



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de farnésyltransférase dans le traitement du cancer

Nicolas Wlodarczyk

► **To cite this version:**

Nicolas Wlodarczyk. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de farnésyltransférase dans le traitement du cancer. Médicaments. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00331313

HAL Id: tel-00331313

<https://theses.hal.science/tel-00331313>

Submitted on 16 Oct 2008

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

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

UNIVERSITE DE LILLE 2 – DROIT ET SANTE
INSTITUT DE CHIMIE PHARMACEUTIQUE ALBERT LESPAGNOL

THESE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : Sciences du Médicament

Soutenue publiquement

Par

Nicolas Wlodarczyk

le 12 septembre 2008

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION PHARMACOLOGIQUE
DE NOUVEAUX INHIBITEURS POTENTIELS DE
FARNESYLTRANSFERASE DANS LE TRAITEMENT DU CANCER**

JURY

Directeur de thèse :	Jean-Pierre HENICHART	Professeur, Université de Lille 2
Rapporteurs :	Joëlle DUBOIS	Chargée de Recherche (UPR 2301 CNRS), ICSN, Gif-sur-Yvette
	Luc VAN HIJFTE	Directeur de Recherches, Johnson & Johnson
Examineurs :	Benoît RIGO	Professeur à HEI, Lille
	Frédéric SCHMIDT	Chargé de Recherche (UMR 176 CNRS), Institut Curie, Paris
	Régis MILLET	Maître de Conférences, Université de Lille 2

Je dédie cette thèse...

A mes parents

Votre présence, votre soutien permanent ont permis l'aboutissement de ces longues années d'études, Merci pour tout.

A mes frères, Guillaume et Damien

Merci pour votre compréhension et vos encouragements.

A mes amis

Votre soutien, votre compassion et la curiosité à l'égard de mon travail m'ont encouragés dans les moments les plus difficiles. Je vous en remercie sincèrement.

J'adresse mes plus vifs remerciements à :

A mon directeur de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Hénichart

Professeur émérite, Université de Lille 2

Si, au cours de mes études, j'ai pu éprouver un profond respect pour certaines personnes, vous êtes de celles-là. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'acceptant dans votre équipe d'abord en stage de DU Sciences du médicament et sciences biologiques et en me proposant ce sujet passionnant. Durant ces six années, vous avez su m'inculquer le goût de la recherche et votre sens du " Drug Design". Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A mes rapporteurs

Madame la docteur Joëlle Dubois

Chargée de recherche (CNRS), Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette

Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire afin d'y effectuer la mesure de l'inhibition de la farnésyltransférase. Je suis également très honoré que vous ayez accepté de juger mon travail. Votre expérience et votre compétence sur ce sujet apporteront un regard avisé sur ce travail.

Monsieur le Docteur Luc Van Hijfte

Directeur de recherche, Johnson & Johnson, Val de Reuil

Je suis très honoré que vous acceptiez de juger ce travail. Je voudrais vous remercier de nous faire partager vos connaissances et d'apporter à ce travail un regard critique. Qu'il me soit permis de vous remercier sincèrement et de vous assurer de ma profonde gratitude.

Aux autres membres du jury

Monsieur le Docteur Frédéric Schmidt

Chargé de recherche (CNRS), Institut Curie, Paris

C'est un très grand honneur de vous compter parmi les membres de ce Jury. De par votre expérience et votre compétence dans le domaine du cancer, je vous remercie du regard critique et avisé que vous apportez sur ce travail.

Monsieur le professeur Benoît Rigo

Professeur, Ecole des Hautes Etudes d'Ingénieur, Lille

C'est un grand plaisir de vous compter parmi les membres du jury. Je vous en remercie sincèrement.

Monsieur le docteur Régis Millet

Maître de Conférence, ICPAL, Université de Lille 2

Nos discussions autour de ce sujet ont permis de faire progresser ce travail. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité et pour avoir suivi le déroulement de ma thèse.

Enfin, Je tiens également à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué de loin ou de près à ce travail :

Monsieur le Docteur **Raymond Houssin**. Vous avez pu suivre l'avancement de ce travail et l'avez toujours fait avec beaucoup de patience et de gentillesse. Je tiens particulièrement à vous témoigner toute ma reconnaissance pour votre disponibilité permanente, votre rigueur et vos conseils avisés. Votre aide fut très précieuse lors des moments fastidieux de rédaction.

Madame le Docteur **Pauline Gilleron**. J'ai suivi puis participé à ton sujet pendant tes trois années de thèse pour ensuite avoir eu le privilège de le continuer. Tu m'as beaucoup appris aussi bien au niveau pratique que théorique. Ta bonne humeur quotidienne est un rayon de soleil dans le laboratoire.

Messieurs les Docteurs **Guillaume Laconde** et le **Mathieu Desroses**. Malgré tout ce que vous m'avez fait subir (qui aime bien châtie bien), vous avez toujours été disponible et aimable à mon égard. Je suis reconnaissant pour votre aide, votre soutien et vos conseils.

Sabrina Chétitah, **Nancy Bitsy**, **Perrine Six** et **Virginie Nicole**. Ce fut un plaisir de vous avoir encadré lors de vos stages respectifs. Votre participation aux synthèses décrites dans ce mémoire a contribué de manière non négligeable à l'avancement de ce travail.

Mademoiselle **Amélie Lemoine**. Je te remercie pour avoir réalisé l'évaluation pharmacologique cellulaire décrite dans ce mémoire.

Madame la docteur **Nicole Pommery**. Vos conseils scientifiques et professionnels m'ont toujours été précieux.

Mademoiselle **Delphine Ryckewaert** et Monsieur le docteur **Christophe Furman**. Vos travaux d'étude immunocytochimique ont permis d'aborder un autre aspect à ce sujet.

Monsieur le docteur **Amaury Farce**. Tes études de modélisation moléculaire ont été très utiles pour illustrer la conception de mes composés, en permettant de déterminer avec précision leur mode de fixation.

Tous les membres du laboratoire d'application de RMN, vos conseils et votre patience ont été appréciables pour la bonne identification de mes molécules.

Madame **Frédérique Klupsch**. Ta disponibilité, tes conseils et ta bonne humeur ont largement participé au bon déroulement de ma thèse. Merci pour tous les petits services rendus au quotidien.

Madame Frédérique Lebègue. Ta joie de vivre et ta grande disponibilité ont grandement contribué au bon déroulement de ma thèse.

Madame la docteur **Sylvia Brignoux**. Je te remercie pour m'avoir supporté durant ces deux années dans la même pièce.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'ICPAL qui, de près ou de loin, ont apporté un maillon à ce travail : Laurence, Nicolas B., Antonio, Jamal, Sébastien, Virginie, Céline, Aurélie D. et Aurélie T. Merci pour votre sympathie.

Sommaire

Remerciements.....2

Liste des abréviations.....9

Introduction.....12

**1° Partie : Du cancer aux inhibiteurs de farnésyltransférase :
Quelle perspectives thérapeutiques ?.....14**

I. Généralités sur le cancer.....15

A. Description de la pathologie.....15

B. Les traitements.....15

II. La farnésyltransférase (FTase).....18

A. Les enzymes de prénylation et d'autres modifications post-traductionnelles
.....19

B. Présentation de la farnésyltransférase.....22

C. Mécanisme réactionnel de la farnésylation.....23

D. Spécificité de substrat des enzymes de prénylation.....26

III. Mécanisme d'action des inhibiteurs de farnésyltransférase.....30

A. Les petites protéines G impliquées dans le mécanisme d'action des
FTis.....31

B. Les centromères protéines CENP-E et CENP-F.....38

C. La Rab-géranylgéranyltransférase (Rab-GGTase).....39

D. Perspectives sur le mécanisme d'action des FTis.....40

IV. Perspectives thérapeutiques des FTis.....41

A. Utilisation dans le traitement du cancer.....41

B. Perspectives thérapeutiques des FTis dans d'autres pathologies.....44

**2° Partie : Les différentes stratégies utilisés pour le drug
design des inhibiteurs de FTase.....46**

I. Découverte de FTis par conception rationnelle.....47

A. Les mimétiques de la « boîte CA₁A₂X ».....48

B. Les mimétiques du farnésylpyrophosphate (FPP).....58

C. Les mimétiques de l'état de transition.....	59
II. Découverte de FTis par criblage de chimiothèques.....	60
A. Les composés naturels.....	60
B. Les composés synthétiques.....	62
3° Partie : Conception et évaluation pharmacologique de nouveaux inhibiteurs de farnésyltransférase.....	68
I. Conception d'un nouvel espaceur de type 4-aminopipéridine-2-carboxylate de méthyle.....	70
A. Présentation des premiers FTis préparés au laboratoire.....	70
B. Conception de nouveaux inhibiteurs.....	72
C. Résultats pharmacologiques.....	73
II. Conception d'inhibiteurs avec un espaceur 1,4-diazépanique (séries J, K et L).....	76
A. Découverte de « hits » à partir d'une librairie focalisée de 64 composés préparés par synthèse parallèle.....	76
B. Conception de l'espaceur 1,4-diazépanique à partir de « hits ».....	78
1. Evaluation pharmacologique des composés possédant le 1,4-diazépane (Série J).....	79
2. Evaluation pharmacologique des composés possédant le 5-phényl-1,4-diazépane (séries K et L).....	83
III. Étude des effets des inhibiteurs de farnésyltransférase sur le cycle cellulaire.....	89
A. Effets des FTis sur l'organisation des microtubules.....	90
B. Implication de la protéine CENP-E dans l'organisation de la tubuline.....	92
4° Partie : Stratégie de synthèse.....	95
I. Synthèse du 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole.....	96
II. Synthèse des composés à espaceur 4-aminopipéridinyl-2-carboxylate de méthyle (série B).....	99
A. Synthèse des pipéridinones.....	99
B. Substitution des dérivés 4-aminopipéridiniques.....	104
III. Synthèse des dérivés du 1,4-diazépane (séries J, K et L).....	106
A. Préparation des composés 1,4-diazépaniques (série J).....	107
B. Préparation des composés à espaceur 5-phényl-1,4-diazépane (série K et L).....	108
1. Synthèse de l'hétérocycle 1,4-diazépane substitué en position 5.....	109

2. Substitution des deux fonctions amines.....	115
Conclusion-perspectives.....	118
Références bibliographiques.....	123
Partie expérimentale.....	142
Partie A : Synthèse chimique.....	142
I. Appareillage et techniques d'analyse.....	143
II. Protocoles expérimentaux.....	145
Synthèse du 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole.....	145
Synthèse des composés à espaceur 4-aminopipéridinyl-2-carboxylate de méthyle (série B).....	147
Synthèse des dérivés du 1,4-diazépane (séries J, K et L).....	166
Partie B : Evaluation pharmacologique.....	215

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

Abréviations biologiques :

Apppi	(5'-[3-(3-méthylbut-3-ényl)triphosphate] de 1-adénosine)
CDK	cyclin-dependent kinase
CENP	Centromere protein
DTT	dithiothréitol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERKs	extracellular-signal regulated kinases
FDA	food and drug administration
FPP	farnésylpyrophosphate
FTase	farnésyltransférase
FTi	farnesyl transferase inhibitor
GAPs	GTPase activating proteins
GDP	guanosine diphosphate
GEFs	guanosine nucleotide exchange factors
GGPP	géranylgéranylpyrophosphate
GGTase	géranylgéranyltransférase
Grb2	growth factor receptor binding protein-2
GTP	guanosine triphosphate
HDACs	histones deacetylases
HMG CoA	hydroxyméthylglutaryl CoA
H-Ras	Harvey Ras
hRCE ₁	Ras and a-factor converting enzyme
ICMT	Isoprénylvytéine Carboxyl Méthyl Transférase
IC ₅₀	concentration inhibitrice 50 %
IKK	I-κB kinase
IPP	isoprénoïde pyrophosphate
IRS	Insulin Receptor Substrate
kDa	kilo-Dalton
K-Ras	Kirsten Ras
MAP Kinases	mitogen activated protein kinases
MEK	mitogen / extracellular-signal regulated kinase kinase
MMP	matrice métalloprotéinase
MMTV	mouse mammary tumor virus
mSOS	mammalian-son of sevenless
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl)-2,5-diphényltétrazolium
n.d.	non déterminé
NF-κB	Nuclear Factor κB
N-Ras	Neuroblastoma Ras
n.s.	non significatif
OGP	n-Octyl β-D-glucopyranoside

PBS	Phosphate Buffering Saline
pcCMT	prénylcystéine carboxyl méthyl transférase
PDGF	platelet derived growth factor
PDK	phosphoinositide dependent Kinase
PH	pleckstrin homology
PKB	protéine kinase B
PIP3	phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLD	phospholipase D
PRL	Phosphatase of Regenerating Liver
PTEN	phosphatase and tensin homolog
REP	Rab Escort Protein
Rheb	Ras homolog enriched in brain
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SAB	Sérum Albumine Bovine
SH-2	src homology 2
SH-3	src homology 3
siRNA	small interference RNA (RiboNucleic Acid)
SSase	squalène synthétase
SVF	Sérum de Veau Foetal
WB	Western Blot

Abréviations chimiques :

AE	acétate d'éthyle
APCI ⁺	ionisation chimique à pression atmosphérique
BOC	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
CCE	chromatographie sur couche épaisse
CCM	chromatographie sur couche mince
DCM	dichlorométhane
DIEA	diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
éq	équivalent
F	point de fusion
Fmoc	9-fluorénylméthoxy-carbonyle
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide haute performance
Hz	hertz
IR	infra-rouge
LC-MS	chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidinophosphonium
PyBrOP	hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidinophosphonium
Rdt	rendement
Rf	facteur de rétention
RMN	résonance magnétique nucléaire

	s	singulet
	d	doublet
	D	doublet avec couplage en ortho pour les aromatiques
	t	triplet
	q	quadruplet
	m	massif ou multiplet
	<i>J</i>	constante de couplage
SM		spectrométrie de masse
	EI	impact électronique
	IC	ionisation chimique
T A.		température ambiante
TEA		triéthylamine
TFA		acide trifluoracétique
THF		tétrahydrofuranne
t_r		temps de rétention

INTRODUCTION

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol à Lille, sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Jean-Pierre Hénichart. Mon sujet de thèse a pour objet la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de l'enzyme farnésyltransférase et s'inscrit dans le cadre général de recherches de molécules à visée anticancéreuse menées au sein de l'équipe.

Le cancer reste une maladie encore très fréquente. Malgré les grands progrès de la médecine, les traitements actuels sont peu sélectifs des cellules cancéreuses, entraînant de nombreux effets indésirables, assez sévères. De plus, certaines cellules cancéreuses développent une chimiorésistance, les rendant hautement invasives et immortelles. Les avancées dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis d'identifier de nouvelles cibles pour traiter le cancer, ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Une des stratégies consiste à cibler une métalloenzyme à zinc, la farnésyltransférase (FTase). Celle-ci catalyse l'addition du groupement isoprénoïde à quinze atomes de carbone appelé farnésyle. Cette réaction permet alors la maturation d'environ 60 protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (Ras, Rheb, RhoB, CENP-E, -F, etc...). Une nouvelle classe d'agents anticancéreux, les inhibiteurs de farnésyltransférase (FTis), a ainsi été développée pour inhiber spécifiquement cette enzyme, dans le cas d'un dysfonctionnement amenant à une prolifération cellulaire anarchique.

Après avoir présenté quelques généralités sur le cancer et ses traitements, je décrirai la cible thérapeutique choisie, l'enzyme farnésyltransférase. Une fois le mécanisme d'action de la FTase présenté, j'exposerai les différentes cibles des inhibiteurs de FTase pour évoquer les différentes perspectives thérapeutiques de ces inhibiteurs. Ensuite, je listerai les différentes stratégies de *drug design* utilisées pour concevoir des FTis. Puis j'exposerai, à partir d'études de modélisation moléculaire, la conception de nouveaux FTis ainsi que leur évaluation pharmacologique. Enfin, je présenterai les diverses voies de synthèse élaborées et mises en œuvre pour obtenir ces composés. Je conclurai en évoquant les diverses perspectives.

**DU CANCER AUX INHIBITEURS DE
FARNESYLTRANSFERASE :
QUEL POTENTIEL THERAPEUTIQUE ?**

I. Généralités sur le cancer

A. Description de la pathologie

Le cancer se caractérise par une prolifération cellulaire qui n'est plus inhibée par le contact, induisant une croissance en amas et conduisant à la formation de tumeurs. Toutes les tumeurs n'ont pas un caractère cancéreux. La plupart du temps, elles sont dites «bénignes», leur croissance cessant spontanément.

Le cancer est une maladie génétique acquise, non héréditaire, qui témoigne d'un double caractère : c'est à la fois une pathologie multigénique et somatique. Les altérations génétiques dans les cellules cancéreuses sont acquises au cours de la vie. Ces mutations peuvent être dues à divers agents extérieurs, dits mutagènes ou cancérogènes : substances chimiques, radiations ionisantes, virus...

Il existe deux types de gènes participant à la régulation du cycle cellulaire et impliqués dans la maladie cancéreuse :

- Les proto-oncogènes : ce sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. Leur modification est dite dominante : il faut qu'une des deux copies de ces gènes soit modifiée pour qu'un cancer se manifeste. Une oncoprotéine est soit un facteur de croissance muté ou surexprimé, soit un récepteur membranaire muté et activé en permanence, soit une protéine relais mutée, soit un facteur de transcription nucléaire dérégulé. Les plus connus sont : *ras*, *myc* ou *abl*.

- Les gènes suppresseurs de tumeurs : appelés aussi anti-oncogènes, leur altération est dite récessive : les deux copies du gène doivent être modifiées pour inactiver leur fonction. Les protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeurs veillent sur le bon fonctionnement des cellules et déclenchent l'apoptose des cellules porteuses de mutations néfastes. Les plus connus sont : *Rb*, *p53* ou *APC*.

Dans les deux cas, les cellules reçoivent un signal mitotique incontrôlé et exagéré qui se traduit par une prolifération anarchique (Murray et al., 1995). Il est généralement admis que plusieurs gènes doivent être altérés pour qu'une cellule passe à l'état cancéreux. Ce sont ces combinaisons qui sont à la base de la diversité génétique des cancers.

Les cellules tumorales forment d'abord une tumeur «primaire». Après une période de croissance lente, les divisions cellulaires s'accélèrent et la tumeur croît rapidement; pendant cette phase, la tumeur grossit. Les éléments nécessaires à la synthèse de nouvelles cellules deviennent insuffisants, ralentissant la croissance tumorale et entraînant sa vascularisation. Ensuite, la tumeur se disperse en formant des métastases. Ce mode de propagation à distance est l'une des difficultés majeures posées par la maladie cancéreuse, car même après l'ablation de la tumeur initiale, un cancer peut réapparaître à partir de métastases.

B. Les traitements

“Le cancer” (ou plutôt les cancers) correspondant à une classe de maladies, il n'existe donc pas un seul traitement pour le combattre. Le choix de la thérapie se fait alors en fonction de sa nature et de son évolution.

1. La chirurgie

La chirurgie consiste en l'ablation, soit de la tumeur sous forme solide, soit de l'organe entier. En théorie, ces cancers pourraient être totalement soignés par cette méthode, mais elle n'est applicable que pour des tumeurs bien accessibles et isolées. Lorsque des métastases commencent à se développer, la chirurgie n'est plus utilisable. Cependant, la chirurgie reste un moyen pour diminuer de façon rapide la progression de tumeurs solides. La croissance des cancers hormono-dépendants (prostate et sein) peut être inhibée par l'ablation des glandes libérant les hormones induisant leur développement (testostérone et oestrogènes).

2. L'immunothérapie

L'immunothérapie active les défenses immunitaires de l'organisme contre les tumeurs. Les agents utilisés sont, soit des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines caractéristiques des cellules cancéreuses, soit des cytokines modulant la réponse du système immunitaire. Ils sont utilisés dans différents types de cancer. Le trastuzumab/Herceptin, un anticorps monoclonal du récepteur HER2/neu (erbB2) est utilisé dans le cancer du sein (Littlejohns et al., 2006) et le gemtuzumab (ozogamicin/Mylotarg), un anticorps monoclonal ciblé contre le CD33 combiné à un agent cytotoxique (la calichéamicine) est utilisé dans le traitement de la leucémie (Bross et al., 2001). Des recherches ont été menées pour développer des “vaccins anticancéreux” afin de prévenir des infections et promouvoir une réponse immunitaire. En octobre 2005, un vaccin a été proposé contre les infections au HPV (Human Papillomavirus) de type 16 et 18, pouvant ainsi prévenir les lésions précancéreuses et les cancers non invasifs du col de l'utérus induits par ce virus (Harper et al., 2004).

3. La radiothérapie

La radiothérapie consiste à attaquer les cellules cancéreuses par irradiation, soit externe (EBRT : External Beam Radiotherapy), soit interne (brachythérapie, curiethérapie). Les cellules sont endommagées ou détruites par détérioration de leur matériel génétique, rendant impossible la croissance et la division cellulaire, déclenchant ainsi leur apoptose. Les radiations touchent aussi bien les cellules cancéreuses que normales. Les cellules normales étant plus aptes à se réparer et récupérer leur fonction, une sélectivité relative existe donc envers les cellules cancéreuses. La nature et l'intensité des radiations doivent donc être choisies de façon judicieuse afin d'optimiser cette sélectivité. Des phénomènes de radorésistance existent mais peuvent être résolus par l'utilisation de composés appelés adjuvants à la radiothérapie.

4. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à traiter les cancers, métastasés ou non, par des agents chimiques : les anticancéreux. La chimiothérapie « classique » a plus de cent ans. Elle agit le plus souvent pendant la mitose et cible la duplication de l'ADN ou la séparation de chromosomes nouvellement formés. La majorité des chimiothérapies cible les cellules se divisant rapidement, donc avec une préférence relative pour les cellules cancéreuses. Cependant, leur sélectivité insuffisante, vis-à-vis des cellules cancéreuses, induit des effets indésirables parfois sévères.

Depuis une quarantaine d'années, les recherches sur de nouvelles molécules anti-cancéreuses ont montré leur efficacité mais certains cancers, comme le cancer de la prostate hormono-indépendant restent encore sans traitement. Le combat contre le cancer n'est pas terminé et de nouvelles stratégies thérapeutiques ont donc été explorées. Les progrès de la recherche en biologie moléculaire ont permis de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques entraînant le développement de nouveaux anticancéreux.

a) *Les traitements en chimiothérapie « classique »*

Les composés utilisés en chimiothérapie classique sont divisés en différentes classes qui sont les suivantes :

➤ Les antimétabolites : cette classe de médicaments interfère avec la synthèse de bases puriques et pyrimidiques. Ils nuisent donc à l'assemblage de l'ADN et de l'ARN. Les antimétabolites utilisés comme anticancéreux les plus connus sont : le 5-fluorouracile, la 6-mercaptopurine, le méthotrexate, la gemcitabine, la cytarabine et la fludarabine.

➤ Les agents altérant l'ADN : Ces composés peuvent se diviser en plusieurs grands groupes :

✓ *Les alkylants* : ils endommagent directement l'ADN par alkylation des bases de l'ADN, modifiant la conformation de la double hélice d'ADN et nuisant à la réplication cellulaire. Les alkylants les plus utilisés sont : le cisplatine, les carboplatines, le cyclophosphamide, l'ifosfamide, la dacarbazine, la méchloréthamine (moutarde à l'azote) et le témozolomide.

✓ *La bléomycine* : Elle chélate le fer et, en présence d'un réducteur tel qu'un thiol, des radicaux libres sont libérés, altérant l'ADN.

✓ *Les inhibiteurs de topoisomérases* : ils interfèrent avec les topoisomérases (TOPO), qui ont un rôle important dans la réplication de l'ADN et dans de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc...). Ces enzymes contrôlent la topologie de l'ADN en le coupant de façon transitoire, entraînant le passage de segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Des inhibiteurs de TOPO I (Topotécan et Irinotécan) et TOPO II (Etoposide et Téniposide) sont utilisés dans le traitement de certains cancers, comme les cancers du poumon, du côlon ou encore du testicule.

✓ *Les intercalants (anthracyclines et dérivés)* : ce sont des molécules planes qui s'intercalent entre les paires de bases, interférant avec la réplication de l'ADN et la synthèse de l'ADN et l'ARN. Ils empêchent ainsi la réplication des cellules cancéreuses. La plupart de ces composés libèrent des espèces réactives de l'oxygène, permettant d'accroître leur efficacité. Les anthracyclines (Daunorubicine, Doxorubicine, Epirubicine, Idarubicine) inhibent également la TOPO II.

➤ Les poisons du fuseau (ou antimitotiques) : ce sont pour la plupart des alcaloïdes, provenant de plantes ou d'autres produits naturels. Ils empêchent la formation du fuseau mitotique, vital pour la division cellulaire. Les principaux poisons du fuseau sont les taxanes (taxol ou paclitaxel, docetaxel) et les vinca alcaloïdes (vinblastine, vincristine et vinorelbine).

b) Les nouvelles stratégies en chimiothérapie

Les progrès technologiques ont permis l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques, conduisant ainsi au développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces et plus sélectives des cellules cancéreuses (Nam et al., 2003) :

➤ L'inhibition de l'angiogénèse : le processus d'angiogénèse est constitué de différentes étapes allant de la croissance lente en l'absence de vaisseaux, passant par la vascularisation de la tumeur, jusqu'à la formation de métastases. Les principales stratégies anti-angiogéniques sont : le blocage du récepteur à l'Intégrine par des antagonistes peptidiques (EMD121974, Arg-Gly-Asp-D-Phe cyclique) (Posey, 2001) ou par des anticorps monoclonaux (Vitaxin[®]) (Taga, 2002) et l'inhibition d'une famille d'enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire, les MétalloProtéinases Matricielles (MMP) par des inhibiteurs de MMP-2 et -9 (Marimastat, Tanomastat...) (Bramhall, 2002).

➤ L'inhibition des Tyrosine Kinases (TK) : les TK sont une famille de protéines incluant les récepteurs mono-transmembranaires tyrosine kinases (EGFR, VEGFR) et les tyrosine kinases cytoplasmiques sans récepteur (Src kinase, Bcr-abl kinase) (Tremonts-Lukats, 2003 ; Atalay, 2003). Après fixation du ligand, le récepteur active la TK (phosphorylation), induisant différents événements cellulaires tels que la prolifération, la division ou l'angiogénèse. Deux familles de composés ont été mises au point pour bloquer les TK : les inhibiteurs de la partie intracellulaire (Iressa[®], Tarceva[®], Glivec[®]) et les anticorps monoclonaux (Herceptin[®], Rituxan[®], Erbitux[®]).

➤ La régulation du cycle cellulaire : les CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) appartiennent à un groupe de protéine kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. S'il était possible d'interrompre sélectivement la régulation du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses en interagissant avec l'action des CDKs, les cellules mourraient. Actuellement, des inhibiteurs de CDK tels que le Seliciclib sont en essais cliniques (Fischer, 2005).

➤ L'inhibition d'enzymes impliquées dans le cancer : les histone désacétylases (HDAC) (Kelly, 2003), la télomérase (Rowley et al., 2000) ou la farnésyltransférase (FTase) sont des enzymes impliquées directement ou indirectement dans la prolifération cellulaire normale ou cancéreuse : des inhibiteurs de ces enzymes ont donc été développés.

II. La farnésyltransférase (FTase)

De très nombreuses protéines jouant un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires (croissance, différenciation, morphologie), requièrent, pour être activées, une, voire plusieurs modifications post-traductionnelles. Il existe une centaine de modifications post-traductionnelles, toutes catalysées par des enzymes. L'inhibition de l'une de ces enzymes permettrait d'inactiver leurs protéines substrats, induisant un effet anti-prolifératif.

Dans le milieu des années 1980, Gelb et Glomset ont mis en évidence le phénomène de prénylation dans les cellules de mammifère (Glomset et al., 1990). Cette modification post-traductionnelle consiste à l'ajout d'un groupement farnésyle (15 atomes de carbone) ou géranylgeranyle (20 atomes de carbone) à des protéines par l'intermédiaire de la farnésyltransférase (FTase) ou la géranylgeranyltransférase (GGTase). La prénylation permet la reconnaissance protéine-protéine et la fixation de protéines dans la membrane. Ces protéines peuvent être des protéines G

hétérotrimériques et les lamines nucléaires. La famille la plus importante et la plus étudiée pour leur rôle dans la prolifération cellulaire, est la famille des petites protéines G (Ras, Rheb, CENP-E, -F, RhoB...). Les inhibiteurs de FTase (FTis) ont été initialement conçus pour bloquer l'oncoprotéine Ras (mutée dans 30% des cancers), mais leur mode d'action est plus complexe.

A. Les enzymes de prénylation et d'autres modifications post-traductionnelles

1. Généralités

L'ajout d'une chaîne grasse apporte l'hydrophobie nécessaire à la protéine substrat pour qu'elle puisse interagir correctement dans son site fonctionnel. Il existe quatre grands types de modification post-traductionnelle de nature lipidique (figure 1) :

➤ La myristoylation est l'acylation de la glycine N-terminale par l'acide myristique (ou C-15 tétradécanoïque) formant une liaison amide. La myristoylation se produit juste après l'excision de la méthionine d'initiation et il s'agit donc d'un processus quasiment co-traductionnel et irréversible.

➤ La palmitoylation est l'acylation d'une cystéine interne de la protéine par l'acide palmitique (C-16) formant une liaison thioester. Contrairement à la myristoylation, cette réaction est largement post-traductionnelle et réversible.

➤ La prénylation est l'addition d'une chaîne isoprénoïde au niveau d'une cystéine. Il existe deux types de prénylation (Maurer-Stroh et al., 2003) :

✓ **La farnésylation** est l'ajout d'un groupement farnésyle (en C15) par l'intermédiaire d'une farnésyltransférase (FTase) et de son substrat le farnésylpyrophosphate (FPP). La FTase a été la première prényltransférase identifiée et isolée de cerveaux de rat (Reiss et al., 1990).

✓ **La géranylgéranlylation** est l'ajout d'un groupement géranylgéranyle (en C20) par l'intermédiaire d'une géranylgéranlyltransférase (GGTase) et de son substrat le géranylgéranlylpyrophosphate (GGPP). Il existe une autre enzyme de géranylgéranlylation, la GGTase-II, qui ajoute deux groupement géranylgéranyle.

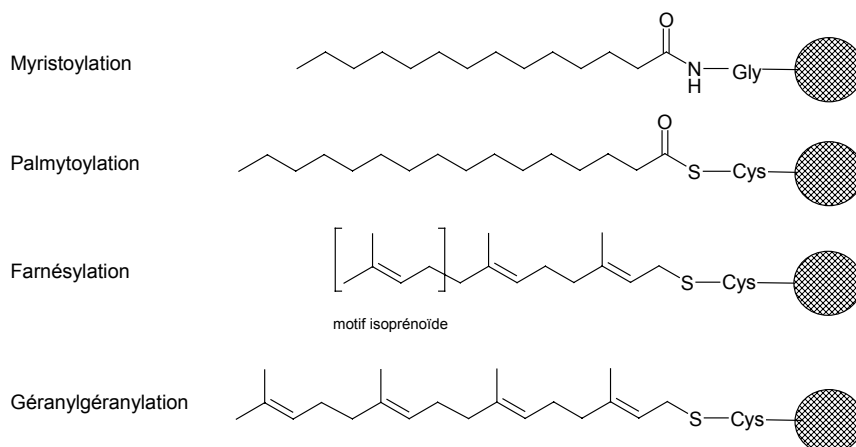


Figure 1 : Exemples de chaînes grasses

La GGTase-I et la FTase reconnaissent et modifient spécifiquement la séquence consensus C-terminale des protéines substrats, appelées « boîte CA₁A₂X » (figure 2), où :

- C est une cystéine ;
- A₁A₂ sont des acides aminés, le plus souvent aliphatiques ;
- X est un acide aminé responsable de la sélectivité FTase/GGTase-I. La méthionine permet d'avoir une sélectivité pour la FTase tandis que la leucine ou l'isoleucine sont plus favorables pour la GGTase-I. La phénylalanine est reconnue aussi bien par la FTase que par la GGTase-I. Ces premières observations ne permettent pas de prédire de façon stricte la nature de la prénylation des protéines (Mazières et al., 2003).

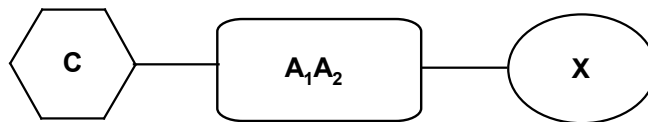


Figure 2 : « Boîte CA₁A₂X »

La GGTase-II, aussi appelée Rab géranylgeranyltransférase, reconnaît les enchaînements caractéristiques XCXC, CCXX ou XXCC (X, acide aminé quelconque). Les deux résidus cystéine sont ainsi géranylgeranylés. La Rab-GGTase a uniquement pour substrat les protéines Rab. L'inhibition de cette enzyme induit un effet pro-apoptotique. De plus, la diminution de la sur-expression de la Rab-GGTase dans de nombreuses tumeurs induit l'apoptose. Ces éléments suggèrent que cette enzyme pourrait être une nouvelle cible anticancéreuse (Lackner et al., 2005).

Les inhibiteurs de FTase ont initialement été conçus pour inactiver les protéines Ras, mais l'avancée des études sur les FTis et la FTase ainsi que les progrès en biologie moléculaire ont montré que la FTase reconnaît d'autres protéines (environ 250 protéines peuvent être farnésylées et/ou géranylgeranylées). Quelques dizaines de ces protéines sont bien connues, quelques-unes sont étudiées dans le mécanisme d'action de FTis : Rheb (croissance), CENP-E et F (mitose), RhoB (morphologie du cytosquelette et trafic des vésicules). La connaissance du mécanisme de prénylation permet de mieux déterminer les protéines prénylées ainsi que la nature de leur prénylation.

L'utilisation d'un modèle de souris knockout FTase a montré que la farnésylation ne serait pas requise pour la transformation maligne de la cellule mais jouerait un rôle prépondérant pour la progression et l'entretien de la tumeur (Mijmolle et al., 2005). L'inhibition de la farnésylation ne serait donc pas létale pour les cellules saines. Le mécanisme d'action des FTis est complexe et pourrait mettre en doute l'intérêt d'inhiber la FTase, mais la faible toxicité de ces composés et les résultats des inhibiteurs en essais cliniques ont conduit à continuer les recherches sur les FTis.

Biosynthèse des chaînes isoprénoïdes :

Les isoprénoïdes (également appelés terpénoïdes) ont diverses tailles et fonctions ; ils dérivent tous du motif à cinq atomes de carbone isopentényle et son isomère diméthylallyle. Ce motif basique à cinq atomes de carbone pyrophosphaté est à la base de dizaine de milliers de structures terpéniques, telles que les stéroïdes (Rodriguez-Concepcion et al., 2002). Les deux substrats isoprénoïdes des enzymes de prénylation (FPP et GGPP) sont synthétisés dans la voie du mévalonate à partir de l'acétyl-CoA (figure 3). L'acétyl CoA est transformé en mévalonate (MVA) pour

ensuite donner l'isopenténylpyrophosphate (IPP) *via* plusieurs enzymes clés. Le FPP a pour précurseur l'IPP. Le GGPP, qui dispose d'une unité isoprénoïde supplémentaire, dérive directement du FPP.

En plus de son rôle dans la production du FPP et du GGPP, le MVA est également un précurseur d'autres groupements isoprénoïdes qui sont incorporés dans de nombreux produits tels que le cholestérol. Ainsi, la synthèse du MVA est régulée par l'organisme afin d'empêcher la surproduction de cholestérol. La conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) en MVA par l'HMG CoA réductase est l'étape limitante de cette voie. La baisse en MVA provoquée par les statines (ex : Compactine et Lovastatine), des inhibiteurs de HMG-CoA réductase, utilisés comme hypocholestérolémiant, provoquent généralement une accumulation de protéines non prénylées (Holstein et al., 2002). De tels composés pourraient donc avoir un intérêt dans le traitement ou la prévention du cancer ; des études cliniques approfondies sont cependant encore nécessaires.

Les biphosphonates sont des médicaments qui inhibent la farnésyl diphosphate synthétase, donc la prénylation de protéines (Holstein et al., 1998). En plus des effets antiprolifératifs *via* l'inhibition de prénylation, ils exercent un rôle proapoptotique important qui serait dû à l'accumulation d'IPP, pouvant être métabolisé en Apppi (5'-[3-(3-méthylbut-3-ényl)triphosphate] de 1-adénosine). Cet analogue intracellulaire de l'ATP peut induire directement l'apoptose (Green, 2004).

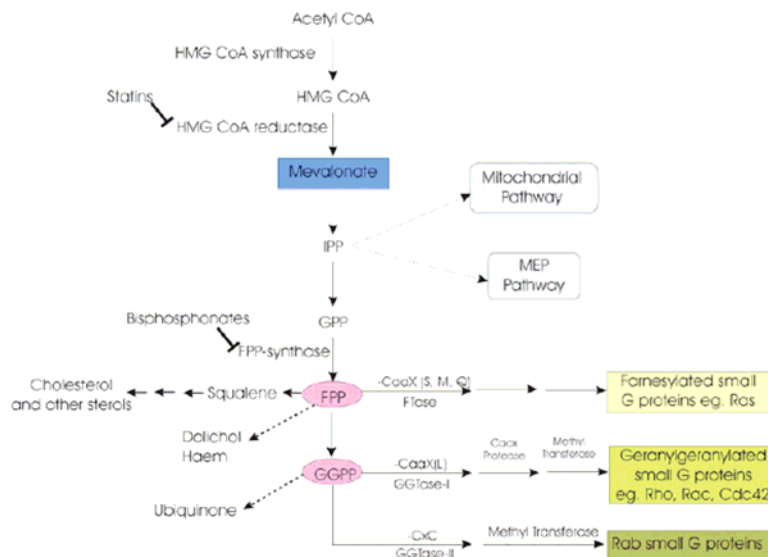


Figure 3 : Voie du mévalonate

2. La localisation intracellulaire

La simple réaction de farnésylation ne suffit pas à la localisation adéquate de la protéine substrat : d'autres réactions enzymatiques sont nécessaires. Ces dernières varient en fonction de la protéine substrat.

Après prénylation, la protéine est transportée dans le réticulum endoplasmique où le tripeptide A_1A_2X est clivé par des endoprotéases spécifiques des protéines prénylées, hRCE1p (Ras-Converting Enzyme) ou Ste24p (désignée Zmpste24 dans les cellules de mammifères) (Tam et al., 1998 ; Boyartchuk et al., 1997 ; Kim et al., 1999 ; Schmidt et al., 1998). Ces deux enzymes reconnaissent des séquences A_1A_2X différentes (Trueblood et al., 2000). Le résidu cystéinyle devenu terminal est estérifié par l'ICMT (Isoprénylcystéine Carboxyl Methyl Transférase) en

présence de son co-facteur, la SAM (S-Adénosyl Méthionine). Cette dernière étape va permettre d'augmenter le caractère lipophile de la protéine (Dai et al., 1998 ; Strickland et al., 1998). Mais dans le cas des protéines doublement géranylgeranylées, où les deux cystéines vicinales (CC et non pas CXC) sont suivies ou non de deux acides aminés, il n'y a pas de carboxyméthylation (donnant C(GG)C(GG)-COOH ou C(GG)C(GG)XY-COOH) (Smeland et al., 1994).

Certaines protéines prénylées, telles que les isoformes H- et N-Ras, peuvent encore être palmitoylées ou myristoylées sur les résidus cystéine adjacents à la « boîte CA₁A₂X ». Cette palmitoylation permet de stabiliser l'association de la protéine farnésylée avec la membrane (Sinensky, 2000) et joue un rôle essentiel dans la localisation membranaire, donc dans son fonctionnement. Les liaisons covalentes par un thioéther ou un thioester sont, respectivement, permanentes pour la farnésylation ou la géranylgeranylation, et réversibles pour la palmitoylation (Tucker et al., 2002). Les protéines K-Ras 4A et 4B n'ont pas de sites de palmitoylation ; leur ancrage est renforcé par des interactions électrostatiques entre le fragment riche en lysine situé juste en amont de la boîte C-terminale et les phospholipides de la membrane plasmique.

Il a également été démontré que les étapes suivant la farnésylation (palmitoylation, méthylation...) sont indispensables au positionnement adéquat de certaines protéines (figure 4) (Magee et al., 2005). En effet, la suppression d'une de ces modifications post-traductionnelles n'entraîne pas la localisation de la protéine dans son site actif.

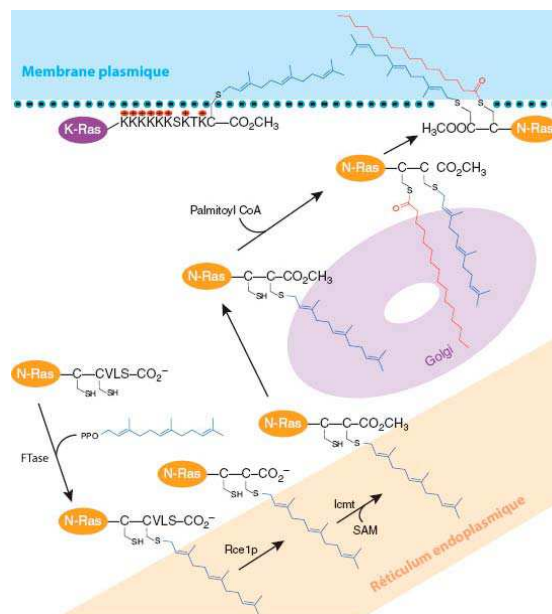


Figure 4 : Modifications post-traductionnelles suivant la prénylation des protéines (cas de la FTase).

B. Présentation de la farnésyltransférase

La farnésyltransférase est une métalloenzyme hétérodimérique (Long et al., 2001) (figure 5) nécessitant, pour être activée, un atome de zinc et de magnésium, alors que GGTase-I a seulement besoin de zinc (Long et al., 2002). Cette enzyme est constituée de deux sous-unités : α (49 kDa) et β (46 kDa) (Reis et al., 1990). La sous-unité α est identique à celle de la géranylgeranyltransférase-I. Elle catalyse la réaction de prénylation. La sous-unité β a seulement 30 % de séquence commune

avec la GGTase-I. Elle contient les sites de fixation du substrat peptidique et de la chaîne isoprénoïde, lui conférant la spécificité FTase vs. GGTase-I (Sinensky, 2000).

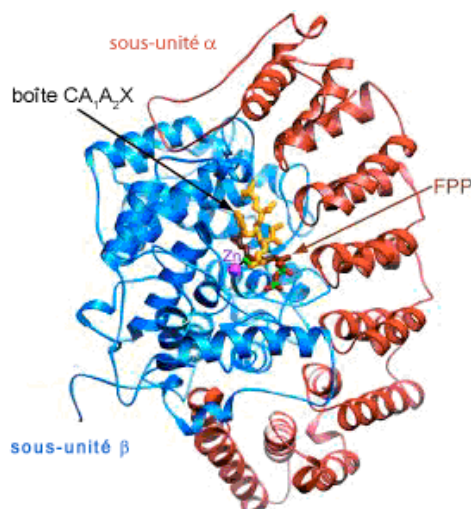


Figure 5 : Représentation de la FTase avec le FPP et l'inhibiteur L-739,750 (d'après Long et al., 2000)

La Rab-GGTase est un hétérodimère composé de deux sous-unités étroitement associées α (68 kDa, 22% d'homologie de séquence avec celles de la FTase et de la GGTase-I) et β (45 kDa, 30% d'homologie avec celles de la FTase et de la GGTase-I). Contrairement aux autres enzymes de prénylation, la Rab-GGTase ne reconnaît pas directement ses protéines substrats, mais fonctionne en concertation avec une protéine de 75 kDa appelée REP (Rab Escort Protein) (Andres et al., 1993). La sous-unité α reconnaît ce complexe et s'y fixe. La sous-unité β de la Rab-GGTase apporte l'activité catalytique en géranylgeranylant Rab.

C. Mécanisme réactionnel de la farnésylation

L'équipe de Long (2002) a découvert deux nouvelles structures cristallines du complexe enzymatique : l'une contenant un peptide mimant Ras farnésylé seul (**3**) et l'autre avec une molécule de FPP supplémentaire (**4**) (figure 6).

En ajoutant à ces deux structures les trois structures déjà connues (l'enzyme seule (**0**) (Park et al., 1997), l'enzyme contenant une molécule de FPP (**1**) (Long et al., 1998) et un analogue non réactif du FPP avec un peptide non farnésylé (**2**) (Sinensky et al., 2000 ; Long et al., 2000)), il a été possible de déterminer les différentes étapes du mécanisme de la farnésylation.

Le peptide substrat, mimant la boîte CA₁A₂X, est reconnu et vient se fixer dans l'enzyme pour former le complexe ternaire réactif (**2**) constitué d'une molécule de FPP, d'un atome de zinc et du peptide substrat. Ensuite, la cystéine du peptide substrat réagit avec le FPP ; un peptide farnésylé (**3**) est formé, libérant une molécule de pyrophosphate PPI. La production du complexe (**3**) n'est pas l'étape finale de la réaction qui est représentée par le complexe (**4**), dans laquelle une nouvelle molécule de FPP vient se fixer, déplaçant le groupement farnésyle du peptide farnésylé vers un nouveau site d'ancrage : l'« exit groove » (Long et al., 2002). Ce mouvement est accompagné du passage d'une conformation étendue du segment CA₁A₂X vers une conformation en β -turn. Enfin, le peptide farnésylé quitte l'enzyme et régénère le complexe (**1**). Dans le complexe (**4**), les deux résidus

terminaux AX de la boîte CA₁A₂X gardent les mêmes sites de fixation que dans les complexes (2) et (3).

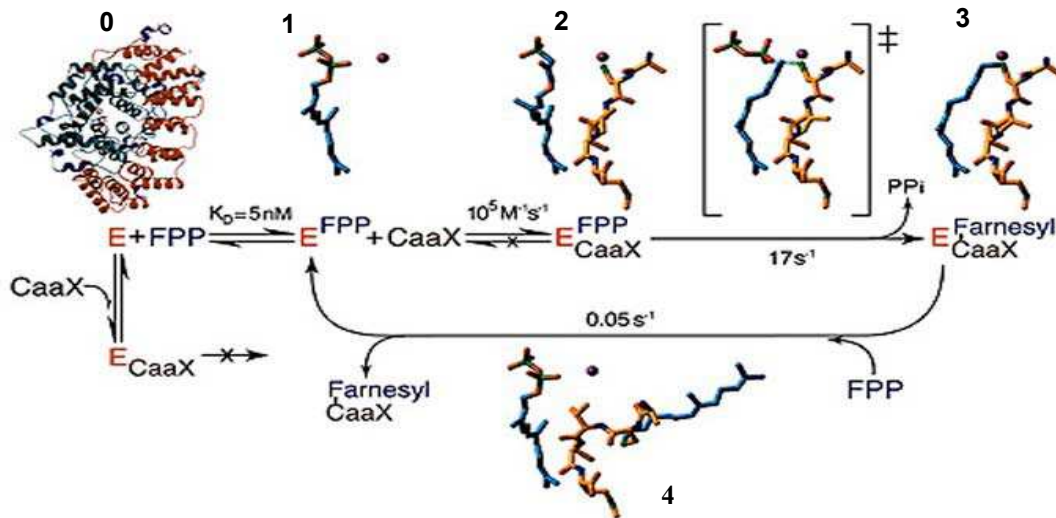


Figure 6: Farnésylation : 0 : structure de la FTase sans ligand ; 1 : l'atome de zinc (en violet) et le FPP (en bleu) liés à la FTase ; 2 : le peptide substrat mimant la « boîte CA₁A₂X » (en jaune) avec le FPP formant le complexe ternaire réactif ; 3 : le produit farnésylé lié dans le site catalytique ; 4 : le produit de la farnésylation avec une nouvelle molécule de FPP (d'après Long et al., 2002)

Au cours des différentes étapes de cette réaction, le peptide CA₁A₂X adopte donc deux conformations différentes : l'une étendue (complexes (2) et (3)) et l'autre en β -turn (complexe (4)). Les inhibiteurs de farnésyltransférase (FTis) peuvent interagir dans deux sites de fixation différents : « le site du substrat peptidique » et l'« exit groove ». Les FTis vont donc pouvoir bloquer au moins l'un de ces deux sites.

Pour la GGTase-I, le mécanisme est identique. La différence a lieu uniquement au niveau de la reconnaissance des substrats (GGPP et protéine).

La GGTase-II, qui effectue une double prénylation, ne se dissocie pas de l'intermédiaire mono-prénylé. Le relargage du produit observé dans la FTase apporterait une explication pour le mécanisme de Rab-GGTase. En effet, la structure cristalline de cette dernière (observée en l'absence de ligand) montre des similitudes avec le site actif de la FTase (Desnoyers et al., 1998). La Rab-GGTase dispose d'un seul site de fixation pour la partie terpénique (Thomä et al., 2001). Après la translocation du produit mono-prénylé depuis le site catalytique, le fragment géranylgéranyle se déplace dans un tunnel analogue à « l'exit groove » (figure 7). De manière semblable à ce qui est observé pour la FTase, cette translocation devrait être associée à la fixation d'une nouvelle molécule de GGPP. Ceci permettrait aussi à la seconde cystéine d'interagir avec l'atome de zinc pour préparer la seconde prénylation. La capacité de la Rab-GGTase à modifier des cystéines en différentes positions pourrait s'expliquer par sa possibilité à insérer différentes tailles de chaîne isoprénolide à travers ce tunnel.

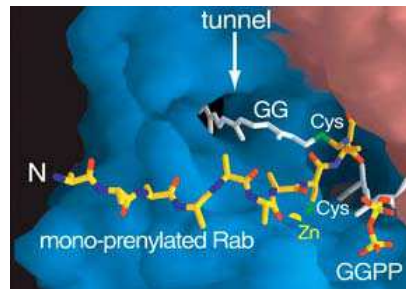


Figure 7 : Modélisation de la prénylation par la Rab-GGTase (d'après Long et al., 2002)

Rôle de l'atome de zinc :

Le site de fixation du zinc (figure 8) a été déterminé avec précision (Tobin et al., 2003) ; il se lie par chélation à une histidine, à une cystéine et à un ligand bidentate, l'acide aspartique. Le peptide se lie, dans une conformation étendue, par chélation avec l'atome de zinc dans le site actif de l'enzyme. Cette liaison entraîne une diminution du pKa du thiol de la cystéine, ce qui augmenterait la nucléophilie du complexe zinc-thiolate et faciliterait la réaction entre la cystéine et le FPP (Hightower et al., 1998 ; Rozema et al., 1999 ; Tobin et al., 2003).

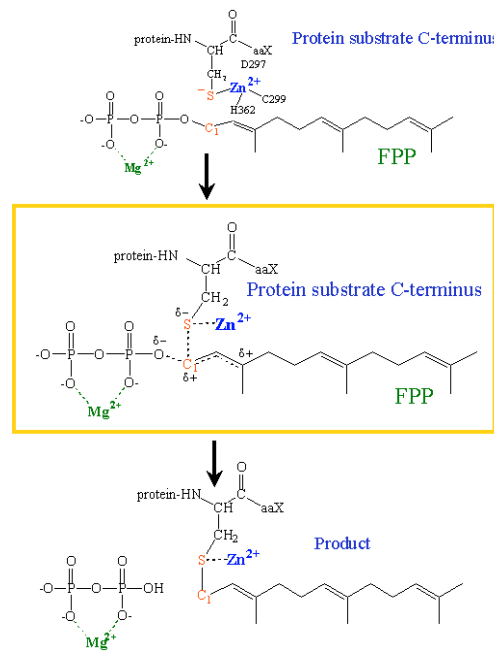


Figure 8 : Interaction du zinc et du magnésium avec les substrats lors de la réaction de farnésylation (d'après Rozema et al., 1999)

De plus, il a été montré par des études de diffraction de rayons X (Long et al., 2000) que le zinc est responsable de la conformation étendue du peptide. En effet, en absence de zinc, le peptide adopte une conformation en β -turn. Ces résultats suggèrent que cette conformation, observée par étude de RMN, représente un état où la cystéine ne chélate pas le zinc.

Les premières études de co-cristallisation de la FTase (Reid et al., 2004c) suggèrent un système pentacoordiné déformé autour de l'ion zinc incluant l'acide aspartique 297 β (ligand bidentate), la cystéine 299 β et l'histidine 362 β de l'enzyme et la cystéine de la « boîte CA₁A₂X ». Ceci fut confirmé plus tard dans une étude à haute résolution du peptide farnésylé dans l'enzyme (Terry et al., 2006) (figure 9).

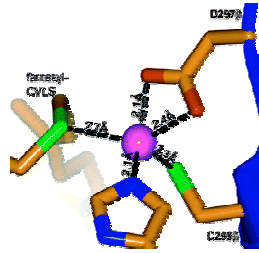


Figure 9 : Site de fixation du zinc dans l'enzyme (d'après Terry et al., 2006)

Rôle du magnésium :

Le magnésium se trouve en quantité non stœchiométrique dans l'enzyme (Park et al., 1997). Il est nécessaire pour une activité enzymatique optimale (Reiss et al., 1992). Le magnésium, en se fixant à l'acide aspartique 352 β , lie le groupement diphosphate du FPP dans l'enzyme (Long et al., 2002). Le magnésium stabiliserait la charge négative, formée dans l'état de transition, facilitant le départ du PPI.

D. Spécificité de substrat des enzymes de prénylation

La sous-unité α , commune à la GGTase-I et à la FTase, catalyse la réaction de prénylation, alors que la sous-unité β (figure 10), contient les sites de fixation du substrat peptidique et de la chaîne isoprénoïde, conférant la spécificité FTase vs. GGTase-I (Sinensky, 2000). Les « boîtes CA₁A₂X » viennent se fixer dans une conformation étendue sans entraîner de modification de conformation de l'enzyme. La Rab-GGTase ne reconnaît que la famille des protéines Rab, qui comprend plus de 60 protéines, avec un mécanisme différent des deux autres enzymes de prénylation, passant par un complexe Rab-REP-GGTase-II (Pylypenko et al., 2003).

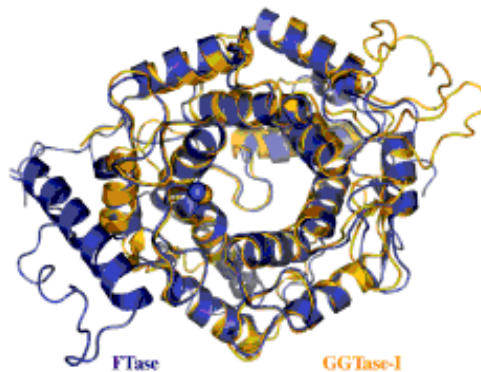


Figure 10 : Superposition de la FTase avec la GGTase-I (d'après Long et al., 2002)

Malgré le peu de différences entre la FTase et la GGTase-I au niveau de leur site actif (Park et al., 1997 ; Taylor et al., 2003), il existe une certaine spécificité de substrat entre ces deux enzymes. Les différences significatives apportant cette sélectivité se trouvent dans les interactions des deux derniers acides aminés de la « boîte CA₁A₂X » avec le site actif de l'enzyme. Les premières études de cinétique enzymatique démontrent que la sélectivité se situe au niveau du dernier acide aminé, avec la préférence de la FTase pour la méthionine, la sérine, la glutamine ou l'alanine, et la préférence de la GGTase-I pour la leucine ou la phénylalanine (Casey, 1992 ; Winter-Vann et al., 2005). Une série d'analyses par co-cristallographie (Reid

et al., 2004b) entre l'enzyme (FTase et GGTase-I), des analogues du FPP et du GGPP et un échantillon de huit peptides substrats reprenant les séquences C-terminales des protéines H-Ras, RhoB, TC21 (oncoprotéine du tétatocarcinome de la famille Ras) ou Rap2a (protéine de la famille Ras) ont permis de mieux comprendre la sélectivité FTase/GGTase-I.

Résidu		FTase	GGTase-I
C	Site de fixation Acide aminé accepté	Coordination de l'atome de zinc Cystéine	Coordination de l'atome de zinc Cystéine
A₁	Site de fixation Acides aminés acceptés	Possibilité de liaisons hydrogène par l'intermédiaire de solvant Sans restriction	Possibilité de liaisons hydrogène par l'intermédiaire de solvant Sans restriction
A₂	Site de fixation Acides aminés acceptés	Trp102 β , Trp106 β , Tyr361 β , FPP, isoprène 3 Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Thr, Met, mais préférence pour Ile et Val	Thr49 β , Phe53 β , Leu320 β , GGPP, isoprène 3-4, résidu X de la « boîte CA ₁ A ₂ X » Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Thr, Met, mais préférence pour Ile et Leu
X	Site de fixation 1 Acides aminés acceptés	Tyr 361 β , Ala98 β , Ser99 β , Trp102 β , His149 β , Ala151 β , Pro152 β Met, Gln liées par interactions polaires avec Ser, Ala, Thr, Cys- molécule d'eau	Thr49 β , His121 β , Ala123 β , Phe174 β , isoprène 4, résidu A ₂ de la « boîte CA ₁ A ₂ X » Leu, Ile, Val, Phe
	Site de fixation 2 Acides aminés acceptés	Leu96 β , Ser99 β , Trp120 β , Trp106 β , Ala151 β , isoprène 3, résidu A ₂ de la « boîte CA ₁ A ₂ X » Phe et possibilité de Leu, Asn, His	Non observé Non observé

Tableau 1 : Interactions entre la « boîte CA₁A₂X » et le site actif de la FTase et de la GGTase-I

Les interactions entre l'enzyme et les acides aminés de la « boîte CA₁A₂X » ont été examinées individuellement (tableau 1 et figure 11) :

✓ Les acides aminés qui précèdent la « boîte CA₁A₂X » n'interviennent pas sur la sélectivité. Ils se fixent à la surface de l'enzyme par des liaisons hydrogène (directes et/ou par l'intermédiaire de molécules d'eau).

✓ La **cystéine** chélate l'atome de zinc.

✓ Le résidu **A₁** peut être un acide aminé quelconque mais il ne doit pas former d'obstacle stérique ou altérer la conformation étendue de la « boîte CA₁A₂X ». Il a été observé que des groupements polaires ou chargés peuvent former, de façon directe ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, une liaison hydrogène avec le site actif.

✓ L'acide aminé **A₂** forme une liaison hydrogène directe avec une arginine présente dans la sous-unité β de la FTase (Arg202 β) et de la GGTase-I (Arg173 β). Le groupement latéral de cet acide aminé vient se fixer dans une cavité hydrophobe appelée « A₂ binding pocket » (tableau 1). Des acides aminés apportant des interactions hydrophobes et stériques, tels que Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Thr et Met, peuvent interagir avec cet espace sans modification stérique ou altération de la conformation de la « boîte CA₁A₂X ».

✓ Dans la GGTase-I, les chaînes latérales des résidus C-terminaux **X** (Leu majoritairement, Met et Phe) des peptides substrats se fixent de façon isostérique dans la même cavité hydrophobe appelée « specificity pocket ». Ces trois résidus sont stabilisés avec l'enzyme par des interactions hydrophobes et de Van der Waals. Des études cinétiques ont aussi montré que des térapeptides CA₁A₂X avec Ile ou Val en position X peuvent être des substrats de cette enzyme ; ces deux acides aminés peuvent être modélisés dans la « specificity pocket » sans modification stérique ou repositionnement de la « boîte CA₁A₂X ». La nature hydrophobe de la « specificity pocket » de la GGTase-I exclut tout résidu polaire ou chargé.

✓ Dans la FTase, les résidus C-terminaux **X** (Met, Gln et Ser) des peptides substrats se fixent tous de façon isostérique dans la « specificity pocket ». De façon différente de la GGTase-I, ils forment des liaisons par des interactions de type Van der Waals et électrostatiques avec l'enzyme. La méthionine est orientée pour que le thioéther puisse accepter une liaison hydrogène faible avec l'hydroxyle de Ser99β. Gln forme une liaison hydrogène avec l'oxygène de l'amide de Ala98β par l'intermédiaire d'une molécule d'eau adjacente, et accepte une liaison hydrogène avec Trp102β. Ser est accompagnée d'une molécule d'eau pour former une liaison hydrogène entre son hydroxyle et le carbonyle de Ala98β. La comparaison du mode d'interaction de ces trois substrats révèle que la « specificity pocket » de la FTase possède deux sous-sites : l'un donnant une liaison hydrogène et l'autre acceptant une liaison hydrogène.

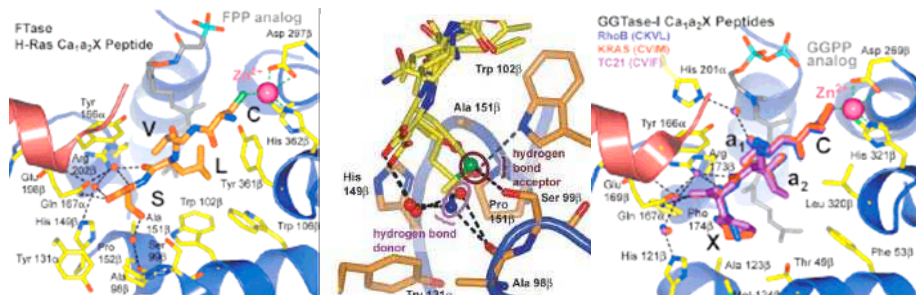


Figure 11 : Représentation de « boîtes CA₁A₂X » dans le site actif de la FTase et de la GGTase-I (d'après Reid et al., 2004b)

Un résultat inattendu a été observé avec la protéine TC21, substrat de la FTase, où l'acide aminé X est Phe (figures 11 et 12). Au vu des interactions connues avec les autres protéines, la « specificity pocket » de la FTase ne pourrait pas accueillir la phénylalanine. En effet, ce peptide se fixe différemment dans la FTase ; sa chaîne latérale benzyle se loge dans une autre cavité hydrophobe et deux molécules d'eau sont présentes dans l'autre site de fixation de la « specificity pocket ». Le groupement phényle de Phe est stabilisé par un stacking avec Trp102β. Cette dernière observation permet de justifier le manque de sélectivité FTase/GGTase-I pour Phe en position X.



Figure 12 : Séquence C-terminale de la protéine TC21 dans le site actif de la FTase

La superposition du site de fixation des trois enzymes de prénylation (figure 13) montre bien que la différence de reconnaissance du substrat isoprénoïde se fait au niveau d'un acide aminé. En effet, le remplacement de Trp102 β de la FTase par des résidus plus petits dans la GGTase-I et dans la GGTase-II (Thr49 et Ser48, respectivement) permet le positionnement du quatrième motif isoprénoïde du GGPP. De plus, des études de mutagenèse ont montré que le remplacement dans la FTase du Trp par Thr induit la reconnaissance du GGPP sans altérer la reconnaissance des substrats peptidiques (Taylor et al., 2003).

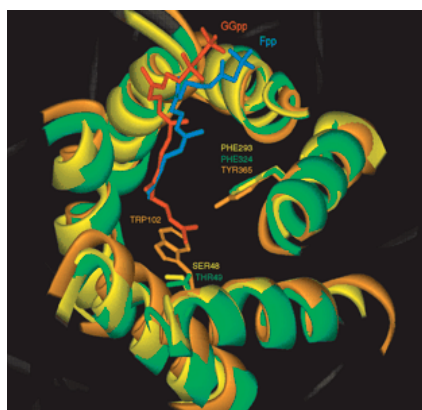


Figure 13 : Superposition des trois enzymes de prénylation (FTase en orange, GGTase-I en vert et GGTase-II en jaune) (Lane et al., 2006)

Toutes ces observations ont permis de dégager une série de règles permettant de prédire la nature de la prénylation des protéines possédant une « boîte CA₁A₂X ». Ces règles ont été utilisées dans la base de données Swiss-Prot du génome humain ; plus de 300 protéines différentes disposant d'une « boîte CA₁A₂X » et donc susceptibles d'être prénylées par la FTase ou la GGTase-I ont été identifiées (Reid et al., 2004a).

La Rab-GGTase semble avoir une spécificité de substrat pour les protéines Rab. Le mécanisme de reconnaissance reste encore à déterminer avec précision pour pouvoir concevoir de façon rationnelle des inhibiteurs de cette enzyme qui présenteraient un effet pro-apoptotique (Lackner et al., 2005).

Un modèle bioinformatique (PrePS) a été développé à partir de la séquence des protéines prénylées par la FTase, la GGTase et la Rab-GGTase (Maurer-Stroh et al., 2005). Cet outil permet de prédire la nature de la prénylation d'une protéine à partir de sa séquence. Des protéines cibles hypothétiques des FTis (NAP1-like, des protéines Rab, etc...) ont été découvertes en utilisant cet outil sur les protéines de la base de données Swiss-Prot (Maurer-Stroh et al., 2005).

III. Mécanisme d'action des inhibiteurs de farnésyltransférase

Au début des années 90, les FTis ont été conçus pour inactiver les protéines Ras. Les études *in vitro* et *in vivo* de FTis actifs et sélectifs ont mis en évidence un potentiel anticancéreux marqué avec divers effets pharmacologiques (Bell, 2004 ;

Kohl et al., 1995). Mais l'avancée des recherches sur les FTis et les progrès en biologie moléculaire ont montré la complexité des effets des FTis.

Des protéines peuvent être aussi bien farnésylées que géranylgeranylées. En présence d'un FTi (figure 14), une protéine normalement farnésylée peut devenir géranylgeranylée ou non prénylée, entraînant le maintien ou le changement de sa localisation cellulaire. La farnésylation de plus d'une vingtaine de protéines connues a été mise en évidence (Sebti, 2005) et d'autres protéines substrats ont été découvertes par des études de bioinformatique (NAP1-like, des protéines Rab, RND, etc...). Cependant, des études expérimentales sont nécessaires pour vérifier ces résultats théoriques. Un FTi peut donc induire trois effets sur une protéine habituellement farnésylée : son inactivation, l'acquisition d'une nouvelle fonction ou le maintien de sa fonction. Il ne suffit donc pas d'inhiber la farnésylation d'une protéine pour l'inactiver. Toutes ces remarques remettent en question l'importance de la farnésylation pour l'activation de certaines protéines substrats (telles que N- et K-Ras).

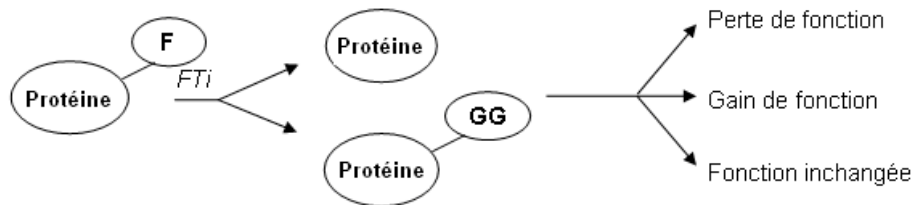


Figure 14 : Effets d'un FTi sur une protéine farnésylée

Après l'étude des différentes protéines farnésylées connues et des nombreux effets biochimiques induits par les FTis, différentes cibles ont été évaluées (Tamanoi et al., 2001 ; Sebti et al., 2003 ; Aadjei et al., 2000) telles que :

- des petites protéines G : H-Ras (prolifération cellulaire), RhoB (croissance), Rheb (synthèse protéique et croissance)
- des protéines nucléaires : CENP-E ou -F (cycle cellulaire, mitose)
- une autre enzyme de prénylation : la Rab-GGTase

Ces premières études ont permis de mettre en évidence quelques mécanismes d'action des cibles moléculaires des FTis (figure 15) (Pan et al., 2005). Les protéines farnésylées occupent un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération, de la survie cellulaire, du cycle cellulaire et du cytosquelette. L'augmentation de la forme RhoB-GG est un facteur important dans l'apoptose induite par les FTis. La GGTase-II, qui prényle les protéines Rab, peut être la cible de certains FTis, s'ajoutant à l'inhibition de la FTase. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « Reactive Oxygen Species »), endommageant l'ADN, est reliée à l'expression de RhoB. Le mécanisme de libération de ROS reste encore mal défini.

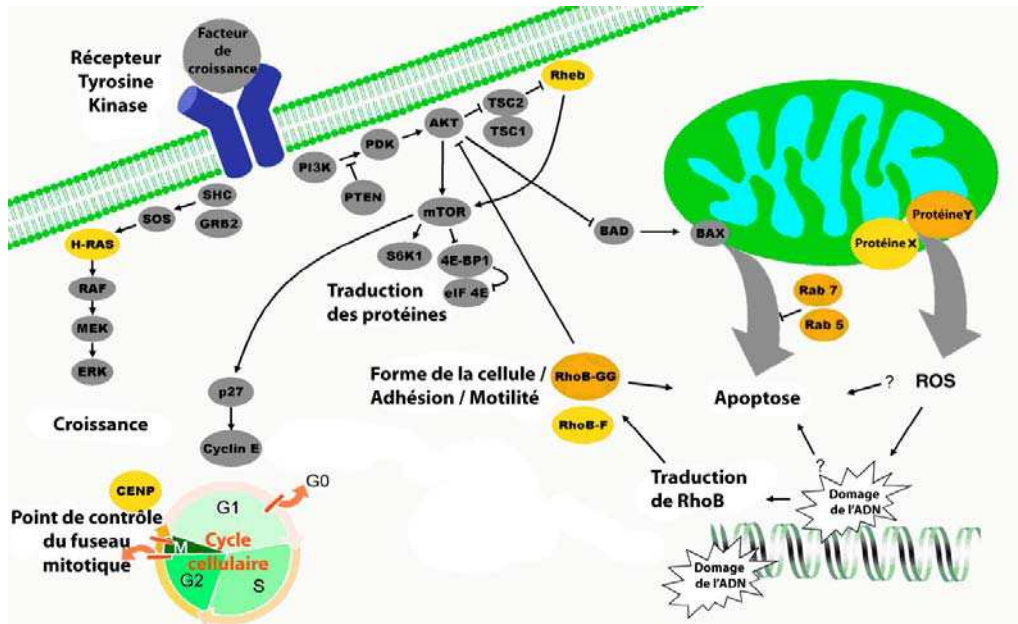


Figure 15 : Cibles des FTis avec leurs effets (d'après Pan et al., 2005)

A. Les petites protéines G impliquées dans le mécanisme d'action des FTis

Les petites protéines G (20-25 kDa) sont des GTPases monomériques. Plus d'une centaine de ces protéines sont identifiées uniquement dans les eucaryotes (Takai et al., 2001). Les petites protéines G ont un rôle essentiel dans une multitude de signaux de transduction qui contrôlent la division cellulaire, l'apoptose, l'adhésion cellule-cellule, l'adhésion cellule-matrice et la migration (Kinbara et al., 2003, Ridley et al., 2003, Mitin et al., 2005). Parmi les petites protéines G, la superfamille des protéines Ras est la plus étudiée et est classée structurellement en 5 grandes sous-familles (Takai et al., 2001, Machesky et al., 1996) :

- Ras : elles régulent principalement l'expression de gènes
- Rho/Rac : elles régulent la réorganisation du cytosquelette et l'expression de gènes
- Rab et Sar/ARF : ces deux sous-familles régulent le trafic intracellulaire des vésicules (endocytose/exocytose)
- Ran : les membres de cette sous-famille régulent le transport nucléocytoplasmique pendant les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire.

1. Activation des petites protéines G

Les petites protéines G sont des GTPases qui fonctionnent comme un « interrupteur moléculaire » en alternant entre une conformation GDP-lié (inactif) et GTP-lié (actif). Contrairement aux protéines G hétérotrimériques (activées par la fixation d'un agoniste à un récepteur couplé à une protéine G (GPCR : G Protein Coupled with Receptor)) l'échange GTP/GDP est catalysé par des GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors). Leur inactivation est la conséquence de leur activité GTPasique intrinsèque. Cette activité étant faible, elle requiert la stimulation par des GAPS (GTPase Activating Proteins). A la différence des sous-familles Ras, Arf et Ran, les protéines Rho et Rab disposent par l'intermédiaire des GDIs (Guanine

nucleotide Dissociation Inhibitors) d'un niveau supérieur de régulation (Takai et al., 1993). Les GDIs séquestrent la chaîne terpénique dans une cavité hydrophobe, empêchant l'interaction avec la membrane et maintenant la protéine dans le cytosol (Di-Poï et al., 2001). Le mécanisme contrôlant l'interaction et la dissociation du complexe GDI/protéine G n'est pas bien élucidé (Olofsson, 1999 ; DerMardirossian et al., 2005). Les GDIs sont régulés par d'autres protéines appelées les GDFs (GDI Displacement Factors) qui permettent la dissociation du complexe.

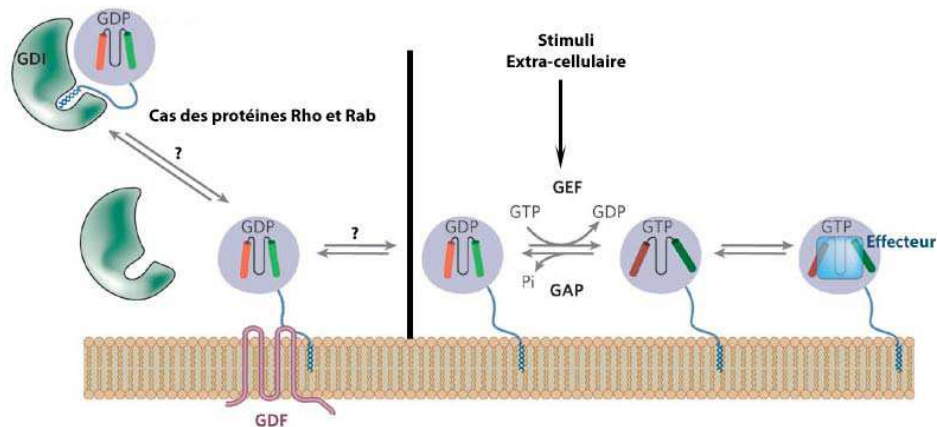


Figure 16 : Cycle de l'activation et de la désactivation des protéines Ras (d'après DerMardirossian et al., 2005)

Ce processus d'échange GTP/GDP est critique pour le développement et la physiologie normale de la cellule. En effet, des mutations sur des régulateurs de GTPases tels que les GEFs et GAPS sont responsables : de la croissance de tumeurs, du développement de métastases (Malliri et al., 2003), de retard mental (Newey et al., 2005), d'immuno-développement et de développement vasculaire (Cernuda-Morollon et al., 2006). Par exemple, dans un cancer impliquant la mutation d'un gène tel que *ras*, les acides aminés impliqués dans la reconnaissance par GAP sont modifiés, perturbant ainsi l'activité GTPasique. Ras reste alors sous forme active (GTP) stimulant continuellement la prolifération cellulaire (Sprang, 1997).

2. La protéine Ras

La protéine Ras est une petite protéine G de bas poids moléculaire (21 kDa) qui est synthétisée dans le cytoplasme à partir de précurseurs biologiquement inactifs ; ces précurseurs subissent de multiples modifications post-traductionnelles avant d'arriver à maturité.

Il existe trois gènes *ras* encodant quatre protéines :

- H-Ras (Harvey Ras),
- N-Ras (Neuroblastoma Ras),
- K-Ras (Kirsten Ras) existant sous deux formes K-Ras 4A et K-Ras 4B.

La différence entre les formes de Ras réside dans leur régulation de fonctions cellulaires telles que la croissance, la différenciation et le signal de transduction.

Type de cancer	Forme exprimée majoritairement	Taux de cas présentant un gène ras muté (%)
Pancréas	K	80-90

Côlon	K	30-60
Intestin grêle	H	31
Poumon	K	27-60
Prostate	H et K	0-25
Foie	K et N	12-26
Peau	H, K et N	0-46
Dont mélanomes	N	20
Thyroïde	H, K et N	0-60
Leucémies	K et N	6-40

Tableau 2 : Expression des oncogènes ras dans les cancers humains (Leonard, 1997)

La mutation de *ras* est présente dans à peu près 30 % des cancers et ce taux peut atteindre 90% dans le cas du cancer du pancréas (tableau 2). Ces chiffres faisaient de Ras une cible intéressante pour traiter de façon sélective les cellules cancéreuses. Cependant, parmi les trois isoformes de la protéine Ras (H-Ras, N-Ras et K-Ras), les FTis inhibent seulement l'activité de H-Ras. En effet, en présence de FTis, K-Ras et N-Ras sont géranylgeranylées et se fixent à la membrane cellulaire, fonctionnant donc normalement. Dans les cancers humains, K-Ras est le gène le plus muté alors que H-Ras ne l'est que rarement ; les protéines Ras ne sont donc pas une cible majeure des FTis (Whyte et al., 1997).

L'impact de l'inhibition de prénylation de K-Ras sur des modèles de souris greffées et transgéniques a été évalué en utilisant un inhibiteur mixte de FTase/GGTase-I. La prénylation a bien été inhibée *in vitro* et *in vivo*, mais les doses utilisées deviennent létales pour la souris ; cette approche est donc difficilement envisageable cliniquement (Lobell et al., 2001).

Contrairement aux isoformes N-Ras et K-Ras qui activent Raf de la voie MAP-Kinase, la protéine H-Ras active la protéine PI3-K de la voie PI3-K/Akt (Li et al., 2004a). Cependant, l'isoforme H-Ras n'est que très faiblement mutée dans les cancers, donc H-Ras muté ne peut être une cible majeure des FTis. En revanche, la forme non mutée, sauvage, est une cible plus importante : son implication sera dépendante de la suractivation d'autres protéines (récepteurs Tyrosine Kinase).

a) Ras dans la voie de transduction MAP-Kinase

Ras relie des récepteurs à facteurs de croissance aux voies des MAP Kinases (Mitogen Activated Protein Kinases), et en particulier à la voie dite des ERKs (Extracellular-signal Regulated Kinases), permettant de conduire le message mitotique jusqu'aux facteurs de transcription nucléaires (figure 17) (Porter et al., 1998). La reconnaissance d'un facteur de croissance par une partie extracellulaire du récepteur Tyrosine Kinase (RTK) induit la dimérisation de celui-ci, suivi d'une phosphorylation croisée. Les résidus phosphorylés sont reconnus par une protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor Receptor Binding Protein-2). Grb2 s'associe par ses deux domaines SH3 (Src Homology 3) à mSOS (mammalian-Son Of Sevenless). Lorsque la reconnaissance a lieu, l'hétérodimère Grb2-SOS se positionne près de la membrane cellulaire où est ancrée la protéine Ras. Leur proximité induit l'activation de Ras, qui active Raf, la première kinase de la voie des ERKs, et transmet le signal vers d'autres kinases l'acheminant vers le noyau (Strickland et al., 1999).

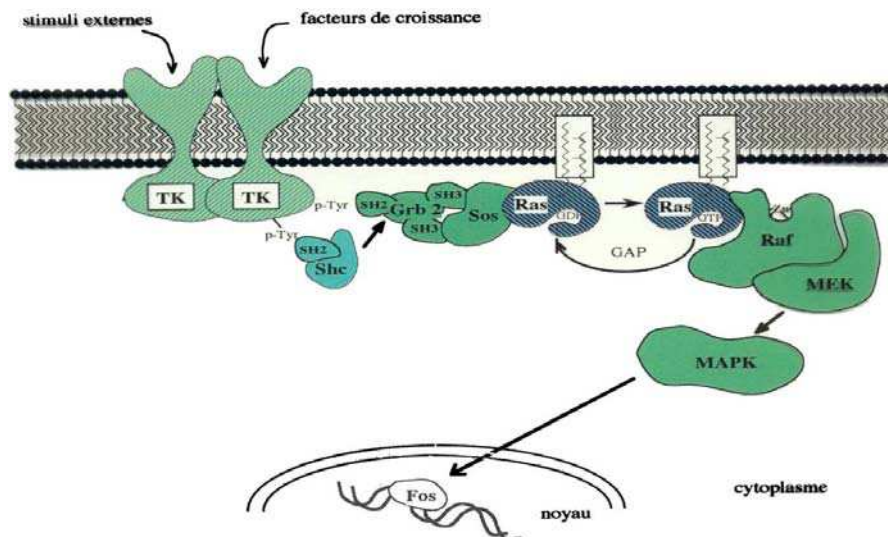


Figure 17 : La protéine Ras dans la voie MAP-Kinase (d'après Porter et al., 1998)

Il existe dans l'organisme de nombreux récepteurs à activité Tyrosine Kinase (TK), tels que le récepteur à l'insuline. Le mésylate d'Imatinib ou Imatinib (initialement appelé CGP57148B ou STI571) est un médicament utilisé pour traiter certains types de cancers et est commercialisé par Novartis sous le nom de Glivec[®]. C'est un dérivé de la 2-phénylaminopyrimidine, inhibiteur spécifique des domaines TK : *abl* (le proto-oncogène Abelson), *c-kit* et PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor). Dans la leucémie myéloïde chronique, le chromosome Philadelphia entraîne la fusion de la protéine *abl* avec *bcr* (breakpoint cluster region), induisant l'activation continue de ces protéines Tyrosine Kinases : l'Imatinib permet de diminuer l'activité de *bcr-abl*.

b) Ras dans la voie de transduction PI3-Kinase / Akt

Akt1, également appelée Akt ou Protéine Kinase B (PKB) est une protéine importante dans la signalisation cellulaire par son implication dans la voie PI3K/Akt. Ces protéines sont des kinases, spécifiques de la sérine et de la thréonine. L'activation de la voie de transduction PI3-K/Akt entraîne l'inactivation de protéines engagées dans l'apoptose et l'activation des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, d'où son nom de voie de survie tumorale.

Akt possède un domaine protéique appelé PH domain, ou Pleckstrin Homology domain, qui fixe avec une affinité élevée le phosphoinositide sous forme de phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃ ou PIP3) ou de phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphate (PtdIns(3,4)P₂ ou PIP2). Suite à un messageur chimique extérieur, PIP2 est phosphorylé par la PI3-Kinase (phosphoinositide 3-Kinase ou PI3K) en PIP3. La PI3K peut être activée, soit par un récepteur couplé à une protéine G comme la protéine Ras, soit par un récepteur Tyrosine Kinase tel que le récepteur à l'insuline (IRS : Insulin Receptor Substrate). Parmi les quatre isoformes de Ras, H-Ras a une plus grande affinité pour la voie PI3-K/Akt que les isoformes N-Ras et K-Ras, qui sont plus affines pour la voie MAP-Kinase.

Une fois activée, PI3K phosphoryle PIP2 en PIP3, Akt, et sa kinase activatrice, la Phosphoinositide Dependent Kinase 1 (PDK-1), se positionne dans la membrane et entre en contact. Une fois fixée dans la membrane plasmique, PDK-1 et/ou PDK-2 activent Akt, par phosphorylation de Ser473 et/ou de Thr308, par le biais de PIP3. Akt agit ensuite au niveau de protéines pro-apoptotiques telles que la caspase-9 et

les protéines de la famille Forkhead responsables de l'expression du ligand Fas. Leur phosphorylation par Akt inhibe leur pouvoir pro-apoptotique. Akt agit également au niveau de protéines favorisant la prolifération cellulaire telles que NF- κ B (libéré du complexe I κ B/NF- κ B) et mTOR (activée par Rheb).

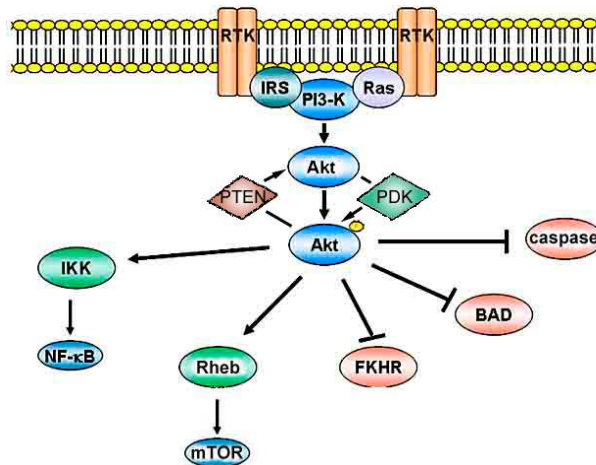


Figure 18 : Implication de Ras dans la voie PI3K/Akt

L'activation d'Akt, dépendante de PI3K, peut être régulée à travers le gène suppresseur de tumeur PTEN qui fonctionne essentiellement par opposition à PI3K. PTEN est une phosphatase, déphosphorylant PIP3 en PIP2, supprimant sa localisation membranaire. Sans sa localisation, l'activation d'Akt diminue fortement, ainsi que tous ses effecteurs de la voie PI3K/Akt. La perte de PTEN, entraînant l'amplification de PI3K et la surexpression, est décrite dans de nombreux cancers (Vivanco et al., 2002). De plus, l'activation prépondérante de la voie PI3K/Akt a été décrite comme un mécanisme de résistance aux agents cytotoxiques (Jin et al., 2003), à la radiothérapie (Liang et al., 2003) et aux inhibiteurs de l'EGFR (Chakravarti et al., 2002). La PI3K/Akt est donc une cible intéressante pour concevoir des anticancéreux qui inhiberaient la prolifération, réactiveraient l'apoptose et supprimeraient les résistances aux thérapies cytotoxiques.

Des efforts considérables ont été entrepris pour découvrir des molécules qui inhiberaient PI3K, PDK1 et Akt. A l'heure actuelle, aucun inhibiteur de kinase spécifique ne se trouve en essai clinique ; il existe cependant plusieurs outils pharmacologiques capables de bloquer différentes protéines de la voie PI3K/Akt :

- des inhibiteurs de la PI3-Kinase, comme la Wortmannine, un inhibiteur irréversible de toutes les isoformes de la PI3K (Powis et al., 1994),
- des inhibiteurs PDK-1, comme l'UCN-01 (7-hydroxy staurosporine) (Sato et al., 2002) qui inhibe également d'autres sérine/thréonine kinases,
- des inhibiteurs mTOR, avec comme chef de file la Rapamycine (Douros et al., 1981) et son dérivé le CCI-779 (Georger et al., 2001).

3. Les protéines Rho et la protéine RhoB

Le rôle dans la tumorigénèse des protéines Rho a été largement étudié lors de ces dernières années. La famille des protéines Rho est constituée de trois sous-familles : Rho (RhoA, RhoB et RhoC), Rac (Rac1, Rac2 et Rac3) et Cdc42 (Cdc42Hs et G25K). Elles régulent de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération,

l'apoptose, la formation d'actine, l'adhésion cellulaire, le trafic endocytaire des vésicules, la progression du cycle cellulaire et la motilité (Raftopoulou et al., 2004, Etienne-Manneville et al., 2002).

La modification post-traductionnelle des protéines Rho est essentielle. Elle va définir leur localisation vers un compartiment membranaire spécifique (Wennerberg et al., 2004). Ces protéines sont modifiées par prénylation ou dans certains cas par palmitoylation (tableau 3).

Protéine Rho	Localisation	Modification post-traductionnelle
RhoA	MP et cytosol	GG
RhoB	MP et endosome	GG, F et P
RhoC	MP et cytosol	GG
RhoD	MP et endosome	GG
Rnd1	MP	F
Rnd2	Endosome et cytosol	F
Rac1	MP	GG
Rac2	MP et cytosol	GG
Rac3	MP et endomembranes	GG
Cdc42	MP et Golgi	GG

Tableau 3 : Localisation et modification de protéines Rho (MP : membrane plasmique, F : farnésylation, GG : géranylgeranylation, P : palmitoylation) (Ridley, 2006)

Parmi toutes les isoformes de cette famille, RhoB est étudiée comme cible des FTis, car elle peut être aussi bien farnésylée que géranylgeranylée avec deux localisations et deux fonctions distinctes. Elle est principalement localisée dans l'endosome ; elle régule le trafic des récepteurs membranaires (tel que le récepteur à l'EGF) et la survie cellulaire. La localisation intracellulaire de RhoB dépend de sa prénylation, induisant des effecteurs différents et donc des fonctions distinctes. La forme géranylgeranylée est distribuée dans les vésicules de l'endosome tardif, qui se dirigent vers la voie de dégradation, tandis que la forme farnésylée se localise dans la membrane cellulaire (Wherlock et al., 2004). La régulation du recyclage des récepteurs par RhoB ne dépendrait pas seulement du niveau d'activation de RhoB mais également de l'abondance des deux formes de prénylation.

RhoB contrôle négativement l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Fritz et al., 2001). L'utilisation de formes mutées de RhoB a montré que RhoB-GG inhibe (tandis que RhoB-F favorise) la croissance de fibroblastes NIH-3T3 *ras* mutées, en impliquant les voies Ras/Raf/ERK et PI3K/Akt/NF- κ B (Mazières et al., 2005). Il a également été démontré que RhoB-GG active la kinase PRK, formant un complexe ternaire (RhoB-GG/PRK/PDK1) qui inhiberait Akt (Gampel et al., 1999 ; Flynn et al., 2000). RhoB-GG bloquerait donc la voie de survie Akt par séquestration de PRK.

Les FTis augmentent la concentration de RhoB-GG, qui inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose (Chen et al., 2000). A l'heure actuelle, le mécanisme intracellulaire précis responsable de ces effets reste encore assez confus.

4. La protéine Rheb (Ras homolog enriched in brain)

Certaines études (Jiang et al., 2000) montrent que les FTis interagissent également sur la voie PI3-K/Akt, appelée voie de survie tumorale. Ces effets seraient dus à une inactivation de la protéine Rheb (Aspuria et al., 2004) et/ou de la protéine H-Ras (Sebti, 2003). Ces protéines, ne pouvant pas être géranylgeranylées, sont des cibles intéressantes des FTis.

La protéine Rheb est une petite protéine G, membre de la superfamille des protéines Ras. Rheb joue un rôle essentiel dans la régulation de la croissance et du

cycle cellulaire, due à sa participation dans la voie insuline/mTOR/S6K. Rheb agit comme un effecteur d'Akt et active la phosphorylation, grâce à mTOR impliquée dans la synthèse protéique. Elle a été initialement découverte dans le cerveau de rat (Yamagata et al., 1994). Chez l'Homme, Rheb existe sous deux isoformes RhebL1 et RhebL2 et est ubiquitaire (Patel et al., 2003).

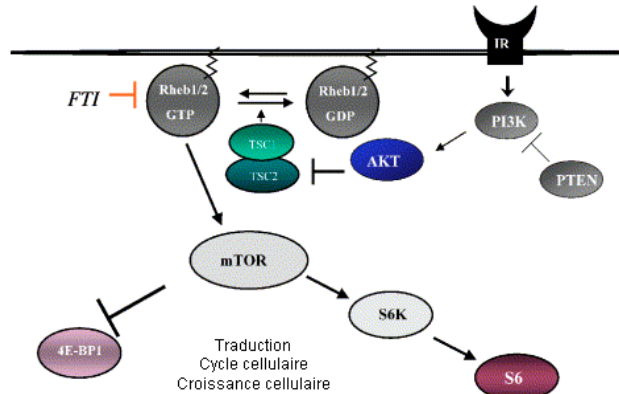


Figure 19 : La protéine Rheb dans la voie PI3K/Akt (d'après Patel et al., 2003)

1. Mode d'activation de Rheb

La protéine Rheb existe sous forme d'équilibre entre deux états, GDP inactive et GTP active (figure 19). Cet équilibre met en jeu deux enzymes Rheb GEF activatrice, et le complexe Tsc1/Tsc2 inactivateur. TSC1 et TSC2 sont deux gènes, appelés respectivement tubérine et hamartine, qui forment ensemble un complexe à activité GTPasique. Leur mutation est à l'origine de la sclérose tubéreuse de Bourneville, une maladie autosomique dominante faisant partie des phacomatoses (anomalies au niveau du développement du tissu ectodermique) caractérisée par l'apparition de tumeurs bénignes appelées hamartomes (Van Slegtenhorst et al., 1997). Cette pathologie se manifeste par des symptômes cutanés, cardiaques, cérébraux et rénaux. Il n'existe pas de traitement curatif, mais des traitements des manifestations neurologiques sont utilisés (antiépileptiques).

2. Rôle dans la voie PI3K/Akt

Rheb agit en aval d'Akt et active la phosphorylation de S6K qui dépend de mTOR (figure 19). Lors de l'activation du récepteur membranaire par l'insuline ou IGF1, PI3K est activée et phosphoryle Akt. Akt activée phosphoryle Tsc2 et inhibe la capacité de Tsc1/Tsc2 à réguler négativement mTOR. L'inhibition de Tsc1/Tsc2 entraîne l'activation de mTOR qui active à son tour 4E-BP1 ainsi que p70S6K, qui phosphoryle S6. Ces deux phénomènes contribuent à l'augmentation de la synthèse protéique et à la progression du cycle cellulaire (Fingar et al., 2004). Dans les cellules cancéreuses, Rheb est principalement suractivée de deux façons, soit par une délétion du gène TSC2, soit par une inactivation de la protéine Tsc2 par Akt.

Il a été démontré que Rheb a besoin d'être farnésylée pour activer mTOR et ses effecteurs. Mais, l'importance de la farnésylation de Rheb dans l'activation de ses effecteurs reste encore assez controversée (Karbowiczek et al., 2004 ; Li et al., 2004b).

B. Les centromères protéines CENP-E et CENP-F

Après la duplication du matériel génétique, ce dernier est réparti entre deux cellules par jonction au niveau du centromère avec le fuseau mitotique. Cette interaction et ce mouvement nécessitent un complexe macromoléculaire constitué d'une centaine de protéines, le kinétochore. Les protéines du kinétochore peuvent être classées en deux groupes : les protéines constitutives telles que CENP-A, -B et -C qui ont un rôle de structuration du kinétochore et les protéines fonctionnelles comme CENP-E, -F, Bub (Budding uninhibited by benomyl), Mad (Mitotic arrest deficiency) qui régulent le fonctionnement du kinétochore en s'associant avec le centromère de façon transitoire.

CENP-E (312 kDa) et CENP-F (367 kDa) (également appelée mitosine) sont deux protéines étroitement liées, exprimées lors de la phase G2/M. Elles ont un rôle important dans la formation et le fonctionnement du kinétochore (Putkey et al., 2002). En effet, la suppression de CENP-E et -F entraîne une désorganisation des chromosomes (Falugi et al., 2003). Lors du cycle cellulaire, le kinétochore évolue selon des processus complexes encore mal élucidés.

Pour assurer la bonne séparation des chromatides, les cellules possèdent un mécanisme de contrôle mitotique qui empêche la séparation des chromatides (anaphase) avant la fixation des chromosomes au fuseau mitotique. Ce mécanisme est régulé par des protéines telles que BubR1, Bub1, Mad1, Mad3, qui activent un signal d' « attente de l'anaphase » (figure 20). Ce signal est perturbé par la fixation de CENP-E entre le kinétochore et le fuseau mitotique qui altère l'activité et/ou de l'affinité BubR1 pour le kinétochore.

Après la destruction de l'enveloppe nucléaire, CENP-F vient se lier dans la partie extérieure du kinétochore, entraînant le recrutement de BubR1 dans la partie intérieure et extérieure du kinétochore (Rattner et al., 1997). CENP-F ne semble pas être essentiel à la régulation de la mitose mais permet de supporter un retard prolongé de la mitose, causé, soit par le nocodazole (un inhibiteur de polymérisation de la tubuline), soit par une défaillance de protéines du kinétochore telles que CENP-E (Feng et al., 2006). L'absence de CENP-F ne permet pas de générer un signal suffisant d'« attente de l'anaphase » et donc de maintenir un arrêt mitotique prolongé. CENP-E utilise de l'ATP pour se déplacer le long du microtubule vers l'extrémité positive (Wood et al., 1997) et vient se lier à CENP-F. Une fois CENP-E fixée au fuseau mitotique, BubR1 et les autres protéines régulatrices sont désactivées, permettant la séparation des deux chromatines (figure 20).

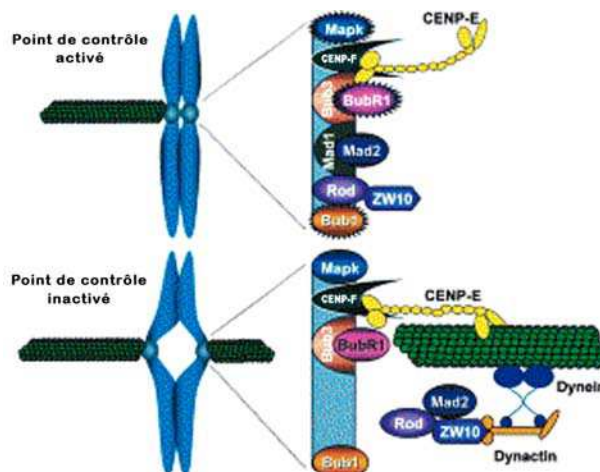


Figure 20 : Activation et inactivation de points de contrôles mitotiques (adapté de Wood et al., 1997)

Les FTis induisent l'accumulation en phase G2/M de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, provoquée par un retard de l'alignement des chromosomes (Ashar et al., 2001). Cet effet des FTis serait dû à l'inactivation de CENP-E et -F qui sont farnésylées (Schaar et al., 1997). Il a été démontré qu'un FTi (Lonafarnib) affecte seulement l'association de CENP-E avec les microtubules, mais n'affecte pas la localisation de CENP-E ou CENP-F dans le kinétochore (Schafer-Hales et al., 2007). La farnésylation de CENP-F est nécessaire à la progression en phase G2/M, à la capture du microtubule et à la dégradation de CENP-F après la mitose (Hussein et al., 2002). L'importance de la farnésylation de CENP-E et -F dans leur fonctionnement et dans leur localisation intracellulaire est encore mal appréciée. De nombreuses études démontrent cependant que l'utilisation d'un FTi en combinaison avec un inhibiteur de polymérisation du fuseau mitotique (taxane) apporte une potentialisation des effets qui pourrait s'expliquer par l'implication des CENP (Ready et al., 2007).

C. La Rab-géranyl-géranyltransférase (Rab-GGTase)

Les protéines de la famille Rab (>60 protéines) régulent le trafic membranaire intracellulaire. Leur double géranyl-géranylation par la Rab-GGTase (ou GGTase-II) est essentielle à leur localisation correcte et à leur bon fonctionnement (Deneka et al., 2003). La relation entre le niveau de Rab25 et l'agressivité de cancers épithéliaux (Cheng et al., 2004) ainsi que le taux élevé de l'expression des gènes codant pour les sous-unités de la Rab-GGTase dans certaines tumeurs, montrent que cette enzyme joue un rôle fonctionnel important dans l'initiation ou la progression du cancer (Lackner et al., 2005).

Certains FTis de chez Bristol-Myers Squibb disposent d'une activité pro-apoptotique qui n'est pas corrélée avec leur pouvoir inhibiteur de la FTase ou de la GGTase-I (Rose et al., 2001, Buckner et al., 2000). L'effet pro-apoptotique de ces composés est corrélé avec une inhibition *in vivo* de la Rab-GGTase (Lackner et al., 2005). Des études *in vitro* de ces composés ont également montré une très forte activité inhibitrice de la Rab-GGTase. Des méthodes pharmacologiques, biochimiques et génétiques montrent l'implication d'une seule enzyme dans cet effet pro-apoptotique. Ces approches ont mis en évidence que le blocage de la modification post-traductionnelle des protéines Rab est une source de l'activité pro-apoptotique de ces FTis. Le mécanisme d'action de cet effet reste cependant encore inconnu.

Le mécanisme réactionnel de la Rab-GGTase est difficile à étudier car il nécessite la formation au préalable d'un complexe ternaire Rab/REP/Rab-GGTase. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de Rab-GGTase faciliterait la caractérisation du mode d'action de cette enzyme. L'étude de cette enzyme et plus particulièrement de son inhibition permettrait de concevoir des inhibiteurs mixtes FTase/Rab-GGTase et donc de potentialiser le pouvoir anticancéreux de ces composés.

D. Perspectives sur le mécanisme d'action des FTis

Les FTis ont été initialement conçus pour bloquer les oncoprotéines Ras, mais les isoformes les plus souvent mutées (N-Ras et K-ras) deviennent géranyl-géranyllées en présence de FTis en maintenant leur fonction (Whyte et al., 1997). Afin d'inactiver ces protéines, des inhibiteurs de GGTase-I (GGTis) ont été développés et ont permis la découverte de protéines géranylgéranyllées telles que les protéines RhoA, RhoC, Cdc42 qui ont un rôle important dans la prolifération cellulaire. Les GGTis peuvent induire la régression de tumeurs sur un modèle de souris xénotransgénique, un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'apoptose (Sun et al., 1999 ; Sun et al., 2003). Le mécanisme d'action des GGTis reste cependant mal connu.

Des inhibiteurs mixtes FTase/GGTase-I ont été conçus. Leur étude pré-clinique sur des souris atteintes du cancer du pancréas a montré que ces composés inhibaient complètement la prénylation de K-Ras (Lobell et al., 2001). Cependant, les concentrations utilisées se sont révélées létales mais une inhibition partielle de la GGTase-I est tolérée. L'inhibiteur mixte L-778,123 est bon inhibiteur de GGTase-I ($IC_{50} = 100$ nM et IC_{50} (FTase) = 2 nM) (Huber et al., 2001). Des essais cliniques indiquent que la GGTase-I est inhibée (Lobell et al., 2002), mais aucune réponse tumorale significative n'a été décelée (Britten et al., 2001). Astra Zeneca a développé un inhibiteur mixte, le AZD3409 (Stephens al., 2003, Kelly et al., 2005), bien toléré *in vivo*, avec une inhibition de la FTase de 80–90% et de la croissance tumorale supérieure à 60%. Des études cliniques de phase I révèlent une bonne tolérance avec de faibles effets indésirables (McCormack et al., 2004). Ce composé montre une activité dans le cancer du sein, mais avec d'autres effets que ceux induits par d'autres FTis, donc un mécanisme d'action différent (Maiello et al., 2007). Toutes ces observations interrogent sur la nécessité d'inhiber de façon sélective la FTase vis-à-vis de la GGTase-I et ne nous permettent pas de choisir quelle stratégie adopter.

Les FTis inhibent la farnésylation de nombreuses protéines, induisant différents effets anti-tumoraux qui ne peuvent pas être attribués à l'inactivation d'une seule protéine. Il est évident que l'activité des FTis n'est pas dépendante d'une seule protéine, mais plutôt d'un mécanisme multi-étapes, avec une inhibition concertée de la farnésylation de plusieurs protéines intervenant dans le processus de cancérogenèse. Actuellement, plusieurs protéines cibles sont étudiées : H-Ras, RhoB, Rheb et CENP-E / CENP-F. Mais d'autre(s) cible(s) potentielle(s) existe(nt) comme une protéine associée à la voie PI3K/Akt, ou les protéines tyrosine phosphatases (telles que PRL3) dont la fonction reste mal connue, ou encore une autre protéine encore inconnue (Kho et al., 2004). Malgré les incertitudes persistantes sur leur mécanisme d'action biologique, les FTis sont des molécules à haut potentiel thérapeutique.

IV. Perspectives thérapeutiques des FTis

Malgré un mécanisme d'action indéterminé, de nombreux essais thérapeutiques ont été menés dans divers cancers. Les FTis sont également étudiés dans d'autres pathologies telles que les laminopathies et les maladies parasitaires.

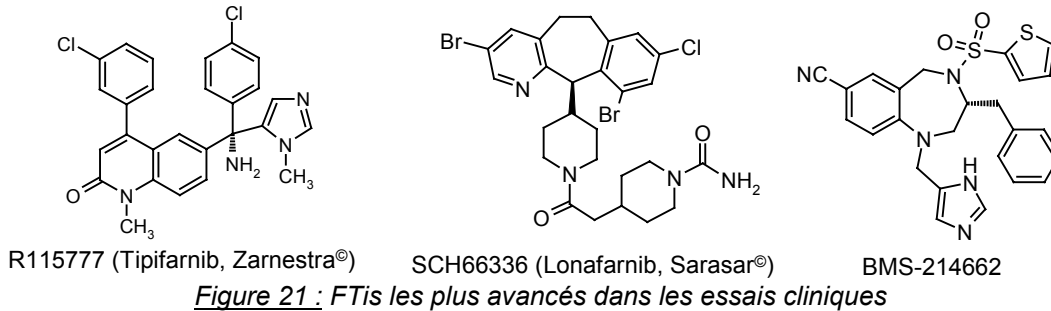
A. Utilisation dans le traitement du cancer

Actuellement, plusieurs inhibiteurs sont en essais cliniques (figure 21):

- Le R115777 (Tipifarnib ou Zarnestra[®])

- Le SCH-66336 (Lonafarnib ou Sarasar[®])
- Le BMS-214662.

Lors des premiers essais cliniques, le cancer étudié était déterminé par le taux de mutation de *ras*, mais la découverte du mécanisme d'action des FTis a conduit à élargir à d'autres cancers, en monothérapie ou en combinaison avec d'autres anticancéreux.



1) Le R115777 (Tipifarnib, Zarnestra[®])

Le Tipifarnib peut être pris oralement jusque 1300 mg, deux fois par jour, les principaux effets indésirables étant la myélosuppression et l'asthénie (Zujewski et al., 2000).

Les premières études ont montré une activité dans les cancers du poumon non à petites cellules, du côlon et du pancréas. Mais, les études de phase III pour les cancers du côlon et du pancréas, ayant le plus fort taux de mutation de *ras*, n'ont pas donné de résultats concluants. Les essais de phase II ne sont pas également concluants dans les cancers du poumon à petites cellules (CPPC) et non à petites cellules (CPNPC), de la prostate métastatique hormono-indépendant et du système nerveux central. Dans le cancer du sein, les premiers résultats rapportés en monothérapie ou en combinaison avec le Tamoxifène (anti-oestrogène) sont assez prometteurs. Le Tipifarnib a aussi été étudié en combinaison avec des agents cytotoxiques (taxanes, gemcitabine et 5-fluorouracile). La combinaison du Tipifarnib avec le Taxol sur des tumeurs solides est bien tolérée, potentialisant les effets anticancéreux (42 % de réponse) (Awada et al., 2007). Sa combinaison avec la radiothérapie sur des patients atteints de glioblastomes est bien tolérée, donnant de bons résultats cliniques.

L'inhibition par le Tipifarnib de cibles impliquées dans de nombreux cancers hématologiques ou myéloïdes incite à son utilisation dans ces pathologies (tableau 4). L'étude de phase I dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA) indique que la concentration du Tipifarnib est trois à quatre fois supérieure dans la partie infectée (Karp et al., 2001) ; une efficacité médiocre avec une différence interindividuelle a été observée lors des études de phase II. Johnson and Johnson a effectué une étude de phase III en comparant le Tipifarnib avec d'autres traitements utilisés dans LMA, mais la FDA n'a pas délivré d'autorisation de mise sur le marché. Les études de phase II dans le Syndrome Myélodysplasique (SMD) montrant des problèmes de tolérance ; les prochaines études se feront à des concentrations plus faibles. Son utilisation dans la myélofibrose (une anomalie myéloproliférative fatale avec des options thérapeutiques limitées) apporte 33% de réponse avec un mode d'action indéterminé. La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) peut être soignée par l'Imatinib (un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase Bcr-Abl), mais des résistances à ce

dernier existent. Le Tipifarnib seul et en combinaison avec l'Imatinib est efficace sur des patients réfractaires ou non à l'Imatinib. L'effet indésirable le plus fréquent est gastrique, mais est généralement modéré et supportable. L'alliance de mécanismes d'action distincts empêcherait donc l'apparition de résistances aux inhibiteurs de Tyrosine Kinase. Cette combinaison serait plus efficace si elle était entreprise avant l'apparition des résistances à l'Imatinib. L'étude de phase II dans le traitement du myélome montre une stabilisation de la maladie (Alsina et al., 2004).

Type de cancer	Dose quotidienne (mg)	Agent de co-traitement	Phase clinique	Taux de réponse (%)	Références
Essais en monothérapie					
Sein	600-800	aucun	II	25	Head et al., 2004
Colorectal	600	aucun	III	24,3 (stable)	Rao et al., 2004
CPNPC	600	aucun	II	16 (stable)	Adjei et al., 2003
CPPC	800	aucun	II	0	Heymach et al., 2004
Urothélial	600	aucun	II	6	Rosenberg et al., 2005
Glioblastome	600	aucun	II	0	Cloughesy et al., 2006
Pancréas	600	aucun	III	0	Schellens et al., 2000
Prostate	300	aucun	II	0	Haas et al., 2002
SNC	200	aucun	II	0	Fouladi et al., 2007
LMA	600 (2 fois/jour)	aucun	II	29	Karp et al., 2001; Lancet et al., 2004 ; Harousseau et al., 2007a et b
SMD	600	aucun	II	33	Kurzrock et al., 2004 ; Fenaux et al., 2007
Myélofibrose	300 (2 fois/jour)	aucun	II	33	Mesa et al., 2004
LMC	1200	aucun	II	32	Cortes et al., 2003
Myélome	600	aucun	II	64	Alsina et al., 2004
Essais en combinaison avec d'autres anticancéreux					
Sein	400-600	Tamoxifen	II	25	Johnston et al., 2003; Lebowitz et al., 2005 ; Johnston et al., 2008
Pancréas	400	Gemcitabine	III	0	Van Custem et al., 2004
LMC	300-400	Imatinib (400 mg)	I	hématologiques=62% cytogénétiques=36%	Cortes et al., 2007
Glioblastome	200	Radiothérapie (60 Gy)	I	55	Moyal et al., 2007

Tableau 4 : Essais cliniques du Tipifarnib (CPNPC : Cancer du Poumon à Non-Petites Cellules, CPPC : Cancer du Poumon à Petites Cellules, LMA : Leucémie Myéloïde Aiguë, SMD : Syndrome Myélodysplasique, LMC : Leucémie Myéloïde Chronique, SNC : Système Nerveux Central)

D'autres essais cliniques en monothérapie sont encore en cours, mais il semblerait que ce composé ait plus d'avenir en combinaison avec d'autres traitements anti-cancéreux.

2) Le SCH66336 (Lonafarnib, Sarasar[®])

Le SCH-66336 peut être utilisé jusqu'à 200 mg (deux fois par jour), par voie orale, son principal effet secondaire étant la diarrhée ; les nausées, les vomissements et la fatigue sont aussi fréquemment observés. Plusieurs études de phase II dans les cancers urothélial et colorectal n'ont pas donné de résultats significatifs (tableau 5). Une étude de phase II sur diverses malignités hématologiques avancées (AML, MDS, CML) donne des résultats incitant à d'autres études plus approfondies (Cortes et al., 2002). Il inhibe la prolifération des cellules résistantes à l'Imatinib et augmente l'apoptose induite par ce dernier (Hoover et al., 2002). Sa combinaison avec la Gemcitabine dans le cancer urothélial avancé ne démontre aucune toxicité hématologique sévère avec un taux de réponse de 32% (Theodore et al., 2005). La même combinaison avec le Cisplatine dans le cancer du poumon non à petites cellules donne une toxicité sévère (neutropénie,

thrombocytopénie, anémie) sans bénéfice pour le patient (Chow et al., 2007). La combinaison Taxol/Lonafarnib a montré une synergie antiproliférative puissante sur plusieurs lignées cellulaires et modèles précliniques (Shi et al., 2000). Une étude de phase I/II dans le cancer du sein avec le Taxol et le Lonafarnib a été conduite, montrant une bonne tolérance et une bonne efficacité. De plus, les patients réfractaires ou résistants au taxol répondent à cette combinaison, renversant la résistance au Taxol (Marcus et al., 2006). Cette combinaison montre une augmentation des effets anti-prolifératifs et un effet pro-apoptotique *in vitro* et *in vivo* sur le cancer de l’ovaire (Taylor et al., 2008). De plus, l’Association of Gynecologic Oncology (AGO) a récemment initié une étude de phase II pour déterminer les effets de la combinaison du Lonafarnib avec le Taxol et le Carboplatine sur des patientes atteintes d’un cancer avancé de l’ovaire.

Type de cancer	Dose quotidienne (mg)	Agent de co-traitement	Phase clinique	Taux de réponse (%)	Référence
Essais en monothérapie					
Urothélial	200	aucun	II	0	Winqvist et al., 2001
Colorectal	200	aucun	II	0	Sharma et al., 2002
LMA, SMD, LMC	200	aucun	II	19	Cortes et al., 2002
Essais en combinaison avec d’autres anticancéreux					
LMC		Imatinib	II	33	Hoover et al., 2002
Urothélial		Gemcitabine	II	32	Theodore et al., 2005
CPNPC	75	Gemcitabine (750 mg/m ²) Cisplatine (75 mg/m ²)	II	Toxique	Chow et al., 2007
Sein	125 mg, 2 fois par jour	Taxol (80 mg/m ²)	II	57	Sun et al., 1999

Tableau 5 : Essais cliniques du Lonafarnib

3) Le BMS-214662

Contrairement aux autres FTis, plutôt cytostatiques, le BMS-214662 dispose d’un puissant effet cytotoxique sur divers modèles de tumeurs xénotransplantées (Rose et al., 2001). La formulation orale du BMS-214662 provoque une toxicité gastro-intestinale dose-dépendante (Camacho et al., 2001). Il est donc utilisé par administration intraveineuse jusqu’à 200 mg/m², de plus fortes doses pouvant être administrées en modulant le rythme d’administration (Cortes et al., 2005).

Bien qu’il ne soit pas entré en essai clinique dans la LMC, des essais de phase I dans la LMA donnent des résultats prometteurs (Cortes et al., 2005). Sa combinaison (200 mg/m²) avec le cisplatine (75 mg/m²) est bien tolérée, montrant une stabilisation de la pathologie de 15 des 29 patients traités (Mackay et al., 2004). Le BMS-214662 a été également étudié en combinaison avec le Taxol (160 mg/m²) et le Carboplatine (225 mg/m²) sur des tumeurs solides avancées, montrant une bonne tolérance, avec une activité sur différentes tumeurs (Dy et al., 2005). Sur des tumeurs solides avancées, une autre étude de combinaison du Taxol (80 mg/m²) et du BMS-214662 (160 mg/m²) est bien tolérée avec seulement quelques effets gastriques et des activités encourageantes (Bailey et al., 2007).

B. Perspectives thérapeutiques des FTis dans d’autres pathologies

Enfin, bien que les FTis aient été développés pour une utilisation dans le traitement du cancer, ils se sont également révélés efficaces dans des maladies parasitaires et des laminopathies.

1. Utilisation des FTis comme agent antiparasitaire

Malgré les avancées pharmaceutiques, les maladies parasitaires comme le paludisme ou la maladie de Chagas continuent à être des maladies infectieuses étendues. Une approche pour accélérer le développement de thérapeutiques anti-parasitaires consiste à développer les FTis pour une utilisation anti-parasitaire (Gelb et al., 2003).

En effet, la prénylation ne s'effectue pas seulement dans les cellules de mammifères mais également dans des parasites protozoaires tels que le *Trypanosoma brucei* (maladie africaine du sommeil) et *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) (Yokoyama et al., 1997 ; Field et al., 1996), le *Leishmania major* (Yokoyama et al., 1998a), le *Giardia lamblia* (Lujan et al., 1995), *Schistosoma mansoni* (Chen et al., 1993), *Plasmodium falciparum* (malaria) (Chakrabarti et al., 1998), le *Toxoplasma gondii* (toxoplasmose) (Ibrahim et al., 2001). Les FTases des parasites *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania major* ont été clonées (Yokoyama et al., 1998b ; Buckner et al. ; 2002 ; Carrico et al., 2004). Ces enzymes ont une spécificité de substrat différente de leur homologue de mammifère. Il est donc possible de préparer des composés sélectifs de la FTase du parasite (Gelb et al., 2003).

Des inhibiteurs puissants de la FTase du parasite capables de bloquer la croissance de ce dernier ont été développés (Hucke et al., 2005). Ces FTis ont une toxicité sélective envers les parasites qui s'explique par l'absence de GGTase-I parasitaire ou d'une autre modification possible pour les protéines farnésylées. Cependant, la GGTase-I est présente dans quelques parasites, comme le *Trypanosoma cruzi* (Yokoyama et al., 2008). Dans ce cas, les FTis sélectifs perdent de leur efficacité sur le parasite. La *T. cruzi* GGTase-I étant clonée, il est possible de concevoir des inhibiteurs sélectifs de la *T. cruzi* GGTase-I ou des inhibiteurs mixtes *T. cruzi* FTase/GGTase-I.

2. Utilisation des FTis dans le traitement du syndrome progéroïde d'Hutchinson Gilford (HGPS)

Les syndromes progéroïdes sont des désordres génétiques rares qui miment les caractéristiques cliniques et moléculaires de la vieillesse. D'abord décrite par Hutchinson (Hutchinson, 1886) et plus tard par Gilford (Gilford, 1904) la progéria ou Hutchinson Gilford Progeria Syndrome (HGPS) est une maladie rare et sévère. Le phénotype clinique est caractérisé par un retard de croissance sévère, associé à une altération du squelette, une amyotrophie marquée, une lipodystrophie, une atrophie de la peau et une alopecie (Jansen et al., 2000). Les enfants affectés décèdent vers un âge moyen de 13,5 ans, le plus souvent par infarctus du myocarde (Hennekam, 2006).

Des mutations sur le gène *LMNA*, codant pour les lamines A et C (Lin et al., 1993), ont été identifiées comme cause de l'HGPS (De Sandre-Giovannoli et al., 2003, Navarro et al., 2006). Les lamines ont un rôle inattendu dans ce vieillissement prématuré (Mattout et al., 2006). La néosynthèse de la lamine A nécessite une série

de quatre modifications post-traductionnelles (Navarro et al., 2006) (figure 22). Après la farnésylation de la prélamine A, les trois derniers résidus « AAX » sont clivés par FACE1/ZMPSTE24, puis la cystéine est méthylée par ICMT (Isoprénylcystéine Carboxyl Méthyl Transférase). Un second clivage par FACE1/ZMPSTE24 solubilise la lamine mature dans le cytosol. La lamine A est alors importée dans le nucléoplasme à travers un Complexe du Pore Nucléaire (CPN).

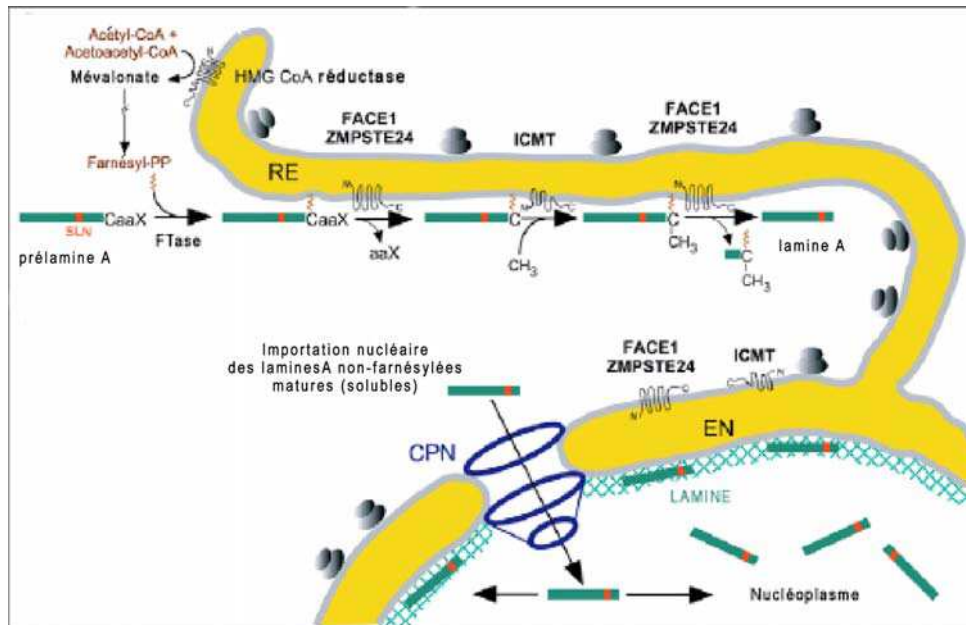


Figure 22 : Processus de maturation de la lamine A (RE : réticulum endoplasmique, EN : enveloppe nucléaire, CPN : complexe du pore nucléaire, SLN : signal de localisation nucléaire, ICMT : isoprénylcystéinecarboxylméthyltransférase) (d'après Navarro et al., 2006)

La mutation de *LMNA* induit la traduction d'une prélamine A tronquée au niveau de la seconde séquence reconnue par la ZMPSTE24 : la prélamine A n'est donc plus clivée, empêchant la maturation en lamine A (Navarro et al., 2006, Eriksson et al., 2003). L'accumulation de prélamine A farnésylée (progérine) toxique (Fong et al., 2004) est réduite par les FTis, améliorant le phénotype cellulaire (Yang et al., 2005). Un FTi a été administré sur des souris atteintes de progéria, augmentant leur tonus, diminuant leur fracture osseuse et améliorant leur longévité (Fong et al., 2006). Les FTis inhibent fortement l'accumulation de progérine et partiellement la farnésylation de la Lamine A. Etant donné qu'une faible quantité de Lamine A mature permet l'assemblage de l'enveloppe nucléaire, les FTis ont alors un effet positif sur le noyau (Lourim et al., 1993). Ces premiers résultats sur modèle animal ont conduit à étudier le Lonafarnib (phase II) dans cette pathologie.

**LES DIFFERENTES STRATEGIES UTILISEES DANS
LE DRUG DESIGN DES INHIBITEURS DE
FARNESYLTRANSFERASE**

L'étude du mécanisme de farnésylation a montré que la « boîte CA₁A₂X » adopte deux conformations interagissant différemment avec le site actif de la FTase (figure 1). Dans un premier temps, cette séquence peptidique se fixe dans une conformation étendue. Puis, après addition de la chaîne farnésyle sur le thiol de la cystéine, il y a passage à une conformation coudée de type β -turn. Ce changement de conformation entraîne le déplacement de la partie « CA₁ » et celui du groupement farnésyle vers une cavité hydrophobe appelée l'« exit groove » formée par Ala92 β , Tyr93 β , Asp359 β , Cys95 β et Leu96 β (Long et al., 2002). De ce fait, l'inhibition de la FTase peut se faire en mimant au moins l'un des deux substrats (FPP ou la « boîte CA₁A₂X ») et en se fixant dans au moins l'un des deux sites.

Comme indiqué dans le chapitre précédent, les FTis disposent d'un potentiel thérapeutique non négligeable dans le traitement de maladies parasitaires (maladie de Chagas et paludisme). Les farnésyltransférases de ces parasites ont été clonées et leur superposition avec l'enzyme humaine montre une légère différence (Gelb et al., 2003). Il est donc possible de concevoir des inhibiteurs spécifiques des FTases parasitaires à partir d'inhibiteurs de FTase humaine. Mes travaux de thèse étant focalisés vers l'aspect anticancéreux, je ne détaillerai pas la conception de ces inhibiteurs.

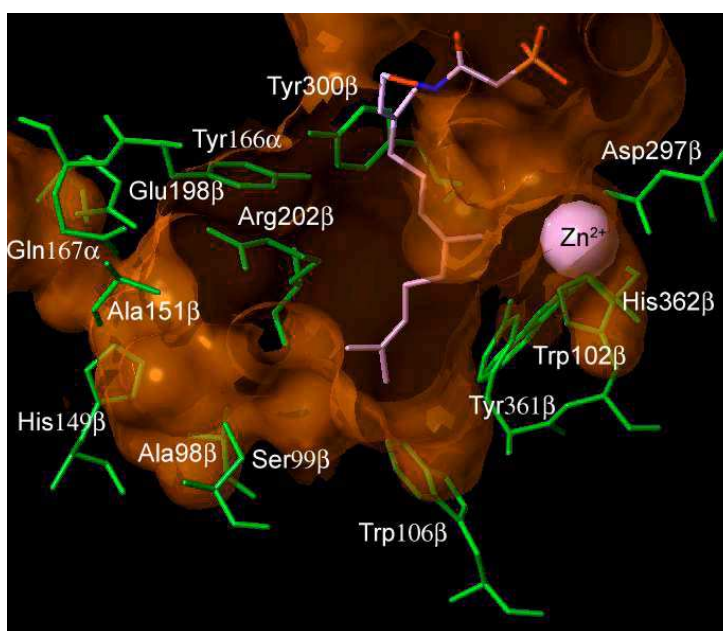


Figure 1 : Présentation du site actif de l'enzyme

Deux grandes approches ont été entreprises, parallèlement, pour découvrir des inhibiteurs de farnésyltransférase :

- *une approche rationnelle*, initiée à partir des premières représentations de la FTase, évoluant avec la découverte de son mécanisme réactionnel
- *une approche aléatoire*, consistant au criblage de chimiothèques

I. Découverte de FTis par conception rationnelle

La conception rationnelle de FTis a initialement été basée sur des données cinétiques de la réaction de farnésylation. Les études par cristallographie ont ensuite permis de déterminer le mode de fixation des FTis, facilitant ainsi la conception de nouveaux inhibiteurs.

A. Les mimétiques de la « boîte CA₁A₂X »

La conception rationnelle d'inhibiteurs compétitifs de la « boîte CA₁A₂X » commence au début des années 90 avec les travaux de Goldstein et de Brown (Reiss et al., 1990 ; Goldstein et al., 1991). Ils ont été les premiers à identifier, caractériser et purifier la FTase et ensuite à démontrer que des tétrapeptides de type CA₁A₂X inhibaient la FTase.

Le remplacement dans la séquence CVIM (caractéristique de K-Ras 4B) de l'isoleucine par une phénylalanine a conduit au tétrapeptide CVFM qui est un inhibiteur compétitif de la protéine Ras avec une IC₅₀ de 60 nM vis-à-vis de la FTase (figure 2) (Brown et al., 1992). Ce composé a ainsi été retenu comme chef de file des inhibiteurs peptido-mimétiques. Les peptides basés sur ce modèle inhibent *in vitro* de façon sélective la FTase (vs. GGTase-I). Mais la nature peptidique de ce composé le rend sensible à l'action de peptidases endogènes et donc inutilisable *in vivo*.

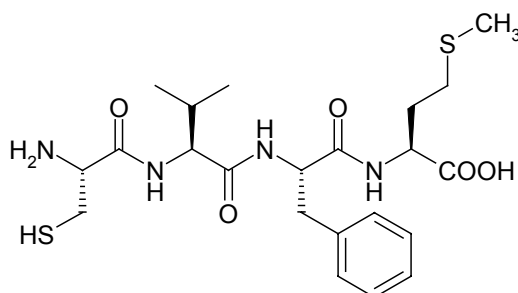


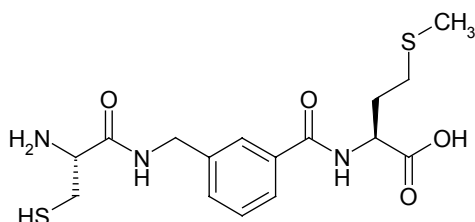
Figure 2 : Tétrapeptide CVFM : IC₅₀ (FTase) = 60 nM, IC₅₀ (GGTase-I) = 11 000 nM

De nombreux travaux ont permis de supprimer son caractère peptidique. Les modifications apportées ont tout d'abord concerné l'espaceur central A₁A₂, puis la méthionine et enfin la cystéine, aboutissant à une entité totalement non peptidique, sans thiol, et interagissant ou n'interagissant pas avec l'atome de zinc (Leonard, 1997 ; Williams, 1999 ; Bell, 2000).

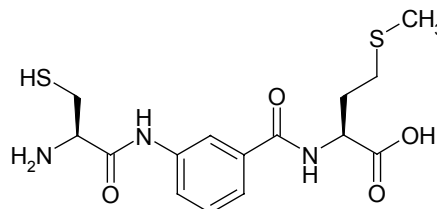
a. Modifications de l'espaceur central A₁A₂

Les deux acides aminés centraux du tétrapeptide CVFM ont d'abord été remplacés par un espaceur hydrophobe, l'acide 3-aminométhylbenzoïque (3-AMBA) (Niam et al., 1993). Celui-ci permet de conserver la distance observée dans le tétrapeptide CVFM entre la cystéine et la méthionine, tout en réduisant le nombre de liaisons peptidiques. Ainsi, le composé **FTI-205** présente une activité de 100 nM (figure 3).

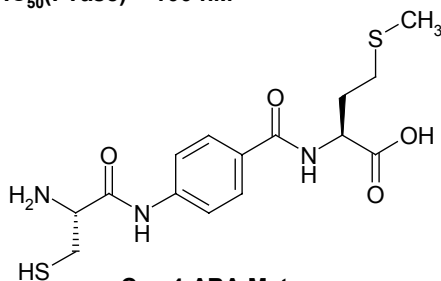
Les deux aminoacides centraux ont également été remplacés par l'acide 3- ou 4-aminobenzoïque (ABA) et l'acide 4-aminométhylbenzoïque (4-AMBA) qui permettent de faire varier la distance entre la cystéine et la méthionine. Les acides 3-ABA et 4-AMBA ne correspondent pas aux exigences géométriques imposées par le modèle peptidique, et par conséquent l'activité des composés **Cys-4-AMBA-Met** et **Cys-3-ABA-Met** est très faible par rapport aux inhibiteurs **Cys-3-AMBA-Met** et **Cys-4-ABA-Met**.



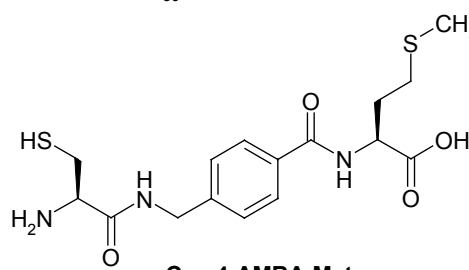
Cys-3-AMBA-Met (FTI-205)
 $IC_{50}(FTase) = 100 \text{ nM}$



Cys-3-ABA-Met
 $IC_{50}(FTase) = 6\,400 \text{ nM}$



Cys-4-ABA-Met
 $IC_{50}(FTase) = 50 \text{ nM}$



Cys-4-AMBA-Met
 $IC_{50}(FTase) = 2\,550 \text{ nM}$

Figure 3 : Modifications de l'espaceur A_1A_2 par un groupement phényle ou benzyle

La réduction d'une liaison amide du **Cys-4-ABA-Met** (figure 3) a conduit au composé **FTI-249** qui possède une IC_{50} de 50 nM (figure 4). La comparaison de la structure de ce dernier avec le térapeptide CVFM suggère que l'inhibition peut être améliorée en augmentant l'hydrophobie du connecteur central. L'inhibiteur **FTI-276**, 100 fois plus actif que le composé **FTI-249**, a donc été conçu. Le composé pro-drug **FTI-277** inhibe la farnésylation intracellulaire avec une IC_{50} de 100 nM.

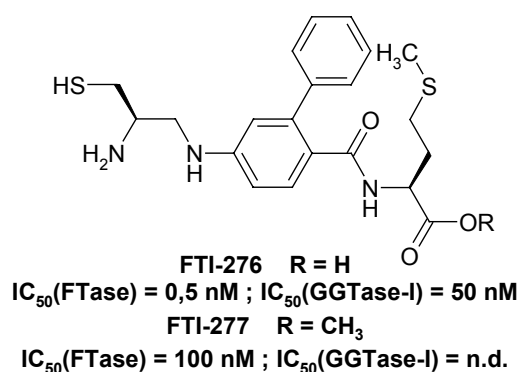
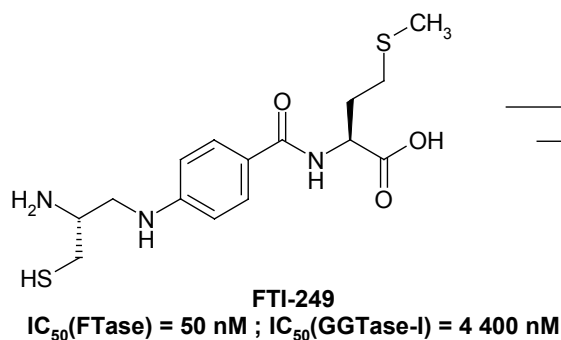


Figure 4 : Modification de l'espaceur A_1A_2 par un biphenyle

Une autre équipe a également modifié le térapeptide CVFM en réduisant une ou deux liaisons amide pour donner respectivement les composés **B515** et **B581** (figure 5). Ces modifications permettent de multiplier par 3 l'activité, tout en

préservant la sélectivité FTase/GGTase-I. Le remplacement de liaisons méthylamine par des chaînons éthyléniques a conduit au composé **B956** ($IC_{50} = 11$ nM) (Nagasu et al., 1995). Selon la lignée cellulaire, le **B956** inhibe leur prolifération à des concentrations comprises entre 0,2 et 60 μ M. Les lignées cellulaires exprimant l'oncogène H-ras sont les plus sensibles à l'inhibiteur **B581**.

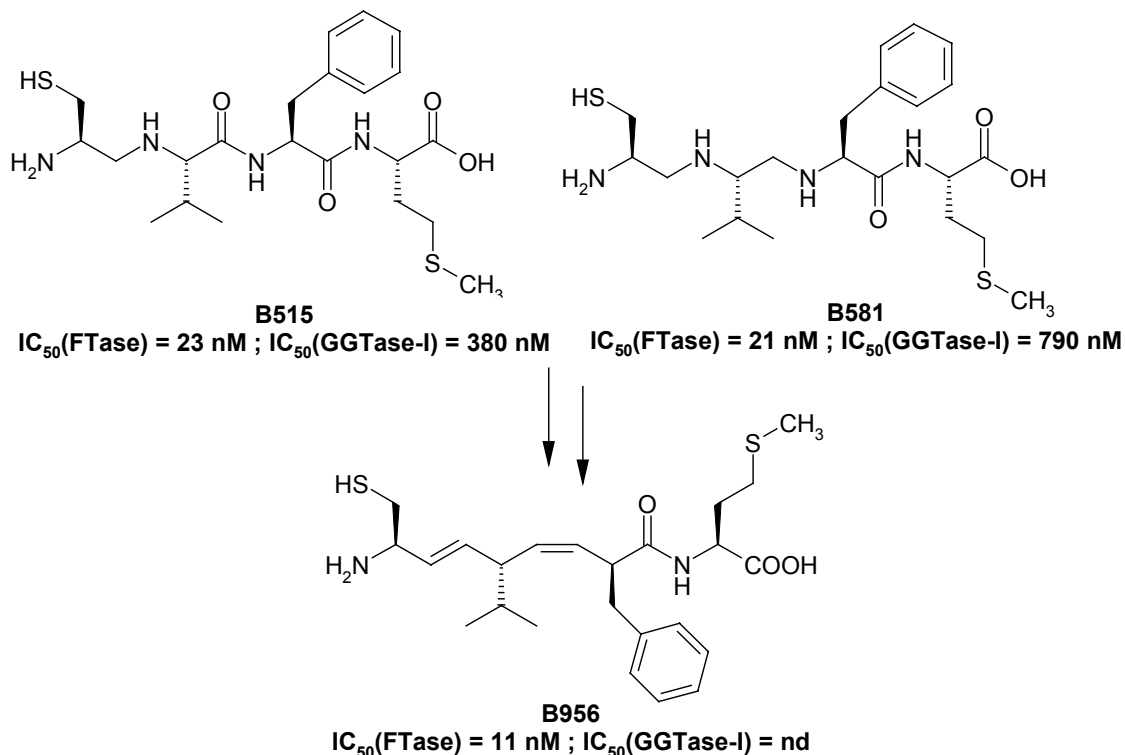
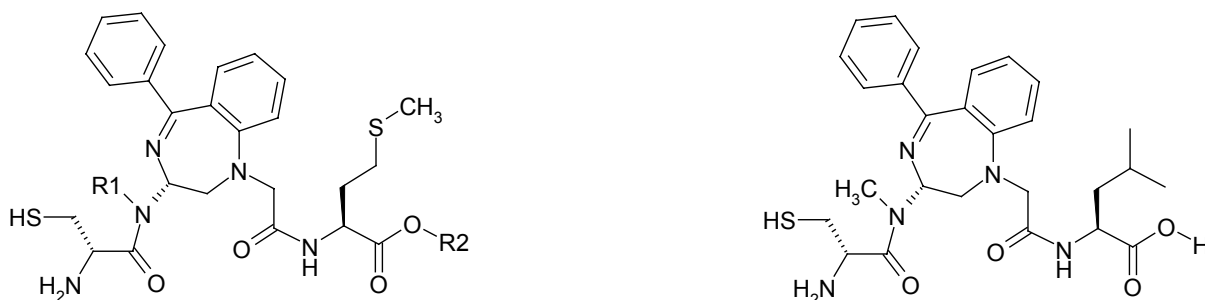


Figure 5 : Modification de l'espaceur A_1A_2 par des chaînons éthyléniques

Le dipeptide central A_1A_2 a également été remplacé par une benzodiazépine, conférant à la molécule une conformation coudée de type β -turn. Les racémiques **BZA-1A** et **B** obtenus présentent une activité modérée vis-à-vis de la FTase (James et al., 1993). La *N*-méthylation de **BZA-1B** donne le composé **BZA-2B** 400 fois plus actif grâce à une augmentation des interactions hydrophobes avec le site actif. Cependant, ce dernier n'est pas très sélectif de la FTase vis-à-vis de la GGTase-I. Le **BZA-5B**, prodrug du composé précédent, a également été préparé. Le remplacement de la partie thioéther, oxydable en sulfone, par un groupement isopropyle (**BZA-4B**) ne modifie pas l'inhibition de la FTase mais diminue la sélectivité vis-à-vis de cette dernière.

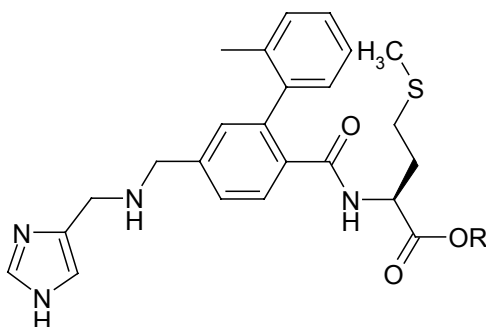


BZA-1B $R_1 = H$ $R_2 = H \Rightarrow IC_{50}(FTase) = 400$ nM ; $IC_{50}(GGTase-I) = n.d.$
 BZA-2B $R_1 = CH_3$ $R_2 = H \Rightarrow IC_{50}(FTase) = 0,85$ nM ; $IC_{50}(GGTase-I) = 35$
 BZA-5B $R_1 = CH_3$ $R_2 = CH_3 \Rightarrow IC_{50}(FTase) = 41$ nM ; $IC_{50}(GGTase-I) = n.d.$
 BZA-4B $IC_{50}(FTase) = 1,3$ nM IC_{50} ; $IC_{50}(GGTase-I) = 7$ nM

Figure 6 : Modification de l'espaceur A_1A_2 par une benzodiazépine

b. Remplacement de la cystéine

Afin d'augmenter la stabilité des inhibiteurs, le thiol de la cystéine, fragile et facilement oxydable, a été remplacé par des imidazoles substitués. Par exemple, le **FTI-2148** (figure 7) inhibe la FTase avec une IC_{50} de 0,86 nM. L'ester correspondant (**FTI-2153**) exerce une activité *in vivo* bien supérieure à celle de l'acide carboxylique (**FTI-276**) et réduit de façon significative les tumeurs du poumon (A549) chez la souris (figure 4) (Sun et al., 1999).



R=H, FTI-2148 \Rightarrow enz. $IC_{50}(FTase) = 1,4$ nM $IC_{50}(GGTase-I) = 1700$ nM
 R=Me, FTI-2153 \Rightarrow cell. $IC_{50}(FTase) = 0,01$ μ M
 $IC_{50}(GGTase-I) > 30$ μ M

Figure 7 : Remplacement de la cystéine par un imidazole

La substitution de l'imidazole permet d'apporter des interactions supplémentaires avec le site actif de l'enzyme. La substitution de l'atome d'azote proximal imidazolique par un groupement benzylique a donc été envisagée. Différentes modifications ont permis l'obtention d'un inhibiteur présentant une IC_{50} de 0,4 nM envers la FTase (figure 8). Son prodrug ester méthylique traverse la membrane cellulaire et inhibe la farnésylation de H-Ras, avec une concentration de 5 μ M. L'effet inhibiteur sur la croissance cellulaire est observé à partir d'une concentration de 1 μ M (Ciccarone et al., 1999).

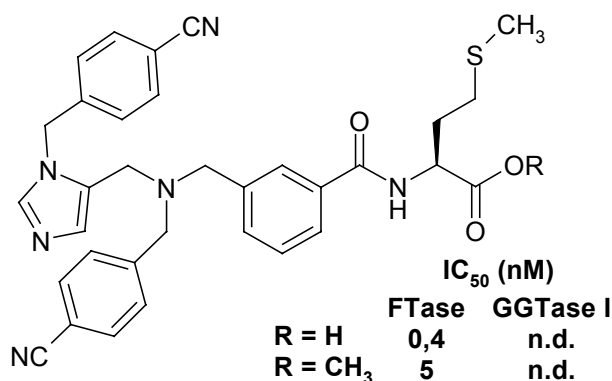


Figure 8 : Remplacement de la cystéine par le 1-(4-cyanobenzyl)imidazole

De nombreux composés, avec ou sans méthionine terminale et possédant un groupement 1-(4-cyanobenzyl)imidazole comme alternative à la cystéine, ont été développés. Par exemple, les deux composés de la figure 9 inhibent la FTase avec une activité de l'ordre du picomolaire (IC₅₀ = 0,15 nM) et suppriment la croissance tumorale chez la souris (Anthony et al., 1999 ; Williams et al., 1999 ; Dinsmore et al., 2003).

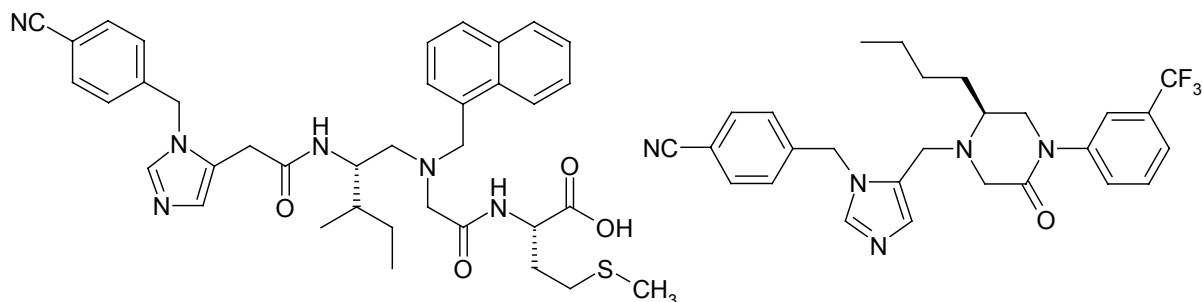


Figure 9 : Remplacement de la cystéine par le 1-(4-cyanobenzyl)imidazole

Au laboratoire, une série d'inhibiteurs à espaceur 4-aminopipéridinique a été synthétisée (Houssin et al., 2002 ; Millet et al., 2004). Les composés possédant un groupement 1-(4-cyanobenzyl)imidazole (figure 10) ont révélé une bonne activité inhibitrice de la FTase. Ces inhibiteurs ont servi de base pour la conception de nouvelles molécules.

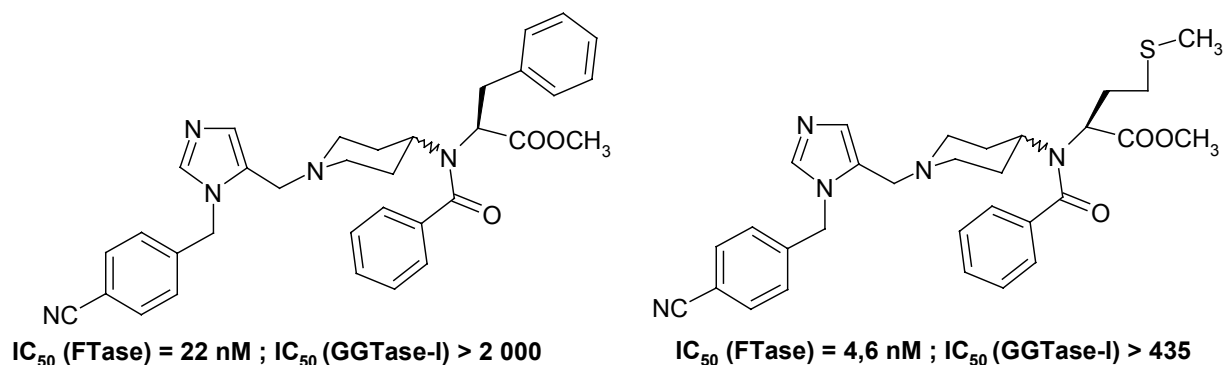


Figure 10 : Composés du laboratoire à espaceur 4-aminopipéridinique et à chélateur 4-(cyanobenzyl)imidazole

Des chercheurs de chez Johnson & Johnson ont remplacé l'imidazole par le triazole. Les pharmacomodulations se sont faites en trois positions (figure 11) (Saha et al., 2005). Le screening de ces composés montre que le groupement 4-cyanobenzyle est indispensable à l'activité. Ensuite, le triazole a été remplacé par d'autres hétérocycles. L'imidazole substitué en position 5 diminue l'activité, le tétrazole supprime l'activité alors que le 5-méthyltriazole augmente l'activité.

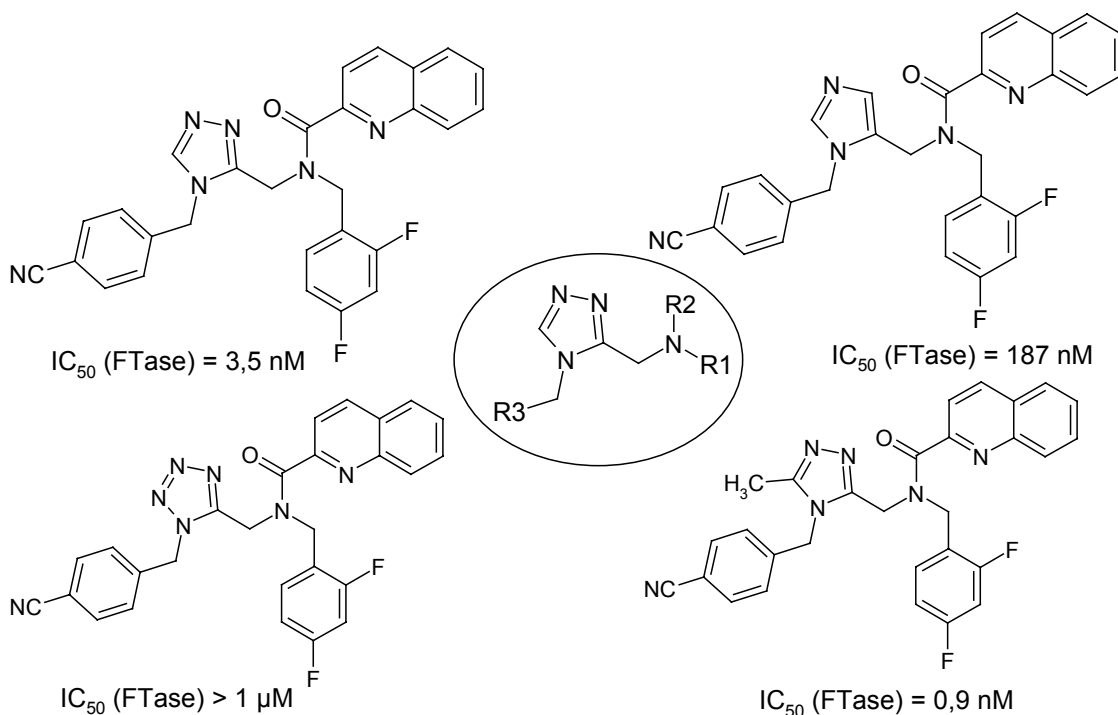


Figure 11 : Remplacement de l'imidazole par d'autres hétérocycles azotés

c. Remplacement de la méthionine

La très faible perméabilité à la membrane cellulaire apportée par le groupement acide carboxylique de la méthionine a freiné son utilisation. Les laboratoires Merck ont donc conçu de nouveaux inhibiteurs dipeptidomimétiques en démontrant que le groupement carboxylique n'est pas un élément essentiel à la conception des inhibiteurs de la FTase (deSolms et al., 1995). Leurs premiers FTis inhibent la farnésylation de H-Ras sur culture cellulaire de façon très modeste. Une contrainte stérique a donc été introduite dans le squelette peptidique par le biais d'une pipérazine substituée en position 2, donnant un produit plus actif que le produit non cyclisé (figure 12).

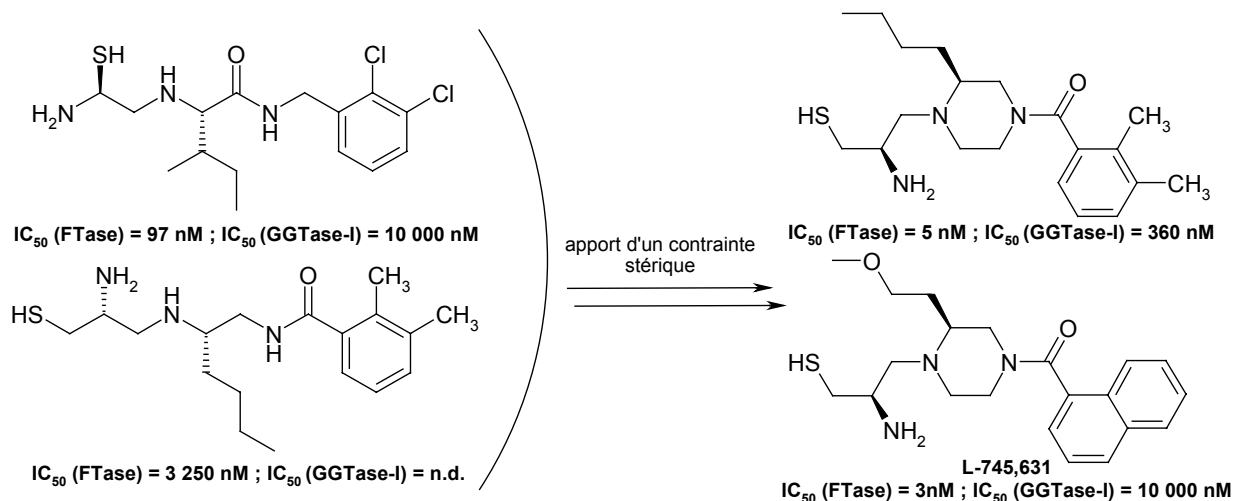


Figure 12 : Modification du résidu méthionine

Les laboratoires Merck ont modifié les motifs CIIM (K-Ras-4A) et CIFM (figure 13). Le remplacement de la méthionine par une sérine et la réduction des liaisons amide a donné le composé **L-731,735**, un bon inhibiteur sélectif de la FTase (Kohl et al., 1994). L'oxydation du soufre de la méthionine en sulfone et le remplacement de l'atome d'azote de la phénylalanine par un atome d'oxygène ont conduit au **L-739,750**, un inhibiteur puissant et sélectif de la FTase. L'ester méthylique est moins actif sur enzyme isolée mais il réduit la croissance tumorale sur des lignées cellulaires Ras-mutées chez la souris. De plus, aucune toxicité n'a été remarquée lors d'un traitement prolongé par le **L-739,749** chez la souris. Le **L-744,832** est l'ester isopropylique du **L-739,750** (prodrug) (Kohl et al., 1995). En culture cellulaire, le **L-744,832** inhibe la farnésylation de Ras avec une IC_{50} comprise entre 0,1 et 1 μ M (Sepp-Lorenzino et al., 1995).

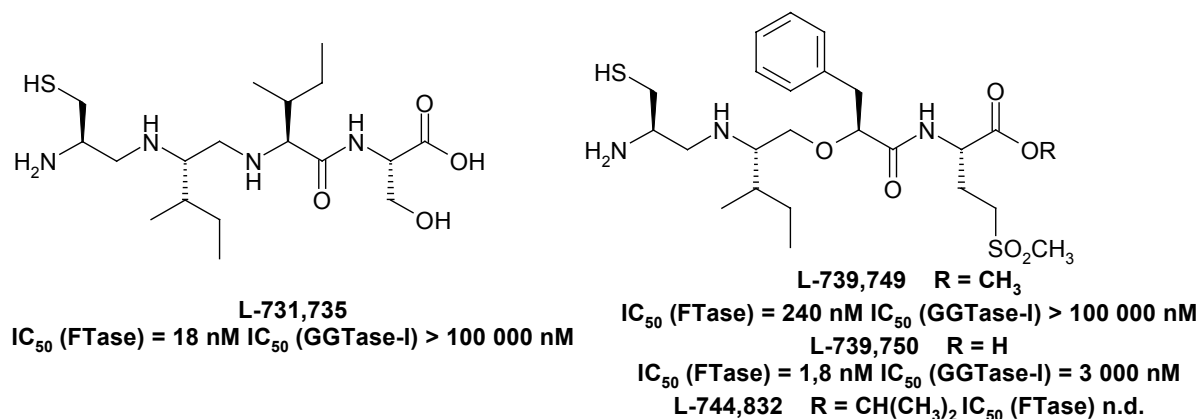


Figure 13 : Modifications de la méthionine

De plus en plus d'inhibiteurs mimétiques de la boîte CA₁A₂X ne comportant pas de méthionine en position C-terminale sont synthétisés. La question se pose alors à propos de la pertinence de la méthionine en tant qu'élément déterminant de la spécificité de la FTase par rapport à la GGTase-I. Il est néanmoins probable que le groupement aromatique ne mime pas la méthionine. La sélectivité apparente des inhibiteurs proviendrait ainsi d'interactions autres que celles qui différencient un résidu aliphatique (leucine, isoleucine) d'un résidu porteur d'une chaîne fonctionnalisée (sérine ou méthionine) en position terminale (Williams et al., 1999).

d. Conception d'un pharmacophore

Toutes ces modifications ont permis de dégager des relations structure-activité et l'élaboration d'un modèle de pharmacophore (figure 14). Le connecteur central (A_1A_2) de la « boîte CA_1A_2X » peut être remplacé par un espaceur **S**, le plus souvent cyclique tel qu'un hétérocycle azoté, pouvant être substitué par un groupement aromatique **A'**. Ensuite, la cystéine a été remplacée par des groupements soufrés de type thiol, mais ces derniers s'oxydant facilement en sulfone, ont été remplacés par un groupement chélateur de zinc **C** qui est le plus souvent l'imidazole. Enfin, la méthionine (facteur de sélectivité **X** de la « boîte CA_1A_2X » pour la FTase) a finalement été remplacée par un groupement hydrophobe **A** qui peut-être aromatique.

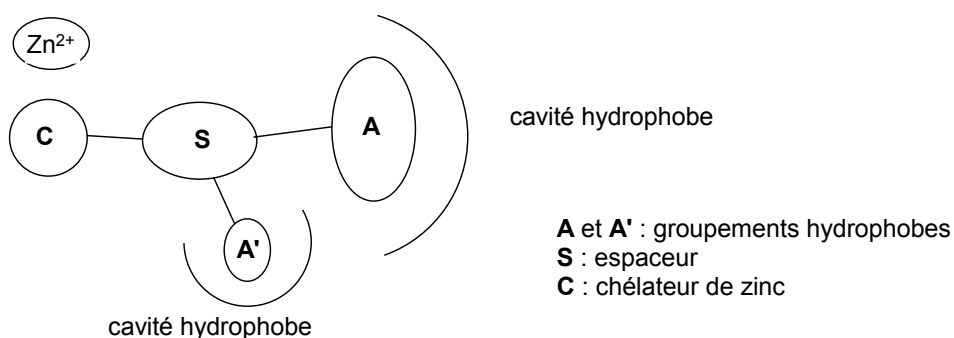


Figure 14 : Proposition de pharmacophore de FTis

e. Les FTis non-peptidiques issus du pharmacophore

Les laboratoires Merck ont obtenu un inhibiteur puissant de la FTase comportant un espaceur 2-pipérazinone, le **L-778,123** (figure 15) (Williams et al., 1999). Le cycle pipérazin-2-one s'est révélé être un bon connecteur central pour la conception d'inhibiteurs de FTase puisque le **L-778,123** inhibe la FTase avec une IC_{50} de 2 nM. Au vu de ces résultats, ce composé a été choisi pour des études cliniques.

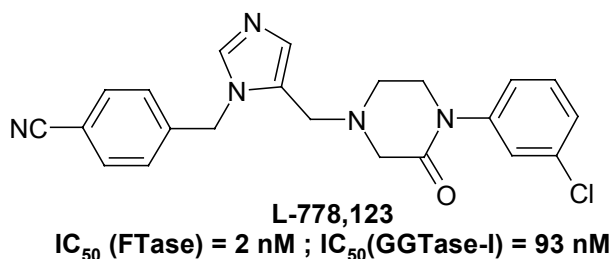


Figure 15 : Inhibiteur L-778,123

Alors que l'évaluation initiale *in vitro* du **L-778,123** montre une forte sélectivité envers la FTase, des résultats *in vivo* indiquent de façon surprenante une inhibition de la GGTase-I (Huber et al., 2001). L'étude de ce phénomène a montré que le **L-778,123** inhibe la GGTase-I par un mécanisme assez inattendu. Lors de son évaluation *in vitro*, le **L-778,123** devient un puissant inhibiteur de GGTase-I en

présence de certains anions, absents lors de la mesure initiale *in vitro*, comme les sulfates, phosphates ou autres dérivés (Reid et al., 2004b). Le mécanisme d'inhibition de la GGTase-I se fait plutôt par compétition avec le GGPP qu'avec la « boîte CA₁A₂X ». Pour résumer, le **L-778,123** se fixe dans la FTase à la place de la « boîte CA₁A₂X », alors que dans la GGTase-I, il se loge dans le site du GGPP en présence d'un anion (figure 16).

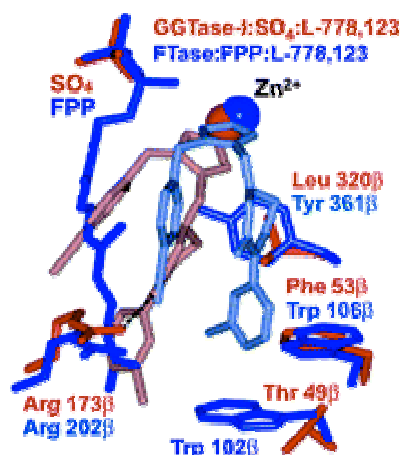
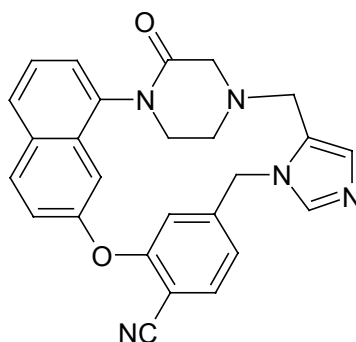


Figure 16 : Co-cristallisation du L-778,123 (FTase/FPP/L-778,123 en bleu ; GGTase-I/SO₄²⁻/L-778,123 en violet)

Le **L-778,123** a été testé en administration intraveineuse à 560 mg/m². Des effets secondaires mineurs, comme une myélosuppression, des nausées, des vomissements et de la fatigue, ont été observés (Eskens et al., 2000). Ensuite testé sur diverses tumeurs solides, le **L-778,123** n'a pas produit d'effet probant et son développement a été arrêté (Bell, 2000). Il n'est pas clairement établi que le manque d'efficacité soit dû au mode d'administration en intraveineuse ou au fait que le **L-778,123** soit relativement peu sélectif de la FTase par rapport à la GGTase-I.

La cyclisation *via* le 8-amino-2-naphtol reliant l'espaceur pipérazinone au 1-(4-cyanobenzyl)imidazolyl-5-méthyle a conduit à une nouvelle famille de FTis macrocycliques (Dinsmore et al., 2001 ; Beshore et al., 2001) (figure 17).



IC₅₀(FTase) = 0,1nM

Figure 17 : Exemple d'inhibiteur macrocyclique

Les laboratoires Servier ont développé deux nouvelles séries d'inhibiteurs à espaceur 3-aminoazépin-2-one (figure 18) (Le Diguarher et al., 2003 ; Le Diguarher et al., 2004). Les composés des deux séries présentent des résultats similaires. Ils possèdent également de bonnes activités cellulaires sur une lignée H-Ras mutée.

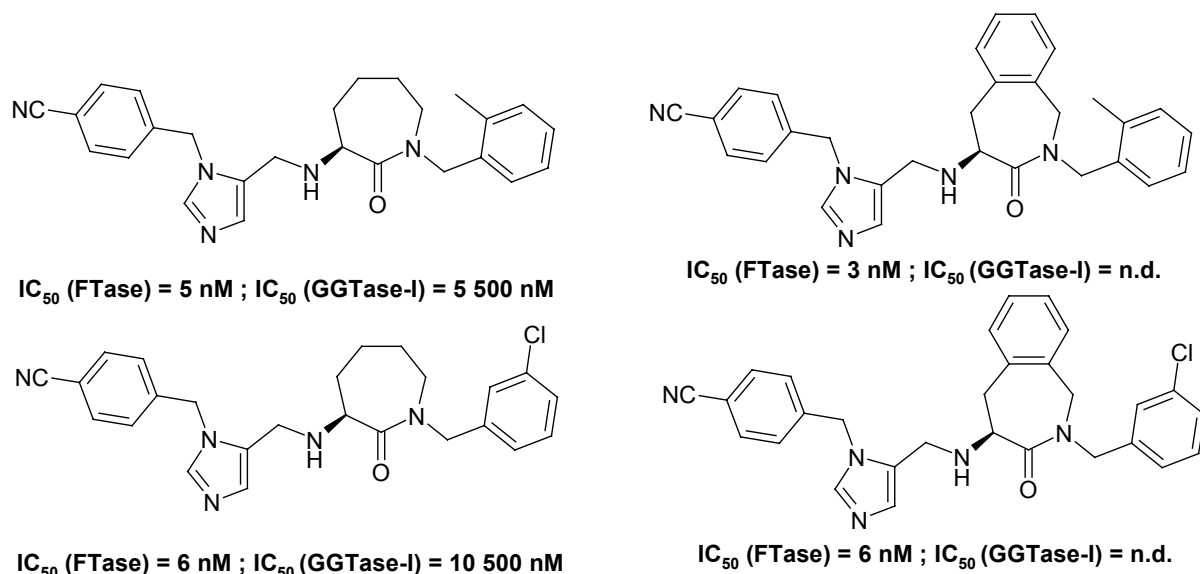


Figure 18 : Les inhibiteurs Servier à espaceur 3-aminoazépin-2-one

La firme Eli Lilly a découvert lors d'un screening d'une librairie de 3000 composés, un FTi dérivé de la 5-nitropipéridin-2-one (Nara et al., 2003). Les diverses modulations entreprises sur ce *lead* ont permis la découverte de deux composés (figure 19). Les études pharmacocinétiques préliminaires suggèrent que l'hydroxyle phénolique induit la rapide élimination de ces composés. Des modifications au niveau du phénol ont donc été entreprises pour améliorer leur stabilité métabolique (Tanaka et al., 2007).

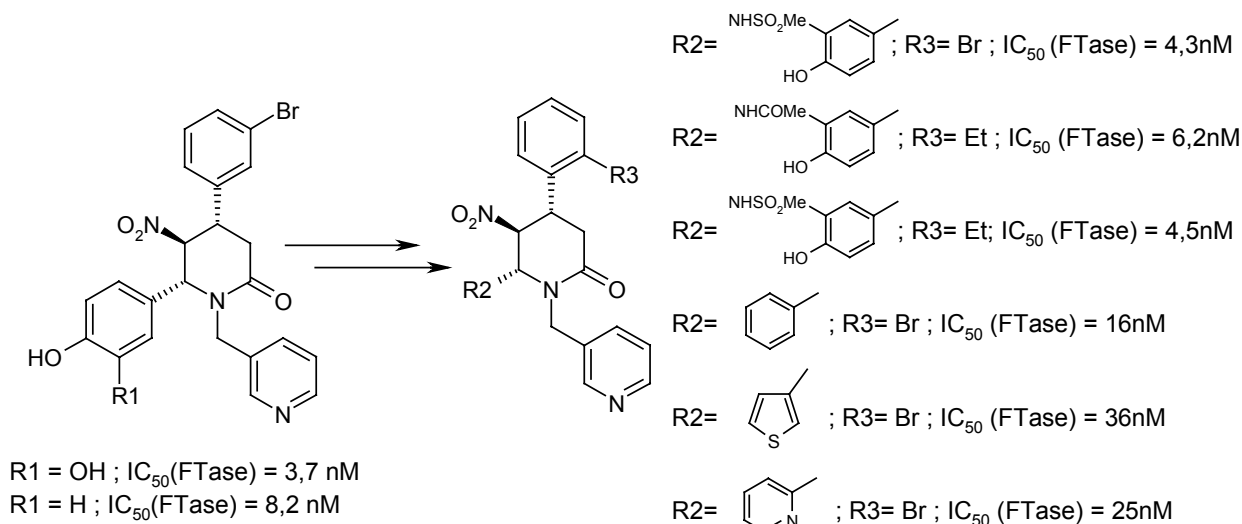


Figure 19 : Inhibiteurs Eli Lilly à noyau 5-nitropipéridin-2-one

Le BMS-214662 :

Les chimistes de la firme BMS ont rigidifié le connecteur central A_1A_2 de la « boîte CA_1A_2X » en tétrahydrobenzodiazépine. Ils ont d'abord obtenu un premier composé actif sur l'enzyme. Après différentes modulations, ils sont parvenus au **BMS-214662** (Hunt et al., 2000). Il présente une IC_{50} de 1,4 nM envers la FTase et il est hautement sélectif de cette enzyme (Haluska et al., 2002).

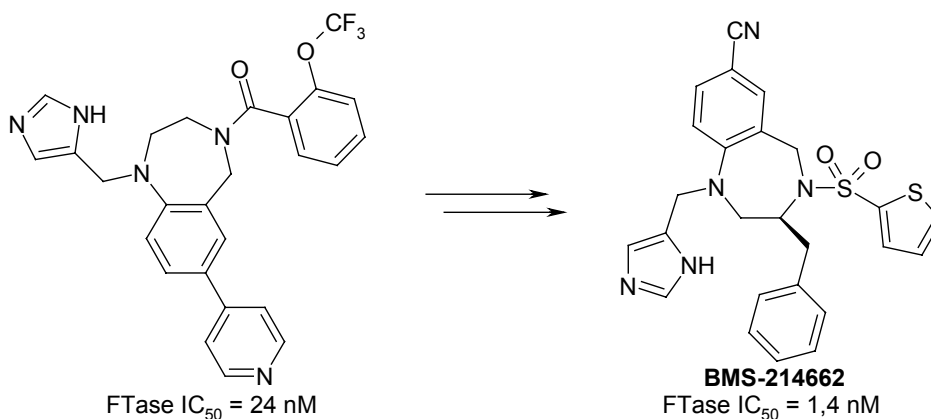


Figure 20 : Obtention du BMS-214662

Des études par co-cristallisation (Reid et al., 2004a) ont récemment permis de définir son mode de fixation (figure 21). Il se fixe de façon compétitive dans le site actif en interagissant avec la troisième unité isoprénoïde du FPP. Le groupement central benzodiazépine adopte une conformation en bateau. L'imidazole chélate l'atome de zinc. Les autres interactions sont uniquement des interactions de type Van der Waals avec la protéine et le fragment farnésyle du FPP. La benzodiazépine est en stacking avec Tyr361 β ; le groupement benzyle se loge dans une cavité hydrophobe, formée par le farnésyle du FPP, Trp102 β et Trp106 β . Le groupement thiénylsulfonyl crée une interaction intramoléculaire aromatique-aromatique avec la benzodiazépine.

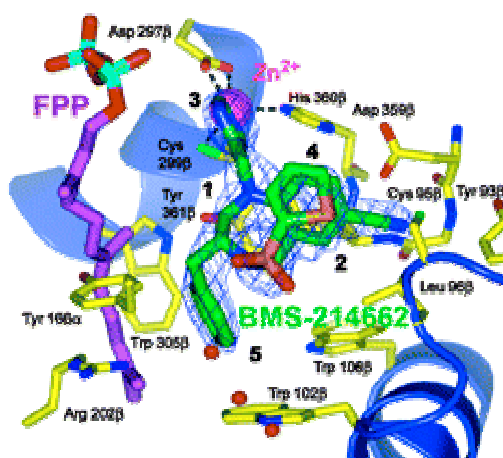


Figure 21 : Co-cristallisation du BMS-214662 avec la FTase (Reid et al., 2004a)

La superposition de l'inhibiteur (en vert) avec le peptide CVIM (en jaune), substrat de la FTase (figure 22), indique que l'inhibiteur se fixe en ne recouvrant que la partie CA₁A₂ de la conformation étendue ou coudée de la « boîte CA₁A₂X » (Reid et al., 2004a). De plus, l'inhibiteur se loge dans l'entrée de l'« exit groove » en recouvrant une partie du produit farnésylé. La cavité, appelée « specificity pocket », où vient normalement se loger le facteur de sélectivité X n'étant pas occupée, la sélectivité FTase/GGTase-I ne se fait donc pas, pour cet inhibiteur, au niveau de cette cavité. La seule autre différence substantielle entre le site actif de la FTase et celui de la GGTase-I se situe au niveau d'une poche hydrophobe appelée le « A₂ binding site » formée dans la FTase par Trp361 β , Tyr102 β et Tyr106 β et dans la GGTase-I par Leu320 β , Phe53 β et Thr49 β . Cette cavité est formée par davantage d'acides aminés de nature aromatique. Cette différence suggère que la sélectivité

envers la FTase se ferait par des interactions de type aromatique-aromatique avec le « A₂ binding site ». Ainsi, pour favoriser une sélectivité FTase vis-à-vis de la GGTase-I, il est préférable d'introduire des substituants aromatiques qui peuvent former des interactions de type « stacking » au sein de cette cavité.

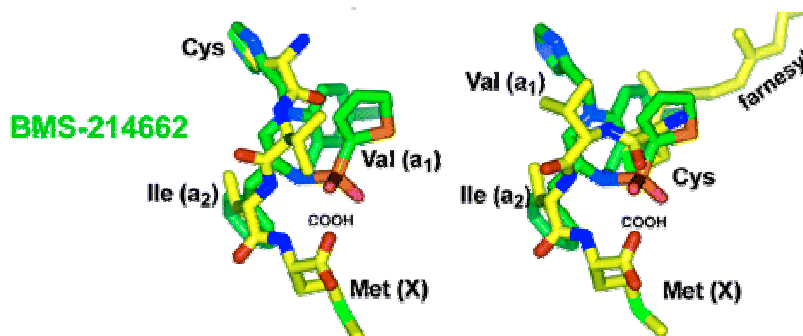


Figure 22 : Superposition du BMS-214662 avec la « boîte CA₁A₂X »

B. Les mimétiques du farnésylpyrophosphate (FPP)

Les inhibiteurs de FTase analogues du FPP présentent plusieurs avantages par rapport aux inhibiteurs bisubstrats ou peptidomimétiques de CA₁A₂X du fait qu'ils sont de petite taille et non peptidiques. Pour apporter le caractère inhibiteur aux analogues structuraux du FPP (empêcher qu'il soit substrat de la FTase), le groupement pyrophosphate a été remplacé par des groupements monophosphonate, hydroxyphosphonylméthylphosphonate (Pompliano et al., 1992), β-phosphonophénylalaninate (Lamothe et al., 1996) ou β-phosphonothréoninate (Bell, 2000), biphosphonate ou carboxyphosphonate (Holstein et al., 1998), 2,3,6-trifluoro-5-hydroxy-4-nitrophénoxy (Barber et al., 1999) ou encore aspartate (Schlitzer et al., 1999).

L'acide *E,E,E*-α-hydroxyfarnésylphosphonique inhibe la FTase avec une IC₅₀ de 5 nM. La stéréochimie de la chaîne farnésyle est très importante car, même à la concentration de 1 μM, l'acide *Z,E,E*-α-hydroxyfarnésylphosphonique, n'inhibe la FTase qu'à 60% (Hohl et al., 1998) (figure 23).

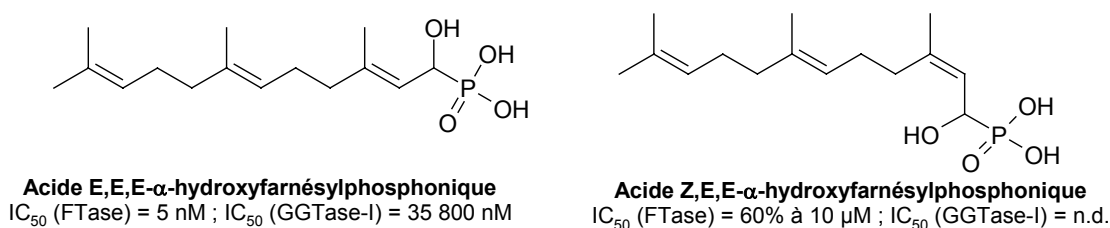


Figure 23 : FTis mimétiques du FPP

Les chercheurs de Bristol-Myers ont inséré un groupement amide reliant la chaîne farnésyle au groupement β-carboxyphosphonate et ont ainsi obtenu les dérivés décrites dans la figure 24 (Patel et al., 1995b).

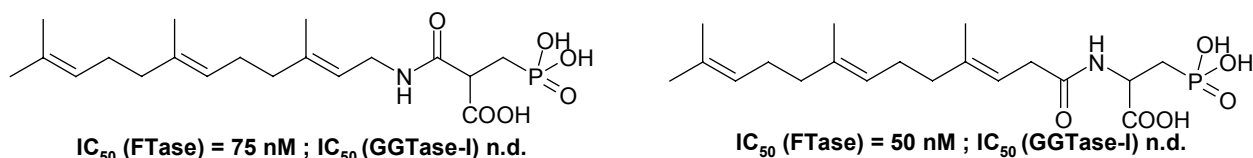


Figure 24 : FTis Bristol-Myers Squibb mimétiques du FPP

La recherche d'inhibiteurs analogues et compétitifs du FPP reste cependant freinée par le fait qu'ils risquent d'agir également sur d'autres enzymes reconnaissant le FPP. En effet, le FPP étant un intermédiaire important dans la biosynthèse du cholestérol, l'inhibition non sélective d'autres enzymes telles que la squalène synthétase (SSase) provoquerait des effets secondaires importants.

C. Les mimétiques de l'état de transition

Les composés bisubstrats préparés par le groupe Bristol-Myers Squibb sont basés sur un modèle hypothétique du site actif dans lequel le groupement thiol de la « boîte CA₁A₂X » attaque le carbone allylique du FPP par réaction nucléophile (Bhide et al., 1994). Leur stratégie a consisté à connecter un groupement mimétique du motif CA₁A₂X contenant un acide carboxylique, phosphonique ou phosphinique à la chaîne farnésyle du FPP (Patel et al., 1995a).

Ainsi, les composés **BMS-186511** et **BMS-184467** (figure 25) ont respectivement des IC_{50} de 10 et 6 nM envers la FTase et présentent une bonne sélectivité FTase/GGTase-I. Mais ces composés étant chargés, ils sont incapables de pénétrer dans la cellule. *In vitro*, à une concentration de 100 μ M, les esters méthyliques pro-drugs de ces composés inhibent de 75 à 80% la croissance des cellules transformées par l'oncogène H-ras sans manifestation de cytotoxicité. Les travaux ne mentionnent pas encore d'essais cliniques ou *in vivo* (Manne et al., 1995).

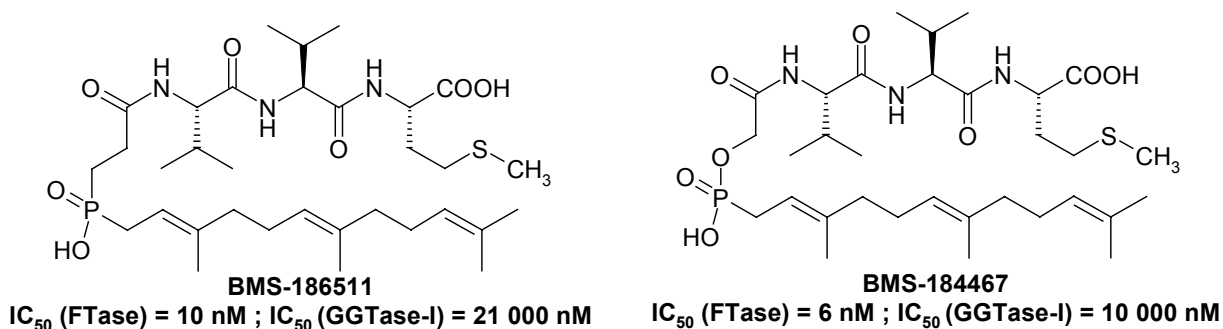


Figure 25 : Inhibiteurs bisubstrats terpéniques

Une série d'inhibiteurs bisubstrats contenant le motif 1-(4-cyanobenzyl)-5-méthylimidazole a été décrite (Lannuzel et al., 2003). Son meilleur composé (figure 25) présente une IC_{50} de 6 nM sur enzyme isolée mais n'inhibe que très peu la farnésylation de H-Ras dans les cellules (IC_{50} = 1 μ M).

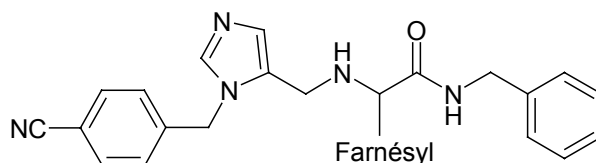
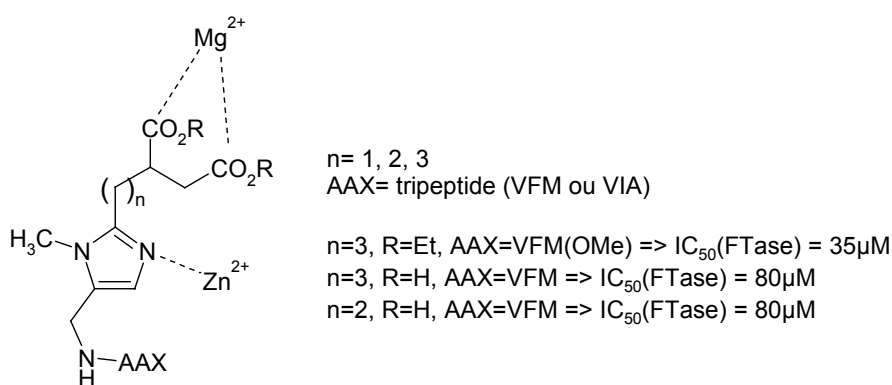


Figure 26.: Inhibiteur bisubstrat non terpénique

Des inhibiteurs mimétiques de l'état de transition ont été conçus avec un fragment 1,4-diacide carboxylique chélatant le magnésium, mimant le pyrophosphate du FPP, l'imidazole 2,5-disubstitué chélatant le zinc substitué par un tripeptide AAX se logeant dans le site de fixation de la « boîte CA₁A₂X » (de Figueiredo et al., 2007). Les meilleurs composés (figure 27) n'inhibent la FTase qu'à 35 ou 80 μ M. Des études de cinétique démontrent que les imidazoles 2,5-disubstitués ne sont pas des analogues bisubstrats et seul le deuxième composé est compétitif du motif CA₁A₂X.



n= 1, 2, 3
AAX= tripeptide (VFM ou VIA)

n=3, R=Et, AAX=VFM(OMe) => IC₅₀(FTase) = 35 μ M

n=3, R=H, AAX=VFM => IC₅₀(FTase) = 80 μ M

n=2, R=H, AAX=VFM => IC₅₀(FTase) = 80 μ M

Figure 27 : Inhibiteurs mimétiques de l'état de transition

II. Découverte de FTis par criblage de chimiothèques

Deux types de chimiothèques, avec des structures bien différentes, ont été criblées sur la FTase :

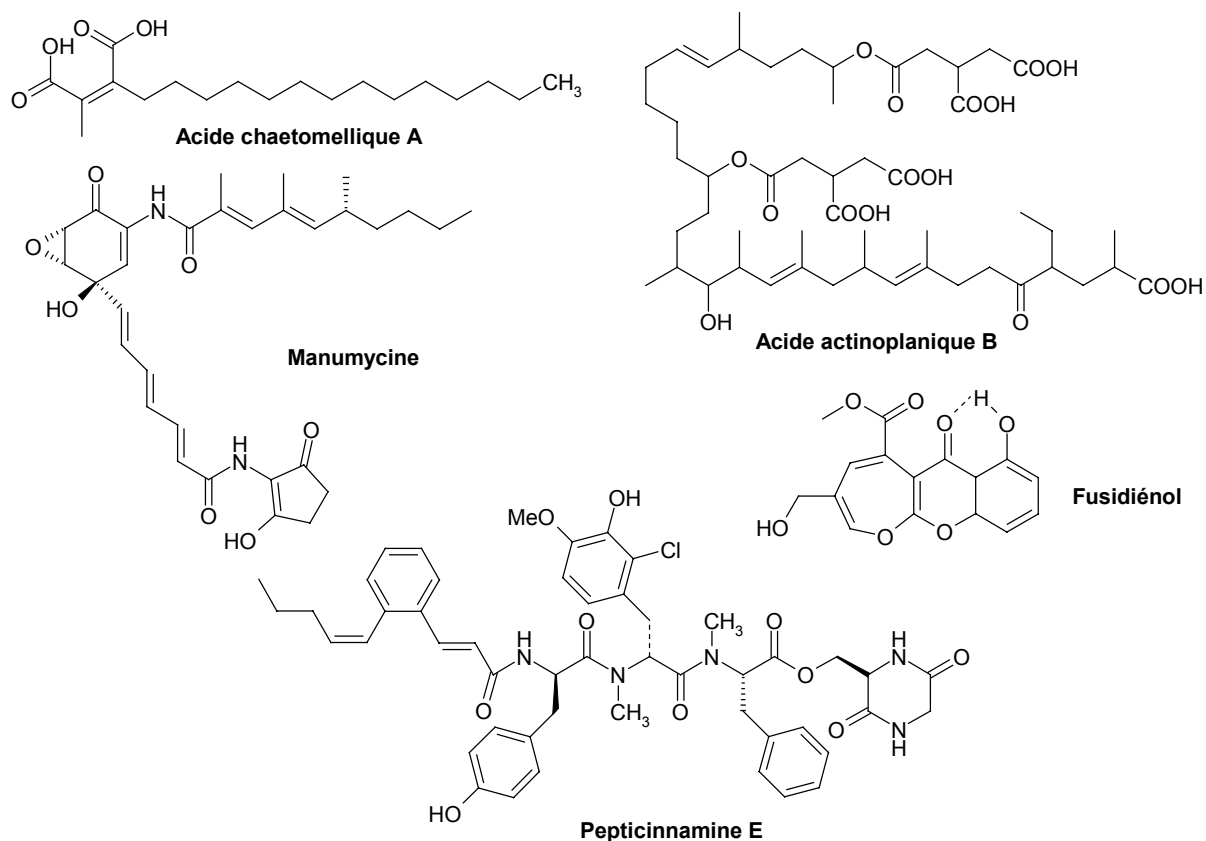
- Les librairies de composés issus d'extraits de produits naturels
- Les chimiothèques de composés préparés initialement dans le traitement d'autres pathologies.

A. Les composés naturels

De nombreux inhibiteurs de la FTase ont été découverts par screening de chimiothèques de produits naturels isolés de microorganismes ou de plantes. Beaucoup de ces composés n'ont subi aucune modification chimique. Même si leurs structures ne sont souvent pas comparables à celles des substrats naturels, ils agissent dans la plupart des cas de façon compétitive, du peptide ou du FPP (figure 28).

L'acide actinoplanique B et l'acide chaetomellique A sont des inhibiteurs compétitifs du FPP, sélectifs de la FTase vis-à-vis de la GGTase-I et de la squalène

synthétase (SSase) (Silverman et al., 1997). Les groupements chargés carboxy mimeraient le groupement diphosphate et les chaînes lipophiles occuperaient l'espace utilisé par le motif isoprène (Qian et al., 1997). La manumycine est compétitive du FPP (Hara et al., 1993). Elle a montré une activité antitumorale envers les tumeurs solides à K-Ras mutée (Hara et al., 1995). Le fusidiénol n'est compétitif ni du FPP, ni de la protéine Ras et agit selon un mécanisme inconnu (Qian et al., 1997). La pepticinnamine E provient d'une des fractions d'extrait d'actinobactéries (Shiomi et al., 1993). Elle mime les deux substrats (Omura et al., 1993).



Inhibiteur	IC ₅₀ (nM)	
	FTase	GGTase I
Acide chaetomellique A	55	92 000
Acide actinoplanique B	50	> 1 000
Manumycine	5 000	180 000
Fusidiénol	300	Inactif
Pepticinnamine E	300	Inactif

Figure 28 : FTis issus de produits naturels

Une cinquantaine d'analogues de la pepticinnamine E ont été préparé par synthèse en phase solide et seul une vingtaine se sont révélés actifs dans les conditions de cette étude (figure 29) (Thutewohl et al., 2003a ; Thutewohl et al., 2003b). Les études cinétiques révèlent que certains de ces inhibiteurs sont compétitifs du substrat peptidique, du farnésylpyrophosphate ou des deux substrats.

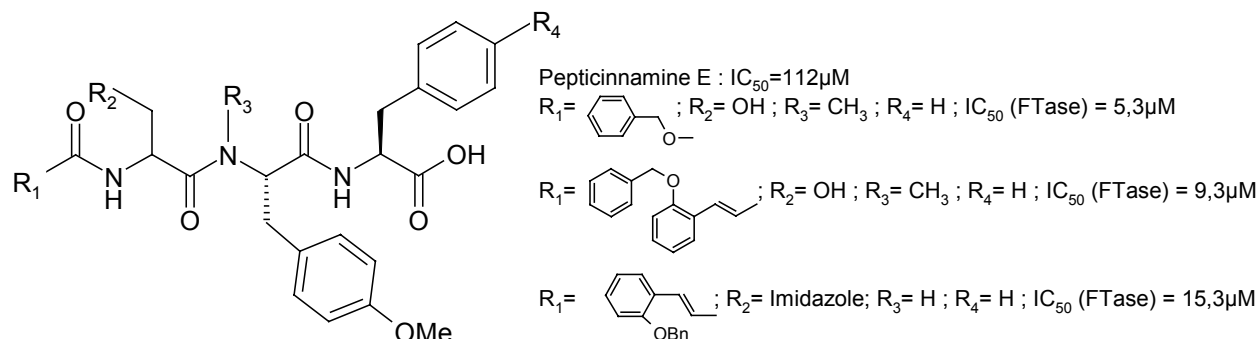


Figure 29 : Analogues de la pepticinnamine E

Le screening d'une librairie d'inhibiteurs de SSase par le groupe Banyu Pharmaceuticals a permis de découvrir le **J-104,133**, structuralement différent du FPP mais dont il reste compétitif. Il inhibe la FTase avec une IC_{50} de 3,4 μ M. Après optimisation, le composé **J-104,134** inhibe la FTase avec une IC_{50} de 5 nM. **J-104,135** est le plus actif des stéréoisomères (figure 30) (Aoyama et al., 1998).

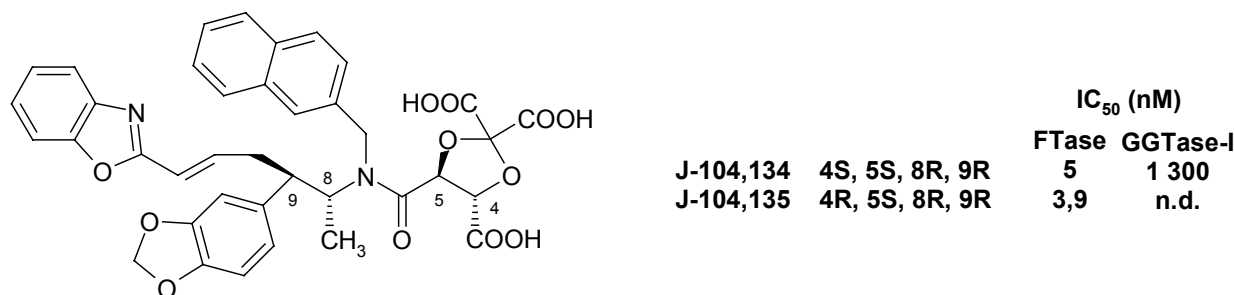


Figure 30 : Composés naturels inhibiteurs de la FTase et compétitifs du FPP

B. Les composés synthétiques

Le criblage des librairies de firmes pharmaceutiques a conduit, après optimisation de leur structure, à la découverte de deux composés actuellement en essais cliniques.

- **L'inhibiteur R11577 (Tipifarnib, Zarnestra®) :**

Le criblage d'une chimiothèque de 3 300 composés par le groupe Johnson and Johnson a permis d'identifier une quinoléine substituée, le **R89154**, modérément active sur la FTase (Venet et al., 2003). Plusieurs modulations ont conduit au composé **R115777** qui inhibe sélectivement la FTase avec une IC_{50} de 7,9 nM (figure 31).

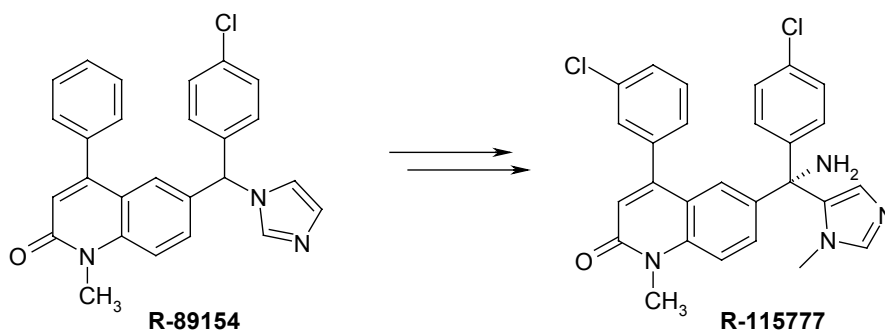


Figure 31 : Obtention du R115777

Des études par co-cristallisation (Reid et al., 2004a) ont récemment permis de définir son mode de fixation (figure 32). Il se fixe de façon compétitive dans le site actif en interagissant avec la troisième unité isoprénoïde du FPP. L'inhibiteur adopte une forme en U, stabilisée par stacking entre les noyaux para et méta chlorophényle. L'azote distal de l'imidazole chélate l'atome de zinc. L'inhibiteur forme des liaisons hydrogène par l'intermédiaire de molécules d'eau entre l'atome d'oxygène du carbonyle de la quinoléinone et Phe360 β de la protéine et entre l'amine primaire et l'atome d'oxygène du groupement α -phosphate du FPP. Les autres interactions formées par le **R115777** avec l'enzyme et le fragment farnésyle du FPP sont uniquement de type Van der Waals. Des interactions aromatique-aromatique sont relativement nombreuses : le para-chlorophényle interagit avec le farnésyle du FPP, le noyau quinoléinone avec Tyr361 β et le métachlorophényle avec Trp102 β et Trp106 β .

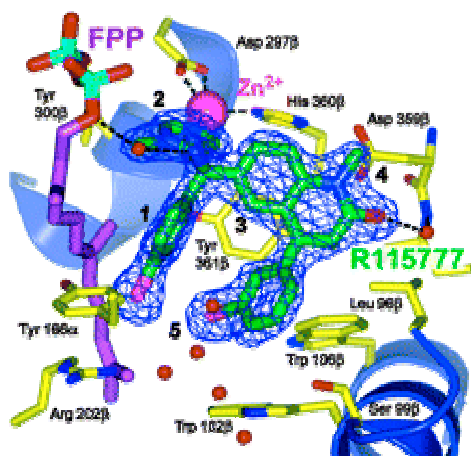


Figure 32 : Co-cristallisation du Tipifarnib avec la FTase

La superposition, dans le site actif de l'enzyme, de l'inhibiteur avec le peptide CVIM, substrat de la FTase (Reid et al., 2004a) montre comme pour le **BMS-214662** qu'il ne mime que la partie CA₁A₂.

De par sa structure chimique, le Tipifarnib présente plusieurs insuffisances au niveau pharmacocinétique. Plusieurs modulations ont donc été effectuées (figure 33). Pour augmenter la solubilité et donc la biodisponibilité, l'imidazole a été remplacé par un 1,2,4-triazole et un tétrazole (Angibaud et al., 2003b). Le triazole apporte une inhibition enzymatique analogue à l'imidazole alors que le tétrazole la réduit. Afin d'empêcher la déméthylation de l'azote quinoléinique, le N-méthyle a été rigidifié dans un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons entre les sommets 1 et 8 de la quinolinone.

Des résultats similaires au Tipifarnib sont obtenus avec la pyrrolidine (n=1) (Angibaud et al., 2003a). Un tétrazole a également été inséré entre les sommets 1 et 2 de la quinoléine ou de la quinazoline, conférant une inhibition de la FTase analogue au Tipifarnib (Angibaud et al., 2003c). Des études de modélisation moléculaire ont suggéré le remplacement du groupement 4-chlorophényle par d'autres hétérocycles (Angibaud et al., 2007). Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'imidazole en position 1 de la quinazoline et substitué en position 2 de l'imidazole par un benzyle.

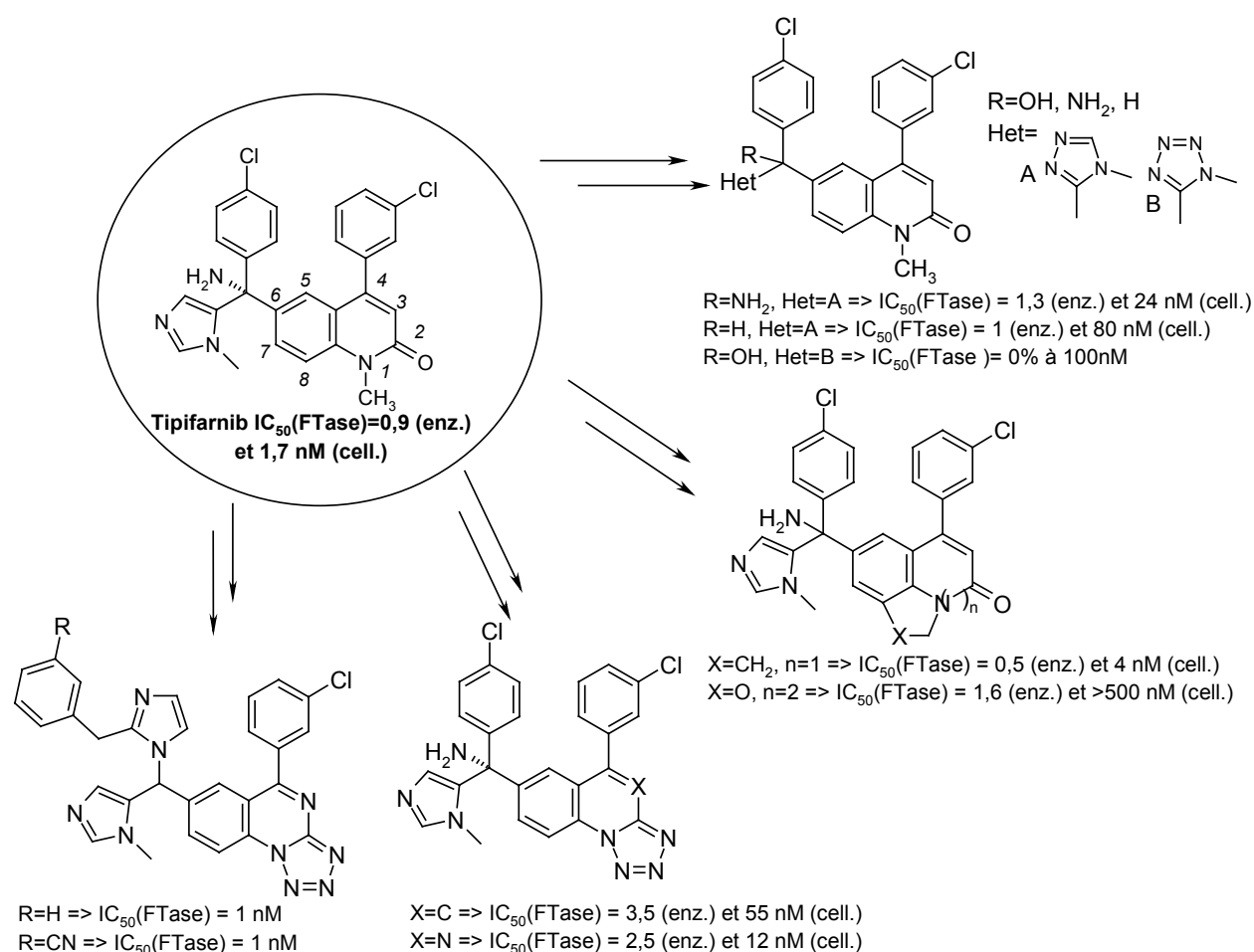


Figure 33 : Modifications du Tipifarnib

• L'inhibiteur SCH66336 (Lonafarnib, Sarasar[®]) :

Le criblage des chimiothèques de dérivés d'antihistaminiques de Schering-Plough a permis de sélectionner le composé tricyclique **SCH-44342**, actif envers la FTase avec une IC_{50} de 250 nM (Bishop et al., 2001) (schéma 34). Une molécule trihalogénée est le résultat de plusieurs modulations; le **SCH-66336** possède une bonne sélectivité envers la FTase ($IC_{50} = 2$ nM) et une bonne biodisponibilité (Taveras et al., 2003).

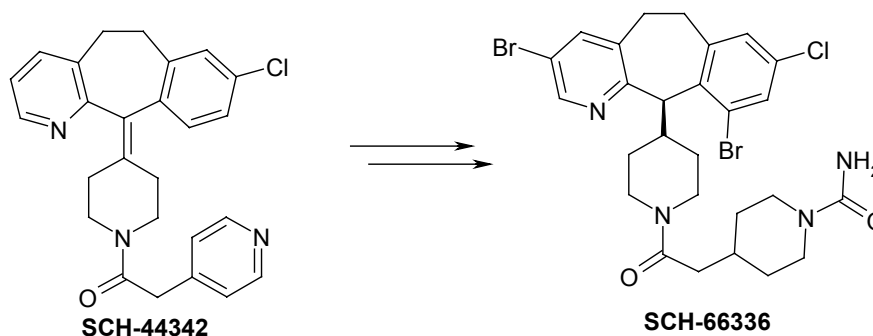


Figure 34 : Obtention du SCH-66336

Des études par co-cristallisation avec la FTase (Strickland et al., 1999) ont permis de déterminer son mode d'interaction avec l'enzyme (figure 35). Il n'y a pas de chélation du zinc et le tricyclic forme un stacking avec la partie isoprénoïde du FPP. Plus tard, en connaissant le mécanisme de farnésylation, il a été démontré (Long et al., 2002) que le SCH-66336 mimait à la fois la conformation étendue et coudée de la « boîte CA₁A₂X » (figure 35).

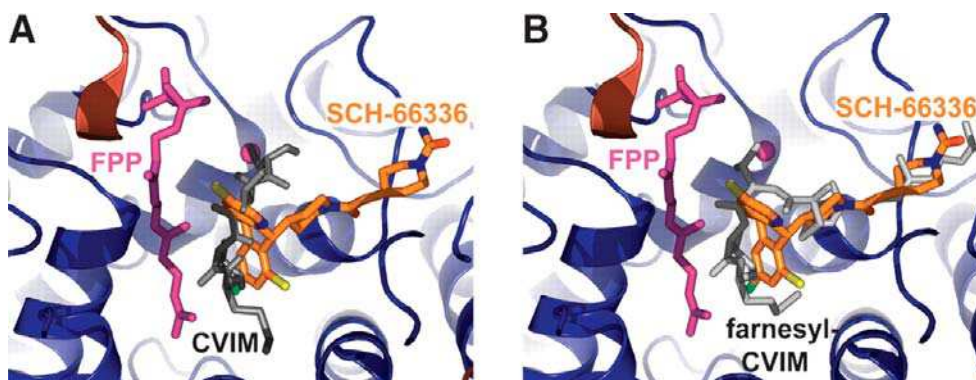


Figure 35 : Co-cristallisation du SCH-66336 avec la FTase et sa superposition avec le peptide CVIM en conformation étendue (A) et avec le peptide CVIM farnésylé en conformation coudée (B)

D'autres structures comportant un ensemble tricyclique (figure 36), dérivés du **SCH-66336**, ont été conçues. Ces composés comportent un groupement chélateur de zinc tel que l'imidazole (Huang et al., 2006) ou une pipérazine fixée directement sur le tricyclic (Njoroge et al., 2006).

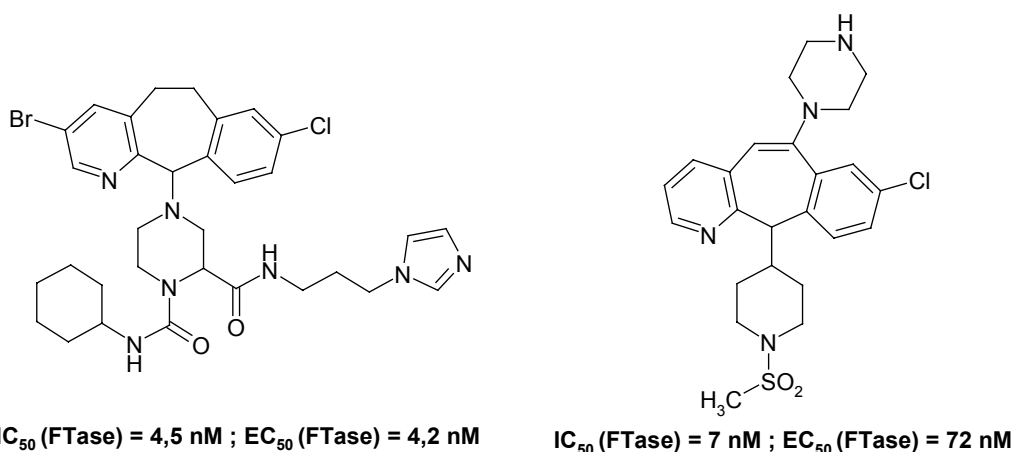
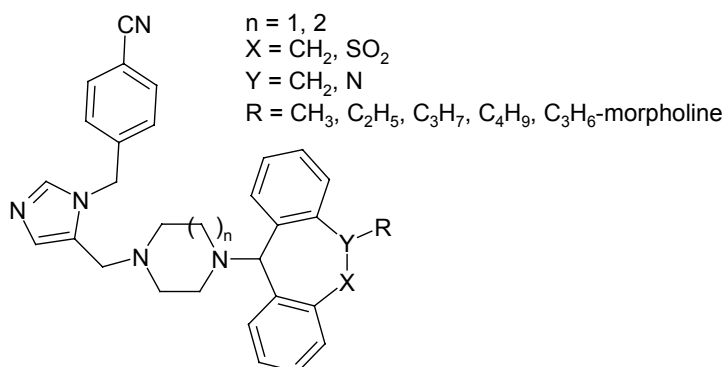


Figure 36 : FTis tricycliques dérivés du **SCH-66336**

Des dérivés tricycliques ont également été préparés au laboratoire. Ces molécules associent un groupement chélateur de zinc et un tricycle (figure 37) (Gilleron et al., 2007). Les meilleures activités (FTase et cellulaire) sont obtenus avec le tricycle dioxodibenzothiazépine substitué par un groupement propylmorpholine.



$n = 2; X = \text{SO}_2; Y = \text{N}; \text{C}_3\text{H}_6\text{-Morph} \Rightarrow \text{IC}_{50}(\text{FTase}) = 17\text{nM}; \text{IC}_{50}(\text{PC3}) = 27\mu\text{M}$

Figure 37 : FTis possédnt un tricycle et un chélateur de zinc

**CONCEPTION ET
EVALUATION PHARMACOLOGIQUE
DE NOUVEAUX INHIBITEURS POTENTIELS DE
FARNESYLTRANSFERASE**

La prise en considération de la spécificité des différentes familles d'inhibiteurs de farnésyltransférase nous a conduit à concevoir des inhibiteurs mimétiques de la « boîte CA₁A₂X ». En effet, le FPP sert de substrat pour plusieurs enzymes et participe à la biosynthèse du cholestérol. Un composé mimant le FPP risquerait donc de perturber d'autres processus enzymatiques.

Au sein de notre laboratoire, de nombreux FTis ont été préparés. Les premiers d'entre eux étaient directement inspirés de l'inhibiteur historique, le peptide CVFM. Ces FTis étaient de nature peptidique et comportaient d'un côté, un résidu cystéine qui chélate l'atome de zinc et de l'autre côté un analogue du résidu méthionine conférant la sélectivité FTase vis-à-vis de la GGTase-I. Les deux groupements sont disposés pour une interaction optimale avec le site actif de l'enzyme.

Initialement de nature peptidique et soufrée, les inhibiteurs de FTase du laboratoire ont ensuite évolué vers des composés non-peptidiques non soufrés. La diversité de ces FTis a enrichi les données de relations structure-activité, permettant ainsi le développement d'un modèle de pharmacophore (figure 1). De plus, les diverses études publiées de cristallisation de l'enzyme (Long et al., 2002 ; Long et al., 2004) ont permis d'effectuer le docking de ces molécules, permettant ainsi de déterminer leur mode de fixation et leurs interactions avec les différents éléments du site actif de la FTase.

A partir de ce modèle de pharmacophore, différentes séries de composés ont été préparées en modulant les trois éléments du pharmacophore. Chacune de ces séries est centrée autour d'un espaceur, souvent maintenu constant, qui est généralement un hétérocycle. Les modulations se font au niveau du groupement hydrophobe et parfois également au niveau du groupement chélateur de zinc.

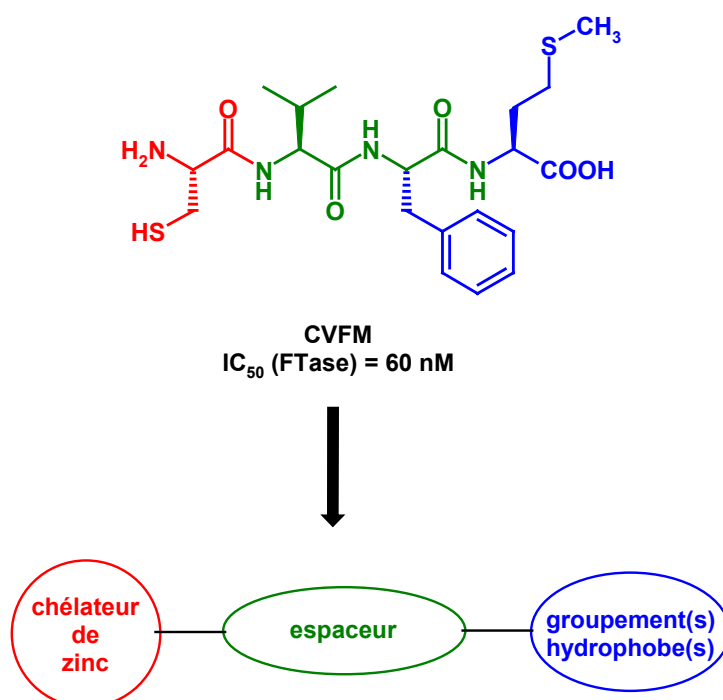


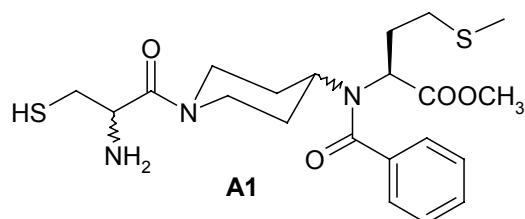
Figure 1 : Conception de nouveaux inhibiteurs potentiels de farnésyltransférase

I. Conception d'un nouvel espaceur de type 4-aminopipéridine-2-carboxylate de méthyle

Les premiers travaux sur les FTis consistaient à la suppression progressive du caractère peptidique en modulant, successivement, les trois éléments du pharmacophore. La partie A₁A₂ a d'abord été remplacée par divers espaceurs aromatiques (biphényle) ou hétérocycliques (pipéridine ou pipérazine), puis la cystéine par un imidazole et enfin le facteur de sélectivité X, la méthionine, par d'autres acides aminés ou des substituants hydrophobes.

A. Présentation des premiers FTis préparés au laboratoire

L'un des premiers espaceurs utilisés au laboratoire pour concevoir des inhibiteurs de FTase est le *N*-(4-pipéridinyl)benzamide (Houssin et al., 2002). Les modulations concernaient principalement la nature de l'acide aminé porté par l'amine exocyclique. Le groupement chélateur de zinc, maintenu constant, est la cystéine. Le méthioninate de méthyle apportait les meilleurs résultats enzymatiques avec cependant une absence d'activité au niveau cellulaire (figure 2).

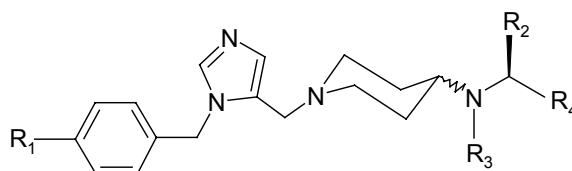


IC₅₀ (FTase) = 22 nM ; IC₅₀ (GGTase-I) >100 nM

Figure 2 : Composé A1 avec un espaceur *N*-(4-pipéridinyl)benzamide (Houssin et al., 2002)

Dans un second temps, d'autres modulations ont été réalisées dans le but d'affiner les relations structure-activité et d'augmenter l'activité cellulaire (tableau 1). La faible stabilité de la cystéine a conduit à son remplacement par le benzylimidazole substitué par le groupement R₁ dont l'influence du caractère électronique a été étudiée en utilisant des groupements électrodonneurs tels que le méthyle et le méthoxy et des groupements électroattracteurs tels que le trifluorométhyle et le groupement cyano. Ensuite, afin de favoriser les interactions avec la cavité hydrophobe de l'enzyme, la nature des groupements R₂ (*tert*-butyle, benzoyle ou éthylméthylsulfure), R₃ (benzoyle ou benzyle) et R₄ (fonction acide ou ester méthylique) portés par l'amine exocyclique a été modifiée.

L'inhibition de la FTase augmente lorsque le groupement R₁ est électroattracteur (nitrile et trifluorométhyle) alors qu'elle diminue quand R₁ est électrodonneur (méthyle et méthoxy). La méthionine (A6), la phénylalanine (A7) ou l'isoleucine (A8) apporte, comme prévu, la sélectivité sur la FTase vis-à-vis de la GGTase-I. Les acides A9 et A10 étant moins actifs que leur esters correspondants A6 et A7, ces composés ne sont donc pas des prodrugs. Le méthioninate de méthyle (A6) apporte la meilleure inhibition de la FTase (IC₅₀ = 5 nM) et le remplacement de la fonction amide par une fonction amine (A11) augmente le pouvoir inhibiteur (IC₅₀ = 2 nM).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (nM)	
					FTase	GGTase-I
A1					22	>100
A2	H	(CH ₂) ₂ SCH ₃	COC ₆ H ₅	COOCH ₃	397	n.d.
A3	CH ₃	(CH ₂) ₂ SCH ₃	COC ₆ H ₅	COOCH ₃	600	n.d.
A4	CF ₃	(CH ₂) ₂ SCH ₃	COC ₆ H ₅	COOCH ₃	44	n.d.
A5	OCH ₃	(CH ₂) ₂ SCH ₃	COC ₆ H ₅	COOCH ₃	575	n.d.
A6	CN	(CH₂)₂SCH₃	COC₆H₅	COOCH₃	5	> 2 000
A7	CN	CH ₂ C ₆ H ₅	COC ₆ H ₅	COOCH ₃	22	> 2 000
A8	CN	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	COC ₆ H ₅	COOCH ₃	33	> 2 000
A9	CN	(CH ₂) ₂ SCH ₃	COC ₆ H ₅	COOH	10	> 2 000
A10	CN	CH ₂ C ₆ H ₅	COC ₆ H ₅	COOH	54	> 2 000
A11	CN	(CH₂)₂SCH₃	CH₂C₆H₅	COOCH₃	2	> 2 000

Tableau 1 : Résultats pharmacologiques des composés formés d'un cycle 4-aminopipéridine et du 1-(4-cyanobenzyl)imidazole (Millet et al., 2004)

Les composés **A6** et **A11** montrent une bonne inhibition de la FTase (tableau 2). La présence de l'imidazole en tant que groupement chélateur de zinc est gage de l'existence d'une bonne activité enzymatique. De plus, la présence du groupement méthioninate de méthyle assure la sélectivité FTase vis-à-vis de la GGTase-I. La molécule **A6** possède un pouvoir d'inhibition de la prolifération cellulaire des lignées L-1210 (cellules leucémiques murines) et DLD-1 (lignée cancéreuse du côlon, K-ras mutée).

	IC ₅₀ (nM)		EC ₅₀ (µM)	
	FTase	GGTase-I	L-1210	DLD-1
A1	22	>100	>10	18,1
A6	5	>2000	0,02	9,20
A11	2	>2000	>5	12,9

Tableau 2 : Résultats pharmacologiques des FTis **A1**, **A6** et **A11** (Millet, 2004)

Le docking de la molécule **A11** (figure 2) dans le site actif de l'enzyme permet de définir son mode de fixation. L'azote distal de l'imidazole chélate l'atome de zinc. Le groupement cyanobenzyle de l'imidazole crée des interactions de type stacking avec la chaîne isoprénoïque du FPP. La méthionine (sous forme d'ester méthylique) et le benzoyle interagissent par des interactions de type électrostatique avec la

cavité hydrophobe définie par les acides aminés Trp102 β , Trp106 β et Tyr361 β . Les groupements aroyle et benzyle de l'inhibiteur participent à une interaction intramolécule de type aromatique-aromatique conférant une forme en U à l'inhibiteur.

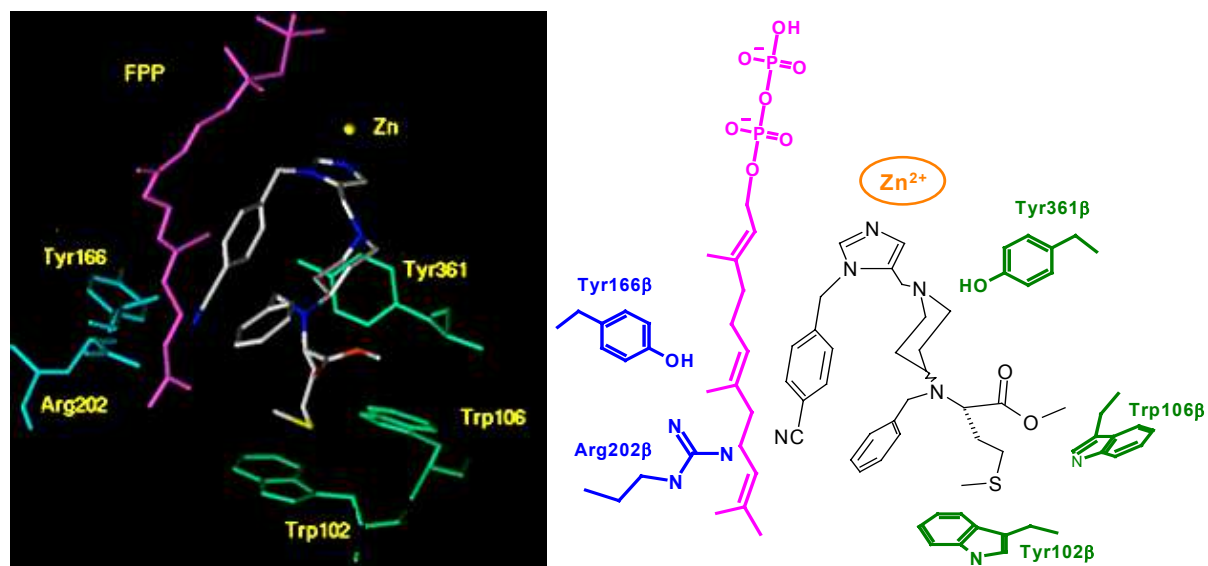


Figure 3 : Docking du composé A11 dans le site actif de la FTase (Millet et al., 2004).

B. Conception de nouveaux inhibiteurs

Les travaux antérieurs autour de l'espaceur 4-aminopipéridinique ont permis l'obtention d'inhibiteurs de FTase actifs et sélectifs (vis-à-vis de la GGTase-I). Néanmoins, l'activité cellulaire n'étant pas satisfaisante et diverses modifications ont donc été entreprises (figure 3) :

✓ Le docking du composé A11 dans le site actif de la FTase (Millet et al., 2004) montre que l'atome de carbone 2 de la pipéridine se trouve à proximité de l'hydroxyle phénolique de Tyr361 β (figure 3) ; une liaison hydrogène avec cette fonction est susceptible d'augmenter l'activité enzymatique. De plus, cet acide aminé étant une leucine dans la GGTase-I, permettrait à cette interaction de privilégier la sélectivité FTase/GGTase-I. Le groupement choisi pour former cette liaison hydrogène est le carboxylate de méthyle mais d'autres substituants tels que des alcools, des acides carboxyliques, des esters ou des amides seront envisagées.

✓ L'atome de soufre de la méthionine s'oxydant facilement en sulfone, d'autres groupements ont été envisagées en R₁. Le phénylalaninate de méthyle, présent dans le composé A7 (IC₅₀ (FTase) = 22 nM), a d'abord été testé. Ensuite, différents groupements hydrophobes aromatiques (benzoyle, naphtoyle, biphényle) ou aliphatiques (adamantanyle) ont été utilisés (figure 4).

Les composés de cette série comportant deux carbones asymétriques C2 et C4. La voie de synthèse a été choisie afin de séparer le composé 2S du composé 2R et de préparer deux séries de diastéréoisomères: ceux de la série 2S et ceux de la série 2R. La stéréochimie en position 4 n'étant pas maîtrisée en cours de synthèse, les produits finaux sont obtenus sous forme de mélange des deux énantiomères dont la séparation est envisagée en fonction de la qualité des résultats pharmacologiques.

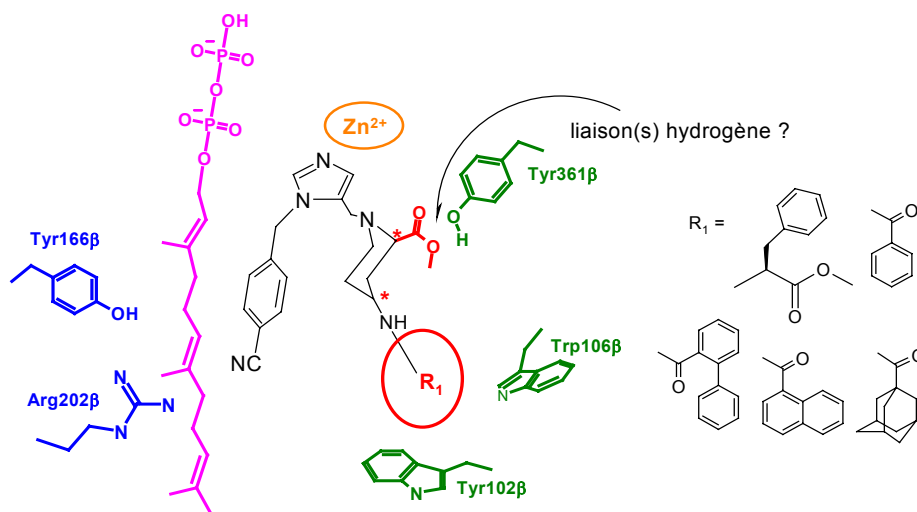


Figure 4 : Conception des inhibiteurs de la série B

C. Résultats pharmacologiques

L'évaluation pharmacologique des composés de la série B se fait systématiquement par mesure de l'inhibition de farnésylation et par mesure de l'inhibition de prolifération cellulaire (tableau 3). J'ai réalisée personnellement la mesure de l'inhibition de la FTase à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette (Essonne). La méthode utilisée pour évaluer l'activité enzymatique met en jeu un substrat peptidique fluorescent (dansyl-GCVLS) dont la fluorescence augmente avec sa farnésylation, permettant ainsi de mesurer l'inhibition de farnésylation (Cassidy et al., 1995). Le pouvoir anti-prolifératif est évalué au laboratoire par le test MTT sur deux lignées cellulaires hormono-indépendantes du cancer de la prostate : DU145 (à métastases cérébrales) et PC3 (à métastases osseuses). Ces deux phénotypes cellulaires ont été choisies en raison de leur résistance marquée aux anticancéreux.

Le prodrug du **L-739750** (IC_{50} (FTase) = 1,8 nM), le **L-744832** (Calbiochem), a été utilisé comme composé de référence (figure 5). Il a été choisi en raison de son utilisation classique comme FTi de référence. Il est décrit avec des IC_{50} (PC3) = 225 nM et IC_{50} (DU145) = 20 μ M (Sepp-Lorenzino et al., 2001), qui, dans notre modèle, sont respectivement de 75 μ M et de 78 μ M. De plus, une étude *in vivo* sur des souris xénogreffées, montre à 30 mg/kg une diminution de la tumeur de 85 % sur DU145 et de 87 % sur PC3 (Sirotnak et al., 2000).

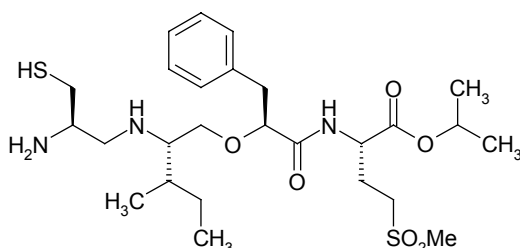


Figure 5 : Inhibiteur de référence L-744832

L'espaceur 4-aminopipéridine-2-carboxylate de méthyle substitué par le 4-cyanobenzylimidazole comme chélateur de zinc contribue à inhiber la FTase de

façon modérée avec des activités enzymatiques de l'ordre du submicromolaire (tableau 3). Le phénylalaninate de méthyle apporte les meilleures activités enzymatiques, avec une IC_{50} de 34 nM pour l'énantiomère 2S (**16**) et de 76 nM pour le 2R (**17**). Les autres groupements hydrophobes amènent à des activités enzymatiques assez inférieures.

De manière inattendue, il ne se dégage pas de corrélation entre le pouvoir inhibiteur de la FTase et la configuration de l'atome de carbone 2. Plusieurs hypothèses ont été émises. Les composés étant testés sous forme de mélange d'épimères 4R et 4S, l'étude précise de leur énantiosélectivité est difficile. De plus, la flexibilité relative du fragment 4-aminopipéridine induit de multiples conformations qui peuvent donc s'agencer de différentes façons dans le site actif de l'enzyme, indépendamment de sa stéréochimie.

Tous ces composés sont des esters hydrolysables, au niveau cellulaire, en leur acide correspondant. Ils sont donc susceptibles d'être des prodrugs. Pour le vérifier, les acides correspondants seront préparés (par saponification), afin de mesurer leur activité enzymatique.

En dépit de leur faible activité enzymatique, la plupart de ces composés sont actifs sur les deux lignées cellulaires testées. Ce résultat inattendu peut s'expliquer, soit par la lipophilie du groupement carboxylate de méthyle, soit par l'inhibition d'une autre cible biologique. Contrairement à l'activité enzymatique, les composés **16** et **17** (avec phénylalaninate de méthyle) sont parmi les moins actifs sur ces deux lignées. Ces composés sont plus actifs sur la lignée DU145 que sur la lignée PC3. A l'exception des composés **41** et **42**, tous les inhibiteurs de la série **B** disposent d'une activité anti-proliférative sur la lignée PC3 (inférieure au composé de référence, le L-744832 ($IC_{50} = 75 \mu\text{M}$) dans notre modèle cellulaire).

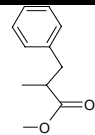



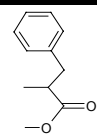



	R ₁	Configuration	IC ₅₀		
			FTase (nM)	DU145 (μM)	PC3 (μM)
A11			2	N.D.	N.D.
L-744832			27	78	75
16		2S	34	79	30% à 100 μM
36		2S	557	21% à 100 μM	16% à 100 μM
37		2S	275	68	47% à 100 μM
38		2S	571	63	48% à 100 μM
17		2R	76	91	90
40		2R	N.D.	N.D.	N.D.
41		2R	443	88	54
42		2R	191	54	71

Tableau 3 : Résultats pharmacologiques des composés de la série **B**

Des études de docking ont été effectuées, par le Docteur Amaury Farce, sur le composé **16**, possédant le phénylalaninate de méthyle, disposant de la meilleure activité enzymatique. Le docking est réalisé à l'aide du programme GOLD sous SYBIL. Ces études s'appuient sur un algorithme génétique qui permet de positionner à partir du squelette du ligand ses descendants conformationnels exerçant le plus d'interactions avec le site actif et engageant le moins de pénalités

(entropie conformationnelle et clash stérique). A partir de fonctions de scoring dix poses sont ensuite sélectionnées et évaluées statistiquement de façon consensus. Ces résultats sont alors investigués grâce à l'œil avisé du modélisateur.

Il adopte une conformation en U. L'atome distale de l'imidazole chélate le zinc et son substituant 4-cyanobenzyle forme des interactions de type stacking avec les doubles liaisons du FPP. Le phényalaninate de méthyle vient se loger dans le « A₂ binding site » formé par Tyr361β, Trp102β et Trp106β. Le groupement carboxylate de méthyle ne forme pas de liaison hydrogène avec la tyrosine mais se positionne à l'entrée de « l'exit groove ».

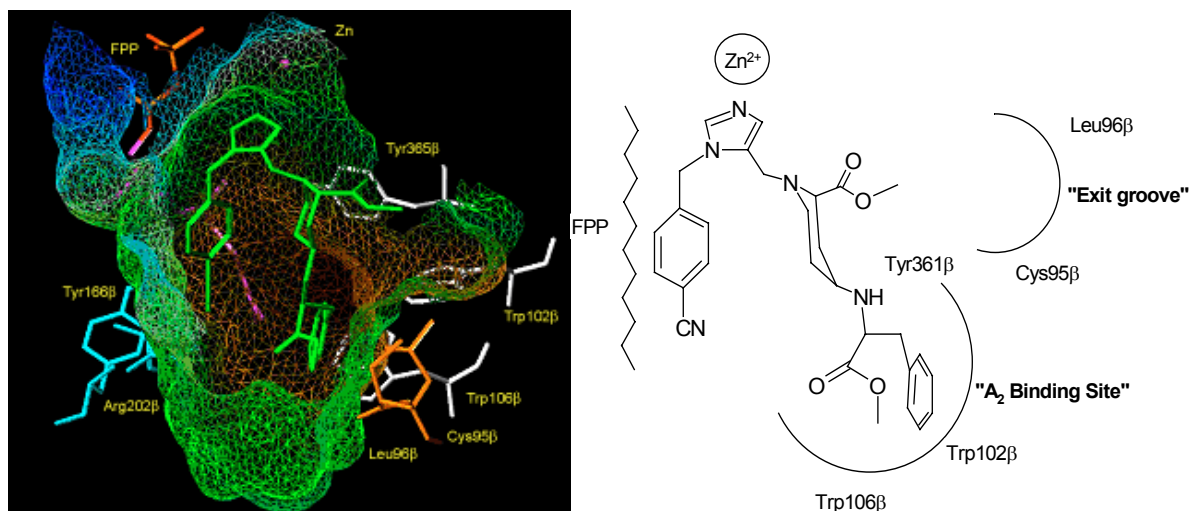


Figure 6 : Docking du composé **16** dans le site actif de la FTase

Autour des composés de la série **B**, plusieurs modifications peuvent être envisagées (figure 7) :

✓ L'ester de méthyle, ne formant pas de liaison hydrogène avec Tyr361β, pourrait être remplacé par un autre groupement tel qu'un alcool, un acide carboxylique ou un amide primaire. Ceux-ci pourraient également être substitués par un groupement plus encombré (alkyle ou aryle), permettant ainsi de mieux interagir avec « l'exit groove ».

✓ La différence d'activité significative entre les amides (**16** et **17**) et les amines (**36-43**) suggère que l'utilisation d'autres acides aminés ou d'autres groupements alkyles hydrophobes améliorerait l'affinité avec le site actif de l'enzyme.

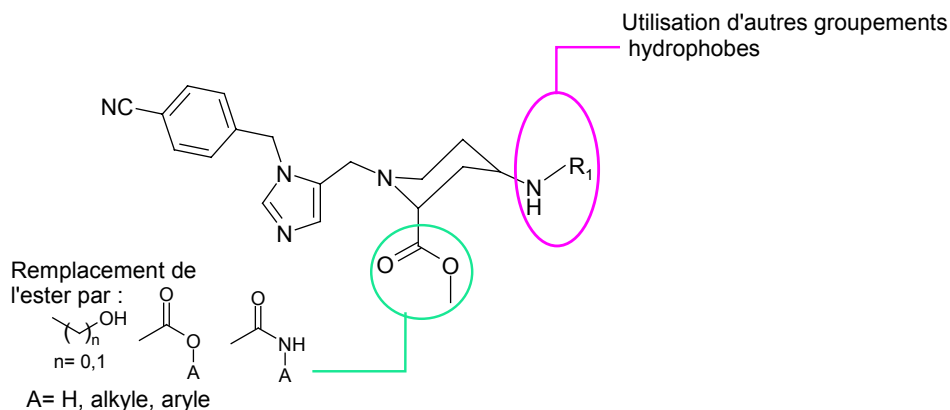


Figure 7 : Modulations envisageables autour de la série **B**

II. Conception d'inhibiteurs avec un espaceur 1,4-diazépanique (série J, K et L)

D'autres composés ont été préparés en prenant en considération les relations structure-activité de la série **B** (figure 7). Une mini chimiothèque de 64 composés, d'une grande diversité et originalité chimique, a donc été préparée, facilement, par synthèse parallèle (figure 8) (Gilleron et al., 2006)

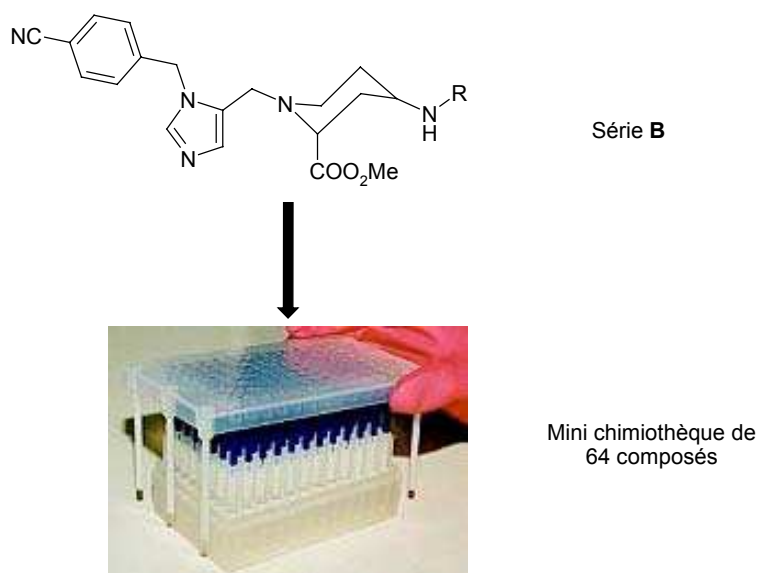


Figure 8 : Conception de la mini-chimiothèque

A. Découverte de « hits » à partir d'une librairie focalisée de 64 composés préparés par synthèse parallèle (Gilleron et al., 2006)

La conception des 64 composés de cette mini chimiothèque est basée sur le modèle de la « boîte CA₁A₂X ». Ces composés se différencient par 8 connecteurs (A₁A₂) et 8 chélateurs (C) différents pour former 64 composés. Les résultats pharmacologiques de la série **B** ont incité à garder la phénylalanine comme facteur de sélectivité. De plus, il a été démontré que des groupements hydrophobes, préférentiellement aromatiques, sont favorables à une sélectivité FTase vis-à-vis de la GGTase-I (deSolms et al., 1995).

Cette mini chimiothèque a été réalisée par synthèse parallèle sur support solide, par la méthode Multipin[®]. Cette méthode est de plus en plus utilisée dans le domaine de la conception de médicaments car elle permet de synthétiser assez rapidement un grand nombre de produits dans des quantités de 4 à 5 mg. Lors de leur séparation des « pins », les produits finaux, fixés à un linker de type « Rink amide » (RAM), sont libérés sous forme d'amides.

Après criblage par un test rapide de prolifération cellulaire (test MTT) sur la lignée cellulaire DU145, huit composés ont été retenus et resynthétisés en solution. Leur activité enzymatique sur la FTase a ensuite été évaluée. Deux molécules, les

composés **C1** et **C7** (figure 9), ont révélé des activités enzymatiques et cellulaires intéressantes.

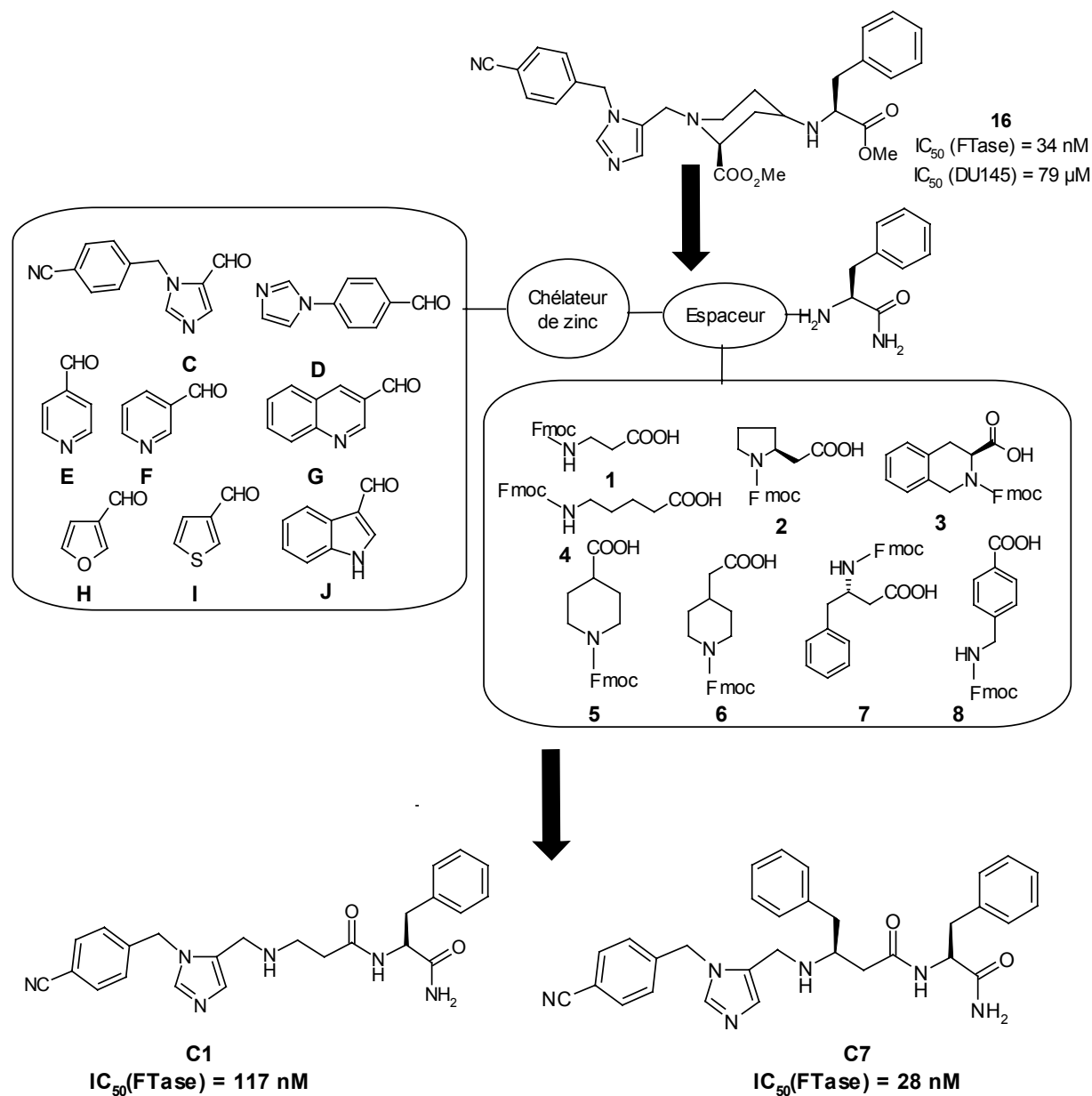


Figure 9 : Découverte de « hits » à partir d'une librairie focalisée de 64 composés

Le docking des deux *hits* met en évidence leur mode d'interaction avec le site actif de la FTase (figure 10). L'atome distal de l'imidazole chélate l'atome de zinc et son substituant 4-cyanobenzyle interagit par stacking avec les doubles liaisons isoprénoïdes du FPP. Le benzyle de l'homophénylalanine se loge dans l'« exit groove » et l'aromatique du phénylalaninamide, dans le « A₂ binding site ». La liaison hydrogène intramoléculaire entre l'oxygène de l'amide et l'hydrogène de l'amine rigidifie l'espaceur, lui conférant une conformation « étendue ».

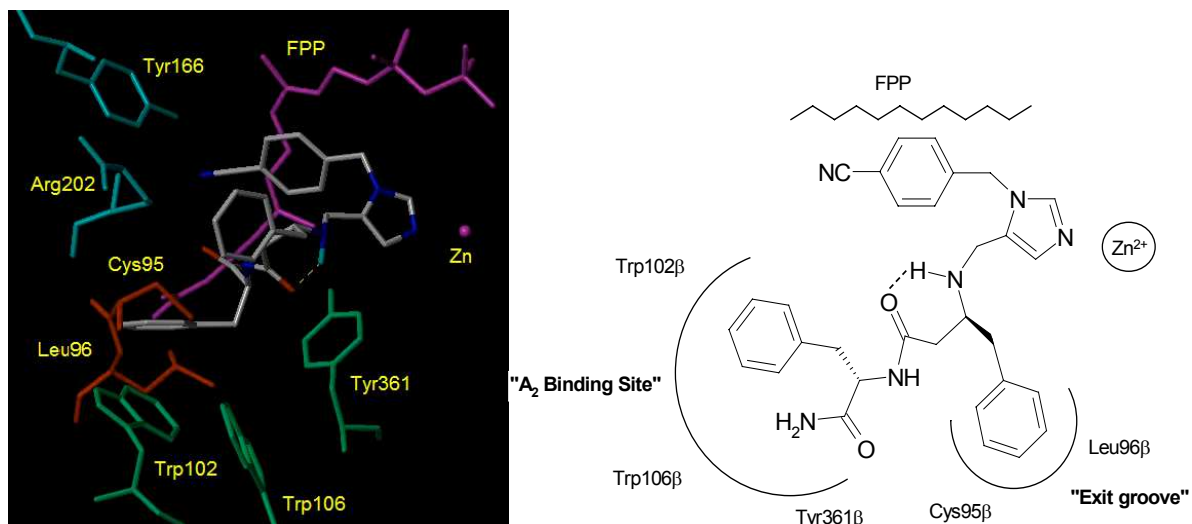


Figure 10 : Docking du composé **C7**

Après farnésylation, la chaîne isoprénoïde vient se loger dans « l'exit groove », entraînant le passage à une conformation coudée de type de β -turn de la « boîte CA_1A_2X ». La superposition de **C7** avec le produit farnésylé montre que l'inhibiteur mime toute la partie peptidique et le premier motif isoprénoïde de la chaîne farnésyle.

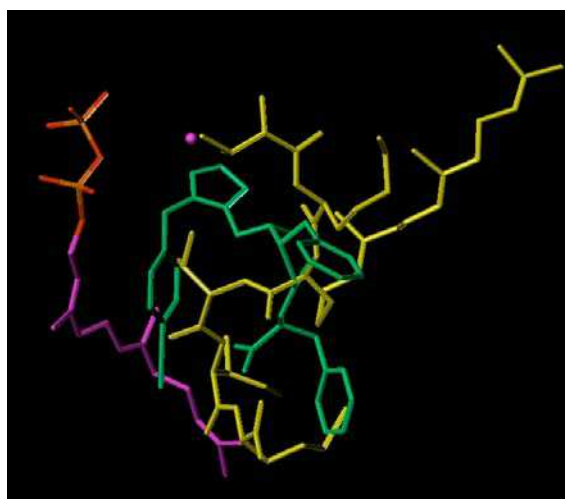


Figure 11 : Superposition du composé **C7** avec la « boîte CA_1A_2X »

B. Conception de l'espaceur 1,4-diazépanique à partir de « hits »

Les études de modélisation moléculaire des composés **C1** et **C7** montrent la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire au niveau du connecteur central (figure 10). Cette interaction intramoléculaire apporte une pseudoforme cyclique à l'homophénylalanine. Cette conformation a donc été mimée en rigidifiant l'espaceur en 1,4-diazépane et en 5-phényl-1,4-diazépane (figure 12).

Une structure de type 1,4-diazépane présente plusieurs avantages. D'abord, d'un point de vue chimique, un tel hétérocycle permet une substitution assez facile de chaque atome d'azote par synthèse parallèle sur phase solide. Ensuite, le

maintien d'au moins un des deux atomes d'azote sous forme d'amine tertiaire, permet d'obtenir ces composés sous forme de sel, augmentant leur hydrosolubilité.

Le diazépane est substitué sur un premier atome d'azote par un groupement hydrophobe R_2 et sur le deuxième atome d'azote par le groupement chélateur de zinc. Le screening de la librairie montre que le groupement chélateur de zinc apportant la meilleure inhibition de la FTase reste le para-cyanobenzylimidazole. Ce dernier est donc présent sur toutes les molécules de ces séries (figure 12).

Le 1,4-diazépane est à l'origine de trois séries de composés (figure 12). Dans un premier temps, les modulations du 1,4-diazépane sont effectuées au niveau de R_2 avec une vingtaine de groupements hydrophobes, pour donner la série J. Les relations structure-activité de FTis montrent que l'ajout d'un substituant sur le connecteur central augmente de façon importante l'activité enzymatique. Dans cette optique, le 5-phényl-1,4-diazépane a donc été préparé. Cet hétérocycle est substitué, d'abord, en position 1 par le groupement chélateur de zinc et en position 4 par 6 groupements hydrophobes de la série J, formant ainsi la série L. Ensuite, la position de ces deux substituants est inversée pour conduire à la série K.

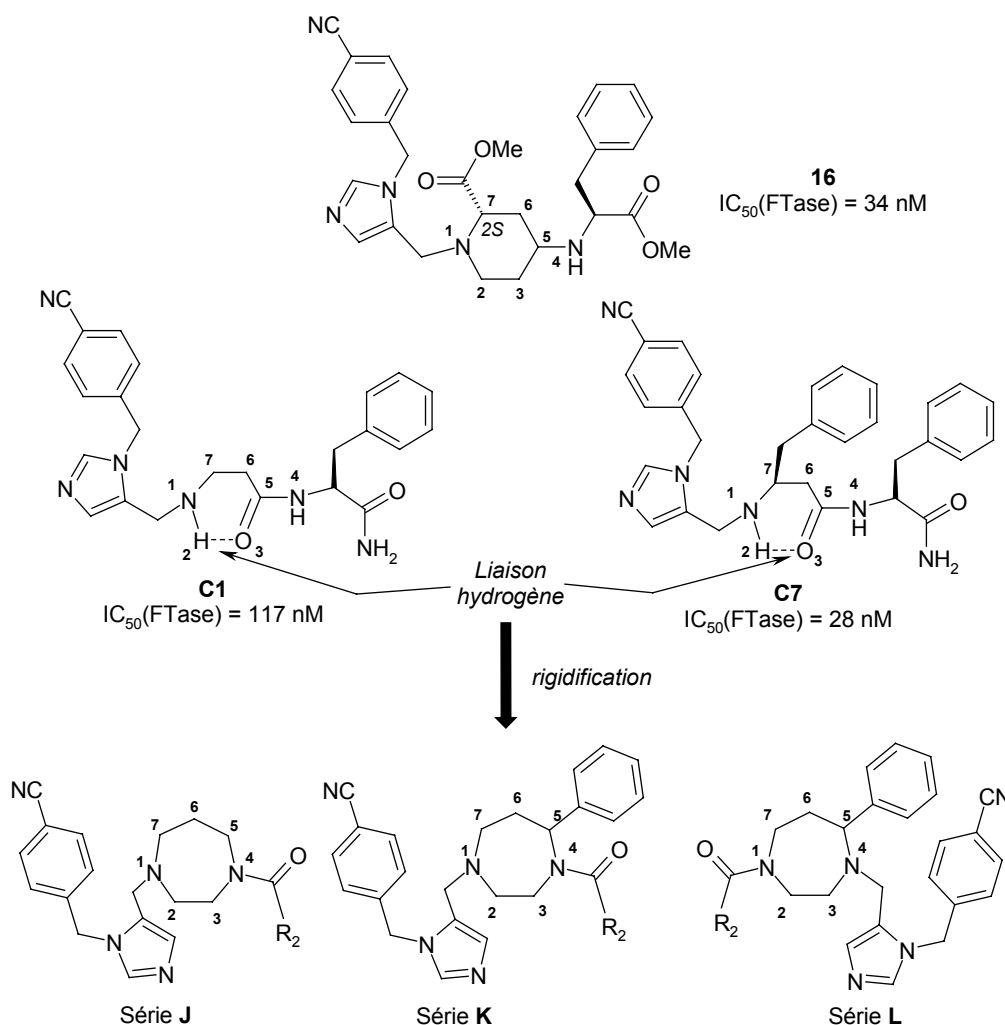


Figure 12 : Conception du cycle 1,4-diazépane

1. Evaluation pharmacologique des composés possédant le 1,4-diazépane (Série J)

Dix-neuf composés avec le 1,4-diazépane comme espaceur ont été synthétisés, en modulant le groupement R_2 par divers résidus hydrophobes. Les résidus hydrophobes choisis sont soit aromatiques tels que le benzène substitué par des groupements électroattracteurs (halogènes, nitrile) ou électrodonneurs (méthyle, méthoxy), le naphthalyle, le biphényle ou des hétérocycles (pyridinyle ou thiophényle) soit aliphatiques cyclique (cyclohexyle et adamantyle) ou acyclique (isobutyle) (figure 13). La diversité des groupements R_2 utilisés permet ainsi de compléter les relations structure-activité et notamment au niveau du « A_2 binding site ».

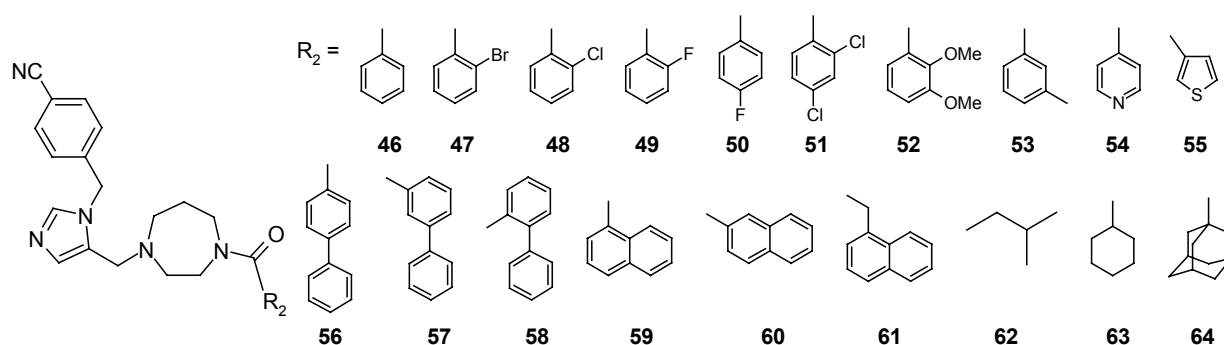


Figure 13 : Composés de la série J

Plusieurs paramètres pharmacologiques ont été mesurés : l'inhibition de la FTase (figure 14) et l'inhibition de la prolifération cellulaire sur deux lignées cancéreuses (figure 15) : DU145 et PC3.

Toutes ces molécules inhibent la FTase ; l'ensemble regroupant le (4-cyanobenzyl)imidazole et le 1,4-diazépane est donc un premier élément permettant d'inhiber la FTase. Le composé **46**, avec un groupement benzoyl, présente une très bonne activité inhibitrice de la FTase avec une IC_{50} de 8 nM ; sa substitution par des groupements électroattracteurs (fluore, chlore, brome) ou électrodonneurs (méthoxy, méthyle) entraîne la diminution de l'inhibition enzymatique. Parmi les trois halogènes utilisés, le chlore (**48**) apporte la meilleure activité ($IC_{50} = 25$ nM). Le passage de la position ortho à para du fluor (**50**) augmente l'activité. Le remplacement du phényle par un groupement bioisostère, pyridinyle (**54**) et thiophényle (**55**), n'améliore pas l'activité. L'activité des composés biaryle tels que biphényle (**56** (para), **57** (méta) et **58** (ortho)) ou naphthyle (**59** (α) et **60** (β)) démontre que la cavité hydrophobe serait plus large que profonde. Le passage à des substituants aliphatiques donne des résultats différents. Le groupement isobutyle (composé **62**) diminue fortement l'interaction avec le site de fixation ($IC_{50} = 205$ nM), mais la présence de l'adamantyle (composé **64**) apporte la meilleure activité inhibitrice de la FTase de la série ($IC_{50} = 5$ nM).

La rigidification de l'homophénylalanine du composé **C1**, qui dispose d'une IC_{50} (FTase) de 117nM, en hétérocycle 1,4-diazépane confère un pouvoir inhibiteur de la FTase, confirmant ainsi notre hypothèse de départ. De plus, ces relations structure-activité montre qu'un groupement volumineux, assez court, aromatique ou aliphatique, est favorable à l'inhibition de la FTase.

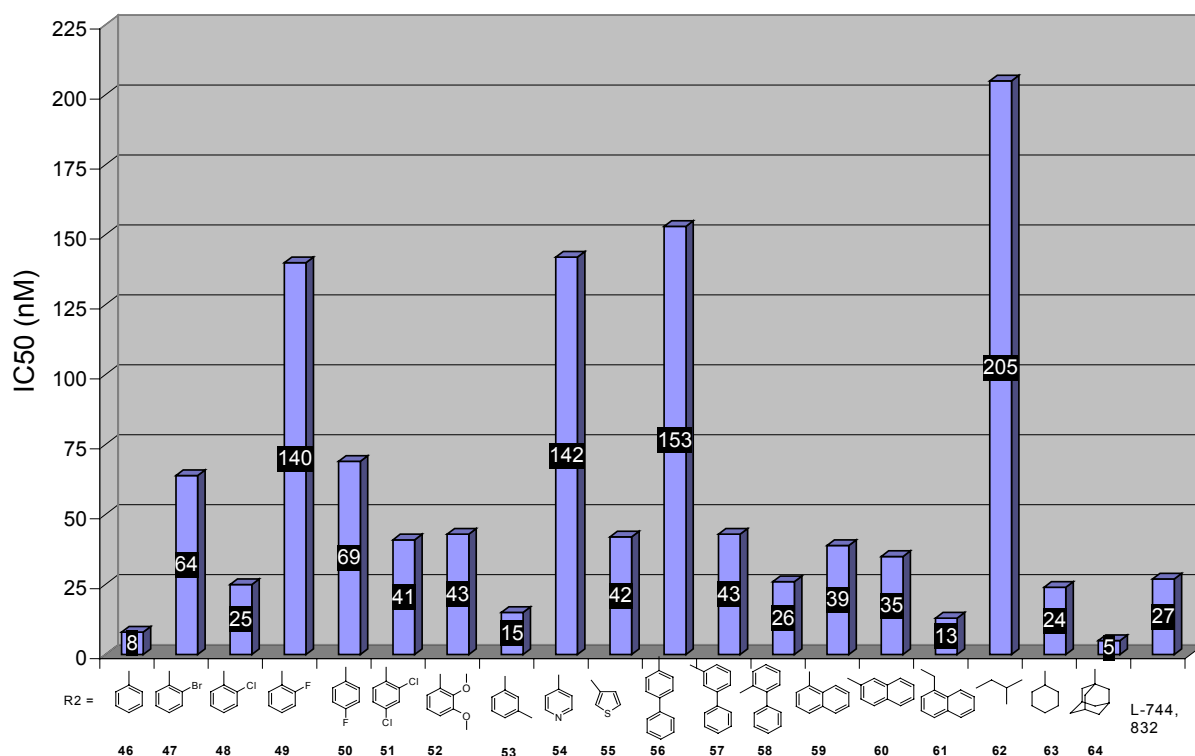


Figure 14 : Activités enzymatiques des composés de la série J

Le pouvoir inhibiteur de la FTase de ces composé n'est pas directement corrélé avec l'inhibition de prolifération des deux lignées cellulaires étudiées. En effet, seulement 8 composés (**48**, **51**, **56**, **57**, **58**, **60** et **64**) sur les 19 préparés peuvent être considérés actifs sur le test d'inhibition de prolifération cellulaire (figure 15). Des inhibiteurs puissants de FTase, comme le composé possédant un benzoyle (**46**), ont un pouvoir anti-prolifératif sur les lignées cellulaires DU145 et PC3 négligeable. Ceci suggère que la très faible activité cellulaire de certains de ces inhibiteurs de FTase (composés **46**, **53** et **61**) est due à leur manque de pénétration cellulaire. En effet, le calcul théorique de la lipophilie ($\log P_{\text{calc}}$) de tous ces composés (courbe en jaune figure 15) montre que les composés les moins lipophiles ($\log P_{\text{calc}} < 2,5$) disposent d'IC₅₀ supérieures à 100 μM tandis que les composés les plus lipophiles ($\log P > 2,5$) inhibent la prolifération cellulaire. Cette remarque pourra être étayée expérimentalement par la mesure du $\log P$ ou de l'inhibition de farnésylation intracellulaire.

Ces 8 composés disposent d'un meilleur pouvoir antiprolifératif que le produit de référence sur les deux lignées étudiées. Les composés avec le 2,4-dichlorophényle (**51**) et l'adamantyle (**64**) inhibent la prolifération cellulaire de la lignée PC3 avec des IC₅₀ respectives de 26 et 21 μM .

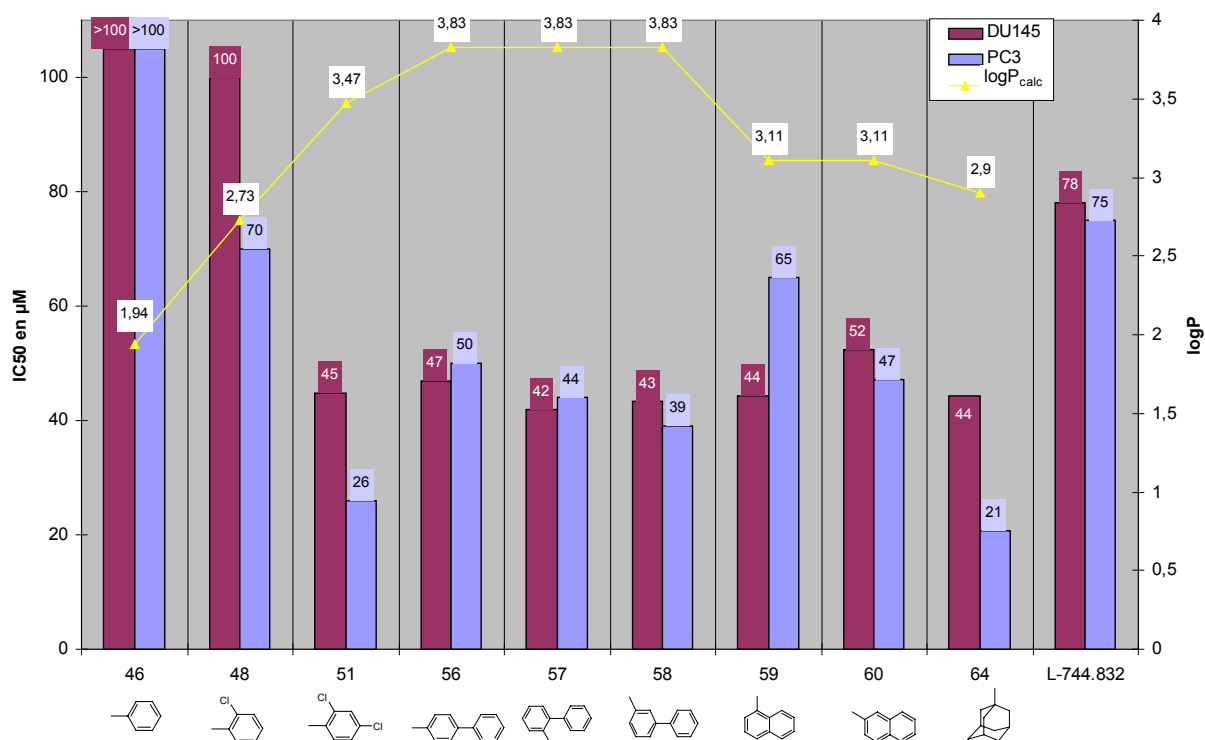


Figure 15 : Inhibition de prolifération cellulaire sur DU145 et PC3 de composé de la série J

Le docking du composé **64** avec l'adamantyle est comparable à celui déjà obtenu avec les autres composés. L'atome distal de l'imidazole chélate l'atome de zinc et le 4-cyanobenzyle forme des interactions de type stacking avec la chaîne farnésyle du FPP. Le groupement hydrophobe se loge dans le « A₂ binding site » formé par Tyr361β, Trp102β et Trp106β.

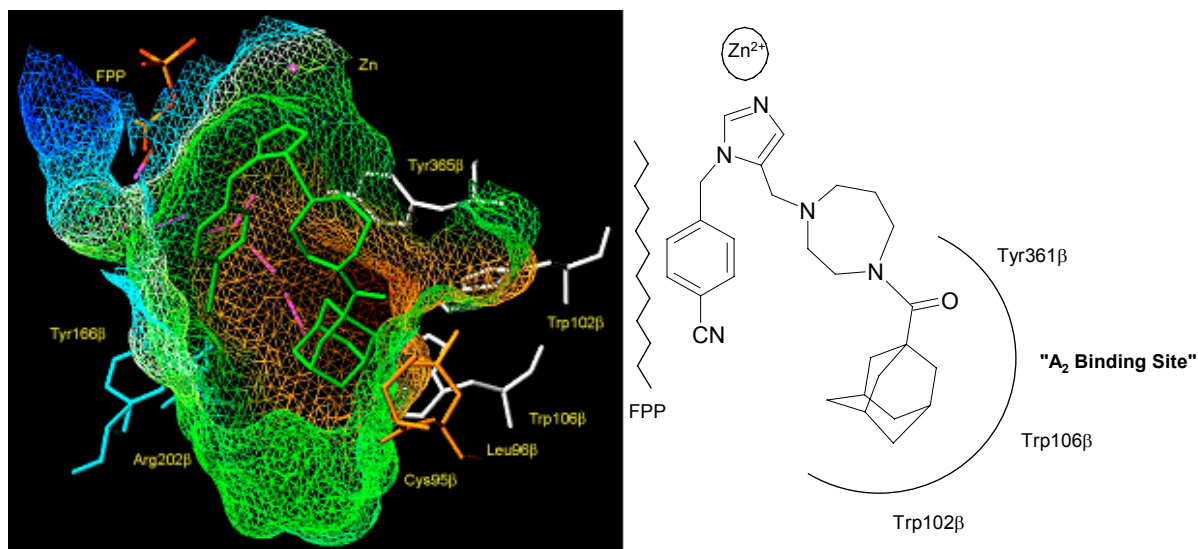


Figure 16 : Modélisation moléculaire du composé 64

2. Evaluation pharmacologique des composés possédant le 5-phényl-1,4-diazépane (séries K et L)

Les résultats pharmacologiques de la librairie montrent que l'ajout d'un benzyle sur l'homophénylalanine du composé **C1**, donnant le composé **C7**, entraîne le passage de l'activité enzymatique d'une IC_{50} (FTase) de 117 nM à 28 nM. Le docking de **C7** montre une interaction du phényle avec « l'exit groove ». Le phényle du 5-phényl-1,4-diazépane interagirait de façon analogue avec le site actif de l'enzyme, augmentant ainsi l'activité enzymatique. De plus, la lipophilie apportée par ce substituant permettrait d'accroître le passage membranaire cellulaire et donc l'activité cellulaire.

Les séries **K** et **L** se distinguent par la position de deux substituants sur l'espacement 5-phényl-1,4-diazépane (figure 17). Le groupement chélateur de zinc est situé en position 1 dans la série **K** tandis qu'il se trouve en position 4 dans la série **L**.

Les 6 groupements R_2 ont été choisis dans le but d'établir rapidement des relations structure-activité. Pour cela, ces groupements, issus de la série **J**, sont sélectionnés en fonction de leurs résultats pharmacologiques. Deux groupements aliphatiques (cyclohexyle et adamantyle) et quatre groupements aromatiques (phényle, 2,4-dichlorophényle, naphtalyle et *ortho*-biphényle) ont été introduits.

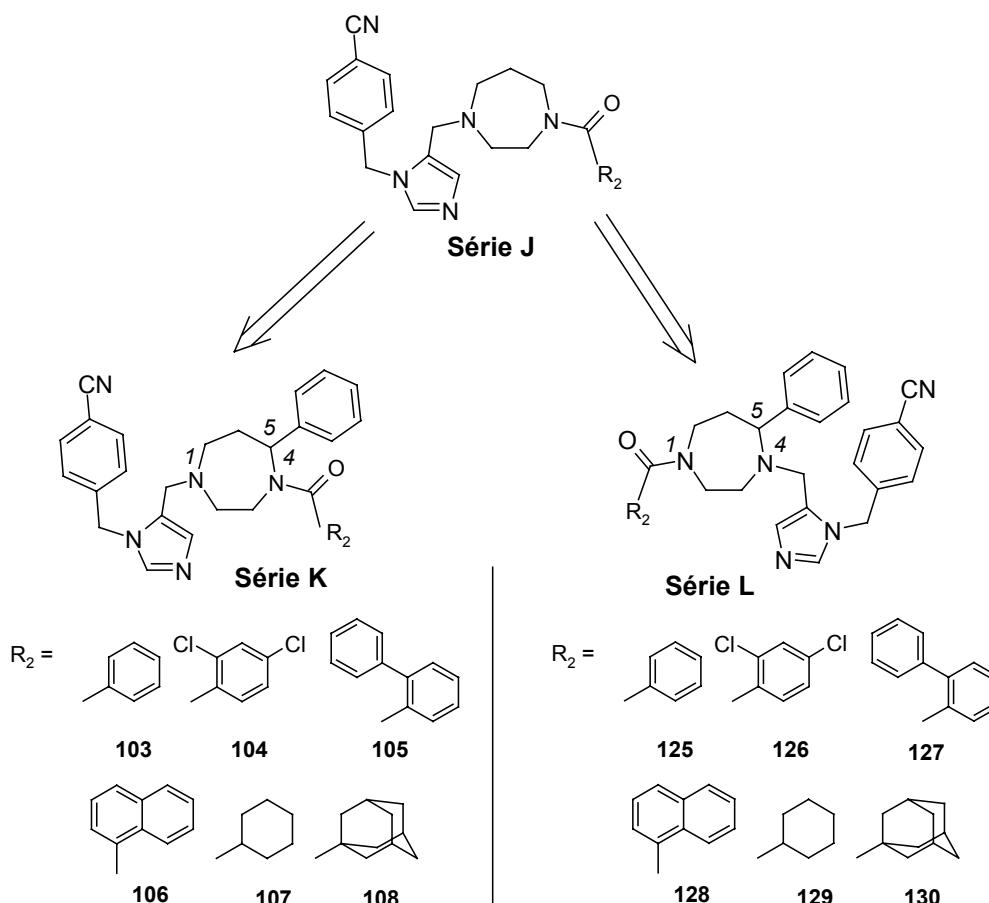


Figure 17: Structures générales des composés des séries **K** et **L**

Au cours de la synthèse du diazépane, les conditions réactionnelles amènent à la formation secondaire de la 1-(3-phénylpropyl)éthane-1,2-diamine, par scission de l'hétérocycle entre le carbone en alpha du phényle et l'amine. Cette diamine a été

utilisée pour préparer deux composés (**111** et **112**), permettant ainsi de vérifier l'intérêt de la rigidification en diazépane (série **K'**) (figure 18).

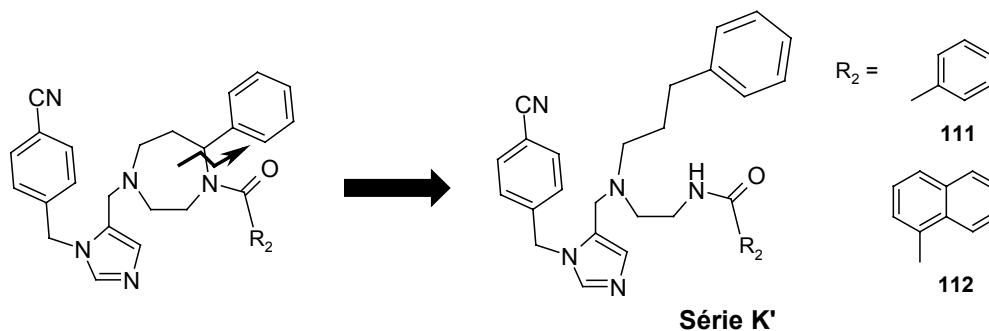


Figure 18 : Composés de la série **K'**

L'étude pharmacologique effectuée sur les séries **K**, **K'** et **L** est identique à celle des précédentes séries (tableau 4, figures 19, 20 et 21).

La position du groupement chélateur de zinc et du groupement hydrophobe sur le 5-phényl-1,4-diazépane influe de façon importante sur l'inhibition de la FTase. En effet, les composés avec le groupement chélateur de zinc en position 4 (série **L**) disposent d'activités enzymatiques nettement supérieures aux molécules avec ce même substituant en position 1 (série **K**). Ceci est parfaitement illustré avec le cyclohexyle comme groupement R_2 , où la différence d'activité enzymatique est d'un facteur 70 entre les composés **107** ($IC_{50} = 7$ nM) et **129** ($IC_{50} = 503$ nM). Les composés **111** et **112**, issus de l'ouverture du diazépane, étant moins actifs que leur analogues hétérocycliques **125** et **128**, justifient l'intérêt d'une cyclisation de l'espaceur sous la forme d'un diazépane. Tous les composés de la série **L** disposent d'un très bon pouvoir inhibiteur de la FTase. Cependant, l'activité enzymatique des composés avec le 5-phényl-1,4-diazépane de la série **L** n'est que légèrement supérieure aux composés avec le 1,4-diazépane de la série **J**. L'ajout d'un deuxième groupement hydrophobe ne semble donc pas apporter une interaction supplémentaire avec le site actif de la FTase.

N°	R_2	IC_{50}		
		FTase (nM)	DU145 (μ M)	PC3 (μ M)
L-744832		29		75
111		31	52	50
112		90	34	50

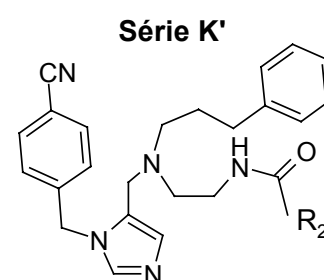


Tableau 4 : Résultats pharmacologiques des composés de la série **K'**

Erreur ! Liaison incorrecte. Figure 19 : Comparaison des activités enzymatiques des composés des séries **J**, **K** et **L** (les chiffres en gras correspondent à l' IC_{50} et ceux en italique au numéro de la molécule)

Le docking des composés **107** (en bleu) et **129** (en jaune) dans le site actif de la FTase permet de comprendre la différence d'activité entre les composés des séries **K** et **L** (figure 20). Dans les deux cas, l'atome distal de l'imidazole chélate l'atome de zinc et son substituant, le 4-cyanobenzyle, forme des interactions de type

stacking avec les motifs isoprénoïdes du FPP. Dans le cas du composé **129**, le cyclohexyle et le diazépane se logent parfaitement dans la cavité « A₂ binding site », formée par Tyr361 β , Trp102 β et Trp106 β tandis que le fragment analogue du composé **107** se place à l'extérieur de l'enzyme, diminuant fortement les interactions avec le site actif. La faible différence d'activité enzymatique entre les composés des séries **J** et **L** est corrélée avec l'absence d'interaction du phényle, situé en position 5 de l'espaceur, avec le site actif de la FTase.

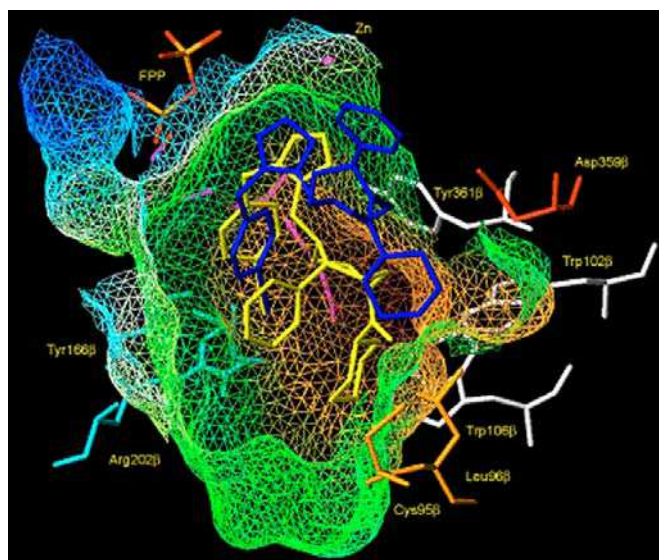


Figure 20 : Docking des composés **107** (en bleu) et **129** (en jaune) dans le site actif de la FTase

L'ajout du phényle sur le diazépane augmente légèrement l'activité enzymatique, suggérant ainsi une faible interaction supplémentaire avec le site actif de la FTase. En effet, la mesure du potentiel électrostatique des composés **63** et **107** montre la présence au niveau d'un atome d'hydrogène du diazépane d'une charge positive en direction de l'acide aspartique Asp359 β (figure 21).

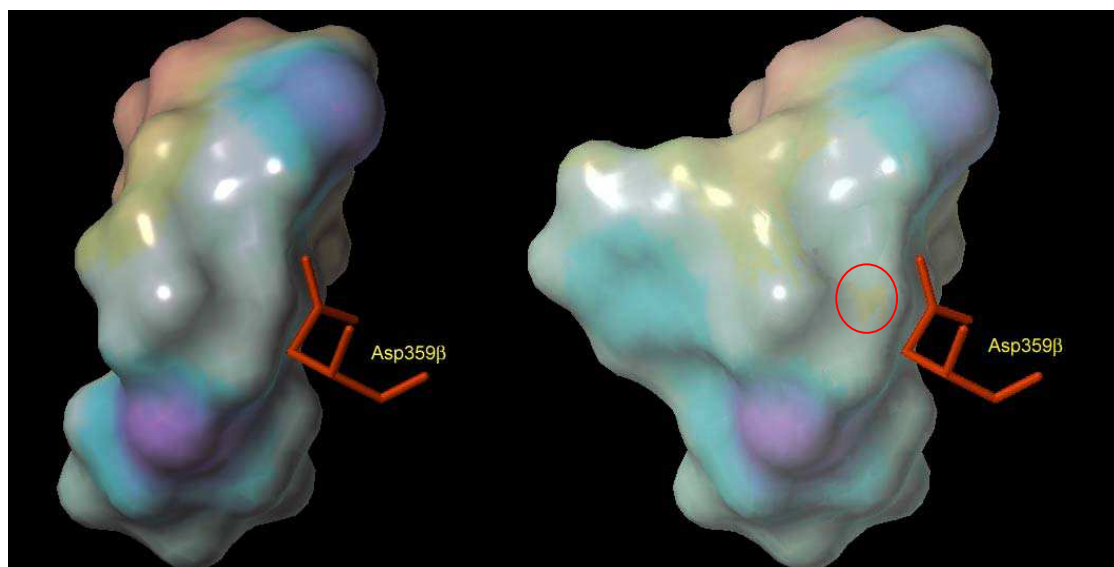


Figure 21 : Mesure du potentiel électrostatique des composés **63** (à gauche) et **107** (à droite)

La conception des inhibiteurs comportant un cycle diazépane est basée sur la rigidification de l'homophénylalanine du composé **C7** (figure 12). Afin de vérifier cette

hypothèse, la superposition des composés **C7** et **129** a été effectuée (figure 22). Le diazépane ne mime pas, atome par atome, l'homophénylalanine. Cet hétérocycle permet cependant d'agencer de façon identique les deux substituants.

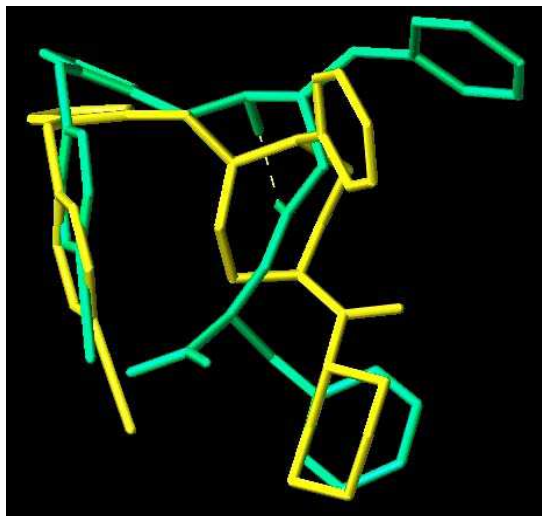


Figure 22 : Superposition du composé **129** avec le composé **C7**

La superposition du composé **129** avec la « boîte CA₁A₂X » farnésylée en conformation coudée de type β -turn montre que l'inhibiteur mime toute la « boîte CA₁A₂X » dans cette conformation et que le benzyle se superpose avec le premier motif isoprénoïde de la chaîne farnésyle (figure 23).

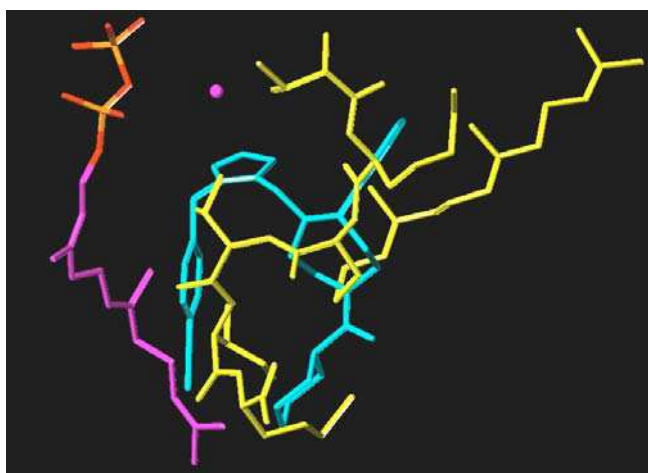


Figure 23 : Superposition du composé **129** avec la partie C-terminale d'une protéine farnésylée

L'activité antiproliférative des composés des séries **K** et **L** sur les lignées DU145 et PC3 est corrélée à l'activité enzymatique (figures 19, 24 et 25). La plupart des composés des séries **K** et **L** ont un pouvoir antiprolifératif sur les lignées DU145 et PC3 supérieur au composé de référence, le **L-744832**, qui possède une IC₅₀(DU145) de 78 μ M et une IC₅₀(PC3) de 75 μ M. Le composé **130**, avec l'adamantyle, est le plus actif. Il possède des IC₅₀(DU145) de 29 μ M et IC₅₀(PC3) de 18 μ M.

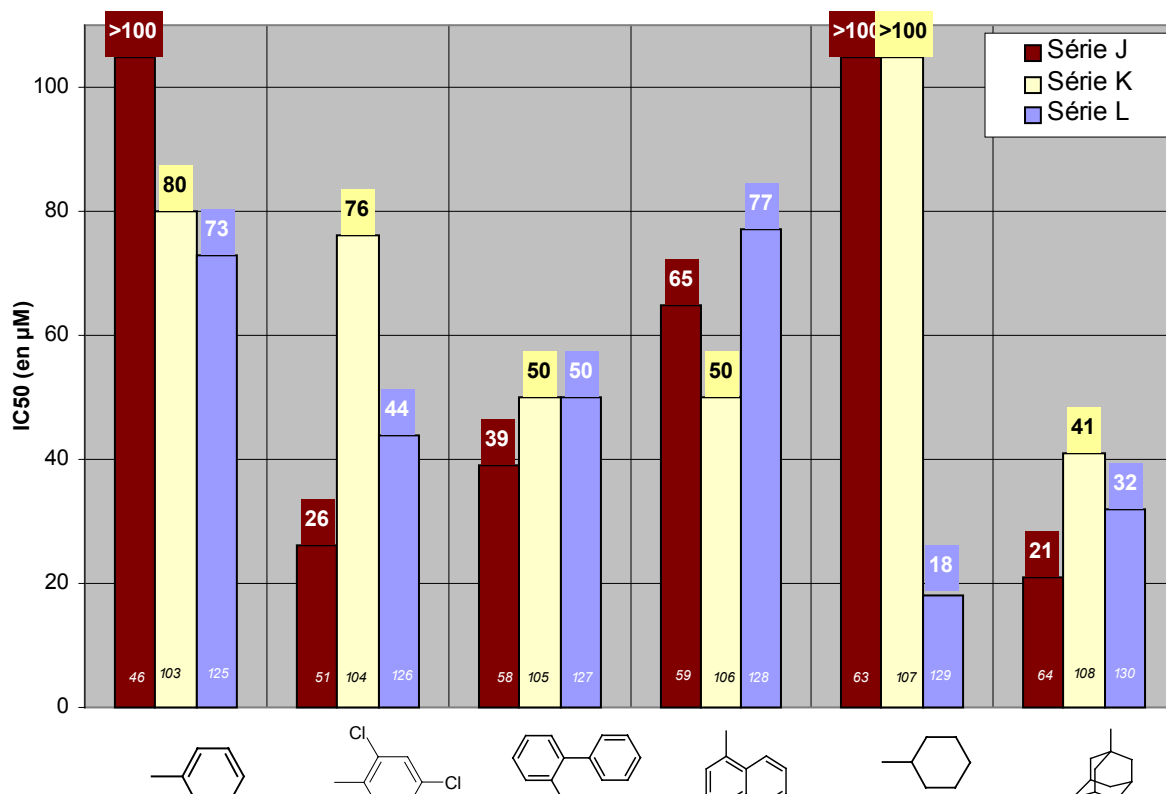


Figure 24 : Mesure de l'activité antiproliférative sur la lignée PC3 des composés des séries J, K et L (les chiffres en gras correspondent à l'IC₅₀ et ceux en italique au numéro de la molécule)

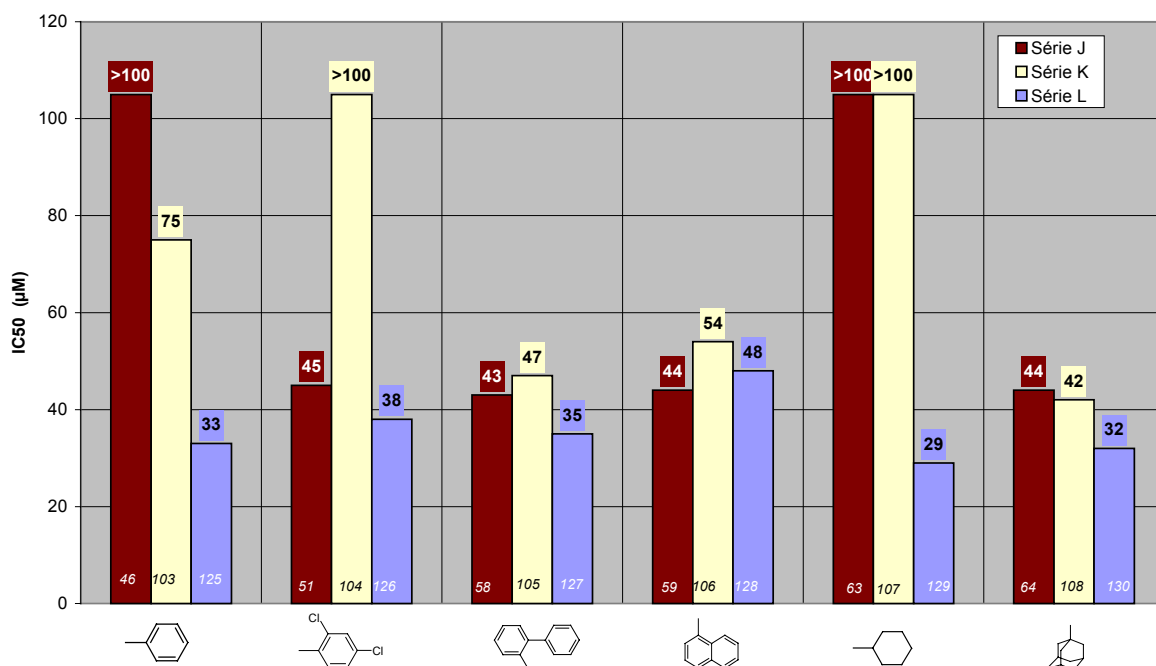


Figure 25 : Mesure de l'activité antiproliférative sur la lignée DU145 des composés des séries J, K et L (les chiffres en gras correspondent à l'IC₅₀ et ceux en italique au numéro de la molécule)

Alors que l'ajout d'un phényle en position 5 du diazépane n'influe que très légèrement sur l'inhibition de la FTase, il permet d'augmenter nettement le pouvoir antiprolifératif sur les deux lignées étudiées. Cette remarque étaye le postulat concernant le manque d'activité cellulaire de nombreux composés de la série J. En effet, cette carence se justifie par une faible lipophilie, induisant donc une mauvaise

pénétration cellulaire. A part pour les composés **63** et **107**, qui inhibent faiblement la FTase, il existe une bonne corrélation entre l'activité cellulaire (PC3) et la lipophilie des composés des séries **J**, **K** et **L** (figure 26).

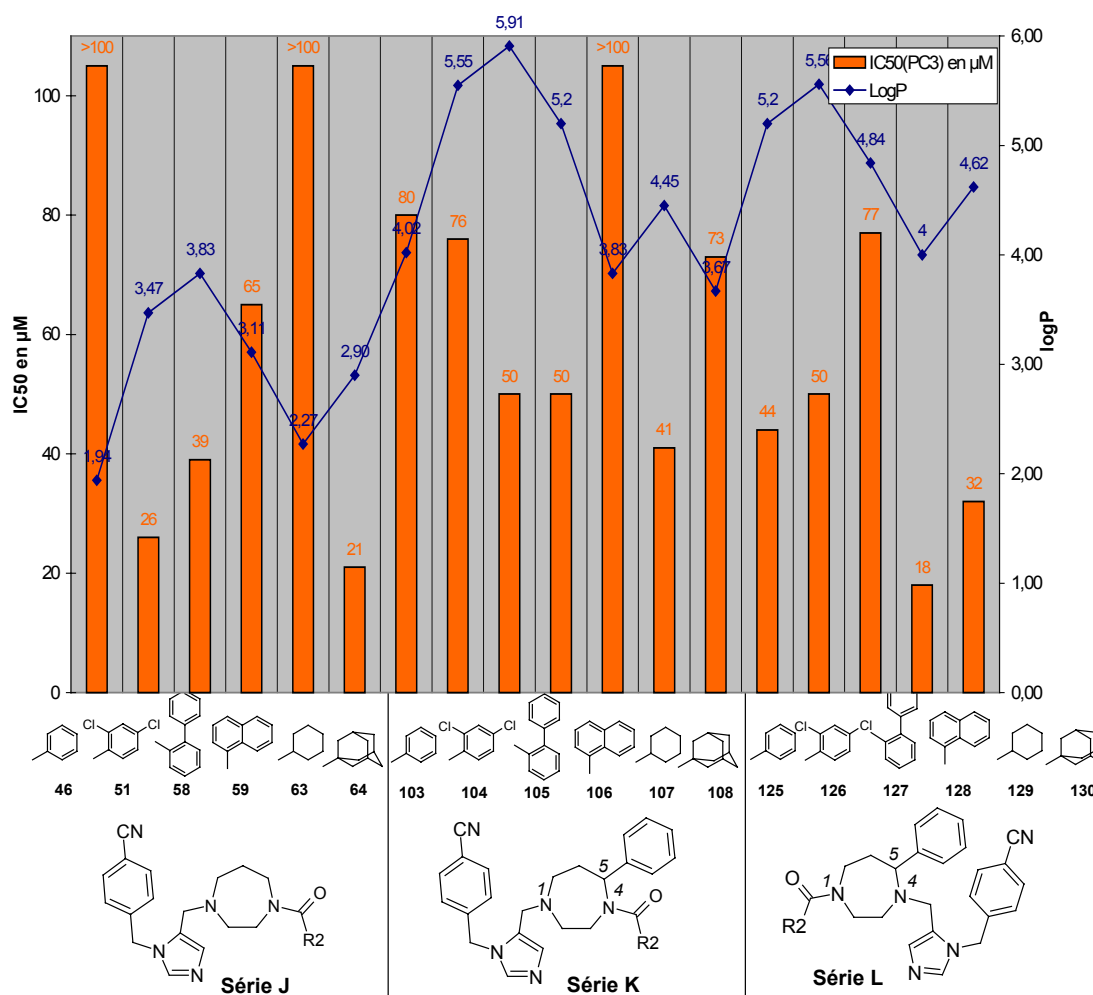


Figure 26 : Activité antiproliférative sur la lignée PC3 et lipophilie des composés des séries **J**, **K** et **L**

Le remplacement de l'espaceur 1,4-diazépane (série **J**) par le 5-phényl-1,4-diazépane correctement substitué (série **L**) n'influe que modestement sur l'activité enzymatique, alors que ce changement améliore nettement l'activité cellulaire. Le phényle interagit donc de façon négligeable avec le site actif de la FTase, mais apporte cependant un caractère lipophile nécessaire au passage membranaire, qui permet ainsi d'inhiber la prolifération cellulaire.

III. Étude des effets des inhibiteurs de farnésyltransférase sur le cycle cellulaire

Les FTis induisent l'accumulation en phase G2-M de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Crespo et al., 2001). Cet effet serait dû à l'inhibition de farnésylation de CENP-E, induisant la perturbation de son association avec le fuseau mitotique (Schaar et al., 1997).

Au vu des résultats pharmacologiques, les effets de quatre FTis (**64**, **108**, **129** et **130**) sur le déroulement du cycle cellulaire dans les cellules PC3, en particulier sur l'organisation des microtubules, ont été étudiés. Ces travaux ont été effectués par Delphine Ryckewaert en collaboration avec l'équipe d'imagerie cellulaire de l'Institut de Biologie de Lille.

A. Effets des FTIs sur l'organisation des microtubules

Dans un premier temps, la fixation des cellules PC3 sur lamelle de verre, qui est l'étape cruciale permettant de conserver la morphologie de la cellule et d'éviter la perte de l'antigène détecté par immunocytochimie, doit être vérifiée avant la suite de l'étude. Pour cela, le marquage nucléaire de ces cellules par le Hoechst Vital 33 342 a d'abord été effectué. Les résultats obtenus (figure 27) ont permis d'établir que les cellules PC3 étaient utilisables dans ce type de protocole, et de poursuivre l'étude. Ensuite, la visualisation de l' α -tubuline de cellules PC3 non traitées, traitées par les FTIs et la Combretastatine A-4 (CA-4) (utilisée comme témoin positif de la désorganisation des microtubules) s'effectue par immuno-marquage. Les concentrations des FTIs utilisées pour traiter les cellules PC3 sont celles correspondantes aux IC_{50} de l'inhibition de la prolifération cellulaire.

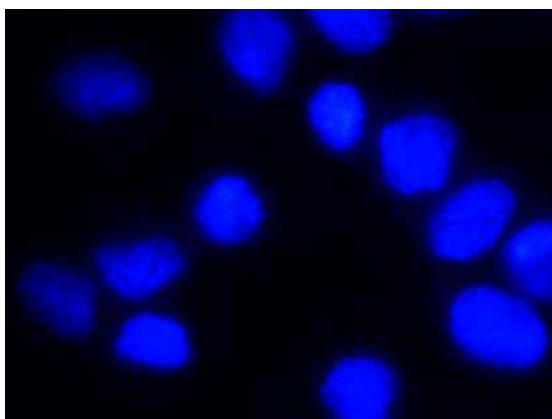


Figure 27 : Marquage nucléaire des PC3

Les cellules sont immuno-marquées avec un anticorps anti- α -tubuline marqué à l'Alexa-488. Les cellules contrôles non traitées (figure 28) présentent un réseau tubulaire filamenteux qui parcourt toute la cellule.

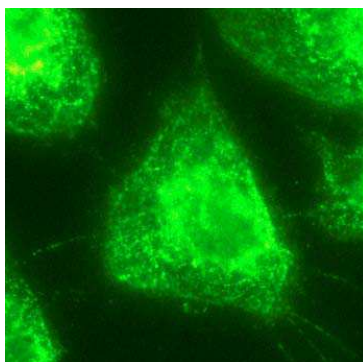


Figure 28 : Marquage de la tubuline des PC3 sans traitement (témoin)

La disparition progressive du treillis microtubulaire est observée pour les cellules traitées par la **C-A4** (figure 29). Ce phénomène est causé par la dépolymérisation des microtubules dont le raccourcissement est également visible. Ce rétrécissement est plus épais et localisé principalement aux pôles des cellules qui ont perdu leur forme allongée. Les photographies correspondant aux cellules traitées avec le **L-744832** et le composé **130**, révèlent des cellules ayant le même profil morphologique et structural que celles traitées par la **CA-4**. Le traitement par le composé **64** induit la désorganisation du réseau de tubuline dans quelques cellules. De plus, les cellules traitées par le composé **64** présentent une désorganisation microtubulaire plus diffuse dans la cellule. Ces différents résultats mettent en avant le fait que ces FTIs induisent chacune un niveau de désorganisation différent, après 24 h de traitement. Cette différence de réponse cellulaire pourrait dépendre de la durée du traitement, ainsi que de l'effet plus ou moins rapide sur la désorganisation du réseau microtubulaire de ces FTIs.

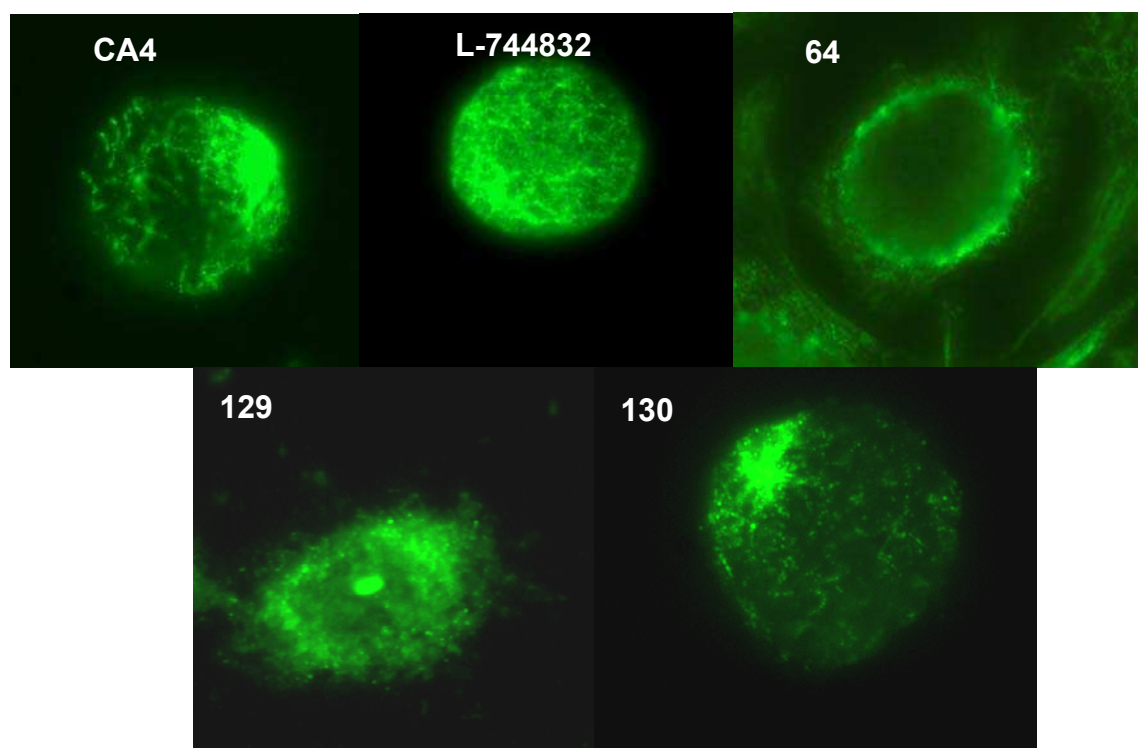


Figure 29 : Désorganisation de la tubuline des PC3 traitées par la C-A4 et des FTIs

De plus, lors du traitement des cellules, malgré l'utilisation de lamelles facilitant par leur adhérence, certaines ont pu se détacher, et par conséquent, conduire à une perte considérable de cellules visualisables, expliquant le fait qu'il n'y ait pas de résultats immunocytochimiques des cellules traitées avec le composé **108**. Ainsi, d'autres expériences, prenant en compte le temps d'exposition des cellules avec les molécules testées, sont à prévoir.

B. Implication de la protéine CENP-E dans l'organisation de la tubuline

1. Expression de CENP-E dans les cellules cancéreuses de prostate

Dans un premier temps, le niveau d'expression de la protéine d'intérêt, CENP-E, est déterminé par la technique de Western Blot, dans les lignées cancéreuses prostatiques humaines PC3 et DU145. Dès lors, les protéines issues de ces cellules sont extraites et dosées et quatre concentrations différentes de protéines dans les puits sont déposées (20, 30, 40 et 60 µg) (figure 30).

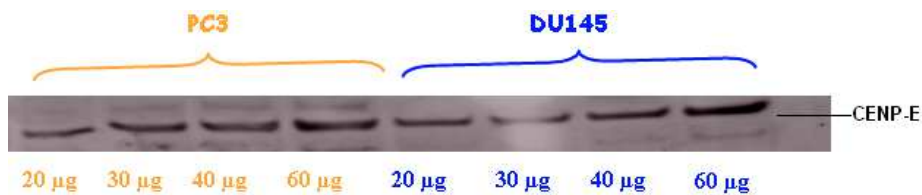


Figure 30 : Expression de CENP-E dans PC3 et DU145

Afin de révéler la membrane de nitrocellulose par autoradiographie et d'identifier la protéine CENP-E, un anticorps primaire anti-CENP-E (dilué au 1/200^{ème} reconnu par un anticorps secondaire dilué au 1/2000^{ème}) est utilisé : la protéine CENP-E est bien exprimée dans les deux types cellulaires.

Pour la suite de l'étude, l'expression de CENP-E par la technique de siRNA, 30 µg de protéines sont déposés, à une concentration suffisante pour étudier l'inhibition de l'expression de cette protéine.

2. Expression de CENP-E après transfection des cellules PC3 et DU145 par des siRNA

Les deux types cellulaires sont transfectés avec trois types de siRNA (Ambion, réf. : 10616, 10706 et 121338) (figure 31).

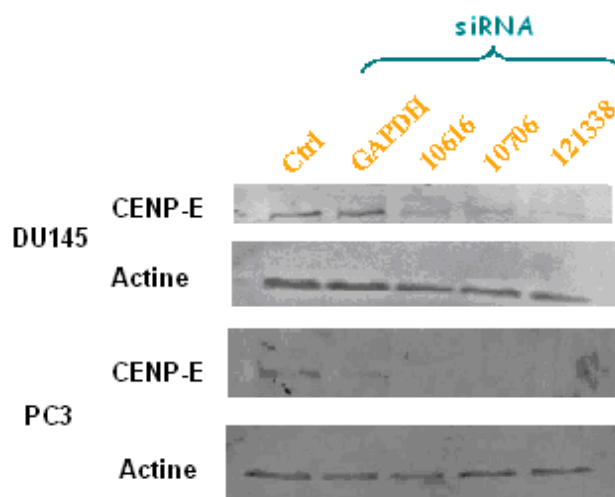


Figure 31 : Expression de CENP-E après transfection des cellules PC3 et DU145 par siRNA

Les cellules transfectées par les trois siRNA sous-expriment la protéine CENP-E. Cette transfection sur des cellules cultivées sur lamelles a pour intérêt de déterminer si la protéine CENP-E est impliquée dans l'organisation des microtubules.

3. Immuno-marquage du CENP-E

Puisque la CENP-E permet le passage des cellules en mitose, d'abord, les cellules sont synchronisées en phase G₂/M en les privant de sérum pendant 24 h puis remise en culture pendant 20 h avec du milieu contenant 10% de sérum. Ensuite, par la méthode d'immunocytochimie décrite précédemment, la protéine a pu être localisée dans les cellules PC3 par l'utilisation d'un anticorps primaire anti-CENP-E reconnu par un anticorps secondaire marqué à l'Alexa 568. Les photographies (figure 32) montrent que cette protéine est localisée majoritairement dans le noyau mais qu'elle est également présente dans le cytoplasme.

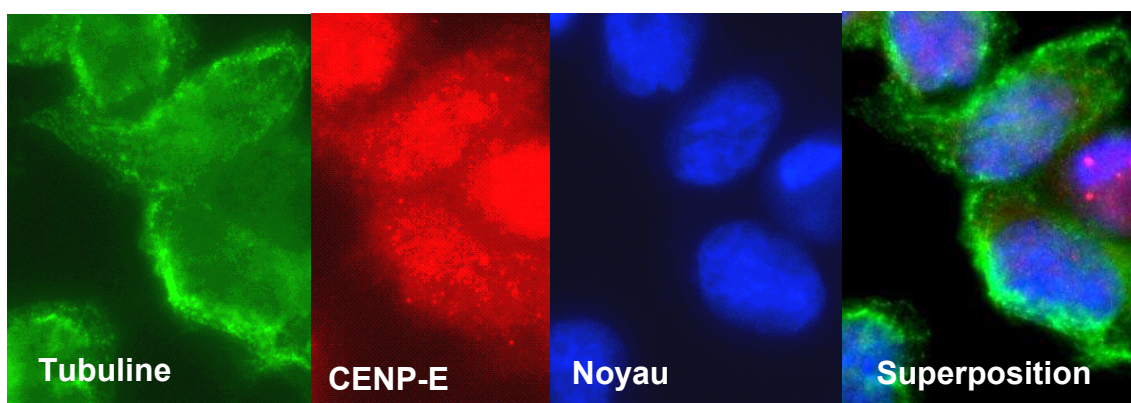


Figure 32 : Localisation intracellulaire du CENP-E

4. Implication du CENP-E sur la formation du réseau tubuline

Les résultats précédents ont montré que les FTis influent sur l'organisation de ce réseau. Ceci étant, la contribution de CENP-E à sa stabilité a été étudié. Comme le révèle les acquisitions (figure 33), les cellules transfectées par les trois types de siRNA ont perdu leur réseau organisé en faveur d'une accumulation de tubuline au niveau des membranes cytoplasmiques des cellules, contrairement aux cellules non traitées ou transfectées par un siRNA GAPDH. Ceci démontre que la protéine CENP-E contribue à la formation des microtubules.

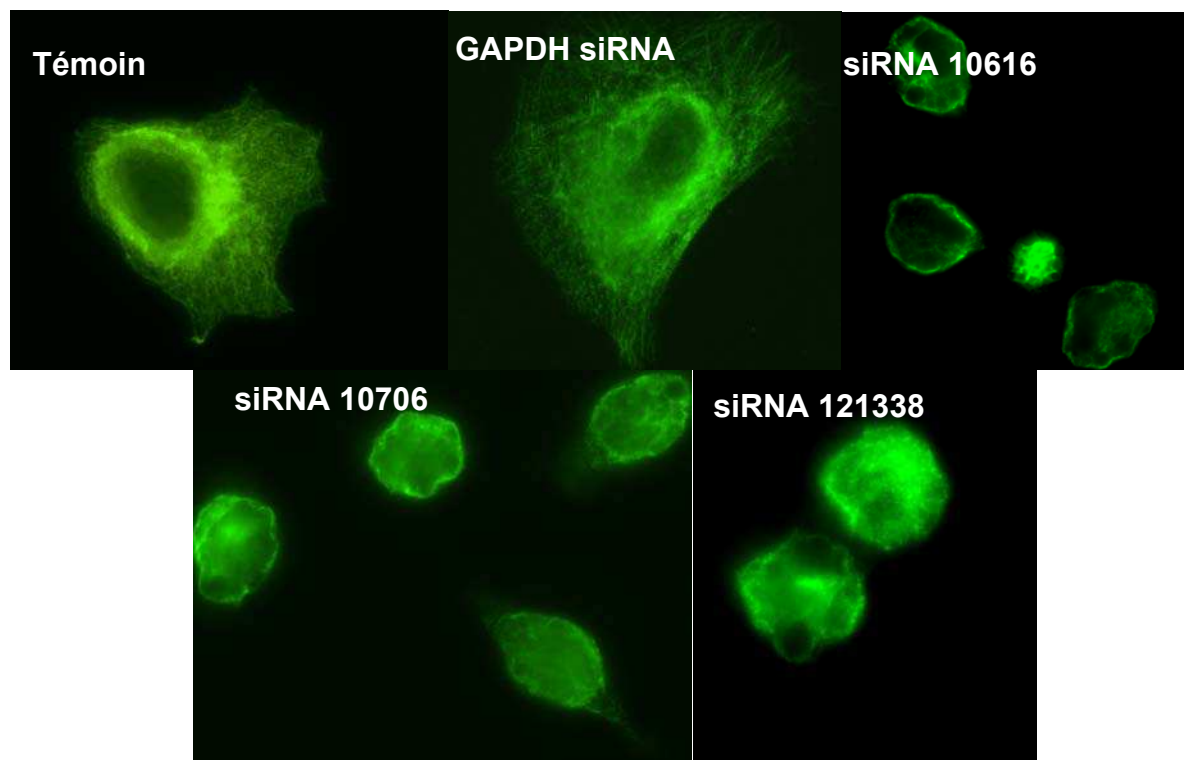
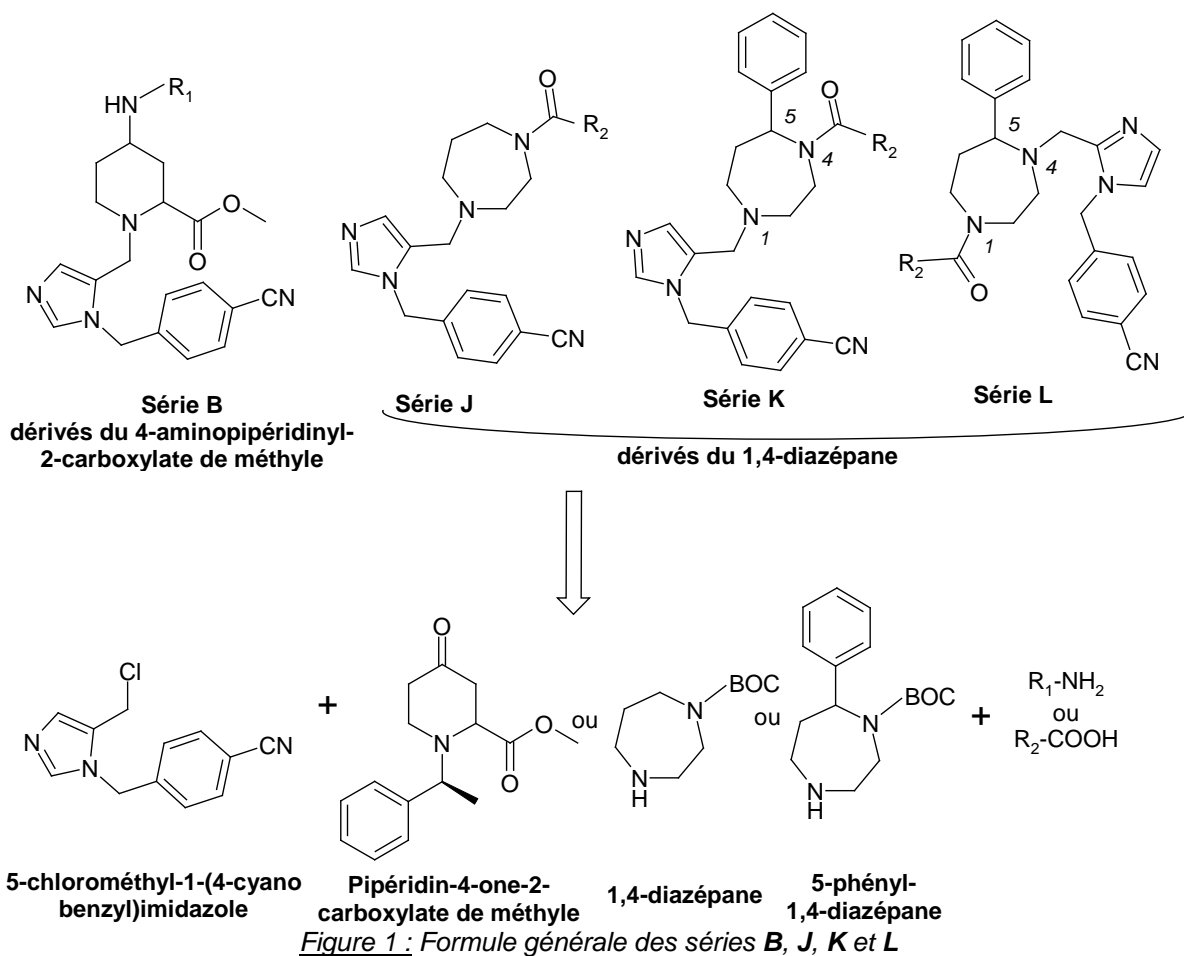


Figure 33 : désorganisation de la tubuline après transfection des cellules par siRNA

STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Quatre séries de molécules potentiellement inhibitrices de farnésyltransférase ont été préparées (figure 1). De façon générale, tous ces composés comportent le même groupement chélateur de zinc, le paracyanobenzylimidazole. Les modulations de chacune de ces séries ont été réalisées au niveau de leurs groupements hydrophobes R_1 ou R_2 . La stratégie de synthèse de ces molécules a été élaborée de façon à effectuer les modifications lors des dernières étapes de synthèse. Les séries préparées ont été les suivantes :

- Une série (**B**) avec un espaceur de type 4-aminopipéridinyl-2-carboxylate de méthyle
- Une série (**J**) avec un espaceur de type 1,4-diazépane (homopipérazine)
- Deux séries (**K** et **L**) avec un espaceur de type 5-phényl-1,4-diazépane



Dans ce chapitre, je détaillerai d'abord la synthèse du 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole nécessaire à la préparation des molécules des quatre séries. Ensuite, je présenterai, en exposant l'obtention de leur hétérocycle, la préparation de la série comportant le 4-aminopipéridinyl-2-carboxylate de méthyle (série **B**) puis celle des séries comportant le 1,4-diazépane (séries **J**, **K** et **L**).

I. Synthèse du 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole

Le 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole est préparé en quatre étapes à partir du bromure de 4-cyanobenzyle, (Hartman et al., 2000). Sous l'action de

l'hexaméthylènetétramine, le bromure de 4-cyanobenzyle est transformé en l'amine **1** correspondante isolée sous forme de phosphate. L'imidazole **2** est obtenu par cyclisation entre l'amine **1**, la dihydroxyacétone et le thiocyanate de potassium en milieu acide. Après oxydation par l'eau oxygénée, le groupement thiol est clivé, donnant l'imidazole disubstitué **3**. Le dérivé chloré **4**, isolé sous forme de chlorhydrate, est obtenu par action du chlorure de thionyle sur l'alcool **3**.

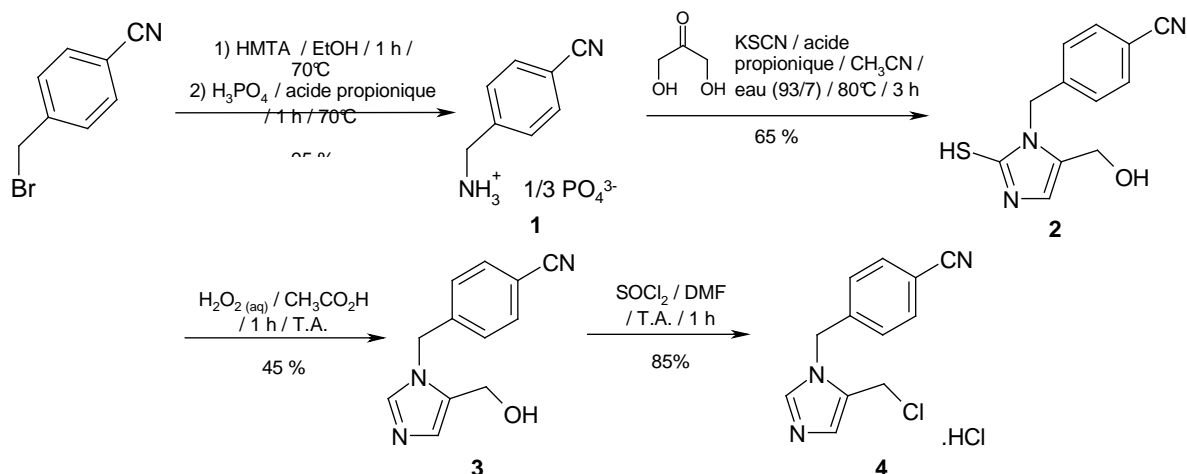


Figure 2 : Synthèse du chlorhydrate de 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole **4**

Préparation de la benzylamine **1** :

Une approche classique pour préparer les amines benzylques est la réaction de Delépine. Le bromure de 4-cyanobenzyle réagit avec l'hexaméthylènetétramine pour donner l'ammonium quaternaire (figure 3). L'utilisation d'acide phosphorique pour la libération de l'amine permet l'isolement du composé **1** sous forme de phosphate avec un très bon rendement.

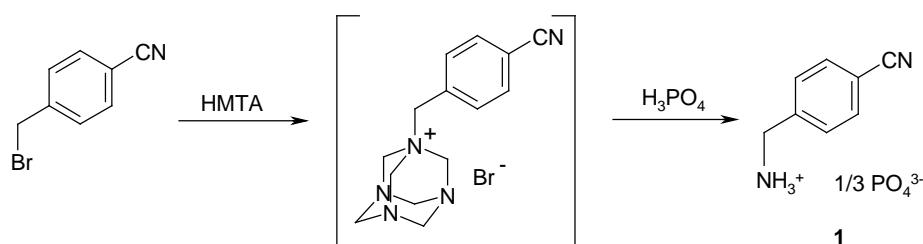


Figure 3 : Synthèse de la 4-cyanobenzylamine **1**

Formation du thioimidazole **2** :

Le thioimidazole **2** est obtenu par réaction de cyclisation de Marckwald en présence de thiocyanate de potassium et de dihydroxyacétone dans l'acétonitrile. Le mécanisme de la cyclisation est détaillé dans la figure 4. Il a été remarqué la formation d'un produit secondaire **X** provenant de la réaction d'un alcène exocyclique, issu de la voie (b), avec l'excès de thiocyanate (Maligres et al., 2003).

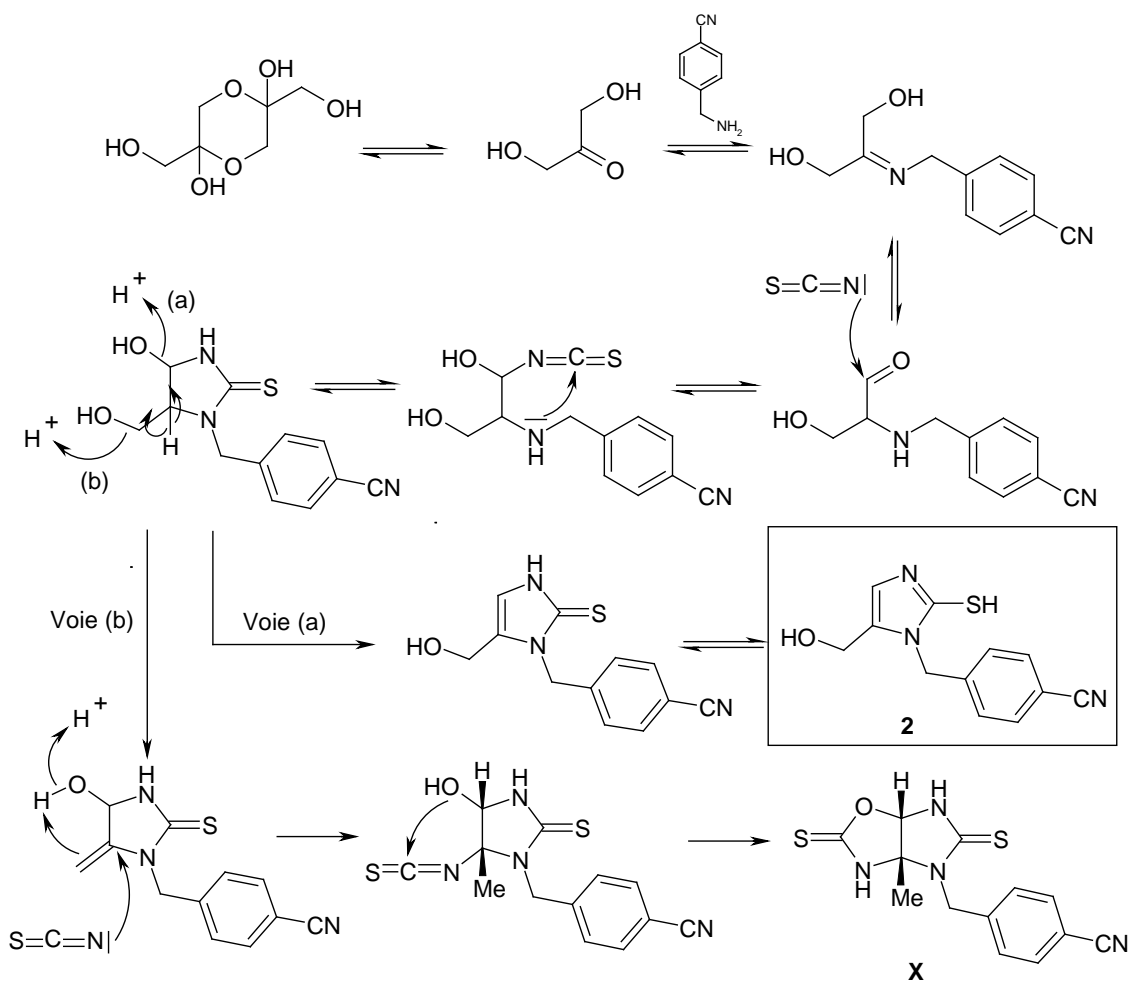


Figure 4 : Mécanisme de la cyclisation de Marckwald de l'imidazole 2 (Maligres et al., 2003).

Préparation de 3 et 4 :

Le groupe thiol de l'imidazole est oxydé par l'eau oxygénée en milieu acide, donnant la sulfone clivée *in situ* à chaud, libérant du dioxyde de soufre.

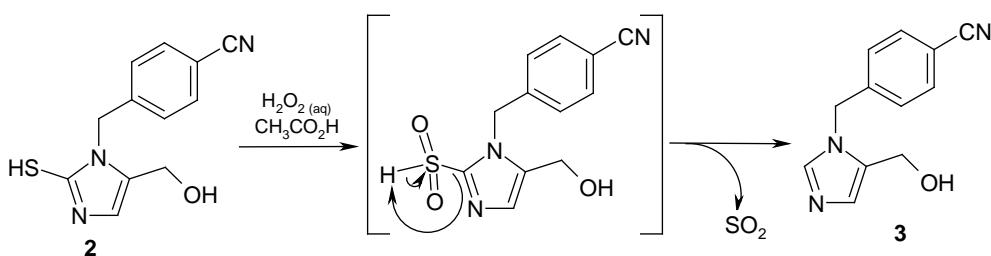


Figure 5 : Oxydation du thiol

Le dérivé chloré 4 est obtenu par action du chlorure de thionyle sur l'alcool précédemment obtenu. L'acide chlorhydrique libéré est capté par l'imidazole entraînant son isolement sous forme de chlorhydrate.

II. Synthèse des composés à espaceur 4-aminopipéridinyl-2-carboxylate de méthyle (série B)

Le schéma de synthèse mis au point permet de contrôler la stéréochimie de l'atome de carbone 2. Ainsi, la série **B** est constituée de 10 composés. Leur structure se distingue par la nature de R₁ et la stéréochimie de l'atome de carbone 2.

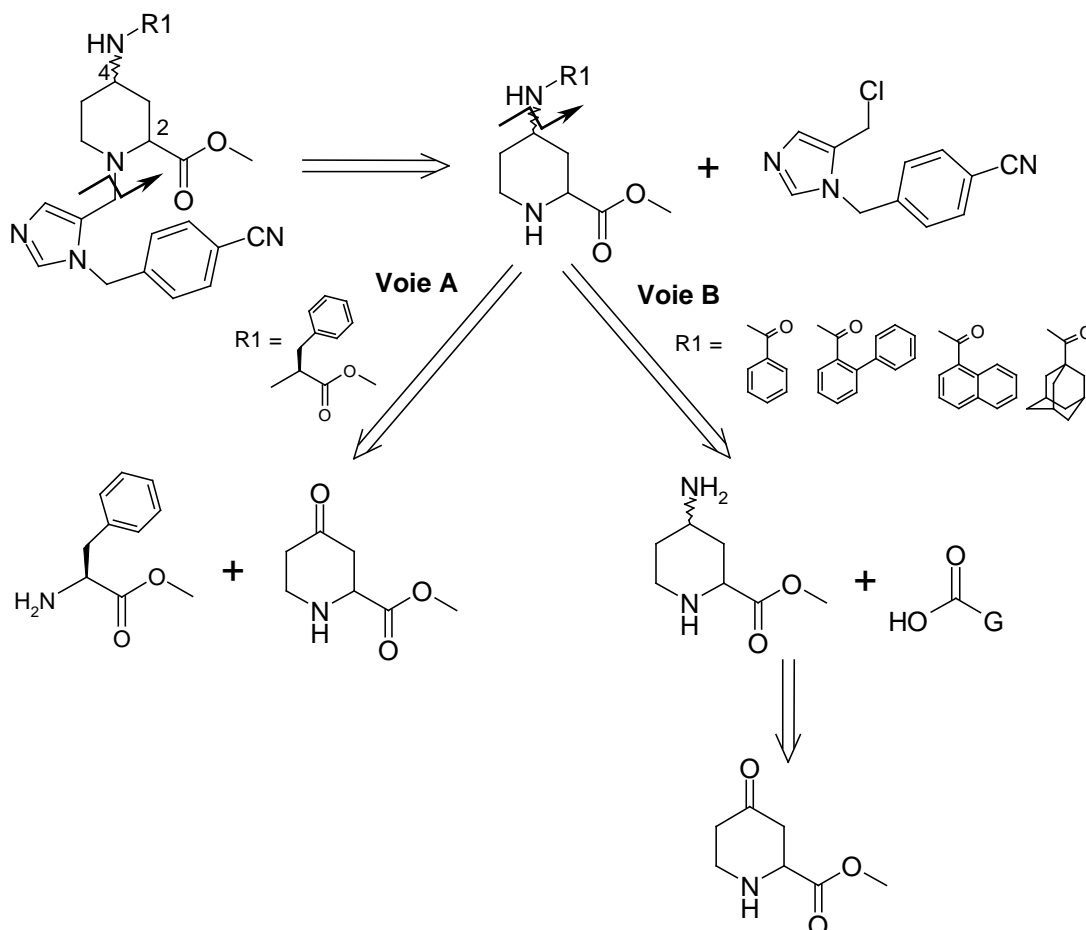


Figure 6 : Rétrosynthèse des composés de la série B

A. Synthèse des pipéridinones

La synthèse du motif pipéridinone (figure 7. fait appel à la méthode utilisée pour la préparation de l'acide (2S, 4R)-hydroxyproline et de ses dérivés (Gillard et al., 1995). La protection de l'amine hétérocyclique par un groupement chiral benzylique permet de séparer les deux diastéréoisomères **8** et **9** par chromatographie sur gel de silice classique, d'autant que la différence de migration des lactones **6** et **7** est trop faible pour les séparer facilement.

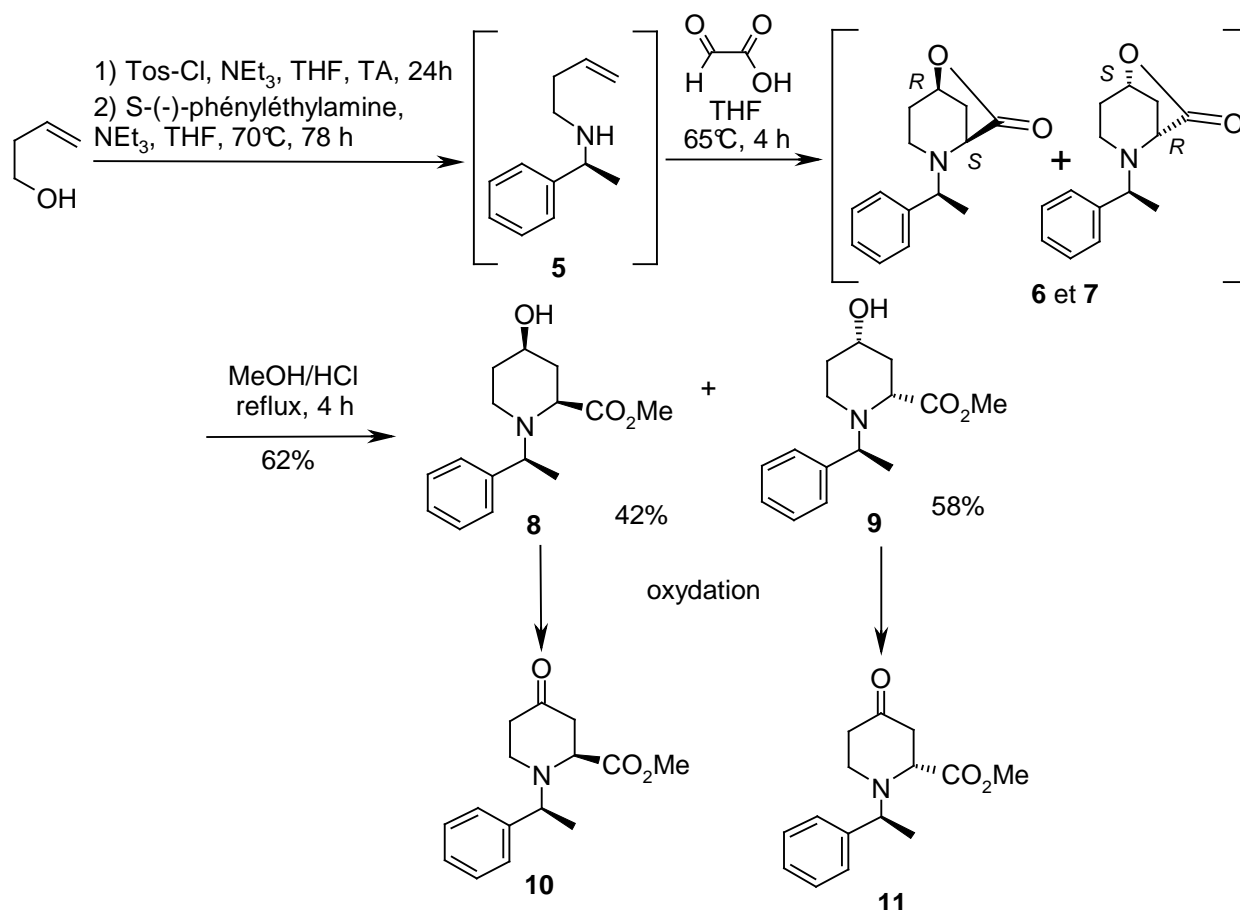


Figure 7.: Synthèse des pipéridinones **10** et **11**

1. Synthèse de l'amine chirale

Après activation sous forme de tosylate, le 3-butén-1-ol réagit avec la S-(-)-phényléthylamine, en présence de triéthylamine, pour former l'amine chirale **5** qui n'est pas isolée.

2. Cyclisation

La cyclisation en lactone bicyclique se fait par chauffage à reflux de l'amine chirale **5** avec l'acide glyoxylique (à 50% dans l'eau). Les lactones sont obtenues sous forme d'un mélange des deux diastéréoisomères **6** et **7**. Le mécanisme réactionnel supposé passerait d'abord par une étape d'imination puis de deux réactions consécutives de cyclisation intramoléculaire (figure 8) (Skiles et al., 1996). Les réactions de cyclisation peuvent se dérouler de deux façons. En présence d'eau, il y a formation d'un alcool qui va réagir ensuite avec l'acide pour former les lactones **8** et **9**. En milieu anhydre, la cyclisation en lactone passe par la formation d'un carbocation. La cyclisation en lactone implique évidemment les stéréoisomères dans lesquels les fonctions hydroxyle et acide carboxylique sont en cis.

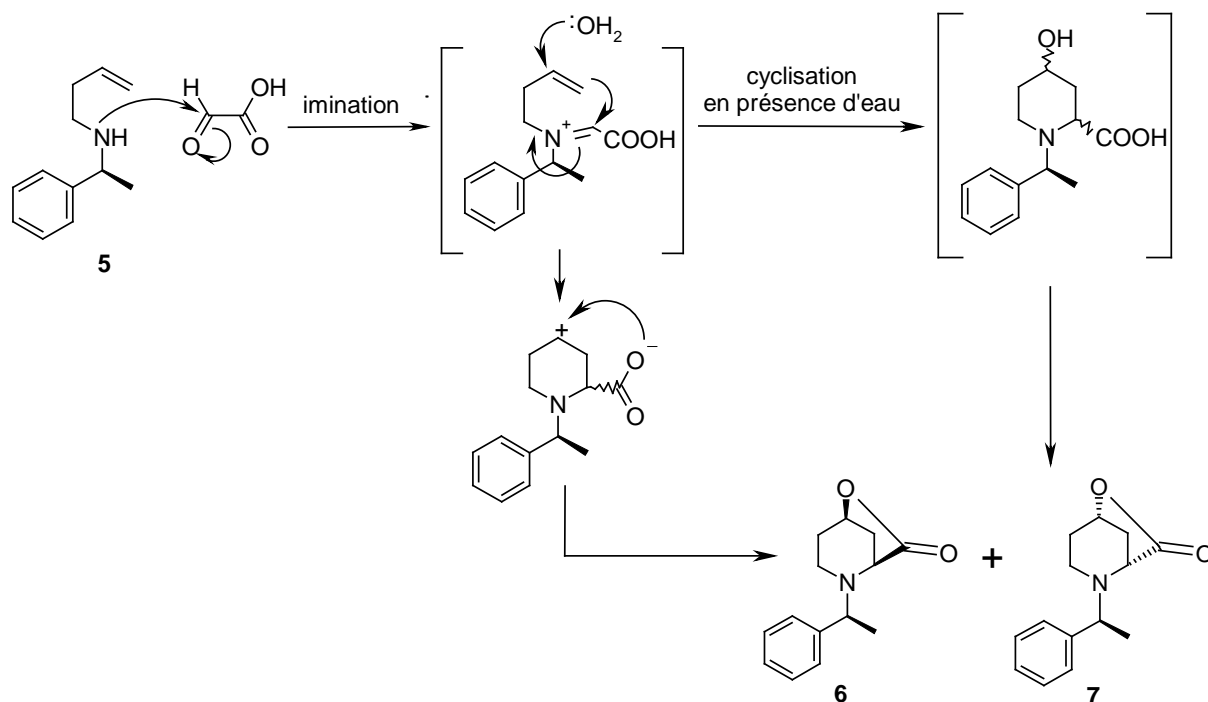


Figure 8 : Réaction de cyclisation des lactones 6 et 7

3. Ouverture des lactones

L'ouverture des lactones 6 et 7 s'effectue par méthanolyse en présence d'acide chlorhydrique. Les deux diastéréoisomères issus de cette réaction, 8 et 9, présentant des migrations chromatographiques bien distinctes ($R_f=0,41$ et $0,63$) permettant leur séparation par chromatographie sur gel de silice. Le diastéréoisomère de configuration $(2S, 4R)$ 8 est obtenu à 42% et celui de configuration $(2R, 4S)$ 9 à 58%. La configuration absolue est attribuée par comparaison de leur migrations chromatographiques avec celles établies dans ce travail de référence pour des molécules analogues.

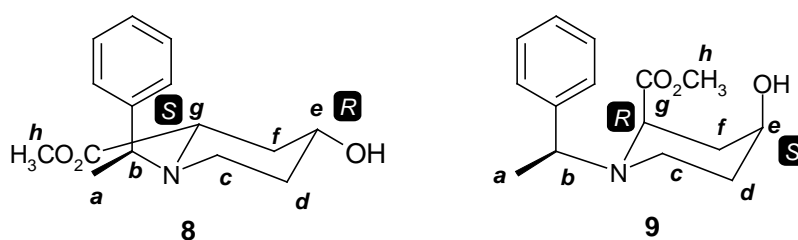


Figure 9 : Conformation des alcools 8 et 9

Des études de spectrométrie RMN 2D ont permis de confirmer la structure des deux diastéréoisomères et leur stéréochimie, les hydrogènes axiaux et équatoriaux étant inéquivalents chimiquement. Le déplacement des protons axiaux et équatoriaux portés par le même carbone est identifié grâce aux techniques HSQC et HMBC (figure 10). Les dernières incertitudes sont levées par la technique COSY (figure 11).

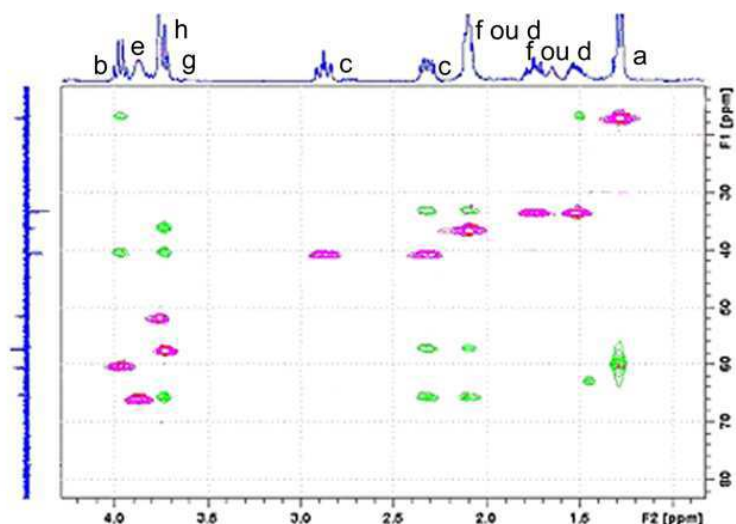


Figure 10.: Spectre HSQC (magenta) superposé au spectre HMBC (vert) du composé **9**

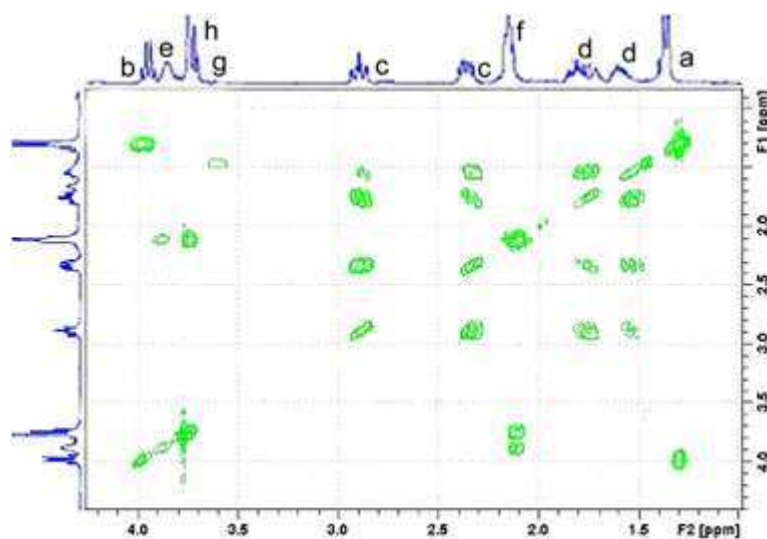


Figure 11.: Spectre COSY du composé **9**

L'identification des protons axiaux et équatoriaux peut s'effectuer grâce à leur constante de couplage. Ceci a été possible avec les protons **c** en alpha de l'azote sont bien résolus.

Les deux protons **c** du composé de Rf inférieur ont des déplacements de 2,30-2,35 ppm ($J_D=12$ Hz ; $J_{Dd}=6$ Hz ; $J_{Ddd}=3,9$ Hz) et 2,83-2,91 ppm ($J_D=12$ Hz ; $J_{Dd}=9,3$ Hz ; $J_{Ddd}=3$ Hz). La constante de couplage J_{Dd} de 6 Hz correspond à un proton axial et celle de 9,3 Hz à un proton équatorial. L'irradiation par effet NOE du proton équatorial montre sa proximité spatiale avec le proton **b** et géminal **c** et permet de déduire la position équatoriale des protons **e** et **g** (figure 12). La configuration de ce composé est donc 2R,4S.

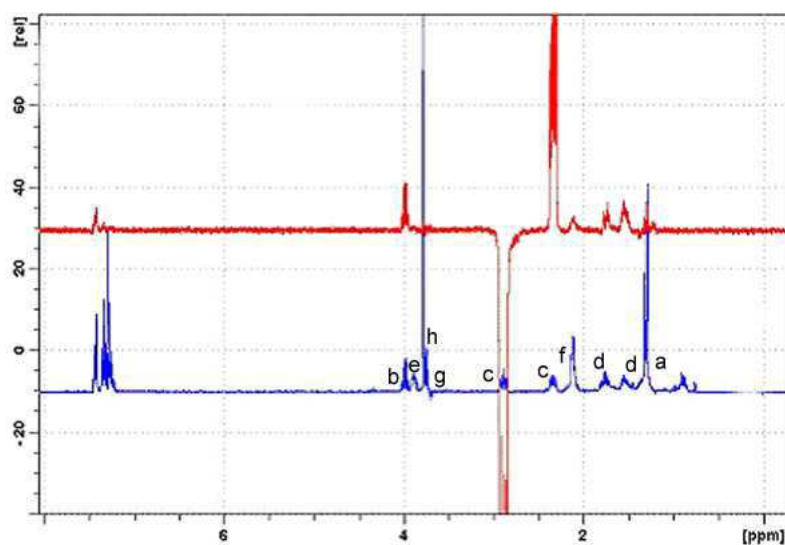
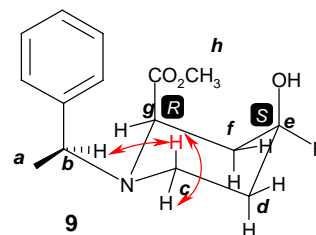


Figure 12 : Irradiation par effet NOE du composé **9**



La même démarche a été effectuée avec le diastéréoisomère **9**. L'étude du spectre COSY a permis de distinguer, dans le massif de 3,15-3,65 ppm, le déplacement des protons **c** et **e** ; le proton **e** a un δ de 3,15-3,45 ppm et le proton **c** a un δ de 3,45-3,65 ppm ($J_D=11$ Hz ; $J_{Dd}=7$ Hz ; $J_{Ddd}=4,5$ Hz). Les constantes de couplage de ce dernier montrent qu'il se trouve en position équatoriale, alors que le proton **c** vers 2,4 ppm est axial. La configuration de ce composé est de ce fait 2R,4S.

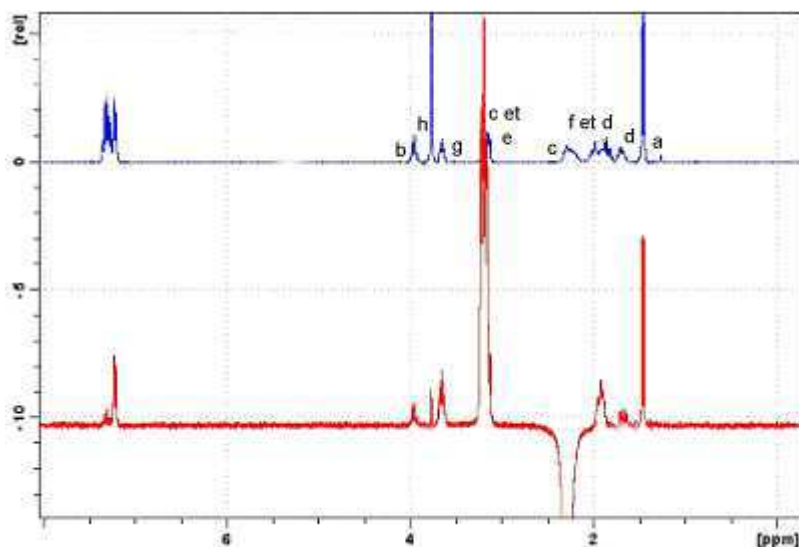
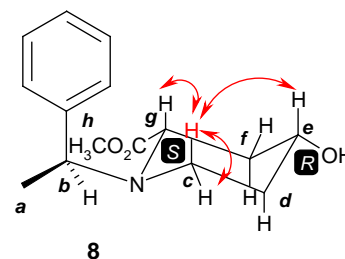


Figure 13 : Irradiation par effet NOE du composé **8**



4. Oxydation

Les alcools **8** et **9** sont transformés respectivement en cétones **10** et **11**, par oxydation de Swern, entraînant la suppression d'un centre chiral (Ohsugia et al., 2003). L'oxydation de Swern des alcools évite l'utilisation de métaux toxiques tels que le chrome. Par ailleurs, l'avantage de cette méthode par rapport à l'oxydation de Dess-Martin est le faible coût des réactifs. Cette méthode d'oxydation relativement douce permet d'obtenir des aldéhydes ou des cétones à partir d'alcools primaires ou secondaires sans former l'acide carboxylique.

L'oxydation de Swern fait intervenir un ion diméthylchlorosulfonium, généré à

-78°C *in situ* à partir du DMSO et du chlorure d'oxalyle (figure 14). Cet intermédiaire réagit avec l'alcool pour donner un ion alcoxysulfonium dont la déprotonation en milieu basique donne un carbanion, qui provoque un réarrangement intramoléculaire *via* un état de transition pseudocyclique à cinq sommets, libérant la cétone désirée et le sulfure de diméthyle.

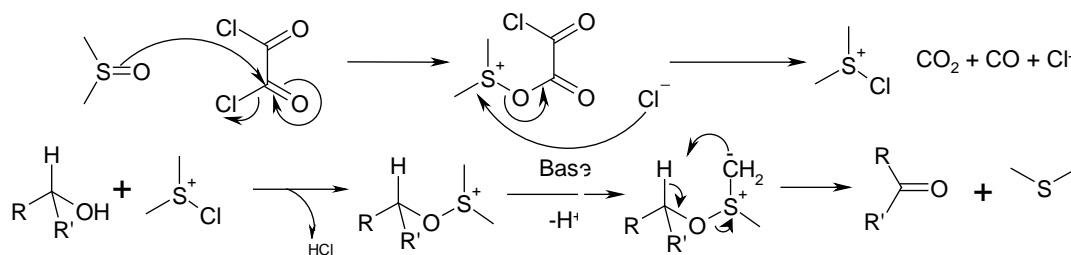


Figure 14 : Mécanisme de l'oxydation de Swern

B. Substitution des dérivés 4-aminopipéridiniques

1. Préparation des amines (voie A)

Le phénylalaninate de méthyle est introduit par amination réductrice des cétones **10** ou **11**, avec le cyanoborohydrure de sodium en présence de triéthylamine. Les amines pipéridiniques (**12** et **13**) sont ensuite déprotégées par hydrogénolyse avec l'hydroxyde de palladium comme catalyseur. Les pipéridines **14** et **15** sont enfin alkylées par le dérivé chloré **4** par chauffage à reflux dans l'acétonitrile avec la triéthylamine comme base avec un rendement de 55%.

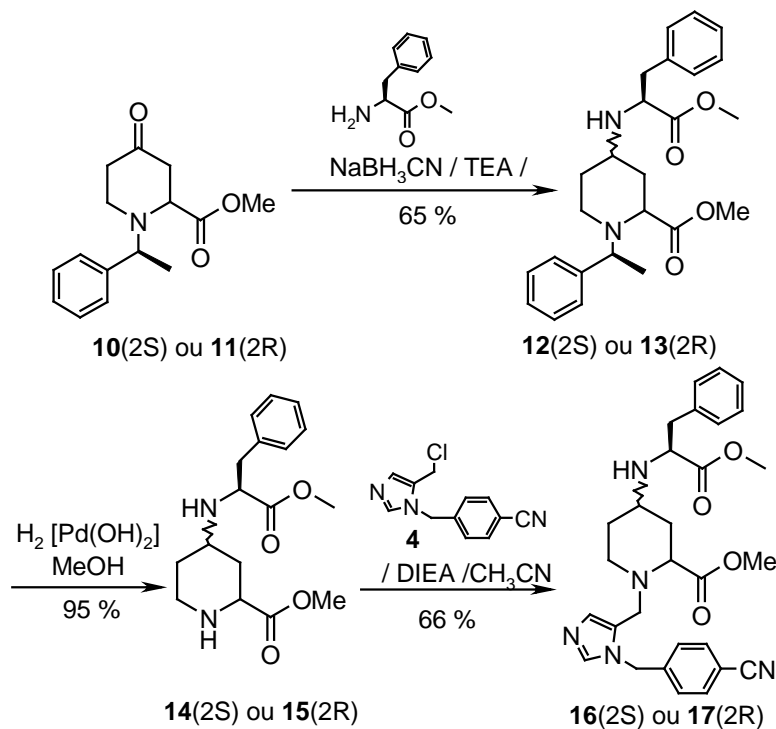


Figure 15 : Synthèse des 4-aminopipéridines substituées par le phénylalaninate de méthyle

2. Préparation des amides (voie B)

Afin de préparer les amides, la cétone est transformée en amine primaire par amination réductrice avec l'acétate d'ammonium en présence de cyanoborohydrure de sodium (Lavey et al., 1996). Lors du premier essai de cette réaction, une réaction secondaire a été constatée (figure 16). L'amine primaire nouvellement formée réagit avec la cétone de départ formant une amine secondaire symétrique. Afin de limiter cette réaction parasite, l'amination réductrice s'effectue avec un défaut de cétone, en ajoutant goutte à goutte la cétone à l'acétate d'ammonium dissous dans un grand volume de méthanol anhydre. L'ajout de cette amine sur le cycle de la pipéridine crée un nouveau carbone asymétrique formant un diastéréoisomère (**18** ou **19**) dont la stéréochimie n'est pas contrôlée.

L'amine exocyclique nouvellement formée est acylée par divers acides carboxyliques, par synthèse parallèle en phase solide sur résine PS-HOBt.

Les amines pipéridiniques (**20-27**) sont ensuite déprotégées par hydrogénolyse, avec l'hydroxyde de palladium comme catalyseur. Les pipéridines **28-35** sont enfin alkylées par le dérivé chloré **4**, en utilisant la même méthode que précédemment. Les produits finaux sont isolés sous forme de mélange de deux épimères (4R et 4S). L'évaluation pharmacologique est effectuée sur ces couples d'épimère. Leur séparation sera envisagée en fonction des activités enzymatiques obtenues.

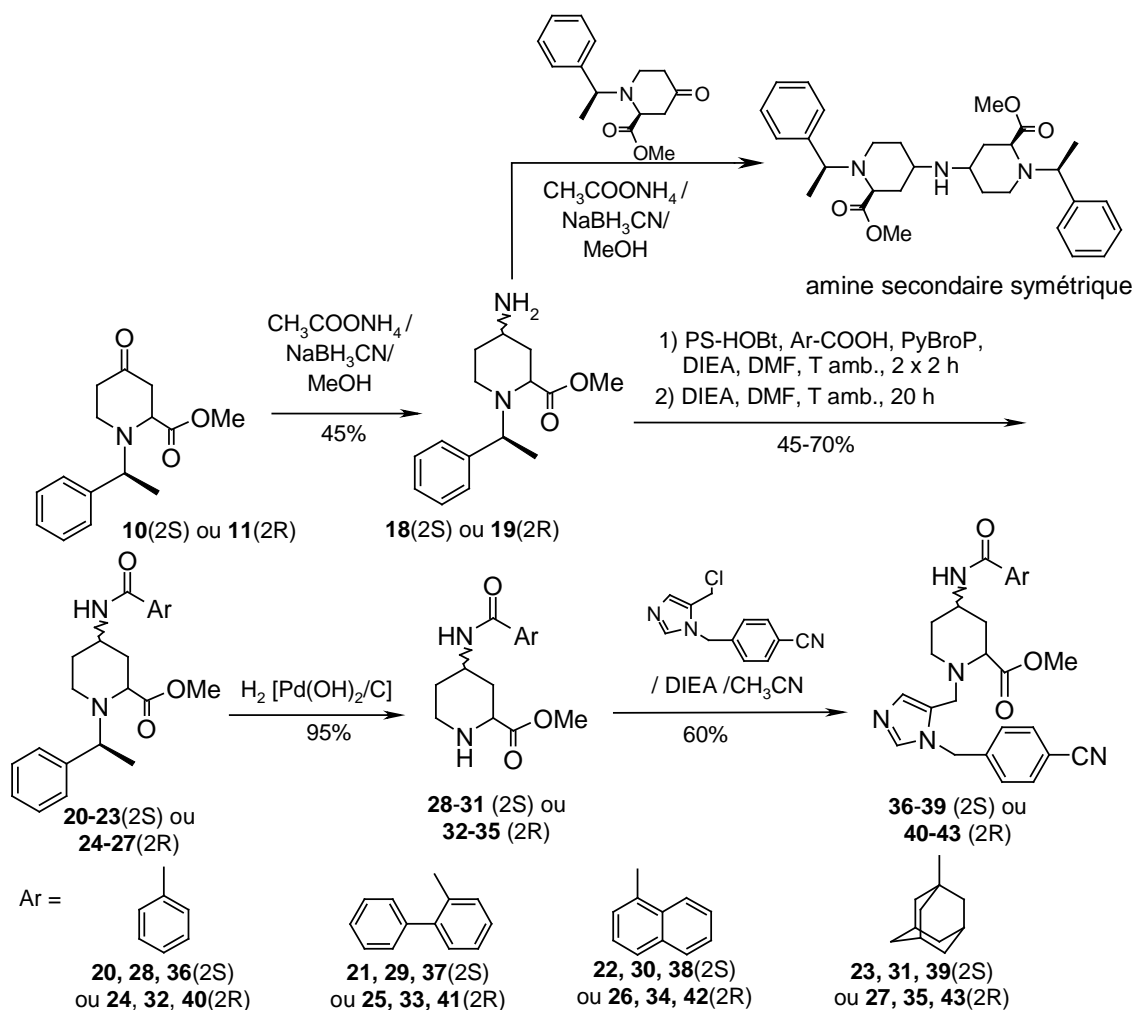


Figure 16 : Synthèse des 4-amidopipéridines substituées

Les amides ont été préparés au moyen d'un synthétiseur de type QUEST 205[®]. Grâce à cette technique, la modulation du résidu hydrophobe R₁ a pu se faire facilement et rapidement, rendant ainsi possible la préparation d'une série de vingt composés.

La réaction de couplage acide / amine sur support solide nécessite l'utilisation d'un agent de couplage greffé sur la résine. Dans le cas de la résine PS-HOBt, l'agent de couplage HOBt est greffé sur des billes de polystyrène (PS) par l'intermédiaire d'un groupement sulfonamide.

Cette synthèse se fait selon une stratégie dite « *catch and release* » Elle s'effectue en deux étapes (figure 17) :

- 1^o étape « *catch* » : après activation par le PyBroP (hexafluorophosphate de bromotrispyrrolidino-phosphonium), l'acide carboxylique se fixe sur la résine, formant un intermédiaire activé. La résine est ensuite filtrée puis rincée plusieurs fois par le DMF, pour éliminer l'excès de réactif.

- 2^o étape « *release* » : l'espèce activée, fixée sur la résine, est clivée par une amine pour former l'amide souhaité. L'utilisation en défaut de l'amine facilite la purification du milieu réactionnel.

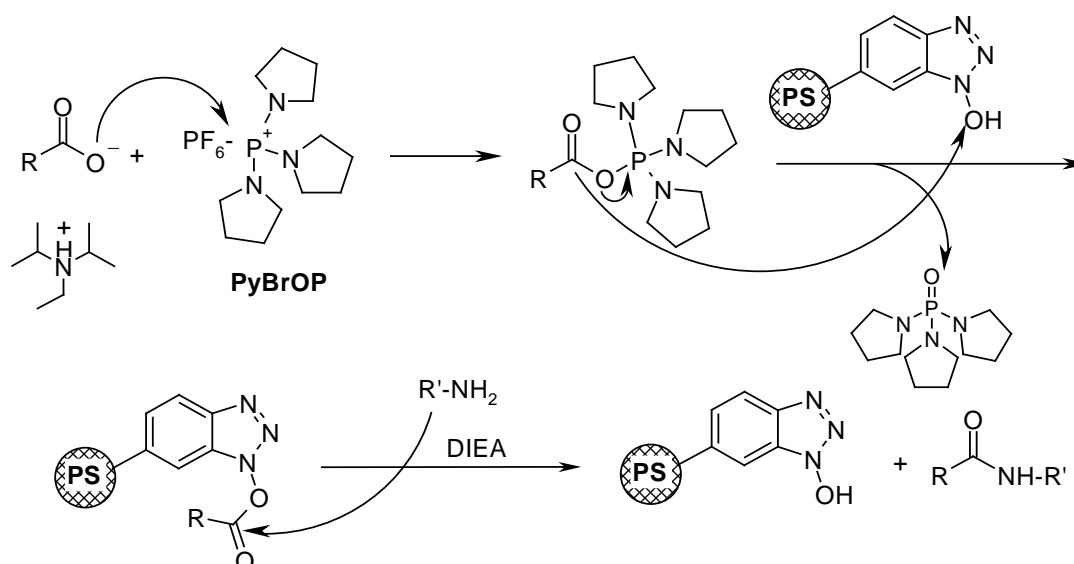


Figure 17.: Principe de l'acylation en phase solide de l'amine R'-NH₂ avec la résine PS-HOBt

III. Synthèse des dérivés du 1,4-diazépane (séries J, K et L)

Les trois séries de composés (séries J, K et L) sont préparées à partir du 1,4-diazépane (ou homopipérazine) (figure 18). La méthode de synthèse du 1,4-diazépane substitué en position 5 permet différentes substitutions de l'hétérocycle. 19 composés dans la série **J** et 6 composés dans chacune des séries **K** et **L** ont été synthétisés.

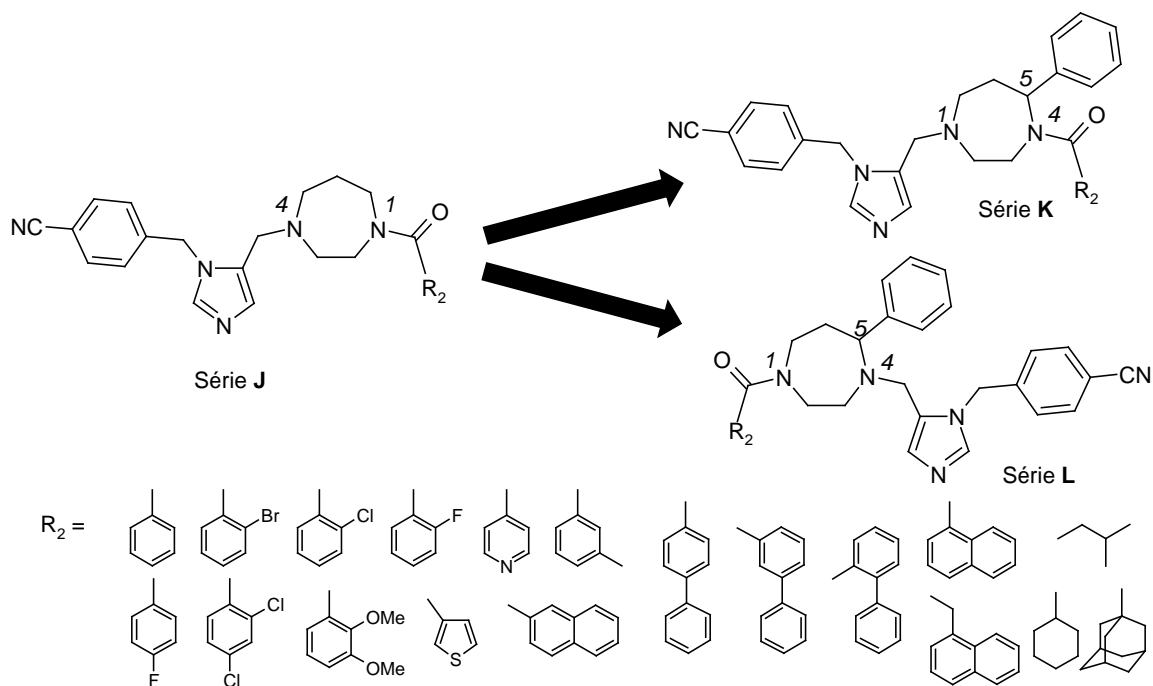


Figure 18 : Structure générale des composés des séries J, K et L

A. Préparation des composés 1,4-diazépaniques (série J)

Les composés 1,4-diazépaniques sont préparés à partir du 1-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4-diazépane, commercial, qui est ensuite alkylé, déprotégé et acylé (figure 19). L'introduction du groupement hydrophobe R₂ se fait lors de la dernière étape par acylation en phase solide.

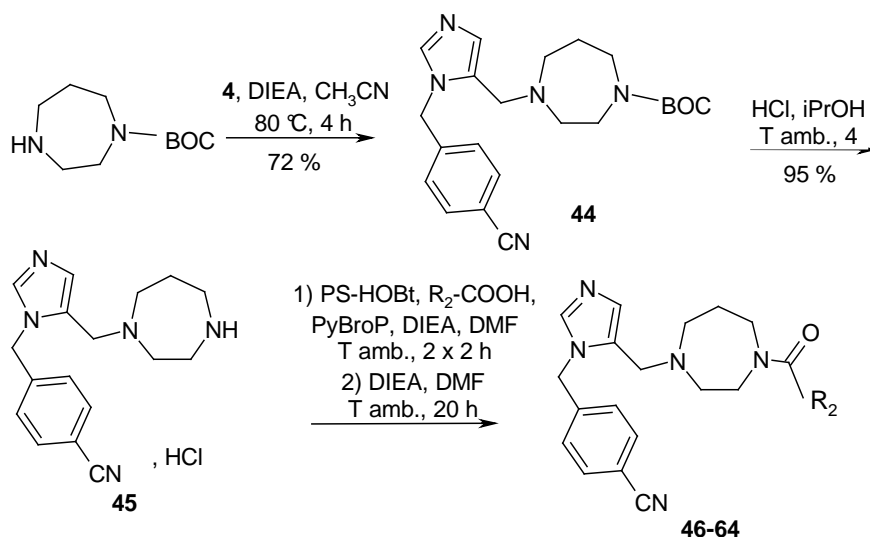


Figure 19 : Synthèse des composés de la série J

1. N-alkylation et déprotection

Le composé 44 est obtenu par substitution nucléophile entre la BOC-homopipérazine et le dérivé chloré 4 par chauffage à 50 °C dans l'acétonitrile en

présence de diisopropyléthylamine, avec un rendement de 72 %. L'amine obtenue est ensuite libérée du groupement *tert*-butoxycarbonyle par une solution d'isopropanol saturé en acide chlorhydrique pour donner le composé **45** sous forme de chlorhydrate.

2. Acylation par synthèse parallèle en phase solide

Les amides **46** à **64** sont préparés par synthèse parallèle en phase solide selon la méthode utilisée pour la série **J**. Cette technique a permis d'obtenir rapidement une vingtaine de composés (figure 20), avec de bons rendements. Ces composés sont facilement purifiés par chromatographie sur couche épaisse et stockés sous forme de chlorhydrate.

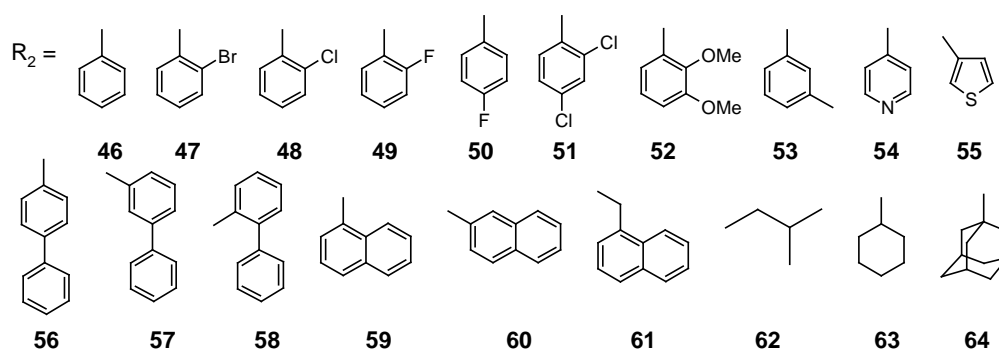


Figure 20 : Substituents des composés de la série **J**

B. Préparation des composés à espaceur 5-phényl-1,4-diazépane (séries **K** et **L**)

L'analyse rétrosynthétique des dérivés diazépaniques substitués en position 5 (figure 21) met en évidence deux déconnexions, nécessitant le 5-phényl-1,4-diazépane, le 1-(4-cyanobenzyl)-5-chlorométhylimidazole **4** et des acides carboxyliques (figure 21). La différence dans le schéma de synthèse des séries **K** et **L** se situe dans l'enchaînement des réactions.

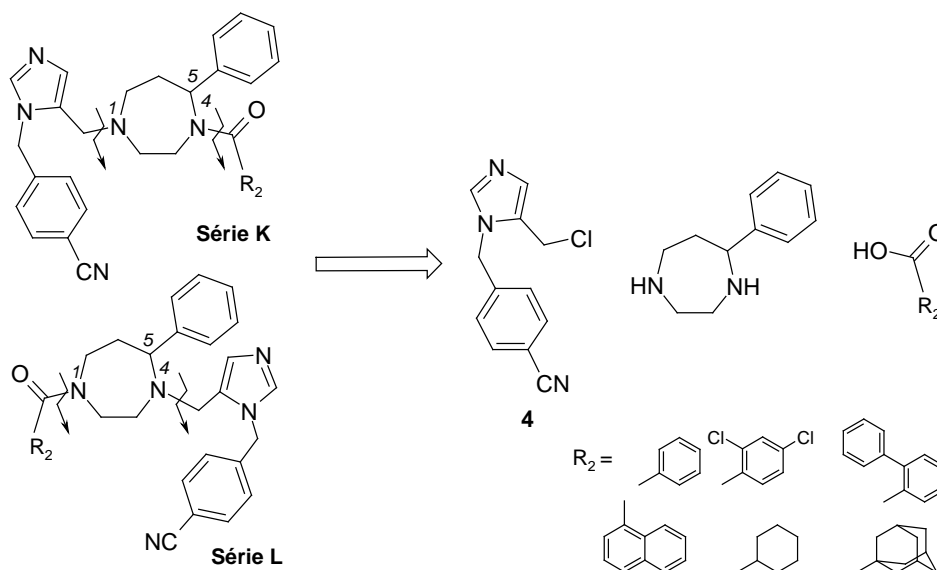


Figure 21 : Rétrosynthèse des composés des séries **K** et **L**

1. Synthèse de l'hétérocycle 1,4-diazépane substitué en position 5

Les 1,4-diazépanes (**92-97**) sont préparés selon une méthode originale mise au point au laboratoire (figure 22) (Włodarczyk et al., 2007). Elle permet d'obtenir, en quatre étapes, l'hétérocycle diaminé souhaité, protégé régiosélectivement par un groupement carbamate. Cette préparation mise au point initialement avec un groupement phényle (G) en position 5 a été transposée à d'autres groupements aromatiques ou aliphatiques. La modulation de G s'effectue lors de la première étape, permettant ainsi d'obtenir les différents hétérocycles substitués correspondants.

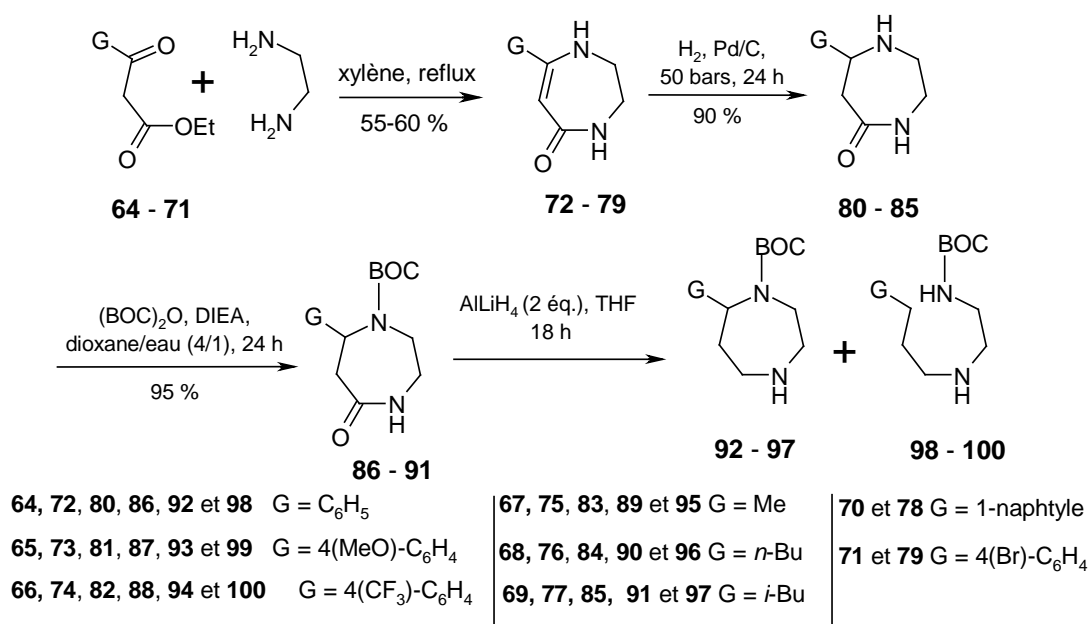


Figure 22 : Préparation des 1,4-diazépanes

a. Synthèse de la 1,4-diazépin-5-one substituée en position 7

Le cycle 1,4-diazépin-5-one est obtenu par réaction de condensation entre un β-cétoester et l'éthanediamine, par adaptation de la méthode décrite (Hofmann, 1962). Les deux réactants sont chauffés à reflux dans le xylène pendant 8 heures. L'eau et l'alcool formés sont éliminés par distillation azéotropique à l'aide d'un montage de Dean-Stark (figure 23). La synthèse des hétérocycles **72** à **79** nécessite au préalable la préparation des β-cétoesters par la méthode décrite à la figure 24.

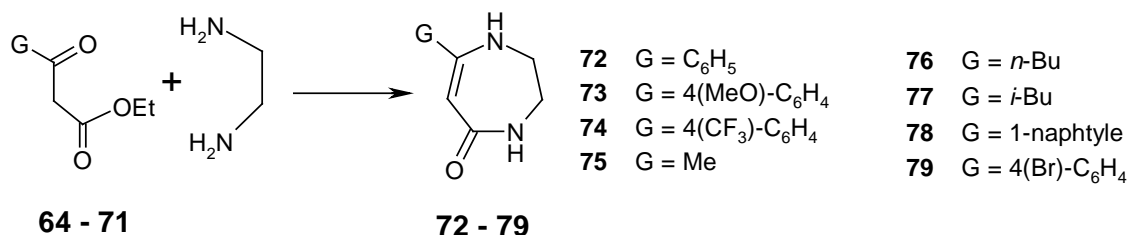


Figure 23 : Synthèse des 1,4-diazépin-5-ones **72-79**

Préparation des β -cétoesters :

Les β -cétoesters **68-71** sont préparés d'après la méthode décrite (Katritsky et al., 2004) (figures 24 et 25).

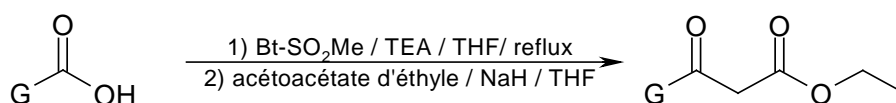


Figure 24 : Synthèse des β -cétoesters

La synthèse des β -cétoesters passe par un intermédiaire acylbenzotriazole. Ce dernier est rapidement formé par réaction d'un acide carboxylique G-COOH avec le N-(1-méthanesulfonyl)benzotriazole (préalablement obtenu par action du chlorure de méthanesulfonyle sur le benzotriazole) en présence de triéthylamine. Le β -cétoester souhaité est obtenu par condensation de l'énolate de l'acétoacétate d'éthyle (préparé par action de l'hydruide de sodium sur l'acétoacétate d'éthyle) avec l'acylbenzotriazole à température ambiante, suivi par le clivage *in situ* du groupement acétyle par chauffage à reflux dans un mélange de chlorure d'ammonium et d'ammoniac aqueux (figure 25). Les β -cétoesters sont obtenus avec des rendements compris entre 53 et 68 % sans formation de produits secondaires.

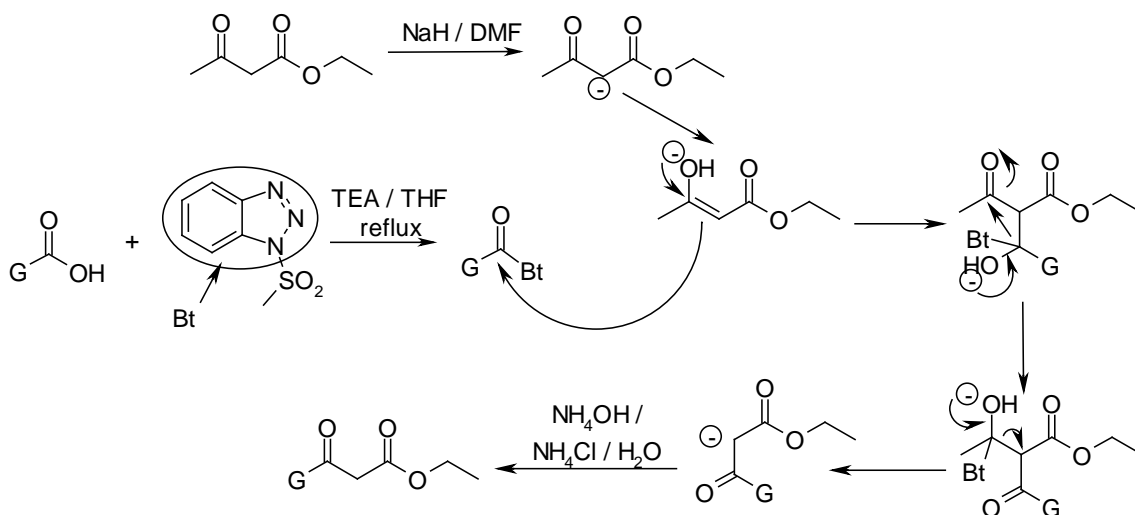


Figure 25 : Mécanisme réactionnel de synthèse des β -cétoesters

Le mécanisme de la cyclisation en 1,4-diazépin-5-one (figure 26) se décompose en deux étapes : une réaction d'imination entre la cétone et l'éthanediamine, puis une réaction d'aminolyse entre l'ester et l'amine primaire. Les 1,4-diazépin-5-ones existent théoriquement sous forme d'un équilibre tautomère céto-énolique. L'étude du spectre de RMN ^1H démontre l'absence de la forme imine, au profit de la forme énaminolactame conjuguée plus stable.

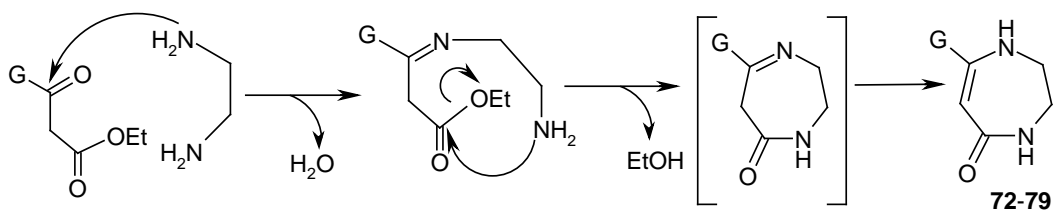


Figure 26 : Mécanisme de cyclisation en 1,4-diazépin-5-ones **72-79**

Les rendements, inférieurs à 40%, et les analyses LC/MS mettent en évidence la formation de divers sous-produits issus de réactions parasites dépendantes des conditions réactionnelles (figure 27). Par exemple, la condensation de l'éthanediamine avec le benzoylacétate d'éthyle **64** donne principalement la 2,3,4,5-tétrahydro-1,4-diazépin-5-one **72** (tableau 1) avec 40% de rendement, alors que l'acétoacétate d'éthyle **67** donne la 2,3,4,5-tétrahydro-1,4-diazépin-5-one **75** et le bis(iminoester) **I**, avec des rendements respectifs de 32% et 30%. Ces résultats illustrent clairement la difficulté de trouver les conditions expérimentales adéquates permettant d'obtenir sélectivement le produit désiré. Une étude a donc été conduite pour augmenter les rendements (Wlodarczyk et al., 2007).

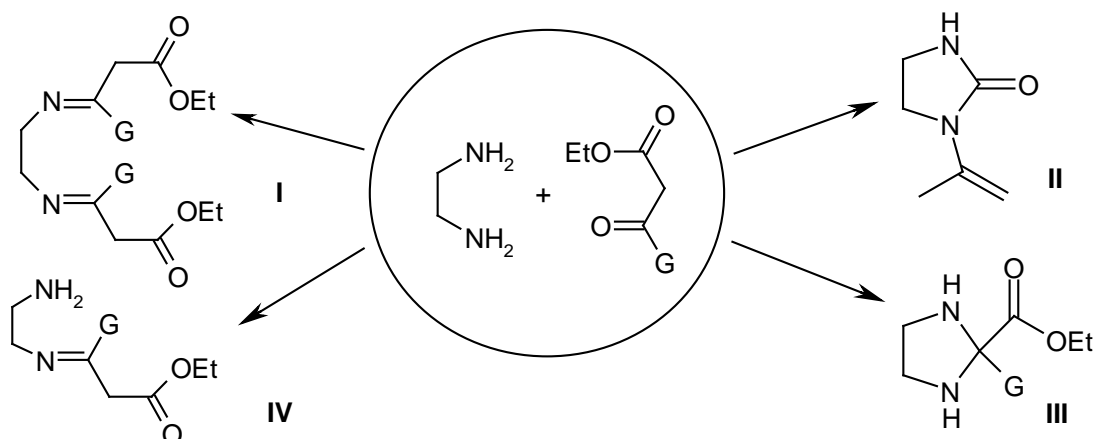

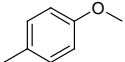
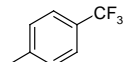

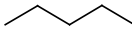


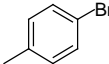


Figure 27 : Sous-produits observés après réaction d'un β-cétoester avec l'éthanediamine.

Plusieurs travaux (Puodziunaite et al., 1999 ; Israel et al., 1971) sur des composés similaires montrent que les proportions en sous-produits dépendent des paramètres réactionnels tels que le pH, le temps de réaction et la nature du solvant. Après plusieurs essais, le xylène s'est avéré être le meilleur solvant permettant de limiter la formation de l'imidazolidinone **II**, de l'imidazolidine **III** et de l'imine **IV**. L'utilisation de conditions basiques (pyridine, potasse alcoolique) ne permet pas d'augmenter la proportion de diazépinone, tandis que des conditions acides augmentent la proportion d'imidazolidine **III** (Slusarczuk et al., 1971 ; Saloutin et al., 1992). Les meilleures conditions réactionnelles de synthèse des 2,3,4,5-tétrahydro-1,4-diazépin-5-ones **72** à **79** sont obtenues par distillation azéotrope avec le xylène en milieu neutre (tableau 1, méthode A).

L'irradiation micro-ondes pour la synthèse organique est en pleine expansion ; c'est une bonne technique pour des réactions libérant de l'eau et/ou de l'alcool (Bougrin et al., 1994). Cette méthode permet souvent d'augmenter les rendements en formant des produits plus propres, tout en diminuant le temps de réaction. Afin d'augmenter le taux de cyclisation en diazépinones **72-79**, l'approche thermique a

donc été remplacée par l'irradiation micro-ondes, permettant ainsi d'augmenter de 20 % les rendements et la vitesse de réaction (tableau 1).

Composé	G	Méthode A ^a Rendement (%)	Méthode B ^b Rendement (%)
72		40	60
73		39	58
74		36	55
75		32	47
76		35	48
77		38	54
78		41	57
79		40	55

^a Méthode A: xylène, chauffage classique, montage de Dean-Stark, 8 h.

^b Méthode B: xylène, irradiation micro-ondes (300 W), montage de Dean-Stark, 10 min.

Tableau 1 : Comparaison des rendements pour la synthèse des 2,3,4,5-tétrahydro-1,4-diazépin-5-ones **72-79** sous chauffage classique et par micro-ondes

b. Réduction de la liaison éthylénique et protection de l'amine

La formation des diazépانونes **80-85** s'effectue par réduction catalytique de la liaison éthylénique des diazépانونes **72-79** en présence de palladium sur charbon sous 50 bars d'hydrogène à 50°C, avec un rendement de 90 % (figure 28).

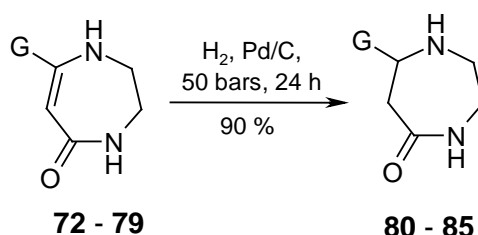


Figure 28 : Réduction des diazépانونes 72-79

La RMN ¹H ne permet pas de déterminer les constantes de couplage entre les protons. Des études de RMN 2D ont donc été effectuées sur le composé **80**. La corrélation proton-carbone HSQC-dept a permis d'identifier les protons portés par chaque atome de carbone (figure 29). Ce spectre montre la présence du carbone tertiaire *b* portant un seul hydrogène. Le spectre de corrélation proton-proton COSY (figure 30) confirme le couplage entre les deux atomes d'hydrogène *d* et *c* et entre les atomes d'hydrogènes *a* et *b*. La confrontation de ces résultats avec ceux des spectres de RMN ¹H des composés **81-85** confirme la structure cyclique de tous ces composés.

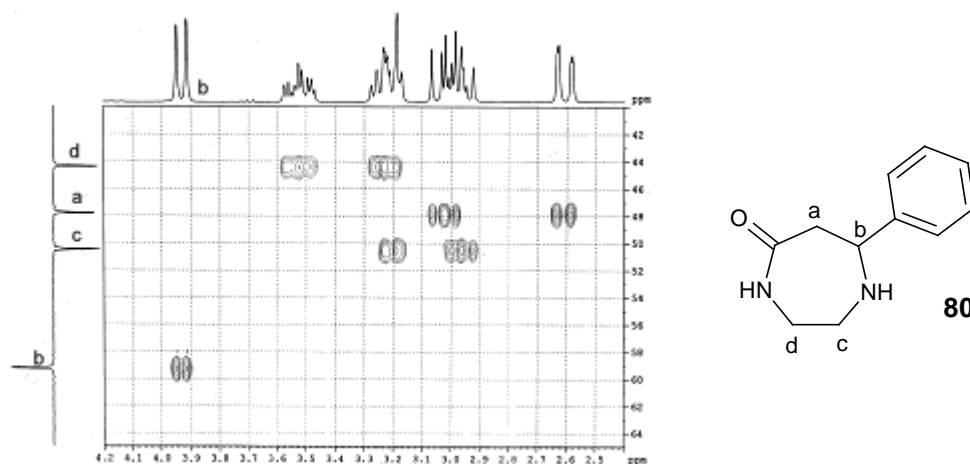


Figure 29 : Spectre HSQC-dept du composé **80**

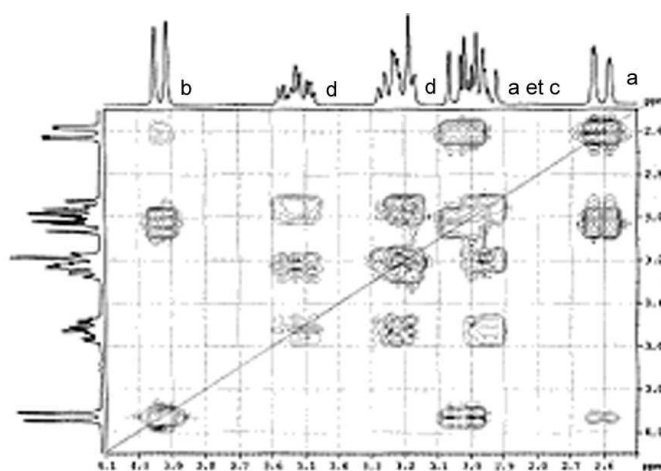


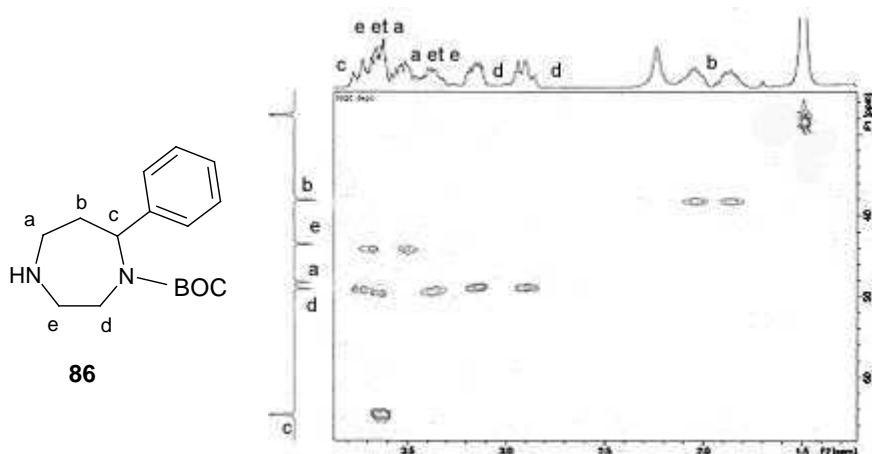
Figure 30 : Spectre COSY du composé **80**

Les amines secondaires **80-85** sont ensuite protégées par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (BOC) clivable en milieu acide.

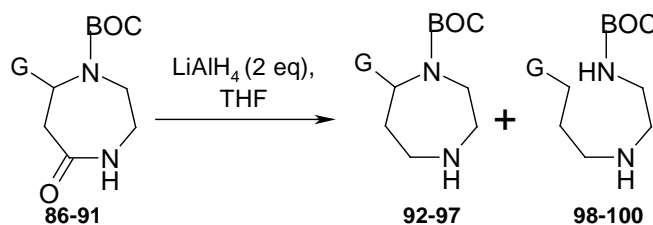
c. Réduction de la fonction lactame

La réduction de la fonction lactame a été réalisée au moyen du tétrahydrure de lithium d'aluminium. D'autres hydrures ont également été utilisés tels que des dérivés boronés ($\text{BH}_3\text{-THF}$, $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$) ou un mélange de monochloroalane (AlH_2Cl) et de dichloroalane (AlHCl_2), préparé *in situ* à partir de LiAlH_4 et de AlCl_3 (Ojima et al., 1991). Leur emploi a cependant conduit à la décarbamoxylation du produit de départ.

La réduction du lactame **86** avec LiAlH_4 (2 éq.) en amine n'est pas chimiosélective. En effet, deux composés principaux ont été isolés par chromatographie sur gel de silice. Les analyses du composé de R_f supérieur montrent la présence d'un carbone tertiaire c (55 ppm) par expérience d'HSQC (figure 31). La confrontation du spectre proton et de l'analyse LC-MS permet de confirmer la structure cyclique de ce composé (**86**). Les analyses par RMN et LC-MS du composé de R_f inférieur ont montré que, parallèlement à la réduction de l'amine, le cycle diazépiane s'ouvrait par rupture de la liaison entre l'amine protégée et l'atome de carbone substitué par le phényle.

Figure 31 : Spectre HCSQC du composé **86**

Cette coupure de l'hétérocycle n'est pas décrite avec la 1-*tert*-butoxycarbonyl-2-phénylpipéridin-3-one (Kise et al., 2004) et la 3-amino-1-*tert*-butoxycarbonyl-2-phénylpipéridine (du CP-99,994 et NaBH₄ comme hydrure) (Huang et al., 2003). Les analyses chromatographiques et LC/MS indiquent que la réduction, en diazépane **92**, et l'hydrogénolyse, en éthanediamine **98**, se déroulent simultanément. De plus, une étude comparative réalisée avec les 7-aryl et 7-alkyl 1,4-diazépan-5-ones (**86-88** et **89-91**, respectivement) (figure 32 et tableau 2) montre que l'ouverture du cycle se produit exclusivement en présence d'un noyau phényle, indépendamment du caractère électronique de son substituant (4-méthoxy pour **87** et 4-trifluorométhyle pour **88**). La conversion totale des lactames **86-88** en amines **98-100** est observée quand la stœchiométrie de LiAlH₄ est égale à 4 équivalents. Cette réaction évoque l'ouverture d'hétérocycles azotés comme la 2-phénylpyrrolidine par le lithium (Almena et al., 1996), ou peut être également comparée à l'hydrogénolyse catalytique classique de N-benzylamines.

Figure 32 : Réduction du lactame par LiAlH₄

Diazépan-5-ones	G	Diazépane (rendement en %)	Amine (rendement en %)
86		92 20	98 13
87		93 18	99 10
88		94 22	100 7
89		95 55	0
90		96 51	0
91		97 57	0

Tableau 2 : Rendements en produits obtenus par réduction du lactame avec AlLiH₄

2. Substitution des deux fonctions amines

Les voies de synthèse utilisées pour obtenir les séries **K** et **L** (figure 33) sont similaires et ne se différencient que dans leur enchaînement. L'obtention des composés de la série **K** est plus aisée puisque la modulation s'effectue lors de la dernière étape.

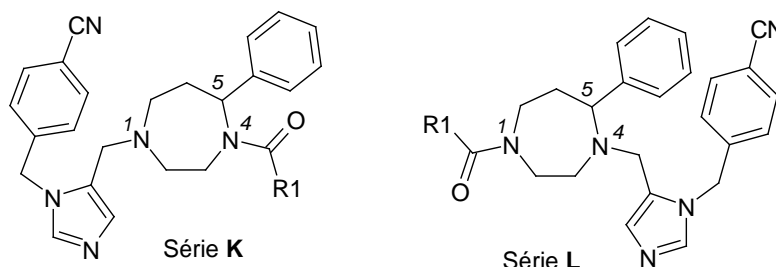


Figure 33 : Formule générale des composés des séries **K** et **L**

a. Préparation de la série **K**

Les composés de la série **K** sont préparés de façon analogue à ceux de la série **J**. L'amine **92** est alkylée par le dérivé chloré **4** dans l'acétonitrile à 50°C en présence de diisopropyléthylamine. L'amine tertiaire **101** obtenue est déprotégée par de l'acide chlorhydrique libérant l'amine **102**. Les faibles rendements de l'acylation de l'amine **102** par l'utilisation du mélange PyBroP/HOBt, aussi bien en phase solide qu'en solution, ont conduit au changement de méthode d'acylation. L'activation des acides carboxyliques sous forme de chlorure d'acide fournit les amides souhaités avec de faibles rendements à cause de la faible stabilité des chlorures d'acide et de l'élimination difficile des produits secondaires (SO₂ et HCl). Par contre, la méthode retenue, impliquant l'EDCI (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), permet d'obtenir les amides **103-108** avec de bons rendements.

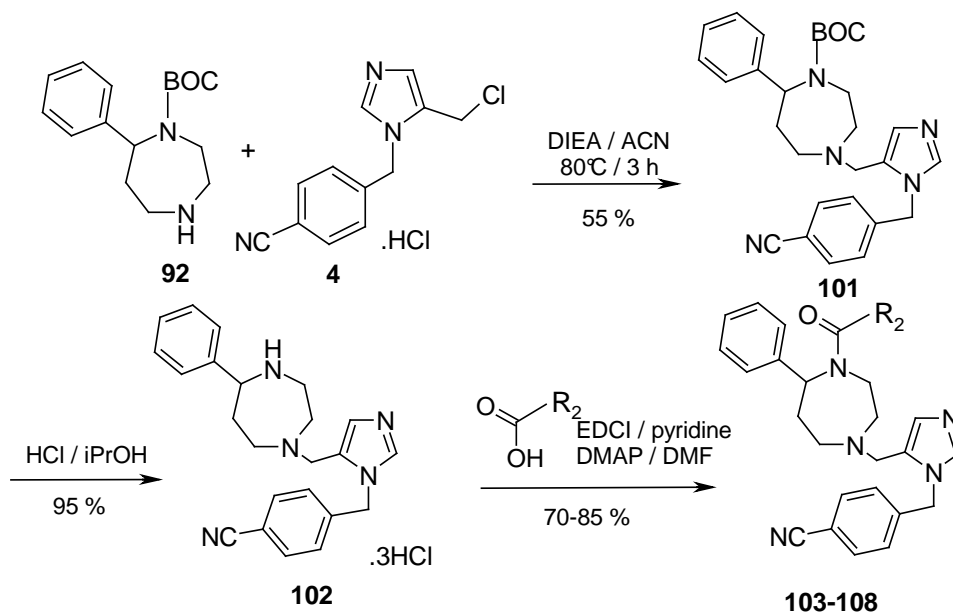


Figure 34 : Préparation des composés de la série **K**

Ce schéma de synthèse (figure 34) permet la préparation de 6 composés avec

le 5-phényl-1,4-diazépane, substitué en position 4 par des groupements hydrophobes R_2 (série **K**), et de 2 composés avec la 1-(3-phénylpropyle)-éthane-1,2-diamine, amine issue de la réduction de la diazépinothione (série **K'**) (figure 35).

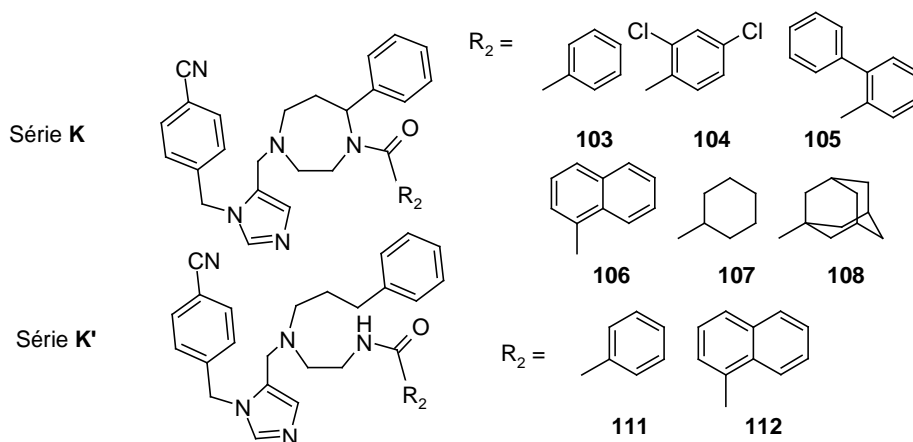


Figure 35 : Structure des composés des séries **K** et **K'**

Le mécanisme réactionnel d'acylation par l'EDCI passe par plusieurs intermédiaires, permettant ainsi l'activation de l'acide (figure 36). L'EDCI et l'acide carboxylique forment une *O*-acylisourée, disposant d'une réactivité similaire aux anhydrides d'acide correspondants. Suite à une migration du groupement acyle, la *O*-acylisourée se transforme lentement en *N*-acylurées secondaires qui peuvent être isolées quantitativement en absence d'agent nucléophile. La réaction de la DMAP (*N,N*-diméthylaminopyridine) avec la *O*-acylisourée forme un amide réactif ("l'ester activé") qui empêche la formation intramoléculaire de type *N*-acylurée, favorisant ainsi la génération de l'amide souhaité. La DMAP agit dans cette voie comme un réactif de transfert d'acyle. Le fragment diméthylamino de l'EDCI rend l'urée facilement salifiable, permettant ainsi son élimination du milieu réactionnel par lavage à l'aide d'une solution légèrement acide.

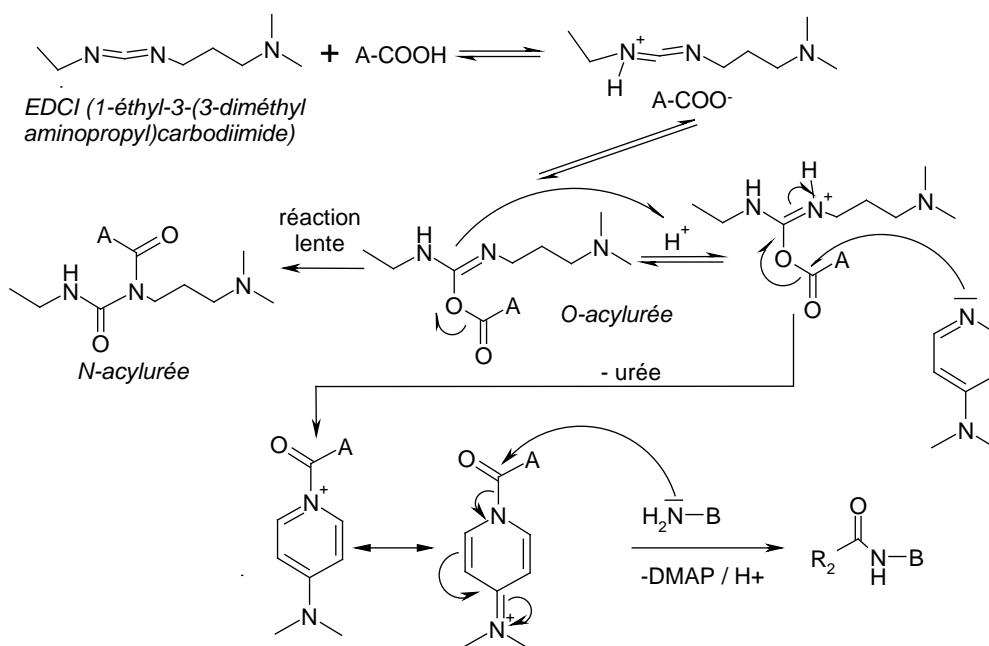


Figure 36 : Mécanisme réactionnel du couplage avec l'EDCI

b. Préparation de la série L

Les réactions utilisées pour la synthèse de la série L sont identiques à celles de la série K (figure 37). Le diazépane **92** est acylé par divers acides carboxyliques en utilisant le mélange EDCI/DMAP comme agent d'activation. Après déprotection en milieu acide, l'amine hétérocyclique libérée est alkylée par le paracyanobenzylimidazole **4** pour donner les six produits finaux **125** à **130**.

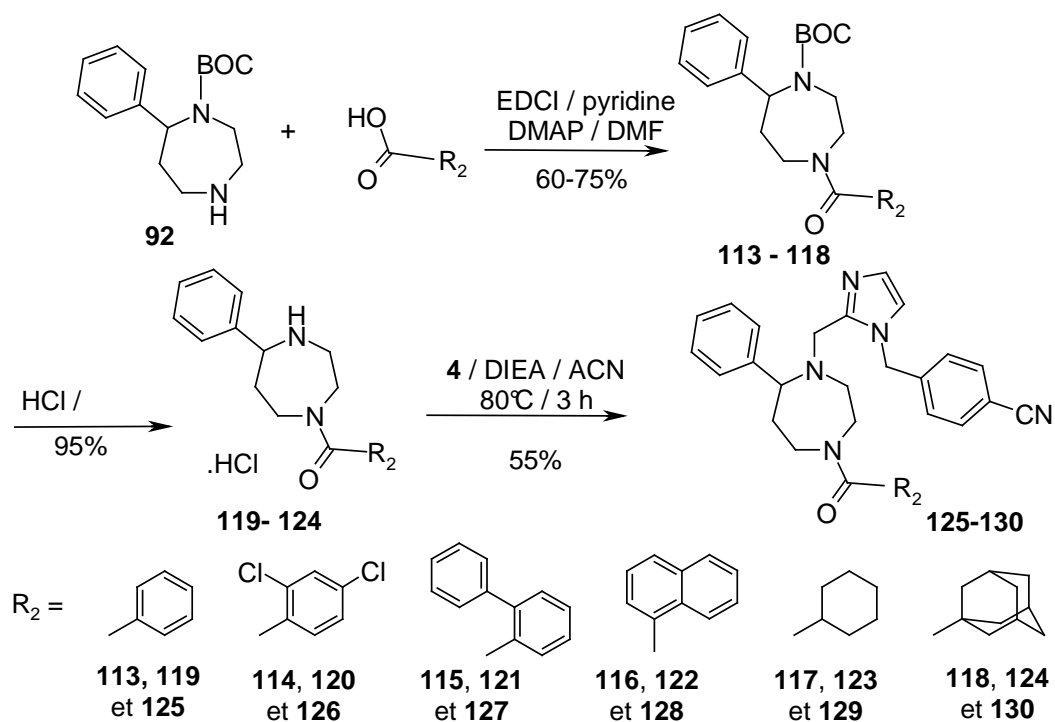
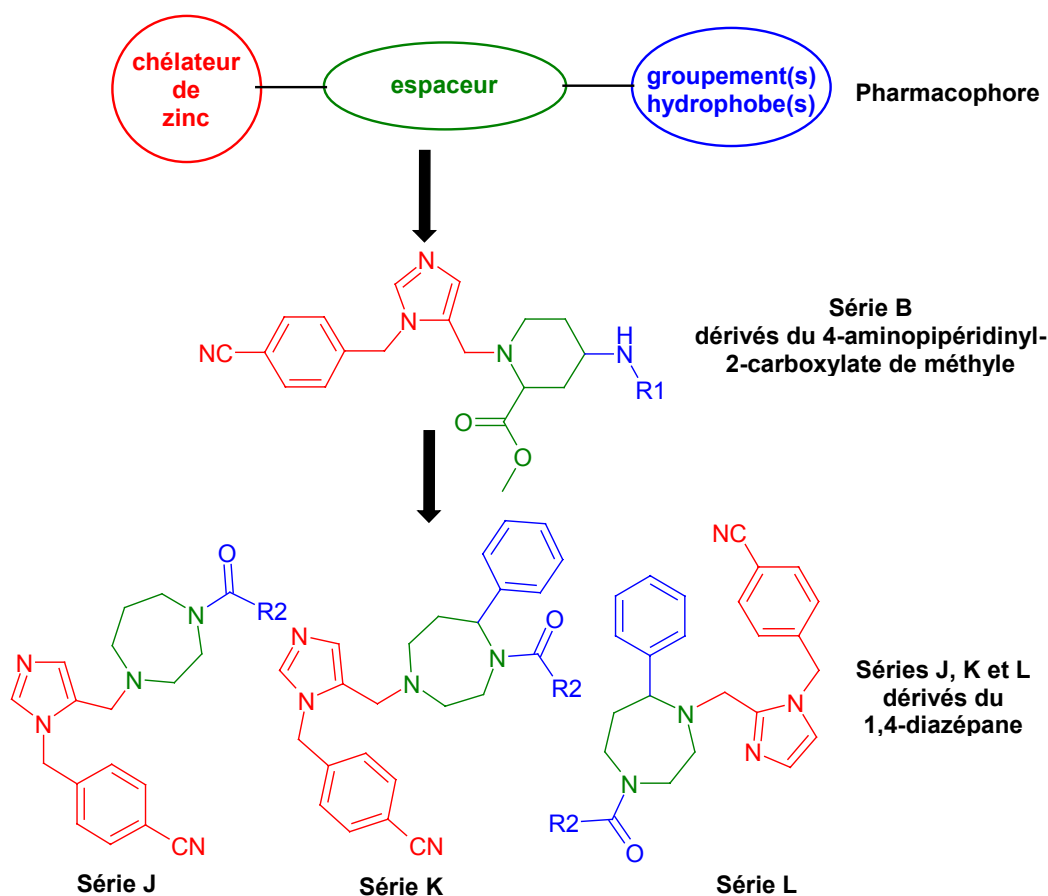


Figure 37.: Synthèse des composés de la série L

**CONCLUSION
PERSPECTIVES**

Le peptide CVFM est le premier FTi décrit ($IC_{50}(FTase) = 60 \text{ nM}$). Sa nature peptidique empêchant son utilisation thérapeutique, de nombreuses modulations visant à supprimer le caractère peptidique et à augmenter l'activité *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées. Les relations structure-activité résultant de ces modulations ont conduit à l'élaboration d'un pharmacophore.

Mon travail avait pour but principal la synthèse et l'évaluation pharmacologique de quatre séries originales de composés potentiellement inhibiteurs de farnésyltransférase possédant trois hétérocycles différents comme espaceur : la 4-aminopipéridine-2-carboxylate de méthyle (série **B**), le 1,4-diazépane (série **J**) et le 5-phényl-1,4-diazépane (séries **K** et **L**). Le groupement chélateur est, pour tous les composés préparés, le 1-(4-cyanobenzyl)imidazole. Les modulations ont été effectuées au niveau du groupement hydrophobe.

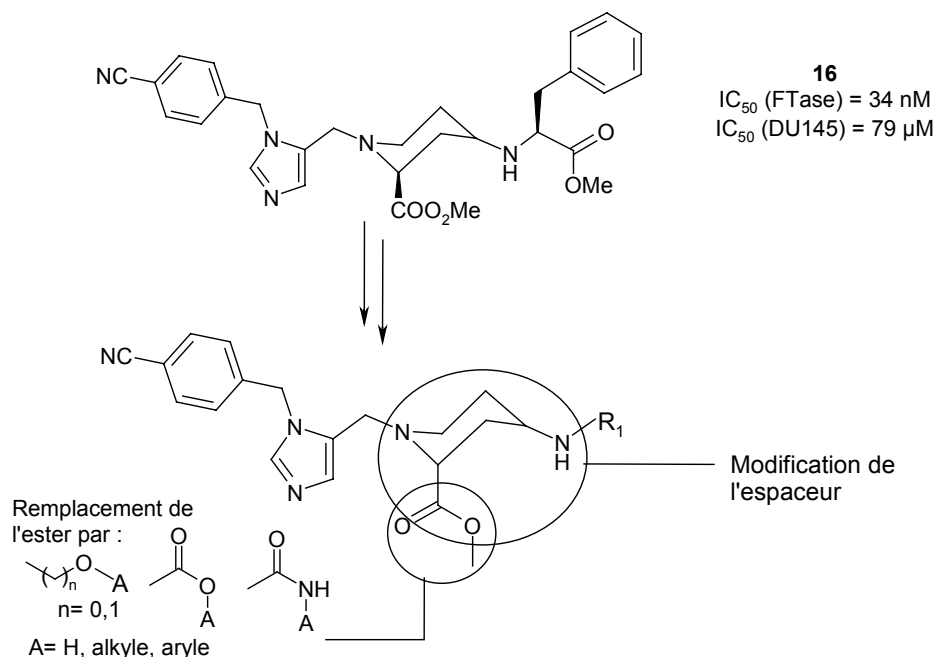


Après avoir mis au point une voie de synthèse permettant de séparer les diastéréoisomères $2R$ et $2S$ des molécules possédant le motif 4-aminopipéridine-2-carboxylate de méthyle, une dizaine de composés sont préparés en modulant le groupement hydrophobe R_1 de cet hétérocycle (série **B**). Leur évaluation pharmacologique a été réalisée de façon systématique par mesure de l'inhibition de farnésylation et par mesure de l'inhibition de prolifération cellulaire sur les lignées DU145 et PC3. L'activité enzymatique et cellulaire de ces composés est modeste. Le composé possédant le motif le phénylalaninate de méthyle (**16**) possède la meilleure activité inhibitrice de la FTase. Son inhibition de prolifération cellulaire est similaire à celle du composé de référence (**L-744832**).

La mesure de l'activité enzymatique des acides carboxyliques correspondant à ces esters permettra ultérieurement de savoir si ces composés sont des prodrugs. L'influence de la stéréochimie de ces diastéréoisomères sur l'activité biologique

pourra être étudiée par leur séparation, pour les plus actifs d'entre eux, par chromatographie chirale.

D'autres modulations ont été envisagées à partir de ce squelette pipéridinique, en remplaçant l'ester par un autre groupement tel qu'un alcool, un acide carboxylique ou un amide primaire. Une autre stratégie, consistait à modifier l'espaceur. Une mini chimiothèque de 64 composés a été préparé, par synthèse parallèle, en modulant le groupement chélateur de zinc et le groupement hydrophobe.

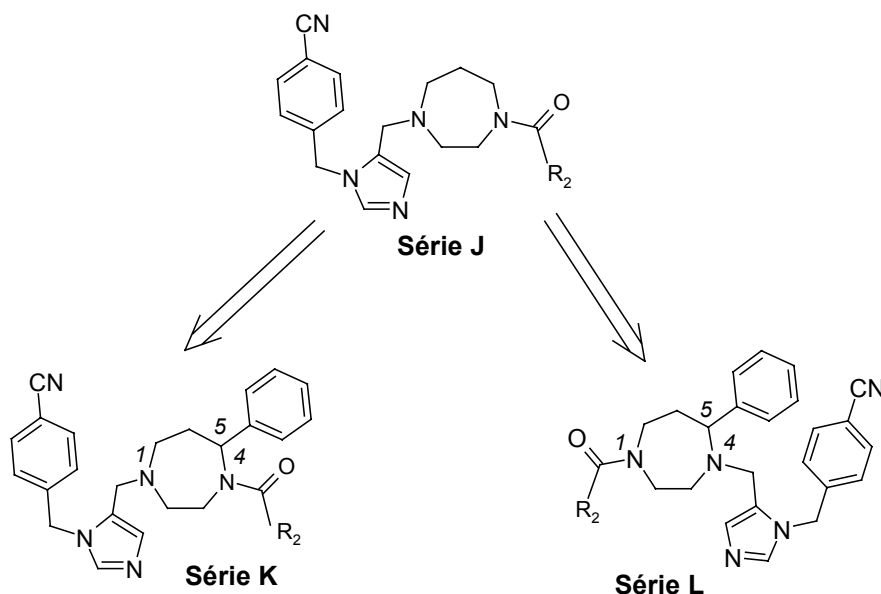


Le criblage de la chimiothèque a révélé deux hits **C5** et **C7**. L'espaceur de ces deux *hits*, l'homophénylalanine, a été rigidifié en 1,4-diazépane (série **J**) et en 7-phényl-1,4-diazépane (séries **K** et **L**).

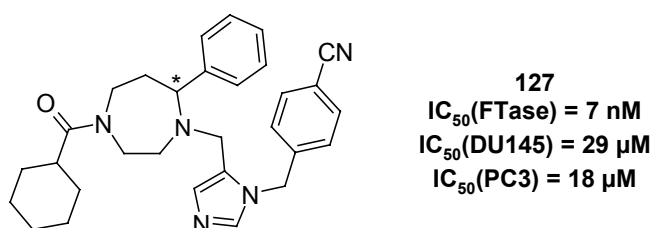
Une vingtaine de composés ont d'abord été préparés en modulant le groupement hydrophobe R_2 du 1,4-diazépane (série **J**). Leur évaluation pharmacologique permet d'établir des relations structure-activité et notamment au niveau du « A_2 binding site ». Parmi les 19 composés, seulement 7 inhibent la prolifération cellulaire des lignées DU145 et PC3. Le calcul théorique de leur lipophilie montre une relation avec l'activité cellulaire. Cette corrélation pourra être vérifié de façon expérimentale par mesure du logP et de l'inhibition intracellulaire de la FTase.

Ensuite, un phényle est ajouté en position 5 du diazépane. Le groupement chélateur de zinc et le groupement hydrophobe pouvant se placer de deux façons différentes sur le 5-phényl-1,4-diazépane, deux séries (**K** et **L**) sont préparées. Après avoir optimisé la synthèse de cet hétérocycle (Wlodarczyk et al., 2007), 6 composés pour chacune de ces deux séries (**K** et **L**) sont synthétisés en modulant le groupement hydrophobe R_2 .

Les composés avec le groupement chélateur de zinc en position 4 (série **L**) disposent d'activités enzymatiques nettement supérieures aux molécules avec ce même substituant en position 1 (série **K**). Le remplacement du 1,4-diazépane (série **J**) par le 5-phényl-1,4-diazépane correctement substitué (série **L**) n'influe que modestement sur l'activité enzymatique. Cependant, l'ajout de ce groupement potentialise de façon significative l'activité cellulaire.



Le composé **127** avec le cyclohexane comme groupement hydrophobe possède les meilleures activités enzymatiques et cellulaires. Le docking de ce composé montre l'importance de la stéréochimie dans la reconnaissance par le site actif de la FTase. Le composé **127**, testé initialement sous forme racémique, sera séparé par chromatographie sur phase chirale, pour ensuite effectuer l'évaluation pharmacologique des deux énantiomères.

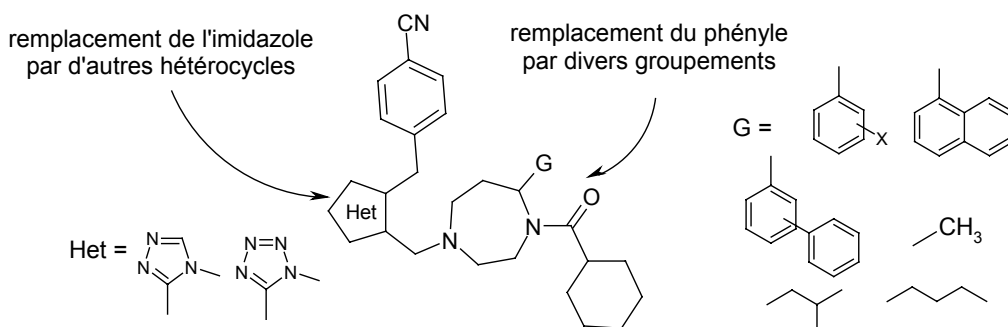


Une étude *in vivo* montre que le composé de référence, le **L-744832**, diminue, à 30 mg/kg la taille de la tumeur de 85 % sur DU145 et de 87 % sur PC3, par rapport aux souris non traitées (Sirotnak et al., 2000). De plus, un composé du laboratoire, similaire au composé **127**, a été étudié *in vivo* sur un modèle de souris xéno greffées HT29 (cancer du côlon), ce composé a montré une diminution de 50 % du volume de la tumeur (Włodarczyk et al., 2006). Au vu de ces remarques, une étude *in vivo* du composé **127** possédant de meilleures activités cellulaires que le **L-744832**, est envisageable.



De nouvelles séries sont envisageables autour de l'espaceur diazépane. L'aromatique pourrait être substitué par divers groupements G, aromatiques ou aliphatiques, afin d'établir de nouvelles relations structure-activité. Pour augmenter la

solubilité et donc la biodisponibilité, l'imidazole pourrait être remplacé par un 1,2,4-triazole et un tétrazole.



Les inhibiteurs de farnésyltransférase (FTis) induisent l'accumulation en phase G2-M de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Crespo et al., 2001), qui pourrait être due à l'inactivation d'une protéine farnésylée, la CENP-E (Schaar et al., 1997). En effet, l'inhibition de farnésylation de CENP-E interfère avec son association avec le fuseau mitotique.

Afin de déterminer le mécanisme responsable de la modification du cycle cellulaire induit par les FTis, quatre FTis, préparés ici, ont été utilisés comme outils pharmacologiques sur la lignée PC3. La visualisation de la séparation des chromosomes ainsi que la localisation intracellulaire de CENP-E lors du cycle cellulaire est réalisée par microscopie confocale couplée à des techniques d'immunomarquage et de fluorescence. Ces FTis ont créé une désorganisation des microtubules de façon analogue à celle d'un inhibiteur de polymérisation du fuseau mitotique (la combretastatine A4). De plus, l'inactivation de CENP-E par siRNA donne le même effet qu'avec les FTis. Il reste cependant à démontrer la corrélation entre l'inhibition de farnésylation de CENP-E et la désorganisation des microtubules.

L'importance de la farnésylation de CENP-E dans son fonctionnement et dans sa localisation intracellulaire est encore mal évaluée. De nombreuses études démontrent cependant une synergie lors de l'utilisation d'un FTi en combinaison avec un inhibiteur de fusion du fuseau mitotique, tel que les taxanes (Ready, 2007). L'influence de la combinaison du composé **129** avec un inhibiteur de polymérisation du fuseau mitotique, tel que le taxol ou la combretastatine A4, sera étudiée sur la lignée PC3.

Enfin, bien que les FTis aient été développés dans le traitement du cancer, ils se sont révélés efficaces en tant qu'agents antiparasitaires sur des protozoaires des familles *Plasmodium*, *Trypanosoma* et *Leishmania*. Grâce à plusieurs collaborations, nous envisageons de mesurer l'activité enzymatique de ces inhibiteurs sur l'enzyme FTase de ces parasites ainsi que leur activité antiparasitaire intrinsèque, dans le but d'obtenir des composés plus sélectifs de ces autres formes de la FTase. En fonction de ces résultats, d'autres modulations pourront être envisagées, notamment pour améliorer le passage membranaire.

Références bibliographiques

- Adjei A. A., Erlichman C., Davis J. N., Cutler D. L., Sloan J. A., Marks R. S., Hanson L. J., Svingen P. A., Atherton P., Bishop W. R., Kirschmeier P., Kaufmann S. H., "A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biological and clinical activity.", **Cancer Res.**, 2000, *60*, 1871
- Adjei A. A., Mauer A., Bruzek L., Marks R. S., Hillman S., Geyer S., Hanson L. J., Wright J. J., Erlichman C., Kaufmann S. H., Vokes E. E., "Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with advanced non-small-cell lung cancer.", **J. Clin. Oncol.**, 2003, *21*, 1760
- Almena J., Foubelo F., Yus M., "Nitrogen-containing remote functionalised organolithium compounds by reductive opening of five- and six-membered heterocycles.", **Tetrahedron**, 1996, *52*, 8545
- Alsina M., Fonseca R., Wilson E. F., Belle A. N., Gerbino E., Price-Troska T., Overton R. M., Ahmann G., Bruzek L. M., Adjei A. A., Kaufmann S. H., Wright J. J., Sullivan D, Djulbegovic B, Cantor AB, Greipp PR, Dalton WS, Sebti SM., "Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib is well tolerated, induces stabilization of disease, and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma.", **Blood**, 2004, *103*, 3271
- Andres D. A., Seabra M. C., Brown M. S., Armstrong S. A., Smeland T. E., Cremers F. P., Goldstein J. L., "cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein." **Cell.**, 1993, *73*, 1091
- Angibaud P., Bourdrez X., Devine A., End D. W., Freyne E., Ligny Y., Muller P., Mannens G., Pilatte I., Poncelet V., Skrzat S., Smets G., Van Dun J., Van Remoortere P., Venet M., Wouters W., "5-imidazolyl-quinolinones, -quinazolinones and -benzo-azepinones as farnesyltransferase inhibitors.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2003a, *13*, 1543
- Angibaud P., Saha A. K., Bourdrez X., End D. W., Freyne E., Lezouret P., Mannens G., Mevellec L., Meyer C., Pilatte I., Poncelet V., Roux B., Smets G., Van Dun J., Venet M., Wouters W., "4-methyl-1,2,4-triazol-3-yl heterocycle as an alternative to the 1-methylimidazol-5-yl moiety in the farnesyltransferase inhibitor ZARNESTRA.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2003b, *13*, 4361
- Angibaud P., Bourdrez X., End D. W., Freyne E., Janicot M., Lezouret P., Ligny Y., Mannens G., Damsch S., Mevellec L., Meyer C., Muller P., Pilatte I., Poncelet V., Roux B., Smets G., Van Dun J., Van Remoortere P., Venet M., Wouters W., "Substituted azoloquinolines and -quinazolines as new potent farnesyl protein transferase inhibitors.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2003c, *13*, 4365
- Angibaud P., Mevellec L., Meyer C., Bourdrez X., Lezouret P., Pilatte I., Poncelet V., Roux B., Merillon S., End D. W., Van Dun J., Wouters W., Venet M., "Impact on farnesyltransferase inhibition of 4-chlorophenyl moiety replacement in the Zarnestra series.", **Eur. J. Med. Chem.**, 2007, *42*, 702
- Anthony N. J., Gomez R. P., Schaber M. D., Mosser S. D., Hamilton K. A., O'Neil T. J., Koblan K. S., Graham S. L., Hartman G. D., Shah D., Rands E., Kohl N. E., Gibbs J. B., Oliff A. I., "Design and in vivo analysis of potent non-thiol inhibitors of farnesyl protein transferase.", **J. Med. Chem.**, 1999, *42*, 3356

- Aoyama T., Satoh T., Yonemoto M., Shibata J., Nonoshita K., Arai S., Kawakami K., Iwasawa Y., Sano H., Tanaka K., Monden Y., Koderu T., Arakawa H., Suzuki-Takahashi I., Kamei T., Tomimoto K., "A new class of highly potent farnesyl diphosphate-competitive inhibitors of farnesyl transferase.", **J. Med. Chem.**, 1998, *41*, 143
- Ashar H. R., James L., Gray K., Carr D., McGuirk M., Maxwell E., Black S., Armstrong L., Doll R. J., Taveras A. G., Bishop W. R., Kirschmeier P., "The farnesyl transferase inhibitor SCH66336 induces a G2→M or G1 pause in sensitive human tumor cell lines.", **Exp. Cell Res.**, 2001, *262*, 17
- Aspuria P. J., Tamanoi F., "The Rheb family of GTP-binding proteins.", **Cell. Signal.**, 2004, *16*, 1105
- Atalay G., Cardoso F., Awada A., Piccart M. J., "Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer.", **Ann Oncol.**, 2003, *14*, 1346
- Awada A., Zhang S., Gil T., de Valeriola D., Lalami Y., De Porre P., Piccart-Gebhart M. J., "A phase I clinical and pharmacokinetic study of tipifarnib in combination with docetaxel in patients with advanced solid malignancies.", **Curr. Med. Res. Opin.**, 2007, *23*, 991
- Barber A. M., Hardcastle I. R., Rowlands M. G., Nutley B. P., Marriott J. H., Jarman M., "Solid-phase synthesis of novel inhibitors of farnesyl transferase.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1999, *9*, 623
- Bailey H. H., Alberti D. B., Thomas J. P., Mulkerin D. L., Binger K. A., Gottardis M. M., Martell R. E., Wilding G., "Phase I trial of weekly paclitaxel and BMS-214662 in patients with advanced solid tumors.", **Clin. Cancer Res.**, 2007, *13*, 3623
- Bell I. M., "Inhibitors of protein prenylation.", **Exp. Opin. Ther. Patents**, 2000, *10*, 1813
- Bell I. M., "Inhibitors of farnesyltransferase: a rational approach to cancer chemotherapy.", **J. Med. Chem.**, 2004, *47*, 1869
- Beshore D. C., Bell I. M., Dinsmore C. J., Homnick C. F., Culberson J. C., Robinson R. G., Fernandes C., Walsh E. S., Abrams M. T., Bhimnathwala H. G., Davide J. P., Ellis-Hutchings M. S., Huber H. A., Koblan K. S., Buser C. A., Kohl N. A., Lobell R. B., Chen I.-W., McLoughlin D. A., Olah T. V., Graham S. L., Hartman G. D., Williams T. M., "Evaluation of amino acid based linkers in potent macrocyclic inhibitors of farnesyl protein transferase.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2001, *11*, 1817
- Bhide R. S., Patel D. V., Patel M. M., Robinson P., Hunihan L. W., Gordon E. M., "Rational design of potent carboxylic acid base bisubstrate inhibitors of Ras farnesyl protein transferase.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1994, *4*, 2107
- Bishop W. R., Pai J. J.-K., Armstrong L., Dalton M. B., Doll R. J., Taveras A., Njoroge G., Sinensky M., Zhang F., Liu M., Kirschmeier P., "Tricyclic farnesyl protein transferase inhibitors. Antitumor activity and effects on protein prenylation.", **Farnesyltransferase inhibitors in cancer therapy**, éd, **Humana Press**, Totowa, New Jersey., Sebti S. M. & Hamilton A. D., 2001, 87
- Bougrin K., Bennani A. K., Tétouani S. F., Soufiaoui M., "An easy route to synthesize 1,5-arylodiazepin-2-ones", **Tetrahedron Lett.**, 1994, *35*, 8373
- Boyartchuk V. L., Ashby M. N., Rine J., "Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis.", **Science**, 1997, *275*, 1796
- Bramhall S. R., Rosemurgy A., Brown P. D., Bowry C., Buckels J. A., "Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial.", **J. Clin. Oncol.**, 2001, *19*, 3447

- Britten C. D., Rowinsky E. K., Soignet S., Patnaik A., Yao S. L., Deutsch P., Lee Y., Lobell R. B., Mazina K. E., McCreery H., Pezzuli S., Spriggs D., "A Phase I and pharmacological study of the farnesyl protein transferase inhibitor L-778,123 in patients with solid malignancies.", **Clin. Cancer Res.**, 2001, 7, 3894
- Bross P. F., Beitz J., Chen G., Chen X. H., Duffy E., Kieffer L., Roy S., Sridhara R., Rahman A., Williams G., Pazdur R., "Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia.", **Clin. Cancer Res.**, 2001, 7, 1490
- Brown M. S., Goldstein J. L., Paris K. J., Burnier J. P., Marsters J. C., "Tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase: amino-terminal substitution in phenylalanine-containing tetrapeptides restores farnesylation.", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 1992, 89, 8313
- Buckner F. S., Eastman R. T., Nepomuceno-Silva R. T., Speelman E. C., Myler P. J., Van Voorhis W. C., Yokoyama K., "Cloning heterologous expression, and substrate specificities of protein farnesyltransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 2002, 122, 181
- Buzzeo R., Enkemann S., Nimmanapalli R., Alsina M., Lichtenheld M. G., Dalton W. S., Beaupre D. M., "Characterization of a R115777-resistant human multiple myeloma cell line with cross-resistance to PS-341." **Clin Cancer Res.**, 2005, 11, 6057
- Camacho L. H., Soignet S., Pezzuli S., "Dose escalation study of oral farnesyl transferase inhibitor (FTI) BMS-214662 in patients with solid tumors.", **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 2001, 20, 311
- Carrico D., Ohkanda J., Kendrick H., Yokoyama K., Blaskovich M. A., Bucher C. J., Buckner F. S., Van Voorhis W. C., Chakrabarti D., Croft S. L., Gelb M. H., Sebti S. M., Hamilton A. D., "In vitro and in vivo antimalarial activity of peptidomimetic protein farnesyltransferase inhibitors with improved membrane permeability.", **Bioorg. Med. Chem.**, 2004, 12, 6517
- Casey P. J., "Biochemistry of protein prenylation. ", *J. Lipid Res.*, 1992, 33, 1731
- Cassidy P. B., Dolence J. M., Poulter C. D., "Continuous fluorescence assay for protein prenyltransferases.", **Meth. Enzymol.**, 1995, 250, 30
- Cernuda-Morollón E., Ridley A. J., "Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells.", **Circ Res.**, 2006, 98, 757
- Chakrabarti D., Azam T., DeVecchio C., Qiu L., Park Y. I., Allen C M., "Protein prenyl transferase activities of *Plasmodium falciparum*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1998, 94, 175
- Chakravarti A., Loeffler J. S., Dyson N. J., "Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling.", **Cancer Res.**, 2002, 62, 200
- Chen G. Z., Bennett J. L., "Characterization of mevalonate-labeled lipids isolated from parasite proteins in *Schistosoma mansoni*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1993, 59, 287
- Chen Z., Sun J., Pradines A., Favre G., Adnane J., Sebti S. M., "Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice.", *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 17974
- Cheng K. W., Lahad J. P., Kuo W. L., Lapuk A., Yamada K., Auersperg N., Liu J., Smith-McCune K., Lu K. H., Fishman D., Gray J. W., Mills G. B., "The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers.", **Nat. Med.**, 2004, 10, 1251.

- Chow L. Q., Eckhardt S. G., O'Bryant C. L., Schultz M. K., Morrow M., Grolnic S., Basche M., Gore L., "A phase I safety, pharmacological, and biological study of the farnesyl protein transferase inhibitor, lonafarnib (SCH 663366), in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced solid tumors.", **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 2007, (sous presse)
- Ciccarone T. M., MacTough S. C., Williams T. M., Dinsmore C. J., O'Neil T. J., Shah D., Culberson J. C., Koblan K. S., Kohl N. E., Gibbs J. B., Oliff A. I., Graham S. L., Hartman G. D., "Non-thiol 3-aminomethylbenzamide inhibitors of farnesyl-protein transferase.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1999, 9, 1991
- Cloughesy T. F., Wen P. Y., Robins H. I., Chang S. M., Groves M. D., Fink K. L., Junck L., Schiff D., Abrey L., Gilbert M. R., Lieberman F., Kuhn J., DeAngelis L. M., Mehta M., Raizer J. J., Yung W. K., Aldape K., Wright J., Lamborn K. R., Prados M. D., "Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a North American Brain Tumor Consortium Study.", **J. Clin. Oncol.**, 2006, 24, 3651
- Cohen S. J., Gallo J., Lewis N. L., Alpaugh R. K., Gentner L., Rogatko A., Yeslow G., Schol J., Verhaeghe T., Zannikos P., Palmer P. A., Weiner L. M., Meropol N. J., "Phase I and pharmacokinetic study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in combination with irinotecan in patients with advanced cancer.", **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 2004, 53, 513
- Cortes J., Holyoake T. L., Silver R. T., Simonsson B., DeAngelo D., Turner A. R., "Continuous oral lonafarnib (Sarasar™) for the treatment of patients with advanced hematologic malignancies : a phase II study.", **Blood**, 2002, 100, 793a
- Cortes J., Albitar M., Thomas D., Giles F., Kurzrock R., Thibault A., Rackoff W., Koller C., O'Brien S., Garcia-Manero G., Talpaz M., Kantarjian H., "Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies.", **Blood**, 2003, 101, 1692
- Cortes J., Faderl S., Estey E., Kurzrock R., Thomas D., Beran M., Garcia-Manero G., Ferrajoli A., Giles F., Koller C., O'Brien S., Wright J., Bai S. A., Kantarjian H., "Phase I study of BMS-214662, a farnesyl transferase inhibitor in patients with acute leukemias and high-risk myelodysplastic syndromes.", **J. Clin. Oncol.**, 2005, 23, 2805
- Cortes J., Quintás-Cardama A., Garcia-Manero G., O'Brien S., Jones D., Faderl S., Ebarb T., Giles F., Thomas D., Kantarjian H., "Phase 1 study of tipifarnib in combination with imatinib for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase after imatinib failure.", **Cancer**, 2007, 110, 2000
- Crespo N. C., Ohkanda J., Yen T. J., Hamilton A. D., Sebti S. M. "The farnesyltransferase inhibitor, FTI-2153, blocks bipolar spindle formation and chromosome alignment and causes prometaphase accumulation during mitosis of human lung cancer cells", **J. Biol. Chem.**, 2001, 276, 16161.
- Dai Q., Choy E., Chiu V., Romano J., Slivka S. R., Steitz S. A., Michaelis S., Phillips M. R., "Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum.", **J. Biol. Chem.**, 1998, 273, 15030
- Deneka M., Neeft M., van der Sluijs P., "Regulation of membrane transport by rab GTPases.", **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 2003, 38, 121
- DerMardirossian C., Bokoch G. M., "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation.", **Trends Cell Biol.**, 2005, 15, 356

- De Figueiredo R. M., Coudray L., Dubois J., "Synthesis and biological evaluation of potential bisubstrate inhibitors of protein farnesyltransferase." Design and synthesis of functionalized imidazoles.", **J. Org. Biomol. Chem.**, 2007, *5*, 3299
- De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Cau P., Navarro C., Amiel J., Boccaccio I., Lyonnet S., Stewart C. L., Munnich A., Le Merrer M., Lévy N., "Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria.", **Science**, 2003, *300*, 2055
- Desnoyers L, Seabra MC., "Single prenyl-binding site on protein prenyl transferases.", **Proc Natl Acad Sci.**, 1998, *95*, 12266
- deSolms S. J., Deana A. A., Giuliani E. A., Graham S. L., Kohl N. E., Wilson F. R., Mosser S. D., Oliff A., Pompiano D. L., Rands E., Scholz T. H., Wiggins J. M., Gibbs J. B., Smith R. L., "Pseudodipeptido inhibitors of protein farnesyltransferase.", **J. Med. Chem.**, 1995, *38*, 3967
- Dinsmore C. J., Bell I. M., "Inhibitors of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I for antitumor therapy: substrate-based design, conformational constraint and biological activity.", **Curr. Topics Med. Chem.**, 2003, *3*, 1075
- Di-Poï N., Fauré J., Grizot S., Molnár G., Pick E., Dagher M. C., "Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex.", **Biochemistry**, 2001, *40*, 10014
- Douros J., Suffness M., "New antitumor substances of natural origin.", **Cancer Treat. Rev.**, 1981, *8*, 63
- Druker B. J., "Overcoming Resistance to Imatinib by Combining Targeted Agents ", **Mol. Cancer Ther.**, 2003, *2*, 225
- Dy G. K., Bruzek L. M., Croghan G. A., Mandrekar S., Erlichman C., Peethambaram P., Pitot H. C., Hanson L. J., Reid J. M., Furth A., Cheng S., Martell R. E, Kaufmann S. H., Adjei A. A., "A Phase I Trial of the Novel Farnesyl Protein Transferase Inhibitor, BMS-214662, in Combination with Paclitaxel and Carboplatin in Patients with Advanced Cancer ", **Clin. Cancer Res.**, 2005, *11*, 1877
- Eriksson M., Brown W. T., Gordon L. B., Glynn M. W., Singer J., Scott L., Erdos M. R., Robbins C. M., Moses T. Y., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka A. B., Boehnke M., Glover T. W., Collins F. S., "Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome.", **Nature**, 2003, *423*, 293.
- Eskens F. A. L. M., Stoter G., Verweij J., "Farnesyl transferase inhibitors: current developments and future perspectives.", **Cancer Treat. Rev.**, 2000, *26*, 319
- Etienne-Manneville S., Hall A., "Rho GTPases in cell biology.", **Nature**, 2002, *420*, 629
- Falugi C., Trombino S., Granone P., Margaritora S., Russo P. , "Increasing Complexity of Farnesyltransferase Inhibitors Activity: Role in Chromosome Instability.", **Curr. Cancer Drug Targ.**, 2003, *3*, 109
- Fenaux P., Raza A., Mufti G. J., Aul C., Germing U., Kantarjian H., Cripe L., Kerstens R., De Porre P., Kurzrock R., "A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome.", **Blood**, 2007, *109*, 4158
- Feng J., Huang H., Yen T. J., "CENP-F is a novel microtubule-binding protein that is essential for kinetochore attachments and affects the duration of the mitotic checkpoint delay.", **Chromosoma**, 2006, *115*, 320
- Field H., Blench I., Croft S., Field M. C., "Characterisation of protein isoprenylation in procyclic form *Trypanosoma brucei*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1996, *82*, 67

- Fingar D. C., Richardson C. J., Tee A. R., Cheatham L., Tsou C., Blenis J., "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E.", **Mol. Cell. Biol.**, 2004, 24, 200
- Fischer P. M., Gianella-Borradori A., "Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors.", **Expert Opin Investig Drugs.**, 2005, 14, 457
- Flynn P., Mellor H., Casamassima A., Parker P. J., "Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase.", **J. Biol. Chem.**, 2000, 275, 11064.
- Fong LG, Ng JK, Meta M, Coté N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K, Bergo MO, Young SG., "Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice.", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2004, 101, 18111.
- Fong L. G., Frost D., Meta M., Qiao X., Yang S. H., Coffinier C., Young S. G., "A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria.", **Science**, 2006, 311, 1621.
- Fouladi M., Nicholson H. S., Zhou T., Laningham F., Helton K. J., Holmes E., Cohen K., Speights R. A., Wright J., Pollack I. F., "A phase II study of the farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, in children with recurrent or progressive high-grade glioma, medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor, or brainstem glioma: a Children's Oncology Group study.", **Cancer**, 2007, 110, 2535
- Fritz G., Kaina B., "Ras-related GTPase RhoB represses NF-kappaB signaling.", **J Biol Chem.**, 2001, 276, 3115.
- Gampel A., Parker P. J., Mellor H., "Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase RhoB.", **Curr. Biol.**, 1999, 9, 955.
- Gelb M. H., Reiss Y., Ghomashchi F., Farnsworth C. C., "Exploring the specificity of prenyl protein-specific methyltransferase with synthetic prenylated rab peptides", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1995, 5, 881.
- Gelb M. H., Van Voorhis W. C., Buckner F. S., Yokoyama K., Eastman R., Carpenter E. P., Panethymitaki C., Brown K. A., Smith D. F., "Protein farnesyl and N-myristoyl transferase: piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics.", **Mol. Bioch. Parasitol.**, 2003, 126, 155.
- Georger B., Kerr K., Tang C. B., Fung K. M., Powell B., Sutton L. N., Phillips P. C., Janss A. J., "Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy.", **Cancer Res.**, 2001, 61, 1527
- Gilford, H., "Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age.", **Brit. Med. J.**, 1904, 2, 914.
- Gillard J., Abraham A., Anderson P., Beaulieu P. L., Bogri T., Bousquet Y., Grenier L., Guse I., Lavallée P., "Preparation of (2S, 4R)-4-Hydroxypipicolinic acid and derivatives", **J. Org. Chem.**, 1996, 61, 2226.
- Gilleron P., Millet R., Houssin R., Wlodarczyk N., Farce A., Lemoine A., Goossens J. F., Chavatte P., Pommery N., Hénichart J. P., "Solid-phase synthesis and pharmacological evaluation of a library of peptidomimetics as potential farnesyltransferase inhibitors: an approach to new lead compounds.", **Eur. J. Med. Chem.**, 2006, 41, 745.
- Gilleron P., Wlodarczyk N., Houssin R., Farce A., Laconde G., Goossens J-F., Lemoine A., Pommery N., Hénichart J-P., Millet R., "Design, synthesis and biological

evaluation of substituted dioxodibenzothiazepines and dibenzocycloheptanes as farnesyltransferase inhibitors.”, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2007, *17*, 5465.

- Glomset J. A., Gelb M. H., Farnsworth C. C., “Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor.”, **Trends Biochem. Sci.**, 1990, *15*, 139.
- Goldstein J. L., Brown M. S., Stradley S. J., Reiss Y., Gierasch L. M., “Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase.”, **J. Biol. Chem.**, 1991, *266*, 15575.
- Green J. R., “Biphosphonates: preclinical review. ”, **Oncologist**, 2004, *9*, 3.
- Haas N., Peereboom D., Ranganathan S., Thistle A., Greenberg R., Ross E., Lewis N., Wright J., Hudes G., Chase F., “Phase II trial of R115777, an inhibitor of farnesyltransferase, in patients with hormone refractory prostate cancer.”, **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 2002, *21*, abstr 721
- Haluska P., Dy G. K., Adjei A. A., “Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents. ”, **Eur. J. Cancer**, 2002, *38*, 1685
- Hara M., Akasaka K., Akinaga S., Okabe M., Nakano H., Gomez R., Wood D., Uh M., Tamanoi F., “Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening.”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1993, *90*, 2281
- Hara M., Han M., “Ras farnesyltransferase inhibitors suppress the phenotype resulting from an activated ras mutation in *Caenorhabditis Elegans*.”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , 1995, *92*, 3333
- Harousseau J. L., Lancet J. E., Reiffers J., Lowenberg B., Thomas X., Huguet F., Fenaux P., Zhang S., Rackoff W., De Porre P., Stone R., “A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia.”, **Blood**, 2007a, *109*, 5151
- Harousseau J.-L., Martinelli G., Jedrzejczak W. W., Brandwein J., Bourdessoule D., Masszi T., Ossenkoppelle G., Alexeeva J. A., Beutel G., Park Y. C., De Porre P., Howes A. J.; “A Randomized Phase 3 Study of Tipifarnib Compared to Best Supportive Care (Including Hydroxyurea) in the Treatment of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) in Patients 70 Years or Older.”, **Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)**, 2007b, *110*, 439
- Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C., Ferris D. G., Jenkins D., Schuind A., Zahaf T., Innis B., Naud P., De Carvalho N. S., Roteli-Martins C. M., Teixeira J., Blatter M. M., Korn A. P., Quint W., Dubin G., “Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial.”, **Lancet**, 2004, *364*, 1757
- Hartman G. D., Lumma J. C., Sisko J. C., Smith A. M., Tucker T. J., Stokker G. E., “Inhibitors of prenyl-protein transferase.”, **PCT International Application WO 00/51611**, 2000.
- Head J., Johnston S. R. D., “New targets for therapy in breast cancer: Farnesyltransferase inhibitors.”, **Breast Cancer Res.**, 2004, *6*, 262
- Hennekam R. C., “Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype.”, **Am. J. Med. Genet. A.**, 2006, *140*, 2603
- Heymach J. V., Johnson D. H., Khuri F. R., Safran H., Schlabach L. L., Yunus F., DeVore R. F., De Porre P. M., Richards H.M., Jia X., Zhang S., Johnson B. E., “Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with sensitive relapse small-cell lung cancer.”, **Ann. Oncol.**, 2004, *15*, 1187
- Hightower K. E., Huang C. C., Casey P. J., Fierke C. A., “H-Ras peptide and proteine substrat bind protein farnesyltransferase as ionised thiolate.”, **Biochemistry**, 1998, *37*, 15555

- Hofmann C. M., Safir S. R., "Synthesis and structure of 7-methyl- and 7-phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,4-diazepin-5-ones.", **J. Org. Chem.**, 1962, 27, 3565
- Hohl R. J., Lewis K. A., Cermak D. M., Wiemer D. F., "Stereochemistry-dependent inhibition of Ras farnesylation by farnesyl phosphonic acid.", **Lipids**, 1998, 33, 39
- Holstein S. A., Cermak D. M., Wiemer D. F., Lewis K. A., Hohl R. J., "Phosphonate and biphosphonate analogues of farnesyl pyrophosphate as potential inhibitors of farnesyl protein transferase.", **Bioorg. Med. Chem.**, 1998, 6, 687.
- Holstein S. A., Wohlford-Lenane C. L., Hohl R. J., "Consequences of Mevalonate Depletion. Differential transcriptional, translational, and post-translational up-regulation of Ras, Rap1a, RhoA, and RhoB.", **J. Biol. Chem.**, 2002, 277, 10678
- Hoover R. R., Mahon F. X., Melo J. V., Daley G. Q., "Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336.", **Blood**, 2002, 100, 1068
- Houssin R., Pommery J., Salaün M.-C., Deweer S., Goossens J.-F., Chavatte P., Hénichart J.-P., "Design, synthesis and pharmacological evaluation of new farnesyl protein transferase inhibitors.", **J. Med. Chem.**, 2002, 45, 533
- Huang C. Y., Stauffer T. M., Strickland C. L., Reader J. C., Huang H., Li G., Cooper A. B., Doll R. J., Ganguly A. K., Baldwin J. J., Rokosz L. L., "Guiding farnesyltransferase inhibitors from an ECLiPS library to the catalytic zinc.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2006, 16, 507
- Huang P.-Q., Liu L.-X., Wei B.-G., Ruan Y.-P., "Asymmetric Synthesis of (+)-L-733,060 and (+)-CP-99,994 Based on a New Chiral 3-Piperidinol Synthone.", **Org. Lett.**, 2003, 5, 1927.
- Huber H. E., Robinson R. G., Watkins A., Nahas D. D., Abrams M. T., Buser C. A., Lobell R. B., Patrick D., Anthony N. J., Dinsmore C. J., Graham S. L., Hartman G. D., Lumma W. C., Williams T. M., Heimbrook D. C., "Anions Modulate the Potency of Geranylgeranyl-Protein Transferase I Inhibitors", **J. Biol. Chem.**, 2001, 276, 24457.
- Hucke O., Gelb M. H., Verlinde C. L., Buckner F. S., "The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease.", **J. Med. Chem.**, 2005, 48, 5415.
- Hunt J. T., Ding C. Z., Batorsky R., Bednarz M., Bhide R., Cho Y., Chong S., Chao S., Gullo-Brown J., Guo P., Kim S. H., Lee F. Y. F., Leftheris K., Miller A., Mitt T., Patel M., Penhallow B. A., Ricca C., Rose W. C., Schmidt R., Slusarchyk W. A., Vite G., Manne V., "Discovery of (R)-7-Cyano-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1*H*-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1*H*-1,4-benzodiazepine (BMS-214662), a Farnesyltransferase Inhibitor with Potent Preclinical Antitumor Activity.", **J. Med. Chem.**, 2000, 43, 3587
- Hutchinson J., "A case of congenital absence of hair with atrophic condition of the skin and its appendages.", **Lancet**, 1886, 1, 923
- Ibrahim M., Azzouz N., Gerold P., Schwarz R. T., "Identification and characterisation of *Toxoplasma gondii* protein farnesyltransferase.", **Int. J. Parasitol.**, 2001, 31, 1489
- Israel M., Jones L. C., "Application of a thermal rearrangement reaction to questions of structure of condensed dihydrodiazepinones: synthesis and characterization of isomeric dihydropyrido[3,4-*b*][1,4]diazepinones from 3,4-diaminopyridine and ethyl acetoacetate", **J. Heterocycl. Chem.**, 1971, 8, 797
- James G. L., Goldstein J. L., Brown M. S., Rawson T. E., Somers T. C., McDowell R. S., Crowley C. W., Lucas B. K., Levinson A. D., "Benzodiazepine

peptidomimetics : potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells.", **Science**, 1993, *260*, 1937

- Jansen T., Romiti R., "Progeria infantum (Hutchinson-Gilford syndrome) associated with scleroderma-like lesions and acro-osteolysis: a case report and brief review of the literature.", **Pediatr. Dermatol.**, 2000, *17*, 282.
- Jiang K., Coppola D., Crespo N. C., Nicosia S. V., Hamilton A. D., Sebti S. M., Cheng J. Q., "The Phosphoinositide 3-OH Kinase / Akt2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis.", **Mol. Cell. Biol.**, 2000, *20*, 139
- Jin W., Wu L., Liang K., Liu B., Lu Y., Fan Z., "Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells.", **Br. J. Cancer.**, 2003, *89*, 185
- Johnston S. R., Hickish T., Ellis P., Houston S., Kelland L., Dowsett M., Salter J., Michiels B., Perez-Ruixo J. J., Palmer P., Howes A., "Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer.", **J. Clin. Oncol.**, 2003, *21*, 2492
- Johnston S. R., Semiglazov V. F., Manikhas G. M., Spaeth D., Romieu G., Dodwell D. J., Wardley A. M., Neven P., Bessems A., Park Y. C., De Porre P. M., Perez Ruixo J. J., Howes A. J., "A phase II, randomized, blinded study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib combined with letrozole in the treatment of advanced breast cancer after antiestrogen therapy." **Breast Cancer Res Treat.**, 2008, *110*, 327
- Karbowniczek M., Cash T., Cheung M., Robertson G. P., Astrinidis A., Henske E. P., "Regulation of B-Raf kinase activity by tuberin and Rheb is mammalian target of rapamycin (mTOR)-independent.", **J. Biol. Chem.**, 2004, *279*, 29930
- Karp J. E., Lancet J. E., Kaufmann S. H., End D. W., Wright J. J., Bol K., Horak I., Tidwell M. L., Liesveld J., Kottke T. J., Ange D., Buddharaju L., Gojo I., Highsmith W. E., Belly R. T., Hohl R. J., Rybak M. E., Thibault A., Rosenblatt J., "Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial.", **Blood**, 2001, *97*, 3361
- Kelly W. K., Richon V. M., O'Connor O., Curley T., MacGregor-Curtelli B., Tong W., Klang M., Schwartz L., Richardson S., Rosa E., Drobnyak M., Cordon-Cordo C., Chiao J. H., Rifkind R., Marks P. A., Scher H. "Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously.", **Clin. Cancer Res.**, 2003, *9*, 3578
- Kelly J., Dominguez-Ecrig J., Leung H. Y. T. C. Stephens, D. E. Neal, B. R. Davies "The prenyltransferase inhibitor AZD3409 has anti-tumor activity in preclinical models of urothelial carcinoma.", **Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.**, 2005, *46*, 5962
- Kim E., Ambroziak P., Otto J. C., Taylor B., Ashby M., Shannon K., Casey P. J., Young S. G., "Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells.", **J. Biol. Chem.**, 1999, *274*, 8383
- Kinbara K., Goldfinger L. E., Hansen M., Chou F. L., Ginsberg M. H., "Ras GTPases: integrins' friends or foes?", *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003, *4*, 767.
- Kise N., Ohya K., Arimoto K., Yamashita Y., Hirano Y., Ono T., Ueda N., "Electroreductive Intramolecular Coupling of Aromatic - and -Imino Esters: A New Synthetic Method for N-Alkoxy carbonyl-2-aryl-3-ones and cis-2-Aryl-3-ols of Pyrrolidines and Piperidines.", **J. Org. Chem.**, 2004, *69*, 7710
- Kho Y., Kim S. C., Jiang C., Barma D., Kwon S. W., Cheng J., Jaunbergs J., Weinbaum C., Tamanoi F., Falck J., Zhao Y., "A tagging-via-substrate technology for

detection and proteomics of farnesylated proteins.”, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2004 *101*, 12479

- Kohl N. E., Omer C. A., Conner M. W., Anthony N. J., Davide J. P., deSolms S. J., "Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice.", **Nat. Med.**, 1995, *1*, 792.
- Kohl N. E., Wilson F. R., Mosser S. D., Giuliani E. deSolms S. J., Conner M. W., Anthony N. J., Holtz W. J., Gomez R. P., Lee T. J., Smith R. L., Graham S. L., Hartman G. D., Gibbs J. B., Oliff A., "Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice.", **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 1994, *91*, 9141.
- Kurzrock R., Albitar M., Cortes J. E., Estey E. H., Faderl S. H., Garcia-Manero G., Thomas D. A., Giles F. J., Ryback M. E., Thibault A., De Porre P., Kantarjian H. M., "Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome.", **J. Clin. Oncol.**, 2004, *22*, 1287
- Lackner M. R., Kindt R. M., Carroll P. M., Brown K., Cancilla M. R., Chen C., de Silva H., Franke Y., Guan B., Heuer T., Hung T., Keegan K., Lee J. M., Manne V., O'Brien C., Parry D., Perez-Villar J. J., Reddy R. K., Xiao H., Zhan H., Cockett M., Plowman G., Fitzgerald K., Costa M., Ross-Macdonald P., "Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors.", **Cancer Cell**, 2005, *7*, 325
- Lamothe M., Perrin D., Blotieres D., Leborgne M., Gras S., Bonnet D., Hill B. T., Halazy S., "Inhibition of farnesyl protein transferase by new farnesyl phosphonate derivatives of phenylalanine.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1996, *6*, 1291
- Lane K. T., Beese L. S., "Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I.", **J. Lipid. Res.**, 2006, *47*, 681
- Lancet J. E., Gotlib J., Gojo I., Feldman E. J., Morris L., Thibault A., Liesveld J. L., Greer J., Dugan K., Raponi M., Wright J., Greenberg P. L., Karp J. E., "Tipifarnib (ZARNESTRA®) in Previously Untreated Poor-Risk AML of the Elderly: Updated Results of a Multicenter Phase 2 Trial.", **Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)**, 2004, *104*, 4310
- Lannuzel M., Lamothe M., Schambel P., Etiévant C., Hill B., Perez M., "From pure FPP to mixed FPP and CAAX competitive inhibitors of farnesyl protein transferase.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2003, *13*, 1459
- Lavey B. J., Janda K. D., "Catalytic antibody mediated hydrolysis of paraoxon.", **J. Org. Chem.**, 1996, *61*, 7633
- Lebowitz P. F., Eng-Wong J., Widemann B. C., Balis F. M., Jayaprakash N., Chow C., Clark G., Gantz S. B., Venzon D., Zujewski J., "A phase I trial and pharmacokinetic study of tipifarnib, a farnesyltransferase inhibitor, and tamoxifen in metastatic breast cancer.", **Clin. Cancer Res.**, 2005, *11*, 1247
- Le Diguarher T., Ortuno J.-C., Dorey G., Shanks D., Guilbaud N., Pierré A., Fauchère J.-L., Hickman J. A., Tucker G. C., Casara P. J., "Parallel liquid synthesis of N,N'-disubstituted 3-amino azepin-2-ones as potent and specific farnesyl transferase inhibitors.", **Bioorg. Med. Chem.**, 2003, *11*, 3193
- Le Diguarher T., Ortuno J.-C., Shanks D., Guilbaud N., Pierré A., Raimbaud E., Fauchère J.-L., Hickman J. A., Tucker G. C., Casara P. J., "Synthesis of N,N'-disubstituted 3-aminobenzo[c] and [d]azepin-2-ones as potent and specific farnesyl transferase inhibitors.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2004, *14*, 767
- Leonard D. M., "Ras farnesyltransferase : a new therapeutic target.", **J. Med. Chem.**, 1997, *40*, 2971

- Li W., Zhu T., Guan K-L., "Transformation Potential of Ras Isoforms Correlates with Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase but Not ERK.", **J. Biol. Chem.**, 2004, 279, 37398
- Li Y., Inoki K., Guan K-L., "Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity.", **Mol. Cell. Biol.**, 2004, 24, 7965
- Liang K., Jin W., Knuefermann C., Schmidt M., Mills G. B., Ang K. K., Milas L., Fan Z., "Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway for enhancing breast cancer cells to radiotherapy.", **Mol. Cancer Ther.**, 2003, 2, 353
- Lin F, Worman H. J., "Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C.", **J. Biol. Chem.**, 1993, 268, 16321.
- Littlejohns P., "Trastuzumab for early breast cancer: evolution or revolution?", **Lancet Oncol.**, 2006, 7, 22
- Lobell R. B., Omer C. A., Abrams M. T., Bhimnathwala H. G., Brucker M. J., Buser C. A., Davide J. P., deSolms S. J., Dinsmore C. J., Ellis-Hutchings M. S., Kral A. M., Liu D., Lumma W. C., Machotka S. V., Rands E., Williams T. M., Graham S. L., Hartman G. D., Oliff A. I., Heimbrook D. C., Kohl N. E., "Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models.", **Cancer Res.**, 2001, 15, 8758.
- Lobell R. B., Liu D., Buser C. A., Davide J. P., DePuy E., Hamilton K., Koblan K. S., Lee Y., Mosser S., Motzel S. L., Abbruzzese J. L., Fuchs C. S., Rowinsky E. K., Rubin E. H., Sharma S., Deutsch P. J., Mazina K. E., Morrison B. W., Wildonger L., Yao S.-L., Kohl N. E., "Preclinical and Clinical Pharmacodynamic Assessment of L-778,123, a Dual Inhibitor of Farnesyl:Protein Transferase and Geranylgeranyl:Protein Transferase Type-I.", **Mol. Cancer Ther.**, 2002, 1, 747 .
- Long S. B., Casey P. J., Beese L. S., "Co-crystal structure of protein farnesyltransferase with a farnesyl diphosphate substrate.", **Biochemistry**, 1998, 37, 9612
- Long S., Casey P. J., Beese L. S., "The basis for K-Ras4B binding specificity to protein farnesyltransferase revealed by 2 Å resolution ternary complex structures.", **Struct. Fold. Des.**, 2000, 15, 209
- Long S. B., Hancock P. J., Kral A. M., Hellinga H. W., Beese L. S., "The crystal structure of human protein farnesyltransferase reveals the basis for inhibition by CaaX and their mimetics.", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2001, 96, 12948
- Long S. B., Casey P. J., Beese L. S., "Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution.", **Nature**, 2002, 419, 645
- Lourim D., Krohne G., "Membrane-associated lamins in *Xenopus* egg extracts: identification of two vesicle populations.", **J. Cell. Biol.**, 1993, 123, 501
- Luján H. D., Mowatt M. R., Chen G. Z., Nash T. E., "Isoprenylation of proteins in the protozoan *Giardia lamblia*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1995, 72, 121
- Machesky L. M., Hall A., "Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton.", **Trends Cell Biol.**, 1996, 6, 304
- Mackay H. J., Hoekstra R., Eskens F. A., Loos W. J., Crawford D., Voi M., Van Vreckem A., Evans T. R., Verweij J., "A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the farnesyl transferase inhibitor BMS-214662 in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors.", **Clin. Cancer Res.**, 2004, 10, 2636
- Magee T., Seabra M. C., "Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat", **Curr. Opin. Cell Biol.**, 2005, 17, 190

- Maiello M. R., D'Alessio A., De Luca A., Carotenuto A., Rachiglio A. M., Napolitano M., Cito L., Guzzo A., Normanno N., "AZD3409 inhibits the growth of breast cancer cells with intrinsic resistance to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib.", **Breast Cancer Res. Treat.**, 2007, *102*, 275
- Maligres P. E., Waters M. S., Weissman S. A., McWilliams J. C., Lewis S., Cowen J., Reamer R. A., Volante R. P., Reider P. J., Askin D., "Preparation of a clinically investigated Ras farnesyl transferase inhibitor.", **J. Heterocyclic. Chem.**, 2003, *40*, 229
- Malliri A., Collard J. G., "Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer." **Curr. Opin. Cell Biol.**, 2003, *15*, 583
- Manne V., Yan N., Carboni J. M., Tuomari A. V., Ricca C. S., Brown J. G., Andahazy M. L., Schmidt R. J., Patel D., Zahler R., "Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase: a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells.", **Oncogene**, 1995, *10*, 1763
- Marcus A. I., O'Brate A. M., Buey R. M., Zhou J., Thomas S., Khuri F. R., Andreu J. M., Díaz F., Giannakakou P., "Farnesyltransferase inhibitors reverse taxane resistance.", **Cancer Res.**, 2006, *66*, 8838
- Mattout A., Dechat T., Adam S. A., Goldman R. D., Gruenbaum Y., "Nuclear lamins, diseases and aging.", **Curr. Opin. Cell. Biol.**, 2006, *18*, 335
- Maurer-Stroh S., Eisenhaber F., "Refinement and prediction of protein prenylation motifs.", **Genome Biol.**, 2005, *6*, article R55
- Mazières J., Pradines A., Favre G., "Les inhibiteurs de farnésyl transférase : une cible peut en cacher une autre. ", **Médecine/Sciences**, 2003, *19*, 211
- Mazières J., Tillement V., Allal C., Clanet C., Bobin L., Chen Z., Sebti S. M., Favre G., Pradines A., "Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells.", **Exp. Cell. Res.**, 2005, *304*, 354
- McCormack P., Macpherson M., Wilson D., Lindsay A., Parry T., Holt A., Hughes A., "Pharmacokinetic characterization of the novel oral prenyl transferase inhibitor AZD3409: the first analysis in healthy male volunteers.", **J. Clin. Oncol. (Meeting Abstracts)**, 2004, *22*, 3172
- Mesa R. A., Camoriano J. K., Geyer S. M., Kaufmann S. H., Rivera C. E., Erlichman C., Tefferi A., "A Phase 2 Consortium (P2C) Trial of R115777 (Tipifarnib) in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia.", **Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)**, 2004, *104*, 1509
- Mesa R. A., "Tipifarnib: farnesyltransferase inhibition at a crossroads.", **Expert. Rev. Anticancer. Ther.**, 2006, *6*, 313
- Mijimolle N., Velasco J., Dubus P., Guerra C., Weinbaum C. A., Casey P. J., Campuzano V., Barbacid M., "Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development.", **Cancer Cell**, 2005, *7*, 313
- Millet R., Domarkas J., Houssin R., Gilleron P., Goossens J-F., Chavatte P., Logé C., Pommery N., Pommery J., Hénichart J-P., "Potent and selective farnesyltransferase inhibitors.", **J. Med. Chem.**, 2004, *47*, 6812
- Mitin N., Rossman K. L., Der C. J., "Signaling interplay in Ras superfamily function.", **Curr Biol.**, 2005, *15*, R563
- Moyal E. C., Laprie A., Delannes M., Poublanc M., Catalaa I, Dalenc F., Berchery D., Sabatier J., Bousquet P., De Porre P., Alaux B., Toulas C., "Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme.", **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 2007, *68*, 1396

- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., "Précis de biochimie", Harper, éd. Presse de l'Université de Laval, 1995, 26, 814
- Nagasu T., Yoshimatsu K., Rowell C., Lewis M. D., Garcia A. M., "Inhibition of human tumor xenograft growth by treatment with the farnesyl transferase inhibitor B956.", **Cancer Res.**, 1995, 52, 5310
- Nam N.-H., Parang K., "Current targets for anticancer drug discovery.", **Curr. Drug Targets**, 2003, 4, 159
- Navarro C. L., Cau P., Lévy N., "Molecular bases of progeroid syndromes.", **Hum. Mol. Genet.**; 2006, 15,:R151
- Nara S., Tanaka R., Eishima J., Hara M, Takahashi Y., Otaki S., Foglesong R. J., Hughes P. F., Turkington S., Kanda Y., "Discovery and structure-activity relationships of novel piperidine inhibitors of farnesyltransferase.", **J. Med. Chem.**, 2003, 46, 2467
- Newey S. E., Velamoor V., Govek E. E., Van Aelst L., "Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation.", **J Neurobiol.**, 2005, 64, 58
- Niam M., Seong C.-M., Qian Y., Hamilton A. D., Sebti S. M. , "Potent inhibition of human tumor p21ras farnesyltransferase by A1A2-lacking p21ras CA1A2X peptidomimetics. ", **J. Biol. Chem.**, 1993, 268, 20695
- Njoroge F. G., Vibulbhan B., Pinto P., Strickland C., Bishop W. R., Nomeir A., Girijavallabhan V., "Enhanced FTase activity achieved via piperazine interaction with catalytic zinc.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2006, 16, 984
- Ojima I., Zhao M., Yamato T., Nakahashi K., Yamashita M., Abe R. , "Azetidines and bisazetidines. Their synthesis and use as the key intermediates to enantiomerically pure diamines, amino alcohols, and polyamines.", **J. Org. Chem.**, 1991, 56, 5263
- Olofsson B., "Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling.", **Cell Signal.**, 1999, 11, 545
- Ohsugia S.-I., Nishidea K., Oonob K., Okuyamab K., Fudesakaa M., Kodamaa S., Node M., "New odorless method for the Corey–Kim and Swern oxidations utilizing dodecyl methyl sulfide (Dod-S-Me).", **Tetrahedron**, 2003 , 59, 8393
- Omura S., Van der Pyl D., Inokoshi J., Takahashi Y., Takeshima H., "Peptidocinnamins, new farnesyl-protein transferase inhibitors produced by an actinomycete. I. Producing strain, fermentation, isolation and biological activity.", **J. Antibiot.**, 1993, 46, 222
- Pan J., Yeung S.-C. J., "Recent advances in understanding the antineoplastic mechanisms of Farnesyltransferase Inhibitors.", **Cancer Res.**, 2005 , 65, 9109
- Park H.-W., Boduluri S. R., Moomaw J. F., Casey P. J., Beese L. S, "Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution.", **Science**, 1997, 275, 1800
- Patel D. V., Gordon E. M., Schmidt R. J., Weller H. N., Young M. G., Zahler R., Barbacid M., Carboni J. M., Gullo-Brown J. L., Hunihan L., Ricca C., Robinson S., Seizinger B. R., Tuomari A. V., Manne V., "Phosphinyl acid-based bisubstrate analog inhibitors of Ras farnesyl protein transferase.", **J. Med. Chem.**, 1995a, 38, 435
- Patel D. V., Schmidt R. J., Biller S. A., Gordon E. M., Robinson S. S., Manne V., "Farnesyl diphosphate based inhibitors of Ras farnesyl protein transferase.", **J. Med. Chem.**, 1995b, 38, 2906
- Patel P. H., Thapar N., Guo L., Martinez M., Maris J., Gau C. L., Lengyel J. A., Tamanoi F. , "Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth.", **J. Cell Sci.**, 2003, 116, 3601

- Peters R., Althaus M., Diolez C., Rolland A., Manginot E., Veyrat M., "Practical Formal Total Syntheses of the Homocamptothecin Derivative and Anticancer Agent Diflomotecan via Asymmetric Acetate Aldol Additions to Pyridine Ketone Substrates.", **J. Org. Chem.**, 2006, *71*, 7583
- Pompliano D. L., Rands E., Schaber M. D., Mosser S. D., Anthony N. J., Gibbs J. B., "Steady-state kinetic mechanism of Ras farnesyl protein transferase.", **Biochemistry**, 1992, *31*, 3800
- Porter A. C., Vaillancourt R. R., "Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis.", **Oncogene**, 1998, *16*, 1343
- Posey J. A., Khazaeli M. B., DelGrosso A., Saleh M. N., Lin C. Y., Huse W., LoBuglio A. F., "A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer.", **Cancer Biother. Radiopharm.**, 2001; *16* 125.
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G, Vlahos C. J., "Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase.", **Cancer Res.**, 1994, *54*, 2419
- Putkey F. R., Cramer T., Morphew M. K., Silk A. D., Johnson R. S., McIntosh J. R., Cleveland D. W., "Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E.", **Dev Cell.**, 2002, *3*, 351
- Pylypenko O., Rak A., Reents R., Niculae A., Sidorovitch V., Cioaca M. D., Bessolitsyna E., Thomä N. H., Waldmann H., Schlichting I., Goody R. S., Alexandrov K., "Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase.", **Mol Cell.**, 2003, *11*, 483
- Qian Y., Sebti S. M., Hamilton A. D., "Farnesyltransferase as a target for anticancer drug design.", **Pept. Science**, 1997, *43*, 25
- Raftopoulou M., Hall A., "Cell migration: Rho GTPases lead the way.", **Dev Biol.**, 2004, *265*, 23
- Rao S., Cunningham D., de Gramont A., Scheithauer W., Smakal M., Humblet Y., Kourteva G., Iveson T., Andre T., Dostalova J., Illes A., Belly R., Perez-Ruixo J. J., Park Y. C., Palmer P. A., "Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer.", **J. Clin. Oncol.**, 2004, *22*, 3950
- Rattner J. B., Rao A., Fritzler M. J., Valencia D. W., Yen T. J., "CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization.", **Cell Motil Cytoskeleton.**, 1993, *26*, 214
- Ready N. E., Lipton A., Zhu Y., Statkevich P., Frank E., Curtis D., Bukowski R. M., "Phase I study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with weekly paclitaxel in patients with solid tumors.", **Clin Cancer Res.**, 2007, *13*, 576
- Reid T. S., Besse L. S., "Crystal structure of the anticancer clinical candidates R115777 (tipifarnib) and BMS-214662 complexed with protein farnesyltransferase suggest a mechanism of FTis selectivity.", **Biochemistry**, 2004a, *43*, 6877
- Reid T. S., Long S. B., Besse L. S., "Crystallographic analysis reveals that anticancer clinical candidate L-778,123 inhibits protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I by different binding modes.", **Biochemistry**, 2004b, *43*, 9000
- Reid T. S., Terry K. L., Casey P. J., Beese L. S., "Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity.", **J. Mol. Biol.**, 2004c, *343*, 417

- Reiss Y., Brown M. S., Goldstein J. L., "Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme.", **J. Biol. Chem.**, 1992, 267, 6403
- Reiss Y., Goldstein J. L., Seabra M. C., Casey P. J., Brown M. S., "Inhibition of purified p21ras farnesyl protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides.", **Cell**, 1990, 62, 81
- Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R., "Cell migration: integrating signals from front to back." **Science**, 2003, 302, 1704.
- Ridley A.J., "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking.", **Trends Cell Biol.**, 2006, 16, 522.
- Rodriguez-Concepcion M., Boronat A., "Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: a metabolic milestone achieved through genomics", **Plant Physiol.**, 2002, 130, 1079
- Rose W. C., Lee F. Y., Fairchild C. R., Lynch M., Monticello T., Kramer R. A., Manne V., "Preclinical antitumor activity of BMS-214662, a highly apoptotic and novel farnesyltransferase inhibitor.", **Cancer Res.**, 2001, 61, 7507.
- Rosenberg J. E., von der Maase H., Seigne J. D., Mardiak J., Vaughn D. J., Moore M., Sahasrabudhe D., Palmer P. A., Perez-Ruixo J. J., Small E. J., "A phase II trial of R115777, an oral farnesyl transferase inhibitor, in patients with advanced urothelial tract transitional cell carcinoma.", **Cancer**, 2005, 103, 2035
- Rowley P. T., Tabler M., "Telomerase inhibitors.", **Anticancer Res.**, 2000, 20, 4419.
- Rozema D. B., Poulter C. B., "Yeast protein farnesyltransferase. pKas of peptide substrates bound as zinc thiolates.", **Biochemistry**, 1999, 38, 3138.
- Saha A. K., Liu L., Simoneaux R., DeCorte B., Meyer C., Skrzat S., Breslin H. J., Kukla M. J., End D. W., "Novel triazole based inhibitors of Ras farnesyl transferase.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2005, 15, :5407-11
- Saloutin V. I., Skryabina Z. E., Burgart Y. V., "Condensation of fluoroalkyl-containing 1,3-carbonyl compounds with ethylenediamine.", **J. Fluor. Chem.**, 1992, 56, 325
- Sato S., Fujita N., Tsuruo T., "Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine).", **Oncogene**, 2002, 21, 1727
- Schaar B. T., Chan G. K., Maddox P., Salmon E. D., Yen T. J., "CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment.", **J Cell Biol.**, 1997, 139, 1373
- Schellens J., de Klerck G., "Phase I and pharmacologic study with the novel farnesyltransferase inhibitor (FTI) R115777.", **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 2000, 19, Abstract No: 715
- Schafer-Hales K., Iaconelli J., Snyder J. P., Prussia A., Nettles J. H., El-Naggar A., Khuri F. R., Giannakakou P., Marcus A. I., "Farnesyl transferase inhibitors impair chromosomal maintenance in cell lines and human tumors by compromising CENP-E and CENP-F function.", **Mol. Cancer Ther.**, 2007, 6, 1317.
- Schlitzer M., Sattler I., "Aromatic carboxylic acids as farnesyl surrogates in farnesylpyrophosphate-based farnesyltransferase inhibitors.", **Bioorg. Med. Chem.**, 1999, 7, 2391
- Schmidt W. K., Tam A., Fujimura-Kamada K., Michaelis S., "Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in

carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage.", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1998, 5, 11175

- Sebti S. M., "Blocked Pathways: FTIs shut down oncogene signals.", **The oncologist**, 2003, 8, 30
- Sebti S. M., Der C. J., "Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors.", **Nature Rev.**, 2003, 3, 945
- Sebti S. M., "Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy.", **Cancer Cell**, 2005, 7, 297
- Sepp-Lorenzino L., Tjaden G., Moasser M. M., Timaul N., Ma Z., Kohl N. E., Gibbs J. B., Oliff A., Rosen N., Scher H. I., "Farnesyl:protein transferase inhibitors as potential agents for the management of human prostate cancer.", **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, 2001, 4, 33
- Sharma S., Kemeny N., Kelsen D. P., Ilson D., O'Reilly E., Zaknoen S., Baum C., Statkevich P., Hollywood E., Zhu Y., Saltz L. B., "A phase II trial of farnesyl protein transferase inhibitor SCH 66336, given by twice-daily oral administration, in patients with metastatic colorectal cancer refractory to 5-fluorouracil and irinotecan ", **Ann. Oncol.**, 2002, 13, 1067
- Shi B., Yaremko B., Hajian G., Terracina G., Bishop W. R., Liu M., Nielsen L. L., "The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 synergizes with taxanes in vitro and enhances their antitumor activity in vivo.", **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 2000, 46, 387
- Shiomi K., Yang H., Inokoshi J., Van der Pyl D., Nakagawa A., Takeshima H., Omura S., "Peptidocinnamins, new farnesyl-protein transferase inhibitors produced by an actinomycete. II. Structural elucidation of peptidocinnamin E.", **J. Antibiot.**, 1993, 46, 229
- Skiles J. W., Giannousis P. P., Fales K. R., "Asymmetric synthesis of cis(-)-(2R4S)-4-(phosphonomethyl)-2-piperidinecarboxylic acid, a potent NMDA receptor antagonist.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 1996, 6, 963
- Sinensky M., "Recent advances in the study of prenylated proteins.", **Biochem. Biophys. Acta**, 2000, 1484, 93.
- Silverman K. C., Jayasuriya H., Cascales C., Vilella D., Bills G. F., Jenkins R. G., Singh S. B., Lingham R. B., "Oreganic acid, a potent inhibitor of ras farnesyl-protein transferase.", **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1997, 232, 478
- Sirotnak F. M., Sepp-Lorenzino L., Kohl N. E., Rosen N., Scher H. I., "A peptidomimetic inhibitor of ras functionality markedly suppresses growth of human prostate tumor xenografts in mice. Prospects for long-term clinical utility.", **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 2000, 46, 79
- Slusarczuk G. M. J., Joullié M. M., "Synthesis and properties of fluorine-containing heterocyclic compounds. Reactions of fluorinated 3-keto esters with amines", **J. Org. Chem.**, 1971, 36, 37
- Smeland T. E., Seabra M. C., Goldstein J. L., Brown M. S., "Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro.", **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1994, 91, 10712.
- Sprang S. R., "G protein mechanisms: insights from structural analysis.", **Annu. Rev. Biochem.**, 1997, 66, 639
- Stephens T. C., Wardleworth M. J., Matusiak Z. S., "AZD3409, a novel, oral, protein prenylation inhibitor with promising preclinical antitumor activity.", **Proc. Am. Assoc. Cance.r Res.**, 2003, 44, R4870

- Strickland S. L., Windsor W. T., Syto R., Wang L., Bond R., Wu Z., Schwartz J., Le H. V., Beese L. S., Weber P. C., "Crystal structure of farnesyl protein transferase complexed with CaaX peptide and farnesyl diphosphate analogue.", **Biochemistry**, 1998, *37*, 16601
- Strickland C. L., Weber P. C., Windsor W. T., Wu Z., Le H. V., Albanese M. M., Alvarez C. S., Cesarz D., del Rosario J., Deskus J., Mallams A. K., Njoroge F. G., Piwinski J. J., Remiszewski S., Rossman R. R., Taveras A. G., Vibulbhan B., Doll R. J., Girijavallabhan V. M., Ganguly A. K., "Tricyclic farnesyl protein transferase inhibitors : crystallographic and calorimetric studies of structure-activity relationships.", **J. Med. Chem.**, 1999, *42*, 2125
- Sun J., Blaskovich M. A., Knowles D., Qian Y., Ohkanda J., Bailey R. D., Hamilton A. D., Sebti S. M., "Antitumor efficacy of a novel class of Non-thiol-containing peptidomimetic inhibitors of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: combination therapy with the cytotoxic agents cisplatin, taxol, and gemcitabine.", **Cancer Res.**, 1999, *59*, 4919
- Sun J., Ohkanda J., Coppola D., Yin H., Kothare M., Busciglio B., Hamilton A. D., Sebti S. M. "Geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-2154 induces breast carcinoma apoptosis and tumor regression in H-Ras transgenic mice.", **Cancer Res.**, 2003, *63*, 8922
- Taga T., Suzuki A., Gonzalez-Gomez I., Gilles F. H., Stins M., Shimada H., Barsky L., Weinberg K. I., Laug W. E., "alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin.", **Int. J. Cancer.**, 2002, *98*, 690
- Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A., Sasaki T., Shirataki H., "Regulators of small GTPases.", **Ciba Found Symp.**, 1993, *176*, 128
- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T., "Small GTP-binding proteins.", **Physiol Rev.**, 2001, *81*, 153
- Tamanoi F., Gau C. L., Jiang C., Edamatsu H., Kato-Stankiewicz J., "Protein farnesylation in mammalian cells : effects of farnesyltransferase inhibitors on cancer cells. ", **Cell. Mol. Life Sci.**, 2001, *58*, 1636
- Tam A., Nouvet F. J., Fujimura-Kamada K., Slunt H., Sisodia S. S., Michaelis S., "Dual roles for Ste24p in yeast a-factor maturation: NH2-terminal proteolysis and COOH-terminal CAAX processing.", **J Cell Biol.**, 1998, *142*, 635
- Tanaka R., Rubio A., Harn N. K., Gernert D., Grese T. A., Eishima J., Hara M., Yoda N., Ohashi R., Kuwabara T., Soga S., Akinaga S., Nara S., Kanda Y., "Design and synthesis of piperidine farnesyltransferase inhibitors with reduced glucuronidation potential.", **Bioorg. Med. Chem.**, 2007, *15*, 1363
- Taveras A. G., Kirschmeier P., Baum C. M., "Sch-66336 (Sarasar®) and other benzocycloheptapyridyl farnesyl protein transferase inhibitors: discovery, biology and clinical observations.", **Curr. Topics Med. Chem.**, 2003, *3*, 1103
- Taylor J. S., Reid T. S., Terry K. L., Casey P. J., Beese L. S., "Structure of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I.", **EMBO J.**, 2003, *22*, 5963
- Taylor S. A., Marrinan C. H., Liu G., Nale L., Bishop W. R., Kirschmeier P., Liu M., Long B. J., "Combining the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel results in enhanced growth inhibitory effects on human ovarian cancer models in vitro and in vivo.", **Gynecol. Oncol.**, 2008, *109*, 97
- Terry K. L., Casey P. J., Beese L. S., "Conversion of Protein Farnesyltransferase to a Geranylgeranyltransferase.", **Biochemistry**, 2006, *45*, 9746

- Thomä N. H., Iakovenko A., Kalinin A., Waldmann H., Goody R. S., Alexandrov K., "Allosteric regulation of substrate binding and product release in geranylgeranyltransferase type II.", **Biochemistry**, 2001, *40*, 268.
- Theodore C., Geoffrois L., Vermorken J. B., Caponigro F., Fiedler W., Chollet P., Ravaud A., Peters G. J., de Balincourt C., Lacombe D., Fumoleau P., "Multicentre EORTC study 16997: feasibility and phase II trial of farnesyl transferase inhibitor & gemcitabine combination in salvage treatment of advanced urothelial tract cancers.", **Eur J Cancer**., 2005, *41*, 1150
- Thutewohl M., Kissau L., Popkirova B., Karaguni I. M., Nowak T., Bate M., Kuhlmann J., Müller O., Waldmann H., "Identification of mono- and bisubstrate inhibitors of protein farnesyltransferase and inducers of apoptosis from a peptidocinnamin E library.", **Bioorg. Med. Chem.**, 2003a, *11*, 2617
- Thutewohl M., Waldmann H., "Solid-phase synthesis of a peptidocinnamin E library.", **Bioorg. Med. Chem.**, 2003b, *11*, 2591
- Tobin D. A., Pickett J. S., Hartman H. L., Fierke C. A., Penner-Hahn J. E., "Structural Characterization of the Zinc Site in Protein Farnesyltransferase.", **J. Am. Chem. Soc.**, 2003, *125*, 9962
- Tremont-Lukats I. W., Gilbert M.R. , "Advances in molecular therapies in patients with brain tumors.", **Cancer Control**, 2003; *10*, 125
- Trueblood C. E., Boyartchuk V. L., Picologlou E. A., Rozema D., Poulter C. D., Rine J., "The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities.", **Mol Cell Biol.**, 2000, *20*, 4381
- Tucker T. J., Abrams M. T., Buser C. A., Davide J. P., Ellis-Hutchings M., Fernandes C., Gibbs J. B., Graham S. L., Hartman G. D., Huber H. E., Liu D., Lobell R. B., Lumma W. C., Robinson R. G., Sisko J. T., Smith A. M., "The synthesis and biological evaluation of a series of potent dual inhibitors of farnesyl and geranyl-Geranyl protein transferases.", **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2002, *12*, 2027
- Van Cutsem E., van de Velde H., Karasek P., Oettle H., Vervenne W. L., Szawlowski A., Schoffski P., Post S., Verslype C., Neumann H., Safran H., Humblet Y., Perez Ruixo J., Ma Y., Von Hoff D., "Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer." **J Clin Oncol.**, 2004, *22*, 1430
- Van Slechtenhorst M., de Hoogt R., Hermans C., Nellist M., Janssen B., Verhoef S., Lindhout D., van den Ouweland A., Halley D., Young J., Burley M., Jeremiah S., Woodward K., Nahmias J., Fox M., Ekong R., Osborne J., Wolfe J., Povey S., Snell R. G., Cheadle J. P., Jones A. C., Tachataki M., Ravine D., Sampson J. R., Reeve M. P., Richardson P., Wilmer F., Munro C., Hawkins T. L., Sepp T., Ali J. B. M., Ward S., Green A. J., Yates J. R. W., Kwiatkowska J., Henske E. P., Short M. P., Haines J. H., Jozwiak S., Kwiatkowski D. J., "Identification of the Tuberous Sclerosis Gene TSC1 on Chromosome 9q34.", **Science**, 1997, *207*, 805
- Venet M., End D., Angibaud P., "Farnesyl protein transferase inhibitor ZARNESTRA R115777 – History of a discovery.", **Curr. Top. Med. Chem.**, 2003, *3*, 1095
- Vivanco I., Sawyers C. L., "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.", **Nat. Rev. Cancer.**, 2002, *2*, 489
- Wennerberg K., Der C. J., "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it).", **J Cell Sci.**, 2004, *117*, 1301

- Wherlock M., Gampel A., Futter C., Mellor H., "Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase.", **J Cell Sci.**, 2004, *117*, 3221
- Whyte D. B., Kirschmeier P., Hockenberry T. N., Nunez-Oliva I., James L., Catino J. J., Bishop W. R., Pai J. K., "K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors.", **J. Biol. Chem.**, 1997, *272*, 14459
- Williams T. M., Bergman J. M., Brashear K., Breslin M. J., Dinsmore C. J., Hutchinson J. H., Mac Tough S. C., Stump C. A., Wei D. D., Zartman C. B., Bogusky M. J., Culbertson C., Buser-Doepner C., Davide J., Greenberg I. B., Hamilton K. A., Koblan K. S., Kohl N. E., Liu D., Lobell R. B., Mosser S. D., O'Neil T. J., Rands E., Schaber M. D., Wilson F., Senderak E., Motzel S. L., Gibbs J. B., Graham S. L., Heimbrook D. C., Hartman G. D., Oliff A. I., Huff J. R., " N-arylpiperazinone inhibitors of farnesyltransferase : discovery and biological activity.", **J. Med. Chem.**, 1999, *42*, 3779
- Winquist E., Moore M. J., Chi K., "A phase II study of a farnesyl transferase inhibitor (SCH 66336) in patients with unresectable or metastatic transitional cell carcinoma of the urethelial tract failing prior chemotherapy", **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 2001, *20*, 785
- Winter-Vann, A. M., Casey. P. J., "Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. ", **Nat. Rev. Cancer.**, 2005, *5*, 405
- Wlodarczyk N., Gilleron P., Millet R., Houssin R., Goossens J.-F., Lemoine A., Pommery N., Wei M. X., Hénichart J.-P. "In vitro and in vivo evaluation of two rational-designed nonpeptidic farnesyltransferase inhibitors on HT29 human colon cancer cell lines.", **Oncol Res.**, 2005, *16*, 107
- Wlodarczyk N., Gilleron P., Millet R., Houssin R., Hénichart J.-P., "Synthesis of 1,4-diazepin-5-ones under microwave irradiation and their reduction products", **Tetrahedron Lett.**, 2007, *48*, 2583
- Wood K. W., Sakowicz R., Goldstein L. S., Cleveland D. W., "CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment.", **Cell.**, 1997, *91*, 357
- Yamagata K., Sanders L. K., Kaufmann W. E., Yee W., Barnes C. A., Nathans D., Worley P. F., "Rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. ", **J Biol. Chem.**, 1994, *269*, 16333
- Yokoyama K., Lin Y., Stuart K. D., Gelb M. H., "Prenylation of proteins in *Trypanosoma brucei*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1997, *87*, 61
- Yokoyama K., Trobridge P., Buckner F. S., Scholten J., Stuart K. D., Van Voorhis W. C., Gelb M. H., "The effects of protein farnesyltransferase inhibitors on trypanosomatids: inhibition of protein farnesylation and cell growth.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1998a, *94*, 87.
- Yokoyama K., Trobridge P., Buckner F. S., Scholten J., Stuart K. D., Van Voorhis W. C., Gelb M. H., " Protein farnesyltransferase from *Trypanosoma brucei*. A heterodimer of 61- and 65-kda subunits as a new target for antiparasite therapeutics.", **J. Biol. Chem.**, 1998b, *273*, 26497.
- Yokoyama K., Gillespie J. R., Van Voorhis W. C., Buckner F. S., Gelb M. H., "Protein geranylgeranyltransferase-I of *Trypanosoma cruzi*.", **Mol. Biochem. Parasitol.**, 2008, *157*, 32.
- Zhu K., Gerbino E., Beaupre D. M., Mackley P. A., Muro-Cacho C., Beam C., Hamilton A. D., Lichtenheld M. G., Kerr W. G., Dalton W., Alsina M., Sebti S. M., "Farnesyltransferase inhibitor R115777 (Zarnestra, Tipifarnib) synergizes with

paclitaxel to induce apoptosis and mitotic arrest and to inhibit tumor growth of multiple myeloma cells.”, **Blood**, 2005, *105*, 4759.

- Zujewski J., Horak I. D., Bol C.J., Woestenborghs R., Bowden C., End D. W., Piotrovsky V. K., Chiao J., Belly R. T., Todd A., Kopp W. C., Kohler D. R., Chow C., Noone M., Hakim F. T., Larkin G., Gress R. E., Nussenblatt R. B., Kremer A. B., Cowan K. H. , "Phase I and pharmacokinetic study of farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in advanced cancer.", **J. Clin. Oncol.**, 2000, *18*, 927.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie A : Synthèse chimique

I. Appareillage et techniques d'analyse

A. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La pureté des produits de synthèse est contrôlée par chromatographie sur couche mince sur des plaques de gel de silice 60F₂₅₄ d'épaisseur 0,2 mm (réf. POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄).

Révélation : - UV (254 et 366 nm) pour les produits avec liaisons conjuguées,
 - ninhydrine pour les amines,
 - iode dans tous les cas,
 - réactif de Dragendorff pour les composés comportant un atome d'azote hétérocyclique.

L'éluant et le facteur de rétention (Rf) sont précisés dans la partie « Protocoles Expérimentaux ».

B. Chromatographie sur colonne

Les purifications par chromatographie sur colonne sont réalisées sur gel de silice 60, granulométrie 0,040-0,063 mm (réf. 815381 Macherey Nagel). L'éluant est choisi de façon à obtenir un Rf compris entre 0,20 et 0,25 sur plaques de CCM.

Les purifications par chromatographie sur couche épaisse sont réalisées sur gel de silice 60F₂₅₄ (réf. 816320.25 Macherey Nagel) qui est déposé sur une plaque de verre (20 x 20 cm). L'éluant est choisi de façon à obtenir un Rf compris entre 0,30 et 0,35 sur plaques de CCM.

C. Points de fusion (F)

Les points de fusion sont déterminés à l'aide d'un appareil Büchi SMP 20 et ne sont pas corrigés. Ils sont exprimés en degrés Celsius (°C).

D. Spectrométrie infrarouge (IR)

Les spectres infrarouge sont réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker Vector 22. Les signaux caractéristiques sont repérés par leur nombre d'onde exprimé en cm⁻¹.

E. Polarimétrie

Les mesures du pouvoir rotatoire sont réalisées sur un polarimètre Perkin Elmer Polarimeter 343, dans une cuve de 10 cm (contenance 1 mL) thermostatée à 25°C, à la longueur d'onde de 589 nm (lampe au sodium). Les échantillons sont mis en solution à la concentration de 10 mg/mL. Les mesures sont ensuite effectuées deux fois. Le pouvoir rotatoire spécifique de l'échantillon est alors calculé par la formule ci-dessous.

$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = \frac{\alpha_{lu}}{l \times c}$$

α_{lu} : pouvoir rotatoire lu sur l'appareil
 l : longueur de la cuve en décimètre (ici, $l = 1$ dm)
 c : concentration de l'échantillon en g/mL (ici, $c = 10$ mg/mL soit 0,01 g/mL)

F. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN sont enregistrés à 300 MHz (^1H , 2D COSY, HMBC et HSQC) et 75 MHz (^{13}C , HMBC et HSQC) sur un appareil à transformée de Fourier Bruker AC 300P, avec le TMS comme référence interne, dans le laboratoire d'application de RMN du Service Commun de Physico-chimie de l'Université de Lille 2. Les spectres sont enregistrés à température ambiante. Chaque signal est repéré par son déplacement chimique (δ en ppm), son intensité (nombre de H), sa multiplicité (s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, massif ou multiplet) et éventuellement sa constante de couplage (J en Hertz). Dans le cas de massifs, celle-ci n'est pas mesurable.

G. Spectrométrie de masse (SM)

Certains composés sont caractérisés par LC-MS ; le chromatographe liquide haute performance (colonne ODS, phase mobile : eau/acétonitrile/acide formique en mode gradient) est couplé à un détecteur UV et à un détecteur de masse de type APCI⁺ (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique). Ces spectres sont enregistrés au Centre Universitaire des Mesures Analytiques de l'Université de Lille 2, sur un appareil Thermo Electron Surveyor MSQ.

H. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La pureté des finaux est contrôlée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) : les analyses sont réalisées sur un appareil Kontron 325 System équipé d'un détecteur UV à barrette de diodes DAD440L, en mode isocratique (débit = 1 mL/min). Les produits sont détectés par balayage UV de 200 à 400 nm. Les colonnes utilisées sont des colonnes phase inverse (Kromasil C18, 150 x 4,6 mm).

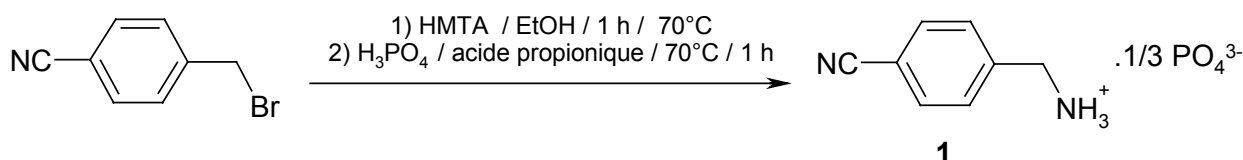
I. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires des produits finaux ont été réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS de Vernaison. Une marge d'erreur de $\pm 0,4$ % est tolérée sur les pourcentages calculés.

II. Protocoles expérimentaux

Synthèse du 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole

Phosphate de 4-(aminométhyl)benzonitrile (1)



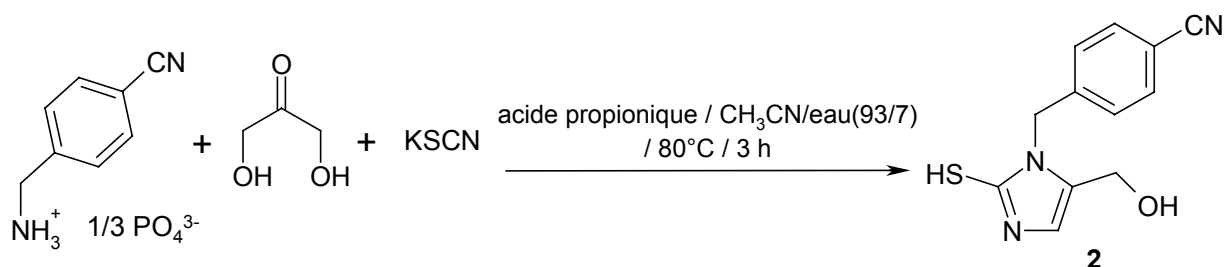
L'hexaméthylènetétramine (1,1 éq., 3,75 g, 26,8 mmol) mise en suspension dans 15 mL d'éthanol est ajoutée à 50°C au dérivé bromé (1 éq., 5 g, 25,5 mmol) dissous dans 20 mL d'éthanol. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 70°C pendant 1 heure, puis la température est abaissée à 50°C pour ajouter 1 mL d'acide propionique et 3 mL d'acide phosphorique. Le milieu réactionnel est ensuite laissé à 70°C pendant 1 heure. Après 1 heure d'agitation à température ambiante, le précipité formé est filtré et lavé 2 fois par de l'éthanol puis 3 fois par de l'eau, avant d'être mis à sécher.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,05 ; F : >250°C.

Analyses spectrales

- **IR :** 2229 ν (C≡N nitrile) ; 1430 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (DMSO- d_6 + D_2O) :** 4,50 (s, 2 H, CH_2) ; 7,58-7,60 (d, 2 H, J = 4,1, **Ar**) ; 7,81-7,82 (d, 2 H, J = 4,0, **Ar**).

1-(4-Cyanobenzyl)-5-hydroxyméthyl-2-mercaptoimidazole (2)



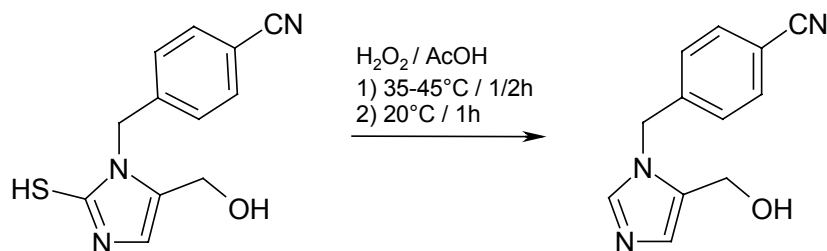
La benzylamine **1** (1,2 éq., 2 g, 12 mmol), le thiocyanate de potassium (1,4 éq., 0,98 g, 14 mmol), la dihydroxyacétone dimère (0,5 éq., 0,45 g, 5 mmol) et l'acide propionique (2,15 éq., 1,6 mL, 21 mmol) sont introduits dans 10 mL d'un mélange acétonitrile/eau (93/7). Après 3 heures de chauffage à 80°C, le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante. Le précipité formé est filtré et lavé par de l'acétonitrile puis par de l'eau.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 65 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,10 ; F (cyclohexane) : 228°C.

Analyses spectrales

- IR : 3121 ν (O-H); 2229 ν (C \equiv N nitrile) ; 1430 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 2,10 (s, 1 H, **OH**) ; 3,90 (s, 1 H, **SH**) ; 4,16 (s, 2 H, **CH₂-OH**) ; 5,38 (s, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 6,93 (s, 1 H, **Im**) ; 7,35-7,38 (d, 2 H, J = 4,2, **Ar**) ; 7,80-7,82 (d, 2 H, J = 4,2, **Ar**).

1-(4-Cyanobenzyl)-5-hydroxyméthylimidazole (**3**)



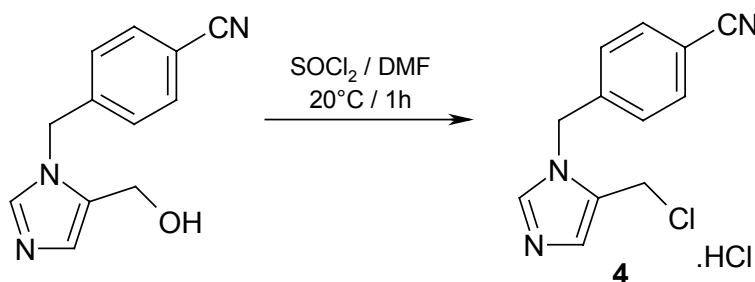
L'imidazole **2** (1 éq., 28 g, 114 mmol) est introduit dans 30 mL d'acide acétique. L'eau oxygénée à 35%_{vol} (3 éq., 34 mL, 342 mmol) est ajoutée goutte à goutte à ce mélange maintenu à 35-45°C. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation une demi-heure à 35-45°C puis 1 heure à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 7 mL d'une solution à 20% de Na₂SO₃. Le milieu réactionnel est alcalinisé par l'ammoniaque à 20% et laissé sous agitation pendant 1 heure. Le précipité formé est filtré et lavé par une solution à 2% en ammoniaque puis par de l'acétate d'éthyle.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,20 ; F : 168°C.

Analyses spectrales

- IR : 3121 ν (O-H), 2601-3093 ν (C-H), 2232 ν (C \equiv N nitrile)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 4,31 (s, 2 H, **CH₂-OH**) ; 5,37-5,54 (m, 3 H, **OH** et **CH₂-Ar**) ; 6,87 (s, 1 H, **Im**) ; 7,35-7,38 (d, 2 H, J = 4,1, **Ar**) ; 7,74 (s, 1 H, **Im**) ; 7,80-7,82 (d, 2 H, J = 4,2, **Ar**).

Chlorhydrate de 5-chlorométhyl-1-(4-cyanobenzyl)imidazole (**4**)



Le chlorure de thionyle (1,2 éq., 0,12 mL, 1,74 mmol) est ajouté goutte à goutte, à 5°C, à l'alcool **3** (1 éq., 300 mg, 1,41 mmol) dissous dans 20 mL de DMF

anhydre. Le milieu réactionnel est ensuite laissé sous agitation demi-heure à 5°C puis 1 heure à température ambiante. Ensuite, 0,5 mL d'isopropanol et 5 mL sont ajoutés. Après 1 heure d'agitation à 5°C, le précipité formé est filtré et lavé par de l'acétate d'éthyle.

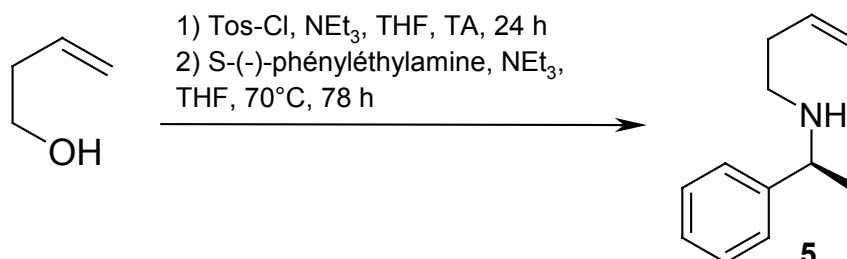
Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 90 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,05 ; F : 161°C.

Analyses spectrales

- IR : 2232 ν (C≡N nitrile).
- RMN ^1H (DMSO- d_6 +D $_2$ O) : 4,92 (s, 2 H, **CH₂-Cl**) ; 5,66 (s, 2H, **CH₂-Ar**) ; 7,53-7,56 (d, 2 H, **Ar**, J = 4,3) ; 7,87-7,93 (m, 3H, **Ar**, **Im**) ; 9,31 (s, 1H, **Im**).

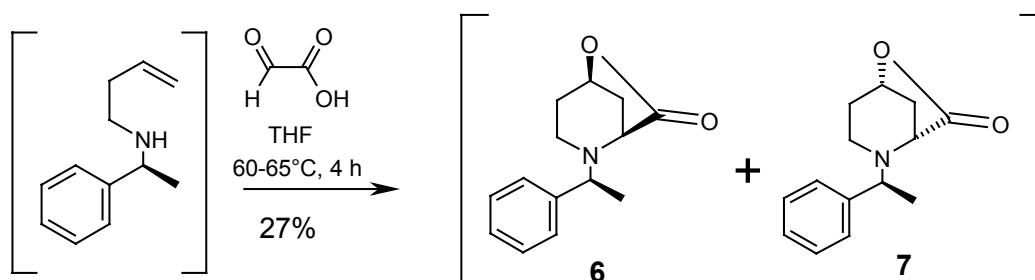
Synthèse des composés à espaceur 4-aminopipéridinyl-2-carboxylate de méthyle (série B)

1-[(S)-Phényléthyl]but-3-ényl-1-amine (5)



Le 3-butén-1-ol (1 éq., 138 mmol, 10 g) et le chlorure de tosylé (1,05 éq., 145 mmol, 7,6 g) sont introduits dans 100 mL de THF anhydre. La triéthylamine (1,2 éq., 23,4 mL, 0,166 mol) est ajoutée goutte à goutte en maintenant la température du milieu réactionnel inférieure à 45°C. Après 24 heures de réaction, la triéthylamine chlorhydratée précipite et est filtrée puis lavée par du THF. Le filtrat est ensuite concentré. Après l'ajout de 100 mL de THF anhydre et de triéthylamine (1,2 éq., 0,16 mol, 23,1 mL) à ce résidu, la (S)-(-)-1-phényléthylamine (1,2 éq., 0,16 mol, 21 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est agité à 70°C pendant 42 heures. Après l'ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium, la phase aqueuse est extraite deux fois par de l'éther diéthylique. Les phases organiques sont réunies pour être lavée par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée.

(1S,5R) et (1R,5S)-2-[(S)-2-Phényléthyl]-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.1]octan-7-ones (6 et 7)



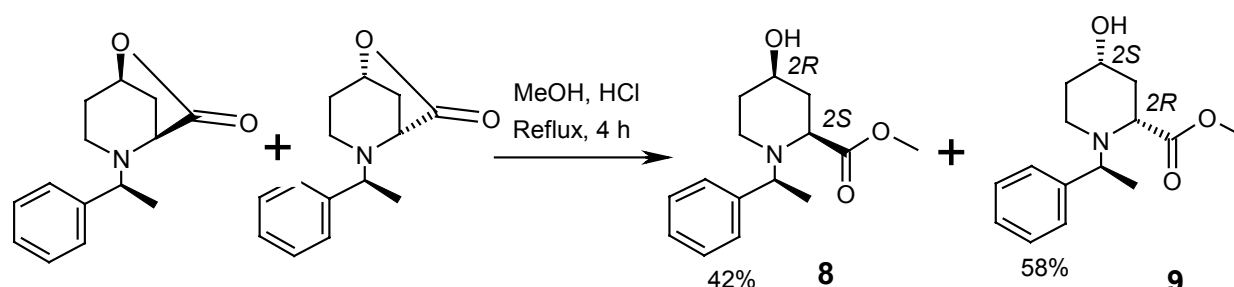
L'acide glyoxylique (1,5 éq., 210 mmol, 22,9 mL) est ajouté goutte à goutte à l'amine **5** obtenue précédemment en maintenant la température à 60°C et est laissé à cette température pendant 4 heures. Puis la solution est refroidie et est diluée par l'ajout d'eau et de solution saturée en NaCl. Après alcalinisation par de la soude à 10% jusqu'à atteindre un pH compris entre 8 et 9, la phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies pour être lavées successivement par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée, de l'eau et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie de gel de silice avec l'acétate d'éthyle comme éluant.

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement (à partir du 3-butén-1-ol) : 45 % ; R_f (Acétate d'éthyle) : 0,68 ; [α] = +57,7°

Analyses spectrales

- IR : 1772 v (lactone)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,42-1,48 (d, 3 H, J = 5,2, **CH₃-CH**) ; 1,55-1,69 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,81-2,05 (m, 2 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 2,15-2,38 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂, CH₂-CH-CH₂**) ; 3,41-3,44 (m, 1 H, **N-CH**) ; 4,02-4,12 (q, 1 H, J = 5,5, **CH₃-CH**) ; 4,18-4,22 (m, 1 H, **CH-O**) ; 7,10-7,35 (m, 5 H, **Ar**).
- LC-MS : Tr = 3,01 min et 3,08 min, MH⁺ = 232

4-(R)-Hydroxy-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (**8**) et 4-(S)-Hydroxy-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(R)-carboxylate de méthyle (**9**)



Le mélange des deux lactones est chauffé à reflux pendant 4 heures dans une solution de méthanol préalablement saturé en acide chlorhydrique. Le milieu réactionnel est ensuite concentré et le sel formé est alcalinisé par une solution à 10 % en K₂CO₃. Cette solution est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les

phases organiques sont réunies et lavées par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant acétate d'éthyle/cyclohexane : 60/40, où les deux diastéréoisomères **8** et **9** sont séparés.

Rendement (des deux alcools) : 62 %

Composé 2S (8) :

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; R_f (acétate d'éthyle) : 0,41 ; [α] (méthanol) = +51°

Analyses spectrales

- **IR :** 3450 v (OH), 1735 v (C=O ester)
- **RMN ¹H (CDCl₃) :** 1,43-1,52 (d, 3 H, J = 6,7, **CH₃-CH**) ; 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,11-2,17 (m, 1 H, **OH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,11-3,24 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **N-CH-COOCH₃**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,91-4,02 (q, 1 H, J = 6,7, **CH-CH₃**) ; 7,20-7,30 (m, 5 H, **Ar**).

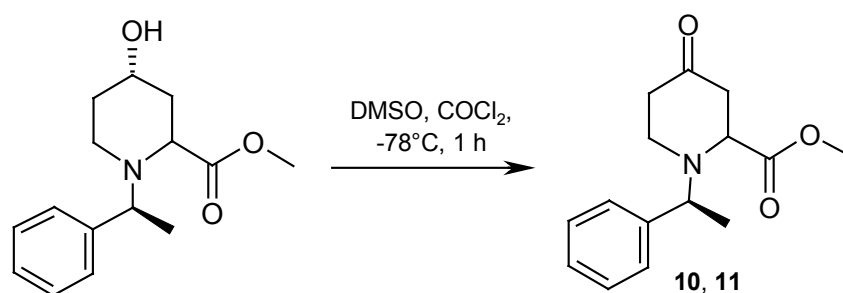
Composé 2R (9) :

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; R_f (acétate d'éthyle) : 0,63 ; [α] (méthanol) = +2°

Analyses spectrales

- **IR :** 3450 v (OH), 1737 v (C=O ester)
- **RMN ¹H (CDCl₃) :** 1,24-1,33 (d, 3 H, J = 6,7, **CH₃-CH**) ; 1,42-1,48 (m, 1 H, **CH₂-CH₂-CH**) ; 1,60 (m, 1 H, **OH**) ; 1,70-1,80 (m, 1 H, **CH₂-CH₂-CH**) ; 2,03-2,12 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,82-2,93 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,67-3,76 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,82-3,85 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,96-4,05 (q, 1 H, J = 6,7, **CH-CH₃**) ; 7,18-7,36 (m, 5 H, **Ar**).
- **RMN ¹³C (CDCl₃) :** 17,8 (CH₃) ; 32,3 (CH₂) ; 34,4 (CH₂) ; 40,5 (CH₂) ; 51,1 (CH₃) ; 58,5 (CH) ; 60,0 (CH) ; 66,2 (CH) ; 128,0 (Ar).

4-Oxo-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (10) et 4-Oxo-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(R)-carboxylate de méthyle (11)



Le chlorure d'oxalyle (1,3 éq., 8,97 mmol, 2,10 mL) en solution dans 10 mL de dichlorométhane anhydre est refroidi à -78°C. Le diméthylsulfoxyde (2,6 éq., 18 mmol, 3,50 mL), dilué dans 10 mL de dichlorométhane, est ensuite, ajouté goutte à goutte. Dix minutes après la fin de l'ajout, une solution d'alcool **8** ou **9** (1 éq., 6,9

mmol, 4,8 g) dans environ 10 mL de dichlorométhane est ajouté goutte à goutte et l'agitation est maintenue pendant 15 minutes. La triéthylamine (4 éq., 6,5 mmol, 0,5 mL) est ajoutée et après 10 minutes d'agitation à -78°C , le milieu réactionnel est laissé revenir lentement à température ambiante. Le solvant est concentré, le résidu est repris par de l'eau et est alcalinisé. Cette solution est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies pour être lavées par de l'eau et une solution saturée en chlorure de sodium. Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées.

Composé 2S (10) :

Caractéristiques : Aspect : huile jaune foncé, Rendement : 78 %, Rf (acétate d'éthyle) : 0,88

Analyses spectrales

- **IR :** 1720 ν (C=O cétone), 1725 ν (C=O ester)
- **RMN ^1H (CDCl_3):** 1,53-1,61 (d, 3 H, $J = 6,2$, $\text{CH}_3\text{-CH}$) ; 1,78-2,61 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-CO-CH}_2$) ; 3,11-3,22 (m, 2 H, N-CH_2) ; 3,62-3,78 (m + s, 4 H, $J = 6,0$, CH-COOCH_3) ; 3,91-4,01 (q, 1 H, CH-CH_3) ; 7,12-7,42 (m, 5 H, Ar).

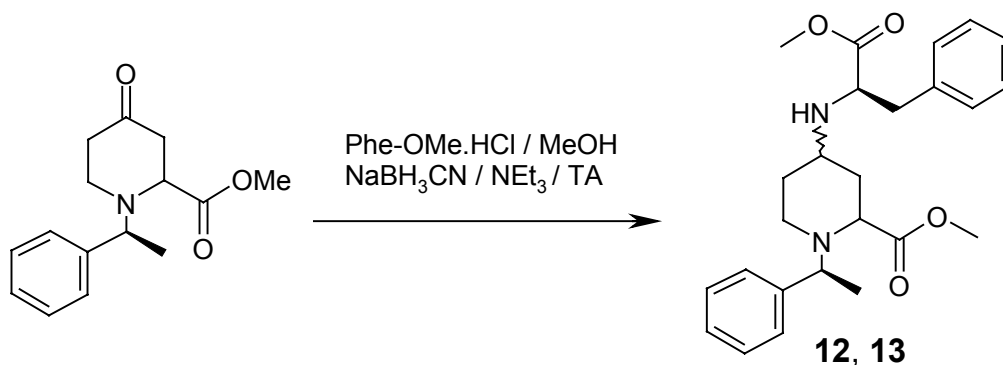
Composé 2R (11) :

Caractéristiques : Aspect : huile jaune foncé, Rendement : 71 %, Rf (acétate d'éthyle) : 0,93

Analyses spectrales

- **IR :** 1720 ν (C=O cétone), 1725 ν (C=O ester)
- **RMN ^1H (CDCl_3):** 1,42-1,50 (d, 3 H, $J = 6,2$, $\text{CH}_3\text{-CH}$) ; 2,2-2,9 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 3,75 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{-COO}$) ; 3,80-3,90 (m, 1 H, CH-CH_3) ; 4,02-4,28 (q, 1 H, $J = 6,5$, CH-COOCH_3) ; 7,26-7,44 (m, 5 H, Ar).

**4-[(R)-1-Méthoxycarbonyl-2-phényléthylamino]-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (12) et
4-[(R)-1-Méthoxycarbonyl-2-phényléthylamino]-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(R)-carboxylate de méthyle (13)**



La cétone **10** ou **11** (1 éq., 1,15 mmol, 300 mg) phénylalaninate de méthyle (1,5 éq., 1,72 mmol, 370 mg) ainsi que la triéthylamine (2 éq., 2,29 mmol, 0,32 mL)

sont introduits dans 30 mL de méthanol anhydre. Le tamis moléculaire 3Å est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation sous atmosphère inerte (azote). Après trois heures de réaction, NaBH₃CN (1,1 éq., 80 mg, 1,26 mmol) est introduit. Le tamis moléculaire est ensuite filtré et le filtrat est concentré. Le résidu repris dans de l'acétate d'éthyle est lavé par de l'hydrogénocarbonate de sodium à 5%, de l'eau et une solution saturé en NaCl. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et enfin concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle / cyclohexane : 20/80).

Composé 2S (12) :

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement : 55 % ; Rf (acétate d'éthyle) : 0,73.

Analyses spectrales

- **IR :** 1733 v (C=O ester).
- **RMN ¹H (CDCl₃) :** 1,45-1,56 (d, 3 H, J = 7,1, **CH₃-CH**) ; 1,63-1,79 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,83-2,11 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,30-2,41 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,87-2,99 (m, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 3,12-3,26 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,63-3,70 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,72-3,83 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,84-3,92 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,94-4,07 (q, 1 H, J = 6,7, **CH-CH₃**) ; 7,15-7,41 (m, 10 H, **Ar**).

Composé 2R (13) :

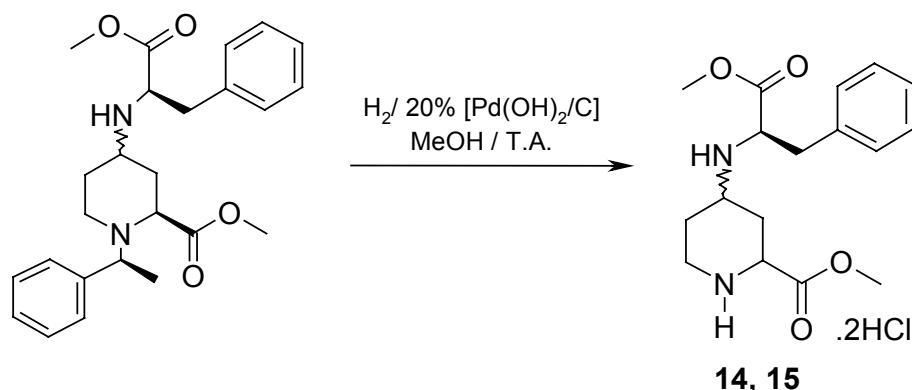
Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement : 42 % ; Rf (acétate d'éthyle) : 0,82.

Analyses spectrales

- **IR :** 1734 v (C=O ester).
- **RMN ¹H (CDCl₃) :** 1,22-1,34 (d, 3 H, J = 6,7, **CH₃-CH**) ; 1,43-1,49 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,51-1,59 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,04-2,12 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,29-2,39 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,89-2,98 (m, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 3,40-3,53 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,55-3,71 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,73-3,82 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,84-3,89 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,90-4,02 (q, 1 H, J = 6,7, **CH-CH₃**) ; 7,11-7,40 (m, 10 H, **Ar**).

Chlorhydrate de 4-[(R)-1-méthoxycarbonyl-2-phényléthylamino]pipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (14) et

Chlorhydrate de 4-[(R)-1-méthoxycarbonyl-2-phényléthylamino]pipéridin-2(R)-carboxylate de méthyle (15)



L'hydroxyde de palladium sur charbon est ajouté à la pipéridine N-benzylée dissoute dans du méthanol. La suspension est agitée sous 1 bar d'hydrogène pendant quatre heures à température ambiante. Le catalyseur est filtré sur célite et le filtrat est concentré. Le produit formé est isolé sous forme de chlorhydrate.

Composé 2S (14) :

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane/méthanol : 9/1) : 0,08 ; F = 205 °C.

Analyses spectrales

- IR : 1744 ν (C=O ester)
- RMN ^1H (DMSO- d_6 + D $_2$ O): 1,44-1,49 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,44-1,56 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,03-2,12 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,86-2,97 (m, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 3,18-3,31 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,53-3,68 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,70-3,81 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 7,19-7,38 (m, 5 H, **Ar**).

Composé 2R (15) :

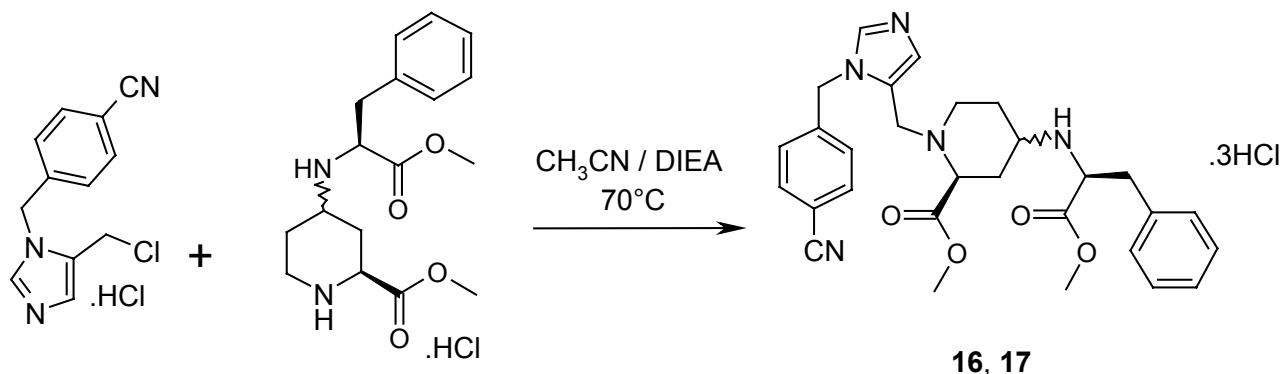
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane/méthanol : 9/1) : 0,15 ; F = 215°C.

Analyses spectrales

- IR : 1746 ν (C=O ester)
- RMN ^1H (DMSO- d_6): 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,86-2,97 (m, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 3,11-3,24 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **N-CH-COOCH₃**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,77-3,86 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,82-3,88 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 7,21-7,33 (m, 5 H, **Ar**).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-[(R)-1-méthoxycarbonyl-2-phényléthylamino]pipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle

(16) et
chlorydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-4-[(*R*)-1-méthoxycarbonyl-2-phényléthylamino]pipéridin-2(*R*)-carboxylate de méthyle
(17)



La pipéridine **14** ou **15** (1 éq., 8,3 mmol, 1,5 g), la DIEA (2,5 éq., 16,6 mmol, 3,4 mL) et le dérivé chloré **4** (1,2 éq., 10 mmol, 2,7 g) sont solubilisés dans l'acétonitrile anhydre. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant environ douze heures. Après réaction, le milieu réactionnel est évaporé et le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par de l'eau puis par de la solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse (DCM/MeOH : 95/5).

Composé 2S (16) :

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 98 % ; Rf (acétate d'éthyle) : 0,08.

Analyses spectrales

- **IR :** 2229 ν (C≡N nitrile) ; 1738 ν (C=O ester)
- **RMN ¹H (DMSO-*d*₆) :** 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂ et CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,86-2,97 (m, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 3,11-3,24 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂, CH₂-CH-CH₂**) ; 3,48 (s, 2 H, **CH₂-Im**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,77-3,86 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 5,47 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,03 (s, 1 H, **Im**) ; 7,18-7,45 (m, 9 H, **Ar**) ; 7,12-7,56 (m, 1 H, **Im**).
- **LC-MS :** Tr = 2,98 min ; MH⁺ = 516 ; Pureté = 99,3 %

Analyse élémentaire : C₂₉H₃₃N₅O₄, 3 HCl => 625,1 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,77 ; %H = 5,81 ; %N = 11,21 ; %Cl = 17,00 ; Expérimental: %C = 55,73 ; %H = 5,91 ; %N = 11,34 ; %Cl = 17,11).

Composé 2R (17) :

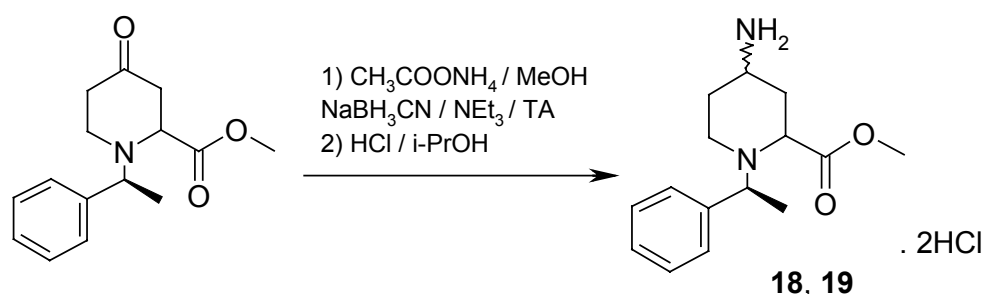
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 94 % ; Rf (acétate d'éthyle) : 0,12.

Analyses spectrales

- IR : 2226 ν (C≡N nitrile) ; 1746 ν (C=O ester)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,38-1,42 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,51-1,58 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,07-2,13 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,23-2,35 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,81-2,95 (m, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 3,35-3,44 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,48 (s, 2 H, **CH₂-Im**) ; 3,67-3,76 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,79-3,88 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,91-3,98 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 5,47 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,03 (s, 1 H, **Im**) ; 7,14-7,43 (m, 9 H, **Ar**) ; 7,12-7,56 (m, 1 H, **Im**).
- LC-MS : Tr = 2,83 min ; MH⁺ = 516 ; Pureté = 99,7 %

Analyse élémentaire : C₂₉H₃₃N₅O₄, 3 HCl => 625,1 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,73 ; %H = 5,81 ; %N = 11,21 ; %Cl = 17,00 ; Expérimental: %C = 55,75 ; %H = 5,91 ; %N = 11,31 ; %Cl = 17,05).

**Chlorhydrate de 4-amino-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (18)
et chlorhydrate de 4-amino-1-[1S-phényléthyl]pipéridinyl-2(R)-carboxylate de méthyle (19)**



La cétone **10** ou **11** (1 éq., 7,5 mmol, 1,96 g), l'acétate d'ammonium (10 éq., 75 mmol, 5,75 g) et NaBH₃CN (0,8 éq., 6,0 mmol, 370 mg) sont introduits dans 150 mL de méthanol anhydre. Le tamis moléculaire 3Å est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation sous atmosphère inerte pendant 18 heures. Le tamis moléculaire est ensuite filtré et le filtrat est concentré. Le résidu repris dans de l'acétate d'éthyle est lavé par de l'hydrogénocarbonate de sodium à 5%, de l'eau et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée. L'amine est isolée sous forme de chlorhydrate.

Composé 2S (18) :

Caractéristiques : Aspect : huile jaune foncé ; Rendement : 77 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,24 ; α (méthanol) = +51°

Analyses spectrales

- IR : 1725 ν (C=O ester) ; 1720 ν (C=O cétone),
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,42-1,51 (d, 3 H, J = 6,9, **CH₃-CH**) ; 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,18-3,24 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **N-CH-COO-CH₃**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,92-4,01 (m, 1 H, **CH-NH³⁺**) ; 4,12-4,21 (q, 1 H, J = 6,7, **CH-CH₃**) ; 4,52-4,61 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 7,20-7,30 (m, 5 H, **Ar**) ; 8,52-8,85 (m, 3 H, **NH₃⁺**).

Composé 2R (19) :

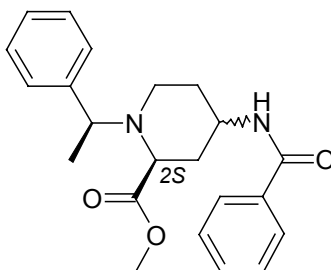
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 79 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,20 ; α (méthanol) = +1,7°

Analyses spectrales

- IR : 1733 ν (C=O ester) ; 1722 ν (C=O cétone)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,25-1,32 (d, 3 H, J = 6,9, **CH₃-CH**) ; 1,43-1,50 (m, 1 H, **CH₂-CH₂-CH**) ; 1,71-1,79 (m, 1 H, **CH₂-CH₂-CH**) ; 2,05-2,14 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,29-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,81-2,94 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,66-3,75 (m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,93-4,02 (m, 1 H, **CH-NH³⁺**) ; 4,06-4,14 (q, 1 H, J = 6,6, **CH-CH₃**) ; 4,44-4,51 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 7,17-7,36 (m, 5 H, **Ar**) ; 8,42-8,55 (m, 3 H, **NH₃⁺**).

Méthode générale d'acylation des 4-aminopipéridines 18 et 19 (composés 20-27)

L'amine **18** ou **19** est dissoute dans 30 mL de diméthylformamide, puis l'acide carboxylique, l'EDCI.HCl, la pyridine et la DMAP sont ajoutés. Après 18 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré. Le résidu est repris de l'acétate d'éthyle pour être lavé par deux fois une solution de soude 1M, une fois par de l'eau et une fois par une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. Après séchage sur sulfate de magnésium, la phase aqueuse est évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie avec un éluant dichlorométhane / méthanol 98 : 2.

4-Benzamido-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (20)

20

Acide benzoïque	2 éq.	1,24 mmol	170 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μL
DMAP	catalytique		
Amine 18 ou 19	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

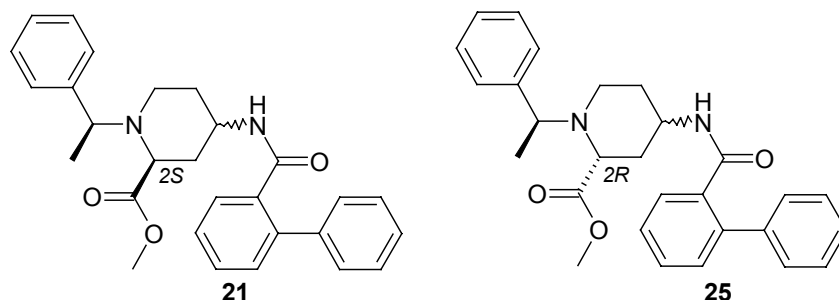
Composé 2S (20) :

Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 82 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,85.

Analyses spectrales :

- IR : 1730 ν (C=O ester), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,42-1,51 (d, 3 H, J = 6,9, **CH₃-CH**) ; 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,18-3,24 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,64-3,81 (m + s, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,92-4,01 (q, 1 H, J = 6,7, **CH-CH₃**) ; 7,13-7,34 (m, 10 H, **Ar**) ; 8,49-8,58 (m, 1 H, **CONH**).

4-(Biphén-2-yl)carboxamido-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (21) et
4-(biphén-2-yl)carboxamido-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(R)-carboxylate de méthyle (25)



Acide 2-biphénoïque	2 éq.	1,24 mmol	245 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μL
DMAP	catalytique		
Amine 18 ou 19	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Composé 2S (21) :

Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 85 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,90.

Analyses spectrales :

- IR : 1733 ν (C=O ester) ; 1635 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,43-1,52 (d, 3 H, J = 6,7, **CH₃-CH**) ; 1,61-1,76 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,83-2,10 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,29-2,36 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,18-3,26 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,58-3,69 (m, 1 H, **CH-COO-CH₃**) ; 3,71-3,79 (s, 3 H, **CH-COO-CH₃**) ; 3,92-4,01 (q, 1 H, J = 6,2, **CH-CH₃**) ; 7,17-7,51 (m, 14 H, **Ar**) ; 8,52-8,61 (m, 1 H, **CONH**).

Composé 2R (25) :

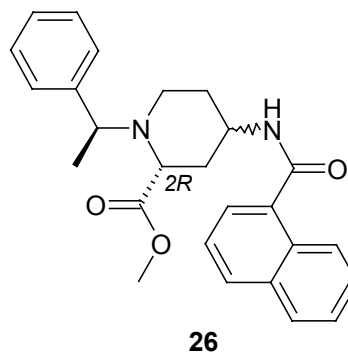
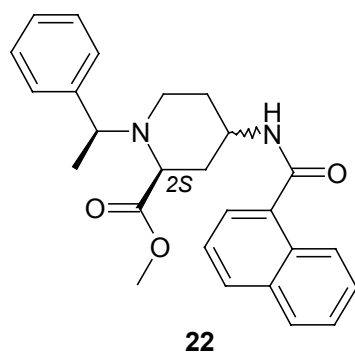
Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 85 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,82.

Analyses spectrales :

- IR : 1733 ν (C=O ester) ; 1633 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,24-1,33 (d, 3 H, J = 6,7, **CH₃-CH**) ; 1,42-1,48 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,45-1,57 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,03-2,12 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-

2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,32-3,41 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,67-3,76 (m+ s, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,80-3,86 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) 3,96-4,05 (q, 1 H, **CH-CH₃**, J = 6,7) ; 7,21-7,66 (m, 14 H, **Ar**) ; 8,48-8,59 (m, 1 H, **CONH**).

4-(Napht-1-yl)-carboxamido-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (22) et
4-(napht-1-yl)-carboxamido-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(R)-carboxylate de méthyle (26)



Acide 1-naphtoïque	2 éq.	1,24 mmol	235 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 18 ou 19	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Composés 2S (22) :

Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 75 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,83.

Analyses spectrales :

- IR : 1733 ν (C=O ester) ; 1636 ν (C=O amide)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,43-1,52 (d, 3 H, J = 7,0, **CH₃-CH**) ; 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,15-3,22 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,92-4,01 (q, 1 H, J = 6,5, **CH-CH₃**) ; 7,17-7,51 (m, 11 H, **Ar**) ; 8,84 (s, 1 H, **Napht**) ; 9,54 -9,61 (m, 1 H, **CONH**).

Composés 2R (26) :

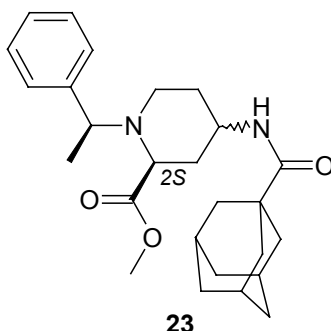
Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 85 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,92.

Analyses spectrales :

- IR : 1733 ν (C=O ester) ; 1638 ν (C=O amide)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,24-1,33 (d, 3 H, J = 6,7, **CH₃-CH**) ; 1,42-1,48 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,45-1,57 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,03-2,12 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,32-3,41 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,67-3,76 (m + s, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,81-3,88 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,96-4,05 (q, 1 H, **CH-CH₃**, J

= 6,7) ; 7,21-7,66 (m, 11 H, **Ar**) ; 8,82 (s, 1 H, **Napht**) ; 9,11-9,16 (m, 1 H, **CONH**).

4-(Adamant-1-yl)-carboxamido-1-[(S)-2-phényléthyl]pipéridine-2(S)-carboxylate de méthyle (23)



Acide benzoïque	2 éq.	1,24 mmol	245 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 18	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Composé 2S (23):

Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 71 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,81

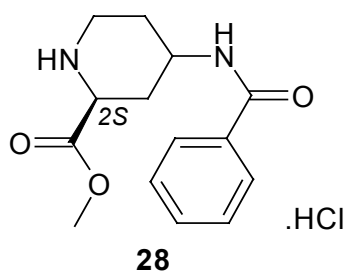
Analyses spectrales :

- IR : 1733 ν (C=O ester) ; 1635 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,41-1,50 (d, 3 H, J = 6,9 , **CH₃-CH**) ; 1,60-1,73 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,68 (s, 6 H, **CH₂ adamantane**) ; 1,74-1,95 (m, 9 H, **CH₂ adamantane** et **CH adamantane**) ; 1,88-2,10 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,30-2,41 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,15-3,21 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,65-3,87 (m + s, 4 H, **CH-COO-CH₃**) ; 3,95-4,04 (q, 1 H, J = 6,7 , **CH-CH₃**) ; 7,21-7,52 (m, 5 H, **Ar**) ; 9,55-9,62 (m, 1 H, **CONH**).

Méthode générale de déprotection des pipéridines 20-27 (composés 28-25)

A une suspension d'hydroxyde de palladium sur charbon dans 30 mL de méthanol est ajoutée l'amine pipéridinique. Après 6 heures d'agitation sous atmosphère d'hydrogène, le milieu réactionnel est filtré. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol : 95/5).

**Chlorhydrate de 4-benzamidopipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (28) et
Chlorhydrate de 4-benzamido-pipéridin-2(R)-carboxylate de méthyle (32)**

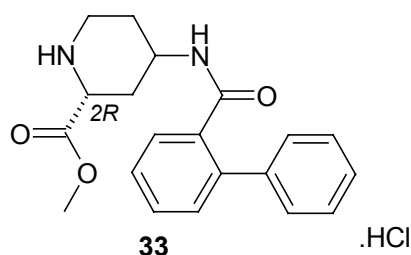
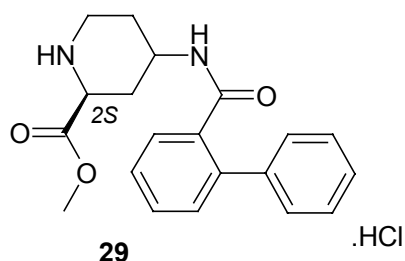
**Composés 2S (28) :**

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 71 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,11.

Analyses spectrales :

- IR : 1733 v (C=O ester) ; 1636 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,18-3,24 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 7,17-7,32 (m, 5 H, **Ar**) ; 8,22-8,33 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,11-9,46 (m, 2 H, **NH²⁺**).

**Chlorhydrate de 4-(biphén-2-yl)carboxamidopipéridin-2S-carboxylate de méthyle (29) ou
chlorhydrate de 4-(biphén-2-yl)carboxamidopipéridin-2(R)-carboxylate de méthyle (33)**

**Composé 2S (29) :**

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 90 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,06

Analyses spectrales

- ✓ IR : 1725 v (C=O ester) ; 1638 v (C=O amide)
- ✓ RMN ¹H (DMSO-d₆) : 1,58-1,74 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,78-2,04 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,31-2,40 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,19-3,25 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**)

CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$) ; 3,67-3,79 (m + s, 4 H, CH-COO-CH_3) ; 7,23-7,49 (m, 9 H, Ar) ; 8,35-8,46 (m, 1 H, CONH) ; 9,22-9,63 (m, 2 H, NH^{2+}).

Composé 2R (33) :

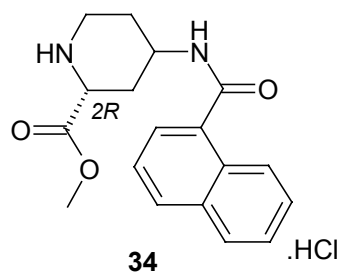
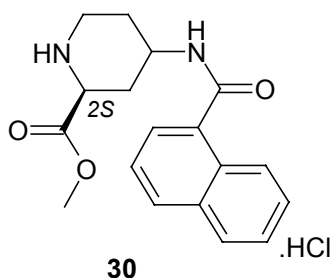
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 91% ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,19

Analyses spectrales

- ✓ IR : 1725 ν (C=O ester) ; 1639 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,41-1,49 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 1,44-1,58 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 2,04-2,13 (m, 2 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}$) ; 2,28-2,35 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 3,33-3,40 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 3,65-3,77 (s + m, 4 H, CH-COOCH_3) ; 3,83-3,88 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$) ; 7,35-7,61 (m, 9 H, Ar) ; 8,48-8,59 (m, 1 H, CONH) ; 9,22-9,63 (m, 2 H, NH^{2+}).

Chlorhydrate de-4-(naph-1-yl)carboxamidopipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (30) et

chlorhydrate de-4-(naph-1-yl)carboxamidopipéridin-2(R)-carboxylate de méthyle (34)



Composé 2S (30) :

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 54 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,38

Analyses spectrales

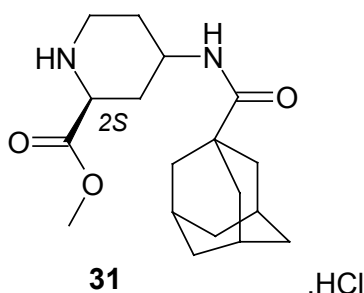
- ✓ IR : 1728 ν (C=O ester) ; 1636 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,62-1,77 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ et $\text{CH-CH}_2\text{-CH}$) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 3,18-3,24 (m, 2 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, CH-COO-CH_3) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, CH-COO-CH_3) ; 7,17-7,51 (m, 6 H, Ar) ; 8,84 (s, 1 H, Napht) ; 9,54 -9,61 (m, 1 H, CONH) ; 9,72-9,82 (m, 2 H, NH^{2+}).

Composé 2R (34) :

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 54 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,38

Analyses spectrales

- ✓ IR : 1725 ν (C=O ester) ; 1636 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,40-1,45 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,45-1,57 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,02-2,11 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,31-2,39 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,35-3,44 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,68-3,75 (m, 4 H, **CH-COO-CH₃**) ; 3,82-3,87 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 7,31-7,53 (m, 6 H, **Ar**) ; 8,86 (s, 1 H, **Napht**) ; 9,11-9,16 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,72-9,82 (m, 2 H, **NH²⁺**).

Chlorhydrate de 4-(adamantan-1-yl)carboxamidopipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (31)
**Composé 2S (31) :**

Caractéristiques : Aspect : poudre grise ; Rendement : 46% ; R_f (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,48

Analyses spectrales

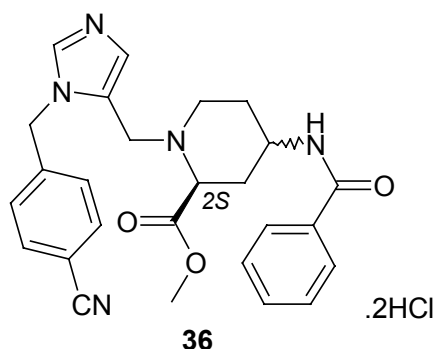
- ✓ IR : 1725 ν (C=O ester) ; 1632 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,53-1,59 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,62 (s, 6 H, **CH₂ adamantane**) ; 1,71-1,89 (m, 9 H, **CH₂ adamantane** et **CH adamantane**) ; 1,96-2,13 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,24-2,35 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,16-3,22 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,62-3,70 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,72-3,80 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 8,55-8,67 (m, 1 H, **CONH**) ; 8,98 -9,11 (m, 2 H, **NH²⁺**).

Méthode générale d'acylation des amines pipéridiniques 28-35 (composés 36-43)

L'amine pipéridinique est dissoute dans 30 mL d'acétonitrile anhydre, puis le dérivé chloré **4** et la DIEA sont ajoutés. Après 12 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé par de l'eau puis par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur couche épaisse avec un éluant dichlorométhane / acétate d'éthyle 95 : 5. Le composé obtenu est isolé sous forme de chlorhydrate.

Chlorhydrate de 4-benzamido-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-

pipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (36)



Amine 28	1 éq.	0,46 mmol	120 mg
Dérivé chloré 4	2 éq.	0,92 mmol	250 mg
DIEA	4,5 éq.	2,03 mmol	0,35 mL

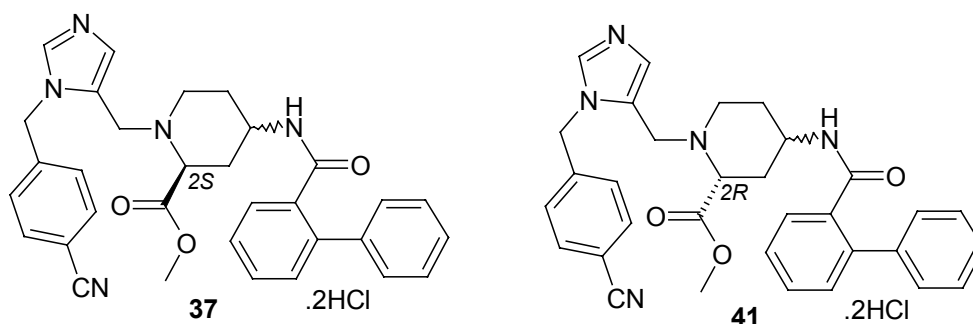
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 42 % ; Rf (acétate d'éthyle) : 0,68

Analyses spectrales

- ✓ **IR :** 2225 ν (C \equiv N nitrile) ; 1728 ν (C=O ester) ; 1636 ν (C=O amide)
- ✓ **RMN 1 H (DMSO- d_6) :** 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,18-3,24 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,48 (s, 2H, **N-CH₂-Im**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COO-CH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COO-CH₃**) ; 5,47 (m, 3 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,03 (s, 1H, **Im**) ; 7,17-7,32 (m, 10 H, **Im** et **Ar**) ; 8,22-8,33 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,11-9,46 (m, 2 H, 2 x **NH⁺**).
- ✓ **LC-MS :** Tr = 3,08 min; MH⁺ = 458 ; Pureté = 99,7 %

Analyse élémentaire : C₂₆H₂₇N₅O₃, 2 HCl, 2 H₂O => 565,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,13 ; %H = 5,83 ; %N = 12,37 ; %Cl = 12,55 ; Expérimental : %C = 55,13 ; %H = 5,79 ; %N = 12,40 ; %Cl = 12,51).

Chlorhydrate de 4-(biphén-2-yl)carboxamido-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1-*H*imidazol-5-yl]méthyl]pipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (37) et chlorhydrate de 4-(biphén-2-yl)carboxamido-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1-*H*imidazol-5-yl]méthyl]pipéridin-2(R)-carboxylate de méthyle (41)



Composé 2S (37) :

Amine 29	1 éq.	2,5 mmol	80 mg
Dérivé chloré 4	2 éq.	5,0 mmol	135 mg
DIEA	4,5 éq.	1,1 mmol	0,20 mL

Caractéristiques : Aspect : Poudre blanche ; Rendement : 46 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,67

Analyses spectrales

- ✓ IR : 2225 ν (C \equiv N nitrile) ; 1725 ν (C=O ester) ; 1639 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,58-1,74 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,78-2,04 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,31-2,40 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,19-3,25 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,48 (s, 2 H, **CH₂-Im**) ; 3,67-3,79 (m + s, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 5,47 (m, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,08 (s, 1 H, **Im**) ; 7,23-7,49 (m, 14 H, **Ar + Im**) ; 8,35-8,46 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,22-9,63 (m, 2 H, **NH²⁺**).
- ✓ LC-MS : Tr = 3,24 min ; MH⁺ = 534 ; Pureté = 98,4 %

Analyse élémentaire : C₃₂H₃₁N₅O₃, 2 HCl, 2 H₂O => 641,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 59,81 ; %H = 5,76 ; %N = 10,90 ; %Cl = 11,06 ; Expérimental : %C = 59,91 ; %H = 5,71 ; %N = 10,88 ; %Cl = 11,10).

Composé 2R (41) :

Amine 33	1 éq.	2,5 mmol	80 mg
Dérivé chloré 4	2 éq.	5,0 mmol	135 mg
DIEA	4,5 éq.	1,1 mmol	0,20 mL

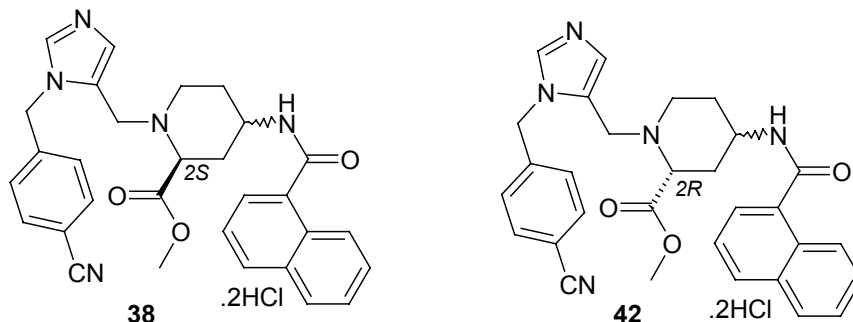
Caractéristiques : Aspect : Poudre blanche ; Rendement : 48 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,55

Analyses spectrales

- ✓ IR : 2225 ν (C \equiv N nitrile) ; 1725 ν (CO ester) ; 1638 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,41-1,49 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,44-1,58 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,04-2,13 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,35 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,33-3,40 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,48 (s, 2 H, **CH₂-Im**) ; 3,65-3,77 (s + m, 4 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,83-3,88 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 5,49 (m, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,03 (s, 1H, **Im**) ; 7,35-7,61 (m, 14 H, **Ar + Im**) ; 8,48-8,59 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,22-9,63 (m, 2 H, 2 x **NH⁺**).
- ✓ LC-MS : Tr = 3,15 min ; MH⁺ = 534 ; Pureté = 97,8 %

Analyse élémentaire : C₃₂H₃₁N₅O₃, 2 HCl, 2 H₂O => 641,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 59,81 ; %H = 5,76 ; %N = 10,90 ; %Cl = 11,06 ; Expérimental : %C = 59,88 ; %H = 5,78 ; %N = 10,93 ; %Cl = 11,03).

Chlorhydrate de 4-[(naph-1-yl)carboxamido]-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1-Himidazol-5-yl]méthyl]pipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (38) et chlorhydrate de 4-[(naph-1-yl)carboxamido]-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1-Himidazol-5-yl]méthyl]pipéridin-2(R)-carboxylate de méthyle (42)

**Composé 2S (38) :**

Amine 30	1 éq.	0,19 mmol	60 mg
Dérivé chloré 4	2 éq.	0,38 mmol	102 mg
DIEA	4,5 éq.	0,86 mmol	0,15 mL

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 35 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,72

Analyses spectrales

- ✓ **IR :** 2224 v (C≡N nitrile) ; 1725 v (C=O ester) ; 1632 v (C=O amide)
- ✓ **RMN ¹H (DMSO-d₆) :** 1,62-1,77 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,80-2,07 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,28-2,38 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,18-3,24 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,48 (s, 2 H, **CH₂-Im**) ; 3,61-3,69 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,71-3,81 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 5,47 (m, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,10 (s, 1 H, **Im**) ; 7,05-7,58 (m, 11 H, **Ar** et **Im**) ; 8,84 (s, 1 H, **Napht**) ; 9,54 -9,61 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,72-9,82 (m, 2 H, 2 x **NH⁺**).
- ✓ **LC-MS :** Tr = 3,30 min ; MH⁺ = 508 ; Pureté = 98,3 %

Analyse élémentaire : C₃₀H₂₉N₅O₃, 2 HCl, 2 H₂O => 615,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 58,45 ; %H = 5,45 ; %N = 11,36 ; %Cl = 11,52 ; Expérimental : %C = 58,51 ; %H = 5,59 ; %N = 11,28 ; %Cl = 11,58).

Composé 2R (42) :

Amine 34	1 éq.	0,19 mmol	60 mg
Dérivé chloré 4	2 éq.	0,38 mmol	102 mg
DIEA	4,5 éq.	0,86 mmol	0,15 mL

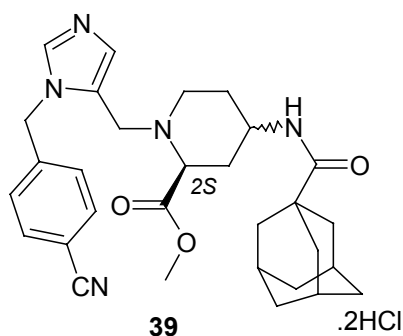
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 38 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,79

Analyses spectrales

- ✓ IR : 2224 ν (C \equiv N nitrile) ; 1725 ν C=O ester) ; 1631 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,40-1,45 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,45-1,57 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 2,02-2,11 (m, 2 H, **CH-CH₂-CH**) ; 2,31-2,39 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,35-3,44 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,48 (s, 2H, **CH₂-Im**) ; 3,68-3,75 (m, 4 H, **CH-COO-CH₃**) ; 3,82-3,87 (m, 1 H, **CH₂-CH-CH₂**) ; 5,47 (m, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,03 (s, 1H, **Im**) ; 7,119-7,53 (m, 11 H, **Ar**) ; 8,86 (s, 1 H, **Napht**) ; 9,11-9,16 (m, 1 H, **CONH**) ; 9,72-9,82 (m, 2 H, 2x **NH⁺**).
- ✓ LC-MS : Tr = 3,31 min ; MH⁺ = 508 ; Pureté = 99,1 %

Analyse élémentaire : C₃₀H₂₉N₅O₃, 2 HCl, 2 H₂O => 615,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 58,45 ; %H = 5,45 ; %N = 11,36 ; %Cl = 11,52 ; Expérimental : %C = 58,40 ; %H = 5,50 ; %N = 11,31 ; %Cl = 11,55).

Chlorhydrate de 4-[(adamantan-1-yl)carboxamido]-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]pipéridin-2(S)-carboxylate de méthyle (39)

**Composé 2S (39) :**

Amine 31	1 éq.	2,5 mmol	80 mg
Dérivé chloré 4	2 éq.	5,0 mmol	135 mg
DIEA	4,5 éq.	1,1 mmol	0,20 mL

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 27 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol : 9/1) : 0,66

Analyses spectrales

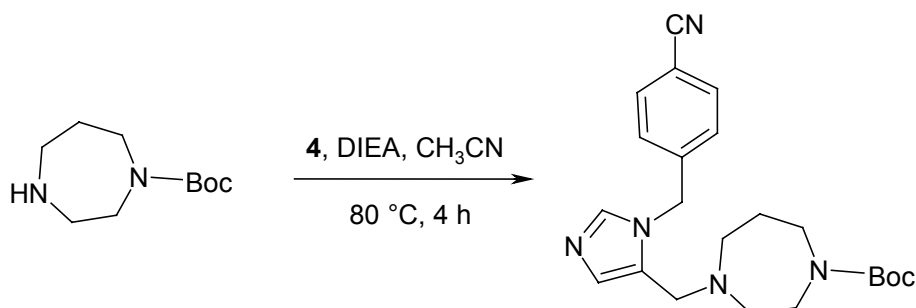
- ✓ IR : 2226 ν (C \equiv N nitrile) ; 1725 ν C=O ester) ; 1634 ν (C=O amide)
- ✓ RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,53-1,59 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 1,62 (s, 6 H, **CH₂ adamantane**) ; 1,71-1,89 (m, 9 H, **CH₂ adamantane** et **CH adamantane**) ; 1,96-2,13 (m, 3 H, **N-CH₂-CH₂** et **CH-CH₂-CH**) ; 2,24-2,35 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂**) ; 3,16-3,22 (m, 2 H, **N-CH₂-CH₂**, **CH₂-CH-CH₂**) ; 3,48 (s, 2 H, **CH₂-Im**) ; 3,62-3,70 (m, 1 H, **CH-COOCH₃**) ; 3,72-3,80 (s, 3 H, **CH-COOCH₃**) ; 5,47 (m, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,08 (s, 1 H, **Im**) ; 7,11-7,56 (m, 5 H, **Ar + Im**) ; 8,32-8,63 (m, 1 H, **CONH**) ; 8,98 - 9,11 (m, 2 H, 2x **NH⁺**).
- ✓ LC-MS : Tr = 3,60 min ; MH⁺ = 516 ; Pureté = 99,3 %

Analyse élémentaire : C₃₀H₃₇N₅O₃, 2 HCl, 2 H₂O => 623,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C =

57,70 ; %H = 6,89 ; %N = 11,22 ; %Cl = 11,38 ; Expérimental : %C = 57,68 ; %H = 7,01 ; %N = 11,25 ; %Cl = 11,41).

Synthèse des dérivés du 1,4-diazépane (séries J, K et L)

1-Tert-butoxycarbonyl-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (44)



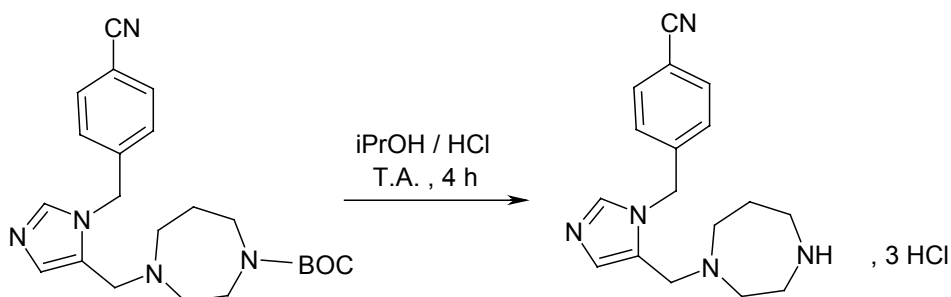
La Boc-homopipérazine (3,10 mL, 15,7 mmol ; 1,2 éq), le dérivé chloré **4** (3,5 g ; 13,1 mmol ; 1 éq) et la diisopropyléthylamine (6,80 mL ; 39,2 mmol ; 3 éq) sont ajoutés dans 40 mL d'acétonitrile anhydre. Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé par de l'eau. La phase organique est séparée puis elle est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice avec un éluant dichlorométhane / méthanol 96 : 4.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 72 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65 ; F : 132°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 2229 ν (C≡N nitrile), 1683 ν (C=O caramate)
- **RMN ¹H** (DMSO-*d*₆) : 1,45 (s, 9 H, **CH**₃) ; 2,45-2,60 (m, 4 H, **H diazépane**) ; 3,31 (s, 2 H, **N-CH**₂-**Im**) ; 3,31-3,46 (m, 6 H, **H diazépane**) ; 5,38 (s, 2 H, **Im-CH**₂-**Ar**) ; 6,97 (s, 1 H, **Im**) ; 7,16 (D, 2 H, J = 7,9, **Ar**) ; 7,56 (s, 1 H, **Im**) ; 7,63 (D, 2 H, J = 7,9, **Ar**).

Chlorhydrate de 4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (45)



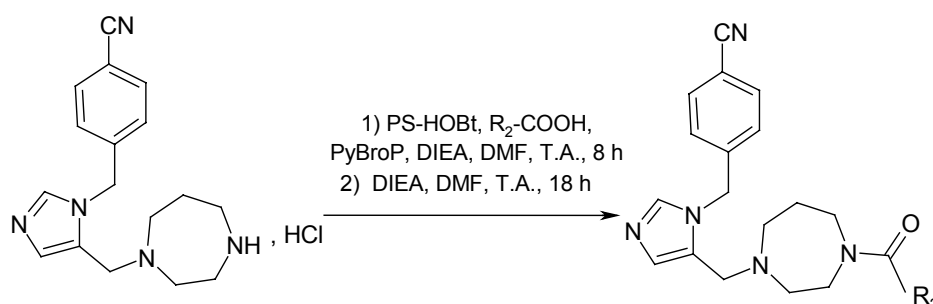
Le carbamate **44** est dissous dans un minimum de méthanol et il y est ajouté une solution d'isopropanol titrée en HCl gazeux (5-6 N). Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré sous pression réduite. Le solide obtenu est lavé à l'éther, filtré et recristallisé dans l'éthanol absolu.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,15 ; F : 153 °C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 3,10-3,90 (m, 10 H, **H diazépiane**) ; 4,43 (s, 2 H, **N-CH $_2$ -Im**) ; 5,82 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 7,57 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,92 (m, 2 H, **Ar**) ; 8,11 (s, 1 H, **Im**) ; 9,31 (s, 1 H, **Im**) ; 9,64 (m, 1 H, **NH $^+$ Cl $^-$**).

Méthode générale d'acylation par synthèse en phase solide avec la résine PS-HOBt (composés 46-64)

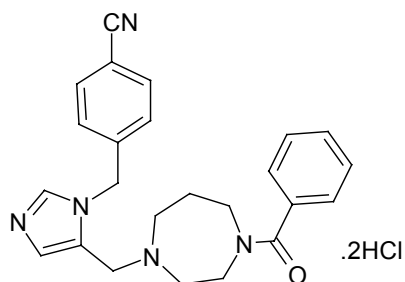


La résine PS-HOBt (1g) est introduite dans chaque réacteur. Après 18 heures dans le dichlorométhane, la résine est filtrée.

L'acide carboxylique, la DIEA et le PyBroP dissous dans 20 mL de DMF anhydre sont introduits dans le réacteur. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 heures. Cette opération est renouvelée et la résine est filtrée, lavée 3 fois par du DMF, 3 fois par du dichlorométhane et 3 fois par du DMF.

L'amine **45** et la DIEA dissous dans 20 mL de DMF anhydre sont introduites dans le réacteur. Après 18 heures d'agitation, la résine est filtrée et lavée 3 fois par du DMF. Le filtrat est concentré et le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse. Le produit isolé est conservé sous forme de chlorhydrate.

Chlorhydrate de 4-benzoyl-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépiane (**46**)



Acide benzoïque	2 éq.	1,50 mmol	185 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

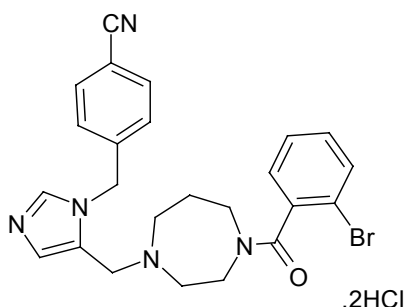
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 60 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,36 ; F : 170°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (DMSO- d_6) : 3,15-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépiane**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,32-7,50 (m, 5 H, **Ar**) ; 7,41-7,57 (d, 2 H, **Ar**, J = 7 Hz) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,12 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,72 min ; MH⁺ = 400 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₂₅N₅O, 2 HCl, 2,5 H₂O => 517,4 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,71 ; %H = 6,23 ; %N = 13,53 ; %Cl = 13,70 ; Expérimental : %C = 55,79 ; %H = 6,23 ; %N = 13,32 ; %Cl = 13,29).

Chlorhydrate de 4-(2-bromobenzoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépiane (47)



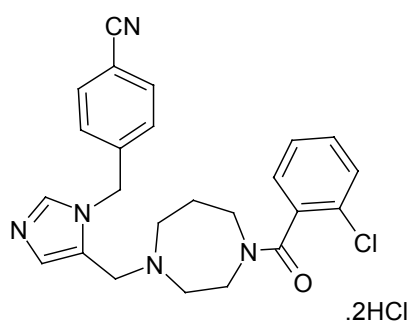
Acide 2-bromobenzoïque	2 éq.	1,50 mmol	300 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 46 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,55 ; F : 179°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 v (C≡N nitrile), 1623v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 3,28-3,92 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,50 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,44-7,62 (m, 6 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,21 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,15 (s, 1 H, **Im**) ; 12,18 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,86 min ; MH⁺ = 478,1 ; pureté : 98,7 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₂₄BrN₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O => 477,90 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 60,26 ; %H = 5,75 ; %N = 14,65 ; %Cl = 14,86 ; Expérimental : %C = 60,31 ; %H = 5,73 ; %N = 14,7 ; %Cl = 15,01).

Chlorhydrate de 4-(2-chlorobenzoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (48)


Acide 2-chlorobenzoïque	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 µL
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 µL

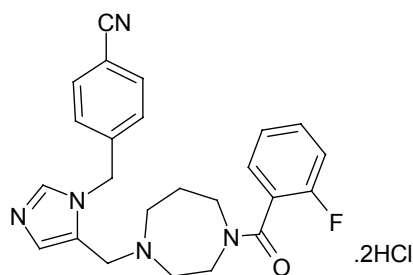
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 52 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,47 ; F : 140°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 v (C≡N nitrile), 1623 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 3,19-3,88 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,48-7,71 (m, 6 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,26 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,80 min ; MH⁺ = 439. ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₂₄ClN₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 542,89 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 53,10 ; %H = 5,57 ; %N = 12,90 ; %Cl = 19,59 ; Expérimental : %C = 53,43 ; %H = 5,49 ; %N = 12,71 ; %Cl = 19,17).

Chlorhydrate de 4-(2-fluorobenzoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (49)



Acide 2-fluorobenzoïque	2 éq.	1,50 mmol	466 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 µL
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 µL

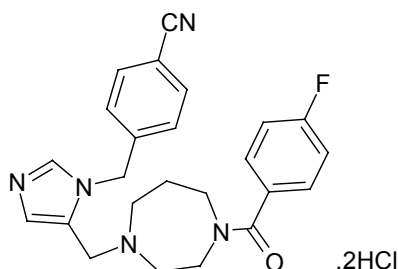
Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 56 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,63 ; F : 162°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 v (C≡N nitrile), 1623 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 3,15-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,17-7,39 (m, 4 H, **Ar**) ; 7,41-7,57 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,12 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 3,05 min ; MH⁺ = 418 ; pureté : 99,1 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₂₄FN₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O => 517,4 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,71 ; %H = 5,36 ; %N = 13,54 ; %Cl = 13,70 ; Expérimental : %C = 55,66 ; %H = 5,25 ; %N = 13,42 ; %Cl = 13,65).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-(4-fluorobenzoyl)-1,4-diazépane (50)



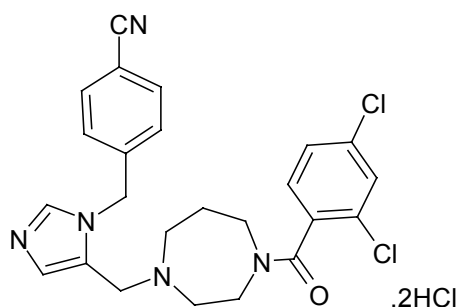
Acide 4-fluorobenzoïque	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 µL
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 µL

Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 43 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,45 ; F : 96°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 3,30-3,90 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,82 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,48-7,68 (m, 6 H, **Ar**) ; 7,88-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,22 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,77 min ; MH^+ = 418 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₂₄FN₅O, 2 HCl, 1 H₂O => 508,42 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 56,70 ; %H = 5,55 ; %N = 13,77 ; %Cl = 13,98 ; Expérimental : %C = 56,88 ; %H = 5,82 ; %N = 13,37 ; %Cl = 13,52).

Chlorhydrate de 1- $\{[1-(4\text{-cyanobenzyl})-1H\text{-imidazol-5-yl}]m\acute{e}thyl\}$ -4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,4-diazépane (51)


Acide 2,4-dichlorobenzoiq	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

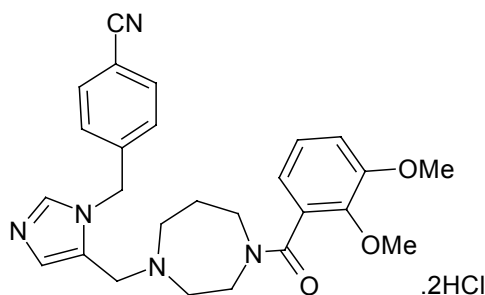
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 40 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,45 ; F : 192°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 3,28-3,96 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,48-7,68 (m, 5 H, **Ar**) ; 7,75-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,01 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,26 (s, 1 H, **Im**) ; 12,22 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 3,14 min ; MH^+ = 468 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₂₃Cl₂N₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O => 568,33 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 50,72 ; %H = 4,97 ; %N = 12,32 ; %Cl = 24,95 ; Expérimental : %C = 50,93 ; %H = 4,99 ; %N = 12,03 ; %Cl = 24,61).

Chlorhydrate de 1- $\{[1-(4\text{-cyanobenzyl})-1H\text{-imidazol-5-yl}]m\acute{e}thyl\}$ -4-(2,3-diméthoxybenzoyl)-1,4-diazépane (52)



Acide 2,3-diméthoxybenzoïque	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

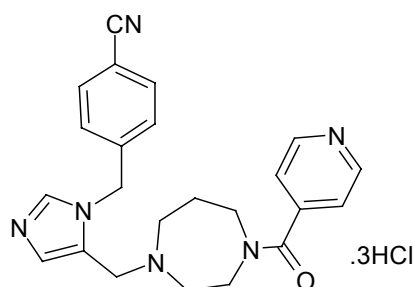
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 60 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,44 ; F : 144°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (DMSO- d_6) : 2,98-3,69 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 3,71 (s, 3 H, **OCH₃**) ; 3,83 (s, 3 H, **OCH₃**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 6,82-6,92 (m, 1 H, **Ar**) ; 7,06-7,15 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,49-7,61 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,95-8,15 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,25 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,12 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,77 min ; MH⁺ = 460 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₂₆H₂₉N₅O₃, 2 HCl, 1,5 H₂O => 559,49 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,82 ; %H = 6,12 ; %N = 12,52 ; %Cl = 12,64 ; Expérimental : %C = 55,88 ; %H = 6,16 ; %N = 12,22 ; %Cl = 12,84).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]methyl]-4-(4-pyridinoyl)-1,4-diazépane (**54**)



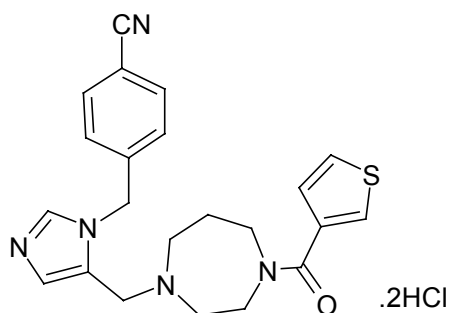
Acide 3-isonicotinique	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 52 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,17 ; F : 211°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1627 ν (C=O amide)
- **RMN ^1H (DMSO- d_6)** : 3,10-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,48 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,82 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,27-7,35 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,55-7,78 (m, 4 H, **Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **Im**) ; 8,92 (m, 2 H, **Ar**) ; 9,23 (s, 1 H, **Im**) ; 12,32 (m, 1 H, **NH⁺**).
- **LC-MS**: T_r = 2,24 min ; MH^+ = 401 ; pureté : 98,2 %.

Analyse élémentaire : C₂₃H₂₄N₆O, 3 HCl, 3 H₂O => 563,91 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 48,99 ; %H = 5,90 ; %N = 14,90 ; %Cl = 18,86 ; Expérimental : %C = 49,12 ; %H = 5,67 ; %N = 14,52 ; %Cl = 18,49).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-(3-thénoyl)-1,4-diazépane (55)


Acide 3-thiophénecarboxylique	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μL
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μL

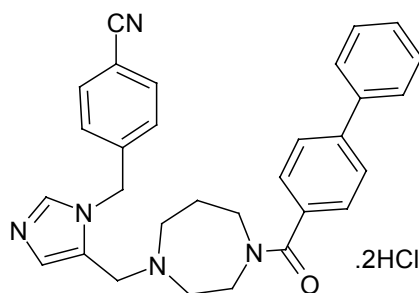
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 54 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,33 ; F : 215°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- **RMN ^1H (DMSO- d_6)** : 3,18-3,92 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,48 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,80 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,02-7,10 (m, 1 H, **Ar**) ; 7,39-7,43 (m, 1 H, **Ar**) ; 7,52-7,70 (m, 3 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,13 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,22 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- **LC-MS**: T_r = 2,62 min ; MH^+ = 406 ; pureté : 98,2 %.

Analyse élémentaire : C₂₂H₂₃N₅OS, 2 HCl, 2 H₂O => 541,53 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 48,75 ; %H = 5,36 ; %N = 12,93 ; %Cl = 13,11 ; Expérimental : %C = 48,81 ; %H = 5,41 ; %N = 13,01 ; %Cl = 13,01).

Chlorhydrate de 4-(4-biphénoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (56)



Acide 4-biphénylcarboxylique	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

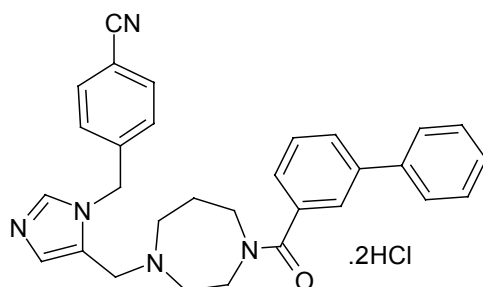
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 56 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,42 ; F : 233°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (DMSO- d_6) : 3,12-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,48 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,83 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,38-7,62 (m, 7 H, **Ar**) ; 7,67-7,79 (m, 4 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Ar** et **Im**) ; 8,15 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,22 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,91 min ; MH⁺ = 414 ; pureté : 98,7 %.

Analyse élémentaire : C₃₀H₂₉N₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 584,54 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 61,64 ; %H = 6,03 ; %N = 11,98 ; %Cl = 12,13 ; Expérimental : %C = 61,86 ; %H = 5,82 ; %N = 11,96 ; %Cl = 12,19).

Chlorhydrate de 4-(3-biphényl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (57)



Acide 3-biphénylcarboxylique	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

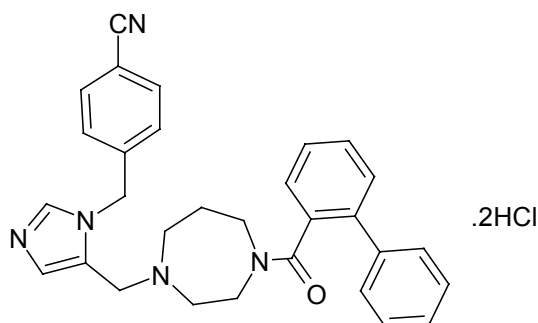
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,42 ; F : 247°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 3,15-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,44 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,34-7,60 (m, 7 H, **Ar**) ; 7,67-7,79 (m, 4 H, **Ar**) ; 7,81-7,96 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,15 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,12 (s, 1 H, **Im**) ; 12,20 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 3,24 min ; MH^+ = 476 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₃₀H₂₉N₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 584,54 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 61,64 ; %H = 6,03 ; %N = 11,98 ; %Cl = 12,13 ; Expérimental : %C = 61,63 ; %H = 6,06 ; %N = 11,92 ; %Cl = 12,08).

Chlorhydrate de 4-(2-biphénoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (58)



Acide 2-biphénylcarboxylique	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μL
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μL

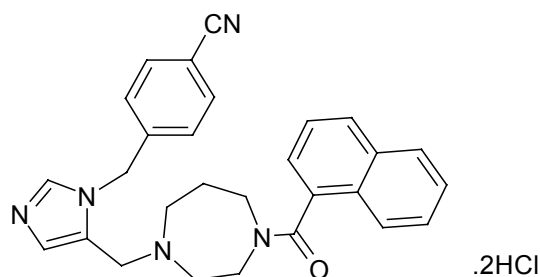
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 56 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,42 ; F : >250°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1630 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 3,12-3,77 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,45 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,77 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,38-7,60 (m, 11 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,09 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,18 (s, 1 H, **Im**) ; 12,09 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 3,12 min ; MH^+ = 476 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₃₀H₂₉N₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 584,54 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 61,64 ; %H = 6,03 ; %N = 11,98 ; %Cl = 12,13 ; Expérimental : %C = 61,44 ; %H = 5,88 ; %N = 12,08 ; %Cl = 11,67).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-(1-naphtoyl)-1,4-diazépane (59)



Acide 2-naphtoïque	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

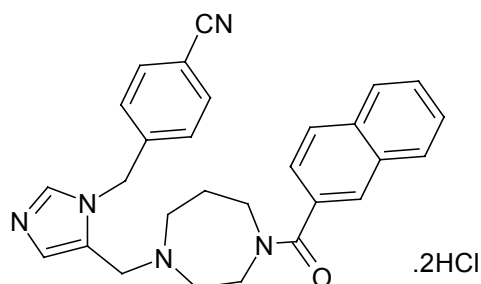
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 68 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,42 ; F : 229°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1641 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (DMSO- d_6) : 3,15-3,95 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,48 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,82 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,40-7,60 (m, 5 H, **Ar**) ; 7,85-8,05 (m, 6 H, **Im et Ar**) ; 8,21 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,27 (s, 1 H, **Ar**) ; 12,22 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 3,03 min ; MH⁺ = 450 ; pureté : 100 %.

Analyse élémentaire : C₂₈H₂₇N₅O, 2 HCl, 3 H₂O => 576,52 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 58,33 ; %H = 6,12 ; %N = 12,15 ; %Cl = 12,30 ; Expérimental : %C = 58,24 ; %H = 5,84 ; %N = 12,22 ; %Cl = 11,93).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-(2-naphtoyl)-1,4-diazépane (60)



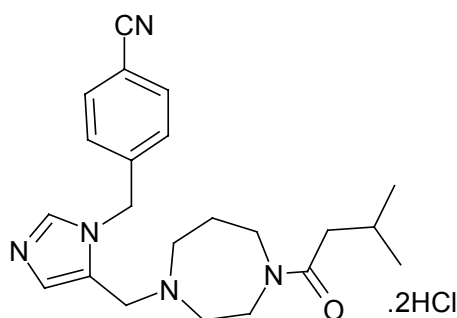
Acide 2-naphtoïque	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 62 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,39 ; F : 156°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1632 ν (C=O amide)
- **RMN ^1H** (DMSO- d_6) : 3,15-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,48 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,82 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,50-7,65 (m, 5 H, **Ar**) ; 7,85-8,08 (m, 7 H, **Im et Ar**) ; 8,13 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,18 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- **LC-MS**: T_r = 3,02 min ; MH^+ = 450 ; pureté : 98,2 %.

Analyse élémentaire : C₂₈H₂₇N₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 558,51 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 60,21 ; %H = 5,95 ; %N = 12,54 ; %Cl = 12,69 ; Expérimental : %C = 60,14 ; %H = 5,93 ; %N = 12,78 ; %Cl = 12,64).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-(3-méthylbutyroyl)-1,4-diazépane (62)


Acide 3-méthylbutanoïque	2 éq.	1,50 mmol	443 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μL
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μL

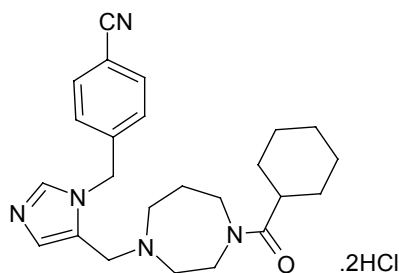
Caractéristiques : Aspect : solide beige ; Rendement : 56 % ; R_f (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1) : 0,65 ; F : 160°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- **RMN ^1H** (DMSO- d_6) : 0,87-0,95 (d, 6 H, J = 7,2, (**CH₃)₂-CH**) ; 2,07-2,21 (m, 1 H, **CH**) ; 2,38-2,42 (d, 2 H, J = 6,1, **CH₂-CH**) ; 3,15-3,85 (m, 10 H, **CH₂ diazépane**) ; 4,51 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,84 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,41-7,57 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,83-7,95 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,12 (s, 1 H, **Im**) ; 12,13 (m, 1 H, **NH⁺**).
- **LC-MS**: T_r = 2,40 min ; MH^+ = 380 ; pureté : 97,8 %.

Analyse élémentaire : C₂₂H₂₉N₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O ; 479,4 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 55,12 ; %H = 6,83 ; %N = 14,61 ; %Cl = 14,78 ; Expérimental : %C = 55,22 ; %H = 6,75 ; %N = 14,20 ; %Cl = 14,72).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-cyclohexanoyl-1,4-diazépane (63)



Acide cyclohexanoïque	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

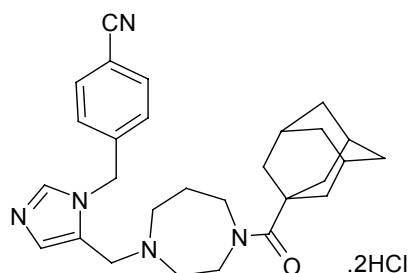
Caractéristiques : Aspect : solide ; Rendement : 58 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,45 ; F : 213°C.

Analyses spectrales

- IR : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,15-1,40 (m, 6 H, **H cyclohexane**) ; 1,55-1,80 (m, 5 H, **H cyclohexane**) ; 2,95-3,15 (m, 2 H, **H diazépane**) ; 3,30-3,65 (m, 6 H, **H diazépane**) ; 3,85-4,20 (m, 2 H, **H diazépane**) ; 4,44 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,80 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,41-7,57 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,92-8,15 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,14 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,24 (s, 1 H, **Im**) ; 12,10 (m, 1 H, **NH⁺**).
- LC-MS: T_r = 2,91 min ; MH⁺ = 414. ; pureté : 98,7 %.

Analyse élémentaire : C₂₄H₃₁N₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 514,49 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 56,03 ; %H = 7,25 ; %N = 13,61 ; %Cl = 13,78 ; Expérimental : %C = 56,31 ; %H = 7,32 ; %N = 13,90 ; %Cl = 13,50).

Chlorhydrate de 4-(1-adamantanoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1,4-diazépane (64)



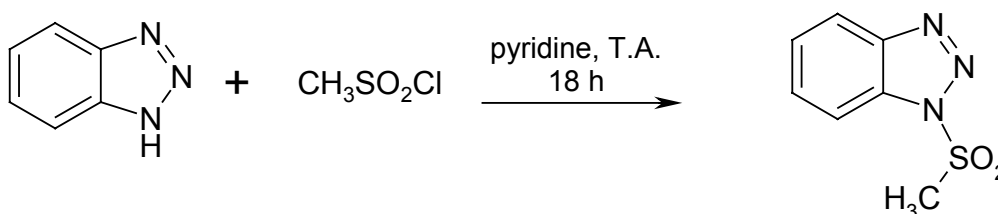
Acide 1-adamantanecarboxylique	2 éq.	1,50 mmol	283 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 45	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 58 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,29 ; F : 206°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 2228 ν (C \equiv N nitrile), 1623 ν (C=O amide)
- **RMN ^1H (DMSO- d_6)** : 1,68 (s, 6 H, **CH₂ adamantane**) ; 1,80-2,00 (m, 9 H, **CH₂ adamantane et CH adamantane**) ; 3,00-3,12 (m, 2 H, **H diazépane**) ; 3,30-3,60 (m, 6 H, **H diazépane**) ; 3,85-4,15 (m, 2 H, **H diazépane**) ; 4,46 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,82 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,35-7,47 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,88-8,03 (m, 3 H, **Im et Ar**) ; 8,18 (m, 1 H, **NH⁺**) ; 9,29 (s, 1 H, **Im**) ; 12,08 (m, 1 H, **NH⁺**).
- **LC-MS**: T_r = 3,29 min ; MH^+ = 458. ; pureté : 98,0 %.

Analyse élémentaire : C₂₈H₃₅N₅O, 2 HCl, 2 H₂O => 566,57 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 60,32 ; %H = 7,23 ; %N = 12,56 ; %Cl = 12,72 ; Expérimental : %C = 59,82 ; %H = 7,25 ; %N = 12,60 ; %Cl = 12,64).

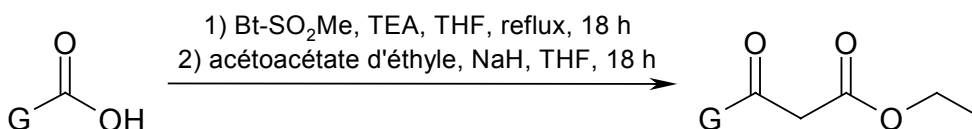
N-(1-méthanesulfonyl)benzotriazole

Le benzotriazole (1 éq., 100 mmol, 11,9 g), le chlorure de méthanesulfonyle (1,4 éq., 140 mmol, 9,3 mL) et la pyridine (1,6 éq., 160 mmol, 12,7 mL) sont mélangés dans 100 mL de toluène anhydre. Après 18 heures d'agitation à température ambiante, 100 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite réunies pour être lavées par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée. Le produit est purifié par recristallisation dans le toluène.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 83 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,45 ; F : 110°C.

Analyses spectrales :

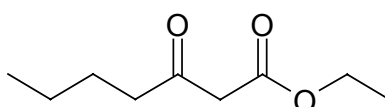
- **IR** : 1213 ν (S=O sulfone)
- **RMN ^1H (CDCl₃)** : 2,83 (s, 3 H, **CH₃**) ; 7,37-7,49 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,95-8,02 (m, 2 H, **Ar**).

Méthode générale d'obtention des β -cétoesters

L'acide carboxylique, le 1-méthanesulfonylbenzotriazole et la triéthylamine sont dissous dans du THF anhydre. Après 18 heures de chauffage à reflux, le milieu

réactionnel est concentré. Le résidu est ensuite repris par de l'acétate d'éthyle pour être lavé par de l'eau et par de la solution saturée en NaCl. La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 avant d'être concentrée pour donner l'ester activé. L'hydrure de sodium est ajouté par portions à l'acétoacétate d'éthyle dissous dans du THF anhydre. Après une demi-heure d'agitation à température ambiante, l'ester activé est ajouté au milieu réactionnel qui est ensuite laissé sous agitation pendant 18 heures. La réaction est arrêtée par ajout de 0,5 mL d'eau, 4 g de NH_4Cl et 5,8 mL NH_4OH à 20% (pour 22,8 mmol d'acide carboxylique). Après une heure de chauffage à reflux, le milieu réactionnel est acidifié par de l' HCl 6N. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies pour être lavées par de l'eau puis par une solution saturée en NaCl.

3-Oxoheptanoate d'éthyle (68)



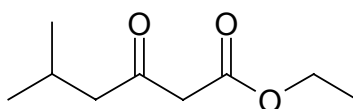
Acide pentanoïque	1 éq.	22,8 mmol	2,5 mL
1-Méthanesulfonylbenzotriazole	1 éq.	22,8 mmol	4,5 g
Triéthylamine	1,5 éq.	34,2 mmol	4,8 mL
Acétoacétate d'éthyle	1 éq.	22,8 mmol	2,9 mL
NaH 60 % dans l'huile	1,1 éq.	25,1 mmol	1 g

Caractéristiques : Aspect : huile incolore ; Rendement : 63 % ; Rf cyclohexane / acétate d'éthyle 5 : 5) : 0,65.

Analyses spectrales :

- **IR** : 1626 ν (C=O cétone); 1720 ν (C=O ester).
- **RMN ^1H (CDCl_3)** : 0,76-0,82 (t, 3 H, $J = 7, 1$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$) ; 1,15-1,37 (m, 5 H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 1,48-1,61 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 2,43-2,53 (t, 2 H, $J = 6,7$, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 3,39 (s, 2 H, $\text{CO-CH}_2\text{-CO}$) ; 4,08-4,19 (q, 2 H, $J = 7, 2$, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

5-Méthyl-3-oxohexanoate d'éthyle (69)



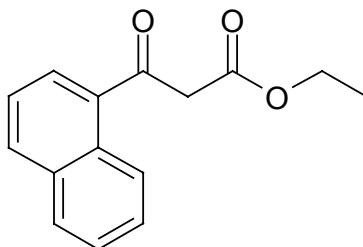
Acide 3-méthylbutanoïque	1 éq.	22,8 mmol	2,5 mL
Méthanesulfonylbenzotriazole	1 éq.	22,8 mmol	4,5 g
Triéthylamine	1,5 éq.	34,2 mmol	4,8 mL
Acétoacétate d'éthyle	1 éq.	22,8 mmol	2,9 mL
NaH 60 % dans l'huile	1,1 éq.	25,1 mmol	1 g

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 67 % ; Rf cyclohexane / acétate d'éthyle 5 : 5) : 0,65.

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O cétone); 1720 ν (C=O ester).
- RMN ^1H (CDCl_3) : 0,87-0,95 (d, 6 H, J = 7,0, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$) ; 1,22-1,29 (t, 2 H, J = 7, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$) ; 2,07-2,21 (m, 1 H, CH) ; 2,38-2,42 (d, 2 H, J = 6,6, $\text{CH}_2\text{-CH}$) ; 3,39 (s, 2 H, $\text{CO-CH}_2\text{-CO}$) ; 4,13-4,21 (q, 2 H, J = 7,4, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

3-(Naphthalén-1-yl)-3-oxopropanoate d'éthyle (70)



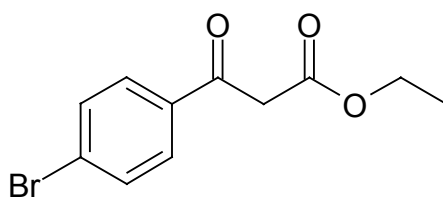
Acide 1-naphtoïque	1 éq.	101 mmol	17,4 g
1-Méthanesulfonylbenzotriazole	1 éq.	101 mmol	20 g
Triéthylamine	1,5 éq.	152 mmol	21,3 mL
Acétoacétate d'éthyle	1 éq.	101 mmol	12,9 mL
NaH 60 % dans l'huile	1,1 éq.	111 mmol	4,45 g

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement : 81 % ; Rf (cyclohexane / acétate d'éthyle 5 : 5) : 0,75.

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O cétone); 1720 ν (C=O ester); 1497 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl_3) : 1,21-1,25 (t, 3 H, J = 7,2, CH_3) ; 4,13 (s, 2 H, CH_2) ; 4,18-4,25 (q, 2 H, J = 7,0, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ; 7,45-7,71 (m, 3 H, **Ar**) ; 7,84-7,94 (m, 2 H, **Ar**) ; 8,05-8,11 (d, 1 H, J = 8,4, **Ar**) ; 8,76-8,79 (d, 1 H, J = 9,2 Hz, **Ar**).

3-(4-Bromophényl)-3-oxopropanoate d'éthyle (71)



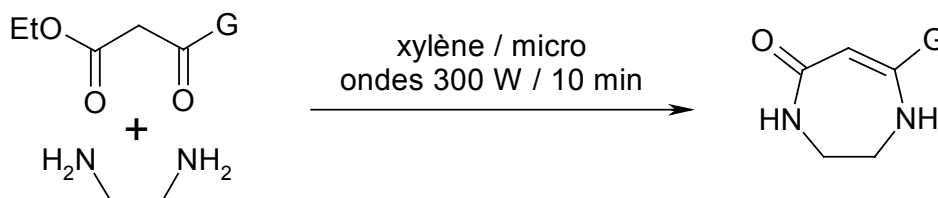
Acide 4-bromobenzoïque	1 éq.	22,8 mmol	4,5 g
1-Méthanesulfonylbenzotriazole	1 éq.	22,8 mmol	4,6 g
Triéthylamine	1,5 éq.	34,2 mmol	4,8 mL
Acétoacétate d'éthyle	1 éq.	2,45 mmol	2,45 mL
NaH 60 % dans l'huile minérale	1,1 éq.	25,1 mmol	1 g

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement : 78 % ; Rf (cyclohexane / acétate d'éthyle 5 : 5) : 0,80.

Analyses spectrales :

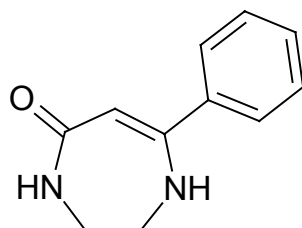
- IR : 1626 ν (C=O cétone); 1720 ν (C=O ester); 1497 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,21-1,25 (t, 3 H, J = 7,2, **CH₃**) ; 4,13 (s, 2 H, **CH₂**) ; 4,18-4,25 (q, 2 H, J = 7,6, **CH₂-CH₃**) ; 7,60-7,63 (d, 2 H, **Ar**) ; 7,76-7,85 (d, 2 H, **Ar**).

Méthode générale d'obtention des 2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-ones



La réaction se fait dans un four micro-ondes (CEM Discover[®]) équipé d'un agitateur magnétique. Le β -cétoester (1 éq.) et l'éthanediamine (1 éq.) sont ajoutés dans du xylène anhydre. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 135°C par irradiation micro-ondes (300 W) pendant 10 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite concentré et le solide formé est recristallisé dans le toluène.

7-Phényl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (72)



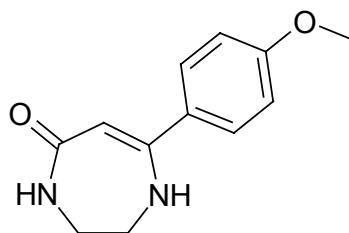
Benzoylacétate d'éthyle	1 éq.	166 mmol	28,8 mL
Ethanediamine	1 éq.	166 mmol	11,2 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 60 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,35 ; F : 206°C

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine); 1497 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 3,49-3,53 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,64-3,68 (m, 2 H, **CH₂-NHCO**) ; 4,91 (m, 1 H, **CH**) ; 5,00 (s, 1 H, **NH**) ; 6,10 (m, 1 H, **NHCO**) ; 7,38-7,41 (m, 3 H, **Ar**) ; 7,51-7,53 (m, 2 H, **Ar**).

7-(4-Méthoxyphényl)-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (73)



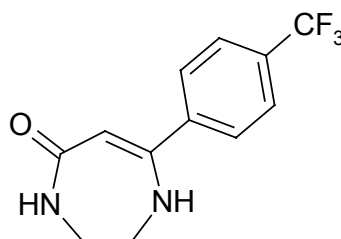
3-(4-Méthoxyphényl)-3-oxopropanoate d'éthyle	1 éq.	52 mmol	10 g
Ethanediamine	1 éq.	52 mmol	2,8 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 58 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,35 ; F : 168°C.

Analyses spectrales :

- **IR** : 1626 ν (C=O lactame) ; 1550 ν (C=N énamine) ; 1497 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (DMSO- d_6)** : 3,15-3,27 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,29-3,49 (m, 2 H, **CH₂-NHCO**) ; 3,77 (s, 3 H, **O-CH₃**) ; 4,47 (m, 1 H, **CH**) ; 6,90-7,05 (m, 3 H, **NH** et **Ar**) ; 7,07-7,18 (m, 1 H, **NH**) ; 7,41-7,53 (m, 2 H, **Ar**).

7-(4-Trifluorométhylphényl)-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (74)



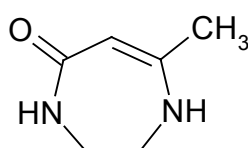
3-(4-Trifluorométhylphényl)-3-oxopropanoate d'éthyle	1 éq.	9,6 mmol	2 mL
Ethanediamine	1 éq.	9,6 mmol	0,5 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,47 ; F : 171°C.

Analyses spectrales :

- **IR** : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine); 1497 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl₃)** : 3,49-3,53 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,64-3,68 (m, 2 H, **CH₂-NHCO**) ; 4,91 (m, 1 H, **CH**) ; 5,00 (s, 1 H, **NH**) ; 6,10 (m, 1 H, **NHCO**) ; 7,51-7,58 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,65-7,72 (m, 2 H, **Ar**).

7-Méthyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (75)



Acétoacétate d'éthyle	1 éq.	166 mmol	21 mL
-----------------------	-------	----------	-------

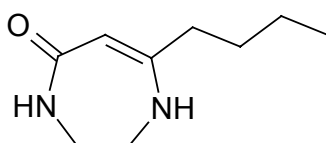
Ethanediamine	1 éq.	166 mmol	11,2 mL
---------------	-------	----------	---------

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 47 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,15 ; F : 110°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine).
- RMN ^1H (CDCl_3) : 1,29 (s, 3 H, **CH₃**) ; 3,33-3,43 (m, 2 H, **CH₂**) ; 3,44-3,52 (m, 2 H, **CH₂**) ; 4,55 (s, 1 H, **CH**) ; 5,00 (m, 1 H, **NH**) ; 6,41 (m, 1 H, **CONH**).

7-Butyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (76)



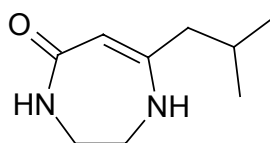
3-Oxoheptanoate d'éthyle	1 éq.	32 mmol	5,5 g
Ethanediamine	1 éq.	32 mmol	2,15 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 48 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,50 ; F : 168°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine).
- RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) : 0,81-0,91 (m, 3 H, **CH₃**) ; 1,21-1,52 (m, 4 H, **CH₃-CH₂-CH₂-**) ; 1,94-2,05 (m, 2 H, **CH₂-(CH₂)₂-CH₃**) ; 3,05-3,12 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,17-3,24 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 4,14 (s, 1 H, **CH**) ; 6,67 (m, 1 H, **NH**) ; 6,80 (m, 1 H, **NH**).

7-Isobutyl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (77)



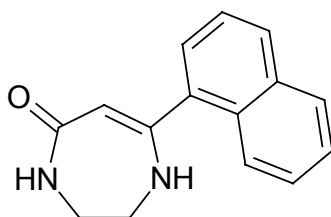
5-Méthyl-3-oxohexanoate d'éthyle	1 éq.	23 mmol	4 g
Ethanediamine	1 éq.	23 mmol	1,6 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 54 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,50 ; F : 188°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine).
- RMN ^1H (CDCl_3) : 0,83-0,92 (m, 6 H, 2 x **CH₃**) ; 1,78-1,88 (m, 2 H, **CH₂**) ; 3,06-3,13 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,07-3,17 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,35 (s, 1 H, **CH-(CH₃)₂**) ; 4,10 (m, 1 H, **CH**) ; 6,67 (m, 1 H, **NH**) ; 6,84 (m, 1 H, **NH**).

7-(1-Naphtyl)-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (78)



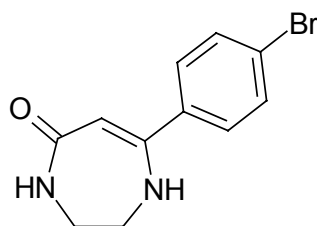
3-(1-Naphtyl)-3-oxopropanoate d'éthyle	1 éq.	9,6 mmol	2 mL
Ethanediamine	1 éq.	9,6 mmol	0,5 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 57 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,50 ; F : 192°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine); 1497 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl_3) : 3,49-3,53 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,64-3,68 (m, 2 H, **CH₂-NHCO**) ; 4,91 (m, 1 H, **CH**) ; 5,00 (s, 1 H, **NH**) ; 6,10 (m, 1 H, **NHCO**) ; 7,25-7,58 (m, 5 H, **Ar**) ; 7,65-7,72 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,80 (s, 1 H, **Ar**).

7-(4-Bromophényl)-2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-one (79)



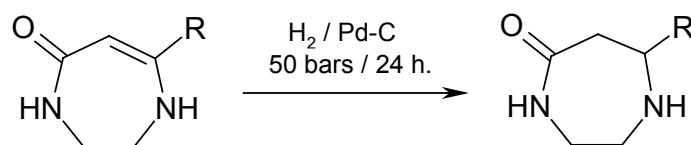
3-(4-Bromophényl)-3-oxopropanoate d'éthyle	1 éq.	30 mmol	8 g
Ethanediamine	1 éq.	30 mmol	2 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,51 ; F : 166°C.

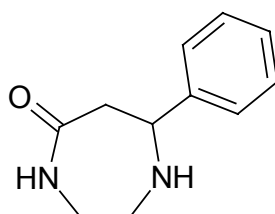
Analyses spectrales :

- IR : 1626 ν (C=O lactame); 1550 ν (C=N énamine); 1497 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) : 3,19-3,25 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,36-3,42 (m, 2 H, **CH₂-NHCO**) ; 4,47 (m, 1 H, **CH**) ; 7,08 (s, 1 H, **NH**) ; 7,17 (m, 1 H, **NH**) ; 7,51-7,58 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,65-7,72 (m, 2 H, **Ar**).

Méthode générale de réduction des

2,3,4,5-tétrahydro-1H-1,4-diazépin-5-ones 72 à 79 (composés 80-85)


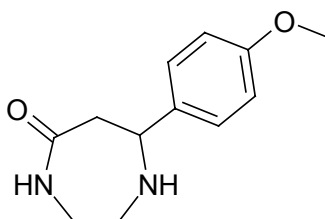
Le palladium à 10% sur charbon est ajouté à la diazépinoone solubilisée dans le méthanol. Le milieu réactionnel est mis sous agitation sous 50 bars d'hydrogène, à 50°C, pendant 24 heures. Le catalyseur est ensuite filtré et le filtrat est concentré.

7-Phényl-1,4-diazépan-5-one (80)


Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 90 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,35 ; F : 45°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 1670 ν (C=O lactame), 1495 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl₃)** : 2,00 (m, 1 H, **NH**) ; 2,57–2,61 (d, 1 H, J = 14,0, **CH₂-CO**) ; 2,95–3,00 (m, 2 H, **CH₂-CO**, **CH₂-NH**) ; 3,17–3,22 (m, 2 H, **CH₂-NH**, **CH₂-NHCO**) ; 3,47–3,55 (m, 1 H, **CH₂-NHCO**) ; 3,89–3,93 (d, 1 H, J = 10,0, **CH**) ; 7,25 (m, 1 H, **CONH**) ; 7,28–7,37 (m, 5 H, **Ar**).

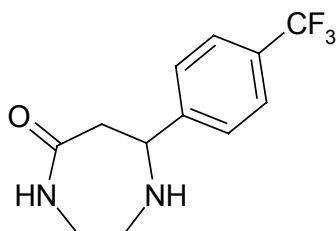
7-(4-Méthoxyphényl)-1,4-diazépan-5-one (81)


Caractéristiques : Aspect : Solide blanc ; Rendement : 90 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,35 ; F : 55°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 1670 ν (C=O lactame), 1495 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl₃)** : 2,00 (m, 1 H, **NH**) ; 2,57–2,61 (d, 1 H, **CH₂-CO**, J = 14,0) ; 2,95–3,00 (m, 2 H, **CH₂-CO**, **CH₂-NH**) ; 3,17–3,22 (m, 2 H, **CH₂-NH**, **CH₂-NHCO**) ; 3,47–3,55 (m, 1 H, **CH₂-NHCO**) ; 3,77 (s, 3 H, **CH₃-O**) ; 3,89–3,93 (d, 1 H, J = 10,0, **CH**) ; 7,25 (m, 1 H, **CONH**) ; 7,28–7,37 (m, 4 H, **Ar**).

7-(4-Trifluorométhylphényl)-1,4-diazépan-5-one (82)

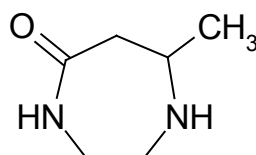


Caractéristiques : Aspect : Solide blanc ; Rendement : 90 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,46 ; F : 47°C.

Analyses spectrales

- IR : 1670 v (C=O lactame), 1495 v (C=C aromatique)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 2,00 (m, 1 H, NH) ; 2,47–2,54 (d, 1 H, CH₂-CO, J = 13,0) ; 2,95–3,00 (m, 2 H, CH₂-CO, CH₂-NH) ; 3,17–3,22 (m, 2 H, CH₂-NH, CH₂-NHCO) ; 3,47–3,55 (m, 1 H, CH₂-NHCO) ; 4,17–4,28 (m, 1 H, CH, J = 10,0) ; 7,25 (m, 1 H, CONH) ; 7,28–7,37 (m, 4 H, Ar).

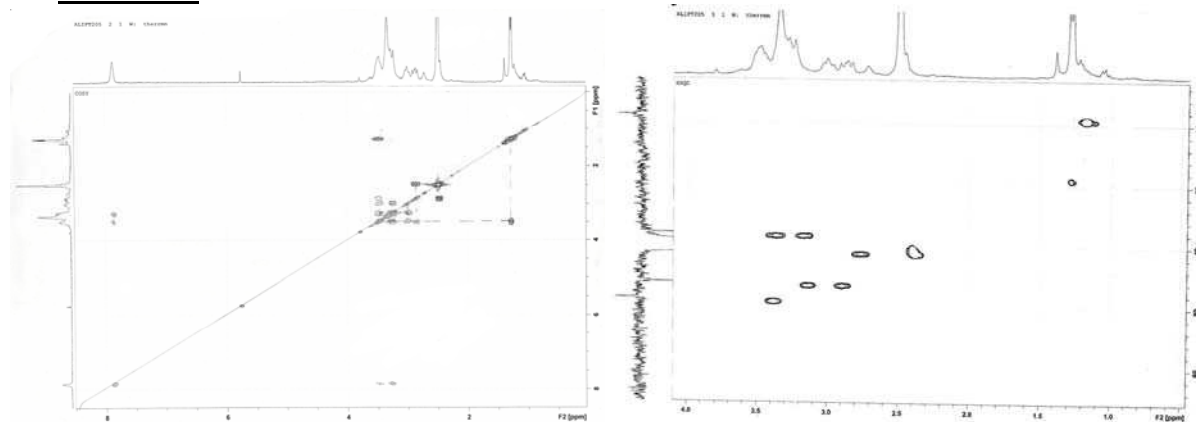
7-Méthyl-1,4-diazépan-5-one (83)



Caractéristiques : Aspect : solide blanc hygroscopique ; Rendement : 90 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,15 ; F : 35°C.

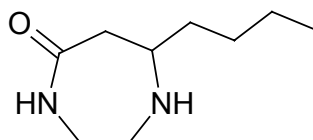
Analyses spectrales

- IR : 1670 v (C=O lactame)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,27-1,32 (d, 3 H, J = 5,1, CH₃) ; 2,42-2,48 (d, 1 H, CO-CH₂) ; 2,82-3,09 (m, 2 H, CO-CH₂, NH-CH₂-CH₂) ; 3,17-3,56 (m, 4 H, NH-CH₂-CH₂, CO-CH₂-CH) ; 7,87 (m, 1H, NH) ; 9,64 (m, 1 H, CONH).
- RMN 2D :



- RMN ¹³C (CDCl₃) : 19,6 (CH₃) ; 38,5 (CH₂) ; 41,7 (CH₂) ; 47,5 (CH₂) ; 49,6 (CH).
- LC-MS: T_r = 0,40 min ; MH⁺ = 129.

7-Butyl-1,4-diazépan-5-one (84)

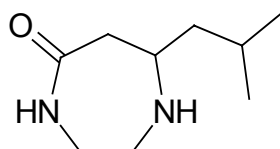


Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement : 90 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,45.

Analyses spectrales

- **IR** : 1670 ν (C=O lactame)
- **RMN ^1H (CDCl₃)** : 0,81-0,91 (m, 3 H, **CH₃**) ; 1,21-1,52 (m, 4 H, **CH₃-CH₂-CH₂**) ; 1,57-1,68 (m, 2H, **CH-CH₂-(CH₂)₂**) ; 2,42-2,48 (d, 1 H, **CO-CH₂**) ; 2,82-3,09 (m, 2 H, **CO-CH₂, NH-CH₂-CH₂**) ; 3,17-3,56 (m, 4 H, **NH-CH₂-CH₂, CO-CH₂-CH**) ; 7,87 (m, 1H, **NH**) ; 9,64 (m, 1 H, **CONH**).

7-Isobutyl-1,4-diazépan-5-one (85)

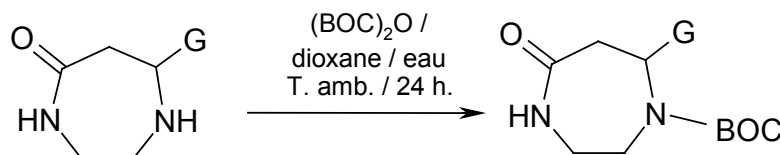


Caractéristiques : Aspect : Huile jaunâtre ; Rendement : 90 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,45.

Analyses spectrales

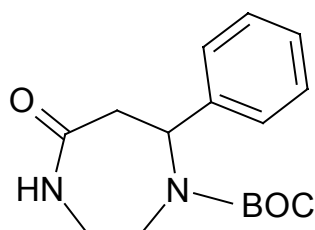
- **IR** : 1670 ν (C=O lactame),
- **RMN ^1H (CDCl₃)** : 0,83-0,92 (m, 6 H, 2 x **CH₃**) ; 1,78-1,88 (m, 2 H, **CH₂**) ; 3,35 (s, 1 H, **CH-(CH₃)₂**) ; 2,42-2,48 (d, 1 H, **CO-CH₂**) ; 2,82-3,09 (m, 2 H, **CO-CH₂, NH-CH₂-CH₂**) ; 3,17-3,56 (m, 4 H, **NH-CH₂-CH₂, CO-CH₂-CH**) ; 7,87 (m, 1H, **NH**) ; 9,64 (m, 1 H, **CONH**).

Méthode générale de N-protection sous forme de carbamate de *tert*-butyle (composés 86-91)



La diazépnone et la diisopropyléthylamine sont solubilisées dans 40 mL d'un mélange dioxane / eau (4 : 1) puis le dicarbonate de di-*tert*-butyle est ajouté par portions. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré et le résidu est recristallisé dans l'hexane.

1-Tert-butoxycarbonyl-7-phényl-1,4-diazépan-5-one (86)



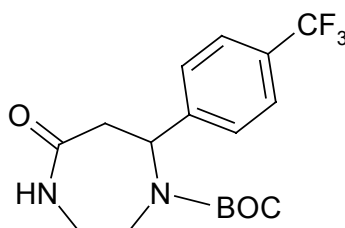
Diazépanone 41	1 éq.	8,85 mmol	2,6 g
Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle	1,1 éq.	9,75 mmol	2,2 g
Diisopropyléthylamine	2,5 éq.	22,1 mmol	3,8 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65.

Analyses spectrales

- **IR** : 1681 ν (C=O carbamate), 1672 ν (C=O lactame), 1498 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl_3)** : 1,38 (s, 9 H, **BOC**) ; 2,57–2,61 (d, 1 H, J = 14,0, **CH₂-CO**) ; 2,95–3,00 (m, 2 H, **CH₂-CO**, **CH₂-N**) ; 3,17–3,22 (m, 2 H, **CH₂-NBOC**, **CH₂-NH**) ; 3,47–3,55 (m, 1 H, **CH₂-NH**) ; 3,89–3,93 (d, 1 H, J = 10,0, **CH**) ; 7,25 (m, 1 H, **CONH**) ; 7,28–7,37 (m, 5 H, **Ar**).

1-Tert-butoxycarbonyl-7-(4-trifluorométhylphényl)-1,4-diazépan-5-one (87)



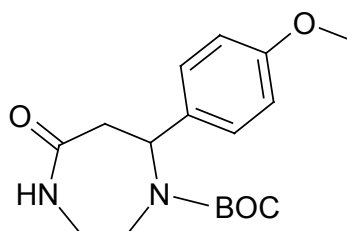
Diazépanone 43	1 éq.	8,85 mmol	2,7 g
Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle	1,1 éq.	9,75 mmol	2,2 g
Diisopropyléthylamine	2,5 éq.	22,1 mmol	3,8 mL

Caractéristiques : Aspect : Solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65 ; F (hexane) : 85°C.

Analyses spectrales

- **IR** : 1681 ν (C=O carbamate), 1672 ν (C=O lactame), 1498 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl_3)** : 1,37 (s, 9 H, **BOC**) ; 2,57–2,61 (d, 1 H, J = 14,2, **CH₂-CO**) ; 2,95–3,00 (m, 2 H, **CH₂-CO**, **CH₂-N**) ; 3,17–3,22 (m, 2 H, **CH₂-NBOC**, **CH₂-NH**) ; 3,47–3,55 (m, 1 H, **CH₂-NH**) ; 3,89–3,93 (d, 1 H, J = 10,1, **CH**) ; 7,25 (m, 1 H, **CONH**) ; 7,48–7,63 (m, 4 H, **Ar**).

1-Tert-butoxycarbonyl-7-(4-méthoxyphényl)-1,4-diazépan-5-one (88)



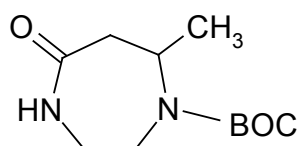
Diazépanone 42	1 éq.	8,85 mmol	2,7 g
Dicarbonat de di- <i>tert</i> -butyle	1,1 éq.	9,75 mmol	2,2 g
Diisopropyléthylamine	2,5 éq.	22,1 mmol	3,8 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65 ; F (hexane) : 121°C.

Analyses spectrales

- IR : 1681 v (C=O carbamate), 1672 v (C=O lactame), 1498 v (C=C aromatique)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,38 (s, 9 H, **BOC**) ; 2,57–2,61 (d, 1 H, J = 14,2, **CH₂-CO**) ; 2,95–3,00 (m, 2 H, **CH₂-CO**, **CH₂-N**) ; 3,17–3,22 (m, 2H, **CH₂-NBOC**, **CH₂-NH**) ; 3,47–3,55 (m, 1H, **CH₂-NH**) ; 3,78 (s, 3 H, **O-CH₃**) ; 3,89–3,93 (d, 1H, J = 10,0, **CH**) ; 7,25 (m, 1 H, **CONH**) ; 7,31–7,37 (m, 4H, **Ar**).

1-*Tert*-butoxycarbonyl-7-méthyl-1,4-diazépan-5-one (89)



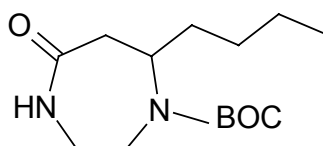
Diazépanone 44	1 éq.	8,85 mmol	2 g
Dicarbonat de di- <i>tert</i> -butyle	1,1 éq.	9,75 mmol	2,2 g
Diisopropyléthylamine	2,5 éq.	22,1 mmol	3,8 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65 ; F (hexane) : 85°C.

Analyses spectrales

- IR : 1681 v (C=O carbamate), 1672 v (C=O lactame).
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,27-1,32 (d, 3 H, J = 5,1, **CH₃**) ; 1,41 (s, 9 H, **BOC**) ; 2,42-2,48 (d, 1 H, **NH-CH₂-CH₂**) ; 2,82-3,09 (m, 2 H, **NH-CH₂-CH₂**, **NH-CH₂-CH₂**) ; 3,17-3,56 (m, 4 H, **NH-CH₂-CH₂**, **CO-CH₂-CH**) ; 5,64 (m, 1 H, **CONH**).

1-*Tert*-butoxycarbonyl-7-butyl-1,4-diazépan-5-one (90)



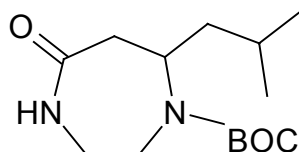
Diazépanone 45	1 éq.	8,85 mmol	2,4 g
Dicarbonat de di- <i>tert</i> -butyle	1,1 éq.	9,75 mmol	2,2 g
Diisopropyléthylamine	2,5 éq.	22,1 mmol	3,8 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65 ; F (hexane) : 135 °C.

Analyses spectrales

- IR : 1681 v (C=O carbamate), 1672 v (C=O lactame)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 0,81-0,91 (m, 3 H, **CH₃**) ; 1,21-1,52 (m, 4 H, **CH₃-CH₂-CH₂**) ; 1,42-1,48 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,57-1,68 (m, 2H, **CH-CH₂-(CH₂)₂**) ; 2,57-2,61 (d, 1 H, **CH₂-CO**, J = 14,0) ; 2,95-3,00 (m, 2H, **CH₂-CO**, **CH₂-N**) ; 3,17-3,22 (m, 2 H, **CH₂-NBOC**, **CH₂-NH**) ; 3,47-3,55 (m, 1 H, **CH₂-NH**) ; 4,09-4,13 (m, 1 H, **CH**) ; 6,05 (m, 1 H, **CONH**).

1-Tert-butoxycarbonyl-7-isobutyl-1,4-diazépan-5-one (91)



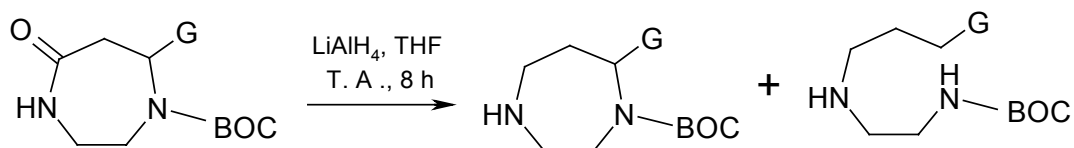
Diazépanone 46	1 éq.	8,85 mmol	2,4 g
Dicarbonat de di- <i>tert</i> -butyle	1,1 éq.	9,75 mmol	2,2 g
Diisopropyléthylamine	2,5 éq.	22,1 mmol	3,8 mL

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65 ; F (hexane) : 137 °C.

Analyses spectrales

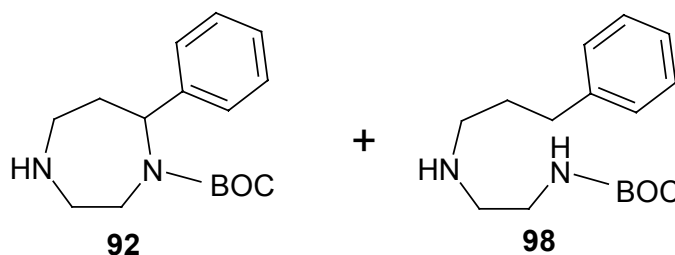
- IR : 1681 v (C=O carbamate), 1672 v (C=O lactame)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 0,83-0,92 (m, 6 H, 2 x **CH₃**) ; 1,42-1,48 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,78-1,88 (m, 2 H, **CH-CH₂**) ; 3,35 (s, 1 H, **CH-(CH₃)₂**) ; 2,57-2,61 (d, 1 H, **CH₂-CO**, J = 14,0) ; 2,95-3,00 (m, 2H, **CH₂-CO**, **CH₂-NBOC**) ; 3,17-3,22 (m, 2 H, **CH₂-NBOC**, **CH₂-NH**) ; 3,47-3,55 (m, 1 H, **CH₂-NH**) ; 4,09-4,13 (m, 1 H, **CH**) ; 6,05 (m, 1 H, **CONH**).

Méthode générale de réduction du groupement lactame 86-91 (composés 92-100)



A une suspension d'hydrure de lithium et d'aluminium dans 60 mL de tétrahydrofurane sec est ajouté le lactame. Après 8 heures d'agitation sous atmosphère d'azote à température ambiante, le mélange réactionnel est porté à 0°C puis 20 mL de tétrahydrofurane, 10 mL d'eau et 25 mL d'une solution de soude 2N sont successivement ajoutés (pour 68 mmol d'AlLiH₄). Le précipité formé est filtré et écarté. Après évaporation du filtrat, le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (dichlorométhane / méthanol 97 : 3 => 95 : 5) où deux produits principaux sont isolés dans certains cas.

1-*Tert*-butoxycarbonyl-7-phényl-1,4-diazépane (92) et 1-*tert*-butoxycarbonyl-2-(3-phénylpropyl)éthane-1,2-diamine (98)



Diazépanone 86	1 éq.	8,5 mmol	2,5 g
Hydrure de lithium et d'aluminium	2 éq.	17 mmol	0,65 g

Composé 92

Caractéristiques : Aspect : Huile incolore ; Rendement : 30 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,60

Analyses spectrales

- IR : 1697 ν (C=O carbamate) ; 1530 ν (C=C aromatique)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 1,48 (s, 9 H, BOC) ; 1,72–1,91 (m, 1 H, CH-CH₂-CH₂-NH) ; 2,05–2,11 (m, 1 H, CH-CH₂-CH₂-NH) ; 2,15 (m, 1 H, NH) ; 2,80–2,93 (m, 1 H, CH-CH₂-CH₂-NH) ; 3,10–3,17 (m, 1 H, CH-CH₂-CH₂-NH) ; 3,33–3,76 (m, 5 H, CH₂-CH₂-N(BOC)-CH) ; 7,22–7,45 (m, 5 H, Ar).
- RMN ¹³C (CDCl₃) : 29,4 (BOC) ; 38,4 (CH-CH₂-CH₂-NH) ; 44,8 (CH₂-NBOC) ; 49,6 (CH₂-NH-CH₂) ; 65,1 (CH) ; 125,8 (Ar).

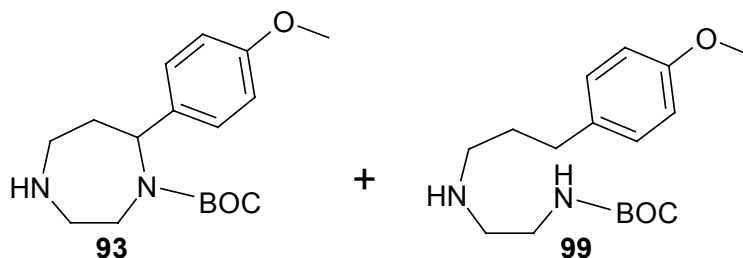
Composé 98

Caractéristiques : Aspect : huile incolore ; Rendement : 35 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,40

Analyses spectrales

- IR : 1701 ν (C=O carbamate) ; 1501 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,45 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,79–1,84 (m, 3 H, **CH₂-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,62–2,72 (m, 6 H, **CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₂**) ; 3,21–3,23 (m, 2 H, **CH₂-NHBOC**) ; 5,07 (m, 1 H, **NHBOC**) ; 7,18–7,27 (m, 5 H, **Ar**).
- RMN ^{13}C NMR (CDCl₃) : 28,4 (CH₃) ; 31,6 (CH₂-CH₂-CH₂) ; 33,6 (CH₂-Ar) ; 40,2 (CH₂-NHBOC) ; 49,0 (CH₂-NH-CH₂) ; 125,8 (Ar) ; 128,4 (Ar).

**1-Tert-butoxycarbonyl-7-(4-méthoxyphényl)-1,4-diazépane (93) et
2-tert-butoxycarbonyl-1-[3-(4-méthoxyphényl)propyl]éthane-1,2-diamine (99)**



Diazépanone 87	1 éq.	17 mmol	1 g
Hydruure de lithium et d'aluminium	2 éq.	34 mmol	1,3 g

Composé 93

Caractéristiques : Aspect : Huile incolore ; Rendement : 30 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,63

Analyses spectrales

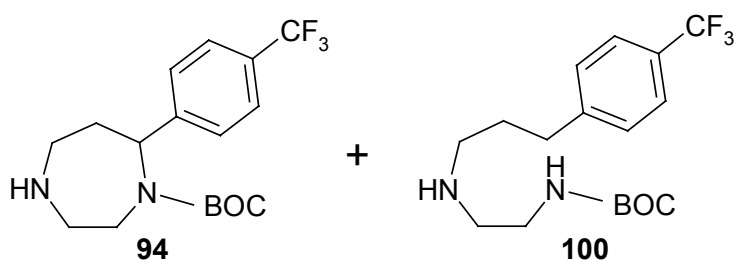
- IR : 1695 ν (C=O carbamate) ; 1535 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,50 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,85–1,89 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,13 (m, 1 H, **NH**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 3,80 (s, 3 H, **CH₃-O**) ; 7,21–7,34 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,42–7,59 (m, 2 H, **Ar**).

Composé 99

Caractéristiques : Aspect : huile incolore ; Rendement : 35 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,42

Analyses spectrales

- IR : 1697 ν (C=O carbamate) ; 1501 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl₃) : 1,45 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,79–1,84 (m, 3 H, **CH₂-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,62–2,72 (m, 6 H, **CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₂**) ; 3,21–3,23 (m, 2 H, **CH₂-NHBOC**) ; 3,81 (s, 3 H, **CH₃-O**) ; 5,07 (m, 1 H, **NHBOC**) ; 7,11–7,24 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,33–7,41 (m, 2 H, **Ar**).

**1-Tert-butoxycarbonyl-7-(4-trifluorométhylphényl)-1,4-diazépane (94) et
1-tert-butoxycarbonyl-2-[3-(4-trifluorométhylphényl)propyl]éthane-1,2-diamine
(100)**


Diazépanone 88	1 éq.	5 g	17 mmol
Hydruide de lithium aluminium	2 éq.	1,3 g	34 mmol

Composé 94

Caractéristiques : Aspect : Huile incolore ; Rendement : 30 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,60

Analyses spectrales

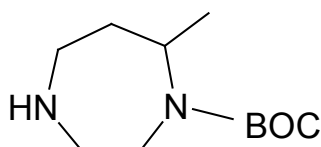
- **IR** : 1697 ν (C=O carbamate) ; 1501 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl_3)** : 1,50 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,81–1,86 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,06–2,14 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,65 (m, 1 H, **NH**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 7,16–7,28 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,36–7,44 (m, 2 H, **Ar**).

Composé 100

Caractéristiques : Aspect : huile incolore, Rendement : 35 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,34

Analyses spectrales

- **IR** : 1697 ν (C=O carbamate) ; 1501 ν (C=C aromatique)
- **RMN ^1H (CDCl_3)** : 1,45 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,79–1,84 (m, 3 H, **CH₂-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,62–2,72 (m, 6 H, **CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₂**) ; 3,21–3,23 (m, 2 H, **CH₂-NHBOC**) ; 5,07 (m, 1 H, **NHBOC**) ; 7,26–7,28 (m, 2 H, **Ar**) ; 7,45–7,57 (m, 2 H, **Ar**).

1-Tert-butoxycarbonyl-7-méthyl-1,4-diazépane (95)


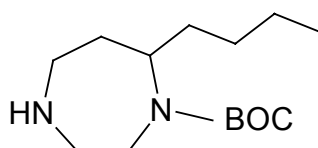
Diazépanone 89	1 éq.	5 g	17 mmol
Hydruide de lithium et d'aluminium	2 éq.	1,3 g	34 mmol

Caractéristiques : Aspect : Huile incolore ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane

/ méthanol 9 : 1) : 0,28.

Analyses spectrales

- IR : 1697 ν (C=O carbamate) ; 1501 ν (C=C aromatique)
- RMN ^1H (CDCl_3) : 1,27-1,32 (d, 3 H, $J = 5,1$, CH_3) ; 1,41 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,85–1,89 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,01–2,17 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,10–3,22 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,33–3,75 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(BOC)-CH}$) ; 4,56 (m, 1 H, **NH**).

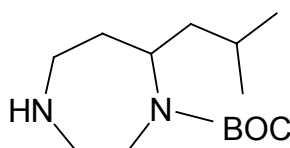
1-Tert-butoxycarbonyl-7-butyl-1,4-diazépane (96)

Diazépanone 51	1 éq.	5 g	17 mmol
Hydrure de lithium et d'aluminium	2 éq.	1,3 g	34 mmol

Caractéristiques : Aspect : Huile incolore ; Rendement : 51 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,33.

Analyses spectrales

- IR : 1697 ν (C=O carbamate)
- RMN ^1H (CDCl_3) : 0,77-0,90 (m, 3 H, CH_3) ; 1,21-1,52 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) ; 1,42 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,67-1,77 (m, 2 H, $\text{CH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2$) ; 1,79–1,85 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,45 (m, 1 H, **NH**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,09–3,12 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,22–3,68 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(BOC)-CH}$)

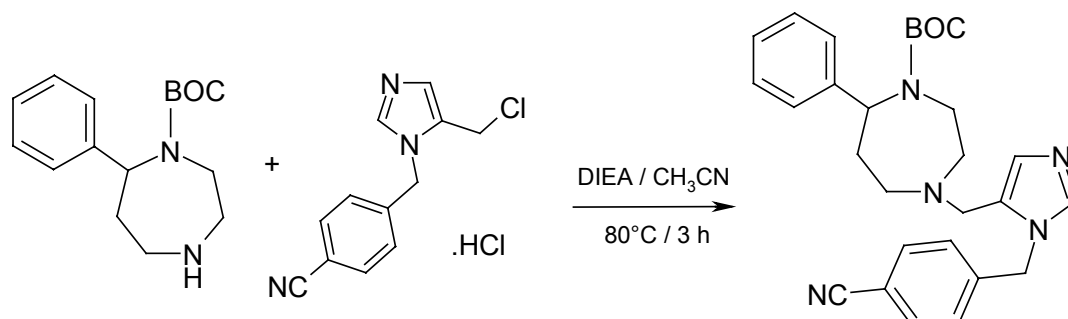
1-Tert-butoxycarbonyl-7-isobutyl-1,4-diazépane (97)

Diazépanone 52	1 éq.	350 mg	1,3 mmol
Hydrure de lithium et d'aluminium	2 éq.	100 mg	2,6 mmol

Caractéristiques : Aspect : Huile incolore ; Rendement : 57 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,35.

Analyses spectrales

- IR : 1697 ν (C=O carbamate)
- RMN ^1H (CDCl_3) : 0,78-0,93 (m, 6 H, 2 x CH_3) ; 1,48 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,78-1,88 (m, 2 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 1,85–1,89 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 1,97–2,08 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,21 (m, 1 H, **NH**) ; 2,41 (s, 1 H, $\text{CH-(CH}_3\text{)}_2$) ; 2,77–2,89 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,10–3,21 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,29–3,69 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(BOC)-CH}$)

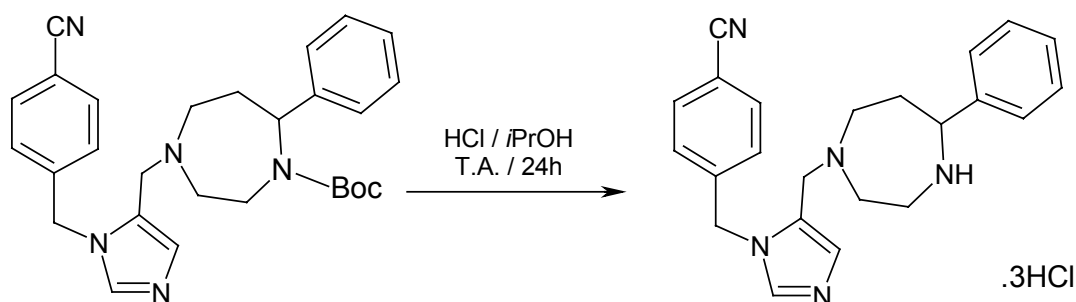
CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**1-Tert-butoxycarbonyl-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-7-phényl-1,4-diazépane (101)**

L'amine **92** (1 éq., 1 g, 3,6 mmol), le dérivé chloré **4** (1 éq., 1,1 g, 3,6 mmol) et la diisopropyléthylamine (3 éq., 2,4 mL, 2,4 mmol) sont introduits dans 50 mL d'acétonitrile. Après 3 heures de chauffage à 80°C, le solvant est concentré. Le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle pour être lavé par de l'eau et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant dichlorométhane / éthanol (97:3).

Caractéristiques : Aspect : Huile jaunâtre ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,65.

Analyses spectrales

- **IR** : 2229 v (C≡N nitrile), 1689 v (C=O carbamate)
- **RMN ¹H (CDCl₃)** : 1,50 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,85-1,89 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂-CH-Ar**) ; 2,03-2,12 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂-CH-Ar**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂-CH-Ar**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **N-CH₂-CH₂-CH-Ar**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Im-CH₂-N-CH₂-CH₂-N-CH-Ar**) ; 5,47 (s, 2 H, **Ar-CH₂-Im**) ; 6,78-6,80 (m, 1H, **Im**) ; 7,21-7,58 (m, 10 H, **Ar**).

Chlorhydrate de 4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-7-phényl-1,4-diazépane (102)

2 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (5N) dans l'isopropanol (5 éq., 2 mL, 10,6 mmol) sont ajoutés à l'amine **101** (1éq., 1 g, 2,10 mmol) dissoute dans 3 mL de méthanol. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré. 100 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés au résidu dissous dans un

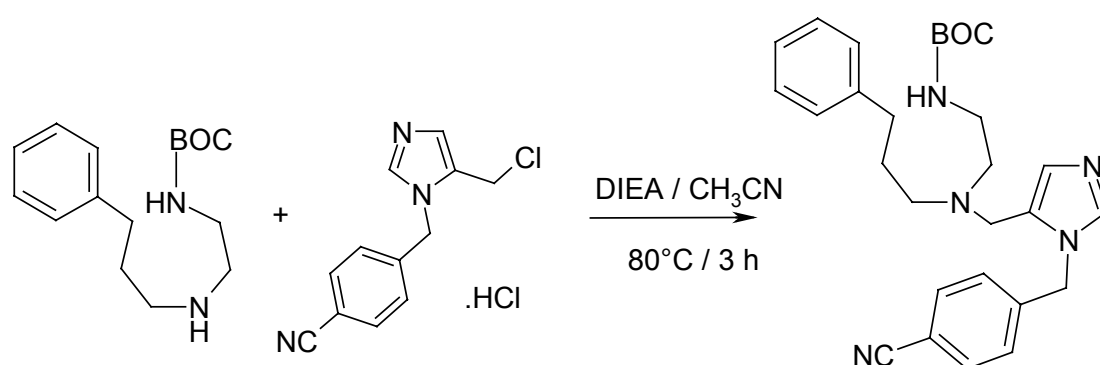
minimum d'éthanol. Après quelques heures d'agitation, le précipité formé est filtré.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,05 ; F > 250°C.

Analyses spectrales

- IR : 2229 ν (C≡N nitrile)
- RMN ^1H (D_2O) : 1,85-1,89 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 2,03-2,12 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-NH-CH₂-CH₂-N-CH₂-Im**) ; 5,45 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,19-7,59 (m, 10 H, **Ar**).

2-tert-butoxycarbonyl-1-{[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl}-1-(3-phénylpropyl)éthane-1,2-diamine (109)



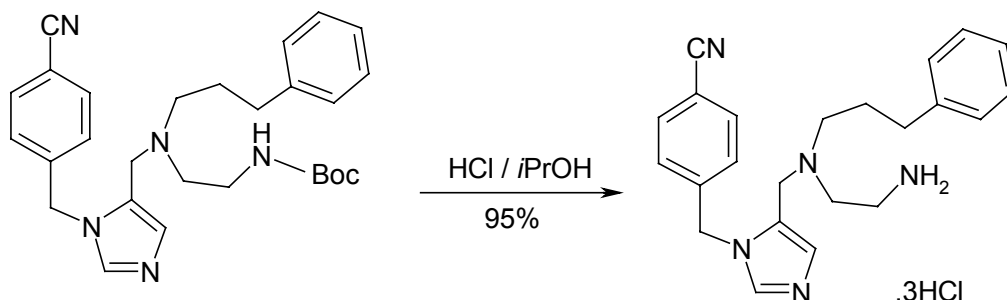
L'amine **98** (1 éq., 1 g, 3,6 mmol), le dérivé chloré **4** (1 éq., 1,1 g, 3,6 mmol) et la diisopropyléthylamine (3 éq., 2,4 mL, 2,4 mmol) sont introduit dans 50 mL d'acétonitrile. Après 3 heures de chauffage à 80°C, le solvant est concentré. Le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle pour être lavé par de l'eau et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 avant d'être concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant dichlorométhane / méthanol (95:5).

Caractéristiques : Aspect : huile jaunâtre ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,62.

Analyses spectrales

- IR : 2229 ν (C≡N nitrile) ; 1689 ν (C=O carbamate)
- RMN ^1H (CDCl_3) : 1,45 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,63–1,72 (m, 2 H, **CH₂-CH₂-CH₂**) ; 2,42–2,62 (m, 6 H, **CH₂-CH₂-CH₂-N-CH₂**) ; 3,05–3,19 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 3,39 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 4,54 (m, 1 H, **NH**) ; 5,36 (s, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 7,05–7,65 (m, 11 H, **Ar** et **Im**).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-1-(3-phénylpropyl)éthane-1,2-diamine (110)



2 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 5N dans l'isopropanol sont ajoutés à l'amine **70** dissoute dans 3 mL de méthanol. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré. 100 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés au résidu dissous dans un minimum d'éthanol. Après quelques heures d'agitation, le précipité formé est filtré puis lavé par de l'acétate d'éthyle.

Caractéristiques : Aspect : solide blanc hygroscopique ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,05 ; F > 250°C.

Analyses spectrales

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D_2O) : 1,69–1,80 (m, 2 H, **CH₂-CH₂-CH₂**) ; 2,62–2,72 (m, 2 H, **CH₂-CH₂-Ar**) , 3,11–3,30 (m, 4 H, 2 x **CH₂-N**) ; 4,03–4,17 (m, 2 H, **CH₂-NH₂**) ; 4,54 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,55 (s, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 7,00–7,10 (d, 2 H, J = 4,2, **Ar**) ; 7,12–7,22 (m, 5 H, **Ar**) ; 7,55 (s, 1 H, **Im**) ; 7,59–7,70 (d, 2 H, J = 4,2, **Ar**) ; 8,74 (s, 1 H, **Im**).

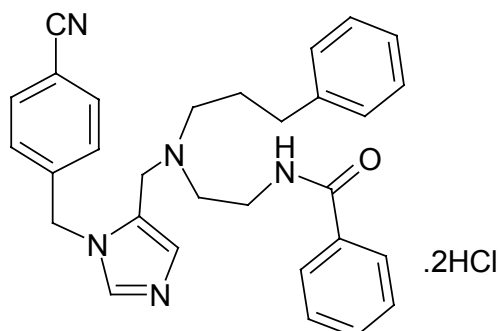
Méthode générale d'acylation de l'amine 102 et 110 (composés 103-108, 111' et 112')

La résine PS-HOBt (1g) est introduite dans chaque réacteur. Après 18 heures dans le dichlorométhane, la résine est filtrée.

L'acide carboxylique, la DIEA et le PyBroP dissous dans 20 mL de DMF anhydre sont introduits dans le réacteur. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 heures. Cette opération est renouvelée et la résine est filtrée et lavée 3 fois par du DMF, 3 fois par du dichlorométhane et 3 fois par du DMF.

L'amine **71** et la DIEA dissous dans 20 mL de DMF anhydre sont introduites dans le réacteur. Après 18 heures d'agitation, la résine est filtrée et lavée 3 fois par du DMF. Le filtrat est concentré et le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse (dichlorométhane / méthanol : 95 / 5). Le produit isolé est conservé sous forme de chlorhydrate.

Chlorhydrate de 2-benzoyl-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-1-(3-phénylpropyl)éthane-1,2-diamine (111)



Acide benzoïque	2 éq.	1,50 mmol	185 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 μ L
Amine 110	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 μ L

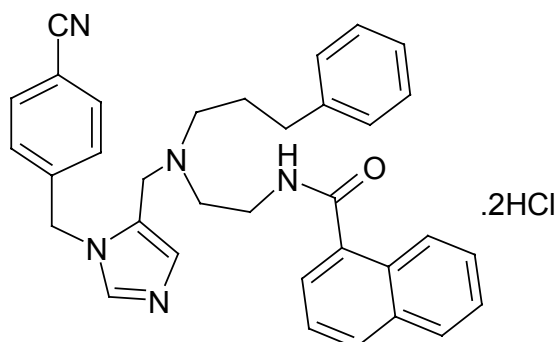
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 75 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F > 200°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ¹H (D₂O) : 1,69–1,80 (m, 2 H, **CH₂-CH₂-CH₂**) ; 2,62–2,72 (m, 2 H, **CH₂-CH₂-Ar**) ; 3,07–3,29 (m, 4 H, 2 x **CH₂-N**) ; 4,03–4,17 (m, 2 H, **CH₂-NH**) ; 4,25 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,33 (s, 2 H, **CH₂-Ar**) ; 7,02–7,32 (m, 7 H, **Ar**) ; 7,55 (s, 1 H, **Im**) ; 7,59–7,70 (d, 2 H, **Ar**) ; 8,74 (s, 1 H, **Im**)
- LC-MS : Tr = 3,50 min. ; MH⁺ = 478 ; Pureté = 98,5 %

Analyse élémentaire : C₃₀H₃₁N₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O => 577,3 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 62,42 ; %H = 6,02 ; %N = 12,28 ; %Cl = 12,13 ; Expérimental : %C = 62,12 ; %H = 6,26 ; %N = 12,23 ; %Cl = 12,01).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-2-(1-naphtoyl)-1-(3-phénylpropyl)éthane-1,2-diamine (112)



Acide 1-naphtoïque	2 éq.	1,50 mmol	260 mg
PyBroP	2 éq.	1,50 mmol	700 mg
DIEA	3 éq.	2,25 mmol	370 µL
Amine 110	0,8 éq.	0,61 mmol	290 mg
DIEA	5 éq.	3,75 mmol	630 µL

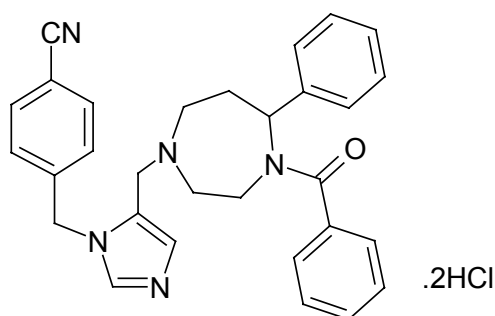
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche hygroscopique ; Rendement : 77 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F : 215°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D $_2\text{O}$) : 1,97–2,11 (m, 2 H, **CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,62–2,72 (m, 2 H, **CH $_2$ -CH $_2$ -Ar**) ; 3,11–3,23 (m, 2 H, **CH $_2$ -N**) ; 3,45–3,52 (m, 2 H, **CH $_2$ -N**) ; 3,75–3,82 (m, 2 H, **CH $_2$ -NHCO**) ; 4,54 (s, 2 H, **N-CH $_2$ -Im**) ; 5,55 (s, 2 H, **CH $_2$ -Ar**) ; 7,15–8,15 (m, 17 H, **Ar** et **Im**) ; 8,84 (s, 1 H, **napht**).
- LC-MS : Tr = 3,70 min. ; MH $^+$ = 528 ; Pureté = 98,7 %

Analyse élémentaire : C $_{34}$ H $_{32}$ N $_5$ O, 2 HCl, 1,5 H $_2$ O => 618,6 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 66,01 ; %H = 5,78 ; %N = 11,32 ; %Cl = 11,46 ; Expérimental : %C = 66,12 ; %H = 5,51 ; %N = 11,18 ; %Cl = 11,65).

Chlorhydrate de 4-benzoyl-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (103)



Acide benzoïque	2 éq.	1,24 mmol	150 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 102	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

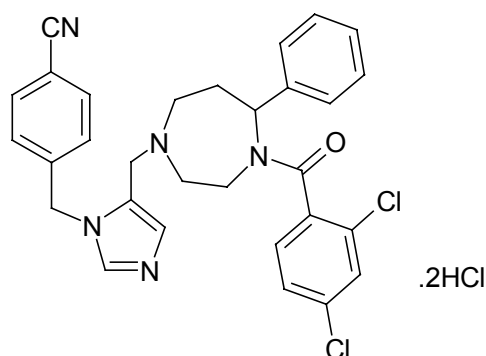
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche hygroscopique ; Rendement : 85 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F : 185 °C.

Analyses spectrales :

- IR : 2231 ν (C \equiv N nitrile), 1652 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D $_2\text{O}$) : 1,78–2,15 (2 x m, 2 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,78–2,89 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 3,07–3,16 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 3,36–3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N**) ; 3,95 (s, 2 H, **N-CH $_2$ -Im**) ; 5,25 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 7,01–7,75 (m, 16 H, **Ar** et **Im**).
- LC-MS : Tr = 3,81 min., MH $^+$ = 476, Pureté = 99,7 %

Analyse élémentaire : $C_{30}H_{29}N_5O$, 2 HCl, 1,5 H_2O => 557,5 $g \cdot mol^{-1}$ (Calculé : %C = 64,63 ; %H = 5,88 ; %N = 12,56 ; %Cl = 12,71 ; Expérimental : %C = 64,72 ; %H = 6,01 ; %N = 12,34 ; %Cl = 12,87).

Chlorhydrate de 4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (104)



Acide 2,4-dichlorobenzoiïque	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 63	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

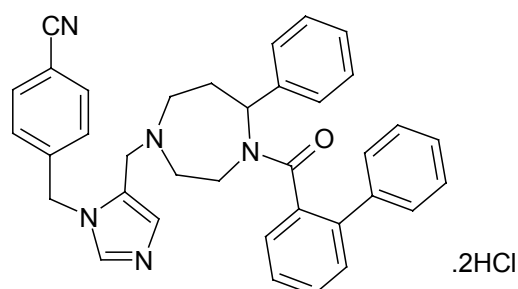
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 82 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F : 188°C.

Analyses spectrales :

- **IR** : 2229 ν ($C \equiv N$ nitrile), 1649 ν ($C=O$ amide)
- **RMN 1H (DMSO- d_6)** : 1,88-2,21 (m, 2 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 3,08-3,15 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 3,33-3,81 (m, 5 H, **Ar-CH-N-CH₂-CH₂**) ; 4,01 (s, 2 H, **N-CH₂-Im**) ; 5,18 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 7,01-7,72 (m, 14 H, **Ar et Im**).
- **LC-MS** : Tr = 3,70 min., MH^+ = 510, Pureté = 98,7 %

Analyse élémentaire : $C_{30}H_{27}Cl_2N_5O$, 2 HCl, 1 H_2O => 634,84 $g \cdot mol^{-1}$ (Calculé : %C = 56,84 ; %H = 4,88 ; %N = 11,03 ; %Cl = 22,37 ; Expérimental : %C = 56,75 ; %H = 4,96 ; %N = 11,01 ; %Cl = 22,41).

Chlorhydrate de 4-(2-biphényl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (105)



Acide 2-biphénoïque	2 éq.	1,24 mmol	245 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 102	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

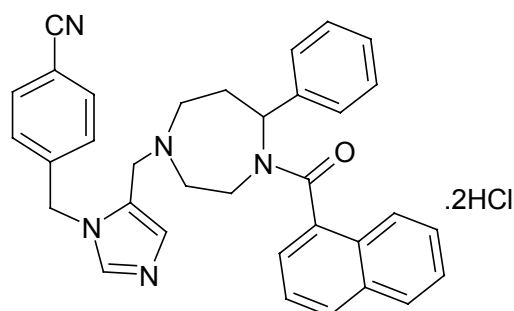
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 78 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,78 ; F > 250°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (D $_2$ O) : 1,81-1,87 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,07-2,16 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,76-2,93 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) 3,11-3,69 (m, 6 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$**) ; 3,95 (s, 2 H, **N-CH $_2$ -Im**) ; 5,45 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,06-7,70 (m, 19 H, **Ar et Im**).
- LC-MS : Tr = 3,73 min. ; MH $^+$ = 552 ; Pureté = 98,7 %

Analyse élémentaire : C $_{36}$ H $_{35}$ N $_5$ O, 2 HCl, 1,5 H $_2$ O => 642,6 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 67,29 ; %H = 5,73 ; %N = 10,09 ; %Cl = 11,03 ; Expérimental : %C = 67,22 ; %H = 6,06 ; %N = 10,43 ; %Cl = 11,11).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-(1-naphtoyl)-5-phényl-1,4-diazépane (106)



Acide α -naphtoïque	2 éq.	1,24 mmol	220 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 102	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche hygroscopique ; Rendement : 75 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,75 ; F : 205°C.

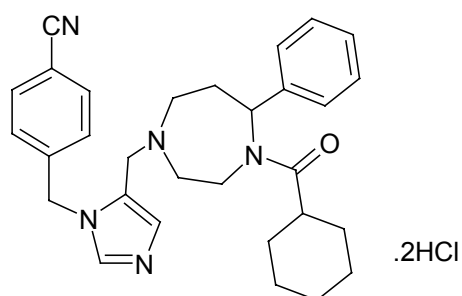
Analyses spectrales :

- IR : 2227 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (DMSO- d_6) : 1,85-1,89 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 2,03-2,12 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$ -Im**) ; 5,45 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,15-8,15 (m, 17 H, **Ar et Im**) ; 8,84 (s, 1 H, **napht**).

➤ LC-MS : Tr = 3,70 min., MH^+ = 526, Pureté = 98,7 %

Analyse élémentaire : $C_{34}H_{31}N_5O$, 2 HCl, 1,5 H_2O => 616,6 $g \cdot mol^{-1}$ (Calculé : %C = 66,23 ; %H = 5,48 ; %N = 11,36 ; %Cl = 11,49 ; Expérimental : %C = 66,12 ; %H = 5,51 ; %N = 11,18 ; %Cl = 11,65).

Chlorhydrate de 1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-4-cyclohexanoyl-5-phényl-1,4-diazépane (107)



Acide cyclohexanoïque	2 éq.	1,24 mmol	160 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 102	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

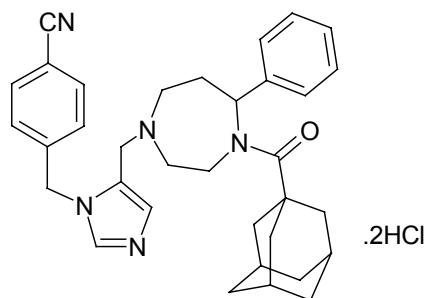
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche hygroscopique ; Rendement : 68 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,62 ; F : 125°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C≡N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN 1H (D_2O) : 1,15-1,40 (m, 6 H, **H cyclohexane**) ; 1,55-1,80 (m, 5 H, **H cyclohexane**) ; 1,85-1,89 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 2,03-2,12 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂-**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH₂-CH₂-N-CH₂-Im**) ; 5,45 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,17-7,63 (m, 10 H, **Ar et Im**).
- LC-MS : Tr = 3,70 min. ; MH^+ = 482 ; Pureté = 98,7 %

Analyse élémentaire : $C_{30}H_{35}N_5O$, 2 HCl, 1,5 H_2O => 581,6 $g \cdot mol^{-1}$ (Calculé : %C = 61,95 ; %H = 6,74 ; %N = 12,04 ; %Cl = 12,18 ; Expérimental: %C = 61,99 ; %H = 6,55 ; %N = 12,05 ; %Cl = 12,22).

Chlorhydrate de 4-(1-adamantanoyl)-1-[[1-(4-cyanobenzyl)-1*H*-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (108)



Acide 1-adamantanoïque	2 éq.	1,24 mmol	230 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 μ L
DMAP	catalytique		
Amine 102	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 67 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,64 ; F > 250°C

Analyses spectrales :

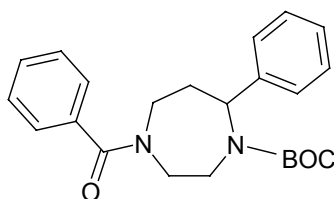
- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN 1 H (D $_2$ O) : 1,68 (s, 6 H, **CH $_2$ adamantane**) ; 1,80-2,00 (m, 9 H, **CH $_2$ et CH adamantane**) ; 1,85-1,89 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 2,03-2,12 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$ -**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$ -Im**) ; 5,45 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,21-7,65 (m, 9 H, **Ar et Im**).
- LC-MS : Tr = 3,70 min. ; MH $^+$ = 534 ; Pureté = 98,7 %

Analyse élémentaire : C $_{34}$ H $_{39}$ N $_5$ O, 2 HCl, 1,5 H $_2$ O => 624,6 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 65,38 ; %H = 6,86 ; %N = 11,21 ; %Cl = 11,35 ; Expérimental : %C = 65,22 ; %H = 6,26 ; %N = 11,03 ; %Cl = 11,08).

Méthode générale d'acylation du 5-phényl-1,4-diazépane 92 (composés 111-116)

L'amine **53** est dissoute dans 30 mL de diméthylformamide, puis l'acide carboxylique, l'EDCI.HCl, la pyridine et la DMAP sont ajoutés. Après 18 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré. Le résidu est repris de l'acétate d'éthyle pour être lavé par deux fois une solution de soude 1M, une fois par de l'eau et une fois par une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. Après séchage sur sulfate de magnésium, la phase aqueuse est évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 95 : 5).

4-tert-Butoxycarbonyl-1-benzoyl-5-phényl-1,4-diazépane (113)



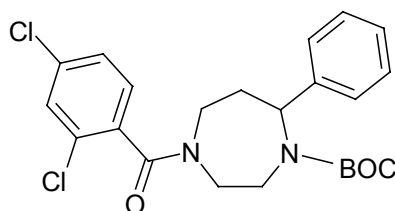
Acide benzoïque	2 éq.	1,24 mmol	155 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 92	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : huile transparente ; Rendement : 77 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,87.

Analyses spectrales :

- IR : 1682 ν (C=O carbamate) ; 1649 ν (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,33 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,55–1,61 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,13–2,21 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,71–3,77 (m, 6 H, **CH-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 3,82–3,99 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 7,11–7,55 (m, 8 H, **Ar**) ; 7,72–7,91 (m, 2 H, **Ar**).

1-(2,4-dichlorobenzoyl)-4-tert-butoxycarbonyl-5-phényl-1,4-diazépane (114)



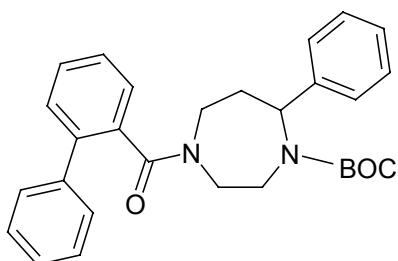
Acide 2,4-dichlorobenzoïque	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 92	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : huile translucide ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,95

Analyses spectrales :

- IR : 1691 ν (C=O carbamate) ; 1649 ν (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,38 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,85–1,89 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 7,11–7,55 (m, 8 H, **Ar**).

1-(2-biphénoyl)-4-tert-butoxycarbonyl-5-phényl-1,4-diazépane (115)



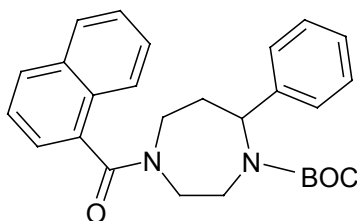
Acide ortho-biphénoïque	2 éq.	1,24 mmol	250 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 92	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : huile translucide ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,95.

Analyses spectrales :

- IR : 1680 v (C=O carbamate), 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,50 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,85–1,89 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 7,11–7,80 (m, 14 H, **Ar**).

1-(1-naphtoyl)-4-tert-butoxycarbonyl-5-phényl-1,4-diazépane (116)



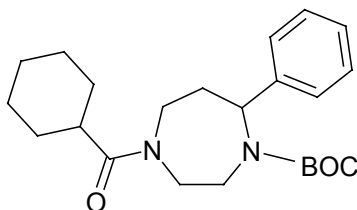
Acide 2,4-dichlorobenzoïque	2 éq.	1,24 mmol	220 mg
EDCI.HCl	2 éq.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 éq.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 63	1 éq.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : huile translucide ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,95.

Analyses spectrales :

- IR : 1685 v (C=O carbamate), 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,50 (s, 9 H, **CH₃**) ; 1,85–1,89 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 7,11–

7,65 (m, 12 H, Ar).

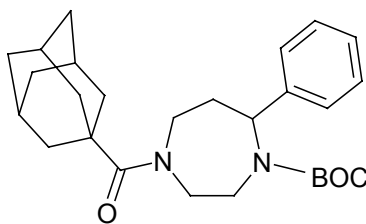
1-cyclohexanoyl-4-tert-butoxycarbonyl-5-phényl-1,4-diazépane (117)


Acide cyclohexanecarboxylique	2 équ.	1,24 mmol	160 mg
EDCI.HCl	2 équ.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 équ.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 63	1 équ.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : huile translucide ; Rendement : 91 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,85.

Analyses spectrales :

- IR : 1686 v (C=O carbamate) ; 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : 1,10-1,38 (m, 6 H, **H cyclohexane**) ; 1,39 (s, 9 H, **BOC**) ; 1,45-1,78 (m, 5 H, **H cyclohexane**) ; 1,81-1,92 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,08-2,21 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,38-3,73 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 7,09-7,38 (m, 5 H, **Ar**).

1-(1-adamantanoyl)-4-tert-butoxycarbonyl-5-phényl-1,4-diazépane (118)


Acide 1-adamantanoïque	2 équ.	1,24 mmol	230 mg
EDCI.HCl	2 équ.	1,24 mmol	240 mg
Pyridine	3 équ.	1,86 mmol	150 µL
DMAP	catalytique		
Amine 92	1 équ.	0,62 mmol	300 mg

Caractéristiques : Aspect : huile blanche ; Rendement : 88 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,85.

Analyses spectrales :

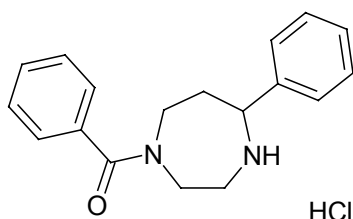
- IR : 1690 v (C=O carbamate) ; 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : 1,55-1,72 (m, 15 H, **BOC et CH₂ adamantane**) ; 1,75-1,95

(m, 9 H, **CH₂** et **CH adamantane**) ; 1,98–2,05 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-N(BOC)-CH**) ; 7,11–7,45 (m, 5 H, **Ar**).

Méthode générale de déprotection des amines 113 à 118 (composés 119-124)

1 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 5N dans l'isopropanol sont ajoutés à l'amine dissoute dans 3 mL de méthanol. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est concentré. 100 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés au résidu dissous dans un minimum d'éthanol. Après quelques heures d'agitation, le précipité formé est filtré et mis immédiatement au dessiccateur.

Chlorhydrate de 1-benzoyl-5-phényl-1,4-diazépane (119)

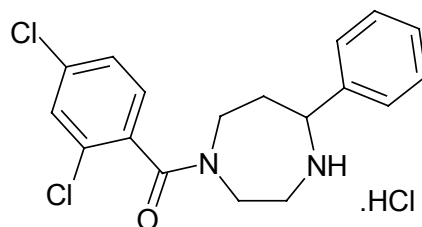


Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,15 ; F : 175°C.

Analyses spectrales :

- **IR :** 1653 ν (C=O amide)
- **RMN ¹H (DMSO-*d*₆) :** 1,88–1,98 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,09–2,21 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,76–2,97 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-NH-CH**) ; 7,11–7,55 (m, 10 H, **Ar**).

Chlorhydrate de 1-(2,4-dichlorobenzoyl)-5-phényl-1,4-diazépane (120)



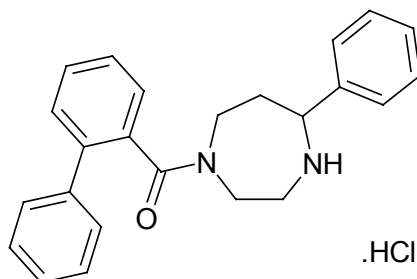
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,20 ; F : 205°C.

Analyses spectrales :

- **IR :** 1649 ν (C=O amide)
- **RMN ¹H (DMSO-*d*₆) :** 1,85–1,89 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-N**) ; 7,11–7,55 (m, 10 H, **Ar**).

$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}$) ; 7,11–7,55 (m, 8 H, Ar).

Chlorhydrate de 1-(2-phénylbenzoyl)-5-phényl-1,4-diazépane (121)

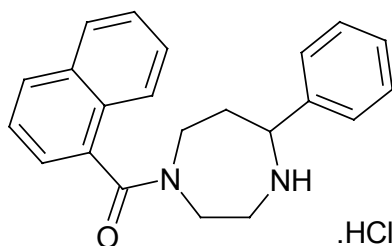


Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,20 ; F : 188°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1649 v (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,85–1,89 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,36–3,75 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}$) ; 7,11–7,65 (m, 14 H, Ar).

Chlorhydrate de 1-(1-naphtoyl)-5-phényl-1,4-diazépane (122)

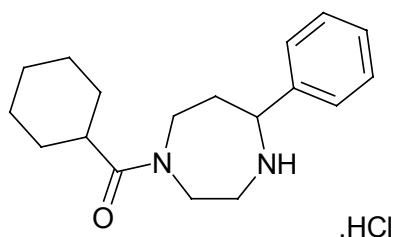


Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,20 ; F : 188°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1649 v (C=O amide)
- RMN ^1H (DMSO- d_6) : 1,85–1,89 (m, 1 H, $\text{Ar-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) ; 2,03–2,12 (m, 1 H, $\text{Ar-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) ; 2,82–2,95 (m, 1 H, $\text{Ar-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) ; 3,13–3,19 (m, 1 H, $\text{Ar-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) ; 3,36–3,75 (m, 7 H, $\text{Ar-CH-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-}$) ; 5,45 (s, 2 H, $\text{Im-CH}_2\text{-Ar}$) ; 7,21–7,55 (m, 11 H, Ar) ; 8,79 (s, 1 H, Napht).

Chlorhydrate de 1-cyclohexanoyl-5-phényl-1,4-diazépane (123)

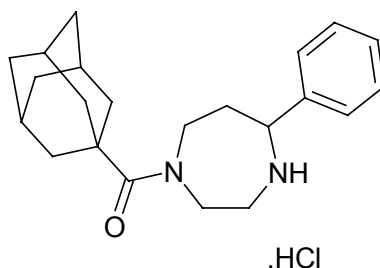


Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,10 ; F : 195°C.

Analyses spectrales :

- IR : 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,15-1,40 (m, 6 H, **H cyclohexane**) ; 1,55-1,80 (m, 5 H, **H cyclohexane**) ; 1,85-1,89 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,03-2,12 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,82-2,95 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,36-3,75 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-NH-CH**) ; 7,11-7,45 (m, 5 H, **Ar**).

Chlorhydrate de 1-(1-adamantanoyl)-5-phényl-1,4-diazépane (124)



Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,10 ; F : 188°C.

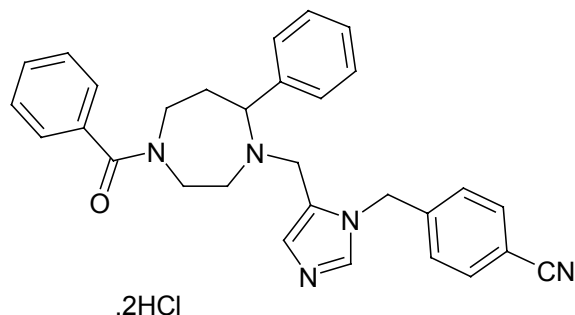
Analyses spectrales :

- IR : 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,68 (s, 6 H, **CH₂ adamantane**) ; 1,82-2,05 (m, 9 H, **CH₂ et CH adamantane**) ; 1,98-2,05 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,08-2,17 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 2,91-3,03 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,17-3,29 (m, 1 H, **CH-CH₂-CH₂-NH**) ; 3,14-3,66 (m, 5 H, **CH₂-CH₂-NH-CH**) ; 7,17-7,49 (m, 5 H, **Ar**).

**Méthode générale d'alkylation
des 5-phényl-1,4-diazépanes 119 à 124 (composés 125 à 130)**

Les amines **119** à **124**, le dérivé chloré **4** et la diisopropyléthylamine sont introduit dans 50 mL d'acétonitrile. Après 3 heures de chauffage à 80°C, le solvant est concentré. Le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle pour être lavé par de l'eau et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ avant d'être concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un éluant dichlorométhane / méthanol (95:5).

Chlorhydrate de 1-benzoyl-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (125)



Amine 117	1 éq.	0,5 mmol	150 mg
Dérivé chloré 4	1,5 éq.	0,7 mmol	190 mg
Diisopropyléthylamine	3 éq.	1,5 mmol	150 µL

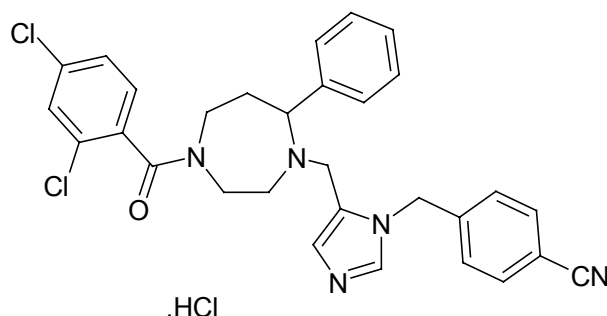
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche hygroscopique ; Rendement : 55 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,69 ; F : 185 °C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 v (C≡N nitrile), 1649 v (C=O amide)
- RMN ¹H (D₂O) : 1,45-1,57 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 1,73-1,85 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 2,55-2,68 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 3,01-3,12 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 3,22-3,61 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH₂-CH₂-N-CH₂-Im**) ; 5,11 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,13-7,62 (m, 14 H, **Ar et Im**).
- LC-MS : Tr = 3,81 min., MH⁺ = 476, Pureté = 99,7 %

Analyse élémentaire : C₃₀H₂₉N₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O => 557,5 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 64,63 ; %H = 5,88 ; %N = 12,56 ; %Cl = 12,71 ; Expérimental : %C = 64,72 ; %H = 6,01 ; %N = 12,34 ; %Cl = 12,87).

Chlorhydrate de 1-(2,4-dichlorobenzoyl)-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (126)



Amine 118	1 éq.	0,5 mmol	150 mg
Dérivé chloré 4	1,5 éq.	0,7 mmol	190 mg
Diisopropyléthylamine	3 éq.	1,5 mmol	150 µL

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 95 % ; Rf

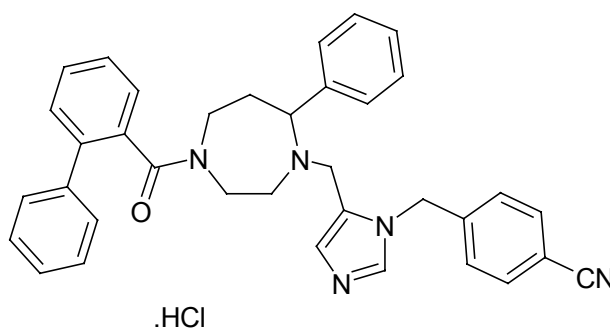
(dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F : 188°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D $_2\text{O}$) : 1,91-1,99 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,01-2,09 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,76-2,91 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 3,13-3,19 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$ -Im**) ; 5,30 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 7,05-7,63 (m, 14 H, **Ar et Im**).
- LC-MS : Tr = 3,70 min., MH $^+$ = 510, Pureté = 100 %

Analyse élémentaire : C $_{30}$ H $_{27}$ N $_5$ OCl $_2$, 2 HCl, 1 H $_2$ O => 634,84 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 56,84 ; %H = 4,88 ; %N = 11,03 ; %Cl = 22,37 ; Expérimental : %C = 56,75 ; %H = 4,96 ; %N = 11,01 ; %Cl = 22,41).

Chlorhydrate de 1-(2-biphénoyl)-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (127)



Amine 119	1 éq.	0,5 mmol	150 mg
Dérivé chloré 4	1,5 éq.	0,7 mmol	190 mg
Diisopropyléthylamine	3 éq.	1,5 mmol	150 μL

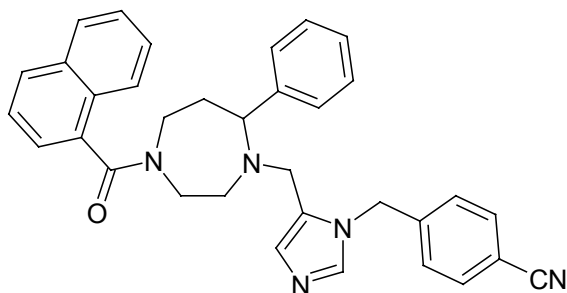
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 62 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F > 250°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D $_2\text{O}$) : 1,70-2,03 (m, 2 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,55-3,55 (m, 5 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$ -Im**) ; 4,17-4,26 (m, 1 H, **CH**) ; 4,48 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -N**) ; 5,45 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 7,05-7,70 (m, 19 H, **Ar et Im**).
- LC-MS : Tr = 3,60 min. ; MH $^+$ = 552 ; Pureté = 100 %

Analyse élémentaire : C $_{36}$ H $_{35}$ N $_5$ O, 2 HCl, 1,5 H $_2$ O => 642,6 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 67,29 ; %H = 5,73 ; %N = 10,09 ; %Cl = 11,03 ; Expérimental : %C = 67,22 ; %H = 6,06 ; %N = 10,43 ; %Cl = 11,11).

Chlorhydrate de 1-(1-naphtoyl)-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (128)



Amine 120	1 éq.	0,5 mmol	150 mg
Dérivé chloré 4	1,5 éq.	0,7 mmol	190 mg
Diisopropyléthylamine	3 éq.	1,5 mmol	150 µL

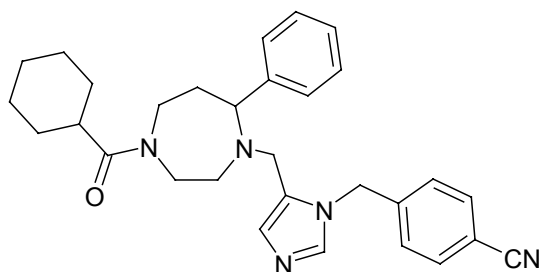
Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 51 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,81 ; F : 208°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2227 v (C≡N nitrile), 1654 v (C=O amide)
- RMN ¹H (DMSO-*d*₆) : 1,78-1,86 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 1,91-2,06 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 2,75-2,82 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 3,01-3,11 (m, 1 H, **Ar-CH-CH₂-CH₂**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂**) ; 4,01-4,09 (m, 1 H, **CH**) ; 4,12 (s, 2 H, **Im-CH₂-N**) ; 5,05 (s, 2 H, **Im-CH₂-Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,05–8,17 (m, 17 H, **Ar et Im⁺**) ; 8,84 (s, 1 H, **napht**).
- LC-MS : Tr = 3,72 min., MH⁺ = 526, Pureté = 99,7 %

Analyse élémentaire : C₃₄H₃₁N₅O, 2 HCl, 1,5 H₂O => 616,6 g.mol⁻¹ (Calculé : %C = 66,23 ; %H = 5,48 ; %N = 11,36 ; %Cl = 11,49 ; Expérimental : %C = 66,12 ; %H = 5,51 ; %N = 11,18 ; %Cl = 11,65).

Chlorhydrate de 1-cyclohexanoyl-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (129)



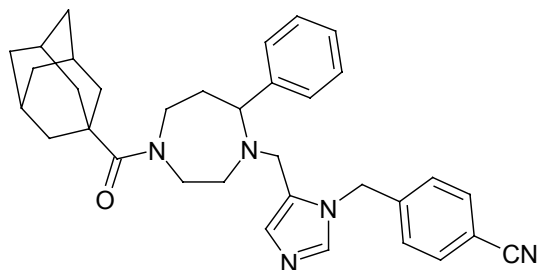
Amine 121	1 éq.	0,5 mmol	150 mg
Dérivé chloré 4	1,5 éq.	0,7 mmol	190 mg
Diisopropyléthylamine	3 éq.	1,5 mmol	150 µL

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche hygroscopique ; Rendement : 82 % ; Rf (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,70 ; F : 125°C.

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile) ; 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D $_2\text{O}$) : 1,17-1,41 (m, 6 H, **H cyclohexane**) ; 1,63-1,96 (m, 6 H, **H cyclohexane** et **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 2,02-2,10 (m, 1 H, **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 3,12-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 4,02-4,11 (m, 1 H, **CH**) ; 4,17 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -N**) ; 5,15 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 6,95-6,99 (m, 1 H, **Im**) ; 7,18-7,65 (m, 10 H, **Ar** et **Im**).
- LC-MS : Tr = 3,70 min. ; MH $^+$ = 482 ; Pureté = 100 %

Analyse élémentaire : C $_{30}$ H $_{35}$ N $_5$ O, 2 HCl, 1,5 H $_2$ O => 581,6 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 61,95 ; %H = 6,74 ; %N = 12,04 ; %Cl = 12,18 ; Expérimental: %C = 61,99 ; %H = 6,55 ; %N = 12,05 ; %Cl = 12,22).

Chlorhydrate de 1-(1-adamantanoyl)-4-[[1-(4-cyanobenzyl)-1H-imidazol-5-yl]méthyl]-5-phényl-1,4-diazépane (130)


Amine 122	1 éq.	0,5 mmol	150 mg
Dérivé chloré 4	1,5 éq.	0,7 mmol	190 mg
Diisopropyléthylamine	3 éq.	1,5 mmol	150 μL

Caractéristiques : Aspect : poudre blanche ; Rendement : 57 % ; R_f (dichlorométhane / méthanol 9 : 1) : 0,59 ; F > 250°C

Analyses spectrales :

- IR : 2229 ν (C \equiv N nitrile), 1649 ν (C=O amide)
- RMN ^1H (D $_2\text{O}$) : 1,59 (s, 6 H, CH $_2$ **adamantane**) ; 1,78-2,08 (m, 10 H, **CH $_2$, CH adamantane** et **Ar-CH-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 3,36-3,75 (m, 7 H, **Ar-CH-N-CH $_2$ -CH $_2$ -N-CH $_2$ -CH $_2$**) ; 4,10-4,18 (m, 1 H, **CH**) ; 4,28 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -N**) ; 5,30 (s, 2 H, **Im-CH $_2$ -Ar**) ; 6,93-6,96 (m, 1 H, **Im**) ; 7,21-7,45 (m, 10 H, **Ar** et **Im**).
- LC-MS : Tr = 3,94 min. ; MH $^+$ = 534 ; Pureté = 97,7 %

Analyse élémentaire : C $_{34}$ H $_{39}$ N $_5$ O, 2 HCl, 1,5 H $_2$ O => 624,6 g.mol $^{-1}$ (Calculé : %C = 65,38 ; %H = 6,86 ; %N = 11,21 ; %Cl = 11,35 ; Expérimental : %C = 65,22 ; %H = 6,26 ; %N = 11,03 ; %Cl = 11,08).

Partie B : Evaluation pharmacologique

I. Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire

La mesure des activités cellulaires a été réalisée au laboratoire par Mademoiselle Amélie Lemoine, sous la direction de Madame Nicole Pommery, Maître de Conférences. Les lignées cellulaires utilisées sont les PC3 isolées de métastases osseuses de carcinome de prostate humain ainsi que les DU145, cellules cancéreuses de prostate issues de métastases cérébrales, toutes deux représentatives du stade d'hormono-indépendance. Le choix de ces lignées est dicté par l'objectif de l'équipe qui tend à mettre en évidence des composés actifs sur des lignées cancéreuses représentatives de cancers difficilement curables par la chimiothérapie actuelle. La lignée L1210 est, quant à elle, utilisée classiquement dans les tests de screening des molécules à visée antitumorale.

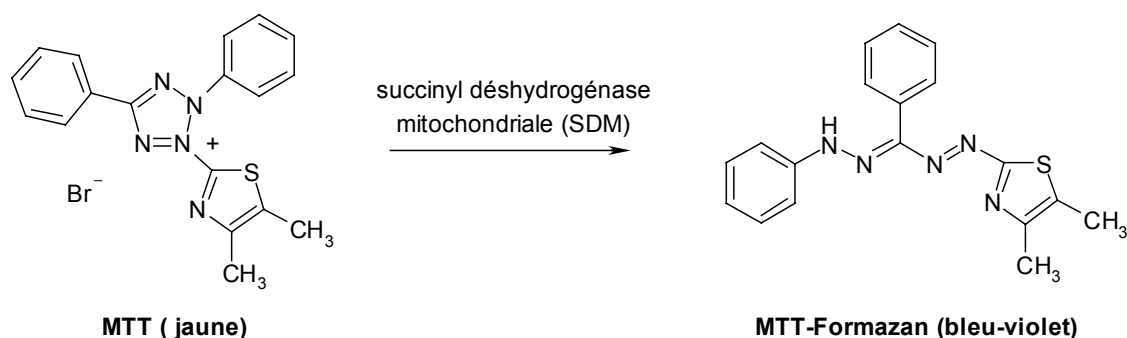
Les cellules sont cultivées en monocouche dans un milieu RPMI-1640 (Life Technologies) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF), et 2 mM de Glutamine. Le milieu est tamponné à pH 7,4 par du bicarbonate de sodium à une concentration de 26 mM. Le milieu RPMI-1640 est également supplémenté en antibiotiques tels que la streptomycine (100 µg/mL) et la pénicilline (100 UI/mL), puis la solution est filtrée. Les cellules sont placées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère humide contrôlée (5% CO₂).

La croissance cellulaire est déterminée par mesure d'une activité enzymatique, le test MTT. Les cellules sontensemencées dans leur milieu de culture en plaque 96 puits. On les laisse adhérer et se diviser pendant 72 heures. Elles sont ensuite cultivées pendant 24 heures dans un milieu dépourvu de sérum, ce qui leur permet d'entrer dans une phase de différenciation appelée phase de quiescence. Les molécules à tester sont alors mises au contact des cellules pendant 72 heures, à différentes concentrations (10⁻⁴ à 10⁻⁷ M). A l'issue de ce traitement, leur activité est évaluée grâce au test MTT.

Ce test met en jeu le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), sel de couleur jaune soluble dans l'eau. Les cellules vivantes possèdent des déshydrogénases mitochondriales, enzymes capables de cliver ce sel en un dérivé formazan, de couleur bleue, insoluble en milieu aqueux. Le MTT est laissé au contact des cellules traitées pendant 4 heures, puis les cristaux bleus de formazan formés sont solubilisés dans une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium) solubilisé dans HCl pendant 18 heures à 37°C. On mesure alors l'absorbance (A) du contenu des différents puits à 570 nm, avec une correction à 630 nm : elle est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

On peut ainsi déterminer le pourcentage de croissance :

$$\% \text{ croissance} = (A_{t=72h} - A_0) / (A_0) \times 100$$



II. TRAITEMENT DES CELLULES

Une fois synchronisées en G2/M, les cellules sont traitées avec différents inhibiteurs de farnésyltransférase, dissous dans du DMSO dont la concentration n'excède pas 1‰ pour ne pas altérer la croissance cellulaire.

III. TRANSFECTION PAR siRNA

La transfection est réalisée dans des boîtes 6 puits. Dans des tubes séparés, on dilue un volume approprié de siRNA 2µM (Tube 1) et de réactif de transfection dharmaFECT (*Invitrogen*) (Tube 2) dans un milieu sans SVF. Après mélange par refoulement, chaque tube est incubé 5 min à température ambiante. Ensuite, la solution est transférée du tube 1 dans le tube 2, et est également mélangé par refoulement puis incubée 20 min à température ambiante. Une fois l'incubation terminée, du milieu avec 10% de SVF mais sans pénicilline et streptomycine est ajoutée.

Le milieu des cellules est remplacé par le mix : milieu + dharmaFECT + siRNA puis les cellules sont incubées à 37°C à 5% de CO₂ durant 48 à 96 h.

IV. EXTRACTION PROTEIQUE

Les cellules sont préalablement lavées au PBS 1X à froid puis les membranes sont lysées avec un tampon de lyse contenant du Triton X-100, du DOC (Déoxycholate), du NaPP (pyrophosphate de sodium), du NaV (orthovanadate de sodium), du NaF (Fluorure de sodium), du PMSF et un cocktail d'inhibiteurs 1X.

Les lysats cellulaires sont récupérés puis centrifugés 25 min à 13000 rpm. Les extraits protéiques provenant du surnageant sont stockés à -20°C et seront utilisés pour des techniques de Western Blot.

La concentration en protéine est ensuite déterminée par la méthode BCA (acide bicinchoninique).

V. DOSAGE DES PROTEINES

On effectue une gamme étalon grâce à la BSA (Bovine Serum Albumine). A la gamme, ainsi qu'à l'échantillon, est ajouté un mélange préparé extemporanément de réactif A (carbonate et bicarbonate de sodium, réactif de détection BCA et tartrate de sodium 0,2N dans l'hydroxyde de sodium) avec le réactif B (sulfate de cuivre à 4%) avec un rapport 50 :1.

Les échantillons, déposés dans une plaque 96 puits, sont incubés 30 min à 37°C avant lecture au spectrophotomètre à 570 nm.

VI. WESTERN BLOT

Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les fractions protéiques sont diluées dans 7,5 µl de tampon SDS et 3 µL d'agent réducteur. Les échantillons sont chauffés 10 min à 70°C, refroidis, centrifugés puis déposés sur un gel de polyacrylamide 3-8 % Tris-Acétate (Invitrogen). La migration s'effectue 1 h à 150V.

Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 1 h à 30 V dans un tampon 5% de tampon de transfert 20X, 20% de méthanol et 1% d'antioxydant.

Révélation de la membrane

La membrane est saturée dans du tampon de base avec Tween additionné de lait à 5% pendant une heure. Elle est ensuite incubée 1h avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de base avec Tween. Après 3 lavages de 15 min, la membrane est incubée une heure avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horseradish Peroxydase), puis la révélation est effectuée par la technique de l'ECL+ (Amersham).

VII. MARQUAGE NUCLEAIRE

Les cellules sontensemencées sur des lamelles et incubées 24h à 37°C à 5% de CO₂. Les cellules sont marquées avec différents marqueurs nucléaires tels que le DRAQ-5 et le Hoechst Vital 33 342.

Les cellules sont ensuite lavées au PBS 1X et fixées au PFA sous sorbonne. Une fois lavées au PBS, les lamelles sont montées sur lames avec 5µl de Mowiol. Après 24h à 4°C, les lames sont visualisées au microscope à fluorescence.

VIII. IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules, une foisensemencées sur des lamelles en poly-D-lysine afin d'améliorer l'adhérence des cellules, sont, après 24 h, lavées au PBS 1X et fixées au PFA puis relavées au PBS 1X et perméabilisées avec du Triton X-100. Une fois lavées, les cellules sont bloquées pendant 45 minutes. Elles sont ensuite rincées puis incubées 1 h avec l'anticorps primaire puis après lavages, sont incubées 1 h également avec l'anticorps secondaire. Les cellules sont alors lavées puis montées sur lames au Mowiol et visualisées en microscopie à fluorescence.

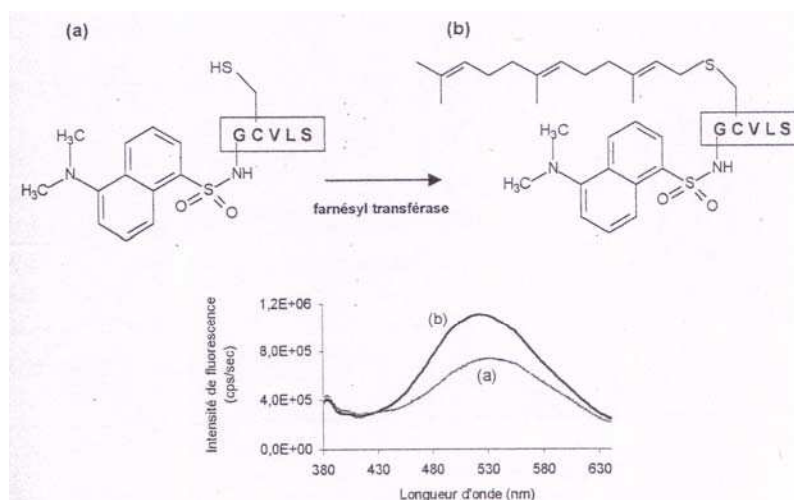
IX. Mesure des activités FTase

La mesure des activités enzymatiques a été réalisée à l'Institut de Chimie des

Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette (Essonne). J'ai effectué la majorité des mesures sous la direction de Madame Joëlle Dubois, Chargée de Recherches (CNRS).

La méthode utilisée pour mesurer l'activité FTase est basée sur la mesure de l'augmentation de la fluorescence au cours de la farnésylation du peptide dansylé (Cassidy et al., 1995). Cette augmentation de fluorescence, ainsi que le déplacement de la longueur d'onde maximale vers une longueur d'onde plus faible qui l'accompagne, sont dus à un changement de polarité dans l'environnement du groupement dansyle, provoqué par le farnésyle. En effet, la liaison covalente du farnésyle avec le groupement thiol de la cystéine place la chaîne hydrophobe près du groupement dansyle, modifiant la polarité et causant un changement radical des propriétés de fluorescence.

Dans le cas du peptide dansyl-GCVLS, un spectre d'émission pris avant (en bleu) et après farnésylation enzymatique (en rose) indique une augmentation de l'intensité de fluorescence, ainsi qu'un déplacement de la longueur d'onde maximale. Cette méthode permet ainsi de suivre la cinétique de farnésylation en temps réel.



Spectres d'émission du peptide dansylé avant (a) et après farnésylation (b).

A. Production de la FTase humaine recombinante

Pour obtenir la FTase humaine recombinante hétérodimérique d'*Escherichia coli*, les deux sous-unités sont codées sous forme d'opéron qui sont sous la dépendance transcriptionnelle du bactériophage T7 dans le plasmide pET-DUET-1 (Novagen). Le couplage traductionnel est effectué en plaçant la séquence codant pour la sous-unité α en amont de la séquence codant pour la sous-unité β . Une séquence de six histidines est incorporée à la partie C-terminale de la sous-unité α , permettant ainsi une purification par affinité de l'hétérodimère à partir des extraits d'*E. coli*.

L'espèce transformée de BL21 RIL(DE3) est cultivée à 37°C dans 14 litres de milieu LB enrichi avec 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ampicilline et la densité bactérienne est ajustée à une densité optique de 0,6 A_{600} avec 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. Après 12-15 h, les bactéries sont collectées par centrifugation. Une fraction (22,5 g) est diluée dans 50 mL de tampon A (25 mM Tris, HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl) et des

inhibiteurs de protéase et est lysée par un broyeur Dyno mill (0.2 mm) 25 fois pendant 30 s à 4 °C, 4500 rpm. Les solutions de lysat et de rinçage (60 mL) sont rassemblées et centrifugées à 10000 rpm (JA 2550) pendant 20 min. Le surnageant est introduit sur une colonne type His, (5 mL, Amersham) et est élué, par étapes successives avec du tampon A et du tampon B (25 mM Tris, HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazole): 0-4 % B, 4-25 % B, 25-100 % B. Les fractions les plus actives (~80%) éluées à 25% de tampon B sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration (YM30 filtre) et stockées dans le tampon A avec 5% glycérol à 4°C.

B. Détermination des cinétiques de farnésylation par fluorescence en continu

Les cinétiques sont suivies par la technique décrite (Cassidy et al., 1995) grâce à la fluorescence émise par les peptides substrats dansylés dansyl-GCVLS.

Mode opératoire

- Préparation des solutions mères de dansyl-GCVLS

La concentration en peptide dansylé est déterminée par spectrophotométrie en utilisant un étalonnage par la dansyl-glycine. Les solutions mères sont préparées dans le DMSO à 5 mM en DTT, diluées dans un tampon (20 mM Tris HCl ; pH 7,0 ; 10 mM EDTA), puis aliquotées et stockées à -20°C.

- Suivi de la cinétique de farnésylation

L'analyse est réalisée dans des plaques 96 puits, préparées avec deux robots pipeteur-diluteur robots Beckman NX et Biomec 3000 permettant de travailler sur plaque multi-puits (96 ou 384) par groupe de 8 puits ou mono-puits et directement par 96 puits. La lecture des plaques est réalisée sur fluorimètre Wallac Victor (Perkin-Elmer). Par puit 20 µL de farnésylpyrophosphate (10 µM) sont ajoutés à 180 µL d'une solution contenant 2 µL du composé testé à différentes concentrations (diluées dans le DMSO) et 178 µL d'une solution composée par 0,1 mL de FTase humaine recombinante partiellement purifiée (2,2 mg/mL) et 7,0 mL du peptide Dansyl-GCVLS (2 µM) dans une solution tampon (5,5 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂ and 0.08% (w/v) OGP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5). L'augmentation de fluorescence est ensuite enregistrée pendant 15 minutes (0,7 secondes par puit répété 20 fois) à 30°C avec une excitation à 340 nm et une émission à 486 nm.

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de farnésyltransférase dans le traitement du cancer

La maturation de nombreuses protéines requiert une voire plusieurs modification(s) post-traductionnelle(s). Environ 60 oncoprotéines (Ras, Rheb, RhoB, CENP-E, -F) sont activées par une série de modifications post-traductionnelles incluant la prénylation, la protéolyse et la carboxyméthylation. La prénylation est l'ajout d'un groupement isoprénoïde sur le résidu cystéinyle localisé au niveau de la séquence C-terminale tétrapeptidique appelée "boîte CA₁A₂X" (A₁A₂: deux acides aminés aliphatiques; X: une méthionine ou une sérine pour la FTase et une leucine ou une isoleucine pour la GGTase-I). Cette réaction est catalysée par une métaloenzyme à zinc, la farnésyltransférase (C15) (FTase) ou la géranylgeranyltransférase (C20) (GGTase-I). La farnésylation apporte l'hydrophobie suffisante pour la localisation cellulaire adéquate de protéines suractivées dans certaines pathologies comme le cancer. Ce dysfonctionnement peut être induit soit directement par mutation de la protéine farnésylée soit indirectement par mutation d'un activateur ou un inactivateur de la protéine farnésylée. D'intenses études se sont donc focalisées pour concevoir des inhibiteurs de farnésyltransférase (FTis).

Actuellement, trois composés, avec une inhibition sélective de la FTase vis-à-vis de la GGTase-I, sont en essais cliniques. Une étude sur des lignées cellulaires cancéreuses a montré que plus de 70% de ces lignées sont sensibles aux FTis, mais leur mécanisme d'action exact reste encore inconnu. Une connaissance précise du nombre de protéines farnésylées et l'élucidation des conséquences de leur farnésylation faciliteraient la découverte de ce mécanisme. Cependant, l'excellente efficacité et la faible toxicité systémique sur des modèles précliniques animaux des FTis présentent ces inhibiteurs comme agents prometteurs dans la thérapie anti-cancéreuse.

Une des stratégies pour inhiber cette enzyme consiste à concevoir des peptidomimétiques de la "boîte CA₁A₂X". La connaissance de la FTase a permis le passage des FTis peptidomimétiques contenant des thiols à des molécules sans thiol, non-peptidiques, pouvant ou ne pouvant pas interagir avec l'atome de zinc. Sur la base de ce modèle et d'études de modélisation moléculaire, nous avons conçu trois séries de composés, dans lesquelles le chélateur de zinc, le 1-(4-cyanobenzyl)-5-méthylimidazole, est constant :

- une série dans laquelle l'espaceur est la 4-aminopipéridine-2-carboxylate de méthyle où la partie hydrophobe est substituée,
- deux séries où l'espaceur est le 1,4-diazépane substitué ou non par un phényle et dans lesquelles la partie hydrophobe est l'élément de modulation.

Les évaluations enzymatique et cellulaire (DU145 et PC3) des composés synthétisés nous ont permis de compléter les relations structure-activité, permettant ainsi de proposer de nouvelles structures. Les protéines associées aux centromères, CENP-E et CENP-F, sont des cibles pertinentes des FTis, puisque leur association fonctionnelle avec le fuseau mitotique nécessite une farnésylation. Nous avons également souhaité évaluer quelques FTis sélectionnés pour leur effet sur les CENP.

Design, synthesis and pharmacological evaluation of potent farnesyltransferase inhibitors in cancer therapy

The maturation of many proteins requires one or more post-translational modification(s). Around 60 proteins (Ras, Rheb, RhoB, CENP-E, -F) were activated by a series of post-translational modifications including prenylation, proteolysis and carboxymethylation. The prenylation is the addition of an isoprenoid moiety to the cysteine residue located at the C-terminal tetrapeptidic sequence called "CA₁A₂X box" (A₁A₂: aliphatic amino acids; X: methionine or serine for farnesyltransferase, leucine or isoleucine for geranylgeranyltransferase-I). This reaction is catalyzed by a zinc metalloenzyme, the farnesyltransferase (C15) (FTase) or geranylgeranyltransferase (C20) (GGTase-I). The farnesylation give the sufficient hydrophobicity for the adequate cellular localisation of the protein overactivated in some pathology like cancer. This perturbation can be inducing ether directly by mutation of the farnesylated protein or by mutation of an activator or an inactivator of the farnesylate protein. Thus intense studies have been focused to design farnesyltransferase inhibitors (FTis).

Actually, three compounds with selective inhibition of FTase vs GGTase-I are in clinical trials. A survey of cancer cell lines has shown that more than 70% of these cell lines are sensitive to FTis, with the exact biological mechanism remains still unknown. An accuracy acknowledgment of the number of farnesylated proteins and the role of their farnesylation would allow the discovery of this mechanism. Yet, the excellent efficacy and low systemic toxicity in preclinical animal models of FTis present these inhibitors as promising agents in cancer therapy.

One of the strategies to inhibit this enzyme consists in the design of peptidomimetics of the "CA₁A₂X box". The acknowledgment of the FTase allowed the evolution of FTis from thiol-containing peptidomimetics to non-thiol, non-peptidic molecules, which may or may not interact with the zinc atom. On the basis of this model and studies of molecular modelling, we have designed three series of compounds, in which the zinc chelator, the 1-(4-cyanobenzyl)-5-methylimidazole, is constant:

- a series in which the spacer is a 4-aminopiperidine-2-carboxylate methyl ester where the hydrophobic moiety is modulate,
- two series where the spacer is the 1,4-diazepane substituted or not by a phenyl and in which hydrophobic moiety is the variation component.

Enzymatic and cellular (DU145 and PC3) assays of the synthesized compounds allowed us to establish structure-activity relationships, and thus to design new appropriate structures. CENP-E and CENP-F, centromere-associated proteins, are pertinent targets of FTis since their functional association with mitotic spindle requires farnesylation. We would so like to evaluate any selcted FTis for their effects on the CENP.