup>234</sup> Wu, B. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 6398-6411.

Essai	X	ArB(OH) <sub>2</sub>	Conditions de chauffage	Rendement (%)	
				Composé <b>56</b> (67%)	<b>59</b> (27%)
1	Br		classique, 105°C, 3 h	<b>Composé 56</b> (67%)	<b>59</b> (27%)
2	Br		classique, 105°C, 2 h	<b>57</b> (68%)	<b>60</b> (9%)
3	Br		classique, 105°C, 1 h	<b>58</b> (52%)	<b>61</b> (traces)
4	Br		classique, 80°C, 4 h	<b>56</b> (74%)	<b>59</b> (traces)
5	I		classique, 80°C, 3 h	<b>56</b> (74%)	non observé
6	I		μ-ondes, 80°C, 10 min	<b>56</b> (67%)	non observé

**Tableau 11** : Mise au point des conditions réactionnelles pour l'arylation en position 3.

Un premier essai de couplage de l'acide phénylboronique avec le dérivé bromé (**54**) est réalisé en utilisant du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> comme catalyseur et du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> comme base dans un mélange 1,4-dioxane / H<sub>2</sub>O (4:1). Le mélange réactionnel est chauffé à 105 °C pendant 3 h en tube scellé et permet d'observer un mélange des produits mono (**56**) et biarylé (**59**) difficilement purifiables par chromatographie sur gel de silice gel (essai 1). Une purification en phase inverse a ainsi été requise pour permettre la séparation de chaque produit.

Pour s'assurer que la formation du produit 3,7-diarylé n'était pas due au réactif boré, deux autres acides phénylboroniques portant un groupement électro-attracteur et électro-donneur ont été testés dans les mêmes conditions (essais 2-3). Dans les deux cas le composé bicouplé a été observé (par LC-MS) ou isolé (composé (**60**) obtenu avec 9% de rendement). Une baisse de la température à 80°C permet de réduire significativement la formation du composé biarylé (essai 4).

Ensuite, nous avons voulu comparer la réactivité entre le dérivé bromé (**54**) et son analogue iodé (**55**). Le mélange réactionnel est chauffé à 80°C et permet d'isoler le composé (**56**) avec un bon rendement de 74% sans que le composé (**59**) ne soit détecté (essai 5). De manière similaire, le composé (**56**) est obtenu en un temps plus court avec 67% de rendement en irradiant sous micro-ondes pendant 10 minutes.

Le contrôle de la chimiosélectivité étant plus efficace avec la 7-chloro-3-iodo-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one (**55**), c'est ce composé qui a été choisi par la suite pour réaliser les couplages de Suzuki-Miyaura. En variant les acides phénylboroniques employés, sept naphtyridin-2(1*H*)-ones arylées en position 3 ont pu être isolées en utilisant les conditions réactionnelles décrites précédemment (**Schéma 28, tableau 12**).

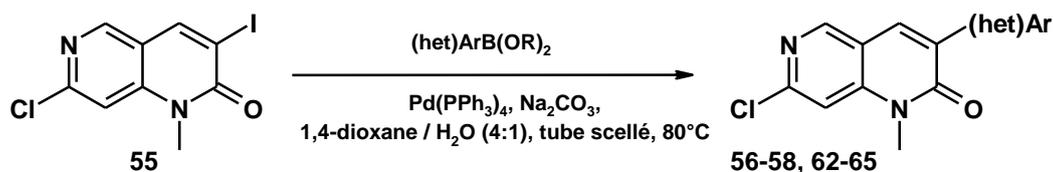


Schéma 28 : Arylation en position 3 par couplage de Suzuki-Miyaura selon la procédure F.

Produit	(het)ArB(OR) <sub>2</sub>	Temps de réaction	(het)Ar	Rendement (%)
56		3 h		74
57		2 h		70
58		3 h		68
62		1.5 h		70
		10 h		pas de réaction
63		3 h		68
64		2 h		71
65		11 h		55
		10 h		dégradation

Tableau 12 : Synthèse des produits 56 à 58 et 62 à 65.

De manière générale, l'introduction de substituants sur le cycle benzénique n'a pas d'influence sur le succès du couplage. Ainsi les groupements donneurs (méthoxy et méthyl) et attracteurs (halogènes et cyano) n'affectent pas la réactivité des acides boroniques correspondants (environ 70%, composés (56) à (62) et (63) à (64)). L'utilisation de l'acide 2,6-diméthylphénylboronique ne permet pas d'observer la formation du produit de couplage, ceci pourrait être expliqué par un problème d'encombrement stérique puisque la réaction de couplage avec l'acide 3,5-diméthylphénylboronique aboutit à l'obtention du dérivé (63) avec un rendement de 68% confirmant cette hypothèse. Ce couplage autorise aussi l'emploi de

l'ester pinacolique de l'acide 4-pyridylboronique permettant d'isoler le composé (**65**) avec un rendement de 55% malgré un temps de réaction prolongé. Nous avons également essayé d'introduire le noyau furane sur cet hétérocycle ; malheureusement, la réaction aboutit à une dégradation du milieu réactionnel après 10 h de chauffage.

#### b) Par couplage de Buchwald-Hartwig

En se basant sur le succès du couplage de Suzuki réalisé sur le composé iodé (**55**), nous avons envisagé d'étendre cette méthodologie et d'étudier la réactivité de cet intermédiaire au travers de couplages de type Buchwald-Hartwig.

Dans un premier temps, nous avons examiné la réaction de couplage entre ce composé dihalogéné (**55**) et le 4-méthoxybenzamide, faible nucléophile, en s'appuyant sur une procédure développée par Buchwald<sup>235</sup> (formation de la liaison C-N par réaction entre des halogénures d'aryles et des amides) et adaptée par Messaoudi *et al.*<sup>236</sup> pour la préparation d'aminoquinoléin-2(1*H*)-ones fonctionnalisées en position 3 (**Schéma 29**). Malheureusement, en utilisant le système catalytique Pd(OAc)<sub>2</sub> / Xantphos avec du carbonate de césium au reflux du 1,4-dioxane, aucune réaction n'a lieu (**Tableau 13, essai 1**). Le changement de Pd(OAc)<sub>2</sub> par Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (essai 2) ou l'utilisation d'autres ligands bidentates de type phosphine tel que le BINAP (essai 3) ne permettent pas d'isoler le produit désiré, de même que l'emploi de la base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (essai 4). Finalement, aucun couplage n'a lieu quand l'aniline, plus nucléophile, est utilisée (essai 5).

Par la suite, nous avons décidé de remplacer le précurseur iodé (**55**) par le dérivé bromé (**54**). Historiquement, plusieurs travaux ont reporté que les iodures d'aryles étaient de moins bons substrats que leurs analogues bromés dans des réactions d'aminations palladocatalysées avec des différences notables de réactivité.<sup>237,238,239</sup> Nous avons ainsi été ravis de constater que la 3-bromo-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one (**54**) pouvait être couplée avec le 4-méthoxybenzamide dans un système Pd(OAc)<sub>2</sub> / Xantphos en présence de carbonate de césium au reflux du 1,4-dioxane (essai 6). Après 1 h de chauffage, l'amide (**9**) est isolé avec 81% de rendement. Un second essai avec l'aniline permet aussi d'isolement du dérivé souhaité (**66**) avec un bon rendement de 84% (essai 7). À la vue des résultats, ce sont ces conditions qui ont été utilisées pour permettre le couplage d'une série d'amines aliphatiques et aromatiques ainsi que certains amides.

<sup>235</sup> Yin, J.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1101-1104.

<sup>236</sup> Messaoudi, S. *et al.*, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10202-10210.

<sup>237</sup> Bolm, C.; Hildebrand, J. P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 169-175.

<sup>238</sup> Ali, M. H.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2560-2565.

<sup>239</sup> Smith, J. A. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8880-8892.

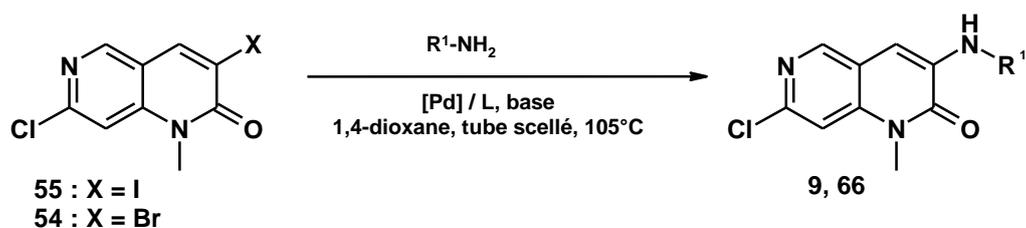


Schéma 29 : Schéma réactionnel des essais de couplage de Buchwald-Hartwig en position 3.

Essai	X	R <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	Système catalytique	Base	Temps de réaction	Rendement
1	I		Pd(OAc) <sub>2</sub> /Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 h	pas de réaction
2	I		Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> /Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 h	pas de réaction
3	I		Pd(OAc) <sub>2</sub> /BINAP	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 h	pas de réaction
4	I		Pd(OAc) <sub>2</sub> /Xantphos	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 h	pas de réaction
5	I		Pd(OAc) <sub>2</sub> /Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 h	pas de réaction
6	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> /Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 h	81%, produit <b>9</b>
7	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> /Xantphos	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 h	84%, produit <b>66</b>

Tableau 13 : Mise au point des conditions réactionnelles pour le couplage de Buchwald-Hartwig en position 3.

Une variété de 3-(*N*-alkyl)- et 3-(*N*-aryl)-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones a été synthétisée avec des rendements modestes à très bons (Schéma 30, tableau 14). Le couplage est fonctionnel avec des amines aliphatiques primaires et secondaires associé à des temps de chauffage raisonnables de 2 à 4 h (produits (67)-(69)). Les composés (68) et (69) sont isolés avec de très bons rendements (87% et 83% respectivement) tandis que le composé (67) est obtenu avec seulement 29% de rendement dû à des difficultés de purification. Le couplage a ensuite été réalisé avec trois amines aromatiques. Les dérivés (66) et (70) ont été obtenus avec

de très bons rendements de 84% et 81% respectivement, cependant le couplage avec la 4-chloroaniline n'a permis d'obtenir le produit de couplage qu'avec un rendement de 44%.

Cette amination palladocatalysée de Buchwald-Hartwig a aussi offert une seconde voie d'accès à deux amides analogues de la novobiocine. Le rendement du produit (**6**) reste inférieur (49%) à celui obtenu par réaction entre le chlorure d'acétyle et la 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one (**5**) (63%), mais le produit reste cependant plus facile à purifier par cette voie. Les rendements observés pour le produit (**9**) sont eux comparables (81% par couplage contre 76% par la méthode au chlorure d'acide).

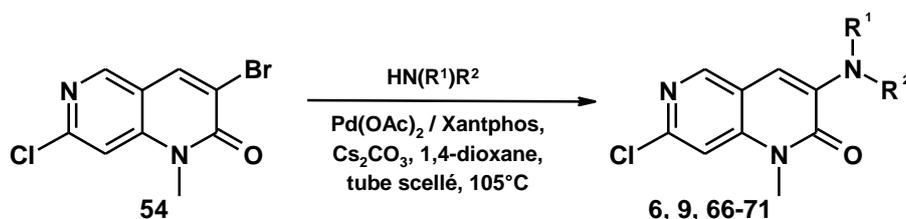


Schéma 30 : Couplages de Buchwald-Hartwig en position 3 selon la procédure G.

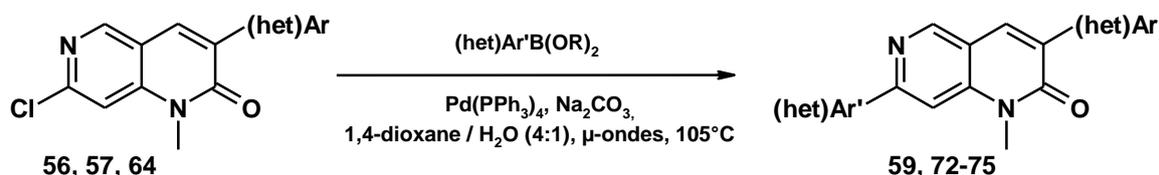
Produit	HN(R <sup>1</sup> )R <sup>2</sup>	Temps de réaction	N(R <sup>1</sup> )R <sup>2</sup>	Rendement (%)
67	<chem>NCCC</chem>	3.5 h	<chem>CNCCC</chem>	29
68	<chem>NCCc1ccccc1</chem>	4 h	<chem>CNCCc1ccccc1</chem>	87
69	<chem>C1CCNCC1</chem>	2 h	<chem>C1CCN(C1)C2=CC=CC=C2</chem>	83
66	<chem>Nc1ccccc1</chem>	1 h	<chem>CNc1ccccc1</chem>	84
70	<chem>Nc1ccc(OC)cc1</chem>	1 h	<chem>CNc1ccc(OC)cc1</chem>	81
71	<chem>Nc1ccc(Cl)cc1</chem>	1 h	<chem>CNc1ccc(Cl)cc1</chem>	44
6	<chem>CC(=O)N</chem>	1.5 h	<chem>CC(=O)Nc1ccccc1</chem>	49
9	<chem>CC(=O)Nc1ccc(OC)cc1</chem>	1 h	<chem>CC(=O)Nc1ccc(OC)cc1</chem>	81

Tableau 14 : Synthèse des produits 66 à 71.

## 4 - Accès aux 1,6-naphtyridin-2(1H)-ones 3,7-disubstituées

## a) Par couplage de Suzuki-Miyaura sur les 3-aryl-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones

Les premiers essais de couplages de Suzuki sur le dérivé bromé (**54**) ont mis en avant la labilité de l'atome de chlore. Nous avons ainsi considéré que les conditions de couplage décrites précédemment pouvaient être exploitées à partir des intermédiaires chlorés arylés en 3 pour fonctionnaliser la position 7. Un premier essai (non représenté ici) réalisé sur la 7-chloro-3-phényl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**56**) en présence d'acide phénylboronique, de palladium tétrakis(triphénylphosphine) et de carbonate de sodium dans un mélange 1,4-dioxane / H<sub>2</sub>O (4:1) en tube scellé à 105°C pendant 72 h résulte en une conversion incomplète. Environ 50% du produit de départ est retrouvé en analyse UPLC-MS, le reste correspondant à des produits de dégradation. Ces résultats nous ont ainsi conduits à explorer l'utilisation du chauffage micro-ondes afin d'accélérer la conversion (**Schéma 31**, **tableau 15**).



**Schéma 31** : Schéma réactionnel des couplages de Suzuki-Miyaura en position 7 sur les 3-aryl-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones selon la procédure H.

La réaction de la 7-chloro-3-phényl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**56**) avec l'acide phénylboronique nous a permis d'isoler le dérivé 3,7-diarylé (**59**) avec un rendement de 69% après 2 h de chauffage. La nature des substituants sur les acides boroniques a ensuite été investiguée. Dans les deux cas de figure, que les groupements soient de type électrodonneur ou électroattracteur, tous les acides boroniques réagissent de manière similaire pour donner les produits de couplages en 1 h avec des rendements de bons à très bons (61% à 92%). Le couplage réalisé avec l'ester pinacolique de l'acide 4-pyridylboronique a été plus efficace en position 7 qu'en position 3 (**tableau 12**, produit (**65**)). Le temps de chauffage a été raccourci et le rendement amélioré.

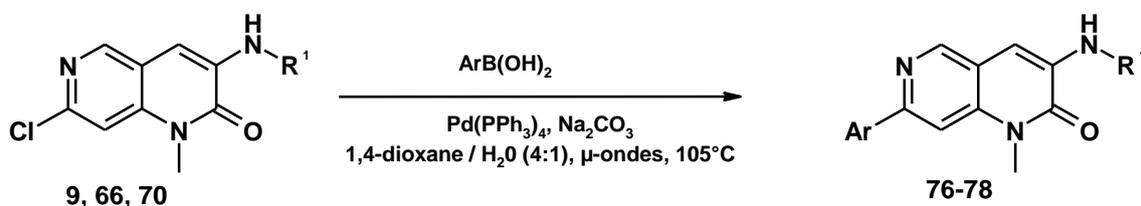
Produit	(het)Ar'B(OR) <sub>2</sub>	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
59		2 h		69

72		1 h		61
73		1 h		81
74		1 h		78
75		1 h		92

Tableau 15 : Synthèse des produits 59 et 72 à 75.

b) Par couplage de Suzuki-Miyaura sur les 7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones 3-N-substituées

Les mêmes conditions ont ensuite été appliquées aux 7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones 3-N-substituées et ont permis d'isoler les produits de couplages correspondants (**Schéma 32, tableau 16**). Le couplage des composés (**66**) et (**70**) avec l'acide phénylboronique est réalisé en 1 h et conduit aux produits bisubstitués (**76**) et (**77**) avec des rendements respectifs de 53% et 71%. L'acide 4-cyanophénylboronique, déficient en électrons, réagit de manière similaire à l'acide phénylboronique pour donner le produit (**78**) après 1 h de chauffage avec 69% de rendement.



**Schéma 32** : Schéma réactionnel des couplages de Suzuki-Miyaura en position 7 sur les 7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones 3-N-substituées selon la procédure H.

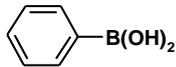
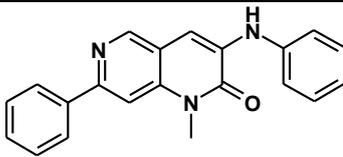
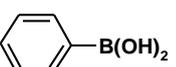
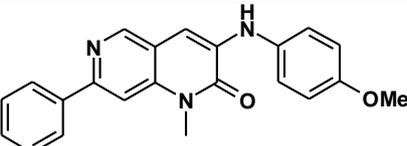
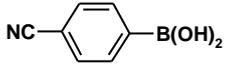
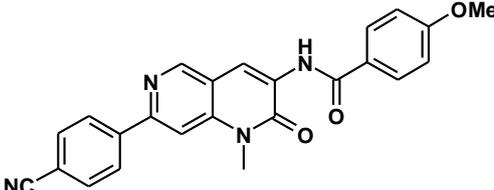
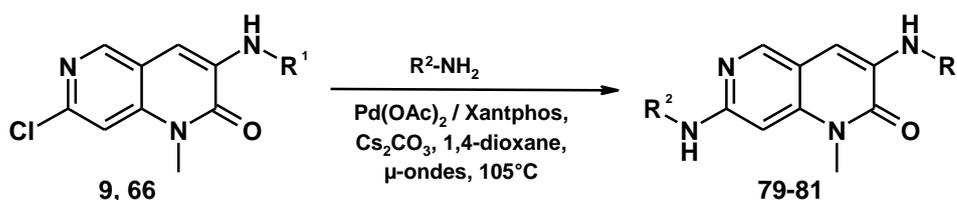
Produit	ArB(OH) <sub>2</sub>	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
76		1 h		53
77		1 h		71
78		1 h		69

Tableau 16 : Synthèse des produits 76 à 78.

c) Par couplage de Buchwald-Hartwig sur les 7-chloro-1,6-naphthyridin-2(1H)-ones 3-N-substituées

Le succès de ces couplages de Suzuki réalisés en position 7 sur les 7-chloro-1,6-naphthyridin-2(1H)-ones 3-N-substituées nous a amené à considérer qu'une seconde amination palladocatalysée de type Buchwald-Hartwig pouvait être réalisée en position 7 sur ces intermédiaires en adaptant les conditions décrites pour la fonctionnalisation en 3 de l'analogue bromé (**54**) et en les transposant sous irradiations micro-ondes (**Schéma 33**, **tableau 17**).



**Schéma 33** : Schéma réactionnel des couplages de Buchwald-Hartwig en position 7 sur les 7-chloro-1,6-naphthyridin-2(1H)-ones 3-N-substituées selon la procédure I.

Produit	R <sup>2</sup> -NH <sub>2</sub>	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
79		2 h		69
80		1 h		57
81		0.5 h		55

Tableau 17 : Synthèse des produits 79 à 81.

La réaction de la 3-anilino-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one (**66**) avec l'aniline et la *p*-anisidine permettent d'obtenir les 3,7-(*N,N'*-diaryl)-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones (**79**) et (**80**) avec respectivement 69% et 57% de rendements, bien que l'emploi de 15% de Pd(OAc)<sub>2</sub> et de 15% de Xantphos aient été nécessaires pour observer une conversion complète. Le dérivé (**81**) a lui été isolé avec un rendement acceptable de 55% en un temps plus court.

Nous avons aussi essayé d'inclure une amine primaire aliphatique sous ces conditions de Buchwald, malheureusement aucune trace du composé désiré n'a pu être observée après 4 h de chauffage micro-ondes. La réaction a finalement été réalisée par une réaction de type Ullmann utilisant un excès d'amine et du CuI (**Schéma 34**).

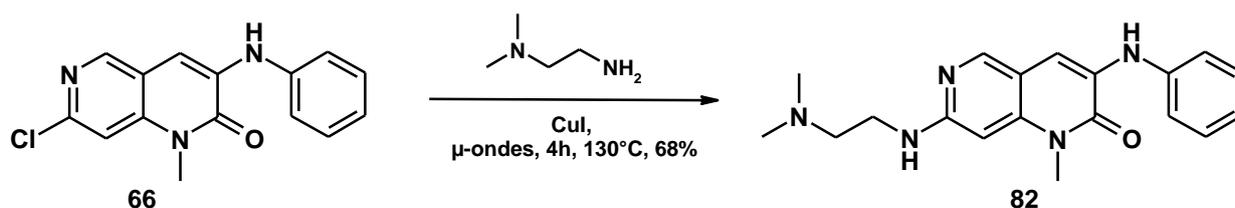


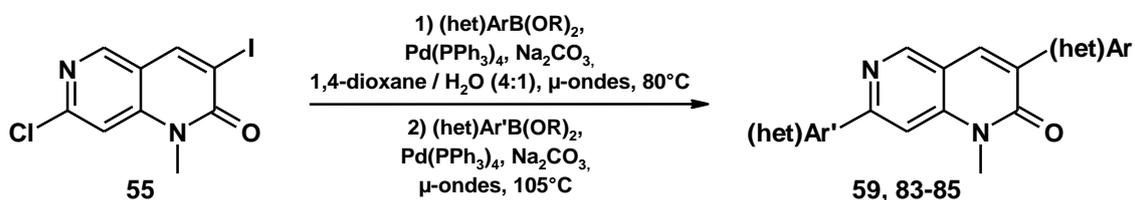
Schéma 34 : Synthèse du composé 82 par une réaction de type Ullmann.

### 5 - Accès aux 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones 3,7-disubstituées « one-pot »

Après avoir établi une voie d'accès intéressante pour la fonctionnalisation des 3,7-dihalogéno-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones (**54**) et (**55**), nous avons voulu réinvestiguer ces couplages séquentiels sous irradiation micro-ondes sans isoler l'intermédiaire fonctionnalisé en position 3. Des séquences « one-pot » incluant un couplage séquentiel de type Suzuki / Suzuki, Buchwald / Suzuki, Buchwald / Buchwald ou un enchaînement Buchwald / S<sub>N</sub>Ar, ont été réalisées soit à partir du dérivé iodé (**55**) pour le premier couplage séquentiel, soit à partir du dérivé bromé (**54**) pour les trois autres couplages. Ceux-ci présentent l'avantage d'offrir un

accès rapide à des 3,7-di(amino)(het)aryl-1,6-naphtyridin-2(1H)-ones hautement fonctionnalisées.

a) Par couplage séquentiel de type Suzuki / Suzuki



**Schéma 35** : Couplage séquentiel de type Suzuki / Suzuki sur la 7-chloro-3-iodo-1,6-naphtyridin-2(1H)-one **55** selon la procédure J.

Au cours d'une première étape, la 7-chloro-3-iodo-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**55**) est mise en réaction avec un équivalent d'acide phénylboronique selon les conditions établies précédemment (page 76, **tableau 12**). Puis, après contrôle de la formation de la 7-chloro-3-phényl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**56**) par analyse UPLC-MS, un second équivalent d'acide phénylboronique est ajouté au milieu réactionnel ainsi que du palladium tétrakis(triphénylphosphine) (5 mol %) et du carbonate de sodium. La réaction est alors chauffée sous irradiation micro-ondes pendant 3 h et conduit à la 3,7-diphényl-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1H)-one (**59**) avec 58% de rendement global comparable à celui obtenu sur deux étapes (51%, produit (**56**), **tableau 12** et produit (**59**) page 81, **tableau 15**).

Le couplage employant l'acide 3-fluorophénylboronique puis l'acide 4-méthoxyphénylboronique a permis d'isoler le composé (**83**) avec un bon rendement de 55%. Enfin, les réactions avec les acides boroniques hétérocycliques suivants : l'ester pinacolique de l'acide 4-pyridylboronique et l'acide 2-thiénylboronique, aboutissent à l'obtention des composés (**84**) et (**85**) avec respectivement 32% et 33% de rendement.

Globalement, cette approche « one-pot » a permis de préparer des dérivés 3,7-disubstitués avec des rendements comparables à ceux obtenus lors des synthèses en deux étapes et ont nécessité qu'une seule étape de purification.

Partie A : Travaux de synthèse

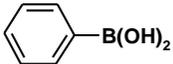
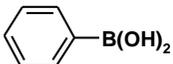
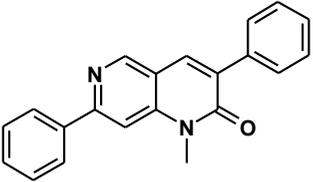
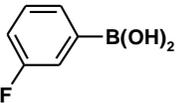
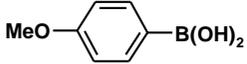
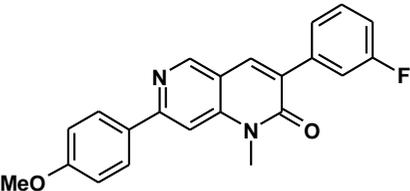
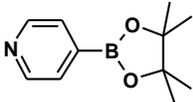
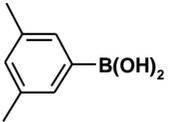
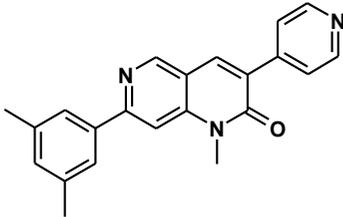
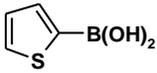
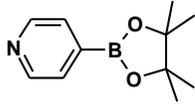
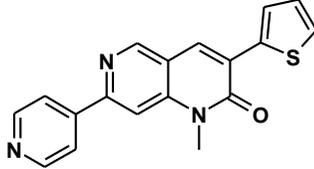
Produit	Étape 1 (het)ArB(OH) <sub>2</sub>	Temps de réaction	Étape 2 (het)ArB(OH) <sub>2</sub>	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
59		10 min		3 h		58
83		10 min		2 h		55
84		1.25 h		1.5 h		32
85		1.5 h		3.5 h		33

Tableau 18 : Synthèse des produits 59 et 83 à 85.

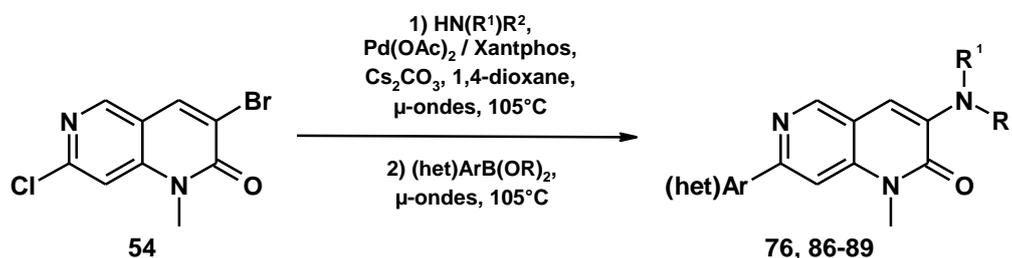
## b) Par couplage séquentiel de type Buchwald / Suzuki

Une seconde séquence « one-pot » de type Buchwald / Suzuki a permis d'isoler quatre nouveaux produits. Les conditions classiques de Buchwald ont été conservées dans la première étape. Il a été intéressant de constater que le couplage de Suzuki fonctionnait très bien en conservant le système catalytique de la première étape et permettait d'obtenir les produits souhaités avec de bons rendements.

Au cours d'une première réaction de couplage, l'aniline réagit avec le dérivé bromé (**54**) selon les conditions de Buchwald décrites précédemment (**tableau 14**). Un contrôle UPLC-MS est effectué à la fin de la première étape puis l'acide phénylboronique est ajouté au milieu réactionnel sans catalyseur supplémentaire. La réaction est chauffée 2 h à 105°C sous irradiation micro-ondes pour donner le produit (**76**) bifonctionnalisé avec un rendement de 61% meilleur que celui obtenu en deux étapes (45%, produit (**66**) page 79, **tableau 14** et produit (**76**) page 82, **tableau 16**).

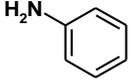
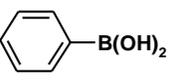
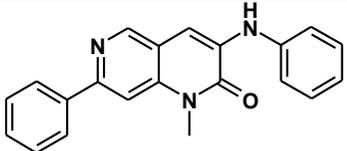
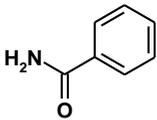
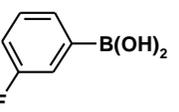
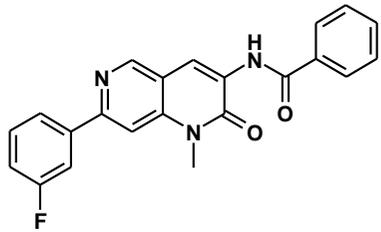
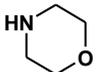
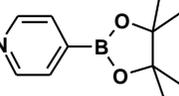
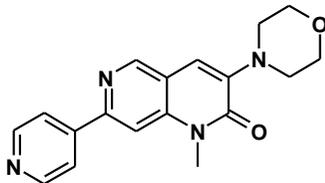
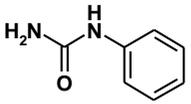
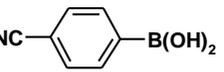
Une large variété de réactifs azotés a été utilisée au cours de la première étape. Tous se sont révélés être de bons agents pour le couplage et ont permis d'observer la formation des intermédiaires réactionnels entre 20 et 25 minutes exceptés pour la morpholine (2 h). La réaction mettant en jeu le benzamide puis l'acide 3-fluorophénylboronique a conduit à l'obtention de la 1,6-naphtyridinone (**86**) avec un rendement de 40%. La formation du dérivé (**87**) grâce à la morpholine et à l'ester pinacolique de l'acide 4-pyridylboronique a nécessité l'ajout de palladium tétrakis(triphénylphosphine) (5 mol %) pour permettre à la réaction d'arriver à son terme et d'isoler le produit avec 54% de rendement. Enfin les réactions avec l'acide 4-cyanophénylboronique et l'acide 3,5-diméthylphénylboronique ont permis de donner les produits (**88**) et (**89**) avec 62% de rendement chacun en ajoutant 10 % d'acétate de palladium et 10 % de Xantphos au début de la deuxième étape.

Là encore, la nature des groupements électroattracteurs et électrodonneurs n'a pas affecté la réactivité des acides boroniques engagés. Les rendements globaux obtenus avec cette procédure « one-pot » sont également comparables à ceux obtenus sur les synthèses en deux étapes.



**Schéma 36** : Couplage séquentiel de type Buchwald / Suzuki sur la 3-bromo-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1H)-one **54** selon la procédure K.

Partie A : Travaux de synthèse

Produit	Étape 1 HN(R <sup>1</sup> )R <sup>2</sup>	Temps de réaction	Étape 2 (het)ArB(OR) <sub>2</sub>	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
76		20 min		2 h		61
86		25 min		1 h		40
87		2 h		2 h		54
88		20 min		1.5 h		62

Partie A : Travaux de synthèse

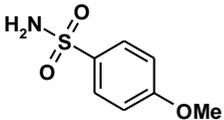
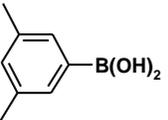
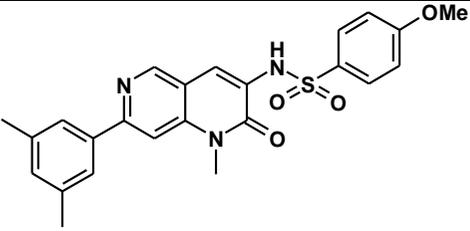
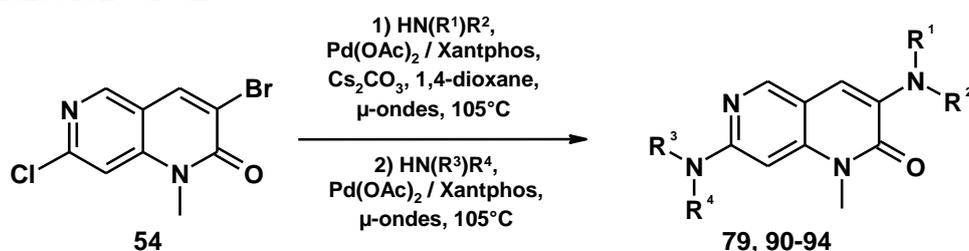
89		25 min		2 h		62%
----	---	--------	--	-----	---	-----

Tableau 19 : Synthèse des produits 76 et 86 à 89.

## c) Par couplage séquentiel de type Buchwald / Buchwald

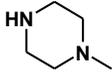
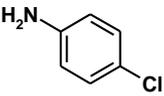
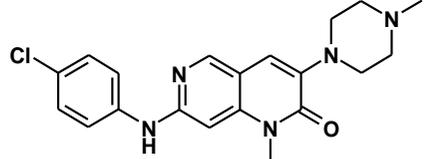
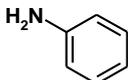
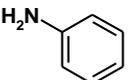
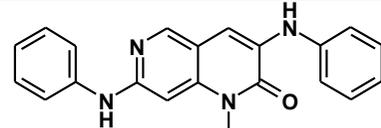
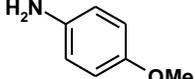
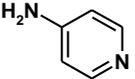
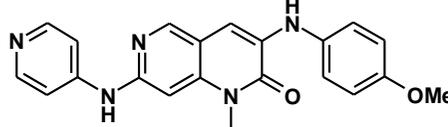
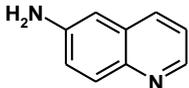
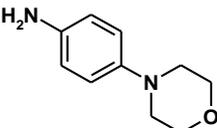
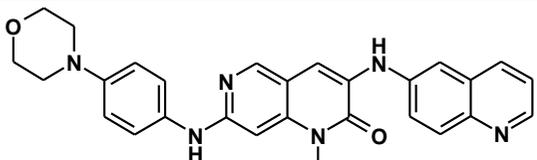
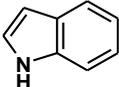
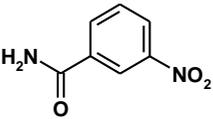
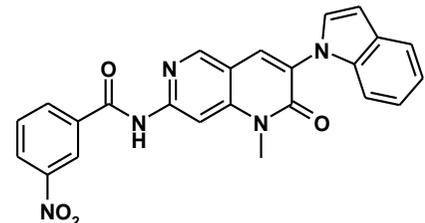
Une double amination séquentielle de Buchwald a ensuite été réalisée sur le dérivé bromé (**54**). Dans un premier essai, la 1-méthylpipérazine est couplée avec le composé dihalogéné (**54**). Puis, un équivalent de 4-chloroaniline est ajouté au sein du milieu réactionnel ainsi que 20 % d'acétate de palladium et 20 % de Xantphos après disparition complète du produit de départ (contrôlée par UPLC-MS). La réaction est chauffée sous micro-ondes à 105°C pendant 1.5 h et permet d'isoler le produit (**90**) avec un rendement de 36%. Le couplage a ensuite été poursuivi avec l'aniline. Après la formation de l'intermédiaire *N*-arylé, un second équivalent d'aniline est ajouté. Le milieu réactionnel est chauffé pendant 2 h à 105°C et donne la 3,7-dianilino-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one (**79**) avec un rendement global de 77%, meilleur que celui obtenu en deux étapes (58%, produit (**66**) page 79, **tableau 14** et produit (**79**) page 83, **tableau 17**). De manière générale, la première étape est réalisée en un temps court de 10 à 20 minutes quelque soit la nature du réactif azoté, excepté pour les couplages mettant en jeu la 1-méthylpipérazine et l'indole aboutissant à une conversion complète seulement au bout de 2.5 h. Concernant la seconde étape de couplage, une large variété de réactifs qu'ils soient riches ou pauvres en électrons ont été utilisés, mais aucune différence notable sur leur réactivité n'a été observée. Les produits de couplage ont ainsi été obtenus avec des rendements similaires (36-46%) en utilisant un temps de chauffage de 40 minutes à 1.5 h. Cependant le composé (**91**) a été isolé avec un rendement n'excédant pas 13% malgré une conversion complète observée par UPLC-MS. Pour chaque réaction, l'addition d'une quantité variable d'acétate de palladium et de Xantphos (10-30%) au début de la seconde étape a été nécessaire pour permettre une conversion complète de l'intermédiaire formé. Comme observé précédemment avec la *N,N*-diméthyléthylènediamine (**Schéma 34**), le couplage avec la 1-méthylpipérazine n'a pas été efficace, le milieu réactionnel devenant complexe.

Les amines aliphatiques se prêtant très mal aux couplages palladocatalysés de type Buchwald-Hartwig sur le chlore en position 7, une séquence alternative par substitution nucléophile aromatique a été envisagée pour permettre d'introduire ces motifs aminés. Comme nous l'avons vu précédemment avec les analogues de la novobiocine, le chlore possède un faible pouvoir nucléofuge et c'est seulement l'utilisation d'un large excès d'amine aliphatique qui a permis de le substituer. Ces conditions ont été ainsi reprises pour la fonctionnalisation suivante.



**Schéma 37** : Couplage séquentiel de type Buchwald / Buchwald sur la 3-bromo-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one **54** selon la procédure L.

Partie A : Travaux de synthèse

Produit	Étape 1 HN(R <sup>1</sup> )R <sup>2</sup>	Temps de réaction	Étape 2 HN(R <sup>3</sup> )R <sup>4</sup>	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
90		2.5 h		1.5 h		36
79		20 min		2 h		77
91		15 min		1.5 h		13
92		20 min		1.5 h		39
93		2.5 h		1.5 h		46

Partie A : Travaux de synthèse

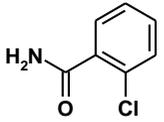
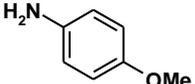
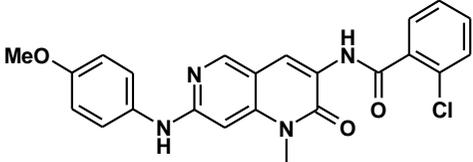
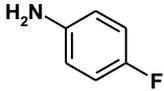
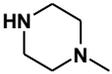
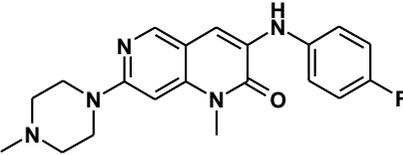
94		10 min		40 min		46
		10 min		1.5 h		-

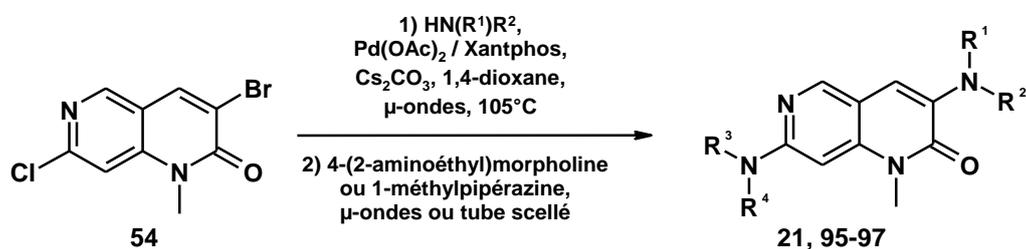
Tableau 20 : Synthèse des produits 79 et 90 à 94.

d) Par couplage de Buchwald-Hartwig puis par  $S_NAr$ 

Deux types de chauffage ont dû être utilisés afin de synthétiser les composés souhaités. Les produits (**21**) et (**95**) ont été obtenus par irradiation micro-ondes lors de la seconde étape tandis qu'un chauffage en tube scellé a été nécessaire pour les composés (**96**) et (**97**). Ces derniers n'aboutissant qu'à une dégradation du milieu réactionnel en chauffant sous micro-ondes. Il est possible que le motif 4-fluorophényle en position 3 de ces deux composés soit responsable de cette dégradation.

En partant du composé bromé (**54**), une première amination de Buchwald est réalisée en position 3 avec le 4-méthoxybenzamide. Après formation de l'intermédiaire *N*-arylé, un large excès de 4-(2-aminoéthyl)morpholine est ajouté puis le milieu réactionnel est chauffé sous irradiation micro-ondes à 150°C pendant 1 h. Malheureusement le produit (**21**) est obtenu avec un très faible rendement de 24%, la réaction résultant en un complexe réactionnel difficile à purifier. Les mêmes conditions sont utilisées avec la *p*-anisidine et permettent d'isoler le composé (**95**) avec un rendement encore plus faible de 9%. Enfin les 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones (**96**) et (**97**) ont été plus difficiles à obtenir, seul un temps de réaction prolongé (68-92 h) et un chauffage en tube scellé ont permis de les isoler avec de faibles rendements respectifs de 8% et 21%.

Cette dernière séquence « one-pot » a mis en avant la difficulté à substituer le chlore sur cette position et avec les conditions employées. Les couplages palladocatalysés en conditions de Buchwald n'ont pas permis d'introduire les amines aliphatiques désirées et seule une substitution nucléophile aromatique a permis de fonctionnaliser la position 7.



**Schéma 38** : Couplage de type Buchwald puis  $S_NAr$  sur la 3-bromo-7-chloro-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one **54** selon la procédure M.

Partie A : Travaux de synthèse

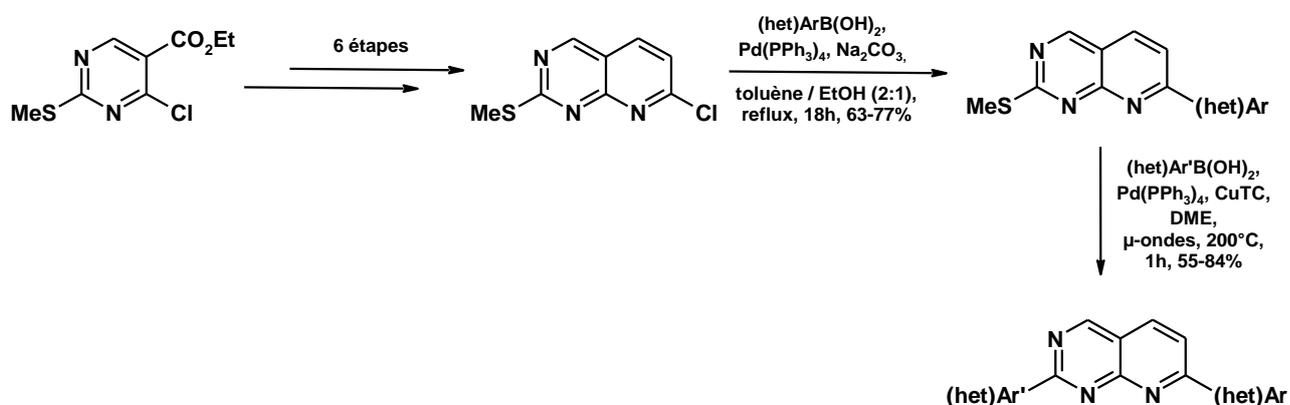
Produit	Étape 1 HN(R <sup>1</sup> )R <sup>2</sup>	Temps de réaction	Étape 2 Amine aliphatique	Temps de réaction	Structure	Rendement (%)
21		20 min		1 h (μ-ondes)		24
95		15 min		1 h (μ-ondes)		9
96		10 min		68 h (tube scellé)		8
97		10 min		92 h (tube scellé)		21

Tableau 21 : Synthèse des produits 21 et 95 à 97.

## 6 - Conclusion

Un nombre important de 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones originales substituées en positions 3 et 7 ont été synthétisées à partir de quatre séquences « one-pot » réalisées sur un précurseur 3,7-dihalogéné unique. Des séquences de type Suzuki / Suzuki, Buchwald / Suzuki, Buchwald / Buchwald et Buchwald /  $S_NAr$  ont permis d'accéder rapidement à un très large éventail de 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones hautement fonctionnalisées en exploitant la réactivité relativement flexible des composés dihalogénés. La première fonctionnalisation en position 3 est généralement réalisée en quelques minutes sous irradiations micro-ondes tandis que la substitution du chlore en position 7 du cycle pyridinique, peu décrite, requiert un chauffage plus long de quelques heures.

Une autre approche pourrait être envisagée pour faciliter le couplage sur cette position. L'introduction d'un groupement thiométhyle en position 7 sur le 6-chloro-4-méthylaminopyridine-3-carboxylate d'éthyle (**3**) par substitution du chlore pourrait permettre après formation du cycle 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one, l'accès à une 3-halogéno-7-thiométhyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one. Celle-ci pouvant par la suite être exploitée aux travers de couplages de type Liebeskind-Srogl. Ce couplage est réalisé sur un groupement thiométhyle ou sur un thioester avec un acide boronique, un catalyseur au palladium et un complexe de cuivre comme cofacteur. Il permet d'obtenir une sélectivité intéressante lors de couplages séquentiels « one-pot » d'acides boroniques sur des dérivés possédant un halogène et un thioester ou un thiométhyle.<sup>240,241,242</sup>



**Schéma 39** : Accès à des 2,7-(het)arylprido[2,3-*d*]pyrimidines par couplage de type Liebeskind-Srogl.<sup>242</sup>

<sup>240</sup> Liebeskind, L. S.; Srogl, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11260-11261.

<sup>241</sup> Kusturin, C. *et al.*, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4349-4352.

<sup>242</sup> Maingot, L. *et al.*, *Synlett* **2012**, *23*, 2449-2452.

## II - Synthèses en série 1,6-naphtyridin-4(1H)-one

### A - Aperçu bibliographique

#### 1 - Intérêt en chimie thérapeutique

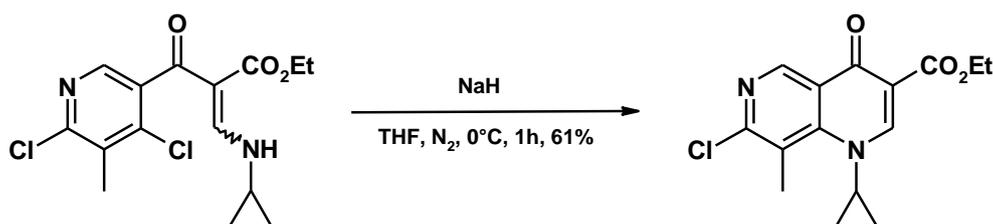
Les 1,6-naphtyridin-4(1H)-ones de part leur similarité avec la série précédente, partagent des propriétés biologiques communes. Elles sont majoritairement étudiées pour leur activité antibactérienne. A ce titre, on peut citer l'acide nalidixique connu pour ses propriétés antibiotiques et possédant un noyau 1,8-naphtyridin-4(1H)-one.<sup>243,244</sup> Des composés présentant une activité anti-VIH ont aussi été retrouvés dans cette famille. Ils agiraient par un mécanisme original d'inhibition de la protéine Tat contrôlant l'expression du virus et participant à sa dissémination.<sup>245,246</sup> Des activités immunosuppressives ont également été identifiées chez des représentants de cette famille, agonistes du récepteur S1P1 (Sphingosine 1 Phosphate receptor 1).<sup>247</sup>

#### 2 - Synthèse du noyau 1,6-naphtyridin-4(1H)-one

Deux voies d'accès peuvent être envisagées pour la synthèse de ce noyau et font toutes les deux intervenir une cyclisation intramoléculaire à partir d'un noyau pyridinique.

##### a) Par fermeture de la liaison 1-8a

En présence d'hydruure de sodium à 0°C dans le THF, la 2,4-dichloro-5-(3-cyclopropylamino-2-éthoxycarbonylacryloyl)-3-méthylpyridine peut se cycliser en 7-chloro-1-cyclopropyl-8-méthyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridin-3-carboxylate d'éthyle par substitution nucléophile du chlore en position 4 par l'amine.<sup>244</sup>



**Schéma 40** : Accès au 7-chloro-1-cyclopropyl-8-méthyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridin-3-carboxylate d'éthyle.<sup>244</sup>

<sup>243</sup> Sanchez, J. P.; Gogliotti, R. D. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, 30, 855-859.

<sup>244</sup> Sabatini, S. *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.* **1999**, 36, 953-957.

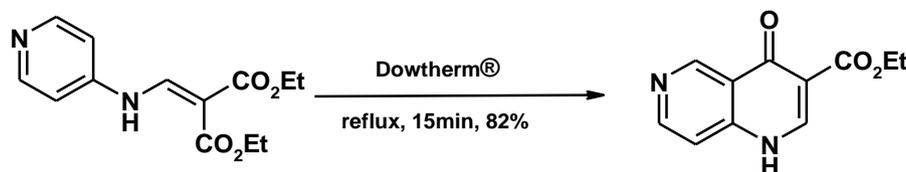
<sup>245</sup> Tabarrini, O. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5567-5578.

<sup>246</sup> Platts, M. Y. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 512-514.

<sup>247</sup> Harrington, P. E. *et al.* *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 74-78.

## b) Par fermeture de la liaison 4-4a

À haute température, la 4-(2,2-diéthoxycarbonylvinylamino)pyridine peut se réarranger en 4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridin-3-carboxylate d'éthyle. Le doublet de l'azote extracyclique se délocalise grâce à son effet donneur sein du cycle pyridinique aboutissant à une attaque nucléophile sur un des deux esters.<sup>248</sup>



**Schéma 41** : Accès au 4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridin-3-carboxylate d'éthyle.<sup>248</sup>

La réactivité du noyau 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one est très peu décrite. De façon générale, les fonctions chimiques nécessaires sont introduites au fur et à mesure de la construction de l'hétérocycle azoté.

### B - Stratégie de synthèse

Au regard des travaux précédents développés en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one, des structures analogues s'appuyant sur un squelette de type 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one sont envisagées. L'idée étant d'incorporer sur ce nouvel hétérocycle les motifs chimiques de la première série ayant montré une bonne activité sur la Hsp90 ainsi que sur lignée cellulaire.

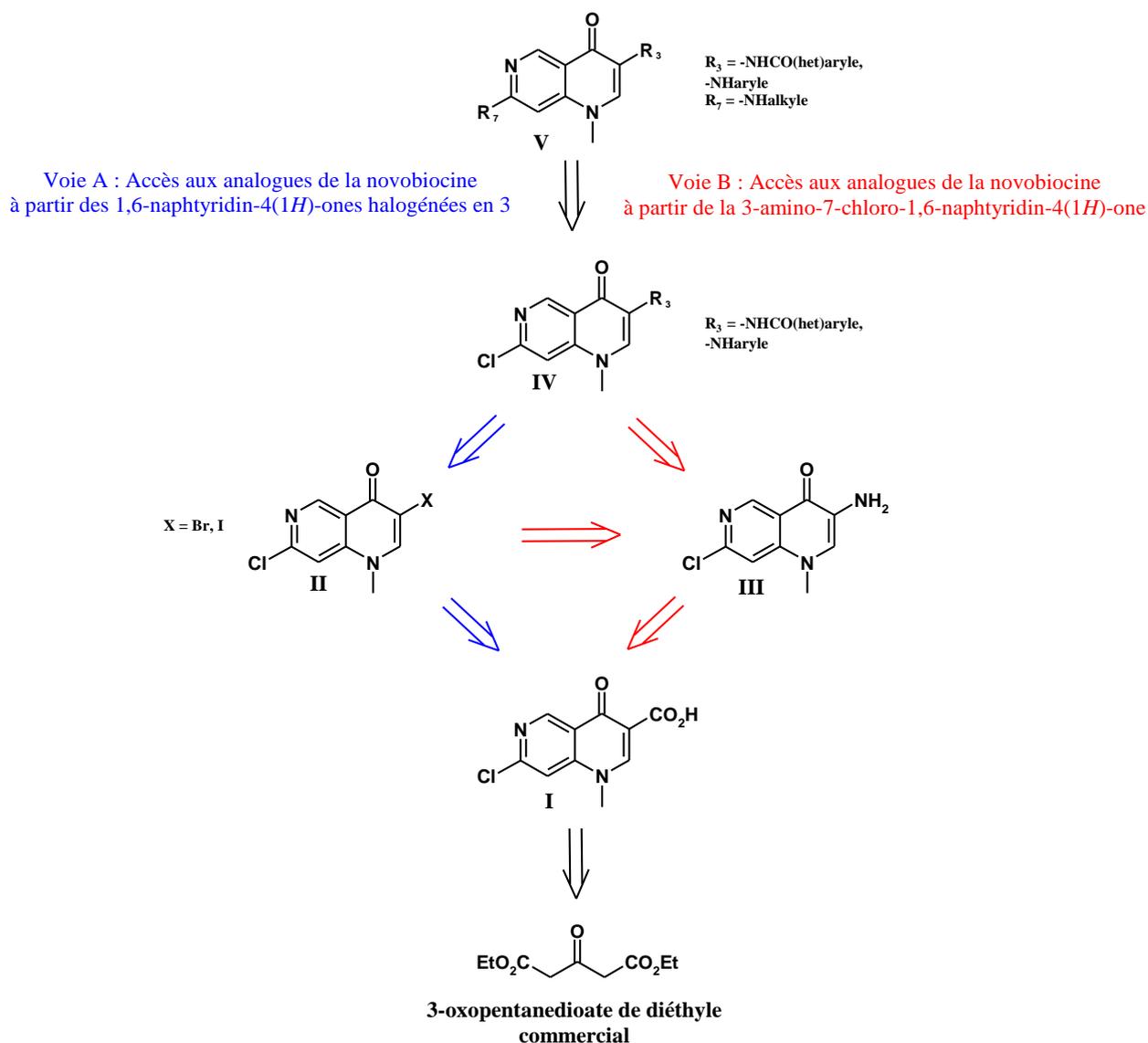
L'accès aux molécules cibles peut s'envisager selon l'approche rétrosynthétique présentée sur le **schéma 42**. Pour accéder aux 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-ones bifonctionnalisées **V**, nous avons voulu adapter la voie de synthèse précédemment décrite en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one à partir du 3-oxopentanedioate de diéthyle commercial. L'acide en 3 considéré comme l'intermédiaire clé **I**, est synthétisé en cinq étapes à partir du diester commercial.

Les analogues de la novobiocine **V** sont envisagés en trois étapes selon deux approches différentes. La voie A s'appuie sur les réactions palladocatalysées développées précédemment sur les précurseurs dihalogénés en positions 3 puis 7. L'halogène en 3 étant formé par halogénodécarboxylation de l'acide **I**.

Les molécules cibles **V** peuvent être synthétisées selon la voie B par fonctionnalisation de la position 7 par une amine aliphatique après réaction d'amidification sur la position 3 de l'hétérocycle. L'amine **III** peut être obtenue soit à partir du dérivé dihalogéné **II**, soit après hydrolyse et réarrangement de Curtius de l'acide **I**.

<sup>248</sup> Hauser, C. R.; Reynolds, G. A. *J. Org. Chem.* **1950**, *15*, 1224-1232.

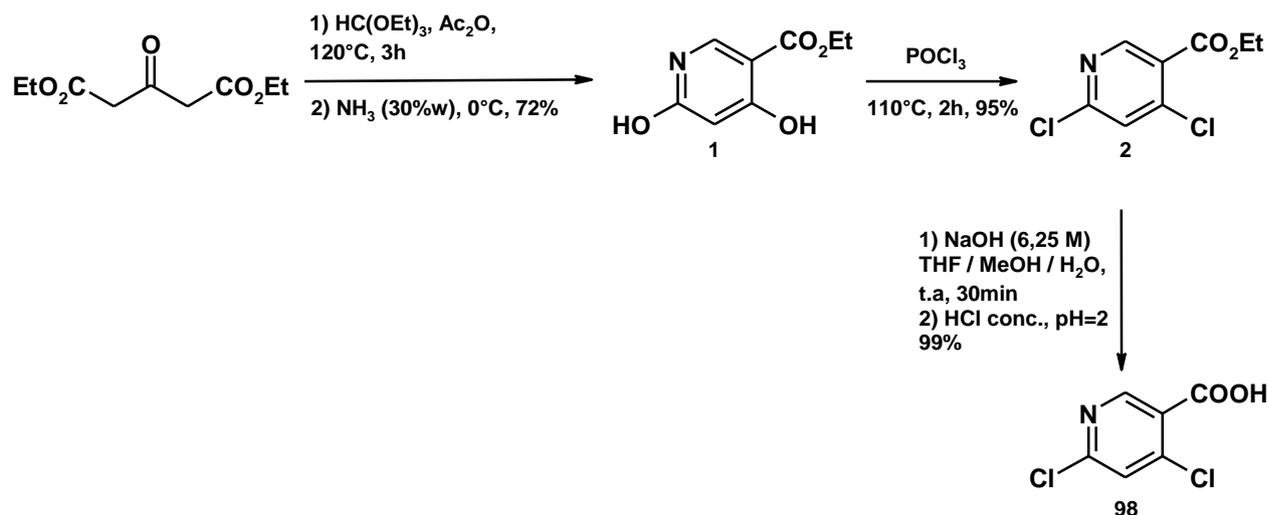
Partie A : Travaux de synthèse



**Schéma 42 :** Schéma rétrosynthétique menant aux 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-ones disubstituées **V**.

**C - Synthèse de l'acide 7-chloro-1-méthyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridine-3-carboxylique**

Les deux premières étapes de la synthèse entreprises à partir du 3-oxopentanedioate de diéthyle sont identiques à celle réalisées en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one. La synthèse débute par la construction du cycle pyridinique en condensant le 3-oxopentanedioate de diéthyle avec l'orthoformiate de triéthyle. L'ajout d'ammoniaque au milieu réactionnel donne après cyclisation l'ester (**1**) avec 72% de rendement. Puis la chloration au reflux de l'oxychlorure de phosphore suivie de la saponification par l'hydroxyde de sodium permettent l'obtention de l'acide (**98**) avec de bons rendements (**Schéma 43**).

Schéma 43 : Accès à l'acide 4,6-dichloronicotinique **98**.

En s'appuyant sur les données de la bibliographie précédemment décrite (page 95, paragraphe **II-A-2-a**), l'accès aux molécules cibles est ensuite envisagé par fermeture de la liaison 1-8a. La préparation du chlorure d'acide est effectuée à l'aide du chlorure de thionyle, non isolé il est engagé en réaction avec le 3-(diméthylamino)acrylate d'éthyle en présence de triéthylamine dans le THF et permet d'aboutir à l'énaminoate (**99**) avec un bon rendement. Ce dernier réagit ensuite avec la méthylamine et donne après cyclisation en conditions basiques l'ester (**100**) avec un rendement de 67%.<sup>245,246</sup> De manière différente à la réaction réalisée en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one, le mécanisme réactionnel passe ici par une substitution nucléophile du motif diméthylamine par la méthylamine selon une addition de Michael. Puis, la réaction évolue favorablement vers la cyclisation permettant d'isoler le composé (**100**). Finalement l'hydrolyse basique de l'ester permet d'isoler l'acide (**101**) avec 94% de rendement.<sup>247</sup>

Des difficultés ont été rencontrées pour isoler l'ester (**100**). En effet une conversion de celui-ci en acide (observée en faibles proportions en UPLC-MS) a lieu lors de la réaction de cyclisation, rendant délicate l'étape de purification de l'ester et affectant le rendement.

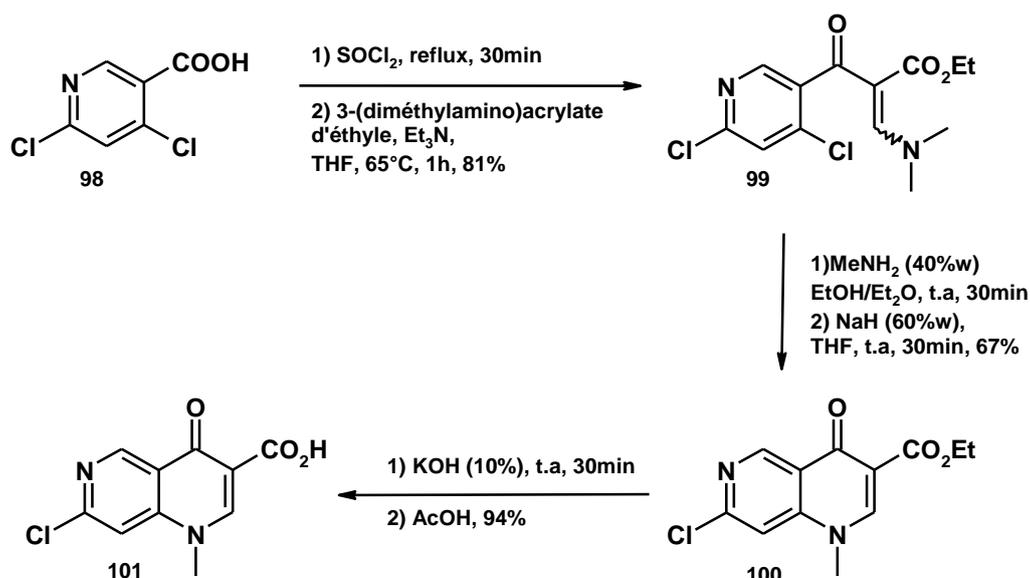


Schéma 44 : Accès à l'acide **101** à partir de l'acide **98**.

Pour s'affranchir de ces difficultés, la dernière étape d'hydrolyse basique a été réalisée à la suite de la formation de l'ester sans isoler celui-ci. L'acide 7-chloro-1-méthyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphtyridine-3-carboxylique (**101**) est ainsi obtenu avec un rendement global de 74%.

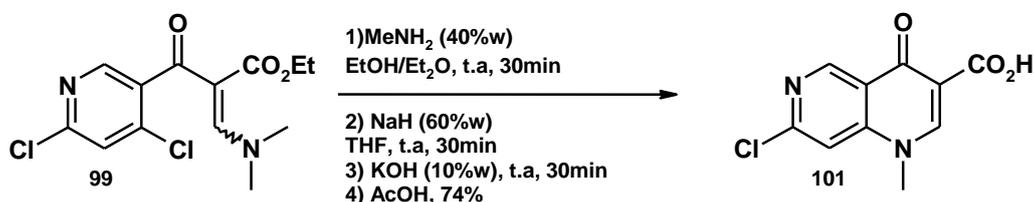
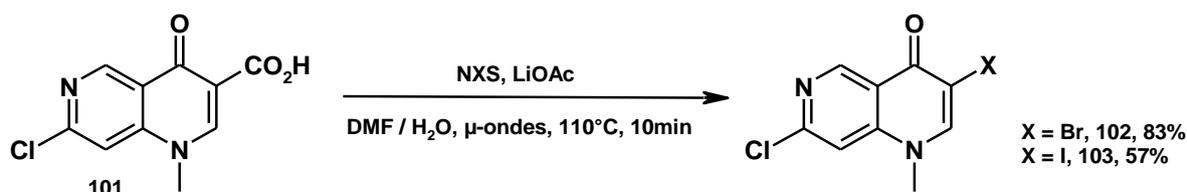


Schéma 45 : Accès à l'acide **101** à partir de l'énaminoate **99**.

## D - Accès aux analogues de la novobiocine à partir des 1,6-naphtyridin-4(1H)-ones halogénées en 3 (Voie A)

### 1 - Synthèse des 7-chloro-3-halogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-4(1H)-ones

En appliquant les conditions décrites précédemment en série 1,6-naphtyridin-2(1H)-one pour l'accès aux analogues bromés et iodés (**54**) et (**55**), une réaction d'halogénéodécarboxylation de l'acide (**101**) en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) ou de *N*-iodosuccinimide (NIS) a conduit aux composés dihalogénés (**102**) et (**103**) correspondants avec respectivement 83% et 57% de rendements. (Schéma 46).

Schéma 46 : Halogénodécarboxylation de l'acide **101** selon la procédure E.

## 2 - Synthèse d'amines et d'amides dérivés de la 7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-4(1H)-one

### a) Par couplage palladocatalysé de type Buchwald-Hartwig

Profitant de notre expérience précédente (page 78, schéma 29, tableau 13), une amination de type Buchwald-Hartwig sur le dérivé bromé (**102**) a été entreprise à l'aide d'acétate de palladium (5 mol %), de Xantphos (5 mol %), et de carbonate de césium à 105°C dans le dioxane. Après 48 h de chauffage en tube scellé le produit correspondant est isolé avec 27% de rendement (essai 1, tableau 22). Une transposition sous irradiations micro-ondes ou un changement de ligand ne permet pas d'observer la disparition du produit de départ (essais 2 et 3). L'utilisation de tris(dibenzylidène acétone) dipalladium comme ligand autorise aussi l'accès au produit correspondant malgré un long temps de chauffage (essai 4). Finalement après plusieurs essais de mise au point sur l'ajustement des quantités du système Pd(OAc)<sub>2</sub> / Xantphos (non représentés ici), c'est l'utilisation de 15 % du catalyseur et du ligand qui nous a permis d'isoler avec un temps de chauffage raisonnable, l'amide correspondant avec un rendement acceptable de 54% (essai 5). Malgré une réduction du temps de chauffage, le rendement s'est avéré être plus faible lors du passage sous micro-ondes (essai 6). Le couplage a également pu être réalisé avec la *p*-anisidine et a donné l'amine correspondante avec 36% de rendement. Enfin un essai avec la 7-chloro-3-iodo-1-méthyl-1,6-naphtyridin-4(1H)-one (**103**) conduit à la dégradation du milieu réactionnel (essai 8).

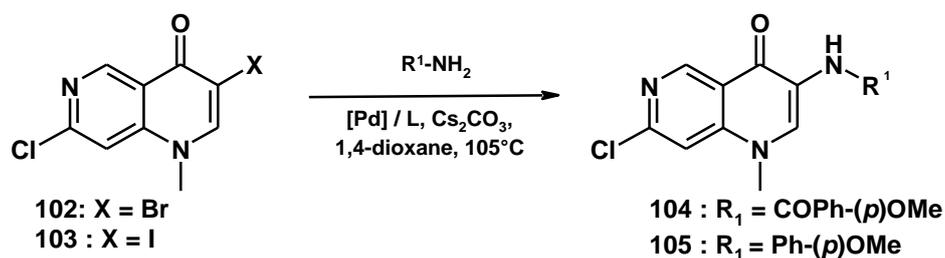


Schéma 47 : Schéma réactionnel des essais de couplage de Buchwald-Hartwig en position 3.

Essai	X	R <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	Catalyseur	Ligand	Conditions de chauffage	Rendement (%)
1	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> (5%)	Xantphos (5%)	tube scellé, 48 h	27
2	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> (5%)	Xantphos (5%)	μ-ondes, 1 h	pas de réaction
3	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> (5%)	BINAP (5%)	tube scellé, 48 h	pas de réaction
4	Br		Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (5%)	Xantphos (5%)	tube scellé, 96 h	30
5	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> (15%)	Xantphos (15%)	tube scellé, 2 h 30	54
6	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> (15%)	Xantphos (15%)	μ-ondes, 45 min	36
7	Br		Pd(OAc) <sub>2</sub> (15%)	Xantphos (15%)	tube scellé, 1 h	36
8	I		Pd(OAc) <sub>2</sub> (15%)	Xantphos (15%)	tube scellé, 48 h	dégradation

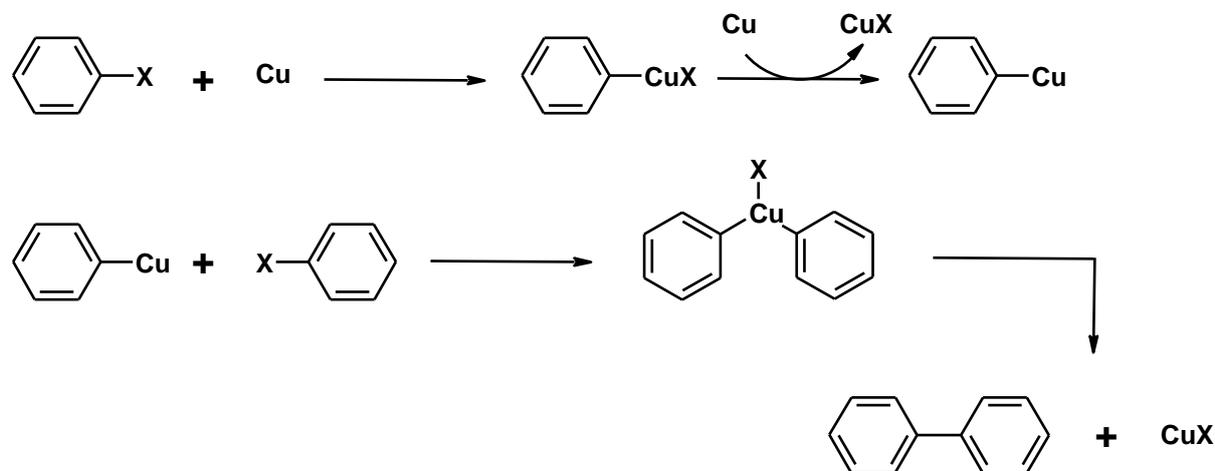
**Tableau 22** : Synthèse des composés **104** et **105** par couplage de Buchwald-Hartwig en position 3.

b) Par couplage cuprocatalysé de type Ullmann

À la vue des résultats décevants obtenus par réaction de Buchwald-Hartwig, un autre de type de couplage selon une réaction de type Ullmann a été envisagé afin d'introduire des amines et des amides.

La réaction d'Ullmann originale<sup>249</sup> a été décrite pour la synthèse de biaryles symétriques obtenus par homocouplage d'halogénures d'aryles en présence de cuivre en excès et à haute température (200°C). Une première étape d'addition oxydante va permettre au cuivre de s'insérer dans la liaison carbone-halogène et de passer sous la forme de cuivre (II) puis d'être réduit en cuivre (I). L'organocuprate ainsi obtenu va pouvoir s'insérer à son tour dans la liaison carbone-halogène d'un autre halogénure d'aryle et s'oxyder en cuivre (III). Une

élimination réductrice s'ensuit et permet la formation de la liaison carbone-carbone du biaryle (**Schéma 48**).



**Schéma 48** : Cycle catalytique du couplage d'Ullmann.

Outre la création de la liaison carbone-carbone, la réaction d'Ullmann a connu de nombreuses modifications et a été adaptée pour permettre la formation de liaisons carbone-hétéroatome. Le nucléophile utilisé pour piéger le cuprate intermédiaire est dans ce cas un alcool, un thiol, une amine ou un amide. L'une des premières modifications de la réaction d'Ullmann est la modification de Godlberg. Le nucléophile choisi est un amide et grâce à une combinaison appropriée d'un catalyseur au cuivre, d'un ligand aminé et d'une base, cela permet l'accès à des arylamides.<sup>250</sup> Depuis, de nombreux travaux ont été décrits dans la littérature<sup>251,252</sup> montrant bien l'intérêt de ce couplage pour la création de liaisons carbone-azote. Le mécanisme proposé inclut une séquence classique d'addition oxydante de l'halogénure d'aryle sur un catalyseur au cuivre, suivie d'une substitution nucléophile puis d'une élimination réductrice du produit de couplage (**Figure 34**). Ces ligands aminés agissent sous forme de « pinces chélatantes » permettant d'augmenter la densité électronique autour du cuivre et ainsi facilitant l'addition oxydante des halogénures d'aryles.<sup>253,254</sup>

<sup>249</sup> Ullmann, F.; Bielecki J. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1901**, 34, 2174-2185.

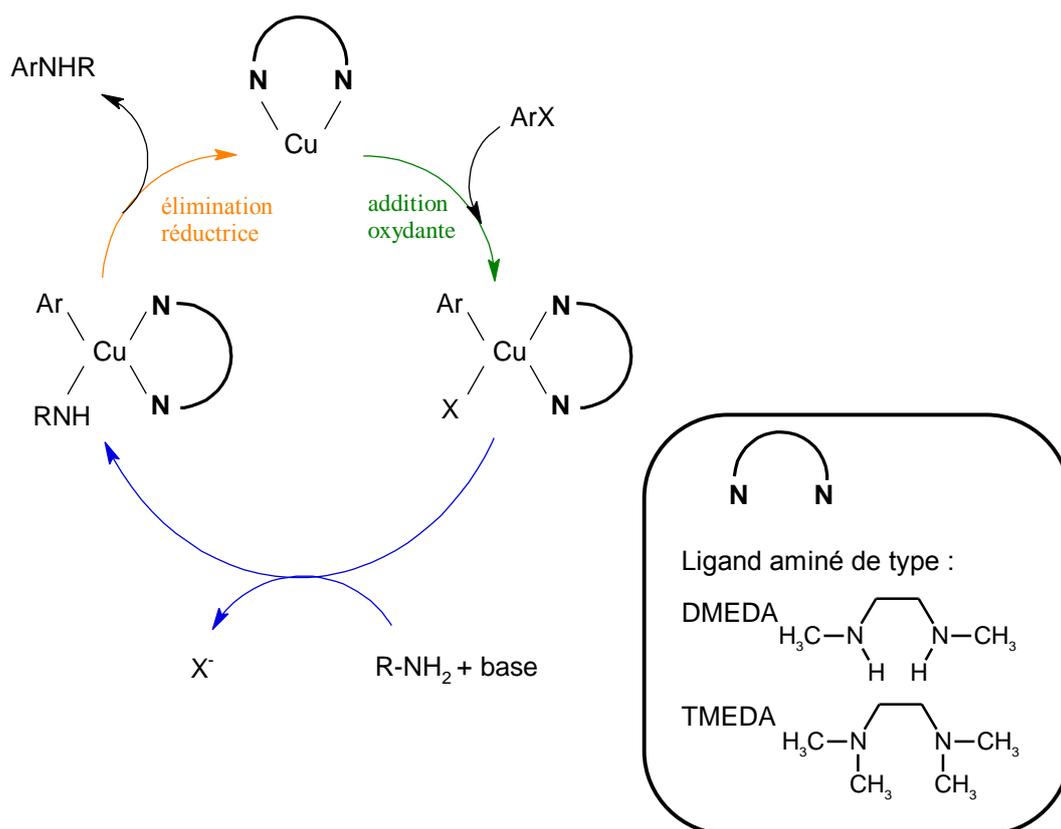
<sup>250</sup> Goldberg, I. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1906**, 39, 1691.

<sup>251</sup> Klapars, A. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7421.

<sup>252</sup> Audisio, D. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 4995-5005.

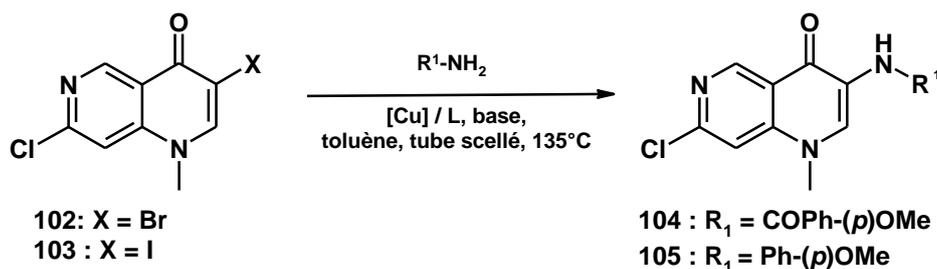
<sup>253</sup> Ouali, A. *et al.*, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1906-1916.

<sup>254</sup> Sperotto, E. *et al.*, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 10338-10351.



**Figure 34** : Cycle catalytique de l'amination selon une réaction de type Ullmann.

Ce type de réaction a été appliqué à nos dérivés halogénés (**102**) et (**103**) selon les conditions décrites dans la publication d'Audisio *et al.*<sup>252</sup> Malheureusement celles-ci se sont révélées infructueuses. Un premier essai en présence du dérivé bromé, du 4-méthoxybenzamide, de cuivre métallique, de DMEDA et de carbonate de potassium à 135°C en tube scellé dans le toluène ne permet d'observer qu'une faible conversion du produit de départ (**Tableau 23**, essai 1). De même, un changement de catalyseur (essai 2), de ligand aminé (essai 3), de base (essai 4), ou de réactif azoté (essai 5), ne donne au mieux qu'une faible conversion du produit de départ. Lorsque le substrat bromé (**102**) est remplacé par le dérivé iodé (**103**), le couplage est efficace et le produit (**104**) est isolé avec 48% de rendement seulement après 1 h 30 de chauffage (essai 6). En revanche, lorsque la réaction est conduite avec la *p*-anisidine, nous observons une dégradation du milieu réactionnel au bout de 20 h. Parmi les produits identifiés nous retrouvons 9% de produit de départ (détecté en UPLC-MS) et 21% du produit déshalogéné en position 3.



**Schéma 49** : Schéma réactionnel des essais de couplage de type Ullmann en position 3.

Essai	X	R <sup>1</sup> -NH <sub>2</sub>	Catalyseur	Ligand	Base	Conditions de chauffage	Rendement
1	Br		Cu (10%)	DMEDA (20%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 20 h	9% de conversion en UPLC-MS
2	Br		CuI (10%)	DMEDA (20%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 20 h	11% de conversion en UPLC-MS
3	Br		Cu (10%)	TMEDA (20%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 20 h	dégradation
4	Br		Cu (10%)	DMEDA (20%)	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 20 h	11% de conversion en UPLC-MS
5	Br		Cu (10%)	DMEDA (20%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 20 h	pas de conversion
6	I		Cu (10%)	DMEDA (20%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 1 h 30	48%
7	I		Cu (10%)	DMEDA (20%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	tube scellé, 20 h	dégradation

Tableau 23 : Essais de couplages en position 3 selon une réaction de type Ullmann.

### *E - Accès aux analogues de la novobiocine à partir de la 3-amino-7-chloro-1,6-naphtyridin-4(1H)-one (Voie B)*

Les essais de couplages réalisés à partir des précurseurs bromés (**102**) et iodés (**103**) n'ont pas permis de substituer l'halogène en position 3 de manière efficace par un amide ou une amine. La seconde stratégie envisagée a été de former l'amine primaire en 3 soit directement à partir de l'halogène, soit à de partir de l'acide carboxylique afin d'obtenir un azoture d'acyle pouvant être converti en amine *via* un réarrangement de Curtius. Celle-ci peut ensuite être additionnée sur un chlorure d'acide et la fonctionnalisation en position 7 par une amine aliphatique pourra alors être envisagée.

#### **1 - Par couplage avec la benzophénone imine puis clivage**

L'idée est de pouvoir coupler, par une amination de Buchwald-Hartwig, la benzophénone imine sur le précurseur bromé (**102**), puis de cliver l'imine en milieu basique pour libérer l'amine primaire. Trois essais de couplages ont été tentés sur le précurseur bromé

(102). Malheureusement, tous se sont soldés par une dégradation du milieu réactionnel après 1 h de chauffage (Schéma 50, tableau 24).

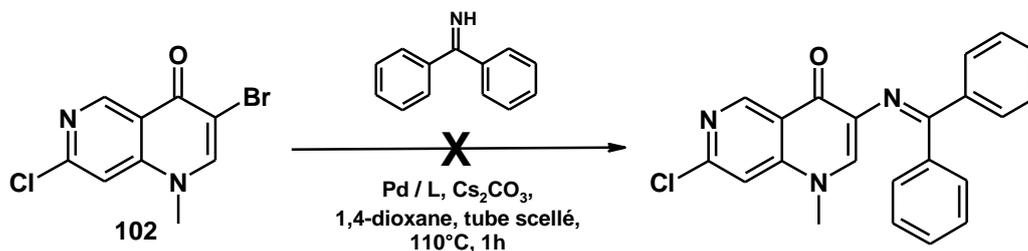


Schéma 50 : Tentatives de couplages de la benzophénone imine par amination de Buchwald-Hartwig.

Essai	Catalyseur	Ligand	Observations
1	Pd(OAc) <sub>2</sub> (15%)	Xantphos (15%)	dégradation
2	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (15%)	Xantphos (15%)	dégradation
3	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (15%)	BINAP (15%)	dégradation

Tableau 24 : Tentatives de couplages de la benzophénone imine par amination de Buchwald-Hartwig.

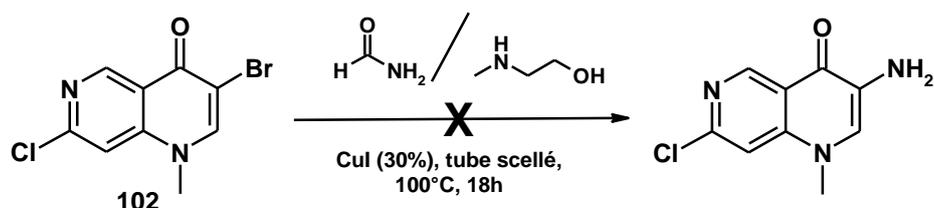
## 2 - Par génération *in situ* d'ammoniac et réaction cuprocatalysée

Cette deuxième méthode s'appuie sur des travaux de 2014 d'Aillerie *et al.*<sup>255</sup> impliquant la génération *in situ* d'ammoniac et un catalyseur au cuivre. L'ammoniac est produit par condensation entre un aminoalcool (la *N*-méthyléthanolamine) et le formamide (Schéma 51), puis le couplage est réalisé en présence d'iodure de cuivre et de la 7-chloro-3-bromo-1-méthyl-1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one (102). Malheureusement, ces conditions rapportées à notre dérivé bromé n'ont pas permis d'isoler le composé correspondant : seul un mélange du produit débromé et du composé de départ (102) est retrouvé après 18 h de chauffage (Schéma 52).



Schéma 51 : Formation *in situ* d'ammoniac.

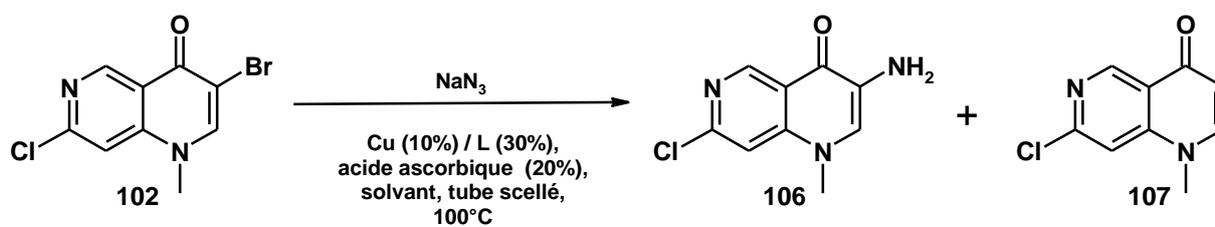
<sup>255</sup> Aillerie, A. *et al.*, *New J. Chem.* **2014**, 38, 1389-1391.



**Schéma 52** : Essai d'amination cuprocatalysée par génération *in situ* d'ammoniac.

### 3 - Par réaction cuprocatalysée en présence d'azoture de sodium

Cette méthode a été décrite par Messaoudi *et al.*<sup>256</sup> En utilisant une combinaison appropriée d'un catalyseur au cuivre, d'un ligand aminé et en présence d'azoture de sodium dans l'EtOH, des structures de type 3-aminoquinolinones et 3-aminocoumarines ont pu être synthétisées à partir de leurs précurseurs halogénés. Dans cette réaction, le passage par un intermédiaire nitrène subissant une thermolyse est évoqué. Les conditions employées dans ces travaux ont été appliquées au composé (**102**).



**Schéma 53** : Couplage cuprocatalysé en présence d'azoture de sodium sur le composé **102**.

Un premier essai de couplage en présence de L-proline ne permet d'observer qu'une faible conversion du composé (**102**) en (**106**) (essai 1, **tableau 25**), le reste du milieu réactionnel comportant des produits de dégradation. L'utilisation du DMEDA comme ligand conduit à l'obtention d'un mélange composé du produit aminé (**106**) et du produit déshalogéné en position 3 (**107**). Les composés sont respectivement isolés avec 9% et 43% de rendements (essai 2). Les deux derniers essais avec le mélange racémique de l'acide pipécolinique comme ligand donnent un mélange réactionnel composé des produits (**106**) et (**107**) ne contenant plus le produit de départ. Les rendements obtenus (13%) sont identiques, l'usage d'éthanol seul comme solvant permet de diminuer largement le temps de réaction.

<sup>256</sup> Messaoudi, S. *et al.*, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1677-1687.

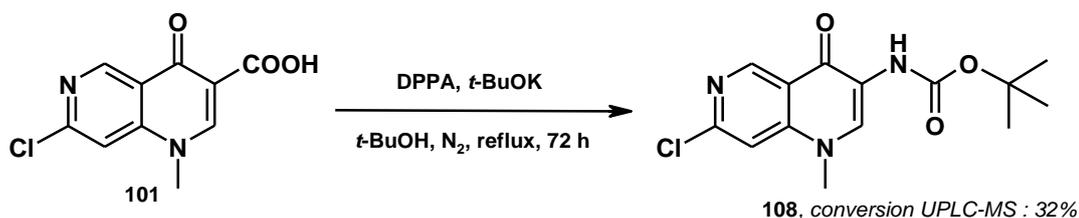
Essai	Ligand	Temps de réaction	Solvant	Conversion UPLC-MS (%)	Rendement (%)
1	L-proline	48 h	EtOH / H <sub>2</sub> O (7/3)	17 (composé <b>106</b> ) 35 (composé <b>102</b> )	non déterminé
2	DMEDA	9 h	EtOH / H <sub>2</sub> O (7/3)	43 (composé <b>106</b> ) 35 (composé <b>107</b> ) 6 (composé <b>102</b> )	9 (composé <b>106</b> ) 43 (composé <b>107</b> )
3	(±)-acide pipécolinique	144 h	EtOH / H <sub>2</sub> O (7/3)	37 (composé <b>106</b> ) 15 (composé <b>107</b> )	13 (composé <b>106</b> )
4	(±)-acide pipécolinique	48 h	EtOH	22 (composé <b>106</b> ) 15 (composé <b>107</b> )	13 (composé <b>106</b> )

**Tableau 25** : Essais de couplage cuprocatalysé en présence d'azoture de sodium sur le composé **102**.

#### 4 - Par réarrangement de Curtius à partir de l'acide carboxylique

Le réarrangement de Curtius consiste en la décomposition thermique des azotures d'acyles en isocyanates. Cette réaction est catalysée par des acides protiques ou des acides de Lewis permettant de réduire considérablement la température de pyrolyse.<sup>257,258</sup> L'azoture d'acyle peut être préparé par traitement de l'acide carboxylique avec l'azoture de diphenylphosphoryle (DPPA).<sup>259</sup> L'isocyanate obtenu peut être isolé si la pyrolyse est effectuée en l'absence de réactif nucléophile. Si celle-ci est réalisée en présence d'eau, d'amines ou d'alcools, les amines, les urées et les carbamates correspondants sont formés. Le réarrangement de Curtius est une réaction très générale qui peut être appliquée à partir d'acides carboxyliques contenant une large gamme de groupements fonctionnels.

Dans notre cas, l'acide carboxylique (**101**) a été mis en réaction avec l'azoture de diphenylphosphoryle (dppa) en présence de *tert*-butanolate de potassium dans le *tert*-butanol.<sup>260</sup> Malheureusement seule une conversion de 32% est observée après 48 h de chauffage, le milieu réactionnel étant contaminé par de nombreux produits secondaires. (**Schéma 54**).



**Schéma 54** : Synthèse du carbamate **108** par réarrangement de Curtius.

<sup>257</sup> Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297-368.

<sup>258</sup> Bräse, S. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188-5240.

<sup>259</sup> Shioiri, T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203-6205.

<sup>260</sup> Stern, E. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5471-5484.

## F - Conclusion

L'accès à des composés fonctionnalisés en position 3 en série 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one s'est avéré délicat. Nous avons ainsi pu noter une grande différence de réactivité entre cette série et la série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one. Cette dernière, plus facile à travailler, nous a permis d'accéder plus facilement aux composés cibles.

En série 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one, les produits de couplages obtenus par amination de Buchwald-Hartwig sur le dérivé diahlogéné bromé (**102**) ont donné des rendements modestes de 27% à 54% et ont nécessité une quantité de catalyseur et de ligand parfois trois fois supérieure à la quantité catalytique normalement utilisée. L'amination réalisée sur l'analogue iodé (**103**) a donné lieu à une dégradation du milieu réactionnel. De même, les couplages d'Ullmann n'ont abouti qu'à une faible conversion du précurseur bromé après un temps de chauffage prolongé. Seule la réaction avec le dérivé iodé et le 4-méthoxybenzamide a été concluante et a conduit à isoler l'amide de manière satisfaisante.

Les essais permettant d'obtenir l'amine libre en position 3 se sont également révélés compliqués à mettre en œuvre à partir du dérivé bromé (**102**). Le couplage avec la benzophénone imine ainsi que la réaction cuprocatalysée avec génération *in situ* d'ammoniac n'ont entraîné qu'une dégradation du milieu réactionnel.

Finalement, l'amine n'a pu être isolée que difficilement par une réaction cuprocatalysée en présence d'azoture de sodium. Le milieu réactionnel conduisant à une déshalogénéation importante du dérivé bromé.

Un dernier essai par réarrangement de Curtius entrepris sur l'acide carboxylique (**101**) a été considéré afin d'obtenir le carbamate désiré et d'envisager par la suite son hydrolyse en amine. Malheureusement celui-ci n'a permis d'observer qu'une faible conversion du produit de départ.

Malgré la difficulté rencontrée lors des tentatives d'amidification et d'amination de la position 3, d'autres essais doivent être réalisés. En particulier, le réarrangement de Curtius doit encore être travaillé et une mise au point est nécessaire pour espérer obtenir le carbamate correspondant avec de meilleurs rendements.

# PARTIE B : ETUDE BIOLOGIQUE

## I - Introduction

Nos travaux avaient pour objectif de déterminer les molécules potentiellement inhibitrices de la protéine Hsp90 et ciblant en particulier le domaine C-terminal. En accord avec ces objectifs, l'évaluation biologique des produits synthétisés a été effectuée au sein de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR) de l'Université de Rennes 1 et de l'équipe 8 « Survie cellulaire et échappement tumoral dans les cancers du sein » du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers UMR INSERM U892, IRS-UN, de l'Université de Nantes. Seuls les analogues de la novobiocine ont fait l'objet d'une évaluation au CRCNA.

- Des tests de solubilité dans du DMSO 100% à une concentration de l'ordre du millimolaire ont tout d'abord été réalisés sur les molécules. Cette étape est indispensable et conditionne la suite des tests de binding.
  - Une fois ce premier critère rempli, le seuil de solubilité de chaque composé a été déterminé par sédimentation et dosage spectrophotométrique. Le seuil critique a été fixé à 25%.
  - Les molécules ayant franchi ces deux premières étapes de sélection ont ensuite été criblées en fonction de leur capacité à interagir de façon spécifique avec la Hsp90. Cette capacité est appréciée par mesure de la variation de fluorescence intrinsèque à deux stœchiométries : Hsp90 : molécule 1 : 2 et 1 : 4.
  - Enfin, les meilleurs candidats ont été évalués selon leur spécificité à interagir vis-à-vis de chacun des domaines N- et C-terminaux de la Hsp90.
- ⇒ Ces premiers tests ont été menés par le Dr. C. Garnier de l'équipe « Translation and folding » de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR) de l'Université de Rennes 1.
- Par la suite, des mesures de viabilité cellulaire ont été réalisées afin d'évaluer l'activité antiproliférative des composés. Deux lignées cancéreuses mammaires humaines connues pour surexprimer la Hsp90 ont été sélectionnées, il s'agit des lignées MCF-7 et MDA-MB-468.
  - Sur les molécules les plus actives à l'issue de ce test, nous avons ensuite voulu savoir si leur activité était liée à un arrêt de prolifération cellulaire ou à une induction de mort cellulaire. Pour ce faire, nous avons réalisé un marquage à l'annexine V-FITC couplé avec un marquage IP (iodure de propidium) en cytométrie en flux puis analysé l'influence de ces molécules sur le cycle cellulaire par un marquage IP.

- Enfin, les lignées cellulaires traitées par ces mêmes molécules ont fait l'objet d'une analyse Western Blot afin de mettre en évidence une dégradation de certaines protéines clientes de la Hsp90.

⇒ Ces trois dernières études ont été réalisées sous la responsabilité du Dr. Sophie Barillé-Nion au sein de l'équipe 8 « Survie cellulaire et échappement tumoral dans les cancers du sein » du CRCNA, équipe dirigée par le Dr. Philippe Juin.

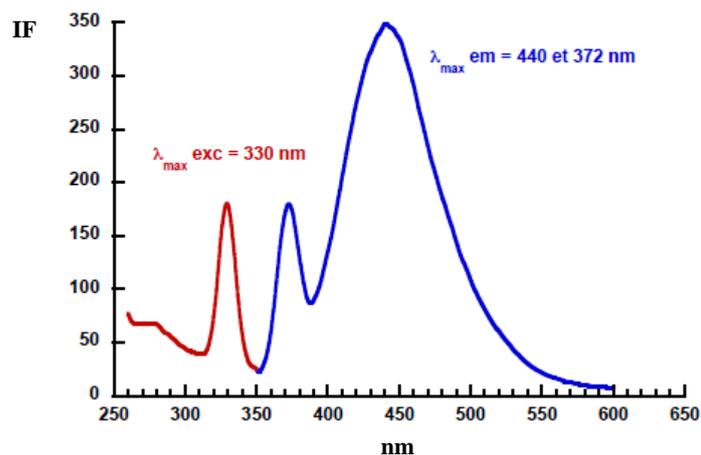
## II - Etude de la solubilité

Dans un premier temps, les composés ont été repris dans du DMSO 100 % à une concentration finale était de 10 mM. Cette première étape est importante car seules les molécules totalement solubles pourront être conservées pour la suite des évaluations. Au total, ce sont soixante-cinq molécules qui ont été testées. Tous les dérivés amidiques analogues de la novobiocine ont été évalués (les douze intermédiaires chlorés, les trente molécules finales et les cinq chlorhydrates) ainsi que dix-huit composés issus des travaux de couplages (seize molécules obtenues par couplages de Buchwald-Hartwig et deux par couplage de Suzuki-Miyaura).

À l'issue de ce test, vingt-trois molécules se sont révélées insolubles et n'ont donc pas pu être évaluées par la suite. Parmi elles, les intermédiaires chlorés sont les plus touchés puisque sept composés sur douze sont insolubles dans le DMSO 100%. Sur les trente dérivés amidiques analogues de la novobiocine, seulement huit sont insolubles, montrant donc l'importance d'une fonctionnalisation en position 7 par une chaîne hydrosoluble. Un seul chlorhydrate s'est révélé insoluble sur les cinq. Concernant les composés issus des travaux de couplages, les deux dérivés obtenus par couplage de Suzuki n'ont pas pu être conservés, indiquant l'intérêt qui doit être porté aux groupements hydrophiles de type amine et amide. Enfin, pour les molécules issues de la série de couplage de Buchwald, deux composés sur cinq fonctionnalisés uniquement en position 3 et trois sur onze fonctionnalisés sur les deux positions sont inexploitable pour la suite des tests (**Tableau 27**).

Une fois cette première étape franchie, le seuil de solubilité en milieu aqueux par sédimentation et dosage spectrophotométrique a été déterminé pour chaque molécule restante. Pour ce faire, les solutions mères ont été diluées d'un facteur 400 dans le DMSO, puis l'analyse par spectrophotométrie a permis de mettre en évidence plusieurs maxima d'absorption pour chacune des molécules.

Afin d'éviter de surcharger le document, seulement un exemple représentatif est décrit avec le composé **(19)** (**Figure 35**). Ainsi, concernant ce dérivé, un  $\lambda_{\text{max}}$  d'excitation à 330 nm a été mesuré et deux  $\lambda_{\text{max}}$  d'émission à 372 et 440 nm ont été déterminés.



**Figure 35** : Détermination d'un  $\lambda_{\max}$  d'excitation (en rouge) et de deux  $\lambda_{\max}$  d'émission (en bleu) pour le composé **19**.

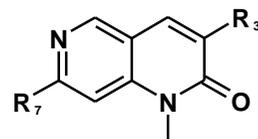
Puis, pour chaque composé soluble dans le DMSO 100%, le seuil de solubilité a été déterminé en milieu aqueux dans le DMSO 10% et 1% par sédimentation. L'absorption à leurs maxima est ainsi mesurée avant (échantillon total) et après (surnageant) centrifugation à 12 500 g pendant 5 minutes à température ambiante (**Tableau 26**).

Molécule <b>19</b>	DMSO (%)	Absorbance avant centrifugation	Absorbance après centrifugation	Solubilité à 25 $\mu$ M
(371 nm, diluée au 100 <sup>e</sup> )	10	0.35606	0.30292	100%
	1	0.30125	0.23041	

**Tableau 26** : Exemple de l'étude de la solubilité par sédimentation de la molécule **19**.

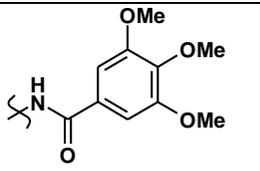
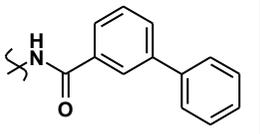
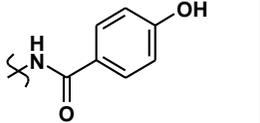
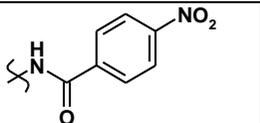
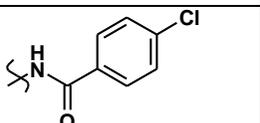
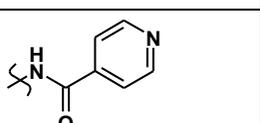
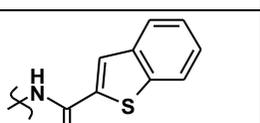
Parmi les composés solubles en DMSO, seulement six composés se sont révélés insolubles en milieu aqueux, il s'agit des deux intermédiaires chlorés (**7**) et (**9**) et de quatre composés (**(79)**, (**92**), (**93**) et (**96**)) issus du couplage de Buchwald-Hartwig fonctionnalisés en positions 3 et 7. Finalement, ce sont donc trente-six molécules qui ont pu être testées quant à leur capacité à se lier à la Hsp90. Les deux premières étapes sont résumées dans le **tableau 27**.

Partie B : Étude biologique

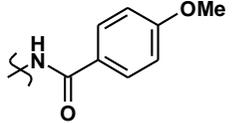
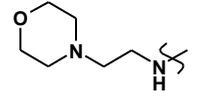
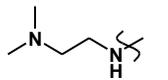
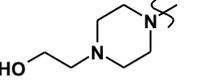
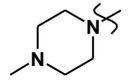
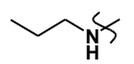
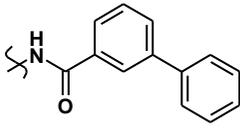
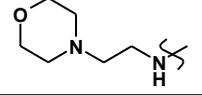
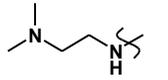
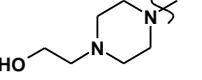
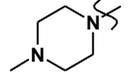
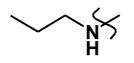
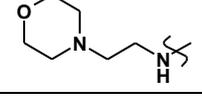


Composé	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>	Solubilité			Conclusion
			100% DMSO [ ] 10mM	10% DMSO	1% DMSO	
<b>Intermédiaires chlorés en 7</b>						
6		Cl	+	+	+	conservé pour les études de binding
7		Cl	+	-	-	insoluble en milieu aqueux
8		Cl	+	+	+	conservé pour les études de binding
9		Cl	+	-	-	insoluble en milieu aqueux
10		Cl	+	+	+	conservé pour les études de binding

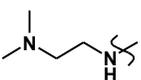
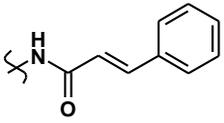
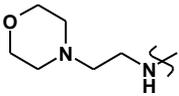
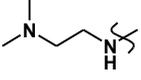
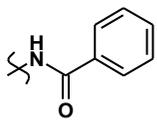
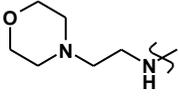
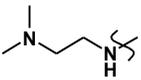
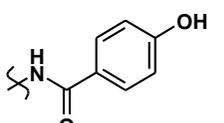
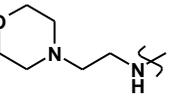
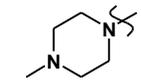
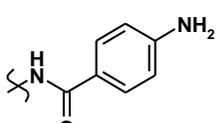
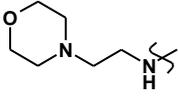
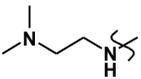
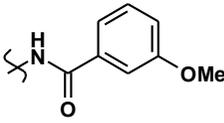
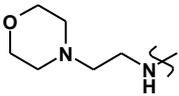
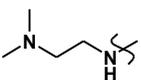
Partie B : Étude biologique

11		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
12		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
13		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
14		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
15		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
16		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
17		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
<b>Analogues amidiques de la novobiocine fonctionnalisés en positions 3 et 7</b>						

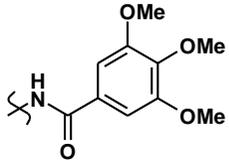
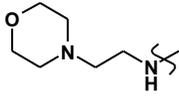
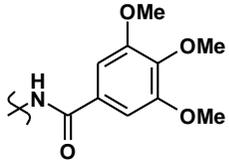
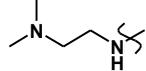
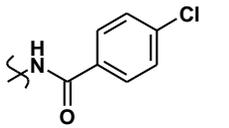
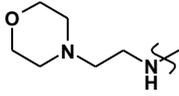
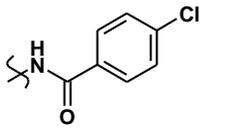
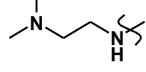
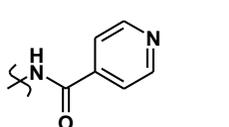
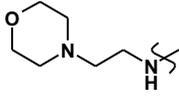
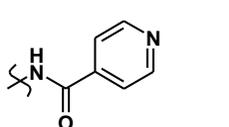
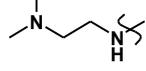
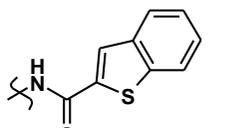
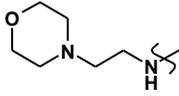
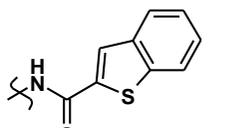
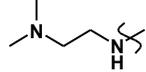
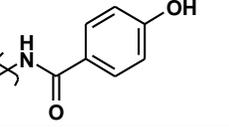
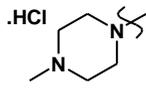
Partie B : Étude biologique

21			+	+	+	conservé pour les études de binding
22			+	+	+	conservé pour les études de binding
23			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
24			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
25			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
26			+	+	+	conservé pour les études de binding
27			+	+	+	conservé pour les études de binding
28			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
29			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
30			+	+	+	conservé pour les études de binding
31			+	+	+	conservé pour les études de binding

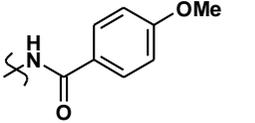
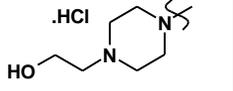
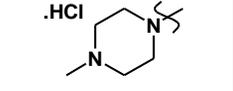
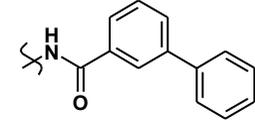
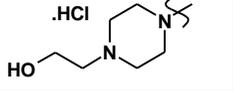
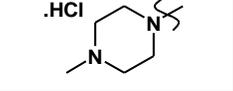
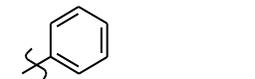
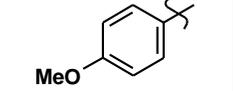
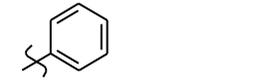
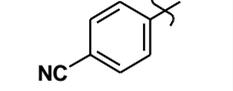
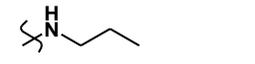
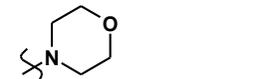
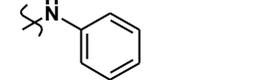
Partie B : Étude biologique

32			+	+	+	conservé pour les études de binding
33			+	+	+	conservé pour les études de binding
34			+	+	+	conservé pour les études de binding
35			+	+	+	conservé pour les études de binding
36			+	+	+	conservé pour les études de binding
19			+	+	+	conservé pour les études de binding
20			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
37			+	+	+	conservé pour les études de binding
38			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
39			+	+	+	conservé pour les études de binding
18			+	+	+	conservé pour les études de binding

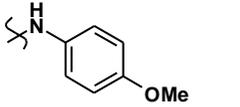
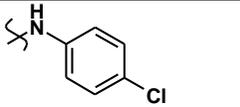
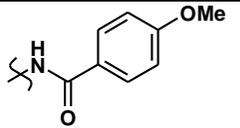
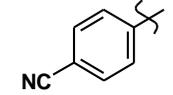
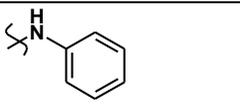
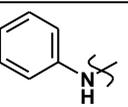
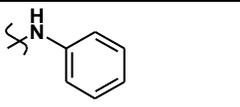
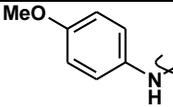
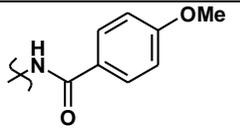
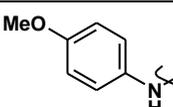
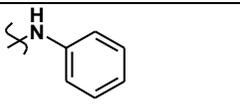
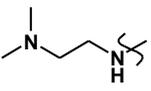
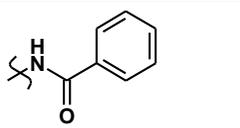
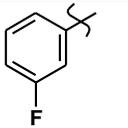
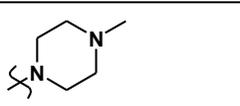
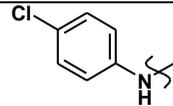
Partie B : Étude biologique

40			+	+	+	conservé pour les études de binding
41			+	+	+	conservé pour les études de binding
42			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
43			+	+	+	conservé pour les études de binding
44			+	+	+	conservé pour les études de binding
45			+	+	+	conservé pour les études de binding
46			+	+	+	conservé pour les études de binding
47			+	+	+	conservé pour les études de binding
<b>Analogues amidiques de la novobiocine fonctionnalisés en positions 3 et 7 chlorhydratés</b>						
48			+	+	+	conservé pour les études de binding

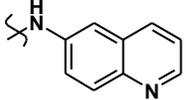
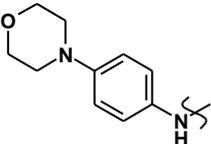
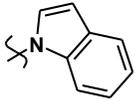
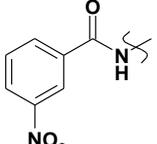
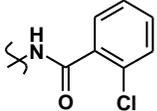
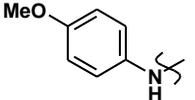
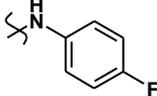
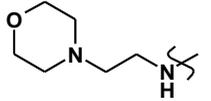
Partie B : Étude biologique

49			+	+	+	conservé pour les études de binding
50			+	+	+	conservé pour les études de binding
51			+	+	+	conservé pour les études de binding
52			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
<b>Composés issus du couplage de Suzuki-Miyaura</b>						
72			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
73			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
<b>Composés issus du couplage de Buchwald-Hartwig fonctionnalisés en position 3</b>						
67		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
69		Cl	+	+	+	conservé pour les études de binding
66		Cl	+	+	+	conservé pour les études de binding

Partie B : Étude biologique

70		Cl	+	+	+	conservé pour les études de binding
71		Cl	-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
<b>Composés issus du couplage de Buchwald-Hartwig fonctionnalisés en positions 3 et 7</b>						
78			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
79			+	-	-	insoluble en milieu aqueux
80			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
81			-	-	-	insoluble dans le DMSO 100%
82			+	+	+	conservé pour les études de binding
86			+	+	+	conservé pour les études de binding
90			+	+	+	conservé pour les études de binding

Partie B : Étude biologique

92			+	-	-	insoluble en milieu aqueux
93			+	-	-	insoluble en milieu aqueux
94			+	+	+	conservé pour les études de binding
96			+	-	-	insoluble en milieu aqueux

**Tableau 27** : Molécules sélectionnées à l'issue des tests de solubilité.

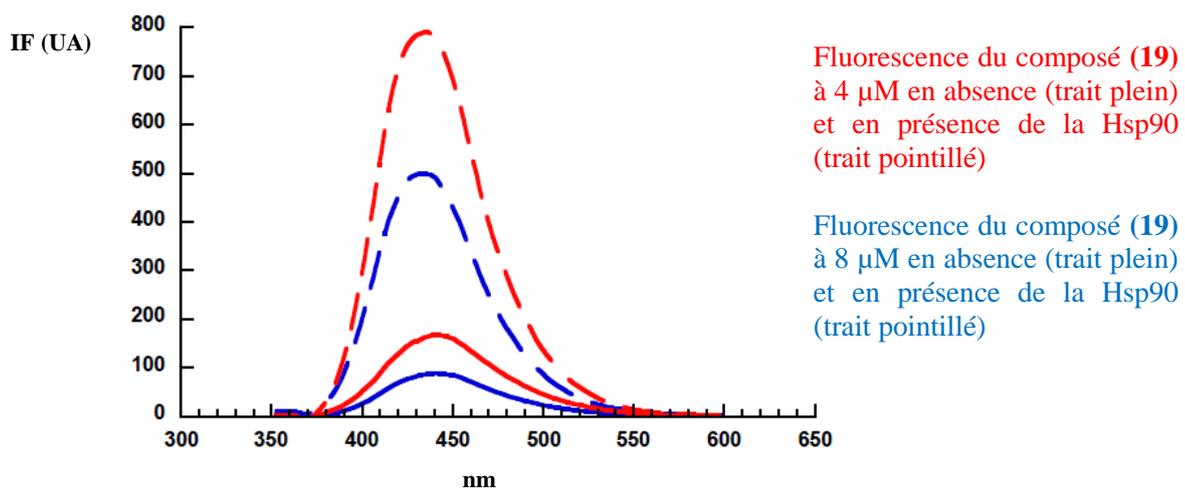
### III - Détermination de l'interaction molécule / Hsp90 par fluorescence

#### A - Sur la Hsp90 entière

Après ces deux premières étapes, la capacité de chaque molécule à lier la Hsp90 a été déterminée par mesure de la variation de fluorescence intrinsèque de la molécule en présence et en absence de la Hsp90 aux stœchiométries 1:2 et 1:4. La concentration de la Hsp90 a été fixée à 2  $\mu\text{M}$  tandis que celles des molécules étaient de 4 et de 8  $\mu\text{M}$ .

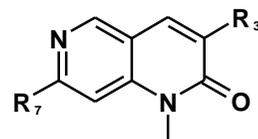
La variation de fluorescence a ensuite été mesurée en se plaçant à la longueur d'onde maximale d'excitation déterminée précédemment pour chaque molécule et en observant une éventuelle variation (shift et / ou augmentation / diminution) du spectre d'émission en présence de la Hsp90. Un changement de celui-ci suggère une liaison de la molécule à la Hsp90. Toutes les mesures ont été réalisées dans des cuvettes en quartz (0.2x1.0 cm) à l'aide d'un spectrofluorimètre LS55 (Perkin Elmer) (**Figure 36**). À 4  $\mu\text{M}$ , et en excitant à 330 nm pour le composé (**19**), une variation de fluorescence de 600% a été mesurée à 440 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  d'émission), tandis qu'elle se situe à 485% à 8  $\mu\text{M}$ . Une variation supérieure à 100% est considérée comme importante. Trente-six molécules ont ainsi été évaluées par fluorescence vis-à-vis de leur capacité à interagir avec la Hsp90 (**Tableau 28**). Au total, seize composés se sont révélés intéressants en présentant une forte variation de fluorescence en présence de la Hsp90, suggérant une liaison avec celle-ci. Aucun intermédiaire de type amide en position 3 et chloré en 7 n'a montré une variation importante. Sur les vingt-deux analogues amidiques de la novobiocine, huit molécules semblent interagir avec la Hsp90. Les dérivés *para*-méthoxy (**21**) et (**22**) tout d'abord, avec une variation d'environ 200% en présence de la Hsp90. Plus intéressant encore, tous les dérivés biphényles ont présenté des variations d'au moins 500%, le composé (**26**) allant même jusqu'à +1100%. Le dérivé *para*-hydroxy (**19**) et les deux dérivés hétérocycliques (**46**) et (**47**) sont également à conserver.

La synthèse des chlorhydrates dans le but de contourner les problèmes de solubilité s'est révélée judicieuse puisqu'en plus de gagner en solubilité, les quatre chlorhydrates testés ont tous montré de bonnes variations de fluorescence de 100 à 500%. Enfin les composés issus du couplage de Buchwald-Hartwig ont également mis en avant leur potentiel de liaison à la Hsp90. Tous d'abord les dérivés (**66**) et (**70**) comportant un motif aniline en position 3 et un chlore en position 7 ont présenté des variations de fluorescence de 300% en présence de la protéine chaperon. Enfin les dérivés (**82**) et (**90**) semblent aussi se lier fortement à la Hsp90. Le composé (**82**) représente actuellement la molécule potentiellement inhibitrice de la Hsp90 la plus prometteuse avec une variation de 1400% en présence de la protéine chaperon.



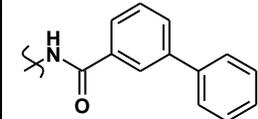
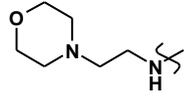
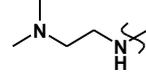
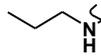
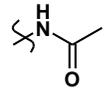
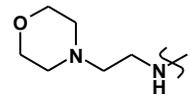
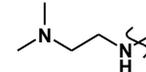
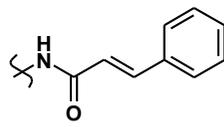
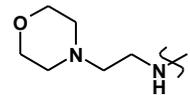
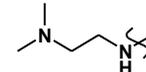
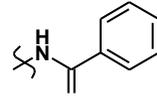
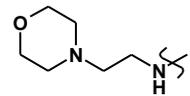
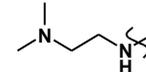
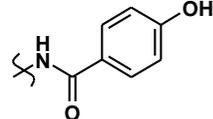
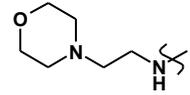
**Figure 36** : Spectres d'émission de fluorescence du composé **19** à deux stœchiométries (1:2 et 1:4), en absence et en présence de la Hsp90.

Partie B : Étude biologique

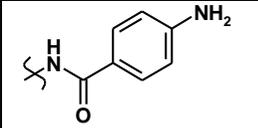
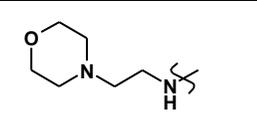
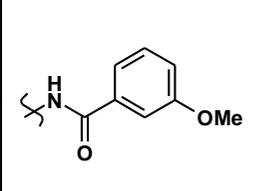
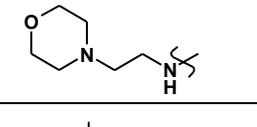
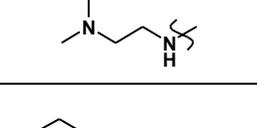
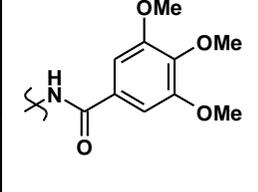
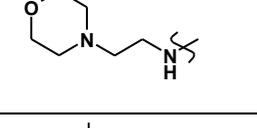
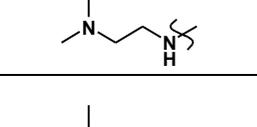
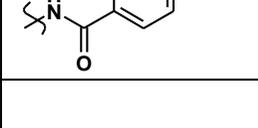
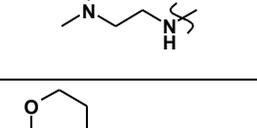
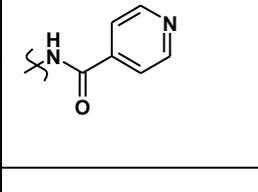
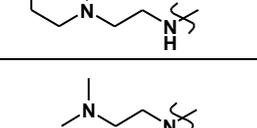
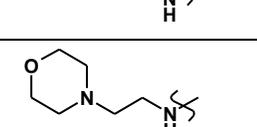
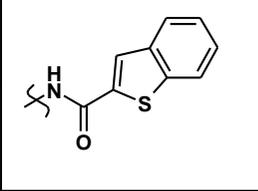
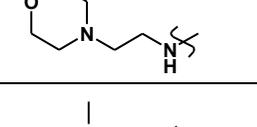
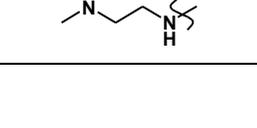


Composé	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>	Binding Hsp90 (à 2 μM)		Conclusion (+ : <25%, ++ : 25%≤X≤100%, +++ >100%)
			Composé à 4 μM (Δ IF)	Composé à 8 μM (Δ IF)	
<b>Intermédiaires chlorés en 7</b>					
6		Cl	-13%	-10%	+
8		Cl	+36%	+36%	++
10		Cl	+30%	+58%	++
<b>Analogues amidiques de la novobiocine fonctionnalisés en positions 3 et 7</b>					
21			+175%	+171%	+++
22			+215%	+215%	+++

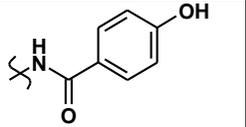
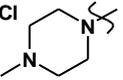
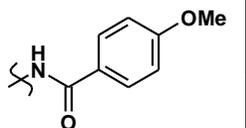
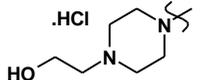
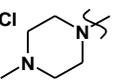
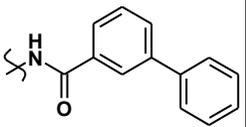
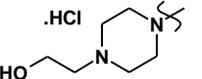
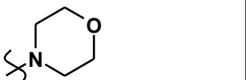
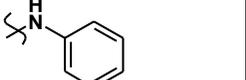
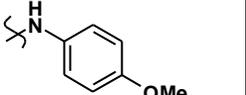
Partie B : Étude biologique

26			+1100%	+800%	+++
27			+720%	+530%	+++
30			+588%	+504%	+++
31			+0%	+0%	-
32			+3%	+5%	+
33			+3%	+2%	-
34			+9%	+12%	+
35			+12%	+12%	+
36			+11%	+13%	+
19			+600%	+485%	+++

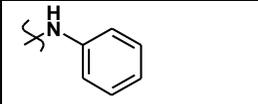
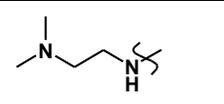
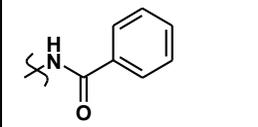
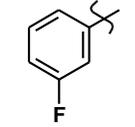
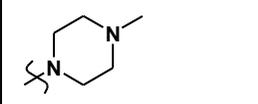
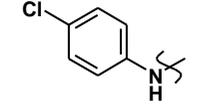
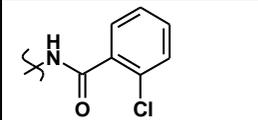
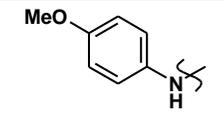
Partie B : Étude biologique

37			+1%	+13%	+
39			+10%	+2%	+
18			+36%	saturation	+
40			+60%	+53%	++
41			+45%	+43%	+
43			+73%	+76%	++
44			+0%	+0%	-
45			+0%	+0%	-
46			+376%	+192%	+++
47			+186%	+192%	+++

Partie B : Étude biologique

Analogues amidiques de la novobiocine fonctionnalisés en positions 3 et 7 chlorhydratés					
48			+100%	+90%	+++
49			+301%	+233%	+++
50			+280%	+215%	+++
51			+520%	+410%	+++
Composés issus du couplage de Buchwald-Hartwig fonctionnalisés en position 3					
69		Cl	+11%	+9%	+
66		Cl	+290%	+280%	+++
70		Cl	+333%	+289%	+++
Composés issus du couplage de Buchwald-Hartwig fonctionnalisés en positions 3 et 7					

Partie B : Étude biologique

82			+1400%	+1030%	+++
86			-30%	-20%	+
90			+800%	+500%	+++
94			non testé en fluorescence ( $\lambda_{\text{max}}$ excitation situé à la longueur d'onde d'absorption de la Hsp90)		

**Tableau 28** : Étude de binding des composés sélectionnés sur la Hsp90.

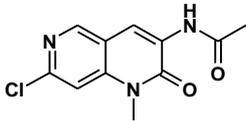
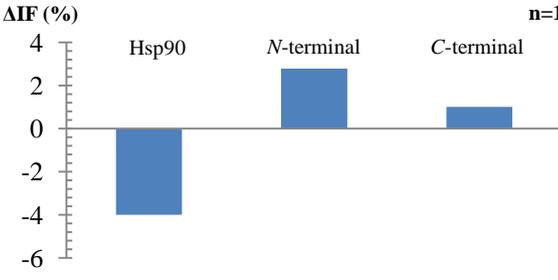
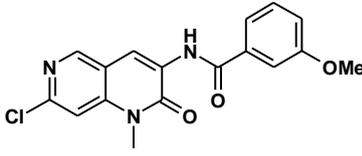
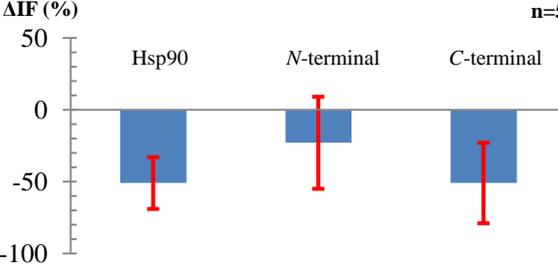
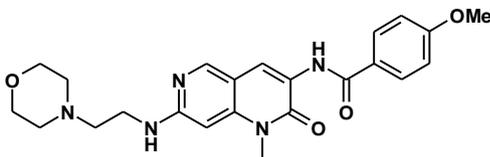
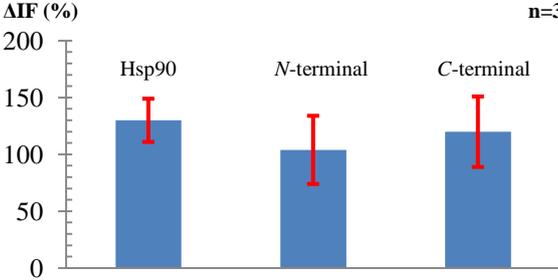
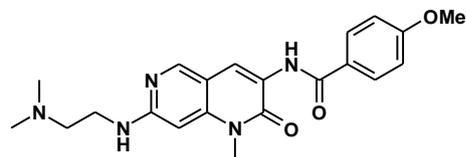
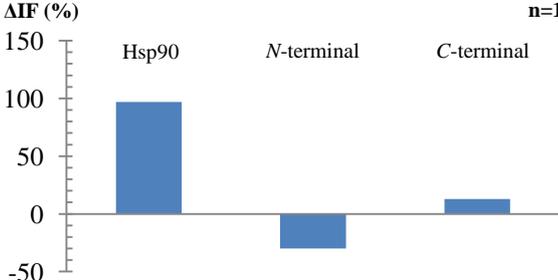
## **B - Sur chacun des domaines N- et C-terminaux**

Après avoir sélectionné seize molécules quant à leur solubilité et à leur capacité à interagir avec la Hsp90 entière, sept d'entre-elles ((**21**), (**22**), (**26**), (**27**), (**30**), (**19**) et (**66**)) ont pour l'instant pu être testées dans le but de déterminer quel domaine de la Hsp90 (N- ou C-terminal) est impliqué dans la liaison à la molécule, la spécificité C-terminale étant recherchée. Quatre supplémentaires ((**6**), (**10**), (**18**), et (**69**)) donnant moins de variation de fluorescence, ont également été ajoutées à l'analyse. Ce sont donc onze molécules qui ont fait l'objet d'évaluations complémentaires. Pour ce faire, ces composés ont été testés séparément sur chacun des domaines N- (1-221) et C-terminaux (446-731) dans le but d'étudier leur spécificité d'interaction avec ces deux fragments. Trois profils de molécules ont été dégagés : celles se liant à la Hsp90 sans spécificité de domaine, celles qui se lient préférentiellement au domaine N-terminal, et celles se liant préférentiellement au domaine C-terminal (**Tableau 29**).

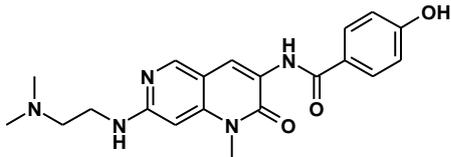
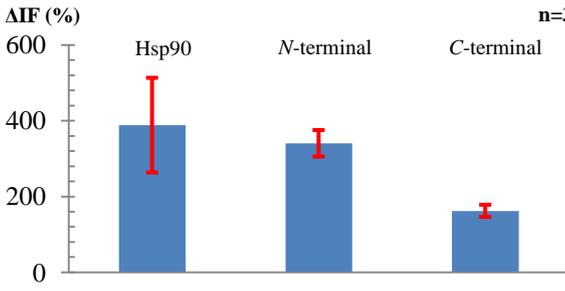
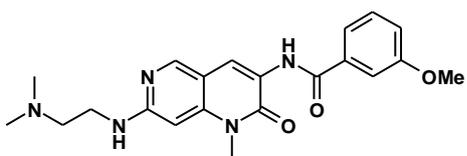
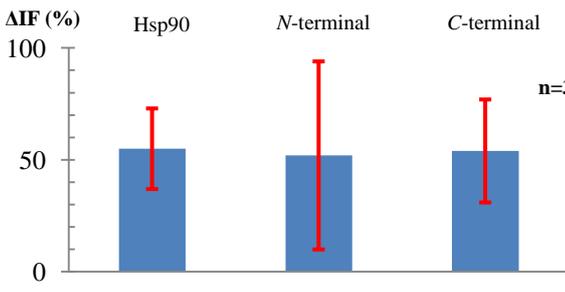
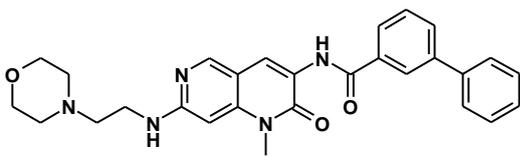
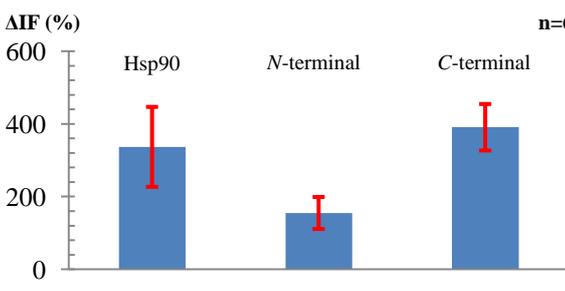
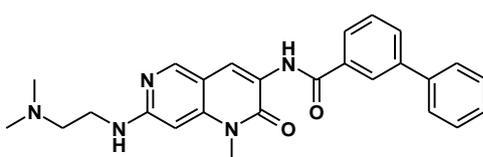
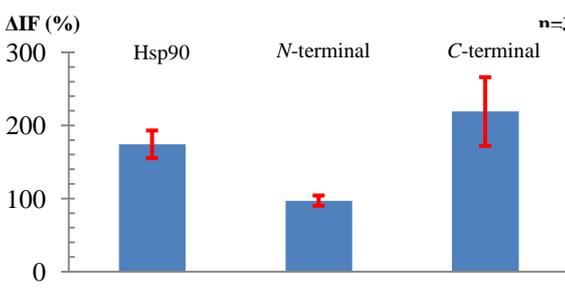
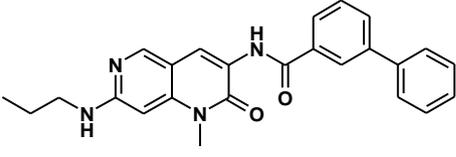
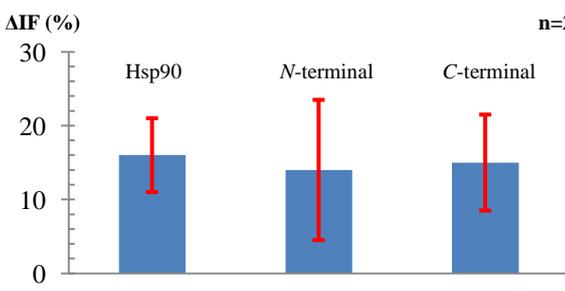
Sur les onze molécules testées, six ne semblent pas spécifiques d'un domaine particulier de la Hsp90. Il s'agit de l'intermédiaire chloré (**6**), de quatre analogues amidiques de la novobiocine (tous les dérivés *para*-méthoxy (**21**), (**22**) et (**18**) et un dérivé biphenyle (**30**)) et du composé (**69**) issu de la série Buchwald. Les composés (**6**) et (**69**) sont les moins intéressants et ne semblent pas se lier à la protéine, ni à ses fragments, la variation de fluorescence restant très faible. Le composé (**19**) est quant à lui à conserver, une forte variation de fluorescence est observable en présence de la protéine entière. De plus, une différence de variation de 100% est observable entre le fragment N- et le fragment C-terminal. Celle-ci est plus importante sur le premier domaine, suggérant ainsi une liaison préférentielle à celui-ci. Enfin, les quatre derniers composés (**10**), (**26**), (**27**) et (**66**) sont les plus prometteurs, ils sont plus spécifiques du domaine C-terminal. Excepté pour le composé (**10**) dont les données sont à confirmer, les trois autres dérivés présentent une différence de variation de fluorescence de 115 à 250% entre les deux fragments en faveur du fragment C-terminal.

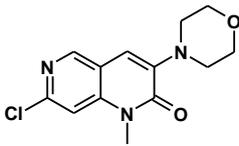
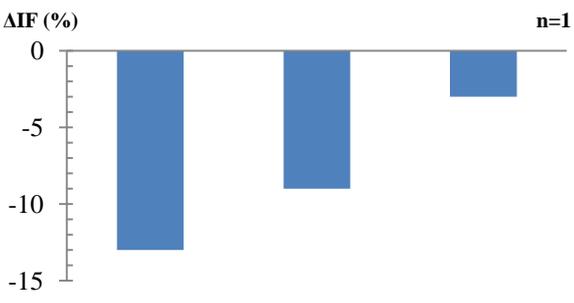
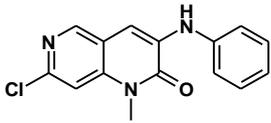
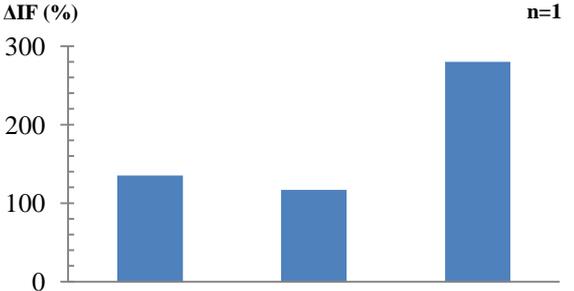
L'étude des relations structure-activité est difficile à ce stade de l'analyse. Le motif biphenyle donnant la plus forte variation de fluorescence pour les composés plus affins du domaine C-terminal. La présence d'une chaîne aminée en position 7 semble importante sans qu'aucune différence de spécificité ne puisse être faite entre les motifs N-(2-aminoéthyl)morpholinyle et N,N-diméthyléthylènediaminyle. Les évaluations futures devront s'attacher à finir de hiérarchiser l'ensemble des molécules (neuf sont encore à tester en terme de spécificité de domaine). De plus, certains composés doivent être réévalués afin de s'assurer de la reproductibilité des tests.

Partie B : Étude biologique

Composé	Spectre de fluorescence	Spécificité de la liaison								
<b>Intermédiaires chlorés en 7</b>										
<p>Composé (6)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) n=1</p>  <table border="1"> <caption>Data for Composé (6)</caption> <thead> <tr> <th>Target</th> <th><math>\Delta I F</math> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hsp90</td> <td>-4.5</td> </tr> <tr> <td>N-terminal</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>C-terminal</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table>	Target	$\Delta I F$ (%)	Hsp90	-4.5	N-terminal	2.5	C-terminal	1.0	composé non spécifique
Target	$\Delta I F$ (%)									
Hsp90	-4.5									
N-terminal	2.5									
C-terminal	1.0									
<p>Composé (10)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) n=5</p>  <table border="1"> <caption>Data for Composé (10)</caption> <thead> <tr> <th>Target</th> <th><math>\Delta I F</math> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hsp90</td> <td>-50</td> </tr> <tr> <td>N-terminal</td> <td>-15</td> </tr> <tr> <td>C-terminal</td> <td>-50</td> </tr> </tbody> </table>	Target	$\Delta I F$ (%)	Hsp90	-50	N-terminal	-15	C-terminal	-50	liaison préférentielle au fragment C-terminal
Target	$\Delta I F$ (%)									
Hsp90	-50									
N-terminal	-15									
C-terminal	-50									
<b>Analogues amidiques de la novobiocine fonctionnalisés en positions 3 et 7</b>										
<p>Composé (21)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) n=3</p>  <table border="1"> <caption>Data for Composé (21)</caption> <thead> <tr> <th>Target</th> <th><math>\Delta I F</math> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hsp90</td> <td>130</td> </tr> <tr> <td>N-terminal</td> <td>105</td> </tr> <tr> <td>C-terminal</td> <td>120</td> </tr> </tbody> </table>	Target	$\Delta I F$ (%)	Hsp90	130	N-terminal	105	C-terminal	120	composé non spécifique
Target	$\Delta I F$ (%)									
Hsp90	130									
N-terminal	105									
C-terminal	120									
<p>Composé (22)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) n=1</p>  <table border="1"> <caption>Data for Composé (22)</caption> <thead> <tr> <th>Target</th> <th><math>\Delta I F</math> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hsp90</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>N-terminal</td> <td>-20</td> </tr> <tr> <td>C-terminal</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Target	$\Delta I F$ (%)	Hsp90	100	N-terminal	-20	C-terminal	10	composé non spécifique
Target	$\Delta I F$ (%)									
Hsp90	100									
N-terminal	-20									
C-terminal	10									

Partie B : Étude biologique

<p>Composé (19)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) <span style="float: right;">n=3</span></p> 	<p>liaison préférentielle au fragment N-terminal</p>
<p>Composé (18)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) <span style="float: right;">n=3</span></p> 	<p>composé non spécifique</p>
<p>Composé (26)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) <span style="float: right;">n=6</span></p> 	<p>liaison préférentielle au fragment C-terminal</p>
<p>Composé (27)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) <span style="float: right;">n=3</span></p> 	<p>liaison préférentielle au fragment C-terminal</p>
<p>Composé (30)</p> 	<p><math>\Delta I F</math> (%) <span style="float: right;">n=2</span></p> 	<p>composé non spécifique</p>
<p>Composés issus du couplage de Buchwald-Hartwig fonctionnalisés en position 3</p>		

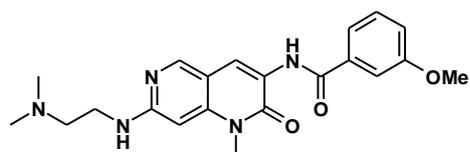
 <p>Composé (69)</p>		<p>composé non spécifique</p>
 <p>Composé (66)</p>		<p>liaison préférentielle au fragment C-terminal</p>

**Tableau 29** : Étude de la spécificité d'interaction des composés vis-à-vis des domaines de la Hsp90.

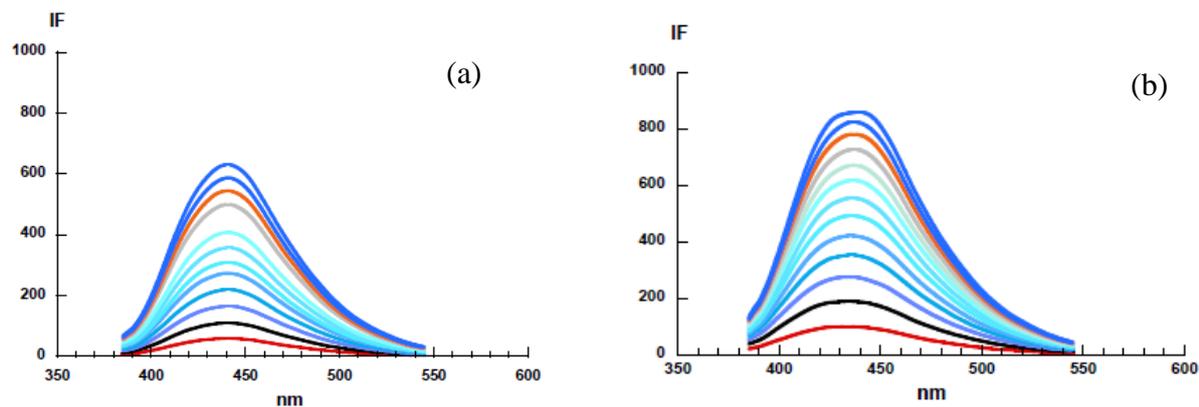
### C - Etude de la liaison des composés 18 et 10 à la Hsp90

Le calcul de constantes de dissociations pour deux composés a été réalisé afin d'apprécier la force de liaison avec la protéine Hsp90.

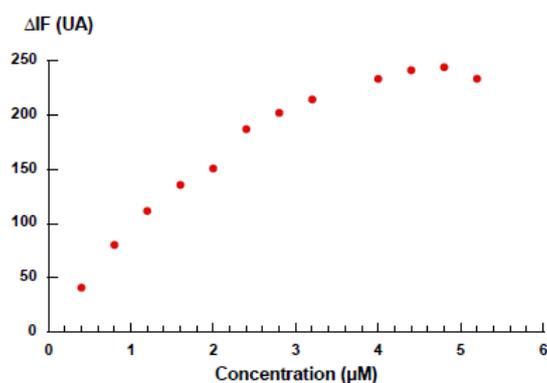
#### 1 - Calcul du Kd pour le composé 18



Dans un premier temps, la Hsp90 a été titrée par le composé (18) en excitant à 350 nm, la Hsp90 n'absorbant pas à cette longueur d'onde ( $\lambda_{\text{max}}$  excitation composé (18) = 350 nm). La fluorescence intrinsèque du dérivé (18) a ainsi été suivie en absence et en présence de la Hsp90 (**Figure 37**). Le tampon DMSO a également été titré par le composé (18) pour vérifier que celui-ci n'avait pas d'effet sur la fluorescence intrinsèque de la molécule. Puis, afin de voir l'influence réelle de la Hsp90 sur la molécule, les spectres de titration de la Hsp90 par la molécule ont été soustraits aux spectres de titration du tampon par le composé (**Figure 38**).

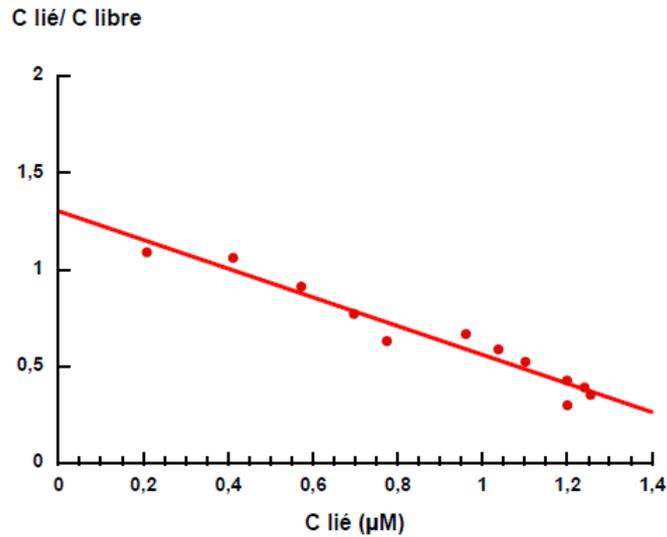


**Figure 37** : (a) Titration du composé **18** en absence de la Hsp90 ; (b) Titration du composé **18** en présence de la Hsp90.



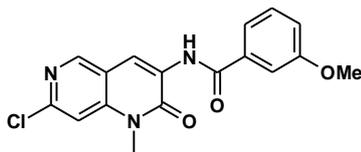
**Figure 38** : Différence de variation de la fluorescence intrinsèque du composé **18**.

La détermination du  $K_d$  (pente) a ensuite été réalisée en utilisant la méthode de Scatchard qui permet de calculer l'affinité d'un ligand pour sa protéine. La constante de dissociation du composé (**18**) pour la Hsp90 a ainsi été calculée à  $3 \pm 3 \mu\text{M}$  (**Figure 39**).

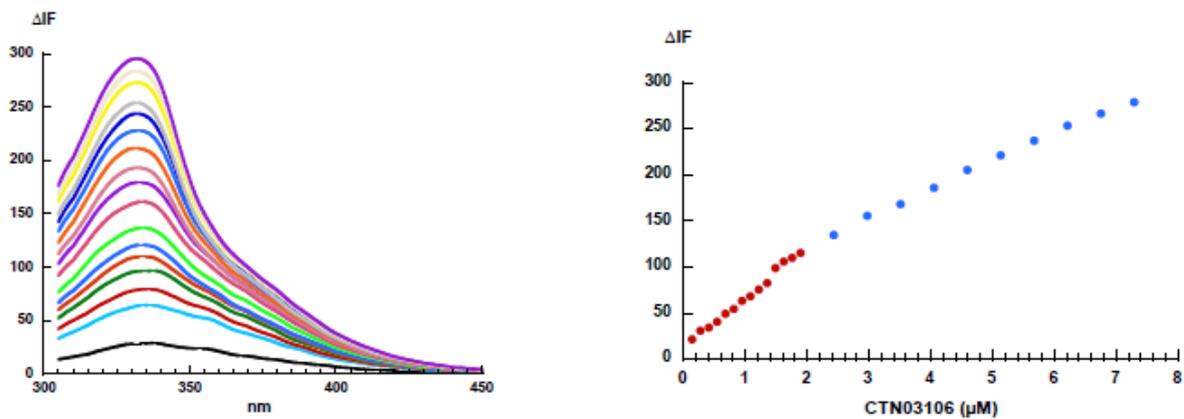


**Figure 39** : Détermination du  $K_d$  du composé **18** par la méthode de Scatchard.

## 2 - Calcul du $K_d$ pour le composé **10**



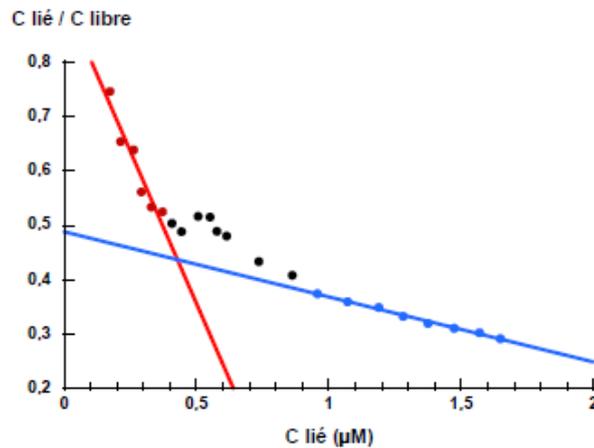
Concernant le composé (**10**), la titration en excitant à 280 nm a permis de suivre l'effet de la molécule sur la fluorescence intrinsèque de la Hsp90. Le tampon DMSO a également été titré par la protéine chaperon afin de vérifier que celui-ci n'avait pas d'effet sur la fluorescence intrinsèque de la Hsp90. Puis, les spectres de titration de la Hsp90 par la molécule ont été soustraits aux spectres de titration du tampon par la Hsp90 (**Figure 40**).



**Figure 40** : Variation de la différence de fluorescence de la Hsp90 en fonction de la concentration du composé **10**.

La détermination du  $K_d$  (pente) a ensuite été réalisée en utilisant la méthode de Scatchard (**Figure 41**). L'ensemble des résultats a montré que ce composé avait deux constantes d'affinité. Deux hypothèses peuvent être formulées : soit il existerait une coopérativité entre les deux sites de fixation de la molécule, soit il y aurait présence de sites d'affinité différents pour la Hsp90.

Une constante d'affinité forte ( $K_d = 1.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ) et une constante d'affinité faible ont été retrouvées ( $K_d = 6.0 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ).



**Figure 41** : Détermination des deux  $K_d$  du composé **10** par la méthode de Scatchard.

## IV - Etude de la viabilité et de la mort cellulaire et analyse par Western Blot de l'expression de protéines clientes de la Hsp90

### A - Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-468 sont issues de patientes atteintes d'adénocarcinome mammaire métastatique et établies à partir d'effusions pleurales. La lignée MCF-7 provient de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA), exprime le récepteur aux oestrogènes (ER+) et est représentative des cancers mammaires hormonodépendants (les plus fréquents). Elle a un statut p53 non mutée. Les cellules de la lignée MDA-MB-468 provenant de l'ATCC (Manassas, Virginia, USA) sont aneuploïdes et mutées sur le gène *TP53*. Cette mutation R280K affecte le domaine de liaison à l'ADN de la protéine p53. Elles n'expriment pas de récepteurs hormonaux (ER- et PR-) et ne présentent pas d'amplification d'expression de l'oncogène HER2. La lignée est donc représentative du sous-type triple négatif des tumeurs mammaires.

Ces deux lignées cellulaires adhérentes ont été cultivées en monocouche sur plastique dans un milieu DMEM contenant 2 mM de L-glutamine, 5 % de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de pénicilline et 50 ng/mL de streptomycine (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

## ***B - Etude de la viabilité cellulaire par test MTT***

### **1 - Principe**

Toutes les molécules ont initialement été dissoutes dans du DMSO à une concentration de 20 mM pour leur stockage à 5°C avant d'être diluées extemporanément dans du milieu de culture cellulaire pour les tests *in vitro*. Le 17-AAG et la novobiocine ont été systématiquement inclus dans les expériences en tant que molécules de référence.

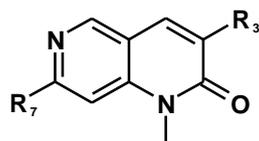
Des cultures de cellules en phase exponentielle de croissance des lignées MDA-MB-468 ou MCF-7 ont étéensemencées sur plaques 96 puits à raison de 6000 cellules par puits dans 50 µL de milieu de culture. 24 h après ensemencement, 50 µL de milieu contenant le composé d'intérêt (gamme de concentrations diluées au 10<sup>e</sup>) sont ajoutés aux puits contenant les cellules (en triplicat), et incubées pendant 48 h à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après une période d'exposition de 48 h avec les composés à tester, 50 µL du réactif MTT (2,5 mg/mL) sont ajoutés dans chacun des puits. Après 3 h 30 d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière, le contenu de chacun des puits est vidé en retournant délicatement les plaques sur du papier absorbant. Les cristaux de formazan formés sont alors dissous par ajout de 100 µL de DMSO puis chacune des plaques est agitée pendant 30 minutes à température ambiante. La densité optique est alors mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques de type Bio-Rad Model 680 XR à 570 nm.

La concentration du composé inhibant la viabilité cellulaire de 50 % (CI<sub>50</sub>) a été déterminée graphiquement en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont présentés sous forme d'une moyenne associée à son écart type. Il est à noter que certains composés testés ont une faible solubilité dans le DMSO et que leur activité n'a pas pu être quantifiée.

### **2 - Résultats biologiques et discussion**

Vingt-sept molécules dont deux références, la novobiocine et le 17-AAG, ont été testées sur les deux lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-468. Le **tableau 30** présente les résultats obtenus.

Partie B : Étude biologique

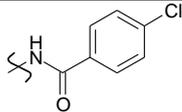
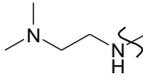
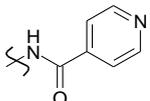
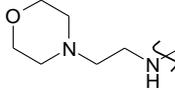
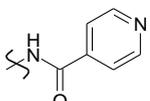
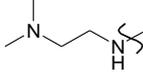
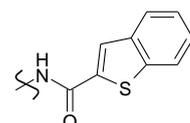
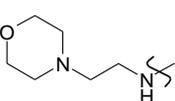
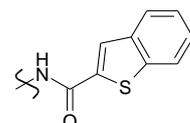
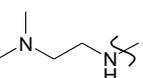


Produit	$R_3$	$R_7$	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) MCF-7	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) MDA-MB-468
17-AAG (tanespimycine) Inhibiteur N-terminal de la Hsp90			$0,029 \pm 1,54 \mu M$ (Litt : $5 \text{ nM}$ ) <sup>261</sup>	$1,57 \pm 1,42 \mu M$
Novobiocine Inhibiteur C-terminal de la Hsp90			$293,3 \pm 2,60 \mu M$ (Litt : $260 \mu M$ ) <sup>188</sup>	$338,40 \pm 9,05 \mu M$
31			$>100 \mu M$	$>100 \mu M$
32			$>100 \mu M$	$>100 \mu M$
33			$>100 \mu M$	$>100 \mu M$
34			$27,41 \pm 1,68 \mu M$	$12,05 \pm 1,81 \mu M$
35			$>100 \mu M$	$>100 \mu M$
36			$35,09 \pm 1,24 \mu M$	$18,27 \pm 1,51 \mu M$
37			$> 100 \mu M$	$> 100 \mu M$
38			$55,77 \pm 1,91 \mu M$	$20,41 \pm 1,50 \mu M$

<sup>261</sup> Kamal, A. et al., *Nature* **2003**, 425, 407-410.

Partie B : Étude biologique

19			>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
21			>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
22			$37,26 \pm 1,58 \mu\text{M}$	$15,71 \pm 1,56 \mu\text{M}$
23			$8,59 \pm 1,43 \mu\text{M}$	$10,47 \pm 3,30 \mu\text{M}$
24			$35,37 \pm 0,33 \mu\text{M}$	$12,55 \pm 1,57 \mu\text{M}$
38			>100 $\mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
18			$43,25 \pm 1,38 \mu\text{M}$	$17,44 \pm 1,72 \mu\text{M}$
40			$48,56 \pm 1,78 \mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$
41			$21,47 \pm 1,40 \mu\text{M}$	$15,59 \pm 1,92 \mu\text{M}$
26			$4,85 \pm 1,31 \mu\text{M}$	$1,96 \pm 1,83 \mu\text{M}$
27			$1,93 \pm 1,55 \mu\text{M}$	$1,68 \pm 1,67 \mu\text{M}$
28			$15,20 \pm 1,31 \mu\text{M}$	$14,67 \pm 1,70 \mu\text{M}$
30			$6,00 \pm 1,34 \mu\text{M}$	$1,87 \pm 1,59 \mu\text{M}$
42			$6,35 \pm 2,04 \mu\text{M}$	>100 $\mu\text{M}$

43			3,09 ± 2,04 μM	1,64 ± 1,56 μM
44			4,47 ± 4,12 μM	>100 μM
45			36,56 ± 2,48 μM	8,36 ± 2,68 μM
46			>100 μM	>100 μM
47			12,03 ± 1,40 μM	3,57 ± 1,76 μM

**Tableau 30** : Évaluation des composés synthétisés, analogues de la novobiocine sur MCF-7 et MDA-MB-468.

- : composés présentant une activité inférieure à 10 μM.  
 : composés sélectionnés pour la suite des tests sur lignées cellulaires.

Les  $CI_{50}$  mesurées pour le 17-AAG et la novobiocine sont peu différentes de celles retrouvées dans la littérature (5 nM et 260 μM, respectivement pour MCF-7). Neuf molécules (**(31)**, **(32)**, **(33)**, **(35)**, **(37)**, **(19)**, **(21)**, **(38)**, et **(46)**) n'ont pas d'effet significatif à une concentration supérieure à 100 μM sur les 2 lignées testées, limite que l'on a choisi d'appliquer pour sélectionner les molécules les plus actives. Trois molécules (**(40)**, **(42)**, **(44)**) présentent une activité antiproliférative uniquement sur la lignée MCF-7. Au total, quatre composés (**(26)**, **(27)**, **(30)**, **(43)**) possèdent une activité inférieure à 10 μM sur les deux lignées cellulaires, mais aucun n'est aussi actif que le 17-AAG. Les composés **(31)** et **(32)** ne présentent aucune activité sur les deux lignées, ce qui semble souligner l'importance d'un groupement benzamide. Tous les composés présentant un motif *N,N*-diméthyléthylènediamine montrent une activité, qui, de plus, est toujours plus importante que leurs analogues substitués par la *N*-(2-aminoéthyl)morpholine. Celle-ci semble donc à privilégier pour les fonctionnalisations ultérieures.

L'introduction des groupements méthoxy qu'ils soient en positions méta **(38)** et **(18)**, para **(21)** à **(24)** ou simultanément en ortho, ortho' et para **(40)** et **(41)** sur le noyau phényle conduit à une modeste activité antiproliférative, les composés **(21)** et **(38)** étant eux, inactifs. Les composés **(26)**, **(27)**, **(28)** et **(30)** comportant le motif biphenyle sont les plus intéressants et présentent tous de bonnes activités sur les deux lignées cellulaires suggérant sans doute l'importance d'un groupement hydrophobe très encombré. Le dérivé **(28)** semble moins actif avec une  $CI_{50}$  plus élevée. Les dérivés substitués en 4 par un atome de chlore **(42)** et **(43)** montrent aussi de très bons résultats sauf le composé **(42)** qui n'est pas actif sur la lignée MDA-MB-468 suggérant que l'activité de ce produit, qui varie selon les fonds cellulaires utilisés, dépend d'une cible différenciellement exprimée entre ces lignées. Que ce soient des

groupements électroattracteurs ou électrodonneurs, nous n'observons pas d'incidence sur l'activité des différents analogues. L'influence de l'introduction d'un hétérocycle a aussi été prise en considération. Les deux analogues substitués par une pyridine (**44**) et (**45**) montrent étonnamment des activités très différentes. Ainsi le composé (**44**) montre une très bonne  $CI_{50}$  sur la lignée MCF-7 mais est inactif sur la lignée MDA-MB-468. Le dérivé (**45**) est actif sur les deux lignées avec une activité prédominante sur MDA-MB-468. Enfin, concernant les composés benzothiényles, seul (**47**) est intéressant avec une très bonne activité antiproliférative, (**46**) se montrant inactif. Le statut p53 de ces lignées, muté pour l'une et sauvage pour l'autre, pourrait contribuer à générer des réponses cellulaires différentes.

Cinq composés ont été sélectionnés (voir **tableau 30**) pour la suite des analyses sur lignées cellulaires. Les critères retenus ont été une activité antiproliférative importante sur les deux lignées cellulaires. Pour cela, les composés (**23**), (**43**) et (**47**) ont été choisis car ils présentent les meilleures  $CI_{50}$ . Tous les dérivés biphényles (**26**) à (**28**) et (**30**) semblent prometteurs et ont aussi été sélectionnés. Ainsi, en accord avec les données de RSA présentées dans les objectifs de recherche, l'importance d'un amide secondaire encombré en position 3 ainsi que la présence d'une chaîne latérale aminée en position 7 semblent à privilégier.

## ***C - Evaluation de la mort cellulaire par marquage à l'annexine V-FITC***

### **1 - Principe**

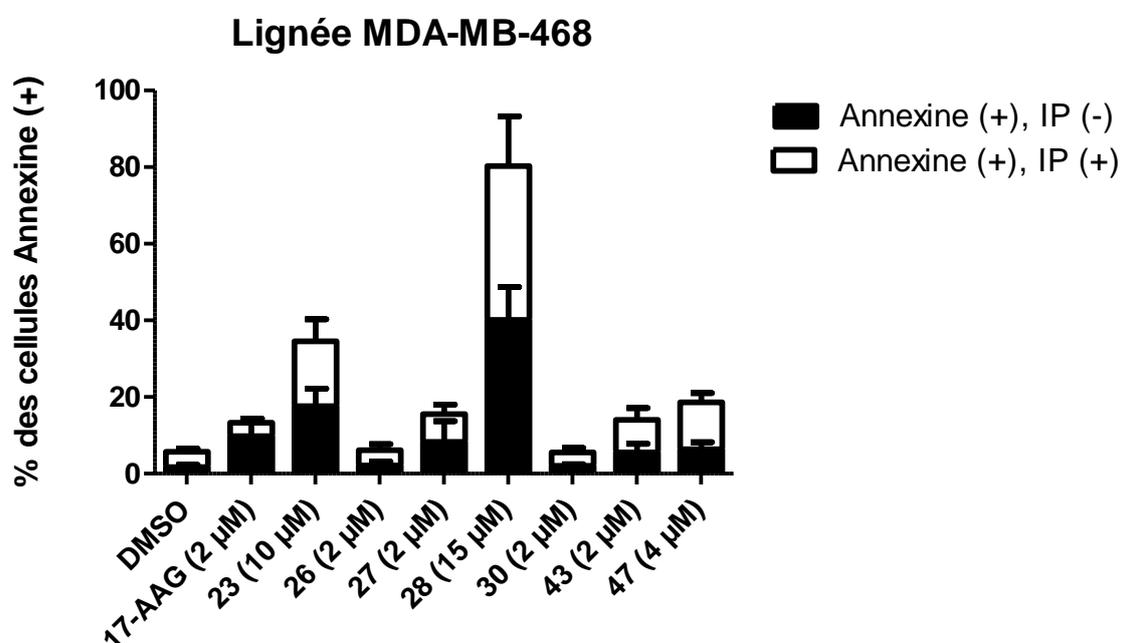
L'annexine V est une protéine reconnaissant la phosphatidylsérine avec une grande affinité. Ce phospholipide, normalement localisé sur la face interne de la membrane plasmique cellulaire, va se retrouver sur la face externe de la membrane plasmique lors du déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. L'annexine V est conjuguée au FITC (fluorochrome) et le test de marquage est couplé avec un marquage IP (iodure de propidium). L'iodure de propidium est un intercalant des acides nucléiques fluorescent (dans le rouge) incapable de traverser la membrane cellulaire lorsque celle-ci est intègre. Dans des conditions de marquage sans perméabilisation, c'est donc un fluorochrome capable de marquer les cellules altérées. Ainsi, une double détection de la fluorescence par cytométrie en flux est réalisée. La détection de cellules positives pour l'annexine V et négatives pour l'IP (Annexine V (+) IP (-)) permet de mettre en évidence des cellules engagées dans une voie de mort cellulaire par apoptose sans altération majeure de l'intégrité membranaire. Le double marquage Annexine V (+) IP (+) identifie une population cellulaire dont la membrane est perméable à l'IP, correspondant à un processus de mort cellulaire plus tardive par apoptose ou par un processus nécrotique.

Des cellules MDA-MB-468 ont étéensemencées sur plaques 96 puits à raison de 40 000 cellules par puits dans 500  $\mu$ L de milieu de culture. 24 h après ensemencement, les composés d'intérêt sont ajoutés à une concentration connue aux puits contenant les cellules, et incubées pendant 48 h à 37 °C sous 5 % de  $CO_2$ . Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après une période d'exposition de 48 h avec les composés à tester, les

cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées. Le culot cellulaire est lavé avec du PBS froid puis incubé avec 150  $\mu\text{L}$  de Buffer 1X (préparé à partir du Buffer 20X du kit) contenant 1  $\mu\text{L}$  d'annexine V-FITC (kit Miltenyi Biotec) et 1  $\mu\text{L}$  d'IP pendant 15 minutes, sur glace et à l'abri de la lumière. La détection de fluorescence est réalisée immédiatement en FL1 / FL3 et l'acquisition sur 10 000 cellules par cytométrie en flux est réalisée à l'aide d'un FACS Calibur (Becton Dickinson) équipé d'un laser argon 488 nm. L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel Cell Quest. Les données ont été compilées graphiquement en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont présentés sous forme d'une moyenne associée à son écart type.

## 2 - Résultats biologiques et discussion

Après avoir mis en évidence une activité antiproliférative des composés (23), (26), (27), (28), (30), (43) et (47) sur les lignées MCF-7 et MDA-MB-468, nous avons recherché si cet effet pouvait être la conséquence du déclenchement d'une mort induite par ces molécules. Les analyses ont été réalisées sur la lignée MDA-MB-468 et à des concentrations correspondant aux  $\text{CI}_{50}$  des composés à tester. Le marquage à l'annexine V couplé à l'IP nous permet d'analyser la mort cellulaire par apoptose et de discriminer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques. Ainsi trois populations cellulaires peuvent être distinguées : les cellules vivantes (AV-, IP-), les cellules en apoptose précoce (AV+, IP-) et les cellules en apoptose tardive ou nécrose (AV+, IP+).<sup>262</sup> Les données présentent pour chacune des molécules les deux populations : une population AV+, IP- et une population AV+, IP+ (Figure 42).



**Figure 42** : Évaluation de la mort cellulaire par le double marquage AV, IP après 48 heures de traitement par chacun des composés d'intérêt sur les cellules MDA-MB-468.

<sup>262</sup> Lecoer, H.; Gougeon, M. L. *Revue française des laboratoires*, 1999, 311, 80-87.

Sur les sept molécules analysées, seules **(23)** et **(28)** montrent une cytotoxicité significative avec des mortalités respectives de 40 et 80 %, **supérieure à celle obtenue avec le 17-AAG**. Les molécules **(26)** et **(30)** n'induisent pas de mort cellulaire. Les molécules **(27)**, **(43)** et **(47)** ont une faible activité proche de celle du 17-AAG. L'activité antiproliférative de la novobiocine sur la lignée MDA-MB-468 étant faible, celle-ci n'a pas été incluse dans les tests de mort cellulaire.

## ***D - Analyse du cycle cellulaire par marquage IP***

### **1 - Principe**

Le cycle cellulaire est étudié à l'aide d'un marquage par l'iodure de propidium (IP) après perméabilisation de la membrane par un traitement des cellules par l'éthanol. Des cultures en phase exponentielle de croissance de cellules MDA-MB-468 ont étéensemencées sur plaques 24 puits à raison de 40 000 cellules par puits dans 500 µL de milieu de culture. 24 h après ensemencement, les composés d'intérêt sont ajoutés à une concentration connue aux puits contenant les cellules, et incubées pendant 48 h à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Chaque expérience a été répétée 3 fois de manière indépendante. Après une période d'exposition de 48 h avec les composés à tester, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées, lavées, perméabilisées à l'éthanol pendant au moins 18 h, et incubées 15 minutes avec 2 µg/mL d'IP à température ambiante. L'acquisition sur 20 000 cellules ainsi que l'analyse des données sont réalisées comme précédemment décrit.

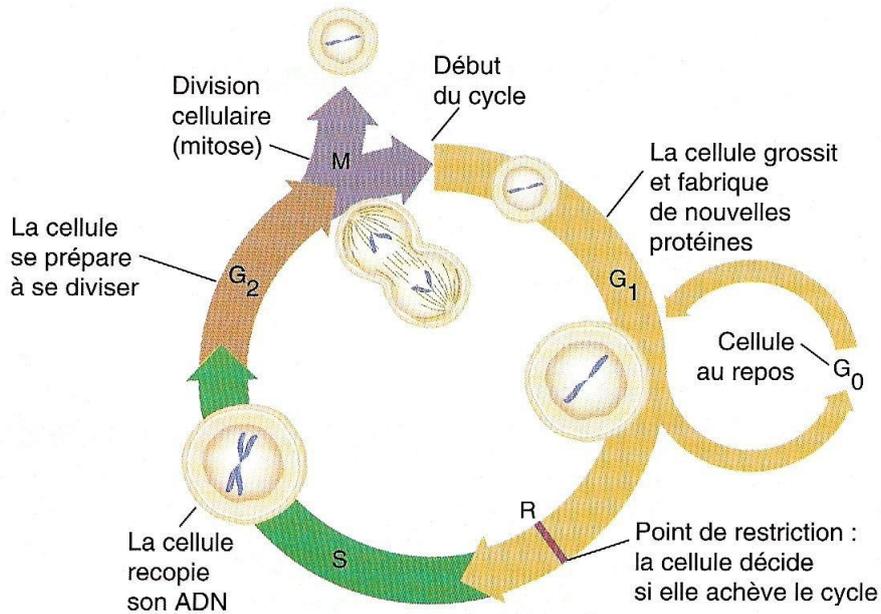
### **2 - Résultats biologiques et discussion**

Nous avons analysé l'effet de chacun des composés **(23)**, **(26)**, **(27)**, **(28)**, **(30)**, **(43)** et **(47)** sur le cycle cellulaire pour voir si l'effet antiprolifératif remarqué pouvait être la conséquence d'un arrêt du cycle cellulaire induit par ces molécules. Après avoir marqué les cellules par l'IP, nous avons utilisé la technique d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux (CMF) pour quantifier le contenu en ADN des cellules et ainsi déterminer leur répartition dans les différentes phases du cycle.

Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division de la cellule, il inclut plusieurs événements biochimiques et morphologiques associés à la prolifération cellulaire.

La CMF offre une méthodologie rapide et simple pour l'analyse du cycle cellulaire. Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues. Elle permet aussi de voir la présence de cellules avec des contenus anormaux d'ADN (étude de la ploïdie). La mesure du cycle cellulaire par des méthodes classiques de CMF divise le cycle en trois phases : **G0/G1**, phase de quiescence (G0) ou préparation des cellules (G1) (le contenu en ADN étant considéré comme égal à 2n pendant cette période), **S**, phase de synthèse de l'ADN (contenu en ADN entre 2n et 4n), **G2/M** phase de mitose (contenu en ADN égal à 4n). Une fois la phase

mitotique achevée, la cellule se divise et peut repasser en phase **G1** et recommencer le cycle de réplication ou entrer en phase **G0** et rester à l'état de repos jusqu'à sa réactivation (**Figure 43**).<sup>263,264</sup>



**Figure 43** : Les différentes phases du cycle cellulaire.<sup>263</sup>

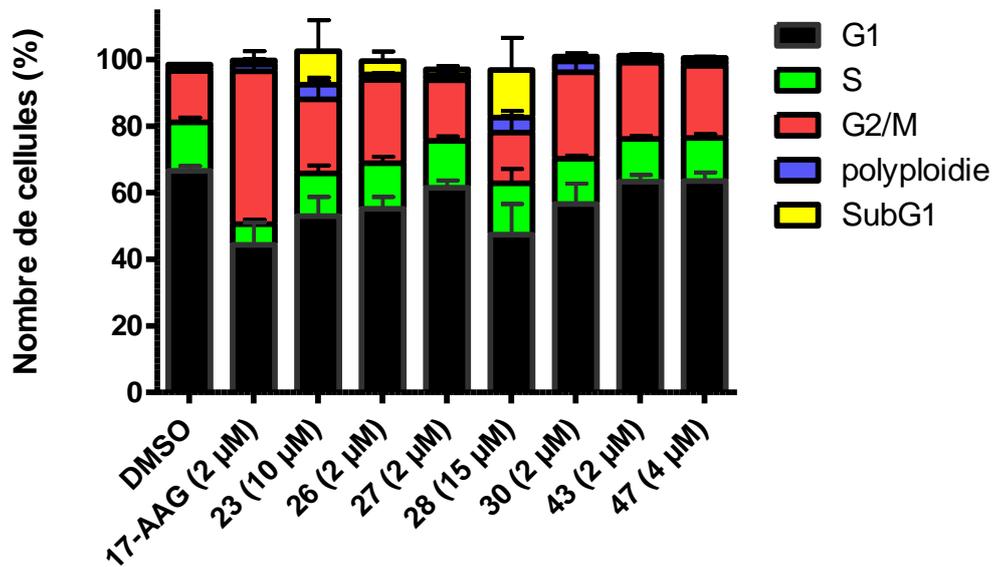
L'IP permettant une analyse stoechiométrique de l'ADN, il est bien adapté à l'étude du cycle cellulaire et de la ploïdie. La distinction entre **G0** (phase quiescente) et **G1** (phase de préparation à la synthèse d'ADN), ainsi que celle entre **G2** (préparation de la mitose) et **M** (mitose) n'est pas possible par cette technique. Cependant, la très grande majorité des cellules cancéreuses cultivées *in vitro* ne connaissent pas de phase G0 et les cellules détectées comme contenant une quantité d'ADN 2n correspondent à des cellules en phase G1. Enfin, le pic subG1 (correspondant à une quantité d'ADN inférieure à 2n et localisé juste avant le pic G0/G1 sur les histogrammes d'analyse obtenus en CMF) permet de déterminer la proportion de cellules en apoptose.<sup>265</sup> Les résultats sont donnés en pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle (**Figure 44**).

<sup>263</sup> <http://lecancer.pagesperso-orange.fr/la%20division%20cellulaire.htm>.

<sup>264</sup> The Cell: A Molecular Approach, Ed. Sinauer Associates, 2<sup>de</sup> édition, 2000, 689 pages.

<sup>265</sup> Culture de cellules animales, Ed. Lavoisier, 3<sup>e</sup> édition, 2014, 700 pages.

## Lignée MDA-MB-468

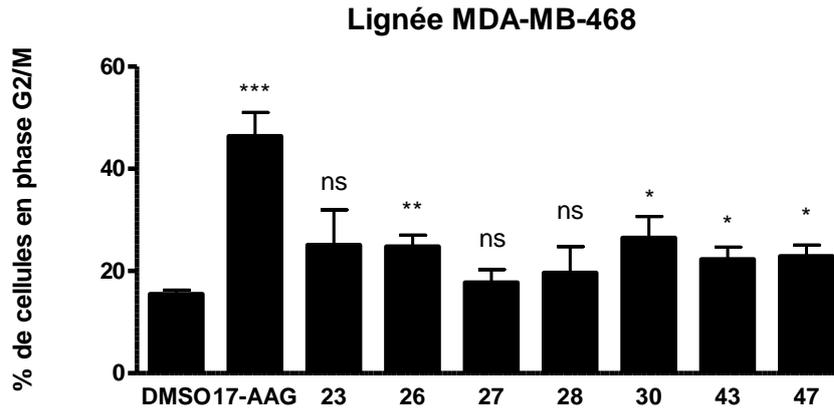


**Figure 44** : Répartition des cellules MDA-MB-468 dans les différentes phases du cycle cellulaire après 48 heures de traitement avec chacun des composés d'intérêt.

Les cellules MDA-MB-468 contrôle (DMSO) présentent un cycle cellulaire de profil classiquement observé dans les lignées cellulaires cancéreuses cultivées *in vitro* dans des conditions de croissance optimales avec une répartition dans les phases G1, S et G2/M représentée dans la **figure 44**. En ce qui concerne les cellules traitées, nous observons après 48 heures d'incubation, une accumulation progressive des cellules MDA-MB-468 et un blocage en phase G2/M pour le 17-AAG, ce qui concorde avec les données de la littérature.<sup>266</sup> Les composés (26), (30), (43) et (47) induisent une augmentation significative de la phase G2/M mais pas la (27) (**Figure 45**). Nous n'avons pas observé de modification majeure du cycle cellulaire par les molécules (23) et (28), on note cependant qu'elles induisent toutes les deux un pic subG1 représentatif d'une population cellulaire apoptotique, caractérisée par une fragmentation et une perte d'ADN, en accord avec les résultats de mort cellulaire précédents. Enfin, la présence de cellules polyploïdes (cellules présentant un nombre de chromosomes supérieur au double de la normale) sous l'effet de (23) et (28) suggère que ces molécules ont une activité sur le cycle cellulaire que les conditions expérimentales utilisées ici ne permettent pas de mettre en évidence. Il serait intéressant de poursuivre ces analyses à des temps plus courts d'exposition à ces molécules.

Après avoir réalisé ces tests cellulaires et mis en évidence pour certains composés des activités antiprolifératives associées à une cytotoxicité importante, une analyse par Western Blot a été pratiquée. Celle-ci nous a permis d'observer l'influence que pouvaient avoir ces molécules sur le niveau d'expression de certaines protéines clientes de la Hsp90.

<sup>266</sup> Wang, S. X. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, 75, 1540-1545.



**Figure 45** : Proportion de cellules MDA-MB-468 bloquées en phase G2/M après 48 heures de traitement avec chacun des composés d'intérêt. (Analyses réalisées en s'appuyant sur le test t de Student. Légende des P-values : \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*  $p < 0,05$  ; ns : non significatif).

### ***E - Analyse par Western Blot du niveau d'expression des protéines clientes de la Hsp90 après traitement des cellules cancéreuses par les molécules d'intérêt***

#### **1 - Principe**

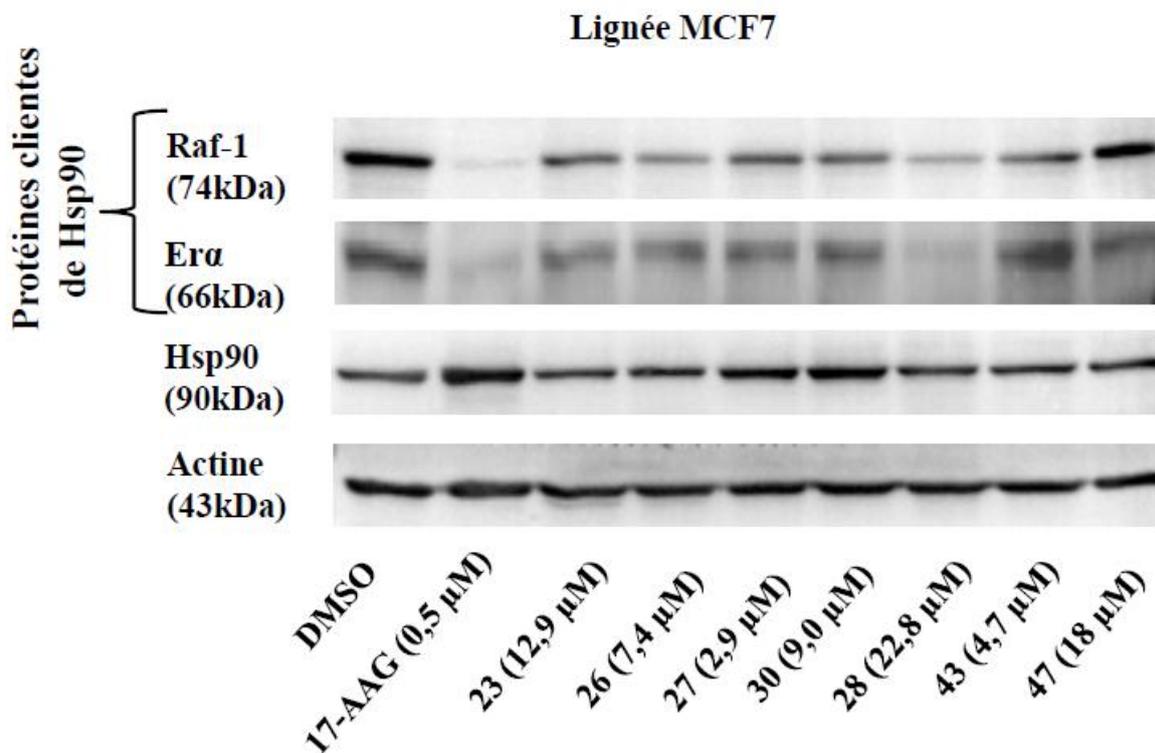
Le Western Blot est une méthode d'analyse des protéines après séparation par électrophorèse et transfert sur une membrane, basée sur l'hybridation d'anticorps spécifiques.

Le milieu de culture et les cellules sont récupérés et centrifugés 5 min à 300g. Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (SDS 1%, EDTA 10 nM, Tris-HCl pH 8,1 50 mM, inhibiteurs de phosphatases et protéases Pierce) puis soniqué par périodes de 15 min à l'aide d'un sonicateur Bioruptor (Diagenode) jusqu'à l'obtention d'un lysat homogène et fluide. Un dosage protéique est réalisé pour chaque échantillon à partir d'une gamme étalon effectué avec le kit BC Assay (Interchim). La réaction colorimétrique s'effectue après incubation 10 min à 37°C puis la DO est lue à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La même quantité de protéines solubles totales (entre 15 et 40 µg) pour tous les échantillons est additionnée de tampon de charge 4X (Tris-HCl pH 6,8 125 mM, glycérol 10%, SDS 4%, bleu de bromophénol et de β-mercaptoéthanol 5%). Les protéines sont ensuite dénaturées 5 min à 95°C puis déposées et séparées par SDS-PAGE selon leur poids moléculaire dans un gel d'électrophorèse présentant un gradient de concentration de 10 à 15% de SDS polyacrylamide (0,375M Tris pH 8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS, TEMED) (SDS-PAGE), puis transférées sur une membrane PVDF (Immobilion Transfer Membranes, Millipore) grâce à un électrotransfert en phase liquide. Les sites aspécifiques de la membrane sont bloqués avec 0,05% de WBR (Western Blocking Reagent, Roche) dans du TBS-Tween 0,05%, 1 h sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite mise à incuber une nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire dilué dans du TBS-Tween 0,05%. Les anticorps utilisés ont été les suivants : anticorps anti-Raf-1 (610151, BD Transduction Laboratories), anti-ER-α (sc-8002, Santa Cruz Biotechnology), anti-Hsp90 (610418, BD Transduction Laboratories) ou anti-

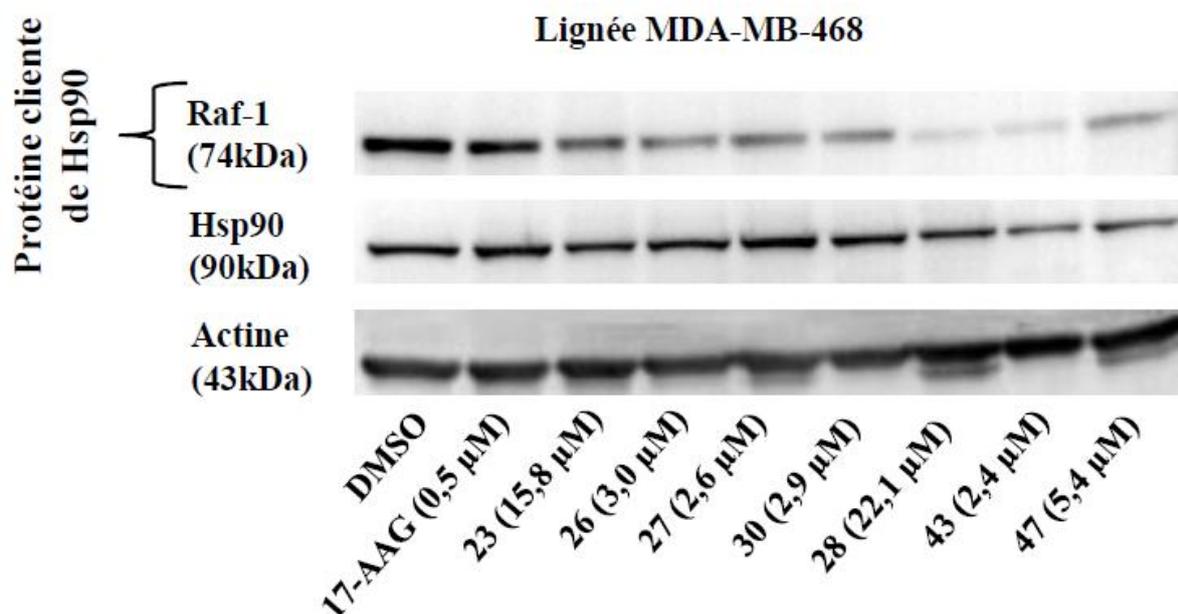
actine (MAB 1501, Merck Millipore), ce dernier permettant d'évaluer l'uniformité quantitative des échantillons déposés sur le gel. Après rinçages dans du TBS-Tween 0,05%, la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP dilué dans du TBS-Tween 0,05% puis rincée dans du TBS-Tween 0,05%. Les protéines d'intérêt sont détectées à l'aide du kit Clarity Western ECL Substrate (Biorad) par chimiluminescence. La révélation se fait à l'aide de l'appareil ChemiDoc MP System (Biorad) et du logiciel informatique ImageLab (BioRad). Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

## 2 - Résultats biologiques et discussion

Afin de relier l'activité antiproliférative des composés (23), (26), (27), (28), (30), (43) et (47) à une inhibition de la Hsp90, des analyses Western Blot ont été réalisées sur des protéines clientes de la Hsp90 au sein des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 traitées avec ces molécules (**Figure 46** et **47**). Deux protéines ont été retenues pour cette analyse : Raf-1 dont l'expression est bien détectable dans les 2 lignées cellulaires étudiées et ER- $\alpha$  (récepteur alpha aux œstrogènes) dans la lignée MCF-7 seulement car la lignée MDA-MB-468 ne l'exprime pas.



**Figure 46** : Analyses par Western Blot des protéines clientes de la Hsp90 sur la lignée MCF-7 traitée par les composés 23, 26, 27, 28, 30, 43 et 47.



**Figure 47** : Analyses par Western Blot des protéines clientes de la Hsp90 sur la lignée MDA-MB-468 traitée par les composés **23**, **26**, **27**, **28**, **30**, **43** et **47**.

Chacun des composés a été testé à une concentration égale à 1,5 fois sa  $CI_{50}$ . Leur capacité à induire la dégradation des protéines clientes a ainsi été évaluée. Le 17-AAG, inhibiteur *N*-terminal de la Hsp90, induit une forte dégradation des protéines clientes Raf-1 et ER- $\alpha$  à 0,5  $\mu$ M tandis qu'il induit une surexpression de la Hsp90, plus marquée dans MCF-7 que MDAMB-468, que l'on peut attribuer à l'induction d'une réponse au choc thermique comme cela a été décrit pour les inhibiteurs *N*-terminaux de la Hsp90.<sup>161</sup> On retrouve cet effet cependant nettement moins marqué avec les molécules (**27**) et (**30**). Les dérivés (**23**), (**26**), (**27**), (**30**), (**28**) et (**43**) diminuent les niveaux de la protéine Raf-1 avec des résultats plus marqués pour la molécule (**28**). Le composé (**47**) semble moins efficace à diminuer les niveaux de celle-ci, notamment dans la lignée MCF-7. Toutes les molécules tendent à diminuer l'expression de ER- $\alpha$  dans la lignée MCF-7. Les molécules (**23**), (**26**), (**28**), (**43**) et (**47**) conservent des niveaux de la Hsp90 constants suggérant qu'ils pourraient exercer leur activité inhibitrice à travers une interaction avec la région *C*-terminale (réponse au choc thermique non retrouvée avec les inhibiteurs *C*-terminaux). Enfin les niveaux d'expression de l'actine, protéine non dépendante de la Hsp90, demeurent inchangés indiquant que la diminution d'expression de protéines ne touche que les protéines clientes de la Hsp90 étudiées.

## V - Conclusion

Soixante-cinq molécules analogues stricts de la novobiocine et composés issus de couplages palladocatalysés ont été évalués à l'Institut de Génétique et Développement de Rennes. Un criblage en quatre temps a été conduit (solubilité DMSO 100%, détermination du seuil de solubilité en milieu aqueux, étude de l'interaction avec la Hsp90 entière et chacun de

ses domaines). En regard des problèmes de solubilité rencontrés, celui-ci a permis à l'heure actuelle de faire émerger seize composés capables d'interagir avec la protéine Hsp90 entière. Parmi eux, onze ont été testés vis-à-vis de chacun des domaines de la protéine chaperon et quatre ((10), (26), (27), (69)) se sont révélés être spécifiques du domaine C-terminal de la protéine.

Les tests réalisés au CRCNA sur les lignées MCF-7 et MDA-MB-468 ont montré eux aussi des résultats encourageants. Sept composés ont présenté des  $CI_{50}$  intéressantes sur ces deux lignées mammaires et ont pu faire l'objet d'analyses plus poussées sur leur capacité à induire de la mort cellulaire et à diminuer l'expression de protéines clientes de la Hsp90. Seuls les composés (23) et (28) comportant tous les deux un motif 1-(2-hydroxyéthyl)pipérazinyle en position sept ont montré une cytotoxicité importante et supérieure à celle du 17-AAG en terme d'induction de mort cellulaire de type apoptotique. Malheureusement, en raison de problèmes de solubilité, ceux-ci n'ont pas pu faire l'objet d'études de binding. Les dérivés (26), (30), (43) et (47) présentent au mieux une faible activité pro-apoptotique et semblent plus exercer une activité cytostatique par blocage partiel de la phase G2/M. Tous ces composés ont montré leur capacité à induire une diminution du niveau d'expression d'au moins deux protéines clientes de la Hsp90 (Raf-1 et ER- $\alpha$ ) dont certains (23), (26), (28), (43) et (47) semblent plus spécifiques de la région C-terminale car n'induisant pas l'expression de la Hsp90 elle-même. Le résultat obtenu pour le composé (26) concorde avec la spécificité vis-à-vis du domaine C-terminal révélée lors de l'étude de binding. Cette spécificité d'interaction devra également être confirmée ultérieurement concernant les molécules (43) et (47).

Dernièrement un test (non présenté ici) basé sur la capacité de ces composés à empêcher la renaturation de la luciférase par blocage de l'activité chaperon de la Hsp90 a été envisagé. Celui-ci s'est appuyé sur les travaux de Sadikot *et al.*<sup>267</sup> dans lesquels ces auteurs ont montré que l'inactivation de la luciférase par la chaleur dans des cellules cancéreuses génétiquement modifiées pour exprimer le gène codant pour la luciférase (firefly), était un processus réversible dépendant notamment de l'activité chaperon de la Hsp90. L'utilisation d'inhibiteurs de la Hsp90 empêche la reconformation et par conséquent l'activité enzymatique de la luciférase qui est révélée en présence de son substrat, la D-luciférine, induisant une luminescence quantifiée par un luminomètre. Des résultats préliminaires obtenus par ce test fonctionnel en cellules entières, indiquent que les molécules analysées (sauf la (43)) diminuent significativement l'activité luciférase, comme les contrôles positifs 17-AAG et novobiocine, suggérant qu'elles sont capables d'interférer avec la renaturation de la luciférase après traitement par la chaleur, processus décrit comme étant dépendant de la Hsp90. Des analyses complémentaires doivent être réalisées pour confirmer ces résultats mais participent au faisceau d'arguments arguant pour un impact de ces molécules sur la Hsp90.

---

<sup>267</sup> Sadikot, T. *et al.*, *Assay Drug Dev. Technol.* **2013**, *11*, 478-488.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

L'objectif de ces travaux de recherche consistait à concevoir de nouveaux azahétérocycles analogues de la novobiocine et inhibiteurs potentiels de la Hsp90. Cinquante-sept produits finaux ont été synthétisés en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one dont trente analogues stricts de type amide et vingt-sept autres composés originaux hautement fonctionnalisés.

L'accès aux composés cibles a été envisagé selon deux voies. La première a permis d'aboutir, par des méthodes classiques d'hétérocyclisation, à une 3-amino-7-chloro-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one. Celle-ci a ensuite été amidifiée en position 3 à l'aide de divers chlorures d'acides fonctionnalisés puis substituée sur le chlore en 7 par différentes amines aliphatiques. Un grand nombre de composés a ainsi été isolé et a pu être évalué biologiquement. Malgré l'ajout de chaînes aminées hydrophiles sur cet hétérocycle, nous avons été confrontés à des problèmes de solubilité conséquents en milieu aqueux, nous amenant à synthétiser des chlorhydrates afin de contourner ces difficultés. Cette alternative s'est révélée fructueuse par la suite pour l'étude de la solubilité nous permettant de procéder à leur évaluation biologique et d'en dégager des résultats intéressants.

La seconde voie d'accès s'est attachée à étudier différentes réactions de couplages palladocatalysés et de substitutions nucléophiles aromatiques. Nous avons ainsi développé quatre séquences « one-pot » originales en exploitant la réactivité de 3,7-dihalogéno-1-méthyl-1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones, ce qui nous a permis d'accéder rapidement à des 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-ones originales fonctionnalisées en positions 3 et 7. Ces travaux de méthodologie ont abouti à deux publications.<sup>268,269</sup>

Les tests préliminaires de solubilité nous ont malheureusement conduits à éliminer vingt-neuf composés sur les soixante-cinq testés. Les trente-six composés restants ont ensuite été évalués sur leur capacité à interagir avec la Hsp90 par des mesures de fluorescences à deux stœchiométries différentes en présence et en absence de la Hsp90. Seize composés ont montré une variation de fluorescence intrinsèque importante en présence de la protéine chaperon et ont pu être testés de manière plus affine sur chacun des domaines *N*- et *C*-terminaux de la protéine. Une molécule s'est liée préférentiellement sur le domaine *N*-terminal et, de manière plus intéressante, quatre se sont révélées plus spécifiques du domaine *C*-terminal. En parallèle, deux déterminations de constantes de dissociations ont été effectuées et ont donné de bons résultats.

Les travaux ultérieurs doivent viser dans un premier temps, à achever les études de binding et de spécificité de domaine afin d'espérer voir émerger d'autres composés prometteurs spécifiques du domaine *C*-terminal. Par la suite, ces composés seront sélectionnés et leur liaison à la Hsp90 sera étudiée plus en détail pour déterminer les constantes d'affinité par fluorescence et / ou microcalorimétrie.

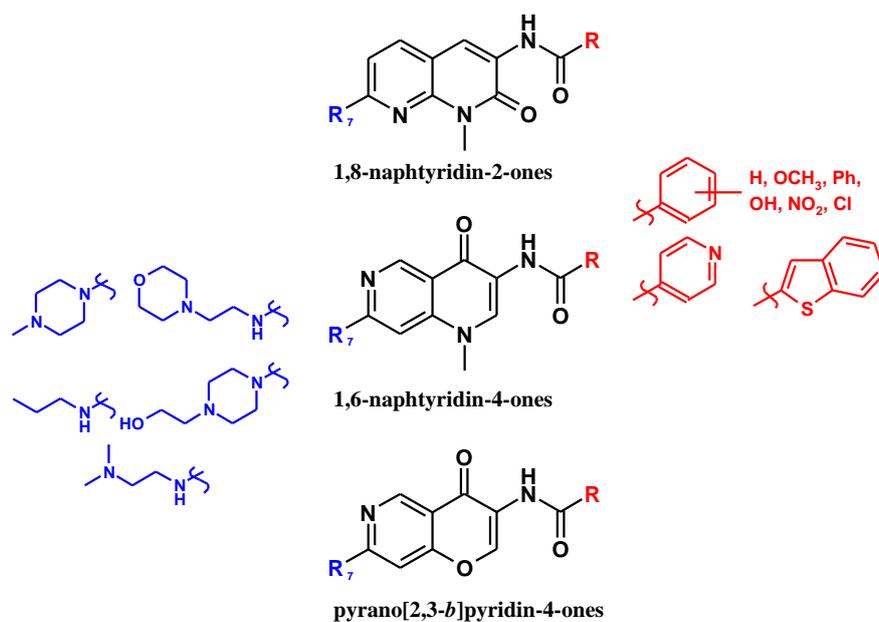
Dans un second temps, les mesures de viabilité cellulaire réalisées sur les deux lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-468 connues pour surexprimer la Hsp90, ont permis de voir émerger de très bonnes activités pour certains composés. Quatre d'entre eux ont présenté une activité inférieure à 10  $\mu$ M sur chacune des deux lignées. Les composés

<sup>268</sup> Montoir, D. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7, 1487-1495.

<sup>269</sup> Montoir, D. *et al.*, *Tetrahedron* **2015**, 71, 3303-3313.

comportant le noyau 3-phénylbenzamidinyle en position 3 se sont montrés les plus actifs en terme d'activité antiproliférative. Les études de mort cellulaire réalisées par la suite ont conforté ces premiers résultats, et deux composés dont un dérivé biphényle encore une fois, ont montré une cytotoxicité significative avec des mortalités obtenues supérieures à celle induite par le 17-AAG utilisé comme référence. Des analyses par Western Blot du niveau d'expression de certaines protéines clientes de la Hsp90 ont été réalisées sur les composés les plus prometteurs. Nous avons ainsi pu constater qu'ils induisaient une baisse du signal de ces protéines clientes à des concentrations se rapprochant de leur  $CI_{50}$ . Il a été intéressant de constater que la majorité d'entre eux n'induisaient pas d'« up-régulation » de la Hsp90, pouvant être considéré comme une signature des inhibiteurs C-terminaux. Ces résultats concordent avec ce qui a pu être observé en fluorescence. Les résultats préliminaires encourageants obtenus sur l'étude du blocage de la renaturation de la luciférase doivent être poursuivis. Des résultats positifs consolideront le fait que ces molécules agissent par inhibition de la Hsp90. A plus long terme des études *in vivo* pourront être initiées.

D'un point de vue chimique, la nouvelle série 1,6-naphtyridin-4(1*H*)-one doit continuer à être travaillée, et les motifs ayant montré une bonne activité biologique en série 1,6-naphtyridin-2(1*H*)-one devront être incorporés sur ce nouvel azahétérocycle pour faire apparaître de nouvelles activités vis-à-vis de la cible. Malheureusement, l'absence à l'heure actuelle de co-cristallisation entre la protéine chaperon Hsp90 et un inhibiteur C-terminal rend difficile l'utilisation d'une approche de conception rationnelle. Malgré cela, les très bons résultats obtenus sur la première série de molécules doivent nous inciter à poursuivre les travaux de pharmacomodulations, notamment en incorporant des motifs encombrés sur l'amide situé en position 3. La présence d'une chaîne hydrophile est également à privilégier sur la position 7. Enfin, et selon les résultats obtenus, ces travaux de synthèse pourront être étendus à d'autres scaffolds (**Schéma 55**) pour espérer obtenir des inhibiteurs ciblant spécifiquement le domaine C-terminal de la Hsp90.



**Schéma 55** : Pharmacomodulations pouvant être envisagées sur de nouvelles séries chimiques.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

## I - General methods

All commercial reagents were used without further purification. All solvents were reagent or HPLC grade. Analytical TLC was performed on silica gel 60 F254 plates. Column chromatography was carried out on silicagel Merck 60 (70-230 mesh ASTM). Yields refer to chromatographically and spectroscopically pure compounds. Melting points were determined on an Electrothermal IA 9000 melting point apparatus and are uncorrected. Infrared spectra (IR) were recorded on a Shimadzu IRAffinity-1 IR-FT spectrophotometer equipped with a MIRacle 10 accessory ATR.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded in  $\text{CDCl}_3$  or  $\text{DMSO}-d_6$  using a Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported as  $\delta$  values in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane as internal standard and coupling constants ( $J$ ) are given in hertz (Hz). Multiplicities are reported as follows: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, ddd = doublet of doublet of doublets, t = triplet, appt = apparent triplet, m = multiplet, q = quartet, br s = broad singlet. LC/MS analyses were run on a Waters ACQUITY UPLC-MS system consisting of a Single Quadrupole Detector (SQD) Mass Spectrometer (MS) equipped with an Electrospray Ionization Interface (ESI) and a Photodiode Array detector (PDA). HRMS analyses were performed with an IT-TOF mass spectrometer composed of an ESI ion source and a hybrid Ion Trap-Time-Of-Flight mass analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Microwave reactions were carried out on a CEM Discover SP monomode apparatus.

## II - General procedures

### **Procedure A: General procedure for preparation of acyl chlorides**

A mixture of the corresponding carboxylic acid (1.0 g, 0.66 mmol) and thionyl chloride (20 mL) was refluxed for 3 hours. The excess thionyl chloride was removed under vacuum and the resulting acyl chloride was used for the next step without further purification.

### **Procedure B: General procedure for amidation of amine 5. Synthesis of amides 6-17**

3-Amino-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one **5** (400 mg, 1.91 mmol) was dissolved in dry pyridine (10 mL). The corresponding acyl chloride (0.49-1.45 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.) was added and the reaction mixture was refluxed for 1 to 5 h. After cooling, water was added and the organic layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was washed with 1M HCl, brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by silica gel chromatography to provide **6-17**.

### **Procedure C: General procedure for $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ of amides 6-17. Synthesis of amides derivatives 18-47**

In a 10 mL vessel were added the amide (75 mg, 0.19-0.30 mmol) and the appropriate aliphatic amine: 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (0.50-0.79 mL, 3.80-6.00 mmol, 20.0 equiv.),

## Experimental section

*N,N*-dimethylethylenediamine (0.41-0.65 mL, 3.80-6.00 mmol, 20.0 equiv.), 1-(2-hydroxyethyl)piperazine (0.47-0.74 mL, 3.80-6.00 mmol, 20.0 equiv.), 1-methylpiperazine (0.42-0.67 mL, 3.80-6.00 mmol, 20.0 equiv.) or *n*-propylamine (0.31-0.49 mL, 3.80-6.00 mmol, 20.0 equiv.). The tube was sealed, and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 130 to 170 °C for 1 to 6 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography to provide **18-47**.

### **Procedure D: General procedure for preparation of hydrochloride salts 48-52**

A solution of the amide derivative (50 mg, 0.10-0.13 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was stirred under inert atmosphere. A mixture of THF/HCl 1M (100-130 μL, 0.10-0.13 mmol, 1.0 equiv.) was added and the reaction was stirred at room temperature for 15 h. The precipitate was collected by filtration and rinsed with Et<sub>2</sub>O to provide the corresponding hydrochloride salts **48-52**.

### **Procedure E: General procedure for halodecarboxylation of carboxylic acid 53 or 101 with NBS or NIS**

In a 10 mL vessel, to a solution containing carboxylic acid **53** or **101** (100 mg, 0.42 mmol) in a DMF/water mixture (9:1, 5 mL) were added NXS (313 mg, 1.76 mmol, 4.2 equiv. for NBS, or 301 mg, 1.35 mmol, 3.2 equiv. for NIS) and LiOAc (33 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.). The tube was sealed and then heated under microwave heating at 110 °C for 10 min. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography or triturated with diisopropyl ether to provide **54**, **55**, **102** and **103**.

### **Procedure F: General procedure for Suzuki–Miyaura cross-coupling of 55**

In a 10 mL vessel were added compound **55** (100 mg, 0.31 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 5 mL), the appropriate boron reagent (41-70 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and the reaction was heated in an oil bath at 80 °C from 1.5 to 11 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography to provide **56-58**, **62-65**.

### **Procedure G: General procedure for Buchwald-Hartwig cross-coupling of 54**

In a 10 mL vessel were added compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), the appropriate amine or amide (22-56 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.),

## Experimental section

Pd(OAc)<sub>2</sub> (5 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) in 1,4-dioxane (3 mL). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated in an oil bath at 105 °C from 1 to 4 h. The resulting suspension was cooled to room temperature and filtered through Celite<sup>®</sup> eluting with ethyl acetate, and the inorganic salts were removed. The filtrate was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography providing **6, 9, 66-71**.

### **Procedure H: General procedure for microwave-promoted Suzuki–Miyaura cross-coupling of 3-aryl- or 3-N-substituted-1,6-naphthyridin-2(1H)-ones**

In a 40 mL vessel were added 3-aryl- or 3-N-substituted-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (150 mg, 0.44-0.55 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 10 mL), the appropriate boron reagent (74-125 mg, 0.49-0.61 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (130-146 mg, 1.23-1.38 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23-35 mg, 0.02-0.03 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 105 °C for 1 or 2 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography to provide **59, 72-78**.

### **Procedure I: General procedure for microwave-promoted Buchwald-Hartwig cross-coupling of 3-N-substituted-1,6-naphthyridin-2(1H)-ones**

In a 10 mL vessel were added 3-N-substituted-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (150 mg, 0.44-0.52 mmol), the appropriate amine (41-64 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (287-339 mg, 0.88-1.04 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7-18 mg, 0.03-0.08 mmol, 0.05-0.15 equiv.) and Xantphos (12-46 mg, 0.03-0.08 mmol, 0.05-0.15 equiv.) in 1,4-dioxane (3 mL). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated under microwave irradiation at 105 °C from 0.5 to 2 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography to provide **79-81**.

### **Procedure J: General procedure for microwave-promoted one-pot two-step Suzuki–Suzuki coupling reaction of 7-chloro-3-iodo-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one 55**

In a 40 mL vessel were added compound **55** (150 mg, 0.47 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 10 mL), the appropriate boron reagent (57-96 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and the reaction was heated under microwave irradiation at 80 °C from 10 min to 1.5 h. After completion of the reaction (monitored by UPLC–MS), the second boron reagent (57-96 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and the mixture was subjected to microwave irradiation at 105 °C from 1.5 h to 3.5 h. After cooling, water was added, and the mixture was

extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography to provide **59**, **83-85**.

**Procedure K: General procedure for microwave-promoted one-pot two-step Buchwald-Suzuki coupling reaction of 3-bromo-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one 54**

In a 40 mL vessel were added compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 4.5 mL), the appropriate amine, amide, urea or sulfonamide (48-103 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated under microwave irradiation at 105 °C from 20 min to 2 h. After completion of the reaction (monitored by UPLC-MS), the appropriate boron reagent (134-226 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture. The tube was sealed, and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 105 °C from 1 to 2 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography to provide **76**, **86-89**.

**Procedure L: General procedure for microwave-promoted one-pot two-step Buchwald-Buchwald coupling reaction of 3-bromo-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one 54**

In a 40 mL vessel were added compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 4.5 mL), the appropriate amine, amide or azaheterocycle (61-79 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated under microwave irradiation at 105 °C from 10 min to 2.5 h. After completion of the reaction (monitored by UPLC-MS), the second amine or amide (51-98 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (13-38 mg, 0.06-0.17 mmol, 0.10-0.30 equiv.) and Xantphos (35-98 mg, 0.06-0.17 mmol, 0.10-0.30 equiv.). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min, and the reaction was subjected to microwave irradiation at 105 °C from 40 min to 2 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography to provide **79**, **90-94**.

**Procedure M: General procedure for microwave-promoted one-pot two-step Buchwald-S<sub>N</sub>Ar reaction of 3-bromo-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one 54**

In a 40 mL vessel were added compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 4.5 mL), the appropriate amine or amide (61-83 mg, 0.55 mmol,

### *Experimental section*

1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (1 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated under microwave irradiation at 105 °C from 10 to 20 min. After completion of the reaction (monitored by UPLC-MS), 4-(2-aminoethyl)morpholine (1.45 mL, 11.0 mmol, 20.0 equiv.) or 1-methylpiperazine (1.22 mL, 11.0 mmol, 20.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture. The tube was sealed and the reaction was subjective to either heat or microwave irradiation at 150 °C for 1 h or from 68 to 92 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography to provide **21**, **95-97**.

### III - Protocols and characterizations

#### Ethyl 4,6-dihydroxynicotinate (1)

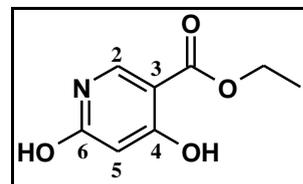
Yellow powder

$C_8H_9NO_4$

MW = 183.16 g.mol<sup>-1</sup>

Mp = 220-221 °C

Yield = 72%



A mixture of diethyl 1,3-acetonedicarboxylate (25.00 g, 0.12 mol), triethyl orthoformate (21.96 mL, 0.13 mol, 1.1 equiv.) and acetic anhydride (22.64 mL, 0.24 mol, 2.0 equiv.) was heated at 120 °C for 3 h. The light yellow oily solution was cooled in an ice bath, and then ammonia (30% solution, 35.00 mL) was added. The precipitate was collected by filtration and rinsed with cold EtOH to afford **1** (16.19 g, 72% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.83 (s, 1H, OH), 10.79 (s, 1H, OH), 8.05 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 5.64 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 4.29 (q, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166.59 (C=O), 165.91 (C<sub>6</sub>), 163.58 (C<sub>4</sub>), 142.34 (C<sub>2</sub>), 100.66 (C<sub>3</sub>), 98.34 (C<sub>5</sub>), 60.64 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3104 (νO-H); 3049 (νC-H<sub>ar</sub>); 2997, 2938 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1688 (νC=O); 1614, 1462 (νC=C)

MS (ESI), m/z (%): 184.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

#### Ethyl 4,6-dichloronicotinate (2)

White powder

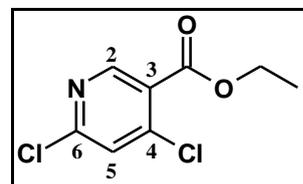
$C_8H_7Cl_2NO_2$

MW = 220.05 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.45 (cyclohexane/ethyl acetate: 90/10)

Mp = 71-72 °C

Yield = 95%



A mixture of compound **1** (5.00 g, 0.03 mol) and POCl<sub>3</sub> (30 mL, 0.33 mol, 11.0 equiv.) was refluxed for 2 h. After cooling, the mixture was poured into ice water, and the resulting mixture was neutralized at 0 °C with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (approximately 100 g). The organic layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and

## Experimental section

concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (dichloromethane) to give **2** (5.72 g, 95% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.87 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.03 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.40 (q, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.37 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 162.66 (C=O), 153.47 (C<sub>6</sub>), 151.67 (C<sub>2</sub>), 144.50 (C<sub>4</sub>), 125.82 (C<sub>5</sub>), 125.30 (C<sub>3</sub>), 61.98 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.88 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3072 (νC-H<sub>ar</sub>); 2978, 2938, 2874 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1730 (νC=O); 1447 (νC=C), 696 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 220.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 222.0 (65) [M+H+2]<sup>+</sup>, 224.0 (10) [M+H+4]<sup>+</sup>.

### Ethyl 6-chloro-4-(methylamino)nicotinate (3)

White powder

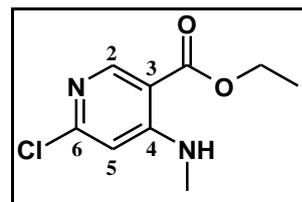
C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

MW = 214.65 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.45 (cyclohexane/ethyl acetate: 80/20)

Mp = 34-36 °C

Yield = 96%



Compound **2** (5.72 g, 0.03 mol) was dissolved in acetonitrile (80 mL). The solution was cooled to 0 °C, and methylamine (40% water solution, 18.00 mL, 0.45 mol, 15 equiv.) was slowly added. The reaction was stirred at 0 °C for 30 min and then warmed to room temperature for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 80:20) to provide **3** (5.37 g, 96% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.54 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.10 (br s, 1H, NH), 6.77 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 4.33 (q, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.91 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 1.34 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 166.25 (C=O), 156.04 (C<sub>4</sub>), 154.53 (C<sub>6</sub>), 152.0 (C<sub>2</sub>), 106.69 (C<sub>3</sub>), 104.58 (C<sub>5</sub>), 60.03 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29.07 (NHCH<sub>3</sub>), 14.01 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3348(νN-H); 3072 (νC-H<sub>ar</sub>); 2990, 2943, 2903 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1690 (νC=O); 1591, 1508, 1450 (νC=C), 789 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 215.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 217.1 (37) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**6-Chloro-4-(methylamino)pyridine-3-carbaldehyde (4)**

White powder

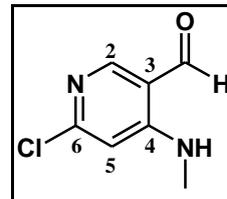
$C_7H_7ClN_2O$

MW = 170.60 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.24 (cyclohexane/ethyl acetate: 80/20)

Mp = 81-82 °C

Yield = 84%



To a mixture of LiAlH<sub>4</sub> (1.95 g, 51.5 mmol, 2.10 equiv.) in anhydrous THF (81 mL) at -78 °C was added dropwise compound **3** (5.26 g, 24.5 mmol) in anhydrous THF (72 mL). The reaction mixture was stirred at -78 °C for 3 h and then gradually warmed to room temperature. A mixture of MeOH/EtOAc (1:1, 20 mL) was slowly added to destroy the excess amount of LiAlH<sub>4</sub>. The resulting mixture was filtered through Celite<sup>®</sup>, and the filtrate was evaporated to dryness. The crude alcohol was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 mL), and MnO<sub>2</sub> (21.31 g, 245 mmol, 10.0 equiv.) was added. The reaction was stirred at room temperature for 2 h. The resulting mixture was filtered through Celite<sup>®</sup> to remove the MnO<sub>2</sub>, and the filter cake was washed thoroughly with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The filtrate was concentrated under reduced pressure, and the crude residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 70:30) to provide **4** (3.51 g, 84% yield over two steps) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.90 (s, 1H, COH), 8.58 (br s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 6.83 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 2.93 (d, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 3H, NHCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 193.28 (C=O), 158.22 (C<sub>2</sub>), 155.14 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>), 114.85 (C<sub>3</sub>), 104.45 (C<sub>5</sub>), 28.93 (NHCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3323 (νN-H); 2930 (νC-H<sub>aliph</sub>); 2858 (νC-H<sub>ald</sub>); 1661 (νC=O); 1591, 1431 (νC=C), 683 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 171.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 173.0 (45) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**3-Amino-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (5)**

Pale yellow powder

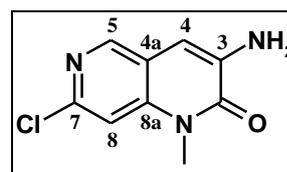
$C_9H_8ClN_3O$

MW = 209.63 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.29 (petroleum ether/ethyl acetate: 50/50)

Mp = 260-261 °C

Yield = 92%



## Experimental section

To a mixture of **4** (2.00 g, 11.7 mmol) in anhydrous DMF (30 mL) were added ethyl glycinate (1.80 g, 12.9 mmol, 1.10 equiv.) and  $K_2CO_3$  (3.23 g, 23.4 mmol, 2.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 5 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with  $CH_2Cl_2$ . The organic layer was washed with brine, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. Trituration with diisopropyl ether afforded **5** (1.96 g, 92%) as a pale yellow powder.

**$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  8.48 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.48 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.80 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 5.94 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  157.96 (C<sub>2</sub>), 145.72 (C<sub>5</sub>), 144.47 (C<sub>8a</sub>), 138.24 (C<sub>7</sub> or C<sub>3</sub>), 138.19 (C<sub>3</sub> or C<sub>7</sub>), 118.13 (C<sub>4a</sub>), 107.98 (C<sub>8</sub>), 101.58 (C<sub>4</sub>), 29.71 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3445 and 3325 ( $\nu$ NH<sub>2</sub>); 1622 ( $\nu$ C=O); 1481, 1423 ( $\nu$ C=C); 777 ( $\nu$ C-Cl).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 210.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 212.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### **N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)acetamide (6)**

White powder

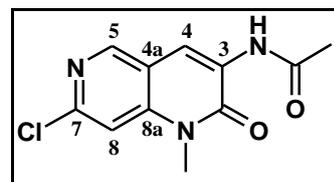
$C_{11}H_{10}ClN_3O_2$

MW = 251.67 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.19 (dichloromethane/ethyl acetate:  
90/10)

Mp = 264-265 °C

Yield = 63%



According to the general *procedure B*, compound **6** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and acetyl chloride (448  $\mu$ L, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 90:10) afforded **6** (302 mg, 63% yield) as a white powder.

**$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  9.70 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.72 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.64 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.70 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.23 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  170.69 (NH-C=O), 157.29 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.21 (C<sub>5</sub>), 148.48 (C<sub>8a</sub>), 142.33 (C<sub>7</sub>), 129.13 (C<sub>3</sub>), 116.68 (C<sub>4</sub>), 116.00 (C<sub>4a</sub>), 108.40 (C<sub>8</sub>), 30.07 (NCH<sub>3</sub>), 24.11 (COCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3361 ( $\nu$ N-H); 2986, 2970 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1771, 1645 ( $\nu$ C=O); 1498 ( $\nu$ C=C); 682 ( $\nu$ C-Cl).

## Experimental section

**MS (ESI), m/z (%):** 252.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 254.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 252.0534, found: 252.0533.

### (2E)-N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3-phenylprop-2-enamide (7)

**Brown powder**

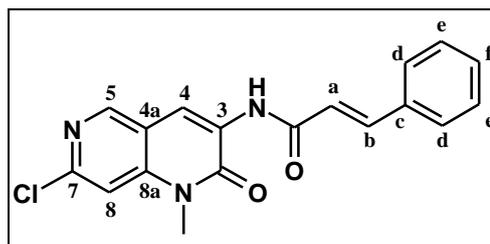
**C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>**

**MW = 339.77 g.mol<sup>-1</sup>**

**R<sub>f</sub> = 0.14 (dichloromethane/ethyl acetate: 99/1)**

**Mp = 254-255 °C**

**Yield = 59%**



According to the general *procedure B*, compound **7** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and (2E)-3-phenylprop-2-enoyl chloride (1.15 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and recrystallization from EtOH provided **7** (381 mg, 59% yield) as a brown powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.94 (s, 1H, NH), 8.90 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.80 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.70-7.65 (m, 3H, H<sub>b</sub>, H<sub>e</sub>), 7.61 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.49-7.45 (m, 4H, H<sub>a</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>f</sub>), 3.73 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 164.90 (NH-C=O), 157.36 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.34 (C<sub>5</sub>), 148.60 (C<sub>8a</sub>), 142.42 (C<sub>7</sub>), 141.13 (C<sub>b</sub>), 134.69 (C<sub>c</sub>), 129.94 (C<sub>f</sub>), 129.29 (C<sub>3</sub>), 128.94 (2C<sub>e</sub>), 127.93 (2C<sub>d</sub>), 122.06 (C<sub>a</sub>), 117.12 (C<sub>4</sub>), 116.05 (C<sub>4a</sub>), 108.40 (C<sub>8</sub>), 30.15 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3335 (νN-H); 3063 (νC-H<sub>ar</sub>); 1682, 1643 (νC=O); 1574, 1512 (νC=C); 766 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 340.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 342.2 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (8)**

White powder

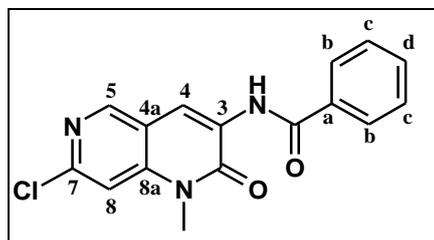
$C_{16}H_{12}ClN_3O_2$

MW = 313.72 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.10 (dichloromethane/ethyl acetate: 99/1)

Mp = 225-226 °C

Yield = 71%



According to the general *procedure B*, compound **8** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and benzoyl chloride (731  $\mu$ L, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 99.5:0.5) and recrystallization from EtOH provided **8** (425 mg, 71% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.61 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.83 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.99 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.70-7.60 (m, 3H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>), 3.75 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  165.33 (NH-C=O), 157.64 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.59 (C<sub>5</sub>), 148.92 (C<sub>8a</sub>), 142.57 (C<sub>7</sub>), 133.47 (C<sub>a</sub>), 132.40 (C<sub>d</sub>), 128.90 (2C<sub>c</sub>), 128.54 (C<sub>3</sub>), 127.29 (2C<sub>b</sub>), 117.75 (C<sub>4</sub>), 115.89 (C<sub>4a</sub>), 108.70 (C<sub>8</sub>), 30.29 (NCH<sub>3</sub>).

IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 338 ( $\nu$ N-H); 1672, 1649 ( $\nu$ C=O); 1578, 1518 ( $\nu$ C=C); 704 ( $\nu$ C-Cl).

MS (ESI), *m/z* (%): 314.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 316.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (9)**

White powder

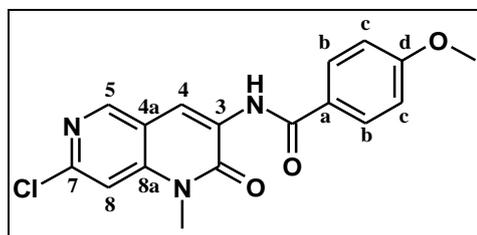
$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$

MW = 343.75 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.17 (dichloromethane/ethyl acetate: 95/5)

Mp = 229-230 °C

Yield = 76%



According to the general *procedure B*, compound **9** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and 4-methoxybenzoyl chloride (1.08 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 99:5) provided **9** (499 mg, 76% yield) as a white powder.

## Experimental section

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.49 (s, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.81 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.97 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.14 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 164.64 (NH-C=O), 162.49 (C<sub>d</sub>), 157.67 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.47 (C<sub>5</sub>), 148.75 (C<sub>8a</sub>), 142.40 (C<sub>7</sub>), 129.27 (2C<sub>b</sub>), 128.65 (C<sub>3</sub>), 125.49 (C<sub>a</sub>), 117.14 (C<sub>4</sub>), 115.97 (C<sub>4a</sub>), 114.11 (2C<sub>c</sub>), 108.66 (C<sub>8</sub>), 55.50 (OCH<sub>3</sub>), 30.25 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3366 (νN-H); 2914, 2837 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1653, 1639 (νC=O); 1580, 1456 (νC=C); 682 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 344.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 346.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 344.0796, found: 344.0796.

### **N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3-methoxybenzamide (10)**

Pale yellow powder

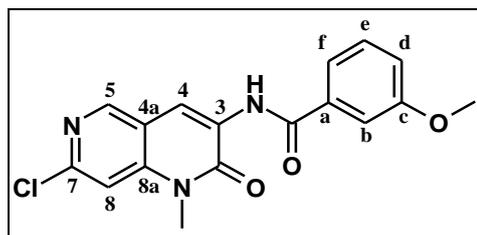
C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

MW = 343.75 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.12 (dichloromethane/ethyl acetate: 98/2)

Mp = 195-196 °C

Yield = 56%



According to the general *procedure B*, compound **10** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and 3-methoxybenzoyl chloride (1.10 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 98:2) provided **10** (365 mg, 56% yield) as a pale yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.58 (s, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.80 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.54-7.53 (m, 2H, H<sub>b</sub>, H<sub>f</sub>), 7.49-7.48 (m, 1H, H<sub>e</sub>), 7.27-7.24 (m, 1H, H<sub>d</sub>), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 165.10 (NH-C=O), 159.14 (C<sub>c</sub>), 157.62 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.59 (C<sub>5</sub>), 148.94 (C<sub>8a</sub>), 142.59 (C<sub>7</sub>), 134.94 (C<sub>a</sub>), 130.09 (C<sub>e</sub>), 128.37 (C<sub>3</sub>), 119.24 (C<sub>b</sub>), 117.95 (C<sub>4</sub>), 117.83 (C<sub>d</sub>), 115.84 (C<sub>4a</sub>), 112.59 (C<sub>f</sub>), 108.70 (C<sub>8</sub>), 55.35 (OCH<sub>3</sub>), 30.34 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3375 (νN-H); 2941(νC-H<sub>aliph</sub>); 1652, 1632 (νC=O); 1574, 1494 (νC=C); 765 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 344.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 346.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (11)**

White powder

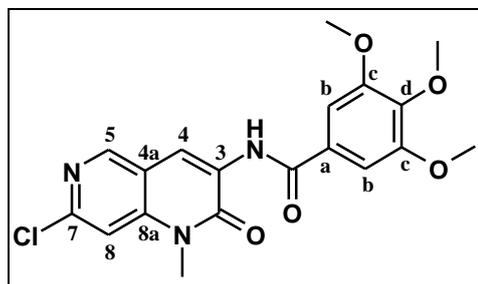
$C_{19}H_{18}ClN_3O_5$

MW = 403.82 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.22 (dichloromethane/ethyl acetate: 90/10)

Mp = 249-250 °C

Yield = 58%



According to the general *procedure B*, compound **11** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride (1.45 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/ethanol of increasing polarity) provided **11** (444 mg, 58% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.63 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.77 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.73 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.29 (s, 2H, H<sub>b</sub>), 3.92 (s, 6H, 2C<sub>c</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.07 (NH-C=O), 157.69 (C<sub>3</sub>-C=O), 152.84 (2C<sub>c</sub>), 149.56 (C<sub>5</sub>), 148.97 (C<sub>8a</sub>), 142.69 (C<sub>7</sub>), 140.91 (C<sub>d</sub>), 128.91 (C<sub>a</sub>), 128.64 (C<sub>3</sub>), 118.50 (C<sub>4</sub>), 115.85 (C<sub>4a</sub>), 108.69 (C<sub>8</sub>), 104.97 (2C<sub>b</sub>), 60.13 (C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 56.09 (2C<sub>c</sub>-OCH<sub>3</sub>), 30.21 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3674 (νN-H); 2963, 2901 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1717, 1639 (νC=O); 1584, 1489 (νC=C); 630 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 404.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 406.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**Biphenyl-3-carboxylic acid**

White powder

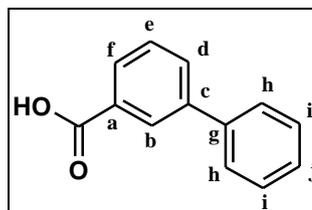
$C_{13}H_{10}O_2$

MW = 198.22 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.31 (dichloromethane/EtOH: 99/1)

Mp = 165-166 °C (Litt.<sup>215</sup> Mp = 164 °C)

Yield = 80%



In a 40 mL vessel were added 3-chlorobenzoic acid (2.00 g, 12.8 mmol) in a acetonitrile/water mixture (1:1, 25 mL), phenylboronic acid (1.88 g, 15.4 mmol, 1.2 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.31 g, 38.4 mmol, 3.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (61 mg, 0.27 mmol, 0.02 equiv.) and SPhos

## Experimental section

(213 mg, 0.52 mmol, 0.04 equiv.). The tube was sealed and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 110 °C for 1 h. After cooling the reaction mixture was acidified to pH 5 with 1M HCl, diluted with water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (dichloromethane/ethanol, 99:1) to provide **biphenyl-3-carboxylic acid** (2.02 g, 80% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 13.11 (s, 1H, COOH), 8.18 (appt, <sup>app</sup>*J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 7.95-7.91 (m, 2H, H<sub>d</sub>, H<sub>f</sub>), 7.70 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 7.61 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 7.50 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 7.41 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>j</sub>).

**MS (ESI), m/z (%):** 197.2 (100) [M-H]<sup>+</sup>.

### ***N*-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide (12)**

White powder

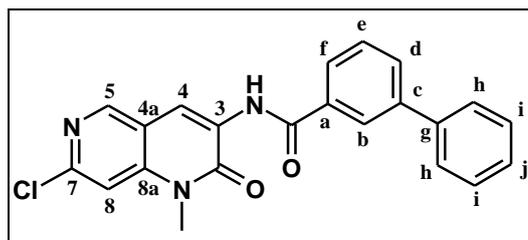
C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

MW = 389.84 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.40 (dichloromethane/ethyl acetate: 90/10)

Mp = 213-214 °C

Yield = 84%



According to the general *procedure B*, compound **12** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and biphenyl-3-carbonyl chloride (1.37 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) provided **12** (626 mg, 84% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.79 (s, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.82 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.20 (br s, 1H, H<sub>b</sub>), 7.97-7.95 (m, 2H, H<sub>d</sub>, H<sub>f</sub>), 7.80-7.70 (m, 4H, H<sub>8</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>h</sub>), 7.56 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 7.47 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 1H, H<sub>j</sub>), 3.74 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 165.61 (NH-C=O), 157.84 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.79 (C<sub>5</sub>), 149.17 (C<sub>8a</sub>), 142.83 (C<sub>7</sub>), 140.84 (C<sub>c</sub> or C<sub>g</sub>), 139.45 (C<sub>g</sub> or C<sub>c</sub>), 134.48 (C<sub>a</sub>), 130.75 (C<sub>d</sub>), 129.69 (C<sub>e</sub>), 129.24 (2C<sub>i</sub>), 128.80 (C<sub>3</sub>), 128.14 (C<sub>j</sub>), 127.09 (2C<sub>h</sub>), 126.60 (C<sub>b</sub>), 125.82 (C<sub>f</sub>), 118.47 (C<sub>4</sub>), 116.04 (C<sub>4a</sub>), 108.85 (C<sub>8</sub>), 30.41 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3300 (νN-H); 2969 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1771, 1636 (νC=O); 1578, 1489 (νC=C); 766 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 390.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 392.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**4-(Acetyloxy)benzoic acid**

White crystals

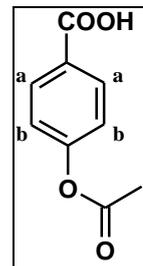
$C_9H_8O_4$

MW = 180.16 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.52 (dichloromethane/EtOH: 95/5)

Mp = 190-191 °C (Litt.<sup>216</sup> Mp = 195 °C)

Yield = 78%



To a solution of 4-hydroxybenzoic acid (1.50 g, 10.9 mmol) in pyridine (3 mL) was added acetic anhydride (1.23 mL, 13.1 mmol, 1.20 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was acidified to pH 2 with 1M HCl, diluted with water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was then recrystallized from EtOH to provide **4-(acetyloxy)benzoic acid** (1.52 g, 78% yield) as white crystals.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.05 (s, 1H, COOH), 8.01 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 7.28 (m, 2H, H<sub>a</sub>), 2.33 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>).

MS (ESI), m/z (%): 179.1 (100) [M-H].

**N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-hydroxybenzamide**  
**(13)**

Yellow powder

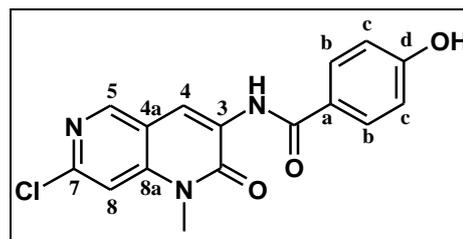
$C_{16}H_{12}ClN_3O_3$

MW = 329.74 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.07 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 325-326 °C

Yield = 63%



According to the general *procedure B*, compound **13** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and 4-(acetyloxy)benzoyl chloride (1.25 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). After concentration under reduced pressure, NaOH (108 mg, 2.69 mmol, 1.4 equiv.) was added to a stirred solution of the crude product in MeOH/water 1:1 (30 mL). After 2 h at room temperature, the reaction mixture was acidified to pH 5 with concentrated HCl. The precipitate was collected by filtration and rinsed with cold EtOH to afford **13** (394 mg, 63% yield) as a yellow powder.

## Experimental section

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  10.35 (s, 1H, OH), 9.41 (s, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.81 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.87 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.96 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.76 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  164.77 (NH-C=O), 161.33 (C<sub>d</sub>), 157.71 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.43 (C<sub>5</sub>), 148.67 (C<sub>8a</sub>), 142.34 (C<sub>7</sub>), 129.38 (2C<sub>b</sub>), 128.74 (C<sub>3</sub>), 123.90 (C<sub>a</sub>), 116.74 (C<sub>4</sub>), 116.04 (C<sub>4a</sub>), 115.48 (2C<sub>c</sub>), 108.67 (C<sub>8</sub>), 30.26 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3264 ( $\nu$ N-H,  $\nu$ O-H); 1628, 1574 ( $\nu$ C=O); 1504 ( $\nu$ C=C); 756 ( $\nu$ C-Cl).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 330.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 332.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### ***N*-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-nitrobenzamide (14)**

Pale yellow powder

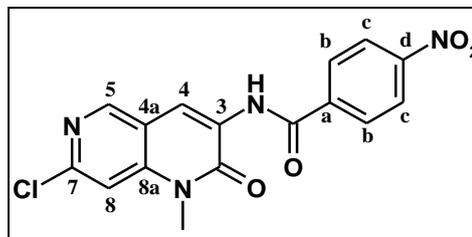
C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

MW = 358.74 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.28 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 348-349 °C

Yield = 79%



According to the general *procedure B*, compound **14** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and 4-nitrobenzoyl chloride (1.17 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). After cooling, the precipitate was collected by filtration and rinsed with cold water to afford **14** (541 mg, 79% yield) as a pale yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  10.04 (s, 1H, NH), 8.90 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.86 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.43 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 8.23 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.74 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.76 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  162.27 (NH-C=O), 156.54 (C<sub>3</sub>-C=O), 150.91 (C<sub>8a</sub>), 150.69 (C<sub>5</sub>), 150.21 (C<sub>d</sub>), 144.96 (C<sub>7</sub>), 140.29 (C<sub>a</sub>), 133.29 (C<sub>3</sub>), 131.50 (2C<sub>b</sub>), 125.86 (C<sub>4a</sub>), 124.29 (2C<sub>c</sub>), 114.41 (C<sub>4</sub>), 109.17 (C<sub>8</sub>), 30.00 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3385 ( $\nu$ N-H); 1738, 1639 ( $\nu$ C=O); 1587 ( $\nu$ C=C); 1512 ( $\nu_{\text{as}}\text{NO}_2$ ), 1236 ( $\nu_{\text{sy}}\text{NO}_2$ ); 710 ( $\nu$ C-Cl).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 359.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 361.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**4-Chloro-N-(7-chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (15)**

White powder

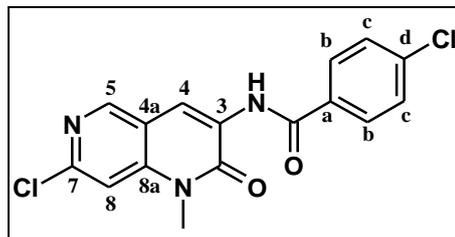
$C_{16}H_{11}Cl_2N_3O_2$

MW = 348.19 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.19 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 278-279 °C

Yield = 53%



According to the general *procedure B*, compound **15** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and 4-chlorobenzoyl chloride (1.10 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) and trituration with acetonitrile afforded **15** (350 mg, 53% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.72 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.81 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.01 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.68 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 3.75 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.56 (NH-C=O), 157.62 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.56 (C<sub>5</sub>), 149.02 (C<sub>8a</sub>), 142.72 (C<sub>7</sub>), 137.15 (C<sub>d</sub>), 132.30 (C<sub>a</sub>), 129.40 (2C<sub>c</sub>), 128.87 (2C<sub>b</sub>), 128.51 (C<sub>3</sub>), 118.42 (C<sub>4</sub>), 115.82 (C<sub>4a</sub>), 108.71 (C<sub>8</sub>), 30.24 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3379 (νN-H); 1686, 1636 (νC=O); 1580, 1518, 1483 (νC=C); 743, 606 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 348.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 350.0 (65) [M+H+2]<sup>+</sup>, 352.0 (10) [M+H+4]<sup>+</sup>.

**N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)pyridine-4-carboxamide (16)**

Yellow powder

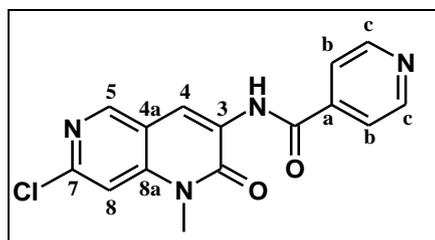
$C_{15}H_{11}ClN_4O_2$

MW = 314.72 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.07 (dichloromethane/ethyl acetate: 70/30)

Mp = 308-309 °C

Yield = 39%



According to the general *procedure B*, compound **16** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and isonicotinoyl chloride hydrochloride (1.12 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The precipitate was collected by filtration and rinsed with cold water to afford **16** (239 mg, 39% yield) as a yellow powder.

## Experimental section

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.95 (s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.84 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 8.83 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.88 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.72 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.74 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 164.40 (NH-C=O), 157.53 (C<sub>3</sub>-C=O), 150.52 (2C<sub>c</sub>), 149.79 (C<sub>5</sub>), 149.24 (C<sub>8a</sub>), 142.94 (C<sub>7</sub>), 140.63 (C<sub>a</sub>), 128.29 (C<sub>3</sub>), 121.29 (2C<sub>b</sub>), 119.37 (C<sub>4</sub>), 115.69 (C<sub>4a</sub>), 108.73 (C<sub>8</sub>), 30.23 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3352 (νN-H); 2961, 2901 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1717, 1638 (νC=O); 1582, 1518, 1491 (νC=C); 743, 678 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 315.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 317.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### ***N*-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (17)**

**Yellow powder**

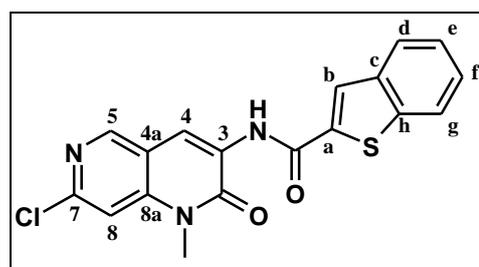
**C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S**

**MW = 369.83 g.mol<sup>-1</sup>**

**R<sub>f</sub> = 0.15 (dichloromethane)**

**Mp = 287-288 °C**

**Yield = 33%**



According to the general *procedure B*, compound **17** was obtained by reaction between amine **5** (400 mg, 1.91 mmol) and benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl chloride (1.24 g, 6.30 mmol, 3.3 equiv.). After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The precipitate was collected by filtration and trituration with CH<sub>3</sub>CN afforded **17** (234 mg, 33% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.85 (s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.78 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.48 (s, 1H, H<sub>b</sub>), 8.13-8.07 (m, 2H, H<sub>d</sub>, H<sub>g</sub>), 7.73 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.59-7.51 (m, 2H, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>), 3.77 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 160.57 (NH-C=O), 157.51 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.67 (C<sub>5</sub>), 149.08 (C<sub>8a</sub>), 142.76 (C<sub>7</sub>), 140.71 (C<sub>a</sub>), 139.07 (C<sub>h</sub>), 137.92 (C<sub>c</sub>), 128.19 (C<sub>3</sub>), 127.08 (C<sub>b</sub>), 126.97 (C<sub>e</sub> or C<sub>f</sub>), 125.82 (C<sub>d</sub> or C<sub>g</sub>), 125.21 (C<sub>f</sub> or C<sub>e</sub>), 122.90 (C<sub>g</sub> or C<sub>d</sub>), 118.75 (C<sub>4</sub>), 115.79 (C<sub>4a</sub>), 108.73 (C<sub>8</sub>), 30.27 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3354 (νN-H); 1643, 1580 (νC=O); 1525 (νC=C); 617 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 370.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 372.0 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**N-(7-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3-methoxybenzamide (18)**

Pale yellow powder

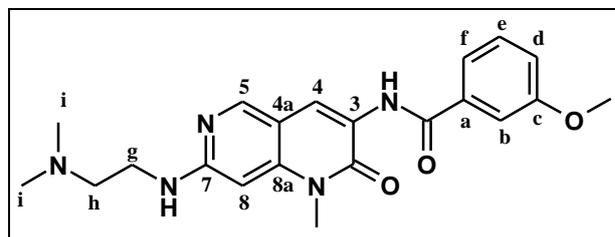
$C_{21}H_{25}N_5O_3$

MW = 395.46 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.11 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 154-155 °C

Yield = 50%



According to the general *procedure C*, compound **18** was obtained by reaction between amide **10** (75 mg, 0.22 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (474 μL, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **18** (44 mg, 50% yield) as a pale yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.18 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.78 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.38 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.49-7.48 (m, 2H, H<sub>b</sub>, H<sub>f</sub>), 7.40 (appt, <sup>app</sup>*J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 7.09 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.0 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 6.22 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.86 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.59-3.55 (m, 2H, H<sub>g</sub>), 2.82 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.4 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 2.47 (s, 6H, H<sub>i</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 165.53 (NH-C=O), 160.01 (C<sub>c</sub>), 159.04 (C<sub>7</sub>), 158.15 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.53 (C<sub>5</sub>), 143.12 (C<sub>8a</sub>), 135.75 (C<sub>a</sub>), 129.81 (C<sub>e</sub>), 124.29 (C<sub>3</sub>), 119.67 (C<sub>4</sub>), 118.91 (C<sub>b</sub>), 118.37 (C<sub>d</sub>), 112.33 (C<sub>f</sub>), 109.88 (C<sub>4a</sub>), 89.48 (C<sub>8</sub>), 58.13 (C<sub>h</sub>), 55.48 (OCH<sub>3</sub>), 44.60 (2C<sub>i</sub>), 38.30 (C<sub>g</sub>), 29.86 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3395 (νN-H); 2980, 2951 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1717, 1645 (νC=O); 1589, 1518, 1456 (νC=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 396.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-(1-Methyl-7-[[2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino]-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-hydroxybenzamide (19)**

Yellow powder

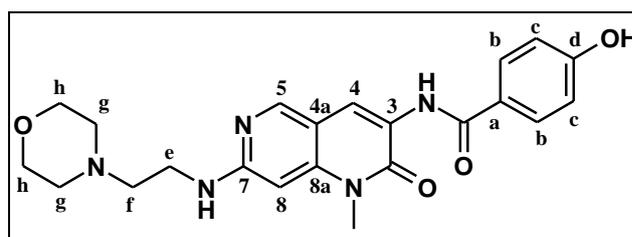
$C_{22}H_{25}N_5O_4$

MW = 423.47 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.12 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 232-233 °C

Yield = 53%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **19** was obtained by reaction between amide **13** (75 mg, 0.23 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (605  $\mu$ L, 4.60 mmol, 20 equiv.). After microwave heating at 170  $^{\circ}$ C for 1.5 h, the reaction mixture was adjusted to pH 7 with a 1 M HCl solution. The precipitate was collected by filtration, rinsed with cold water and purified by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity). Trituration with diisopropyl ether afforded **19** (49 mg, 53% yield) as a yellow powder.

**$^1$ H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  10.26 (s, 1H, OH), 9.19 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.56 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.44 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.83 (d,  $^3J$  = 8.4 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.93 (d,  $^3J$  = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.81 (s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 6.40 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.62-3.61 (m, 7H, H<sub>h</sub>, NCH<sub>3</sub>), 3.48-3.46 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 3.21-3.20 (m, 2H, H<sub>f</sub>), 2.49-2.44 (m, 4H, H<sub>g</sub>).

**$^{13}$ C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  164.52 (NH-C=O), 161.14 (C<sub>d</sub>), 159.15 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.72 (C<sub>7</sub>), 149.53 (C<sub>5</sub>), 142.86 (C<sub>8a</sub>), 129.37 (2C<sub>b</sub>), 124.63 (C<sub>3</sub>), 123.33 (C<sub>a</sub>), 120.48 (C<sub>4</sub>), 115.64 (2C<sub>c</sub>), 108.39 (C<sub>4a</sub>), 88.84 (C<sub>8</sub>), 66.40 (2C<sub>h</sub>), 57.54 (C<sub>f</sub>), 53.58 (2C<sub>g</sub>), 38.29 (C<sub>e</sub>), 29.75 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm $^{-1}$ ):** 3229 ( $\nu$ N-H,  $\nu$ O-H); 2943 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1591, 1578 ( $\nu$ C=O); 1528, 1503, 1445 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 425.2 (100) [M+H] $^{+}$ .

### ***N*-(1-Methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-hydroxybenzamide (20)**

**Yellow powder**

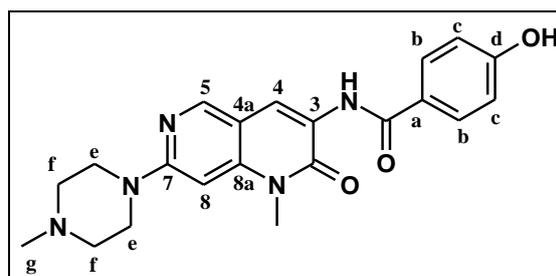
**C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>**

**MW = 393.44 g.mol $^{-1}$**

**R<sub>f</sub> = 0.23 (dichloromethane/methanol: 99/1)**

**Mp = 296-297  $^{\circ}$ C**

**Yield = 39%**



According to the general *procedure C*, compound **20** was obtained by reaction between amide **13** (75 mg, 0.23 mmol) and 1-methylpiperazine (510  $\mu$ L, 4.60 mmol, 20 equiv.). After microwave heating at 150  $^{\circ}$ C for 1.25 h, the precipitate was collected by filtration, rinsed with cold water and purified by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity). Trituration with diisopropyl ether afforded **20** (34 mg, 39% yield) as a yellow powder.

## Experimental section

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  10.27 (s, 1H, OH), 9.23 (s, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.56 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.84 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.94 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.65 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.72-3.66 (m, 7H, H<sub>e</sub>, CONCH<sub>3</sub>), 3.37-3.35 (m, 4H, H<sub>f</sub>), 2.33 (s, 3H, H<sub>g</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  164.38 (NH-C=O), 160.99 (C<sub>d</sub>), 158.59 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.38 (C<sub>7</sub>), 148.71 (C<sub>5</sub>), 142.93 (C<sub>8a</sub>), 129.12 (2C<sub>b</sub>), 124.38 (C<sub>3</sub>), 124.11 (C<sub>a</sub>), 119.38 (C<sub>4</sub>), 115.40 (2C<sub>c</sub>), 108.77 (C<sub>4a</sub>), 89.13 (C<sub>8</sub>), 54.12 (2C<sub>f</sub>), 45.44 (C<sub>g</sub>), 44.43 (2C<sub>e</sub>), 29.69 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3132 ( $\nu$ N-H,  $\nu$ O-H); 2918 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1647 ( $\nu$ C=O); 1584, 1504, 1445 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 394.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

### ***N*-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (21)**

Beige powder

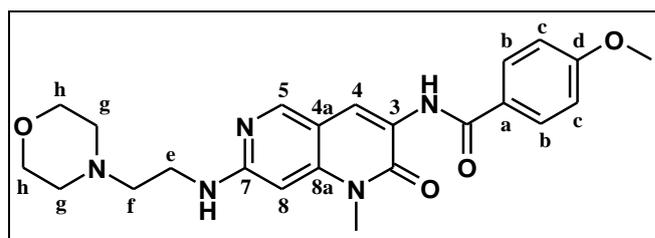
C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

MW = 437.50 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.30 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 195-196 °C

Yield = 40%



According to the general *procedure C*, compound **21** was obtained by reaction between amide **9** (75 mg, 0.22 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (579  $\mu\text{L}$ , 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **21** (39 mg, 40% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.12 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.80 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.40 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.91 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.99 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.08 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.47 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.76-3.74 (m, 4H, H<sub>h</sub>), 3.70 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.44-3.39 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 2.68 (t,  $^3J = 5.5$  Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 2.55-2.51 (m, 4H, H<sub>g</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.21 (NH-C=O), 162.68 (C<sub>d</sub>), 159.17 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.56 (C<sub>7</sub>), 149.96 (C<sub>5</sub>), 143.16 (C<sub>8a</sub>), 129.03 (2C<sub>b</sub>), 126.58 (C<sub>a</sub>), 124.33 (C<sub>3</sub>), 119.49 (C<sub>4</sub>), 114.02 (2C<sub>c</sub>), 109.69 (C<sub>4a</sub>), 87.56 (C<sub>8</sub>), 66.95 (2C<sub>h</sub>), 56.83 (C<sub>f</sub>), 55.50 (OCH<sub>3</sub>), 53.32 (2C<sub>g</sub>), 38.46 (C<sub>e</sub>), 29.80 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3362 ( $\nu$ N-H); 2945 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1632 ( $\nu$ C=O); 1585, 1499, 1454 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 438.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

## Experimental section

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 438.2136, found: 438.2134.

### *N*-(7-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (22)

Beige powder

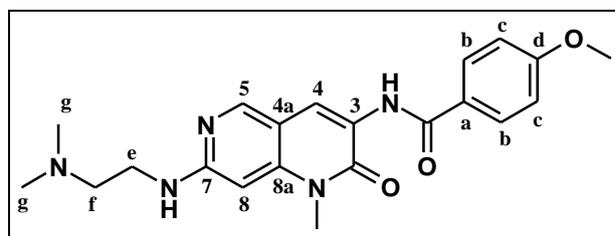
C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

MW = 395.46 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.15 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 146-147 °C

Yield = 53%



According to the general *procedure C*, compound **22** was obtained by reaction between amide **9** (75 mg, 0.22 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (474  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **22** (46 mg, 53% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.12 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.78 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.39 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.91 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.98 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.15 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.63 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.48-3.46 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 2.69 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.6 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 2.36 (s, 6H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.20 (NH-C=O), 162.66 (C<sub>d</sub>), 159.17 (C<sub>7</sub>), 158.49 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.76 (C<sub>5</sub>), 143.05 (C<sub>8a</sub>), 129.02 (2C<sub>b</sub>), 126.61 (C<sub>a</sub>), 124.30 (C<sub>3</sub>), 119.47 (C<sub>4</sub>), 114.01 (2C<sub>c</sub>), 109.73 (C<sub>4a</sub>), 88.45 (C<sub>8</sub>), 57.83 (C<sub>f</sub>), 55.49 (OCH<sub>3</sub>), 44.97 (2C<sub>g</sub>), 39.16 (C<sub>e</sub>), 29.78 (CONC<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3397, 3240 ( $\nu$ N-H); 1641 ( $\nu$ C=O); 1593, 1497, 1462 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI), *m/z* (%):** 396.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-7-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]-4-methoxybenzamide (23)**

Beige powder

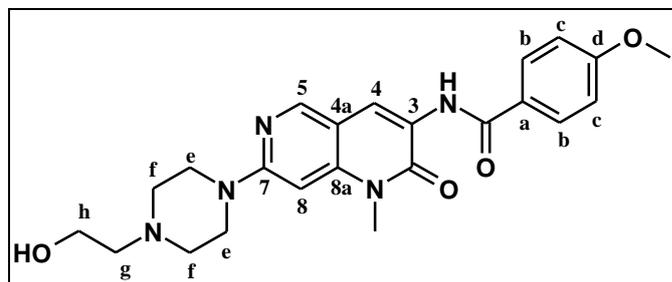
$C_{23}H_{27}N_5O_4$

MW = 437.50 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.15 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 238-239 °C

Yield = 70%



According to the general *procedure C*, compound **23** was obtained by reaction between amide **9** (75 mg, 0.22 mmol) and 1-(2-hydroxyethyl)piperazine (540  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **23** (67 mg, 70% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.15 (s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.48 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.91 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.99 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.29 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.72-3.67 (m, 9H, H<sub>e</sub>, H<sub>h</sub>, NCH<sub>3</sub>), 2.68 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 4H, H<sub>f</sub>), 2.64 (t, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 2H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.40 (NH-C=O), 162.86 (C<sub>d</sub>), 159.30 (C<sub>3</sub>-C=O), 159.20 (C<sub>7</sub>), 149.46 (C<sub>5</sub>), 143.21 (C<sub>8a</sub>), 129.19 (2C<sub>b</sub>), 126.67 (C<sub>a</sub>), 125.04 (C<sub>3</sub>), 119.23 (C<sub>4</sub>), 114.18 (2C<sub>c</sub>), 109.98 (C<sub>4a</sub>), 88.69 (C<sub>8</sub>), 59.52 (C<sub>h</sub>), 57.94 (C<sub>g</sub>), 55.65 (OCH<sub>3</sub>), 52.77 (2C<sub>f</sub>), 45.57 (2C<sub>e</sub>), 29.89 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3385 ( $\nu$ N-H); 2920, 2849 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1641 ( $\nu$ C=O); 1591, 1501, 1437 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 438.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-(1-Methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (24)**

Pale yellow powder

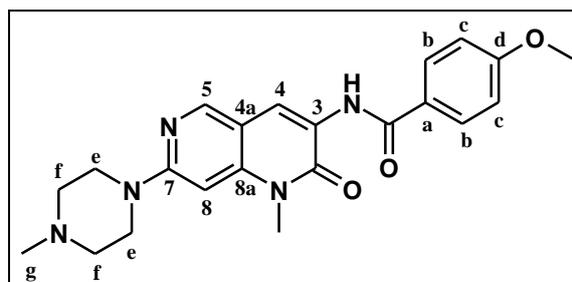
$C_{22}H_{25}N_5O_3$

MW = 407.47 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.17 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 248-249 °C

Yield = 51%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **24** was obtained by reaction between amide **9** (75 mg, 0.22 mmol) and 1-methylpiperazine (488  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **24** (46 mg, 51% yield) as a pale yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.15 (s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.47 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.91 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.99 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.30 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.74-3.72 (m, 7H, H<sub>e</sub>, CONCH<sub>3</sub>), 2.69-2.63 (m, 4H, H<sub>f</sub>), 2.44 (s, 3H, H<sub>g</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.26 (NH-C=O), 162.72 (C<sub>d</sub>), 159.14 (C<sub>7</sub>), 158.91 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.30 (C<sub>5</sub>), 143.07 (C<sub>8a</sub>), 129.05 (2C<sub>b</sub>), 126.51 (C<sub>a</sub>), 124.97 (C<sub>3</sub>), 119.03 (C<sub>4</sub>), 114.03 (2C<sub>c</sub>), 109.94 (C<sub>4a</sub>), 88.69 (C<sub>8</sub>), 55.50 (OCH<sub>3</sub>), 54.56 (2C<sub>f</sub>), 45.84 (C<sub>g</sub>), 44.98 (2C<sub>e</sub>), 29.77 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3368 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2936 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1639 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1593, 1528, 1503 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 408.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

### ***N*-[1-Methyl-2-oxo-7-*n*-propylamino-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]-4-methoxybenzamide (25)**

Beige powder

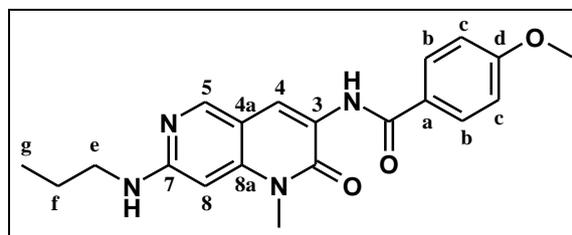
$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$

MW = 366.42  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.12 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 209-210 °C

Yield = 70%



According to the general *procedure C*, compound **25** was obtained by reaction between amide **9** (75 mg, 0.22 mmol) and *n*-propylamine (362  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.) in *N*-methyl-2-pyrrolidone (1 mL). CuI (21 mg, 0.11 mmol, 0.5 equiv.) was added and the mixture was heated under microwave irradiation. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **25** (57 mg, 70% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.12 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.79 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.38 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.91 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.99 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.04 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 4.88 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.70 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.30-3.25 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 1.77-1.68 (m, 2H, H<sub>f</sub>), 1.05 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 3H, H<sub>g</sub>).

## Experimental section

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.20 (NH-C=O), 162.66 ( $\text{C}_d$ ), 158.18 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 158.76 ( $\text{C}_7$ ), 149.44 ( $\text{C}_5$ ), 143.24 ( $\text{C}_{8a}$ ), 129.02 ( $2\text{C}_b$ ), 126.60 ( $\text{C}_a$ ), 124.23 ( $\text{C}_3$ ), 119.55 ( $\text{C}_4$ ), 114.01 ( $2\text{C}_c$ ), 109.57 ( $\text{C}_{4a}$ ), 86.86 ( $\text{C}_8$ ), 55.49 ( $\text{OCH}_3$ ), 44.45 ( $\text{C}_e$ ), 29.79 ( $\text{NCH}_3$ ), 22.57 ( $\text{C}_f$ ), 11.62 ( $\text{C}_g$ ).

IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3233 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2924 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1631 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1593, 1501, 1462 ( $\nu\text{C=C}$ ).

MS (ESI),  $m/z$  (%): 367.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### *N*-(1-Methyl-7- $\{$ 2-(morpholin-4-yl)ethylamino $\}$ -2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide (26)

White powder

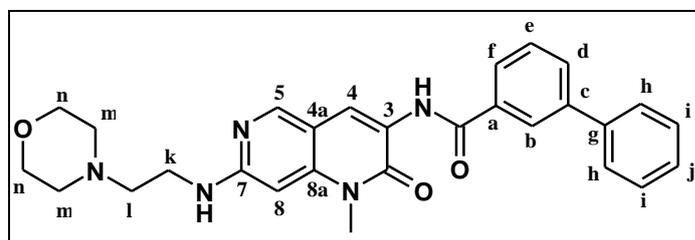
$\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3$

MW = 483.57  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.28 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 171-172  $^\circ\text{C}$

Yield = 71%



According to the general *procedure C*, compound **26** was obtained by reaction between amide **12** (75 mg, 0.19 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (500  $\mu\text{L}$ , 3.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **26** (65 mg, 71% yield) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.25 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.84 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.42 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.15 (s, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7.90 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_f$ ), 7.78 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_d$ ), 7.65 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_h$ ), 7.57 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_e$ ), 7.48 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_i$ ), 7.39 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_j$ ), 6.09 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.50 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.75 (t,  $^3J = 4.0$  Hz, 4H,  $\text{H}_n$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.44-3.39 (m, 2H,  $\text{H}_k$ ), 2.69 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_l$ ), 2.54-2.50 (m, 4H,  $\text{H}_m$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.63 (NH-C=O), 159.11 ( $\text{C}_7$ ), 158.66 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 150.09 ( $\text{C}_5$ ), 143.27 ( $\text{C}_{8a}$ ), 142.01 ( $\text{C}_c$  or  $\text{C}_g$ ), 140.08 ( $\text{C}_g$  or  $\text{C}_c$ ), 134.91 ( $\text{C}_a$ ), 130.74 ( $\text{C}_d$ ), 129.28 ( $\text{C}_e$ ), 128.96 ( $2\text{C}_i$ ), 127.87 ( $\text{C}_j$ ), 127.26 ( $2\text{C}_h$ ), 125.93 ( $\text{C}_b$ ), 125.80 ( $\text{C}_f$ ), 124.13 ( $\text{C}_3$ ), 119.96 ( $\text{C}_4$ ), 109.58 ( $\text{C}_{4a}$ ), 87.59 ( $\text{C}_8$ ), 66.92 ( $2\text{C}_n$ ), 56.83 ( $\text{C}_l$ ), 53.31 ( $2\text{C}_m$ ), 38.42 ( $\text{C}_k$ ), 29.81 ( $\text{NCH}_3$ ).

IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3231 ( $\nu\text{N-H}$ ); 1639 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1591, 1512, 1466 ( $\nu\text{C=C}$ ).

MS (ESI),  $m/z$  (%): 484.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**N-(7-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide (27)**

Yellow powder

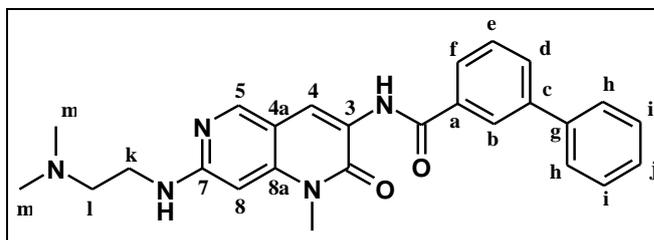
$C_{26}H_{27}N_5O_2$

MW = 441.53 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.11 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 136-137 °C

Yield = 64%



According to the general *procedure C*, compound **27** was obtained by reaction between amide **12** (75 mg, 0.19 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (409  $\mu$ L, 3.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **27** (54 mg, 64% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.26 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.82 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.41 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.15 (s, 1H, H<sub>b</sub>), 7.90 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 1H, H<sub>f</sub>), 7.78 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 7.65 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 7.57 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.8 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 7.48 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.4 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 7.39 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>j</sub>), 6.14 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.59 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.68 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.48-3.43 (m, 2H, H<sub>k</sub>), 2.66 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.6 Hz, 2H, H<sub>l</sub>), 2.34 (s, 6H, H<sub>m</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.62 (NH-C=O), 159.13 (C<sub>7</sub>), 158.66 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.96 (C<sub>5</sub>), 143.18 (C<sub>8a</sub>), 142.00 (C<sub>c</sub> or C<sub>g</sub>), 140.09 (C<sub>g</sub> or C<sub>c</sub>), 134.92 (C<sub>a</sub>), 130.72 (C<sub>d</sub>), 129.27 (C<sub>e</sub>), 128.95 (2C<sub>i</sub>), 127.86 (C<sub>j</sub>), 127.26 (2C<sub>h</sub>), 125.93 (C<sub>b</sub>), 125.80 (C<sub>f</sub>), 124.08 (C<sub>3</sub>), 119.99 (C<sub>4</sub>), 109.59 (C<sub>4a</sub>), 88.28 (C<sub>8</sub>), 57.80 (C<sub>l</sub>), 45.03 (2C<sub>m</sub>), 39.29 (C<sub>k</sub>), 29.79 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3372 ( $\nu$ N-H); 2949 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1634 ( $\nu$ C=O); 1593, 1518, 1474 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 442.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-7-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide (28)**

Pale yellow powder

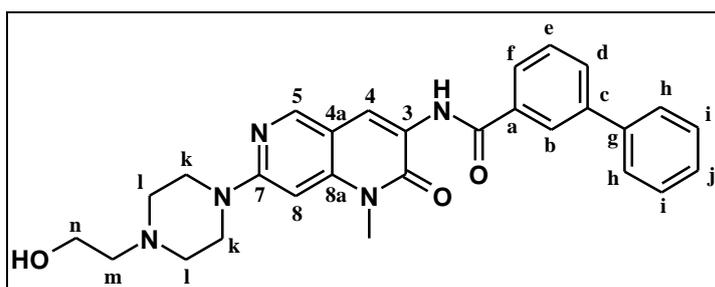
$C_{28}H_{29}N_5O_3$

MW = 483.57 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.11 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 188-189 °C

Yield = 61%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **28** was obtained by reaction between amide **12** (75 mg, 0.19 mmol) and 1-(2-hydroxyethyl)piperazine (466  $\mu$ L, 3.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **28** (56 mg, 61% yield) as a pale yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.28 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.85 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.50 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.15 (s, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7.90 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_f$ ), 7.79 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_d$ ), 7.65 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_h$ ), 7.58 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_e$ ), 7.48 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_i$ ), 7.40 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_j$ ), 6.30 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.72-3.68 (m, 9H,  $\text{H}_n$ ,  $\text{H}_k$ ,  $\text{NCH}_3$ ), 2.69 (t,  $^3J = 5.0$  Hz, 4H,  $\text{H}_l$ ), 2.64 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_m$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.68 ( $\text{NH-C=O}$ ), 159.13 ( $\text{C}_7$ ), 159.10 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 149.45 ( $\text{C}_5$ ), 143.19 ( $\text{C}_{8a}$ ), 142.03 ( $\text{C}_c$  or  $\text{C}_g$ ), 140.07 ( $\text{C}_g$  or  $\text{C}_c$ ), 134.86 ( $\text{C}_a$ ), 130.79 ( $\text{C}_d$ ), 129.30 ( $\text{C}_e$ ), 128.96 ( $2\text{C}_i$ ), 127.88 ( $\text{C}_j$ ), 127.26 ( $2\text{C}_h$ ), 125.94 ( $\text{C}_b$ ), 125.80 ( $\text{C}_f$ ), 124.69 ( $\text{C}_3$ ), 119.57 ( $\text{C}_4$ ), 109.72 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.51 ( $\text{C}_8$ ), 59.39 ( $\text{C}_n$ ), 57.80 ( $\text{C}_m$ ), 52.63 ( $2\text{C}_l$ ), 45.41 ( $2\text{C}_k$ ), 29.77 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3374 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2833 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1638 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1589, 1517 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 484.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N***-(1-Methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide (**29**)

Beige powder

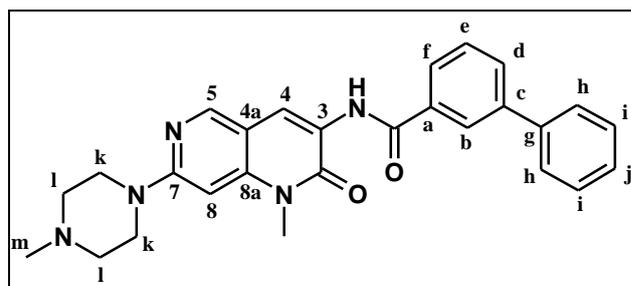
$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2$

MW = 453.54  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.16 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 192-193  $^\circ\text{C}$

Yield = 95%



According to the general *procedure C*, compound **29** was obtained by reaction between amide **12** (75 mg, 0.19 mmol) and 1-methylpiperazine (421  $\mu$ L, 3.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **29** (82 mg, 95% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.28 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.85 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.49 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.15 (s, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7.90 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_f$ ), 7.79 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_d$ ), 7.65 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_h$ ), 7.58 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_e$ ), 7.48 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_i$ ), 7.40 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_j$ ), 6.30 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.72 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.69 (t,  $^3J = 4.9$  Hz, 4H,  $\text{H}_k$ ), 2.57 (t,  $^3J = 4.9$  Hz, 4H,  $\text{H}_l$ ), 2.38 (s, 3H,  $\text{H}_m$ ).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.68 (NH-C=O), 159.22 ( $\text{C}_7$ ), 159.11 ( $\text{C}_3$ -C=O), 149.45 ( $\text{C}_5$ ), 143.19 ( $\text{C}_{8a}$ ), 142.01 ( $\text{C}_c$  or  $\text{C}_g$ ), 140.07 ( $\text{C}_g$  or  $\text{C}_c$ ), 134.88 ( $\text{C}_a$ ), 130.77 ( $\text{C}_d$ ), 129.29 ( $\text{C}_e$ ), 128.96 ( $2\text{C}_i$ ), 127.87 ( $\text{C}_j$ ), 127.26 ( $2\text{C}_h$ ), 125.94 ( $\text{C}_b$ ), 125.81 ( $\text{C}_f$ ), 124.60 ( $\text{C}_3$ ), 119.63 ( $\text{C}_4$ ), 109.63 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.50 ( $\text{C}_8$ ), 54.78 ( $2\text{C}_l$ ), 46.17 ( $\text{C}_m$ ), 45.28 ( $2\text{C}_k$ ), 29.74 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3372 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2924 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1638 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1593, 1520, 1443 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 454.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-[1-Methyl-2-oxo-7-*n*-propylamino-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]biphenyl-3-carboxamide (30)**

Pale yellow powder

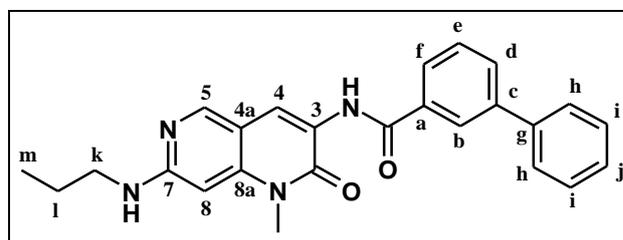
$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$

MW = 412.49  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.12 (dichloromethane/methanol:  
99.5/0.5)

Mp = 144-145 °C

Yield = 57%



According to the general *procedure C*, compound **30** was obtained by reaction between amide **12** (75 mg, 0.19 mmol) and *n*-propylamine (312  $\mu\text{L}$ , 3.80 mmol, 20 equiv.) in *N*-methyl-2-pyrrolidone (1mL). CuI (19 mg, 0.10 mmol, 0.5 equiv.) was added and the mixture was heated under microwave irradiation. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **30** (45 mg, 57% yield) as a pale yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.25 (s, 1H,  $\text{C}_3$ -NH), 8.84 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.40 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.15 (s, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7.90 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_f$ ), 7.78 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_d$ ), 7.65 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_h$ ), 7.58 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_e$ ), 7.48 (appt,  $^{\text{app}}J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_i$ ), 7.40 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_j$ ), 6.05 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 4.90-4.87 (m, 1H,  $\text{C}_7$ -NH), 3.71 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.31-3.26 (m, 2H,  $\text{H}_k$ ), 1.77-1.68 (m, 2H,  $\text{H}_l$ ), 1.05 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{H}_m$ ),

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.62 (NH-C=O), 159.13 ( $\text{C}_3$ -C=O), 158.89 ( $\text{C}_7$ ), 150.13 ( $\text{C}_5$ ), 143.35 ( $\text{C}_{8a}$ ), 142.00 ( $\text{C}_c$  or  $\text{C}_g$ ), 140.09 ( $\text{C}_g$  or  $\text{C}_c$ ), 134.94 ( $\text{C}_a$ ), 130.72 ( $\text{C}_d$ ), 129.27 ( $\text{C}_e$ ), 128.95 ( $2\text{C}_i$ ), 127.86 ( $\text{C}_j$ ), 127.26 ( $2\text{C}_h$ ), 125.93 ( $\text{C}_b$ ), 125.80 ( $\text{C}_f$ ), 124.03 ( $\text{C}_3$ ), 120.03 ( $\text{C}_4$ ), 109.48 ( $\text{C}_{4a}$ ), 86.86 ( $\text{C}_8$ ), 44.45 ( $\text{C}_k$ ), 29.80 (NCH<sub>3</sub>), 22.58 ( $\text{C}_l$ ), 11.62 ( $\text{C}_m$ ),

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3387, 3244 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3078 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2961, 2936, 2876 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1643 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1587, 1512 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 413.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**N-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)acetamide (31)**

Beige powder

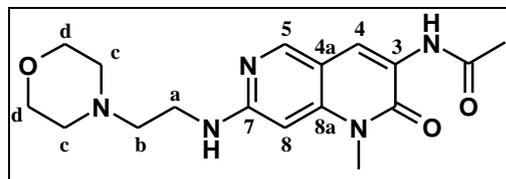
$C_{17}H_{23}N_5O_3$

MW = 345.40 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.27 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 203-204 °C

Yield = 19%



According to the general *procedure C*, compound **31** was obtained by reaction between amide **6** (75 mg, 0.30 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (789  $\mu$ L, 6.00 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **31** (20 mg, 19% yield) as a pale yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.61 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.36 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.33 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 6.06 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.44 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.74 (t, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 3.66 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.42-3.37 (m, 2H, H<sub>a</sub>), 2.68 (t, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 2.54-2.49 (m, 4H, H<sub>c</sub>), 2.22 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  168.90 (NH-C=O), 158.82 (C<sub>7</sub>), 158.53 (C<sub>3</sub>-C=O), 149.86 (C<sub>5</sub>), 143.18 (C<sub>8a</sub>), 124.03 (C<sub>3</sub>), 119.60 (C<sub>4</sub>), 109.55 (C<sub>4a</sub>), 87.66 (C<sub>8</sub>), 66.85 (2C<sub>d</sub>), 56.87 (C<sub>b</sub>), 53.30 (2C<sub>c</sub>), 38.38 (C<sub>a</sub>), 29.78 (NCH<sub>3</sub>), 24.78 (COCH<sub>3</sub>).

IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3291, 3237 ( $\nu$ N-H); 2970 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1620 ( $\nu$ C=O); 1589, 1514 ( $\nu$ C=C).

MS (ESI), m/z (%): 346.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-(7-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)acetamide (32)**

Beige powder

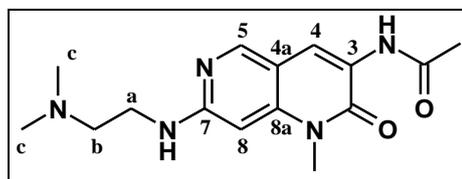
$C_{15}H_{21}N_5O_2$

MW = 303.36 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.11 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 132-133 °C

Yield = 48%



According to the general *procedure C*, compound **32** was obtained by reaction between amide **6** (75 mg, 0.30 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (646  $\mu$ L, 6.00 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **32** (44 mg, 48% yield) as a beige powder.

## Experimental section

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.60 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.35 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.34 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 6.10 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.34 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.64 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.45-3.41 (m, 2H,  $\text{H}_a$ ), 2.64 (t,  $^3J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 2.33 (s, 6H,  $\text{H}_c$ ), 2.22 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  168.89 ( $\text{NH-C=O}$ ), 158.84 ( $\text{C}_7$ ), 158.58 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 149.77 ( $\text{C}_5$ ), 143.09 ( $\text{C}_{8a}$ ), 123.97 ( $\text{C}_3$ ), 119.64 ( $\text{C}_4$ ), 109.52 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.14 ( $\text{C}_8$ ), 57.77 ( $\text{C}_b$ ), 45.02 ( $2\text{C}_c$ ), 38.32 ( $\text{C}_a$ ), 29.74 ( $\text{CONCH}_3$ ), 24.77 ( $\text{COCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3292, 3227 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2970 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1639 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1587, 1504 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 304.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### (2E)-N-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3-phenylprop-2-enamide (33)

Yellow powder

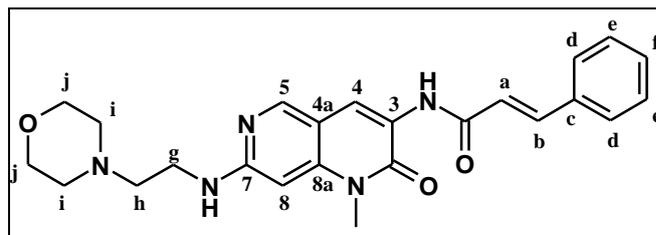
$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3$

MW = 433.51  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.25 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 231-232  $^\circ\text{C}$

Yield = 38%



According to the general *procedure C*, compound **33** was obtained by reaction between amide **7** (75 mg, 0.22 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (579  $\mu\text{L}$ , 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **33** (36 mg, 38% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.77 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.55 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.38 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.72 (d,  $^3J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7.56 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 2.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_e$ ), 7.40-7.38 (m, 3H,  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_f$ ), 6.61 (d,  $^3J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_a$ ), 6.06 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.51 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.74 (t,  $^3J = 4.4$  Hz, 4H,  $\text{H}_j$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.42-3.38 (m, 2H,  $\text{H}_g$ ), 2.68 (t,  $^3J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_h$ ), 2.53-2.49 (m, 4H,  $\text{H}_i$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  164.34 ( $\text{NH-C=O}$ ), 158.90 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 158.59 ( $\text{C}_7$ ), 150.03 ( $\text{C}_5$ ), 143.23 ( $\text{C}_{8a}$ ), 142.32 ( $\text{C}_b$ ), 134.58 ( $\text{C}_c$ ), 130.07 ( $\text{C}_f$ ), 128.92 ( $2\text{C}_e$ ), 128.05 ( $2\text{C}_d$ ), 124.16 ( $\text{C}_3$ ), 120.71 ( $\text{C}_a$ ), 120.09 ( $\text{C}_4$ ), 109.63 ( $\text{C}_{4a}$ ), 87.56 ( $\text{C}_8$ ), 66.90 ( $2\text{C}_j$ ), 56.84 ( $\text{C}_h$ ), 53.31 ( $2\text{C}_i$ ), 38.43 ( $\text{C}_g$ ), 29.83 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3294 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2922 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1622 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1589, 1520 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 435.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**(2E)-N-(7-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3-phenylprop-2-enamide (34)**

Yellow powder

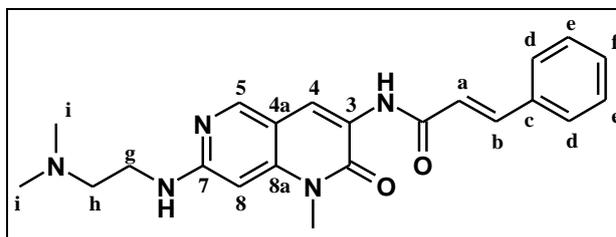
$C_{22}H_{25}N_5O_2$

MW = 391.48 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.18 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 161-162 °C

Yield = 24%



According to the general *procedure C*, compound **34** was obtained by reaction between amide **7** (75 mg, 0.22 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (474  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **34** (21 mg, 24% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.76 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.54 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.38 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.73 (d, <sup>3</sup>J = 15.6 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 7.56 (dd, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 2H, H<sub>e</sub>), 7.41-7.36 (m, 3H, H<sub>d</sub>, H<sub>f</sub>), 6.61 (d, <sup>3</sup>J = 15.6 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 6.15 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.67 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.66 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.52-3.57 (m, 2H, H<sub>g</sub>), 2.71 (t, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 2.38 (s, 6H, H<sub>i</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  164.37 (NH-C=O), 158.90 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.50 (C<sub>7</sub>), 149.91 (C<sub>5</sub>), 143.13 (C<sub>8a</sub>), 142.28 (C<sub>b</sub>), 134.59 (C<sub>c</sub>), 130.09 (C<sub>f</sub>), 129.01 (2C<sub>e</sub>), 128.10 (2C<sub>d</sub>), 124.11 (C<sub>3</sub>), 120.76 (C<sub>a</sub>), 120.07 (C<sub>4</sub>), 109.71 (C<sub>4a</sub>), 88.55 (C<sub>8</sub>), 57.93 (C<sub>h</sub>), 45.10 (2C<sub>i</sub>), 39.10 (C<sub>g</sub>), 29.79 (CONCH<sub>3</sub>).

IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3354 ( $\nu$ N-H); 2922 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1649 ( $\nu$ C=O); 1587, 1514 ( $\nu$ C=C).

MS (ESI),  $m/z$  (%): 392.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (35)**

Beige powder

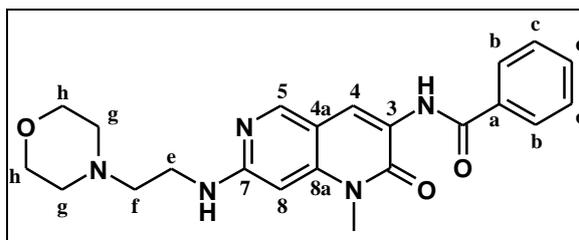
$C_{22}H_{25}N_5O_3$

MW = 407.47 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.26 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 168-169 °C

Yield = 93%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **35** was obtained by reaction between amide **8** (75 mg, 0.24 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (631  $\mu$ L, 4.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **35** (91 mg, 93% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.20 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.82 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.41 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.94 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.58-7.49 (m, 3H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ), 6.08 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.48 (t,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.75 (t,  $^3J = 4.6$  Hz, 4H,  $\text{H}_h$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.43-3.39 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.68 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.53-2.50 (m, 4H,  $\text{H}_g$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.71 ( $\text{NH-C=O}$ ), 159.13 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 158.64 ( $\text{C}_7$ ), 150.02 ( $\text{C}_5$ ), 143.28 ( $\text{C}_{8a}$ ), 134.32 ( $\text{C}_a$ ), 132.07 ( $\text{C}_d$ ), 128.83 ( $2\text{C}_c$ ), 127.14 ( $2\text{C}_b$ ), 124.17 ( $\text{C}_3$ ), 119.85 ( $\text{C}_4$ ), 109.72 ( $\text{C}_{4a}$ ), 87.85 ( $\text{C}_8$ ), 66.97 ( $2\text{C}_h$ ), 56.93 ( $\text{C}_f$ ), 53.38 ( $2\text{C}_g$ ), 38.61 ( $\text{C}_e$ ), 29.94 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3663 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2986, 2970 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1632 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1591, 1514 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 408.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-(7-*[[*2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (36)**

Yellow powder

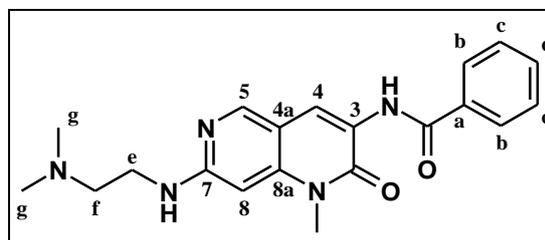
$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2$

MW = 365.44  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.30 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 145-146  $^\circ\text{C}$

Yield = 66%



According to the general *procedure C*, compound **36** was obtained by reaction between amide **8** (75 mg, 0.24 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (517  $\mu$ L, 4.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **36** (58 mg, 66% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.20 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.81 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.41 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.94 (d,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.58-7.48 (m, 3H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ), 6.12 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.50 (s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.44-3.40 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.62 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.31 (s, 6H,  $\text{H}_g$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.62 ( $\text{NH-C=O}$ ), 159.11 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 158.73 ( $\text{C}_7$ ), 149.98 ( $\text{C}_5$ ), 143.16 ( $\text{C}_{8a}$ ), 134.33 ( $\text{C}_a$ ), 132.05 ( $\text{C}_d$ ), 128.81 ( $2\text{C}_c$ ), 127.11 ( $2\text{C}_b$ ), 124.04 ( $\text{C}_3$ ), 119.90 ( $\text{C}_4$ ), 109.52 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.04 ( $\text{C}_8$ ), 57.73 ( $\text{C}_f$ ), 45.12 ( $2\text{C}_g$ ), 39.49 ( $\text{C}_e$ ), 29.76 ( $\text{CONCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3383, 3250 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2978, 2949 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1641 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1593, 1518 ( $\nu\text{C=C}$ ).

MS (ESI), m/z (%): 366.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**4-Amino-N-(1-methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (37)**

Yellow powder

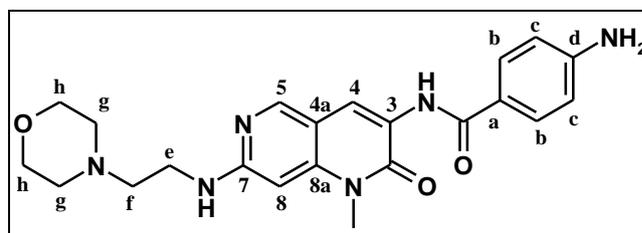
C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

MW = 422.02 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.16 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 250-251 °C

Yield = 62%



According to the general *procedure C*, compound **37** was obtained by reaction between amide **14** (75 mg, 0.21 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (552 μL, 4.20 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **37** (55 mg, 62% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.04 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.56 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.42 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.66 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.76 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.2 Hz, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 6.67 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.39 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.92 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.64-3.61 (m, 7H, H<sub>h</sub>, NCH<sub>3</sub>), 3.50-3.45 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 2.56-2.54 (m, 2H, H<sub>f</sub>), 2.49-2.45 (m, 4H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 164.44 (NH-C=O), 158.69 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.44 (C<sub>7</sub>), 152.57 (C<sub>d</sub>), 149.03 (C<sub>5</sub>), 142.39 (C<sub>8a</sub>), 128.65 (2C<sub>b</sub>), 123.35 (C<sub>a</sub>), 119.98 (C<sub>3</sub>), 119.12 (C<sub>4</sub>), 112.90 (2C<sub>c</sub>), 108.31 (C<sub>4a</sub>), 88.60 (C<sub>8</sub>), 66.15 (2C<sub>h</sub>), 57.37 (C<sub>f</sub>), 53.33 (2C<sub>g</sub>), 38.10 (C<sub>e</sub>), 29.43 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3383 and 3350 (νNH<sub>2</sub>); 3240 (νN-H); 2968 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1627 (νC=O); 1587, 1508 (νC=C).

MS (ESI), m/z (%): 423.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**4-Amino-N-(7-([2-(dimethylamino)ethyl]amino)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (38)**

Orange powder

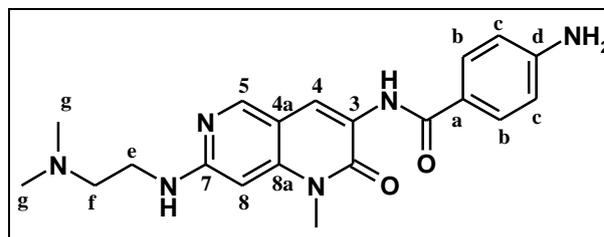
$C_{20}H_{24}N_6O_2$

MW = 380.45 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.16 (dichloromethane/methanol: 80/20)

Mp = 180-181 °C

Yield = 19%



According to the general *procedure C*, compound **38** was obtained by reaction between amide **14** (75 mg, 0.21 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (452  $\mu$ L, 4.20 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **38** (15 mg, 19% yield) as an orange powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.07 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.77 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.38 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.78 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.71 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.14 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.57 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 4.04 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.48-3.44 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 2.67 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 2.35 (s, 6H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.56 (NH-C=O), 159.67 (C<sub>7</sub>), 158.62 (C<sub>3</sub>-C=O), 150.20 (C<sub>d</sub>), 149.65 (C<sub>5</sub>), 143.05 (C<sub>8a</sub>), 129.17 (2C<sub>b</sub>), 124.75 (C<sub>a</sub>), 123.91 (C<sub>3</sub>), 119.28 (C<sub>4</sub>), 114.44 (2C<sub>c</sub>), 110.02 (C<sub>4a</sub>), 88.57 (C<sub>8</sub>), 58.06 (C<sub>f</sub>), 45.23 (2C<sub>g</sub>), 39.55 (C<sub>e</sub>), 29.87 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3379 ( $\nu$ N-H); 3345 and 3335 ( $\nu$ NH<sub>2</sub>); 2949 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1626 ( $\nu$ C=O); 1532, 1505 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI), *m/z* (%):** 381.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3-methoxybenzamide (39)**

Red powder

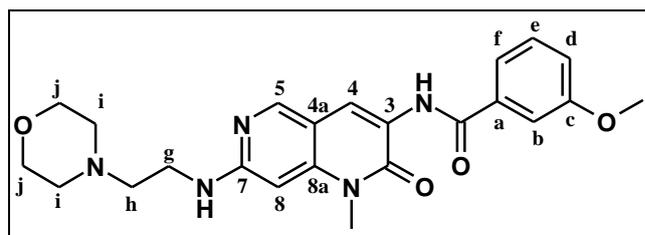
$C_{23}H_{27}N_5O_4$

MW = 437.50 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.06 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 183-184 °C

Yield = 86%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **39** was obtained by reaction between amide **10** (75 mg, 0.22 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (579  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Trituration with diisopropyl ether afforded **39** (83 mg, 86% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.17 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.80 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.40 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.49-7.46 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ,  $\text{H}_f$ ), 7.40 (appt,  $^{app}J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_e$ ), 7.09 (ddd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 2.0$  Hz,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_d$ ), 6.09 (s, 1H,  $\text{H}_g$ ), 5.50 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.75 (t,  $^3J = 4.8$  Hz, 4H,  $\text{H}_j$ ), 3.69 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.44-3.40 (m, 2H,  $\text{H}_g$ ), 2.69 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_h$ ), 2.54-2.51 (m, 4H,  $\text{H}_i$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.54 ( $\text{NH-C=O}$ ), 162.02 ( $\text{C}_d$ ), 159.08 ( $\text{C}_7$ ), 158.56 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 149.97 ( $\text{C}_5$ ), 143.27 ( $\text{C}_{8a}$ ), 135.76 ( $\text{C}_a$ ), 129.82 ( $\text{C}_e$ ), 124.16 ( $\text{C}_3$ ), 119.87 ( $\text{C}_4$ ), 118.91 ( $\text{C}_b$ ), 118.37 ( $\text{C}_d$ ), 112.34 ( $\text{C}_f$ ), 109.63 ( $\text{C}_{4a}$ ), 87.82 ( $\text{C}_8$ ), 66.73 ( $2\text{C}_j$ ), 56.93 ( $\text{C}_h$ ), 55.49 ( $\text{OCH}_3$ ), 53.29 ( $2\text{C}_i$ ), 38.28 ( $\text{C}_g$ ), 29.82 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3304, 3227 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2967 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1641 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1587, 1504 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 439.2 (100) [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

### ***N*-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (40)**

Beige powder

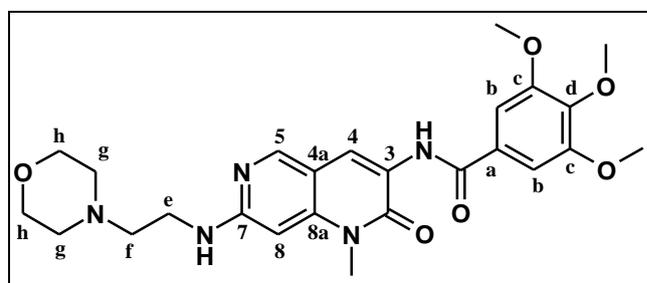
$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_6$

MW = 497.55  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.33 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 197-198  $^\circ\text{C}$

Yield = 55%



According to the general *procedure C*, compound **40** was obtained by reaction between amide **11** (75 mg, 0.19 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (500  $\mu$ L, 3.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **40** (52 mg, 55% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.11 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.79 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.41 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.15 (s, 2H,  $\text{H}_b$ ), 6.09 (s, 1H,  $\text{H}_g$ ), 5.51 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.95 (s, 6H,  $2\text{C}_c\text{-OCH}_3$ ), 3.92 (s, 3H,  $\text{C}_d\text{-OCH}_3$ ), 3.75 (t,  $^3J = 4.6$  Hz, 4H,  $\text{H}_h$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.43-3.39 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.69 (t,  $^3J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.53-2.51 (m, 4H,  $\text{H}_g$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.32 ( $\text{NH-C=O}$ ), 159.14 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 158.66 ( $\text{C}_7$ ), 153.36 ( $2\text{C}_c$ ), 150.08 ( $\text{C}_5$ ), 143.22 ( $\text{C}_{8a}$ ), 141.44 ( $\text{C}_d$ ), 129.68 ( $\text{C}_a$ ), 124.08 ( $\text{C}_3$ ), 119.90 ( $\text{C}_4$ ), 109.57

## Experimental section

(C<sub>4a</sub>), 104.41 (2C<sub>b</sub>), 87.57 (C<sub>8</sub>), 66.93 (2C<sub>h</sub>), 60.98 (C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 56.81 (2C<sub>c</sub>-OCH<sub>3</sub>), 56.36 (C<sub>f</sub>), 53.31 (2C<sub>g</sub>), 38.43 (C<sub>e</sub>), 29.81 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3238 ( $\nu$ N-H); 2922 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1634 ( $\nu$ C=O); 1587, 1495 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 499.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

### *N*-(7-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (41)

Beige powder

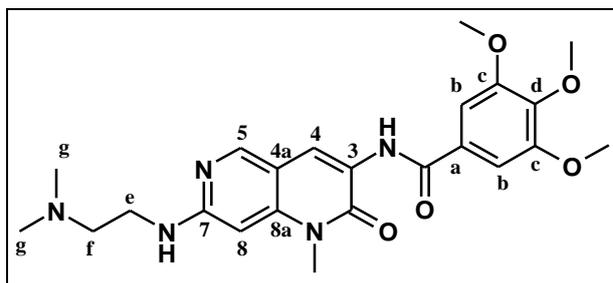
C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>

MW = 455.51 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.15 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 188-189 °C

Yield = 60%



According to the general *procedure C*, compound **41** was obtained by reaction between amide **11** (75 mg, 0.19 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (409  $\mu$ L, 3.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **41** (52 mg, 60% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.11 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.77 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.39 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.15 (s, 2H, H<sub>b</sub>), 6.16 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.66 (t, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.95 (s, 6H, 2C<sub>c</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.50-3.46 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 2.70 (t, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 2.37 (s, 6H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.30 (NH-C=O), 159.13 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.58 (C<sub>7</sub>), 153.35 (2C<sub>c</sub>), 149.90 (C<sub>5</sub>), 143.10 (C<sub>8a</sub>), 141.41 (C<sub>d</sub>), 129.70 (C<sub>a</sub>), 124.05 (C<sub>3</sub>), 119.88 (C<sub>4</sub>), 109.62 (C<sub>4a</sub>), 104.40 (2C<sub>b</sub>), 88.45 (C<sub>8</sub>), 60.98 (C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 57.83 (C<sub>f</sub>), 56.35 (2C<sub>c</sub>-OCH<sub>3</sub>), 44.96 (2C<sub>g</sub>), 39.13 (C<sub>e</sub>), 29.79 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3240 ( $\nu$ N-H); 2938 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1636 ( $\nu$ C=O); 1586, 1495 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 457.3 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**4-Chloro-N-(1-methyl-7-[[2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino]-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (42)**

Yellow powder

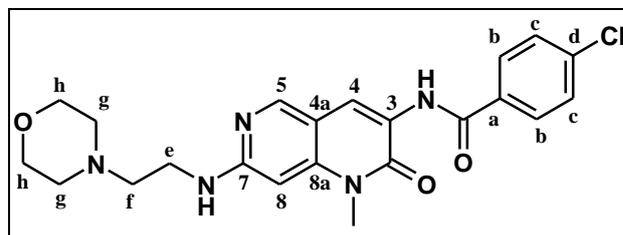
$C_{22}H_{24}ClN_5O_3$

MW = 441.92 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.19 (dichloromethane/methanol: 97/3)

Mp = 209-210 °C

Yield = 79%



According to the general *procedure C*, compound **42** was obtained by reaction between amide **15** (75 mg, 0.22 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (579  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **42** (77 mg, 79% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.15 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.78 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.41 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.87 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.47 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.08 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.51 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.75 (t, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 4H, H<sub>h</sub>), 3.69 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.43-3.39 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 2.69 (t, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 2.54-2.50 (m, 4H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  164.51 (NH-C=O), 159.06 (C<sub>3</sub>-C=O), 158.70 (C<sub>7</sub>), 150.12 (C<sub>5</sub>), 143.29 (C<sub>8a</sub>), 138.40 (C<sub>d</sub>), 132.66 (C<sub>a</sub>), 129.10 (2C<sub>c</sub>), 128.54 (2C<sub>b</sub>), 123.90 (C<sub>3</sub>), 120.07 (C<sub>4</sub>), 109.48 (C<sub>4a</sub>), 87.58 (C<sub>8</sub>), 66.92 (2C<sub>h</sub>), 56.82 (C<sub>f</sub>), 53.31 (2C<sub>g</sub>), 38.42 (C<sub>e</sub>), 29.82 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3383 ( $\nu$ N-H); 2978, 2951 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1638 ( $\nu$ C=O); 1593, 1517, 1483 ( $\nu$ C=C); 613 ( $\nu$ C-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 442.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 444.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**4-Chloro-N-(7-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)benzamide (43)**

Yellow powder

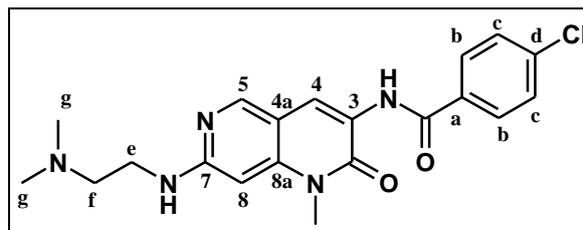
$C_{20}H_{22}ClN_5O_2$

MW = 399.98 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.30 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 183-184 °C

Yield = 70%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **43** was obtained by reaction between amide **15** (75 mg, 0.22 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (474  $\mu$ L, 4.40 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **43** (62 mg, 70% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.16 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.77 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.40 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.87 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 7.48 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 6.14 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.60 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.47-3.43 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.66 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.54 (s, 6H,  $\text{H}_g$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  164.50 ( $\text{NH-C=O}$ ), 159.07 ( $\text{C}_7$ ), 158.70 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 150.00 ( $\text{C}_5$ ), 143.18 ( $\text{C}_{8a}$ ), 138.38 ( $\text{C}_d$ ), 132.68 ( $\text{C}_a$ ), 129.09 ( $2\text{C}_c$ ), 128.54 ( $2\text{C}_b$ ), 123.84 ( $\text{C}_3$ ), 120.09 ( $\text{C}_4$ ), 109.48 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.27 ( $\text{C}_8$ ), 57.79 ( $\text{C}_f$ ), 45.02 ( $2\text{C}_g$ ), 39.27 ( $\text{C}_e$ ), 29.80 ( $\text{CONCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3375 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2972 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1634 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1518, 1485 ( $\nu\text{C=C}$ ); 613 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 400.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 402.1 (40)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ .

### *N*-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)pyridine-4-carboxamide (44)

Yellow powder

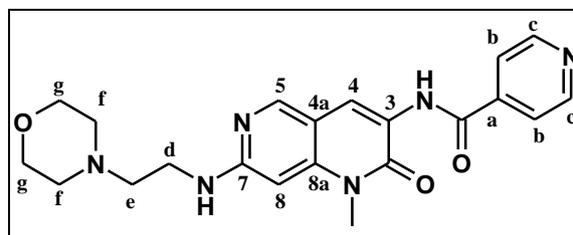
$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3$

MW = 408.45  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.15 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 235-236  $^\circ\text{C}$

Yield = 45%



According to the general *procedure C*, compound **44** was obtained by reaction between amide **16** (75 mg, 0.24 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (631  $\mu$ L, 4.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **44** (44 mg, 45% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.24 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.82 (d,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 8.80 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.42 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.76 (d,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 6.10 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.55 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.75 (t,  $^3J = 4.4$  Hz, 4H,  $\text{H}_g$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.44-3.40 (m, 2H,  $\text{H}_d$ ), 2.70 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.55-2.51 (m, 4H,  $\text{H}_f$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  163.53 ( $\text{NH-C=O}$ ), 158.96 ( $\text{C}_7$ ), 158.84 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 150.84 ( $2\text{C}_c$ ), 150.29 ( $\text{C}_5$ ), 143.45 ( $\text{C}_{8a}$ ), 141.20 ( $\text{C}_a$ ), 123.44 ( $\text{C}_3$ ), 120.80 ( $2\text{C}_b$ ,  $\text{C}_4$ ), 109.30 ( $\text{C}_{4a}$ ), 87.65 ( $\text{C}_8$ ), 66.90 ( $2\text{C}_g$ ), 56.85 ( $\text{C}_e$ ), 53.35 ( $2\text{C}_f$ ), 38.33 ( $\text{C}_d$ ), 29.86 ( $\text{NCH}_3$ ).

## Experimental section

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3408, 3368 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2847 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1643 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1593, 1501, 1487 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 409.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N***-(7-**[2-(Dimethylamino)ethyl]amino**)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)pyridine-4-carboxamide (**45**)

**Yellow powder**

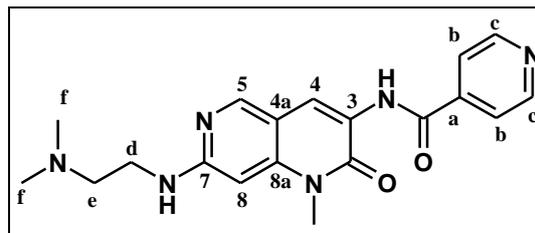
**$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$**

**MW = 366.42  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$**

**Rf = 0.10 (dichloromethane/methanol: 90/10)**

**Mp = 169-170  $^{\circ}\text{C}$**

**Yield = 60%**



According to the general *procedure C*, compound **45** was obtained by reaction between amide **16** (75 mg, 0.24 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (517  $\mu\text{L}$ , 4.80 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **45** (53 mg, 60% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.24 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.82 (dd,  $^3J = 4.4$  Hz,  $^5J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 8.78 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.41 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.76 (dd,  $^3J = 4.4$  Hz,  $^5J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 6.14 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.67 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.49-3.45 (m, 2H,  $\text{H}_d$ ), 2.68 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.36 (s, 6H,  $\text{H}_f$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  163.50 ( $\text{NH-C=O}$ ), 158.93 ( $\text{C}_7$ ), 158.82 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 150.88 ( $2\text{C}_c$ ), 150.17 ( $\text{C}_5$ ), 143.33 ( $\text{C}_{8a}$ ), 141.24 ( $\text{C}_a$ ), 123.37 ( $\text{C}_3$ ), 120.77 ( $2\text{C}_b$ ), 120.76 ( $\text{C}_4$ ), 109.29 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.34 ( $\text{C}_8$ ), 57.75 ( $\text{C}_e$ ), 44.99 ( $2\text{C}_f$ ), 39.17 ( $\text{C}_d$ ), 29.83 ( $\text{CONCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3366, 3246 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2853 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1643 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1597, 1517 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 367.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**N-(1-Methyl-7-([2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (46)**

Yellow powder

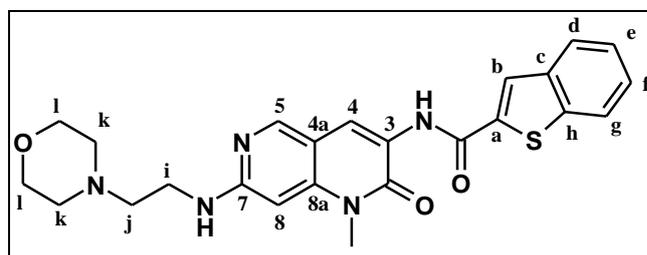
$C_{24}H_{25}N_5O_3S$

MW = 463.56 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.11 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 222-223 °C

Yield = 77%



According to the general *procedure C*, compound **46** was obtained by reaction between amide **17** (75 mg, 0.20 mmol) and 2-(morpholin-4-yl)ethanamine (526  $\mu$ L, 4.00 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **46** (72 mg, 77% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.18 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.76 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.40 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.93 (s, 1H, H<sub>b</sub>), 7.90-7.88 (m, 2H, H<sub>g</sub>, H<sub>d</sub>), 7.48-7.41 (m, 2H, H<sub>f</sub>, H<sub>e</sub>), 6.09 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.22 (br s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.75 (t, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 4H, H<sub>l</sub>), 3.71 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.43-3.39 (m, 2H, H<sub>i</sub>), 2.69 (t, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 2H, H<sub>j</sub>), 2.53-2.51 (m, 4H, H<sub>k</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  160.57 (NH-C=O), 158.90 (C<sub>7</sub>), 158.70 (C<sub>3</sub>-C=O), 150.14 (C<sub>5</sub>), 143.30 (C<sub>8a</sub>), 141.39 (C<sub>a</sub>), 139.13 (C<sub>h</sub>), 138.64 (C<sub>c</sub>), 126.68 (C<sub>3</sub>), 125.53 (C<sub>b</sub>), 125.33 (C<sub>f</sub> or C<sub>e</sub>), 125.08 (C<sub>g</sub> or C<sub>d</sub>), 123.71 (C<sub>e</sub> or C<sub>f</sub>), 122.79 (C<sub>d</sub> or C<sub>g</sub>), 120.14 (C<sub>4</sub>), 109.49 (C<sub>4a</sub>), 87.58 (C<sub>8</sub>), 66.92 (2C<sub>l</sub>), 56.81 (C<sub>j</sub>), 53.31 (2C<sub>k</sub>), 38.41 (C<sub>i</sub>), 29.87 (NCH<sub>3</sub>).

IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3320 ( $\nu$ N-H); 2845 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1634 ( $\nu$ C=O); 1585, 1530, 1487 ( $\nu$ C=C).

MS (ESI), m/z (%): 465.4 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**N-(7-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (47)**

Yellow powder

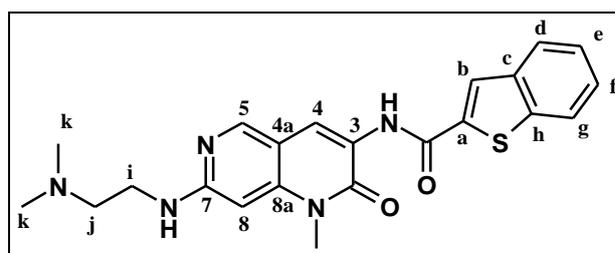
$C_{22}H_{23}N_5O_2S$

MW = 421.52 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.18 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 216-217 °C

Yield = 42%



## Experimental section

According to the general *procedure C*, compound **47** was obtained by reaction between amide **17** (75 mg, 0.20 mmol) and *N,N*-dimethylethylenediamine (431  $\mu$ L, 4.00 mmol, 20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **47** (35 mg, 42% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.18 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.75 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.39 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.93 (s, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7.90-7.88 (m, 2H,  $\text{H}_g, \text{H}_d$ ), 7.47-7.41 (m, 2H,  $\text{H}_d, \text{H}_e$ ), 6.15 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.64 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.69 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.49-3.45 (m, 2H,  $\text{H}_i$ ), 2.67 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_j$ ), 2.35 (s, 6H,  $\text{H}_k$ ).

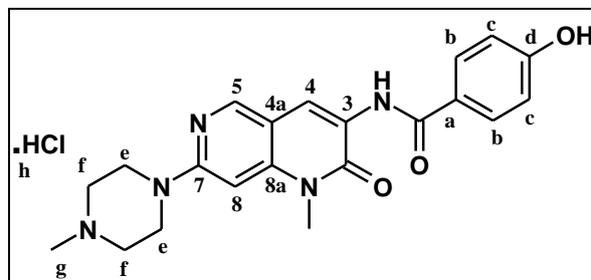
**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  160.55 ( $\text{NH-C=O}$ ), 158.90 ( $\text{C}_7$ ), 158.69 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 150.00 ( $\text{C}_5$ ), 143.18 ( $\text{C}_{8a}$ ), 141.39 ( $\text{C}_a$ ), 139.13 ( $\text{C}_h$ ), 138.69 ( $\text{C}_c$ ), 126.65 ( $\text{C}_3$ ), 125.52 ( $\text{C}_b$ ), 125.32 ( $\text{C}_f$  or  $\text{C}_e$ ), 125.07 ( $\text{C}_g$  or  $\text{C}_d$ ), 123.65 ( $\text{C}_e$  or  $\text{C}_f$ ), 122.78 ( $\text{C}_f$  or  $\text{C}_g$ ), 120.16 ( $\text{C}_4$ ), 109.50 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.36 ( $\text{C}_8$ ), 57.79 ( $\text{C}_j$ ), 45.01 ( $2\text{C}_k$ ), 39.22 ( $\text{C}_i$ ), 29.84 ( $\text{CONCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3244, 3360 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2970 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1638 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1593, 1522, 1503 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 423.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### ***N*-(1-Methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-hydroxybenzamide hydrochloride (48)**

White powder  
 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_3$   
MW = 429.91  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
Mp = 292-293  $^\circ\text{C}$   
Yield = 36%



According to the general *procedure D*, compound **48** was obtained by reaction between amide derivative **20** (50 mg, 0.13 mmol) and a THF/HCl 1M mixture (130  $\mu$ L, 0.13 mmol, 1.0 equiv.). Filtration and rinsing with  $\text{Et}_2\text{O}$  provided the corresponding hydrochloride salt **48** (20 mg, 36% yield) as a white powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  10.57 (br s, 1H,  $\text{H}_h$ ), 10.32 (br s, 1H, OH), 9.27 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.67 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.64 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.84 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 6.95 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 6.82 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 4.66-4.63 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.58-3.54 (m, 2H,  $\text{H}_f$ ), 3.37-3.31 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 3.16-3.09 (m, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.86 (d,  $^3J = 4.4$  Hz, 3H,  $\text{H}_g$ ).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  164.52 (NH-C=O), 160.86 ( $\text{C}_d$ ), 158.33 ( $\text{C}_7$ ), 157.46 ( $\text{C}_3$ -C=O), 148.54 ( $\text{C}_5$ ), 143.06 ( $\text{C}_{8a}$ ), 129.17 ( $2\text{C}_b$ ), 124.69 ( $\text{C}_3$ ), 124.25 ( $\text{C}_a$ ), 119.18 ( $\text{C}_4$ ), 115.36 ( $2\text{C}_c$ ), 109.61 ( $\text{C}_{4a}$ ), 90.14 ( $\text{C}_8$ ), 51.94 ( $2\text{C}_f$ ), 42.15 ( $2\text{C}_e$ ), 42.09 ( $\text{C}_g$ ), 29.87 (CONCH $_3$ ).

### ***N*-7-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide hydrochloride (49)**

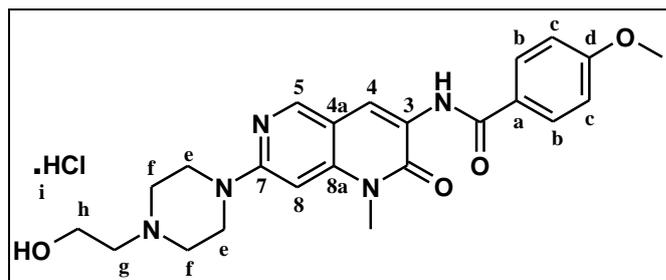
White powder

$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClN}_5\text{O}_4$

MW = 473.96 g.mol $^{-1}$

Mp = 279-280 °C

Yield = 70%



According to the general *procedure D*, compound **49** was obtained by reaction between amide derivative **23** (50 mg, 0.11 mmol) and a THF/HCl 1M mixture (110  $\mu\text{L}$ , 0.11 mmol, 1.0 equiv.). Filtration and rinsing with Et $_2$ O provided the corresponding hydrochloride salt **49** (20 mg, 70% yield) as a white powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  10.50 (br s, 1H,  $\text{H}_i$ ), 9.35 (s, 1H,  $\text{C}_3$ -NH), 8.66 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.63 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.95 (d,  $^3J = 8.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.13 (d,  $^3J = 8.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 6.81 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.44-5.40 (m, 1H, OH), 4.65-4.54 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 3.88 (s, 3H, OCH $_3$ ), 3.86-3.84 (m, 2H,  $\text{H}_h$ ), 3.72 (m, 3H, NCH $_3$ ), 3.68-3.58 (m, 2H,  $\text{H}_f$ ), 3.51-3.41 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 3.28-3.22 (m, 2H,  $\text{H}_g$ ), 3.22-3.10 (m, 2H,  $\text{H}_f$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  164.34 (NH-C=O), 162.27 ( $\text{C}_d$ ), 158.34 ( $\text{C}_7$ ), 157.67 ( $\text{C}_3$ -C=O), 148.74 ( $\text{C}_5$ ), 143.11 ( $\text{C}_{8a}$ ), 129.07 ( $2\text{C}_b$ ), 125.90 ( $\text{C}_a$ ), 124.63 ( $\text{C}_3$ ), 119.56 ( $\text{C}_4$ ), 114.08 ( $2\text{C}_c$ ), 109.45 ( $\text{C}_{4a}$ ), 89.99 ( $\text{C}_8$ ), 57.75 ( $\text{C}_g$ ), 55.48 (OCH $_3$ ), 54.98 ( $\text{C}_h$ ), 50.85 ( $2\text{C}_f$ ), 41.92 ( $2\text{C}_e$ ), 29.88 (NCH $_3$ ).

**N-(1-Methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide hydrochloride (50)**

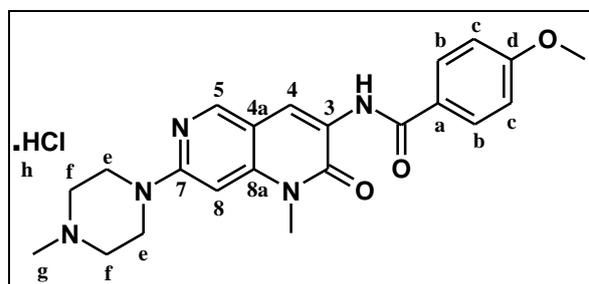
White powder

$C_{22}H_{26}ClN_5O_3$

MW = 443.93 g.mol<sup>-1</sup>

Mp = 299-300 °C

Yield = 84%



According to the general *procedure D*, compound **50** was obtained by reaction between amide derivative **24** (50 mg, 0.12 mmol) and a THF/HCl 1M mixture (120 μL, 0.12 mmol, 1.0 equiv.). Filtration and rinsing with Et<sub>2</sub>O provided the corresponding hydrochloride salt **50** (19 mg, 84% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.51 (br s, 1H, H<sub>h</sub>), 9.36 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.67 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.64 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.95 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.13 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.82 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 4.66-4.63 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.57-3.54 (m, 2H, H<sub>f</sub>), 3.36-3.30 (m, 2H, H<sub>e</sub>), 3.16-3.08 (m, 2H, H<sub>f</sub>), 2.87 (d, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 3H, H<sub>g</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.36 (NH-C=O), 162.29 (C<sub>d</sub>), 158.34 (C<sub>3</sub>-C=O), 157.57 (C<sub>7</sub>), 148.68 (C<sub>5</sub>), 143.13 (C<sub>8a</sub>), 129.09 (2C<sub>b</sub>), 125.90 (C<sub>a</sub>), 124.71 (C<sub>3</sub>), 119.55 (C<sub>4</sub>), 114.08 (2C<sub>c</sub>), 109.52 (C<sub>4a</sub>), 90.12 (C<sub>8</sub>), 55.48 (OCH<sub>3</sub>), 51.89 (2C<sub>f</sub>), 42.13 (2C<sub>e</sub>), 42.04 (C<sub>g</sub>), 29.90 (CONCH<sub>3</sub>).

**N-7-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide hydrochloride (51)**

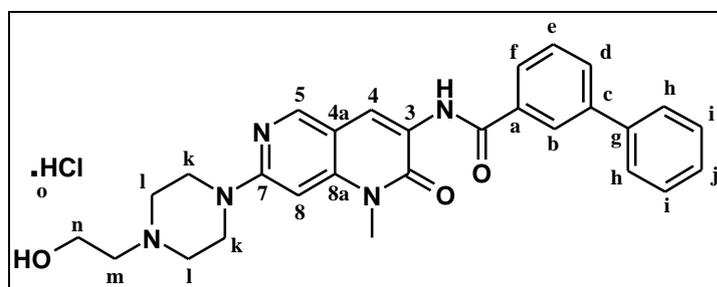
White powder

$C_{28}H_{30}ClN_5O_3$

MW = 520.03 g.mol<sup>-1</sup>

Mp = 291-292 °C

Yield = 69%



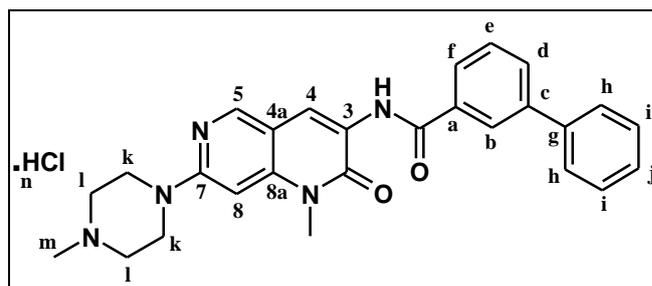
According to the general *procedure D*, compound **51** was obtained by reaction between amide derivative **28** (50 mg, 0.10 mmol) and a THF/HCl 1M mixture (100 μL, 0.10 mmol, 1.0 equiv.). Filtration and rinsing with Et<sub>2</sub>O provided the corresponding hydrochloride salt **51** (19 mg, 36% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 10.40 (br s, 1H, H<sub>o</sub>), 9.67 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.69 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.67 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.22 (br s, 1H, H<sub>b</sub>), 7.97-7.96 (m, 2H, H<sub>d</sub>, H<sub>f</sub>), 7.81 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 7.70 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.8 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 7.57 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.4 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 7.47 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 1H, H<sub>j</sub>), 6.82 (s, 1H, H<sub>g</sub>), 5.48-5.40 (m, 1H, OH), 4.65-4.62 (m, 2H, H<sub>k</sub>), 3.86 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>n</sub>), 3.73 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.68-3.65 (m, 2H, H<sub>l</sub>), 3.47-3.45 (m, 2H, H<sub>k</sub>), 3.30-3.28 (m, 2H, H<sub>m</sub>), 3.24-3.16 (m, 2H, H<sub>l</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 165.06 (NH-C=O), 158.35 (C<sub>7</sub>), 157.74 (C<sub>3</sub>-C=O), 148.88 (C<sub>5</sub>), 143.39 (C<sub>8a</sub>), 140.63 (C<sub>c</sub> or C<sub>g</sub>), 139.33 (C<sub>g</sub> or C<sub>c</sub>), 134.65 (C<sub>a</sub>), 130.31 (C<sub>d</sub>), 129.48 (C<sub>e</sub>), 129.05 (2C<sub>i</sub>), 127.93 (C<sub>j</sub>), 126.90 (2C<sub>h</sub>), 126.28 (C<sub>b</sub>), 125.49 (C<sub>f</sub>), 124.53 (C<sub>3</sub>), 120.88 (C<sub>4</sub>), 109.36 (C<sub>4a</sub>), 89.98 (C<sub>8</sub>), 57.66 (C<sub>m</sub>), 54.85 (C<sub>n</sub>), 50.79 (2C<sub>l</sub>), 41.84 (2C<sub>k</sub>), 29.85 (NCH<sub>3</sub>).

**N-(1-Methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)biphenyl-3-carboxamide hydrochloride (52)**

White powder  
 C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
 MW = 489.99 g.mol<sup>-1</sup>  
 Mp = 299-300 °C  
 Yield = 44%



According to the general *procedure D*, compound **52** was obtained by reaction between amide derivative **29** (50 mg, 0.11 mmol) and a THF/HCl 1M mixture (110 μL, 0.11 mmol, 1.0 equiv.). Filtration and rinsing with Et<sub>2</sub>O provided the corresponding hydrochloride salt **52** (19 mg, 44% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.08 (br s, 1H, H<sub>n</sub>), 9.68 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.69 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.68 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.21 (s, 1H, H<sub>b</sub>), 7.97-7.95 (m, 2H, H<sub>d</sub>, H<sub>f</sub>), 7.80 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 7.70 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 7.57 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 7.47 (appt, <sup>app</sup>*J* = 7.5 Hz, 1H, H<sub>j</sub>), 6.84 (s, 1H, H<sub>g</sub>), 4.66-4.63 (m, 2H, H<sub>k</sub>), 3.73 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.57-3.54 (m, 2H, H<sub>l</sub>), 3.45-3.39 (m, 2H, H<sub>k</sub>), 3.17-3.09 (m, 2H, H<sub>l</sub>), 2.85 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, 3H, H<sub>m</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 165.11 (NH-C=O), 158.34 (C<sub>7</sub>), 157.25 (C<sub>3</sub>-C=O), 148.21 (C<sub>5</sub>), 143.58 (C<sub>8a</sub>), 140.65 (C<sub>c</sub> or C<sub>g</sub>), 139.22 (C<sub>g</sub> or C<sub>c</sub>), 134.46 (C<sub>a</sub>), 130.39 (C<sub>d</sub>), 129.57 (C<sub>e</sub>), 129.09 (2C<sub>i</sub>), 127.98 (C<sub>j</sub>), 126.85 (2C<sub>h</sub>), 126.22 (C<sub>f</sub>), 125.39 (C<sub>b</sub>), 124.58 (C<sub>3</sub>), 120.78 (C<sub>4</sub>), 109.48 (C<sub>4a</sub>), 90.29 (C<sub>8</sub>), 51.89 (2C<sub>l</sub>), 42.20 (2C<sub>k</sub>), 42.08 (C<sub>m</sub>), 29.87 (CONCH<sub>3</sub>).

**7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridine-3-carboxylic Acid (53)**

Yellow powder

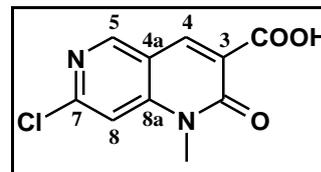
$C_{10}H_7ClN_2O_3$

MW = 238.62 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.22 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 277-278 °C

Yield = 99%



To a stirred solution of compound **4** (200 mg, 1.17 mmol) in EtOH (2 mL) were added Meldrum's acid (169 mg, 1.17 mmol, 1.0 equiv.), piperidine (17  $\mu$ L, 0.12 mmol, 0.1 equiv.), and acetic acid (20  $\mu$ L, 0.35 mmol, 0.3 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min and then heated at reflux for 2 h. After cooling to room temperature, the crystallized product was filtered, washed with EtOH, and dried *in vacuo* to give **53** (276 mg, 99%) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  13.76 (s, 1H, COOH), 9.06 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.92 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.87 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.71 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  164.09 (COOH), 161.67 (C<sub>2</sub>), 152.98 (C<sub>8a</sub>), 152.74 (C<sub>5</sub>), 146.86 (C<sub>7</sub>), 142.13 (C<sub>4</sub>), 121.30 (C<sub>3</sub>), 114.81 (C<sub>4a</sub>), 109.45 (C<sub>8</sub>), 30.03 (NCH<sub>3</sub>).

IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3105 ( $\nu$ O-H); 1730 ( $\nu$ C=O); 1612 ( $\nu$ C=O); 1416 ( $\nu$ C=C), 804 ( $\nu$ C-Cl).

MS (ESI), *m/z* (%): 239.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 241.0 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 239.0218, found 239.0208.

**3-Bromo-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (54)**

Yellow powder

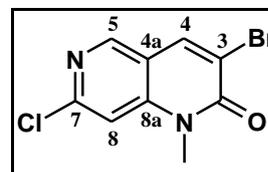
$C_9H_6BrClN_2O$

MW = 273.42 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.24 (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20)

Mp = 264-265 °C

Yield = 74%



According to the general *procedure E*, compound **54** was obtained by reaction between carboxylic acid **53** (100 mg, 0.42 mmol), NBS (313 mg, 1.76 mmol, 4.2 equiv.) and LiOAc (33 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.). Trituration with diisopropyl ether afforded **54** (85 mg, 74%) as a white powder.

## Experimental section

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.76 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.67 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.72 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 157.50 (C=O), 150.79 (C<sub>8a</sub>), 149.51 (C<sub>5</sub>), 145.83 (C<sub>7</sub>), 138.67 (C<sub>4</sub>), 117.49 (C<sub>3</sub>), 115.72 (C<sub>4a</sub>), 109.06 (C<sub>8</sub>), 30.85 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 2961 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1651 (νC=O); 1607, 1470 (νC=C); 806 (νC-Cl); 625 (νC-Br).

**MS (ESI), m/z (%):** 273.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 275.0 (80) [M+H+2]<sup>+</sup>, 277.0 (32) [M+H+4]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. For C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>BrClN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 272.9425, found 272.9418.

### **7-Chloro-3-iodo-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (55)**

**Brown powder**

**C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>ClIN<sub>2</sub>O**

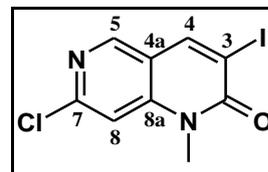
**MW = 320.52 g.mol<sup>-1</sup>**

**Rf = 0.24 (petroleum ether/ethyl acetate/:**

**80/20)**

**Mp = 227-228 °C**

**Yield = 93%**



According to the general *procedure E*, compound **55** was obtained by reaction between carboxylic acid **53** (100 mg, 0.42 mmol), NIS (301 mg, 1.35 mmol, 3.2 equiv.) and LiOAc (33 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.). Trituration with diisopropyl ether afforded **55** (126 mg, 93%) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.82 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.71 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.66 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.65 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 158.34 (C=O), 150.74 (C<sub>8a</sub>), 149.12 (C<sub>5</sub>), 146.42 (C<sub>7</sub>), 145.67 (C<sub>4</sub>), 116.79 (C<sub>4a</sub>), 108.98 (C<sub>8</sub>), 96.00 (C<sub>3</sub>), 31.06 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 1657 (νC=O); 1470, 1420 (νC=C); 795 (νC-Cl); 623 (νC-I).

**MS (ESI), m/z (%):** 321.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 322.9 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>ClIN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 320.9286, found 320.9279.

**7-Chloro-1-methyl-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (56)**

Yellow powder

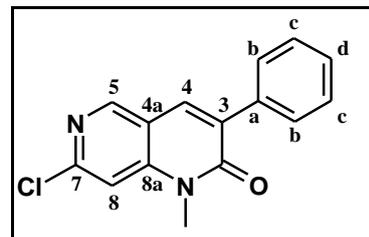
$C_{15}H_{11}ClN_2O$

MW = 270.72 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.18 (dichloromethane)

Mp = 146-147 °C

Yield = 74%



According to the general *procedure F*, compound **56** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), phenylboronic acid (41 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **56** (62 mg, 74% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.82 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.24 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.73 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.69 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.52-7.45 (m, 3H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>), 3.69 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160.53 (C=O), 150.47 (C<sub>8a</sub>), 150.28 (C<sub>5</sub>), 145.89 (C<sub>7</sub>), 135.78 (C<sub>3</sub>), 134.32 (C<sub>4</sub>), 132.42 (C<sub>a</sub>), 128.72 (2C<sub>b</sub>), 128.35 (C<sub>d</sub>), 128.03 (2C<sub>c</sub>), 115.76 (C<sub>4a</sub>), 108.49 (C<sub>8</sub>), 29.79 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3026 (νC-H<sub>ar</sub>); 2924 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1649 (νC=O); 1564, 1474 (νC=C); 706 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 271.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 273.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 271.0633, found 271.0624.

**7-Chloro-3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (57)**

White powder

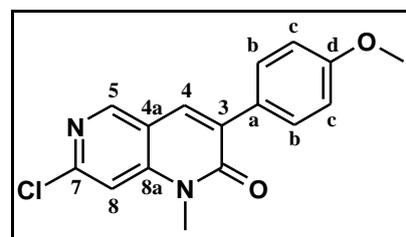
$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$

MW = 300.74 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.09 (dichloromethane)

Mp = 171-172 °C

Yield = 70%



## Experimental section

According to the general *procedure F*, compound **57** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), 4-methoxyphenylboronic acid (52 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 80:20) afforded **57** (65 mg, 70% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.80 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.19 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.73 (d, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.67 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.06 (d, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 160.67 (C=O), 159.43 (C<sub>d</sub>), 150.10 (C<sub>8a</sub>), 150.02 (C<sub>5</sub>), 145.62 (C<sub>7</sub>), 132.99 (C<sub>4</sub>), 131.92 (C<sub>3</sub>), 130.03 (2C<sub>b</sub>), 127.98 (C<sub>a</sub>), 115.89 (C<sub>4a</sub>), 113.49 (2C<sub>c</sub>), 108.40 (C<sub>8</sub>), 55.17 (OCH<sub>3</sub>), 29.79 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 2940, 2843 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1655 (νC=O); 1603, 1562, 1510 (νC=C); 727 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 301.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 303.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 301.0738, found 301.0735.

### **7-Chloro-3-(4-chlorophenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (58)**

Beige powder

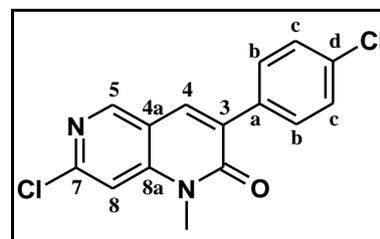
C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

MW = 305.16 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.20 (dichloromethane)

Mp = 229-230 °C

Yield = 68%



According to the general *procedure F*, compound **58** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), 4-chlorophenylboronic acid (53 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **58** (65 mg, 68% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.82 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.29 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.78 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.70 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.56 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 3.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 160.37 (C=O), 150.64 (C<sub>8a</sub>), 150.40 (C<sub>5</sub>), 145.94 (C<sub>7</sub>), 134.62 (C<sub>4</sub>), 134.55 (C<sub>3</sub>), 133.08 (C<sub>d</sub>), 131.03 (C<sub>a</sub>), 130.52 (2C<sub>c</sub>), 128.08 (2C<sub>b</sub>), 115.65 (C<sub>4a</sub>), 108.55 (C<sub>8</sub>), 29.83 (NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3065, 3028 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 1649 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1620, 1572, 1477 ( $\nu\text{C=C}$ ); 833 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 305.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 307.0 (65)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ , 309.0 (10)  $[\text{M}+\text{H}+4]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  305.0243, found 305.0235.

### 1-Methyl-3,7-diphenyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (59)

**White powder**

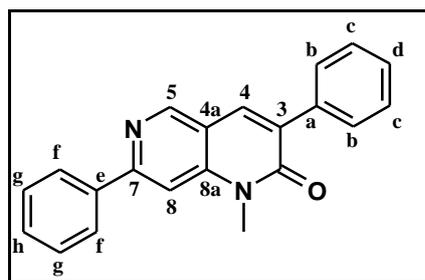
**$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$**

**MW = 312.37  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$**

**R<sub>f</sub> = 0.22 (dichloromethane)**

**Mp = 155-156 °C**

**Yield = 69%**



According to the general *procedure H*, compound **59** was obtained by reaction between 3-aryl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one **56** (150 mg, 0.55 mmol), 4-phenylboronic acid (74 mg, 0.61 mmol, 1.1 equiv.),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (146 mg, 1.38 mmol, 2.5 equiv.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (35 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **59** (119 mg, 69% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  9.07 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.32 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 8.28 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.00 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 7.79 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.61-7.44 (m, 6H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_g$ ,  $\text{H}_h$ ), 3.84 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  160.84 ( $\text{C=O}$ ), 156.03 ( $\text{C}_{8a}$ ), 150.52 ( $\text{C}_5$ ), 144.81 ( $\text{C}_7$ ), 138.40 ( $\text{C}_e$ ), 136.18 ( $\text{C}_3$ ), 134.78 ( $\text{C}_4$ ), 131.80 ( $\text{C}_a$ ), 129.49 ( $\text{C}_h$ ), 128.75 ( $2\text{C}_g$  or  $2\text{C}_b$ ), 128.72 ( $2\text{C}_b$  or  $2\text{C}_g$ ), 128.14 ( $\text{C}_d$ ), 127.99 ( $2\text{C}_c$ ), 127.12 ( $2\text{C}_f$ ), 115.36 ( $\text{C}_{4a}$ ), 104.76 ( $\text{C}_8$ ), 29.60 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3048 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 1643 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1574, 1429 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 313.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  313.1335, found 313.1322.

**3,7-di(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (60)**

Yellow powder

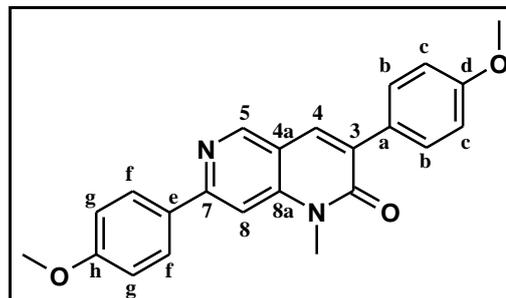
$C_{23}H_{20}N_2O_3$

MW = 372.41 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.26 (petroleum ether/ethyl acetate:  
70/30)

Mp = 189-190 °C

Yield = 9%



In a 10 mL vessel were added compound **54** (100 mg, 0.37 mmol) in a 1,4-dioxane/water mixture (4:1, 5 mL), 4-methoxyphenylboronic acid (62 mg, 0.41 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99 mg, 0.93 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). The tube was sealed and the reaction was heated in an oil bath at 105 °C for 2 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (dichloromethane) to provide **60** (12 mg, 9% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.99 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.28 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 8.18 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.88 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.76 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.12 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 7.05 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.88 (s, 3H, C<sub>h</sub>-OCH<sub>3</sub> or C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub> or C<sub>h</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 161.01 (C=O), 160.49 (C<sub>h</sub> or C<sub>d</sub>), 159.21 (C<sub>d</sub> or C<sub>h</sub>), 150.21 (C<sub>5</sub>), 144.54 (C<sub>7</sub>), 133.55 (C<sub>4</sub>), 130.88 (C<sub>3</sub> or C<sub>e</sub>), 130.80 (C<sub>e</sub> or C<sub>3</sub>), 129.99 (2C<sub>f</sub>), 128.52 (2C<sub>b</sub>), 128.47 (C<sub>a</sub>), 114.98 (C<sub>4a</sub>), 114.08 (2C<sub>g</sub>), 113.42 (2C<sub>c</sub>), 103.52 (C<sub>8</sub>), 55.27 (C<sub>h</sub>-OCH<sub>3</sub> or C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub>), 55.16 (C<sub>d</sub>-OCH<sub>3</sub> or C<sub>h</sub>-OCH<sub>3</sub>), 29.55 (NCH<sub>3</sub>).

C<sub>8a</sub> is missing.

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 2926 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1639 (νC=O); 1582, 1510 (νC=C).

MS (ESI), m/z (%): 373.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**7-Chloro-3-(4-cyanophenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (62)**

Beige powder

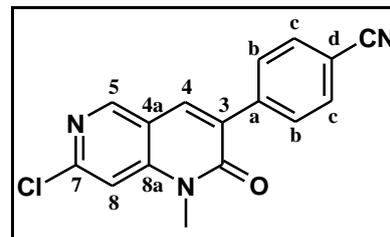
$C_{16}H_{10}ClN_3O$

MW = 295.45 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.13 (dichloromethane)

Mp = 330-331 °C

Yield = 70%



According to the general *procedure F*, compound **62** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), 4-cyanophenylboronic acid (50 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **62** (64 mg, 70% yield) as a beige powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.84 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.39 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.98 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.95 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.73 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.70 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160.15 (C=O), 151.05 (C<sub>8a</sub>), 150.74 (C<sub>5</sub>), 146.18 (C<sub>7</sub>), 140.47 (C<sub>a</sub>), 135.93 (C<sub>4</sub>), 131.98 (2C<sub>c</sub>), 130.59 (C<sub>3</sub>), 129.61 (2C<sub>b</sub>), 118.72 (C≡N), 115.54 (C<sub>4a</sub>), 110.80 (C<sub>3</sub>), 108.68 (C<sub>8</sub>), 29.87 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3100 (νC-H<sub>ar</sub>); 2228 (νC≡N), 1670 (νC=O); 1620, 1574, 1479 (νC=C); 831 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 296.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 298.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 296.0585, found 296.0582.

**7-Chloro-3-(3,5-dimethylphenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (63)**

Pale yellow powder

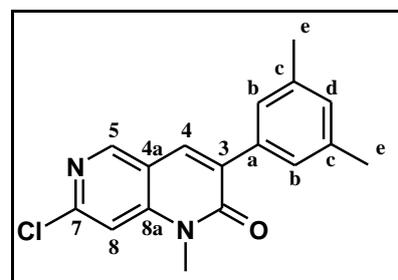
$C_{17}H_{15}ClN_2O$

MW = 298.77 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.18 (dichloromethane)

Mp = 165-166 °C

Yield = 68%



## Experimental section

According to the general *procedure F*, compound **63** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), 3,5-dimethylphenylboronic acid (51 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **63** (63 mg, 68% yield) as a pale yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.80 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.19 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.67 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.33 (s, 2H, H<sub>b</sub>), 7.08 (s, 1H, H<sub>d</sub>), 3.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 6H, H<sub>e</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 160.52 (C=O), 150.36 (C<sub>8a</sub>), 150.18 (C<sub>5</sub>), 145.78 (C<sub>7</sub>), 136.92 (2C<sub>c</sub>), 135.67 (C<sub>3</sub>), 134.02 (C<sub>4</sub>), 132.62 (C<sub>a</sub>), 129.73 (C<sub>d</sub>), 126.43 (2C<sub>b</sub>), 115.77 (C<sub>4a</sub>), 108.42 (C<sub>8</sub>), 29.74 (NCH<sub>3</sub>), 20.93 (2C<sub>e</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 1657 (νC=O); 1620, 1564, 1452 (νC=C); 698 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 299.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 301.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 299.0946, found 299.0940.

### 7-Chloro-3-(3-fluorophenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (64)

White powder

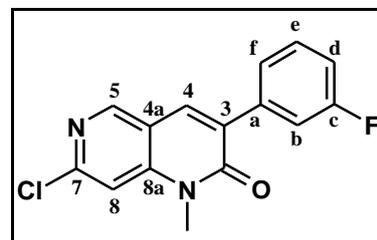
C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FCIN<sub>2</sub>O

MW = 288.71 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.27 (dichloromethane)

Mp = 160-161 °C

Yield = 71%



According to the general *procedure F*, compound **64** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), 3-fluorophenylboronic acid (48 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **64** (64 mg, 71% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.82 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.34 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.63-7.52 (m, 3H, H<sub>b</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>), 7.33-7.28 (m, 1H, H<sub>d</sub>), 3.69 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 161.74 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 241 Hz, C<sub>c</sub>), 160.29 (C=O), 150.76 (C<sub>8a</sub>), 150.49 (C<sub>5</sub>), 145.97 (C<sub>7</sub>), 137.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 8 Hz, C<sub>a</sub>), 135.08 (C<sub>4</sub>), 130.80 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 2 Hz, C<sub>3</sub>), 130.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 8 Hz, C<sub>e</sub>), 124.79 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 3 Hz, C<sub>f</sub>), 115.58 (C<sub>4a</sub>), 115.54 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 23 Hz, C<sub>b</sub>), 115.14 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 20 Hz, C<sub>d</sub>), 108.58 (C<sub>8</sub>), 29.84 (NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3088 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 1667 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1620, 1572, 1481 ( $\nu\text{C=C}$ ); 1059, 1099 ( $\nu\text{C-F}$ ), 847 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 289.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 291.1 (40)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  289.0538, found 289.0532.

### 7-Chloro-1-methyl-3-(pyridin-4-yl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (65)

White powder

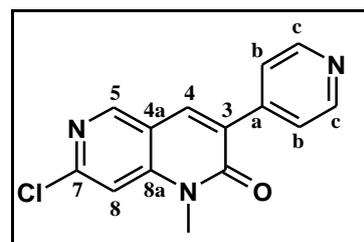
$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$

MW = 271.45  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.07 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp > 400 °C

Yield = 55%



According to the general *procedure F*, compound **65** was obtained by reaction between dihalo compound **55** (100 mg, 0.31 mmol), 4-pyridineboronic acid pinacol ester (70 mg, 0.34 mmol, 1.1 equiv.),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (83 mg, 0.78 mmol, 2.5 equiv.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **65** (46 mg, 55% yield) as a white powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  8.86 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.71 (dd,  $^3J = 4.6$  Hz,  $^5J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 8.46 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.78 (dd,  $^3J = 4.6$  Hz,  $^5J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.74 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  160.00 ( $\text{C=O}$ ), 151.18 ( $\text{C}_{8a}$ ), 150.82 ( $\text{C}_5$ ), 149.56 ( $2\text{C}_c$ ), 146.27 ( $\text{C}_7$ ), 143.07 ( $\text{C}_a$ ), 136.09 ( $\text{C}_4$ ), 129.62 ( $\text{C}_3$ ), 123.13 ( $2\text{C}_b$ ), 115.44 ( $\text{C}_{4a}$ ), 108.71 ( $\text{C}_8$ ), 29.84 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3038 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 1645 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1572, 1483 ( $\nu\text{C=C}$ ); 829 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 272.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 274.1 (40)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  272.0585, found 272.0581.

**3-Anilino-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (66)**

White powder

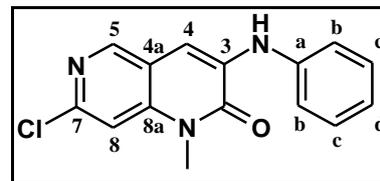
$C_{15}H_{12}ClN_3O$

MW = 285.73 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.31 (dichloromethane)

Mp = 184-195 °C

Yield = 84%



According to the general *procedure G*, compound **66** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), aniline (34  $\mu$ L, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **66** (89 mg, 84% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.42 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.41 (appt, <sup>app</sup>J = 7.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.27-7.25 (m, 3H, H<sub>b</sub>, NH), 7.21 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.20 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.13 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 3.78 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  158.84 (C=O), 147.18 (C<sub>8a</sub>), 147.02 (C<sub>5</sub>), 140.48 (C<sub>7</sub>), 139.65 (C<sub>a</sub>), 134.08 (C<sub>3</sub>), 129.68 (2C<sub>c</sub>), 123.78 (C<sub>d</sub>), 120.98 (2C<sub>b</sub>), 117.48 (C<sub>4a</sub>), 107.74 (C<sub>8</sub>), 102.33 (C<sub>4</sub>), 30.28 (NCH<sub>3</sub>).

IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3319 ( $\nu$ N-H); 2922 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1618 ( $\nu$ C=O); 1574, 1521 ( $\nu$ C=C); 831 ( $\nu$ C-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 286.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 288.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 286.0742, found: 286.0734.

**7-Chloro-1-methyl-3-n-propylamino-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (67)**

Beige powder

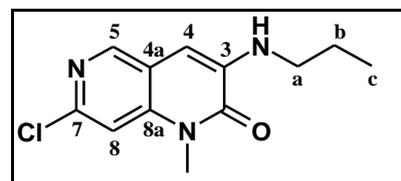
$C_{12}H_{14}ClN_3O$

MW = 251.72 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.23 (dichloromethane)

Mp = 198-199 °C

Yield = 29%



## Experimental section

According to the general *procedure G*, compound **67** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), *n*-propylamine (30  $\mu$ L, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **67** (27 mg, 29% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.41 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.14 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.36 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 5.32 (s, 1H, NH), 3.72 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.17-3.12 (m, 2H, H<sub>a</sub>), 1.77-1.68 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 1.04 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 3H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  158.66 (C=O), 146.24 (C<sub>5</sub>), 145.83 (C<sub>8a</sub>), 139.65 (C<sub>7</sub>), 137.82 (C<sub>3</sub>), 118.38 (C<sub>4a</sub>), 107.64 (C<sub>8</sub>), 98.48 (C<sub>4</sub>), 44.81 (C<sub>a</sub>), 29.95 (NCH<sub>3</sub>), 21.88 (C<sub>b</sub>), 11.66 (C<sub>c</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3341 ( $\nu$ N-H); 2966, 2866 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1639 ( $\nu$ C=O); 1661, 1572, 1504 ( $\nu$ C=C); 856 ( $\nu$ C-Cl).

**MS (ESI), *m/z* (%):** 252.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 254.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 252.0898, found: 252.0888.

### 3-(Benzylamino)-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (68)

White powder

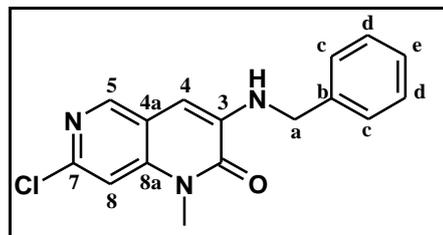
C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O

MW = 299.76 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.29 (dichloromethane)

Mp = 169-170 °C

Yield = 87%



According to the general *procedure G*, compound **68** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), benzylamine (40  $\mu$ L, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **68** (97 mg, 87% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.34 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.38-7.28 (m, 5H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>e</sub>), 7.14 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.35 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 5.79 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.43 (d, <sup>3</sup>*J* = 5.8 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 3.72 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  158.62 (C=O), 146.51 ( $\text{C}_5$ ), 146.23 ( $\text{C}_{8a}$ ), 139.92 ( $\text{C}_7$ ), 137.48 ( $\text{C}_3$ ), 137.29 ( $\text{C}_b$ ), 128.85 ( $2\text{C}_d$ ), 127.68 ( $\text{C}_e$ ), 127.25 ( $2\text{C}_c$ ), 118.04 ( $\text{C}_{4a}$ ), 107.66 ( $\text{C}_8$ ), 99.75 ( $\text{C}_4$ ), 47.25 ( $\text{C}_a$ ), 29.98 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3389 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2940 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1618 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1574, 1495 ( $\nu\text{C=C}$ ); 729 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 300.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 302.1 (40)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  300.0898, found: 300.0891.

### 7-Chloro-1-methyl-3-morpholin-4-yl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (69)

Yellow powder

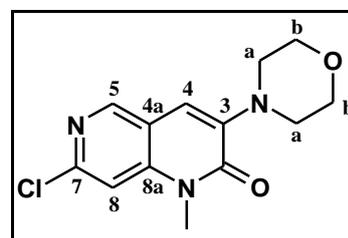
$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_2$

MW = 279.73  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.13 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 171-172  $^\circ\text{C}$

Yield = 83%



According to the general *procedure G*, compound **69** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), morpholine (32  $\mu\text{L}$ , 0.37 mmol, 1.0 equiv.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **69** (86 mg, 83% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.48 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.18 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 6.89 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 3.91 (t,  $^3J = 4.7$  Hz, 4H,  $\text{H}_b$ ), 3.67 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.25 (t,  $^3J = 4.7$  Hz, 4H,  $\text{H}_a$ ),

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  159.20 (C=O), 148.94 ( $\text{C}_{8a}$ ), 148.01 ( $\text{C}_5$ ), 142.76 ( $\text{C}_7$ ), 142.57 ( $\text{C}_3$ ), 116.48 ( $\text{C}_{4a}$ ), 114.46 ( $\text{C}_4$ ), 107.59 ( $\text{C}_8$ ), 66.69 ( $2\text{C}_b$ ), 49.71 ( $2\text{C}_a$ ), 29.81 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2965, 2868 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1655 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1609, 1572 ( $\nu\text{C=C}$ ); 870 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 280.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 282.1 (40)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  280.0847, found: 280.0839.

**7-Chloro-3-[(4-methoxyphenyl)amino]-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (70)**

Yellow powder

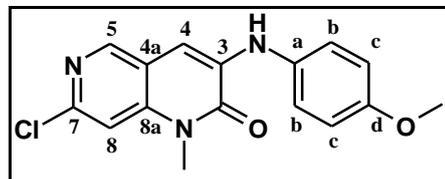
$C_{16}H_{14}ClN_3O_2$

MW = 315.76 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.28 (dichloromethane)

Mp = 165-166 °C

Yield = 81%



According to the general *procedure G*, compound **70** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), *p*-anisidine (46 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **70** (95 mg, 81% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.36 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.21-7.18 (m, 3H, H<sub>b</sub>, H<sub>8</sub>), 7.02 (br s, 1H, NH), 6.96 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.92 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158.80 (C=O), 156.72 (C<sub>d</sub>), 146.75 (C<sub>5</sub>), 146.72 (C<sub>8a</sub>), 140.23 (C<sub>7</sub>), 135.59 (C<sub>3</sub>), 135.29 (C<sub>a</sub>), 124.20 (2C<sub>b</sub>), 117.75 (C<sub>4a</sub>), 114.95 (2C<sub>c</sub>), 107.69 (C<sub>8</sub>), 100.98 (C<sub>4</sub>), 55.75 (OCH<sub>3</sub>), 30.18 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3331 (νN-H); 3044 (νC-H<sub>ar</sub>); 2951 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1622 (νC=O); 1575, 1519 (νC=C); 766 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 316.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 318.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 316.0847, found: 316.0836.

**7-Chloro-3-[(4-chlorophenyl)amino]-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (71)**

Beige powder

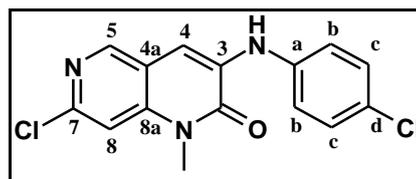
$C_{15}H_{11}Cl_2N_3O$

MW = 320.18 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.20 (dichloromethane)

Mp = 266-267 °C

Yield = 44%



## Experimental section

According to the general *procedure G*, compound **71** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), 4-chloroaniline (47 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) and trituration with acetone afforded **71** (52 mg, 44% yield) as a beige powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.43 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.37 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.23-7.19 (m, 4H, NH, H<sub>b</sub>, H<sub>8</sub>), 7.15 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 3.78 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 158.71 (C=O), 147.50 (C<sub>8a</sub>), 147.13 (C<sub>5</sub>), 140.58 (C<sub>7</sub>), 138.25 (C<sub>a</sub>), 133.79 (C<sub>3</sub>), 129.75 (2C<sub>c</sub>), 128.75 (C<sub>d</sub>), 124.14 (2C<sub>b</sub>), 117.23 (C<sub>4a</sub>), 107.81 (C<sub>8</sub>), 102.80 (C<sub>4</sub>), 30.32 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3308 (νN-H); 3107 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1649 (νC=O); 1576, 1516, 1489 (νC=C); 772, 750 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 320.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 322.0 (65) [M+H+2]<sup>+</sup>, 324.0 (10) [M+H+4]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 320.0352, found: 320.0340.

### **N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)acetamide (6)**

White powder

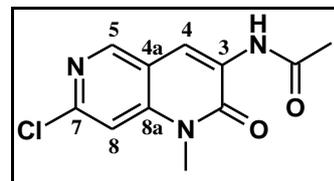
C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

MW = 251.67 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.26 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 264-265 °C

Yield = 49%



According to the general *procedure G*, compound **6** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), acetamide (19 μL, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **6** (46 mg, 49% yield) as a white powder. Analytical data agree with previous characterization.

**N-(7-Chloro-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (9)**

White powder

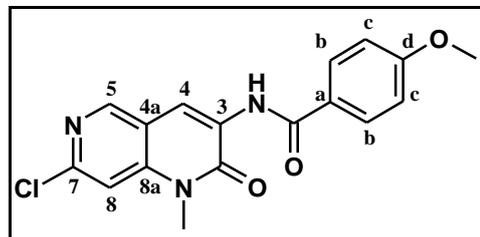
$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$

MW = 343.75 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.08 (dichloromethane)

Mp = 229-230 °C

Yield = 81%



According to the general *procedure G*, compound **9** was obtained by reaction between dihalo compound **54** (100 mg, 0.37 mmol), 4-methoxybenzamide (56 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (12 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **9** (103 mg, 81% yield) as a white powder. Analytical data agree with previous characterization.

**7-(4-Methoxyphenyl)-1-methyl-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (72)**

White powder

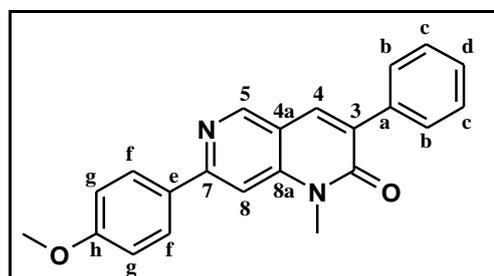
$C_{22}H_{18}N_2O_2$

MW = 342.40 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.07 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 198-199 °C

Yield = 61%



According to the general *procedure H*, compound **72** was obtained by reaction between 3-aryl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one **56** (150 mg, 0.55 mmol), 4-methoxyphenylboronic acid (93 mg, 0.61 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (146 mg, 1.38 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (35 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **72** (115 mg, 61% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.01 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.29 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 8.24 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.91 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.77 (dd, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.52-7.42 (m, 3H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>), 7.13 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160.87 (C=O), 160.55 (C<sub>h</sub>), 155.85 (C<sub>8a</sub>), 150.43 (C<sub>5</sub>), 144.83 (C<sub>7</sub>), 136.25 (C<sub>3</sub>), 134.85 (C<sub>4</sub>), 131.26 (C<sub>a</sub>), 130.80 (C<sub>e</sub>), 128.73 (2C<sub>c</sub>), 128.57 (2C<sub>f</sub>), 128.05 (C<sub>d</sub>), 127.98 (2C<sub>b</sub>), 114.85 (C<sub>4a</sub>), 114.09 (2C<sub>g</sub>), 103.57 (C<sub>8</sub>), 55.28 (OCH<sub>3</sub>), 29.56 (NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 1649 ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ); 1580, 1574, 1489 ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 343.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  343.1441, found 343.1432.

### **7-(4-Cyanophenyl)-1-methyl-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (73)**

White powder

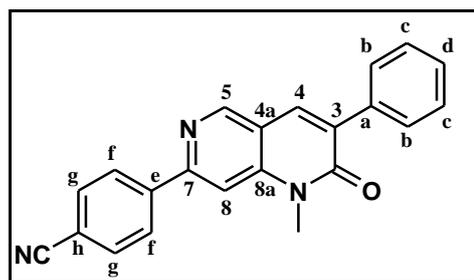
$\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$

MW = 337.38  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.13 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 235-236  $^{\circ}\text{C}$

Yield = 81%



According to the general *procedure H*, compound **73** was obtained by reaction between 3-aryl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one **56** (150 mg, 0.55 mmol), 4-cyanophenylboronic acid (90 mg, 0.61 mmol, 1.1 equiv.),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (146 mg, 1.38 mmol, 2.5 equiv.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (35 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) and trituration with diisopropyl ether afforded **73** (151 mg, 81% yield) as a white powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):**  $\delta$  9.11 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.53 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_g$ ), 8.29 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.14 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 8.06 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 7.78 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.53-7.45 (m, 3H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ), 3.84 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):**  $\delta$  160.78 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 153.83 ( $\text{C}_{8a}$ ), 150.70 ( $\text{C}_5$ ), 144.86 ( $\text{C}_7$ ), 142.58 ( $\text{C}_e$ ), 136.03 ( $\text{C}_3$ ), 134.62 ( $\text{C}_4$ ), 132.68 ( $2\text{C}_g$ ), 132.55 ( $\text{C}_a$ ), 128.77 ( $2\text{C}_b$ ), 128.29 ( $\text{C}_d$ ), 128.02 ( $2\text{C}_f$ ), 127.83 ( $2\text{C}_c$ ), 118.76 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ), 116.03 ( $\text{C}_{4a}$ ), 111.73 ( $\text{C}_h$ ), 106.09 ( $\text{C}_8$ ), 29.75 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3051 ( $\nu\text{C}-\text{H}_{\text{ar}}$ ); 2230 ( $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ ); 1651 ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ); 1605, 1585, 1557 ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 338.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  338.1288, found 338.1290.

**3-(4-Methoxyphenyl)-1-methyl-7-(pyridin-4-yl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (74)**

Yellow powder

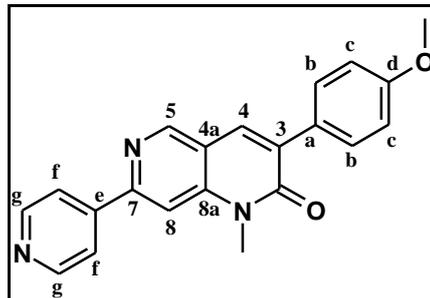
$C_{21}H_{17}N_3O_2$

MW = 343.38 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.10 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 252-253 °C

Yield = 78%



According to the general *procedure H*, compound **74** was obtained by reaction between 3-aryl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one **57** (150 mg, 0.50 mmol), 4-pyridineboronic acid pinacol ester (113 mg, 0.55 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (132 mg, 1.25 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (35 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **74** (134 mg, 78% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.10 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.78 (dd, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, <sup>5</sup>J = 1.6 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 8.28 (dd, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, <sup>5</sup>J = 1.6 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 8.25 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.14 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.78 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.07 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 160.90 (C=O), 159.41 (C<sub>d</sub>), 152.91 (C<sub>8a</sub>), 150.54 (C<sub>5</sub>), 150.30 (2C<sub>g</sub>), 145.35 (C<sub>7</sub>), 144.56 (C<sub>e</sub>), 133.26 (C<sub>4</sub>), 132.21 (C<sub>3</sub>), 130.07 (2C<sub>b</sub>), 128.21 (C<sub>a</sub>), 121.08 (2C<sub>f</sub>), 116.56 (C<sub>4a</sub>), 113.47 (2C<sub>c</sub>), 106.00 (C<sub>8</sub>), 55.18 (OCH<sub>3</sub>), 29.77 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3042 (νC-H<sub>ar</sub>); 2995, 2947 (νC-H<sub>aliph</sub>), 1643 (νC=O); 1582 (νC=C).

MS (ESI), m/z (%): 344.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 344.1394, found 344.1394.

**3-(3-Fluorophenyl)-1-methyl-7-(3,5-dimethylphenyl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (75)**

White powder

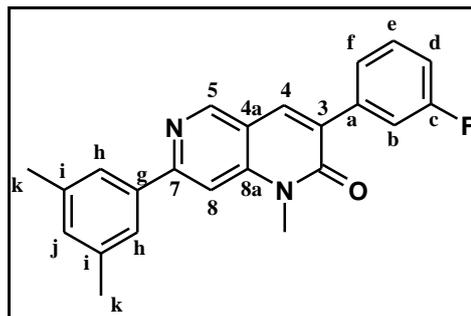
$C_{23}H_{19}FN_2O$

MW = 358.19 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.16 (dichloromethane)

Mp = 225-226 °C

Yield = 92%





## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  159.17 (C=O), 153.86 ( $\text{C}_{8a}$ ), 147.89 ( $\text{C}_5$ ), 140.06 ( $\text{C}_a$ ), 139.45 ( $\text{C}_7$ ), 139.39 ( $\text{C}_e$ ), 133.73 ( $\text{C}_3$ ), 129.65 ( $2\text{C}_c$ ), 128.89 ( $\text{C}_h$ ), 128.86 ( $2\text{C}_g$ ), 126.88 ( $2\text{C}_f$ ), 123.38 ( $\text{C}_d$ ), 120.66 ( $2\text{C}_b$ ), 117.10 ( $\text{C}_{4a}$ ), 104.54 ( $\text{C}_8$ ), 103.47 ( $\text{C}_4$ ), 30.15 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3300 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3053 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 1638 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1584, 1518, 1495 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 328.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  328.1444, found: 328.1441.

### 3-[(4-Methoxyphenyl)amino]-1-methyl-7-phenyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (77)

Yellow powder

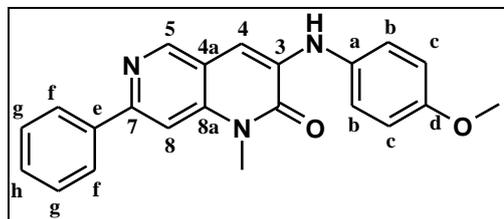
$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$

MW = 357.41  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.21 (petroleum ether/ethyl acetate:  
80/20)

Mp = 197-198  $^\circ\text{C}$

Yield = 71%



According to the general *procedure H*, compound **77** was obtained by reaction between 3-*N*-substituted-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one **70** (150 mg, 0.48 mmol), 4-phenylboronic acid (65 mg, 0.53 mmol, 1.1 equiv.),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (127 mg, 1.20 mmol, 2.5 equiv.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 70:30) afforded **77** (122 mg, 71% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.68 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.02 (dd,  $^3J = 6.8$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 7.55 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 7.50 (appt,  $^{app}J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_g$ ), 7.44-7.40 (m, 1H,  $\text{H}_h$ ), 7.23 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.07 (s, 1H, NH), 7.04 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 6.98 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  159.13 (C=O), 156.47 ( $\text{C}_d$ ), 153.43 ( $\text{C}_{8a}$ ), 147.64 ( $\text{C}_5$ ), 139.52 ( $\text{C}_7$ ), 139.13 ( $\text{C}_e$ ), 135.28 ( $\text{C}_3$ ), 132.75 ( $\text{C}_a$ ), 128.84 ( $\text{C}_h$ ), 128.79 ( $2\text{C}_g$ ), 126.83 ( $2\text{C}_f$ ), 123.91 ( $2\text{C}_b$ ), 117.38 ( $\text{C}_{4a}$ ), 114.92 ( $2\text{C}_c$ ), 104.53 ( $\text{C}_8$ ), 102.03 ( $\text{C}_4$ ), 55.58 ( $\text{OCH}_3$ ), 30.06 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3304 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2943, 2905 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1618 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1585, 1522, 1506 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 358.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  358.1550, found: 358.1541.

**N-[7-(4-Cyanophenyl)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]-4-methoxybenzamide (78)**

White powder

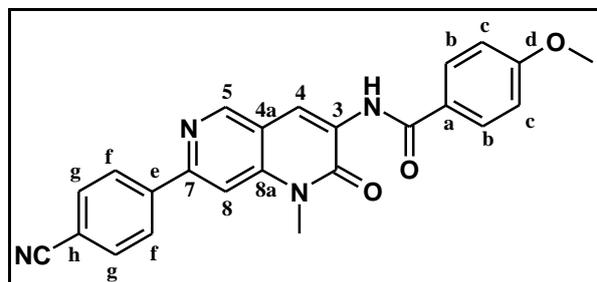
$C_{24}H_{18}N_4O_3$

MW = 410.43 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.17 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 300-301 °C

Yield = 69%



According to the general *procedure H*, compound **78** was obtained by reaction between 3-*N*-substituted-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one **9** (150 mg, 0.44 mmol), 4-cyanophenylboronic acid (71 mg, 0.48 mmol, 1.1 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (117 mg, 1.10 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/methanol, 99.5:0.5) afforded **78** (125 mg, 69% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.32 (s, 1H, NH), 8.97 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.95 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.19 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 7.94 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 7.80 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.63 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.01 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.90 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Unanalyzable compound (insoluble in common solvents).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3364 (νN-H); 3069 (νC-H<sub>ar</sub>); 2920 (νC-H<sub>aliph</sub>); 2228 (νC≡N); 1672, 1638 (νC=O); 1587, 1504 (νC=C).

MS (ESI), m/z (%): 411.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI): calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 411.1452, found: 411.1439.

**3,7-Dianilino-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (79)**

Yellow powder

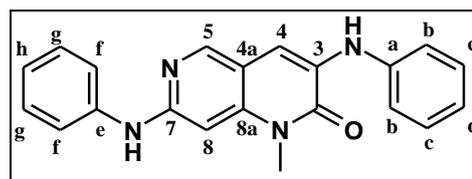
$C_{21}H_{18}N_4O$

MW = 342.40 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.23 (dichloromethane/methanol: 99.5/0.5)

Mp = 259-260 °C

Yield = 69%



## Experimental section

According to the general *procedure I*, compound **79** was obtained by reaction between 3-*N*-substituted-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one **66** (150 mg, 0.52 mmol), aniline (47  $\mu$ L, 0.52 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (339 mg, 1.04 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (18 mg, 0.08 mmol, 0.15 equiv.) and Xantphos (45 mg, 0.08 mmol, 0.15 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **79** (123 mg, 69% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.30 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.40-7.32 (m, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>g</sub>), 7.27-7.22 (m, 3H, H<sub>b</sub>, H<sub>4</sub>), 7.12-7.03 (m, 3H, C<sub>7</sub>-NH, H<sub>d</sub>, H<sub>h</sub>), 6.73 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 6.72 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.67 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.53 (C=O), 153.42 (C<sub>8a</sub>), 144.85 (C<sub>5</sub>), 142.04 (C<sub>7</sub>), 140.52 (C<sub>a</sub> ou C<sub>e</sub>), 139.72 (C<sub>e</sub> ou C<sub>a</sub>), 130.99 (C<sub>3</sub>), 129.68 (2C<sub>c</sub> or 2C<sub>g</sub>), 129.58 (2C<sub>g</sub> or 2C<sub>c</sub>), 123.86 (C<sub>d</sub>), 122.79 (C<sub>h</sub>), 121.01 (2C<sub>f</sub>), 120.08 (2C<sub>b</sub>), 112.23 (C<sub>4a</sub>), 104.67 (C<sub>4</sub>), 90.27 (C<sub>8</sub>), 30.08 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3304 ( $\nu$ N-H); 2986, 2972 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1645 ( $\nu$ C=O); 1582, 1493 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 343.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 343.1553, found: 343.1554.

### **3-Anilino-7-[(4-methoxyphenyl)amino]-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one (80)**

Yellow powder

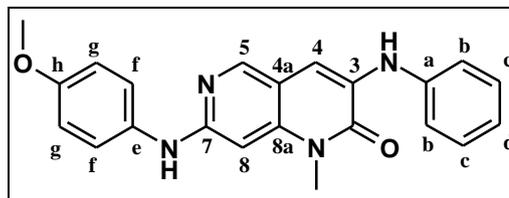
C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

MW = 372.43 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.20 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 246-247 °C

Yield = 57%



According to the general *procedure I*, compound **80** was obtained by reaction between 3-*N*-substituted-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one **66** (150 mg, 0.52 mmol), *p*-anisidine (64 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (339 mg, 1.04 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (18 mg, 0.08 mmol, 0.15 equiv.) and Xantphos (46 mg, 0.08 mmol, 0.15 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) and trituration with acetonitrile afforded **80** (111 mg, 57% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.27 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.37 (appt, <sup>app</sup>J = 7.0 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 7.26-7.22 (m, 5H, H<sub>b</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>4</sub>), 7.06-7.01 (m, 2H, C<sub>3</sub>-NH, H<sub>d</sub>), 6.95 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 6.48-6.46 (m, 2H, C<sub>7</sub>-NH, H<sub>8</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.61 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  159.65 (C=O), 156.64 ( $\text{C}_7$ ), 155.66 ( $\text{C}_{8a}$ ), 147.18 ( $\text{C}_5$ ), 141.57 ( $\text{C}_h$ ), 140.91 ( $\text{C}_a$ ), 132.93 ( $\text{C}_3$ ), 130.19 ( $\text{C}_e$ ), 129.51 (2 $\text{C}_c$ ), 124.42 (2 $\text{C}_f$ ), 122.35 ( $\text{C}_d$ ), 119.72 (2 $\text{C}_b$ ), 114.88 (2 $\text{C}_g$ ), 111.65 ( $\text{C}_{4a}$ ), 105.72 ( $\text{C}_4$ ), 88.90 ( $\text{C}_8$ ), 55.26 ( $\text{OCH}_3$ ), 29.94 ( $\text{NCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3300 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3036 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 2932 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1645 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1580, 1504 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 373.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  373.1659, found: 373.6151.

### ***N*-[7-(4-Methoxyphenyl)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]-4-methoxybenzamide (81)**

**Yellow powder**

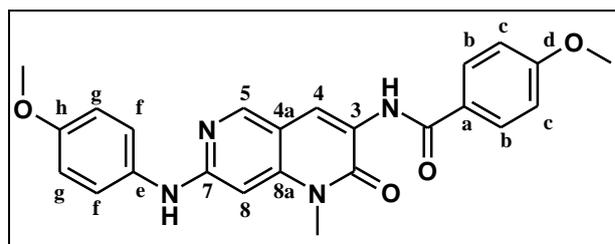
**$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$**

**MW = 430.46  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$**

**Rf = 0.19 (dichloromethane/methanol: 99/1)**

**Mp = 259-260  $^\circ\text{C}$**

**Yield = 55%**



According to the general *procedure I*, compound **81** was obtained by reaction between 3-*N*-substituted-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one **9** (150 mg, 0.44 mmol), *p*-anisidine (54 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (287 mg, 0.88 mmol, 2.0 equiv.),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/methanol, 99.5:0.5) and trituration with diisopropyl ether afforded **81** (104 mg, 55% yield) as a yellow powder.

**NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  9.12 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 8.80 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8.44 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.90 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.28-7.26 (m, 2H,  $\text{H}_f$ ), 6.99-6.94 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_g$ ), 6.73 (s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 6.42 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.87 (s, 3H,  $\text{C}_d\text{-OCH}_3$ ), 3.84 (s, 3H,  $\text{C}_h\text{-OCH}_3$ ), 3.58 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.26 ( $\text{NH-C=O}$ ), 162.73 ( $\text{C}_d$ ), 159.08 ( $\text{C}_3\text{-C=O}$ ), 157.34 ( $\text{C}_7$ ), 157.03 ( $\text{C}_{8a}$ ), 149.89 ( $\text{C}_5$ ), 143.10 ( $\text{C}_h$ ), 132.27 ( $\text{C}_3$ ), 129.05 (2 $\text{C}_b$ ), 126.50 ( $\text{C}_a$ ), 124.96 (2 $\text{C}_f$ ), 119.04 ( $\text{C}_4$ ), 114.94 (2 $\text{C}_g$ ), 114.04 (2 $\text{C}_c$ ), 110.73 ( $\text{C}_{4a}$ ), 88.30 ( $\text{C}_8$ ), 55.56 ( $\text{C}_d\text{-OCH}_3$  or  $\text{C}_h\text{-OCH}_3$ ), 55.50 ( $\text{C}_h\text{-OCH}_3$  or  $\text{C}_d\text{-OCH}_3$ ), 29.84 ( $\text{NCH}_3$ ).

$\text{C}_e$  is missing.

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3370, 3331 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2831 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1626 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1589, 1495 ( $\nu\text{C=C}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 431.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## Experimental section

**HRMS (ESI):** calcd. for  $C_{24}H_{22}N_4O_4$   $[M+H]^+$  431.1714, found: 431.1708.

### **3-Anilino-7-(*N,N*-dimethylethylenediamino)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one (82)**

**Brown powder**

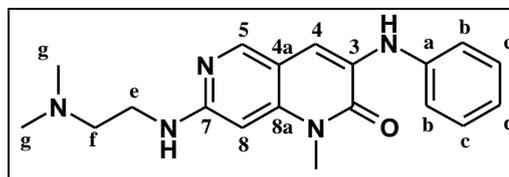
**$C_{19}H_{23}N_5O$**

**MW = 337.42 g.mol<sup>-1</sup>**

**Rf = 0.15 (dichloromethane/methanol: 90/10)**

**Mp = 128-129 °C**

**Yield = 68%**



In a 10 mL vessel were added compound **66** (150 mg, 0.52 mmol), *N,N*-dimethylethylenediamine (1.11 mL, 10.40 mmol, 20 equiv.) and CuI (50 mg, 0.26 mmol, 0.5 equiv.). The tube was sealed, and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 130 °C for 4 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with  $CH_2Cl_2$ . The organic layer was washed with brine, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) to provide **82** (119 mg, 68% yield) as a brown powder.

**NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  8.20 (s, 1H,  $H_5$ ), 7.35 (appt,  $^{app}J = 7.8$  Hz, 2H,  $H_c$ ), 7.23 (s, 1H,  $H_4$ ), 7.21 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H,  $H_b$ ), 7.01 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 1H,  $H_d$ ), 6.97 (s, 1H,  $C_3$ -NH), 6.15 (s, 1H,  $H_8$ ), 5.39 (br s, 1H,  $C_7$ -NH), 3.69 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.45-3.41 (m, 2H,  $H_e$ ), 2.66 (t,  $^3J = 5.8$  Hz, 2H,  $H_f$ ), 2.34 (s, 6H,  $H_g$ ).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  159.73 ( $C_3$ - $\underline{C}=\underline{O}$ ), 156.60 ( $C_7$ ), 146.56 ( $C_5$ ), 141.68 ( $C_{8a}$ ), 141.10 ( $C_a$ ), 129.70 ( $C_3$ ), 129.47 (2 $C_c$ ), 122.12 ( $C_d$ ), 119.54 (2 $C_b$ ), 110.89 ( $C_{4a}$ ), 106.06 ( $C_4$ ), 90.05 ( $C_8$ ), 58.26 ( $C_f$ ), 44.54 (2 $C_g$ ), 38.35 ( $C_e$ ), 29.98 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3242 ( $\nu$ N-H); 2924 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1643 ( $\nu$ C=O); 1582, 1514, 1495 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 338.2 (100)  $[M+H]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $C_{19}H_{23}N_5O$   $[M+H]^+$  338.1975, found: 338.1976.

**3,7-Diphenyl-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (59)**

White powder

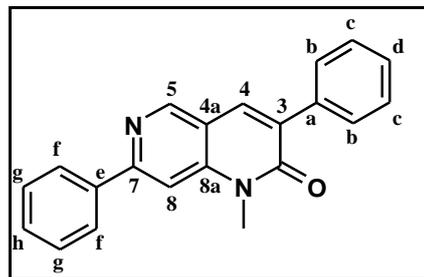
$C_{21}H_{16}N_2O$

MW = 312.37 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.22 (dichloromethane)

Mp = 155-156 °C

Yield = 69%



Compound **59** was prepared according to *procedure J*. In the first step, compound **55** (150 mg, 0.47 mmol) was reacted with phenylboronic acid (57 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). After completion, phenylboronic acid (57 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **59** (119 mg, 69% yield) as a white powder. Analytical data agree with previous characterization.

**3-(3-Fluorophenyl)-7-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (83)**

Beige powder

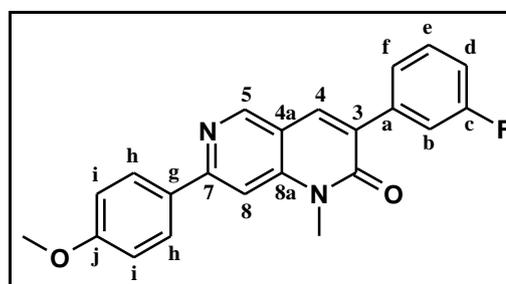
$C_{22}H_{17}FN_2O_2$

MW = 360.39 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.19 (dichloromethane)

Mp = 1610-161 °C

Yield = 55%



Compound **83** was prepared according to *procedure J*. In the first step, compound **55** (150 mg, 0.47 mmol) was reacted with 3-fluorophenylboronic acid (66 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-methoxyphenylboronic acid (71 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **83** (93 mg, 55% yield) as a beige powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.01 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.34 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.29 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 7.91 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.67-7.63 (m, 2H, H<sub>b</sub>, H<sub>f</sub>), 7.57-7.52 (m, 1H, H<sub>e</sub>), 7.29 (ddd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 2.3 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 7.13 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  161.76 (d,  $^1J_{CF} = 240$  Hz,  $\text{C}_c$ ), 160.63 (C=O or  $\text{C}_j$ ), 160.61 ( $\text{C}_j$  or C=O), 156.12 ( $\text{C}_{8a}$ ), 150.65 ( $\text{C}_5$ ), 144.92 ( $\text{C}_7$ ), 138.45 (d,  $^3J_{CF} = 9$  Hz,  $\text{C}_a$ ), 135.59 ( $\text{C}_4$ ), 130.72 ( $\text{C}_g$ ), 129.92 (d,  $^3J_{CF} = 9$  Hz,  $\text{C}_e$ ), 129.59 (d,  $^4J_{CF} = 3$  Hz,  $\text{C}_3$ ), 128.62 ( $2\text{C}_h$ ), 124.75 (d,  $^4J_{CF} = 3$  Hz,  $\text{C}_f$ ), 115.50 (d,  $^2J_{CF} = 23$  Hz,  $\text{C}_b$ ), 114.81 (d,  $^2J_{CF} = 20$  Hz,  $\text{C}_d$ ), 114.67 ( $\text{C}_{4a}$ ), 114.10 ( $2\text{C}_i$ ), 103.58 ( $\text{C}_8$ ), 55.28 (OCH<sub>3</sub>), 29.67 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2930 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1638 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1576 ( $\nu\text{C=C}$ ), 1177, 1248 ( $\nu\text{C-F}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 361.2 (100) [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 361.1347, found 361.1341.

### 7-(3,5-Dimethylphenyl)-1-methyl-3-(pyridin-4-yl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (84)

Beige powder

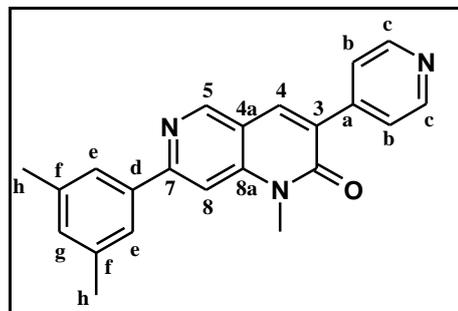
$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$

MW = 341.41  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.10 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 233-234 °C

Yield = 32%



Compound **84** was prepared according to *procedure J*. In the first step, compound **55** (150 mg, 0.47 mmol) was reacted with 4-pyridineboronic acid pinacol ester (96 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 3,5-dimethylphenylboronic acid (70 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **84** (51 mg, 32% yield) as a beige powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  9.05 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.70 (d,  $^3J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 8.46 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.95 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 7.93 (s, 2H,  $\text{H}_e$ ), 7.82 (d,  $^3J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.16 (s, 1H,  $\text{H}_g$ ), 3.82 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.42 (s, 6H,  $\text{H}_h$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  160.30 (C=O), 156.88 ( $\text{C}_{8a}$ ), 150.88 ( $\text{C}_5$ ), 149.49 ( $2\text{C}_c$ ), 145.16 ( $\text{C}_7$ ), 143.46 ( $\text{C}_a$ ), 138.07 ( $\text{C}_d$ ), 137.76 ( $2\text{C}_f$ ), 136.53 ( $\text{C}_4$ ), 131.09 ( $\text{C}_g$ ), 128.67 ( $\text{C}_3$ ), 124.96 ( $2\text{C}_e$ ), 123.12 ( $2\text{C}_b$ ), 114.94 ( $\text{C}_{4a}$ ), 104.66 ( $\text{C}_8$ ), 29.65 (NCH<sub>3</sub>), 20.99 ( $2\text{C}_h$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3036 ( $\nu\text{C-H}_{\text{ar}}$ ); 2914 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1643 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1582 ( $\nu\text{C=C}$ ).

## Experimental section

**MS (ESI), m/z (%):** 342.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 342.1601, found 342.1598.

### 1-Methyl-7-(pyridin-4-yl)-3-(thien-2-yl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (85)

**Yellow powder**

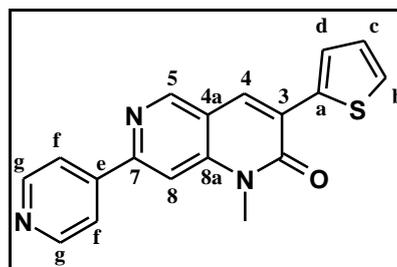
**C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OS**

**MW = 319.39 g.mol<sup>-1</sup>**

**Rf = 0.15 (dichloromethane/methanol: 98/2)**

**Mp = 261-262 °C**

**Yield = 33%**



Compound **85** was prepared according to *procedure J*. In the first step, compound **55** (150 mg, 0.47 mmol) was reacted with 2-thienylboronic acid (60 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-pyridineboronic acid pinacol ester (96 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (124 mg, 1.17 mmol, 2.5 equiv) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (23 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **85** (50 mg, 33% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.14 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.29 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 8.76 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.28 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, 2H, H<sub>f</sub>), 8.18 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.00 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.2 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 7.74 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.2 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 7.25 (appt, <sup>app</sup>*J* = 4.4 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 3.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 159.83 (C=O), 152.84 (C<sub>8a</sub>), 150.64 (C<sub>5</sub>), 150.32 (2C<sub>g</sub>), 145.27 (C<sub>7</sub>), 143.75 (C<sub>e</sub>), 136.11 (C<sub>a</sub>), 129.87 (C<sub>4</sub>), 129.41 (C<sub>d</sub>), 126.84 (C<sub>c</sub>), 126.17 (C<sub>b</sub>), 125.71 (C<sub>3</sub>), 121.09 (2C<sub>f</sub>), 116.47 (C<sub>4a</sub>), 106.17 (C<sub>8</sub>), 29.99 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 2984 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1638 (νC=O); 1580 (νC=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 320.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 320.0852, found 320.0847.

**3-Anilino-1-methyl-7-phenyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (76)**

Pale yellow powder

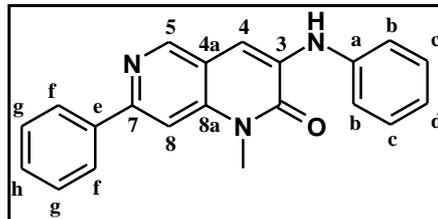
$C_{21}H_{17}N_3O$

MW = 327.39 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.16 (dichloromethane)

Mp = 180-181 °C

Yield = 61%



Compound **76** was prepared according to *procedure K*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with aniline (50  $\mu$ L, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, phenylboronic acid (67 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction. Purification by silica gel chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 70:30) afforded **76** (110 mg, 61% yield) as a yellow powder. Analytical data agree with previous characterization.

**N-[7-(3-Fluorophenyl)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]benzamide (86)**

White powder

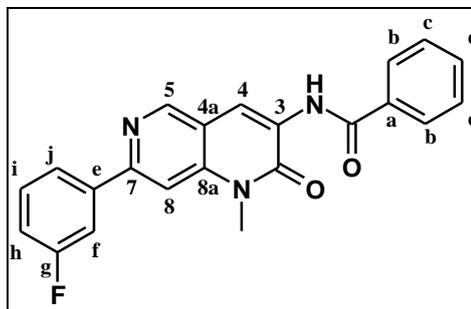
$C_{22}H_{16}FN_3O_2$

MW = 373.39 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.06 (dichloromethane)

Mp = 148-149 °C

Yield = 40%



Compound **86** was prepared according to *procedure K*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with benzamide (67 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 3-fluorophenylboronic acid (77 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **86** (82 mg, 40% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.39 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.95 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.98 (d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.86-7.79 (m, 2H, H<sub>f</sub>, H<sub>j</sub>), 7.63-7.60 (m, 1H, H<sub>d</sub>), 7.59 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.56-7.46 (m, 3H, H<sub>c</sub>, H<sub>i</sub>), 7.16 (ddd, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H, H<sub>h</sub>), 3.90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  165.99 (NH-C=O), 163.38 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 245$  Hz, C-F), 158.60 (C<sub>3</sub>-C=O), 154.90 (d,  $^4J_{\text{CF}} = 2$  Hz, C<sub>7</sub>), 150.22 (C<sub>5</sub>), 141.33 (C<sub>8a</sub>), 141.25 (d,  $^3J_{\text{CF}} = 7$  Hz, C<sub>e</sub>), 133.82 (C<sub>a</sub>), 132.48 (C<sub>d</sub>), 130.43 (d,  $^3J_{\text{CF}} = 8$  Hz, C<sub>i</sub>), 128.95 (2C<sub>c</sub>), 128.82 (C<sub>3</sub>), 127.25 (2C<sub>b</sub>), 122.60 (d,  $^4J_{\text{CF}} = 3$  Hz, C<sub>j</sub>), 117.75 (C<sub>4</sub>), 116.29 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 21$  Hz, C<sub>f</sub>), 114.11 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 23$  Hz, C<sub>h</sub>), 104.63 (C<sub>8</sub>), 30.16 (NCH<sub>3</sub>).

C<sub>4a</sub> is missing.

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3381 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2986, 2970, 2901 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1674 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1632, 1584, 1487 ( $\nu\text{C=C}$ ), 1418, 1373 ( $\nu\text{C-F}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 374.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 374.1299, found: 374.1285.

### 1-Methyl-3-morpholin-4-yl-7-pyridin-4-yl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (87)

Orange powder

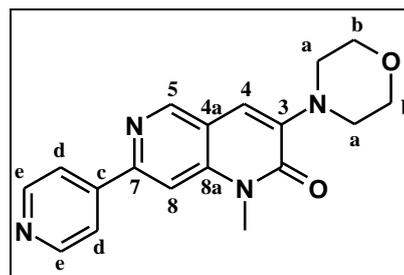
C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

MW = 322.32 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.17 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 254-255 °C

Yield = 54%



Compound **87** was prepared according to *procedure K*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with morpholine (47  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-pyridineboronic acid pinacol ester (77 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (35 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **87** (96 mg, 54% yield) as an orange powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.83 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.76 (d,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, H<sub>e</sub>), 7.95 (d,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, H<sub>d</sub>), 7.62 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.00 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 3.94 (t,  $^3J = 4.6$  Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 3.81 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.32 (t,  $^3J = 4.6$  Hz, 4H, H<sub>a</sub>)

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  159.43 (C=O), 152.16 (C<sub>8a</sub>), 150.53 (2C<sub>e</sub>), 148.99 (C<sub>5</sub>), 146.30 (C<sub>7</sub>), 143.10 (C<sub>c</sub>), 141.60 (C<sub>3</sub>), 121.06 (2C<sub>d</sub>), 117.40 (C<sub>4a</sub>), 114.78 (C<sub>4</sub>), 104.91 (C<sub>8</sub>), 66.73 (2C<sub>b</sub>), 49.74 (2C<sub>a</sub>), 29.75 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2949 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1651 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1582 ( $\nu\text{C=C}$ ).



**4-Methoxy-N-[7-(3,5-dimethylphenyl)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl]benzenesulfonamide (89)**

White powder

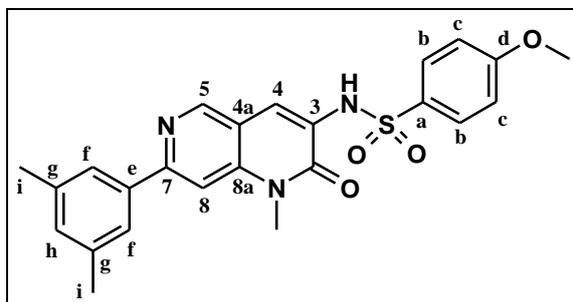
$C_{24}H_{23}N_3O_4S$

MW = 449.53 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.18 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 305-306 °C

Yield = 62%



Compound **89** was prepared according to *procedure K*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 4-methoxybenzenesulfonamide (103 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 3,5-dimethylphenylboronic acid (82 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (13 mg, 0.06 mmol, 0.10 equiv.) and Xantphos (35 mg, 0.06 mmol, 0.10 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **89** (153 mg, 62% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.83 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.95 (br s, 1H, NH), 7.87 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.82 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.61 (s, 2H, H<sub>f</sub>), 7.48 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.10 (s, 1H, H<sub>h</sub>), 6.94 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.41 (s, 6H, H<sub>i</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 163.56 (C<sub>d</sub>), 158.09 (C=O), 157.00 (C<sub>8a</sub>), 149.64 (C<sub>5</sub>), 141.47 (C<sub>7</sub>), 138.79 (C<sub>e</sub>), 138.59 (2C<sub>g</sub>), 131.26 (C<sub>h</sub>), 130.29 (C<sub>3</sub>), 129.47 (2C<sub>b</sub>), 127.62 (C<sub>a</sub>), 124.94 (2C<sub>f</sub>), 115.97 (C<sub>4</sub>), 115.10 (C<sub>4a</sub>), 114.48 (2C<sub>c</sub>), 104.58 (C<sub>8</sub>), 55.63 (OCH<sub>3</sub>), 30.22 (NCH<sub>3</sub>), 21.41 (2C<sub>i</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3173 (νN-H); 2918 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1634 (νC=O); 1587, 1493 (νC=C), 1379 (νS=O).

**MS (ESI), m/z (%):** 450.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 450.1482, found: 450.1483.

**3,7-Dianilino-1-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (79)**

Yellow powder

$C_{21}H_{18}N_4O$

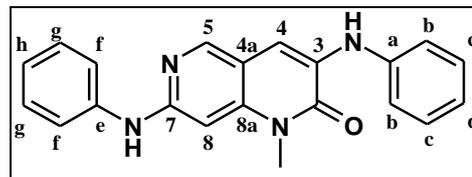
MW = 342.40 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.23 (dichloromethane/methanol:

99.5/0.5)

Mp = 259-260 °C

Yield = 69%



Compound **79** was prepared according to *procedure L*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with aniline (50 μL, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, aniline (50 μL, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (25 mg, 0.11 mmol, 0.20 equiv.) and Xantphos (64 mg, 0.11 mmol, 0.20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane) afforded **79** (145 mg, 77% yield) as a yellow powder. Analytical data agree with previous characterization.

**7-[(4-Chlorophenyl)amino]-1-methyl-3-(4-methylpiperazin-1-yl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (90)**

Yellow powder

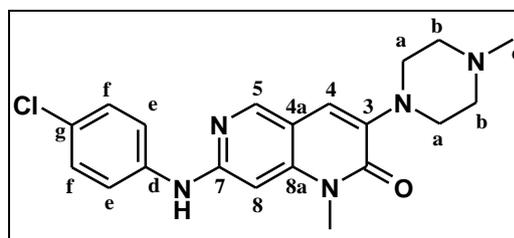
$C_{20}H_{22}ClN_5O$

MW = 383.88 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.21 (dichloromethane/methanol: 90/10)

Mp = 187-188 °C

Yield = 36%



Compound **90** was prepared according to *procedure L*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 1-methylpiperazine (61 μL, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-chloroaniline (70 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (25 mg, 0.11 mmol, 0.20 equiv.) and Xantphos (64 mg, 0.11 mmol, 0.20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **90** (76 mg, 36% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.34 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.33-7.30 (m, 4H, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>), 6.88 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.87 (s, 1H, NH), 6.57 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.56 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 3.25-3.18 (m, 4H, H<sub>a</sub>), 2.69-2.65 (m, 4H, H<sub>b</sub>), 2.38 (s, 3H, H<sub>c</sub>).

## Experimental section

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 159.98 (C=O), 154.73 (C<sub>8a</sub>), 148.09 (C<sub>5</sub>), 143.57 (C<sub>7</sub>), 139.35 (C<sub>d</sub>), 138.86 (C<sub>3</sub>), 129.46 (2C<sub>f</sub>), 128.06 (C<sub>g</sub>-Cl), 121.74 (2C<sub>e</sub>), 117.04 (C<sub>4</sub>), 111.77 (C<sub>4a</sub>), 90.12 (C<sub>8</sub>), 54.85 (2C<sub>b</sub>), 49.36 (2C<sub>a</sub>), 45.92 (C<sub>c</sub>), 29.48 (CONCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3292 (νN-H); 2972, 2901 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1643 (νC=O); 1579, 1489 (νC=C), 696 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 384.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 386.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 384.1486, found: 384.1580.

### **3-[(4-Methoxyphenyl)amino]-1-methyl-7-(pyridin-4-ylamino)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (91)**

Yellow powder

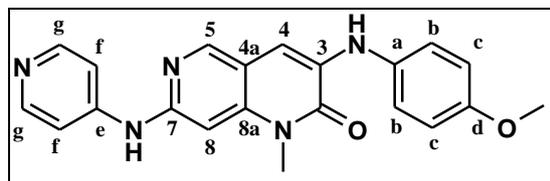
C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

MW = 373.41 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.09 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 220-221 °C

Yield = 13%



Compound **91** was prepared according to *procedure L*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with *p*-anisidine (68 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-aminopyridine (52 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (38 mg, 0.17 mmol, 0.30 equiv.) and Xantphos (98 mg, 0.17 mmol, 0.30 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **91** (27 mg, 13% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.38 (d, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 2H, H<sub>g</sub>), 8.32 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.40-7.37 (m, 3H, H<sub>f</sub>, C<sub>3</sub>-NH), 7.19 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.96 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.95 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.88 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.86 (s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 159.33 (C=O), 156.22 (C<sub>d</sub>), 150.91 (2C<sub>g</sub>), 146.17 (C<sub>5</sub>), 140.72 (C<sub>7</sub>), 133.49 (C<sub>3</sub>), 133.11 (C<sub>a</sub>), 123.62 (2C<sub>b</sub>), 114.88 (2C<sub>c</sub>), 114.19 (C<sub>4a</sub>), 111.59 (2C<sub>f</sub>), 102.66 (C<sub>4</sub>), 94.54 (C<sub>8</sub>), 55.58 (OCH<sub>3</sub>), 30.05 (NCH<sub>3</sub>).

C<sub>e</sub> and C<sub>8a</sub> are missing.

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3293 (νN-H); 2970, 2901 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1641 (νC=O); 1582, 1502 (νC=C).

**MS (ESI), m/z (%):** 374.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

## Experimental section

**HRMS (ESI):** calcd. for  $C_{21}H_{19}N_5O_2$   $[M+H]^+$  374.1612, found: 374.1606.

### **7-[(4-Morpholin-4-ylphenyl)amino]-1-methyl-3-(quinolin-6-ylamino)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (92)**

Yellow powder

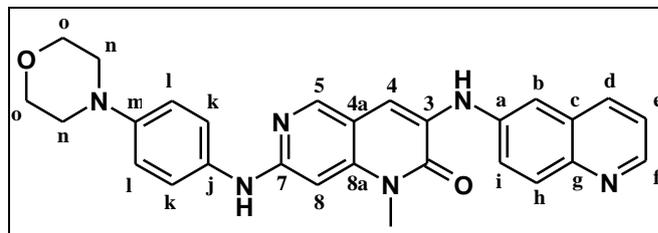
$C_{28}H_{26}N_6O_2$

MW = 478.55  $g \cdot mol^{-1}$

Rf = 0.08 (dichloromethane/methanol: 98/2)

Mp = 281-282 °C

Yield = 39%



Compound **92** was prepared according to *procedure L*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 6-aminoquinoline (79 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.),  $Cs_2CO_3$  (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.),  $Pd(OAc)_2$  (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-morpholinoaniline (98 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with  $Pd(OAc)_2$  (25 mg, 0.11 mmol, 0.20 equiv.) and Xantphos (64 mg, 0.11 mmol, 0.20 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **92** (103 mg, 39% yield) as a yellow powder.

**$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  8.97 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.73 (dd,  $^3J = 4.0$  Hz,  $^4J = 1.9$  Hz, 1H, H<sub>f</sub>), 8.49 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.27 (d,  $^3J = 8.6$  Hz, 1H, H<sub>h</sub>), 8.24 (s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 7.95 (d,  $^3J = 8.6$  Hz, 1H, H<sub>i</sub>), 7.83 (dd,  $^3J = 8.8$  Hz,  $^4J = 1.9$  Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 7.78 (d,  $^4J = 2.4$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 7.77 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.52 (d,  $^3J = 9.0$  Hz, 2H, H<sub>k</sub>), 7.48 (dd,  $^3J = 8.8$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 6.95 (d,  $^3J = 9.0$  Hz, 2H, H<sub>l</sub>), 6.67 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.78 (t,  $^3J = 4.8$  Hz, 4H, H<sub>o</sub>), 3.66 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.08 (t,  $^3J = 4.8$  Hz, 4H, H<sub>n</sub>).

**$^{13}C$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  158.90 (C=O), 154.99 (C<sub>8a</sub>), 147.60 (C<sub>f</sub>), 147.05 (C<sub>5</sub>), 145.86 (C<sub>7</sub>), 143.74 (C<sub>g</sub>), 141.40 (C<sub>m</sub>), 140.02 (C<sub>a</sub>), 134.54 (C<sub>h</sub>), 133.93 (C<sub>3</sub>), 129.72 (C<sub>i</sub>), 129.07 (C<sub>j</sub>), 128.15 (C<sub>c</sub>), 124.43 (C<sub>d</sub>), 121.58 (C<sub>e</sub>), 120.07 (2C<sub>k</sub>), 116.01 (2C<sub>l</sub>), 110.41 (C<sub>4a</sub>), 110.37 (C<sub>b</sub>), 109.93 (C<sub>4</sub>), 90.78 (C<sub>8</sub>), 66.16 (2C<sub>o</sub>), 49.34 (2C<sub>n</sub>), 29.42 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ):** 3292, 3227 ( $\nu$ N-H); 2970 ( $\nu$ C-H<sub>aliph</sub>); 1643 ( $\nu$ C=O); 1587, 1512, 1504 ( $\nu$ C=C).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 479.2 (100)  $[M+H]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $C_{28}H_{26}N_6O_2$   $[M+H]^+$  479.2190, found: 479.2201.

**N-[3-(1H-Indol-1-yl)-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-7-yl]-3-nitrobenzamide (93)**

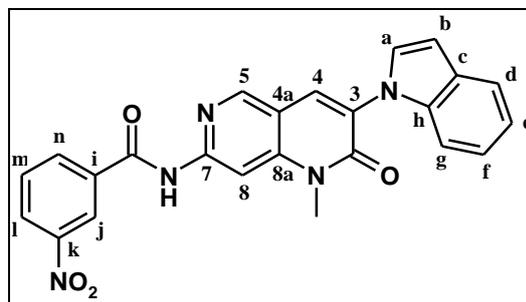
Yellow powder

 $C_{24}H_{17}N_5O_4$ MW = 439.43 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.23 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 239-240 °C

Yield = 46%



Compound **93** was prepared according to *procedure L*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with indole (64 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 3-nitrobenzamide (91 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (13 mg, 0.06 mmol, 0.10 equiv.) and Xantphos (35 mg, 0.06 mmol, 0.10 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **93** (111 mg, 46% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.88 (br s, 1H, NH), 8.84 (appt, <sup>app</sup>J = 1.5 Hz, 1H, H<sub>j</sub>), 8.59 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.53 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.48 (ddd, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J = 0.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz, 1H, H<sub>l</sub>), 8.34-8.32 (m, 1H, H<sub>n</sub>), 7.91 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.78 (appt, <sup>app</sup>J = 8.1 Hz, 1H, H<sub>m</sub>), 7.68 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, H<sub>d</sub>), 7.53 (d, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.44 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 1H, H<sub>g</sub>), 7.27-7.25 (m, 1H, H<sub>f</sub>), 7.19 (ddd, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, <sup>4</sup>J = 0.8 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 6.71 (d, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 3.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 163.35 (NH-C=O), 159.53 (C<sub>3</sub>-C=O), 151.30 (C<sub>k</sub>), 148.79 (C<sub>5</sub>), 148.55 (C<sub>8a</sub>), 145.42 (C<sub>7</sub>), 136.27 (C<sub>h</sub>), 135.42 (C<sub>i</sub>), 133.05 (C<sub>n</sub>), 130.39 (C<sub>m</sub>), 129.39 (C<sub>3</sub>), 129.34 (C<sub>c</sub>), 128.94 (C<sub>4</sub>), 128.73 (C<sub>a</sub>), 127.11 (C<sub>l</sub>), 122.53 (C<sub>f</sub>), 122.24 (C<sub>j</sub>), 121.31 (C<sub>d</sub>), 120.90 (C<sub>e</sub>), 113.64 (C<sub>4a</sub>), 110.53 (C<sub>g</sub>), 104.18 (C<sub>b</sub>), 97.63 (C<sub>8</sub>), 30.39 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3365 (νN-H); 2984, 2970 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1651 (νC=O); 1581 (νC=C), 1529 (ν<sub>as</sub>NO<sub>2</sub>); 1354 (ν<sub>sy</sub>NO<sub>2</sub>).

**MS (ESI), m/z (%):** 440.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 440.1353, found: 440.1349.

**2-Chloro-N-{7-[(4-methoxyphenyl)amino]-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl}benzamide (94)**

Pale yellow powder

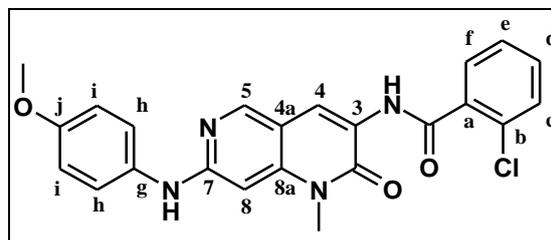
$C_{23}H_{19}ClN_4O_3$

MW = 434.88 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.20 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 211-212 °C

Yield = 46%



Compound **94** was prepared according to *procedure L*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 2-chlorobenzamide (86 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, *p*-anisidine (68 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture along with Pd(OAc)<sub>2</sub> (13 mg, 0.06 mmol, 0.10 equiv.) and Xantphos (35 mg, 0.06 mmol, 0.10 equiv.). Purification by silica gel chromatography (dichloromethane/methanol, 99.5:0.5) afforded **94** (110 mg, 46% yield) as a pale yellow powder.

**NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.22 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 8.84 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.46 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.78 (dd, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 1H, H<sub>f</sub>), 7.49-7.36 (m, 3H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>e</sub>), 7.28 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>h</sub>), 6.96 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 6.73 (s, 1H, C<sub>7</sub>-NH), 6.41 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.85 (s, 3H, C<sub>j</sub>-OCH<sub>3</sub>), 3.57 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 164.88 (NH-C=O), 158.80 (C<sub>3</sub>-C=O), 157.29 (C<sub>8a</sub>), 157.23 (C<sub>7</sub>), 149.25 (C<sub>5</sub>), 143.60 (C<sub>j</sub>), 134.50 (C<sub>3</sub>), 131.94 (C<sub>d</sub>), 131.90 (C<sub>a</sub>), 131.06 (C<sub>b</sub>), 130.63 (C<sub>c</sub>), 130.35 (C<sub>f</sub>), 127.23 (C<sub>e</sub>), 125.16 (2C<sub>h</sub>), 124.80 (C<sub>g</sub>), 119.88 (C<sub>4</sub>), 114.99 (2C<sub>i</sub>), 110.45 (C<sub>4a</sub>), 88.37 (C<sub>8</sub>), 55.56 (OCH<sub>3</sub>), 29.87 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3292, 3235 (νN-H); 2986 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1647 (νC=O); 1595, 1508 (νC=C), 642 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 435.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 437.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI):** calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 435.1218, found: 435.1221.

**N-(1-methyl-7-[[2-(morpholin-4-yl)ethyl]amino]-2-oxo-1,2-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (21)**

Beige powder

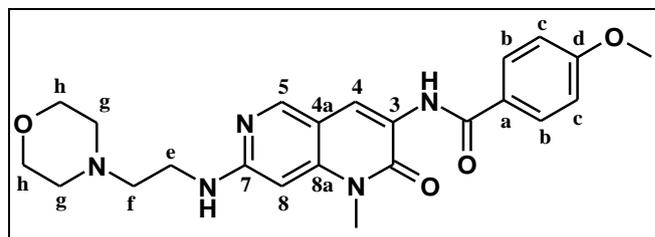
$C_{23}H_{27}N_5O_4$

MW = 437.50 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.30 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 195-196 °C

Yield = 24%



Compound **21** was prepared according to *procedure M*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 4-methoxybenzamide (76 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-(2-aminoethyl)morpholine (1.45 mL, 11.0 mmol, 20.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture. The tube was sealed and the reaction was subjective to microwave irradiation at 150 °C for 1 h. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **21** (58 mg, 24% yield) as a beige powder. Analytical data agree with previous characterization.

**3-[(4-Methoxyphenyl)amino]-1-methyl-7-((2-morpholin-4-yl)ethylamino)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (95)**

Yellow powder

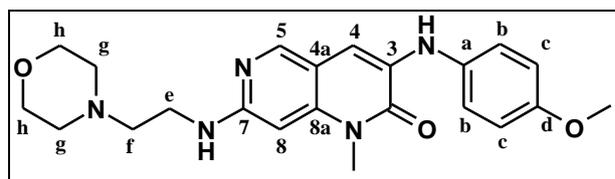
$C_{22}H_{27}N_5O_3$

MW = 409.48 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.29 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 183-184 °C

Yield = 9%



Compound **95** was prepared according to *procedure M*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with *p*-anisidine (68 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-(2-aminoethyl)morpholine (1.45 mL, 11.0 mmol, 20.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture. The tube was sealed and the reaction was subjective to microwave irradiation at 150 °C for 1 h. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) and trituration with diisopropyl ether afforded **95** (20 mg, 9% yield) as a yellow powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.16 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.16 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.97 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.93 (d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.71 (s, 1H, C<sub>3</sub>-NH), 6.09 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 5.24 (t, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz,

## Experimental section

$^1\text{H}$ ,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.73 (t,  $^3J = 4.6$  Hz, 4H,  $\text{H}_h$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.39-3.35 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.67 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.51-2.49 (m, 4H,  $\text{H}_g$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.70 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 157.03 ( $\text{C}_d$ ), 155.70 ( $\text{C}_7$ ), 146.89 ( $\text{C}_5$ ), 141.52 ( $\text{C}_{8a}$ ), 133.93 ( $\text{C}_3$ ), 131.28 ( $\text{C}_a$ ), 123.00 ( $2\text{C}_b$ ), 114.79 ( $2\text{C}_c$ ), 110.82 ( $\text{C}_{4a}$ ), 104.54 ( $\text{C}_4$ ), 88.01 ( $\text{C}_8$ ), 66.97 ( $2\text{C}_h$ ), 56.98 ( $\text{C}_f$ ), 55.57 ( $\text{OCH}_3$ ), 53.35 ( $2\text{C}_g$ ), 38.70 ( $\text{C}_e$ ), 29.83 ( $\text{NCH}_3$ ).

IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3223 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2988 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1638 ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ); 1591, 1504 ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ).

MS (ESI),  $m/z$  (%): 410.3 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

HRMS (ESI): calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  410.2187, found: 410.2193.

### 3-[(4-Fluorophenyl)amino]-1-methyl-7-((2-morpholin-4-yl)ethylamino)-1,6 naphthyridin-2(1H)-one (96)

Yellow powder

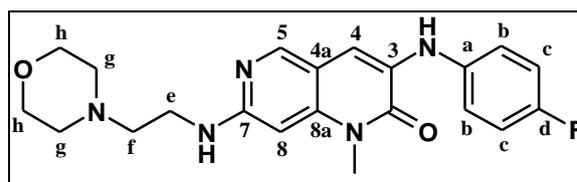
$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_2$

MW = 397.45  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf = 0.21 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 195-196  $^\circ\text{C}$

Yield = 8%



Compound **96** was prepared according to *procedure M*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 4-fluoroaniline (61 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 4-(2-aminoethyl)morpholine (1.45 mL, 11.0 mmol, 20.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture. The tube was sealed and the reaction was subjective to heat at 150  $^\circ\text{C}$  for 68 h. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **96** (18 mg, 8% yield) as a yellow powder.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.19 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.19-7.15 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.08-7.04 (m, 3H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_4$ ), 6.83 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 6.13 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 5.41 (br s, 1H,  $\text{C}_7\text{-NH}$ ), 3.77 (t,  $^3J = 4.4$  Hz, 4H,  $\text{H}_h$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.45-3.40 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 2.73 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_f$ ), 2.59-2.54 (m, 4H,  $\text{H}_g$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.62 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 158.53 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 239$  Hz,  $\text{C}_d$ ), 156.77 ( $\text{C}_7$ ), 146.54 ( $\text{C}_5$ ), 141.78 ( $\text{C}_{8a}$ ), 136.97 (d,  $^4J_{\text{CF}} = 3$  Hz,  $\text{C}_a$ ), 130.45 ( $\text{C}_3$ ), 122.09 (d,  $^3J_{\text{CF}} = 8$  Hz,  $2\text{C}_b$ ), 116.20 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 23$  Hz,  $2\text{C}_c$ ), 110.68 ( $\text{C}_{4a}$ ), 105.34 ( $\text{C}_4$ ), 88.99 ( $\text{C}_8$ ), 66.14 ( $2\text{C}_h$ ), 57.29 ( $\text{C}_f$ ), 53.24 ( $2\text{C}_g$ ), 38.06 ( $\text{C}_e$ ), 29.95 ( $\text{NCH}_3$ ).

## Experimental section

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3229 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2968, 2901 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1641 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1587, 1504, ( $\nu\text{C=C}$ ); 1067, 1057 ( $\nu\text{C-F}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 398.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  398.1987, found: 398.1986.

### **3-[(4-Fluorophenyl)amino]-1-methyl-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-1,6-naphthyridin-2(1H)-one (97)**

**Yellow powder**

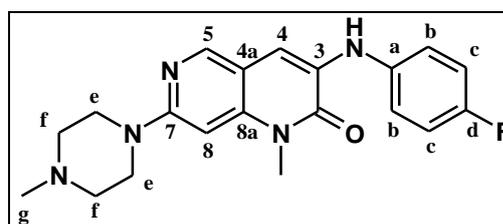
**$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FN}_5\text{O}$**

**MW = 367.43  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$**

**Rf = 0.11 (dichloromethane/methanol: 95/5)**

**Mp = 175-176 °C**

**Yield = 21%**



Compound **97** was prepared according to *procedure M*. In the first step, compound **54** (150 mg, 0.55 mmol) was reacted with 4-fluoroaniline (61 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (358 mg, 1.10 mmol, 2.0 equiv.),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and Xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.). After completion, 1-methylpiperazine (1.22 mL, 11.0 mmol, 20.0 equiv.) was added to the crude reaction mixture. The tube was sealed and the reaction was subjective to heat at 150 °C for 92 h. Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **97** (42 mg, 21% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.27 (s, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.20-7.16 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 7.09-7.05 (m, 3H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_4$ ), 6.87 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{-NH}$ ), 6.32 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{CONCH}_3$ ), 3.62 (t,  $^3J = 4.8$  Hz, 4H,  $\text{H}_e$ ), 2.59 (t,  $^3J = 4.8$  Hz, 4H,  $\text{H}_f$ ), 2.38 (s, 3H,  $\text{H}_g$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  159.51 ( $\text{C=O}$ ), 158.68 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 240$  Hz,  $\text{C}_d$ ), 157.32 ( $\text{C}_7$ ), 146.55 ( $\text{C}_5$ ), 141.46 ( $\text{C}_{8a}$ ), 136.71 (d,  $^4J_{\text{CF}} = 3$  Hz,  $\text{C}_a$ ), 131.35 ( $\text{C}_3$ ), 122.37 (d,  $^3J_{\text{CF}} = 8$  Hz,  $2\text{C}_b$ ), 116.26 (d,  $^2J_{\text{CF}} = 23$  Hz,  $2\text{C}_c$ ), 111.36 ( $\text{C}_{4a}$ ), 104.58 ( $\text{C}_4$ ), 89.84 ( $\text{C}_8$ ), 54.16 ( $2\text{C}_f$ ), 45.10 ( $\text{C}_g$ ), 44.67 ( $2\text{C}_e$ ), 29.90 ( $\text{CONCH}_3$ ).

**IR,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3305 ( $\nu\text{N-H}$ ); 2968, 2930 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1639 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1587, 1504, ( $\nu\text{C=C}$ ); 1233, 1209 ( $\nu\text{C-F}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 368.2 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HRMS (ESI):** calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FN}_5\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  368.1881, found: 368.1878.

**4,6-Dichloronicotinic acid (98)**

White powder

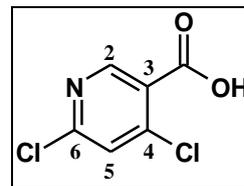
$C_6H_3Cl_2NO_2$

MW = 192.00 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.19 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 154-155 °C

Yield = 99%



NaOH (1,52 mL, 9.53 mmol, 2.1 equiv.) was added to a stirred solution of compound **2** (1.00 g, 4.54 mmol) in 4:1:1 THF/MeOH/H<sub>2</sub>O (15 mL). After 30 minutes, the reaction mixture was acidified to pH 2 with concentrated HCl, diluted with water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure to give **98** (863 mg, 99% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.97 (br s, 1H, COOH), 8.85 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.98 (s, 1H, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 164.19 (C=O), 153.04 (C<sub>6</sub>), 151.72 (C<sub>2</sub>), 144.51 (C<sub>4</sub>), 126.18 (C<sub>3</sub>), 125.71 (C<sub>5</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3217 (νO-H); 1738 (νC=O); 1564, 1535 (νC=C); 853, 785 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 191.9 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 193.9 (65) [M+H+2]<sup>+</sup>, 195.9 (10) [M+H+4]<sup>+</sup>.

**Ethyl (2E/Z)-2-[(4,6-dichloropyridin-3-yl)carbonyl]-3-(dimethylamino)prop-2-enoate (99)**

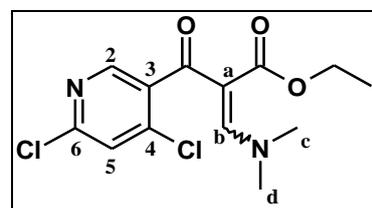
Orange oil

$C_{13}H_{14}Cl_2N_2O_3$

MW = 317.17 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.17 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Yield = 81%



A mixture of acid **98** (10 g, 52.08 mmol) and thionyl chloride (50 mL) was refluxed for 30 minutes. The excess thionyl chloride was removed under reduced pressure to give an oil residue that was dissolved in dry THF (120 mL). Ethyl 3-(dimethylamino)-acrylate (7.46 g, 52.08 mmol, 1.0 equiv.) and triethylamine (8.71 mL, 62.50 mmol, 1.2 equiv.) were added and the resulting solution was heated at 65 °C for 1 h. After cooling, water was added, and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by

## Experimental section

silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) to provide **99** (13.37 g, 81% yield) as an orange oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.34 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.98 (s, 1H, H<sub>b</sub>), 7.85 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 3.92 (q, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.43 (s, 3H, H<sub>c</sub> or H<sub>d</sub>), 2.94 (s, 3H, H<sub>d</sub> or H<sub>c</sub>), 0.95 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 184.39 (C<sub>3</sub>-C=O), 166.26 (O-C=O), 159.60 (C<sub>b</sub>), 149.84 (C<sub>6</sub>), 148.14 (C<sub>2</sub>), 141.66 (C<sub>4</sub>), 137.73 (C<sub>3</sub>), 124.14 (C<sub>5</sub>), 100.59 (C<sub>a</sub>), 59.14 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 42.52 (C<sub>c</sub> or C<sub>d</sub>), 40.11 (C<sub>d</sub> or C<sub>c</sub>), 13.71 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3082 (νC-H<sub>ar</sub>); 2943 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1641 (νC=O); 1595, 1557, 1476 (νC=C); 858, 822 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 317.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 319.0 (65) [M+H+2]<sup>+</sup>, 321.0 (10) [M+H+4]<sup>+</sup>.

### Ethyl 7-chloro-1-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphthyridine-3-carboxylate (100)

White powder

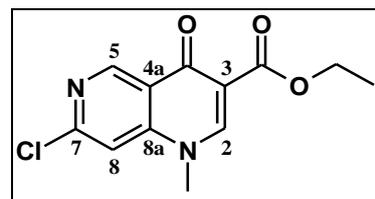
C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

MW = 266.68 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.34 (dichloromethane/methanol: 97/3)

Mp = 211-212 °C

Yield = 47%



A stirred solution of **99** (1.00 g, 3.15 mmol) in EtOH (30 mL) and Et<sub>2</sub>O (10 mL) was treated dropwise with MeNH<sub>2</sub> (627 μL, 5.04 mmol, 1.6 equiv.). After 1.5 h at room temperature the solvent was evaporated to dryness and washed with Et<sub>2</sub>O to give methylamine acrylate as a white solid that was solubilized in THF (40 mL). To this solution maintained at 0° C, NaH (227 mg, 5.67 mmol, 1.8 equiv.) was added portionwise. After 30 minutes at room temperature, the mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) to provide **100** (395 mg, 47% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.11 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.76 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.89 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 4.27 (q, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.32 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 172.31 (C<sub>4a</sub>-C=O), 163.68 (O-C=O), 152.71 (C<sub>8a</sub>), 152.03 (C<sub>2</sub>), 150.12 (C<sub>5</sub>), 147.00 (C<sub>7</sub>), 121.71 (C<sub>4a</sub>), 113.12 (C<sub>3</sub>), 111.24 (C<sub>8</sub>), 60.08 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.33 (NCH<sub>3</sub>), 14.22 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3071 (νC-H<sub>ar</sub>); 1680, 1640 (νC=O); 1574, 1493 (νC=C); 808 (νC-Cl).

## Experimental section

**MS (ESI), m/z (%):** 267.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 269.0 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### **7-chloro-1-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphthyridine-3-carboxylic acid (101)**

White powder

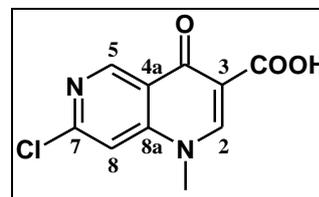
**C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

**MW = 238.62 g.mol<sup>-1</sup>**

**Rf = 0.21 (dichloromethane/methanol: 98/2)**

**Mp = 284-285 °C**

**Yield = 74%**



A stirred solution of **99** (2.00 g, 6.31 mmol) in EtOH (15 mL) and Et<sub>2</sub>O (5 mL) was treated dropwise with MeNH<sub>2</sub> (1.10 mL, 8.83 mmol, 1.4 equiv.). After 30 minutes at room temperature the solvent was evaporated to dryness and gave methylamine acrylate as a white solid that was solubilized in THF (20 mL). To this solution maintained at 0° C, NaH (456 mg, 11.36 mmol, 1.8 equiv.) was added portionwise. After 30 minutes at room temperature, the mixture was evaporated to dryness. 10% aqueous KOH (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. The reaction was neutralized with acetic acid and the solid precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under high vacuum to give **101** (1.11 g, 74% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 14.22 (br s, 1H, COOH), 9.34 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 9.14 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.12 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 4.07 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 177.42 (C<sub>4a</sub>-C=O), 164.92 (COOH), 153.60 (C<sub>8a</sub>), 152.90 (C<sub>2</sub>), 150.18 (C<sub>5</sub>), 146.96 (C<sub>7</sub>), 119.71 (C<sub>4a</sub>), 111.94 (C<sub>8</sub>), 110.74 (C<sub>3</sub>), 41.10 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3102 (νC-H<sub>ar</sub>); 2963 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1722, 1632 (νC=O); 1597, 1452 (νC=C); 812 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 239.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 241.0 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### **3-Bromo-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-4(1H)-one (102)**

White powder

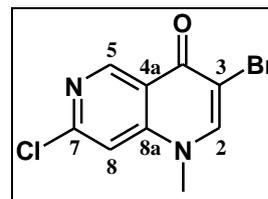
**C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>BrClN<sub>2</sub>O**

**MW = 273.42 g.mol<sup>-1</sup>**

**Rf = 0.13 (dichloromethane/methanol: 99/1)**

**Mp = 305-306 °C**

**Yield = 83%**



## Experimental section

According to the general *procedure E*, compound **102** was obtained by reaction between carboxylic acid **101** (100 mg, 0.42 mmol), NBS (313 mg, 1.76 mmol, 4.2 equiv.) and LiOAc (33 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **197** (95 mg, 83% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.15 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.75 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.87 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.86 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 170.68 (C=O), 151.94 (C<sub>8a</sub>), 150.24 (C<sub>2</sub>), 147.10 (C<sub>5</sub>), 146.35 (C<sub>7</sub>), 118.66 (C<sub>4a</sub>), 110.72 (C<sub>8</sub>), 106.63 (C<sub>3</sub>), 39.46 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3021 (νC-H<sub>ar</sub>); 1630 (νC=O); 1574, 1485, 1454 (νC=C); 889 (νC-Cl); 855 (νC-Br).

**MS (ESI), m/z (%):** 272.9 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 274.9 (80) [M+H+2]<sup>+</sup>, 276.9 (32) [M+H+4]<sup>+</sup>.

### 7-Chloro-3-iodo-1-methyl-1,6-naphthyridin-4(1H)-one (103)

Yellow powder

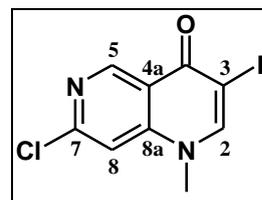
C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>ClIN<sub>2</sub>O

MW = 320.52 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.24 (dichloromethane/methanol: 99/1)

Mp = 279-280 °C

Yield = 57%



According to the general *procedure E*, compound **103** was obtained by reaction between carboxylic acid **101** (100 mg, 0.42 mmol), NIS (301 mg, 1.35 mmol, 3.2 equiv.) and LiOAc (33 mg, 0.50 mmol, 1.2 equiv.). Purification by silica gel chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) afforded **103** (77 mg, 57% yield) as a white powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.10 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.74 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.84 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 3.85 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 172.42 (C=O), 151.76 (C<sub>8a</sub>), 151.42 (C<sub>2</sub>), 150.39 (C<sub>5</sub>), 146.56 (C<sub>7</sub>), 116.70 (C<sub>4a</sub>), 110.64 (C<sub>8</sub>), 83.78 (C<sub>3</sub>), 39.88 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3040 (νC-H<sub>ar</sub>); 2972 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1624 (νC=O); 1568, 1474, 1454 (νC=C); 883 (νC-Cl); 783 (νC-I).

**MS (ESI), m/z (%):** 321.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 322.9 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**N-(7-chloro-1-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphthyridin-3-yl)-4-methoxybenzamide (104)**

White powder

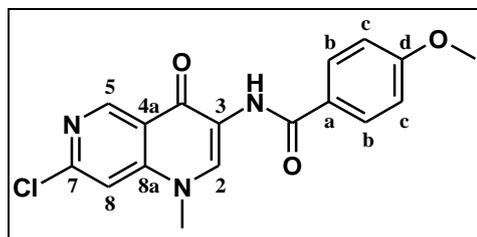
$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$

MW = 343.77 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.20 (cyclohexane/ethyl acetate: 50/50)

Mp = 269-270 °C

Yield = 54%



In a 10 mL vessel were added compound **102** (100 mg, 0.37 mmol), 4-methoxybenzamide (56 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (14 mg, 0.06 mmol, 0.15 equiv.), Xantphos (35 mg, 0.06 mmol, 0.15 equiv.) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.) in 1,4-dioxane (3 mL). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. After 2.5 h at 105 °C in an oil bath, the mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 50:50) to provide **104** (68 mg, 54% yield) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.44 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 9.32 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 9.04 (s, 1H, NH), 7.91 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.33 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.00 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.91 (C<sub>3</sub>-C=O), 164.92 (NH-C=O), 162.66 (C<sub>d</sub>), 152.86 (C<sub>8a</sub>), 151.42 (C<sub>5</sub>), 143.80 (C<sub>7</sub>), 132.37 (C<sub>2</sub>), 128.94 (2C<sub>b</sub>), 125.0 (C<sub>a</sub>), 125.30 (C<sub>3</sub>), 117.18 (C<sub>4a</sub>), 113.85 (2C<sub>c</sub>), 108.42 (C<sub>8</sub>), 55.27 (OCH<sub>3</sub>), 40.43 (NCH<sub>3</sub>).

IR, ν (cm<sup>-1</sup>): 3375 (νN-H); 2928 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1632 (νC=O); 1541, 1483, 1454 (νC=C); 843 (νC-Cl).

MS (ESI), m/z (%): 344.2 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 346.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

**7-Chloro-3-[(4-methoxyphenyl)amino]-1-methyl-1,6-naphthyridin-4(1H)-one (105)**

Yellow powder

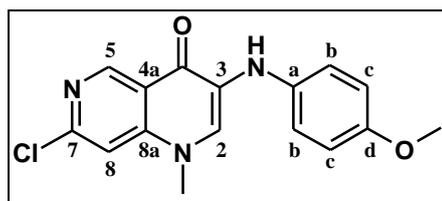
$C_{16}H_{14}ClN_3O_2$

MW = 315.76 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.15 (cyclohexane/ethyl acetate: 50/50)

Mp = 179-180 °C

Yield = 36%



## Experimental section

In a 10 mL vessel were added compound **102** (100 mg, 0.37 mmol), *p*-anisidine (45 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (14 mg, 0.06 mmol, 0.15 equiv.), Xantphos (35 mg, 0.06 mmol, 0.15 equiv.) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol, 2.0 equiv.) in 1,4-dioxane (3 mL). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. After 1 h at 105 °C in an oil bath, the mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 50:50) and recrystallization from EtOH to provide **105** (42 mg, 36% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.44 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.30 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.22 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.12 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 6.92 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 6.43 (s, 1H, NH), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 170.33 (C=O), 155.76 (C<sub>d</sub>), 151.80 (C<sub>5</sub>), 151.52 (C<sub>8a</sub>), 143.43 (C<sub>7</sub>), 133.67 (C<sub>a</sub>), 133.05 (C<sub>3</sub>), 122.93 (2C<sub>b</sub>), 121.58 (C<sub>2</sub>), 116.32 (C<sub>4a</sub>), 114.80 (2C<sub>c</sub>), 107.85 (C<sub>8</sub>), 55.32 (OCH<sub>3</sub>), 40.07 (NCH<sub>3</sub>).

**IR, ν (cm<sup>-1</sup>):** 3379 (νN-H); 2943 (νC-H<sub>aliph</sub>); 1624 (νC=O); 1609, 1508, 1454 (νC=C); 827 (νC-Cl).

**MS (ESI), m/z (%):** 316.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 318.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### 3-amino-7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-4(1*H*)-one (106)

Yellow powder

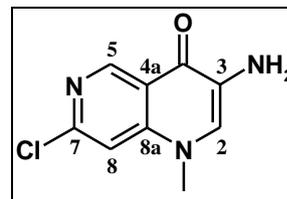
C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O

MW = 209.63 g.mol<sup>-1</sup>

R<sub>f</sub> = 0.19 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 223-224 °C

Yield = 9%



In a 10 mL vessel were added compound **102** (100 mg, 0.37 mmol), Cu powder (2 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.), ascorbic acid (12 mg, 0.07 mmol, 0.20 equiv.), sodium azide (48 mg, 0.73 mmol, 2.0 equiv.) in a mixture of EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3, 2 mL). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated in an oil bath at 100 °C for 9 h. The resulting suspension was cooled to room temperature and filtered through Celite® eluting with dichloromethane. The filtrate was concentrated and purification of the residue by silica gel column chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) provided **106** (7 mg, 9% yield) as a yellow powder.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.11 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.69 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.54 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 4.82 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

## Experimental section

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  169.31 (C=O), 150.27 (C<sub>5</sub>), 149.36 (C<sub>8a</sub>), 142.20 (C<sub>7</sub>), 134.51 (C<sub>3</sub>), 124.77 (C<sub>2</sub>), 116.47 (C<sub>4a</sub>), 109.30 (C<sub>8</sub>), 39.48 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3412 and 3293 ( $\nu\text{NH}_2$ ); 2922 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1634 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1595, 1553, 1499 ( $\nu\text{C=C}$ ); 886 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 210.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 212.1 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

### 7-chloro-1-methyl-1,6-naphthyridin-4(1H)-one (107)

Orange powder

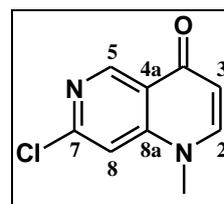
C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub>O

MW = 194.63 g.mol<sup>-1</sup>

Rf = 0.46 (dichloromethane/methanol: 95/5)

Mp = 260-261 °C

Yield = 43%



In a 10 mL vessel were added compound **102** (100 mg, 0.37 mmol), Cu powder (2 mg, 0.02 mmol, 0.05 equiv.), ascorbic acid (12 mg, 0.07 mmol, 0.20 equiv.), sodium azide (48 mg, 0.73 mmol, 2.0 equiv.) in a mixture of EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3, 2 mL). The tube was sealed and purged with argon through the septum inlet for 5 min. The mixture was heated in an oil bath at 100 °C for 9 h. The resulting suspension was cooled to room temperature and filtered through Celite® eluting with dichloromethane. The filtrate was concentrated and purification of the residue by silica gel column chromatography (mixtures of dichloromethane/methanol of increasing polarity) provided **107** (31 mg, 43% yield) as a yellow powder.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.33 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.53 (d, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.27 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.37 (d, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  176.60 (C=O), 154.15 (C<sub>8a</sub>), 151.48 (C<sub>5</sub>), 146.64 (C<sub>7</sub>), 146.21 (C<sub>2</sub>), 119.69 (C<sub>4a</sub>), 113.05 (C<sub>3</sub>), 109.10 (C<sub>8</sub>), 40.59 (NCH<sub>3</sub>).

**IR,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 2920 ( $\nu\text{C-H}_{\text{aliph}}$ ); 1632 ( $\nu\text{C=O}$ ); 1572, 1478, 1452 ( $\nu\text{C=C}$ ); 831 ( $\nu\text{C-Cl}$ ).

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 195.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 197.0 (40) [M+H+2]<sup>+</sup>.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

- 1) Ritossa, F., Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **1996**, *1*, 97-98.
- 2) De Maio, A.; Santoro, M. G.; Tanguay, R. M.; Hightower, L. E., Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* **2012**, *17*, 139-143.
- 3) Burel, C.; Mezger, V.; Pinto, M.; Rallu, M.; Trigon, S.; Morange, M., Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* **1992**, *48*, 629-634.
- 4) Arrigo, A. P., Chaperons moléculaires et repliement des protéines. *Medecine/Science* **2005**, *21*, 619-625.
- 5) Image issue du site : <http://qian.human.cornell.edu>. Consulté le 12 mai **2015**.
- 6) Borkovich, K. A; Farrelly, F. W.; Finkelstein, D. B.; Taulien, J.; Lindquist, S., Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 3919-3930.
- 7) Frey, S.; Leskovar, A.; Reinstein, J.; Buchner, J., The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35612-35620.
- 8) Leskovar, A.; Wegele, H.; Werbeck, N. D.; Buchner, J.; Reinstein, J., The ATPase cycle of the mitochondrial Hsp90 analog Trap1. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11677-11688.
- 9) Felts, S. J.; Owen, B. A.; Nguyen, P.; Trepel, J.; Donner, D. B.; Toft, D. O., The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3305-3312.
- 10) Binder, R. J.; Kelly, J. B.; Vatner, R. E.; Srivastava, P. K., Specific immunogenicity of heat shock protein gp96 derives from chaperoned antigenic peptides and not from contaminating proteins. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7254-7261.
- 11) Kang, B. H.; Plescia, J.; Dohi, T.; Rosa, J.; Doxsey, S. J.; Altieri, D. C., Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. *Cell* **2007**, *131*, 257-270.
- 12) Stemmann, O.; Neidig, A.; Kocher, T.; Wilm, M.; Lechner, J., Hsp90 enables Ctf13p/Skp1p to nucleate the budding yeast kinetochore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2002**, *99*, 8585-8590.

## Bibliographie

- 13) McClellan, A. J.; Xia, Y.; Deutschbauer, A. M.; Davis, R. W.; Gerstein, M.; Frydman, J., Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* **2007**, *131*, 121-135.
- 14) Toft, D. O., Recent advances in the study of hsp90 structure and mechanism of action, *Trends Endocrinol. Metab.* **1998**, *9*, 238-243.
- 15) Buchner, J., Hsp90 & Co. a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 136-141.
- 16) Walter, S.; Buchner, J., Molecular chaperone-cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1098-1113.
- 17) Li, J.; Buchner, J., Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed. J.* **2013**, *36*, 106-107.
- 18) Goetz, M. P.; Toft, D. O.; Ames, M. M.; Erlichman, C., The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 1169-1176.
- 19) Li, J.; Soroka, J.; Buchner, J., The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 624-635.
- 20) Ratzke, C.; Mickler, M.; Hellenkamp, B.; Buchner, J.; Hugel, T., Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2010**, *107*, 16101-16106.
- 21) Hessling, M.; Richter, K.; Buchner, J., Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 287-293.
- 22) Street, T. O.; Lavery, L. A.; Agard, D. A., Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Mol. Cell* **2011**, *42*, 96-105.
- 23) Prodromou, C.; Siligardi, G.; O'Brien, R.; Woolfson, D. N.; Regan, L.; Panaretou, B.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H., Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* **1999**, *18*, 754-762.
- 24) Panaretou, B.; Siligardi, G.; Meyer, P.; Maloney, A.; Sullivan, J. K.; Singh, S.; Millson, S. H.; Clarke, P. A.; Naaby-Hansen, S.; Stein, R.; Cramer, R.; Mollapour, M.; Workman, P.; Piper, P. W.; Pearl, L. H.; Prodromou, C., Activation of the

## Bibliographie

- ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1307-1318.
- 25) Richter, K.; Walter, S.; Buchner, J., The co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 1403-1413.
- 26) Roe, S. M.; Ali, M. M.; Meyer, P.; Vaughan, C. K.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Prodromou, C.; Pearl, L. H., The mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* **2004**, *116*, 87-98.
- 27) Chen, S.; Smith, D. F., Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 35194-35200.
- 28) Röhl, A.; Rohrberg, J.; Buchner, J., The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 253-262.
- 29) Scheufler, C.; Brinker, A.; Bourenkov, G.; Pegoraro, S.; Moroder, L.; Bartunik, H.; Hartl, F. U.; Moarefi, I., Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **2000**, *101*, 199-210.
- 30) Taipale, M.; Krykbaeva, I.; Koeva, M.; Kayatekin, C.; Westover, K. D.; Karras, G. I.; Lindquist, S., Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* **2012**, *150*, 987-1001.
- 31) Gaiser, A. M.; Kretschmar, A.; Richter, K., Cdc37-Hsp90 complexes are responsive to nucleotide-induced conformational changes and binding of further cofactors. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40921-40932.
- 32) Kadota, Y.; Shirasu, K.; Guerois, R., NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 199-207.
- 33) Takahashi, A.; Casais, C.; Ichimura, K.; Shirasu, K., HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2003**, *100*, 11777-11782.
- 34) Eckert, K.; Saliou, J. M.; Monlezun, L.; Vigouroux, A.; Atmane, N.; Caillat, C.; Quevillon-Chéruef, S.; Madiona, K.; Nicaise, M.; Lazereg, S.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianféron, S.; Meyer, P.; Moréra, S., The Pih1-Tah1 cochaperone complex inhibits Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31304-31312.

## Bibliographie

- 35) Mickler, M.; Hessling, M.; Ratzke, C.; Buchner, J.; Hugel, T., The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 281-286.
- 36) Retzlaff, M.; Hagn, F.; Mitschke, L.; Hessling, M.; Gugel, F.; Kessler, H.; Richter, K.; Buchner, J., Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Mol. Cell* **2010**, *37*, 344-354.
- 37) Koulov, A.V.; LaPointe, P.; Lu, B.; Razvi, A.; Coppinger, A.; Dong, M. Q.; Matteson, J.; Laister, R.; Arrowsmith, C.; Yates III, J. R.; Balch, W. E., Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 871-884.
- 38) Wandinger, S. K.; Suhre, M. H.; Wegele, H.; Buchner, J., The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J.* **2006**, *25*, 367-376.
- 39) Soroka, J.; Wandinger, S. K.; Mäusbacher, N.; Schreiber, T.; Richter, K.; Daub, H.; Buchner, J., Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 via regulated phosphorylation. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 517-528.
- 40) Pirkl, F.; Buchner, J., Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 795-806.
- 41) Fanghanel, J.; Fischer, G., Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 3453-3478.
- 42) Bose, S.; Weikl, T.; Bügl, H.; Buchner, J., Chaperone function of Hsp90 associated proteins. *Science* **1996**, *274*, 1715-1717.
- 43) Freeman, B. C.; Toft, D. O.; Morimoto, R. I., Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor associated protein p23. *Science* **1996**, *274*, 1718-1720.
- 44) Riggs, D. L.; Cox, M. B.; Tardif, H. L.; Hessling, M.; Buchner, J.; Smith, D. F., Nuncatalytic role of the FKBP52 peptidylprolyl isomerase domain in the regulation of steroid hormone signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 8658-8669.
- 45) Ali, M. M.; Roe, S. M.; Vaughan, C. K.; Meyer, P.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Prodromou, C.; Pearl, L. H., Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* **2006**, *440*, 1013-1017.

## Bibliographie

- 46) McLaughlin, S. H.; Sobott, F.; Yao, Z. P.; Zhang, W.; Nielsen, P. R.; Grossmann, J. G.; Laue, E. D.; Robinson, C. V.; Jackson, S. E., The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 746-758.
- 47) Echtenkamp, F. J.; Zelin, E.; Oxelmark, E.; Woo, J. I.; Andrews, B. J.; Garabedian, M.; Freeman, B. C., Global functional map of the p23 molecular chaperone reveals an extensive cellular network. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 229-241.
- 48) Kundrat, L.; Regan, L., Balance between folding and degradation for Hsp90 dependent client proteins: a key role for CHIP. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7428-7438.
- 49) Mickler, M.; Hessling, M.; Ratzke, C.; Buchner, J.; Hugel, T., The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 281-286.
- 50) Li, J.; Richter, K.; Reinstein, J.; Buchner, J., Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 cochaperone cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 326-331.
- 51) Li, J.; Richter, K.; Buchner, J., Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 61-66.
- 52) Mollapour, M.; Neckers, L., Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 648-655.
- 53) Shao, J.; Hartson, S. D.; Matts, R. L., Evidence that protein phosphatase 5 functions to negatively modulate the maturation of the Hsp90-dependent heme-regulated eif2alpha kinase. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6770-6779.
- 54) Mollapour, M.; Tsutsumi, S.; Truman, A. W.; Xu, W.; Vaughan, C. K.; Beebe, K.; Konstantinova, A.; Vourganti, S.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Trepel, J. B.; Prodromou, C.; Pearl, L. H.; Neckers, L., Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 672-681.
- 55) Xu, W.; Mollapour, M.; Prodromou, C.; Wang, S.; Scroggins, B. T.; Palchick, Z.; Beebe, K.; Siderius, M.; Lee, M. J.; Couvillon, A.; Trepel, J. B.; Miyata, Y.; Matts, R.; Neckers, L., Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 434-443.

## Bibliographie

- 56) Aoyagi, S.; Archer, T. K., Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 565-567.
- 57) Yang, Y.; Rao, R.; Shen, J.; Tang, Y.; Fiskus, W.; Nechtman, J.; Atadja, P.; Bhalla, K., Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4833-4842.
- 58) Kekatpure, V. D.; Dannenberg, A. J.; Subbaramaiah, K., HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7436-7445.
- 59) Kovacs, J. J.; Murphy, P. J.; Gaillard, S.; Zhao, X.; Wu, J. T.; Nicchitta, C. V.; Yoshida, M.; Toft, D. O.; Pratt, W. B.; Yao, T. P., HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 601-607.
- 60) Bali, P.; Pranpat, M.; Bradner, J.; Balasis, M.; Fiskus, W.; Guo, F.; Rocha, K.; Kumaraswamy, S.; Boyapalle, S.; Atadja, P.; Seto, E.; Bhalla, K., Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26729-26734.
- 61) de Zoeten, E. F.; Wang, L.; Butler, K.; Beier, U. H.; Akimova, T.; Sai, H.; Bradner, J. E.; Mazitschek, R.; Kozikowski, A. P.; Matthias, P.; Hancock, W. W., Histone deacetylase 6 and heat shock protein 90 control the functions of foxp3+ T regulatory cells. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 2066-2078.
- 62) Scroggins, B. T.; Neckers, L., Just say NO: nitric oxide regulation of Hsp90. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1093-1094.
- 63) Hess, D. T.; Matsumoto, A.; Kim, S. O.; Marshall, H. E.; Stamler, J. S.; Hess, D. T., Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 150-166.
- 64) Martínez-Ruiz, A.; Villanueva, L.; González de Orduña, C.; López-Ferrer, D.; Higuera, M. A.; Tarín, C.; Rodríguez-Crespo, I.; Vázquez, J.; Lamas S., S-Nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2005**, *102*, 8525-8530.
- 65) Retzlaff, M.; Stahl, M.; Eberl, H. C.; Lagleder, S.; Beck, J.; Kessler, H.; Buchner, J., Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1147-1153.

## Bibliographie

- 66) Hamamoto, R.; Toyokawa, G.; Nakakido, M.; Ueda, K.; Nakamura, Y., SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation. *Cancer Lett.* **2014**, *351*, 126-133.
- 67) Huang, J.; Perez-Burgos, L.; Placek, B. J.; Sengupta, R.; Richter, M.; Dorsey, J. A.; Kubicek, S.; Opravil, S.; Jenuwein, T.; Berger, S. L., Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* **2006**, *444*, 629-632.
- 68) <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>. Consulté le 21 mai **2015**.
- 69) Pratt, W. B.; Morishima, Y.; Peng, H. M.; Osawa, Y., Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2010**, *235*, 278-289.
- 70) Smith, D. F.; Stensgard, B. A.; Welch, W. J.; Toft, D. O., Assembly of progesterone receptor with heat shock proteins and receptor activation are ATP mediated events. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1350-1356.
- 71) Ziemiecki, A.; Catelli, M. G.; Joab, I.; Moncharmont, B., Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *138*, 1298-1307.
- 72) Xu, Y.; Lindquist, S., Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp 60v-src kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**, *90*, 7074-7078.
- 73) Momose, F.; Naito, T.; Yano, K.; Sugimoto, S.; Morikawa, Y.; Nagata, K., Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45306-45314.
- 74) Mayor, A.; Martinon, F.; De Smedt, T.; Petrilli, V.; Tschopp, J., A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 497-503.
- 75) Boulon, S.; Pradet-Balade, B.; Verheggen, C.; Molle, D.; Boireau, S.; Georgieva, M.; Azzag, K.; Robert, M. C.; Ahmad, Y.; Neel, H.; Lamond, A. I.; Bertrand, E., HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Cell* **2010**, *39*, 912-924.
- 76) Shim, H. Y.; Quan, X.; Yi, Y. S.; Jung, G., Heat shock protein 90 facilitates formation of the HBV capsid via interacting with the HBV core protein dimmers. *Virology* **2011**, *410*, 161-169.

## Bibliographie

- 77) Ujino, S.; Yamaguchi, S.; Shimotohno, K.; Takaku, H., Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 6841-6846.
- 78) Liu, Y.; Burch-Smith, T.; Schiff, M.; Feng, S.; Dinesh-Kumar, S. P., Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2101-2108.
- 79) Toogun, O. A.; Dezwaan, D. C.; Freeman, B. C., The hsp90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 457-467.
- 80) Taipale, M.; Jarosz, D. F.; Lindquist, S., HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 515-528.
- 81) Buchner, J., Bacterial Hsp90: Desperately seeking clients. *Mol Microbiol.* **2010**, *76*, 540-544.
- 82) Li, R.; Soosairajah, J.; Harari, D.; Citri, A.; Price J.; Ng, H. L.; Morton, C. J.; Parker, M. W.; Yarden, Y.; Bernard, O., Hsp90 increases LIM Kinase activity by promoting its homo-dimerization. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1218-1220.
- 83) Citri, A.; Harari, D.; Shohat, G.; Ramakrishnan, P.; Gan, J.; Lavi, S.; Eisenstein, M.; Kimchi, A.; Wallach, D.; Pietrokovski, S.; Yarden Y., Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14361-14369.
- 84) Gould, C. M.; Kannan, N.; Taylor, S. S.; Newton, A. C., The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through A conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4921-4935.
- 85) Terasawa, K.; Yoshimatsu, K.; Iemura, S.; Natsume, T.; Tanaka, K.; Minami, Y., Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 3378-3389.
- 86) Falsone, S. F.; Leptihn, S.; Osterauer, A.; Haslbeck, M.; Buchner, J., Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase. *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 281-291.
- 87) McClellan, A. J.; Tam, S.; Kaganovich, D.; Frydman, J., Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 736-741.
- 88) Ballinger, C. A.; Connell, P.; Wu, Y.; Hu, Z.; Thompson, L. J.; Yin, L. Y.; Patterson, C., Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing

## Bibliographie

- protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 4535-4545.
- 89)** Fan, M.; Park, A.; Nephew, K. P., CHIP (Carboxyl Terminus Of Hsc70-Interacting Protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 2901-2914.
- 90)** Ehrlich, E. S.; Wang, T.; Luo, K.; Xiao, Z.; Niewiadomska, A. M.; Martinez, T.; Xu, W.; Neckers, L.; Yu, X. F., Regulation of Hsp90 client proteins by a Cullin5-RING E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2009**, *106*, 20330-20335.
- 91)** Mandal, A. K.; Gibney, P. A.; Nillegoda, N. B.; Theodoraki, M. A.; Caplan, A. J.; Morano, K. A., Hsp110 chaperones control client fate determination in the Hsp70-Hsp90 chaperone system. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *2*, 1439-1448.
- 92)** Brown, I. R., Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 147-158.
- 93)** Muchowski, P. J.; Wacker, J. L., Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 11-22.
- 94)** Luo, W.; Sun, W.; Taldone, T.; Rodina, A.; Gabriela Chiosis, G., Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurodegener.* **2010**, *5*, 24.
- 95)** Waza, M.; Adachi, H.; Katsuno, M.; Minamiyama, M.; Tanaka, F.; Doyu, M.; Sobue, G., Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 635-646.
- 96)** Westerlund, M.; Hoffer, B.; Olson, L., Parkinson's disease: Exit toxins, enter genetics. *Progress. Neurobiol.* **2010**, *90*, 146-156.
- 97)** Wang, L.; Xie, C.; Greggio, E.; Parisiadou, L.; Shim, H.; Sun, L.; Chandran, J.; Lin, X.; Lai, C.; Yang, W. J.; Moore, D. J.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Chiosis, G.; Cookson, M. R.; Cai, H., The chaperone activity of heat shock protein 90 is critical for maintaining the stability of leucine rich repeat kinase 2. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 3384-3891.
- 98)** Kosik, K. S.; Shimura, H., Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1739*, 298-310.
- 99)** Luo, W.; Dou, F.; Rodina, A.; Chip, S.; Kim, J.; Zhao, Q.; Moulick, K.; Aguirre, J.; Wu, N.; Greengard, P.; Chiosis, G., Roles of heat shock protein 90 in

## Bibliographie

- maintaining and facilitating the neurodegenerative phenotype in tauopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2007**, *104*, 9511-9516.
- 100)** Whitesell, L.; Lindquist, S. L., HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761-772.
- 101)** Zuehlke, A.; Johnson, J. L., Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* **2010**, *93*, 211-217.
- 102)** Revathi, B.; Prashanth, K., Potential Hsp90 inhibitors: a novel target for cancer therapy. *Chemotherapy* **2015**, doi:10.4172/2167-7700.1000146.
- 103)** Kamal, A.; Thao, L.; Sensintaffar, J.; Zhang, L.; Boehm, M. F.; Fritz, L. C.; Burrows, F. J., A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **2003**, *425*, 407-410.
- 104)** Trepel, J.; Mollapour, M.; Giaccone, G.; Neckers, L., Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 537-549.
- 105)** Neckers, L.; Workman, P., Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64-76.
- 106)** Soga, S.; Akinaga, S.; Shiotsu, Y., Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 366-376.
- 107)** DeBoer, C.; Meulman, P. A.; Wnuk, R. J.; Peterson, D. H., Geldanamycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 442-447.
- 108)** Grenert, J. P.; Sullivan, W. P.; Fadden, P.; Haystead, T. A.; Clark, J.; Mimnaugh, E.; Krutzsch, H.; Ochel, H. J.; Schulte, T. W.; Sausville, E.; Neckers, L. M.; Toft, D. O., The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23843-23850.
- 109)** Supko, J. G.; Hickman, R. L.; Grever, M. R.; Malspeis, L., Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *36*, 305-315.
- 110)** Jhaveri, K.; Taldone, T.; Modi, S.; Chiosis, G., Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 742-755.

## Bibliographie

- 111)** Schulte, T. W.; Neckers, L. M., The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, *42*, 273-279.
- 112)** Modi, S.; Stopeck, A.; Linden, H.; Solit, D.; Chandarlapaty, S.; Rosen, N.; D'Andrea, G.; Dickler, M.; Moynahan, M. E.; Sugarman, S.; Ma, W.; Patil, S.; Norton, L.; L. Hannah, A. L.; Hudis, C., HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5132-5139.
- 113)** Richardson, P. G.; Chanan-Khan, A. A.; Lonial, S.; Krishnan, A. Y.; Carroll, M. P.; Alsina, M.; Albitar, M.; Berman, D.; Messina, M.; Anderson, K. C., Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase ½ study. *Br. J. Haematol.* **2011**, *153*, 729-740.
- 114)** <http://www.myelomabeacon.com/news/2010/07/22/tanespimycin-development-halted/>. Consulté le 01 juin **2015**.
- 115)** Hollingshead, M.; Alley, M.; Burger, A. M.; Borgel, S.; Pacula-Cox, C.; Fiebig, H. H.; Sausville, E. A., In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 115-125.
- 116)** Sydor, J. R.; Normant, E.; Pien, C. S.; Porter, J. R.; Ge, J.; Grenier, L.; Pak, R. H.; Ali, J. A.; Dembski, M. S.; Hudak, J.; Patterson, J.; Penders, C.; Pink, M.; Read, M. A.; Sang, J.; Woodward, C.; Zhang, Y.; Grayzel, D. S.; Wright, J.; Barrett, J. A.; Palombella, V. J.; Adams, J.; Tong, J. K., Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2006**, *103*, 17408-17413.
- 117)** <http://www.bloomberg.com/apps/news?pid=newsarchive&sid=anazIh94sWgc>. Consulté le 01 juin **2015**.
- 118)** <https://www.clinicaltrials.gov/>. Consulté le 02 juin **2015**.
- 119)** Delmotte, P.; Delmotte-Plaque, J., A new antifungal substance of fungal origin. *Nature* **1953**, *171*, 344.
- 120)** Soga, S.; Shiotsu, Y.; Akinaga, S.; Sharma, S. V., Development of radicicol analogues. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 359-69.

## Bibliographie

- 121) Kanda, Y.; Soga, S.; Nakashima, T.; Nara, S.; Nakagawa, H.; Shiotsu, Y., Anti-tumor agent. *Brevet*, **2006**, WO 2006088193.
- 122) Cavenagh, J.; Yong, K.; Byrne, J.; Cavet, J.; Johnson, P.; Morgan, G.; Williams, C.; Akinaga, S.; Francis, G.; Kilborn, J., The safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of KW-2478, a novel Hsp90 antagonist, in patients with B Cell malignancies: a first-in-man, phase I, multicentre, open-label, dose escalation study. *50th ASH Annual Meeting and Exposition*, **2008**, 112, 958-959.
- 123) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01063907>. Consulté le 02 juin **2015**.
- 124) Cheung, K. M. J.; Matthews, T. P.; James, K.; Rowlands, M. G.; Boxall, K. J.; Sharp, S. Y.; Maloney, A.; Roe, S. M.; Prodromou, C.; Pearl, L. M.; Aherne, G. W.; McDonald, E.; Workman, P., The identification, synthesis, protein crystal structure and in vitro biochemical evaluation of a new 3,4-diarylpyrazole class of Hsp90 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3338-3343.
- 125) Felip, E.; Carcereny, E.; Barlesi, F.; Gandhi, L.; Sequist, L. V.; Kim, S. W.; Groen, H. J. M.; Besse, B.; Kim, D. W.; Smit, E.; Akimov, M.; Avsar, E.; Bailey, S.; Ofosu-Appiah, W.; Garon, B., Phase II activity of the hsp90 inhibitor AUY922 in patients with ALK-rearranged (ALK+) or EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann. Oncol.* **2012**, 23, 152-174.
- 126) Ying, W.; Du, Z.; Sun, L.; Foley, K. P.; Proia, D. A.; Blackman, R. K.; Zhou, D. Inoue, T.; Tatsuta, N.; Sang, J.; Ye, S.; Acquaviva, J.; Ogawa, L. S.; Wada, Y.; Barsoum, J.; Koya, K., Ganetespib, a unique triazolone containing Hsp90 inhibitor, exhibits potent antitumor activity and a superior safety profile for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, 11, 475-484.
- 127) Woodhead, A. J.; Angove, H.; Carr, M. G.; Chessari, G.; Congreve, M.; Coyle, J. E.; Cosme, J.; Graham, B.; Day, P. J.; Downham, R.; Fazal, L.; Feltell, R.; Figueroa, E.; Frederickson, M.; Lewis, J.; McMenamin, R.; Murray, C. W.; O'Brien, M. A.; Parra, L.; Patel, S.; Phillips, T.; Rees, D. C.; Rich, S.; Smith, D. M.; Trewartha, G.; Vinkovic, M.; Williams, B.; Woolford, A. J.; Discovery of (2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-[5-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-1,3-dihydroisoindol-2-yl]methanone (AT13387), a novel inhibitor of the molecular chaperone Hsp90 by fragment based drug design. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5956-5969.
- 128) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01712217>. Consulté le 02 juin **2015**.
- 129) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02381535>. Consulté le 02 juin **2015**.

## Bibliographie

- 130) Chiosis, G.; Timaul, M. N.; Lucas, B.; Munster, P. N.; Zheng, F. F.; Sepp-Lorenzino, L.; Rosen, N., A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 289-299.
- 131) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00412412>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 132) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01004081>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 133) Mitchell, P., Biogen Idec restructures, sharpens neurology focus. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 7-8.
- 134) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00920205>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 135) Caldas-Lopes, E.; Cerchietti, L.; Ahn, J. H.; Clement, C. C.; Robles, A. I.; Rodina, A.; Moulick, K.; Taldone, T.; Gozman, A.; Guo, Y.; Wu, N.; de Stanchina, E.; White, J.; Gross, S. S.; Ma, Y.; Varticovski, L.; Melnick, A.; Chiosis, G., Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2009**, *106*, 8368-8373.
- 136) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01581541>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 137) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01393509>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 138) Cai, X.; Qian, C.; Zhai, H., Fused amino pyridine as HSP90 inhibitors. *Brevet*, **2008**, WO2008115719.
- 139) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01168752>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 140) Fumoleau, P.; Soria, J. C.; Delord, J. P.; Belli, R.; Brienza, S.; Zanna, C.; Destailhats, A.; Rouits, E.; Hollebecque, A.; Gazzah, A.; Isambert, N., Final results from the phase I study expansion cohort of debio 0932, an oral HSP90 inhibitor, in patients with solid tumors. **2014**, *American Society of Clinical Oncology - 50<sup>th</sup> annual meeting, Chicago, USA*.
- 141) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01714037>. Consulté le 04 juin **2015**.
- 142) Huang, K. H.; Hughes, P.; Ma, W.; Ommen, A.; Woodward, A.; Veal, J.; Barta, T., Tetrahydroindolone and tetrahydroindazolone derivatives. *Brevet*, **2008**, WO2008024970.
- 143) Rajan, A.; Kelly, R. J.; Trepel, J. B.; Kim, Y. S.; Alarcon, S. V.; Kummar, S.; Gutierrez, M.; Crandon, S.; Zein, W. M.; Jain, L.; Mannargudi, B.; Figg, W. D.;

## Bibliographie

- Houk, B. E.; Shnaidman, M.; Brega, N.; Giaccone G., A Phase I study of PF-04929113 (SNX-5422), an orally bioavailable heat shock protein 90 inhibitor, in patients with refractory solid tumor malignancies and lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6831-6839.
- 144)** Peyrat, J. F; Messaoudi, S.; Brion, J. D; Alami, M., Inhibitors of the heat shock protein 90: from cancer clinical trials to neurodegenerative diseases. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **2011**, *15*, 89-105.
- 145)** Bussenius, J.; Blazey, C. M.; Aay, N.; Anand, N. K.; Arcalas, A.; Baik, T.; Bowles, O. J.; Buhr, C. A.; Costanzo, S.; Curtis, J. K.; DeFina, S. C.; Dubenko, L.; Heuer, T. S.; Huang, P.; Jaeger, C.; Joshi, A.; Kennedy, A. R.; Kim, A. I.; Lara, K.; Lee, J.; Li, J.; Loughheed, J. C.; Ma, S.; Malek, S.; Manalo, J. C.; Martini, J. F.; McGrath, G.; Nicoll, M.; Nuss, J. M.; Pack, M.; Peto, C. J.; Tsang, T. H.; Wang, L.; Womble, S. W.; Yakes, M.; Zhang, W.; Rice, K. D., Discovery of XL888: a novel tropane-derived small molecule inhibitor of HSP90. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5396-5404.
- 146)** <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00796484>. Consulté le 08 juin **2015**.
- 147)** <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01657591>. Consulté le 08 juin **2015**.
- 148)** <http://www.exelixis.com/pipeline/xl88>. Consulté le 08 juin **2015**.
- 149)** <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01288430>. Consulté le 08 juin **2015**.
- 150)** Prodromou, C.; Roe, S. M.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H., Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **1997**, *90*, 65-75.
- 151)** Stebbins, C. E.; Russo, A. A.; Schneider, C.; Rosen, N.; Hart, F. U.; Pavletich, N. P., Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **1997**, *89*, 239-250.
- 152)** Roe, S. M.; Prodromou, C.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H., Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 260-266.
- 153)** Panaretou, B.; Prodromou, C.; Roe, S. M.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H., ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* **1998**, *17*, 4829-4836.

## Bibliographie

- 154)** Taldone, T.; Sun, W.; Chiosis, G., Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2225-2235.
- 155)** Wright, L.; Barril, X.; Dymock, B.; Sheridan, L.; Surgenor, A.; Beswick, M.; Drysdale, M.; Collier, A.; Massey, A.; Davies, N.; Fink, A.; Fromont, C.; Aherne, W.; Boxall, K.; Sharp, S.; Workman, P.; Hubbard, R. E., Structure-activity relationships in purine-based inhibitor binding to HSP90 isoforms. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 775-785.
- 156)** Kim, Y. S.; Alarcon, S. V.; Lee, S.; Lee, M. J.; Giaccone, G.; Neckers, L.; Trepel, J. B., Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1479-1492.
- 157)** Bhat, R.; Tummalapalli, S. R.; Rotella, D. P., Progress in the discovery and development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8718-8728.
- 158)** Garnier, C.; Lafitte, D.; Tsvetkov, P. O.; Barbier, P.; Leclerc-Devin, J.; Millot J. M.; Briand, C.; Makarov, A. A.; Catelli, M. G.; Peyrot, V., Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12208-12214.
- 159)** Marcu, M. G.; Chadli, A.; Bohouche, I.; Catelli, B.; Neckers, L. M., The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37181-37186.
- 160)** Soti, C.; Racz, A.; Csermely, P., A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7066-7075.
- 161)** Conde, R.; Belak, Z. R.; Nair, M.; O'Carroll, R. F.; Ovsenek, N., Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochem. Cell Biol.* **2009**, *87*, 845-851.
- 162)** Wang, Y.; McAlpine, S. R., N-terminal and C-terminal modulation of Hsp90 produce dissimilar phenotypes. *Chem. Commun.* **2014**, *51*, 1410-1413.
- 163)** Maxwell, A., The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 681-686.

## Bibliographie

- 164)** Marcu, M. G.; Schulte, T. W.; Neckers, L., Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 242-248.
- 165)** Donnelly, A.; Blagg, B. S., Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2702-2717.
- 166)** Ardi, V. C.; Alexander, L. D.; Johnson, V. A.; McAlpine, S. R., Macrocycles that inhibit the binding between heat shock protein 90 and TPR-containing proteins. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1357-1366.
- 167)** Koay, Y. C.; McConnell, J. R.; Wang, Y.; Kim, S. J.; Buckton, L. K.; Mansour, F.; McAlpine, S. R., Chemically accessible hsp90 inhibitor that does not induce a heat shock response. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 771-776.
- 168)** Peng, B.; Xu, L.; Cao, F.; Wei, T.; Yang, C.; Uzan, G.; Zhang, D., HSP90 inhibitor, celastrol, arrests human monocytic leukemia cell U937 at G0/G1 in thiol-containing agents reversible way. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 79.
- 169)** Moroni, E.; Zhao, H.; Blagg, B. S. J.; Colombo, G., Exploiting conformational dynamics in drug discovery: design of C-terminal inhibitors of Hsp90 with improved activities. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 195-208.
- 170)** Marcu, M. G.; Neckers, L. M., The C-terminal half of heat shock protein 90 represents a second site for pharmacologic intervention in chaperone function. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 343-347.
- 171)** Blagg, B. S., Novobiocin analogs. *Brevet*, **2009**, US20090187014.
- 172)** Blagg, B. S.; Neckers, L.; Yu, X. M., Novobiocin analogs as anticancer agents. *Brevet*, **2006**, WO2006050501.
- 173)** Yu, X. M.; Shen, G.; Neckers, L.; Blake, H.; Holzbeierlein, J.; Cronk, B.; Blagg, B. S., Hsp90 inhibitors identified from a library of novobiocin analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12778-12779.
- 174)** Burlison, J. A.; Neckers, L.; Smith, A. B.; Maxwell, A.; Blagg, B. S., Novobiocin: redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of hsp90. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15529-15536.
- 175)** Burlison, J. A.; Avila, C.; Vielhauer, G.; Lubbers, D. J.; Holzbeierlein, J.; Blagg, B. S., Development of novobiocin analogues that manifest anti-proliferative activity against several cancer cell lines. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2130-2137.

## Bibliographie

- 176)** Donnelly, A. C.; Mays, J. R.; Burlison, J. A.; Nelson, J. T.; Vielhauer, G.; Holzbeierlein, J.; Blagg, B. S. J., The design, synthesis, and evaluation of coumarin ring derivatives of the novobiocin scaffold that exhibit antiproliferative activity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8901-8920.
- 177)** Zhao, H.; Donnelly, A. C.; Kusuma, B. R.; Brandt, G. E.; Brown, D.; Rajewski, R. A.; Vielhauer, G.; Holzbeierlein, J.; Cohen, M. S.; Blagg, B. S., Engineering an antibiotic to fight cancer: optimization of the novobiocin scaffold to produce anti-proliferative agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3839-3853.
- 178)** Zhao, H.; Kusuma, B. R.; Blagg, B. S. J., Synthesis and evaluation of noviose replacements on novobiocin that manifest antiproliferative activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 311-315.
- 179)** Zhao, H.; Blagg, B. S., Novobiocin analogues with second-generation noviose surrogates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 552-557.
- 180)** Zhao, H.; Moroni, E.; Yan, B.; Colombo, G.; Blagg, B. S., 3D-QSAR assisted design, synthesis and evaluation of novobiocin analogues. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 57-62.
- 181)** Zhao, H.; Moroni, E.; Colombo, G.; Blagg, B. S. J., Identification of a new scaffold for Hsp90 C-terminal inhibition. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 84-88.
- 182)** Zhao, J.; Zhao, H.; Hall, J. A.; Brown, D.; Brandes, E.; Bazzill, J.; Grogan, P. T.; Subramanian, C.; Vielhauer, G.; Cohen, M. S.; Blagg, B. S., Triazole containing novobiocin and biphenyl amides as Hsp90 C-terminal inhibitors. *MedChemComm.* **2014**, *5*, 1317-1323.
- 183)** Zhao, H.; Garg, G.; Zhao, J.; Moroni, E.; Girgis, A.; Franco, L. S.; Singh, S.; Colombo, G.; Blagg, B. S., Design, synthesis and biological evaluation of biphenylamide derivatives as Hsp90 C-terminal inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 442-466.
- 184)** Garg, G.; Zhao, H.; Blagg, B. S., Design, synthesis, and biological evaluation of ring-constrained novobiocin analogues as hsp90 C-terminal inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 204-209.
- 185)** Le Bras, G.; Radanyi, C.; Peyrat, J. F.; Brion, J. D.; Alami, M.; Marsaud, V.; Stella, B.; Renoir, J. M., New novobiocin analogues as antiproliferative agents in breast cancer cells and potential inhibitors of heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6189-6200.

- 186)** Radanyi, C.; Le Bras, G.; Marsaud, V.; Peyrat, J. F.; Messaoudi, S.; Catelli, M. G.; Brion, J. D.; Alami, M.; Renoir, J., Antiproliferative and apoptotic activities of tosylcyclonovobiocic acids as potent heat shock protein 90 inhibitors in human cancer cell. *Cancer Lett.* **2009**, *274*, 88-94.
- 187)** Audisio, D.; Messaoudi, S.; Cegielski, L.; Peyrat, J. F.; Brion, J. D.; Methy-Gonnot, D.; Radanyi, C.; Renoir, J. M.; Alami, M., Discovery and biological activity of 6BrCaQ as an inhibitor of the Hsp90 protein folding machinery. *ChemMedChem.* **2011**, *6*, 804-816.
- 188)** Audisio, D.; Methy-Gonnot, D.; Radanyi, C.; Renoir, J. M.; Denis, S.; Sauvage, F.; Vergnaud-Gauduchon, J.; Brion, J. D.; Messaoudi, S.; Alami, M., Synthesis and antiproliferative activity of novobiocin analogues as potential hsp90 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 498-507.
- 189)** Strocchia, M.; Terracciano, S.; Chini, M. G.; Vassallo, A.; Vaccaro, M. C.; Dal Piaz, F.; Leone, A.; Riccio, R.; Bruno, I.; Bifulco G., Targeting the Hsp90 C-terminal domain by the chemically accessible dihydropyrimidinone scaffold. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3850-3853.
- 190)** Kumara, V.; Jaggi, M.; Singh, A. T.; Madaan, A.; Sanna, V.; Singh, P.; S.; Sharma, P. K.; Irchhaiyac, R.; Burman, A. C., 1,8-Naphthyridine-3-carboxamide derivatives with anticancer and anti-inflammatory activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3356-3362.
- 191)** Lucchesi, V.; Hurst, D. P.; Shore, D. M.; Bertini, S.; Ehrmann, B. M.; Allarà, M.; Lawrence, L.; Ligresti, A.; Minutolo, F.; Saccomanni, G.; Sharir, H.; Macchia, M.; Di Marzo, V.; Abood, M. E.; Reggio, P. H.; Manera, C., CB2-selective cannabinoid receptor ligands: synthesis, pharmacological evaluation, and molecular modeling investigation of 1,8-naphthyridin-2(1H)-one-3-carboxamides. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8777-8791.
- 192)** Sriram, D.; Senthilkumar, P.; Dinakaran, M.; Yogeewari, P.; China, A.; Nagaraja, V., Antimycobacterial Activities of Novel 1-(Cyclopropyl/*tert*-butyl/4-fluorophenyl)-1,4-dihydro-6-nitro-4-oxo-7-(substituted secondary amino)-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acid. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6232-6239.
- 193)** Dang, Z.; Yang, Y.; Ji, R.; Zhang, S., Synthesis and antibacterial activity of novel fluoroquinolones containing substituted piperidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4523-4526.
- 194)** Lv, K.; Liu, M. L.; Feng, L. S.; Sun, L. Y.; Sun, Y. X.; Wei, Z. Q.; Guo, H. Q., Synthesis and antibacterial activity of naphthyridone derivatives containing

## Bibliographie

- mono/difluoro-methyloxime pyrrolidine scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 619-625.
- 195)** Feng, L.; Lv, K.; Liu, M.; Wang, S.; Zhao, J.; You, X.; Li, S.; Cao, J.; Guo H., Synthesis and in vitro antibacterial activity of gemifloxacin derivatives containing a substituted benzyloxime moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 125-136.
- 196)** Naik, M.; Raichurkar, A.; Bandodkar, B. S.; Varun, B. V.; Bhat, S.; Kalkhambkar, R.; Murugan, K.; Menon, R.; Bhat, J.; Paul, B.; Iyer, H.; Hussein, S.; Tucker, J. A.; Vogtherr, M.; Embrey, K. J.; McMiken, H.; Prasad, S.; Gill, A.; Ugarkar, B. G.; Venkatraman, J.; Read, J.; Panda, M., Structure guided lead generation for M. tuberculosis thymidylate kinase (Mtb TMK): discovery of 3-cyanopyridone and 1,6-naphthyridin-2-one as potent inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 753-66.
- 197)** Hashimoto, T.; Kiyoshi, T.; Kohayakawa, H.; Iwamura, Y.; Yoshida, N., Pharmacological properties of AC-3933, a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist. *Neuroscience* **2014**, *256*, 352-359.
- 198)** Singh, B.; Leshner, G. Y.; Pluncket, K. C.; Pagani, E. D.; Bode, D. C.; Bentley, R. G.; Connell, M. J.; Hamel, L. T.; Silver, P. J., Novel cAMP PDE II1 inhibitors: 1,6-naphthyridin-2(1H)-ones. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4856-4865.
- 199)** Liu, Q.; Wang, J.; Kang, S.A.; Thoreen, C. C.; Hur, W.; Ahmed, T.; Sabatini, D.M.; Gray, N. S., Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)-phenyl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1473-1480.
- 200)** Lin, S.; Han, F.; Liu, P.; Tao, J.; Zhong, X.; Liu, X.; Yi, C.; Xu, H., Identification of novel 7-amino-5-methyl-1,6-naphthyridin-2(1H)-one derivatives as potent PI3K/mTOR dual inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 790-793.
- 201)** Sakamoto, T.; Kondo, Y.; Yamanaka, H., Condensed heteroaromatic ring systems. IV. Synthesis of naphthyridine derivatives by cyclisation of aminopyridineacrylic esters. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4764-4768.
- 202)** Hawes, E. W.; Gorecki, D. K. J.; Johnson, D. D., 2,3-Disubstituted 1,6-naphthyridines as potential diuretic agents. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 849-853.
- 203)** Singh, B.; Pennock, P. O.; Leshner, G. Y.; Bacon, E. R.; Page, D. F., An efficient and novel synthesis of fused thiazol-2(3H)-ones. *Heterocycles* **1993**, *36*, 133-144.

## Bibliographie

- 204)** Manske, R. H., The chemistry of quinolines. *Chem. Rev.* **1942**, *30*, 113-144.
- 205)** Bu, X.; Deady, L. W.; Denny, W. A., Synthesis and cytotoxic activity of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl] Carboxamide derivatives of benzofuro[2,3-*b*]quinoline, 6*H*-quinindoline, indeno[2,1-*b*]quinoline and [1]benzothieno[2,3-*b*]quinoline. *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 143-147.
- 206)** Hazeldine, S. T.; Polin, L.; Kushner, J.; White, K.; Corbett, T. H.; Horwitz, J. P., Synthesis and biological evaluation of conformationally constrained analogs of the antitumor agents XK469 and SH80. Part 5. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2462-2467.
- 207)** Jachak, M. N.; Bagul, S. M.; Kazi, M. A.; Toche, R. B., Novel synthetic protocol toward pyrazolo[3,4-*h*]-[1,6]naphthyridines via Friedlander condensation of new 4-aminopyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carbaldehyde with reactive  $\alpha$ -Methylene ketones. *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, *48*, 295-300.
- 208)** Rote, R. V.; Bagul, S. M.; Shelar, D. P.; Patil, S. R.; Raghunath B. Toche, R. B.; Jachak, M. N., Synthesis of Benzo[3,4-*h*][1,6]naphthyridines via Friedländer Condensation with Active Methylens. *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, *48*, 301-307.
- 209)** Atkinson, J. D.; Johnson, M. C., Syntheses of some highly substituted pyridines, 2,7-naphthyridines and 1*H*-pyrimido[4,5,6-*i,j*][2,7]naphthyridines. *J. Chem. Soc. C*, **1968**, 1252-1258.
- 210)** Thompson, A. M.; Rewcastle, G. W.; Boushelle, S. L.; Hartl, B. G.; Kraker, A. J.; Lu, G. H.; Batley, B. L.; Panek, R. L.; Showalter, H. D.; Denny, W. A., Synthesis and structure-activity relationships of 7-substituted 3-(2,6-dichlorophenyl)-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-ones as selective inhibitors of pp60(c-src). *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3134-3147.
- 211)** Singh, B.; Bacon, E. R.; Leshner, G. Y.; Robinson, S.; Pennock, P. O.; Bode, D. C.; Pagani, D. E.; Bentley, R. G.; Connell, M. J.; Hamel, L. T.; Silver, P. J., Novel and potent adenosine 3',5'-cyclic phosphate phosphodiesterase III inhibitors: thiazolo[4,5-*b*][1,6]naphthyridin-2-ones. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2546-2550.
- 212)** Ding, Q.; Xie, Y.; Gray, N. S.; You, S.; Chopiuk, G.; Jiang, J.; Liu, Y.; Steensma, R.; Wang, X.; Sim, T., Compounds and compositions as protein kinase inhibitors. *Brevet*, **2005**, WO 2005034869.
- 213)** Kusuma, B. R.; Peterson, L. B.; Zhao, H.; Vielhauer, G.; Holzbeierlein, J.; Blagg, B. S. J., Targeting the heat shock protein 90 dimer with dimeric inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6234-6253.

## Bibliographie

- 214)** Cowden, W. B.; March, D. R.; Robertson, A.; Jenkins, N., Novel cannabinoid cb2 receptor agonists and uses thereof. *Brevet*, **2005**, WO 2005021547.
- 215)** Anderson, K. W.; Buchwald, S. L., General catalysts for the Suzuki-Miyaura and Sonogashira coupling reactions of aryl chlorides and for the coupling of challenging substrate combinations in water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6173-6177.
- 216)** Elsinghorst, P. W.; Cieslik, J. S.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Gütschow, M., First gallamine-tacrine hybrid: design and characterization at cholinesterases and the M2 muscarinic receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5685-5695.
- 217)** Louie, J.; Hartwig, J. F., Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612.
- 218)** Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L., A simple catalytic method for the conversion of aryl bromides to arylamines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1348-1350.
- 219)** Corbet, J. P.; Mignani, G., Selected patented Cross-coupling reaction technologies. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2651-2710.
- 220)** Dreyer, M.; Hofmeister, A.; Ivashchenko, Y.; Kadereit, D.; Kannt, A.; Loehn, M.; Monecke, P.; Peukert, S.; Plettenburg, O.; Ritter, K.; Ruf, S., Isoquinoline derivatives as inhibitors of rho-kinase. *Brevet*, **2005**, WO 2007000240.
- 221)** Tabarrini, O.; Massari, S.; Sancineto, L.; Daelemans, D.; Sabatini, S.; Manfroni, G.; Cecchetti, V.; Pannecouque, C., Structural investigation of the naphthyridone scaffold: identification of a 1,6-naphthyridone derivative with potent and selective anti-HIV activity. *ChemMedChem.* **2011**, *6*, 1249-1257.
- 222)** Emond, R.; Haraldsson, M.; Henriksson, S.; Nilsson, M.; Savory, E.; Simpson, I., Imidazopyridine compounds. *Brevet*, **2010**, WO 2010064020.
- 223)** Noe, C. R.; Kornilios, S.; Lachmann, B., 7-Chloro-4-methyl-6-nitro-2H-chromen-2-one: a novel type of reagent for fluorescence analysis. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 845-848.
- 224)** Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S., A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with ortho-hydroxyaryl aldehydes or ketones. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1755-1758.

## Bibliographie

- 225) Jones, G., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, **1967**, 15, 204-599.
- 226) Chowdhury S.; Roy, S., The first example of a catalytic Hunsdiecker reaction: synthesis of  $\beta$ -halostyrenes. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 199-200.
- 227) Cross, R. M.; Manetsch, R., Divergent route to access structurally diverse 4-quinolones via mono or sequential cross-couplings. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8654-8657.
- 228) Miyaura, N.; Suzuki, A., Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- 229) Moreno-Manas, M.; Perez, M.; Pleixats, R., Palladium-catalyzed Suzuki-type self-coupling of arylboronic acids. A mechanistic study. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2346-2351.
- 230) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A., A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440.
- 231) Li, J. H.; Liu, W. J., Dabco as an inexpensive and highly efficient ligand for palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2809-2811.
- 232) Darses, S.; Jeffery, T.; Genet, J. P.; Brayer, J. L.; Demoute, J. P., Cross-coupling of arenediazonium tetrafluoroborates with arylboronic acids catalysed by palladium. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3857-3860.
- 233) Molander, G. A.; Biolatto, B., Efficient ligandless palladium-catalyzed Suzuki reactions of potassium aryltrifluoroborates. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1867-1870.
- 234) Wu, B.; Wang, H. L.; Pettus, L.; Wurz, R. P.; Doherty, E. M.; Henkle, B.; McBride, H. J.; Saris, C. J. M.; Min Wong, L.; Plant, M. H.; Sherman, L.; Lee, M. R.; Hsieh, F.; Tasker, A. S., Discovery of pyridazinopyridinones as potent and selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 6398-6411.
- 235) Yin, J.; Buchwald, S. L., Palladium-Catalyzed Intermolecular Coupling of Aryl Halides and Amides. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1101-1104.
- 236) Messaoudi, S.; Audisio, D.; Brion, J. D.; Alami, M., Rapid access to 3-(*N*-substituted)-aminoquinolin-2(1*H*)-ones using palladium-catalyzed C-N bond coupling reaction. *Tetrahedron* **2007**, 63, 10202-10210.

- 237) Bolm, C.; Hildebrand, J. P., Palladium-catalyzed *N*-arylation of sulfoximines with aryl bromides and aryl iodides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 169-175.
- 238) Ali, M. H.; Buchwald, S. L., An improved method for the palladium-catalyzed amination of aryl iodides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2560-2565.
- 239) Smith, J. A.; Jones, R. K.; Booker, G. W.; Pyke, S. M., Sequential and selective buchwald-hartwig amination reactions for the controlled functionalization of 6-bromo-2-chloroquinoline: synthesis of ligands for the tec Src homology 3 domain. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8880-8892.
- 240) Liebeskind, L. S.; Srogl, J., Thiol ester-boronic acid coupling. A mechanistically unprecedented and general ketone synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11260-11261.
- 241) Kusturin, C.; Liebeskind, L. S.; Rahman, H.; Sample, K.; Schweitzer, B.; Srogl, J.; Neumann, W. L., Switchable catalysis: modular synthesis of functionalized pyrimidinones via selective sulfide and halide cross-coupling chemistry. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4349-4352.
- 242) Maingot, L.; Dehbi, O.; Buron, F.; Aadil, M.; Akssira, M.; Routier, S.; Guillaumet, G., Regioselective syntheses of 2,7-(het)arylpyrido[2,3-*d*]pyrimidines by orthogonal cross-coupling strategy. *Synlett* **2012**, *23*, 2449-2452.
- 243) Sanchez, J. P.; Gogliotti, R. D., The synthesis of a series of 7-amino-1-cyclopropyl-8-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,6-naphthyridine-3-carboxylic acids as potential antibacterial agents. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, *30*, 855-859.
- 244) Sabatini, S.; Cecchetti, V.; Tabarrini, O.; Fravolini, A., 8-Methyl-7-substituted-1,6-naphthyridine-3-carboxylic acids as new 6-desfluoroquinolone antibacterials. *J. Heterocyclic Chem.* **1999**, *36*, 953-957.
- 245) Tabarrini, O.; Stevens, M.; Cecchetti, V.; Sabatini, S.; Dell'Uomo, M.; Manfroni, G.; Palumbo, M.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Fravolini, A., Structure modifications of 6-aminoquinolones with potent anti-HIV activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5567-5578.
- 246) Platts, M. Y.; Barber, C. G.; Chiva, J. Y.; Eastwood, R. L.; Fenwick, D. R.; Paradowski, K. A.; Blakemore, D. C., A concise synthesis of HIV integrase inhibitors bearing the dipyrindone acid motif. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 512-514.
- 247) Harrington, P. E.; Croghan, M. D.; Fotsch, C.; Frohn, M.; Lanman, B. A.; Pennington, L. D.; Pickrell, A. J.; Reed, A. B.; Sham, K. K. C.; Tasker, A.; Arnett,

## Bibliographie

- H. A.; Fiorino, M.; Lee, M. R.; McElvain, M.; Morrison, H. G.; Xu, H.; Xu, Y.; Zhang, X.; Wong, M.; Cee, V. J., Optimization of a potent, orally active S1P1 agonist containing a quinolinone core. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 74-78.
- 248)** Hauser, C. R.; Reynolds, G. A., Relative ease of cyclization of 2-, 3-, and 4-aminopyridine derivatives. Synthesis of naphthyridines. *J. Org. Chem.* **1950**, *15*, 1224-1232.
- 249)** Ullmann, F.; Bielecki J., Ueber synthesen in der biphenylreihe. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2174-2185.
- 250)** Goldberg, I., Ueber phenylirungen bei gegenwart von kupfer als katalysator. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 1691.
- 251)** Klapars, A.; Huang, X.; Buchwald, S. L., A general and efficient copper catalyst for the amidation of aryl halides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7421.
- 252)** Audisio, D.; Messaoudi, S.; Peyrat, J. F.; Brion, J. D.; Alami, M., A general copper powder-catalyzed Ullmann-type reaction of 3-halo-4(1*H*)-quinolones with various nitrogen-containing nucleophiles. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4995-5005.
- 253)** Ouali, A.; Spindler, J. F.; Jutand, A.; Taillefer, M., Nitrogen ligands in copper-catalyzed arylation of phenols: Structure/Activity relationships and applications. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1906-1916.
- 254)** Sperotto, E.; Van Klink, G. P. M.; Van Koten, G.; De Vries, J. G., The mechanism of the modified Ullmann reaction. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 10338-10351.
- 255)** Aillerie, A.; Pellegrini, S.; Bousquet, T.; Pélinski, L., In situ generation of ammonia for the copper-catalyzed synthesis of primary aminoquinolines. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 1389-1391.
- 256)** Messaoudi, S.; Brion, J. D.; Alami, M., An expeditious copper-catalyzed access to 3-aminoquinolinones, 3-aminocoumarins and anilines using sodium azide. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1677-1687.
- 257)** Scriven, E. F. V.; Turnbull, K., Azides: their preparation and synthetic uses. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297-368.
- 258)** Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188-5240.

## Bibliographie

- 259)** Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S., Diphenylphosphoryl azide. New convenient reagent for a modified Curtius reaction and for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203-6205.
- 260)** Stern, E.; Muccioli, G. G.; Bosier, B.; Hamtiaux, L.; Millet, R.; Poupaert, J. H.; Hénichart, J. P.; Depreux, P.; Goossens, J. F.; Lambert, D. M., Pharmacomodulations around the 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamides, a class of potent CB2-selective cannabinoid receptor ligands: consequences in receptor affinity and functionality. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5471-5484.
- 261)** Kamal, A.; Thao, L.; Sensintaffar, J.; Zhang, L.; Boehm, M. F.; Fritz, L. C.; Burrows, F. J., A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **2003**, *425*, 407-410.
- 262)** Lecoœur, H.; Gougeon, M. L., *Revue française des laboratoires*, **1999**, *311*, 80-87.
- 263)** <http://lecancer.pagesperso-orange.fr/la%20division%20cellulaire.htm>. Consulté le 29 juillet **2015**.
- 264)** The Cell: a molecular approach, Ed. Sinauer Associates, 2<sup>de</sup> édition, **2000**, 689 pages.
- 265)** Culture de cellules animales, Ed. Lavoisier, 3<sup>e</sup> édition, **2014**, 700 pages.
- 266)** Wang, S. X.; Ju, H. Q.; Liu, K. S.; Zhang, J. X.; Wang, X.; Xiang, Y. F.; Wang, R.; Liu, J. Y.; Liu, Q. Y.; Xia, M.; Xing, G. W.; Liu, Z.; Wang, Y. F., SNX-2112, a novel Hsp90 inhibitor, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1540-1545.
- 267)** Sadikot, T.; Swink, M.; Eskew, J. D.; Brown, D.; Zhao, H.; Kusuma, B. R.; Rajewski, R. A.; Blagg, B. S. J.; Matts, R. L.; Holzbeierlein, J. M.; Vielhauer, G. A., Development of a high-throughput screening cancer cell-based luciferase refolding assay for identifying Hsp90 inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2013**, *11*, 478-488.
- 268)** Montoir, D.; Tonnerre, A.; Duflos, M.; Bazin, M. A., Differential functionalization of 1,6-naphthyridin-2(1H)-ones through sequential one-pot Suzuki-Miyaura cross couplings. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *7*, 1487-1495.
- 269)** Montoir, D.; Tonnerre, A.; Duflos, M.; Bazin, M. A., Efficient one-pot synthesis of 3,7-disubstituted 1,6-naphthyridin-2(1H)-ones through regioselective palladium-catalyzed cross-coupling and SNAr reactions. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3303-3313.

# Thèse de Doctorat

David MONTOIR

## Synthèse de nouveaux analogues de la novobiocine, inhibiteurs potentiels de la Hsp90

### Synthesis of new novobiocin analogues as potent inhibitors of heat-shock protein 90

#### Résumé

La protéine de choc thermique Hsp90 est une protéine ATP-dépendante à activité chaperon jouant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie protéique. Elle va pouvoir réguler la maturation et le repliement dans l'espace de nombreuses « protéines clientes » dont un nombre important est impliqué dans l'oncogénèse. Ainsi, l'inhibition de la Hsp90 représente une voie intéressante pour le développement de nouveaux médicaments anticancéreux.

La novobiocine, un antibiotique de la famille des aminocoumarines, a montré un début d'activité antiprolifératif ( $IC_{50} = 700 \mu\text{M}$  sur SKBr3, lignée cellulaire cancéreuse du sein) en se liant spécifiquement sur la région C-terminale de la Hsp90.

Le travail présenté ici décrit la synthèse de nouveaux analogues de la novobiocine en séries 1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one et 1,6-naphthyridin-4(1*H*)-one. Les composés synthétisés ont été évalués sur des lignées cellulaires cancéreuses mammaires afin de mesurer leur potentiel antiprolifératif puis une étude de binding sur la protéine entière Hsp90 et ses fragments a été réalisée. Les meilleurs candidats ont par la suite fait l'objet d'une analyse Western-Blot afin de mesurer leur capacité à induire une dégradation des protéines clientes de Hsp90.

En parallèle un travail de méthodologie de synthèse mettant en jeu des couplages pallado-catalysés a conduit à l'obtention de 1,6-naphthyridin-2(1*H*)-ones 3,7-disubstituées originales.

#### Mots clés

**Protéine de choc thermique 90 – Inhibiteurs de la Hsp90 – Analogues de la novobiocine – Cancer du sein – 1,6-Naphthyridinones – Couplages pallado-catalysés**

#### Abstract

The 90-kDa Heat shock protein (Hsp90) is an ATP-dependent chaperone known to play a crucial role in protein homeostasis. Hsp90 is directly involved in the conformational stability of « client proteins », many of which are associated with cancer cell survival. Thus, Hsp90 inhibition represents an attractive route for the development of new anticancer drugs.

Novobiocin, an aminocoumarin antibiotic, was reported to inhibit Hsp90 targeting C-terminal domain, and showed anti-proliferative properties ( $IC_{50} = 700 \mu\text{M}$  in SKBr3, breast cancer cell line).

The work presented here describes the synthesis of new analogs of novobiocin derived from 1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one and 1,6-naphthyridin-4(1*H*)-one series. Newly synthesized compounds were evaluated against breast cancer cell lines for their antiproliferative activities and selected regarding their capacity to bind the mammalian Hsp90 and its fragments. The best candidates were subsequently tested by Western blot analysis to measure their ability to induce degradation of Hsp90 client proteins.

In parallel a synthetic methodology involving palladium-catalyzed coupling reactions was developed to produce original 3,7-disubstituted 1,6-naphthyridin-2(1*H*)-ones.

#### Key Words

**Heat shock protein 90 – Hsp90 inhibitors – Novobiocin analogues – Breast cancer – 1,6-Naphthyridinones – Palladium-catalyzed coupling reactions**