

Université de Montréal

Synthèse et évaluation cinétique d'inhibiteurs de la Transglutaminase tissulaire

par

Christophe Pardin

Département de chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en chimie organique

Avril 2007

© Christophe Pardin, 2007



QD

3

U54

2007

v.031

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Synthèse et évaluation cinétique d'inhibiteurs de la Transglutaminase tissulaire

présentée par :
Christophe Pardin

a été évaluée par un jury composé des professeurs suivants :

Prof. Joelle N. Pelletier (F.A.S.-Chimie)	Présidente-rapporteuse
Prof. Jeffrey W. Keillor (F.A.S.-Chimie)	Directeur de recherche
Prof. William D. Lubell (F.A.S.-Chimie)	Co-directeur de recherche
Prof. Andreea R. Schmitzer (F.A.S.-Chimie)	Membre du jury
Prof. David Perrin	Examineur externe
Prof. Joelle N. Pelletier (F.A.S.-Chimie)	Représentante du doyen de la FES

Thèse acceptée le :

Résumé

De nombreuses maladies ou symptômes de maladies apparaissent lors d'un excès ou d'une déficience métabolique de l'organisme. La grande majorité des réactions intervenant dans ces voies métaboliques sont contrôlées par des enzymes. L'inhibition enzymatique est donc une porte d'accès au domaine de la pharmacologie (développement d'inhibiteurs appropriés pour la médication) mais également au domaine mécanistique (meilleure compréhension du métabolisme).

La transglutaminase (TGase) tissulaire est une enzyme dépendante du calcium qui catalyse la réticulation intermoléculaire de certaines protéines en formant un lien γ -glutaminyll- ϵ -lysine. La réaction catalytique se fait entre un résidu glutaminyle d'une protéine ou d'un peptide (donneur de groupement acyle) avec un résidu lysine d'une autre protéine ou peptide ou même avec des amines libres (accepteur de groupement acyle). Elle est impliquée dans différentes réactions biologiques comme l'endocytose, l'apoptose et la régulation du développement des cellules.

Cependant une trop grande activité de la TGase tissulaire peut entraîner des perturbations physiologiques entraînant des maladies comme l'acné, les cataractes, les maladies immunitaires, le psoriasis, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la maladie céliaque.

Des inhibiteurs efficaces et sélectifs de la TGase permettraient une meilleure compréhension des maladies causées par ces enzymes mais également permettrait d'envisager le développement de médicaments potentiels. Dans ce but trois différentes séries d'inhibiteurs ont été synthétisés et testés cinétiquement.

La première série a permis de synthétiser et d'évaluer des inhibiteurs compétitifs réversibles basé sur un squelette *trans*-cinnamique. Ces inhibiteurs ont montré des constantes d'inhibitions variant entre 18 μ M et 74 μ M. Une étude structure/ activité a été ensuite menée pour déterminer quelles étaient les propriétés structurales essentielles à l'inhibition. De cette étude, sont ressorties quelques conclusions :

- 1- la présence d'un oxygène hybridé sp^2 au niveau du substituant sur le cycle aromatique du squelette cinnamique semble important.
- 2- La conjugaison et la rigidité de ces molécules jouent également un rôle.
- 3- La présence d'un accepteur de pont H au niveau du benzotriazole permet de garder l'activité inhibitrice.
- 4- La distance entre les deux cycles aromatiques a également un rôle dans cette inhibition.

La deuxième série d'inhibiteurs regroupe des inhibiteurs irréversibles et compétitifs. Ces huit nouveaux inhibiteurs de TGases ont été préparés à partir d'intermédiaires aminés communs basés sur le squelette Cbz-Phe. L'évaluation cinétique de ces inhibiteurs a permis de mettre en lumière certaines caractéristiques favorables pour l'inhibition comme la présence d'aromaticité, la longueur de la chaîne qui entre dans le site actif et la grosseur de l'électrophile qui piège la cystéine de la triade catalytique.

Pour finir, la dernière série d'inhibiteurs a été synthétisée dans le but de marquer la TGase *in vivo*. Ces marqueurs sont basés sur un inhibiteur qui a été déjà synthétisé dans le groupe du Pr. Keillor, la *N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-lysine, auquel on a ajouté une sonde fluorescente ou une biotine par l'intermédiaire d'un espaceur. Les trois composés, ainsi synthétisés, ont montré un comportement d'inhibiteurs avec une efficacité k_{inact}/K_i d'environ $0.014 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$. L'espaceur a pu être modifié pour rendre les molécules plus solubles (facteur de 5). Des tests préalables avec un des composés semblent montrer que le groupe est sur la bonne voie en ce qui concerne le marquage de la TGase tissulaire *in vivo*.

Mots clés : Enzymes, Inhibition, Transglutaminase, Squelette cinnamique, Marquage.

Summary

Many diseases or symptoms of diseases arise from a deficiency or excess of a specific metabolite in the body. Most metabolic processes are controlled by enzymes. Consequently, the enzyme's inhibition gives access to the pharmacological domain (drug development), and also to the mechanistic domain (mechanistic comprehension).

Tissue transglutaminase (TGase) is a Ca^{2+} -dependent enzyme that catalyzes the intermolecular cross-linking of proteins through the formation of γ -glutamyl- ϵ -lysine side chain bridges. Catalytic activity is exhibited toward the γ -carboxamide moiety of a protein- or peptide-bound glutamine residue which serves as acyl donor to either protein- or peptide-bound lysine residues or free amines that serve as acyl acceptors. Tissue transglutaminase is involved in diverse biological processes: endocytosis, apoptosis, cell growth regulation.

High TGase activities are involved in various disease states such as acne, cataracts, immune system diseases, psoriasis, Alzheimer's disease, Huntington's disease, Celiac disease.

Efficient and selective inhibitors of TGase would give access to a better understanding of these diseases and the development of potential drugs. Herein, three different sorts of inhibitors were synthesized and evaluated.

The first group of inhibitors was a series of novel *trans*-cinnamoyl derivatives that were prepared and found to be potent inhibitors of TGase. These inhibitors displayed reversible inhibition and were competitive with acyl donor TGase substrates at IC_{50} values between 18 μM and 74 μM . A structure-activity relationship study for TGase inhibition by the *trans*-cinnamoyl derivatives was focused on different parts of these compounds to determine the important moieties. We discovered:

- 1- the most potent TGase inhibitors bear a substituent with a *sp*²-hybridized oxygen.
- 2- extended conjugation of the amide and conformational restriction may be important for reversible inhibitory activity.
- 3- the presence of a H-bond acceptor and the aromaticity of the acylated moiety were essential for the inhibition
- 4- the distance between the two aromatic parts is important.

Then a series of eight novel compounds as irreversible inhibitors of TGase was synthesized and evaluated. These compounds were based on a minimal peptidic scaffold Cbz-Phe and bear electrophilic groups such as α,β -unsaturated amide, chloroacetamide or maleimide. The affinity conferred by the Cbz-Phe scaffold was determined by comparison to *N*-propylacrylamide and the length of the spacer was also varied to evaluate its importance.

Finally, a series of three labelling inhibitors was synthesized and evaluated. These compounds were obtained by fixing an inhibitor developed in the Keillor laboratory, *N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-lysine, to a fluorescent probe or biotin moiety via a spacer. The inhibitory efficiencies ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$) of these compounds vary up to $0.014 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ and a PEG spacer showed a better solubility. Preliminary *in vivo* tests with one of the labelling inhibitors are encouraging.

Key words : Enzymes, Inhibition, Transglutaminase, *trans*-Cinammoyl derivatives, labelling inhibitors.

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des schémas	xiii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations et des sigles	xv
Remerciements.....	xx
Dédicace.....	xxi
CHAPITRE 1 : Introduction	1
1.1. Les enzymes, protéines d'intérêt pour le développement de médicaments.....	2
1.1.1. Maladies et inhibition.....	2
1.1.2. Inhibiteurs réversibles et irréversibles	3
1.1.3. Marquage.....	5
1.1.4. Évolution des inhibiteurs	8
1.2. La transglutaminase, enzyme d'intérêt	10
1.2.1. Rôle de la TGase	10
1.2.2. Les transglutaminases tissulaires	13
1.2.3. Structure de la transglutaminase tissulaire	14
1.2.4. Pertinence de la transglutaminase du foie de cobaye.....	15
1.2.5. Inhibiteurs des Transglutaminases tissulaires	16
1.3. Nouveaux inhibiteurs de la transglutaminase tissulaire.....	20
1.3.1. Inhibiteurs réversibles	20
1.3.2. Inhibiteurs irréversibles.....	21
1.3.3. Marquage.....	23
1.3.4. Méthodes cinétiques pour déterminer les constantes d'inhibitions	24
1.3.5. Conclusion	25

CHAPITRE 2 : Inhibiteurs compétitifs et réversibles.....	26
2.1. Introduction	27
2.2. Synthèse	34
2.2.1. Les amides benzotriazolyl cinnamoyles.....	34
2.2.2. Azachalcones.....	37
2.2.3. Autres dérivés.....	37
2.3. Études cinétiques	40
2.4. Étude structure/activité.....	42
2.4.1. Importance du substituant sur le cycle aromatique cinnamique	42
2.4.2. Importance de la double liaison du cinnamate	46
2.4.3. Importance du benzotriazole	47
2.4.4. Distance entre les deux parties aromatiques	54
2.5. Localisation de l'inhibition au niveau de l'enzyme	56
2.6. Spécificité.....	60
2.7. Conclusion	60
CHAPITRE 3 : Inhibiteurs compétitifs et irréversibles.....	62
3.1. Introduction	63
3.2. Synthèse	65
3.3. Cinétique.....	68
3.4. Évaluation du pouvoir inhibiteur	69
3.4.1. Les dérivés amides α,β -insaturés	69
3.4.2. Les dérivés chloroacétamides	72
3.4.3. Le dérivé maléimide.....	72
3.4.4. Spécificité.....	73
3.5. Conclusion	74

CHAPITRE 4 : Inhibiteurs-marqueurs	75
4.1 Introduction	76
4.2. Synthèse	78
4.3. Cinétique.....	81
4.4. Évaluation de la capacité d'inhibition	81
4.5. Marquage covalent	83
4.6. Résultats préliminaires <i>in vivo</i>	85
4.7. Conclusion	86
CHAPITRE 5 : Conclusion.....	88
CHAPITRE 6 Partie expérimentale	93
6.1. Synthèse et cinétiques.....	94
6.1.1. Synthèse	94
6.1.2. Cinétiques.....	95
6.2. Partie expérimentale du Chapitre 2.....	98
6.2.1. Cinétiques.....	98
6.2.2. Synthèse	99
6.2.2.1. Réactifs et solvants.....	99
6.2.2.2. Protocoles généraux	100
Préparation des composés du chapitre 2	102
6.3. Partie expérimentale du Chapitre 3.....	160
6.3.1. Réactivité vis-à-vis du glutathion.....	160
6.3.2. Synthèse	160
6.3.2.1. Réactifs et solvants.....	160
6.3.2.2. Protocoles généraux	161
Préparation des composés du chapitre 3	162
6.4. Partie expérimentale du Chapitre 4.....	177
6.4.1. SDS-PAGE.....	177
6.4.2. Synthèse	178

Préparation des composés du chapitre 4	179
Références.....	197

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure cristalline obtenue par rayons X de la transglutaminase ⁸⁴	15
Figure 1.2 : Structures d'inhibiteurs présentées dans la littérature.	17
Figure 1.3 : Structure d'inhibiteurs dérivés 1,2,4-thiadiazole, amides α,β insaturés et époxydes.....	18
Figure 1.4 : Structure de l'inhibiteur-parent 2.14a	21
Figure 1.5 : Structures des marqueurs étudiés.	23
Figure 2.1 : Structures d'inhibiteurs de la TGase.	27
Figure 2.2 : Structures d'inhibiteurs spécifiques de la TGase.	28
Figure 2.3 : Structure de l'ester 2.14a' et de l'amide 2.14a	30
Figure 2.4 : Structure cristalline de l'amide 2.14a avec le TFA.	31
Figure 2.5 : Structure générale et numérotation des dérivés <i>trans</i> -cinnamoyles synthétisés.	32
Figure 2.6 : Structures de différents inhibiteurs basés sur le groupement cinnamoylé.	33
Figure 2.7 : Inhibition compétitive de la TGase tissulaire par l'amide cinnamoylé 2.14a	41
Figure 2.8 : Importance du substituant de l'aromatique du cinnamoylé.	45
Figure 2.9 : Influence de la double liaison.	46
Figure 2.10 : Importance de la double liaison.	47
Figure 2.11 : Importance de la partie benzotriazole.	50
Figure 2.12 : Importance de l'aromaticité et d'un accepteur de pont hydrogène pour le groupement acylé.	52
Figure 2.13 : Importance du benzotriazole.	53
Figure 2.14 : Importance de la distance entre les deux parties aromatiques.	54
Figure 2.15 : Importance de la distance entre les deux parties aromatiques.	54
Figure 2.16 : Amide 2.15a apposé sur le sillon menant au site actif de la TGase.	57
Figure 2.17 : Structures du GTP, de l'acylhydrazide 2.8a et de l'amide 2.14a	58
Figure 2.18 : Marqueurs analogue des inhibiteurs étudiés.	59

Figure 2.19 : Parties importantes pour l'inhibition.	61
Figure 3.1 : Structures des inhibiteurs synthétisés et testés.	64
Figure 3.2 : Analogues α,β -insaturés étudiés dans le groupe du Pr. Keillor.	70
Figure 3.3 : relation entre l'efficacité et la longueur de l'espaceur.	71
Figure 4.1 : développement de marqueurs.	77
Figure 4.2 : Gel SDS-PAGE (acrylamide 18 %) de l'incubation de la TGase avec le marqueur fluorescent 4.9	84
Figure 4.3 : Évaluation du comportement du marqueur 4.12 <i>in vivo</i>	86

Liste des schémas

Schéma 1.1 : Marquage de protéine à l'aide d'un fluorophore biarsénique.	7
Schéma 1.2 : Marquage de protéine avec des dérivés maléimides.	8
Schéma 1.3 : Réaction catalytique de la transglutaminase.....	11
Schéma 1.4 : Cycle catalytique de la transglutaminase.	12
Schéma 1.5 : Structure des inhibiteurs irréversibles étudiés.....	22
Schéma 1.6 : Réaction suivie par spectrométrie.	24
Schéma 1.7 : Réaction suivie par fluorimétrie.	25
Schéma 2.1 : Synthèse des dérivés benzotriazolyle et oxybenzotriazolyle amide.....	35
Schéma 2.2 : Synthèse des dérivés benzotriazoles avec un groupement amidé.	36
Schéma 2.3 : Synthèse des azachalcones.	37
Schéma 2.4 : Synthèse des amides 2.18a , 2.21a-2.27a et des esters 2.19a-2.20a à partir de l'acide <i>p</i> -nitrocinnamique.....	38
Schéma 2.5 : Synthèse du 3-((<i>E</i>)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-2H-chromèn-2-one (2.28a).	39
Schéma 2.6 : Synthèse de (<i>2E,4E</i>)-5-(4-nitrophényl)penta-2,4-diénoyl benzotriazolyl amide (2.37a) et (<i>2E,4E</i>)-5-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)penta-2,4-dièn-1-one (2.38a).	40
Schéma 2.7 : Nouvelle série d'inhibiteurs obtenue par la cycloaddition 1,3-dipolaire.....	61
Schéma 3.1 : Synthèse des intermédiaires aminés.	65
Schéma 3.3 : Synthèse des dérivés chloroacétamides.....	66
Schéma 3.4 : Synthèse du dérivé maléimide.....	67
Schéma 3.5 : Mécanisme de l'inhibition irréversible.....	68
Schéma 4.1 : Synthèse des marqueurs.	79
Schéma 6.1 : Mécanisme de l'inhibition compétitive.....	95

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Activité des dérivés thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazyde sur la TGase tissulaire.	19
Tableau 2.1 : Activité de dérivés thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide sur la TGase tissulaire.	29
Tableau 2.2 : Influence du groupement sur l'aromatique cinnamoyle des dérivés benzotriazolyles.....	43
Tableau 2.3 : Influence du groupement sur l'aromatique cinnamoyle des dérivés oxybenzotriazolyles.....	44
Tableau 2.4 : Influence de la partie acylée.	48
Tableau 2.5 : Influence du groupement sur l'aromatique cinnamoyle dans les azachalcones.....	52
Tableau 2.6 : Distances entre les deux aromatiques pour les composés 2.15a , 2.30a , 2.37a et 2.38a	55
Tableau 3.1 : Paramètres cinétiques pour les inhibiteurs amidés α,β -insaturés 3.4a-3.4d	69
Tableau 3.2 : Paramètres cinétiques pour les inhibiteurs chloroacétamides 3.5a-3.5c	72
Tableau 4.1 : Paramètres cinétiques pour les marqueurs (4.9 , 4.12 et 4.15) et l'acrylamide 4.1	82

Liste des abréviations et des sigles

AcOEt	Acétate d'éthyle
Asp	Asparagine
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyl
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonate
Cbz ou Z	Benzyloxycarbonyle
Cbz-Gln-Gly	<i>N</i> - α -Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine
Cbz-Lys-Gly	<i>N</i> - α -Benzyloxycarbonyl-L-lysinyglycine
Cbz-Phe	<i>N</i> - α -Benzyloxycarbonyl-L-phénylalanine
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
Cys	Cystéine
d	Doublet
DDT	DL-Dithiothreitol
déc.	Décomposition
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIEA	Disopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
E	Enzyme
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
éq.	Équivalent
ES	Complexe Michaelis : complexe enzyme-substrat
Et	Éthyl

Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyl
FmocCl	Chlorure 9-fluorénylméthoxycarbonyl
g	Gramme
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GDH	Glutamate déhydrogenase
GFP	Protéine fluorescente verte
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidase
Gln	Glutamine
GP	Groupe protecteur
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heure
HEPES	Acide <i>N</i> -2-hydroxyéthylpipérazine- <i>N'</i> -2-éthanesulfonique
His	Histidine
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer de moitié la vitesse réactionnelle de 50% de sa valeur initiale non-inhibée
<i>J</i>	Constante de couplage
kDa	Kilodalton (1000g/mol)
KHMDS	Bis(triméthylsilyl)amide de potassium
K _I	Constante d'inhibition
k _{inact}	Constante de vitesse d'inactivation
K _M ^{app}	Constante de Michaelis-Menten apparent
L	Litre

Leu	Leucine
M	Molaire (mol/L)
m	Multiplet
Me	Méthyl
min	Minute
mL	Millilitre
mol	Mole
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonique
β -NADH	β -Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NTA	Nitriolotriacétate
p.f.	Point de fusion
PEG	Polyéthylèneglycol
Phe	Phénylalanine
pNA	<i>p</i> -Nitroaniline
ppm	Partie par million
Pro	Proline
q	Quadruplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SMHR	Spectre de masse haute résolution
t	Triplet
t.a.	Température ambiante
TBTU	<i>O</i> -Benzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium tétrafluoroborate

TFA	Acide trifluoroacétique
TGase	Transglutaminase
THF	Tetrahydrofurane
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV-vis	Ultraviolet-visible
V_{\max}	Vitesse maximale

" Qui vit sans folie, n'est pas si sage qu'il croit " (La Rochefoucauld)

Remerciements

Mon projet a été sous le signe d'une collaboration entre deux hommes formidables que sont le Pr. Keillor et le Pr. Lubell. De cette collaboration, j'ai pu énormément apprendre et évoluer tout le long de ces quatre années. Grâce à eux, mon doctorat a été une expérience enrichissante et très fructueuse. Je remercie donc ces deux professeurs pour avoir si bien partagé leur savoir et pour leur disponibilité.

Un remerciement au département de chimie qui a mis à ma disposition tous les services et appareillages essentiels pour mener à bien ce projet.

Je voudrai remercier également les membres du groupe du Pr. Keillor et du Pr. Lubell que j'ai côtoyés tout le long de ces quatre années pour leur aide, leur disponibilité et l'ambiance chaleureuse. Un gros merci plus particulièrement à Steve avec qui les colonnes étaient beaucoup moins "plates", Roselyne avec qui j'ai aimé discuter de tout et de rien après de longues journées de travail et Carine que j'ai appris à connaître et à apprécier durant ma dernière année de doc. (comme quoi l'huile et l'eau peuvent se mélanger chez les humains)

Je remercie également les membres du groupe du Pr. Pelletier et du Pr. Schmitzer qui ont été en quelque sorte mon 3^e groupe de recherche.

De façon plus personnelle, je tiens à remercier mes parents pour leur support tant moral que financier et je ne serais jamais arrivé à Montréal sans leur soutien. Un clin d'œil à mes trois grands amis, Sam, Fab et Stéphan (bientôt papa) qui m'ont permis de m'évader régulièrement des sciences en me faisant partager tout un tas de conneries comme les bons amis savent le faire.

Et pour finir, un gros gros merci à Tammy, que j'ai retrouvée après deux ans de disparition, pour sa grande gentillesse, son grand côté maternel et qui a été un support important au début de mon doc, Marie-LN pour la complémentarité qu'elle m'a apportée et enfin à ma bonne étoile qui m'a permis de vivre tous ces bons moments.

À Marie-LN et Tammy, mes deux québécoises préférées.

CHAPITRE 1
Introduction

1.1. Les enzymes, protéines d'intérêt pour le développement de médicaments

1.1.1. Maladies et inhibition

De nombreuses maladies ou symptômes de maladies apparaissent lors d'un excès ou d'une déficience métabolique de l'organisme. Si le dysfonctionnement de ces voies métaboliques peut être régulé, les maladies qu'il entraîne peuvent être traitées. Par conséquent, il apparaît nécessaire, afin de pouvoir réguler efficacement ces dérèglements physiologiques, de caractériser précisément quels sont les intermédiaires impliqués dans les étapes-clefs de la bio-synthèse. En effet, une compréhension de ces différents processus biologiques devrait permettre l'élaboration de méthodes thérapeutiques efficaces et la conception de médicaments appropriés. La grande majorité des réactions intervenant dans les voies métaboliques sont contrôlées par des enzymes. Ces protéines présentent une spécificité de réaction et une sélectivité envers le substrat et constituent de ce fait une cible thérapeutique pour le développement rationnel de médicaments. Nombre de médicaments sont donc des inhibiteurs ou inactivateurs d'enzymes. Ces inhibiteurs peuvent être utilisés de deux manières pour obtenir le résultat voulu :

(i) soit l'inhibition permet d'augmenter le taux de substrat en évitant la dégradation de ce dernier. Par exemple en inhibant la GABA aminotransférase, enzyme qui dégrade l'acide γ -aminobutyrique (GABA), on permet le maintien d'une certaine quantité d'acide γ -aminobutyrique dans le cerveau ce qui permet ainsi de préserver l'organisme de certaines crises notamment l'épilepsie entraînées par la diminution de ce substrat;¹

(ii) soit elle permet de diminuer le taux de produit formé en bloquant la réaction enzymatique. Par exemple l'excès d'acide urique dans l'organisme peut entraîner une maladie appelée la goutte. Par conséquent, l'inhibition de la xanthine oxydase, enzyme qui catalyse la transformation de la xanthine en acide urique, permet de diminuer la quantité d'acide urique formé ce qui aurait un effet de diminuer les symptômes liés à la goutte.^{1,2}

Dans le cadre du développement de tels inhibiteurs, il est courant de partir d'une structure proche de celle du substrat de l'enzyme d'intérêt, ce qui permet l'obtention rapide de nombreux composés potentiellement susceptibles de conduire à un médicament. Mais parmi ces nombreux composés, peu atteindront le stade effectif de médicament, puisqu'en plus de bloquer une réaction enzymatique, ces inhibiteurs doivent répondre à plusieurs autres critères^{3, 4} comme (i) la spécificité, pour ne pas perturber d'autres processus métaboliques dans les doses thérapeutiques (notamment des effets secondaires négligeables), (ii) les caractéristiques pharmacocinétiques (absorption, pénétration au niveau du site actif, durée d'action, dose thérapeutique) et (iii) le profil toxicologique (dose létale, effets secondaires) qui doit être acceptable. Ce sont tous ces critères qui fixent le choix des modifications chimiques que l'on pourra apporter aux inhibiteurs afin de pouvoir passer toutes les étapes du développement d'un médicament.

1.1.2. Inhibiteurs réversibles et irréversibles

Historiquement, les inhibiteurs d'enzymes ont été trouvés par criblages ou par analogies avec des éléments de la voie catalytique. Ces inhibiteurs peuvent être classés en deux catégories, les inhibiteurs réversibles et les inhibiteurs irréversibles.

La plupart des principes actifs induisant une inhibition enzymatique sont des inhibiteurs réversibles et agissent essentiellement comme compétiteur au site actif. On peut citer les agents antibactériens de type sulfonamide,⁵⁻⁸ les médicaments contre le cholestérol,⁹⁻¹² les médicaments contre l'hypertension.¹³ En effet, ces inhibiteurs interagissent avec le site actif de l'enzyme à la place du substrat natif de celle-ci, empêchant de ce fait la réaction enzymatique d'avoir lieu. L'inhibiteur réversible peut également être un pseudo-substrat qui conduit à la formation d'un produit inerte qui permet d'occuper l'enzyme dans une réaction infertile. Mais ce type d'inhibition est très peu développé car le produit est rarement totalement inerte et peut même se révéler toxique. Les inhibiteurs réversibles ne sont pas obligés de se lier spécifiquement au niveau du site actif de l'enzyme mais peuvent se fixer ailleurs sur l'enzyme en

provoquant un changement conformationnel qui empêche l'enzyme de réaliser son rôle de catalyseur. Un des avantages du caractère réversible des inhibiteurs est de pouvoir diminuer l'activité d'une enzyme ciblée sans la tuer complètement. Ainsi ces enzymes bien que moins actives peuvent toujours jouer leur rôle physiologique important pour le bon fonctionnement de l'organisme. L'aspect négatif du caractère réversible réside dans la dépendance de l'efficacité vis-à-vis d'une certaine concentration dans l'organisme. Cette concentration doit être maintenue constante¹⁴ pour garder la majorité de l'enzyme sous la forme d'un complexe de type Michaelis avec l'inhibiteur, obligeant le patient à prendre ce traitement plusieurs fois par jour. Pour minimiser cette contrainte le développement d'inhibiteurs réversibles avec de faibles constantes d'inhibition est important.

Pour se libérer complètement de cette contrainte, des inhibiteurs irréversibles sont de plus en plus développés. Dans le cas de ces inhibiteurs, le maintien d'une certaine concentration n'est pas utile puisque l'inhibition est en général réalisée via la formation d'une liaison covalente entre l'inhibiteur et l'enzyme.¹⁵ Ce dernier se trouve donc piégé dans une forme inapte à catalyser sa réaction. Les inhibiteurs irréversibles utilisés en médication sont soit développés pour agir directement au niveau du site actif (aspirine, pénicilline),¹⁶ soit sont inactifs jusqu'à ce que l'enzyme les transforme en espèces actives (pro-drogues¹⁷). Ce dernier type d'inhibiteur est encore appelé inhibiteur suicide et présente l'avantage de réduire significativement le risque de réactions secondaires avec d'autres substances biologiques, contrairement aux inhibiteurs agissant directement sur le site actif de l'enzyme possédant souvent un groupement permettant l'alkylation ou l'acylation du site actif et qui sont donc susceptible d'attaquer de façon non sélective. Les pro-drogues étant moins faciles à développer que les inhibiteurs agissant directement sur le site actif, les effets secondaires pouvant être entraînés par ces derniers doivent être minimisés en développant des inhibiteurs permettant une meilleure reconnaissance de l'enzyme ciblée vis-à-vis de sa structure (une constante d'inhibition le plus faible possible).¹⁸ Cette recherche de grande spécificité peut également être mise à profit au niveau d'un autre domaine que le domaine thérapeutique. En effet, les inhibiteurs irréversibles peuvent être utilisés pour une meilleure compréhension du

mécanisme enzymatique *in vitro* mais surtout *in vivo*.¹⁹ À ce moment, ces inhibiteurs sont modifiés de façon à pouvoir suivre leur cheminement dans la cellule et ainsi voir comment agit l'enzyme ciblée dans l'organisme. Une des modifications largement utilisée pour ce type de marquage, est l'ajout d'une sonde fluorescente à l'inhibiteur.

1.1.3. Marquage

Le marquage des protéines avec des fluorophores, des marqueurs d'affinité ou des espèces chimiquement ou optiquement actives est une méthode largement utilisée pour étudier le rôle de ces protéines dans les cellules vivantes ou dans les tissus. La découverte de la distribution, la dynamique et l'environnement chimique des protéines à l'intérieur des cellules vivantes permet de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires du fonctionnement cellulaire. Ces marquages, que ce soit par fluorescence ou par affinité, ont facilité les études *in vitro* des structures protéiques, des dynamismes moléculaires et des interactions protéine-protéine.²⁰ Mais les méthodes utilisées *in vitro* sont souvent inadaptées *in vivo* car de nombreux autres paramètres rentrent en jeu comme la perméabilité de la cellule vis-à-vis du marqueur, la stabilité et la spécificité de la sonde. Malgré tout, des méthodes efficaces ont été développées pour le marquage *in vivo*.

La méthode la plus utilisée est le marquage des protéines à l'aide de la protéine fluorescente verte (GFP) ou d'un de ses dérivés.^{21, 22} La GFP, protéine de 238 acides aminés, peut être greffée à l'extrémité d'une protéine d'intérêt par biologie moléculaire de façon à former une chimère fluorescente *in situ*.²³⁻²⁵ Elle est exprimée à une extrémité de la protéine d'intérêt et suite à son repliement, une fluorescence est visualisable. Cette technique permet de révéler et de suivre l'évolution d'une protéine dans une cellule, ce qui constitue un outil très puissant et largement répandu en biochimie. Le désavantage de cette technique est que la GFP est relativement volumineuse^{21, 26} (11 brins β , 27 kDa) et que son repliement est lent, ce qui peut, dans certains cas, perturber l'environnement de la protéine et modifier sa fonction (structure tridimensionnelle), sa localisation

subcellulaire ainsi que sa stabilité (demi-vie).^{21, 26} Ainsi la présence de faux négatifs est observable.^{21, 27} Par conséquent, il s'est révélé fondamental de développer des marqueurs fluorescents plus petits. Généralement, l'activité de ces composés est basée sur une interaction de type "récepteur-ligand", impliquant que d'une part, ces marqueurs puissent entrer dans la cellule, et d'autre part, se diriger vers la protéine cible, tout en minimisant le risque de réactions secondaires. C'est pour cela que le succès de cette stratégie repose sur l'identification et le développement d'un "récepteur" qui serait spécifique d'un fluorogène donné et qui n'interfererait pas avec d'autres molécules biologiques. Idéalement, ce "récepteur", lui aussi de petite taille, serait greffé à la cible de façon génétique. Ce type de marquage requiert donc le développement de marqueur non-toxique et présentant une perméabilité membranaire acceptable.

La grande majorité des marquages protéiques de façon chimique *in vivo* se base sur une interaction spécifique, de grande affinité, covalente ou non, entre un ligand synthétique et son récepteur correspondant. Le tandem ligand-récepteur peut être une haptène avec un anticorps,²⁸ la biotine avec l'avidine,²⁹ un inhibiteur avec une enzyme,³⁰ le nitrilotriacétate (NTA) avec une séquence d'oligohistidines³¹ et des fluorophores biarséniques avec une séquence riche en cystéines.^{26, 32-35} Les anticorps et l'avidine sont peu utilisés en général pour le marquage intracellulaire car pour les anticorps le milieu influe beaucoup sur leurs expressions et pour l'avidine, sa grosseur (~ 63 kDa) pourrait interférer avec la protéine que l'on voudrait marquer. Le modèle typique pour illustrer le marquage grâce au système ligand-récepteur *in vivo* est le marquage par un ligand biarsénique-séquence tétracystéinique développé par le groupe du Pr. Tsien.^{26, 32-35} Ce marquage se base sur l'affinité entre un court peptide contenant 4 cystéines (CysCysXXCysCys où X est tout acide aminé sauf une cystéine) est un composé biarsénique comme le 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescéine (FlAsH) (**Schéma 1.1**)

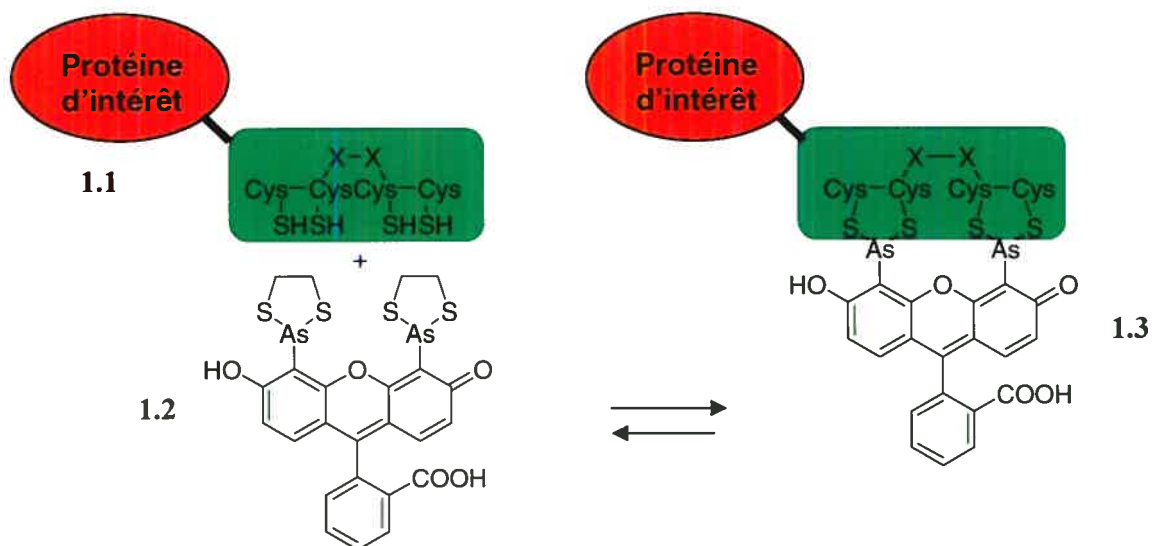


Schéma 1.1 : Marquage de protéine à l'aide d'un fluorophore biarsénique.

Dernièrement dans le laboratoire du Pr. Keillor un même type de marquage a été développé se basant sur le tandem molécule fluorogène-cystéines.³⁶ (**Schéma 1.2**) La molécule fluorogène **1.5** contient deux groupes maléimides attachés directement sur la partie fluorophore et permettant ainsi de diminuer la fluorescence du cœur par un système de transfert d'électrons. De plus, ces fluorogènes réagissent rapidement en présence de deux équivalents de thiol ou d'un équivalent de dithiol. Les espèces dithiolées ainsi formées montrent une plus grande fluorescence que le fluorogène parent. Des tests avec une protéine recombinante hélicoïdale contenant deux cystéines à une distance préalablement choisie et correspondant à la distance des 2 maléimides ont été réalisés et ont montré un marquage de la protéine par le fluorogène et ainsi la faisabilité de la méthode. Des tests sont en cours pour montrer la faisabilité de la méthode dans des cellules bactériennes et mammifères.

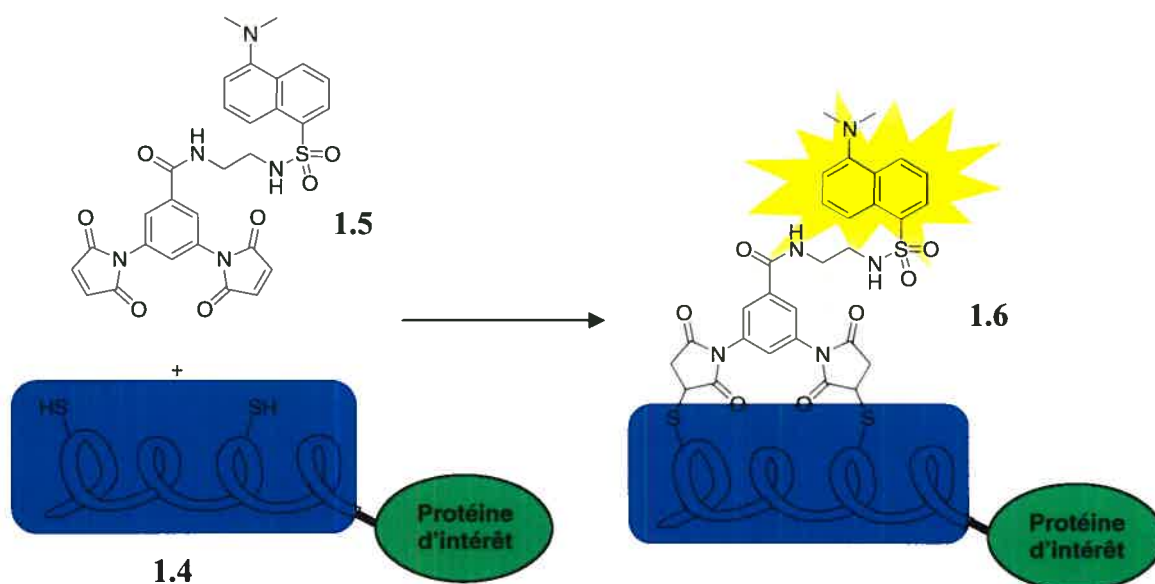


Schéma 1.2 : Marquage de protéine avec des dérivés maléimides.

Dans le cas où le marquage est basé sur un tandem enzyme-inhibiteur, la conception s'en trouve simplifiée. En effet, contrairement aux deux exemples cités ci-dessus qui font appel au développement d'un récepteur (courte séquence peptidique spécifique) lié à la protéine d'intérêt et demandant un travail supplémentaire au niveau du design, une enzyme est déjà un très bon récepteur en elle-même et sa grande spécificité vis-à-vis de son substrat permet de développer rapidement des marqueurs qui seraient simplement des analogues de ce substrat. Ces analogues sont souvent des inhibiteurs irréversibles auxquels seraient liés une sonde.³⁰

1.1.4. Évolution des inhibiteurs

Pour une meilleure spécificité, les inhibiteurs, qu'ils soient réversibles ou irréversibles, sont en général compétitifs car leur développement est souvent basé sur les substrats ou les produits de la réaction de l'enzyme dont ils inhibent l'activité.^{18, 37} Les inhibiteurs non-compétitifs ou incompétitifs ne sont pas communs mais ils commencent à faire leur apparition dans l'étude de médicaments potentiels.³⁸ Cette

catégorie d'inhibiteurs ne se découvre malheureusement que par criblage car il est difficile de rationaliser ces modes d'inhibitions.

Le développement industriel d'un médicament prend entre 10 et 15 ans, il est donc rare de trouver un inhibiteur enzymatique qui répond à tous les critères (absorption, distribution, métabolisme, excrétion, cytotoxicité, diffusion) du premier coup. Dans la majorité des cas, une molécule montrant une certaine activité inhibitrice pour une enzyme est trouvée soit en s'appuyant sur le mécanisme de la réaction enzymatique et en synthétisant des analogues de l'état de transition,³⁹⁻⁴¹ soit par hasard, par l'intermédiaire des effets secondaires (action sur une enzyme autre que celle qu'on semblait cibler). De cette molécule de base, différentes études sont menées pour l'améliorer afin de répondre à tous les critères qui permettront de l'utiliser en tant que médicament. Quelque soit la manière dont ces inhibiteurs ont été découverts, ces molécules ne sont que des précurseurs qui doivent être améliorées. Intervient à ce moment une étude structure/activité qui aura pour but de (i) découvrir les parties essentielles à l'inhibition, (ii) améliorer l'inhibition (K_i et k_{inact}) et les caractéristiques pharmacocinétiques. L'amélioration des inhibiteurs peut passer par différentes modifications agissant à différents niveaux. On peut penser aux isostères, aux groupements permettant d'augmenter la solubilité ou l'hydrophobie (un équilibre hydrophile/hydrophobe étant important *in vivo*), aux groupements permettant d'augmenter l'acidité ou la basicité.⁴²

La modélisation moléculaire constitue un outil de plus en plus utilisé dans le "design" rationnel d'inhibiteurs.⁴³ Cette technique exige cependant une connaissance préalable de la structure de l'enzyme d'intérêt ou au moins de disposer de celle d'une enzyme ayant une bonne homologie structurale avec elle. Cette structure peut être obtenue par cristallographie, par RMN ou par modèle homologique et permet d'extrapoler l'influence de certaines modifications sur la structure 3D de la protéine. La modélisation peut également mettre en évidence certaines interactions importantes pour la reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme.

1.2. La transglutaminase, enzyme d'intérêt

L'inhibition enzymatique est donc une porte d'accès au domaine de la pharmacologie (développement d'inhibiteurs appropriés pour la médication) mais également au domaine mécanistique (meilleure compréhension du métabolisme). Les groupes du Pr. Keillor et du Pr. Lubell se sont rapidement intéressés à la conception d'inhibiteurs d'enzymes ou de récepteurs protéiques mais également des mimiques peptidiques (tours β) ou pseudo-peptides afin de mieux comprendre les mécanismes biochimiques mis en jeu et de pouvoir potentiellement développer de nouveaux outils thérapeutiques. Leurs travaux portent notamment sur des enzymes comme la transglutaminase (TGase) et la gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) (groupe du Pr. Keillor) mais également sur des récepteurs protéiques membranaires tel que les récepteurs couplés aux protéines G (groupe du Pr. Lubell).⁴⁴ Parmi toutes ces protéines d'intérêt, la TGase semblait être une bonne candidate pour le développement de nouveaux inhibiteurs. En effet, malgré les nombreuses études lui ayant été consacrées, beaucoup de détails sur son mécanisme, notamment en milieu biologique, restent à élucider (utilisation des inhibiteurs pour une étude mécanistique). En outre, elle joue également un rôle plus ou moins important dans certaines maladies comme l'acné,^{45, 46} la maladie céliaque,⁴⁷ la maladie d'Huntington^{48, 49} ou la maladie d'Alzheimer⁵⁰⁻⁵⁶ (utilisation d'inhibiteurs comme médicament potentiel).

1.2.1. Rôle de la TGase

Les TGases sont des enzymes dépendantes du calcium qui catalysent la réticulation intermoléculaire de certaines protéines en formant un lien γ -glutaminyll- ϵ -lysine. La réaction catalytique se fait entre un résidu glutamine d'une protéine ou d'un peptide (donneur de groupement acyle) avec un résidu lysine⁵⁷ d'une autre protéine ou peptide ou même avec des amines libres (accepteur de groupement acyle). (**schéma 1.3**)

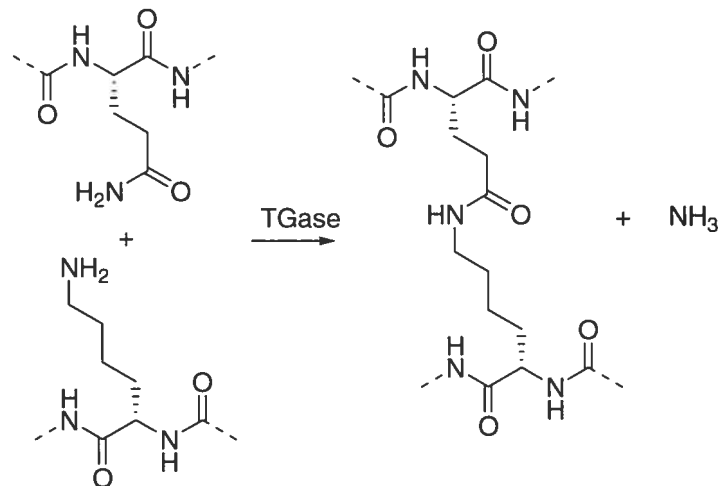


Schéma 1.3 : Réaction catalytique de la transglutaminase.

Le mécanisme d'action de la transglutaminase généralement proposé dans la littérature⁵⁸ et soutenu par le groupe du Pr. Keillor, est un mécanisme de type ping-pong modifié. Dans ce mécanisme, un substrat donneur de groupement acyle (glutamine) se complexent d'abord réversiblement à l'enzyme pour ensuite former un intermédiaire de type acyle-enzyme. Celui-ci peut par la suite se complexer à un deuxième substrat accepteur de groupement acyle (lysine) et réagir pour régénérer l'enzyme libre et former le nouveau lien ϵ -(γ -glutamyl)lysine. Il s'agit donc d'un mécanisme en deux étapes distinctes: l'acylation et la désacylation. L'appellation "modifié" vient du fait que si aucun substrat accepteur n'est présent, l'eau présente dans le milieu peut hydrolyser l'acyle-enzyme pour régénérer l'enzyme libre et former le dérivé acide du donneur d'acyle. (**schéma 1.4**)

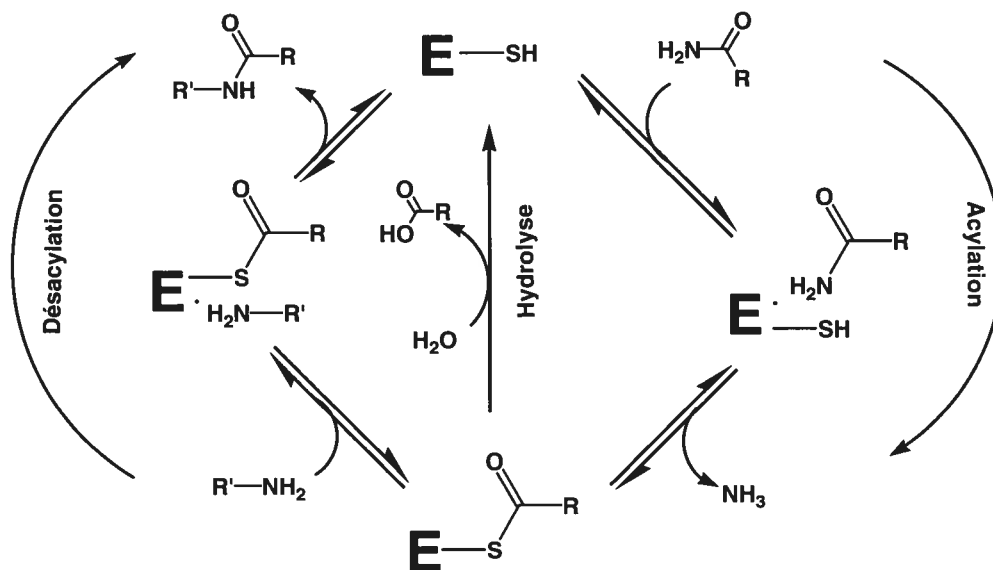


Schéma 1.4 : Cycle catalytique de la transglutaminase.

Chez les mammifères, il existe essentiellement 3 types de TGase, (i) tissulaire,⁵⁹⁻⁶¹ (ii) épidermale⁶² et (iii) plasmatique.⁵⁷ Les TGases tissulaires sont impliquées dans différentes réactions biologiques comme l'endocytose,^{63, 64} l'apoptose⁶⁵ et la régulation du développement des cellules.⁶⁰ Le facteur XIIIa (TGase soluble dans le plasma), la sous-unité catalytique de la pro-enzyme facteur XIII activée par la présence de Ca^{2+} et de thrombine, est responsable de la stabilisation des caillots sanguins par la formation de liens isopeptidiques entre les fibrines.⁶⁶⁻⁶⁸ La TGase épidermale, exprimée dans les tissus de l'épiderme ou dans les follicules capillaires, sont impliquées dans la formation d'une enveloppe cellulaire cornifiée, couche protectrice de la peau.⁶⁹⁻⁷²

Cependant une trop grande activité de la TGase peut entraîner des perturbations physiologiques entraînant des maladies comme l'acné,^{45, 46} les cataractes,⁷³ les maladies immunitaires,⁷⁴ le psoriasis,⁷⁵⁻⁷⁷ la maladie d'Alzheimer,⁵⁰⁻⁵⁶ la maladie de Huntington,^{48, 49} la maladie céliaque⁷⁸ (inflammation intestinale induite par la transformation des glutamines des protéines gliadines- α en acide glutamiques) et le développement de métastases cancéreuses.⁴⁷ Les maladies neurodégénératives comme la

maladie d'Alzheimer et de Huntington seraient causées en partie par l'augmentation du taux de protéines polyglutamines utilisées par la TGase pour former des agrégats insolubles et cytotoxiques dans la région du cerveau.⁷⁹ Tous ces désordres physiologiques sont, en fait, caractérisés par un accroissement non-contrôlé de la concentration des liens isopeptidiques entre diverses protéines, créés par une grande activité de la TGase (réticulation des protéines) pour donner des agrégats insolubles et par ce fait toxiques pour l'organisme.

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur la TGase tissulaire recombinante de foie de cobaye.

1.2.2. Les transglutaminases tissulaires

Les transglutaminases isolées des tissus sont des protéines monomériques, constituées de 685 à 691 acides aminés et de poids moléculaires de 76 à 85 kDa. Ces protéines ne sont pas glycosylées et aucun pont disulfure n'est formé malgré la présence de 5 à 6 sites potentiels à la *N*-glycosylation et de 17 cystéines.⁵⁷ La TGase tissulaire est située majoritairement dans l'espace intracellulaire, mais peut se retrouver également dans les liquides interstitiels.

Contrairement aux autres membres de la grande famille des transglutaminases, les TGases tissulaires sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans des processus biologiques très diversifiés pour lesquels leurs rôles physiologiques demeurent encore toutefois incertains. Une autre particularité des TGases tissulaires, au niveau moléculaire, est leur double activité catalytique. En effet, en plus de leur activité catalytique dépendante de Ca^{2+} , typique des TGases et permettant la formation de liens isopeptidiques, les TGases tissulaires se comportent comme des protéines G impliquées dans la signalisation transmembranaire. Leur activité catalytique (hydrolyse du GTP) est alors dépendante du résidu guanosine triphosphate (GTP). Une structure cristalline de la TGase tissulaire humaine en présence de GTP⁸⁰ a révélé que le site actif de liaison du nucléotide guanosine triphosphate est nettement différent de celui des autres protéines

G. De plus, la structure permet de suggérer une régulation négative de l'activité de transamidation lors de la liaison du nucléotide, mais une régulation positive par les ions Ca^{2+} . Parallèlement, une seconde étude a permis de constater qu'en fait, la liaison de GTP occasionne la diminution de l'activité de transamidation en présence de faibles concentrations de Ca^{2+} , mais demeure essentielle en stabilisant l'activité de transamidation à des concentrations élevées de Ca^{2+} . Enfin, en incubant l'enzyme en présence de GTP ou de Ca^{2+} à 37°C, les tests d'activité ont révélé que la TGase peut maintenir son activité d'hydrolyse du GTP relativement stable, mais que son activité de transamidation (site actif de transamidation plus labile) chute rapidement en l'espace d'une heure seulement.⁸¹

1.2.3. Structure de la transglutaminase tissulaire

Les transglutaminases ont une structure tertiaire composée d'un sandwich- β en *N*-terminal, d'un cœur- α/β et de deux barils- β en *C*-terminal.⁸² L'activité catalytique se situe au sein du cœur- α/β . (**figure 1.1**) Malgré la présence de 17 cystéines et de six sites possibles de *N*-glycosylation aucun pont disulfure et aucune glycosylation ne sont retrouvés dans la TGase tissulaire.⁸³

De nombreuses études ont montré que tous les résidus du site actif de l'enzyme, soit la cystéine (Cys), l'histidine (His) et l'acide aspartique (Asp), étaient conservés. De plus, les acides aminés entourant le résidu cystéine du site catalytique sont hautement conservés, ce qui peut impliquer une conservation éventuelle quant au mécanisme enzymatique.

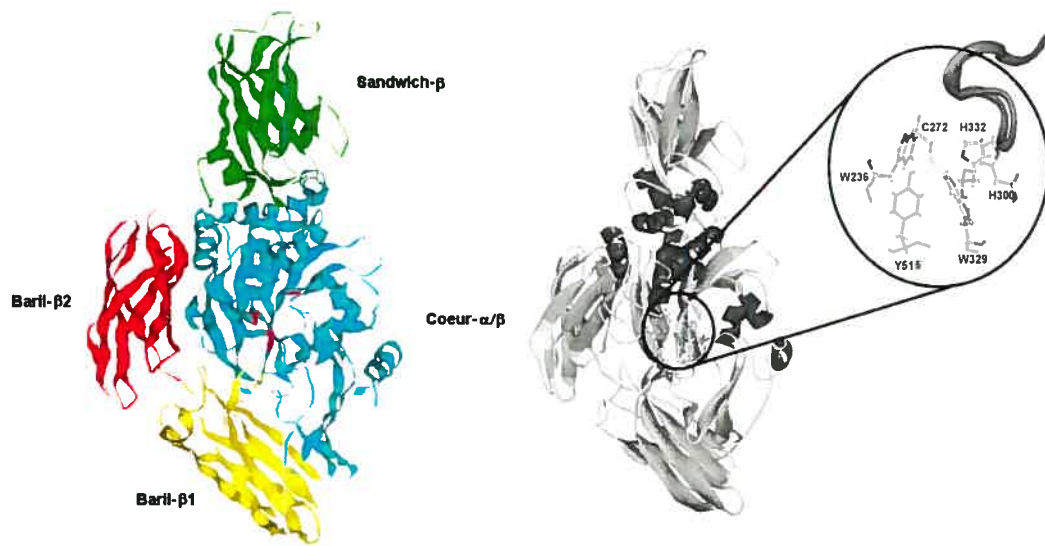


Figure 1.1 : Structure cristalline obtenue par rayons X de la transglutaminase de la dorade rouge.⁸⁴

1.2.4. Pertinence de la transglutaminase du foie de cobaye

Le choix de la transglutaminase du foie de cobaye comme transglutaminase tissulaire modèle repose sur sa grande homologie de séquence avec la TGase humaine⁵⁷ (80 %) et justifie ainsi son importance comme modèle en recherche biomédicale. En plus de sa grande homologie à la transglutaminase humaine, la transglutaminase de foie de cochon d'Inde est facilement disponible à partir des tissus animaux.⁸⁵ En effet, le groupe du Pr. Keillor a mis au point une méthode de purification⁸⁶ à partir de tissus frais, qui dépasse de 55 % le rendement publié dans les méthodes de purification classiques,⁸⁷ tout en obtenant une enzyme dont l'activité spécifique est 28 % plus grande que celle rapportée dans cette même publication. Plus récemment, le groupe du Pr. Keillor en collaboration avec le groupe du Pr. Pelletier, a développé une nouvelle méthode d'obtention de la TGase de foie de cobaye. Ainsi, un système d'expression dans une souche de *E. coli* XL-1 Blue avec un vecteur pQE32 pour la TGase et pDnaKJ

pour deux chaperonnes protéiques⁸⁸ (DnaK et DnaJ) a été mis au point. L'ajout d'une séquence hexahistidine en *N*-terminal de l'enzyme a permis une purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel avec une grande efficacité.⁸⁹ La méthode d'obtention de la transglutaminase de cobaye recombinante maintenant utilisée dans le groupe du Pr. Keillor est donc cette méthode n'impliquant que quelques étapes simples.

La transglutaminase du foie de cobaye est une enzyme monomérique de 79 kDa, non-glycosylée et ne comportant aucun pont disulfure. Ces caractéristiques sont similaires à l'enzyme humaine. En se basant sur les structures déjà connues (Facteur XIIIa⁵⁷ et transglutaminase tissulaire de poisson⁸³) et sur la grande homologie de séquence, on peut supposer que la TGase du foie de cobaye est constituée des même quatre domaines distincts : Baril- β 1, Baril- β 2, Sandwich- β et Cœur- α/β . Le site actif responsable de l'activité transamidase se situerait au sein de ce dernier domaine et serait assuré par la triade Cys-314, His-334 et Asp-358.^{90, 91}

1.2.5. Inhibiteurs des Transglutaminases tissulaires

Des inhibiteurs efficaces et sélectifs des TGases permettraient une meilleure compréhension des maladies causées par ces enzymes mais également permettrait d'envisager le développement de médicaments potentiels. De nombreux inactivateurs de la TGase ont été trouvés pour réguler son activité. Parmi ces inactivateurs, on retrouve les sulfonamides,^{92, 93} les iodoacetates,⁹⁴⁻⁹⁷ les isocyanates,⁹⁸ les thiourées,⁹⁹ les dérivés d'acivicine,^{100, 101} les méthylcétones sulfoniques,¹⁰² les hétérocycles thioacétylés,¹⁰³ les analogues électrophiles de la glutamine.¹⁰⁴ (**figure 1.2**) Tous ces dérivés possèdent un groupement électrophile qui réagit avec la cystéine (nucléophile) du site actif de la TGase de façon covalente pour ainsi empêcher la réaction enzymatique d'avoir lieu. Mais le reste de la molécule ne permettant pas une grande affinité avec la TGase, ces composés possèdent une faible sélectivité vis-à-vis de l'enzyme d'intérêt et dans ce cas ne sont pas de bons candidats pour une utilisation thérapeutique car présentant le risque

d'entraîner des réactions secondaires en réagissant avec n'importe quel nucléophile du milieu biologique.

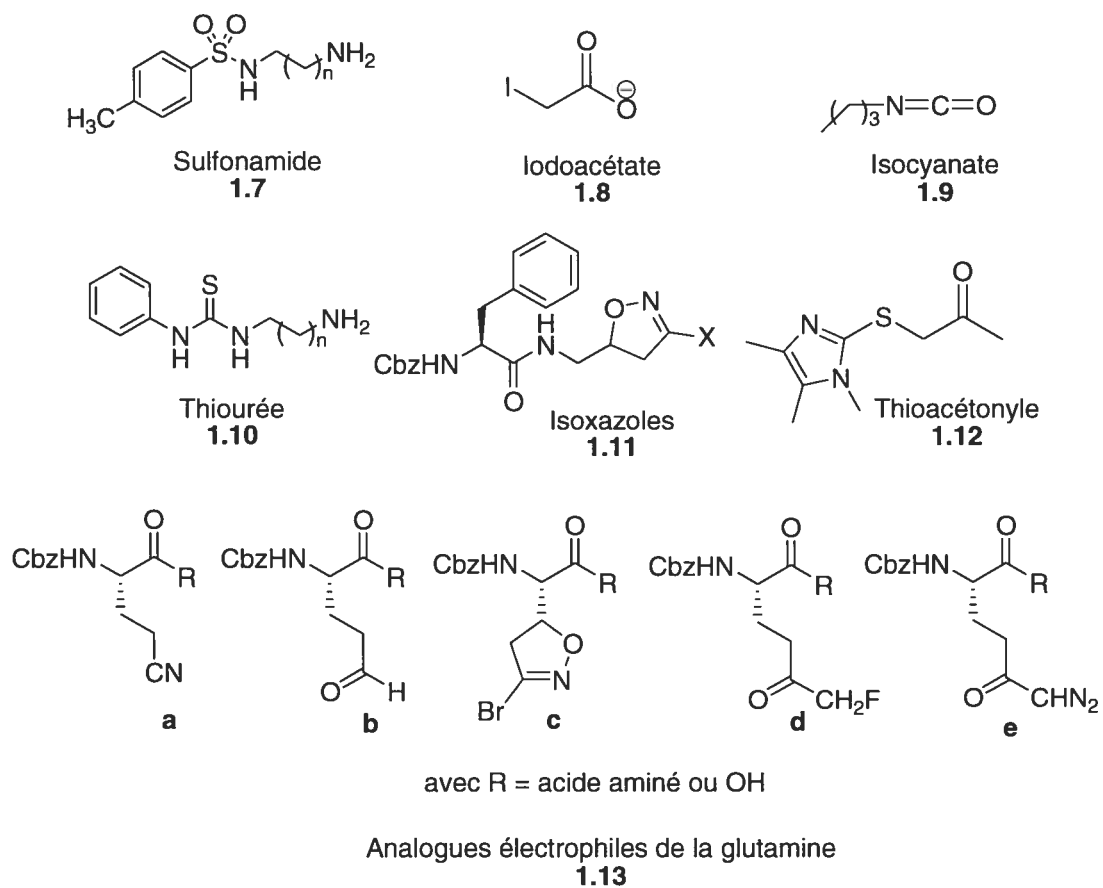


Figure 1.2 : Structures d'inhibiteurs présentées dans la littérature.

Une seconde génération d'inhibiteurs irréversibles de la TGase a été développée dans le groupe du Pr. Keillor basée sur des dipeptides. Parmi eux, on retrouve les dérivés 1,2,4-thiadiazoles¹⁰⁵ (**1.14a**), les amides α,β insaturées¹⁰⁶ (**1.14b**) et les époxydes (**1.14c**). (**figure 1.3**) Ces inhibiteurs montrent une sélectivité pour la TGase tissulaire contrairement aux premiers inhibiteurs cités due notamment à une analogie du squelette avec le substrat non naturel le plus utilisé pour les tests avec la TGase et qui est le Cbz-Gln-Gly.

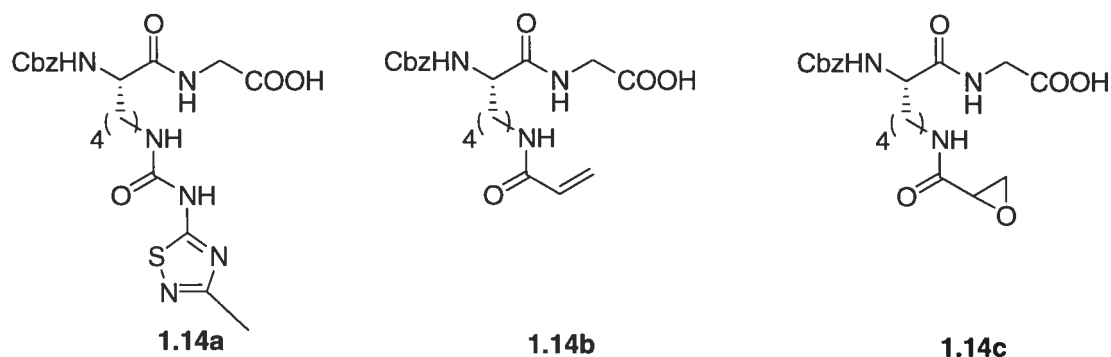


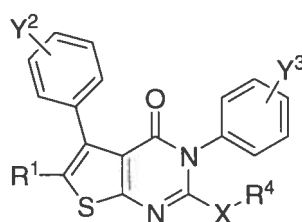
Figure 1.3 : Structure d'inhibiteurs dérivés 1,2,4-thiadiazole, amides α,β -insaturées et époxydes.

L'importance d'un groupement aromatique a également été mise en évidence lors d'une étude⁹⁰ sur des substrats analogues de la TGase tissulaire menée par le groupe du Pr. Keillor. En effet, la partie *N*-carbobenzyloxy (Cbz) du substrat *N*-carbobenzyloxy-L-glutamylglycine (Cbz-Gln-Gly) semble être important dans le processus de reconnaissance. En remplaçant seulement le groupement Cbz par le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc), le TGase ne reconnaît plus ce composé comme substrat malgré le maintien de la séquence Gln-Gly.

Récemment des dérivés thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4-one acylhydrazide ont été synthétisés¹⁰⁷ et ont montré pour la première fois un caractère réversible chez des inhibiteurs de TGase. La plupart de ces dérivés présentent un caractère aromatique et

une grande conjugaison comme l'hydrazine **1.15a**. (**tableau 1.1**) Une récente étude¹⁰⁸ a montré que cette hydrazine se fixerait au niveau du site du GTP de la TGase et changerait ainsi la conformation de l'enzyme qui lierait beaucoup moins bien le calcium, élément essentiel pour le rôle catalytique de la TGase.

Tableau 1.1 : Activité des dérivés thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide sur la TGase tissulaire.¹⁰⁷



Composé	R ¹	Y ²	Y ³	X	R ⁴	IC ₅₀ (μM)
1.15a	H	H	H	S	CH ₂ C(O)NHNH ₂	0.8
1.15b	H	H	H	O	CH ₂ C(O)NHNH ₂	4.5
1.15c	Me	H	H	S	CH ₂ CH ₂ C(O)NHNH ₂	1.3
1.15d	H	H	H	S	CH(Me)C(O)NHNH ₂	> 10
1.15e	H	H	H	NMe	CH ₂ C(O)NHNH ₂	> 20
1.15f	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NMeNH ₂	> 20
1.15g	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NHNHMe	> 20
1.15h	H	4-F	4-F	S	CH ₂ CO ₂ H	> 20
1.15i	H	H	4-F	S	CH ₂ CO ₂ Et	> 20
1.15j	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NHMe	> 20
1.15k	H	2-F	3-F	S	CH ₂ C(O)NH ₂	> 10
1.15l	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NHOH	> 20
1.15m	H	H	3-F	S	CH ₂ C(O)CH ₂ NH ₂	5.3

1.3. Nouveaux inhibiteurs de la transglutaminase tissulaire

Bien que de nombreux travaux au niveau de l'inhibition de la TGase aient été réalisés par de nombreux groupes, beaucoup de choses restent à faire dans ce domaine. Nous nous sommes donc intéressés à certaines parties moins explorées du domaine de l'inhibition de la TGase. Par conséquent, nous avons travaillé sur le développement : (i) d'inhibiteurs réversibles et compétitifs de la TGase (**chapitre 2**), (ii) d'inhibiteurs irréversibles ayant une bonne sélectivité tout en étant plus adaptés pour le domaine *in vivo* (**chapitre 3**) et d'inhibiteurs qui serviraient pour le marquage (**chapitre 4**).

1.3.1. Inhibiteurs réversibles

Par leur nature, les analogues *trans*-cinnamoyles présentent de l'aromaticité, de la conjugaison et de la rigidité. En s'appuyant sur ces caractéristiques, une étude sur le rôle de la rigidité du groupement protecteur Cbz dans le substrat donneur Cbz-Gln-Gly a été menée en remplaçant ce groupement par des *trans*-cinnamoyles. Cette étude a permis d'isoler un intermédiaire réactionnel, l'amide **2.14a** qui s'est révélé être un inhibiteur compétitif et réversible de la TGase. Ce ne sont pas les premiers dérivés *trans*-cinnamoyles montrant une certaine activité d'inhibition. En effet, certains de ces dérivés montrent souvent une activité inhibitrice sur différentes protéines et enzymes, notamment la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase fongique,¹⁰⁹ les récepteurs $\alpha\beta 3$ intégrine¹¹⁰ et la α -glucosidase.¹¹¹ Le projet mené dans le laboratoire du Pr. Keillor a donc permis de révéler cet amide **2.14a** dérivé de l'acide *p*-nitrocinnamique qui possède une activité inhibitrice vis-à-vis de la transglutaminase tissulaire. Par conséquent, une série de dérivés *trans*-cinnamoyles a été synthétisée (**figure 1.4**) et des tests cinétiques réalisés sur la TGase tissulaire ont permis de mettre en évidence que certains de ces composés agissaient comme des inhibiteurs réversibles et compétitifs. Une étude structure/activité a ensuite été menée afin de déterminer quelles étaient les propriétés structurales essentielles à l'inhibition comme la montré l'amide **2.14a** avec un IC₅₀ de 43 μ M et également améliorer leurs caractéristiques pharmacocinétiques. En plus d'avoir

montré une inhibition compétitive réversible, ces molécules ont une voie de synthèse simplifiée ce qui, dans l'optique du développement de composés potentiellement utilisables en thérapeutique, constitue un avantage certain.

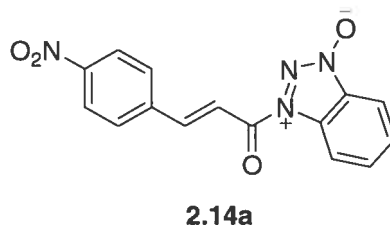


Figure 1.4 : Structure de l'inhibiteur-parent **2.14a**.

Tous les résultats découlant de ces études structure/activité seront présentés dans le **chapitre 2**.

1.3.2. Inhibiteurs irréversibles

Récemment des inhibiteurs (**1.16**) de la TGase basé sur le squelette Cbz-Phe¹¹² ont été synthétisés et évalués cinétiquement. L'inhibition se faisait grâce au groupement dihydroisoxazole qui piège la cystéine du site actif. D'un autre côté, le groupe du Pr. Keillor a synthétisé des inhibiteurs irréversibles¹¹³ (**1.17**) mais cette fois-ci basé sur le squelette Cbz-Gln-Gly et portant une fonction amide α,β -insaturée au lieu de la fonction dihydroisoxazole. Ce dernier groupement semblant assez volumineux pour bien entrer dans le site actif, il a donc paru intéressant de mixer les deux idées en synthétisant et évaluant une série de dérivés basé sur le squelette Cbz-Phe et portant un groupement α,β -insaturé (**3.4a-d**) ou chloroacétamide (**3.5a-c**) moins volumineux que le dihydroisoxazole (**schéma 1.5**). Des tests cinétiques *in vitro* ont mis en évidence que la plupart de ces dérivés étaient capables d'inhiber l'enzyme de façon irréversible.

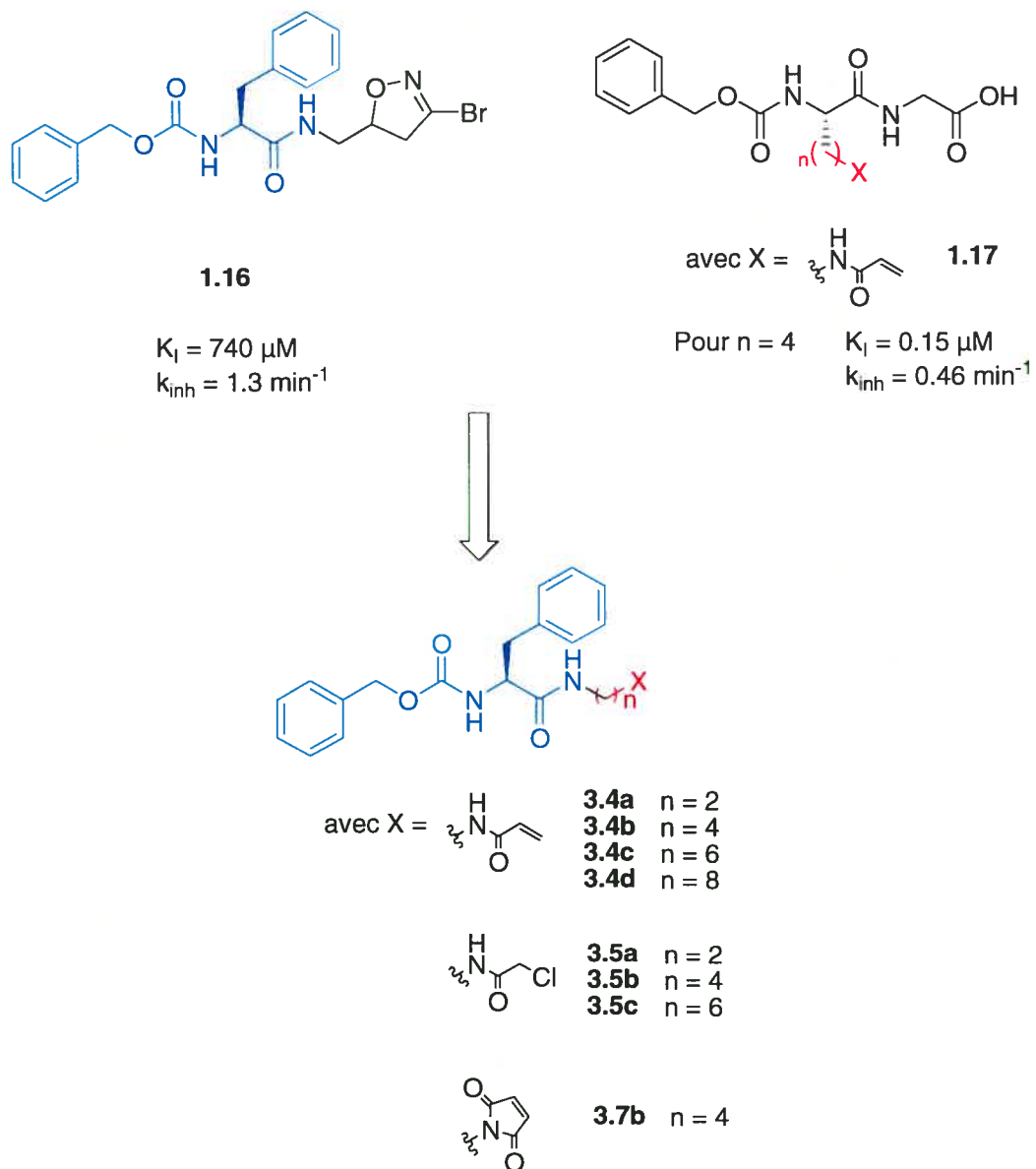


Schéma 1.5 : Structure des inhibiteurs irréversibles étudiés.

De plus, ces inhibiteurs semblent spécifiques à la TGase tissulaire et leurs activités inhibitrices (k_{inact}/K_i) sont dans la moyenne pour des inhibiteurs réversibles de la TGase ($\sim 0.1 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). L'ensemble de ces résultats sera discuté dans le **chapitre 3**.

1.3.3. Marquage

Mais l'inhibition, c'est également une meilleure compréhension des voies métaboliques, il a été donc intéressant de développer des inhibiteurs qui joueraient également le rôle de marqueurs. Trois composés ont été synthétisés, soit deux composés fluorescents (4.9 et 4.12) et un composé possédant un groupement biotinylé (4.15) et ont été testés *in vitro* en vue d'être potentiellement utilisables *in vivo*. (figure 1.5)

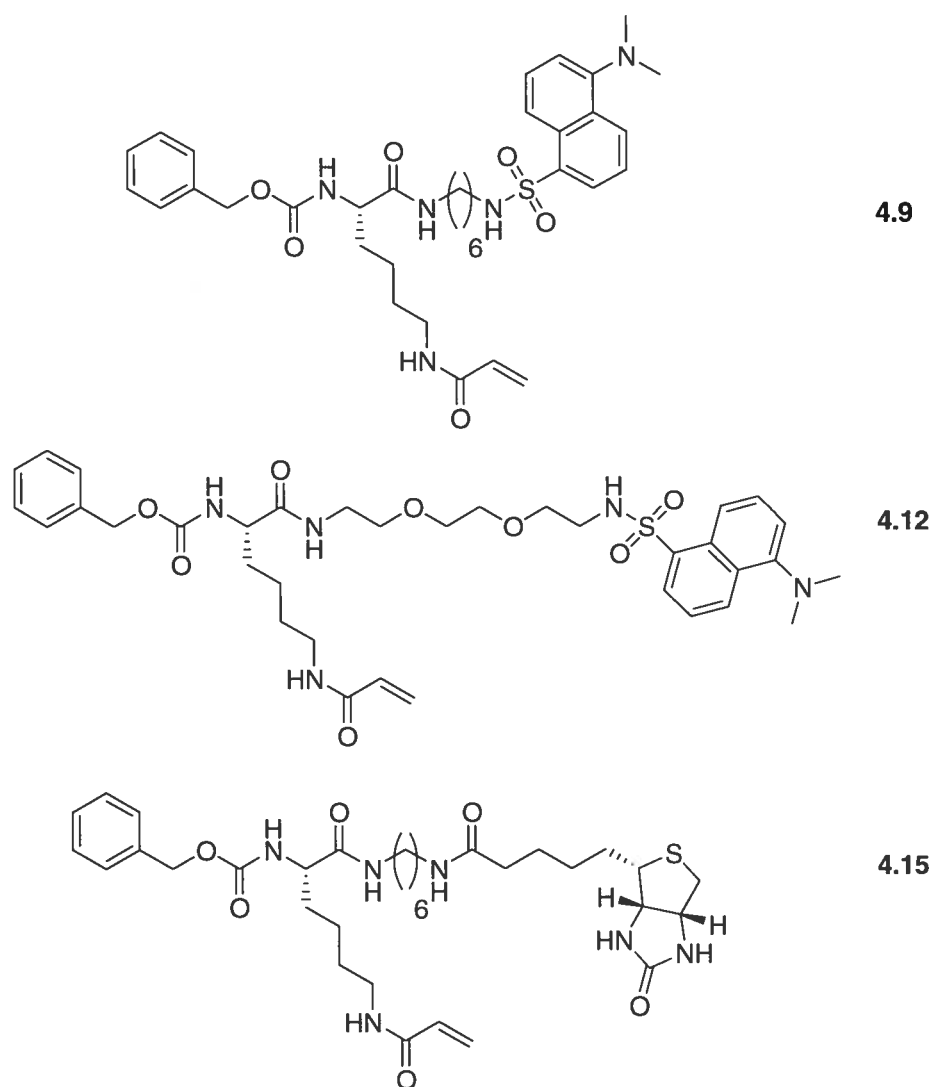


Figure 1.5 : Structures des marqueurs étudiés.

La conception des ces marqueurs repose sur la synthèse d'inhibiteurs de la TGase déjà développés¹⁰⁶ dans le laboratoire du Pr. Keillor auquel il a été ajouté une sonde qui est fluorescente ou biotinylée. L'objectif étant de disposer de molécules présentant une bonne spécificité pour l'enzyme, il est apparu évident de générer ce genre de marqueur se basant sur un inhibiteur connu de la TGase en lui fixant soit une sonde fluorescente, soit un groupement biotine. Les résultats pour ces marqueurs seront présentés dans le **chapitre 4**.

1.3.4. Méthodes cinétiques pour déterminer les constantes d'inhibitions

Tous les tests d'inhibitions *in vitro* ont été suivis par spectrométrie en utilisant le *N*-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophényl)glycine (**schéma 1.6**) comme compétiteur et substrat.¹¹⁴ En effet, il est très facile de suivre en continu la réaction d'hydrolyse de ce composé par spectrophotométrie UV-Vis à 405 nm, longueur d'onde d'absorption du *p*-nitrophénol.

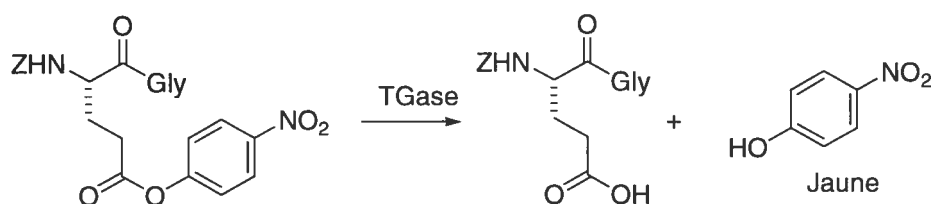


Schéma 1.6 : Réaction suivie par spectrométrie.

Dans le chapitre 3, une nouvelle méthode développée¹¹⁵ au sein du groupe du Pr. Keillor a également été utilisée. Tandis que les tests avec *N*-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophényl)glycine se font par spectrométrie UV-Vis, cette nouvelle méthode fait appel à la fluorimétrie. Le substrat en compétition est cette fois-ci le 4-(*N*-carbobenzoxy-L-phénylalaninylamino)butyrate de coumarin-7-yle. La réaction de la TGase est donc observée via l'augmentation de fluorescence (λ_{exc} 330 nm, λ_{em} 460 nm) due à la libération du 7-hydroxycoumarine qui est l'espèce fluorescente. (**schéma 1.7**)

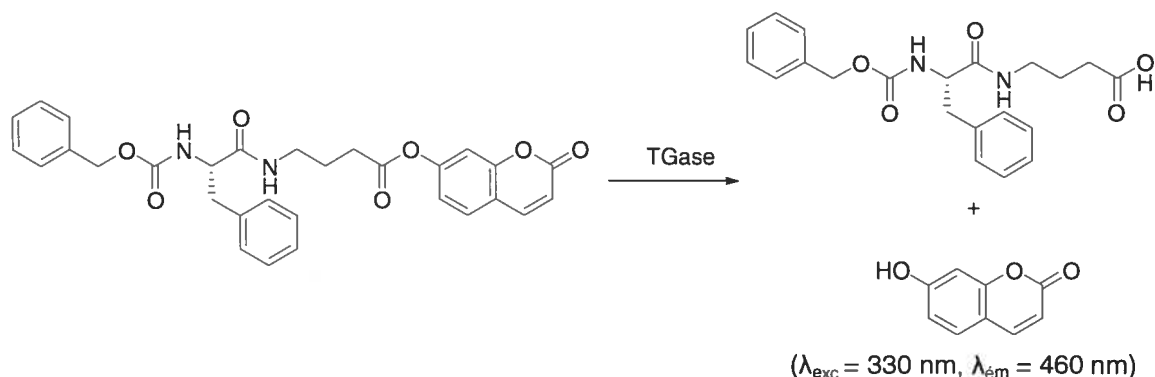


Schéma 1.7 : Réaction suivie par fluorimétrie.

Ces tests d'inhibition ont permis de déterminer des valeurs cinétiques amenant aux constantes et coefficients d'inhibition que ce soit les IC_{50} (concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle de 50 % de sa valeur initiale non-inhibée) pour les inhibiteurs réversibles ou soit K_i (constante d'inhibition) et k_{inact} (constante de vitesse de premier ordre d'inactivation) pour les inhibiteurs irréversibles et les marqueurs.

1.3.5. Conclusion

La TGase semble jouer un rôle important dans différentes maladies (Huntington, cœliaque, acné, Alzheimer) et par ce fait devient une cible d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs que ce soit au niveau pharmacologique ou au niveau mécanistique. Ce mémoire à travers ses différents chapitres montrera le développement d'inhibiteurs compétitifs réversibles et irréversibles qui pourraient avoir une application aussi bien dans la médication (**chap.2 et 3**) que dans la meilleure compréhension du rôle de cette enzyme. (**chap.4**)

CHAPITRE 2

Inhibiteurs compétitifs et réversibles

2.1. Introduction

Des inhibiteurs de la transglutaminase (TGase) ont été développés pour une meilleure compréhension de son fonctionnement et pour jouer potentiellement un rôle thérapeutique. Mais la majorité de ces inhibiteurs montrent un comportement irréversible et sont plus ou moins spécifiques vis-à-vis de l'enzyme d'intérêt. La TGase catalyse une réaction de réticulation intermoléculaire en formant des liens γ -glutaminylo-lysine par une triade catalytique (voir **chapitre 1**) qui contient notamment un résidu cystéine.⁵⁸ Le groupement thiol de ce résidu, qui sert de nucléophile lors de la catalyse, constitue une excellente cible pour tout inhibiteur capable d'alkyler ou d'acyler par l'intermédiaire d'un groupement électrophile. Une grande quantité d'inhibiteurs a donc été développée se basant uniquement sur la possibilité de réagir avec la cystéine du site actif. Parmi ces inhibiteurs, on retrouve des sulfonamides,^{92, 93} des iodoacétates⁹⁴⁻⁹⁷ (ex. : iodoacétamide (**2.1**)), des isocyanates⁹⁸ (ex. : propylisocyanate (**2.2**)), des thiourées⁹⁹ (ex. : 1-(5-aminopentyl)-3-phénylthiourée (**2.3**)), des dérivés d'acivicine^{100, 101} (**2.4**), des méthyl cétones sulfoniques,¹⁰² des hétérocycles thioacétonyles¹⁰³ (ex. : 1,4,5-triméthyl-2-[(2-oxopropyl)thiol]imidazole (**2.5**)) et des analogues électrophiles de la glutamine.¹⁰⁴ (**figure 2.1**)

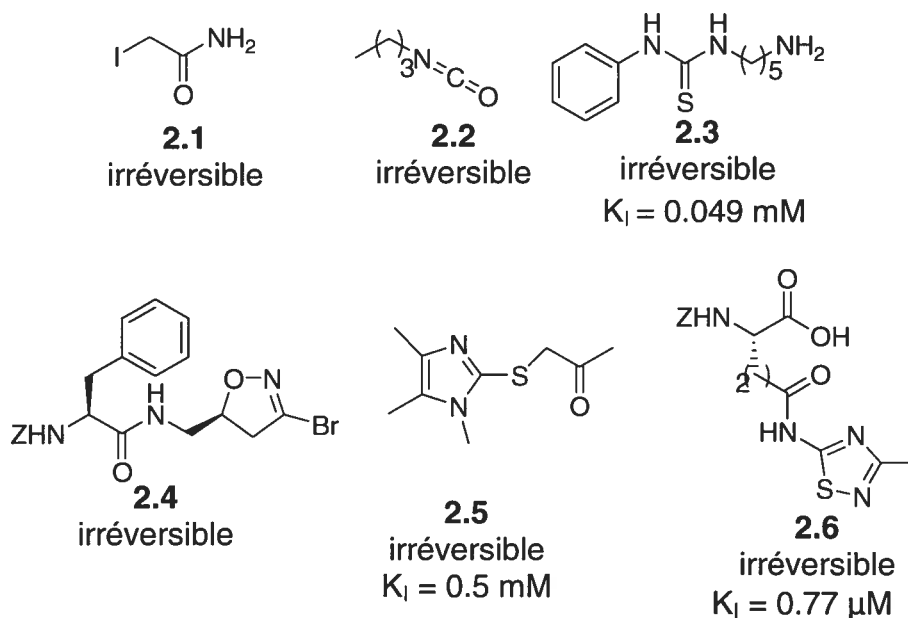


Figure 2.1 : Structures d'inhibiteurs de la TGase.

Mais, bien que ces inhibiteurs se soient révélés efficaces, leur spécificité vis-à-vis de la TGase était mauvaise.⁹⁸ En effet, ils présentaient tous une relation linéaire voire stoechiométrique entre le taux d'inhibition et leur concentration ce qui indique une relation cinétique de second ordre et donc une pauvre spécificité. Par exemple, les isocyanates alkyles sont des inactivateurs de protéases à sérine,¹¹⁶ d'enzymes à cystéine dont la TGase fait partie et de la déshydrogénase d'alcool.¹¹⁷

Afin d'accroître la spécificité tout en préservant l'efficacité, des inhibiteurs^{105, 106} (**2.7a-h**) basés sur le substrat *N*-carbobenzyloxy-L-glutaminyglycine (Cbz-Gln-Gly) ont été développés et conformément aux attentes. Ils ont démontré une bonne spécificité, en plus d'une bonne efficacité. Mais il n'en reste pas moins que ces inhibiteurs, bien que compétitifs, restent des inhibiteurs irréversibles. (**Figure 2.2**)

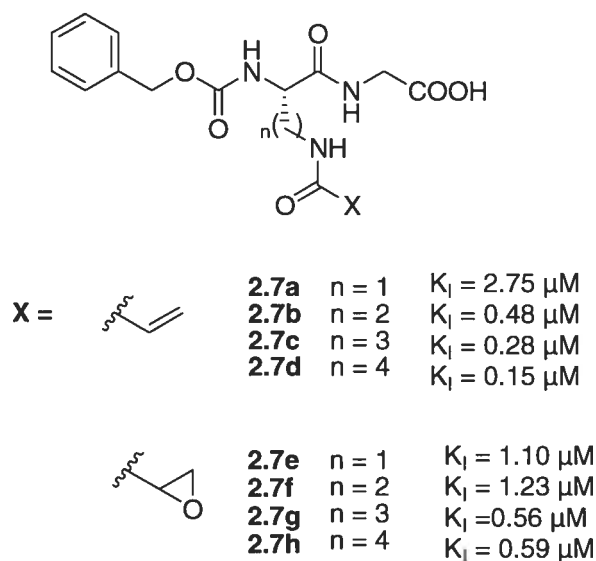
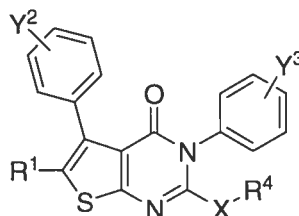


Figure 2.2 : Structures d'inhibiteurs spécifiques de la TGase.

Récemment les premiers inhibiteurs réversibles de la TGase tissulaire connus dans la littérature ont été synthétisés et étudiés.¹⁰⁷ Ces inhibiteurs sont des dérivés thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide (**2.8a-m**) (**tableau 2.1**).

Tableau 2.1 : Activité de dérivés thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide sur la TGase tissulaire.



Composé	R ¹	Y ²	Y ³	X	R ⁴	IC ₅₀ (μM)
2.8a	H	H	H	S	CH ₂ C(O)NHNH ₂	0.8
2.8b	H	H	H	O	CH ₂ C(O)NHNH ₂	4.5
2.8c	Me	H	H	S	CH ₂ CH ₂ C(O)NHNH ₂	1.3
2.8d	H	H	H	S	CH(Me)C(O)NHNH ₂	> 10
2.8e	H	H	H	NMe	CH ₂ C(O)NHNH ₂	> 20
2.8f	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NMeNH ₂	> 20
2.8g	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NHNHMe	> 20
2.8h	H	4-F	4-F	S	CH ₂ CO ₂ H	> 20
2.8i	H	H	4-F	S	CH ₂ CO ₂ Et	> 20
2.8j	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NHMe	> 20
2.8k	H	2-F	3-F	S	CH ₂ C(O)NH ₂	> 10
2.8l	H	4-F	4-F	S	CH ₂ C(O)NHOH	> 20
2.8m	H	H	3-F	S	CH ₂ C(O)CH ₂ NH ₂	5.3

Une étude préliminaire structure/activité de ces dérivés a montré l'importance de la chaîne latérale acylhydrazide thioéther (**2.8a** et **2.8d**) et du cycle thiophène pour l'efficacité (**2.8a** et **2.8e**). La plus part de ces composés mène à une inhibition lente dépendante du temps et une récente publication a indiqué que leur inhibition se fait au niveau du site de fixation du GTP au lieu du site catalytique.¹⁰⁸ De plus, ces composés présentent un squelette à caractère hautement conjugué. À notre connaissance, aucune autre étude d'inhibiteurs réversibles de la TGase tissulaire n'a été publiée jusqu'à

présent. Étant donné les applications pharmaceutiques potentielles de tels inhibiteurs et le manque de données à ce sujet, l'étude que nous avons réalisée présente un intérêt évident.

De précédents travaux effectués dans le groupe du Pr. Keillor portant sur une meilleure compréhension des éléments structuraux essentiels pour la reconnaissance des substrats par la TGase tissulaire, ont révélé l'importance du groupe protecteur Cbz du substrat Cbz-Gln-Gly au niveau de l'affinité vis-à-vis de la TGase.⁹⁰ Un projet basé sur l'importance de la rigidité du Cbz, nous a amené à synthétiser des substrats où le groupement Cbz fut remplacé par des dérivés *trans*-cinnamoyles. Durant ces recherches, un intermédiaire de réaction fut isolé et a montré une grande affinité et une activité inhibitrice vis-à-vis de la TGase tissulaire. Cet intermédiaire étant le résultat de la réaction entre l'acide *p*-nitro-*trans*-cinnamique et le réactif de couplage 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), deux structures étaient envisageables soit le dérivé ester (**2.14a'**) ou le dérivé amide (**2.14a**). (figure 2.3)

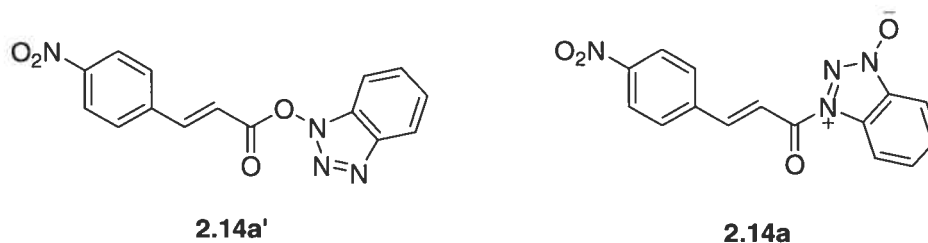


Figure 2.3 : Structure de l'ester **2.14a'** et de l'amide **2.14a**.

La formation de l'amide avec HOBt n'est pas nouveau, des travaux¹¹⁸ ont déjà montré cette formation bien que le mécanisme de couplage à l'aide du réactif HOBt s'écrit le plus souvent en passant par l'ester du 1-hydroxybenzotriazole. Une cristallisation dans le TFA suivi d'une détermination par rayons X a permis sans ambiguïté de connaître la structure de cet intermédiaire qui est l'amide **2.14a**. (figure 2.4)

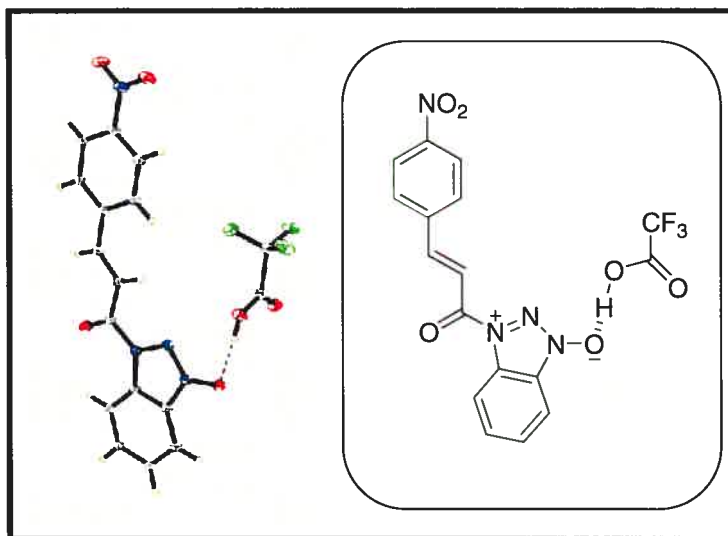
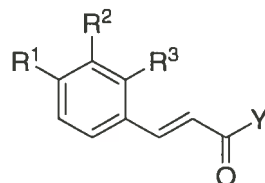


Figure 2.4 : Structure cristalline de l'amide **2.14a** avec le TFA.

En se basant sur cette découverte, une série de composés a donc été synthétisée, basée sur des dérivés *trans*-cinnamoyles (**figure 2.5**) et testés cinétiquement.



	R ¹	R ²	R ³		R ¹	R ²	R ³
a	NO ₂	H	H	k	Cl	H	H
b	H	NO ₂	H	l	H	Cl	H
c	H	H	NO ₂	m	H	H	Cl
d	OMe	H	H	n	NHBoc	H	H
e	H	OMe	H	o	H	NHBoc	H
f	H	H	OMe	p	NHFmoc	H	H
g	Me	H	H	q	CO ₂ Me	Me	H
h	H	Me	H	r	NH ₂	H	H
i	H	H	Me	s	H	NH ₂	H
j	H	H	H	t	NHAc	H	H

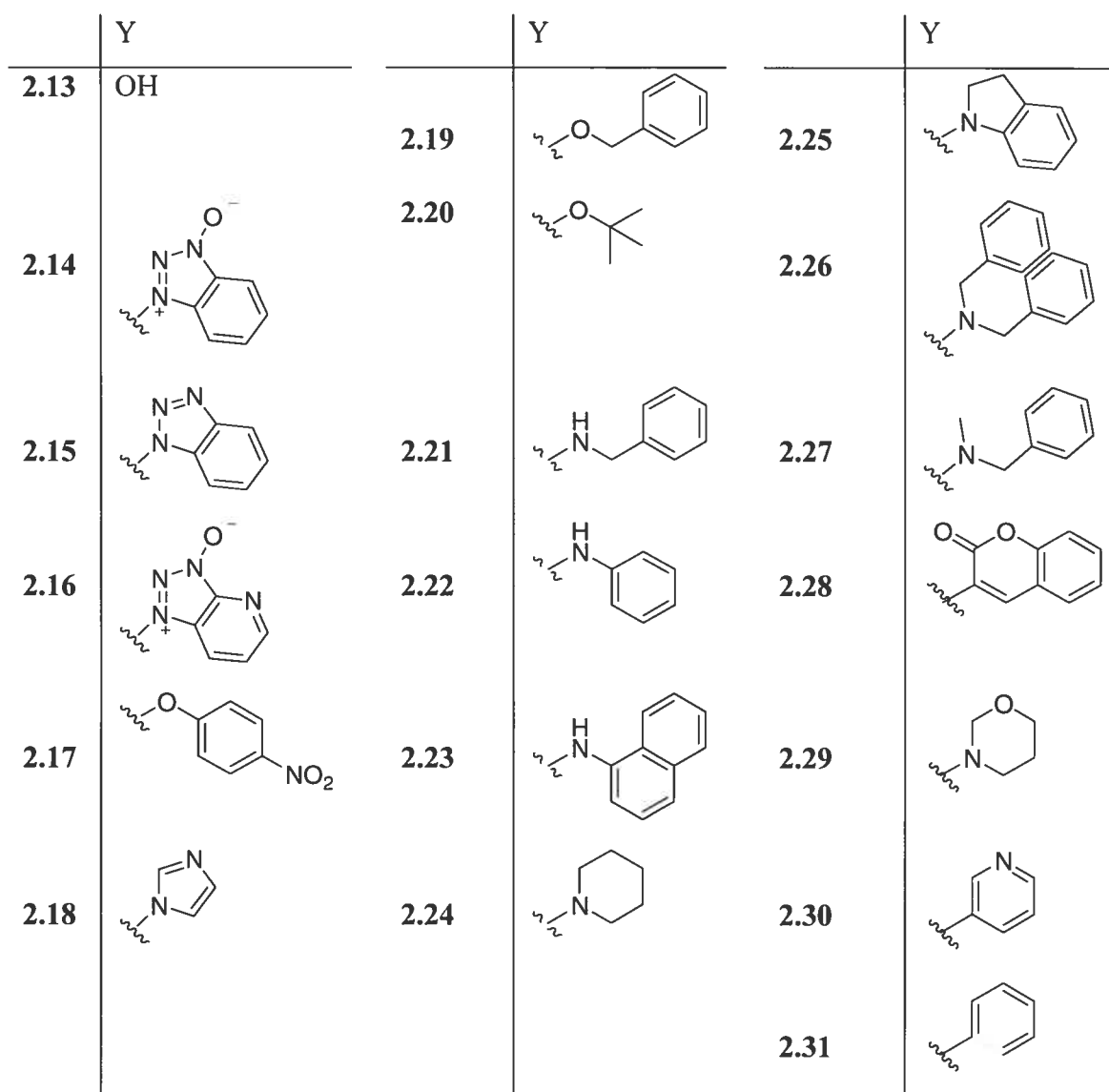
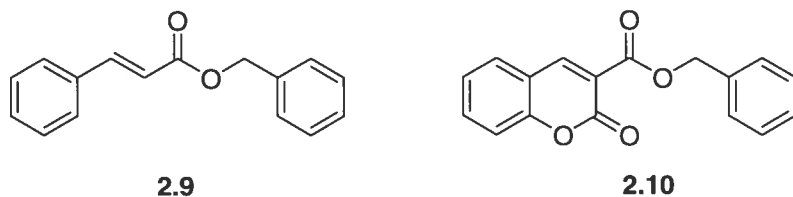
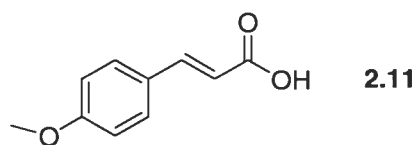


Figure 2.5 : Structure générale et numérotation des dérivés *trans*-cinnamoyles synthétisés.

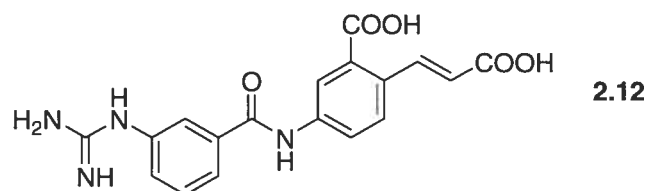
Ce caractère inhibiteur de dérivés *trans*-cinnamoyles n'est pas le premier reporté. En effet, certains dérivés cinnamoyles montrent des activités inhibitrices avec des enzymes et des protéines comme la déhydrogénase de 17 β -hydroxystéroïde¹⁰⁹ (2.9 et 2.10), les récepteurs de l'intégrine $\alpha\beta 3$ ¹¹⁰ (2.11) et la α -glucosidase¹¹¹ (2.12). (figure 2.6)



Inhibiteurs de la déshydrogénase de 17 β -hydroxystéroïde



Inhibiteur de la α -glucosidase



Inhibiteur des récepteurs de l'intégrine $\alpha v \beta 3$

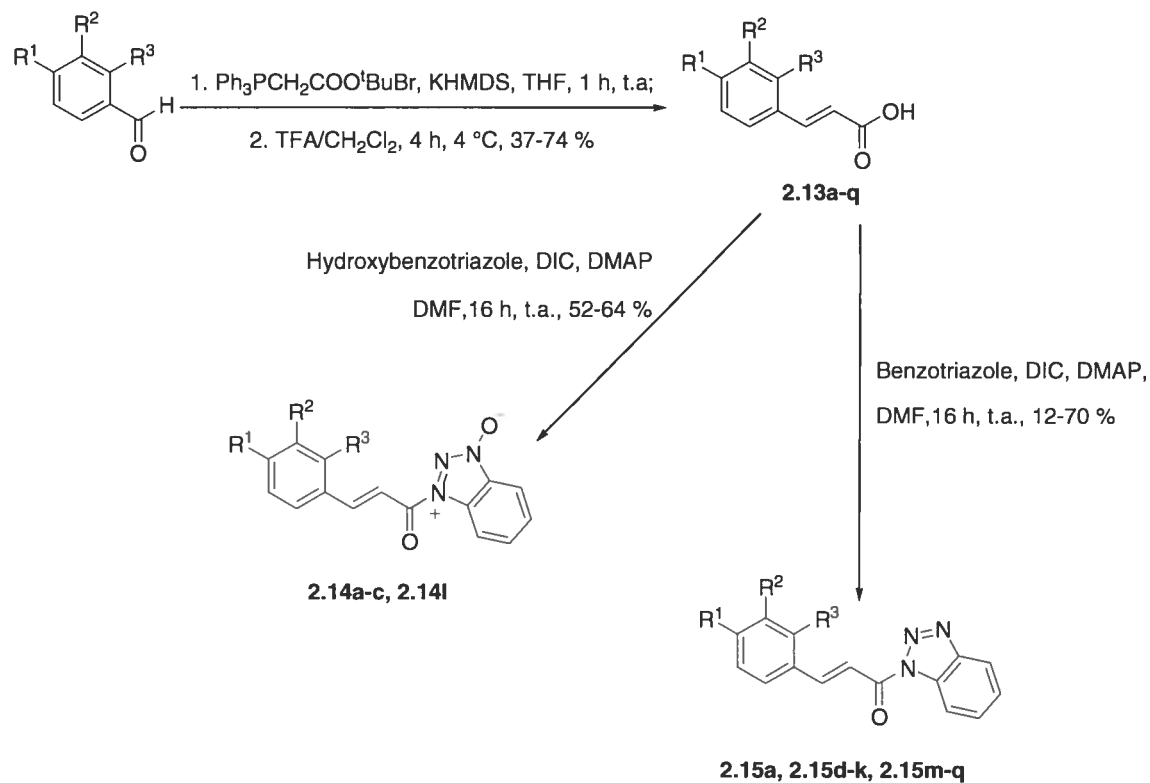
Figure 2.6 : Structures de différents inhibiteurs basés sur le groupement cinnamoyle.

Des tests cinétiques préalables avec l'amide **2.14a** ont montré une inhibition rapide, réversible et compétitive. Cet inhibiteur ne ressemblant aucunement aux substrats de la TGase tissulaire, une étude structure/activité a été menée pour (i) déterminer les éléments essentiels de ce nouveau type d'inhibiteurs (recherche du pharmacophore), (ii) améliorer l'efficacité de ces inhibiteurs en augmentant soit leur solubilité soit leur constante d'affinité.

2.2. Synthèse

2.2.1. Les amides benzotriazolyl cinnamoyles

Les amides benzotriazolyl cinnamoyles ont été étudiés comme inhibiteurs potentiels. Ces dérivés ont été obtenus en couplant une série d'acides *trans*-cinnamique avec le benzotriazole ou l'hydroxybenzotriazole. Ce couplage s'est fait avec l'aide de diisopropylcarbodiimide (DIC) et de diméthylaminopyridine (DMAP) dans le diméthylformamide (DMF) toute la nuit à température ambiante. La purification a été réalisée en diluant le milieu réactionnel dans de l'acétate d'éthyle (AcOEt) et en lavant cette phase organique avec une solution de soude 1N, une solution d'acide chlorhydrique 1N puis une solution saturée de chlorure de sodium. Ces lavages successifs ont cependant engendré une perte assez importante du matériel à purifier. Après avoir évaporé l'AcOEt, une trituration ou une colonne chromatographique a été effectuée pour obtenir les amides **2.14a-c**, **2.14l**, **2.15a**, **2.15d-k** et **2.15m-q** purs avec des rendements variant entre 12 et 70 %. (**schéma 2.1**)



amide	R ¹	R ²	R ³
2.14a	NO ₂	H	H
2.14b	H	NO ₂	H
2.14c	H	H	NO ₂
2.14l	H	Cl	H

amide	R ¹	R ²	R ³	amide	R ¹	R ²	R ³
2.15a	NO ₂	H	H	2.15j	H	H	H
2.15d	OMe	H	H	2.15k	Cl	H	H
2.15e	H	OMe	H	2.15m	H	H	Cl
2.15f	H	H	OMe	2.15n	NHBoc	H	H
2.15g	Me	H	H	2.15o	H	NHBoc	H
2.15h	H	Me	H	2.15p	NHFmoc	H	H
2.15i	H	H	Me	2.15q	CO ₂ Me	H	H

Schéma 2.1 : Synthèse des dérivés benzotriazole et oxybenzotriazole amide.

Les acides *trans*-cinnamiques non-commerciaux ont été préparés à partir des benzaldéhydes correspondants en utilisant l'oléfination de Wittig avec des rendements variant entre 37 et 74 %. Cette réaction a été réalisée à température ambiante dans du tétrahydrofurane (THF) en présence de bromure de (*tert*-

butoxycarbonylméthyl)triphénylphosphonium et de bis(triméthylsilyl)amide de potassium (KHMDs), puis suivie d'une déprotection du *tert*-butyl ester avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) pendant 4 h à 4 °C. (**schéma 2.1**)

Les amides benzotriazole cinnamoyles substitués avec des groupements amide ont été obtenus par réduction du dérivé nitro-cinnamoyl *tert*-butyl ester en utilisant du chlorure d'étain (II) (SnCl₂) dans de l'éthanol.¹¹⁹ Les anilines ainsi obtenues ont été ensuite acylées avec du chlorure 9-fluorénylméthoxycarboxyle (FmocCl) ou avec du *tert*-butyl dicarbonate ((Boc)₂O) pour donner les anilines *N*-protégées **2.13n**, **2.13o** et **2.13p**. (**schéma 2.2**) Ces précurseurs ont été utilisés directement dans les réactions suivantes sans purification supplémentaire pour réagir avec le benzotriazole en utilisant la réaction d'amidation avec le benzotriazole déjà décrite plus haut.

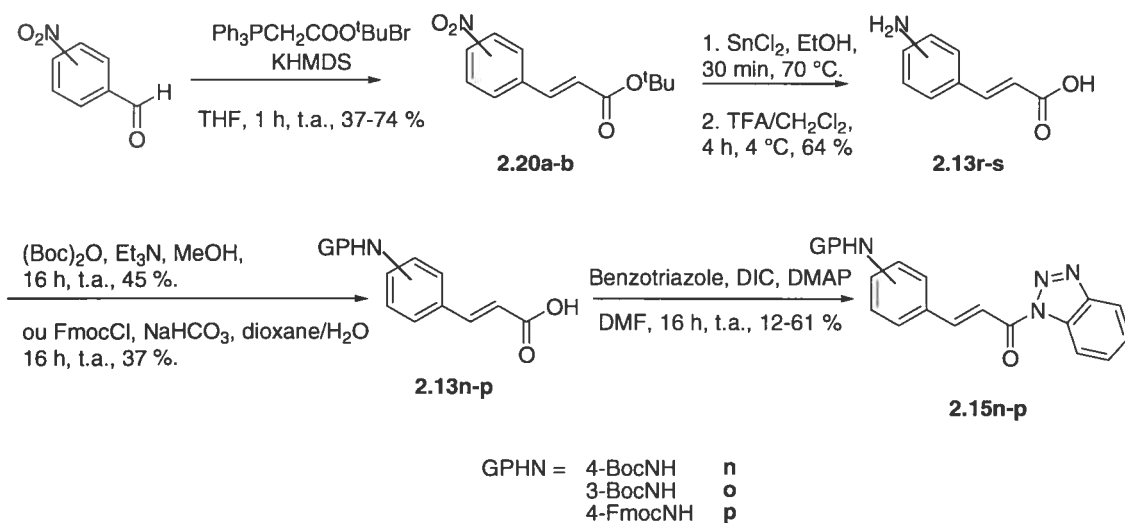


Schéma 2.2 : Synthèse des dérivés benzotriazoles avec un groupement amidé.

2.2.2. Azachalcones

Les azachalcones présentent une autre sous classe d'inhibiteurs potentiels et ont été obtenus en réalisant une condensation aldolique entre le *para*-nitrobenzaldéhyde substitués et la 3-acétylpyridine en présence d'hydroxyde de potassium dans une solution méthanol/eau (1:1).¹²⁰ L'azachalcone **2.30a** précipitant au cours de la réaction, une simple filtration permet son obtention avec un rendement de 73 %. La réduction de ce composé a ensuite été réalisée à l'aide de SnCl_2 ¹¹⁹ pour donner l'azachalcone **2.30r** qui a ensuite été acétylé avec une solution de pyridine contenant 40 % d'anhydride acétique pendant une heure à la température de la pièce pour donner l'azachalcone **2.30t** avec un rendement de 77 %. (schéma 2.3)

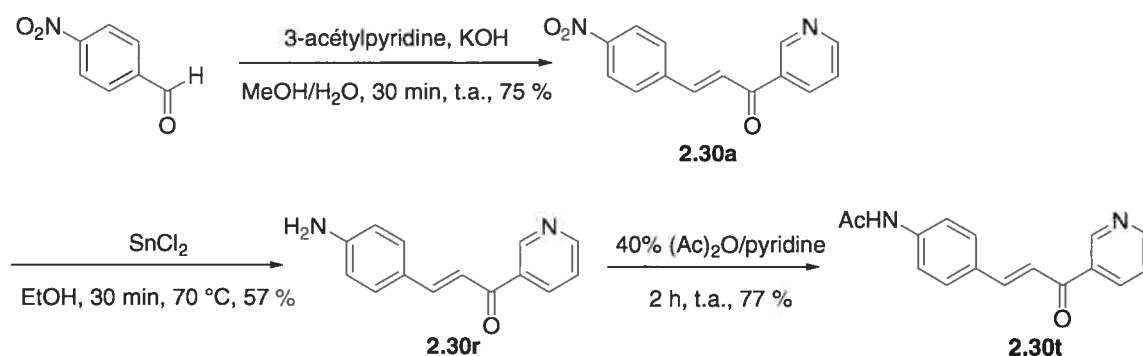
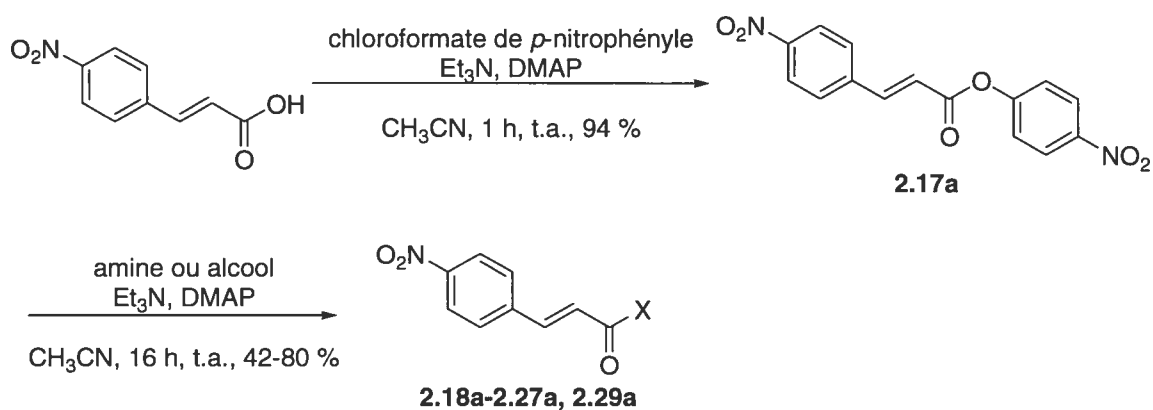


Schéma 2.3 : Synthèse des azachalcones.

2.2.3. Autres dérivés

Pour l'étude structure/activité d'autres cinnamates (**2.19a**) et cinnamides (**2.18a**, **2.21a-2.27a**, **2.29a**) ont été synthétisés à partir de l'ester *p*-nitrophenylique de l'acide *p*-nitrocinnamique obtenu en faisant réagir l'acide *p*-nitrocinnamique avec le *p*-nitrophénylchloroformate en présence de triéthylamine et DMAP. L'ester activé ainsi formé a été filtré et utilisé avec un alcool ou une amine en présence de triéthylamine menant à la formation de l'ester (**2.19a**) et des amides (**2.18a**, **2.21a-2.27a**). Ces

composés ont ensuite été purifiés par colonne chromatographique. (**schéma 2.4**) Enfin, le carbamate **2.32a** a été synthétisé à partir du chloroformate de *p*-nitrophényle et du benzotriazole en présence de Et₃N et DMAP dans le dichlorométhane à température ambiante toute la nuit.



	X		X		X
2.18a		2.22a		2.26a	
2.19a		2.23a		2.27a	
2.20a		2.24a			
2.21a		2.25a			

Schéma 2.4 : Synthèse des amides **2.18a**, **2.21a-2.27a** et des esters **2.19a-2.20a** à partir de l'acide *p*-nitrocinnamique.

Le dérivé coumarine, le 3-((*E*)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-2H-chromèn-2-one¹²¹ (**2.28a**), a été synthétisé en faisant réagir le *p*-nitrobenzaldéhyde avec le 3-(triphénylphosphinylacétényl)coumarine (**2.36**) dans le toluène toute la nuit à température ambiante. Le composé précipite et une simple filtration permet de le récupérer avec un rendement de 36 %. L'ylide **2.36** est obtenu à partir du bromure de 3-(triphénylphosphinylacétyl)coumarine (**2.35**) en présence de carbonate de potassium dans un mélange EtOH/H₂O (2:1) pour donner le produit sous forme d'un solide cristallin jaune après extraction avec un rendement de 95 %. Finalement la phosphine **2.35** vient de la substitution nucléophile du 3-bromoacétylcoumarine avec de la triphénylphosphine dans le dichlorométhane pour donner un solide cristallin jaune de manière quantitative. (schéma 2.5)

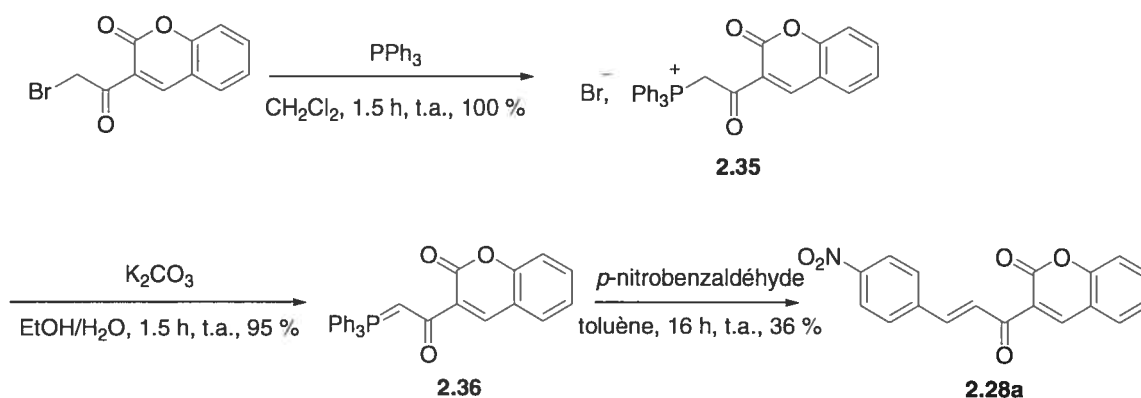


Schéma 2.5 : Synthèse du 3-((*E*)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-2H-chromèn-2-one (**2.28a**).

L'amide **2.37a** et l'azachalcone **2.38a** qui sont les cinnamiques vinyliques sont synthétisés de la même manière que les dérivés benzotriazoles et azachalcones en partant du *p*-nitrocinnamaldéhyde avec un rendement de 48 % pour le dérivé benzotriazole (**2.37a**) et 33 % pour le dérivé azachalcone (**2.38a**). (figure 2.6)

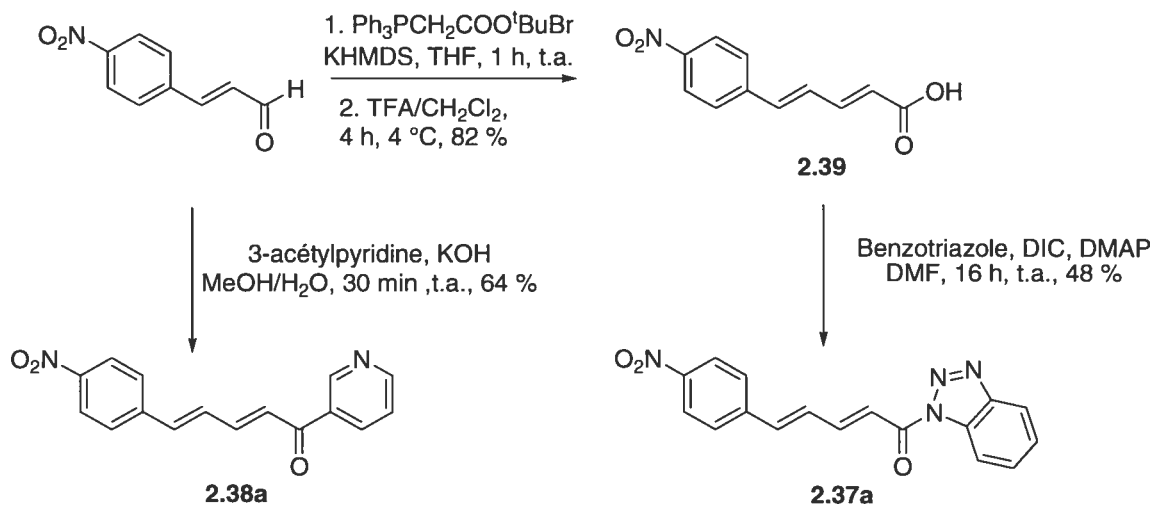


Schéma 2.6 : Synthèse de (2E,4E)-5-(4-nitrophényl)penta-2,4-dièn-1-ol benzotriazolyl amide (**2.37a**) et (2E,4E)-5-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)penta-2,4-dièn-1-one (**2.38a**).

2.3. Études cinétiques

L'étude inhibitrice des composés a été menée sur la TGase tissulaire recombinante de foie de cobaye qui a été exprimée dans *Escherichia coli* et purifiée en suivant un protocole⁸⁹ établi dans le laboratoire du Pr. Keillor. L'utilisation de cette TGase a été motivée par sa grande solubilité, son obtention en grandes quantités de façon aisée mais également par sa grande homologie avec la TGase tissulaire humaine (80 % d'homologie).⁵⁷ L'homologie fait ici référence à la portion de la séquence composée d'acides aminés identiques ou de même type dans les deux protéines en question. Deux acides aminés sont de même type s'ils sont tous deux polaires, chargés, hydrophobes, petit, gros, etc... De par cette homologie, la TGase recombinante représente donc un excellent modèle pour l'étude cinétique des inhibiteurs dans la perspective d'une utilisation thérapeutique.

Les tests cinétiques d'inhibition ont été réalisés en utilisant une méthode colorimétrique en continu, qui consiste à suivre, à 405 nm, la libération du *p*-nitrophénolate provenant de l'hydrolyse du substrat Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly catalysée par la TGase tissulaire.¹¹⁴

Dans un premier temps, ne connaissant pas le comportement de ces inhibiteurs, nous avons préféré réaliser une première sélection rapide en déterminant les IC₅₀ au lieu des K_i car ils demandent beaucoup moins de données pour être déterminés (quatre fois moins). Dans un second temps, nous devrions revenir sur les plus efficaces pour étudier plus en détails leurs paramètres cinétiques (K_i et k_{inact}). Tous les IC₅₀ ont été déterminés dans les mêmes conditions ce qui nous permet de comparer les différents composés. Le caractère compétitif a été complètement démontré avec la molécule-parent (**2.14a**). (figure 2.7)

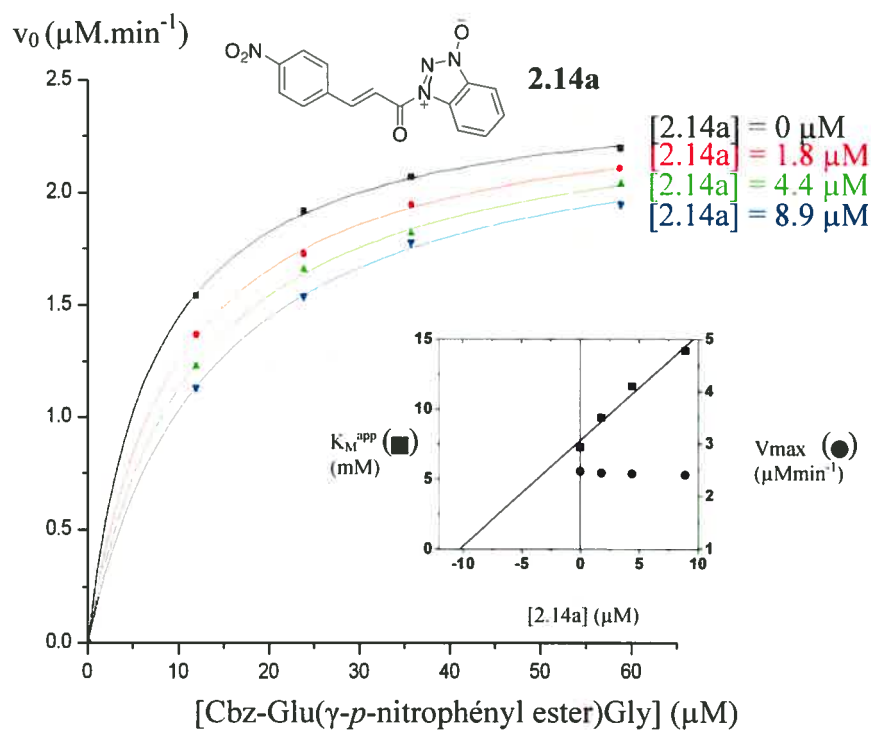


Figure 2.7 : Inhibition compétitive de la TGase tissulaire par l'amide cinnamoyle **2.14a**.

En effet, en traçant les courbes Michaelis-Menten pour chaque concentration d'inhibiteur nous constatons que la constante Michaelis-Menten K_M^{app} augmente en fonction de la concentration d'inhibiteur tandis que le V_{max} reste constant quelque soit la concentration d'inhibiteurs. Ces deux caractéristiques montrent bien le caractère compétitif de notre composé. Dans le cas d'une inhibition incompétitive ou non-compétitive, le V_{max} varierait en fonction de la concentration en inhibiteur.

2.4. Étude structure/activité

Une série de dérivés trans-cinnamoyles a été synthétisée en s'appuyant sur l'amide **2.14a** pour voir les éléments structuraux importants pour l'inhibition.

En effet, le dérivé *p*-nitrocinnamoyl oxybenzotriazolylamide **2.14a** présente de nombreux groupements qui peuvent influencer ou pas sur son inhibition vis-à-vis de la TGase. Parmi ces groupements, on peut indiquer le groupement nitro sur l'aromatique du cinnamoyle, la double liaison, la conjugaison, la taille de la molécule, le benzotriazole (aromaticité et azotes). Pour mieux comprendre le rôle de chacune des parties de cette molécule, une modification systématique de chaque partie a été réalisée afin d'étudier son influence.

2.4.1. Importance du substituant sur le cycle aromatique cinnamique

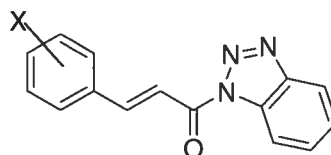
La première étude structure/activité a porté sur le rôle que peut jouer le substituant sur le cycle aromatique cinnamique. Sur la molécule-parent **2.14a** ce groupement est un nitro placé en position *para*. Une série d'analogues a donc été synthétisée en modifiant la nature de ce groupement mais également sa position sur le cycle aromatique. Ces analogues ont comme substituant respectivement le *p*-NO₂, *p*-MeO, *m*-MeO, *o*-MeO, *p*-Me, *m*-Me, *o*-Me, *p*-Cl, *o*-Cl, *p*-BocNH, *m*-BocNH, *p*-FmocNH et *p*-MeO₂C (**2.15a**, **2.15d**, **2.15e**, **2.15f**, **2.15g**, **2.15h**, **2.15i**, **2.15k**, **2.15m**, **2.15n**, **2.15o**, **2.15p** et **2.15q**). Tous ces composés ont été testés cinétiquement. À la vue des résultats (**tableau 2.2**), les inhibiteurs les plus efficaces de cette série sont ceux où le

substituant de l'aromatique cinnamique possède un oxygène hybridé sp^2 c'est-à-dire le p -NO₂ (**2.15a**), les BOCNH (**2.15n** et **2.15o**), le p -FmocNH (**2.15p**) et le p -MeO₂C (**2.15q**). En effet, tous les autres composés ne présentant pas cet oxygène hybridé sp^2 ne montrent pas une inhibition dans la limite de solubilité. Cet oxygène pourrait jouer un ou plusieurs rôles comme accepteur de pont hydrogène, base de Lewis.

De plus, un groupement volumineux en position *para* semble favoriser l'inhibition. En effet, parmi les analogues, les amides **2.15n** et **2.15p** portant respectivement le groupement p -BocNH et p -FmocNH qui sont les groupements les plus volumineux de la série montrent les meilleures IC₅₀ respectivement 18 μ M et 25 μ M. Les autres analogues de cette série ne présentent pas d'inhibition mesurable dans le domaine des concentrations utilisées que ce soit en position *para* qu'en position *mé*ta ou *ortho*.

Ces analogues ont donc montré l'importance d'un oxygène hybridé sp^2 au niveau du substituant de l'aromatique du cinnamoyle et la présence de gros groupements hydrophobes en position *para* favoriseraient l'inhibition.

Tableau 2.2 : Influence du groupement sur l'aromatique cinnamoyle des dérivés benzotriazolyles.



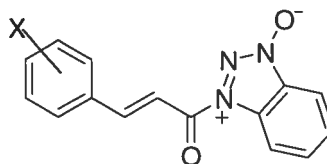
composé	X	IC ₅₀ (μM)
2.15a	4-NO ₂	74 ± 15
2.15d	4-MeO	> 100
2.15e	3-MeO	> 100
2.15f	2-MeO	> 100
2.15g	4-Me	> 100
2.15h	3-Me	> 100
2.15i	2-Me	> 100
2.15j	H	> 100
2.15k	4-Cl	> 100
2.15m	2-Cl	> 100
2.15n	4-BocNH	18 ± 1
2.15o	3-BocNH	39 ± 2
2.15p	4-FmocNH	25 ± 5
2.15q	4-MeO ₂ C	27 ± 4

erreurs indiquées proviennent de la régression linéaire.

Une autre série où le benzotriazole a été remplacé par l'oxybenzotriazole (**2.14l**, **2.14a-c**) a permis de délargir l'étude sur l'importance et le type de substituant sur le cycle aromatique du cinnamique. Les résultats (**tableau 2.3**) montrent que la position a son importance. Les dérivés ayant un substituant permettant une inhibition (substituant ayant un oxygène hybridé sp²) montrent un comportement différent suivant la position de ce substituant. La comparaison des amides **2.14a**, **2.14b** et **2.14c**, où le substituant est le groupement nitro placé respectivement en *para*, *mé*ta et *ortho*, montrent peu d'influence sur l'activité inhibitrice entre les positions *para* et *mé*ta mais une perte de l'inhibition quand le substituant est en position *ortho*.

Un dérivé particulier est celui ayant le groupement Cl en position *mé*ta (**2.14l**) car malgré le fait qu'il ne possède pas d'oxygène hybridé sp², il inhibe avec un IC₅₀ d'environ 41 μM.

Tableau 2.3 : Influence du groupement sur l'aromatique cinnamoyle des dérivés oxybenzotriazoles.

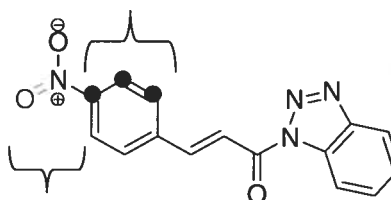


composé	X	IC ₅₀ (μM)
2.14a	4-NO ₂	43 ± 2
2.14b	3-NO ₂	24 ± 5
2.14c	2-NO ₂	> 100
2.14l	3-Cl	41 ± 9

erreurs indiquées proviennent de la régression linéaire.

Ces deux séries d'analogues ont donc montré l'importance de la présence d'un oxygène hybridé sp^2 au niveau du substituant de l'aromatique du cinnamoyle. Cet oxygène pourrait jouer un rôle d'accepteur de pont hydrogène avec un résidu de l'enzyme ou bien comme base de Lewis. Le substituant doit également être en position *para* ou *méta*, la position *ortho* étant défavorable pour l'inhibition. Des groupements volumineux hydrophobes semblent également favoriser l'inhibition. (**figure 2.8**)

importance de la position
du substituant sur le
cycle. (*para* et *méta*
favorisés)

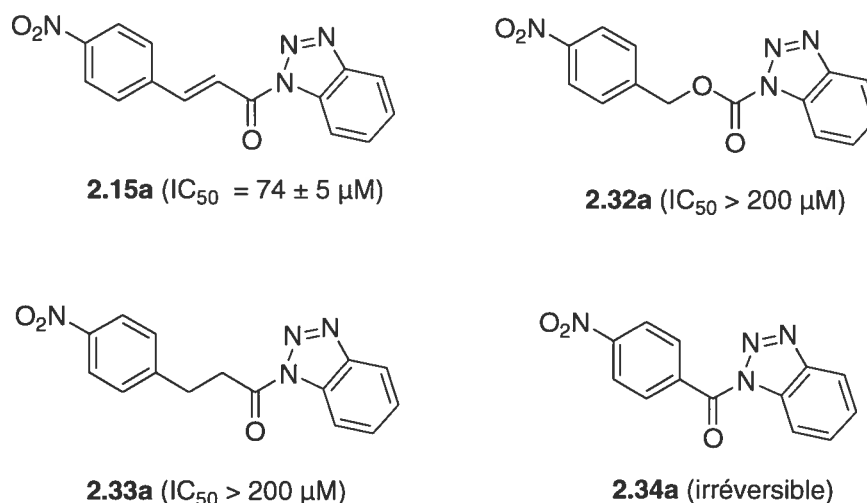


importance d'un O
hybridé sp^2 .

Figure 2.8 : Importance du substituant de l'aromatique du cinnamoyle.

2.4.2. Importance de la double liaison du cinnamate

La double liaison du cinnamate permet (i) de rigidifier la structure des dérivés pour donner des composés relativement planaires, (ii) la conjugaison sur toute la molécule. Pour voir si cette liaison joue un rôle important, le carbamate **2.32a**, le dérivé hydrocinnamate **2.33a** et l'amide **2.34a** ont été synthétisés et testés. (**figure 2.9**)



erreurs indiquées proviennent de la régression linéaire.

Figure 2.9 : Influence de la double liaison.

Le manque d'activité du carbamate **2.32a** (groupement cinnamoyle remplacé par un benzyl carbamate) et de l'hydrocinnamate **2.33a** (réduction de la double liaison) laisse suggérer que la double liaison à son importance soit au niveau de la rigidité car ce carbamate **2.32a** et cet hydrocinnamate **2.33a** ont des degrés de flexibilité plus grands, soit au niveau de la délocalisation car sans double liaison, on réduit la zone de délocalisation.

Cette série d'analogues a permis de découvrir également un inhibiteur irréversible. En effet, le *p*-nitrobenzoyl benzotriazolyl amide (**2.34a**) a montré un caractère irréversible contrairement à tous les autres dérivés. Ce comportement pourrait s'expliquer par une acylation d'un ou de plusieurs groupements nucléophiles de la TGase par le groupement *p*-nitrobenzoyle avec départ du benzotriazole. Ne présentant pas un caractère réversible, une étude plus approfondie de ce composé n'a pas été menée dans le cadre de cette étude mais il serait intéressant de voir si, en plus d'inhiber de façon irréversible, ce composé serait spécifique vis-à-vis de la TGase. La conjugaison tout le long des dérivés et la restriction conformationnelle semblent donc jouer un rôle important pour l'efficacité inhibitrice des composés synthétisés. (**figure 2.10**)

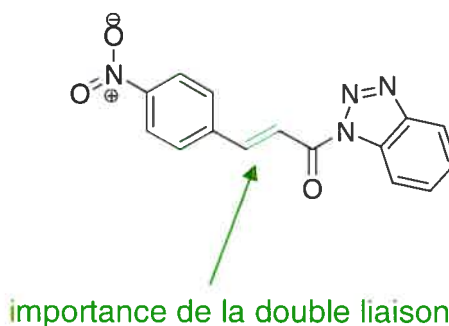
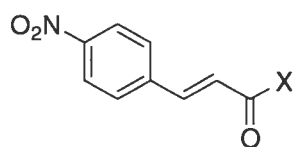


Figure 2.10 : Importance de la double liaison.

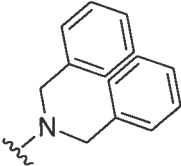
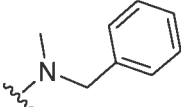
2.4.3. Importance du benzotriazole

Le benzotriazole pouvant être un bon groupement partant, les molécules synthétisées jusqu'à présent présentaient le risque de subir une attaque nucléophile ou une solvolysse avant même de pouvoir atteindre l'enzyme. Des dérivés plus stables ont donc été développés. Des analogues estérifiés et amidés ont été synthétisés et étudiés. (**tableau 2.4**)

Tableau 2.4 : Influence de la partie acylée.



composé	X	IC ₅₀ (μM)
2.15a		74 ± 15
2.14a		43 ± 2
2.16a		33 ± 2
2.18a		45 ± 10
2.19a		> 200
2.20a		> 200
2.21a		> 200
2.22a		> 200
2.23a		> 200
2.24a		> 200
2.25a		> 200

2.26a		57 ± 7
2.27a		> 200

erreurs indiquées proviennent de la régression linéaire.

L'amide pipéridine **2.24a** et pyrrolidine **2.25a**, les esters **2.20a** (aliphatique) et **2.19a** (aromatique) ainsi que les amides secondaires **2.21a**, **2.22a** et **2.23a** ne présentent pas d'inhibition détectable jusqu'au seuil de leurs solubilités. La perte d'activité des amides secondaires **2.21a**, **2.22a** et **2.23a** montre qu'il est important que le deuxième cycle soit attaché directement au cinnamique. Mais dans le cas où le cycle est lié directement au carbonyle de la partie cinnamique, une perte d'aromaticité (**2.24a** et **2.25a**) entraîne également une perte d'activité de ces composés. Cependant ces derniers composés ne sont pas exactement un mime d'un benzotriazole non-aromatique car deux azotes manquent et la présence d'un accepteur de pont hydrogène semble important en s'appuyant sur des résultats donnés plus loin.

Tous les dérivés où le benzotriazole (qui est un cycle aromatique possédant des accepteurs de pont hydrogène) est remplacé par un cycle aromatique possédant au moins un atome d'azote permettant d'accepter un pont hydrogène, montrent une inhibition. En effet, l'imidazolide **2.18a**, l'amide 1-hydroxybenzotriazole **2.14a** et l'amide 1-hydroxy-7-oazabenzotriazole **2.16a** ont des IC_{50} variant de 33 μ M à 45 μ M. (**figure 2.11**)

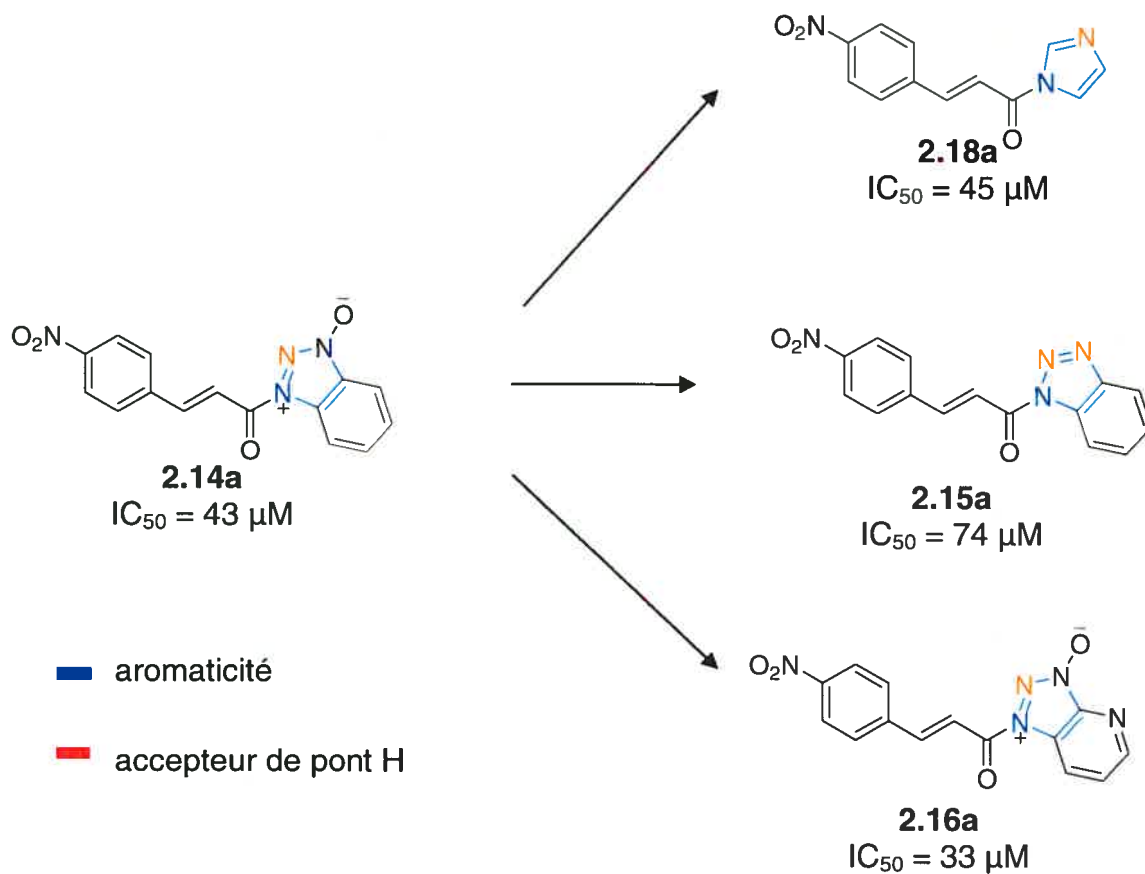


Figure 2.11 : Importance de la partie benzotriazole.

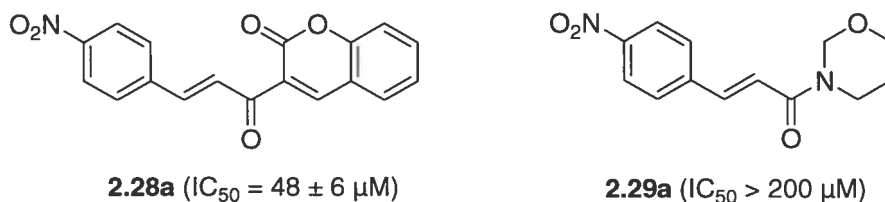
L'amide imidazole **2.18a** montre également que le cycle benzène du groupement benzotriazole n'est pas important pour la reconnaissance de l'inhibiteur par la TGase tissulaire.

Dans cette série d'esters et d'amides, le dibenzyl amide **2.26a** a un comportement particulier. Malgré le fait que les cycles aromatiques ne soient pas liés directement au carbonyle du cinnamoyle et qu'il n'y ait pas d'accepteur de pont hydrogène, ce composé montre une inhibition avec un IC_{50} égal à 57 μM . Or le remplacement d'un des benzyles par un méthyle (amide **2.27a**) entraîne une perte d'activité. Il semblerait donc que pour le dibenzyl amide **2.26a** la présence des deux aromatiques soit importante. Des études plus approfondies sur ce composé particulier n'ont pas été menées considérant que son interaction avec l'enzyme pourrait être différente des autres inhibiteurs découverts et que son activité inhibitrice n'est pas meilleure que celle de nos meilleurs dérivés.

Notre étude structure/activité sur la partie benzotriazole s'est finalement concentrée sur l'importance d'un accepteur de pont hydrogène au niveau de ce groupement. Le benzotriazole a donc été remplacé par un groupement 3-pyridine (**2.30a**) et phényl (**2.31a**). Les tests d'inhibitions montrent que le (*E*)-3-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-èn-1-one **2.30a** montre une activité inhibitrice avec un IC_{50} égal à 21 μM . Ceci s'expliquerait par le fait qu'on a remplacé le benzotriazole par un cycle aromatique qui possède un accepteur de pont hydrogène (l'azote), ce qui est en accord avec les conclusions faites précédemment. Si l'azote n'est plus présent (l'énone **2.31a**) l'inhibition n'est plus détectable ce qui montre bien l'importance de cet azote. Afin de mieux comprendre l'importance des ponts hydrogène, le dérivé coumarine **2.28a** a été synthétisé et testé. (**figure 2.12**) La coumarine possédant deux oxygènes pouvant faire des ponts hydrogène, l'inhibition envisagée présente un IC_{50} de 48 μM .

En sachant l'importance d'un accepteur de pont hydrogène au niveau du groupement benzotriazole, il a été intéressant de voir l'implication de l'aromaticité d'un tel groupement qui agit sur la planarité mais également sur la délocalisation des électrons sur toute la molécule. Il a donc été synthétisé l'amide **2.29a** où le benzotriazole a été remplacé par le groupement 1,3-oxazinan-3-yl. Ce groupement n'est pas aromatique et conserve néanmoins un accepteur de pont hydrogène grâce à la présence de l'oxygène de ce cycle. Les tests d'inhibition montre que ce composé n'a aucune

activité inhibitrice dans le domaine de solubilité ce qui montre ainsi l'importance de l'aromaticité au niveau de ce groupement. (**figure 2.12**)

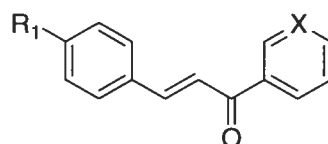


erreurs indiquées proviennent de la régression linéaire.

Figure 2.12 : Importance de l'aromaticité et d'un accepteur de pont hydrogène pour le groupement acylé.

Les dérivés azachalcones montrant une meilleure solubilité par rapport aux dérivés benzotriazole, une très courte série a été synthétisée en faisant varier le substituant sur l'aromatique de la partie cinnamoyle. (**tableau 2.5**)

Tableau 2.5 : Influence du groupement sur l'aromatique cinnamoyle dans les azachalcones.



composé	R ₁	X	IC ₅₀ (μM)
2.30a	NO ₂	N	21 ± 4
2.31a	NO ₂	CH	> 200
2.30r	NH ₂	N	148 ± 27
2.30t	AcNH	N	28 ± 4

erreurs indiquées proviennent de la régression linéaire.

Cette étude a permis de confirmer l'importance d'avoir un oxygène hybridé sp^2 au niveau du substituant. En comparant l'azachalcone **2.30r** et **2.30t**, seul un groupement acétyle les différencie mais la constante d'inhibition est cinq fois plus grande en absence du groupement acétyle. Ces dérivés permettent d'envisager le développement d'inhibiteurs potentiellement intéressants. En effet, changer le substituant ou sa place sur l'aromatique pourrait être intéressant. Changer de place l'azote du groupement pyridine pourrait donner des informations également intéressantes.

L'étude structure/activité basée sur le groupement benzotriazole a permis de montrer qu'une aromaticité et un accepteur de pont hydrogène favorise l'inhibition de la TGase par ces composés. (**figure 2.13**)

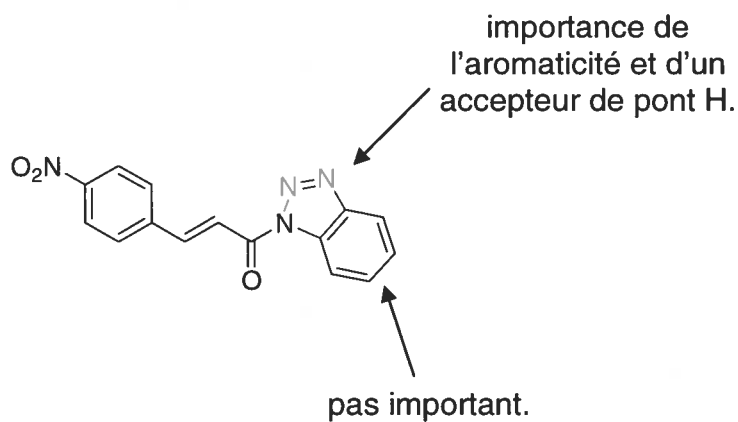


Figure 2.13 : Importance du benzotriazole.

2.4.4. Distance entre les deux parties aromatiques

Dans le but de voir si la distance entre les deux parties aromatiques a de l'importance dans l'inhibition, l'amide **2.37a** et l'azachalcone **2.38a** ont été synthétisées et testées. (**figure 2.14**)

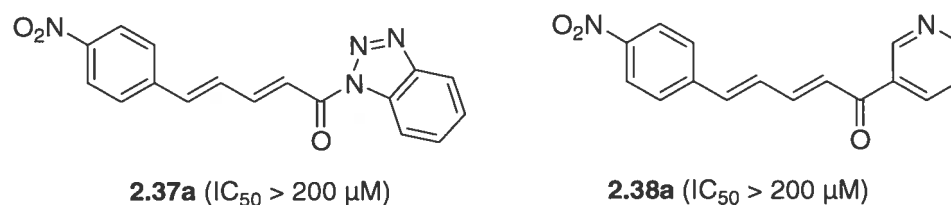


Figure 2.14 : Importance de la distance entre les deux parties aromatiques.

L'allongement de la distance entre les deux parties aromatiques a été réalisé grâce à une double liaison ce qui permet de garder la conjugaison mais également la rigidité. Le manque d'inhibition de ces deux composés montre l'importance d'une certaine distance entre les deux groupements aromatiques. (**figure 2.15**) Ce résultat suggère que les dimensions du site où se fixe ces inhibiteurs sont limitées.

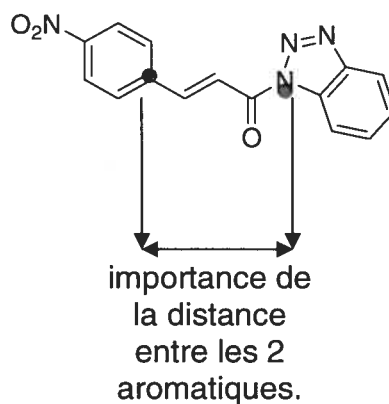
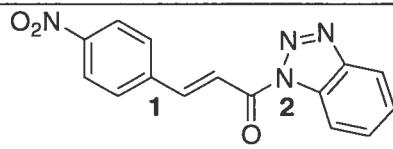
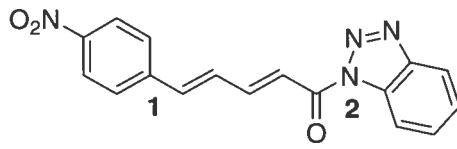
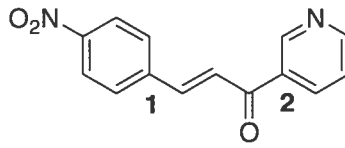
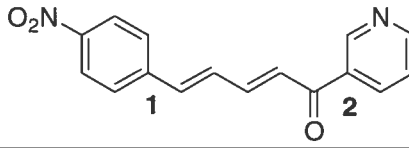


Figure 2.15 : Importance de la distance entre les deux parties aromatiques.

Pour appuyer cette observation, une modélisation à l'aide du logiciel HyperChem Pro 6 suivie d'une minimisation semi-empirique (AM1) a été effectuée sur les amides **2.15a**, et **2.37a** et sur les azachalcones **2.30a** et **2.38a** pour chiffrer la distance entre les deux parties aromatiques. (**tableau 2.6**). Premièrement, la modélisation de ces composés a montré des structures quasi-planaires qui sont concordantes avec la structure cristalline obtenue avec l'amide **2.14a**. (**figure 2.4**) Deuxièmement, les distances calculées montrent bien une différence non-négligeable des distances entre les deux aromatiques si on compare l'amide **2.37a** avec l'amide **2.15a** (1.5 fois plus long) ou bien l'azachalcone **2.30a** avec l'azachalcone **2.38a** (1.5 fois plus long).

Tableau 2.6 : Distances entre les deux aromatiques pour les composés **2.15a**, **2.30a**, **2.37a** et **2.38a**.

composé	structure	$d_{C1-C2 \text{ ou } C1-N2}$ (Å)
2.15a		4.96
2.37a		7.42
2.30a		4.98
2.38a		7.43

2.5. Localisation de l'inhibition au niveau de l'enzyme

Les composés de ce chapitre montrant une activité inhibitrice sont tous de type compétitif. Comme le nom l'indique ils sont donc en compétition avec un élément essentiel pour l'activité de la TGase. Mais avec quelle molécule rentrent-ils en compétition?

La plupart des inhibiteurs synthétisés, qui sont essentiellement irréversibles, cible le site actif donc ils sont en compétition avec le substrat donneur. C'est pour cette raison que ce sont en général des analogues de substrats de la TGase et plus particulièrement du substrat Cbz-Gln-Gly^{105, 106} qui est un des composés les plus utilisés pour étudier cette enzyme. Cette ressemblance de structure entre ces inhibiteurs et le substrat permet ainsi une compétition au niveau du site actif. L'inhibiteur peut donc s'apposer au niveau du site actif et empêcher l'accessibilité de ce site au substrat ce qui entraîne l'inhibition. Si on regarde nos inhibiteurs réversibles et compétitifs, force est de constater que leurs structures ne sont pas très proches du substrat Cbz-Gln-Gly ou de tout autre substrat donneur de la TGase. Mais ce manque d'analogie ne doit pas nous empêcher de penser que nos inhibiteurs pourraient être en compétition pour le site actif ou plus particulièrement pour la zone d'entrée au site actif. En effet, par modélisation,⁹⁰ nous avons constaté que l'entrée du site actif se situe au niveau d'un sillon hautement hydrophobe. **(Figure 2.16)** Nos composés très riches en éléments hydrophobes pourraient donc seulement s'apposer sur la surface du sillon par des interactions hydrophobe-hydrophobe et ainsi boucher l'accès au tunnel du site actif. La modélisation par "docking" automatique a été effectuée dans le laboratoire du Prof. Keillor et a été réalisée avec l'amide **2.15a** et la TGase tissulaire de la dorade rouge, une des seules TGases qui a été cristallisée,⁸⁴. Ce modèle semble donner du poids à l'hypothèse émise. **(Figure 2.16)** Cette hypothèse peut, également, être renforcée par le fait que les inhibiteurs les plus efficaces semblent être ceux qui sont plus hydrophobes.

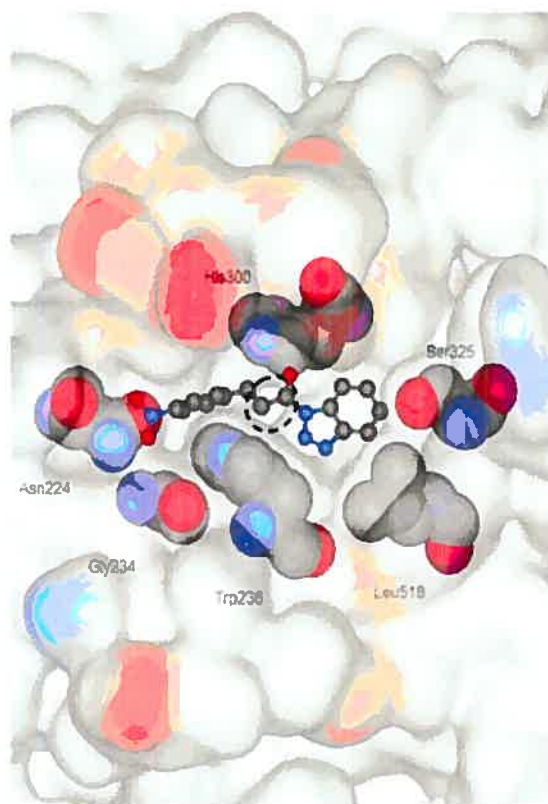
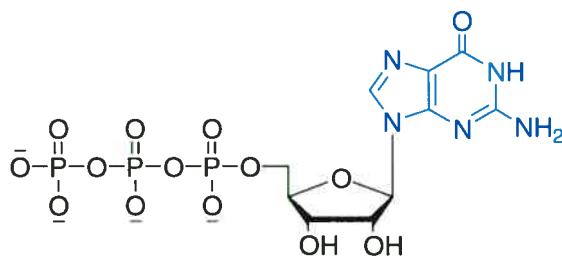


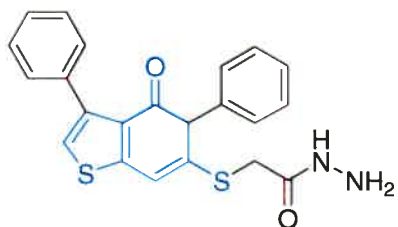
Figure 2.16 : Amide **2.15a** apposé sur le sillon menant au site actif de la TGase.

Une deuxième hypothèse serait que nos inhibiteurs soient en compétition avec le site de fixation pour le GTP. En effet, en plus de leur activité catalytique dépendante de Ca^{2+} , typique des TGases et permettant la formation de liens isopeptidiques, les TGases tissulaires sont régulées allostériquement par le GTP. L'activité de transamidation de ces enzymes peut être inhibée par le GTP ou d'autres nucléotides par un mécanisme allostérique dans lequel le nucléotide se fixe dans une région de l'enzyme différente du site où s'effectue la réaction de transamidation.^{80, 122-124} Cette fixation de GTP induit alors un changement conformationnel qui diminue l'interaction de la TGase avec Ca^{2+} , cation essentiel pour la formation d'isopeptides et inhibe ainsi l'activité de transamidation de la TGase. Les inhibiteurs réversibles dérivés du thiéno[2,3-d]pyrimidin-4-one acylhydrazide (**2.8a-m**)¹⁰⁷ semblent faire partie de ce type d'inhibiteur qui sont en compétition avec le site de fixation du GTP plutôt que le site

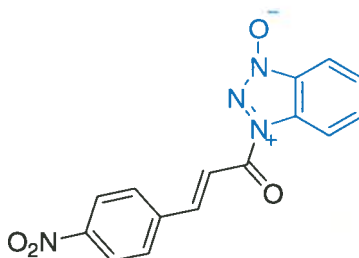
catalytique.¹⁰⁸ En comparant les structures du GTP et de l'acylhydrazide **2.8a**, (figure 2.17) il est assez difficile d'imaginer une analogie entre les deux molécules à part la présence dans chacune de ces molécules d'un bicyclic [5,6] et de donneurs de ponts hydrogène.



GTP



2.8a



2.14a

Figure 2.17 : Structures du GTP, de l'acylhydrazide **2.8a** et de l'amide **2.14a**.

En supposant donc que ce bicyclic aide fortement à la reconnaissance pour le site du GTP, on pourrait penser que nos dérivés benzotriazoles pourraient être en compétition pour le même site car on retrouve un bicyclic [5,6] avec au moins un donneur de pont hydrogène. Cependant, l'amide **2.18a** où le benzotriazole est remplacé par l'imidazole garde toute son activité inhibitrice ce qui suppose que le cycle à six du benzotriazole ne semble pas être important pour le mode d'inhibition de nos dérivés. Donc l'analogie avec le GTP est encore plus faible. On ne peut pas, cependant, réfuter ce mode d'inhibition mais des travaux supplémentaires devraient être menés pour mieux connaître où se fixent plus précisément nos inhibiteurs.

Dans cette optique de mieux comprendre le mode de fonctionnement de nos dérivés, deux analogues (l'amide **2.43** et l'azachalcone **2.44**), qui pourraient marquer la TGase par irradiation, ont été synthétisés (**figure 2.18**) basée sur le marquage à l'aide du groupement diazirine¹²⁵ et sont entrain d'être analysés pour voir la faisabilité de la méthode. Cette méthode consisterait à incuber notre inhibiteur-marqueur avec la TGase puis irradier la solution pour essayer de fixer l'inhibiteur sur la TGase. Cette TGase ainsi marquée, serait ensuite digérée par la trypsine et les fragments présentant une masse plus importante donneront une indication de l'endroit de fixation de nos inhibiteurs.

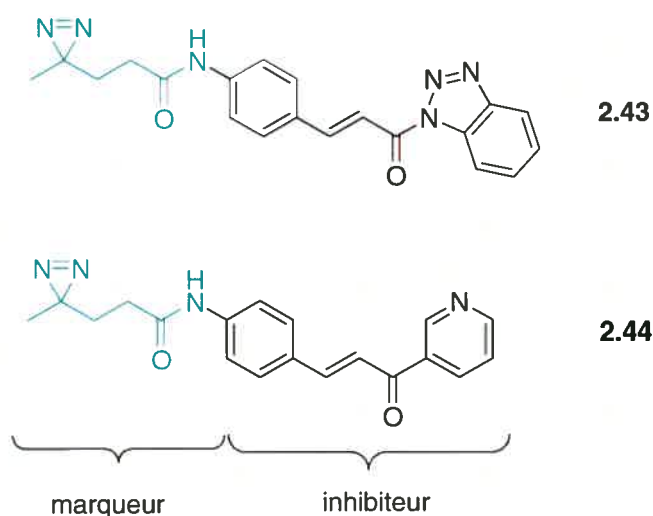


Figure 2.18 : Marqueurs analogue des inhibiteurs étudiés.

2.6. Spécificité

Les dérivés synthétisés dans cette partie ne ressemblant aucunement à un substrat de la TGase tissulaire, un questionnement sur sa spécificité peut être soulevé. Ne pouvant pas tester toutes les enzymes, une sélection de 2 enzymes a été faite. Nous avons testé les amides **2.14a**, **2.15p**, **2.18a**, **2.28a** et le dérivé coumarine **2.30a** sur la caspase 3 et le Facteur XIIIa. Le Facteur XIIIa ont été choisi dû au fait qu'il appartient à la famille des transglutaminases et une inhibition *in vivo* de cette enzyme peut entraîner des perturbations physiologiques comme une mauvaise coagulation. La caspase 3 a été choisie car elle appartient à la famille d'enzymes à cystéine dont le mécanisme passe également par un acyle-enzyme. Les tests de spécificité ont montré une absence d'inhibition vis-à-vis des deux enzymes testées dans le domaine de concentration testable (seuil de solubilité). Une seule exception est l'inhibition de 28 % de la caspase 3 par le dérivé de coumarine **2.28a** à la concentration de 6 μM , ce qui correspondrait à un IC_{50} d'environ 11 μM ce qui est comparable aux IC_{50} trouvés pour la TGase tissulaire.

2.7. Conclusion

Une série d'inhibiteurs réversibles et compétitifs a été synthétisée et testée. Une étude structure/activité a été menée et a permis de tirer plusieurs conclusions sur l'importance des différents éléments de ces inhibiteurs. La présence d'un oxygène hybridé sp^2 au niveau du substituant sur le cycle aromatique du cinnamique semble important. La conjugaison et la rigidité de ces molécules jouent également un rôle. La présence d'un accepteur de pont H au niveau du benzotriazole permet de garder l'activité inhibitrice. La distance entre les deux cycles aromatiques a également un rôle dans cette inhibition. (**figure 2.19**)

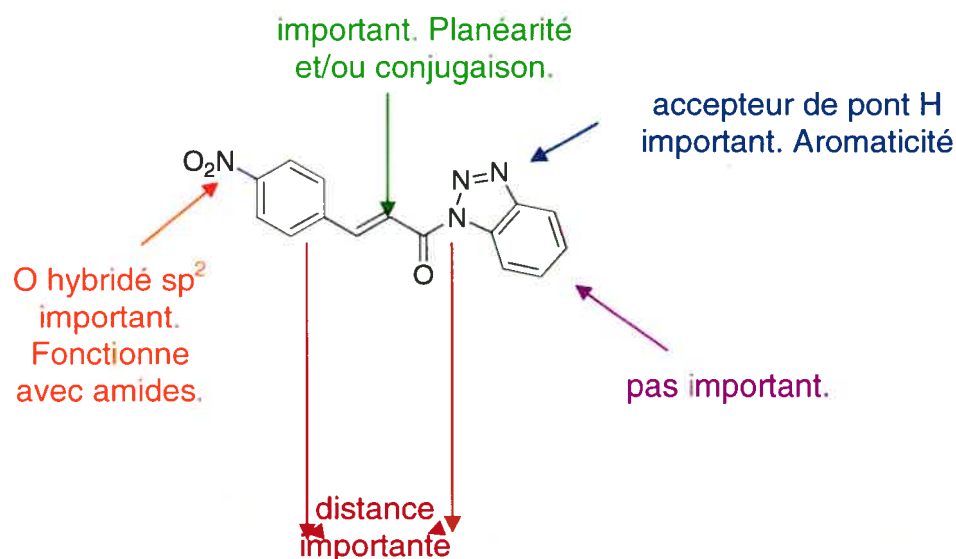


Figure 2.19 : Parties importantes pour l'inhibition.

Cette série de composés n'a pas permis d'améliorer de façon drastique la solubilité ou l'efficacité. Par contre, elle nous a donné les bases pour le développement d'une nouvelle série basée sur la cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azide et un alcyne¹²⁶ (réarrangement de Huisgen) pour donner un triazole (aromatique et possédant au moins un accepteur de proton) (**schéma 2.7**). Cette nouvelle série d'inhibiteurs est en cours d'évaluation pour voir si l'inhibition peut être conservée tout en essayant d'améliorer, cette fois-ci, les caractéristiques pharmacocinétiques des inhibiteurs.

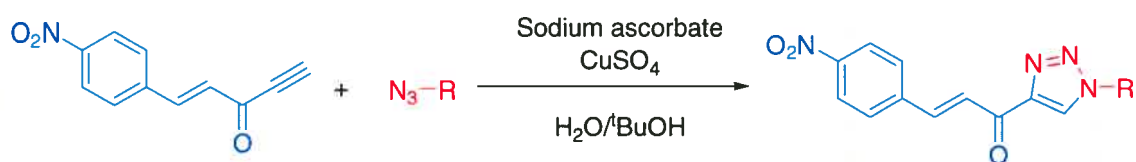


Schéma 2.7 : Nouvelle série d'inhibiteurs obtenue par la cycloaddition 1,3-dipolaire.

CHAPITRE 3

Inhibiteurs compétitifs et irréversibles

3.1. Introduction

Le développement d'inhibiteurs irréversibles pour la médication est en vogue et est supporté par le fait que, contrairement aux inhibiteurs réversibles, le maintien d'une concentration constante de l'inhibiteur dans le corps n'est pas nécessaire.¹⁵ Le grand défi pour le développement de ce type d'inhibiteur est notamment la spécificité. En effet, beaucoup de ces inhibiteurs sont dotés d'un groupement réactif permettant l'alkylation ou l'acylation au niveau du site actif. Il y existe donc toujours le risque que ces groupements réagissent avec d'autres espèces qui posséderaient, elles aussi, un groupement pouvant réagir avec l'inhibiteur. Ces inhibiteurs très peu sélectifs ne sont pas de bons candidats pour la médication mais peuvent être utiles pour une meilleure compréhension des mécanismes *in vitro*. De nombreux inhibiteurs irréversibles non spécifiques ou très peu spécifiques ont été développés pour la TGase. Parmi eux, on peut nommer les sulfonamides,^{92, 93} les iodoacetates,⁹⁴⁻⁹⁷ les isocyanates,⁹⁸ les thiourées,⁹⁹ les dérivés de l'acivicine,^{100, 101} les méthyles cétones sulfoniques,¹⁰² les hétérocycles thioactonylés¹⁰³ et les analogues électrophiles de la glutamine.¹⁰⁴ (**figure 1.2**) Tous ces inactivateurs ont permis l'amélioration des connaissances sur la TGase.

Mais si le but n'est plus la compréhension mais la médication, le caractère « spécifique » devient primordial. Donc, tout en gardant les groupements qui permettent l'alkylation ou l'acylation, les inhibiteurs doivent présenter des éléments qui permettent une meilleure reconnaissance par l'enzyme d'intérêt. Un substrat très utilisé pour les études de la TGase est le *N*-carbobenzoxy-L-glutaminyglycine.¹²⁷ En se basant sur cette structure, une série d'inhibiteurs a été synthétisée dans le groupe du Prof. Keillor et a démontré, en plus d'une bonne efficacité inhibitrice, une grande affinité pour la TGase tissulaire. Parmi ces inhibiteurs, on pourrait citer des dérivés 1,2,3-thiadizoles¹⁰⁵ (**1.14a**), des amides α,β -insaturés¹⁰⁶ (**1.14b**) et des époxydes (**1.14c**). (**figure 1.3**)

Dans le but de simplifier les molécules inhibitrices de la TGase tissulaire tout en conservant une certaine spécificité, une série de 8 nouveaux inhibiteurs (**3.4a-d**, **3.5a-c** et **3.7b**) a été synthétisée et testée comme inhibiteurs irréversibles. (**figure 3.1**)

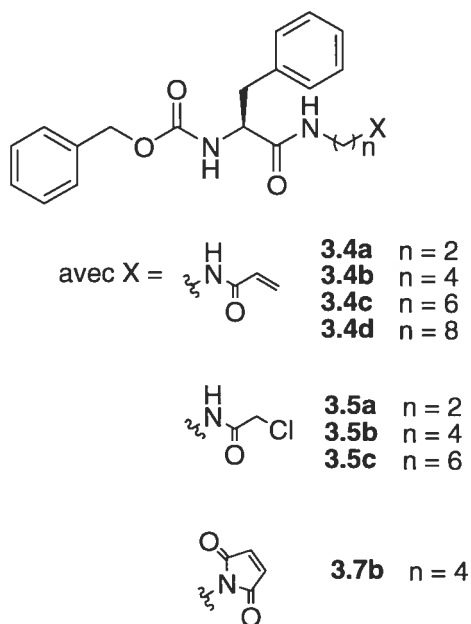


Figure 3.1 : Structures des inhibiteurs synthétisés et testés.

Le squelette de ces inhibiteurs est basé sur l'acide aminé *N*-carbobenzyloxy-L-phénylalanine (Cbz-Phe) selon des travaux récemment publiés.¹¹² Par contre, le groupement électrophile qui est responsable de l'inhibition α , pour sa part, été modifié. Un groupement amide α,β -insaturé, chloroacetamide ou maléimide a donc été utilisé. De plus, le choix de ces trois groupements électrophiles a permis une comparaison de leur efficacité relative. La longueur de l'espaceur entre la phénylalanine et le groupe électrophile a également été sujette à des modifications afin d'évaluer son importance. Finalement le *N*-propylacrylamide a été synthétisé et testé pour déterminer l'importance de la partie Cbz-Phe sur l'affinité.

3.2. Synthèse

Tous les inhibiteurs synthétisés dans cette partie partent de la même molécule commerciale, soit le Cbz-Phe. L'activation de ce Cbz-Phe en formant l'ester *p*-nitrophényle correspondant a été réalisée en suivant un protocole¹²⁸ déjà établi utilisant la triéthylamine comme base et la diméthylaminopyridine comme catalyseur dans l'acétonitrile. Cet ester *p*-nitrophényle a été obtenu avec un rendement de 68 % et a été ensuite couplé avec différents diamino alcanes dans l'acétonitrile pour donner Cbz-Phe-NH-(CH₂)_n-NH₂ avec des rendements variant de 27 à 82 %. (**schéma 3.1**)

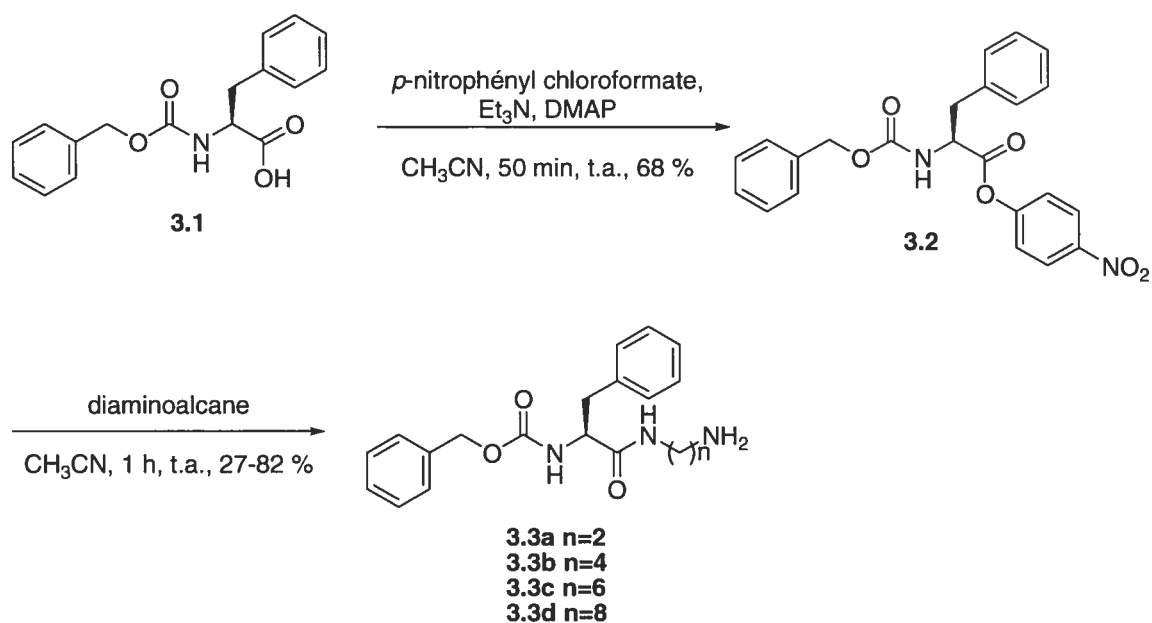


Schéma 3.1 : Synthèse des intermédiaires aminés.

À partir de ce squelette aminé, les acrylamides **3.4a-3.4d** ont été synthétisés en utilisant le chlorure d'acryloyle en présence de la triéthylamine dans l'acétonitrile avec des rendements variant de 29 à 46 %. (**schéma 3.2**)

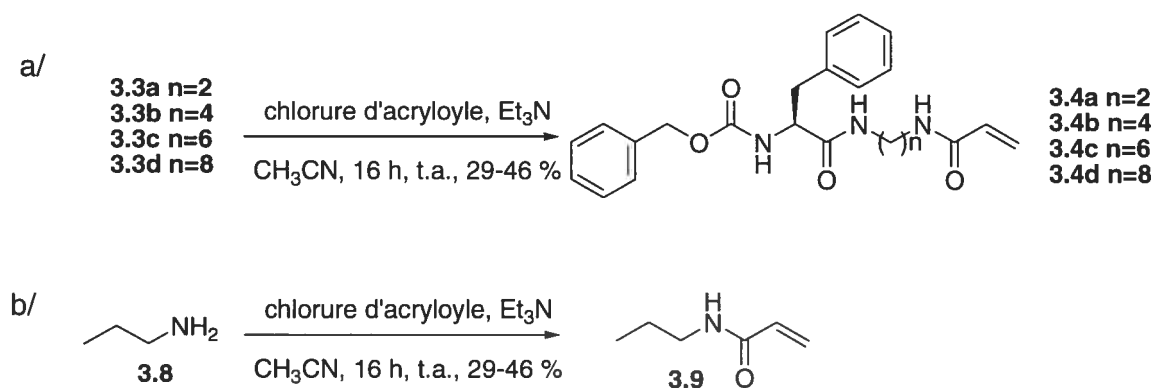


Schéma 3.2 : Synthèse des dérivés amidés α,β -insaturés.

Les chloroacétamides **3.5a-3.5c** ont, quant à eux, été synthétisés en utilisant l'anhydride chloroacétique et la triéthylamine comme base dans l'acétonitrile avec des rendements variant entre 28 et 56 %. (**schéma 3.3**)

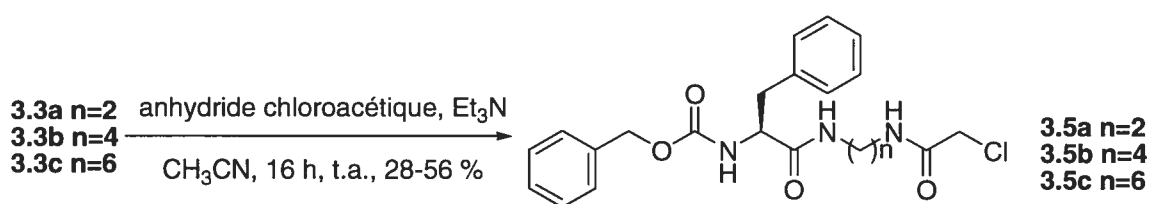


Schéma 3.3 : Synthèse des dérivés chloroacétamides.

De plus, un dérivé maléimide **3.7b** a été synthétisé à partir de l'anhydride maléique en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pour donner la maléamide **3.6b**. Ce composé a ensuite été cyclisé en maléimide à l'aide d'anhydride acétique et d'acétate de sodium pour donner le maléimide **3.7b** avec un rendement global de 37 %. (schéma 3.4)

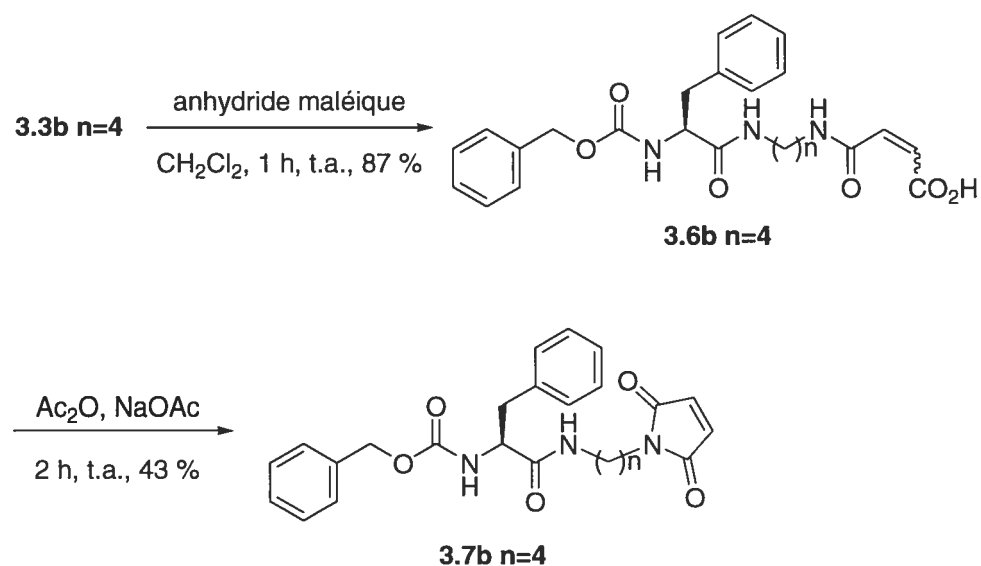


Schéma 3.4 : Synthèse du dérivé maléimide.

Bien qu'aucun des rendements n'ait été optimisé, les composés finaux ont été obtenus facilement et en quantité suffisante pour les études cinétiques.

3.3. Cinétique

Pour tous les composés montrant une activité inhibitrice, une inhibition mono-exponentielle dépendant du temps a été observée, ce qui est en accord avec l'inactivation de l'enzyme de façon irréversible. L'irréversibilité a, de plus, été confirmée par un manque d'activité après avoir dilué l'échantillon d'un facteur de cent, pour permettre la dissociation de tout complexe non-covalent enzyme-inhibiteur. Les tests cinétiques d'inhibition ont été menés en utilisant deux méthodes continues, l'une colorimétrique¹¹⁴ et l'autre fluorimétrique,¹¹⁵ les deux méthodes donnant des résultats comparables. Les vitesses d'inactivation pour déterminer les paramètres cinétiques k_{inact} et K_i (schéma 3.5) sont rapportées dans la section expérimentale.

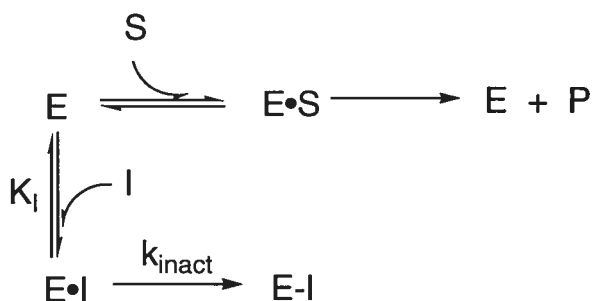


Schéma 3.5 : Mécanisme de l'inhibition irréversible.

3.4. Évaluation du pouvoir inhibiteur

3.4.1. Les dérivés amides α,β -insaturés

Les constantes K_I déterminées pour les amides α,β -insaturés **3.4a-3.4d** (tableau 3.1) varient très peu d'un composé à l'autre, de 3.5 à 13 μM .

Tableau 3.1 : Paramètres cinétiques pour les inhibiteurs amidés α,β -insaturés **3.4a-3.4d**.

inhibiteur	n	k_{inact} (min^{-1})	K_I (μM)	k_{inact}/K_I ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
3.4a	2	0.42 ± 0.03	9 ± 2	0.047 ± 0.009
3.4b	4	0.36 ± 0.03	4.5 ± 1.0	0.080 ± 0.020
3.4c	6	0.90 ± 0.12	13 ± 3	0.069 ± 0.017
3.4d	8	0.38 ± 0.02	3.5 ± 1.0	0.109 ± 0.036

erreurs indiquées proviennent de la régression non-linéaire basée sur le modèle d'inhibition de ce type d'inhibiteurs (schéma 3.5).

Des inhibiteurs similaires (**1.16**) ayant le même squelette Cbz-Phe mais avec un dihydroisoxazole comme groupement électrophile¹¹² avaient déjà été synthétisés et testés. Les constantes d'affinité de ces dérivés dihydroisoxazole étaient, environs, cinquante fois plus grandes que celles des composés synthétisés (**3.4a-3.4d**) ce qui suggère que des grands cycles aromatiques ont plus de difficultés à s'accommoder au niveau du site actif de la TGase.⁹⁰ Par contre si on compare les composés **3.4a-3.4d** avec des composés synthétisés (**2.7a-d**) dans le groupe et possédant les mêmes groupements électrophiles,^{106, 129} ces derniers ont démontré que le squelette Cbz-Lys-Gly (**figure 3.2**) était plus efficace pour la reconnaissance, leurs constantes d'affinité étant d'au moins un ordre de magnitude plus petites.

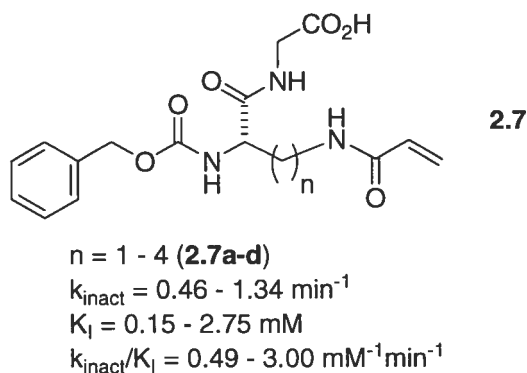


Figure 3.2 : Analogues α,β -insaturés étudiés dans le groupe du Pr. Keillor.

Les efficacités inhibitrices ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$) des composés **3.4a-3.4d** suivent la même tendance que le coefficient d'inhibition K_{I} c'est-à-dire qu'ils sont trois à vingt fois moins efficaces que les inhibiteurs **2.7a-d** mais quatre à cinquante fois plus efficaces que les dérivés **1.16** basés sur le squelette Cbz-Phe.

Une relation entre l'efficacité et la longueur de l'espaceur a , également, été observée. Plus l'espaceur est grand, plus l'inhibiteur semble efficace. Cette tendance a été également observée sur trois autres séries d'inhibiteurs irréversibles^{105, 129} (**3.10a-b**, **3.11a-d**, **3.12a-c**) possédant un squelette différent de celui sur lequel on s'est basé (**figure 3.3**) et pourrait s'expliquer par la façon dont l'enzyme fixe le substrat donneur de groupement acyle.

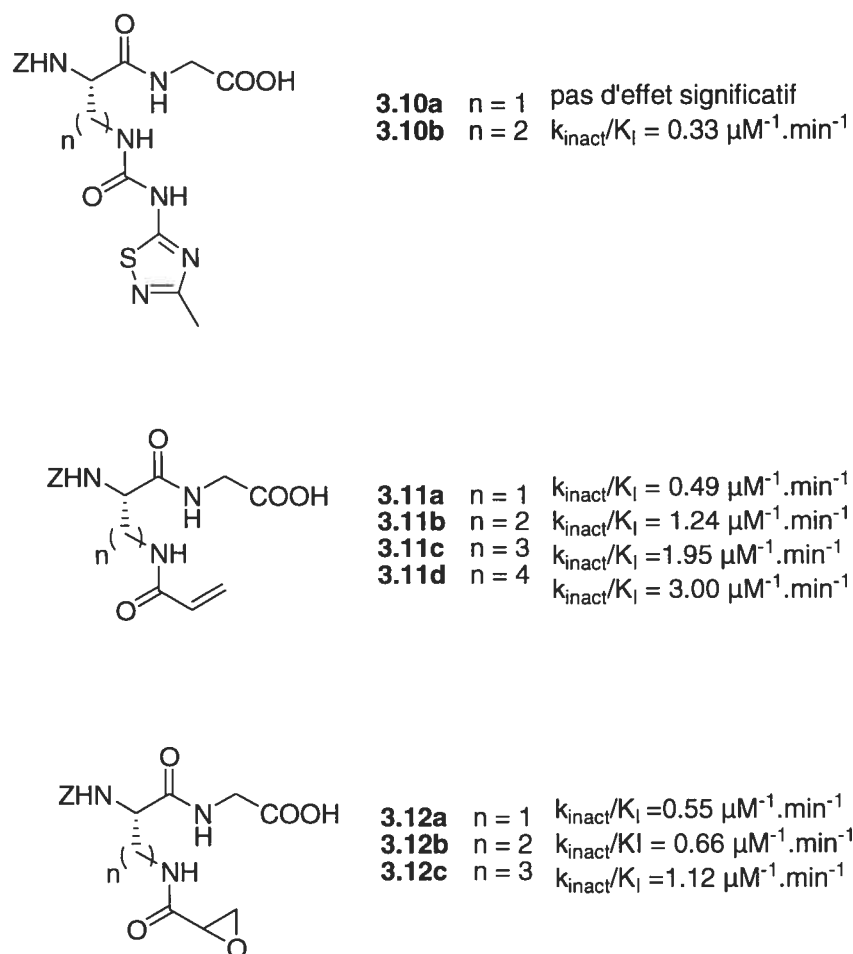


Figure 3.3 : relation entre l'efficacité et la longueur de l'espaceur.

En effet, la TGase est connue pour ne pas réagir avec un résidu asparagine mais uniquement avec des résidus glutamines qui ont un carbone de plus sur la chaîne latérale. De plus, la modélisation moléculaire⁹⁰ semble montrer que le résidu asparagine est trop court pour réagir avec le thiol du site actif ce qui n'est pas le cas pour la glutamine. Une chaîne plus grande, et donc plus flexible, pourrait se positionner plus favorablement pour réagir avec le thiol du site actif. Des inhibiteurs présentant de plus grands espaceurs seraient intéressants à étudier, mais l'inhibiteur avec $n = 8$ (**3.4d**) s'est révélé trop peu soluble que pour obtenir des résultats exploitables. Une option qui pourrait, peut-être, permettre de continuer d'explorer cette piste serait de changer la chaîne alkyle pour une chaîne de type polyéthylèneglycol (PEG).

3.4.2. Les dérivés chloroacétamides

Les paramètres cinétiques des dérivés chloroacétamides **3.5a-3.5c** (tableau 3.2) sont similaires à ceux trouvés pour les dérivés amides α,β -insaturés **3.4a-3.4d**. À noter que le chloroacétamide **3.5a** n'a aucune activité inhibitrice ce qui est sans doute dû au fait qu'il s'agit du plus court inhibiteur étudié. Le carbone électrophile de la partie chloroacétamide est plus près du Cbz-Phe que l'est celui de l'acrylamide **3.4a**. Donc, si on se base sur l'hypothèse développée ci-dessus, le groupe électrophile ne peut peut-être pas se positionner de manière efficace pour agir avec le thiol du site actif et ainsi inhiber l'enzyme.

Tableau 3.2 : Paramètres cinétiques pour les inhibiteurs chloroacétamides **3.5a-3.5c**.

inhibiteur	n	k_{inact} (min^{-1})	K_{I} (μM)	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
3.5a	2	Pas d'inhibition observée		
3.5b	4	0.76 ± 0.11	73 ± 17	0.010 ± 0.001
3.5c	6	0.32 ± 0.04	6 ± 2	0.053 ± 0.017

erreurs indiquées proviennent de la régression non-linéaire basée sur le modèle d'inhibition de ce type d'inhibiteurs (schéma 3.5).

3.4.3. Le dérivé maléimide

La faible solubilité de ce composé et sa grande constante d'inhibition ($K_{\text{I}} > 160 \mu\text{M}$) n'ont pas pu permettre la détermination de paramètres cinétiques précis. Cette grande constante peut s'expliquer par un problème stérique dû au maléimide qui ne pourrait pas s'accommoder au niveau du tunnel qui mène au site actif.⁹⁰ Ce comportement putatif serait comparable à celui des inhibiteurs de type **1.16** ayant un dihydroisoxazole comme groupement électrophile.

Si on compare la série avec le groupement acrylamide et maléimide, les composés ne diffèrent que par un seul carbonyle venant compléter l'hétérocycle.

Cependant l'activité est totalement différente. Normalement, la réactivité des maléimides est supérieure à celle des acrylamides, car la présence du deuxième carbonyle vient activer le lien double, le rendant plus électrophile. On pourrait donc penser que le k_{inact} des analogues maléimides serait plus élevé que celui des acrylamides. Cependant la différence pourrait s'expliquer par un K_i très élevé dû à une mauvaise affinité ($K_i > 160 \mu\text{M}$). Cette diminution flagrante d'affinité serait causée par le grand volume du maléimide. En effet, cet hétérocycle, étant plus volumineux que l'acrylamide, aurait de la difficulté à pénétrer dans le tunnel menant au site actif de la TGase, étant très restreint stériquement selon les études de modélisation du groupe.⁹⁰ L'électrophile ne pouvant pas rejoindre le nucléophile, l'efficacité d'inhibition des dérivés de maléimide se trouve très faible.

3.4.4. Spécificité

Pour montrer l'importance de la partie Cbz-Phe, le *N*-propylacrylamide **3.9** a été synthétisé (**schéma 3.2**) et testé. Il présente une inactivation de la TGase directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme ce qui indique une réaction de second ordre entre le *N*-propylacrylamide **3.9** et la TGase. Cette dépendance linéaire a été observée jusqu'à une concentration de 2 mM de l'inhibiteur. La partie Cbz-Phe semble donc importante pour l'affinité et la spécificité de ces inhibiteurs vis-à-vis de la TGase tissulaire. L'importance du Cbz-Phe peut peut-être s'expliquer par son aromaticité. En effet, les aromatiques semblent jouer un rôle non négligeable⁴⁷ en se liant au niveau d'un sillon hydrophobe sur la surface de l'enzyme ce qui permettrait de faciliter l'accès au tunnel du site actif.⁹⁰

Toujours pour montrer la spécificité de ces inhibiteurs, l'acrylamide **3.4c** et le chloroacétamide **3.5c** ont été testés en présence de glutathion pour mesurer leur résistance à une décomposition non spécifique avec d'autres nucléophiles potentiellement présents *in vivo*. La formation de l'adduit du glutathion après incubation à 37 °C (pH 7) a été suivie par spectre de masse (voir la partie expérimentale) et après

24 h, seuls 10 %, environs, de la quantité d'inhibiteurs ont réagi avec le glutathion, ce qui est peu en comparaison de la vitesse d'inhibition de la TGase avec ces mêmes composés. La spécificité de leur réactivité avec la TGase fait donc d'eux de bons candidats pour des applications *in vivo*.

3.5. Conclusion

Huit nouveaux inhibiteurs de TGases ont été préparés à partir d'intermédiaires aminés communs basés sur le squelette Cbz-Phe. Les dérivés acrylamides **3.4a-3.4d**, chloroacétamides **3.5a-3.5c** et maléimide **3.7b** ainsi préparés montrent une affinité et une réactivité différente. Les dérivés acrylamides et chloroacétamides ont un comportement similaire. Seul le chloroacétamide **3.5a** ne présente pas d'activité inhibitrice, due sans doute à un espaceur trop petit et donc moins flexible. Le dérivé maléimide **3.7b** n'est pas aussi efficace que les autres composés synthétisés sans doute dû à la difficulté du cycle volumineux à s'approcher du site actif se trouvant dans un tunnel. L'accessibilité semble être limitée par un encombrement stérique. La longueur de l'espaceur entre la partie Cbz-Phe et le groupe électrophile semble également importante et requiert une distance minimale pour permettre l'inhibition. Cette discrimination suivant la taille de l'espaceur est sans doute dû à la capacité inhérente de la TGase de distinguer l'asparagine de la glutamine. Malgré une faible activité par rapport aux inhibiteurs rapportés par le groupe du Pr. Keillor, ces inhibiteurs restent les plus efficaces pour des dérivés basés sur le squelette Cbz-Phe. De plus, la spécificité de ces inhibiteurs est montrée par la réaction du *N*-propylacrylamide **3.9** avec la TGase et l'absence ou presque de réaction avec le glutathion indiquant un fort potentiel pour des applications *in vivo*.

Ces inhibiteurs peuvent servir de base à de nouveaux inhibiteurs plus efficaces et plus solubles. Par exemple, le changement de la chaîne hydrophobe par une chaîne plus hydrophile serait un bon point de départ pour améliorer au moins la solubilité de tels composés en milieu aqueux.

CHAPITRE 4

Inhibiteurs-marqueurs

4.1 Introduction

Dans cette période où tout le génome humain a été caractérisé, beaucoup reste à faire au niveau de la connaissance des protéines qu'encode ce génome. Il serait intéressant de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires des différents processus métaboliques.²⁰ Une des techniques les plus rapides à développer et qui est très efficace, est le marquage de protéines avec des marqueurs fluorescents ou des molécules qui ont une grande affinité avec un récepteur protéique. Une des techniques de marquage les plus utilisées est le marquage par la GFP^{21, 22} (**chap.1**) qui est une protéine auto-fluorescente. Sa grande utilisation vient en partie du fait qu'elle peut être encodée génétiquement.²³⁻²⁵ Ainsi, la cellule produit la protéine d'intérêt liée à la GFP, ce qui évite des réactions secondaires tel que le marquage d'autres protéines que celle ciblée. Mais la GFP reste un marqueur assez volumineux^{21, 26} (~ 27 kDa, 4.2 nm × 2.4 nm¹³⁰) ce qui pourrait perturber le repliement et/ou le fonctionnement de la protéine à laquelle elle est liée. C'est pour éviter cet inconvénient que des marqueurs plus petits ont été développés. Ces nombreux types de marquage avec des petites molécules font appel, en général, à une approche de type interactions, telles que : haptène-anticorps²⁸, biotine-avidine,²⁹ enzyme-inhibiteur,³⁰ nitrilotriacétate (NTA)-oligohistidines,³¹ fluorophore biarsénique-peptide riche en cystéine^{26, 32-35} ou fluorogène dimaléimide-cystéines.³⁶

Dans le cas de l'étude suivante on s'est intéressé plus particulièrement au marquage enzyme-inhibiteur. La TGase étant une enzyme d'intérêt dans le laboratoire du Pr. Keillor⁴⁷ et la littérature décrivant plusieurs inhibiteurs lui étant spécifiques^{105, 106}, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés à ce cas. L'idée a donc été de rajouter aux inhibiteurs une sonde qui puisse permettre de suivre la TGase. Une librairie de sondes pourrait être réalisée, mais, dans un premier temps, nous avons décidé de nous concentrer sur deux types de marqueurs avant de pousser plus loin la synthèse. Les sondes utilisées ont été le dansyle, un fluorophore assez facile à manipuler, et la biotine qui a une grande affinité avec la stréptavidine. Les marqueurs développés (**4.9**, **4.12**, **4.15**) s'appuient sur l'inhibiteur *N*- α -carboxylbenzoxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine¹⁰⁶ (**4.1**) au niveau du C-terminal duquel on a greffé la sonde, via un espaceur. (**figure 4.1**)

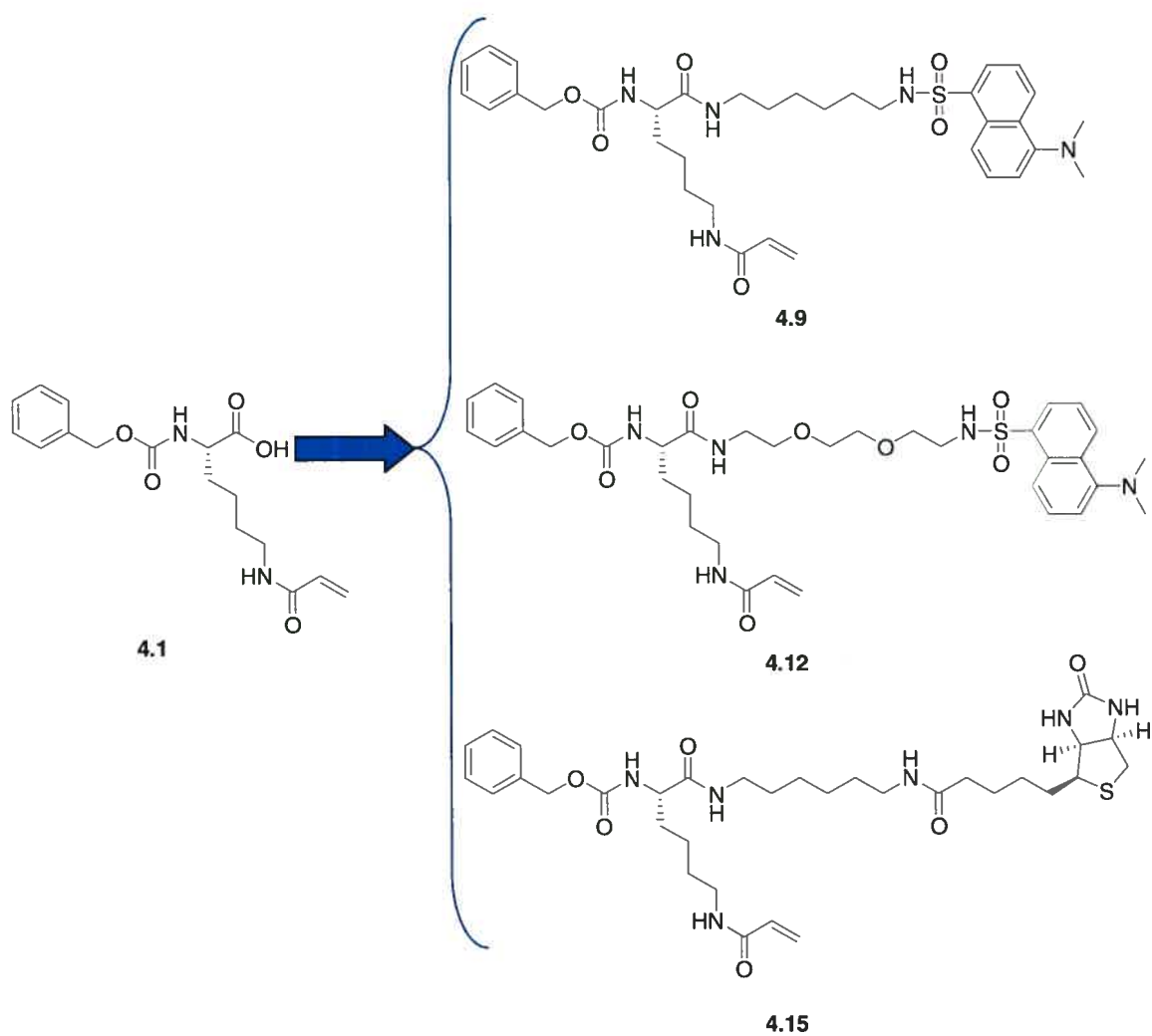
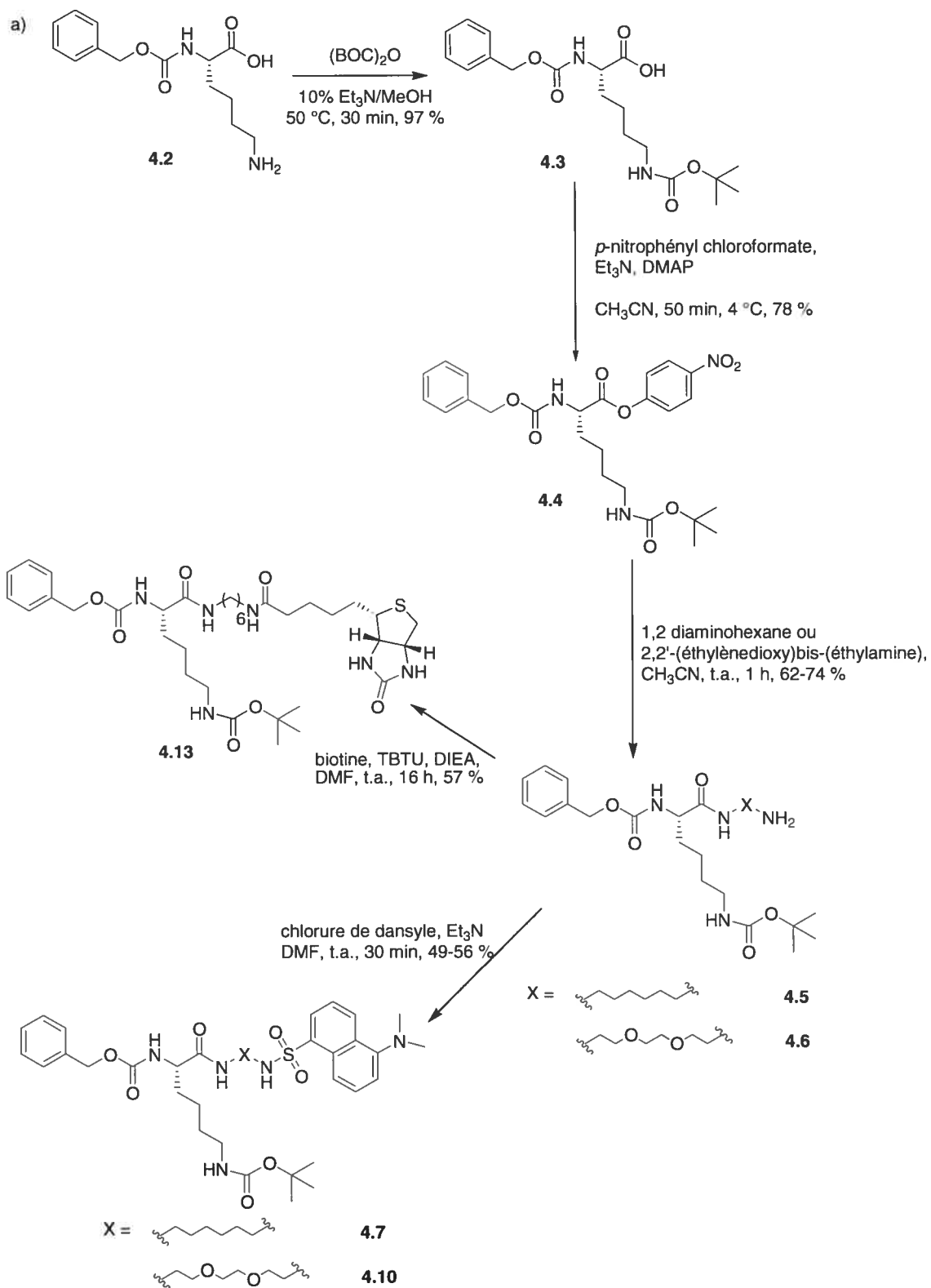


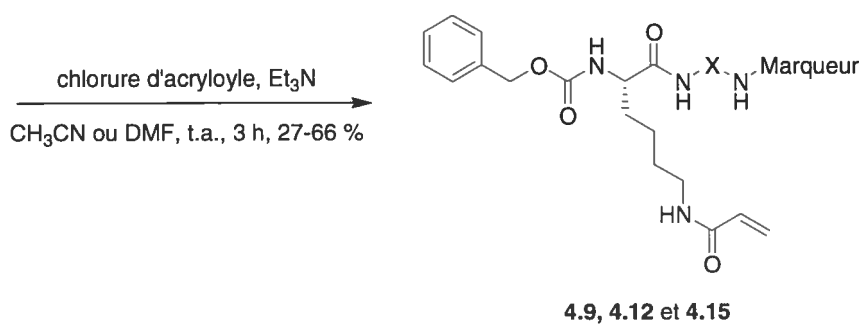
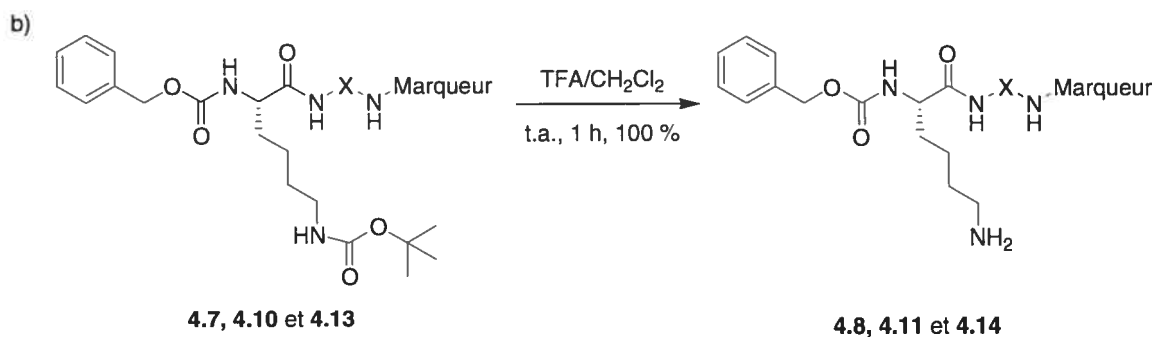
Figure 4.1 : développement de marqueurs.

Ce chapitre portera sur la synthèse des dérivés dans les 4.9 et 4.12 et du dérivé biotinylé 4.15 et sur leurs tests d'inhibition *in vitro* pour évaluer leur aptitude à être utilisés pour *in vivo*.

4.2. Synthèse

Les trois marqueurs synthétisés (**4.9**, **4.12** et **4.15**) partent tous de la *N*- α -carbobenzyloxy-L-lysine (**4.2**) que l'on protège en *N*- ϵ par un groupement *tert*-butoxycarbonyle en faisant réagir la lysine monoprotégée **4.2** avec du di-*tert*-butyl dicarbonate (BOC)₂O dans une solution de 10 % Et₃N dans le méthanol (v : v). On obtient après purification le *N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine **4.3** avec un rendement de 97 %. Cette lysine diprotégée (**4.3**) est ensuite activée en formant l'ester *p*-nitrophényle correspondant (**4.4**) en suivant un protocole¹²⁸ déjà établi utilisant la triéthylamine comme base et la diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur dans l'acétonitrile. Cet ester *p*-nitrophényle a été obtenu avec un rendement de 78 % et a été couplé par la suite avec le 1,6-diaminohexane ou le 2,2'-(éthylènedioxy)bis-(éthylamine) dans l'acétonitrile pour donner les amides **4.5** et **4.6** avec des rendements respectifs de 62 % et de 74 %. (**schéma 4.1**)





	X	Marqueur
4.7, 4.8, 4.9		
4.10, 4.11, 4.12		
4.13, 4.14, 4.15		

Schéma 4.1 : Synthèse des marqueurs.

À partir de ces deux squelettes aminés (**4.5** et **4.6**), une réaction avec le chlorure de dansyle en présence de triéthylamine comme base dans le diméthylformamide (DMF) a été réalisée pour donner les dérivés dansyles **4.7** et **4.10** avec des rendements de 49 % et 56 % respectivement. Le groupement *tert*-butoxycarbonyle est ensuite enlevé à l'aide

de TFA pour donner les amines **4.8** et **4.11** avec des rendements quantitatifs. Les composés **4.9** et **4.12** ont ensuite été synthétisés à partir de ces amines utilisant le chlorure d'acryloyle en présence de triéthylamine dans l'acétonitrile ou le DMF pour donner les acrylamides **4.9** et **4.12** avec des rendements respectivement de 47 % et 27 %. (**schéma 4.1**)

Le dérivé biotinylé **4.15** a été synthétisé à partir de l'amine **4.5** en le faisant réagir avec de la biotine en présence de TBTU, DIEA dans le DMF pour donner le dérivé biotinylé **4.13** avec un rendement de 57 %. Le groupement BOC est ensuite enlevé à l'aide de TFA avec un rendement quantitatif pour donner l'amine **4.14** qui réagit avec le chlorure d'acryloyle en présence de triéthylamine dans le DMF pour donner le marqueur potentiel **4.15** avec un rendement de 66 %.

4.3. Cinétique

Les études cinétiques des composés synthétisés ont été réalisées de la même manière qu'avec les inhibiteurs irréversibles **3.4a-d**, **3.4a-c** du **chapitre 3**.

4.4. Évaluation de la capacité d'inhibition

Les paramètres d'inhibition sont regroupés dans le tableau 4.1. Les constantes K_i déterminées pour les trois marqueurs synthétisés varient entre 9 et 29 μM . Ces constantes sont dans les dizaines de μM . On est loin de la constante du dérivé acrylamide parent¹⁰⁶ **4.1** qui est de 520 nM mais on est dans la région du bas μM ce qui est déjà acceptable pour des études *in vivo* préalables. La différence de K_i entre les marqueurs et l'inhibiteur parent pourrait s'expliquer par la présence d'un espaceur et d'une sonde (dansyle ou biotine) qui agrandissent l'inhibiteur et pourraient donc entraîner des gênes stériques ou des interactions défavorables engendrées par la sonde et son espaceur. Passer de l'espaceur hexyle à un espaceur de type polyéthylène glycol (PEG) a fait augmenter la valeur du K_i , mais on a gagné en solubilité. En effet dans un

tampon MOPS contenant 5 % de DMF, le *N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine(2-(2-dansylaminoéthoxy)éthoxy)éthanamide (**4.12**) est cinq fois plus soluble que le *N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine 6-(dansylamino)hexylamide (**4.9**).

Tableau 4.1 : Paramètres cinétiques pour les marqueurs (**4.9**, **4.12** et **4.15**) et l'acrylamide **4.1**.

inhibiteur	k_{inact} (min^{-1})	K_{I} (μM)	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
4.1	0.67 ± 0.07	0.52 ± 0.05	1.28 ± 0.25
4.9	0.13 ± 0.03	9 ± 3	0.014 ± 0.007
4.12	0.42 ± 0.04	29 ± 5	0.014 ± 0.004
4.15	0.31 ± 0.02	25 ± 3	0.012 ± 0.002

erreurs indiquées proviennent de la régression non-linéaire basée sur le modèle d'inhibition de ce type d'inhibiteurs (schéma 3.5).

Au niveau de l'efficacité inhibitrice ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$), les trois marqueurs sont pratiquement identiques mais sont loin d'être aussi efficaces que l'acrylamide **4.1**. Cette différence de deux ordres de grandeur n'est pas négligeable et pourrait engendrer quelques problèmes au niveau de la vitesse réactionnelle *in vivo*. Quoiqu'il en soit, les qualités de ces trois marqueurs restent tout à fait acceptables pour une première évaluation de faisabilité.

Afin d'améliorer leur efficacité, on pourrait envisager, dans un second temps, de rajouter une glycine avant de mettre l'espaceur. Une étude¹³¹ a, en effet, montré l'importance de la glycine dans la reconnaissance du substrat Cbz-Gln-Gly par la TGase tissulaire. L'utilisation d'un espaceur de type PEG n'affecte pas l'efficacité mais permet une meilleure solubilité, ce qui n'est pas négligeable dans le cadre d'une application *in vivo*.

L'acrylamide **4.1** est un analogue du substrat Cbz-Gln de la TGase qui a un K_{M} d'environ 10 mM. Un substrat peptidique, de séquence Pro-Asn-Pro-Gln-Leu-Pro-Phe, récemment synthétisé et testé cinétiquement à l'aide d'une méthode utilisant le *N,N*-diméthyl-*p*-phénylènediamine dihydrochloride (DMPDA) a montré un K_{M} égal à 26

μM . On peut donc supposer que remplacer la glutamine de cette séquence par l'inhibiteur N- ϵ -acryloyl-lysine et y greffer la sonde en C-terminal permettrait d'obtenir un inhibiteur fluorescent possédant une meilleure efficacité. Une telle étude est d'ailleurs actuellement en cours.

Des études préalables avec l'amide α,β -insaturé **4.12** sont menées dans le groupe du Pr. Kaartinen qui travaille au niveau des tissus. Les premiers résultats semblent prometteurs et sont exposés un peu plus loin.

4.5. Marquage covalent

Pour appuyer l'hypothèse que les marqueurs synthétisés agissent comme des inhibiteurs irréversibles en formant un lien covalent, une incubation de l'acrylamide **4.9** avec la TGase recombinante en présence du tampon servant aux cinétiques a été réalisée. Un gel SDS-PAGE (acrylamide 18 %) a été fait à partir de ce mélange et de différents échantillons-contrôles. (**figure 4.2**)

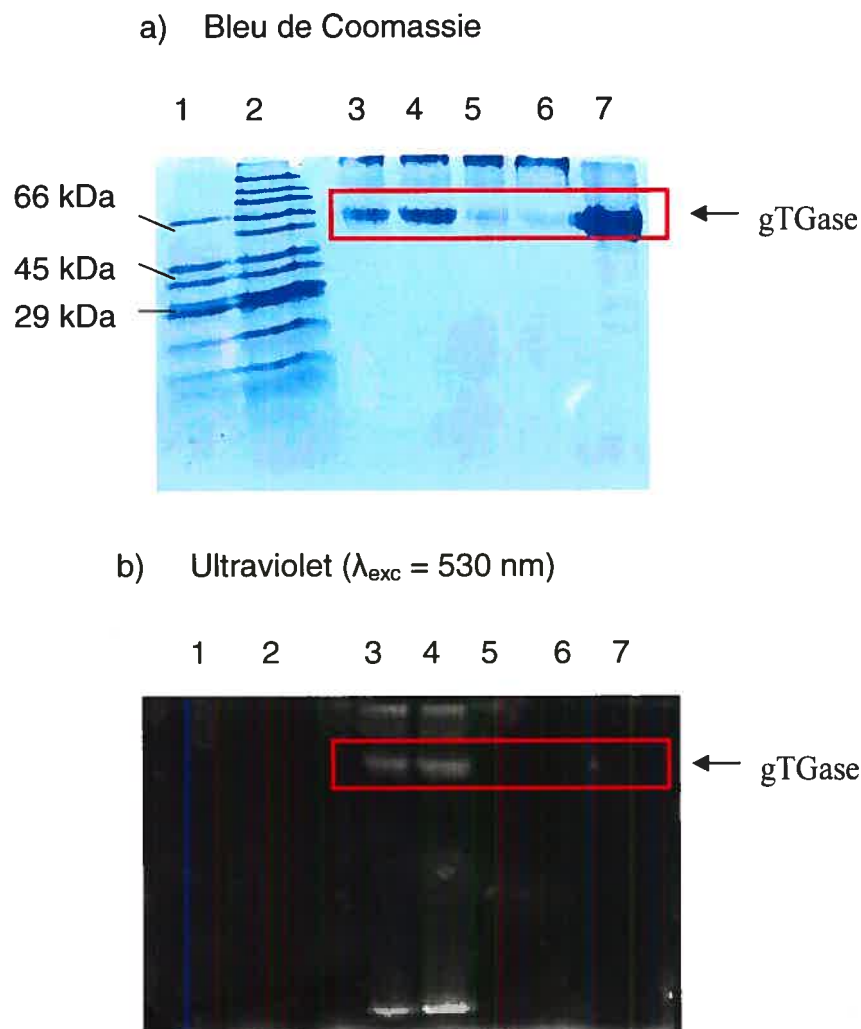


Figure 4.2 : Gel SDS-PAGE (acrylamide 18 %) de l'incubation de la TGase avec le marqueur fluorescent **4.9**. puits 1 : marqueur de poids moléculaires ("low range") ; puits 2 : marqueur de poids moléculaires ("wide range") ; puits 3 : TGase (6.7 μg) + **4.9** après incubation à 37 °C pendant 30 min ; puits 4 : TGase (4.5 μg) + **4.9** après incubation à 37 °C pendant 30 min ; puits 5 : TGase (6.7 μg) après incubation à 37 °C pendant 30 min ; puits 6 : TGase (4.5 μg) après incubation à 37 °C pendant 30 min ; puits 7 : TGase (0.67 mg/mL).

Le puits 7 a servi de contrôle pour savoir où migre la TGase recombinante purifiée. Nous y voyons une seule tache intense au poids moléculaire attendu pour la TGase recombinante de foie de cobaye. Les puits 3 à 6 présentent également cette bande mais une autre bande aussi intense voire plus intense est apparue au dessus. Cette deuxième bande ne migre pas ce qui sous entend un haut poids moléculaire. Nous supposons que cette bande est un précipité de la TGase car à forte concentration et en présence de calcium, cette enzyme a tendance à précipiter. En regardant le gel en ultra violet, seuls les puits 3 et 4 fluorescent, ces puits correspondant à l'expérience de marquage. La bande correspondante à la TGase est bien marquée. On constate que l'agrégat également et il y a une bande en fin de gel qui fluoresce et qui est le marqueur en excès. Les puits 5 et 6 ne présentent aucune fluorescence bien que la TGase y soit présente (voir le gel coloré par le bleu de Coomassie). Ces résultats montrent bien le marquage de la TGase tissulaire par le marqueur fluorescent **4.9** de manière covalente. Cette expérience ne peut cependant pas montrer une certaine spécificité de la méthode de marquage. Une expérience de marquage sur un lysat cellulaire serait donc intéressante.

4.6. Résultats préliminaires *in vivo*

Les travaux exposés dans cette partie ont été réalisés par le groupe du Pr. Kaartinen avec le marqueur **4.12** pour évaluer le comportement de tels composés dans un milieu biologique. L'acrylamide **4.12** a été injecté dans des cellules vivantes à différentes concentrations. Ces cellules croissent ensuite dans un milieu contenant de l'acide ascorbique qui favorise le dépôt de collagène et par ce fait de la minéralisation. Au bout de douze jours de croissance, l'observation par coloration montre que le taux de dépôt de collagène (coloration avec le rouge de Picrosirius) et de minéralisation (coloration Von Kossa) dépendent de la concentration en inhibiteur. (**figure 4.3**)

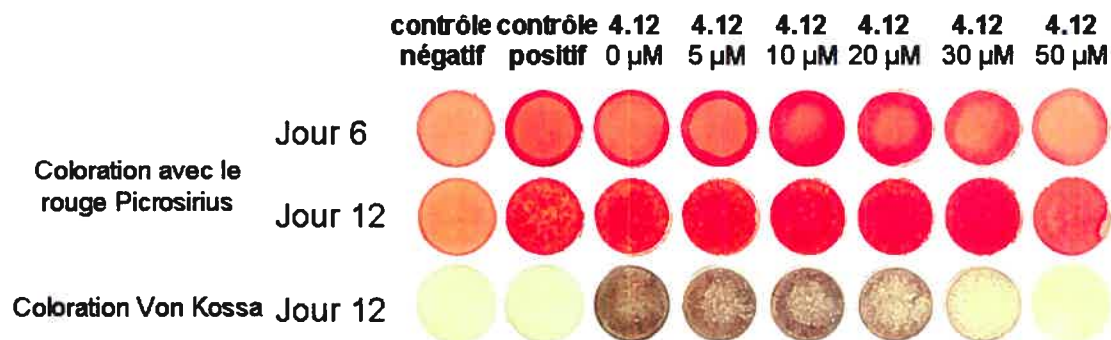


Figure 4.3 : Évaluation du comportement du marqueur **4.12** *in vivo*.

Plus la concentration de l'inhibiteur **4.12** est élevée, moins le dépôt de collagène et de minéralisation est important. Ces phénomènes étant liés directement à l'activité de la TGase dans les cellules d'intérêt, on peut conclure que l'acrylamide **4.12** a la capacité de rentrer dans les cellules et permet ainsi l'inhibition de la TGase. L'inhibiteur-marqueur semble notamment très efficace dans les concentrations de 30-50 μM . De plus le marqueur semble non-toxique pour les cellules.

4.7. Conclusion

Une étude rapide axée sur le marquage de la TGase a permis la synthèse et l'évaluation de trois marqueurs potentiels. Les trois composés ont montré un comportement d'inhibiteurs avec une efficacité k_{inact}/K_i d'environ $0.014 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$. En comparaison de l'inhibiteur parent N- α -carbobenzyloxy-N- ϵ -acryloyl-lysine¹⁰⁶ (**4.1**), l'efficacité a chuté drastiquement mais les K_i restent de l'ordre du μM ce qui est acceptable pour des études préalables *in vivo*. Le passage d'un espaceur purement alkyle à un espaceur de type PEG a permis d'améliorer la solubilité du marqueur fluorescent tout en conservant l'efficacité. Des modifications pour améliorer la reconnaissance de ces inhibiteurs sont actuellement en cours. Elles consistent à insérer la partie inhibitrice X dans une séquence de type Pro-Asn-Pro-X-Leu-Pro-Phe en s'appuyant sur des tests qui ont montré que le peptide analogue Pro-Asn-Pro-Gln-Leu-Pro-Phe est un substrat de

la TGase avec un K_M d'environ 100 μM . Des tests préalables avec le composé **4.12** semblent montrer que le groupe est sur la bonne voie en ce qui concerne le marquage de la TGase tissulaire *in vivo*.

CHAPITRE 5
Conclusion

Les enzymes sont des protéines essentielles au bon fonctionnement des différents métabolismes du corps humain. Leur rôle est de catalyser les diverses réactions essentielles à la vie de l'organisme. Cette catalyse se fait en formant des complexes enzyme-substrat qui permet de réduire la barrière énergétique de réaction. Vu l'importance des enzymes dans le fonctionnement biologique, tout dysfonctionnement à leur niveau peut entraîner des maladies ou des perturbations physiologiques. Elles sont donc devenues rapidement des cibles de choix pour le développement de médicaments ou pour mieux comprendre leur mode de fonctionnement et donc de la maladie. Nous nous sommes intéressés à la transglutaminase (TGase) qui est une enzyme qui aurait un certain rôle dans différentes maladies si son activité n'est pas contrôlée. Parmi ces maladies on pourrait citer l'acné,^{45, 46} les cataractes,⁷³ les maladies immunitaires,⁷⁴ le psoriasis,⁷⁵⁻⁷⁷ la maladie d'Alzheimer,⁵⁰⁻⁵⁶ la maladie de Huntington,^{48, 49} la maladie céliaque⁷⁸ et les métastases cancéreuses.⁴⁷

Le développement d'inhibiteurs de cette enzyme dans le but pharmacologique mais également mécanistique semblait intéressant. Trois séries ont été donc synthétisées et évaluées. La première série d'inhibiteurs a montré un comportement compétitif et réversible vis-à-vis de la TGase. La deuxième série regroupe des inhibiteurs compétitifs irréversibles et la troisième série rassemble des inhibiteurs ayant une sonde et pouvant servir au marquage de la TGase.

La série d'inhibiteurs réversibles sont des dérivés cinnamiques. Le peu de ressemblance de ces composés avec des substrats de la TGase et leur potentiel d'inhibition nous a amené à effectuer une étude structure activité sur ces dérivés. De cette étude sont ressorties différentes indications sur l'importance des différents groupements de ces dérivés (**figure 2.19**)

En se basant sur l'amide parent qui est le *p*-nitrocinnamoyl oxybenzotriazolyl amide (**2.14a**), l'étude a montré l'importance :

- 1- d'avoir un O hybridé sp^2 au niveau du substituant sur l'aromatique du cinnamique ;
- 2- de la planéarité ou/et de la conjugaison des dérivés ;
- 3- de l'aromaticité et de la présence d'un accepteur de pont hydrogène pour le groupement amide ;
- 4- de la distance entre les deux cycles aromatiques de la molécule.

L'étape suivante de cette étude serait de développer d'autres dérivés qui cette fois-ci permettraient d'améliorer leur solubilité en milieu aqueux (dans l'idée d'une application *in vivo*) et leurs affinité avec l'enzyme (K_i ou IC_{50}). Des études préalables ont permis d'améliorer l'affinité mais la solubilité reste encore un problème.

La deuxième série d'inhibiteurs a été développée pour avoir des inhibiteurs irréversibles plus faciles à synthétiser rapidement que ceux déjà développés dans le laboratoire du Pr. Keillor. Cette idée nous a amené à synthétiser et à tester différents composés basés sur le squelette Cbz-Phe-espaceur-(groupement acylant ou alkylant). Les dérivés α,β -acrylamide **3.4a-3.4d**, et les dérivés chloroacétamides **3.5b** et **3.5c** présentent tous une inhibition de type compétitif et irréversible. La longueur de l'espaceur semble influencer sur l'efficacité (k_{inact}/K_i). Par exemple, le passage d'un espaceur de quatre méthylènes (**3.4b**) à huit méthylènes (**3.4d**) a permis l'augmentation de l'efficacité d'un facteur de 2.3. Plus l'espaceur est long, plus le composé inhibe. Mais cet allongement de l'espaceur diminue également la solubilité de ces inhibiteurs en milieu aqueux ce qui augure rien de bon pour le passage *in vivo*.

Bien que la synthèse semble simplifiée, ces composés montrent une efficacité beaucoup plus faible que les inhibiteurs précédemment développés dans le groupe de recherche du Pr. Keillor.¹⁰⁶ Mais ils sont comparables aux autres inhibiteurs irréversibles de la littérature pour la TGase voire plus efficaces.¹¹² Malgré une solubilité en milieu aqueux limitée, ces inhibiteurs réagissent très faiblement avec une source de

thiol (le glutathion). Après 24 h d'incubation à 37 °C des inhibiteurs en présence de glutathion seulement 10 % a réagi ce qui est beaucoup plus lent que la réaction de ces mêmes inhibiteurs avec la TGase. Ce test permet d'avoir l'espoir de bons résultats *in vivo* en ce qui concerne la spécificité. Beaucoup de nouveaux inhibiteurs de la TGase sont basés sur la structure Aromatique-espaceur-groupe inhibiteur de cystéine. Cette structure s'éloigne un peu du substrat modèle qui était le Cbz-Gln-Gly. Il serait donc intéressant de voir si ces nouveaux types d'inhibiteurs se fixent de la même manière que les substrats. On pourrait penser à changer le groupement Phe par un analogue qui permettrait un marquage photochimique¹³² ainsi on pourrait dans un premier temps inhiber la TGase avec ce nouvel inhibiteur puis quand il est complètement inhibé réaliser le marquage photochimique. Ainsi notre inhibiteur sera fixé en deux endroits et après analyse (digestion puis spectrométrie de masse) on pourrait voir les deux acides aminés qui ont été fixés et comparer à la structure cristalline de la TGase.⁸⁴

La dernière série d'inhibiteurs, présentant trois composés prometteurs pour des applications *in vivo*. Ces inhibiteurs ont été basés sur l'inhibiteur *N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine¹⁰⁶ (**4.1**) développé dans le groupe du Pr. Keillor. À partir de cet inhibiteur on a ajouté un espaceur et une sonde pour obtenir des marqueurs. Le premier espaceur utilisé fut le 1,6-diaminohexane qui a permis d'obtenir le dérivé dansyle **4.9** et le dérivé biotinylé **4.15**. Ces deux dérivés ont montré une inhibition compétitive et irréversible mais également une faible solubilité en milieux aqueux. On a donc changé l'espaceur pour quelque chose de plus polaire comme le 2,2'-(éthylènedioxy)bis-(éthylamine) ce qui a donné le dérivé dansyle **4.12**. Ce dernier a montré la même efficacité inhibitrice que les deux autres marqueurs mais avec une solubilité ~5 fois plus grande dans le tampon de cinétique. Au niveau des sondes, on a opté dans un premier temps pour le dansyle, un fluorophore facile à manipuler, et la biotine qui se lie spécifiquement avec la stréptavidine. Les trois composés ont montré cependant une efficacité beaucoup plus faible que l'acrylamide **4.1** mais des tests *in vivo* préalables menés par le groupe de recherche du Pr. Kaartinen ont montré le bon fonctionnement du dérivé dansyle **4.12** au niveau des tissus ce qui est encourageant pour la suite de ce projet. D'autres marqueurs sont actuellement à l'étude pour améliorer l'efficacité mais

également la solubilité tout en gardant la spécificité. On pourrait penser à d'autre type d'espaceurs plus polaires. Cette étude ayant montré la possibilité d'une application *in vivo*, il serait intéressant de modifier la sonde par différents fluorophores.

CHAPITRE 6

Partie expérimentale

6.1. Synthèse et cinétiques

6.1.1. Synthèse

Les chromatographies sur colonne sont réalisées avec un gel de silice de la compagnie Silicycle avec des mailles de 230-400 Mesh.

Les points de fusion (p.f.) ont été réalisés à l'aide d'un appareil de type Unimelt Thomas-Hoover ou encore sur un Gallenkamp.

La provenance des solvants et des produits chimiques utilisés dans la synthèse des composés de chacun des chapitres se retrouve dans la partie expérimentale dans le sous-chapitre dédié au chapitre concerné.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été déterminés dans un solvant deutéré indiqué entre parenthèses, sur un appareil Brüker AMX-300 [300 MHz (^1H), 75 MHz (^{13}C)] à 25 °C. Les déplacements chimiques sont indiqués par rapport à une référence interne qui est le tétraméthylsilane (TMS).

Les spectres de masse de haute résolution ont été pris sur une LC-MSD-Tof par électronébulation en mode positif. Les ions protonés $(\text{M}+\text{H})^+$ ou les adduits sodium $(\text{M}+\text{Na})^+$ ont permis de confirmer la formule empirique des composés synthétisés.

6.1.2. Cinétiques

La TGase recombinante du foie de cobaye a été surexprimée dans *E. coli* et ensuite purifiée en suivant un protocole développé dans le laboratoire du Prof. Keillor.⁸⁹

Pour les cinétiques du **chapitre 2**, le substrat donneur Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly¹¹⁴ a été utilisé dans des concentrations correspondant à $2 \times K_M$ ($\sim 45 \mu\text{M}$) en présence de l'inhibiteur qui était à des concentrations variant entre $1.84 \mu\text{M}$ et $114 \mu\text{M}$. Les solutions mères de tous les inhibiteurs ont été préparées dans le diméthylformamide (DMF) et la concentration finale de ce co-solvant lors des tests cinétiques n'a pas dépassé 5% v/v. Dans le cas d'une inhibition compétitive (**schéma 6.1**), la vitesse initiale v dépend de la concentration d'inhibiteur $[I]$ (**équation 1**).

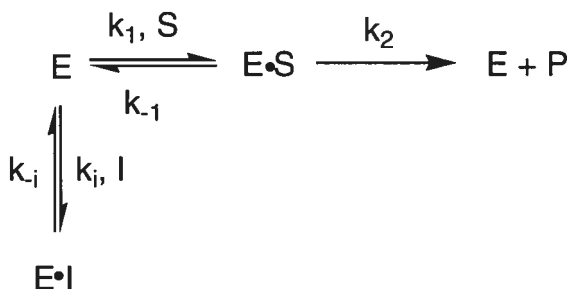


Schéma 6.1 : Mécanisme de l'inhibition compétitive.

En traçant le graphique $v = f([I])$, on peut ainsi déterminer l' IC_{50} qui est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer de moitié la vitesse réactionnelle de 50% de sa valeur initiale non-inhibée.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (1)$$

De plus, une relation entre l' IC_{50} et le K_i (**équation 2**) permet d'obtenir une idée de la valeur du K_i sans le déterminer de façon rigoureuse. En effet, dans le cas des cinétiques du **chapitre 2**, la concentration de substrat utilisé est de $2 \times K_M$ donc d'après l'équation 2, on aura $IC_{50} = 3 \times K_i$.

$$IC_{50} = \frac{K_i}{K_M} [S] + K_i \quad (2)$$

Une inactivation mono-exponentielle dépendant du temps a été observée pour les composés étudiés dans le **chapitre 3** et le **chapitre 4**. Le caractère irréversible a été prouvé par une expérience de dilution. Le mélange réactionnel d'inhibition a été dilué 100 fois pour rendre la concentration de l'inhibiteur négligeable et dans ces conditions aucune activité de la TGase n'a été observée contrairement à la même réaction dans les mêmes concentrations d'enzyme non inhibée. Pour les cinétiques, le substrat donneur Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly¹¹⁴ a été utilisé dans des concentrations correspondant à $2 \times K_M$ ($\sim 45 \mu\text{M}$) en présence de l'inhibiteur qui était à des concentrations variant entre $1.84 \mu\text{M}$ et $114 \mu\text{M}$. Les solutions mères de tous les inhibiteurs ont été préparées dans le diméthylformamide (DMF) et la concentration finale de ce co-solvant lors des tests cinétiques n'a pas dépassé 5% v/v. Les constantes de vitesse de premier ordre observées pour l'inactivation ont été déterminées à partir d'une régression basée sur un modèle mono-exponentiel. Ces constantes ont été ensuite utilisées dans l'équation (3) pour déterminer k_{inact} et K_i .

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} [I]}{[I] + K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)} \quad (3)$$

Le kit de tests d'activité colorimétrique de la caspase 3 contenant également l'enzyme a été obtenu chez Sigma-Aldrich.

Le Facteur XIIIa provient de la compagnie Haematologic Technologies Inc. Avec une activité de 922 Unités/mg (1 unité est égale à l'activité du Facteur XIIIa dans 1 mL de plasma normal)

La glutamate déhydrogénase provenant du foie de bovin (GDH), la *N*- α -actétyl-L-lysine méthyl ester, le sel de sodium de l'acide α -cétoglutarique, la β -nicotinamide adénine dinucléotide (β -NADH) et la *N,N*-diméthylcaséine ont été achetés chez Sigma.

Les constituants des tampons, Tris, MOPS, CaCl₂, DDT, EDTA proviennent tous de Sigma.

Les protocoles de cinétique avec le composé *N*-Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly sont décrits dans les paragraphes suivants.

6.2. Partie expérimentale du Chapitre 2

6.2.1. Cinétiques

Les IC_{50} ont été déterminés par régression linéaire à partir des vitesses initiales mesurées pour différentes concentrations de l'inhibiteur. Étant donné la faible solubilité, en solution aqueuse, de la plupart des inhibiteurs testés, il n'a, en général, pas été possible d'utiliser une concentration correspondant à l' IC_{50} , la valeur de laquelle a donc dû être extrapolée. Pour ces expériences, Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly¹¹⁴ a été utilisé comme substrat donneur à des concentrations de l'ordre de $2 K_M$ ($\sim 45 \mu M$), en présence de l'inhibiteur en concentrations variables, fonction de la solubilité. Des solutions « concentrées » d'inhibiteur ont été préparées dans le DMF, puis diluées dans le tampon de réaction, sans que la proportion de DMF ne dépasse 5 % v/v.

Les expériences de cinétiques ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Cary 100 BIO à la longueur d'onde de 405 nm et à 25 °C. Le tampon utilisé est une solution contenant 50 mM de $CaCl_2$, 50 μM d'EDTA et 0.1 M de MOPS (pH 7.0). Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau déionisée obtenue par le système Millipore BioCell. Les échantillons pour les essais cinétiques contenaient 900 μL de tampon, 50 μL d'une solution de TGase à une concentration de 0.15 mg/mL (0.2 U), 25 μL d'une solution fraîche de *N*-Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly à une concentration de 2.2 mM dans du DMF anhydre, 0 à 25 μL d'une solution de l'inhibiteur dissout dans du DMF anhydre (la concentration de la solution de l'inhibiteur dépendant de sa solubilité) et 25 à 0 μL de DMF anhydre de sorte que la concentration de ce dernier soit constante à 5 % v/v.

L'activité du Facteur XIIIa a été mesurée par une méthode par GDH¹³³ dans laquelle l'enzyme, à une concentration finale de 0.89 $\mu g/mL$, est ajouté à une solution au pH 8.5 (0.1 M Tris-HCl, 5 mM $CaCl_2$ et 10 mM DDT) de 80 μM de *N,N*-diméthylcaséine, 0.5 mM de β -NADH, 3.3 mM de $N\alpha$ -acétyl-L-lysine méthyl ester, 10 mM de α -cétoglutarate et 297 $\mu g/mL$ de GDH à 37 °C. On suit ainsi la diminution de la densité optique à 278 nm pour obtenir la vitesse initiale.

L'activité de la caspase 3 a été mesurée en observant la libération du *p*-nitroaniline (pNA) ($\lambda_{\text{abs}} = 405 \text{ nm}$) venant du clivage du substrat peptidique Ac-Asp-Glu-Val-Asp-pNA catalysé par la caspase 3 humaine (250 ng/mL) à pH 7.4 (18.6 mM d'HEPES, 1.9 mM d'EDTA, 0.09 % de CHAPS et 4.7 mM de DTT).

6.2.2. Synthèse

6.2.2.1. Réactifs et solvants

Les benzaldéhydes, les acides cinnamiques, le 1-hydroxy-1-azabenzotriazole, le 1-hydroxybenzotriazole, le benzotriazole, le KHMDS, le bromure de (*tert*-butoxycarbonylméthyl)triphénylphosphonium, le DIC, le DMAP, le di-*tert*-butyl dicarbonate, le chlorure de 9-fluorénylméthoxycarbonyle, le *p*-nitrophénylchloroformate, le *p*-nitrobenzylchloroformate, l'aniline, la benzylamine, la dibenzylamine, l'alcool benzylique, l'indoline, la pipéridine, la *N*-méthylbenzylamine, l'imidazole, le 3-aminopropanol, le formaldéhyde, 3-(bromoacétyl)coumarine et la 3-acétylpyridine, ont été achetés chez Sigma-Aldrich. La triéthylamine et le DMF viennent d'ACP. L'hydroxyde de potassium et le carbonate de potassium viennent de BDH. Les solvants communs viennent de EMD. Le composé *N*-Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly a été synthétisé suivant une procédure développée dans le laboratoire du Pr. Keillor.¹¹⁴

6.2.2.2. Protocoles généraux

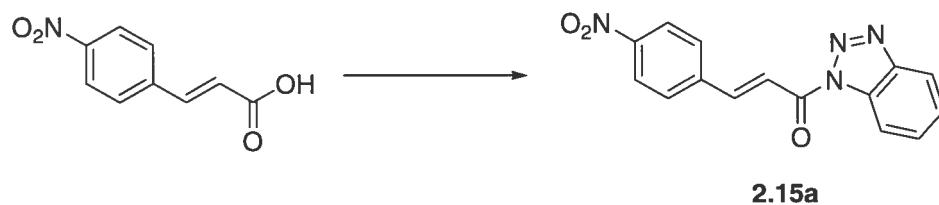
Protocole général A : synthèse des *trans*-cinnamoyl benzotriazolyl amides. L'acide *trans*-cinnamique (0.1 mmol) est dissous dans 2 mL de DMF. À cette solution, sont ajoutés le DIC (0.25 mmol) et le benzotriazole (0.25 mmol). Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à la température de la pièce. Pour les amides **2.15a**, **2.15n**, **2.15o** et **2.15p**, le produit précipite. Il est donc récupéré par simple filtration et lavage avec 20 mL d'éther diéthylique. Pour les amides **2.15d**, **2.15e**, **2.15f**, **2.15g**, **2.15h**, **2.15i**, **2.15k**, **2.15m**, **2.15j** et **2.15q**, le mélange réactionnel est dilué dans 30 mL d'AcOEt et est lavé avec 3×5 mL d'une solution de HCl 1N, 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N et 10 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est éliminé sous pression réduite. Le résidu est recristallisé à l'aide d'éthanol ou d'AcOEt ou purifié par chromatographie flash (voir partie caractérisation pour un produit en particulier).

Protocole général B : synthèse des acides *trans*-cinnamiques substitués. Dans 3 mL de THF, sont dissous le bromure de (*tert*-butoxycarbonylméthyl)triphenylphosphonium (0.33 mmol) et le KHMDS (0.297 mmol). À ce mélange, est ajoutée goutte-à-goutte une solution de benzaldéhyde substitué (0.165 mmol) dans 1 mL de THF. Le mélange réactionnel est agité pendant 1h à la température de la pièce et est ensuite lavé avec 2×2 mL d'une solution saturée de NH₄Cl. La phase organique est séchée avec du MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu est élué à travers une petite colonne de silice avec de l'AcOEt. Le produit obtenu est dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et est traité avec du TFA (2 mL) pendant 4 heures à 4 °C. Le TFA est ensuite éliminé sous pression réduite et le résidu obtenu est trituré à l'aide d'éther diéthylique pour donner le produit voulu.

Protocole général C : condensation aldolique. La 3-acétylpyridine (0.5 mmol) est solubilisée dans 4mL d'une solution MeOH/H₂O 1:1 (v:v). À cette solution, sont ajoutés le benzaldéhyde substitué (1.5 mmol) et l'hydroxyde de potassium (1.5 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 30 min et le précipité formé est filtré. Le solide ainsi obtenu est lavé avec un minimum d'éthanol pour donner le produit désiré.

Protocole général D : réduction d'un groupe nitro par le chlorure d'étain (II). Le dérivé aromatique nitré (1 mmol) est dissous dans 5 mL d'éthanol absolu. À cette solution, est ajouté SnCl₂·2H₂O (5mmol) et le mélange est agité sous azote pendant 30 min à 70 °C. De l'eau glacée (30 mL) est ensuite ajoutée et le mélange est neutralisé avec une solution de 5% de NaHCO₃. Le composé est extrait de la phase aqueuse avec 3×20 mL d'AcOEt. La phase organique ainsi obtenue est séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (100% AcOEt).

Protocole général E : synthèse des esters et des amides à partir de l'acide *p*-nitrocinnamique. Le *p*-nitrocinnamoyl *p*-nitrophenyl ester **2.17a** (préparé suivant le protocole de la page 150) (0.16 mmol) est dissous dans 2 mL de CH₂Cl₂. À cette solution, sont ajoutés la triéthylamine (0.48 mmol) et l'amine ou l'alcool d'intérêt (0.18 mmol). Ce mélange est agité toute la nuit à la température de la pièce et est ensuite évaporé sous pression réduite. De l'AcOEt (30 mL) est ajouté et la phase organique, ainsi obtenue, est lavée avec 3×6 mL d'une solution de HCl 0.1N, 3×6 mL d'une solution de NaOH 1N et 2×5 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est éliminé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec de l'éther diéthylique pour donner le solide désiré.

***p*-Nitrocinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15a)**

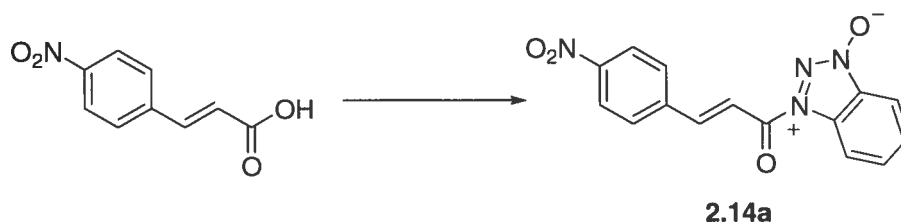
L'amide **2.15a** est synthétisé à partir de l'acide *p*-nitrocinnamique en suivant le protocole général A. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 70 %.

p.f. : 213 à 215 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.27 (m, 8H), 7.81 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.64 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 168.09, 148.96, 142.38, 141.77, 139.67, 131.27, 130.35, 130.23, 126.43, 125.19, 124.98, 124.66, 115.93.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₁N₄O₃ ([M+H]⁺): 295.0826, trouvé 295.0816.

***p*-Nitrocinnamoyl oxybenzotriazolyl amide (2.14a)**

L'amide **2.14a** a été synthétisé à partir de l'acide *p*-nitrocinnamique en suivant le protocole général A et en remplaçant le benzotriazole par le 1-hydroxybenzotriazole. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 55 %.

p.f. : 212 à 214 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.28 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.02 (d, 3H, *J* = 8.6 Hz), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.68 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.58 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.46 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz).

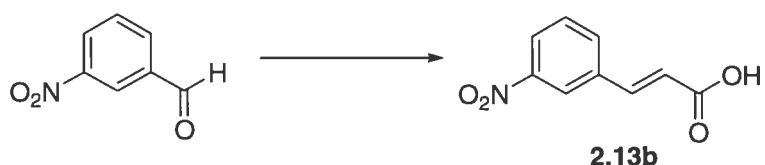
RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) : la très faible solubilité du composé (≤ 1mg/mL) n'a pas permis d'obtenir un spectre dans un temps raisonnable (10 h d'acquisition).

Cristallographie rayons X : C₁₅H₁₀N₄O₄·C₂HF₃O₂; *M_r* = 424.30; cristal incolore triclinique ; groupe spatial P1; dimensions de la maille (Å) a = 7.7137(2), b = 9.7911(2), c = 12.1711(2), α = 96.2560(10)°, β = 107.4280(10)°, γ = 96.4560(10)°; volume de la maille (Å³) = 861.55(3); *Z* = 2

SMHR : Toutes les sources d'ionisation disponibles ont été testées sans succès.

Analyse élémentaire de $C_{15}H_{10}N_4O_4$: attendue : C 58.07; H 3.25; N 18.06
trouvée : C 59.23; H 3.35; N 19.16.

Acide *m*-Nitrocinnamique (**2.13b**)



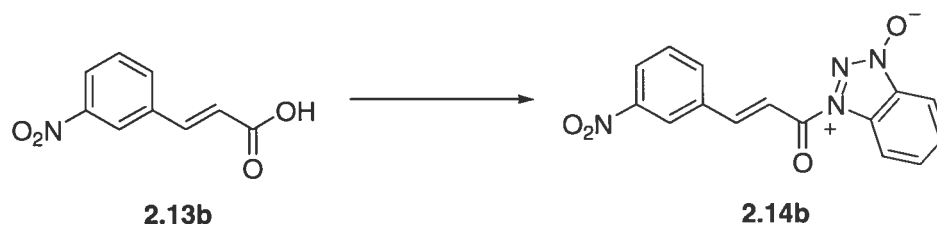
L'acide **2.13b** est synthétisé à partir du *m*-nitrobenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'ether diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune pale avec un rendement de 74 %.

p.f. : 200 à 202 °C.

RMN 1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm) : 8.50 (s, 1H), 8.21 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, 1.7 Hz), 8.17 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.69 (b, 2H), 6.73 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm) : 158.01, 140.61, 134.36, 129.43, 127.48, 124.07, 118.61, 117.17, 116.65.

SMHR (ESI) calculé pour $C_9H_6NO_4$ ($[M-H]^-$): 192.0302, trouvé 192.0310.

***m*-Nitrocinnamoyl oxybenzotriazolyl amide (2.14b)**

L'amide **2.14b** est synthétisé à partir de l'acide **2.13b** en suivant le protocole générale A et en remplaçant le benzotriazole par le 1-hydroxybenzotriazole. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune pale avec un rendement de 52 %.

p.f. : 184 à 186 °C.

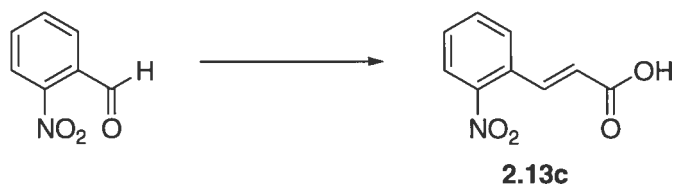
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.55 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.54 (s, 1H), 8.34 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.12 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 8.06 (m, 2H), 7.85 (m, 2H), 7.69 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) : la très faible solubilité du composé (≤ 1mg/mL) n'a pas permis d'obtenir un spectre dans un temps raisonnable (10 h d'acquisition).

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₁N₄O₄ ([M+H]⁺): 311.0775, trouvé 311.0769.

Analyse élémentaire de C₁₅H₁₀N₄O₄ : attendue : C 58.07; H 3.25; N 18.06
trouvée : C 58.47; H 3.83; N 19.23.

Acide *o*-nitrocinnamique (2.13c)



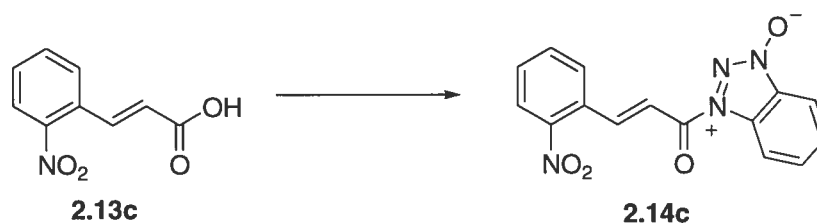
L'acide **2.13c** est synthétisé à partir du *o*-nitrobenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'ether diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune pale avec un rendement de 58 %.

p.f. : 243 à 245 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.05 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 1.2 Hz), 7.92 (dd, 1H, *J* = 7.6 Hz, 1.1 Hz) 7.83 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 7.75 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.65 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 6.52 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 157.74, 140.59, 131.93, 127.33, 124.52, 123.19, 123.08, 118.87, 118.09.

SMHR (ESI) calculé pour C₉H₆NO₄ ([M-H]⁻): 192.0302, trouvé 192.0305.

***o*-Nitrocinnamoyl oxybenzotriazolyl amide (2.14c)**

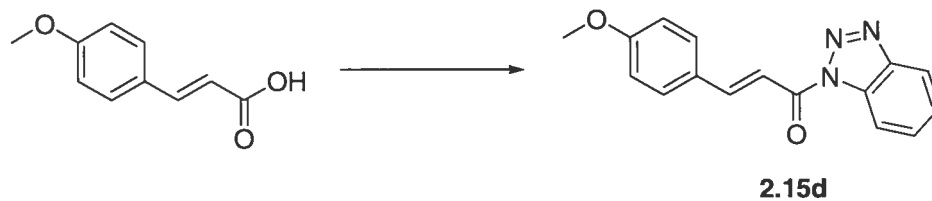
Cet amide est synthétisé à partir de l'acide **2.13c** en suivant le protocole général A et en remplaçant le benzotriazole par le 1-hydroxybenzotriazole. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 53 %.

p.f. : 182 à 184 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.58 (d, 1H, *J* = 13.6 Hz), 8.56 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz), 8.14 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 1.1 Hz), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.84 (m, 2H), 7.76 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz), 7.63 (m, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 167.9, 149.23, 139.85, 134.82, 131.76, 130.36, 130.21, 128.81, 128.32, 126.02, 125.64, 125.48, 124.82, 120.12, 110.57.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₁N₄O₄ ([M+H]⁺): 311.0775, trouvé 311.0774.

***p*-Méthoxycinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15d)**

L'amide **2.15d** est synthétisé à partir de l'acide *p*-méthoxycinnamique en suivant le protocole général A. Le produit est cristallisé à l'aide d'éthanol pour donner un solide blanc avec un rendement de 45 %.

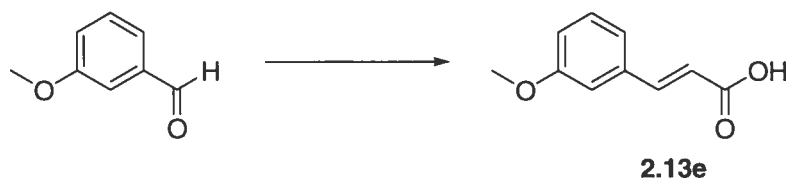
p.f. : 157 à 159 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.43 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.14 (m, 2H), 8.01 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 7.72 (m, 3H), 7.53 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 6.99 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz) 3.89 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.55, 162.77, 148.92, 146.65, 131.86, 131.28, 130.49, 127.32, 126.42, 120.44, 115.19, 114.90, 113.63, 55.84.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₄N₃O₂ ([M+H]⁺): 280.1081, trouvé 280.1081.

Acide *m*-méthoxycinnamique (2.13e)



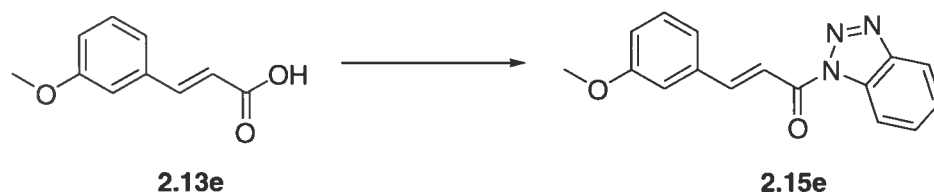
L'acide **2.13e** est synthétisé à partir du *m*-méthoxybenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 47 %.

p.f. : 117 à 119 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.75 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.30 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.13 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.05 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.43 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 3.82 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 165.42, 153.62, 141.78, 131.02, 126.06, 117.90, 114.69, 113.81, 110.61, 57.32.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₀H₁₁O₃ ([M+H]⁺): 179.0703, trouvé 179.0703.

***m*-Méthoxycinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15e)**

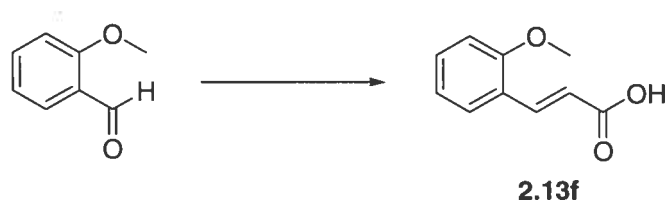
L'amide **2.15e** est synthétisé à partir de l'acide **2.13e** en suivant le protocole général A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide blanc avec un rendement de 28 %.

p.f. : 159 à 161 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.43 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.10 (s, 2H), 7.67 (td, 1H, *J* = 8.0 Hz, 1 Hz), 7.55 (td, 1H, *J* = 8.1 Hz, 1 Hz), 7.38 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 3.89 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.20, 160.32, 149.32, 146.64, 135.71, 131.75, 130.62, 130.41, 126.56, 122.19, 120.49, 117.95, 116.52, 115.13, 113.64, 55.75.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₃N₃O₂Na ([M+Na]⁺): 302.0900, trouvé 302.0905.

Acide *o*-méthoxycinnamique (2.13f)

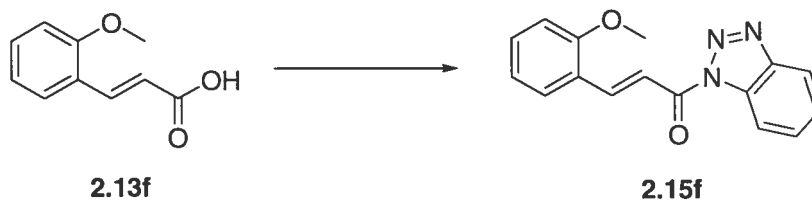
L'acide **2.13f** est synthétisé à partir du *o*-méthoxybenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 46 %.

p.f. : 182 à 184 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.09 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.52 (dd, 1H, *J* = 7.7 Hz, 1.6 Hz), 7.36 (td, 1H, *J* = 7.5 Hz, 1.7 Hz), 6.92 (m, 2H), 6.54 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 3.88 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 173.41, 158.89, 142.87, 132.33, 129.61, 123.32, 121.06, 118.05, 111.50, 55.83.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₀H₁₁O₃ ([M+H]⁺): 179.0703, trouvé 179.0702.

***o*-Méthoxycinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15f)**

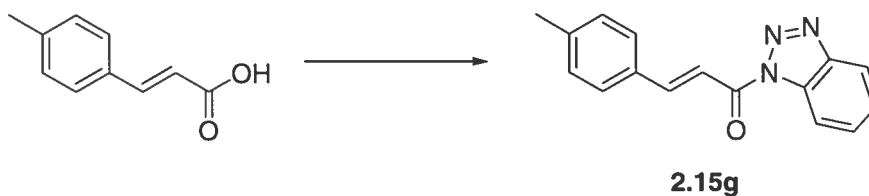
L'amide **2.15f** est synthétisé à partir de l'acide **2.13f** en suivant le protocole général A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide jaune pâle avec un rendement de 33 %.

p.f. : 159 à 161 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.51 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 8.44 (dt, 1H, *J* = 8.3Hz, 0.9Hz), 8.21 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 8.15 (dt, 1H, *J* = 8.3 Hz, 0.9 Hz), 7.77 (dd, 1H, *J* = 7.7 Hz, 1.7 Hz), 7.68 (td, 1H, *J* = 7.1 Hz, 1.0 Hz), 7.52 (m, 2H), 7.04 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.95 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.61, 159.25, 146.46, 144.33, 133.02, 131.71, 130.30, 129.89, 126.25, 123.28, 121.01, 120.25, 116.30, 115.06, 111.48, 55.82.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₃N₃O₂Na ([M+Na]⁺): 302.0900, trouvé 302.0907.

***p*-Méthylcinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15g)**

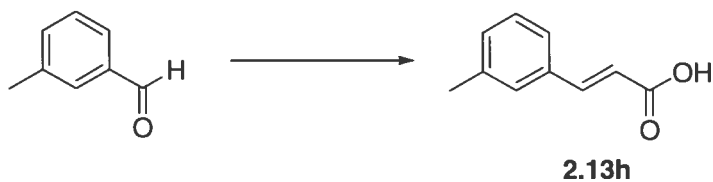
L'amide **2.15g** est synthétisé à partir de l'acide *p*-méthylcinnamique en suivant le protocole A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide blanc avec un rendement de 22 %.

p.f. : 146 à 148 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.43 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.13 (m, 3H), 7.68 (m, 3H), 7.54 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.29 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 2.43 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.28, 149.04, 147.04, 142.45, 131.70, 131.67, 130.44, 130.07, 129.29, 126.37, 120.37, 115.08, 115.04, 21.90.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₄N₃O ([M+H]⁺): 264.1131, trouvé 264.1130.

Acide *m*-méthylcinnamique (2.13h)

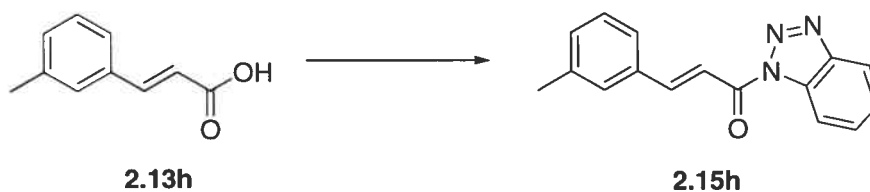
L'acide **2.13h** est synthétisé à partir du *m*-méthylbenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 73 %.

p.f. : 116 à 118 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.76 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.28 (m, 4H), 6.43 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 2.37 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 173.22, 147.62, 138.94, 134.27, 131.92, 129.34, 129.15, 125.91, 117.40, 21.62.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₀H₁₁O₂ ([M+H]⁺): 163.0754, trouvé 163.0747.

***m*-Méthylcinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15h)**

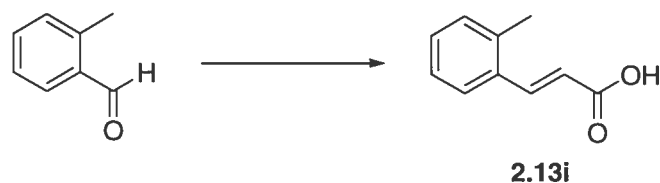
L'amide **2.15h** est synthétisé à partir de l'acide **2.13h** en suivant le protocole A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide blanc avec un rendement de 35 %.

p.f. : 132 à 134 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.43 (dt, 1H, *J* = 8.3 Hz, 0.9 Hz), 8.16 (dt, 1H, *J* = 8.3 Hz, 0.9 Hz), 8.13 (s, 3H), 7.69 (td, 1H, *J* = 7.1 Hz, 1 Hz), 7.54 (m, 3H), 7.34 (m, 2H), 2.43 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.13, 19.15, 146.53, 139.03, 134.25, 132.57, 131.66, 130.45, 129.67, 129.19, 126.61, 126.40, 120.37, 115.91, 115.05, 21.57.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₄N₃O ([M+H]⁺): 264.1131, trouvé 264.1131.

Acide *o*-méthylcinnamique (2.13i)

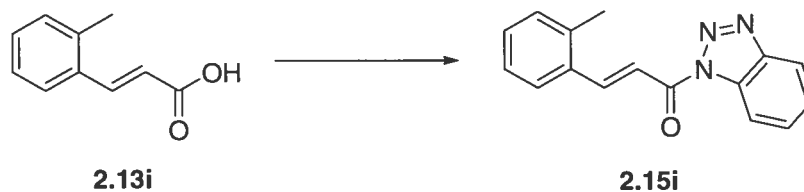
L'acide **2.13i** est synthétisé à partir du *o*-méthylbenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide couleur saumon avec un rendement de 67 %.

p.f. : 174 à 176 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.08 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 7.57 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.24 (m, 3H), 6.37 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 2.44 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 168.54, 142.11, 138.11, 133.87, 131.66, 130.92, 127.41, 127.38, 121.13, 20.26.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₀H₁₁O₂ ([M+H]⁺): 163.0754, trouvé 163.0750.

***o*-Méthylcinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15i)**

L'amide **2.15i** est synthétisé à partir de l'acide **2.13i** en suivant le protocole A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide blanc avec un rendement de 41 %.

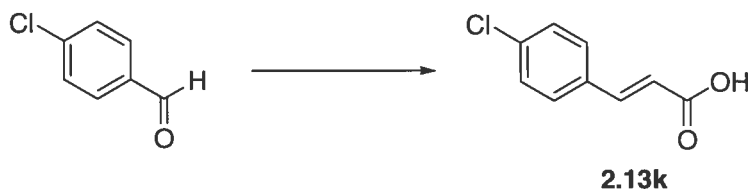
p.f. : 127 à 129 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.45 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 8.40 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.14 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.05 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 7.84 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz), 7.67 (td, 1H, *J* = 7.2 Hz, 0.7 Hz), 7.67 (td, 1H, *J* = 8 Hz, 0.8 Hz), 7.31 (m, 3H), 2.54 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.19, 146.54, 146.36, 138.99, 133.15, 131.68, 131.47, 131.30, 130.49, 127.27, 126.82, 126.42, 120.40, 116.94, 115.01, 20.12.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₄N₃O ([M+H]⁺): 264.1131, trouvé 264.1123.

Acide *p*-chlorocinnamique (2.13k)



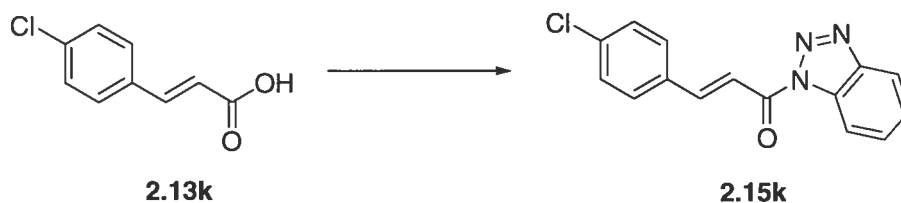
L'acide **2.13k** est synthétisé à partir du *p*-chlorobenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 49 %.

p.f. : 247 à 249 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.71 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.56 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.45 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.54 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 168.45, 143.51, 135.71, 134.19, 130.90, 129.90, 121.05.

SMHR (ESI) calculé pour C₉H₆ClO₂ ([M-H]⁻): 181.0062, trouvé 181.0057.

***p*-Chlorocinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15k)**

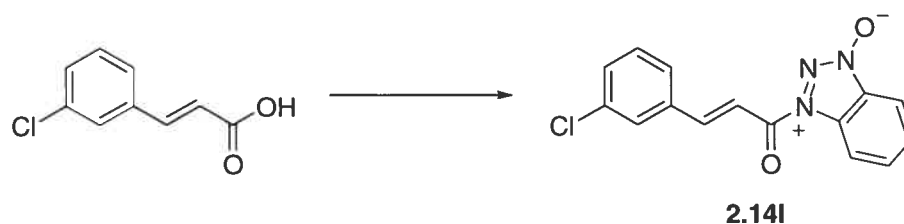
Cet amide est synthétisé à partir de l'acide **2.13k** en suivant le protocole général A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide blanc avec un rendement de 48 %.

p.f. : 191 à 193 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.41 (dt, 1H, *J* = 8.3 Hz, 0.9 Hz), 8.16 (dt, 1H, *J* = 8.3 Hz, 0.9 Hz), 8.10 (s, 2H), 7.68 (m, 3H), 7.54 (td, 1H, *J* = 7.2 Hz, 1.1 Hz), 7.44 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.01, 147.48, 146.65, 137.82, 132.88, 131.70, 130.72, 130.44, 129.75, 126.66, 120.56, 116.85, 115.10.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₁ClN₃O ([M+H]⁺): 284.0585, trouvé 284.0598.

***m*-Chlorocinnamoyl oxybenzotriazolyl amide (2.14I)**

Cet amide est synthétisé à partir de l'acide *m*-chlorocinnamique en suivant le protocole générale A et en remplaçant le benzotriazole par le 1-hydroxybenzotriazole. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 64 %.

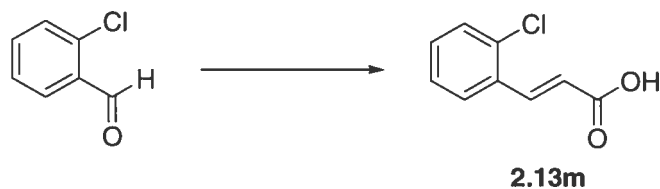
p.f. : 210 à 212 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.53 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.05 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 8.01 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz), 7.83 (td, 1H, *J* = 8.3 Hz, 1.1 Hz), 7.67 (m, 4H), 7.44 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 161.15, 147.20, 135.47, 135.13, 132.95, 132.86, 132.77, 131.31, 130.26, 128.57, 126.89, 126.87, 116.32, 116.21, 115.48.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₁ClN₃O₂ ([M+H]⁺): 300.0534, trouvé 300.0520.

Acide *o*-chlorocinnamique (2.13m)



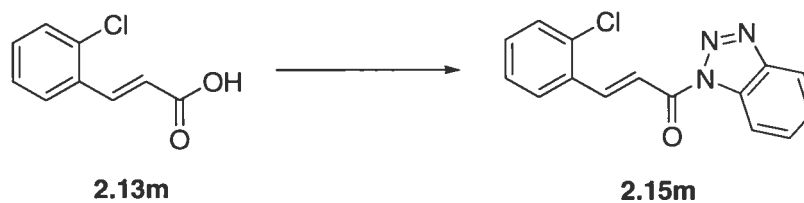
L'acide **2.13m** est synthétisé à partir du *o*-chlorobenzaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 56 %.

p.f. : 206 à 208 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.91 (dd, 1H, *J* = 7.4 Hz, 1.9 Hz), 7.85 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, 1.7 Hz), 7.39 (m, 2H), 6.59 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 168.18, 139.68, 134.57, 132.83, 132.63, 130.91, 129.19, 128.72, 123.26.

SMHR (ESI) calculé pour C₉H₆ClO₂ ([M-H]⁻): 181.0062, trouvé 181.0062.

***o*-Chlorocinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15m)**

Cet amide est synthétisé à partir de l'acide **2.13m** en suivant le protocole général A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide blanc avec un rendement de 37 %.

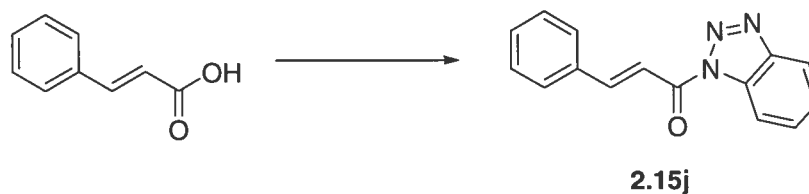
p.f. : 144 à 146 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.58 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 8.40 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.14 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.12 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 7.91 (dd, 1H, *J* = 6.7 Hz, 2.0 Hz), 7.68 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.53 (m, 2H), 7.37 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 163.83, 146.68, 144.63, 136.28, 132.64, 132.50, 131.75, 130.80, 130.75, 128.54, 127.64, 126.72, 120.57, 118.73, 115.14.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₁ClN₃O ([M+H]⁺): 284.0585, trouvé 284.0587.

Cinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15j)



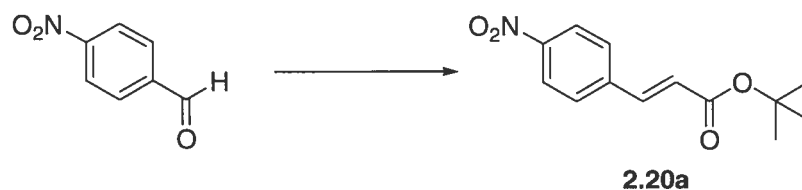
L'amide **2.15j** est synthétisé à partir de l'acide *trans*-cinnamique en suivant le protocole général A. Le produit désiré est obtenu après recristallisation dans l'éthanol pour donner un solide blanc avec un rendement de 23 %.

p.f. : 171 à 173 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.43 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 8.16 (m, 3H), 7.77 (m, 2H), 7.70 (td, 1H, *J* = 7.1 Hz, 1 Hz), 7.55 (td, 1H, *J* = 7.2 Hz, 1.0 Hz), 7.49 (m, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 171.51, 146.38, 137.55, 130.90, 129.43, 129.33, 128.56, 128.37, 128.33, 127.18, 126.65, 120.51, 114.61.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₂N₃O ([M+H]⁺): 250.0975, trouvé 250.0966.

***p*-Nitrocinnamoyl *t*-butyl ester (2.20a)**

Dans un ballon, sont dissous, dans 3 mL de THF, le bromure de (*tert*-butoxycarbonylméthyl)triphénylphosphonium (0.33 mmol) et le KHMDS (0.297 mmol). Le *p*-nitrobenzaldéhyde (0.165 mmol) solubilisé dans 1 mL de THF est ajouté goutte-à-goutte au mélange réactionnel. La solution est ensuite agitée pendant une heure à température de la pièce. La phase organique est lavée deux fois avec 2 mL d'une solution saturée de NH₄Cl, séchée avec du MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (20:80 AcOEt/hexanes) pour donner un solide jaune pâle avec un rendement de 75 %.

p.f. : 146 à 148 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.21 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 7.63 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 7.60 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.47 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 1.52 (s, 9H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 165.55, 148.56, 141.13, 140.86, 128.79, 124.80, 124.40, 81.57, 28.38.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₃H₁₅NO₄Na ([M+Na]⁺): 272.0893, trouvé 272.0895.

Acide *p*-aminocinnamique (2.13r)



Cet acide est synthétisé à partir de l'ester **2.20a** en suivant le protocole général D pour donner le *tert*-butyl ester de l'acide 4-amino-*trans*-cinnamique. Cet ester est dilué dans un minimum de CH₂Cl₂ et du TFA (3 mL) y est ajouté. Le mélange réactionnel est agité pendant 4 heures à 4°C. Le TFA est ensuite éliminé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec de l'éther diéthylique pour donner le produit sous la forme d'un solide orange avec un rendement de 64 %.

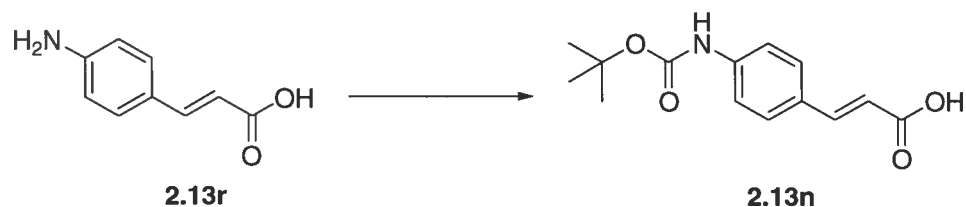
p.f. : 265 à 267 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 7.73 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.67 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.52 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 161.07, 137.51, 130.53, 127.64, 125.14, 119.63, 116.48.

SMHR (ESI) calculé pour C₉H₉NO₂ ([M+H]⁺): 164.0706, trouvé 164.0709.

Acide *p*-(*tert*-butoxycarbonylamine)cinnamique (2.13n)



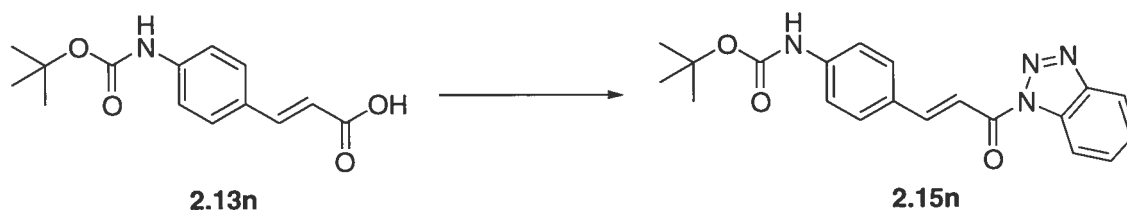
L'acide **2.13r** (0.5 mmol) est dissous dans 5 mL d'une solution de dioxane/H₂O (1:1). À ce mélange, est ajouté le di-*tert*-butyl dicarbonate ((BOC)₂O) (0.6 mmol) et NaHCO₃ (5 mmol). Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à la température de la pièce. Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite et 40 mL d'une solution de NaOH 1N sont ajoutés. La phase aqueuse ainsi obtenue est lavée avec 3×10 mL d'une solution de CH₂Cl₂ et est ensuite acidifiée avec une solution de HCl 1N. L'acide est extrait de la phase aqueuse avec 3×10 mL d'une solution d'AcOEt. La phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 45 %.

p.f. : 195 à 197 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 7.61 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.47 (d, 4H, *J* = 5.4 Hz), 6.35 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 1.51 (s, 9H).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 171.63, 155.66, 147.02, 143.71, 130.89, 130.67, 120.32, 117.84, 82.04, 29.49.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₄H₁₇NO₄Na ([M+Na]⁺): 286.1050, trouvé 286.1045.

***p*-(*tert*-Butoxycarbonylamine)cinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15n)**

Cet amide est synthétisé à partir de l'acide **2.13n** en suivant le protocole général A. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit d'un solide jaune pale avec un rendement de 61 %.

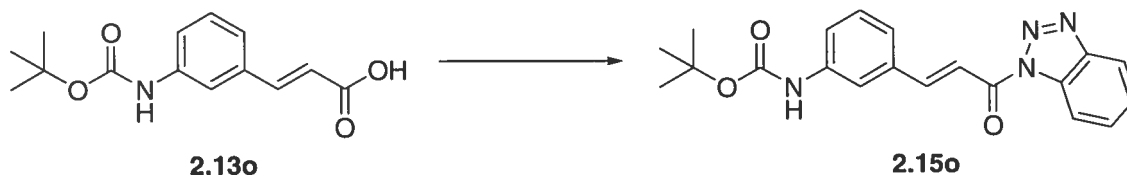
p.f. : 227 à 229 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 9.77 (s, 1H), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.07 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 7.93 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 7.82 (m, 3H), 7.60 (m, 3H), 1.48 (s, 9H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 164.58, 153.45, 149.27, 146.60, 143.94, 131.90, 131.58, 131.35, 128.43, 127.42, 121.03, 118.93, 115.32, 114.11, 80.65, 29.00.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₀H₂₀N₄O₃Na ([M+Na]⁺): 387.1428, trouvé 387.1425.

***m*-(*tert*-Butoxycarbonylamine)cinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15o)**



L'amide **2.15o** est synthétisé en suivant les mêmes voies de synthèse que pour le composé **2.15n**. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit d'un solide blanc avec un rendement de 15 %.

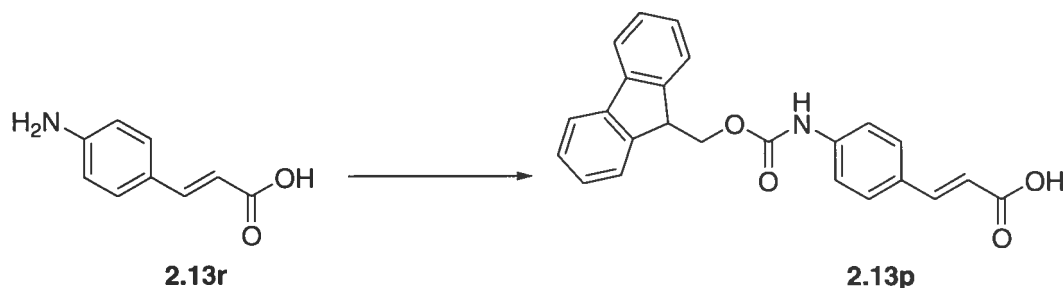
p.f. : 195 à 197 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.40 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.13 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.09 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.67 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.51 (m, 4H), 6.56 (s, 1H), 1.51 (s, 9H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.17, 152.96, 148.89, 146.63, 139.54, 135.20, 131.75, 130.62, 130.02, 126.56, 123.90, 121.75, 120.49, 118.90, 116.69, 115.14, 81.31, 28.65.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₀H₂₁N₄O₃ ([M+H]⁺): 365.1608, trouvé 365.1607.

Acide *p*-(9-fluorénylméthoxycarbonylamino)cinnamique (2.13p)



L'acide **2.13r** (0.5 mmol) est dissous dans 5 mL d'une solution de dioxane/H₂O (1:1). À ce mélange, sont ajoutés le chlorure de 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc-Cl) (0.6 mmol) et le NaHCO₃ (5 mmol). Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à la température de la pièce. Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite et le résidu obtenu est repris dans 40 mL d'une solution de NaOH 1N. La phase aqueuse ainsi obtenue est lavée avec 3×10 mL d'une solution de CH₂Cl₂ et est ensuite acidifiée avec une solution de HCl 6N. L'acide est récupéré avec 3×10 mL d'une solution d'AcOEt. La phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec de l'éther diéthylique pour donner le produit sous la forme d'un solide orangé avec un rendement de 37 %.

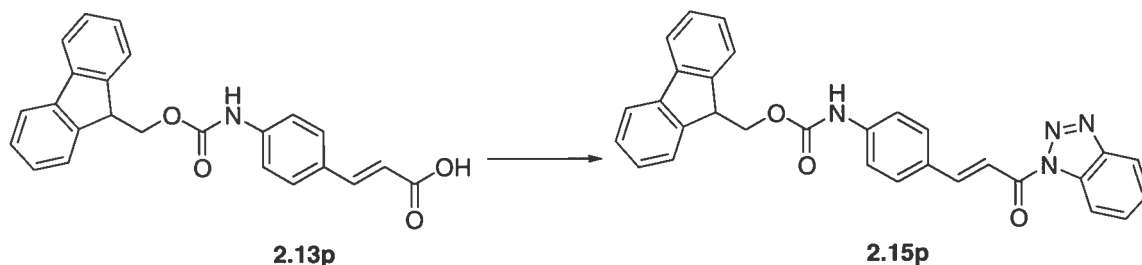
p.f. : 270 à 272 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 9.92 (s, 1H), 7.90 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.73 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.45 (m, 9H), 6.37 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz), 4.30 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 158.59, 145.21, 136.41, 136.36, 133.90, 133.75, 122.95, 122.28, 121.67, 121.15, 119.28, 114.76, 112.86, 111.88, 64.60, 47.00.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₄H₂₀NO₄ ([M+H]⁺): 386.1387, trouvé 386.1383.

***p*-(9-Fluorénylméthoxycarbonylamino)cinnamoyl benzotriazolyl amide
(2.15p)**



Cet amide est synthétisé à partir de l'acide **2.13p** en suivant le protocole général A. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 12 %.

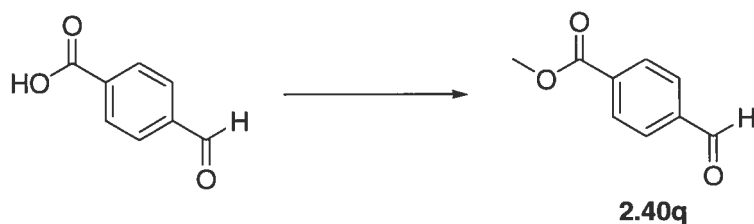
p.f. : 219 à 221 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 10.09 (s, 1H), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.84 (m, 9H), 7.59 (m, 3H), 7.35 (m, 4H), 4.52 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz), 4.32 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) : la très faible solubilité du composé (≤ 1 mg/mL) n'a pas permis d'obtenir un spectre dans un temps raisonnable (10 h d'acquisition).

SMHR (ESI) calculé pour C₃₀H₂₂N₄O₃Na ([M+Na]⁺): 509.1584, trouvé 509.1581.

Analyse élémentaire de C₃₀H₂₂N₄O₃ : attendue : C 74.06; H 4.56; N 11.52
trouvée : C 73.44; H 4.68; N 11.85.

***p*-(Méthoxycarbonyl)benzaldéhyde (2.40q)**

Le 4-carboxybenzaldéhyde (2 mmol) est dilué dans 6 mL de MeOH anhydride. À ce mélange réactionnel, sous azote et à 4°C, est ajouté, goutte-à-goutte, le chlorure d'acétyle. Le mélange est agité sous azote toute la nuit à la température de la pièce. Le méthanol est éliminé sous pression réduite et 35 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 5×10 mL d'une solution de NaOH 1N et 3×10 mL d'une solution NaCl saturée, séchée avec du MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 96 %.

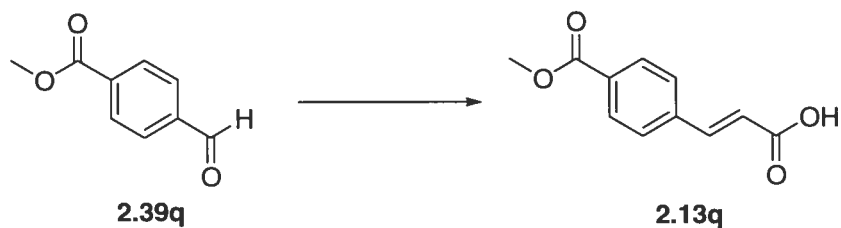
p.f. : 142 à 144 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 10.04 (s, 1H), 8.13 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.89 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 3.90 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 191.91, 166.26, 139.35, 135.27, 130.40, 129.74, 52.81.

SMHR (ESI) calculé pour C₉H₉O₃ ([M+H]⁺): 165.0546, trouvé 165.0543.

Acide *p*-(méthoxycarbonyl)cinnamique (2.13q)



L'acide **2.13q** est synthétisé à partir de l'aldéhyde **2.39q** en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 40 %.

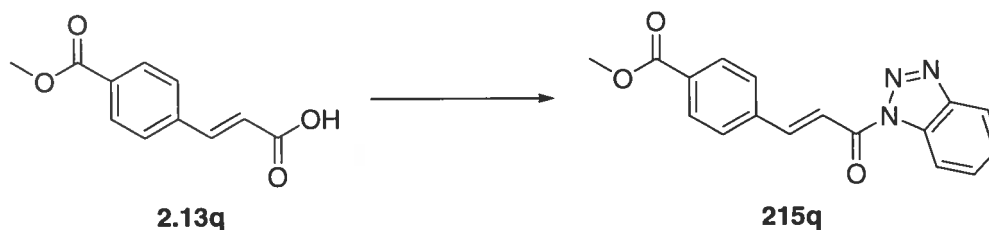
p.f. : 245 à 247 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.94 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.81 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.62 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.64 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 3.84 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 168.54, 166.72, 143.43, 139.73, 131.53, 130.56, 129.38, 122.87, 53.24.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₁H₉O₄ ([M-H]⁻): 205.0506, trouvé 205.0504.

***p*-(Méthoxycarbonyl)cinnamoyl benzotriazolyl amide (2.15q)**



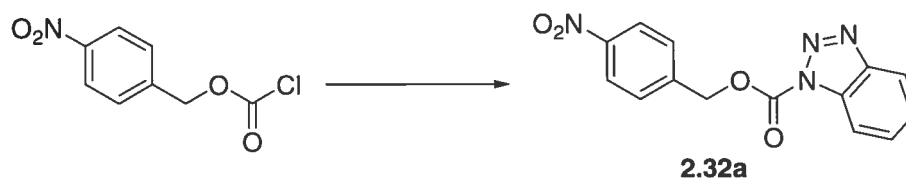
Cet amide est synthétisé à partir de l'acide **2.13q** en suivant le protocole général A. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 39 %.

p.f. : 224 à 226 °C.

RMN ¹H (300 Mhz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.32 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.16 (s, 2H), 8.05 (m, 4H), 7.80 (td, 1H, *J* = 7.2 Hz, 1.0 Hz), 7.63 (td, 1H, *J* = 7.2 Hz, 1.0 Hz), 3.86 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 Mhz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 176.52, 164.24, 163.33, 147.27, 132.57, 131.88, 131.90, 131.50, 131,10, 130.81, 130.36, 121.43, 121.20, 115.35, 53.41.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₇H₁₄N₃O₃ ([M+H]⁺): 308.1030, trouvé 308.1028.

***p*-Nitrobenzyloxycarbonylbenzotriazole (2.32a)**

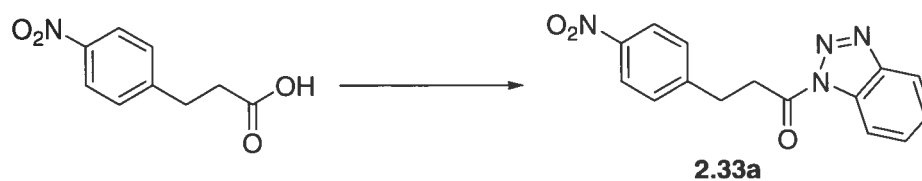
Le chloroformate de *p*-nitrobenzyle (0.5 mmol) est dissous dans 5 mL de CH₂Cl₂. À ce mélange, sont ajoutés le benzotriazole (0.5 mmol) et la triéthylamine (2 mmol). Le mélange est agité toute la nuit à la température de la pièce. Du CH₂Cl₂ (20 mL) est ensuite ajoutée, la phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×5 mL d'une solution de HCl 1N, 2×5 mL d'une solution de NaOH 1N et 5 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est ensuite trituré avec de l'éther diéthylique pour le produit sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 59 %.

p.f. : 160 à 162 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.27 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 8.17 (m, 3H), 7.72 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.65 (td, 1H, *J* = 8.3 Hz, 1.1 Hz), 7.53 (m, 2H), 5.26 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 154.84, 146.17, 142.27, 141.30, 132.01, 130.82, 128.78, 126.37, 124.16, 120.86, 113.58, 68.66.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₄H₁₁N₄O₄ ([M+H]⁺): 299.0775, trouvé 297.0775.

***p*-Nitrohydrocinnamoyl benzotriazolamide (2.33a)**

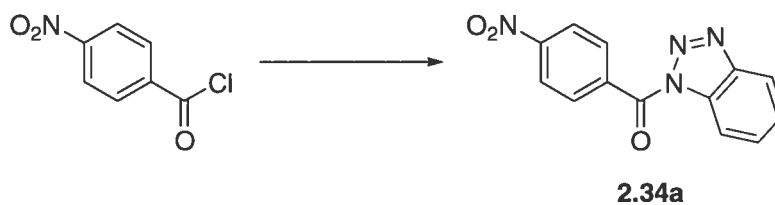
Cet amide est synthétisé à partir de l'acide *p*-nitrohydrocinnamique¹³⁴ en suivant le protocole général A. Le produit est purifié par chromatographie flash (30 : 70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide jaune pâle avec un rendement de 60 %.

p.f. : 134 à 136 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.27 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.19 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 8.13 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.67 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.52 (m, 3H), 3.83 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.35 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 171.15, 147.83, 146.48, 130.96, 130.83, 129.76, 126.69, 125.47, 124.22, 120.59, 114.60, 36.62, 30.14.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₃N₄O₃ ([M+H]⁺): 297.0982, trouvé 297.0977.

***p*-Nitrobenzoyl benzotriazolyl amide (2.34a)**

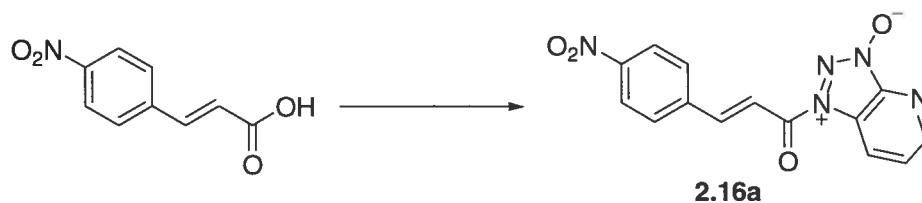
Le chlorure de *p*-nitrobenzoyle (0.5 mmol) est dissous dans 5 mL de CH₂Cl₂. À cette solution, sont ajoutés le benzotriazole (0.5 mmol) et la tréthyamine (2 mmol). Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à la température de la pièce. Du CH₂Cl₂ (20 mL) est ajouté et la phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×5 mL d'une solution de HCl 1N, 2×5 mL d'une solution de NaOH 1N et 5 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et le CH₂Cl₂ est éliminé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec de l'éther diéthylique pour donner le produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 49 %.

p.f. : 194 à 196 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.39 (m, 5H), 8.19 (dt, 1H, *J* = 8.3 Hz, 0.9 Hz), 7.75 (td, 1H, *J* = 8.2 Hz, 1.0 Hz), 7.60 (td, 1H, *J* = 8.2 Hz, 1.0 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 165.33, 150.78, 146.19, 137.22, 132.98, 132.27, 131.38, 127.31, 123.81, 120.85, 115.08.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₃H₉N₄O₃ ([M+H]⁺): 269.0669, trouvé 269.0676.

***p*-Nitrocinnamoyl oxyazabenzotriazolyl amide (2.16a)**

L'amide **2.16a** est synthétisé à partir du 1-hydroxy-1-azabenzotriazole en suivant le protocole général A. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 58 %.

p.f. : 203 à 205 °C (déc.).

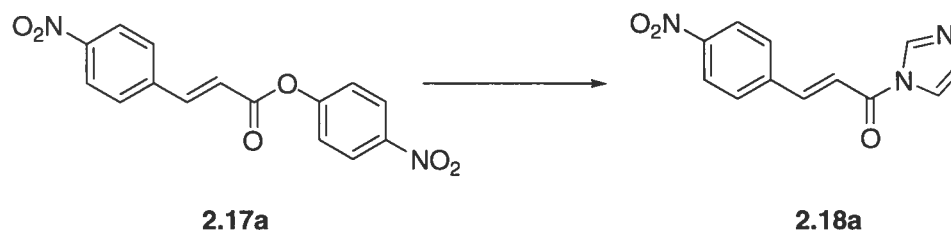
RMN ¹H (300 Mhz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.81 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz), 8.58 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.28 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 8.03 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 4.4 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) : la très faible solubilité du composé (≤ 1mg/mL) n'a pas permis d'obtenir un spectre dans un temps raisonnable (10 h d'acquisition).

SMHR : Toutes les sources d'ionisation disponibles ont été testées sans succès.

Analyse élémentaire de C₁₄H₉N₅O₄ : attendue : C 54.02; H 2.91; N 22.50

trouvée : C 55.34; H 3.16; N 23.46.

***p*-Nitrocinnamoyl imidazolyl amide (2.18a)**

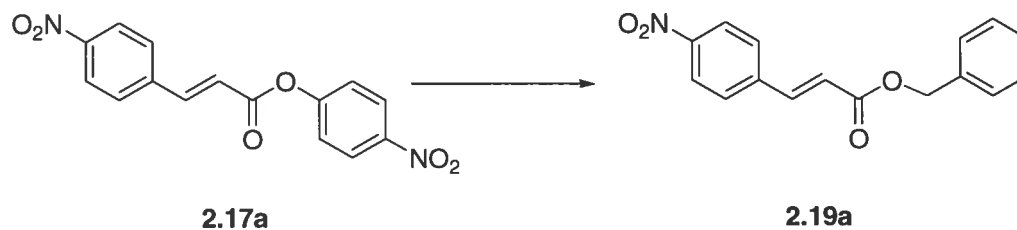
Cet amide est synthétisé à partir de l'imidazole en suivant le protocole général E avec l'acétone comme solvant. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec de l'éther diéthylique permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 68 %.

p.f. : 178 à 179 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.82 (s, 1H), 8.32 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 8.20 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 7.96 (t, 1H, *J* = 1.31 Hz), 7.85 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 7.17 (t, 1H, *J* = 0.9 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 157.96, 140.26, 134.05, 133.72, 128.50, 124.02, 123.11, 118.25, 118.19, 118.12.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₂H₁₀N₃O₃ ([M+H]⁺): 244.0717, trouvé 244.0727.

***p*-Nitrocinnamoyl benzyl ester (2.19a)**

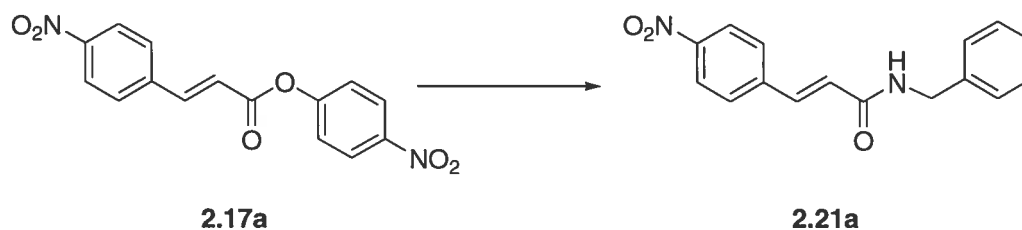
L'ester **2.19a** est synthétisé à partir de l'alcool benzylique en suivant le protocole général E. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide jaune avec un rendement de 80 %.

p.f. : 112 à 114 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.22 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.72 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.64 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.38 (m, 5H), 6.58 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 5.25 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 166.13, 148.79, 142.47, 140.70, 135.90, 128.97, 128.77, 128.69, 124.47 (2 carbones), 122.46, 67.12.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₄NO₄ ([M+H]⁺): 284.0917, trouvé 284.0931.

***p*-Nitrocinnamoyl benzyl amide (2.21a)**

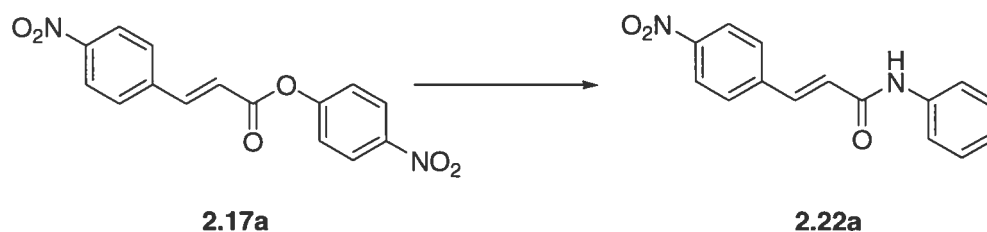
Cet amide est synthétisé à partir de la benzylamine en suivant le protocole général E. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) pour donner un solide jaune pâle avec un rendement de 63 %.

p.f. : 188 à 190 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.76 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 8.24 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.82 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.57 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 7.30 (m, 5H), 6.86 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 4.40 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 155.32, 139.88, 134.37, 132.17, 129.93, 122.49, 122.28, 121.40, 120.95, 120.36, 118.36, 43.15.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₅N₂O₃ ([M+H]⁺): 283.1077, trouvé 283.1076.

***p*-Nitrocinnamoyl phényl amide (2.22a)**

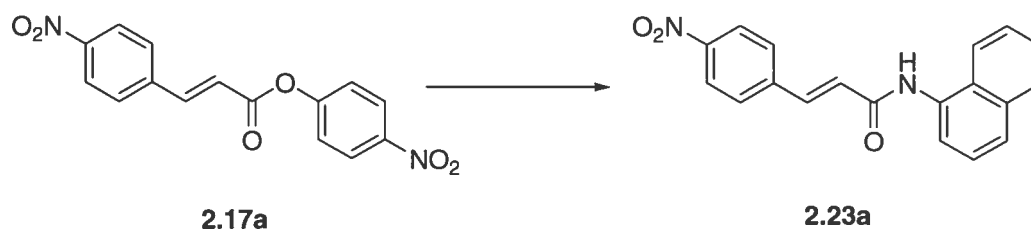
L'amide **2.22a** est synthétisé à partir de l'aniline en suivant le protocole général E. Le produit est purifié par chromatographie flash (40:60 AcOEt/hexanes) pour donner un solide jaune avec un rendement de 61 %.

p.f. : 209 à 211 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 10.35 (s, 1H), 8.28 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.87 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.69 (d, 2H, *J* = 9.4 Hz), 7.68 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz), 7.33 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.07 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 163.77, 148.58, 142.26, 139.99, 138.66, 129.83, 129.71, 127.53, 125.14, 124.62, 120.26.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₃N₂O₃ ([M+H]⁺): 269.0921, trouvé 269.0915.

***p*-Nitrocinnamoyl naphthyl amide (2.23a)**

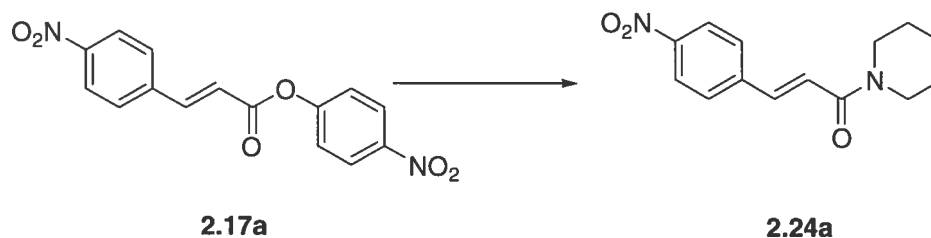
Cet amide est synthétisé à partir du 1-aminonaphtalène en suivant le protocole général E. Le produit est purifié par chromatographie flash (30:70 AcOEt/hexanes) sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 61%.

p.f. : 278 à 280 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 10.28 (s, 1H), 8.31 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 8.14 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 7.93 (m, 4H), 7.78 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 7.55 (b, 3H), 7.33 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 164.61, 148.59, 142.43, 138.82, 134.69, 134.28, 129.74, 129.25, 128.13, 127.60, 127.10, 126.94, 126.61, 126.29, 125.15, 123.45, 121.92.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₉H₁₅N₂O₃ ([M+H]⁺): 319.1077, trouvé 319.1066.

***p*-Nitrocinnamoyl pipéridinyl amide (2.24a)**

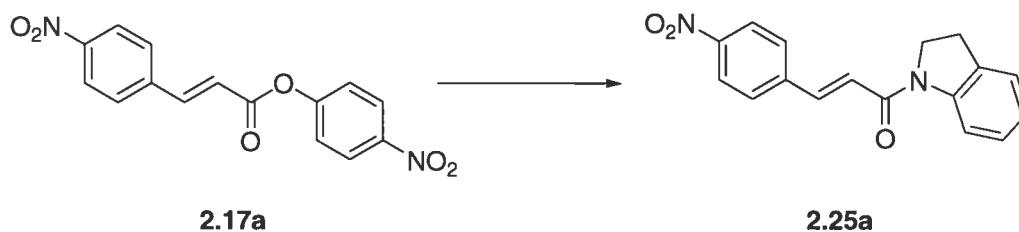
Cet amide est synthétisé à partir de la pipéridine en suivant le protocole général E. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 95 %.

p.f. : 170 à 172 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.21 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.65 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.64 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz), 7.05 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 3.66 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 1.63 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.6, 148.2, 142.1, 139.6, 128.5, 124.4, 122.5, 47.4, 43.7, 27.0, 25.9, 24.8.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₄H₁₇N₂O₃ ([M+H]⁺): 261.1234, trouvé 261.1224.

***p*-Nitrocinnamoyl indolinyl amide (2.25a)**

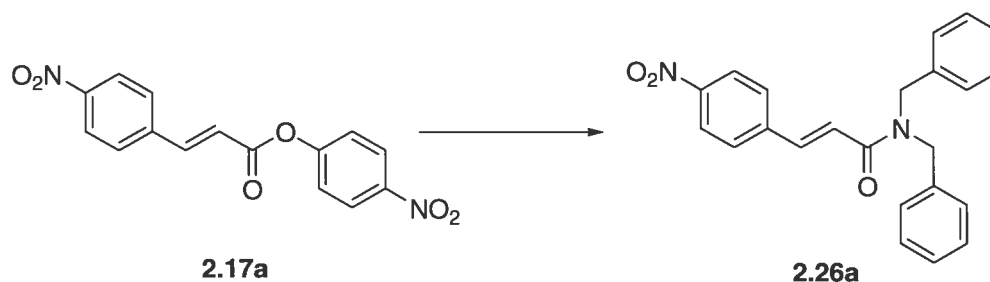
L'amide **2.25a** est synthétisé à partir de l'indoline en suivant le protocole général E. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 42 %.

p.f. : 290 à 292 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.35 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 8.27 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.86 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz), 7.72 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.26 (b, 2H), 7.08 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz), 4.32 (t, 2H, *J* = 8.4 Hz), 3.29 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 163.47, 148.56, 141.61, 140.87, 140.78, 132.38, 128.89, 128.05, 124.75, 124.62, 124.52, 123.45, 118.05, 48.51, 28.35.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₇H₁₅N₂O₃ ([M+H]⁺): 295.1077, trouvé 295.1067.

***p*-Nitrocinnamoyl dibenzyl amide (2.26a)**

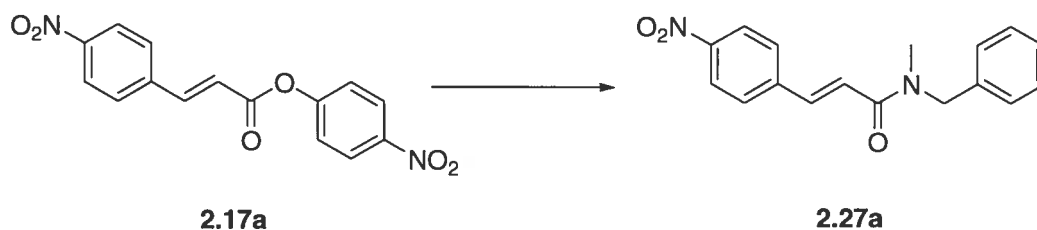
Cet amide est synthétisé à partir de la dibenzylamine en suivant le protocole général E. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 64 %.

p.f. : 142 à 144 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.17 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.84 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.29 (b, 10H), 6.98 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz), 4.71 (s, 2H), 4.60 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 166.11, 147.99, 141.23, 140.84, 136.81, 136.23, 129.01, 128.59, 128.30, 127.81, 127.51, 126.33 (2 carbones), 123.96, 121.52, 50.04, 48.95.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₂₁N₂O₃ ([M+H]⁺): 373.1547, trouvé 373.1534.

***p*-Nitrocinnamoyl méthylbenzyl amide (2.27a)**

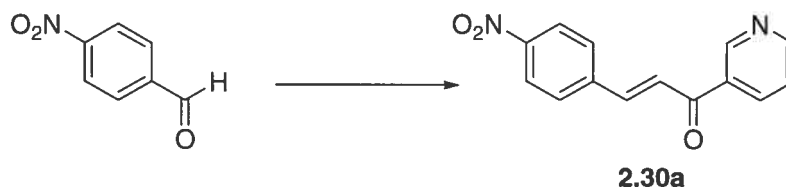
Cet amide est synthétisé à partir de la *N*-méthylbenzylamine en suivant le protocole général E. Le produit (mélange de 2 rotamères (1:1)), après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 73 %.

p.f. : 129 à 131 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.28 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 8.23 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.85 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 7.80 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 7.72 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.63 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.35 (m, 10H), 7.12 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 7.03 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz), 4.77 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.14 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 166.72, 165.81, 148.39, 141.82, 140.64, 137.20, 129.42, 129.02, 128.72, 128.44, 128.26, 127.89, 126.67, 124.45, 124.40, 121.97, 53.88, 51.75, 35.36, 34.92.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₇H₁₇N₂O₃ ([M+H]⁺): 297.1234, trouvé 297.1244.

(E)-3-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-èn-1-one (2.30a)

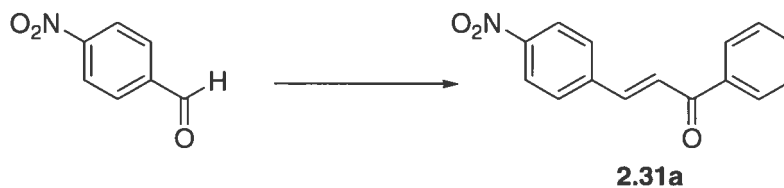
L'énone **2.30a** est synthétisée à partir du *p*-nitrobenzaldéhyde en suivant le protocole général C. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec un minimum d'EtOH permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 75 %.

p.f. : 182 à 184 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 9.23 (s, 1H), 8.82 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 8.29 (m, 3H), 7.80 (m, 3H), 7.58 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz), 7.48 (m, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 188.69, 153.99, 150.09, 149.10, 142.97, 140.80, 136.33, 133.22, 129.48, 125.17, 124.63, 124.21.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₄H₁₁N₂O₃ ([M+H]⁺): 255.0764, trouvé 255.0769.

(E)-3-(4-nitrophényl)-1-phénylprop-2-èn-1-one (2.31a)

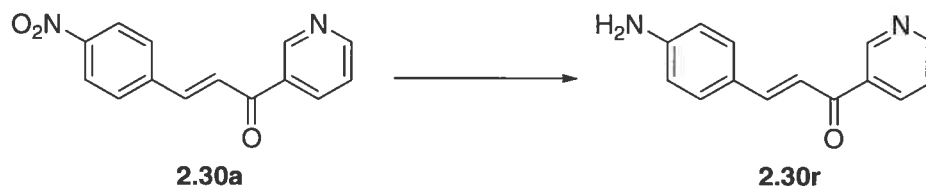
L'énone **2.31a** est synthétisée à partir du *p*-nitrobenzaldéhyde et de l'acétophénone en suivant le protocole général C. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec un minimum d'EtOH permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune pale avec un rendement de 89 %.

p.f. : 162 à 164 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.25 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.02 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.78 (m, 3H), 7.61 (b, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 189.91, 148.82, 141.80, 141.32, 137.79, 133.69, 129.25, 129.12, 128.89, 125.96, 124.51.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₂NO₃ ([M+H]⁺): 254.0812, trouvé 254.0809.

(E)-3-(4-aminophényl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-èn-1-one (2.30r)

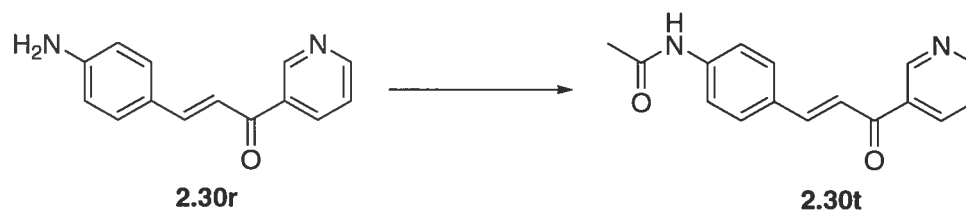
Cette énone est synthétisée à partir du composé **2.30a** en suivant le protocole général D. Le produit est purifié par chromatographie flash (100% AcOEt) sous la forme d'un solide orange pale avec un rendement de 57 %.

p.f. : 167 à 169 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 9.18 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 8.76 (dd, 1H, *J* = 4.8 Hz, 1.6 Hz), 8.25 (dt, 1H, *J* = 8.0 Hz, 1.9 Hz), 7.77 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 7.46 (m, 3H), 7.28 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 4.07 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 180.49, 146.89, 144.29, 144.04, 141.53, 131.49, 129.90, 126.89, 120.98, 120.22, 114.08, 112.11.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₄H₁₃N₂O ([M+H]⁺): 225.1022, trouvé 250.1027.

(E)-3-(4-acétylamino-phényl)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-èn-1-one (2.30t)

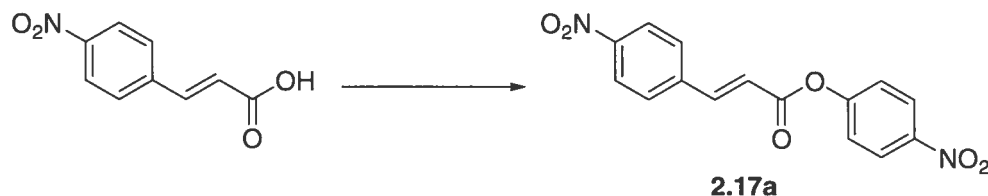
L'énone **2.30t** est synthétisée à partir de l'aniline **2.30r**. Cette aniline (0.045 mmol) est solubilisée dans 500 μ L d'une solution de pyridine contenant 40% d'anhydride acétique. Le mélange est agité pendant 2h à la température de la pièce. L'ajout d'une solution de NaOH 1N fait précipiter le produit qui est ensuite filtré et lavé avec de l'eau. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 77 %.

p.f. : 191 à 193 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 9.21 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.27 (dt, 1H, $J = 7.9$ Hz, 1.8 Hz), 7.78 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 7.59 (m, 4H), 7.39 (m, 3H), 2.19 (s, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 189.42, 169.02, 159.32, 153.39, 149.99, 145.83, 140.87, 136.29, 133.97, 130.08, 124.07, 120.50, 120.03, 25.11.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 267.1128, trouvé 267.1141.

***p*-Nitrocinnamoyl *p*-nitrophényl ester (2.17a)**

Cet ester est synthétisé à partir de l'acide *p*-nitrocinnamique. Cet acide (1 mmol) est dilué dans 6 mL d'acétonitrile. À cette solution, sont ajoutés la triéthylamine (1 mmol) et le DMAP (0.1 mmol). Le mélange est agité pendant 5 min à la température de la pièce puis le chloroformate *p*-nitrophenyle (1.1 mmol) est ajouté et la réaction est à nouveau agité pendant 1h à la température de la pièce. Le précipité formé est filtré et lavé avec 5 mL d'acétonitrile pour donner le produit sous la forme d'un solide jaune pale avec un rendement de 94 %.

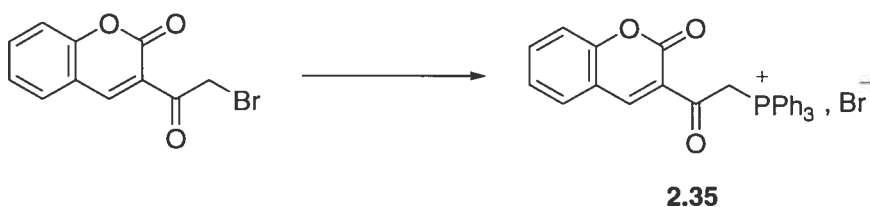
p.f. : 181 à 183 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.32 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz), 8.27 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.10 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 8.02 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.54 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz), 7.13 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 164.70, 156.18, 149.34, 146.07, 145.53, 140.97, 130.84, 126.31, 124.97, 124.17, 121.84.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₁₀N₂O₆Ag ([M+Ag]⁺): 420.9584, trouvé 420.9589.

Bromure de 3-(triphénylphosphinylacétyl)coumarine (2.35)



La phosphine **2.35** est synthétisé à partir de la 3-(bromoacétyl)coumarine. De la triphénylphosphine (2 mmol) est solubilisé dans 5 mL de CH_2Cl_2 . À cette solution, est ajouté la 3-(bromoacétyl)coumarine (2 mmol) et le tout est agité 90 min à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est trituré avec de l'éther diéthylique pour donner le produit sous la forme d'un solide jaune cristallin avec un rendement quantitatif.

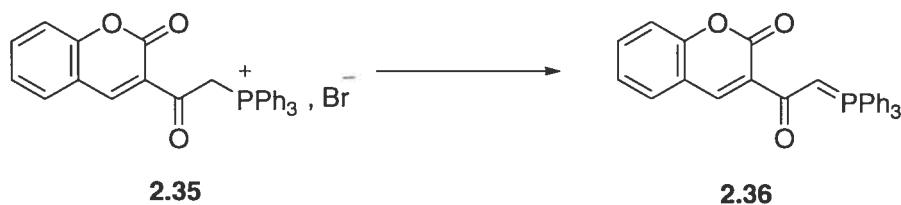
p.f. : 127 à 129 °C (déc.).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 9.24 (s, 1H), 7.83 (m, 6H), 7.60 (m, 11H), 7.23 (m, 2H), 6.35 (d, 2H, $J = 12.2$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 189.2, 158.3, 155.4, 151.4, 135.1, 134.3, 133.8, 132.5, 131.5, 130.5, 130.2, 129.1, 125.4, 119.2, 118.0.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{P}$ ($[\text{M}]^+$): 449.1379, trouvé 449.1313.

3-(triphénylphosphinylacétényl)coumarine (2.36)



La phosphine **2.35** (1 mmol) est diluée dans 4 mL d'éthanol. À cette solution est ajouté goutte-à-goutte du carbonate de potassium (2 mmol) diluée dans 2 mL d'eau. Le mélange est agité 90 min à température ambiante. Cette solution est ensuite diluée avec 40 mL d'eau. Le produit est extrait de cette phase aqueuse avec 4×10 mL d'AcOEt. La phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide cristallin jaune avec un rendement de 95 %.

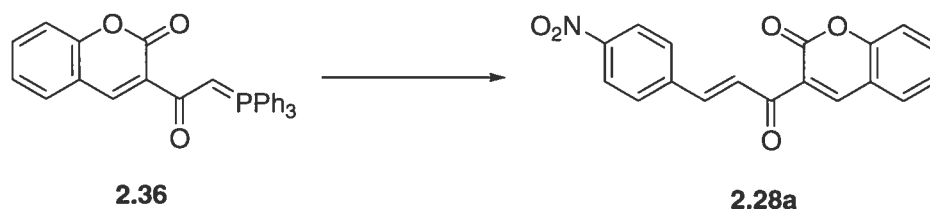
p.f. : 114 à 116 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.66 (s, 1H), 7.68 (m, 6H), 7.40 (m, 11H), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.14 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 5.55 (d, 1H, *J* = 27.3 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 168.4, 168.3, 154.1, 148.2, 138.0, 128.9, 128.0, 127.8, 127.7, 125.0, 123.0, 121.9, 120.6, 116.2, 113.0.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₉H₂₂O₃P ([M+H]⁺): 449.1301, trouvé 449.1302.

3-((*E*)-3-(4-nitrophényl)acryloyl)-2H-chromèn-2-one (2.28a)



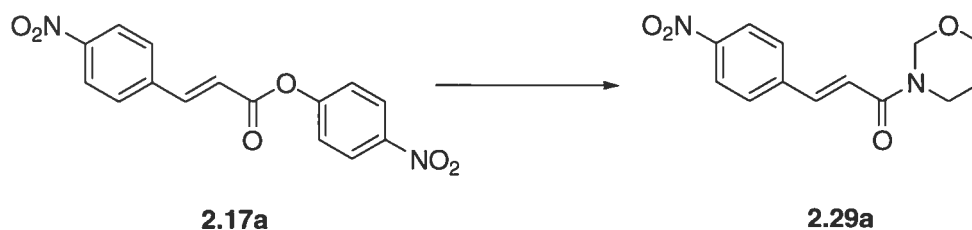
Dans un ballon de 50 mL, est dissous l'ylide **2.36** (1 mmol) dans 10 mL de toluène. À cette solution, est ajouté goutte-à-goutte le *p*-nitrobenzaldéhyde (0.67 mmol) préalablement dissous dans 5 mL de toluène. Le mélange est agité toute la nuit à température ambiante. Le précipité formé est ensuite filtré et lavé avec du toluène pour donner le produit désiré sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 36 %.

p.f. : 272 à 274 °C.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.73 (s, 1H), 8.30 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.03 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.97 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 7.84 (s, 2H), 7.78 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.51 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) : la très faible solubilité du composé (≤ 1 mg/mL) n'a pas permis d'obtenir un spectre dans un temps raisonnable (10 h d'acquisition).

SMHR (ESI) calculé pour C₁₈H₁₂NO₅ ([M+H]⁺): 322.0710, trouvé 322.0716.

(E)-3-(4-nitrophényl)-1-(1,3-oxazinan-3-yl)prop-2-èn-1-one (2.29a)

Cet amide est synthétisé à partir de la 1,3-oxazinanane (**2.41**) (préparé suivant le protocole de la page 159) en suivant le protocole général E. Le produit n'est pas purifié par trituration dans ce cas là mais par chromatographie flash (100% AcOEt) pour l'obtenir sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 88 %.

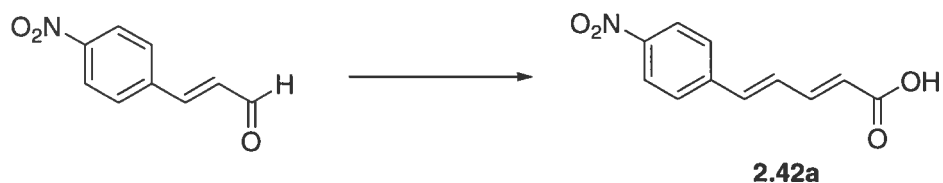
p.f. 162 à 164 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.21 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.67 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz), 7.65 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.00 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 5.09 (s, 2H), 3.93 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 3.85 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 1.79 (qu, 2H, *J* = 5.2 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.8, 148.4, 141.6, 140.7, 128.7, 124.4, 121.4, 78.2, 68.6, 42.0, 26.3

SMHR (ESI) calculé pour C₁₃H₁₅N₂O₄ ([M+H]⁺): 263.1036, trouvé 263.1030.

Acide (2*E*,4*E*)-5-(4-nitrophényl)penta-2,4-diénoïque (2.42a)



L'acide **2.42a** est synthétisé à partir du *p*-nitrocinnamaldéhyde en suivant le protocole général B. Le produit, après trituration à l'éther diéthylique, est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 82 %.

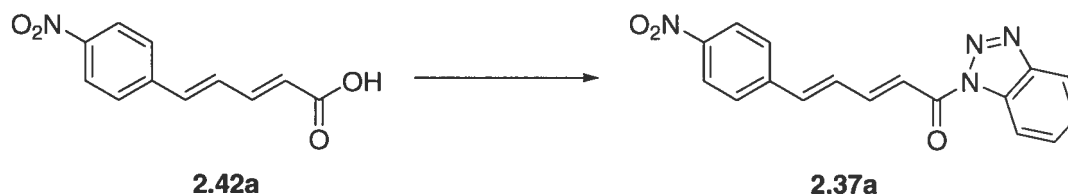
p.f. : 291 à 293 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.25 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.82 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.36 (m, 2H), 7.19 (d, 1H, *J* = 14.7 Hz), 6.15 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz), 7.13 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 168.2, 147.9, 144.3, 143.6, 138.1, 132.0, 129.0, 125.8, 125.0.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₁H₈NO₄ ([M-H]⁻): 218.0380, trouvé 218.0451.

**(2E,4E)-5-(4-nitrophényl)penta-2,4-diénoyl benzotriazolyl amide
(2.37a)**



L'amide **2.37a** est synthétisé à partir de l'acide **2.42a** en suivant le protocole général A. Une filtration du mélange réactionnel suivie d'un lavage avec du DMF permet d'obtenir le produit sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 48 %.

p.f. : 265 à 267 °C (déc.).

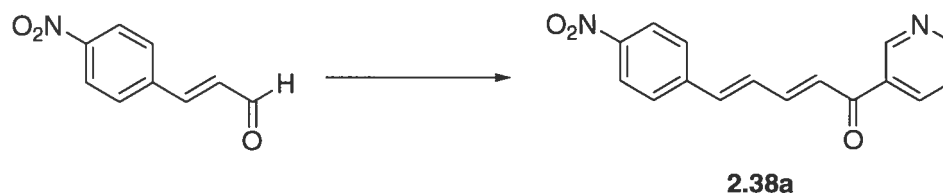
RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.32 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 8.24 (m, 2H), 7.96 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.80 (m, 3H), 7.67 (dd, 1H, *J* = 15.3 Hz, 8.2 Hz), 7.53 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) : la très faible solubilité du composé (≤ 1 mg/mL) n'a pas permis d'obtenir un spectre dans un temps raisonnable (10 h d'acquisition).

SMHR (ESI) calculé pour C₁₇H₁₂N₄O₃Ag ([M+Ag]⁺): 428.0032, trouvé 427.9783.

Analyse élémentaire de C₁₇H₁₂N₄O₃ : attendue : C 63.75; H 3.76; N 17.49

trouvée : C 64.59; H 3.86; N 18.00.

(2*E*,4*E*)-5-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-3-yl)penta-2,4-diène-1-one (2.38a)

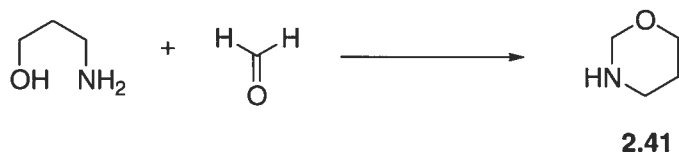
L'énone **2.38a** est synthétisée à partir du *p*-nitrocinnamaldéhyde et de la 3-acétylpyridine en suivant le protocole général C. Le résidu de couleur verdâtre est filtré et est purifié par chromatographie flash (100% AcOEt) pour donner le produit sous la forme d'un solide orange avec un rendement de 33 %.

p.f. : 212 à 214 °C (déc.).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 9.17 (s, 1H), 8.78 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 8.24 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz), 8.21 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.62 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.58 (d, 1H, *J* = 13.3 Hz), 7.44 (m, 1H), 7.12 (m, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 180.1, 147.5, 144.1, 142.5, 139.2, 137.2, 134.9, 131.6, 126.7, 124.1, 123.2 (2 carbones), 120.8, 120.4.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₃N₂O₃ ([M+H]⁺): 281.0921, trouvé 281.0930.

1,3-Oxazinane (2.41)

Dans un ballon sec, a été introduit 20 mL d'éthanol anhydre, le 3-aminopropanol (15 mmol) et le formaldéhyde (15 mmol). Le mélange est ensuite agité toute la nuit sous azote. L'éthanol est évaporé sous pression réduite et le produit est purifié par micro-distillation (37-39 °C, 1.2 mmHg) pour donner un liquide translucide incolore avec un rendement de 57 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 4.29 (s, 2H), 3.79 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz), 2.91 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz), 1,50 (qu, 2H, *J* = 5.4 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 80.1, 67.7, 44.1, 28.2.

SMHR (ESI) calculé pour C₄H₁₀NO ([M+H]⁺): 88.0756, trouvé 88.0760.

6.3. Partie expérimentale du Chapitre 3

6.3.1. Réactivité vis-à-vis du glutathion

L'acrylamide **3.4c** et le chloroacétamide **3.5c** (0.2 mM) ont été incubés à 37 °C en présence de 1.6 mM de glutathion et 3.4 mM de glutamine utilisée comme étalon interne dans une solution de 10 mM de bicarbonate d'ammonium contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO), à pH 7. La composition des mélanges réactionnels a été déterminée par spectrométrie de masse à un temps zéro et puis après 1 h, 2 h, 6 h et 24 h de réaction. Les mesures ont été obtenues par injection directe de 0.2 µL des échantillons sur le LC-MSD-Tof par électronebulation en mode positif. Les aires des pics des ions moléculaires protonés (M+H)⁺ des espèces cibles et du standard interne ont été intégrées et utilisées pour quantifier la proportion d'inhibiteur qui réagit de façon non spécifique avec le glutathion.

6.3.2. Synthèse

6.3.2.1. Réactifs et solvants

Les diaminoalcanes utilisés, ainsi que la *N*-Cbz-L-phénylalanine (Cbz-Phe-OH), le *p*-nitrophenylchloroformate, le chlorure d'acryloyle, l'anhydride chloroacétique, la 1-propylamine, l'anhydride maléique et la diméthylaminopyridine (DMAP) ont été achetés chez Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans autre purification supplémentaire. La triéthylamine et le DMF ont été achetés chez ACP et ont été utilisés tel quel. L'acétate de sodium et l'anhydride acétique ont été obtenus chez Anachemia. L'acétonitrile et le dichlorométhane ont été achetés chez EMD. Le *N*-Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly¹¹⁴ et le Cbz-Phe-GABA umbelliferyl ester¹¹⁵ ont été synthétisés dans le groupe du Prof. Keillor en suivant les protocoles publiés.

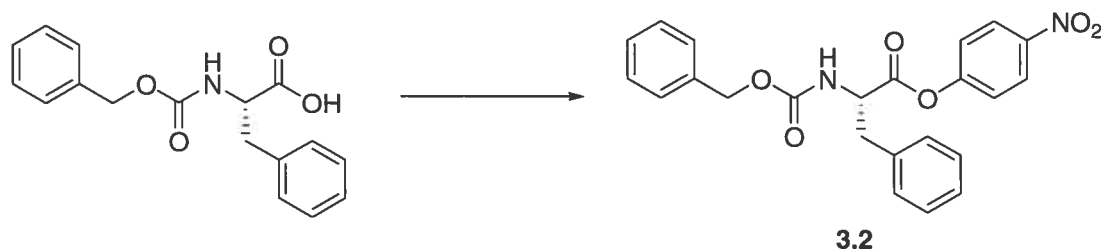
6.3.2.2. Protocoles généraux

Protocole général A : couplage de l'espaceur. Le Cbz-Phe *p*-nitrophényl ester (**3.2**) (0.5 mmol) est dissous dans 50 mL de CH₃CN. À cette solution, est ajouté rapidement le diaminoalcane (5 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1h à la température de la pièce. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et 40 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec une solution de NaOH 1N jusqu'à ce que la phase organique n'ait plus une coloration jaune. A ce moment, la phase organique est séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est précipité avec un mélange CH₂Cl₂/hexanes pour donner le produit désiré sous forme de solide.

Protocole général B : réaction avec le chlorure d'acryloyle. Cbz-Phe-NH-(CH₂)_n-NH₂ (0.15 mmol) est dissous dans 3 mL de CH₃CN en présence de Et₃N (104 μL, 0.75 mmol). Le mélange réactionnel est refroidi à 4 °C et le chlorure d'acryloyle (0.375 mmol) est ajouté goutte-à-goutte. Le mélange est ensuite agité toute la nuit à la température de la pièce. Le produit voulu est purifié soit par filtration à partir du brut, soit par extraction et chromatographie flash.

Protocole général C : réaction avec l'anhydride chloroacétique. Ce protocole est identique au protocole B dans lequel on a remplacé le chlorure d'acryloyle par l'anhydride chloroacétique.

N-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine *p*-nitrophénylester (3.2)



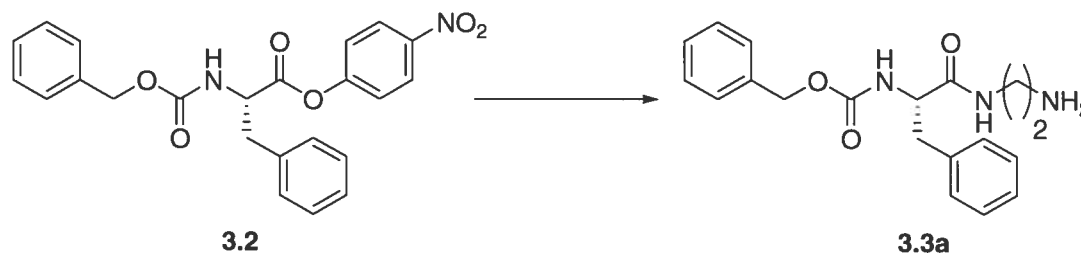
La *N*-Cbz-L-phenylalanine (**2.1**) (1 mmol) est solubilisée dans 10 mL de CH₃CN contenant Et₃N (139 μL, 1 mmol). À cette solution, est ajouté du *p*-nitrophenylchloroformate (222 mg, 1.1 mmol) à 4 °C. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant 5 min à 4 °C. Du DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol) est ajouté et la solution est à nouveau agité pendant 45 min à 4 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et 30 mL de AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×10 mL d'une solution HCl 1N, puis séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et de nouveau évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est trituré à l'aide d'éther diéthylique et filtré pour obtenir un solide blanc avec un rendement de 68 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.22 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 7.33 (m, 10H), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 5.34 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.12 (s, 2H), 4.84 (m, 1H), 3.24 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 162.3, 149.5, 148.6, 140.1, 131.3, 130.5, 125.2, 124.9, 124.5, 124.3, 124.2, 123.6, 121.4, 118.7, 68.1, 56.9, 41.2.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₂₁N₂O₆ ([M+H]⁺): 421.1394, trouvé 421.1396.

N-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 2-aminoéthylamide (3.3a)



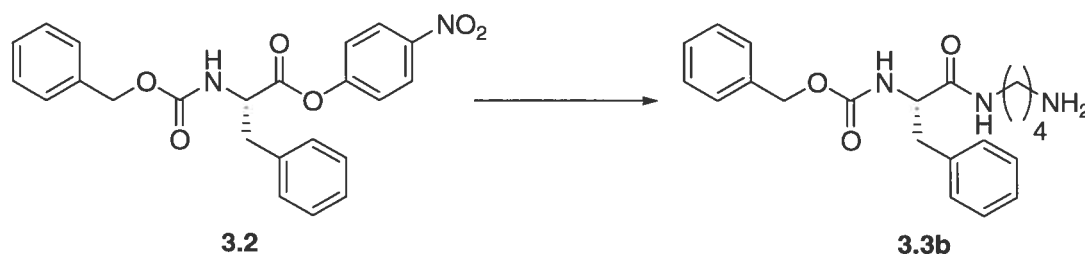
Cet amine est synthétisé à partir du 1,2-diaminoéthane en suivant le protocole général A. Le produit est précipité avec un mélange CH₂Cl₂/hexane pour donner un solide blanc avec un rendement de 56 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.97 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.23 (m, 10H), 4.92 (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.03 (m, 2H), 2.92 (m, 2H), 2.74 (t, 2H, *J* = 10.1 Hz), 2.49 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 163.7, 149.8, 132.0, 131.6, 125.3, 124.7, 124.6, 124.3, 124.1, 123.2, 67.9, 58.3, 44.9, 43.9, 42.1.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₉H₂₄N₃O₃ ([M+H]⁺): 342.1812, trouvé 342.1815.

N-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 4-aminobutylamide (**3.3b**)



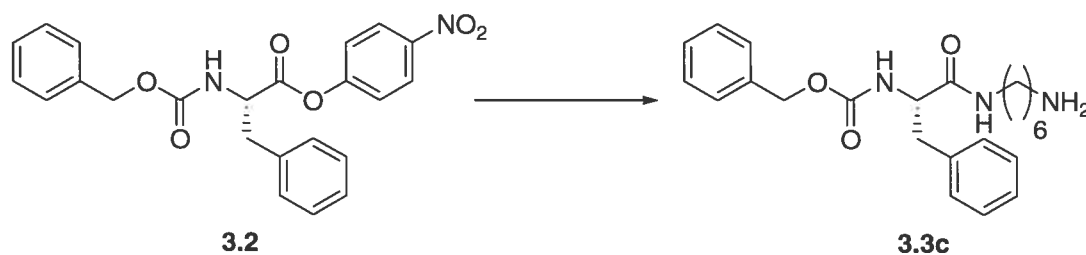
L'amine **3.3b** est synthétisé à partir du 1,4-diaminobutane en suivant le protocole général A. Le produit est précipité avec un mélange CH₂Cl₂/hexane pour donner un solide blanc avec un rendement de 82 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.98 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.23 (m, 10H), 4.91 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 2.97 (m, 4H), 2.72 (t, 2H, *J* = 10.2 Hz), 1.77 (s, 2H), 1.39 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.6, 146.4, 130.2, 129.2, 122.0, 121.1, 120.9, 120.5, 120.3, 119.2, 63.0, 54.9, 40.9, 38.9, 37.8, 30.8, 27.4.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₁H₂₈N₃O₃ ([M+H]⁺): 370.2125, trouvé 370.2123.

N-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 6-aminohexylamide (3.3c)



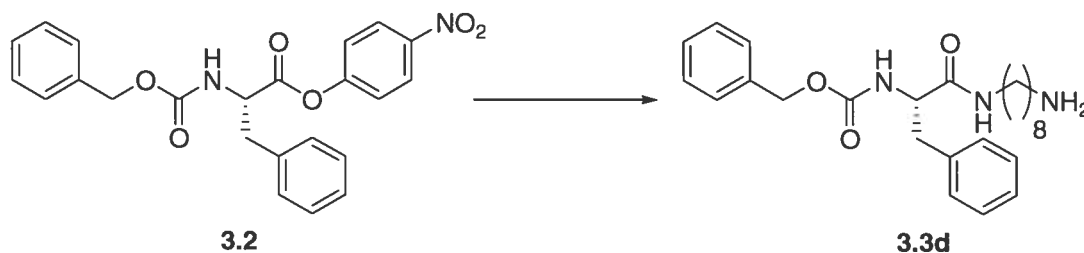
Cette amine est synthétisée à partir du 1,6-diaminohexane en suivant le protocole général A. Le produit est précipité avec un mélange CH₂Cl₂/hexane pour donner un solide blanc avec un rendement de 52 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.95 (t, 1H, *J* = 4.9 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.23 (m, 10H), 4.92 (s, 1H), 4.16 (m, 1H), 2.97 (m, 4H), 2.72 (m, 2H), 2.48 (s, 2H), 1.23 (m, 8H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.7, 146.5, 130.3, 129.3, 122.1, 121.2, 121.0, 120.6, 120.4, 119.3, 63.1, 54.9, 41.2, 38.6, 37.9, 33.2, 29.8, 27.3, 27.2.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₃₂N₃O₃ ([M+H]⁺): 398.2438, trouvé 398.2448.

N-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 8-aminooctylamide (**3.3d**)



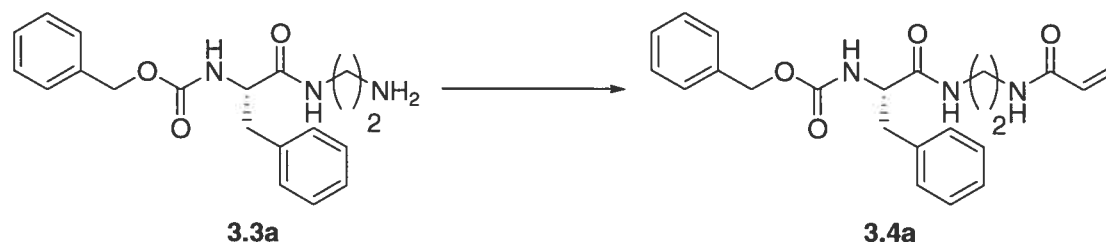
L'amine **3.3d** est synthétisé à partir du 1,8-diaminooctane en suivant le protocole général A. Le produit est précipité avec un mélange CH₂Cl₂/hexane pour donner un solide blanc avec un rendement de 27 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.94 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.23 (m, 10H), 4.92 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 2.97 (m, 4H), 2.72 (m, 2H), 2.48 (s, 2H), 1.20 (m, 12H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 160.6, 146.5, 130.3, 129.3, 122.1, 121.2, 121.0, 120.6, 120.4, 119.3, 63.1, 54.9, 41.4, 37.9, 33.7, 30.0, 29.8, 29.6, 27.4, 27.3, 23.9.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₅H₃₆N₃O₃ ([M+H]⁺): 426.2751, trouvé 426.2748.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 2-(acrylamido)éthylamide (3.4a)**



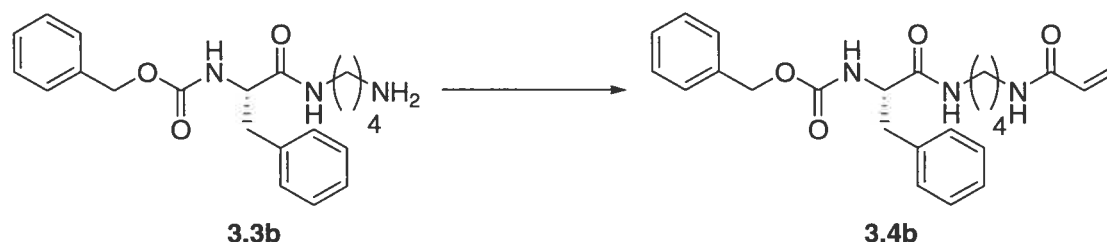
L'acrylamide **3.4a** est synthétisé à partir de l'amine **3.3a** en suivant le protocole général B. Pour la purification, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite et 20 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée à l'aide de 3×5 mL d'une solution HCl 1N puis de 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu grâce à une précipitation à l'aide d'un mélange acétone/éther diéthylique pour donner un solide blanc avec un rendement de 42 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.26 (m, 10H), 6.45 (s, 1H), 6.25 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, 17.0 Hz), 6.22 (s, 1H), 6.03 (dd, 1H, *J* = 10.2 Hz, 17.0 Hz), 5.62 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, 10.2 Hz), 5.39 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 5.07 (s, 2H), 4.36 (q, 1H, *J* = 7.3 Hz), 3.32 (s, 4H), 3.05 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 161.1, 154.8, 146.6, 130.3, 129.3, 124.4, 122.0, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 118.3, 63.1, 54.9, 37.7.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₂H₂₆N₃O₄ ([M+H]⁺): 396.1917, trouvé 396.1924.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 4-(acrylamido)butylamide (3.4b)**



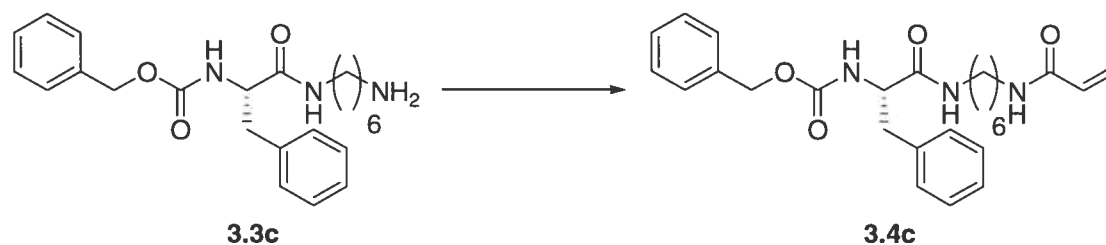
L'acrylamide **3.4b** est synthétisé à partir de l'amine **3.3b** en suivant le protocole général B. Pour la purification, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite et 20 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée à l'aide de 3×5 mL d'une solution HCl 1N puis de 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu grâce à une précipitation à l'aide d'un mélange acétone/éther diéthylique pour donner un solide blanc avec un rendement de 29 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 6.27 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, 16.9 Hz), 6.07 (dd, 1H, *J* = 10.2 Hz, 17.0 Hz), 5.96 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.62 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, 10.2 Hz), 5.38 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.34 (q, 1H, *J* = 7.4 Hz), 3.24 (m, 6H), 1.38 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.7, 154.5, 146.5, 130.9, 129.3, 124.5, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 118.0, 63.1, 54.9, 38.7, 38.3, 27.5.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₄H₃₀N₃O₄ ([M+H]⁺): 424.2230, trouvé 424.2232.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 6-(acrylamido)hexylamide (3.4c)**



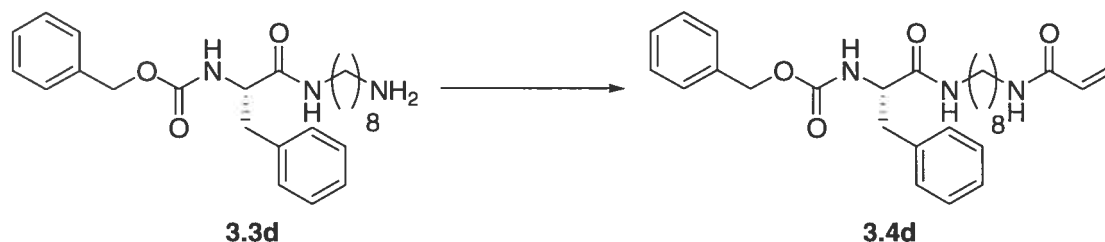
L'acrylamide **3.4c** est synthétisé à partir de l'amine **3.3c** en suivant le protocole général B. Le mélange réactionnel est filtré et le résidu solide est purifié à l'aide d'une chromatographie flash (100% AcOEt) pour donner un solide blanc avec un rendement de 46 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 6.26 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, 17.0 Hz), 6.07 (dd, 1H, *J* = 10.2 Hz, 17.0 Hz), 6.01 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.61 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, 10.2 Hz), 5.42 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 5.05 (s, 2H), 4.35 (q, 1H, *J* = 7.5 Hz), 3.27 (m, 2H), 3.12 (m, 4H), 1.46 (m, 2H), 1.23 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.6, 154.5, 146.5, 130.2, 129.3, 124.5, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 118.0, 63.1, 54.9, 38.5, 37.9, 29.9, 29.8, 27.2, 27.1.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₆H₃₄N₃O₄ ([M+H]⁺): 452.2543, trouvé 452.2532.

N-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 8-(acrylamido)octylamide (**3.4d**)



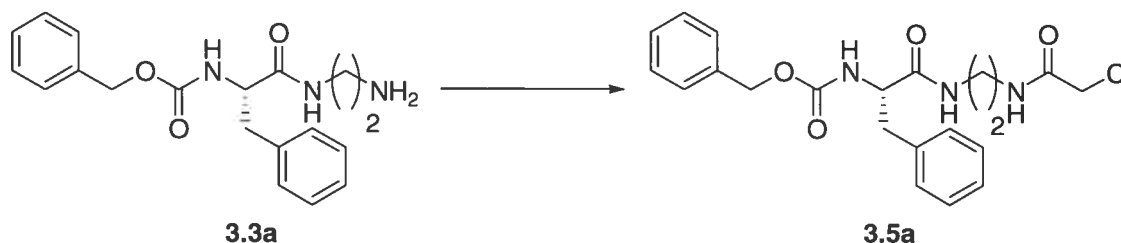
L'acrylamide **3.4d** est synthétisé à partir de l'amine **3.3d** en appliquant le protocole général B. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et 20 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée à l'aide de 3×5 mL d'une solution HCl 1N, de 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N et 5 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (100% AcOEt) pour donner un solide blanc avec un rendement de 46 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 6.25 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, 17.0 Hz), 6.06 (dd, 1H, *J* = 10.2 Hz, 16.9 Hz), 5.66 (s, 1H), 5.65 (s, 1H), 5.60 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, 10.2 Hz), 5.42 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 5.05 (s, 2H), 4.31 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz), 3.28 (m, 2H), 3.09 (m, 4H), 1.49 (m, 2H), 1.24 (m, 10H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.6, 154.5, 146.5, 130.3, 129.3, 124.5, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.4, 119.3, 118.0, 63.1, 54.9, 38.6, 37.9, 29.9, 29.8, 29.5, 27.5, 27.3.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₈H₃₈N₃O₄ ([M+H]⁺): 480.2856, trouvé 480.2869.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 2-(chloroacétylamido)éthylamide
(3.5a)**



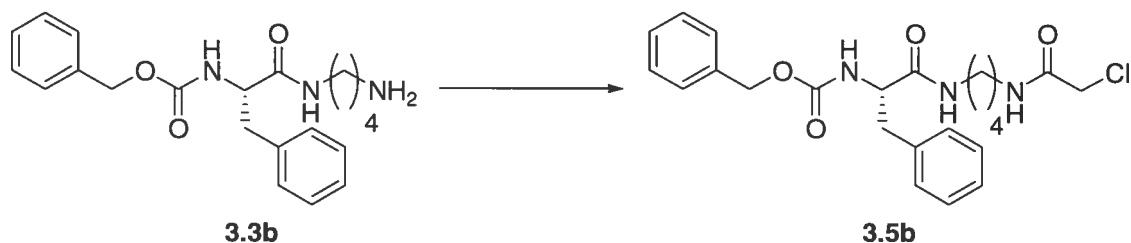
Le chloroacétamide **3.5a** est synthétisé à partir de l'amine **3.3a** en suivant le protocole général C. Après une agitation toute la nuit, le mélange réactionnel est filtré et le solide obtenu est lavé plusieurs fois avec de l'éther diéthylique pour donner le produit pur sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 56 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 7.14 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 5.27 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.32 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz), 3.95 (s, 2H), 3.29 (s, 4H), 3.02 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 161.2, 156.0, 146.6, 130.3, 129.3, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 63.2, 55.0, 42.4, 38.7, 38.2, 37.7.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₁H₂₅N₃O₄Cl ([M+H]⁺): 418.1528, trouvé 418.1538.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 4-(chloroacétamido)butylamide
(3.5b)**



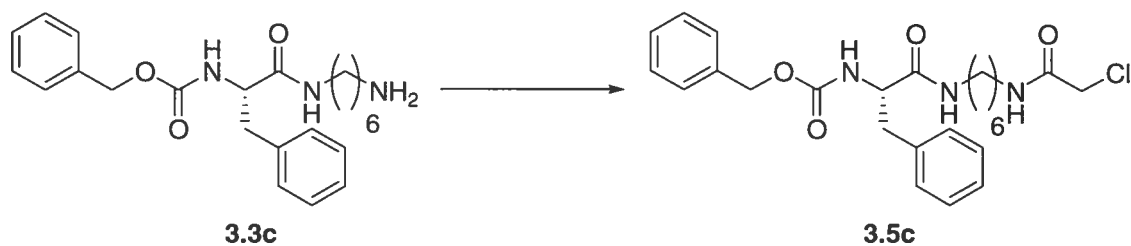
Le chloroacétamide **3.5b** est synthétisé à partir de l'amine **3.3b** en suivant le protocole général C. Après une agitation toute la nuit, le solvant est évaporé sous pression réduite et 20 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×5 mL d'une solution d'HCl 1N et 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N et est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (100 % AcOEt) pour obtenir le produit sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 28 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 6.60 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.33 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.32 (q, 1H, *J* = 6.6 Hz), 4.01 (s, 2H), 3.12 (m, 6H), 1.36 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.7, 155.7, 146.5, 130.3, 129.3, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 63.1, 54.9, 42.4, 38.3, 37.9, 27.4, 27.3.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₂₉N₃O₄Cl ([M+H]⁺): 446.1841, trouvé 446.1842.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 6-(chloroacétamido)hexylamide (3.5c)**



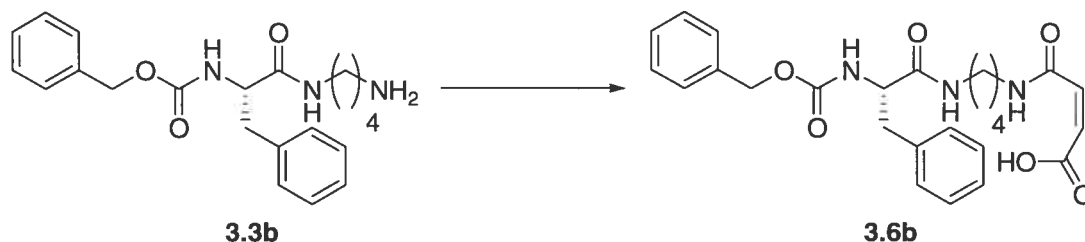
Le chloroacétamide **3.5c** est synthétisé à partir de l'amine **3.3c** en suivant le protocole général C. Après une agitation toute la nuit, le solvant est évaporé sous pression réduite et 40 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×6 mL d'une solution HCl 1N et 3×6 mL d'une solution NaOH 1N pour ensuite être séchée à l'aide de MgSO₄. Le mélange est ensuite filtré et l'AcOEt est évaporé sous pression réduite. Finalement, le résidu est trituré avec de l'AcOEt pour donner le produit sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 43 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 6.59 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.42 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.32 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz), 4.01 (s, 2H), 3.25 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.12 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.23 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.6, 155.7, 146.5, 130.3, 129.3, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 63.1, 54.9, 42.4, 38.5, 37.9, 29.9, 29.8, 27.2, 27.1.

SMHR (ESI) calculé pour C₂₅H₃₃N₃O₄Cl ([M+H]⁺): 474.2154, trouvé 474.2157.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 4-(maléamido)butylamide (3.6b)**



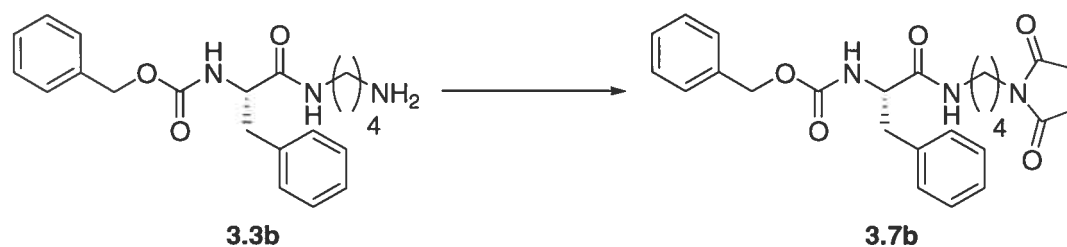
L'amine **3.3b** (0.15 mmol) est dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. À cette solution, est ajouté de l'anhydride maléique (0.165 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant une heure à la température de la pièce sous azote. Le précipité formé est filtré et lavé avec du CH₂Cl₂ pour donner le produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 87 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 9.1 (s, 1H), 7.99 (t, 1H, *J* = 5.3 Hz), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.24 (m, 10H), 6.39 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz), 6.23 (d, 1H, *J* = 12.5 Hz), 4.92 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.10 (m, 4H), 2.76 (m, 2H), 1.38 (s, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.8, 155.4 (2 carbones), 146.5, 130.2, 129.3, 125.6, 124.4, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 63.1, 54.9, 38.2, 37.9, 27.5, 26.8.

HRMS (ESI) calculé pour C₂₅H₃₀N₃O₆ ([M+H]⁺): 468.2129, trouvé 468.2143.

***N*-Carbobenzyloxy-L-phénylalanine 4-(maléimido)butylamide (3.7b)**

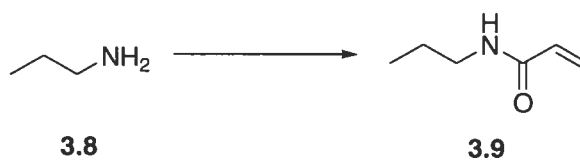


Dans un ballon contenant la maléamide **3.6b** (0.15 mmol), est ajouté de l'acétate de sodium (0.06 mmol) et 1 mL d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures à 100 °C. Ensuite, 10 mL d'une solution de NaOH 1N sont ajoutés et le précipité formé est filtré. Le résidu solide est purifié par chromatographie flash (100 % AcOEt) pour donner le produit sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 43 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 7.24 (m, 10H), 6.66 (s, 2H), 5.66 (s, 1H), 5.33 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.30 (q, 1H, *J* = 6.7 Hz), 3.42 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.13 (m, 4H), 1.38 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 160.7 (4 carbones), 146.5, 130.2, 129.3, 126.9, 122.1, 121.2, 121.0, 120.7, 120.5, 119.3, 63.1, 54.9, 38.1, 37.9, 37.0, 27.3, 26.5.

HRMS (ESI) calculé pour C₂₅H₂₈N₃O₅ ([M+H]⁺): 450.2023, trouvé 450.2026.

***N*-Propylacrylamide (3.9)**

Le *N*-propylacrylamide **3.9** est synthétisé à partir de la propylamine **3.8** en suivant le protocole général B. Le mélange réactionnel est évaporé et 20 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×5 mL d'une solution de HCl 1N, 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N et 5 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (100 % AcOEt) pour donner le produit sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 65 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 6.25 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, 16.9 Hz), 6.06 (dd, 1H, *J* = 10.2 Hz, 16.9 Hz), 5.60 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, 10.2 Hz), 3.28 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz), 1.54 (m, 2H), 0.92 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 161.8, 126.6, 126.0, 48.9, 27.0, 16.7.

HRMS (ESI) calculé pour C₆H₁₂NO ([M+H]⁺): 114.0913, trouvé 114.0912.

6.4. Partie expérimentale du Chapitre 4

6.4.1. SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE pour le marquage est de 18% d'acrylamide pour le « running gel » et de 4 % pour le « stacking gel ». Ainsi, deux solutions doivent être réalisées.

Le « running gel » consiste à faire une solution de 4.5 mL d'acrylamide 40 %, 0.42 mL de bisacrylamide 2 %, 2.5 mL de Tris-Cl (1.5 M, pH 8.6), 100 µL de SDS 10 %, 2.37 mL d'eau et 100 µL d'APS 10 %. Le « stacking gel » est une solution de 750 µL d'acrylamide, 390 µL de bisacrylamide 2 %, 960 µL de Tris-Cl (0.5 M, pH 6.8), 75 µL de SDS 10 %, 6.25 mL d'eau et 75 µL d'APS 10 %.

Lorsque les deux solutions sont préparées, le « running gel » peut-être placé dans le montage immédiatement après l'ajout de 10 µL de TEMED. Il faut ensuite mettre de l'alcool isopropylique à la surface afin d'éviter les bulles d'acrylamide, puis attendre 30 min pour que la polymérisation soit complète. Par la suite, l'alcool peut-être retiré et le « stacking gel » peut-être placé après l'ajout de 7.5 µL de TEMED. Trente minutes plus tard, le gel pourra être submergé par du tampon Tris-glycine 1X et les échantillons protéiques pourront être déposés. Suite à l'insertion des échantillons, un voltage initial de 80 V est ajusté pour la migration. Par contre, lorsque l'échantillon atteint le niveau supérieur du « running gel », le voltage peut être augmenté à 120 V. Un indicateur coloré permet de suivre le front d'élution et ainsi permet de savoir quand arrêter le voltage.

Lorsque la réaction d'inhibition de la TGase avec le marqueur est terminée, les échantillons peuvent être analysés par SDS-PAGE. Toutefois, il ne faut pas ajouter de colorant bleu à ces échantillons. Cette étape est extrêmement importante, car si elle n'est pas respectée, aucune fluorescence ne pourra être observée en spectroscopie U.V.. Ainsi, seulement un mélange H₂O/glycérol 1:1 sera ajouté à la solution. Par contre, les marqueurs possèdent du bleu et c'est ce dernier qui servira d'indicateur de migration.

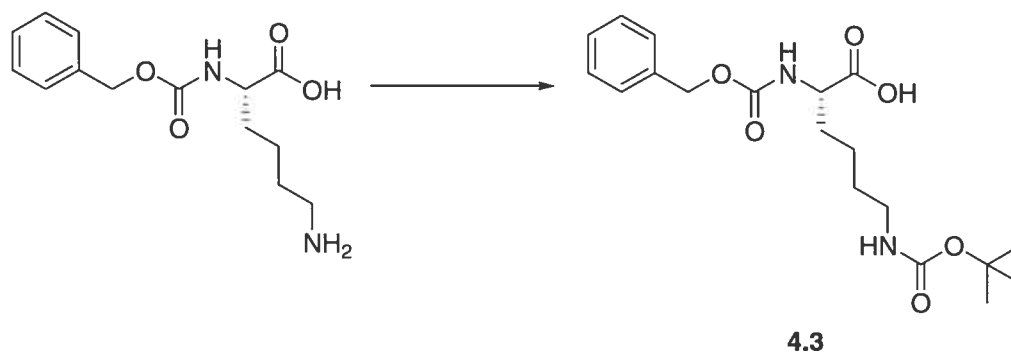
Afin de minimiser tout risque de contamination, un puits demeure libre entre les échantillons et les marqueurs.

Lorsque le gel est terminé. Il ne faut pas faire immédiatement la coloration au bleu de coomassie car la fluorescence ne serait plus détectable. Il faut d'abords faire nos observations sous la lampe U.V. puis ensuite on peut réaliser la coloration du gel qui est ensuite décoloré avec une solution de MeOH/acide acétique.

6.4.2. Synthèse

Le 1,6-diaminohexane, le 2,2'-(éthylendioxy)bis-(éthylamine), ainsi que le *p*-nitrophenylchloroformate, le chlorure d'acryloyle, la biotine, le chlorure de dansyle, la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA), le *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium tetrafluoroborate (TBTU), le di-*tert*-butyl dicarbonate (BOC)₂Oet la diméthylaminopyridine (DMAP) ont été achetés chez Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans autre purification supplémentaire. La triéthylamine et le DMF ont été achetés chez ACP et ont été utilisés tel quel. La *N*- α -carboxybenzyloxy-L-lysine a été obtenus chez Novabiochem. L'acétonitrile, le chloroforme et le dichlorométhane ont été achetés chez EMD. Le *N*-Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophényl ester)Gly¹¹⁴ a été synthétisés dans le groupe du Prof. Keillor en suivant le protocole publié.

***N*-α-carbobenzyloxy-*N*-ε-*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine (4.3)**



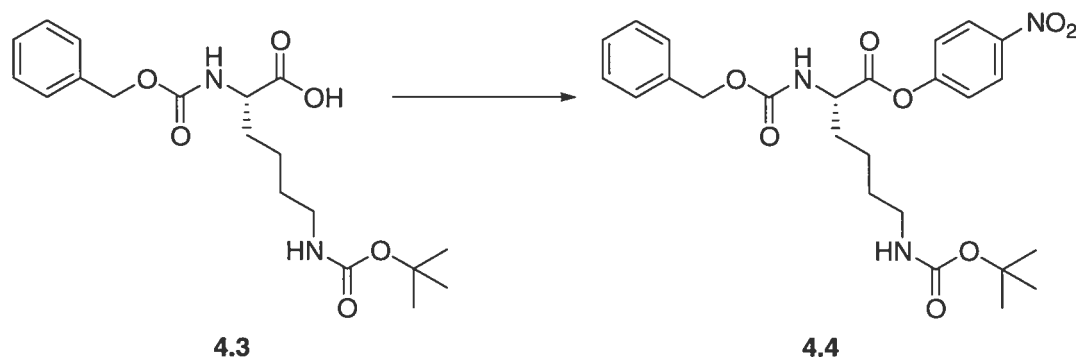
Dans 15 mL d'une solution de 10 % Et₃N/MeOH (v : v), est ajouté le *N*-carboxybenzyloxy-L-lysine **4.2** (2 mmol). Le mélange est partiellement soluble. Le di-*tert*-butyl dicarbonate (BOC)₂O (4 mmol) est ajouté à la solution qui est chauffée à 50 °C pendant 30 min. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et 30 mL d'eau plus 10 mL de NaOH 1 N sont ajoutés. La phase aqueuse ainsi obtenue est lavée avec 3×6 mL d'éther diéthylique. Cette phase est ensuite acidifiée à l'aide d'une solution de HCl 6N. Le produit est extrait avec 3×10 mL d'AcOEt. La phase organique est ensuite séchée avec du MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile translucide avec un rendement de 97 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.23 (m, 5H), 5.84 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 5.02 (m, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.27 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.34 (m, 13H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 167.8, 150.2 (2 carbones), 131.7, 124.5 (3 carbones), 124.1, 67.8, 61.9, 55.7, 43.3, 35.5, 32.4, 25.5, 19.3.

SMHR (ESI) calculé pour C₁₉H₂₈N₂O₆Na ([M+Na]⁺): 403.1839, trouvé 403.1836.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine *p*-nitrophényl ester (4.4)**



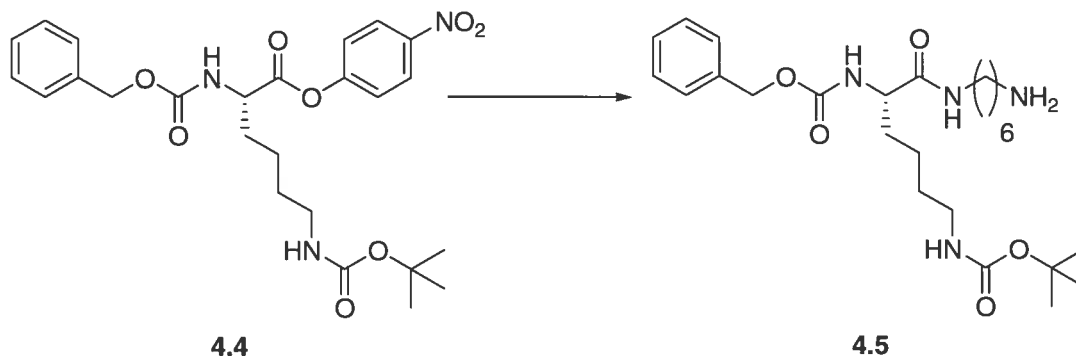
La *N*- α -Cbz-*N*- ϵ -BOC-L-lysine (4.3) (1 mmol) est solubilisée dans 10 mL de CH₃CN contenant Et₃N (139 μ L, 1mmol). À cette solution, est ajouté du *p*-nitrophenylchloroformate (222 mg, 1.1 mmol) à 4 °C. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant 5 min à 4°C. Du DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol) est ajouté et la solution est à nouveau agité pendant 45 min à 4 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et 30 mL de AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 3×5 mL d'une solution HCl 1N et 3×5 mL d'une solution saturée de NaHCO₃. Elle est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et de nouveau évaporée sous pression réduite. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 78 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.12 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.22 (m, 5H), 7.15 (d, 2H, J = 9 Hz), 6.23 (d, 1H, J = 8.0Hz), 5.02 (s, 2H), 4.87 (s, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.03 (m, 2H), 1.32 (m, 15H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 163.8, 163.2, 150.2, 140.1, 131.6, 124.5 (3 carbones), 124.2, 124.1, 121.4, 118.9, 78.5, 67.9, 61.8, 56.2, 33.5, 32.1, 25.5, 19.2.

SMHR (ESI) calculé pour $C_{25}H_{31}N_3O_8Na$ ($[M+Na]^+$): 524.2003, trouvé 524.2000.

***N*- α -Carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine 6-aminohexylamide (4.5)**



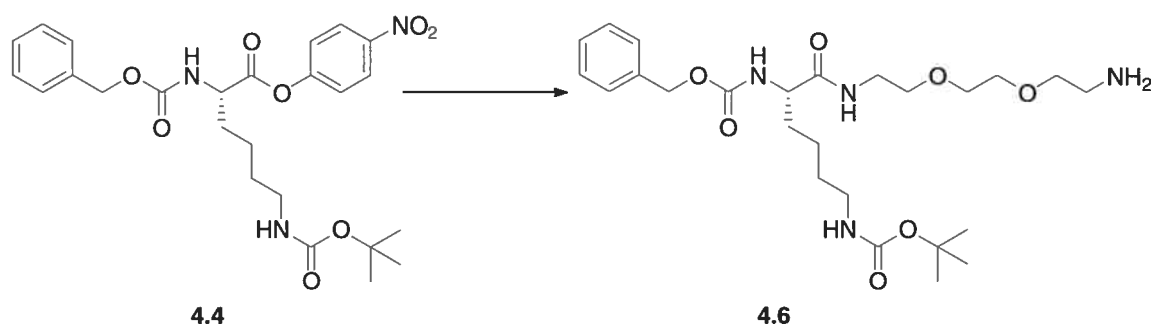
Le *N*- α -Cbz-*N*- ϵ -BOC-L-lysine *p*-nitrophényl ester (**4.4**) (1 mmol) est dissous dans 90 mL de CH_3CN . À cette solution, est ajouté rapidement le 1,6-diaminohexane (10 mmol) solubilisé dans 10 mL de CH_3CN . Le mélange réactionnel est agité pendant 1h à la température de la pièce. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et 60 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec une solution de NaOH 1N jusqu'à ce que la phase organique n'ait plus une coloration jaune. A ce moment, la phase organique est séchée avec du $MgSO_4$, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est ainsi obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 62 %.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7.24 (m, 5H), 7.06 (m, 1H), 6.21 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.65 (m, 1H), 1.34 (m, 22H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 163.7, 150.0, 131.7, 124.4, 124.0, 123.9, 78.7, 67.6, 61.7, 44.7, 42.3, 36.8, 35.9, 33.4, 33.2, 32.3, 30.7, 30.5, 27.0, 25.5, 19.2.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 479.3227, trouvé 479.3229.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine (2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthanamide (4.6)**



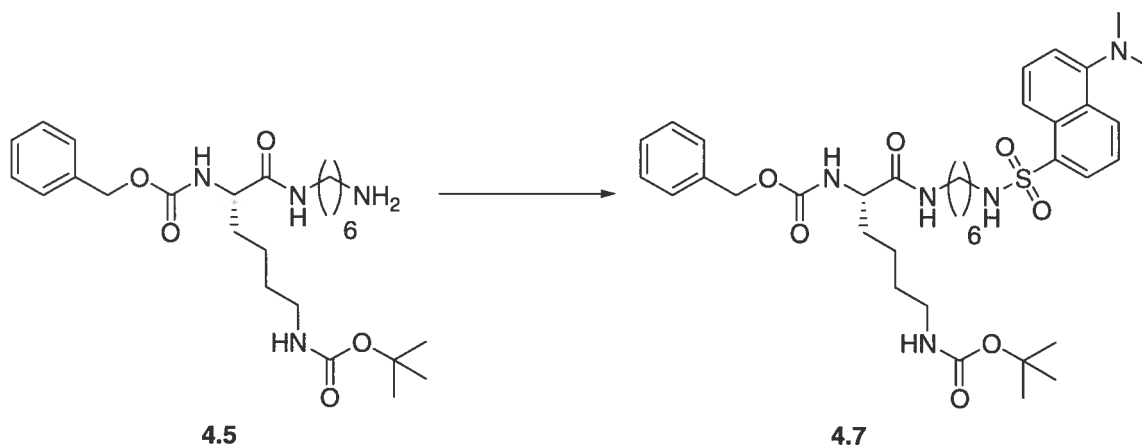
Le *N*- α -Cbz-*N*- ϵ -BOC-L-lysine *p*-nitrophényl ester (**4.4**) (1 mmol) est dissous dans 100 mL de CH_3CN . À cette solution, est ajouté rapidement le 2,2'-(éthylènedioxy)bis-(éthylamine) (10 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1h à la température de la pièce. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et 60 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec une solution de NaOH 1N jusqu'à ce que la phase organique n'ait plus une coloration jaune. A ce moment, la phase organique est séchée avec du MgSO_4 , filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est ainsi obtenu sous la forme d'une huile jaune pale avec un rendement de 74 %.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.37 (m, 1H), 7.24 (m, 5H), 6.48 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.17 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.14 (m, 1H), 3.49 (s, 4H), 3.40 (m, 4H), 3.33 (m, 2H), 2.98 (m, 2H), 2.74 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.33 (m, 13H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 164.6, 163.5, 150.0, 149.9, 131.7, 124.32, 123.9, 123.8, 78.5, 73.2, 70.8, 70.5, 70.2, 67.5, 61.6, 56.6, 44.2, 42.2, 32.2, 25.4, 19.1.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 511.3126, trouvé 511.3133.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine
(dansylamino)hexylamide (4.7) 6-**



Le *N*- α -carboxybenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine hexadecylamine (4.5) (1 mmol) est solubilisé dans 5 mL de DMF. À cette solution, sont ajoutés la triéthylamine (1.2 mmol, 166 μL) et le chlorure de dansyle (1 mmol). Le mélange est agité 30 min à la température de la pièce puis est ensuite dilué dans 60 mL d'AcOEt. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 2×15 mL d'une solution saturée de NaCl, 3×15 mL d'une solution de HCl 0.1N, 3×15 mL d'une solution de NaOH 1N et 15 mL

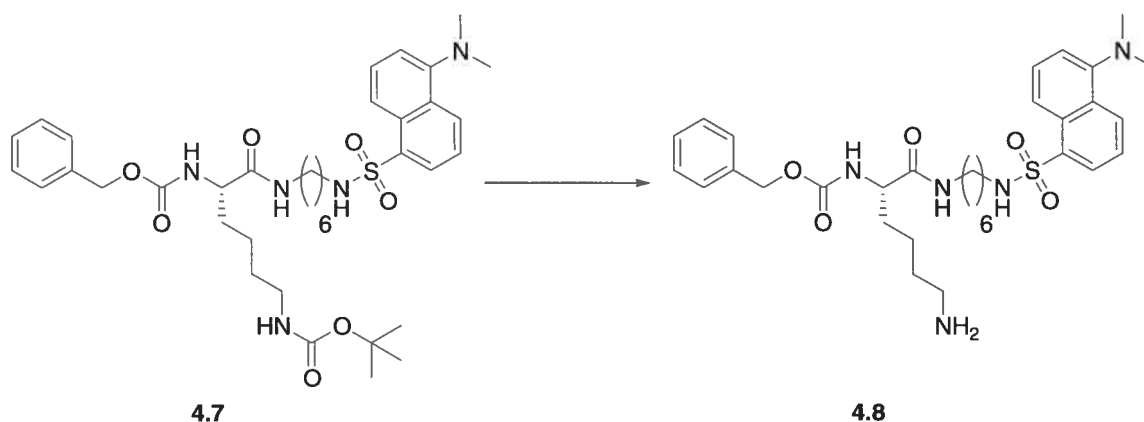
d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (70:30 AcOEt/hexanes) pour donner le produit sous la forme d'un solide jaune-vert avec un rendement de 49 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.48 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.30 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.17 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.47 (m, 2H), 7.25 (m, 5H), 7.12 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.57 (m, 1H), 5.82 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 5.80 (m, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.05 (m, 4H), 2.83 (m, 8H), 1.99 (m, 2H), 1.36 (m, 17H), 1.08 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.6, 150.3, 150.2, 131.8, 130.7, 126.2, 125.8, 125.7, 125.4, 124.6, 124.4, 124.3, 124.1, 119.8, 115.9, 112.4, 79.2, 67.9, 62.0, 56.9, 48.2, 45.9, 43.1, 42.3, 36.1, 33.5, 33.3, 33.1, 32.5, 30.2, 27.1, 25.8, 19.4.

SMHR (ESI) calculé pour C₃₇H₅₄N₅O₇S ([M+H]⁺): 712.3739, trouvé 712.3751.

***N*- α -carbobenzyloxy-L-lysine 6-(dansylamino)hexylamide (4.8)**



Le carbamate **4.7** (0.25 mmol) est solubilisé dans un minimum de CH_2Cl_2 . À cette solution, est ajouté 2mL de TFA. Le mélange est agité 1h à la température de la pièce. Le TFA est ensuite évaporé à l'aide d'un mélange acétone/cyclohexane pour donner le sel de TFA du produit sous la forme d'une huile vert-jaune avec un rendement quantitatif.

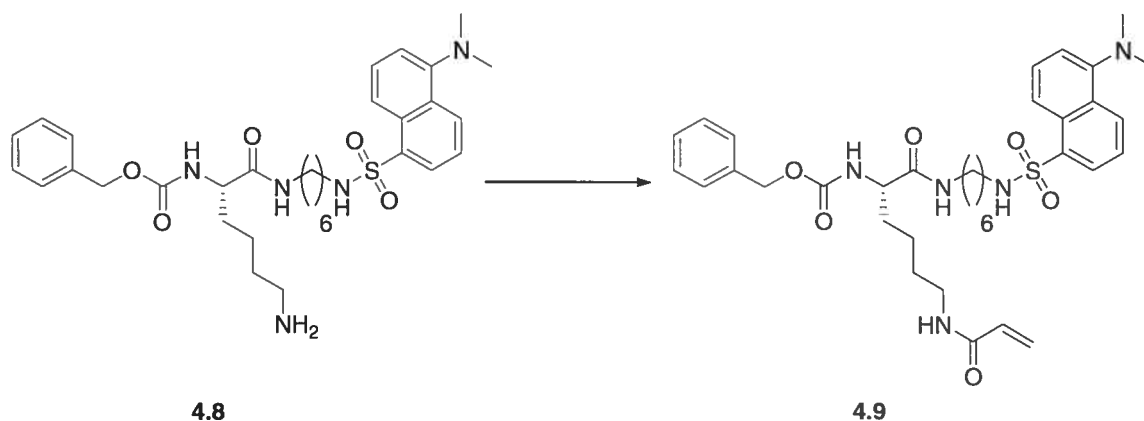
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 8.80 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.51 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.30 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.90 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.76 (m, 2H), 7.29 (m, 5H), 5.05 (s, 2H), 4.04 (m, 1H), 3.33 (s, 6H), 3.01 (m, 2H), 2.83 (m, 4H), 1.70 (m, 4H), 1.43 (m, 2H), 1.27 (m, 4H), 1.07 (m, 4H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 165.4, 153.4 (q, $J = 45.3$ Hz), 150.5, 136.7, 132.2, 131.8, 125.3, 125.0, 123.9, 123.5, 123.3, 122.6, 122.1, 121.8, 121.4, 114.8, 111.0, 77.8, 67.0, 48.2, 45.0, 41.9, 34.8, 33.0, 32.7, 32.3, 30.4, 29.5, 29.1, 26.8, 24.3.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 612.3214, trouvé 612.3228.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine
(dansylamino)hexylamide (4.9)**

6-



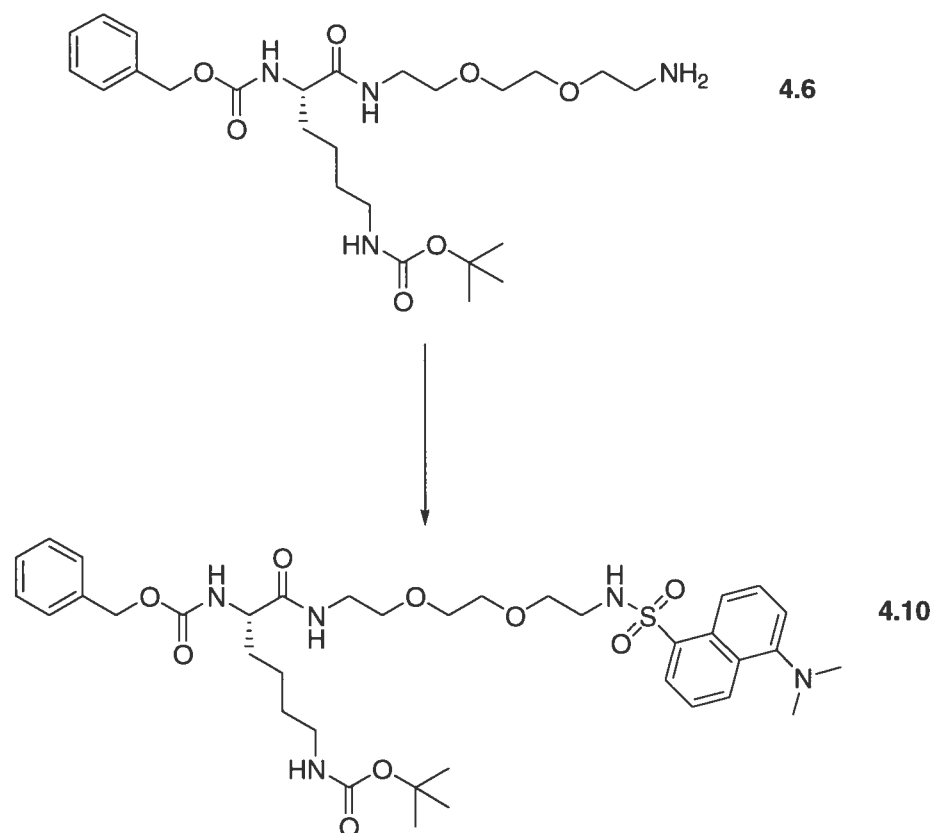
L'amine **4.8** (0.25 mmol) est dissous dans 2 mL de DMF en présence de Et₃N (70 μ L, 0.5 mmol). Le mélange réactionnel sous azote est refroidi à 4 °C et le chlorure d'acryloyle (0.5 mmol) est ajouté goutte-à-goutte. Le mélange est ensuite agité 3 h à la température de la pièce. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite et 40 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée à l'aide de 2 \times 6 mL d'une solution saturée de NaCl, 3 \times 6 mL d'une solution HCl 0.1N, de 3 \times 6 mL d'une solution de NaOH 1N puis de 6 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu grâce à une chromatographie flash (100 % AcOEt) pour donner un solide jaune-vert avec un rendement de 47 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.49 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.30 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.49 (m, 2H), 7.27 (m, 5H), 7.13 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.47 (m, 2H), 6.27 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz), 5.93 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 5.50 (m, 2H), 5.06 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.07 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.08 (m, 2H), 2.84 (b, 8H), 1.72 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.29 (m, 6H), 1.10 (m, 4H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 164.7, 158.6, 150.5, 138.1, 131.9, 130.8, 126.2, 125.9, 125.7, 125.5, 124.7, 124.6, 124.4, 124.3, 124.0, 119.9, 116.0, 113.1, 112.4, 67.9, 57.0, 48.2, 46.6, 45.9, 42.3, 35.5, 33.4, 33.1, 31.2, 30.3, 30.1, 26.7, 25.8.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 666.3320, trouvé 666.3350.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine (2-(2-dansylaminoéthoxy)éthoxy)éthanamide (4.10)**



L'amine **4.6** (0.74 mmol) est solubilisé dans 5 mL de DMF. À cette solution, sont ajoutés la triéthylamine (0.89 mmol, 123 μ L) et le chlorure de dansyle (0.74 mmol). Le mélange est agité 30 min à la température de la pièce puis est ensuite dilué dans 60 mL d'AcOEt. La phase organique ainsi obtenue est lavée avec 2 \times 15 mL d'une solution saturée de NaCl, 3 \times 15 mL d'une solution de HCl 0.1N, 3 \times 15 mL d'une solution de NaOH 1N et 15 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée avec du MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (100 % AcOEt) pour donner le produit sous la forme d'une huile jaune-vert avec un rendement de 56 %.

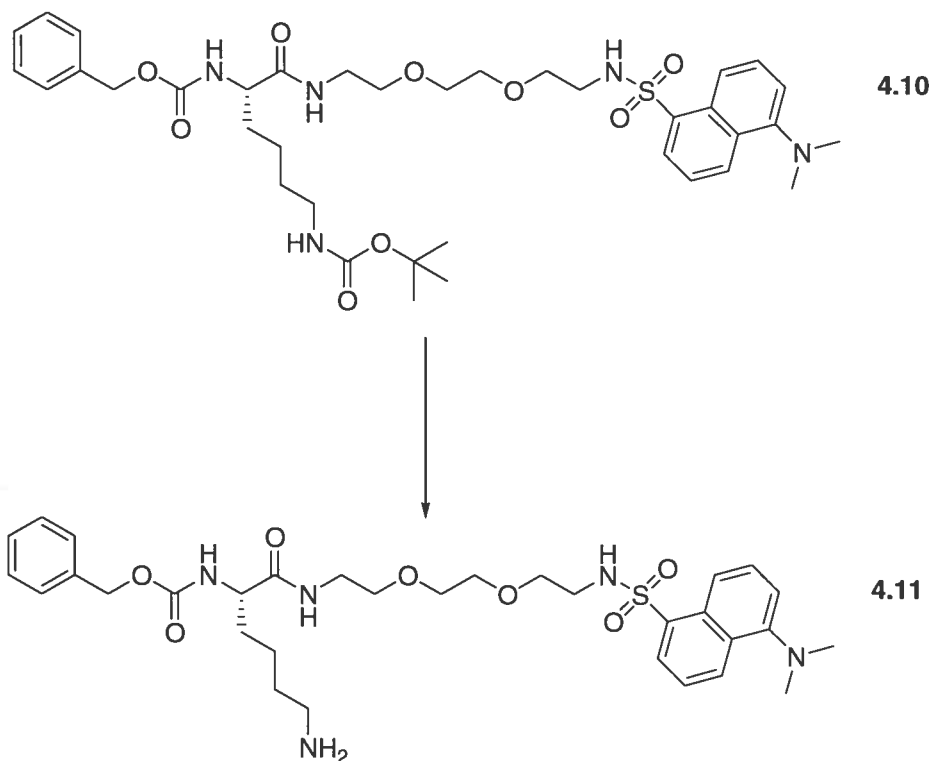
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.47 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 8.32 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz), 7.45 (q, 2H, $J = 7.9$ Hz), 7.23 (m, 5H), 7.10 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.36 (s, 1H), 6.14 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 5.10 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.33 (m, 10H), 3.02 (m, 4H), 2.80 (s, 6H), 1.81 (m, 2H), 1.35 (m, 13H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 164.7, 163.5, 149.8, 145.8, 131.6, 130.6, 125.9, 125.5, 125.4, 124.9, 124.2, 124.0, 123.9, 123.8, 119.5, 115.7, 112.1, 78.5, 70.6, 70.5, 70.1, 69.9, 67.5, 61.6, 47.8, 45.5, 42.9, 41.9, 35.7, 33.2, 32.2, 25.3, 19.1.

SMHR (ESI) calculé pour C₃₇H₅₄N₅O₉S ([M+H]⁺): 744.3637, trouvé 744.3629.

***N*- α -carbobenzyloxy-L-lysine
dansylaminoéthoxy)éthoxy)éthanamide(4.11)**

(2-(2-



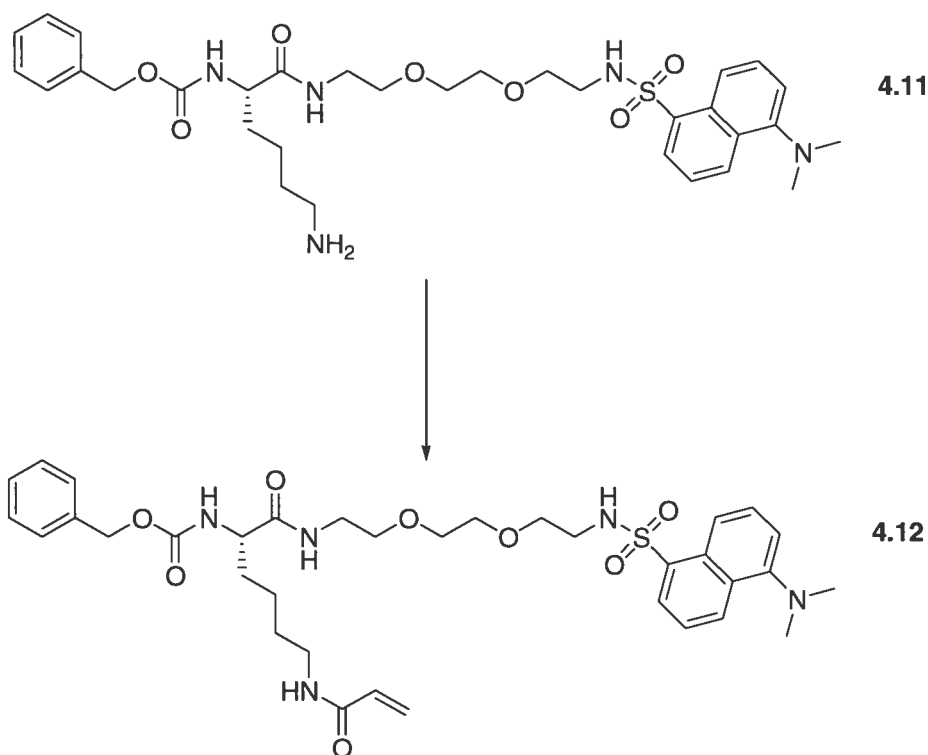
Le carbamate **4.10** (0.25 mmol) est solubilisé dans un minimum de CH_2Cl_2 . À cette solution, est ajouté 2mL de TFA. Le mélange est agité 1h à la température de la pièce. Le TFA est ensuite évaporé à l'aide d'un mélange acétone/cyclohexane pour donner le sel de TFA du produit sous la forme d'une huile vert-jaune avec un rendement quantitatif.

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 8.87 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 8.52 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 8.34 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.99 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.78 (dt, 2H, $J = 10.4$ Hz, 2.2 Hz), 7.25 (m, 5H), 5.03 (s, 2H), 4.11 (m, 1H), 3.39 (m, 16H), 3.05 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.44 (m, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 165.6, 153.4 (q, $J = 45.3$ Hz), 150.3, 132.2, 131.5, 125.3, 124.9, 123.8, 123.4, 123.1, 122.3, 121.9, 121.3, 117.5, 115.3, 114.0, 110.5, 70.0, 69.5, 69.3, 67.0, 66.2, 48.5, 44.9, 41.9, 34.7, 33.0, 30.3, 26.9, 26.4, 18.8.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 644.3113, trouvé 644.3144.

***N*- α -carbobenxzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine
dansylaminoéthoxy)éthoxy)éthanamide (4.12)** (2-(2-



L'amine **4.11** (0.2 mmol) est dissous dans 5 mL de CH_3CN en présence de Et_3N (86 μL , 0.6 mmol). Le mélange réactionnel sous azote est refroidi à 4 $^\circ\text{C}$ et le chlorure

d'acryloyle (0.4 mmol) est ajouté goutte-à-goutte. Le mélange est ensuite agité 3h à la température de la pièce. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite et 40 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée à l'aide de 3×6 mL d'une solution HCl 1N, de 3×6 mL d'une solution de NaOH 1N puis de 3×6 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu grâce à une chromatographie flash (90:10 AcOEt/MeOH) pour donner un solide jaune-vert avec un rendement de 27 %.

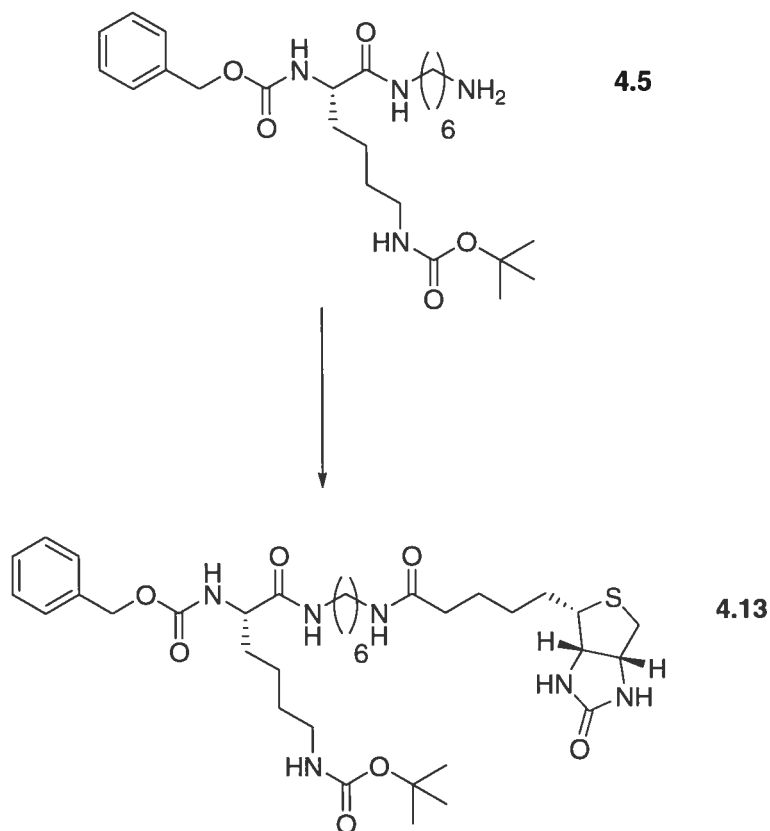
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 8.52 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.29 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.20 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 7.48 (m, 2H), 7.27 (m, 5H), 7.15 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.95 (m, 1H), 6.19 (m, 2H), 6.02 (m, 1H), 5.78 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.46 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz), 5.05 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.43 (m, 10H), 3.21 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.86 (s, 6H), 1.72 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.36 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 165.4, 161.8, 150.5, 132.1, 131.5, 126.4, 126.0, 125.3, 124.8, 123.8, 123.4, 123.1, 122.3, 121.9, 121.4, 117.5, 115.1, 110.5, 70.2, 69.9, 69.5, 69.3, 67.0, 66.1, 48.5, 44.9, 41.9, 34.7, 33.1, 30.5, 26.9, 26.4, 19.2.

SMHR (ESI) calculé pour C₃₅H₄₈N₅O₈S ([M+H]⁺): 698.3218, trouvé 698.3218.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine
(biotinylamino)hexylamide (4.13)**

6-



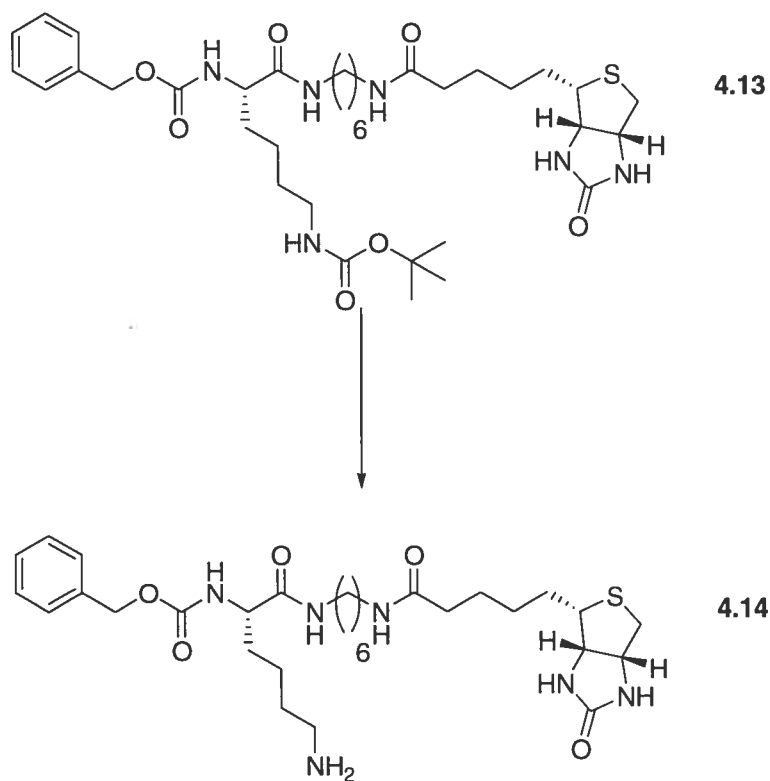
L'amine **4.5** (1 mmol) est solubilisé dans 4 mL de DMF. À cette solution, sont ajoutés le DIEA (174 μ L, 1 mmol), le TBTU (1 mmol) et la biotine (0.8 mmol). Le mélange est agité pendant 5 h puis dilué avec 60 mL d'AcOEt. Un gel apparaît et est filtré. Le solide est ensuite lavé avec une solution saturée de NaCl, une solution de HCl 0.1N, une solution NaOH 1N et de l'eau. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 57 %.

RMN 1 H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm) : 7.80 (m, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.20 (m, 5H), 6.64 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.98

(m, 1H), 3.75 (m, 1H), 2.87 (m, 5H), 2.72 (m, 3H), 2.41 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.22 (m, 29H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ (ppm) : 173.1, 173.0, 164.0, 157.2, 156.9, 138.4, 129.6, 129.0, 128.9, 78.6, 66.6 (2 carbones), 62.3 (2 carbones), 60.5 (2 carbones), 56.7 (2 carbones), 56.1, 39.6, 36.5, 33.0, 30.4, 30.3, 29.5, 29.3, 27.4, 27.3, 26.6, 26.5, 24.1.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 705.4004, trouvé 705.4005.

***N*- α -carbobenzyloxy-L-lysine 6-(biotinylamino)hexylamide (4.14)**

Le carbamate **4.13** (0.25 mmol) est solubilisé dans un minimum de CH_2Cl_2 . À cette solution, est ajouté 2.5 mL de TFA. Le mélange est agité 1h à la température de la pièce. Le TFA est ensuite évaporé à l'aide d'un mélange acétone/cyclohexane pour donner le sel de TFA du produit sous la forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

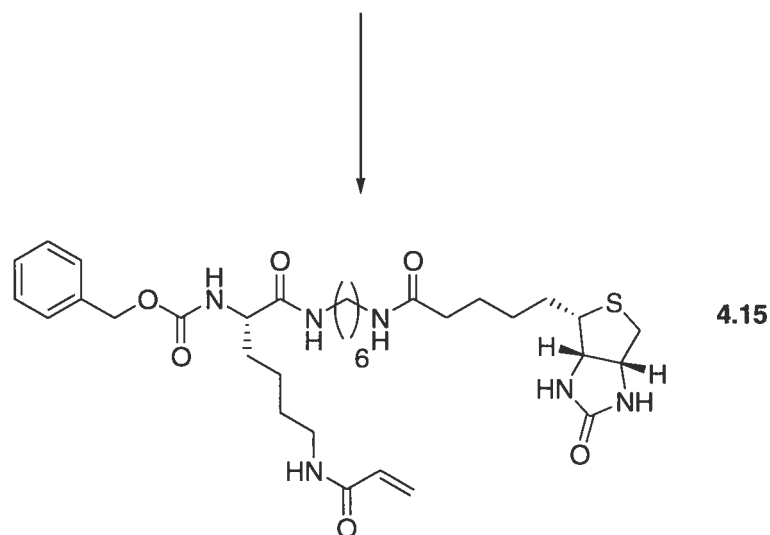
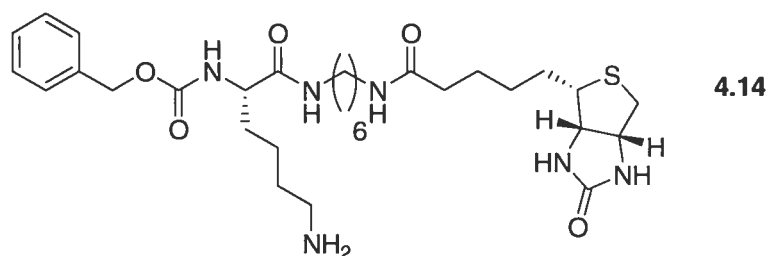
RMN ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm) : 7.75 (m, 1H), 7.64 (m, 3H), 7.21 (m, 6H), 4.87 (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 2.95 (m, 5H), 2.65 (m, 3H), 2.42 (m, 1H), 1.91 (t, 2H, $J = 7.7\text{Hz}$), 1.24 (m, 20H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ (ppm) : 173.2, 172.9, 164.1, 159.8 (q, $J = 35.8$ Hz), 157.2, 138.3, 129.6, 129.0, 128.9, 117.0 (q, $J = 290.0$ Hz), 66.7 (2 carbones), 62.4 (2 carbones), 60.6 (2 carbones), 56.7 (2 carbones), 55.8, 39.6, 36.5, 32.7, 30.4, 30.2, 29.5, 29.3, 27.9, 27.3, 26.6, 23.7.

SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 605.3480, trouvé 605.3499.

***N*- α -carbobenzyloxy-*N*- ϵ -acryloyl-L-lysine
(biotinylamino)hexylamide (4.15)**

6-



L'amine **4.14** (0.25 mmol) est dissous dans 2 mL de DMF en présence de Et₃N (70 µL, 0.5 mmol). Le mélange réactionnel sous azote est refroidi à 4 °C et le chlorure d'acryloyle (0.5 mmol) est ajouté goutte-à-goutte. Le mélange est ensuite agité 3h à la température de la pièce. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite et 40 mL d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique ainsi obtenue est lavée à l'aide de 2×5 mL d'une solution saturée de NaCl, 3×5 mL d'une solution HCl 0.1N, de 3×5 mL d'une solution de NaOH 1N puis de 5 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est ensuite séchée à l'aide de MgSO₄, filtrée et l'AcOEt est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu grâce à une précipitation à l'aide d'un mélange chloroforme/éther diéthylique pour donner un solide blanc-jaune avec un rendement de 66 %.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 8.11 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.39 (m, 6H), 6.19 (m, 2H), 5.83 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz), 5.59 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz), 5.05 (s, 2H), 4.90 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.04 (m, 9H), 2.09 (m, 2H), 1.27 (m, 20H).

RMN ¹³C (75 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm) : 172.7, 172.6, 165.4, 156.9, 153.7, 138.0, 132.8, 129.9, 129.3, 128.6, 125.8, 66.3, 62.2, 58.3, 55.8, 55.6, 55.5, 39.3, 39.3, 37.4, 36.1, 32.7, 30.1, 30.0, 29.7, 29.2, 28.7, 27.1, 27.0, 26.2, 24.0.

SMHR (ESI) calculé pour C₃₃H₅₁N₆O₆S ([M+H]⁺): 659.3585, trouvé 659.3577.

Références

1. Silverman, R. B., *The Organic Chemistry Of Drug Design And Drug Action*. Academic Press: San Diego, 1992; p 147.
2. Smith, H. J.; Simons, C., *Enzymes And Their Inhibition. Drug Development*. CRC Press: 2005; p 176.
3. Palfreyman, M. G.; Mc Cann, P. P.; Lovenberg, W.; Temple Jr, J. G.; Sjoerdsma, A., *Enzymes as Targets for Drug Design*. Academic Press: San Diego, 1989; p 1.
4. Sandler, M.; Smith, H. J., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press ed.; 1989; Vol. 2, p 2.
5. Woods, D. D., *Br. J. Exp. Pathol.* **1940**, 21, 74.
6. Tréfouël, J.; Tréfouël, M. J.; Nitti, F.; Bovet, D., *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* **1935**, 120, 756.
7. Miller, A. K., *Proc. Soc. Exp. Pathol. Med.* **1944**, 57, 151.
8. Domagk, G., *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1935**, 61, 250.
9. Endo, A.; Tsujita, Y.; Kuroda, M.; tanzawa, K., *Eur. J. Biochem.* **1977**, 77, 31.
10. Brown, A. G.; Smale, T. C.; King, T. J.; Hasenkamp, R.; Thompson, R. H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 1165.
11. Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirschfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, 77, 3957.
12. Tanzawa, K.; Endo, A., *Eur. J. Biochem.* **1979**, 98, 195.
13. Cheung, H. S.; Cushman, D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 293, 451.
14. Silverman, R. B., *The Organic Chemistry Of Drug Design And Drug Action*. Academic Press: San Diego, 1992; p 154.
15. Silverman, R. B., *The Organic Chemistry Of Drug Design And Drug Action*. Academic Press: San Diego, 1992; p 178.
16. Sandler, M.; Smith, H. J., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press ed.; 1989; p 49.
17. Sandler, M.; Smith, H. J., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press ed.; 1989; Vol. 2, p 6.
18. Sandler, M.; Smith, H. J., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press ed.; 1989; p 19.
19. Sandler, M., *Enzyme Inhibitors as Drugs*. University Park Press: Baltimore, 1980; p 25.
20. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. San Diego: Academic Press: 1996.
21. Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Y., T. R., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, 3, 906.
22. Tsien, R. Y., *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509.
23. Hess, S. T.; Heikal, A. A.; Webb, W. W., *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 10138.
24. Negro, A.; Grassato, L.; De Laureto, P. P.; Skaper, S. D., *Protein Eng.* **1997**, 10, 1077.

25. Hart, R. C.; Matthews, J. C.; Hori, K.; Cormier, M. J., *Biochemistry* **1979**, 18, 2204.
26. Griffin, B. A.; Adams, R. S.; Jones, J.; Tsien, Y. R., *Methods Enzymol.* **2000**, 327, 565.
27. Whittaker, V. P., *J. Biochem.* **1947**, 41.
28. Farinas, J.; Verkman, A. S., *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 7603.
29. Wu, M. M.; Llopis, J.; Adams, S.; Mc Caffery, J. M.; Kulomaa, M. S.; Machen, T. E.; Moore, H. P.; Tsien, R. Y., *Chem. Biol.* **2000**, 7, 197.
30. Miller, L. W.; Sable, J.; Goelet, P.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1672.
31. Guignet, E. G.; Hovius, R.; Vogel, H., *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 440.
32. Griffin, B. A.; Adams, R. S.; Tsien, R. Y., *Science* **1998**, 281, 269.
33. Adams, R. S.; Campbell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063.
34. Gaietta, G.; Deerinck, T. J.; Adams, R. S.; J., B.; Tour, O.; Laird, D. W.; Sosinsky, G. E.; Tsien, R. Y.; Ellisman, M. H., *Science* **2002**, 296, 503.
35. Tour, O.; Meijer, R. M.; Zacharias, D. A.; Adams, R. S.; Tsien, R. Y., *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1505.
36. Girouard, S.; Houle, M.-H.; Grandbois, A.; Keillor, J. W.; Michnick, S. W., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 559.
37. Sandler, M., *Enzyme Inhibitors as Drugs*. University Park Press: Baltimore, 1980; p 43.
38. Smith, H. J.; Simons, C., *Enzymes And Their Inhibition. Drug Development*. CRC Press: 2005; p 183.
39. Jencks, W. P., *Current Aspects of Biochemical Energetics*. Academic Press, New York.: 1966.
40. Lienhard, G. E., *Annu. Rep. Med. Chem.* **1972**, 7, 249.
41. Wolfenden, R., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1976**, 5, 271.
42. Smith, H. J.; Simons, C., *Enzymes And Their Inhibition Drug Development*.
43. Sandler, M.; Smith, H. J., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press ed.; 1989; Vol. 2, p 42.
44. Belec, L.; Slaninova, J.; Lubell, W. D., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1448.
45. De Young, L.; Ballaron, S.; Epstein, W., *J. Invest. Dermatol.* **1984**, 82, 275.
46. Dalziel, K.; Dykes, P. J.; Marks, R., *Br. J. Exp. Pathol.* **1984**, 65, 107.
47. Keillor, J. W., *Chem. Biol.* **2005**, 12, 410.
48. Dedeoglu, A.; Kubilus, J. K.; Jeitner, T. M.; Matson, S. A.; Bogdanov, M.; Kowall, N. W.; Matson, W. R.; Cooper, A. J. L.; Ratan, R. R.; Beal, M. F., *J. Neurosci.* **2002**, 22, 8942.
49. Mastroberardino, P. G.; Iannicola, C.; Nardacci, R.; Bernassola, F.; De Laurenzi, V.; Melino, G.; Moreno, S.; Pavone, F.; Oliverio, S.; Fesus, L., *Cell Death Differ.* **2002**, 9, 873.
50. Selkoe, D. J.; Ihara, Y.; Salazar, F., *Science* **1982**, 215, 1243.
51. Selkoe, D. J.; Abraham, C.; Ihara, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, 79, 6070.
52. Schaelpfer, W., *Biological Aspects of Alzheimer's Disease*. Cold Spring Harbor laboratory: Cold Spring Harbor, N. Y. ed.; 1983; p 107.

53. Farmer, P. M.; Peck, A.; Terry, R. D., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1976**, 35, 367.
54. Amendola, A.; Lombardi, G.; Oliverio, S.; Colizzi, V.; Piacentini, M., *FEBS Lett.* **1994**, 339, (258).
55. Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 13407.
56. Norlund, M. A.; Lee, J. M.; Zainelli, G. M.; Muma, N. A., *Brain Res.* **1999**, 851, 154.
57. Aeschlimann, D.; Paulsson, M., *Thromb. Haemost.* **1994**, 71, 402.
58. Folk, J. E.; Mulloly, J. P.; Cole, P. W., *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 1838.
59. Griffin, M.; Wilson, J., *Molec. Cell. Biol.* **1984**, 58, 37.
60. Lee, K. N.; Arnold, S. A.; Birckbichler, P. J.; Patterson Jr, M. K.; Fraij, B. M.; Takeuchi, Y.; Carter, H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1202, 1.
61. Thomazy, V.; Fesus, L., *Cell. Tissue Res.* **1989**, 255, 215.
62. Greenberg, C. S.; Birckbichler, P. J.; Rice, R. H., *FASEB J.* **1991**, 5, 3071.
63. Levistzki, A.; Willingham, M.; Pastan, I. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, 77, 2706.
64. Davies, P. J.; Davies, D. R.; Levistzki, A.; Maxfield, F. R.; Milhaud, P.; Willingham, M. C.; Pastan, I. H., *Nature (London)* **1980**, 283, 162.
65. Fesus, L.; Thomazy, V.; Falus, A., *FEBS Lett.* **1987**, 224, 104.
66. Maticic, S.; Loewy, A. G., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 30, 356.
67. Lorand, L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1972**, 202, 6.
68. Pisano, J. J.; Finlayson, J. S.; Peyton, M. P., *Science* **1968**, 160, 892.
69. Rice, R. H.; Green, H., *Cell* **1979**, 18, 681.
70. Kim, S. Y.; Chung, S. I.; Steinert, P. M., *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18026.
71. Nemes, Z.; Demeny, M.; Marekov, L. N.; Fesus, L.; Steinert, P. M., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 2636.
72. Candi, E.; Tarcsa, E.; Digiovanna, J. J.; Compton, J. G.; Elias, P. M.; Marekov, L. N.; Steinert, P. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 2067.
73. Azari, P.; Rahim, J.; Clarkson, D. P., *Curr. Eye. Res.* **1981**, 463.
74. Fesus, L., *Surv. Immunol. Res.* **1982**, 1, 297.
75. Bernard, B. A.; Reano, A.; Darmon, Y. M.; Thivolet, J., *Brit. J. Dermatol.* **1986**, 114, 279.
76. Schroeder, W. T.; Thatcher, S. M.; Stewart-Galetka, S.; Annarella, M.; Chema, D.; Siciliano, M. J.; Davies, P. J. A.; Tang, H. Y.; Sowa, B. A.; Duvic, M., *J. Invest. Dermatol.* **1992**, 99, 27.
77. Wolf, R.; Schiavo, A. L., *Int. J. Dermatol.* **1997**, 36, 10.
78. Piper, J. L.; Gray, G. M.; Khosla, C., *Biochemistry* **2002**, 41, 386.
79. Jeitner, T. M.; Bogdanov, M. B.; Matson, W. R.; Daikhin, Y.; Yudkoff, M.; Folk, J. E.; Steinman, L.; Browne, S. E.; Beal, M. F.; Blass, J. P.; Cooper, A. J., *J. Neurochem.* **2001**, 79, 1109.
80. Liu, S.; Cerione, R. A.; Clardy, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, (2743).
81. Jeon, J.-H.; Cho, S.-Y.; Kim, C.-W.; Shin, D.-M.; Kweon, J.-C.; Choi, K.-H.; Park, S.-C.; Kim, I.-G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2002**, 294, 818.

82. Yee, V. C.; Pedersen, L. C.; Le Trong, I.; Bishop, P. D.; Stenkamp, R. E.; Teller, D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 7296.
83. Ikura, K.; Nasu, T.; Yokota, H.; Tsuchiya, Y.; Sasaki, R.; Chiba, H., *Biochemistry* **1988**, 27, 2898.
84. Noguchi, K.; Ishikawa, K.; Yokoyama, K.-I.; Ohtsuka, T.; Nio, N.; Suzuki, E.-I., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 12055.
85. Abe, T.; Chung, S. I.; DiAugustie, R. P.; Folk, J. E., *Biochemistry* **1977**, 16, 5495.
86. Leblanc, A.; Day, N.; Ménard, A.; Keillor, J. W., *Prot. Exp. & Purif.* **1999**, 17, 89.
87. Folk, J. E.; Chung, S. I., *Methods Enzymol.* **1985**, 113, 358.
88. Yokoyama, K.-L.; Kikuchi, Y.; Yasueda, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 1205.
89. Gillet, S. M. F. G.; Chica, R. A.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N., *Prot. Exp. & Purif.* **2004**, 33, 256.
90. Chica, R. A.; Gagnon, P.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N., *Protein Science* **2004**, 13, 979.
91. Chica, R. A.; Gillet, S. M. F. G.; Dryburg, F.-J.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N., (soumis).
92. Lorand, L.; Rule, N. G.; Ong, H. H.; Furlanetto, R.; Jacobsen, A.; Downey, J.; Oner, N.; Bruner-Lorand, J., *Biochemistry* **1968**, 7, 1214.
93. Stenberg, P.; Nilsson, L.; Erickson, O.; Lunden, R., *Acta Pharm. Suec* **1971**, 8, 415.
94. Holbrook, J. J.; Cooke, R. D.; Kingston, I. B., *Biochem. J.* **1973**, 135, 901.
95. Chung, S. I.; Lewis, M. S.; Folk, J. E., *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 940.
96. Curtis, C. G.; Brown, K. L.; Credo, R. B.; Domanik, R. A.; Gray, A.; Stenberg, P.; Lorand, L., *Biochemistry* **1974**, 13, 3774.
97. Folk, J. E.; Finlayson, J. S., *Adv. Protein Chem.* **1977**, 31, 1.
98. Gross, M.; Whetzel, N. K.; Folk, J. E., *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 7693.
99. Lee, K. N.; Fesus, L.; Yancey, S. T.; Girard, J. E.; Chung, S. I., *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 14689.
100. Castelhana, A. L.; Billedeau, R.; Pliura, D. H.; Bonaventura, B. J.; Krantz, A., *Bioorg. Chem.* **1988**, 16, 335.
101. Auger, M.; Mc Dermott, A. E.; Robinson, V.; Castelhana, A. L.; Billedeau, R. J.; Pliura, D. H.; Krantz, A.; Griffin, R. G., *Biochemistry* **1993**, 32, 3930.
102. Pliura, D. H.; Bonaventura, B. J.; Pauls, H. W.; Killackey, J. F.; Krantz, A., *J. Enzyme Inhib.* **1992**, 6, 181.
103. Freund, K. F.; Doshi, K. P.; Gaul, S. L.; Claremon, D. A.; Remy, D. C.; Baldwin, J. J.; Pitzenberger, S. M.; Stern, A. M., *Biochemistry* **1994**, 33, 10109.
104. Doyle, P. M.; Harris, C. J.; Carter, K. R.; Simpkin, D. S. A.; Bailey-Smith, P.; Stone, D.; Russel, L.; Blackwell, G., *J. Biochem. Soc. Trans.* **1990**, 18, 1318.
105. Marrano, C.; de Macédo, P.; Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 3231.
106. Marrano, C.; de Macédo, P.; Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 1923.
107. Duval, E.; Case, A.; Stein, R. L.; Cuny, G. D., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 15, 1885.
108. Case, A.; Stein, R. L., *Biochem.* **2007**, 46, 1106.

109. Gobec, S.; Sova, M.; Kristan, K.; Rižner, T. L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3933.
110. Penning, T. D.; Russell, M. A.; Chen, B. B.; Chen, H. Y.; Desai, B. N.; Docter, S. H.; Edwards, D. J.; Gesiki, G. J.; Freeman, S. K.; Hanneke, M. L.; Shannon, K. E.; Westlin, M. M.; Nickols, G. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1471.
111. Adisakwattana, S.; Sookkongwaree, K.; Roengsumran, S.; Petsom, A.; Ngamrojnavanich, N.; Chavasiri, W.; Deesamer, S.; Yibchok-anun, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1893.
112. Choi, K.; Siegel, M.; Piper, J. L.; Yuan, L.; Cho, E.; Strnad, P.; Omary, B.; Rich, K. M.; Khosla, C., *Chem. Biol.* **2005**, 12, 469.
113. Marrano, C.; De Macédo, P.; Gagnon, P.; Lapierre, D.; Gravel, C.; Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 3231.
114. Leblanc, A.; Gravel, C.; Labelle, J.; Keillor, J. W., *Biochemistry* **2001**, 40, 8335.
115. Gillet, S. M. F. G.; Pelletier, J. N.; Keillor, J. W., *Anal. Biochem.* **2005**, 347, 221.
116. Brown, W. E.; Wold, F., *Biochemistry* **1973**, 12, 828.
117. Twu, J.; Wold, F., *Biochemistry* **1973**, 12, 381.
118. Sliedregt, K. M.; Schouten, A.; Kroon, A.; Liskamp, R. M. J., *Tet. Lett.* **1996**, 37, 4237.
119. Bellamy, F. D.; Ou, K., *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 839.
120. Nelson, A. T.; Houlihan, W. J., *The aldol condensation. In Organic Reactions.* John Wiley and Sons: New York, 1968; p 44.
121. Yagodnits, P. I.; Skripskaya, O. V.; Chernyuk, I. N.; Shevchuk, M. I., *Zhurnal Obshchei Khimii* **1991**, 61, 1856.
122. Bergamini, C. M., *FEBS Lett.* **1988**, 239, 255.
123. Iismaa, S.; Wu, M.-J.; Nanda, N.; Church, W. B.; Graham, R. M., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18259.
124. Venere, A. D.; Rossi, A.; Matteis, R. D.; Rosato, N.; Agro, A. F.; Mei, G., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3915.
125. Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C., *Nature Methods* **2005**, 2, 261.
126. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
127. Folk, J. E.; Chung, S. I., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1973**, 38, 109.
128. Gagnon, P.; Huang, X.; Therrien, E.; Keillor, J. W., *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7717.
129. de Macédo, P.; Marrano, C.; Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 355.
130. Ormö, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J., *Science* **1996**, 273, 1392.
131. Folk, J. E., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1983**, 54, 1.
132. Nakashima, H.; Hashimoto, M.; Sadakane, Y.; Tomohiro, T.; Hatanaka, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15092.
133. Day, N.; Keillor, J. W., *Anal. Biochem.* **1999**, 274, 141.
134. Walter, M.; Besendorf, H.; Schnider, O., *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 1127.