



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de DOT1L impliqués dans la régulation épigénétique du cancer

Omar Castillo Aguilera

► **To cite this version:**

Omar Castillo Aguilera. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de DOT1L impliqués dans la régulation épigénétique du cancer. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S053 . tel-01881173

HAL Id: tel-01881173

<https://theses.hal.science/tel-01881173>

Submitted on 25 Sep 2018

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.



Université Lille 2 – Droit et Santé
Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL)

Thèse
en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Lille 2
Spécialité Sciences du Médicament

**Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels
de DOT1L impliqués dans la régulation épigénétique du cancer**

Présentée et soutenue le 28 septembre 2017

par

Omar CASTILLO AGUILERA

Membres du jury :

Directeurs de thèse :

Dr. Paola B. ARIMONDO, Directrice de Recherches CNRS, Epigenetic Targeting of Cancer (ETaC), Toulouse
Pr. Patrick DEPREUX, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Lille 2

Co-encadrants de thèse :

Dr. Laurence GOOSSENS, Maître de Conférences des Universités, Université Lille 2
Dr. Ludovic HALBY, Ingénieur d'Etudes, Epigenetic Targeting of Cancer (ETaC), Toulouse

Rapporteurs :

Dr. Philippe DAUBAN, Directeur de Recherches CNRS, Institut de Chimie des Subst. Naturelles, Gif-sur-Yvette
Dr. Maria DUCA, Chargée de Recherches CNRS, Institut de Chimie de Nice (ICN)

Examineur :

Dr. Christian BAILLY, Directeur de Département, Institut de Recherche Pierre Fabre, Toulouse



*Beaucoup de petites personnes,
dans de petits endroits,
en faisant de petites choses,
peuvent changer le monde.*

Eduardo Galeano (écrivain)

Remerciements

Au terme de mon doctorat, je tiens à adresser mes remerciements :

A mes directeurs de thèse,

Dr Paola ARIMONDO

Je vous remercie pour votre direction pendant ces quatre années et pour votre investissement dans ma formation. Je vous remercie pour votre regard toujours critique à notre projet. Je vous remercie également pour m'avoir accueilli dans votre unité à Toulouse lors de la réalisation des tests biologiques.

Pr Patrick DEPREUX

Je vous remercie pour votre direction pendant ces cinq ans, pour m'avoir fait confiance tout ce temps et pour nos échanges lors de différentes réunions.

A mes co-encadrants de thèse,

Dr Laurence GOOSSENS

...je vous remercie infiniment, Laurence ! Je vous remercie vraiment pour la confiance tout au long de ces cinq ans. Vous avez toujours été à mes côtés, toujours avec un regard critique sur notre projet, toujours investie pour ma formation, toujours avec le bon conseil qui m'a toujours encouragé... je vous dis : *merci pour tout !*

Dr Ludovic HALBY

Je te remercie pour ton avis toujours critique sur mes travaux, pour tous tes conseils pratiques, pour les différentes discussions. Je te remercie également pour m'avoir accueilli à l'ETaC à Toulouse lors de la réalisation des tests biologiques.

Aux membres du jury,

Dr. Philippe DAUBAN

Je vous remercie pour votre regard critique à ce travail et pour le partage de vos connaissances en chimie lors des comités de suivi de thèse.

Dr. Maria DUCA

Je vous remercie pour le regard critique et avisé que vous donnerez à ce travail.

Dr. Christian BAILLY

Je vous remercie pour le regard critique sur mon travail et pour vos commentaires toujours enrichissant lors des comités de suivi de thèse.

A ceux qui ont contribué à ce travail,

Pr Jean François GOOSSENS

Je vous remercie pour avoir partagé avec moi vos connaissances lors des réunions et des comités de suivi de thèse. Vous avez toujours eu la disponibilité pour éclaircir mes questions. Un grand merci à vous et à votre équipe pour la réalisation de mes analyses en spectrométrie de masse.

Pr Philippe CHAVATTE

Merci de m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol ces dernières années. Pour votre disponibilité et pour votre sympathie.

Dr. Séverine RAVEZ

Merci pour tes conseils à l'ICPAL. Merci de m'avoir accueilli pendant ton post-doctorat à l'« Université Catholique de Louvain », Belgique, et m'avoir formé aux études de modélisation moléculaire.

Dr. Nicolas RENAULT

Merci pour tes résultats sur le clogP de mes composés. Toujours avec un sourire.

Mme Perrine SIX

Merci pour m'avoir fait découvrir le labo et tes astuces en chimie lors de mon arrivée à l'ICPAL.

Mme Frédéric KLUPSCH

Merci pour ton aide au quotidien, pour tes conseils et pour ton encouragement. Je te remercie pour les LC-MS, les HRMS et l'hydrogénation catalytique.

M. Dany PECHALRIEU

Merci pour ton accueil à l'ETaC et pour ta formation sur les tests DNMT. Un grand merci pour les tests sur mes composés !

Pr. Nathalie AZAROUAL

Merci Mme. Nathalie pour les discussions autour de tubes RMN, où vous m'avez fait partagé vos connaissances. Un grand merci à votre équipe.

M. Vincent ULTRE

Merci pour votre conseil toujours avisé sur mes manipulations en RMN.

Dr. Julio Lenin DOMINGUEZ RAMIREZ

Merci pour votre investissement dans mon projet. Je remercie votre équipe à l' « Universidad de las Américas Puebla, UDLAP », Mexique, pour l'étude de modélisation moléculaire sur DOT1L. « Muchas gracias, Doctor, por haber contribuido con dichos resultados, por su interés y disponibilidad a mi proyecto ».

Je tiens à remercier vivement tous mes stagiaires :

Manon STURBAUT, Martin MONIER, Florian DESCAMPS, Nicolas TESTELIN, Aurélie THELLIEZ.

Je vous remercie pour votre investissement autour de mon projet, pour votre aide dans mes manipulations. J'ai beaucoup appris avec vous : vous avez contribué à ma formation d'enseignant. ¡Gracias!

Je tiens à remercier les membres de l'ICPAL :

M. MILLET et M. FURMAN, pour m'avoir encadré dans des TDs en tant que moniteur.

Natascha, pour tes conseils en chimie et pour m'avoir encadré dans les TDs en tant que moniteur.

Audrey, pour tes conseils en chimie et ton aide au quotidien.

Mélanie, pour la compagnie au labo lors de la fermeture. Je te souhaite du succès pour la fin de ta thèse.

Amélie, pour tes réponses en biologie et pour ton humour au labo. Tu vas danser en Speedy González pour moi ?

Xavier, pour ton aide en biologie et pour le café du matin. Merci pour m'avoir montré le *harvester* !

Fred, pour ta bonne humeur au quotidien.

Je remercie également les étudiants qui ne sont plus actuellement à l'ICPAL mais qui m'ont laissé un bon souvenir :

Stéphane, Dr. Aurélien, Dr. Lucas, Dr. Wei.

Wei, I really appreciated your friendship in the lab and during lunch. Thank you for your advice in chemistry, too!

Fabien, pour ton sourire et ton humour l'année passée.

Je remercie les gens qui indirectement ont contribué avec un sourire, avec leur bonne humeur à une pause repas sympathique : **Maxime, Camille, mes ex-stagiaires, Nico, Tony, Nazime, Andrew, Lydia...** *I really appreciate your company during lunch !*

Je remercie de tout mon cœur mes amis et ma famille. Vous avez été toujours à mes côtés, souvent de très loin, mais toujours dans mes pensées.

Le agradezco a todos mis amigos y a mi familia. Aunque lejos, siempre han estado conmigo y han creído en mí. ¡Gracias a mi mamá, mi papá, mi hermana y a mis sobrinos!

Sommaire

Abréviations	21
Introduction	25
Chapitre 1 : Généralités	28
1.1. Epidémiologie des cancers	28
1.2 Les cancers	30
1.2.1 Classification des cancers.....	32
1.2.1.1 Les leucémies	33
1.2.2. Traitements des cancers	34
1.3 L'épigénétique	35
1.4 La méthylation : une modification épigénétique	37
1.4.1 Méthylation de l'ADN.....	37
1.4.1.1 Les ADN méthyltransférases (DNMTs).....	39
1.4.1.2 Mécanisme catalytique des DNMTs.....	40
1.4.1.3 Inhibiteurs de DNMT (DNMTi).....	41
1.4.2 Méthylation d'histones	46
1.4.2.1 Histones méthyltransférases (HMTs).....	47
1.4.2.2 Arginine méthyltransférases (PRMT).....	47
1.4.2.3 Lysine méthyltransférases (HKMT).....	49
1.5 DOT1L (DOT1 Like, disruptor of telomeric silencing)	52
1.5.1 Caractéristiques fonctionnelles et structurales.....	52
1.5.2 Rôle de DOT1L dans le cancer	56
1.5.3 Inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li)	57
1.6 Méthylation de l'ADN et la méthylation des histones : le crosstalk	64
Chapitre 2 : Conception	66
2.1 Modélisation moléculaire de SGI-1027 (17).....	66
2.2 Etude des inhibiteurs de DOT1L	68
2.3 Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L.....	71
Chapitre 3 : Stratégies de synthèses	74
3.1 Série de composés de type phénylamide	74
3.1.1 Synthèse des précurseurs acides carboxyliques de type pyrimidinobenzénique.....	74
3.1.2 Synthèse des précurseurs amines de type phénylurée	75

3.1.2.1 Synthèse des urées.....	76
3.1.2.2 Synthèse des amines secondaires via une substitution nucléophile (S _N).....	76
3.1.2.3 Synthèse des amines secondaires via une amination réductrice	78
3.1.3 Synthèse des précurseurs amines de type 2-alkylbenzimidazole	82
3.1.3.1 Synthèse du noyau benzimidazole à partir d'une diamine et d'un acide carboxylique activé	82
3.1.3.2 Synthèse du noyau benzimidazole via l'ouverture d'une lactone ou d'une lactame	85
3.1.4 Synthèse des précurseurs amines de type 2-aminobenzimidazole.....	90
3.1.4.1 Synthèse du noyau benzimidazole via une diamine et un isothiocyanate	90
3.1.4.2 Synthèse du noyau benzimidazole via une benzimidazolone.....	91
3.1.5 Synthèse des amides de type pyrimidinobenzénique	93
3.1.5.1 Synthèse des amides de type pyrimidinobenzénique via un couplage de type peptidique	93
3.1.5.2 Synthèse des amides de type pyrimidinobenzénique via un chlorure d'acide..	100
3.2 Série de composés de type benzylamine	101
3.2.1 Synthèse de la série de composés de type benzylamine via une réduction d'amide	101
3.2.2 Synthèse de la série de benzylamines via une amination réductrice	101
3.2.3 Synthèse de la série des benzylamines via une substitution nucléophile	103
3.3 Série de composés de type thiophène	106
3.3.1 Synthèse des composés de type thiophène via une synthèse convergente	106
3.3.1.1 Synthèse des précurseurs acides carboxyliques de type pyrimidinothiophène	106
3.3.2 Synthèse de la série de composés de type thiophène via une S _N Ar	108
3.4 Série de composés de type pyrrole.....	111
3.4.1 Synthèse du précurseur acide carboxylique de type pyrrole	112
3.5 Série de composés de type 3-hydroxythiophène et 3-hydroxypyrrole.....	113
3.5.1 Synthèse du précurseur acide carboxylique de type 3-hydroxythiophène ou 3- hydroxypyrrole via un couplage de type Buchwald-Hartwig.....	115
3.5.1.1 Halogénéation des hétérocycles	115
3.5.1.2 Couplage des hétérocycles halogénés avec un dérivé aminopyrimidine	122
3.5.2 Synthèse du précurseur acide carboxylique de type 3-hydroxythiophène ou 3- hydroxypyrrole via une S _N Ar.....	123
Chapitre 4 : Résultats et discussion	132
4.1 Evaluation de l'activité sur DOT1L	132
4.1.1 Principe du test d'activité sur DOT1L.....	132
4.1.2 Etude de modélisation moléculaire sur DOT1L.....	132
4.1.3 Evaluation de l'activité sur DOT1L	133

4.1.4 Relation entre l'hydrophobicité des composés et leur activité	146
4.1.5 Pharmacomodulations proposées	146
4.2 Evaluation de l'activité sur DNMT	147
4.2.1 Principe du test d'activité sur DNMT	147
4.2.2 Résultats et discussion de l'activité sur DNMT	148
4.2.3 Relation entre l'hydrophobicité des composés et leur activité	152
4.2.4 Pharmacomodulations proposées	153
4.3 Détermination de la spécificité des molécules vis-à-vis d'autres HMTs	154
4.3.1 Principe du test d'activité sur des HMTs	154
4.3.2 Résultats et discussion de l'activité sur d'autres HMTs	154
4.3.3 Pharmacomodulations proposées	157
4.4 Comparaison de l'activité des composés sur DOT1L, DNMT et autres HMTs	157
Chapitre 5 : Conclusions et perspectives	161
Chapitre 6 : Modes opératoires	169
6.1 Synthèses	169
6.1.1 Matériels : Appareillages et techniques d'analyse	169
6.1.2 Protocoles expérimentaux	170
General procedure to obtain amines ALIPF193, 196, 231	170
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzoic acid dihydrochloride, ALIPF193	170
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-2-hydroxybenzoic acid dihydrochloride, ALIPF196	171
3-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzoic acid trichloride, ALIPF231	171
Procedure to obtain imidazolidinone ALIPF148	171
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)imidazolidin-2-one, ALIPF148	172
Procedure to obtain pyrimidinone ALIPF147	172
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)tetrahydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one, ALIPF147	172
General procedure to obtain ureas ALIPF175, 138	173
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)-3-(2-chloroethyl)urea dichloride, ALIPF175	173
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)-3-(3-chloropropyl)urea dichloride, ALIPF138	173
Procedure to obtain phthalimido derivative ALIPF144	174
Procedure to obtain phthalimido derivative ALIPF153	174
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)-3-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)urea, ALIPF153	175
Characterization of ALIPF316	175
General procedure to obtain primary amines ALIPF145, 154	175
1-(2-aminoethyl)-3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)urea, ALIPF145	175
1-(3-aminopropyl)-3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)urea, ALIPF154	176

General procedure to obtain secondary amines ALIPF140, 139, 195, 209	176
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)-3-(2-(isopropylamino)ethyl)urea, ALIPF140	176
1-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)-3-(3-(isopropylamino)propyl)urea, ALIPF139	177
3-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)- <i>N</i> -isopropylpropan-1-amine, ALIPF195	177
Characterization of ALIPF217	177
4-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)- <i>N</i> -isopropylbutan-1-amine, ALIPF209	178
Procedure to obtain benzimidazole ALIPF181	178
4-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butanenitrile, ALIPF181	178
Characterization of 5-(<i>tert</i> -butyl)-2-methyl-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazole, ALIPF278	179
Procedure to obtain <i>N</i> -Boc amine ALIPF212	179
4-((<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)butanoic acid, ALIPF212	179
Procedure to obtain benzimidazoles ALIPF183, 186, 234	179
3-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propan-1-ol, ALIPF183	179
3-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propan-1-ol, ALIPF186	180
5-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)pentan-1-ol, ALIPF234	180
Procedure to obtain primary amines ALIPF190, 188	180
2-(3-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione, ALIPF184	181
3-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propan-1-amine, ALIPF190	181
2-(4-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)isoindoline-1,3-dione, ALIPF187	181
4-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butan-1-amine, ALIPF188	182
Procedure to obtain benzimidazole ALIPF272, 241, 289, 294, 288	182
4-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butan-1-amine, ALIPF272	182
5-(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)pentan-1-amine, ALIPF241	182
4-(5-methoxy-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butan-1-amine, ALIPF289	183
4-(5-methoxy-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butan-1-amine, ALIPF294	183
4-(5-(trifluoromethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butan-1-amine, ALIPF288	183
Procedure to obtain benzimidazolone ALIPF225	184
5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-one, ALIPF225	184
Procedure to obtain benzimidazol ALIPF226	184
5-(<i>tert</i> -butyl)-2-chloro-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazole, ALIPF226	184
Procedure to obtain amines ALIPF230, 290	185
<i>Tert</i> -butyl (2-((5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)ethyl)carbamate, ALIPF228	185
<i>N</i> ¹ -(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)ethane-1,2-diamine, ALIPF230	185
<i>N</i> ¹ -(5-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propane-1,3-diamine, ALIPF290	185
General procedure to obtain amides ALIPF194, 197, 198, 199, 201, 200, 277, 242, 211, 244, 292, 240, 233, 269, 283, 273, 271, 275, 284	186

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)benzamide, ALIPF194	186
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)benzamide, ALIPF197	186
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)- <i>N</i> -isopropylbenzamide, ALIPF198	187
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)- <i>N</i> -isopropylbenzamide, ALIPF199	187
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propyl)benzamide, ALIPF201	188
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, ALIPF200	188
<i>N</i> -(4-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)-3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzamide, ALIPF277	189
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(5-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)pentyl)benzamide, ALIPF242	189
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)- <i>N</i> -isopropylbenzamide, ALIPF211	190
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-((6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)ethyl)benzamide, ALIPF244	190
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-((6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)propyl)benzamide, ALIPF292	191
<i>Tert</i> -butyl (2-(3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzamido)ethyl)carbamate, ALIPF240	191
<i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)-3-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzamide, ALIPF233	192
5-bromo- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF269	192
<i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF283	193
1-(2-((bis(dimethylamino)methylene)amino)ethyl)-3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)urea, ALIPF296	193
<i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)- <i>N</i> -isopropyl-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF273	193
<i>N</i> -(3-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF271	194
<i>N</i> -(4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF275	194
<i>N</i> -(5-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)pentyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF284	195

Procedure to obtain amine ALIPF246	195
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-aminoethyl)benzamide trichloride, ALIPF246	195
General procedure to obtain amides 295, 297, 293, 306, 301	196
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-methoxy-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, ALIPF295	196
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-chloro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, ALIPF297	197
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-(trifluoromethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, ALIPF293	197
<i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF306	198
<i>N</i> -(3-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)propyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF301	198
General procedure to obtain amides ALIPF205, 202, 203	198
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)-2-hydroxybenzamide, ALIPF205	199
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)-2-hydroxy- <i>N</i> -isopropylbenzamide, ALIPF202	199
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propyl)-2-hydroxybenzamide, ALIPF203	200
Procedure to obtain amide ALIPF207	200
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)-2-hydroxy- <i>N</i> -isopropylbenzamide, ALIPF207	200
General procedure to obtain amides ALIPF213, 229	201
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)-2-hydroxybenzamide, ALIPF213	201
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)-2-hydroxybenzamide, ALIPF229	202
Procedure to obtain amine ALIPF206	202
1-(2-((3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzyl)amino)ethyl)-3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)urea, ALIPF206	202
General procedure to obtain primary alcohols ALIPF208, 223	203
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)phenyl)metanol, ALIPF208	203
4-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-2-(hydroxymethyl)phenol, ALIPF223	203
General procedure to obtain aldehyde ALIPF210	204
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzaldehyde, ALIPF210	204
General procedure to obtain tosyl derivative ALIPF216	204
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzyl 4-methylbenzenesulfonate, ALIPF216	205

General procedure to obtain chloride ALIPF221	205
General procedure to obtain amines ALIPF220, 222	205
1-(3-((3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzyl)amino)propyl)-3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)urea, ALIPF220	206
<i>N</i> ⁴ -(3-(((4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)amino)methyl)phenyl)-6-methylpyrimidine-2,4-diamine, ALIPF222	206
General procedure to obtain amines ALIPF285, 307, 279, 274, 280, 286, 302	207
5-amino- <i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF285	207
5-amino- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF307	207
5-amino- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)- <i>N</i> -isopropylthiophene-2-carboxamide, ALIPF279	208
5-amino- <i>N</i> -(3-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF274	208
5-amino- <i>N</i> -(4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF280	208
5-amino- <i>N</i> -(5-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)pentyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF286	209
5-amino- <i>N</i> -(3-((6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF302	209
General procedure to obtain amines ALIPF287, 308, 281, 276, 282, 291, 303, 309	210
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(2-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)ethyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF287	210
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF308	210
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(3-(4-(<i>tert</i> -butyl)phenyl)ureido)propyl)- <i>N</i> -isopropylthiophene-2-carboxamide, ALIPF281	211
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF276	211
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(4-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)butyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF282	212
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(5-(6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)pentyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF291	212
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)- <i>N</i> -(3-((6-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-yl)amino)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF303	213
Methyl 5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF309	214
General procedure to obtain aminopyrrole ALIPF304	214
Methyl 5-amino-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF304	215

Methyl 5-azido-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF311	215
General procedure to obtain halides ALIPF137, 171, 237, 235	215
Methyl 4-bromo-3-hydroxy-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxylate, ALIPF137	215
Methyl 4-bromo-3-hydroxy-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF171	216
Methyl 2-bromo-3-oxo-2,3-dihydrothiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF237	216
Methyl 5-bromothiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF235	217
Procedure to obtain halide ALIPF141	217
Methyl 4,5-dibromo-3-hydroxy-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF141	217
Procedure to obtain halide ALIPF161	218
Methyl 4-bromo-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF161	218
Procedure to obtain halide ALIPF143	218
Methyl 5-chloro-3-hydroxy-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF143	218
Procedure to obtain halide ALIPF162	219
Methyl 5-chloro-3-hydroxy-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF162	219
Methyl 4-chloro-3-hydroxy-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF170	219
Procedure to obtain halide ALIPF155	220
Methyl 2-chloro-3-oxo-2,3-dihydrothiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF155	220
Procedure to obtain halide ALIPF167	220
Methyl 4,5-dichloro-3-hydroxy-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF167	220
Dimethyl 3',4-dichloro-4'-hydroxy-1,1'-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> ,1' <i>H</i> -[2,2'- bipyrrole]-2,5'-yl-dicarboxylate, ALIPF173	221
Procedure to obtain halide ALIPF257	221
Methyl 3-hydroxy-4-iodothiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF257	221
Procedure to obtain azide ALIPF156	222
Methyl 5-azido-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF156	222
Procedure to obtain amine ALIPF159	222
Methyl 5-amino-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF159	222
Procedure to obtain amine ALIPF174	223
Methyl 5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-3-hydroxythiophene-2-yl- carboxylate dihydrochloride, ALIPF174	223
Procedure to obtain ALIPF264	223
5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)thiophen-3(2 <i>H</i>)-one, ALIPF264	223
Procedure to obtain the carboxylic acid ALIPF189	224
3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylic acid, ALIPF189	224
6.2 Etude de modélisation moléculaire	224
6.3 Evaluation pharmacologique	224
6.3.1 Test d'activité sur DOT1L	224
6.3.2 Test d'activité sur DNMT	225

Références bibliographiques
..... **228**

Liste de Figures et de Schémas

Figure 1.1 . Taux d'incidence estimé de cas de cancers au niveau mondial en 2012.	28
Figure 1.2. Taux standardisés à la population mondiale (TSM) de mortalité par cancer à l'échelle départementale en France métropolitaine et dans les DOM (2005-2009).....	29
Figure 1.3. Incidence et mortalité estimées au niveau mondial, tous sexes confondus.	29
Figure 1.4. Incidence et mortalité estimées en France Métropolitaine, tous sexes confondus.	30
Figure 1.5. Processus de tumorigenèse.....	31
Figure 1.6. Propriétés des cellules cancéreuses.....	32
Figure 1.7. Cellules du système hématopoïétique	33
Figure 1.8. Représentation schématique de l'organisation du matériel génétique et de l'approche épigénétique.....	36
Figure 1.9. Différences des profils de méthylation dans les cellules normales et les cellules cancéreuses.	38
Figure 1.10. Représentation des DNMTs.....	40
Figure 1.11. A) Représentation du site catalytique des DNMTs. B) Mécanisme catalytique de la méthylation de l'ADN. C) Mécanisme de la 5-azacytidine (azacitidine) et la 5-aza-2'desoxycytidine (décitabine).	41
Figure 1.12. Représentation schématique des différentes approches pour l'inhibition de l'ADN.	42
Figure 1.13. Structures des inhibiteurs nucléosidiques de DNMT	43
Figure 1.14. Structures des inhibiteurs de DNMT non-nucléosidiques.....	45
Figure 1.15. Structures des inhibiteurs de PRMT.	49
Figure 1.16. Structures des inhibiteurs de G9/GLP.....	50
Figure 1.17. Structures des inhibiteurs d'EZH2.....	51
Figure 1.18. Diagrammes d'arbre de A) la famille PRMT et B) la famille PKMT.	51
Figure 1.19. Mécanisme catalytique de DOT1L.....	52
Figure 1.20. Structures de DOT1 et DOT1L des plusieurs organismes.....	53
Figure 1.21. A) Structure du complexe DOT1L (1-416) – SAM. B) Site actif de DOT1L montrant les interactions avec SAM. C) Canal de liaison de la lysine.	54
Figure 1.22. Superposition des conformations du cofacteur SAM ou SAH extraites des structures cristallines.	55
Figure 1.23. Rôle de DOT1L dans une situation cancéreuse.	56
Figure 1.24. Développement des inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) à partir de pharmacomodulations autour du SAH.	58
Figure 1.25. A) Site actif de DOT1L montrant les interactions avec EPZ004777 (43).....	60
Figure 1.26. A) Site actif de DOT1L montrant les interactions avec EPZ-5676 (45).	61
Figure 1.27. Inhibiteurs de DOT1L (<i>DOT1Li</i>) non nucléosidiques.	63

Figure 2.1. Etude de modélisation moléculaire du composé SGI-1027 (19) dans le site catalytique de la DNMT chez <i>Haemophilus haemolyticus</i> (MHhal DNMT ; PDB : 2HR1).....	64
Figure 2.2. Superposition des <i>dockings</i> du composé SGI-1027 (19) et de SAH dans le site catalytique de DNMT (PDB : 2HR1).....	65
Figure 2.3. Modélisation moléculaire du composé SGI-1027 (17) dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4EKI).....	65
Figure 2.4. Représentation schématique des interactions des composés EPZ004777 (43) (A) et EPZ-5676 (45) (B) dans le site catalytique de DOT1L.....	66
Figure 2.5. A) Superposition des co-cristaux DOT1L-SAM (en vert) et DOT1L-(43) (en orange).....	68
Figure 2.6. Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L basée sur les molécules SGI-1027 (inhibiteur de DNMT) et EPZ-5676 et EPZ004777 (inhibiteurs de DOT1L).....	69
Schéma 3.1. Rétrosynthèse des amides de type benzénique	74
Schéma 3.2. Rétrosynthèse des précurseurs de type acide carboxylique	74
Schéma 3.3. Synthèse des précurseurs de type acide carboxylique liés au motif pyrimidinique	74
Schéma 3.4. Rôle de l'acide chlorhydrique dans la formation de l'électrophile	75
Schéma 3.5. Synthèse du précurseur benzénique lié au motif triazinique.....	75
Schéma 3.6. Rétrosynthèse des amines de type phénylurée via une substitution nucléophile. 76	
Schéma 3.7. Synthèse de l'urée via un mécanisme d'addition	76
Schéma 3.8. Cyclisation des urées halogénées via un mécanisme S _N	78
Schéma 3.9. Rétrosynthèse des amines secondaires de type urée via une amination réductrice	78
Schéma 3.10. Synthèse des amines de type phénylurée	79
Schéma 3.11. Synthèse des composés phtalimido-urée	79
Schéma 3.12. Synthèse des amines primaires	80
Schéma 3.13. Rétrosynthèse des amines primaires de type urée.....	80
Schéma 3.14. Synthèse d'une amine primaire via une homologation de chaîne	80
Schéma 3.15. Cyclisation intermoléculaire de deux molécules d'urée halogénée	81
Schéma 3.16. Synthèse de l'amine primaire ALIPF154 en deux étapes	81
Schéma 3.17. Synthèse des amines secondaires de type phénylurée via une amination réductrice.....	82
Schéma 3.18. Rétrosynthèse des amines de type 2-alkylbenzimidazole	82
Schéma 3.19. Synthèse des précurseurs amines de type 2-alkylbenzimidazole via un chlorure d'acide	83
Schéma 3.20. Synthèse des amines précurseurs de type 2-alkylbenzimidazole via un anhydride mixte	83
Schéma 3.21. Réaction de protection de l'amine par un groupement Boc	84
Schéma 3.22. Formation du noyau benzimidazole à partir d'une diamine et d'un anhydride d'acide mixte.....	84

Schéma 3.23. Formation du dérivé disubstitué et du benzimidazole, produits secondaires	85
Schéma 3.24 . Rétrosynthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via une réaction de Mitsunobu précédée d'une ouverture de lactone	86
Schéma 3.25. Synthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via une réaction de Mitsunobu précédée d'une ouverture de lactone	86
Schéma 3.26. Synthèse des benzimidazoles par l'ouverture d'une lactone en milieu acide	87
Schéma 3.27. Synthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via la réaction de Mitsunobu	88
Schéma 3.28. Synthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via une ouverture de lactame	89
Schéma 3.29. Rétrosynthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via un dérivé isothiocyanate.....	90
Schéma 3.30. Synthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via un dérivé isothiocyanate.....	90
Schéma 3.31. Mécanismes réactionnels proposés pour la formation du benzimidazole.....	91
Schéma 3.32. Rétrosynthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via une benzimidazolone.....	92
Schéma 3.33. Synthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via une benzimidazolone.....	92
Schéma 3.34. Synthèse de la benzimidazolone.....	92
Schéma 3.35. Chloration d'une benzimidazolone	93
Schéma 3.36. Synthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole	93
Schéma 3.37. Synthèse des amides de type benzénique via un couplage de type peptidique	94
Schéma 3.38. Synthèse de l'amide de type triazinique.....	97
Schéma 3.39. Déprotection d'une amine <i>N</i> -Boc protégée par du TFA.....	98
Schéma 3.40. Mécanisme proposé pour le couplage de type peptidique avec les agents HOBt / HBTU.....	98
Schéma 3.41. Mécanisme proposé pour le couplage de type peptidique avec les agents HOBt / EDCI	99
Schéma 3.42. Mécanisme proposé pour le couplage de type peptidique avec l'agent PyBOP	99
Schéma 3.43. Synthèse des amides de type benzénique via un chlorure d'acide	100
Schéma 3.44. Synthèse des amides via un chlorure d'acide	100
Schéma 3.45. Rétrosynthèse des benzylamines à partir des amides correspondants.....	101
Schéma 3.46. Synthèse de l'amine ALIPF206 via une réduction d'amide.....	101
Schéma 3.47. Rétrosynthèse des benzylamines via une amination réductrice	102
Schéma 3.48. Synthèse des benzylamines via une amination réductrice	102
Schéma 3.49. Réduction de la fonction acide carboxylique par un hydrure	102
Schéma 3.50. Oxydation de la fonction alcool pour aboutir au dérivé aldéhyde	103
Schéma 3.51. Mécanisme de l'oxydation de Swern.....	103
Schéma 3.52. Rétrosynthèse des benzylamines via une substitution nucléophile	104

Schéma 3.53. Synthèse des benzylamines via une substitution nucléophile	104
Schéma 3.54. Synthèse d'une benzylamine via un dérivé tosylé	105
Schéma 3.55. Chloration d'un alcool primaire avec le chlorure de thionyle.....	105
Schéma 3.56. Synthèse des benzylamines via une substitution nucléophile	105
Schéma 3.57. Rétrosynthèse des produits de la série thiophène via une synthèse convergente	106
Schéma 3.58. Synthèse des précurseurs acide carboxylique.....	106
Schéma 3.59. Synthèse des précurseurs de type acide carboxylique	107
Schéma 3.60. Synthèse des produits de la série thiophène via un aminothiophène.....	107
Schéma 3.61. Synthèse des produits de la série thiophène via un aminothiophène.....	108
Schéma 3.62. Rétrosynthèse des produits de la série thiophène via une S _N Ar.....	108
Schéma 3.63. Synthèse des produits de la série thiophène via une S _N Ar	108
Schéma 3.64. Mécanisme proposé pour la formation d'un dérivé guanidine en présence d'un excès d'HBTU.....	110
Schéma 3.65. Synthèse d'un amide et d'un dérivé guanidine.....	110
Schéma 3.66. Réduction des dérivés nitrothiophéniques par du fer en milieu acide.....	110
Schéma 3.67. Rétrosynthèse des composés de la série de type pyrrole	111
Schéma 3.68. Synthèse du précurseur acide carboxylique de type pyrrole	112
Schéma 3.69. Mécanisme proposé pour l'amination du 1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxylate de méthyle via un iodane λ^3 asymétrique	112
Schéma 3.70. Synthèse du précurseur acide carboxylique via une S _N Ar et une saponification.....	112
Schéma 3.71. Synthèse du précurseur acide carboxylique via une S _N Ar et une saponification	113
Schéma 3.72. Rétrosynthèse des composés de la série de type 3-hydroxypyrrole ou 3-hydroxythiophène	114
Schéma 3.73. Synthèse des composés de la série de type 3-hydroxypyrrole ou 3-hydroxythiophène.....	115
Schéma 3.74. Formation du dérivé monobromé 6 via un intermédiaire cétonique α - β insaturé.....	116
Schéma 3.75. Halogénéation du 3-hydroxy-thiophène-2-yl-carboxylate de méthyle via une élimination γ	118
Schéma 3.76. Mécanisme d'halogénéation du 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle par le SO ₂ Cl ₂	119
Schéma 3.77. Bromation et iodation du dérivé ALIPF155	119
Schéma 3.78. Chloration du <i>N</i> -méthyl 3-hydroxy-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl-carboxylate de méthyle en présence de SO ₂ Cl ₂ et du zinc.....	120
Schéma 3.79. Couplage de type Buchwald-Hartwig entre les dérivés halogénés et une aminopyrimidine	122

Schéma 3.80. Synthèse du dérivé aminopyrimidino hétérocyclique via une S_NAr	122
Schéma 3.81. Rétrosynthèse du précurseur aminopyrimidino hétérocyclique via une S_NAr ...	123
Schéma 3.82. Synthèse des précurseurs de type acide carboxylique via un hétérocycle aminé.....	124
Schéma 3.83. Synthèse du précurseur 3-hydroxythiophène porteur d'une fonction acide carboxylique	124
Schéma 3.84. Synthèse du 3-hydroxythiophène azoturé en C5(α')	124
Schéma 3.85. Saponification d'ALIPF174	127
Schéma 3.86. Synthèse aboutissant au précurseur acide carboxylique.....	127
Schéma 3.87. Aminolyse sur le dérivé ALIPF174	128
Figure 4.1. Test d'inhibition de DOT1L par scintillation (<i>Scintillation Proximity Assay, SPA</i>)..	132
Figure 4.2. Structures des cristaux de A) DOT1L-SAM (PDB : 3QOW) et B) DOT1L-EPZ004777 (43) (PDB : 4EKI), et C) superposition de (43) du cristal 4ER5 (en rose) et le résultat de son modélisation moléculaire (couleurs CPK) par notre méthode (AMBER).	133
Figure 4.3. Images de modélisation moléculaire des inhibiteurs au site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5).....	136
Figure 4.4. Modélisation moléculaire d'ALIPF220 dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5).	139
Figure 4.5. Modélisation moléculaire d'ALIPF197 et ALIPF200 dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5).	140
Figure 4.6. Remplacement du motif aminopyrimidine par un motif diaminotriazine.	141
Figure 4.7. Modélisation moléculaire du composé ALIPF282 dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5).....	143
Figure 4.8. Inhibition de DOT1L par les composés synthétisés modifiant la nature de la partie A et de la partie B, ainsi que la longueur et la nature de la chaîne liant la partie B et la partie C.	144
Figure 4.9. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs non nucléosidiques de DOT1L	145
Figure 4.10. Inhibition de DOT1L.	145
Figure 4.11. cLogP des composés montrant une activité < 5 % et > 50 % sur DOT1L à une concentration de 32 μ M.	146
Figure 4.12. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique.....	147
Figure 4.13. Principe du test d'inhibition de DNMT3a par fluorescence	148
Figure 4.14. Inhibition de DNMT par les composés synthétisés.	149
Figure 4.15. Etude des composés montrant une inhibition de DNMT supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M.....	150
Figure 4.16. Alignement d'ALIPF213 au sein de DNMT (PDB : 2HR1).	151
Figure 4.17. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs de DNMT.....	150
Figure 4.18. Inhibition de DNMT par les composés de type thiophénique.	152
Figure 4.19. cLogP des composés montrant une activité < 20 % et > 50 % sur DNMT à une concentration de 32 μ M.	153

Figure 4.20. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique.....	153
Figure 4.21. Inhibition d'un panel d'HMTs par les composés synthétisés.	155
Figure 4.22. Etude des composés montrant une inhibition de PRMT4 supérieure à 70 % à une concentration de 32 μ M.....	156
Figure 4.23. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique.....	157
Figure 4.24. Evaluation de l'activité des composés sélectionnés sur différentes cibles épigénétiques.	158
Figure 4.25. Composés montrant un profil d'activité plus ou moins spécifique.	158
Figure 5.1. Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L.....	161
Figure 5.2. Composés cibles de type phénylurée et benzimidazole	162
Figure 5.3. Composés possédant une inhibition de DOT1L supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M.....	163
Figure 5.4. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs non nucléosidiques de DOT1L	163
Figure 5.5. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique.....	164
Figure 5.6. Composés possédant une inhibition de DNMT3a supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M.....	165
Figure 5.7. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs de DNMT	165
Figure 5.8. Pharmacomodulations pour des inhibiteurs de DNMT	166
Figure 5.9. Composés possédant une inhibition de PRMT4 supérieure à 90 % à une concentration de 32 μ M.....	166
Figure 5.10. Figure 4.23. Composés montrant un profil d'activité plus ou moins spécifique ...	167
Figure 6.1. DOT1L activity test by Scintillation Proximity Assay (SPA)	225
Figure 6.2. DNMT3a activity test by fluorescence.....	226

Liste de Tableaux

Tableau 3.1. Conditions réactionnelles évaluées pour l'obtention des amines secondaires via une S_N	77
Tableau 3.2. Synthèse des amines de type 2-alkylbenzimidazole via une ouverture de lactame	89
Tableau 3.3. Optimisation des couplages de type peptidique	95
Tableau 3.4. Synthèse des amides de type benzénique via un couplage de type peptidique...	96
Tableau 3.5. Synthèse des amides de type thiophénique via un couplage de type peptidique	109
Tableau 3.6. Synthèse des produits de la série thiophène via une S_NAr	111
Tableau 3.7. Bromation du 3-hydroxy-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle dans différentes conditions réactionnelles	116
Table 3.8. Rendement de la réaction de bromation des 3-hydroxypyrrroles et 3-hydroxythiophènes dans les conditions expérimentales A à différentes durées.	117
Table 3.9. Optimisation d'une chloration régiosélective du 3-hydroxy-1-méthyl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle	120
Table 3.10. Monochloration des 3-hydroxypyrrroles et 3-hydroxythiophènes	121
Tableau 3.11. Réduction de l'azoture (ALIPF156) par différentes méthodes	125
Tableau 3.12. Couplage de l'aminothiophène (ALIPF159) au dérivé aminopyrimidine halogéné	126
Tableau 3.13. Produits cibles synthétisés	129
Tableau 4.1. Activité des précurseurs (partie A + partie B) sur DOT1L	134
Tableau 4.2. Activité sur DOT1L de la série des amides secondaires de type benzénique	135
Tableau 4.3. Activité sur DOT1L de la série des amides tertiaires de type benzénique	137
Tableau 4.4. Activité sur DOT1L de la série de type phénolique	138
Tableau 4.5. Activité sur DOT1L de la série de type amine	139
Tableau 4.6. Activité sur DOT1L de la série de type benzimidazole	140
Tableau 4.7. Activité sur DOT1L de la série des composés de type thiophénique.....	142
Tableau 4.8. Conditions des tests enzymatiques sur des HMTs	154

Abréviations

μO	Micro-Ondes
06-MGMT	O ⁶ -methylguanine ADN méthyltransferase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALL	leucémie lymphoblastique aiguë
Ar	Aryle
ARN	Acide ribonucléique
AZA	Azacitidine
BAH	<i>Bromo-Adjacent Homology</i>
BAH	<i>Bromo-Adjacent Homology</i>
BRCA1	cancer de sein 1
CARM1	<i>Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1</i>
CDH1	Cadhérine E
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
CDI	DarbonylDilmidazole
CDK	Kinases Cyclin-Dependent
CDKN1C	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C</i>
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CRO	oligonucleotides d'ARN chimérique
CXXC	<i>CXXC-type zinc finger domain</i>
d	Doublet
DAPK	<i>Death-Associated Protein Kinase</i>
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	DicClohexylCarbodiimide
dd	Doublet dédoublé
DIB	Diacétate d'IodoBenzène
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DNMT	ADN MéthylTransférerase
DNMTi	inhibiteurs de DNMT
DOT1L	<i>DOT1 like, disruptor of telomeric silencing</i>
EDCU	diméthylamino-propyléthylcarbodiimide
EGCG	(-)-EpiGalloyCatechin 3-Gallate

EMA	Agence Européenne des Médicaments
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
Eq.	Equivalent
ER	Récepteurs à œstrogènes
EZH2	<i>Enhancer of Homolog Zeste 2</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLP	<i>G9a-Like Protein</i>
H	Histone
H3K79	Lys79 de l'histone 3
HBTU	1-hydroxybenzotriazole (HOBt) / <i>N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)-méthylène]-N-méthylméthanaminium hexafluorophosphate N oxide</i>
HDAC	Histone DésAcétylase
Het	Hétérocycle
HKMT	Histone Lysine MethylTransferases
HMT	Histone Méthyltransférase
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i> (Cribrages Haut Débit)
IC₅₀	<i>Constante Inhibitrice 50</i>
IDH	Indice de Développement Humain
IGF	Interconversion de Groupement Fonctionnel
INC	Institut National du Cancer en France
IPP	interaction protéine–protéine
<i>i</i>-Pr	Isopropyle
iPSCs	cellules souches pluripotentielles induites
IR	<i>Infrared spectra</i>
Ka	Constante d'association
Kd	Constante de dissociation
Ki	Constante d'Inhibition
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
LLA	Leucémie Lymphoïde Aiguë
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique

LMMC	leucémie myélomonocytaire chronique
m	Multiplet
mES	<i>mouse Embryonic Stem</i>
miARN	micro ARN
MST	<i>MicroScale Thermophoresis</i>
NBS	<i>N-bromosuccinimide</i>
NK	Natural Killers
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NMM	<i>N-méthylmorpholine</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P15^{INK4b}	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor B</i>
P16^{INK4a}	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor A</i>
p300/CBP	<i>CREB-binding protein</i>
PBD	<i>PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) Binding Domain</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline Tween-20
PCC	ChloroChromate de Pyridinium
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen Binding Domain</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDCD4	<i>Programmed Cell Death 4</i>
PHD	<i>Plant Homology Domain</i>
PHD	<i>Plant Homology Domain</i>
PM	Poids moléculaire
PRC2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
PRMT	Protein arginine <i>N</i> -MethylTransferases
PTAB	tribromure de phényltriméthylammonium
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PWWP	<i>Proline-Triptophan-Triptophane-Proline</i>
PyBOP	benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidine)phosphonium hexafluorophosphate
q	Quadruplet
RARβ2	Récepteur à l'Acide Rétinoïque B2
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
s	Singulet

SAH ou AdoHcy	S-Adénosyl-L-Homocystéine
SAM ou AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
SET	Su[<i>var</i>]3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
siARN	petits ARN interférents
SMD	Syndromes Myélodysplasiques
S_NAr	Substitution Nucléophile Aromatique
SRC-3	<i>Steroid Receptor Coactivator-3</i>
t	Triplet
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -Butyle
TCDI	1,1'-thiocarbonyldiimidazole
TEA	Triéthylamine
TER	<i>Treatment Emergent Resistance</i>
THF	Tétrahydrofurane
TIMP3	<i>TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3</i>
TIMP-3	métalloprotéinase 3
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
TMA	TriMéthylAluminium
TMS	Tétraméthylsilane
TRF	<i>Targeting Replication Foci</i>
TRF	<i>Targeting Replication Foci</i>
TSG	Gènes Suppresseurs de Tumeurs
TSM	Taux Standardisés à la population Mondiale
VS	<i>Virtual Screening</i> (Criblages Virtuels)

Introduction

Le cancer forme un enjeu de santé publique fort au niveau mondial. D'après l'OMS et son projet GLOBOCAN (www.who.int/cancer/en), en 2012, 14,1 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès suite à un cancer ont été enregistrés. De plus, il a été estimé une augmentation de 70 % de nouveaux cas pour 2030.[1,2] Bien que sa mortalité diminue depuis deux décennies, au moins pour certains types de cancer, son incidence globale augmente en raison du vieillissement de la population, de la généralisation des techniques d'exploration et dépistage et des causes environnementales.

Malgré les traitements disponibles (la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie), il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies contre le cancer plus efficaces et moins envahissantes. D'une part, les médicaments cytotoxiques « classiques » ou antinéoplasiques présentent de nombreux inconvénients comme des phénomènes de résistance, de récurrence et de haute toxicité pour toutes les cellules à prolifération rapide. D'autre part, les thérapies ciblées présentent des résistances qui entraînent parfois l'échec de ces thérapies. De nouvelles approches ont été développées ces dernières années comme celle de la régulation épigénétique du cancer. Cette approche impliquant une reprogrammation cellulaire a montré des résultats très intéressants et prometteurs,[3,4] comme des inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC) en essais cliniques ou mis sur le marché (par exemple, panobinostat en 2015).[5]

Il a été démontré que dans une situation tumorale, le profil épigénétique est dérégulé.[6] Nous nous sommes ainsi intéressés au profil de méthylation de l'ADN et des histones, et plus particulièrement à l'inhibition de DOT1L, une histone méthyltransférase (HMT) impliquée dans la leucémie *MLL-r*.

La leucémie *MLL-r* est caractérisée par une translocation du gène *MLL* conduisant à l'expression de l'histone méthyltransférase *MLL* inactive. Cette protéine recrute DOT1L avec d'autres partenaires de fusion tels que AF4, AF9, AF10, ENL, ELL. L'activité accrue de DOT1L, méthylation du résidu Lys79 de l'histone 3 (H3K79), conduit à l'expression d'oncogènes (comme *HOXA9*, *HOXA10* et *MEIS1*) liés à la leucémie.[7–10] Il a été démontré que l'inhibition de DOT1L conduit à l'hypométhylation de ces gènes, ce qui implique leur répression. Les inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) stoppent la prolifération spécifiquement des cellules leucémiques *MLL-r*, tout en arrêtant le cycle cellulaire, et conduisant à la différenciation et à l'apoptose (**figure 1**).[10]

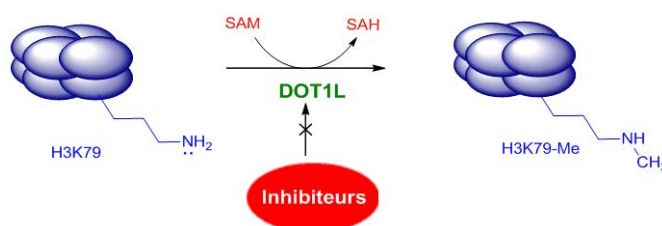


Figure 1: Action des inhibiteurs de DOT1L

A ce jour, les inhibiteurs nucléosidiques de DOT1L comme les composés **EPZ004777** et **EPZ-5676** (pinometostat) ont montré des bons résultats biologiques, malgré leur faible stabilité chimique et pharmacologique. D'ailleurs, des essais cliniques récemment achevés ont été réalisés avec le composé **EPZ-5676** dans le traitement de la leucémie et les syndromes myélodysplasiques (SMD) (ClinicalTrials.gov : NCT02141828 et NCT01684150). Bien qu'il montre une efficacité insuffisante en monothérapie, une étude d'échelonnement de Phase I avec des patients pédiatriques, débuté en 2014, et des études précliniques en combinaison avec d'autres agents anticancéreux sont actuellement en cours.[11] Il est donc nécessaire de développer des nouveaux inhibiteurs de DOT1L, plus stables avec une activité biologique intéressante.

L'HMT DOT1L et l'ADN méthyltransférase (DNMT) utilisent toutes les deux le cofacteur SAM pour leur activité catalytique. Notre projet est de concevoir et de synthétiser de nouveaux inhibiteurs potentiels de DOT1L à partir d'une approche mimant ce cofacteur. Des motifs structuraux des inhibiteurs de référence, ainsi que d'un inhibiteur de DNMT, le composé **SGI-1027**, ont été considérés et modulés. Ces composés sont constitués de trois parties : A) partie aminopyrimidine ou triazinique, B) noyau benzénique, phénolique ou hétérocyclique et C) une chaîne portant une phénylurée ou un benzimidazole. Les composés ont été obtenus selon des voies de synthèse multi-étapes optimisées faisant appel à différents types de réactions : réactions de substitution nucléophile aromatique (S_NAr), hydrogénation catalytique, oxydation de Swern, réduction, halogénéation d'hétérocycles, amination réductrice, réaction de Gabriel, réaction de Mitsunobu, couplage de type peptidique, couplage Buchwald-Hartwig, couplage d'Ullman.

Les différentes parties de nos composés ont été modulées afin d'explorer le site catalytique de DOT1L. Les pharmacomodulations ont été guidées par les résultats préliminaires de l'activité des composés sur l'enzyme (déterminé par la technique de scintillation utilisant le cofacteur SAM radiomarqué) et par des études de modélisation moléculaire utilisant les données cristallographiques de l'enzyme co-cristallisée avec les inhibiteurs de référence.

L'activité des composés sur DNMT et sur d'autres HMTs SAM-dépendantes a été déterminée afin d'étudier leur spécificité et d'identifier d'éventuels inhibiteurs mixtes. En effet, étant donné le *crosstalk* de la méthylation de l'ADN et des histones, une approche multi-cible serait intéressant dans le développement des molécules possédant un effet anticancéreux renforcé.[12–15]

Chapitre 1 : Généralités

1.1. Epidémiologie des cancers	28
1.2 Les cancers	30
1.3 L'épigénétique	35
1.4 La méthylation : une modification épigénétique.....	37
1.5 DOT1L (DOT1 Like, disruptor of telomeric silencing)	52
1.6 Méthylation de l'ADN et la méthylation des histones : le <i>crosstalk</i>	64

Chapitre 1 : Généralités

1.1. Epidémiologie des cancers

Le cancer est un problème majeur de santé publique au niveau mondial. D'après l'OMS et son projet GLOBOCAN, en 2012, 14,1 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès suite à un cancer ont été enregistrés. De plus, il a été estimé une augmentation de 70 % de nouveaux cas pour 2030.[1,2]

Bien que les régions avec un indice de développement humain élevé (IDH) montrent une incidence plus importante que les régions possédant un IDH moins élevé, les premières représentent une proportion globale moins importante que les deuxièmes. Ainsi, 57 % (8 millions) de nouveaux cas et 65 % (5,3 million) de décès par cancer sont enregistrés dans les régions les moins développées de la planète (**figure 1.1**).[1,2]

Taux d'incidence estimé de cas de cancers au niveau mondial en 2012. L'âge est standardisé, les deux sexes sont inclus et le cancer de peau non-mélanome est exclu.

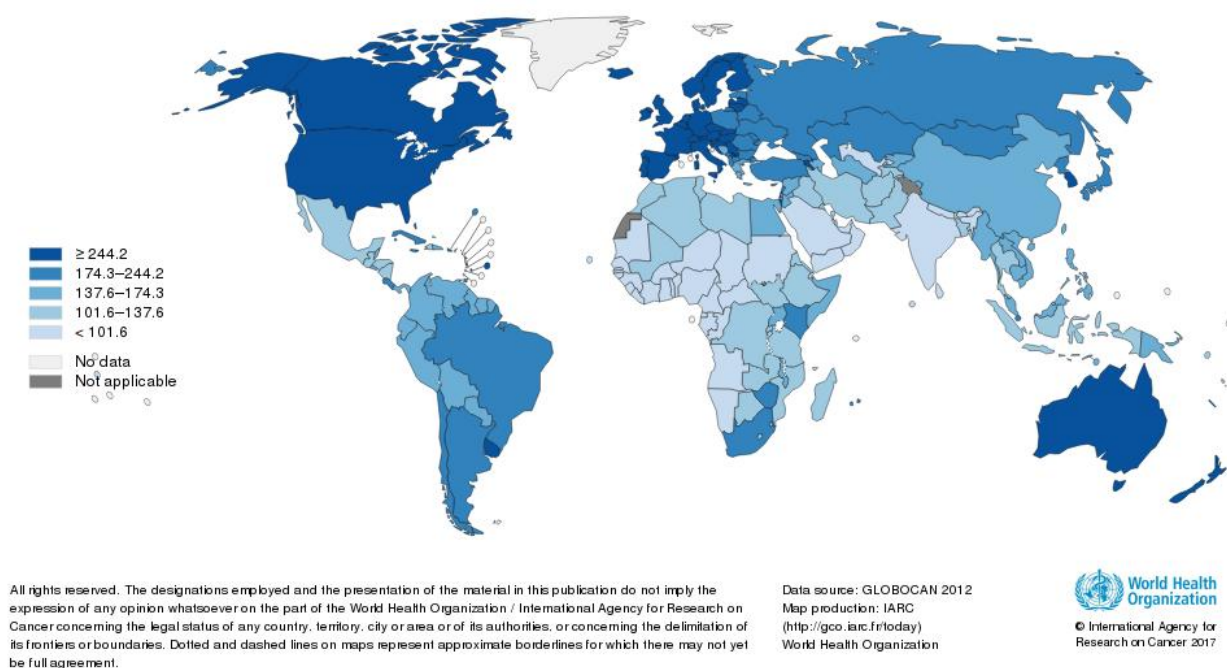


Figure 1.1 : Taux d'incidence estimé de cas de cancers au niveau mondial en 2012. Adaptée de GLOBOCAN 2012.[2]

D'après l'Institut National du Cancer en France (INC), environ 384 442 nouveaux cas et 149 456 décès par cancer en France Métropolitaine ont été estimés en 2015.[16,17] De manière générale, en France un gradient Nord-Sud est observé aussi bien chez l'homme que chez la femme. Les régions du Nord de la France présentent sur la période 2005-2009 les taux d'incidence les plus élevés. Le Nord-Pas-de-Calais a un taux d'incidence de 489,6 pour 100 000 chez l'homme et 304,3 pour 100 000, chez la femme. Les taux de mortalité par rapport à la moyenne française

sur la période 2005-2009 sont de plus de 34 % chez l'homme et de plus de 16 % chez la femme (figure 1.2).⁴

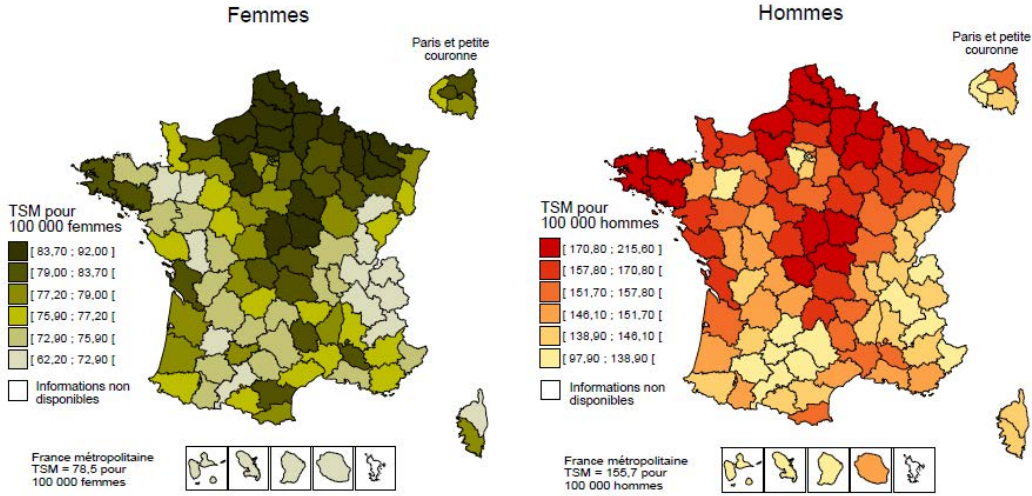


Figure 1.2. Taux standardisés à la population mondiale (TSM) de mortalité par cancer à l'échelle départementale en France métropolitaine et dans les DOM (2005-2009). *Extrait de ©Les cancers en France, Les Données, INCa, édition 2015.*⁴

A l'échelle internationale, le cancer du poumon, suivi du cancer du sein (chez les femmes) et le cancer colorectal sont les plus fréquents. Le cancer de poumon est le plus mortel, suivi du cancer du foie et du cancer colorectal (figure 1.3).^[2]

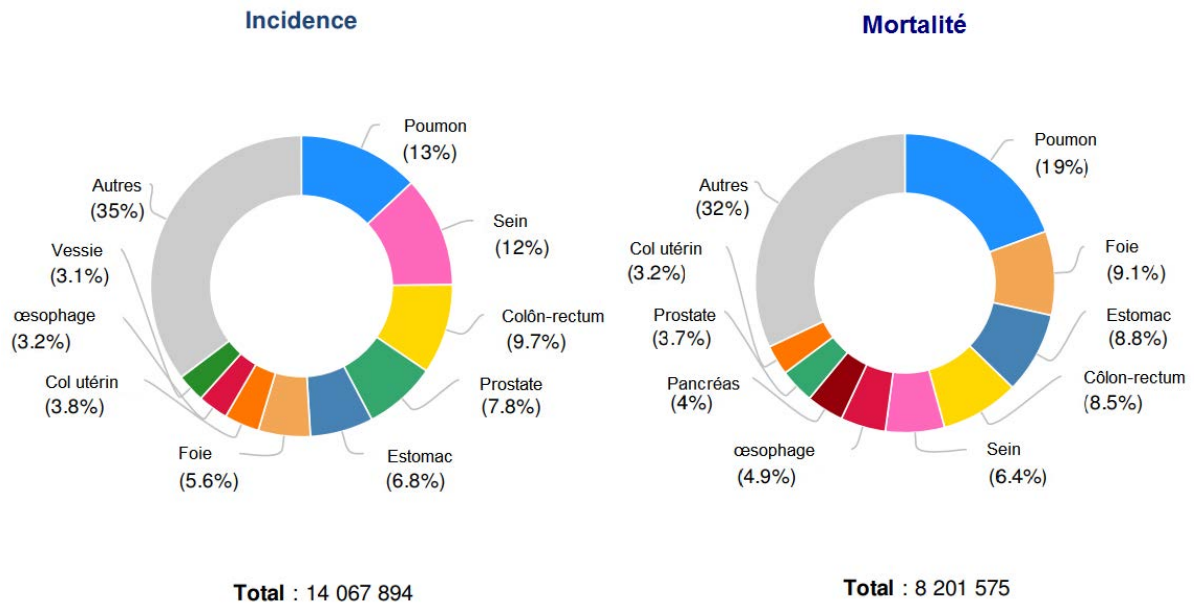


Figure 1.3. Incidence et mortalité estimées au niveau mondial, tous sexes confondus. *Adaptée de GLOBOCAN.*^[2]

En France Métropolitaine, le cancer de prostate (chez les hommes), suivi du cancer de sein (chez les femmes) et le cancer colorectal sont les plus fréquents. Le cancer de poumon est le plus mortel, suivi du cancer du cancer colorectal et du cancer du pancréas (figure 1.4).^[2]

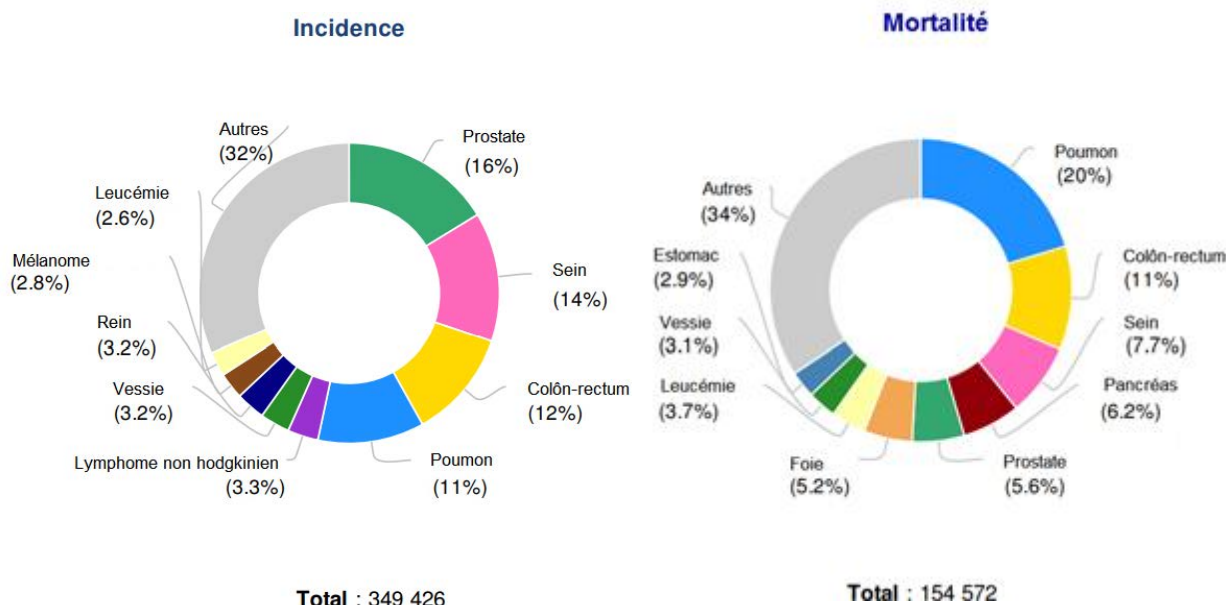


Figure 1.4. Incidence et mortalité estimées en France Métropolitaine, tous sexes confondus. Adaptée de GLOBOCAN.[2]

Les hémopathies malignes regroupent plusieurs maladies du système hématopoïétique, différentes du point de vue biologique, clinique et du pronostic. En 2012, le nombre de nouveaux cas d'hémopathies malignes en France métropolitaine est estimé à 35 000, ce qui représente 10 % des nouveaux cas de cancer. Bien que plus de la moitié des cas d'hémopathies malignes surviennent après 60 ans, chez les enfants de moins de 15 ans, les leucémies représentent 29 % des cas (dont 80 % de leucémies aiguës lymphoblastiques) et les lymphomes représentent 11 % des cas.[17]

Chez l'adulte, 5 % des LLA et entre 5 à 10 % des LMA présentent un réarrangement du gène *MLL*. Les réarrangements de *MLL* sont fréquents dans les leucémies chez l'enfant : 70 % des LLA et entre 35 à 50 % des LMA. D'ailleurs, la translocation du gène *MLL* est fréquente dans les leucémies survenues après un traitement avec des inhibiteurs de topoisomérase II. Même si les leucémies présentant des translocations du gène *MLL* montrent une faible incidence, il s'agit de cancers de mauvais pronostic, d'où l'intérêt des nouvelles thérapies.[9,18]

1.2 Les cancers

Chez l'Homme, les différents types de cellules se divisent et prolifèrent de façon contrôlée selon les besoins de l'organisme. Lorsque les cellules ont vieilli ou ont été en grande partie endommagées, elles activent le système de mort cellulaire programmée (apoptose), elles sont détruites et, selon le cas, sont remplacées par de nouvelles cellules. Le cancer correspond à une anomalie dans ce processus : l'ADN des cellules cancéreuses est endommagé ou modifié par différents facteurs, ce qui affecte leur cycle cellulaire. Les cellules ignorent ainsi les signaux limitant

leur prolifération et elles échappent aux phénomènes d'apoptose. Ces cellules anormales se multiplient et se propagent de façon anarchique. De façon générale, on distingue deux types de cancers : ceux qui touchent le système hématopoïétique et ceux dits « solides » entraînant la formation d'un amas cellulaire, la tumeur. Les cellules d'une tumeur sont localisées au sein du tissu d'un organe et peuvent éventuellement migrer vers d'autres parties du corps par la circulation sanguine pour former des métastases (**figure 1.5**).[19]

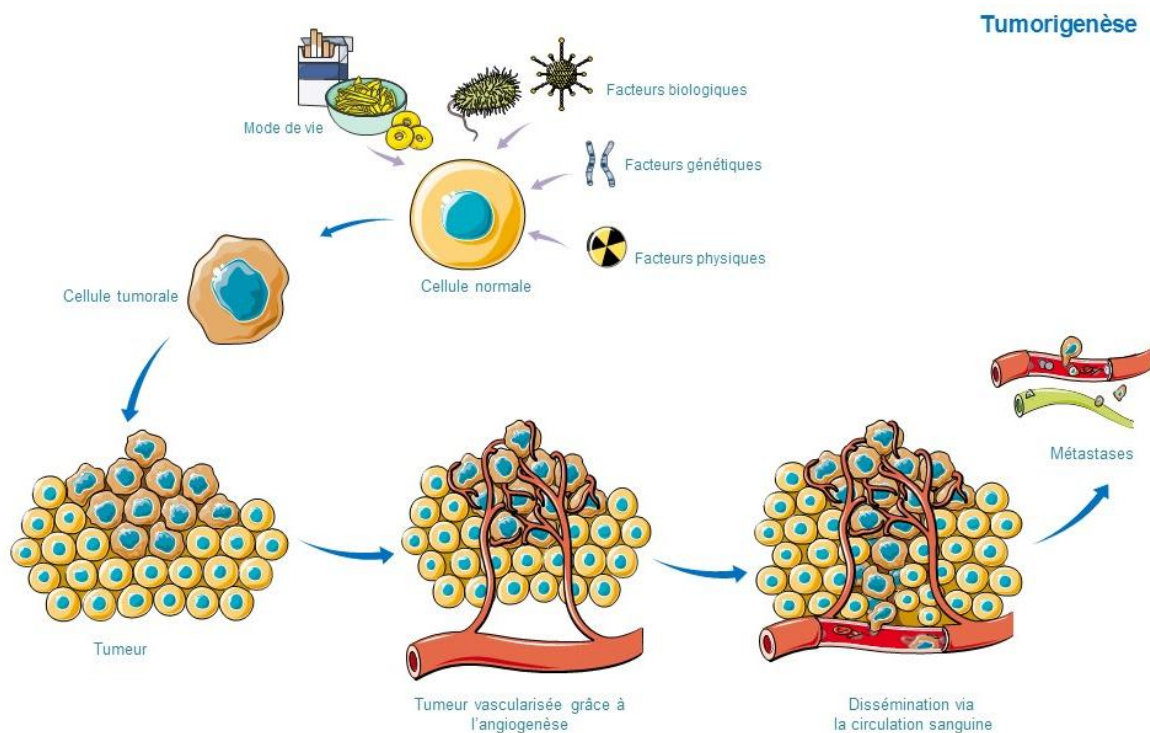


Figure 1.5. Processus de tumorigenèse

Les altérations cellulaires conduisant au processus de cancérogenèse sont dues à des agents extérieurs et à des facteurs génétiques du sujet.[17,20] Les *agents extérieurs* peuvent être des cancérogènes physiques (rayonnements, radiations, alimentations...), des cancérogènes chimiques (amiante, arsenic, tabac...) et des cancérogènes biologiques comme des infections dues à certains virus (Papillomavirus, virus de l'Hépatite B&C, virus de Epstein-Barr...), des parasites (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Schistosoma haematobium*...) et d'une bactérie (*Helicobacter pylori*). Les *facteurs génétiques* impliquant des mutations de certains gènes, des duplications, des translocations dans le génome, participent à la formation de cancers.[21] En particulier, certains gènes ont été identifiés pour jouer un rôle important dans la cancérogenèse :

- les proto-oncogènes, comme des gènes codant pour une protéine régulatrice du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire, devenant des oncogènes lorsqu'ils sont mutés ;
- les gènes suppresseurs de tumeurs (GST), des régulateurs de la division cellulaire, limitant la prolifération des cellules cancéreuses ;
- les gènes réparateurs de l'ADN, possédant comme rôle de détecter et réparer des erreurs commises lors de la réplication de l'ADN.

Dans le cas d'une cellule tumorale, l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose est bouleversé, et il y a une activation des oncogènes et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes réparateurs de l'ADN (**figure 1.5**).

Les mutations des gènes prolifératifs et antiprolifératifs provoquent une modification du cycle cellulaire des cellules cancéreuses les dotant de propriétés spécifiques (**figure 1.6**) :[19]

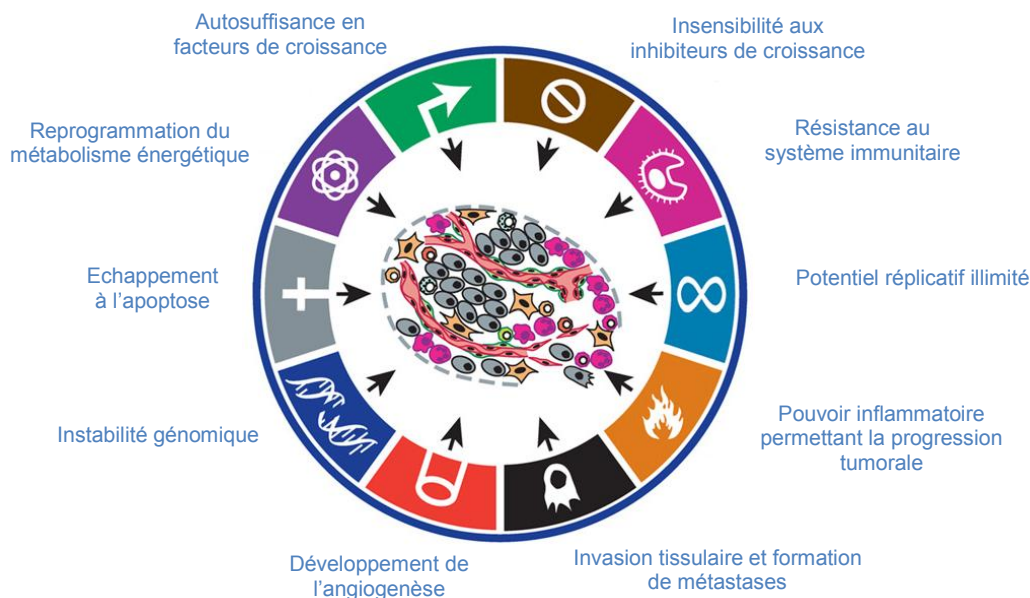


Figure 1.6. Propriétés des cellules cancéreuses. Adaptée de Hanahan D. et Weinberg 2011.[19]

1.2.1 Classification des cancers

Les cancers peuvent être classifiés selon différents critères.[1,16] Une classification oppose les tumeurs solides aux tumeurs des cellules sanguines. Les tumeurs solides, caractérisées par une masse individualisée, sont distinguées des cancers atteignant des cellules sanguines, qui sont diffuses dans l'organisme.

Bien que les cancers reçoivent leur nom selon l'organe touché (cancer de poumon, cancer de sein...), ils peuvent également être classifiés en fonction de leur histologie, la nature du tissu affectée. Ainsi, l'on distingue :

- Les *carcinomes*, où les cellules cancéreuses apparaissent dans un épithélium. Dans cette famille, on distingue les adénocarcinomes qui se développent à partir de l'épithélium d'une glande telle que le sein et la prostate.
- Les *sarcomes*, où les cellules cancéreuses apparaissent dans un tissu conjonctif ou « de support » comme les os, la graisse ou les muscles.
- Les *cancers hématopoïétiques* affectent le système hématopoïétique. C'est le cas des leucémies, des lymphomes et des syndromes myélodysplasiques.

1.2.1.1 Les leucémies

La leucémie correspond à l'ensemble des maladies prolifératives du système hématopoïétique. Ce dernier est constitué de différentes cellules (**figure 1.7**).

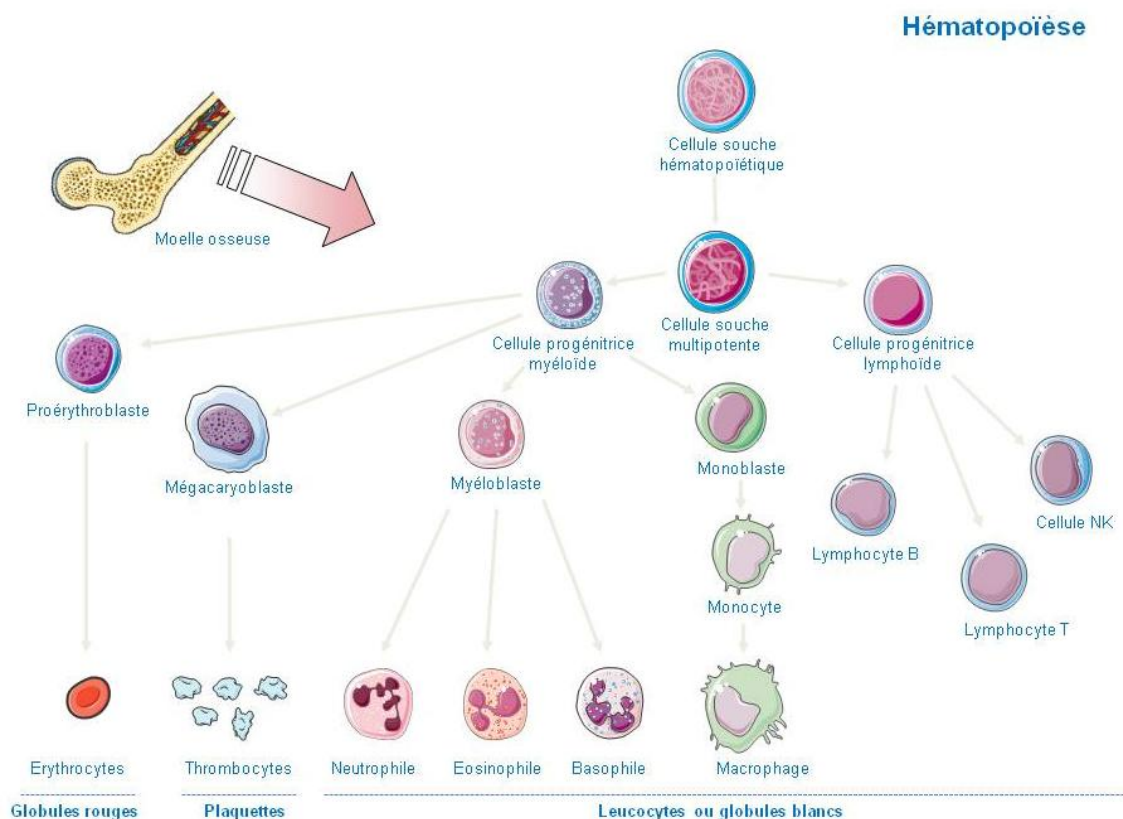


Figure 1.7. Cellules du système hématopoïétique

Les cellules sanguines sont issues d'une cellule souche sanguine commune qui se différencie pour donner naissance à deux lignées de cellules souches distinctes : myéloïde et lymphoïde.

Les *cellules souches myéloïdes* se différencient pour donner des érythrocytes (aussi nommés globules rouges), des thrombocytes (aussi nommés plaquettes), des myéloblastes et des monoblastes. Les myéloblastes se différencient en granulocytes et les monoblastes en monocytes.

Les *cellules souches lymphoïdes* se différencient en lymphoblastes qui donneront naissance aux lymphocytes B & T et aux cellules « *Natural Killers* » (NK). Les lymphocytes B sécrètent des anticorps. Les lymphocytes T synthétisent des facteurs solubles appelés cytokines et deviennent les acteurs de l'immunité à médiation cellulaire.

Les érythrocytes ont pour fonction de transporter l'oxygène vers tous les tissus du corps. Les plaquettes participent au phénomène de coagulation, impliquant la formation des caillots dans les

vaisseaux sanguins endommagés afin d'arrêter les saignements. Les monocytes, les macrophages et les granulocytes, ensemble avec les lymphocytes et les cellules « NK » composent les leucocytes (aussi nommés globules blancs) qui agissent sur les agents pathogènes selon différents mécanismes immunitaires (anticorps, cellulaire, phagocytose...).

La leucémie apparaît lorsque des cellules souches sanguines présentes dans la moelle osseuse subissent des altérations qui rendent leur mode de croissance et/ou leur comportement anormal. Ces cellules anormales, appelées cellules leucémiques, se multiplient peu à peu et finissent par envahir les cellules sanguines non altérées qui sont alors incapables d'accomplir leurs fonctions.

On peut classer les différents types de leucémies selon leur évolution : *aiguë* et *chronique*. La *leucémie aiguë* implique que la maladie s'installe rapidement : quelques jours ou quelques semaines à peine ont lieu entre les premiers symptômes et le diagnostic. Elle se caractérise par une augmentation du nombre de cellules non matures (blastes) et non fonctionnelles dans la circulation sanguine. Au contraire, la *leucémie chronique* s'installe progressivement et elle évolue lentement. Dans ce cas, des cellules matures non fonctionnelles sont présentes dans la circulation.

Parallèlement, on peut distinguer deux types de leucémies suivant la lignée cellulaire affectée : *leucémies myéloïdes* et *leucémies lymphoïdes*.

Ainsi, on distingue la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et la leucémie myéloïde chronique (LMC). La LMA est la forme la plus courante de leucémie aiguë chez les adolescents alors que la LMC touche surtout les adultes. Également, on distingue la leucémie lymphoïde aiguë (LLA) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC). La LLA est la forme la plus répandue de leucémie aiguë chez les jeunes enfants tandis que la LLC affecte principalement les personnes âgées de plus de 60 ans.

La leucémie myéloïde aiguë (LMA) montre de multiples différences au niveau morphologique et immunohistochimique. Elle est associée à des translocations du locus 11q23 (chromosome 11) avec d'autres partenaires chromosomiques comme les chromosomes 4, 6, 11 et 19. Les leucémies montrant des translocations du gène *MLL* au locus 11q23 sont des pathologies avec un pronostic très faible.[9,22] Nous nous sommes intéressés en particulier à la leucémie présentant des translocations du gène *MLL* (leucémie « myeloid/lymphoid » ou « mixed-lineage leukemia »)

1.2.2. Traitements des cancers

Actuellement, malgré les traitements disponibles (la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie), il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies contre le cancer plus

efficaces et moins envahissantes. Les médicaments cytotoxiques « classiques » ou antinéoplasiques comme les alkylants, les agents intercalants, les anti-métabolites ou les agents endommageant l'ADN présentent de nombreux inconvénients comme des phénomènes de résistance, de récurrence et de haute toxicité pour toutes les cellules à prolifération rapide. Les thérapies ciblées, principalement des inhibiteurs de tyrosine kinase (anticorps monoclonaux et « petites molécules »), qui ciblent spécifiquement des mécanismes d'oncogenèse ont permis une grande évolution dans le traitement du cancer mais certains patients présentent des résistances qui entraînent parfois l'échec de ces thérapies.

La chimiothérapie est souvent utilisée en association avec la chirurgie et/ou la radiothérapie. Les anticancéreux peuvent être administrés en monothérapie ou en association pour des traitements personnalisés (médicaments possédant différents mécanismes d'action).

Aujourd'hui la connaissance du génome humain et de l'épigénétique a dirigé la recherche vers de nouvelles approches du traitement du cancer : en effet il est démontré qu'il est possible de moduler la réponse biologique en contrôlant l'accès aux informations génétiques via la régulation épigénétique.[23,24]

1.3 L'épigénétique

L'épigénétique est l'ensemble des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose mais n'entraînent pas de modifications dans la séquence d'ADN, menant à un phénotype héritable et stable.[6,23,25] Le programme épigénétique est crucial pendant le développement, du fait que la différenciation peut avoir lieu en réprimant ou en exprimant des gènes particuliers, et sa stabilité est essentielle pour mener à bien des fonctions cellulaires variées telles que l'inactivation du chromosome X, l'empreinte parentale, la variabilité...[23,26]

Chez les eucaryotes le matériel génétique est organisé dans une structure appelée chromatine, dont l'unité fonctionnelle est nommée nucléosome. Les nucléosomes sont composés d'un segment court d'ADN (~146 paires de bases) enroulé autour d'un octamère d'histones, deux histones de chaque classe, H2A, H2B, H3 et H4 (**figure 1.8**).[27,28]

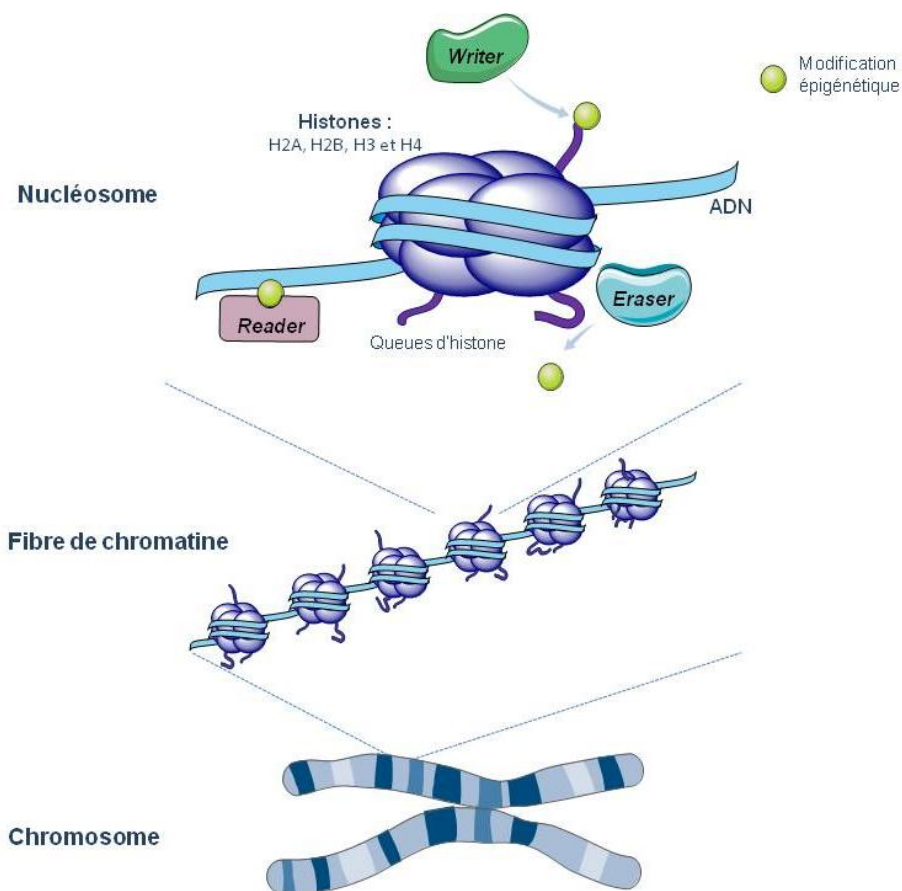


Figure 1.8. Représentation schématique de l'organisation du matériel génétique et de l'approche épigénétique

La chromatine peut adopter une configuration décondensée liée à la transcription génétique (*euchromatine*), mais aussi une configuration condensée liée à la répression de la transcription (*hétérochromatine*). Ces deux états de la chromatine sont définis par des modifications épigénétiques. Ces modifications concernent tant l'ADN que les histones, et elles sont étroitement liées.[29,3] Le profil épigénétique est contrôlé par les régulateurs épigénétiques qui sont sous-divisés en « *writers* », « *erasers* » et « *readers* ». Les « *writers* » catalysent l'addition des modifications épigénétiques comme les méthyltransférases et les acétyltransférases. Les « *erasers* » sont les enzymes qui effacent les modifications épigénétiques comme les histones déméthylases et les histones désacétylases. Enfin, les « *readers* » sont les protéines à domaine bromo, chromo, tudor... pouvant se lier à une modification spécifique et ainsi imposer une conformation particulière à la chromatine.[6,30,31]

Les deux phénomènes épigénétiques les plus étudiés sont la méthylation et l'acétylation. Ces phénomènes sur l'ADN et les histones sont étroitement liés et ils sont impliqués dans l'activation ou l'extinction des gènes.[26,23,24]

Ces dernières années, la recherche a pu montrer que la régulation épigénétique a un rôle clé dans la cancérogenèse et la progression tumorale. En effet, le profil épigénétique est altéré

dans une situation cancéreuse. Contrairement aux changements génétiques, qui sont irréversibles, les aberrations épigénétiques sont des modifications chimiques réversibles.[24,26] Ainsi, des molécules capables de rétablir l'équilibre épigénétique afin de reprogrammer les cellules représentent des outils thérapeutiques potentiels pour le traitement du cancer.[3–6,32]

1.4 La méthylation : une modification épigénétique

La méthylation est une des modifications épigénétiques les plus étudiées. Elle peut avoir lieu tant sur l'ADN que sur les histones et elle est impliquée dans l'activation ou la répression de la transcription génétique. Ces phénomènes sont étroitement liés l'un à l'autre, on parle de *crosstalk*.

1.4.1 Méthylation de l'ADN

Chez l'Homme, la méthylation de l'ADN est décrite comme un phénomène épigénétique stable. Elle a lieu en position 5 (C5) de la cytosine principalement au niveau des dinucléotides CpG grâce aux ADN méthyltransférases (DNMTs).[27,29]

Les dinucléotides CpG sont répartis de façon non uniforme dans le génome, avec une sous-représentation générale, mais un enrichissement dans de courtes régions, appelées îlots CpG, positionnées au niveau du promoteur d'environ 60 % des gènes.[25] De faibles niveaux ou un manque de méthylation d'ADN dans la région du promoteur, associés à une hyperméthylation globale, sont corrélés à une expression de gènes active en raison de la configuration « ouverte » de la chromatine, permettant l'interaction de l'ADN avec les complexes de transcription. En revanche, la méthylation d'îlots CpG dans le promoteur, associée à une hypométhylation globale, est corrélée à une configuration « fermée » de la chromatine, ainsi l'expression de gènes est bloquée (**figure 1.9**).[25,26]

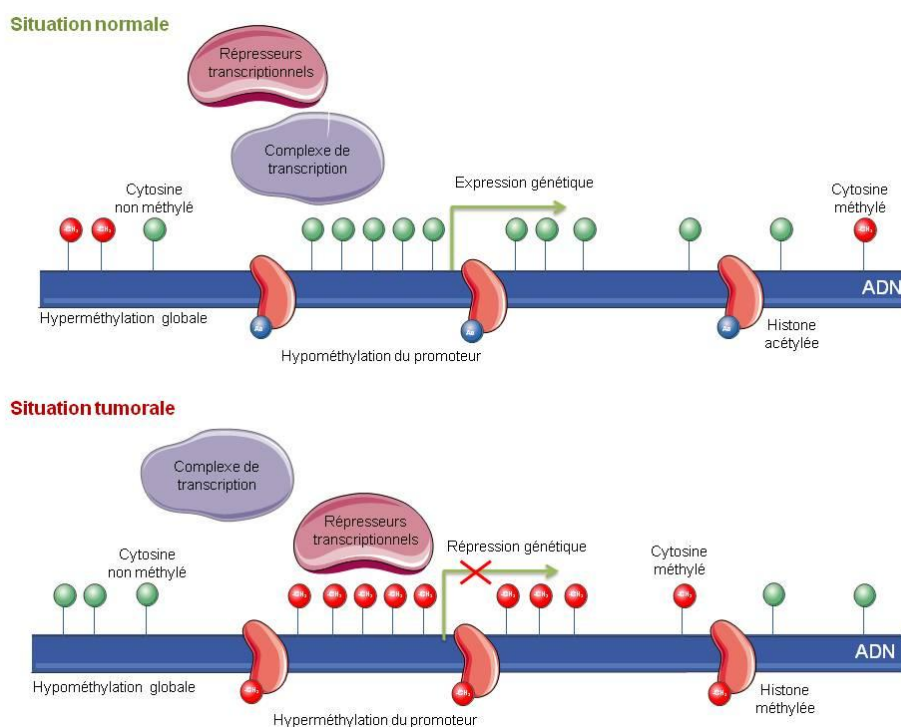


Figure 1.9. Différences des profils de méthylation dans les cellules normales et les cellules cancéreuses

La méthylation de l'ADN est responsable des profils d'expression génétique spécifiques à différents tissus et aux différents stades du développement. Les rôles de la méthylation de l'ADN au niveau des différentes parties des gènes font l'objet de nombreuses études ces dernières années.

La méthylation de l'ADN a un rôle important dans plusieurs fonctions biologiques : l'embryogenèse, l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X, la différenciation cellulaire... Néanmoins, le profil de méthylation de l'ADN peut être altéré, conduisant à une sur- ou sous-expression de gènes, ce qui mène aux pathologies diverses, comme la schizophrénie, le syndrome de Rett ou le cancer.[27,33–37]

Au cours de la tumorigenèse, il existe deux aberrations de la méthylation de l'ADN : l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs et l'hypométhylation du génome conduisant à une instabilité chromosomique et/ou à l'expression d'oncogènes. En effet, il a été mis en évidence que dans une situation tumorale il existe une hyperméthylation des régions promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs (GST) menant à leur extinction.[24,38] Les GST sont impliqués dans différents processus :

- le cycle cellulaire, tels que les inhibiteurs de kinases cyclin-dépendants (*CDK*) ou protéine du rétinoblastome (*RB*) ;
- l'intégrité du génome, tels que *TP53*, cancer de sein 1 (*BRCA1*), *O*⁶-methylguanine ADN méthyltransferase (*O6-MGMT*), mutL homolog 1 (*hMLH1*) ;
- l'apoptose, tels que *caspase 8*, *death-associated protein kinase (DAPK)* ;

- la migration cellulaire, tels que cadhérine E (*CDH1*), inhibiteur de métalloprotéinase 3 (*TIMP-3*)
- réponse aux facteurs de croissance, tels que le *phosphatase and tensin homolog (PTEN)*, les récepteurs à œstrogènes (*ER*)

Il est ainsi reconnu que le profil de méthylation joue un rôle de biomarqueur.[25,27] L'inhibition de la méthylation de l'ADN est donc une approche intéressante dans le traitement du cancer.[3,39–42]

1.4.1.1 Les ADN méthyltransférases (DNMTs)

Trois types de DNMTs, DNMT-1, -3a et -3b, catalysent le transfert d'un groupement méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM ou AdoMet) sur la position 5 de la cytosine principalement dans les dinucléotides CpG.[34]

DNMT1 a été la première ADN méthyltransférase décrite. Elle est la plus abondante dans les cellules somatiques, possède 1616 acides aminés et présente trois isoformes dans la plupart des cellules eucaryotes : DNMT1s (*somatic cells*, cellules somatiques), DNMT1o (oocyte) et DNMT1p (pachytène). La DNMT1 est une méthylase de maintenance : elle a une affinité plus importante pour l'ADN hémi-méthylé (où les CpGs sont méthylés sur un seul brin d'ADN et non sur l'autre) que pour l'ADN non-méthylé, elle intervient donc principalement dans la méthylation des brins récemment synthétisés après la réplication d'ADN, assurant la transmission du profil de méthylation de la cellule mère aux cellules filles. En effet, l'inactivation du gène *DNMT1* chez la souris peut conduire à une déméthylation importante du génome et à la létalité de l'embryon. Dans les cellules normales, le *knockout* partiel ou total de *DNMT1* produit l'apoptose, des défauts mitotiques graves et la tumorigenèse étant donné l'instabilité chromosomique. Dans les cellules cancéreuses, l'inactivation de DNMT1 peut permettre d'arrêter la croissance tumorale et de repousser le stade de non-différenciation sans augmenter l'invasion des cellules. Ainsi, elle se révèle être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer.[27]

DNMT3a et **DNMT3b** aident DNMT1 au processus de méthylation pendant la réplication. A la différence de DNMT1, DNMT3a et DNMT3b sont présentes de façon moins importante dans les cellules somatiques, et elles ne possèdent pas une affinité particulière pour les sites CpG hémi-méthylés ou non-méthylés. Même si elles participent dans la méthylation de maintien, leur rôle principal est la méthylation *de novo*. DNMT3a est impliquée dans le mécanisme de l'empreinte parentale et elle méthyle principalement les régions pericentromériques de l'ADN. DNMT3b pourrait méthyle les régions centromériques de l'ADN, et des altérations de celle-ci conduisent aux syndromes d'immunodéficience et aux instabilités centromériques. Il existe deux isoformes différentes de DNMT3a, tandis qu'il y en a plus de 30 de DNMT3b.[43,44]

DNMT3L est une protéine qui ne présente pas de site catalytique et donc ne montre pas une activité propre. En réalité, elle est le coactivateur de DNMT3a et de DNMT3b, et elle participe dans l'interaction avec les différents acteurs de la chromatine. Ceci permet une augmentation de l'activité d'un facteur de 1,3 à 4.[44,45]

La cristallographie aux rayons X du complexe DNMT3a/3L montre la formation d'un tétramère (DNMT3L-3a-3a-3L), ce qui suggère une méthylation simultanée de deux sites CpG séparés à une distance d'environ 10 pb. À noter, TRDMT1 correspond à une enzyme appelée auparavant DNMT2, mais elle est réellement une ARN C5 méthylase.[27]

Les DNMTs possèdent des caractéristiques communes : un domaine C-terminal bien conservé entre les différentes espèces, responsable de l'activité catalytique et contenant des motifs I à X qui forment le site de liaison avec le cofacteur SAM et le substrat (cytosine). Elles ont un domaine N-terminal contenant le motif ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) et le motif PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro), responsable de la reconnaissance du nucléosome. Ces motifs sont responsables de la liaison à l'ADN et aux protéines guidant les DNMTs au noyau, à la chromatine et à l'ADN (**figure 1.10**).[27,46,47]

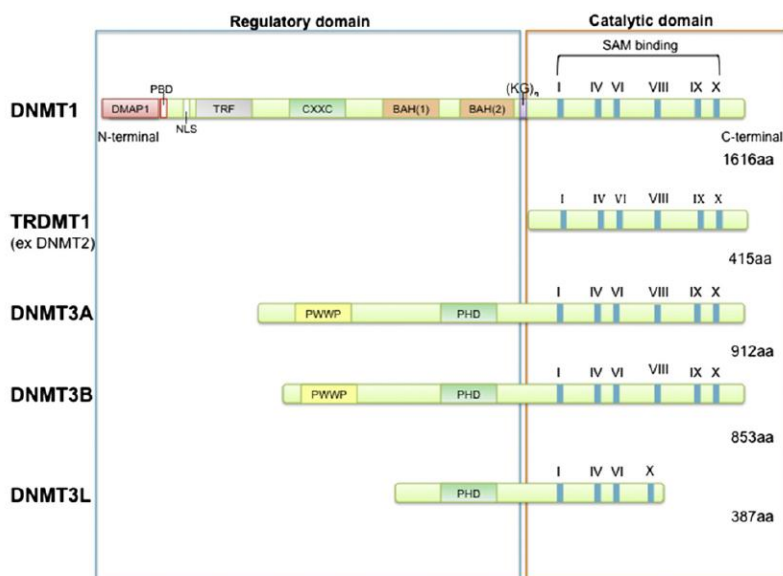


Figure 1.10. Représentation des DNMTs. Le domaine N-terminal possède des motifs permettant l'interaction avec l'ADN et d'autres protéines. Le domaine C-terminal contient 10 motifs bien conservés dans la famille de DNMTs. PBD : PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen Binding Domain*) ; BAH : *Bromo-Adjacent Homology* ; PHD : *Plant Homology Domain* ; NLS : *Nuclear Localization Signal* ; CXXC : *CXXC-type zinc finger domain* ; PWWP : *Proline-Tryptophan-Tryptophane-Proline* et ; TRF : *Targeting Replication Foci*. *Extraite de Gros et al. 2012.*[27]

1.4.1.2 Mécanisme catalytique des DNMTs

Le mécanisme de transfert du groupement méthyle du cofacteur SAM sur la position 5 de la cytosine est commun à toutes les méthyltransférases quelle que soit l'espèce. La cytosine est exposée à l'extérieur de l'hélice d'ADN vers la cavité catalytique de l'enzyme (**figure 1.11-A**). Le thiol de la cystéine dans le motif IV réalise une attaque nucléophile en position 6 de la cytosine

pour former l'énamine correspondante. Le tripeptide ENV dans le motif IV, contenant un résidu de glutamine, permet la protonation du N3. À son tour, la double liaison de l'énamine attaque le méthyle sur le soufre du cofacteur SAM. Une β élimination réalisée par une base (particulière au type de DNMT) dans le site actif permet la libération d'une molécule de S-Adénosyl-L-Homocystéine (SAH ou AdoHcy), le recyclage de l'enzyme et la libération du substrat méthylé (figure 1.11-B).[27]

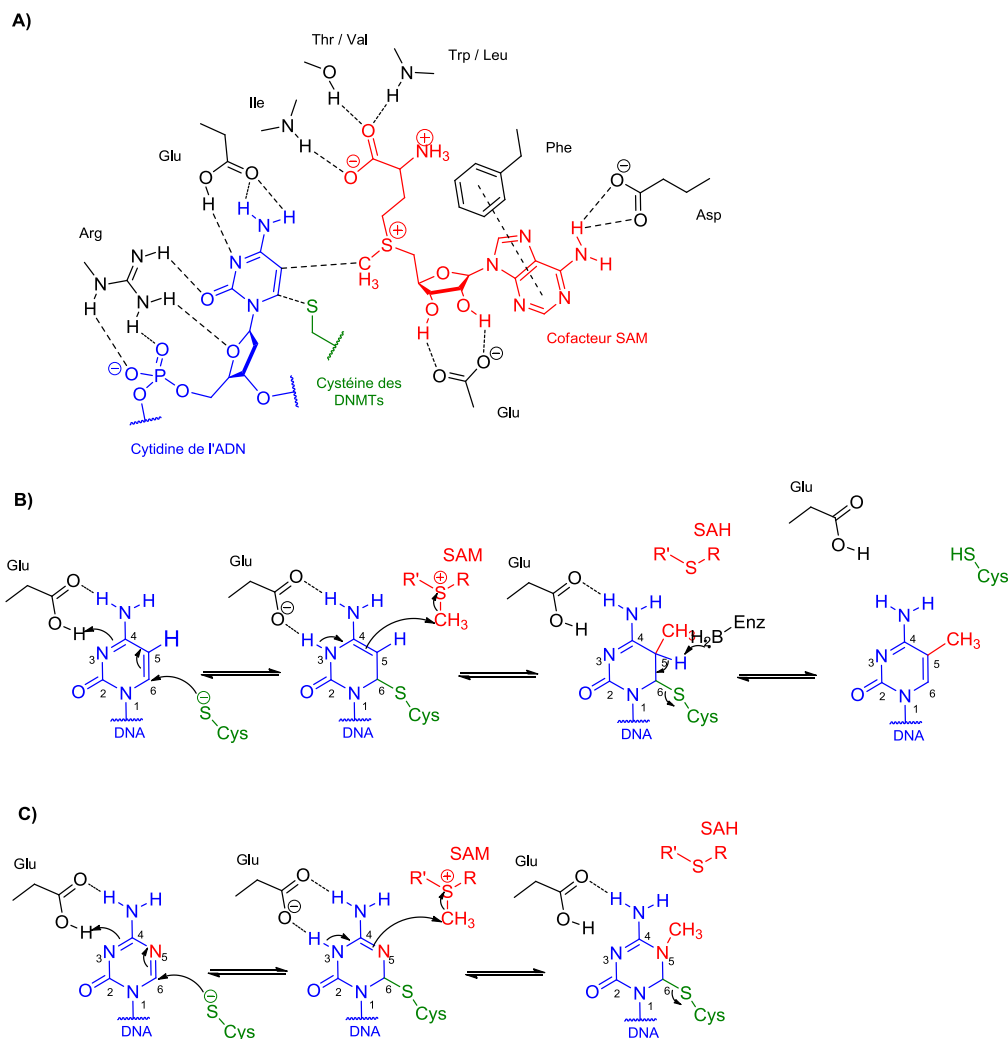


Figure 1.11. A) Représentation du site catalytique des DNMTs. B) Mécanisme catalytique de la méthylation de l'ADN. C) Mécanisme de la 5-azacytidine (azacitidine) et la 5-aza-2'desoxycytidine (décitabine). Le substrat (cytidine de l'ADN ou l'inhibiteur) en bleu, le cofacteur SAM en rouge et le thiol catalytique (appartenant à l'enzyme) en vert.

1.4.1.3 Inhibiteurs de DNMT (DNMTi)

Plusieurs approches permettant d'inhiber la méthylation de l'ADN ont été développées (figure 1.12).[3,40]

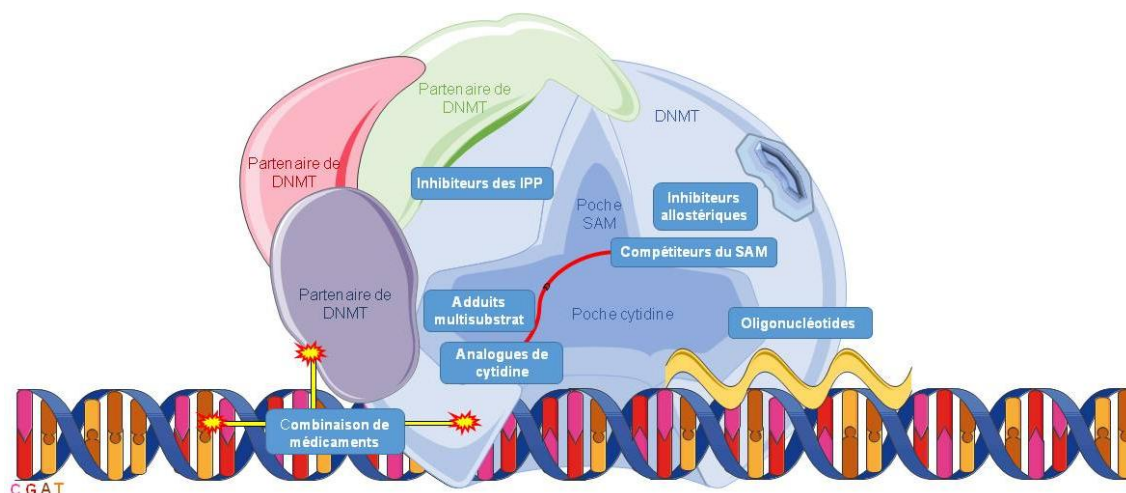
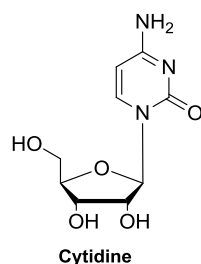
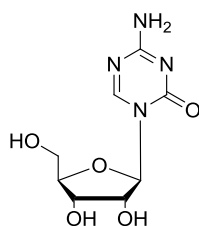


Figure 1.12. Représentation schématique des différentes approches pour l'inhibition de l'ADN. DNMT : ADN méthyltransférase ; IPP : interaction protéine–protéine ; SAM : S-adenosyl-L-méthionine ; CRO: oligonucléotides d'ARN chimérique ; miARN : micro ARN ; siARN : petits ARN interférents. *Adapté de Castillo-Aguilera et al.*[3]

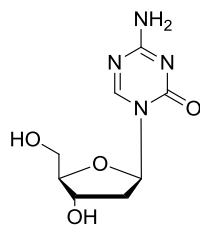
Inhibiteurs nucléosidiques

L'approche la plus avancée est l'inhibition des DNMTs par des analogues de la cytidine étant des substrats suicides. En effet, la 5-azacytidine (azacitidine, AZA, Vidaza®) (1) et la 5-aza-2'-désoxycytidine (décitabine, Dacogen®) (2) (**figure 1.13**) sont les deux seuls inhibiteurs de DNMT (DNMTi) acceptées par la « Food and Drug Administration » (FDA, Etats-Unis d'Amérique) et par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) pour le traitement de la leucémie myeloïde aiguë (LMA), la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) et les syndromes myélodysplasiques (SMD).[3,24]

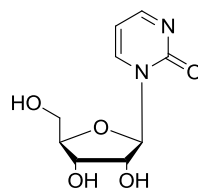
La 5-azacytidine (1) et la 5-aza-2'-désoxycytidine (2) sont des analogues de la cytidine dans lesquels le carbone en position 5 a été remplacé par un atome d'azote et ils contiennent respectivement un ribose et un désoxyribose. L'azacitidine, comme les autres analogues contenant le ribose, s'incorpore à l'ARN ou à l'ADN (après la désoxyconversion), tandis que la décitabine, analogue contenant le désoxyribose, ne s'incorpore qu'à l'ADN, ce qui contribue à une diminution d'effets secondaires.

DNMTi nucléosidiques*DNMTi de première génération*

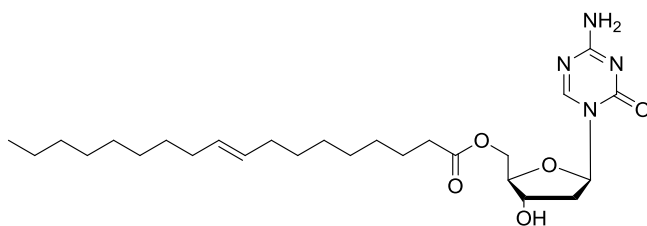
1. Azacitidine (Vidaza)



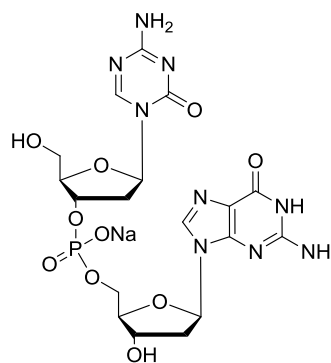
2. Decitabine (Dacogen)



3. Zebularine

DNMTi de deuxième génération

4. CP-4200



5. SGI-110, Guadecitabine

Figure 1.13. Structures des inhibiteurs nucléosidiques de DNMT

Les inhibiteurs dits de première génération s'intègrent au génome pendant la phase S (réplication) du cycle cellulaire, ils sont reconnus par la DNMT et participent dans la même réaction que les cytosines normales avec la formation d'une liaison covalente entre la cystéine du site catalytique de l'enzyme et leur position 6. Néanmoins, à la différence de la cytosine, la réaction de β -élimination permettant de régénérer l'enzyme n'a pas lieu, dû à la présence de l'azote en position 5, l'enzyme est piégée par l'inhibiteur suicide déclenchant sa dégradation (**figure 1.11-C**).[48,49] Bien que ces molécules soient très actives, elles montrent une instabilité chimique et métabolique importantes. En effet, le noyau aza-pyrimidine est instable en solution aqueuse et toxique *in vitro* et *in vivo*. D'ailleurs, la cytidine désaminase catalyse la désamination de la position 4 et conduit ainsi à la formation des composés de type 5-azauridine inactifs. (1) et (2) montrent également une faible spécificité car elles intègrent l'ADN en remplaçant les cytidines, ce qui conduit à des effets secondaires.[27,50] De plus, (1) intègre aussi l'ARN.

La zébularine (**3**) est un autre DNMTi, dont l'absence de groupement amino en position 4, empêche l'activation de la position 5, empêchant à son tour la méthylation, en stabilisant le complexe DNMT-ADN et en ralentissant sa dissociation, sans induire un complexe covalent irréversible. A la différence des substrats suicides, la zébularine est plus stable et moins toxique, mais elle est efficace à des doses plus importantes, ce qui a limité son développement en essais cliniques.[51–53]

Les DNMTi de deuxième génération sont les *prodrugs* de l'azacitidine et de la décitabine. Le composé CP-4200 (**4**), un ester de l'acide elaïdique de l'azacitidine, et SGI-110 (guadécitabine) (**5**), le dinucléotide décitabine-*p*-déoxyguanosine, ont été développés pour améliorer le profil pharmacocinétique des analogues de la cytidine.[50,54] (**5**) se révèle plus résistante à la désamination et présente un meilleur profil pharmacocinétique, avec moins d'effets cytotoxiques. Actuellement il est en phase II des essais cliniques pour le traitement de la LMA, des SMD et des cancers de l'ovaire et du foie (NCT01261312, NCT02901899, NCT01752933).[3]

Des oligonucléotides, de courtes séquences d'ARN (environ 30 nucléotides) ont été développés pour cibler des gènes spécifiques et réduire l'activité catalytique de DNMT. Quelques-uns ont montré des résultats intéressants *in vitro* et une hypométhylation liée à une ré-expression des GST. Néanmoins, leur développement clinique a été limité à cause de leur faible biodisponibilité et leur instabilité dans les conditions physiologiques.[3,40]

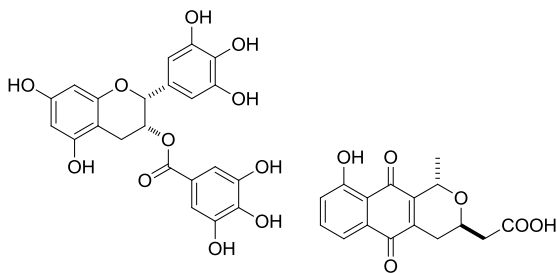
Bien que les inhibiteurs nucléosidiques de DNMTs présentent une activité hypométhylante importante, ils restent non spécifiques et engendrent des effets secondaires. Des inhibiteurs non-nucléosidiques ont donc été développés ces vingt dernières années.

Inhibiteurs non-nucléosidiques

La grande famille de DNMTi non-nucléosidiques comporte différentes structures chimiques mais possèdent des mécanismes variés qui n'impliquent pas l'incorporation à l'ADN (**figure 1.14**). Les produits naturels représentent une source importante de composés biologiquement actifs. Par exemple, le polyphénol (-)-epigallocatechin 3-gallate, (EGCG) (**6**) ou l'antibiotique de type quinone nanaomycine A (**7**) ont montré une activité hypométhylante et une réactivation de certains GST (tels que *P16*, *P21*, *MGMT*, *RARβ2*), malgré leur manque de spécificité et l'absence d'activité directe sur les DNMTs dans certains cas.[55–59]

DNMT1 non-nucléosidiques

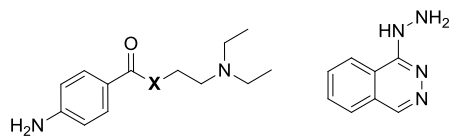
Produits naturels



6. EGCG
IC₅₀ (DNMT1) = 0,5 μM

7. Nanaomycine A
IC₅₀ (DNMT3b) = 0,5 μM
Inactive sur DNMT1

Molécules répositionnées

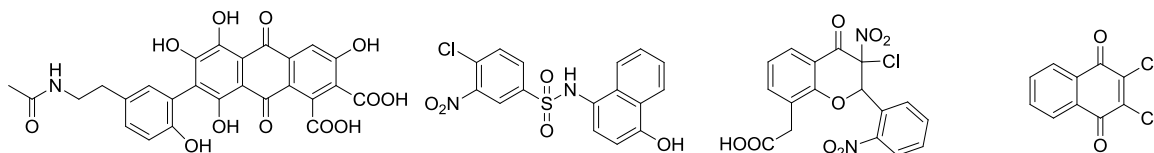


8. X = NH, Procainamide
IC₅₀ (DNMT1) > 500 μM
IC₅₀ (DNMT3a) > 500 μM

10. Hyalazine

9. X = O, Procaine

Hits de Criblages Haut Débit (HTS) et des programmes d'optimisation



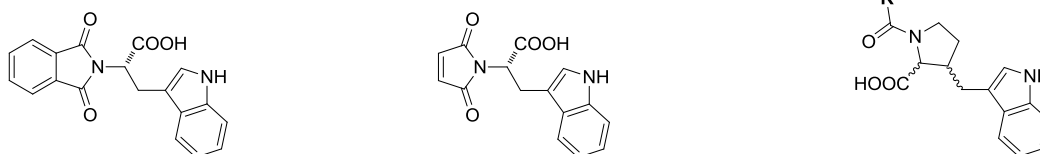
11. Laccaic acid A
IC₅₀ (DNMT1) = 19 μM
IC₅₀ (DNMT3a) = 50 μM

12. SW155246
IC₅₀ (DNMT1) = 1,2 μM
IC₅₀ (DNMT3a) = 38 μM

13.
IC₅₀ (DNMT3a/3L) = 0.49 μM

14. Dichlone
EC₅₀ (DNMT3a/3L) = 460 nM

Hits des criblages virtuels et des programmes d'optimisation

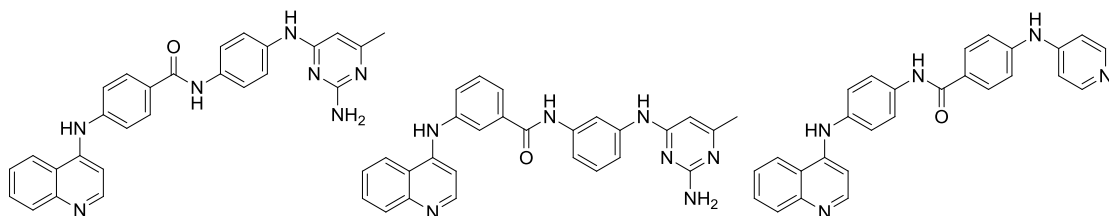


15. RG-108
IC₅₀ (DNMT1) = 390 μM
IC₅₀ (DNMT3a/3L) = 315 μM

16. RG-108-1
IC₅₀ (DNMT1) = 20 μM

17. R = phényle
(2S, 3R) IC₅₀ (DNMT1) = 98 μM
(2R, 3S) IC₅₀ (DNMT1) = 73 μM

18. R = 2-naphthyle
(2S, 3R) IC₅₀ (DNMT1) = 128 μM
(2R, 3S) IC₅₀ (DNMT1) = 50 μM



19. SGI-1027
IC₅₀ (DNMT1) = 6 μM
IC₅₀ (DNMT3a) = 8 μM
IC₅₀ (DNMT3b) = 7,5 μM

20
IC₅₀ (DNMT1) = 9 μM
IC₅₀ (DNMT3a/3L) = 2.8 μM

21
EC₅₀ (DNMT1) = 15 μM
EC₅₀ (DNMT3a) = 0,9 μM

Figure 1.14. Structures des inhibiteurs de DNMT non-nucléosidiques. Les IC₅₀ et les EC₅₀ correspondent respectivement à la concentration inhibitrice médiane et à la concentration efficace médiane. Les deux sont calculés par différents tests enzymatiques, donc les valeurs ne sont pas homogènes.

Des médicaments mis sur le marché auparavant pour d'autres pathologies ont été repositionnés pour leur effet déméthylant, tels que l'amide procaïnamide (**8**), un médicament antiarythmique, et son analogue ester procaïne (**9**), un médicament anesthésique. Ces molécules se lient à l'ADN et bloquent ainsi l'activité de DNMT, conduisant à la réactivation de certains GST.[60–62] L'hydralazine (**10**), un médicament antihypertenseur, conduit également à la réactivation de certains GST sans causer une déméthylation globale chez les cellules.[60,63]

Plusieurs composés ont été également élucidés par des Criblages Haut Débit (*HTS, High-Throughput screening*) sur DNMT ou par des Criblages Virtuels (*VS, Virtual Screening*)[33,64–66]. Le produit naturel acide lactique A (**11**) et le dérivé sulfonamide SW155246 (**12**) ont été issus des études HTS en tant qu'inhibiteurs de DNMT avec une activité déméthylante considérable sur les régions promotrices de certains GST conduisant à leur réactivation.[67–69] Des flavones et des flavonones comme (**13**) et la dichlone (**14**), utilisée comme fongicide, ont été également élucidées par *HTS*.[33,64] La dichlone (**14**) a permis de réactiver l'expression du gène *YFP* dans la lignée cellulaire HEK293 via la déméthylation du promoteur.[33]

Le phthalimido-L-tryptophane RG-108 (**15**) a été identifié dans une étude de VS, et ensuite validé *in vitro* en tant qu'inhibiteur de DNMT. Il conduit aussi à la réactivation des certains GST chez la lignée cellulaire HCT116 (cancer du côlon-rectum).[70,71] L'optimisation de ces *hits* ainsi élucidés ont permis l'obtention de nouvelles molécules possédant une activité inhibitrice de DNMT plus importante, tels que les dérivés maléimides RG-108-1 (**16**), (**17**) et (**18**) conçus à partir du RG-108 (**15**).[38,72] Le composé SGI-1027 (avant nommé S-1027) (**19**) est le résultat des pharmacomodulations d'une famille de sels bisquaternaires liant l'ADN.[73] Ce dérivé quinoléinique lipophile montre une activité inhibitrice vers DNMT1, 3a et 3b en se liant à l'ADN.[74] D'ailleurs, il cause la dégradation de DNMT1 par la voie du protéosome, inhibe la méthylation de l'ADN et il réactive l'expression des GST *TIMP3*, *MLH1* et *P16^{INK4a}* chez les cellules HCT116 (cancer du côlon).[75,76] Grâce à une étude de modélisation moléculaire, il a été mis en évidence qu'il se place dans la cavité accueillant le cofacteur SAM.[66] Les analogues (**20**) et (**21**) résultent des pharmacomodulations autour de SGI-1027 (**19**), montrant aussi une activité importante sur DNMT.[34,66]

Même si la plupart des DNMTi présente une haute toxicité, un manque de spécificité et une instabilité chimique, ils ont été validés comme des outils thérapeutiques importants dans le traitement du cancer. Ce sont les molécules non-nucléosidiques qui se révèlent les plus prometteuses du fait qu'elles ne s'incorporent pas à l'ADN, ce qui pourrait entraîner moins d'effets secondaires.[3,24,40]

1.4.2 Méthylation d'histones

Les histones sont les principaux constituants protéiques des chromosomes et subissent plusieurs modifications post-traductionnelles : acétylation, phosphorylation, ubiquitylation,

sumoylation, méthylation...[41,77,78] L'acétylation et la méthylation ont un rôle important dans la régulation des gènes. En effet, les histones sont enrichies en résidus de lysine et arginine étant responsables des interactions électrostatiques, en particulier des liaisons hydrogène avec l'ADN chargé négativement. L'acétylation et la méthylation sur ces résidus modifient donc les propriétés électrostatiques et stériques des histones et contrôlent ainsi l'accessibilité aux gènes entourant le cœur d'histones.[28] La méthylation des histones a lieu sur les lysines par les lysines méthyltransférases (HKMT, *histone lysine methyltransferases*) mais aussi sur les arginines par les arginines méthyltransférases (PRMT, *protein arginine N-methyltransferases*), au cœur ou aux queues des histones. Les résidus de lysine peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés, tandis que les résidus d'arginine peuvent être di- ou tri-méthylés.[35]

La méthylation des histones, comme la méthylation de l'ADN, peut être impliquée, selon la localisation, dans l'activation (tels que H3K4me1/me2/m3, HK36me3, H3K79me1/me2/me3, H4R3me1, H4K20me1) ou dans la répression (tels que H3K9me2/me3, H3K27me3) des gènes.[3,78,79]

Il a été montré que la méthylation des histones est un processus dynamique impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques : la prolifération cellulaire, la différenciation, la réparation de l'ADN, la recombinaison... Le profil de méthylation des histones, comme le profil de méthylation de l'ADN, peut être altéré dans certaines pathologies, particulièrement dans le cancer.[35,78]

1.4.2.1 Histones méthyltransférases (HMTs)

Les histones méthyltransférases (HMTs) forment une famille de plus de 50 enzymes qui sont responsables de la méthylation des chaînes latérales des résidus de lysine ou d'arginine des histones ou d'autres protéines, car parfois non-spécifiques. Toutes les HMTs, comme les DNMTs, utilisent le cofacteur SAM comme donneur de groupement méthyle et produisent les substrats méthylés et la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH).[26,35]

Les HMTs sont regroupées dans 3 familles distinctes : les PRMT (*protein arginine N-methyltransferases*), la famille contenant le domaine SET (*Su[var]3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*), domaine d'interaction protéine-protéine, et enfin la famille ne possédant pas le domaine SET. Cette dernière famille ne possède qu'une protéine bien conservée au cours de l'évolution, **DOT1L**, ainsi que ses homologues existant dans d'autres organismes.[7]

1.4.2.2 Arginine méthyltransférases (PRMT)

Les PRMT composent une famille de 11 enzymes qui catalysent la mono- ou la diméthylation des résidus arginine (R) sur les histones et sur d'autres protéines. Parmi ces PRMTs nous pouvons citer :

PRMT1

PRMT1 est responsable de la méthylation de l'histone 4 (H4) et d'autres protéines non histones. Elle a un rôle important dans la transcription, les voies de signalisation cellulaire, l'épissage et la réparation de l'ADN.[80] Sa surexpression a été liée aux différents types de cancers (sein, prostate, poumon, côlon, vessie, leucémie).[81,82]

PRMT4 (CARM1)

PRMT4 (nommée aussi CARM1) est responsable de :

- La catalyse de H3R17me2 et H3R26me2.
- La modification d'autres protéines non histones, comme par exemple, p300/CBP (*CREB-binding protein*) et SRC-3 (*Steroid Receptor Coactivator-3*).
- La co-activation de facteurs de transcription, comme le récepteur à stéroïdes.

PRMT4 est aussi impliquée dans le développement du cancer de la prostate et du cancer du sein.[83–86]

PRMT5

PRMT5 est une enzyme responsable de la catalyse de H4R3me et H3R8me2. Elle est aussi active sur des protéines non histones comme P53 et *programmed cell death 4* (PDCD4). Elle est également un répresseur transcriptionnel. La dérégulation de PRMT5 est liée à la tumorigenèse. [87,88]

Etant donné le rôle important de ces enzymes dans la tumorigenèse, leur inhibition se révèle être une stratégie thérapeutique contre le cancer. Parmi les PRMTi (**figure 1.15**), le composé (**22**)[89] est un inhibiteur de PRMT1, l'acide ellagique (nommé aussi TBBD) (**23**)[84] est un inhibiteur de PRMT4 (CARM1), et GSK3235025 (nommé précédemment EPZ015666) (**24**) est un inhibiteur de PRMT5. Une autre molécule, nommée GSK3326595 (nommé précédemment EPZ015938, structure non dévoilée), inhibiteur de PRMT5, est en essai clinique (NCT02783300) pour le traitement des tumeurs solides et du lymphome non-Hodgkinien.[90] Les inhibiteurs sélectifs de CARM1 et de PRMT5 se lient dans le site catalytique au niveau d'une poche accueillant le substrat, même si l'activité de (**24**) est compromise par la liaison de SAM au site catalytique.[3]

PRMT inhibitors

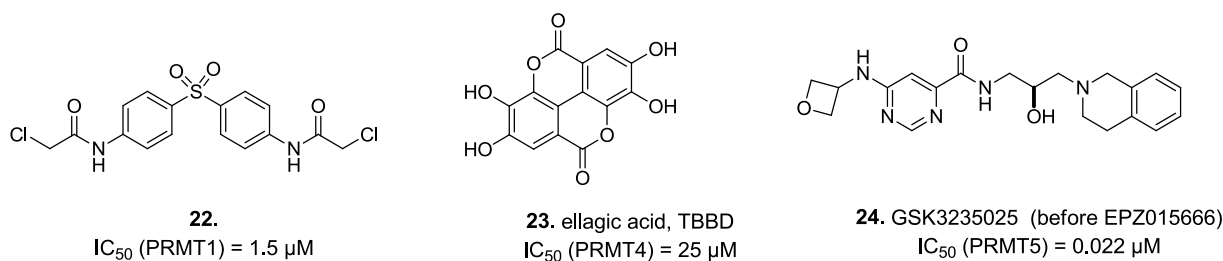


Figure 1.15. Structures des inhibiteurs de PRMT. Les IC_{50} correspondent à la concentration inhibitrice médiane, calculées par différents tests enzymatiques, donc les valeurs ne sont pas homogènes.

1.4.2.3 Lysine méthyltransférases (HKMT)

La famille des HKMTs est caractérisée par son domaine SET (*Su[var]3-9*, *Enhancer of Zeste*, *Trithorax*), domaine d'interaction protéine-protéine. Elles sont responsables de la mono-, di- ou triméthylation des résidus lysine des histones. Parmi les HKMT présentant un rôle important dans le développement des cancers se trouvent les exemples suivants.

G9/GLP

La sous-famille SUV39 possédant le domaine SET est composée par Suv39H1, Suv39H2, SETDB1 et G9/GLP. Cette famille est responsable de la méthylation du résidu lysine 9 de l'histone 3 (H3K9), modification épigénétique dépendante de la méthylation de l'ADN chez les cellules cancéreuses.[91–93] G9a et G9a-like protein (GLP) catalysent la mono- et di-méthylation de ce résidu (H3K9me1 et H3K9me2). G9a et GLP forment un complexe hétéromérique possédant l'activité méthyltransférase de H3K9 *in vivo*.[93–96] Par ailleurs, ce complexe favorise la croissance tumorale, il a une influence sur le cycle cellulaire et sur différentes voies de signalisation.[97] Chez les mammifères, la méthylation de H3K9 et de l'ADN sont étroitement associées. En effet, lorsque les gènes *G9a* ou *GLP* sont mutés, une perte de la méthylation de l'ADN est observée. G9a et GLP peuvent recruter DNMT3a et DNMT3b directement ou indirectement à travers la protéine *M-phase phosphoprotein 8* (MPP8), ce qui conduit à la méthylation de *novus* de l'ADN.[92,98–101]

Plusieurs inhibiteurs du complexe G9/GLP ont été développés (**figure 1.16**). Les composés BIX-01294 (**25**), un compétiteur du substrat de l'enzyme, et BIX-01338 (**26**), compétiteur du SAM, ont été découverts par une étude de HTS.[102] Les composés BRD9539 (**27**) et BRD4770 (**28**) sont le résultat des pharmacomodulations autour de (**25**) et (**26**) afin d'améliorer leur sélectivité et diminuer leur toxicité.[103] (**27**) est la forme active de (**28**), ce dernier est actif dans des essais cellulaires et il réduit les niveaux de méthylation de H3K9, conduisant à l'inhibition de la prolifération des cellules PANC-1 (cancer du pancréas).[103] Le composé UNC0638 (**29**) a également été décrit en tant que sonde chimique. Il inhibe sélectivement G9a et GLP via un

mécanisme de compétition avec le substrat, il réduit les niveaux de H3K9me2 chez plusieurs lignées cellulaires comme MCF7 (cancer du sein), mES (*mouse Embryonic Stem*), MDA-MB231 (cancer du sein), et il module l'expression des gènes régulés par G9a.[104]

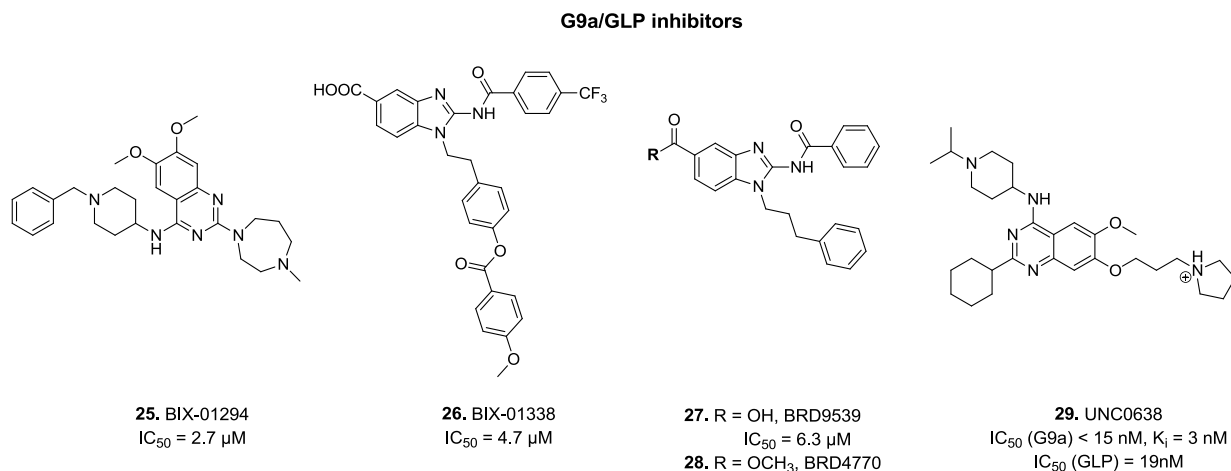


Figure 1.16. Structures des inhibiteurs de G9/GLP. Les IC₅₀ correspondent à la concentration inhibitrice médiane, calculées par différents tests enzymatiques, donc les valeurs ne sont pas homogènes.

EZH2

Enhancer of Homolog Zeste 2 (EZH2) et son homologue EZH1 font partie du cœur du *Polycomb Repressive Complex 2* (**PRC2**). Les complexes PRC1 et PRC2 sont impliqués dans la répression de la transcription de certains gènes. EZH2/EZH1 sont responsables de la méthylation de H3K27, modification maintenant l'extinction des gènes. L'expression ectopique d'EZH2 est considérée comme un biomarqueur de métastases et des tumeurs de mauvais pronostic. EZH2 et DNMT pourraient avoir un mécanisme croisé concernant l'extinction épigénétique qui contribue au phénomène de répression transcriptionnelle des certains gènes chez les cellules cancéreuses.[105–110] L'inhibition spécifique de EZH2 cause une diminution de H3K27me3 et déclenche l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose chez différentes lignées cellulaires.[111,112]

Plusieurs composés ont été développés à ce jour. Le composé CPI-169 (**30**), par exemple, inhibe l'activité catalytique du complexe PRC2, il cause une diminution de H3K27me3 et active l'apoptose chez différents types cellulaires.[111,112] Les composés EPZ6438 (ou tazemetostat) (**31**)[113,114], GSK126 (**32**)[115] et CPI-1205[111] sont en essais cliniques pour différents types de cancer ((**31**): NCT01897571, NCT02601950, NCT02601937, NCT02860286 ; (**32**): NCT02082977 ; CPI-1205 : NCT02395601). Par ailleurs, la Food and Drug Administration (FDA) a attribué le statut « *Fast Track* » à l'inhibiteur d'EZH2, le tazemetostat, comme nouvelle classe de traitement potentiel du lymphome folliculaire en rechute ou réfractaire avec ou sans mutations activant EZH2. Le statut « *Fast Track* » permet de faciliter et accélérer le développement de nouveaux candidats médicaments importants, permettant de les rendre plus rapidement accessibles aux patients.[116]

Ces inhibiteurs de EZH2 présentent un mécanisme d'inhibition par compétition avec le cofacteur SAM.[3]

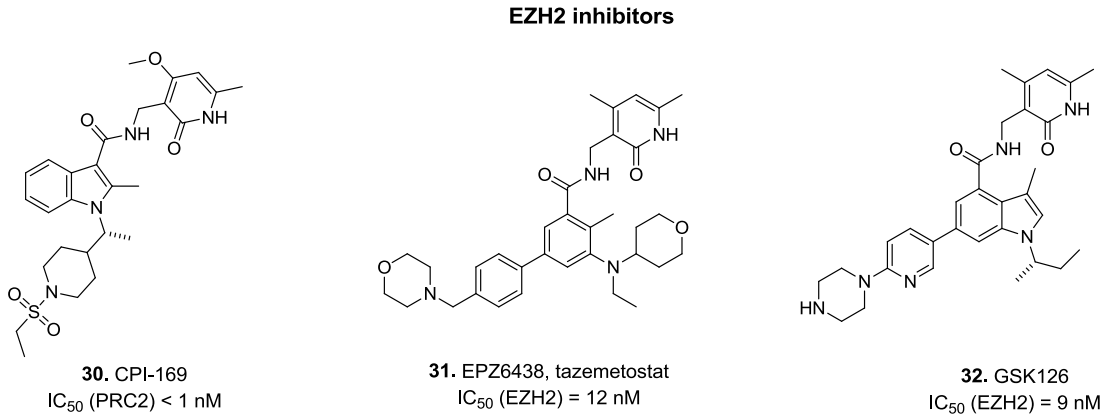


Figure 1.17. Structures des inhibiteurs d'EZH2. Les IC₅₀ correspondent à la concentration inhibitrice médiane, calculées par différents tests enzymatiques, donc les valeurs ne sont pas homogènes.

DOT1L

A la différence de toutes les HKMTs possédant le domaine SET (*Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*), DOT1L (*DOT1 Like, disruptor of telomeric silencing*) est la seule HKMT qui ne l'a pas. En effet, DOT1L est plus proche des PRMTs, montré par un diagramme d'arbre construit selon des caractéristiques structurales communes entre les différentes méthyltransférases (**figure 1.18**).[24,117]

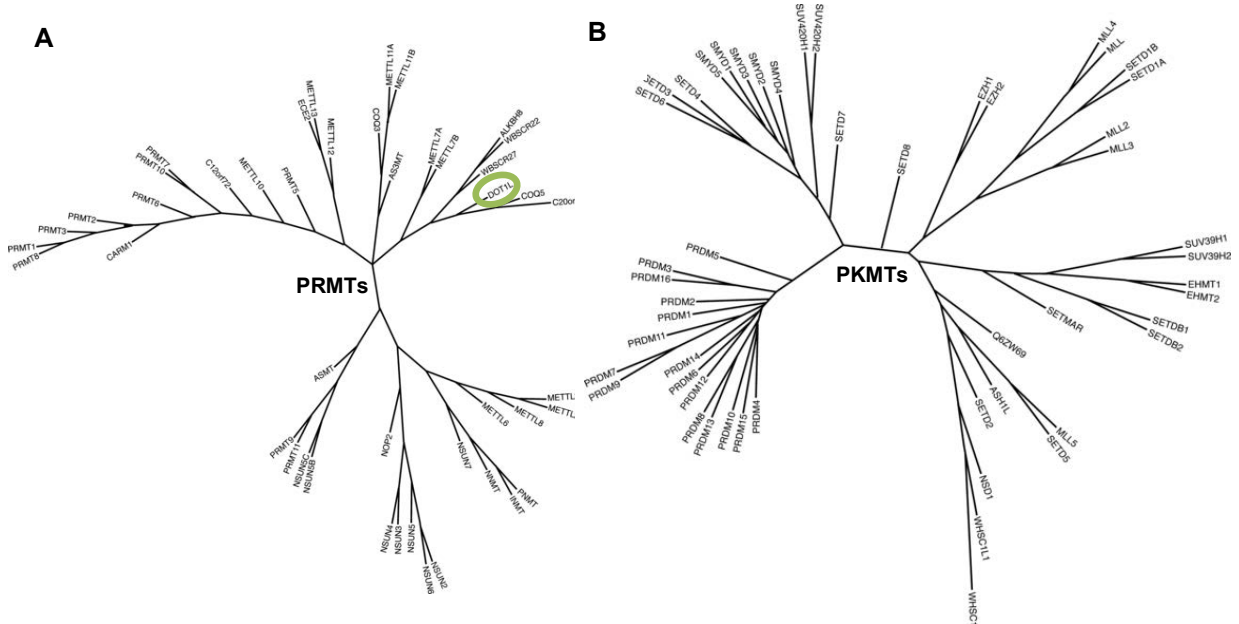


Figure 1.18. Diagrammes d'arbre de A) la famille PRMT et B) la famille PKMT. La longueur des branches est proportionnelle à la distance calculée entre les différents membres de chaque famille. Adaptée de Richon et al., 2011.[117]

Etant donné le rôle de DOT1L dans le cancer, nous nous sommes intéressés au développement des inhibiteurs de cette enzyme, présentée en détail dans la section suivante.

1.5 DOT1L (*DOT1 Like, disruptor of telomeric silencing*)

1.5.1 Caractéristiques fonctionnelles et structurales

DOT1 (*disruptor of telomeric silencing*) a été découverte chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) dans une étude génétique dont la suppression a produit des défauts dans l'extinction télomérique (*telomeric silencing*), d'où son nom. L'homologue chez les mammifères est appelé **DOT1L** (*DOT1 like*). DOT1L est une HMT responsable de la mono-, di- et tri-méthylation exclusive du groupement ϵ -amino du résidu Lys79 de l'histone 3 (H3K79) chez l'Homme. Cette réaction se fait à l'aide du cofacteur SAM et produit le substrat méthylé et SAH (**figure 1.19**).

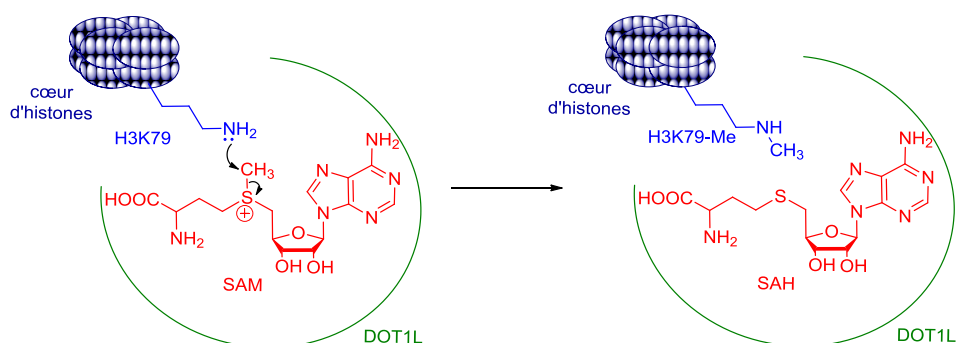


Figure 1.19. Mécanisme catalytique de DOT1L. Le substrat H3K79 est un bleu et SAM en rouge.

Le substrat H3K79 de DOT1L est localisé au cœur de l'histone 3 (H3), tandis que ceux d'autres HMTs se localisent dans les queues des histones. DOT1/DOT1L est la seule enzyme responsable de la méthylation sur H3K79, fait corroboré par le *knock out* de DOT1/DOT1L chez la levure, *Drosophila* et la souris qui montre une perte total de la méthylation de H3K79.[28]

L'enzyme DOT1L humaine possède 1537 acides aminés et présente des motifs bien conservés entre les DOT1 des autres espèces qui forment le site catalytique des enzymes (**figure 1.20**).[118]

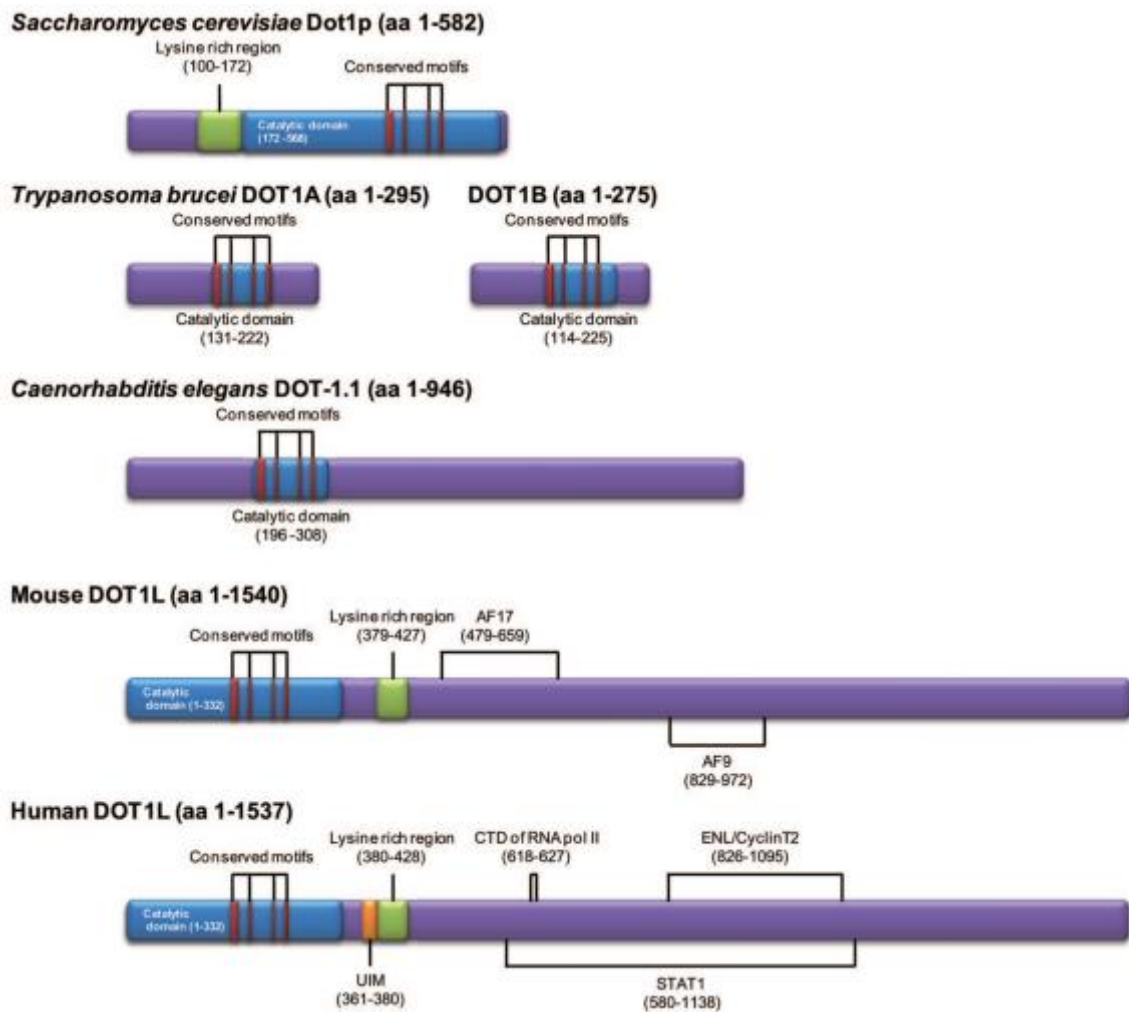


Figure 1.20. Structures de DOT1 et DOT1L des plusieurs organismes. Le domaine catalytique est conservé entre les espèces. Les motifs de liaison avec différentes protéines d'interaction sont montrés. *Extrait de Kim W, et al. 2014.[118]*

Les motifs I, post I, II et III se trouvent également dans les méthyltransférases utilisant le cofacteur SAM. D'ailleurs, les structures cristallines de DOT1 (**figure 1.21-A**) chez la levure et de DOT1L humaine révèlent une structure ouverte α/β composée par 7 feuillets β , caractéristique des méthyltransférases dépendantes de SAM.[7]

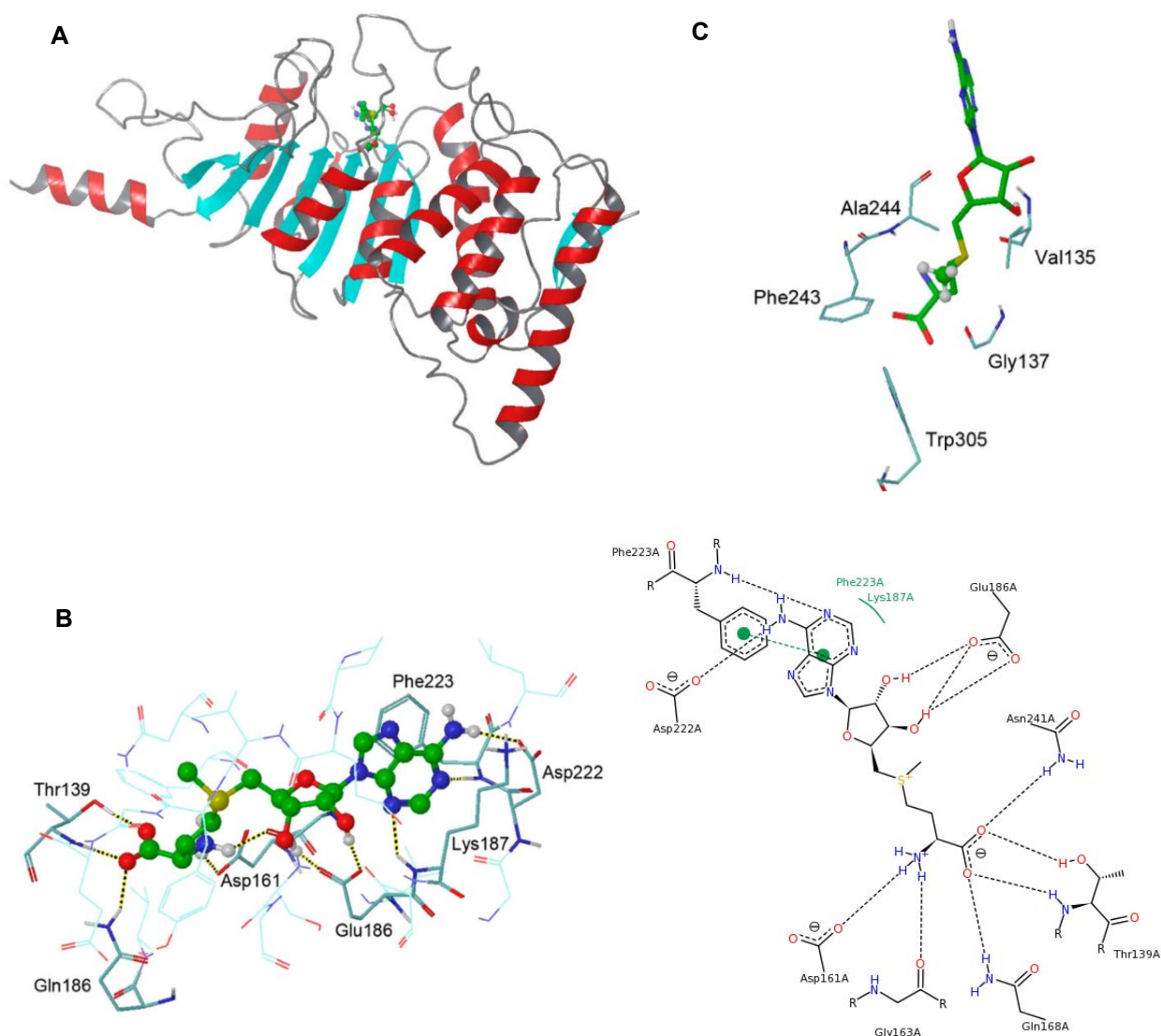


Figure 1.21. A) Structure du complexe DOT1L (1-416) – SAM. B) Site actif de DOT1L montrant les interactions avec SAM. C) Canal de liaison de la lysine. Le cofacteur SAM est schématisé en vert. *Extrainte de Anglin et al.[28] et PDB : 3QOW.[117]*

L'étude cristallographique du complexe DOT (1-416) – SAM (PDB : 3QOW) a permis d'élucider les segments responsables de la liaison du cofacteur SAM : 1) résidus 161-169, 2) résidus 186-191, 3) résidus 239-245, 4) résidus 133-139 et 5) résidus 221-224. Les segments 1 à 3 représentent des motifs de séquence consensus présents dans d'autres méthyltransférases dépendant de SAM. Les segments 3 à 5 sont uniques à DOT1L. Notamment, le segment 4 fait partie d'une boucle flexible qui s'ouvre ou se ferme pour permettre l'entrée ou la sortie du SAM/SAH. Le motif adénosine du cofacteur SAM présente des interactions hydrophobes, notamment de type π - π avec le résidu Phe223, et 5 liaisons hydrogène : a) NH_2 en position 6 de l'adénine avec Asp222, b) N5 de l'adénine avec Phe223, c) N3 de l'adénine avec Lys187, et d, e) 2',3'-diol du ribose avec Glu186. Aussi, le motif acide aminé du SAM forme 5 liaisons hydrogène additionnelles avec les résidus Thr139, Gln168, Asn241, Asp161 et Gly163 (**figure 1.21-B**). Une grande partie de la surface du cofacteur SAM se trouve à l'intérieur de la protéine, ce qui suggère qu'il est fortement lié à DOT1L. Le groupement méthyle du SAM est positionné au niveau du canal

responsable de la liaison à la lysine, formé par les résidus Phe243, Ala244, Val135, Gly137 et Trp305. Le canal possède une ouverture d'environ 4 Å suffisamment large pour accommoder une lysine triméthylée (**figure 1.21-C**).[28,117,119]

D'après les données cristallographiques, le cofacteur SAM adopte 2 conformations différentes au sein des HKMTs et des PRMTs. La superposition des conformations du SAM extraites des structures cristallines montre que SAM (ou SAH) adopte une conformation en « U » (*U shape*) chez les HKMTs, exceptée pour DOT1L (**figure 1.22-A**). SAM/SAH adopte une conformation linéaire et étalée chez les PRMTs et DOT1L (**figure 1.22-B**). Cette différence de conformation peut être utilisée pour le développement des inhibiteurs sélectifs de DOT1L entrant en compétition avec le cofacteur SAM.[117,120]

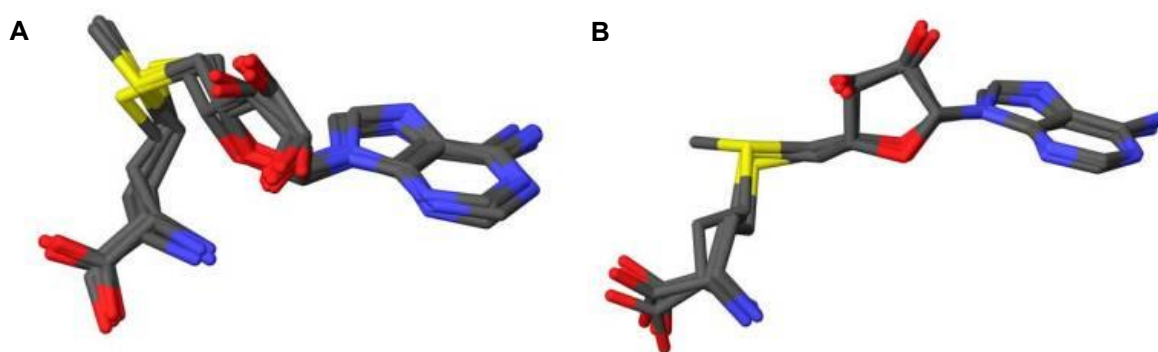


Figure 1.22. Superposition des conformations du cofacteur SAM ou SAH extraites des structures cristallines. A) Structures du SAM au sein de neuf HKMT : G9a (PDB : 3K5K), GLP (PDB : 3MO0), SETMAR (PDB : 3BO5), SUV39H2 (PDB : 2R3A), SETD2 (PDB : 3H6L), SMYD3 (PDB : 3MEK), MLL (PDB : 2W5Z), SET7/9 (PDB : 1O9S) et SETD8 (PDB : 1ZKK). **B)** Structures du SAM au sein de DOT1L (PDB : 1NW3) et des trois PRMTs humaines : PRMT4 (CARM1) (PDB : 2V74), PRMT1 (PDB : 1ORI) et PRMT3 (PDB : 2FYT). *Extrait de Yost et al. 2011.*[120]

Malgré l'absence d'information expliquant la façon dont se lie le substrat (nucléosome) à DOT1L, une étude de modélisation suggère des interactions avec 4 histones du même côté du nucléosome.[28,119] Même si la séquence 1-351 est conservée dans les autres H3K79 méthyltransférases, la protéine recombinante est inactive. La longueur minimale pour que DOT1L humaine soit active est de 1-416, et le domaine C-terminal 391-416 est essentiel à l'activité. Ce fragment contient 15 résidus basiques de Lys et Arg qui permettent une forte interaction électrostatique avec l'ADN chargé négativement, et il est donc essentiel pour la reconnaissance et la liaison enzyme - substrat. Une particularité de DOT1L est de méthyler son substrat au sein du nucléosome, et non lorsqu'il est libre ou soluble.[28,118]

L'activité de cette enzyme est impliquée dans l'expression des gènes, la régulation du cycle cellulaire, la réponse aux lésions de l'ADN, la prolifération, la différenciation et le développement.[118]

Tout comme pour le profil de méthylation de l'ADN, le profil de méthylation des histones est altéré dans les cellules cancéreuses.¹⁰ Des études ont montré que DOT1L est liée à la leucémie

aiguë, mais elle a aussi un rôle fondamental dans la leucémie montrant des translocations du gène MLL.

1.5.2 Rôle de DOT1L dans le cancer

Le gène *MLL* code pour une HKMT nommée MLL, responsable de la méthylation du résidu Lys4 de l'histone 3 (H3K4). Lorsque le gène *MLL* subit un réarrangement, la protéine MLL (dite onco-MLL) perd son activité. L'onco-MLL interagit avec des partenaires protéiniques tels qu'AF4, AF9, AF10, ENL, ELL. Le complexe ainsi formé recrute DOT1L, et son activité catalytique (méthylation de H3K79) cause une surexpression des gènes (comme *HOXA9*, *HOXA10* et *MEIS1*), gènes qui mènent finalement à l'initiation de la leucémie (**figure 1.23**).[7–10]

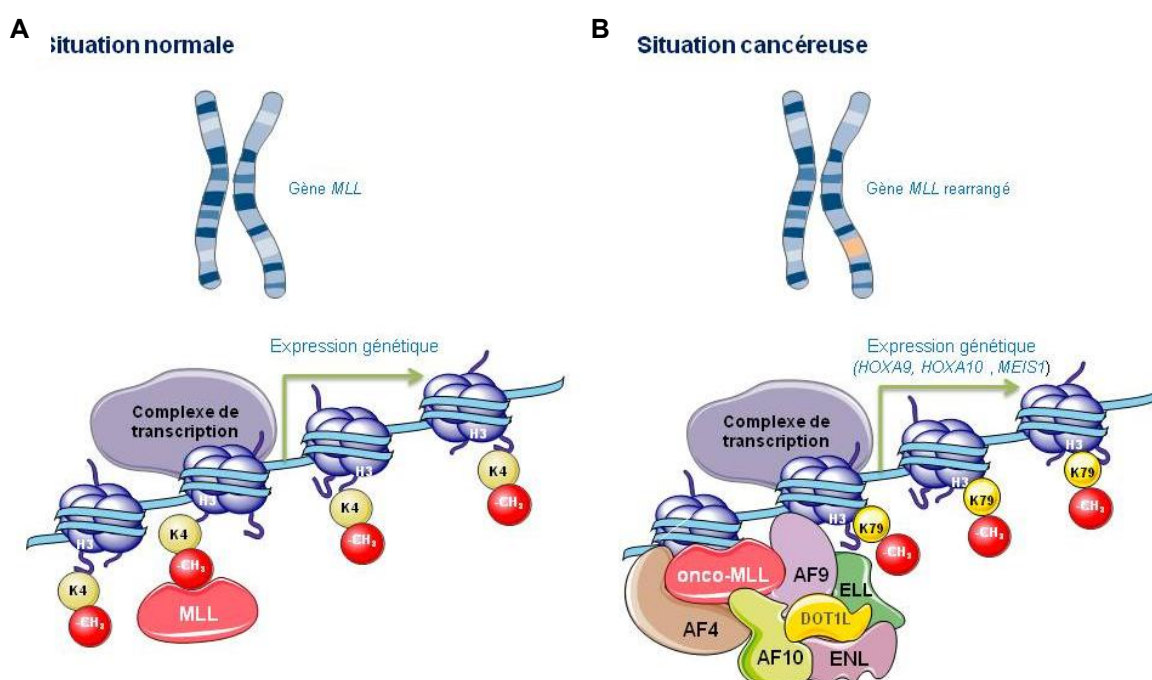


Figure 1.23. Rôle de DOT1L dans une situation cancéreuse. Dans une situation normale le gène sauvage *MLL* code pour une HKMT nommée MLL, responsable de la méthylation de H3K4 et permet l'initiation de la transcription. Lors d'une situation cancéreuse, l'oncogène de fusion *MLL* code pour une onco-MLL inactive qui forme un complexe avec de partenaires de fusion (AF4, AF9, AF10, ENL, ELL...) et recrute DOT1L. La méthylation d'H3K79 mène à la surexpression des gènes impliqués dans la leucémie (*HOX*, *MEIS*).

Dans des études *in vitro*, chez des cellules leucémiques avec des translocations du gène *MLL* (*MLL-r*), l'inhibition de DOT1L conduit à la régulation négative des gènes de fusion de *MLL* (comme *HOXA9* et *MEIS1*), ce qui montre que les inhibiteurs de DOT1L pourraient annuler les effets de la méthylation aberrante de H3K79. Les inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) stoppent la prolifération spécifiquement des cellules leucémiques *MLL-r*, tout en arrêtant le cycle cellulaire, et conduisant à la différenciation et à l'apoptose.[10]

Il a été récemment décrit que DOT1L a un rôle dans d'autres types de cancer tels que : le cancer du sein,[121,122] du poumon,[123] de l'œsophage[124] et le neuroblastome.[125] L'inhibition de l'enzyme est liée à une diminution du renouvellement cellulaire favorisant le

phénomène de différenciation. Récemment, il a été montré que DOT1L est liée au phénomène de sénescence, son inhibition pourrait donc conduire à la reprogrammation cellulaire conduisant à l'augmentation des cellules souches pluripotentielles induites (iPSCs). Ceci pourrait être utile en tant que thérapie régénérative.[126]

Ainsi, DOT1L est une cible validée dans le traitement du cancer.

1.5.3 Inhibiteurs de DOT1L (*DOT1L*)

Depuis la découverte du rôle critique de DOT1L dans la leucémie MLL-r, plusieurs inhibiteurs de DOT1L ont été décrits par différentes équipes. A l'heure actuelle, on peut identifier les inhibiteurs mimant le cofacteur SAM et son produit SAH, résultats d'une conception basée sur le ligand et son mode de liaison à l'enzyme (**figure 1.24**). D'autres inhibiteurs ne contenant pas la partie nucléosidique du SAM/SAH sont issus d'une approche de « fragment-based ». Ils présentent tous un mécanisme de compétition avec le cofacteur SAM.

Inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) mimes du SAH

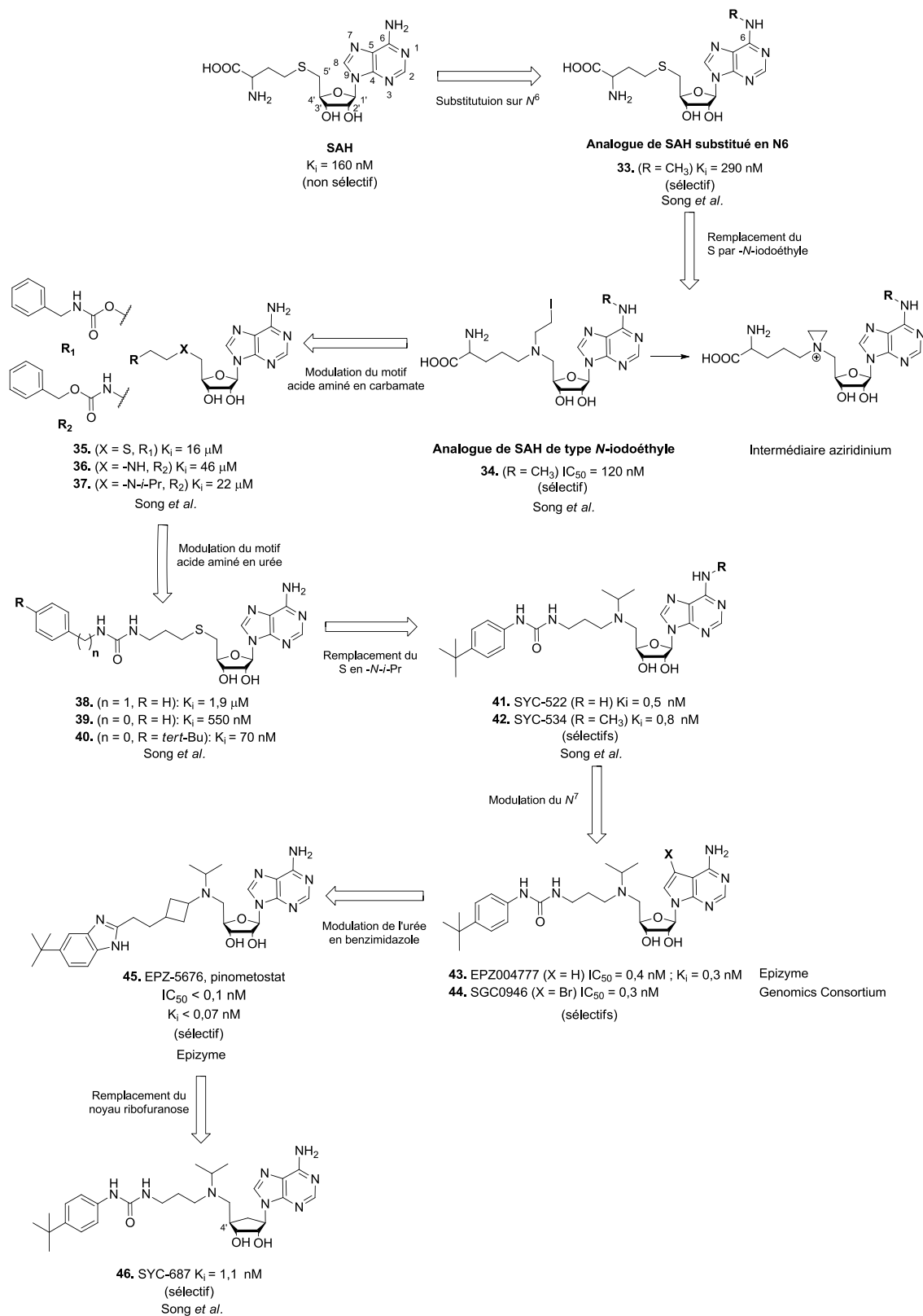


Figure 1.24. Développement des inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) à partir de pharmacomodulations autour du SAH. Les pharmacomodulations montrées correspondent à des travaux de 3 groupes de recherche indépendants (Epizyme, Song Y. *et al.* et Structural Genomics Consortium). Les IC_{50} et les K_i correspondent respectivement à la concentration inhibitrice médiane et à la constante d'inhibition. Les deux sont calculés par différents tests enzymatiques, donc les valeurs ne sont pas homogènes.

Les inhibiteurs présentés dans la **figure 1.24** sont le résultat des pharmacomodulations autour du produit de la réaction catalysée par DOT1L, SAH. En effet, SAH est l'inhibiteur naturel de l'enzyme ainsi que d'autres méthyltransférases. Néanmoins, elle présente deux limitations importantes : son motif acide aminé empêchant son passage membranaire et son manque de spécificité. En effet, SAH inhibe d'autres méthyltransférases de la cellule telles que : Suv39H1, G9a, EZH2, CARM 1 (nommée aussi PRMT4) et PRMT5. Ainsi, différentes pharmacomodulations par différentes équipes de recherche autour de SAH ont été décrites et ont permis d'obtenir des structures possédant des valeurs d'inhibition intéressantes.^{21, 24}

Substitution en N⁶ sur SAH

Des analogues de SAH comportant une substitution en N⁶ ont été synthétisés. Plusieurs groupements tels qu'un allyle, cyclopropyle, isopropyle, butyle, pentyle ramifié, benzyle et méthyle ont été évalués. Ils montrent une faible activité ($K_i = 1,1 - 8.9 \mu\text{M}$) mais une meilleure spécificité vis-à-vis d'autres méthyltransférases. En effet, il a été démontré que les substituants sur N⁶ altèrent l'interaction ligand – protéine avec G9a, CARM1 et d'autres HMTs, mais pas avec DOT1L, ce qui améliore leur spécificité. Le N⁶-méthyl-SAH (**33**) est un inhibiteur puissant de DOT1L ($K_i = 290 \text{ nM}$) et il est inactif sur CARM1, G9A et d'autres HMTs.[127,128]

Composés de type aziridinium

Le soufre a été remplacé par un azote substitué par un groupement iodoéthyle. Ce groupement permet la formation des intermédiaires cationiques aziridinium qui mime le motif méthyl-sulfonium du cofacteur SAM. Cette pharmacomodulation a permis d'élucider une longueur de chaîne optimale de 3 méthylènes entre l'azote et le motif acide aminé. La longueur de la liaison C–S est de 1,8 Å, est celle de la liaison C–N est de 1,5 Å. Ainsi, afin de compenser le remplacement du soufre chez SAM par un azote, un méthylène supplémentaire est nécessaire. La longueur optimale est donc de 3 groupements méthylènes entre l'azote et le motif acide aminé. Ainsi, le composé (**34**) présente une $IC_{50} = 120 \text{ nM}$ et une spécificité pour DOT1L.[127]

Composés de type carbamate et urée

Il a été mis en évidence que la fonction acide aminé est importante pour l'activité inhibitrice de DOT1L. C'est la raison pour laquelle, il est important de la substituer afin d'améliorer sa perméabilité cellulaire tout en conservant l'activité inhibitrice des composés. Ainsi, le groupement acide aminé a été remplacé par une fonction carbamate : K_i (**35**) = 16 μM . [128] Parallèlement, la substitution du soufre chez SAM par un azote substitué a été étudiée. Ainsi, lorsque l'azote est substitué par un groupement isopropyle, l'activité augmente vis-à-vis de son analogue N non substitué : K_i (**37**) = 22 μM , versus K_i (**36**) = 46 μM . [128]

D'autre part, le remplacement du motif carbamate par le motif urée a permis de dévoiler des composés jusqu'à 25 fois plus actifs que leurs homologues carbamates (**38** à **42**).^[129] En effet, le groupement urée participe dans 3 liaisons hydrogène avec DOT1L : l'atome O interagit avec la chaîne latérale du résidu Asn241 et les deux -NH- interagissent avec le carbonyle chargé négativement du résidu Asp161. La longueur optimale de la chaîne liant le motif urée et l'azote est de 3 méthylènes. Par contre, l'absence d'un méthylène entre l'urée et le phényle augmente l'activité: K_i (**39**) = 550 nM, versus K_i (**38**) = 1,9 μ M. Egalement des études de relations structure-activité ont révélé qu'un substituant en 4 sur la phénylurée, tels que 4-Cl, 4-*tert*-Bu et 4-CF₃, augmente l'activité d'un facteur dix : K_i (**40**) = 70 nM, versus K_i (**39**) = 550 nM. Enfin le remplacement du -S- par -N-(*i*-Pr)- (qui avait déjà montré un rôle important) a conduit aux composés SYC-522 (**41**) et SYC-534 (**40**), mais avec un mauvais profil métabolique. L'augmentation de l'activité pourrait être due aux motifs -N-(*i*-Pr) et N-(4-*tert*-butyl)-urée, ce dernier participant à des liaisons de van der Waals avec une poche hydrophobe formée par les résidus Asn241, Ser269, Val267, Tyr312, Met147, Leu143, Val144 et Val169, poche non observée lorsque SAM est dans le site catalytique. Ces changements conformationnels chez DOT1L sont également observés lorsque EPZ004777 (**43**) se lie à DOT1L (**figure 1.25**).^[129–132]

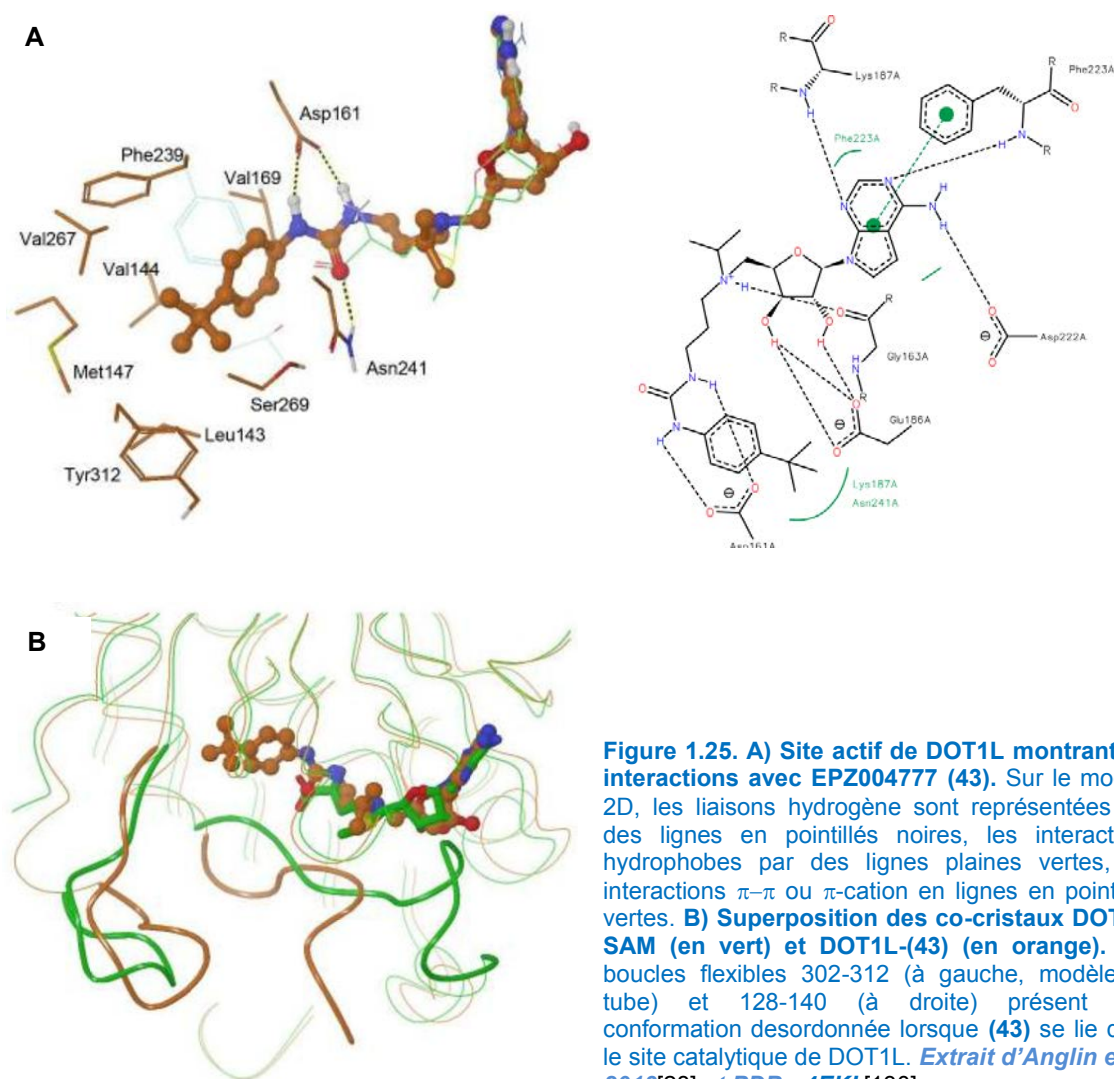


Figure 1.25. A) Site actif de DOT1L montrant les interactions avec EPZ004777 (43**).** Sur le modèle 2D, les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes en pointillés noires, les interactions hydrophobes par des lignes plaines vertes, les interactions π - π ou π -cation en lignes en pointillés vertes. **B) Superposition des co-cristaux DOT1L-SAM (en vert) et DOT1L-(43) (en orange).** Les boucles flexibles 302-312 (à gauche, modèle en tube) et 128-140 (à droite) présentent une conformation désordonnée lorsque **43** se lie dans le site catalytique de DOT1L. *Extrait d'Anglin et al. 2013*^[28] et *PDB : 4EKI*.^[130]

Le composé EPZ004777 (**43**) a été synthétisé par *Epizyme*.^[130,131,133] Le composé (**43**) contient le motif déazaadénosine à la différence du composé SYC522 (**41**) qui contient le motif adénosine. Il se positionne dans le site catalytique de DOT1L de la même façon que le cofacteur SAM. Par contre, le co-cristal DOT1L-(**43**) révèle un changement conformationnel du site catalytique afin d'accueillir le motif *tert*-butylphénylurée, notamment au niveau des boucles 302-312 et 128-140 (**figure 1.25**).

Le composé (**43**) s'est révélé intéressant dans les essais précliniques mais il a montré un mauvais profil pharmacocinétique : un temps de demi-vie court qui obligeait une administration par perfusion continue durant 7 jours.^[133] Ainsi, des pharmacomodulations ont été entreprises sur (**43**), et le composé (**45**) de type benzimidazole a été obtenu.

Composés de type benzimidazole

A l'heure actuelle, le composé EPZ-5676 (**45**), pinometostat, est impliqué dans des essais cliniques. Il est le résultat des pharmacomodulations autour du composé EPZ004777 (**43**). Le *linker* -CH₂-CH₂-CH₂- a été remplacé par le linker *cis*-éthylcyclobutane, et le motif 4-*tert*-butylphénylurée par le groupement 5-*tert*-butylbenzimidazole. Le motif adénosine du composé (**45**) interagit de la même manière que le motif adénosine du cofacteur SAM. D'ailleurs, (**45**) induit un changement de conformation du site catalytique de DOT1L afin d'accueillir le motif *tert*-butylbenzimidazole (**figure 1.26**).^[134] Ces interactions et le changement conformationnel du site catalytique de l'enzyme sont également présent dans le co-cristal DOT1L-(**43**).^[130–132]

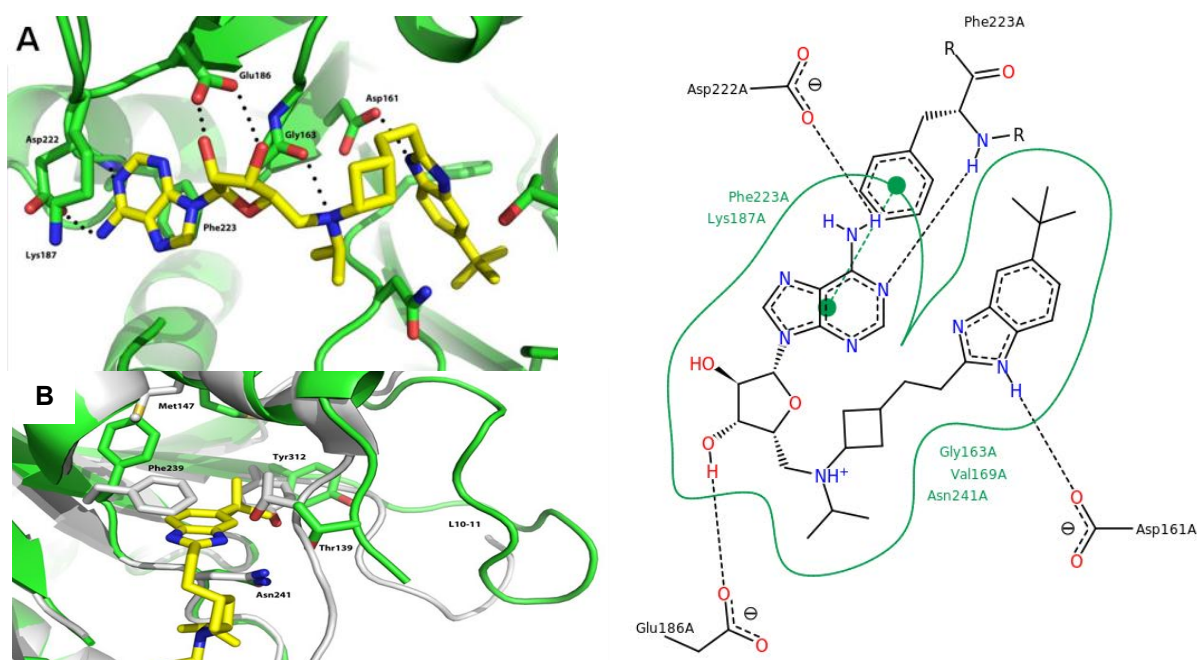


Figure 1.26. A) Site actif de DOT1L montrant les interactions avec EPZ-5676 (45**).** Sur le modèle 2D, les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes en pointillés noirs, les interactions hydrophobes par des lignes plaines vertes, les interactions π - π ou π -cation en lignes en pointillés verts. **B) Superposition des co-cristaux DOT1L-SAM (en gris) et DOT1L-(**45**) (en vert).** Extraite de Daigle et al. 2013^[135] et PDB : 4HRA.^[130]

Les deux composés EPZ004777 (**43**) et EPZ-5676 (**45**) montrent une sélectivité importante pour DOT1L, et sont inactifs vis-à-vis d'une gamme de 8 HMTs (uniquement une activité faible contre PRMT5). Comme d'autres inhibiteurs de DOT1L contenant le motif ribose, ils possèdent un mauvais profil pharmacocinétique, notamment un temps de demi-vie court : plusieurs enzymes reconnaissent les motifs adénosine ou déazaadénosine, de sorte que l'adénine et/ou le substituant en 5' est clivé.[28,135–138]

EPZ-5676, pinometostat (**45**) a participé dans des essais cliniques récemment achevés dans le traitement de la leucémie et les syndromes myélodysplasiques (SMD) (ClinicalTrials.gov : NCT02141828 et NCT01684150). La firme Epizyme a volontairement arrêté en 2015, le recrutement des patients de la phase 1 d'essais cliniques car il montre une efficacité insuffisante en monothérapie. Par contre, l'étude d'échelonnement de Phase I avec des patients pédiatriques, débuté en 2014, et des études précliniques en combinaison avec d'autres agents anticancéreux sont actuellement en cours.[11] Il reste le premier inhibiteur d'HMT impliqué dans des essais cliniques et il a reçu le label « médicament orphelin » par la FDA (*Food and Drug Administration* aux EU) et par la Commission Européenne pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL) et la leucémie myéloïde aiguë (AML).[139] Par ailleurs, une résistance post-traitement avec le pinometostat (**45**) (*treatment emergent resistance -TER*) a été mise en évidence chez cinq types de cellules différentes *MLL-r* (KOPN-8, MOLM-13, MV4-11, NOMO-1 et SEM). Des études ont confirmé que la résistance n'est pas due à une mutation de la cible (DOT1L), mais due à une pompe à efflux ABCB1 (glycoprotéine P, MDR1) ou à un mécanisme indéterminé à l'heure actuelle mais indépendant de ce transporteur.[140]

Remplacement du noyau ribofuranose

Etant donnée l'instabilité chimique et métabolique des inhibiteurs DOT1L cités précédemment, des travaux ont été menés pour remplacer le noyau ribofuranose par un carbocycle à 5 sommets. Ainsi le composé SYC-687 (**46**) a été synthétisé par Song *et al.*. La position 4' est essentielle et un seul des énantiomères montre une activité plus importante et une bonne stabilité métabolique ($CL_{int} = 0,36 \mu\text{L} / \text{min}^{-1} / \text{mg}^{-1}$ protéine), stabilité plus importante que celle de son analogue portant un noyau cyclopentène.[28,129]

Composés halogénés en 7 de l'adénosine

Des études antérieures avaient montré l'importance d'un groupement volumineux, en particulier un halogène, en position 7 de l'adénosine afin d'inhiber DOT1L. Conçu à partir de ces études, le composé SGC0946 (**44**) a montré une sélectivité et une activité comparables à celles de son analogue non halogéné EPZ004777 (**43**). (**44**) est moins actif vis-à-vis des PRMTs ($K_i = 1 \text{ mM}$) et il est inactif sur les HMTs ayant le domaine SET, il est donc plus sélectif pour DOT1L.[28,131]

Composés non nucléosidiques

D'autres inhibiteurs de DOT1L ne contenant pas le motif adénosine ni ribofuranose ont été récemment décrits (**figure 1.27**). Etant donné leur structure chimique, ils montrent une stabilité chimique et métabolique plus importantes que ceux de type nucléosidique.

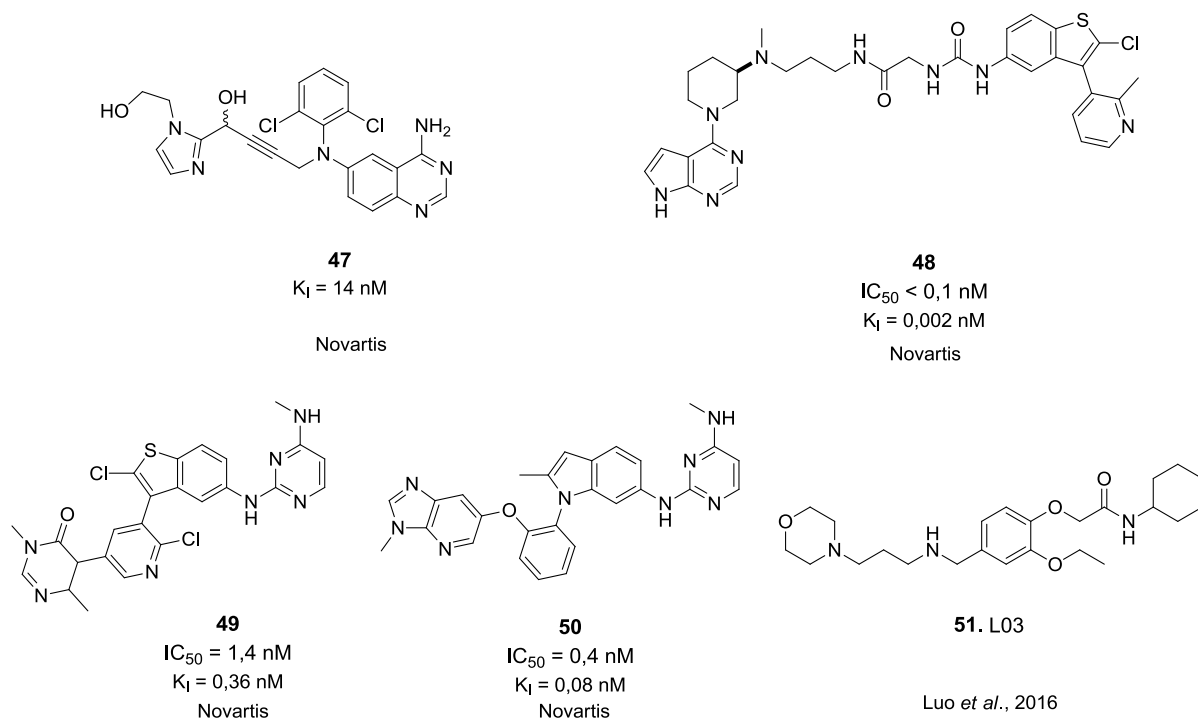


Figure 1.27. Inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) non nucléosidiques. Les IC_{50} et les K_i présentées correspondent respectivement à la concentration inhibitrice médiane et à la constante d'inhibition, calculés par *Scintillation Proximity Assay* (SPA).[141–143]

Les composés (**47**) et (**48**) sont le résultat d'une optimisation d'un *hit* trouvé à partir d'un *screening* de type « fragment-based » liée à une étude de type « structure-based ligand ».[141,143] Les composés (**49**) et (**50**) sont le résultat des pharmacomodulations entreprises au tour d'un *hit* trouvé par une étude *HTS*.[142] Même si ces molécules montrent un mode de liaison différent à celui des inhibiteurs nucléosidiques, ils présentent le même mécanisme de compétition avec le cofacteur SAM. En effet, les co-cristaux de ces composés et DOT1L montrent qu'ils induisent la formation d'une poche adjacente au site accueillant le cofacteur SAM. La nouvelle poche formée conduit à un changement de conformation de la poche de liaison au cofacteur SAM, lui empêchant sa liaison à l'enzyme.

Le dérivé phénoxyacétamide L03 (**51**) est issu d'un *screening* de modélisation moléculaire en combinaison avec une simulation de dynamique moléculaire sur DOT1L. Il constitue un motif différent pour le développement d'inhibiteurs de DOT1L. Cette étude met en évidence que la liaison hydrogène entre le $-NH$ du motif benzimidazole de l'inhibiteur EPZ-5676 (**45**) et le résidu Asp161 de DOT1L contribue de façon importante à la liaison entre l'inhibiteur et l'enzyme.[144] En effet, le composé EPZ004777 (**43**) forme également une liaison hydrogène avec le résidu Asp161 via son motif urée.

Bien que les études de relations structure activité décrites ici aient permis de repérer des éléments clés pour le développement des inhibiteurs de DOT1L, il est toujours nécessaire de concevoir de nouvelles molécules chimiquement et métaboliquement plus stables. Les inhibiteurs de type non nucléosidiques présentent une nouvelle alternative prometteuse pour cibler DOT1L.

1.6 Méthylation de l'ADN et la méthylation des histones : le *crosstalk*

La localisation et le niveau de méthylation des histones peuvent avoir une certaine influence sur l'activité de DNMT. En effet, les méthylations de l'ADN et des histones sont étroitement liées, on parle de *crosstalk*. [145,94,29,146,3] Par exemple, la triméthylation du résidu lysine 36 sur la queue de l'histone 3 (H3K36me3) est liée à la méthylation de l'ADN. Cette modification peut être reconnue par le domaine PWWP de DNMT3a et DNMT3b afin de guider la méthylation de l'ADN. Par conséquent, une mutation du domaine PWWP de l'enzyme, ou l'absence de la marque épigénétique H3K36me3 cause la perte d'interaction de DNMT avec le nucléosome. Ceci conduit à une diminution de la méthylation aux régions péri-centromériques. [3,46,147] En revanche, dans les régions promotrices, H3 non modifiée peut être reconnue par DNMT3 via son domaine ADD ; la méthylation de H3K4 inhibe donc DNMT3. [29]

Etant donné cette relation entre la méthylation de l'ADN et des histones, une approche multi-cible pourrait s'appliquer pour le développement des molécules avec une activité anticancéreuse plus importante. [12,13] Ainsi, des composés à double effet pourraient être une approche thérapeutique intéressante dans le cadre du développement d'agents anticancéreux comme les inhibiteurs mixtes DNMT/EZH2 [14] et DNMT/G9a [15], récemment décrits. [13,12,14,15]

Chapitre 2 : Conception

2.1 Modélisation moléculaire de SGI-1027 (17)	66
2.2 Etude des inhibiteurs de DOT1L.....	68
2.3 Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L	71

Chapitre 2 : Conception

Etant donné que DOT1L utilise le même cofacteur SAM que les DNMTs, les connaissances sur les inhibiteurs de DNMTs mimant le cofacteur pourraient s'appliquer au développement des inhibiteurs sélectifs de DOT1L.

2.1 Modélisation moléculaire de SGI-1027 (17)

Une étude de modélisation moléculaire du composé **SGI-1027 (19)**, inhibiteur de DNMT, dans le site catalytique de cette enzyme a été décrite dans la littérature.[66] Les données cristallographiques du site catalytique de la DNMT bactérienne d'*Haemophilus haemolyticus* (MHhal DNMT ; PDB : 2HR1)[148] ont été utilisées étant donné que le site catalytique est bien conservé parmi les différentes isoformes de DNMTs. De plus, le produit du transfert du méthyle par SAM (la SAH ou AdoHcy) et le substrat (deoxycytidine) sont bien résolus dans la structure cristalline correspondante (PDB : 2HR1). A partir de la modélisation moléculaire, il a été constaté que le motif aminopyrimidine du (**19**) s'emboîte dans la poche de liaison du motif adénine du cofacteur SAM (SAH dans ce cas-ci) au sein du site catalytique de DNMT. (**figure 2.1**).[66]

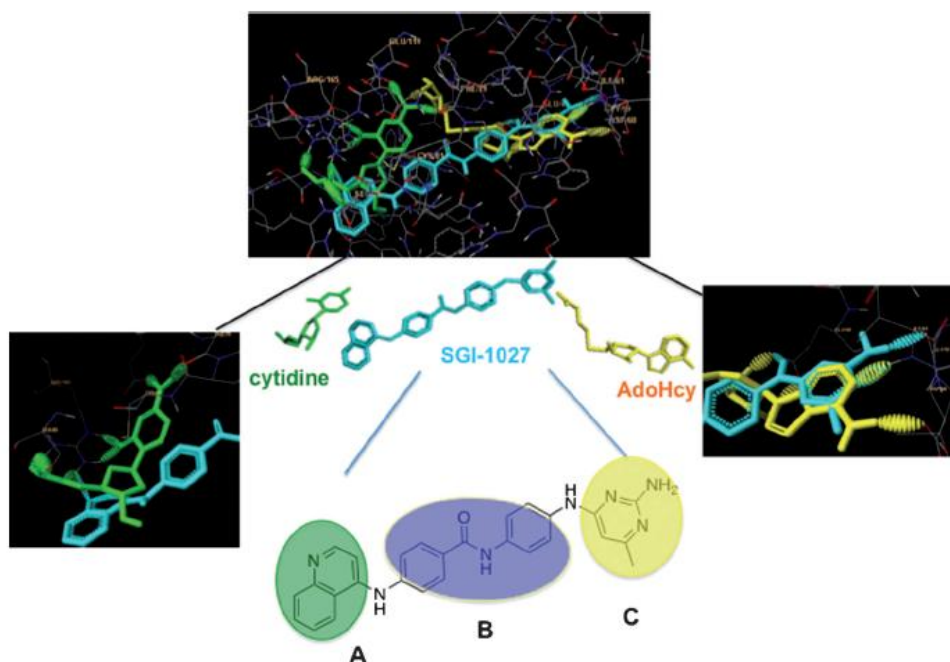


Figure 2.1. Etude de modélisation moléculaire du composé SGI-1027 (19) dans le site catalytique de la DNMT chez *Haemophilus haemolyticus* (MHhal DNMT ; PDB : 2HR1). SAH (AdoHcy) en jaune, le substrat cytidine en vert et SGI-1027 (19) en bleu. Le motif aminopyrimidine de (17) (motif C) se superpose au motif adénine du SAH (image à droite).[66]

De plus, la superposition du *docking* du **SGI-1027 (19)** et du *docking* du **SAH** dans le même site catalytique de DNMT montre que le motif aminopyrimidine de l'inhibiteur est superposable au

cycle à six sommets de l'adénine du SAH dans la même région de la poche catalytique de l'enzyme (**Figure 2.2**).

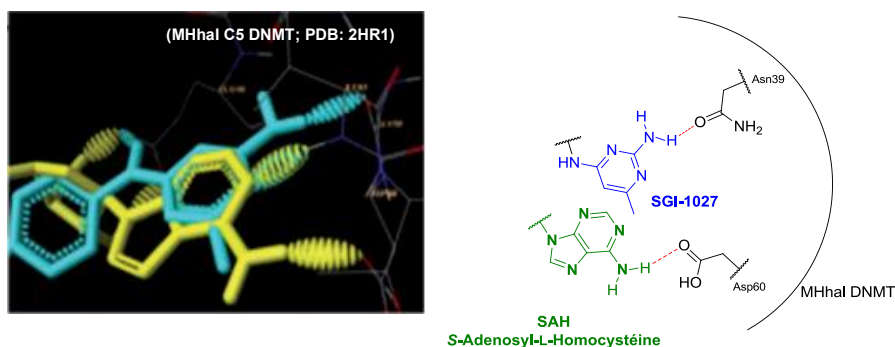


Figure 2.2. Superposition des dockings du composé SGI-1027 (19) et de SAH dans le site catalytique de DNMT (PDB : 2HR1). SAH (AdoHcy) en jaune, le SGI-1027 (17) en bleu. *Adapté de Rilova et al., 2014.[66]*

D'ailleurs, le groupement amino du noyau pyrimidine du (19) et le groupement amino du noyau adénine de **SAH** forment une liaison hydrogène au sein du site catalytique de DNMT :[66]

- Le groupement amino du motif aminopyrimidine de (19) établie une liaison hydrogène avec l'amide du résidu Asn39 (correspondant au résidu Ser659 dans DNMT3A).
- Le groupement amino en C4 de l'adénine du SAM/SAH établie une liaison hydrogène avec l'acide carboxylique du résidu Asp60 (correspondant au résidu Asp682 dans DNMT3A).

D'autre part, nous avons réalisé une étude de modélisation moléculaire du composé (19) dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4EKI) et nous avons confirmé que le motif aminopyrimidine de ce composé interagit avec le site catalytique de l'enzyme via (**figure 2.3**) :

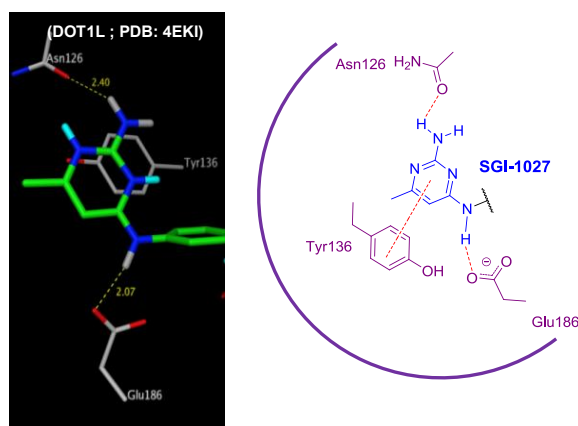


Figure 2.3. Modélisation moléculaire du composé SGI-1027 (17) dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4EKI)

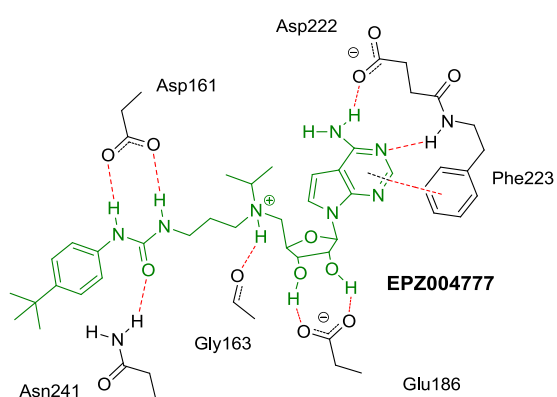
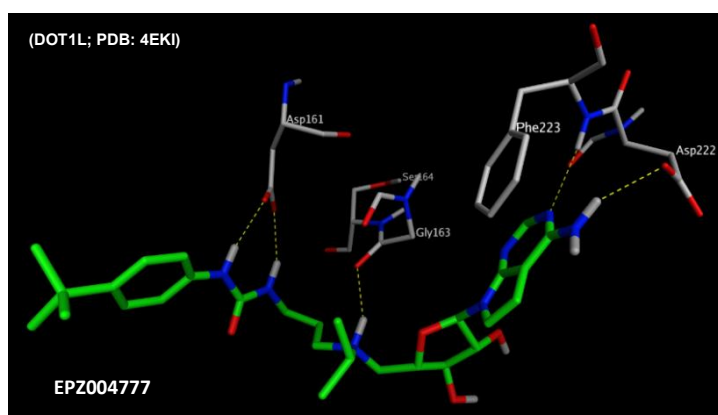
- Une liaison hydrogène entre le $-NH_2$ en position 2 de la pyrimidine et le carbonyle de la chaîne latérale du résidu Asn126
- Une liaison hydrogène entre le $-NH-$ en position 4 de la pyrimidine et le carbonyle de la chaîne latérale du résidu Glu186.
- Une interaction π entre le noyau pyrimidinique et l'aromatique du résidu Tyr136.

A partir de ces résultats de modélisation moléculaire, nous avons conclu que le motif aminopyrimidine de **SGI-1027 (19)** pourrait mimer l'adénosine du cofacteur SAM.

2.2 Etude des inhibiteurs de DOT1L

Les composés **EPZ004777 (43)** et **EPZ-5676 (45)** présentent une activité et une spécificité importantes vis-à-vis de DOT1L. De plus, (45) est actuellement impliqué dans des essais cliniques. Nous nous sommes donc basés sur la résolution des co-cristaux de ces composés dans le site catalytique de DOT1L (**figure 2.4**).[129–132,135]

A



B

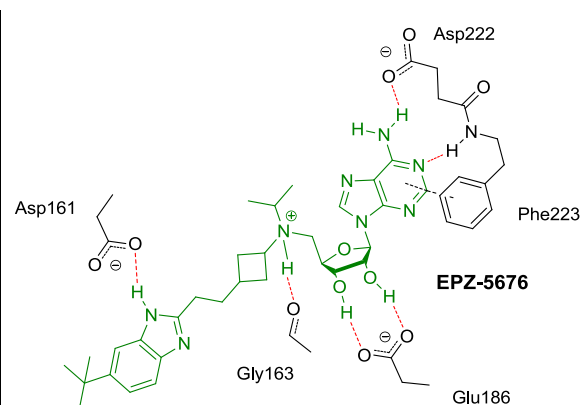
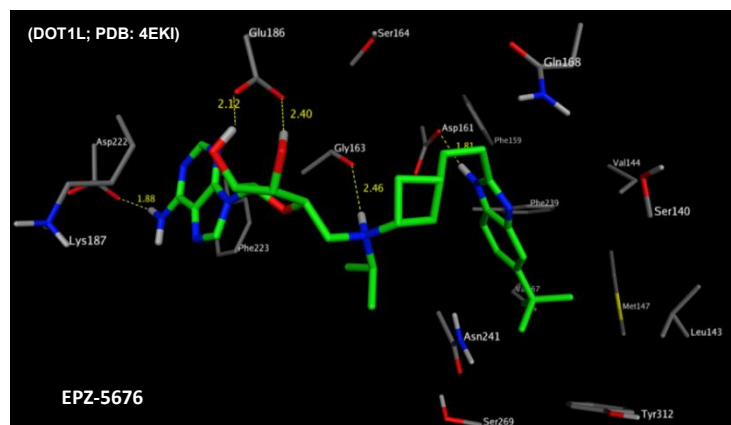


Figure 2.4. Représentation schématique des interactions des composés EPZ004777 (43) (A) et EPZ-5676 (45) (B) dans le site catalytique de DOT1L. Les liaisons hydrogène sont schématisées en rouge.

Les composés **EPZ004777 (43)** et **EPZ-5676 (45)** montrent tous les deux des interactions entre les motifs adénosine (ou deazadénosine), le motif ribose et le site catalytique de DOT1L :

- Une liaison hydrogène entre le $-NH_2$ de la (deaz)adénosine et le carbonyle de la chaîne latérale du résidu Asp222.

- Une liaison hydrogène entre le N^4 du même motif et le NH- de la liaison peptidique liant les résidus Asp222 et Phe223.
- Deux liaisons hydrogène entre les hydroxyles du ribose et le carboxyle de la chaîne latérale du résidu Glu186.
- Une interaction π - π entre la (deaz)adénosine et le résidu Phe223.

Ces interactions sont également montrées dans le co-cristal DOT1L : SAM (**figure 1.21**).[119,117,28,135]

Les deux inhibiteurs **EPZ004777 (43)** et **EPZ-5676 (45)** montrent également une liaison hydrogène entre le NH- de leur motif isopropylamine chargé positivement à pH physiologique et le carbonyle du résidu Gly163.

D'autre part, le composé **EPZ004777 (43)** montre 3 autres liaisons hydrogène :

- Deux liaisons hydrogène entre les -NH- de l'urée et le carbonyle de la chaîne latérale du résidu Asp161.
- Une liaison entre le carbonyle du motif urée et le NH_2 de la chaîne latérale du résidu Asn241.

En revanche, le composé **EPZ-5676 (45)** ne crée qu'une seule liaison hydrogène entre l'azote du benzimidazole et le carbonyle de la chaîne latérale du résidu Asp161.

Les deux inhibiteurs (**43**) et (**45**) induisent l'ouverture d'une poche hydrophobe dans le site catalytique de DOT1L accueillant les motifs *tert*-butylphénylurée et *tert*-butylbenzimidazole (**figure 2.5**).

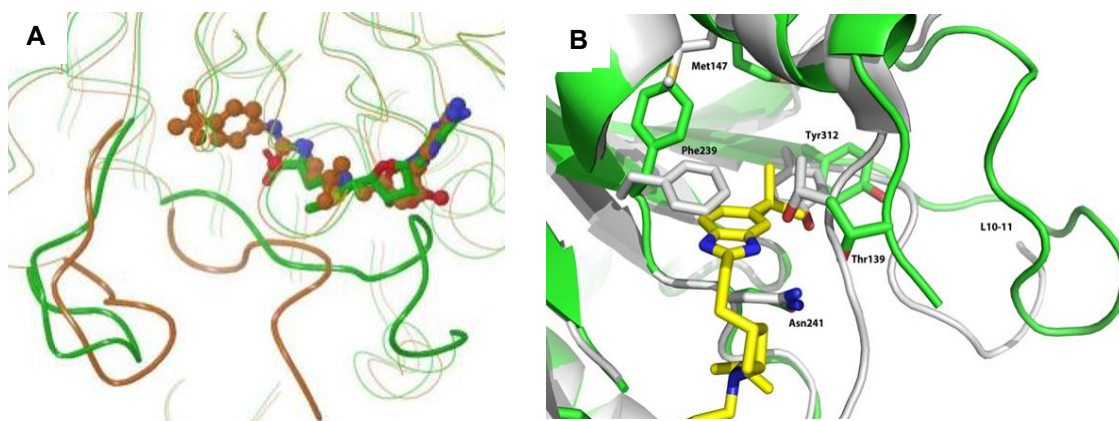


Figure 2.5. A) Superposition des co-cristaux DOT1L-SAM (en vert) et DOT1L-(43) (en orange). Les boucles flexibles 302-312 (à gauche, modèle en tube) et 128-140 (à droite) présentent une conformation désordonnée lorsque (43) se lie dans le site catalytique de DOT1L. *Extrait d'Anglin et al. 2013.[28]* **B) Superposition des co-cristaux DOT1L-SAM (en gris) et DOT1L-(45) (en vert).** *Extrait de Daigle et al. 2013.[135]*

Cette poche n'est pas observée dans le complexe DOT1L-SAM. En effet, ce changement de conformation de l'enzyme implique un déplacement du résidu Thr139 de ~ 3 Å du site de liaison au cofacteur SAM. Ceci conduit à une boucle L-EF désordonnée. De plus, le résidu Phe239 doit tourner, ce qui entraîne un déplacement du résidu Met147. Le résidu Tyr312 doit donc se positionner différemment pour accueillir le groupement *tert*-butyle des inhibiteurs. Tous ces changements conformationnels provoquent un changement important dans la structure de la boucle L10-11.[135]

Les motifs *tert*-butylphénylurée et *tert*-butylbenzimidazole sont donc importants à conserver pour concevoir des inhibiteurs sélectifs de DOT1L.

2.3 Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L

A partir de ces réflexions, une structure générale a été conçue (**figure 2.6**).

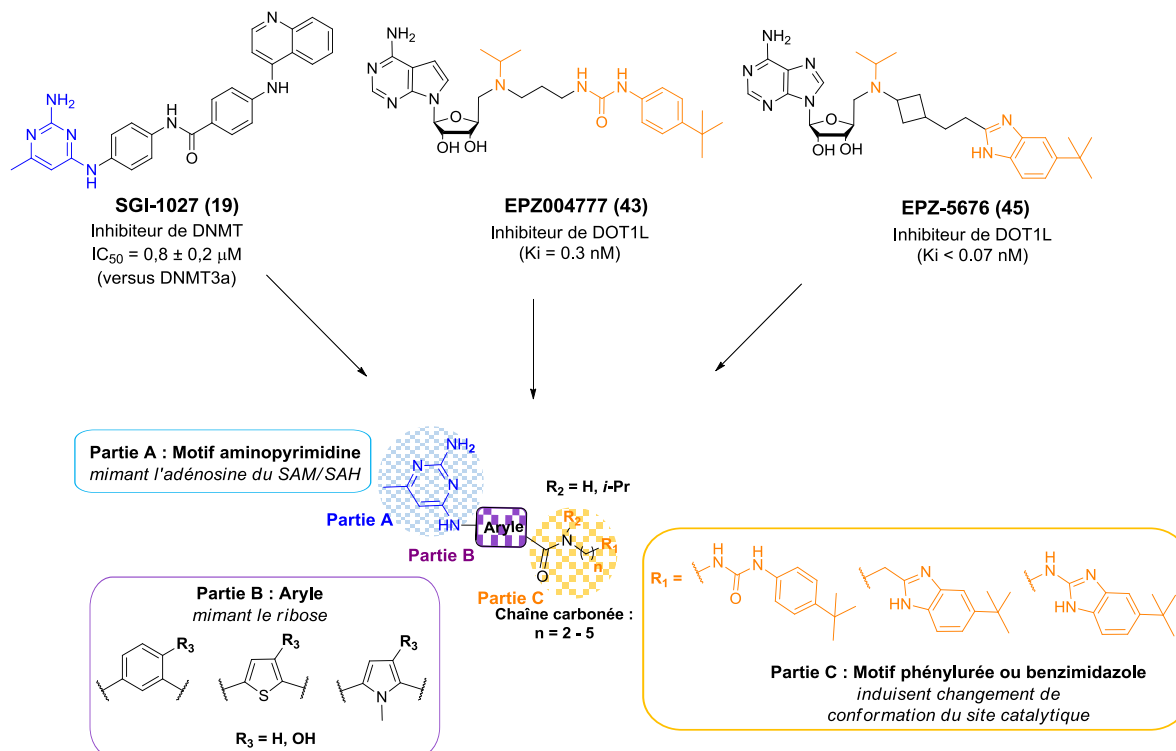


Figure 2.6. Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L basée sur les molécules SGI-1027 (inhibiteur de DNMT) et EPZ-5676 et EPZ004777 (inhibiteurs de DOT1L)

Cette structure générale comporte :

- **Partie A :** Le motif aminopyrimidine présent dans le composé **SGI-1027 (19)**. Les études de modélisation moléculaire mettent en évidence qu'il peut mimer le motif adénosine du cofacteur SAM. Il remplacera donc les motifs adénosine ou déazadénosine des inhibiteurs de DOT1L de référence (**43** et **45**).
- **Partie C :** Le motif *tert*-butylphénylurée du composé **EPZ004777 (43)** ou le motif *tert*-butylbenzimidazole du composé **EPZ-5676 (45)**. Ces motifs permettront d'induire un changement de conformation du site catalytique de DOT1L. Ce changement pourrait contribuer à la spécificité des inhibiteurs potentiels vis-à-vis d'autres enzymes SAM-dépendantes. Nous évaluerons une conformation flexible (urée) ou rigide (2-alkylbenzimidazole ou 2-aminobenzimidazole) de la chaîne latérale, tout en déterminant le nombre optimal de liaisons hydrogène. Nous évaluerons également le remplacement du groupement *tert*-butyle par -H, -OCH₃, -Cl et -CF₃, afin de confirmer son impact dans l'activité de nos inhibiteurs.
- **Partie B :** Un aryle mimant le ribose des (**43**) et (**45**). Cet aryle sera un noyau benzénique ou un hétérocycle à 5 sommets (thiophène, pyrrole), permettant de lier les parties A et C et de les positionner correctement dans le site catalytique. Nous évaluerons la présence d'un

groupement hydroxyle sur l'aryle qui pourrait s'engager à une liaison supplémentaire dans le site catalytique.

Nous allons déterminer la distance optimale entre les **parties B** et **C** par le biais d'une chaîne carbonée (2 à 5 méthylènes). La chaîne carbonée sera liée à la partie B via une liaison amide ou une méthylamine afin d'évaluer les degrés de liberté. Egalement, nous allons évaluer le rôle du groupement isopropyle présent dans les inhibiteurs de référence (**43**) et (**45**).

Les différentes pharmacomodulations énoncées nous permettront d'explorer le site catalytique de DOT1L et de déterminer différentes relations structure-activité (RSA) permettant d'affiner le pharmacophore proposé.

Chapitre 3 : Stratégies de synthèses

3.1 Série de composés de type phénylamide	74
3.2 Série de composés de type benzylamine	101
3.3 Série de composés de type thiophène	106
3.4 Série de composés de type pyrrole	111
3.5 Série de composés de type 3-hydroxythiophène et 3-hydroxypyrrole.....	113

Chapitre 3 : Stratégies de synthèses

3.1 Série de composés de type phénylamide

L'analyse rétrosynthétique des amides de type benzénique met en évidence deux intermédiaires de synthèse : **a)** les acides carboxyliques de type pyrimidinobenzénique, et **b)** les amines primaires ou secondaires de type phénylurée ou de type benzimidazole (**schéma 3.1**). Les amides cibles ont été obtenus via une synthèse convergente impliquant un couplage de type peptidique entre ces deux équivalents synthétiques préparés au préalable.

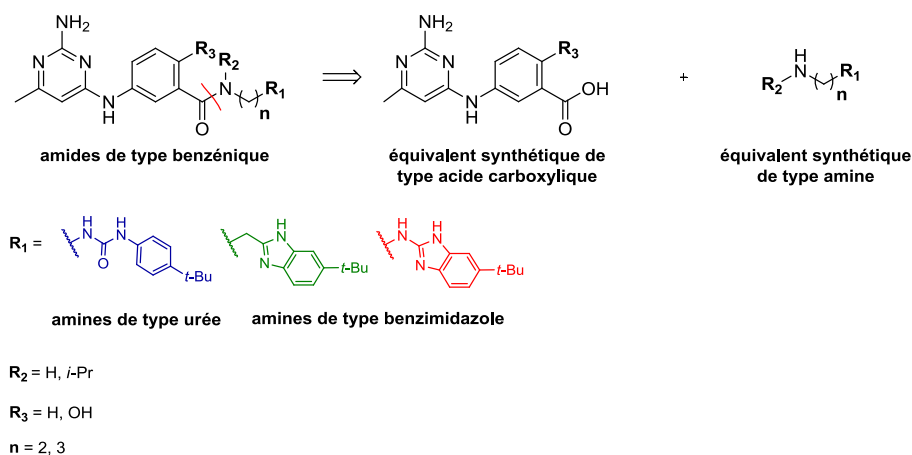


Schéma 3.1. Rétrosynthèse des amides de type benzénique

3.1.1 Synthèse des précurseurs acides carboxyliques de type pyrimidinobenzénique

La synthèse des précurseurs pyrimidinobenzéniques a été envisagée via une réaction de substitution entre une aniline et un dérivé halogéné pyrimidinique (mise au point de cette méthode décrite dans la section 3.5.2) (**schéma 3.2**).

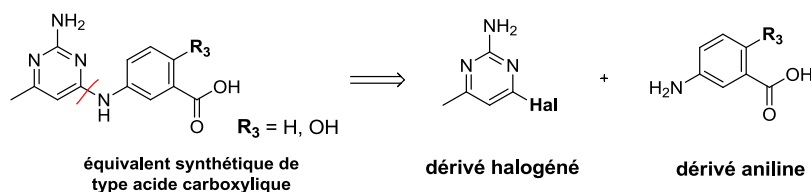


Schéma 3.2. Rétrosynthèse des précurseurs de type acide carboxylique

Les dérivés de type acides carboxylique **ALIPF193** et **ALIPF196** ont été respectivement synthétisés grâce à une substitution nucléophile aromatique (S_NAr) entre la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine et les acides 3-aminobenzoïque ($R_3 = \text{H}$) ou 5-amino-2-hydroxybenzoïque ($R_3 = \text{OH}$), en présence d'acide chlorhydrique à 37 % en quantité catalytique, dans l'isopropanol sous microondes (μO) pendant 30 minutes, avec un rendement de 85 % (**schéma 3.3**).^[34,66] Les composés **ALIPF193** et **ALIPF196** ont été obtenus sous forme dichlorhydratée.

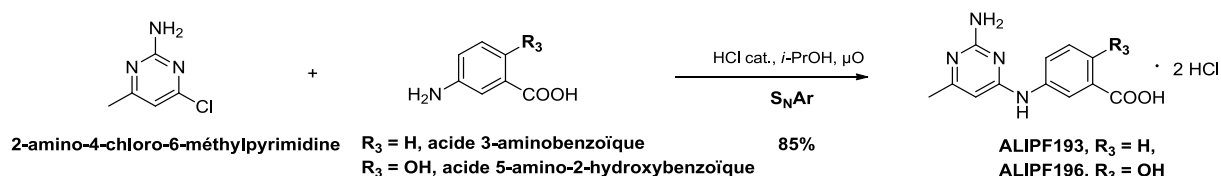
 μO : micro-ondes

Schéma 3.3. Synthèse des précurseurs de type acide carboxylique liés au motif pyrimidinique

La substitution aromatique serait facilitée par l'utilisation d'HCl conduisant à la protonation du groupement amine en position 2 de la pyrimidine. De ce fait, la densité électronique sur le carbone 4 du noyau pyrimidinique est moindre. La liaison C4 – Cl est donc affaiblie et le dérivé montre une électrophilie plus importante vis-à-vis des anilines commerciales nucléophiles (**schéma 3.4**).

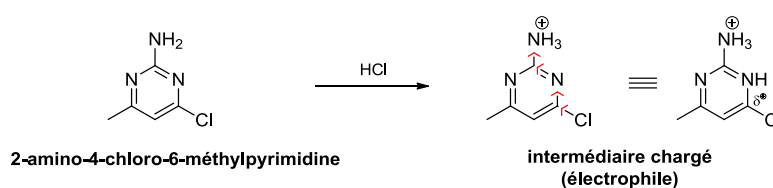


Schéma 3.4. Rôle de l'acide chlorhydrique dans la formation de l'électrophile

La même stratégie de synthèse a été appliquée pour l'obtention du dérivé triazinique **ALIPF231**. La 2,4-diamino-6-chloro-1,3,5-triazine subit une substitution nucléophile aromatique par l'acide 3-aminobenzoïque en présence d'HCl en quantité catalytique, dans l'isopropanol sous microondes pendant 15 minutes, avec un rendement de 78 % (**schéma 3.5**).

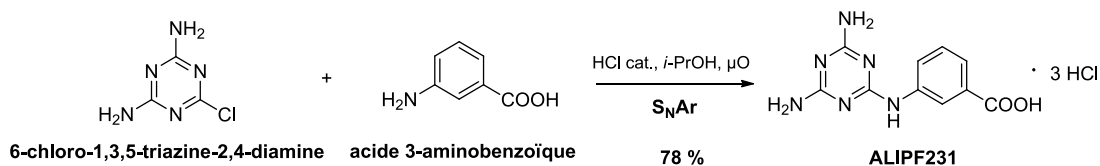
 μO : micro-ondes

Schéma 3.5. Synthèse du précurseur benzénique lié au motif triazinique

A la différence de la réaction avec la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine, la réaction avec l'analogue triazinique s'est faite plus rapidement (15 minutes), étant donnée une réactivité plus importante du noyau triazinique.

3.1.2 Synthèse des précurseurs amines de type phénylurée

La synthèse des précurseurs de type isopropylamine a été initialement envisagée selon une substitution nucléophile de l'isopropylamine sur les dérivés halogénés correspondants. Les dérivés halogénés proviennent de l'addition de la *p*-*tert*-butylaniline sur les isocyanates halogénés adéquats (**schéma 3.6**).

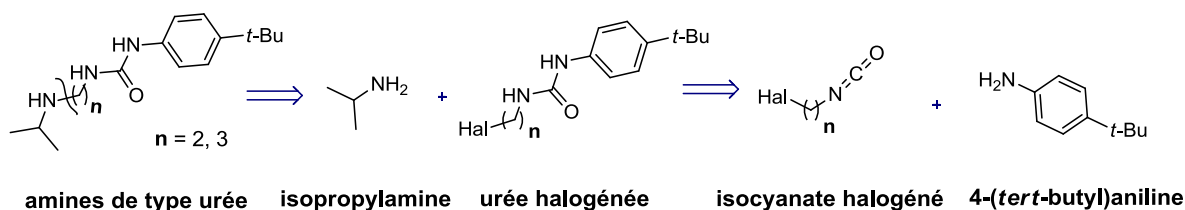


Schéma 3.6. Rétrosynthèse des amines de type phénylurée via une substitution nucléophile

3.1.2.1 Synthèse des urées

Les urées halogénées **ALIPF175** et **ALIPF138** sont obtenues par l'addition de la *p*-*tert*-butylaniline sur l'isocyanate correspondant dans la pyridine sous atmosphère inerte pendant 4 heures (pour **ALIPF175**) ou 24 heures (pour **ALIPF138**) (schéma 3.7),[149] avec un rendement moyen de 73 %.

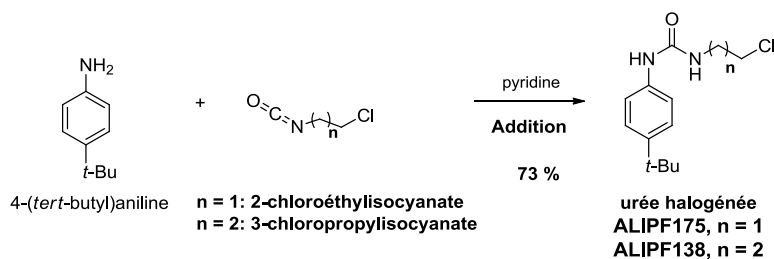
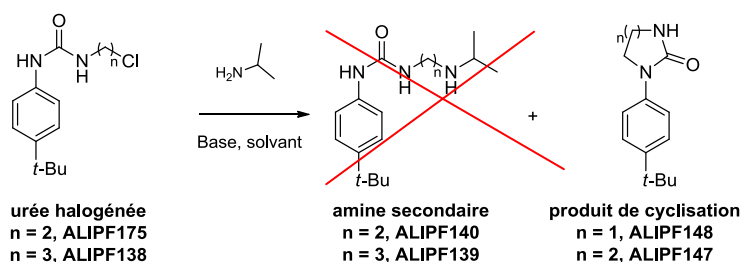


Schéma 3.7. Synthèse de l'urée via un mécanisme d'addition

3.1.2.2 Synthèse des amines secondaires via une substitution nucléophile (S_N)

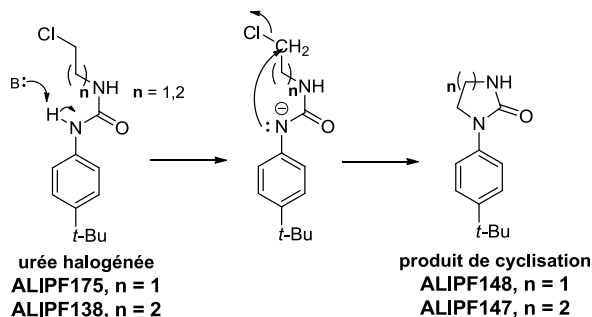
La synthèse des amines secondaires de type phénylurée a été initialement envisagée par le biais de la substitution nucléophile des urées halogénées par l'isopropylamine en présence d'une base via un mécanisme S_N2 . Différentes conditions de réaction ont été évaluées parallèlement pour les composés **ALIPF175** et **ALIPF138** (tableau 3.1).[150–154] Cependant, les amines souhaitées n'ont pas été obtenues. Seule la cyclisation du produit de départ a été mise en évidence.

Tableau 3.1. Conditions réactionnelles évaluées pour l'obtention des amines secondaires via une S_N

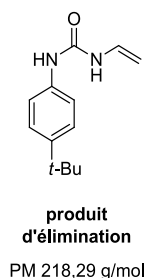
Entrée	Base	Solvant	Température (°C)	Durée (h)	ALIPF148 (%) ^a	ALIPF147 (%) ^a
1	1 éq. K ₂ CO ₃	Acétone	20	12	0	ND
2	1 éq. K ₂ CO ₃	Acétone	56 (reflux)	24	40	ND
3	2 éq. K ₂ CO ₃	DMF	20	12	50	ND
4	2 éq. K ₂ CO ₃	DMF	153 (reflux)	24 - 48	40	40
5	1,1 éq. Cs ₂ CO ₃ .H ₂ O 1,1 éq. KI	CH ₃ CN	20	12	ND	40
6	1,1 éq. CsOH.H ₂ O 1,1 éq. KI	DMF	20	12	ND	90
7	1 éq. DIEA	CH ₂ Cl ₂	20	24	ND	0
8	2 éq. DIEA	DMF	153 (reflux)	24 - 48	0	0
9	1,1 éq. TEA 1,1 éq. NaI	THF	66 (reflux)	60	ND	80

^aRendement du produit isolé.
ND : non déterminé

Les bases organiques *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) et triéthylamine (TEA) n'ont permis la formation d'aucun produit, quelles que soient les conditions de réaction (**tableau 3.1, entrées 7, 8**), excepté lors de la réaction dans du THF à reflux où la formation du produit de cyclisation a été favorisée (**tableau 3.1, entrée 9**). En revanche, les bases inorganiques K₂CO₃, Cs₂CO₃ et CsOH utilisées permettent la cyclisation du produit de départ avec différents rendements allant de 40 à 90 %, quel que soit le solvant et la température, excepté lors de la réaction dans l'acétone à température ambiante (**tableau 3.1, entrée 1**). La réaction de cyclisation est due à la nucléophilie de la fonction -NH portée par l'aromatique, qui en présence d'une base, réagit comme nucléophile sur le carbone portant l'halogène via une S_N et privilégie la formation d'un cycle stable à 5 ou 6 sommets (**schéma 3.8**) et empêche la réaction de l'urée avec l'isopropylamine.

Mécanisme réactionnel**Schéma 3.8. Cyclisation des urées halogénées via un mécanisme S_N**

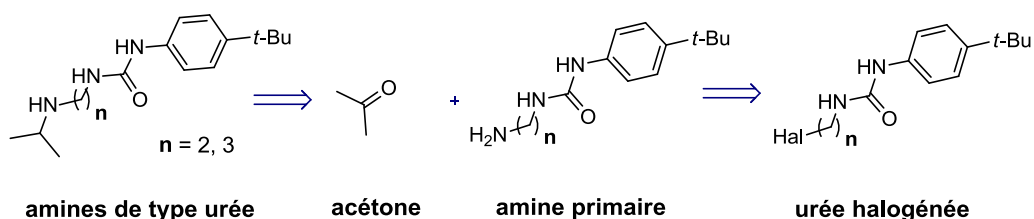
Lorsque l'urée halogénée **ALIPF175** est mise en réaction avec l'isopropylamine en présence de deux équivalents de K₂CO₃ dans du DMF à température ambiante pendant 12 heures, un produit secondaire de poids moléculaire 218,29 g/mol est mis en évidence par LC-MS. Ce dernier pourrait correspondre au produit d'élimination (**tableau 1, entrée 3**) :



Par conséquent, la voie d'accès aux amines a été modifiée par une voie en trois étapes décrite dans la section suivante.

3.1.2.3 Synthèse des amines secondaires via une amination réductrice

La synthèse des amines secondaires de type urée a été envisagée via une amination réductrice entre un dérivé carbonyle (l'acétone) et une amine primaire qui provient à son tour de l'urée halogénée correspondante (**schéma 3.9**).

**Schéma 3.9. Rétrosynthèse des amines secondaires de type urée via une amination réductrice**

Ainsi, le dérivé chloré est converti en son amine primaire correspondante via la réaction de Gabriel. L'amine primaire résultante intervient ensuite dans une amination réductrice avec l'acétone pour aboutir, en présence de NaBH₃CN, à l'amine secondaire souhaitée (**schéma 3.10**).

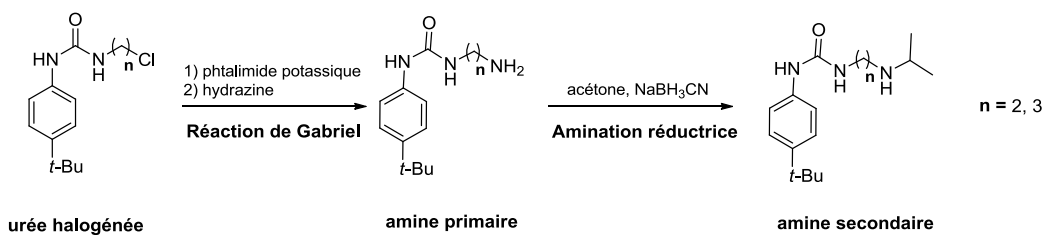


Schéma 3.10. Synthèse des amines de type phénylurée

- *Synthèse des amines primaires via la réaction de Gabriel*

Le dérivé halogéné (**ALIPF175**, **ALIPF138**) réagit donc avec la phtalimide potassique dans le DMF à reflux pendant 4 à 12 heures via un mécanisme S_N2 pour aboutir au composé phtalimido-urée correspondant (**ALIPF144**, **ALIPF153**). [152] Le rendement moyen de la réaction est de 82 % (schéma 3.11).

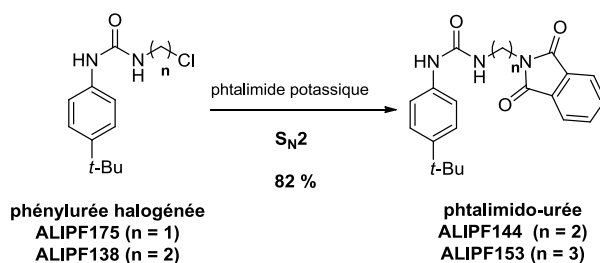
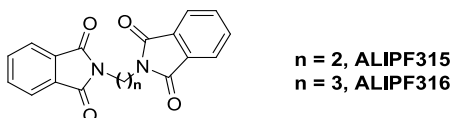


Schéma 3.11. Synthèse des composés phtalimido-urée

Afin d'éviter la formation de produits secondaires et faciliter la purification des produits cibles, le DMF a été remplacé par l'acétonitrile. Néanmoins, le rendement a diminué significativement (25 %), sûrement dû à un manque de solubilité des produits de départ. Dans cette première étape de la réaction de Gabriel, un produit secondaire a été identifié et caractérisé par RMN 1H et LC-MS correspondant à la structure suivante :



Le dérivé phtalimidourée obtenu précédemment (**ALIPF175**, **ALIPF138**) subit une réaction de déprotection par l'hydrazine monohydratée dans l'éthanol à reflux via un mécanisme S_N2 afin de libérer l'amine primaire correspondante (**ALIPF145**, **ALIPF154**) et le phtalhydrazide (schéma 3.12).

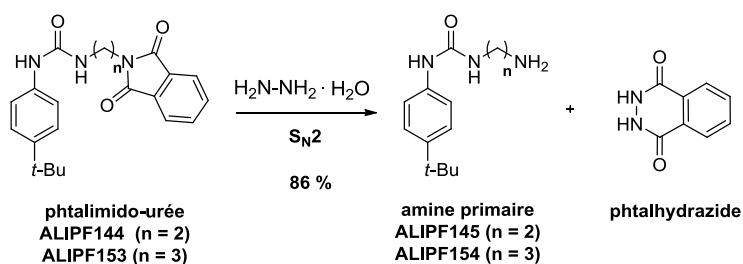


Schéma 3.12. Synthèse des amines primaires

Le rendement moyen de la deuxième étape de la réaction de Gabriel est de 86 % grâce à la mise au point d'une méthode de purification par chromatographie sur silice (CH_2Cl_2 – CH_3OH / ammoniac, 9 :1), permettant d'éliminer le phtalhydrazide. Afin de faciliter l'élimination de la phtalhydrazide, d'autres dérivés de l'hydrazine ont été évalués sous les mêmes conditions opératoires. La méthylhydrazine ne conduit à aucune réaction et le produit de départ est entièrement récupéré ; la *tert*-butylhydrazine conduit à un faible rendement étant donné que la réaction n'est pas totale. Il est clairement identifié que l'hydrazine monohydratée est le réactif le plus efficace pour cette réaction.

- Synthèse des amines primaires via une homologation de chaîne

Dans le but d'obtenir le composé **ALIPF154** directement à partir de son analogue halogéné inférieur (**ALIPF175**), une stratégie de synthèse a été envisagée par le biais d'une réduction de la fonction nitrile introduite au préalable sur un dérivé halogéné (schéma 3.13).

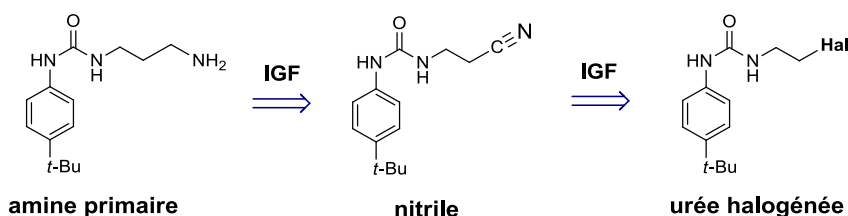


Schéma 3.13. Rétrosynthèse des amines primaires de type urée

Ainsi, l'urée halogénée **ALIPF175** subirait une substitution nucléophile par le cyanure de sodium pour obtenir le nitrile correspondant qui pourrait être réduit pour obtenir l'amine primaire (**ALIPF154**) (schéma 3.14).

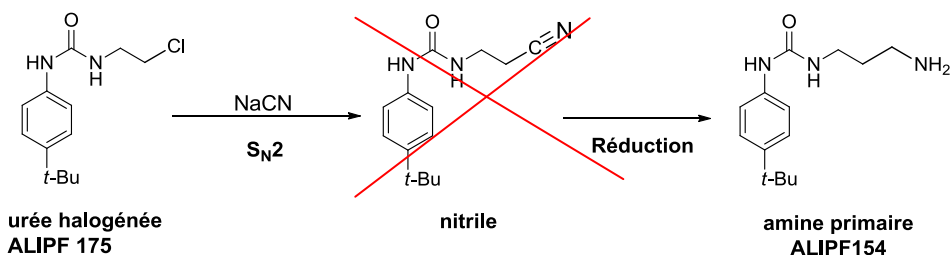


Schéma 3.14. Synthèse d'une amine primaire via une homologation de chaîne

ALIPF175 a été mis en réaction avec un excès de cyanure de sodium (6 équivalents) dans l'éthanol à reflux pendant 24 heures. Néanmoins, le produit souhaité n'a pas été obtenu. Un produit secondaire a été caractérisé et il pourrait correspondre à la structure suivante selon les analyses LC-MS et RMN ¹H. Ce produit résulterait d'une cyclisation intermoléculaire entre deux molécules d'urée suivant le mécanisme proposé dans le **schéma 3.15**.

Mécanisme réactionnel

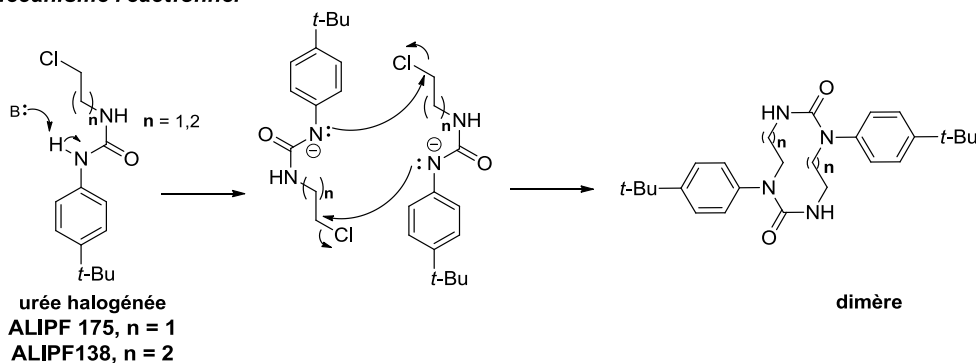


Schéma 3.15. Cyclisation intermoléculaire de deux molécules d'urée halogénée

- **Synthèse des amines primaires via une addition à l'isocyanate**

Une voie alternative, plus courte, pour l'accès aux amines primaires a été développée (**schéma 3.16**).

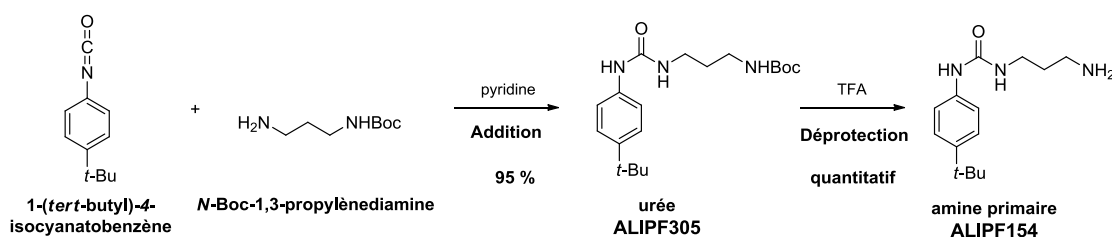


Schéma 3.16. Synthèse de l'amine primaire **ALIPF154** en deux étapes

La *N*-Boc-1,3-propylènediamine s'additionne sur le 1-(*tert*-butyl)-4-isocyanatobenzène dans la pyridine à température ambiante pour donner l'urée **ALIPF305** avec un rendement de 95 %. La fonction amine protégée sur le dérivé **ALIPF305** est déprotégée dans du TFA à température ambiante afin d'aboutir à l'amine primaire correspondante (**ALIPF154**) avec un rendement quantitatif.

Cette voie de synthèse permet d'obtenir les amines primaires avec un rendement global sur deux étapes de 71 %, rendement plus important que celui obtenu par la voie de la synthèse de Gabriel donnant un rendement global sur 3 étapes de 52 %.

- **Amination réductrice entre l'acétone et les amines primaires**

Les amines primaires (**ALIPF145**, **ALIPF154**) obtenues via la réaction de Gabriel s'additionnent au carbonyle de l'acétone pour aboutir aux imines correspondantes non isolées, imines qui sont réduites par NaBH₃CN dans le milieu réactionnel et fournissent les amines

secondaires **ALIPF140** et **ALIPF139** (schéma 3.17).[155] Le rendement moyen de la réaction est de 78 %.

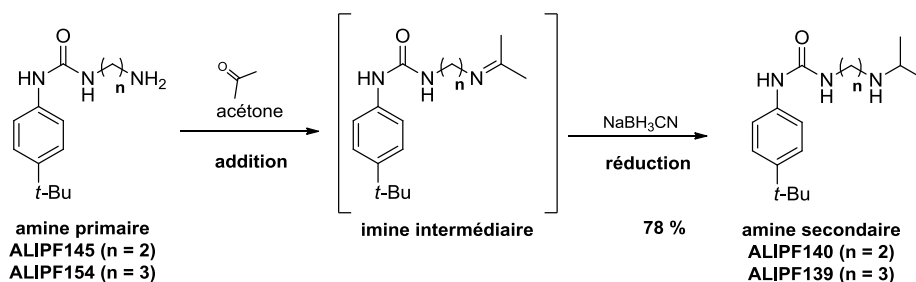


Schéma 3.17. Synthèse des amines secondaires de type phénylurée via une amination réductrice

3.1.3 Synthèse des précurseurs amines de type 2-alkylbenzimidazole

3.1.3.1 Synthèse du noyau benzimidazole à partir d'une diamine et d'un acide carboxylique activé

La synthèse des amines secondaires de type 2-alkylbenzimidazole a été envisagée à partir d'une amination réductrice entre l'acétone et les amines primaires correspondantes qui seraient déprotégées au préalable. Le noyau benzimidazole porteur de cette fonction amine protégée proviendrait d'une réaction de cyclisation entre une phényldiamine et un acide carboxylique activé (schéma 3.18).

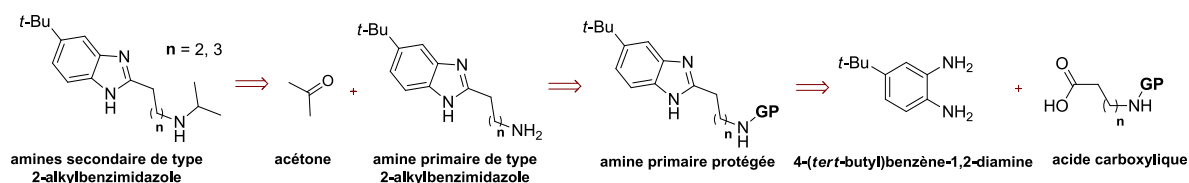


Schéma 3.18. Rétrosynthèse des amines de type 2-alkylbenzimidazole

Ainsi, l'acide 4-cyanobutanoïque réagit avec le chlorure d'oxalyle dans le dichlorométhane à température ambiante pour obtenir le chlorure d'acide intermédiaire non isolé. Puis, le chlorure d'acide réagit avec le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène en présence de TEA dans le dichlorométhane via un mécanisme d'addition-élimination pour donner l'amide qui, sans être isolé, se cyclise en milieu acide à reflux pour aboutir au benzimidazole **ALIPF181** (schéma 3.19).

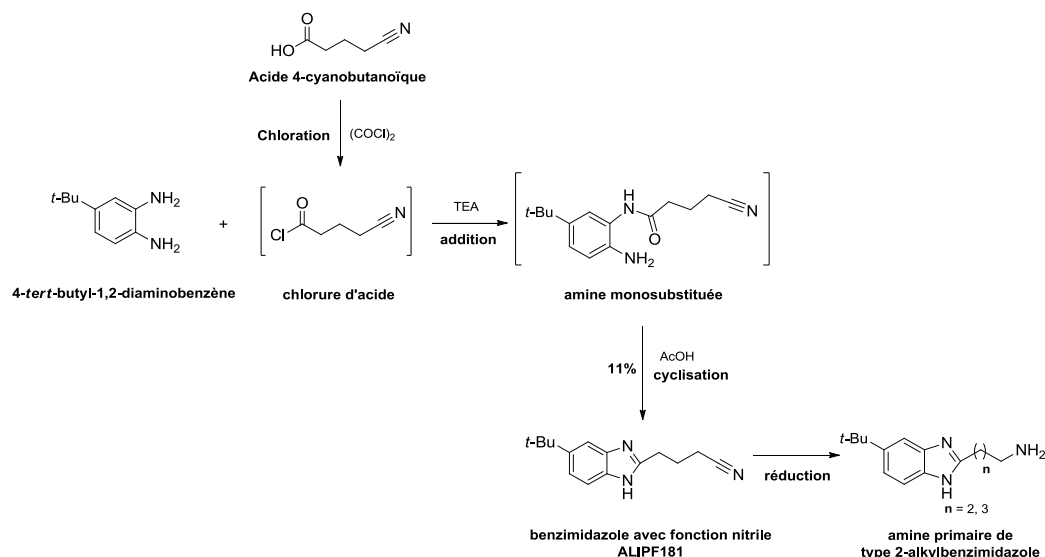
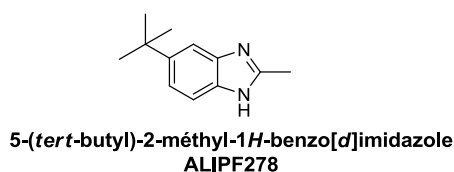


Schéma 3.19. Synthèse des précurseurs amines de type 2-alkylbenzimidazole via un chlorure d'acide

Cependant, le rendement de l'étape de cyclisation est très faible (11 %). Un produit secondaire correspondant à la cyclisation du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène résiduel avec l'acide acétique a été isolé :



Cette stratégie a donc été abandonnée.

La deuxième stratégie évaluée implique la réaction du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène avec l'acide 4-aminobutyrique ou 5-aminopentanoïque *N*-protégés au préalable. L'acide carboxylique est déprotoné par la *N*-méthylmorpholine (NMM) puis activé par l'isobutylchloroformiate, pour que la diamine conduise à la formation d'un amide qui en milieu acide forme le benzimidazole. La fonction amine protégée sur la chaîne latérale du benzimidazole est ensuite déprotégée pour aboutir à l'amine primaire souhaitée (**schéma 3.20**).[156,157]

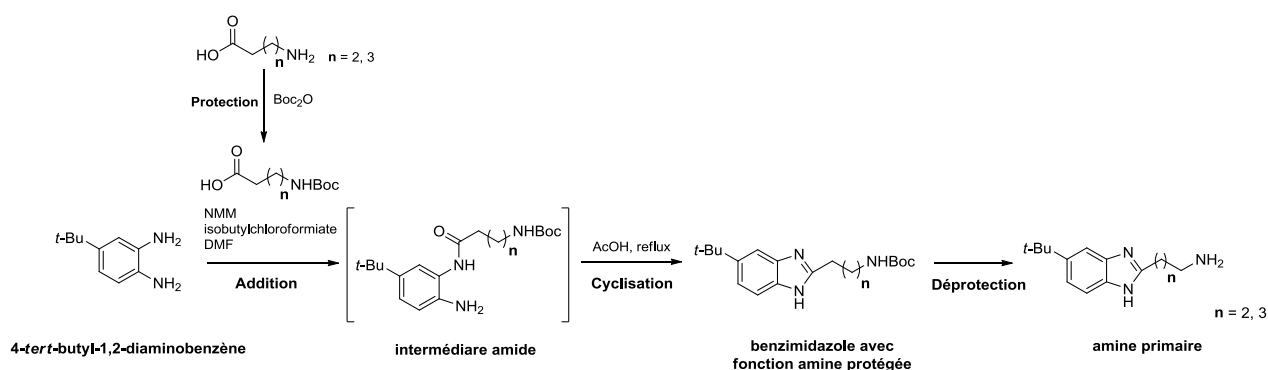


Schéma 3.20. Synthèse des amines précurseurs de type 2-alkylbenzimidazole via un anhydride mixte

De ce fait, l'acide 4-aminobutyrique réagit en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle et d'une base (hydroxyde de sodium) dans le THF à température ambiante pour donner l'amine protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) (**ALIPF212**) avec un rendement de 75 % (**schéma 3.21**).[156]

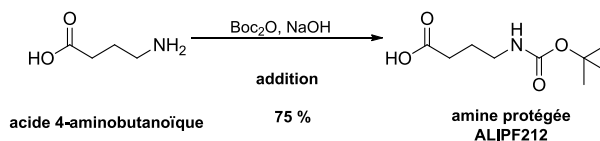


Schéma 3.21. Réaction de protection de l'amine par un groupement Boc

Dans la première étape de la réaction, l'acide carboxylique **ALIPF212** déprotoné par la *N*-méthylmorpholine (NMM) réagit avec le chloroformate d'isobutyle à - 20 ° C pour former l'anhydride d'acide mixte. Ce dérivé réagit à température ambiante avec la *o*-phénylènediamine pour former un intermédiaire amide qui en milieu acide (acide acétique) à reflux aboutit au benzimidazole **ALIPF227** (**schéma 3.22**).[158]

Mécanisme réactionnel

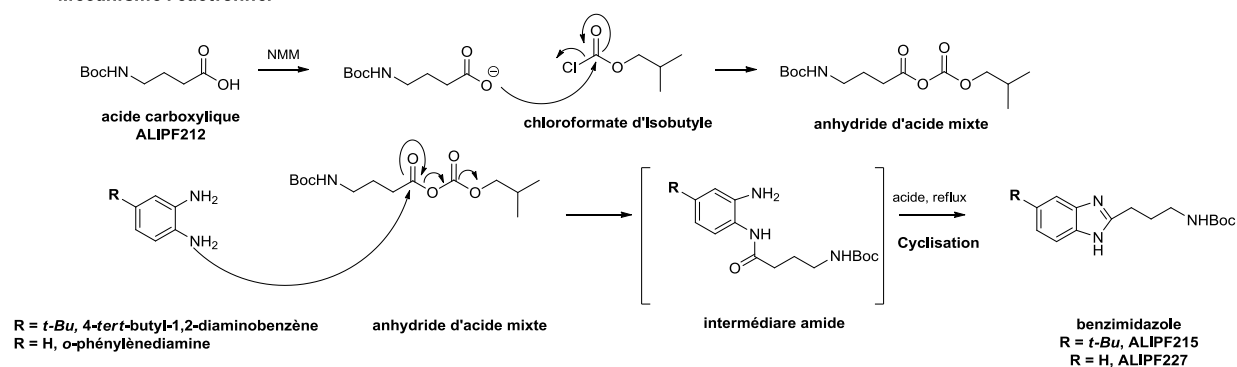
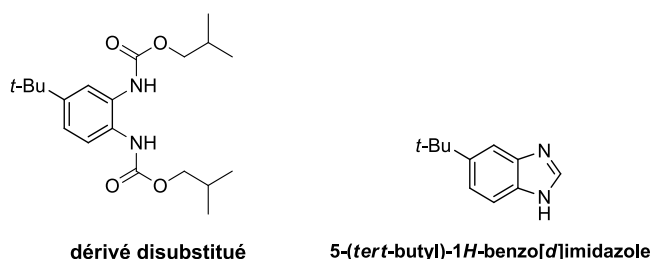


Schéma 3.22. Formation du noyau benzimidazole à partir d'une diamine et d'un anhydride d'acide mixte

Cette réaction n'a pas permis la formation du produit cible **ALIPF215** mais la formation de produits secondaires identifiés :



Le mécanisme proposé implique une attaque de la diamine sur le carbonyle positionné entre les deux oxygènes, celui-ci ayant une électrophilie plus importante. Le dérivé monosubstitué ainsi obtenu réagit de la même façon une deuxième fois sur une autre molécule d'anhydride mixte pour aboutir au dérivé disubstitué. Une fois que le brut réactionnel de cette étape est mis en suspension dans l'acide acétique, le dérivé disubstitué ne se cyclise donc pas. La quantité résiduelle du dérivé

monosubstitué réagit avec l'acide acétique pour se cycliser et donner le benzimidazole correspondant (**schéma 3.23**).

Mécanisme réactionnel

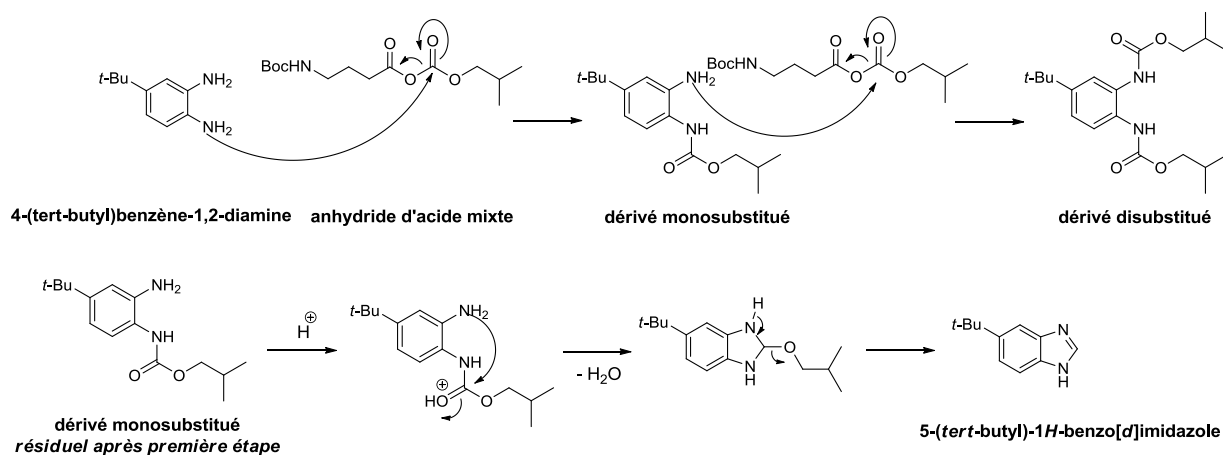
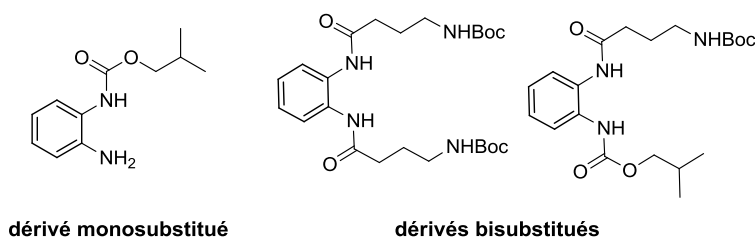


Schéma 3.23. Formation du dérivé disubstitué et du benzimidazole, produits secondaires

Etant donné l'échec de cette réaction, nous avons évalué la température de formation de l'anhydride mixte (à -20°C et à température ambiante), ainsi que le remplacement du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène par son analogue benzène-1,2-diamine comme décrit dans la littérature.[158] Bien que le produit intermédiaire ait été formé, la formation du produit cible reste minoritaire. Des produits secondaires correspondant aux produits de mono- et disubstitution ont pu être identifiés par LC-MS :



Cette méthode ne permettant pas d'accéder quantitativement au composé désiré, une voie de synthèse alternative a été envisagée. Cette stratégie est décrite dans la section suivante.

3.1.3.2 Synthèse du noyau benzimidazole via l'ouverture d'une lactone ou d'une lactame

Les amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole proviennent des alcools primaires correspondants via une réaction de Mitsunobu avec le phtalimide. Les alcools sont obtenus à partir de l'ouverture des lactones correspondantes par le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène (**schéma 3.24**).

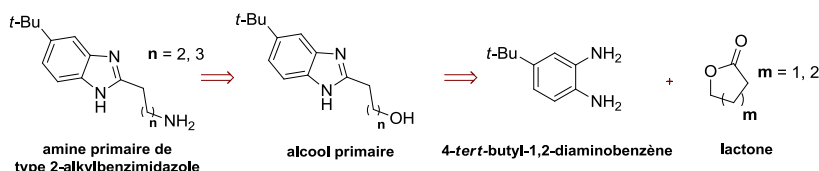


Schéma 3.24 : Rétrosynthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via une réaction de Mitsunobu précédée d'une ouverture de lactone

Ainsi, le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène réagit avec une lactone en milieu acide pour aboutir au benzimidazole porteur d'une fonction hydroxyle.[134] Ce dérivé subit une réaction de Mitsunobu avec le phtalimide, ce qui aboutit à l'amine primaire après traitement avec l'hydrazine monohydratée.[129] Cette amine primaire subit une amination réductrice en présence d'acétone pour fournir les amines de type 2-alkylbenzimidazole (**schéma 3.25**).[155]

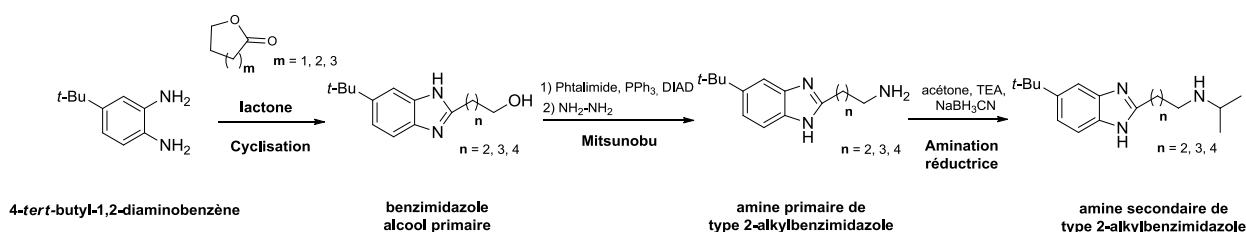


Schéma 3.25. Synthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via une réaction de Mitsunobu précédée d'une ouverture de lactone

Le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène réagit avec les lactones (γ -butyrolactone, δ -valérolactone ou caprolactone) dans une solution aqueuse d'HCl 6N à reflux pour donner les composés respectifs **ALIPF183**, **ALIPF186** et **ALIPF241**, avec un rendement moyen de 81 %.[134] Les composés benzimidazoles sont formés suivant un mécanisme de cyclisation intramoléculaire. Le carbonyle de la lactone se protone rendant le carbone du carbonyle plus électrophile. Une des deux amines du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène attaque le carbone électrophile du carbonyle pour former un hémiaminal. La deuxième amine s'additionne sur le carbone électrophile de l'hémiaminal et le produit formé se déshydrate rapidement. Une ouverture de l'éther cyclique par déprotonation de l'amine permet la formation du benzimidazole avec une chaîne latérale portant une fonction alcool (**schéma 3.26**).

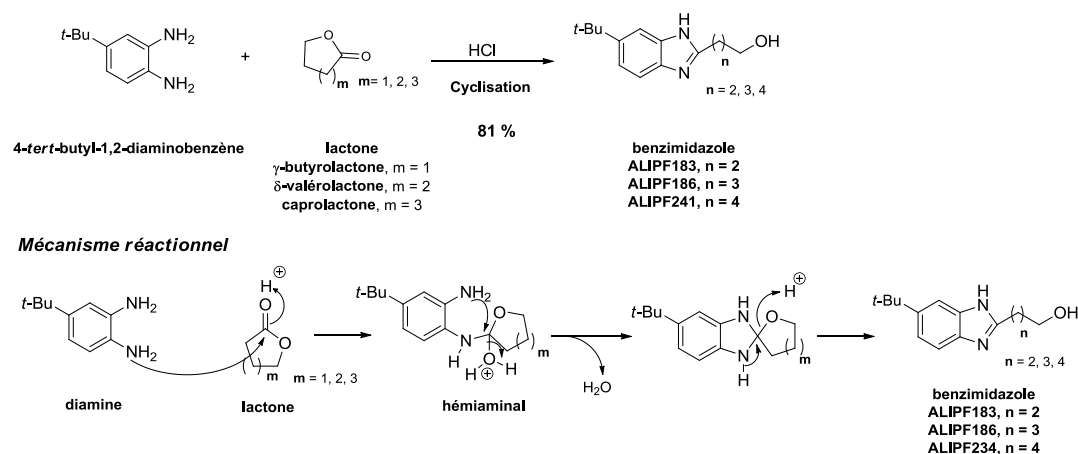
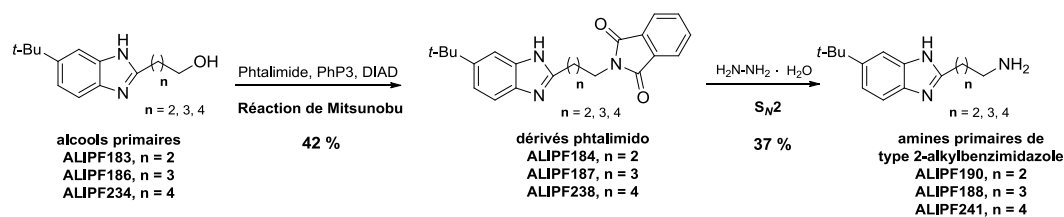


Schéma 3.26. Synthèse des benzimidazoles par l'ouverture d'une lactone en milieu acide

La fonction hydroxyle des dérivés **ALIPF183**, **ALIPF186** et **ALIPF241** réagit lors d'une réaction de Mitsunobu avec le phtalimide en présence de triphénylphosphine et d'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD). La triphénylphosphine réagit avec le DIAD pour former un ion phosphonium qui subit l'attaque de l'alcool primaire. La fonction alcool est ainsi activée en tant que groupement partant. Le phtalimide peut ainsi attaquer le carbone en position alpha du groupement partant. Cette dernière étape permet la formation du produit attendu (**ALIPF184**, **187** et **238**) et la libération de l'oxyde de triphénylphosphine (Ph_3PO). Le dérivé « phtalimido » réagit ensuite avec l'hydrazine monohydratée dans l'éthanol à reflux pour libérer l'amine primaire correspondante (**ALIPF190**, **ALIPF188** et **ALIPF241**) (schéma 3.27).



Mécanisme réactionnel de la réaction de Mitsunobu

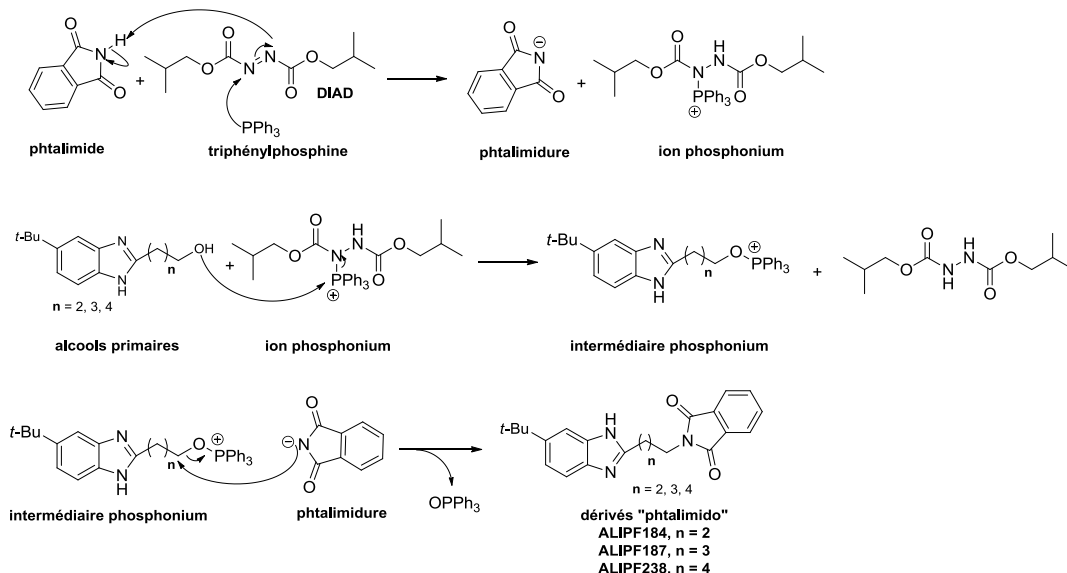


Schéma 3.27. Synthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via la réaction de Mitsunobu

Le rendement moyen de la réaction de Mitsunobu est de 42 %. Ce rendement est dû à la difficulté d'éliminer l'oxyde de triphénylphosphine (Ph₃PO) formé au cours de la réaction. Le solvant initialement utilisé (THF) a été substitué par l'éther diéthylique qui permet la précipitation du Ph₃PO dans le milieu réactionnel. Néanmoins, son élimination n'est pas complète et une purification par chromatographie sur silice est nécessaire. D'ailleurs, les rapports frontaux (R_f) du produit cible et du Ph₃PO sont assez proches rendant la purification encore plus complexe. Nous avons étudié l'utilisation de la triphénylphosphine supportée sur un polymère (copolymère de styrène et divinylbenzène, 100-200 mesh, Ph₃P ~3 mmol/g) qui jouerait le rôle de *scavenger*. Ainsi, après réaction, le Ph₃PO résultant restera donc piégé sur le polymère éliminable par filtration[159]. Cependant, cette technique n'a pas permis l'obtention du produit désiré, probablement dû au nombre d'équivalents de triphénylphosphine supporté par le polymère.

Finalement, il a été décidé de réaliser la deuxième étape de cette voie de synthèse sans isoler le dérivé « phthalimido ». Ainsi, l'amine primaire libérée grâce à l'hydrazine monohydratée a été purifiée par chromatographie sur silice. La purification est donc facilitée car les R_f des sous-produits (dont Ph₃PO) et du produit attendu sont assez différents. Les amines primaires **ALIPF190**, **188** et **241** ont pu être respectivement obtenues avec un rendement global sur les deux étapes de 15 %, 56 % et 20 %. Ce faible rendement pourrait s'expliquer par la formation de plusieurs produits secondaires non identifiés lors de la réaction de Mitsunobu.

Une autre voie de synthèse a été optimisée : le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène réagit avec un lactame (δ -valérolactame et caprolactame) dans une solution aqueuse d'HCl 6N à reflux permettant la formation directe du benzimidazole porteur d'une amine primaire (**schéma 3.28**). Cette stratégie permet de gagner deux étapes par rapport à la voie précédente et d'augmenter le rendement global de la synthèse.

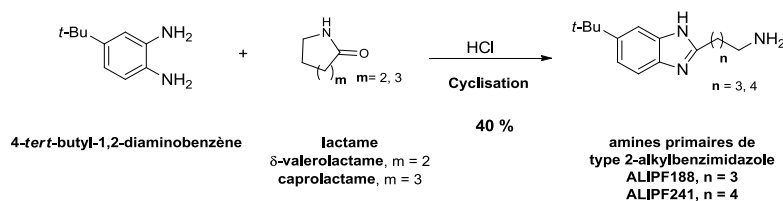
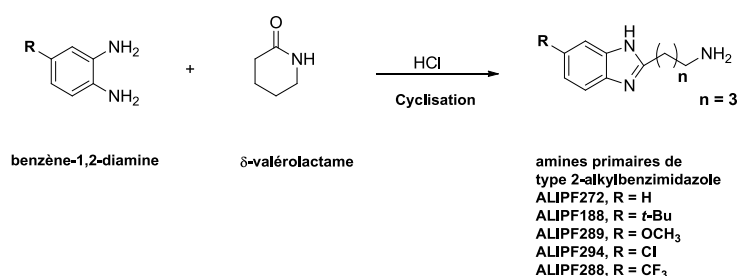


Schéma 3.28. Synthèse des amines primaires de type 2-alkylbenzimidazole via une ouverture de lactame

Cette stratégie de synthèse a aussi permis l'obtention des analogues présentant des modulations sur le noyau benzimidazole (**tableau 3.2**). Le temps de réaction varie selon la substitution de la diamine. Dans tous les cas, la réaction est arrêtée après disparition du produit de départ.

Tableau 3.2. Synthèse des amines de type 2-alkylbenzimidazole via une ouverture de lactame



Entrée	R	Durée (h)	Produit	Rendement (%)
1	H	3	ALIPF272	14
2	<i>t</i> -Bu	24	ALIPF188	29
3	OCH ₃	12	ALIPF289	73
4	Cl	7	ALIPF294	44
5	CF ₃	4	ALIPF288	45

Un groupement activant (*t*-Bu et OCH₃) sur le noyau benzénique permettrait la formation du benzimidazole correspondant (**tableau 3.2, entrées 2 et 3**) avec un meilleur rendement qu'en absence de substituants (**tableau 3.2, entrée 1**) ou en présence de groupements désactivants (Cl ou CF₃) (**tableau 3.2, entrées 4 et 5**). Le groupement activant par effet mésomère donneur (OCH₃) permet la réaction avec le meilleur rendement (73 %).

3.1.4 Synthèse des précurseurs amines de type 2-aminobenzimidazole

3.1.4.1 Synthèse du noyau benzimidazole via une diamine et un isothiocyanate

L'obtention du noyau benzimidazole des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole a été envisagée à partir de la réaction du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène sur un isothiocyanate porteur d'une chaîne possédant une amine protégée. La fonction isothiocyanate serait formée *in situ* à partir du dérivé diamine possédant un groupement protecteur sur une des fonctions. Cette protection serait éliminée lors de la dernière étape de synthèse (**schéma 3.29**).[160]

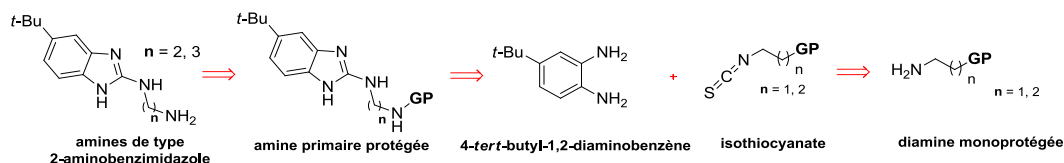


Schéma 3.29. Rétrosynthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via un dérivé isothiocyanate

Ainsi, la diamine monoprotégée correspondante (*N*-Boc-1,2-éthylènediamine ou *N*-Boc-1,3-propylènediamine) s'additionne sur le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (TCDI), réactif équivalent au thiophosgène (CSCl_2). Le dérivé isothiocyanate (**ALIPF239**) n'est pas isolé car instable. Le brut réactionnel est donc mis en réaction avec le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène en présence de la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et une base (TEA) dans l'acétonitrile pour aboutir au benzimidazole correspondant (**ALIPF228**). La fonction amine protégée du benzimidazole obtenu est ensuite déprotégée en présence du TFA à température ambiante de manière quantitative (**schéma 3.30**).

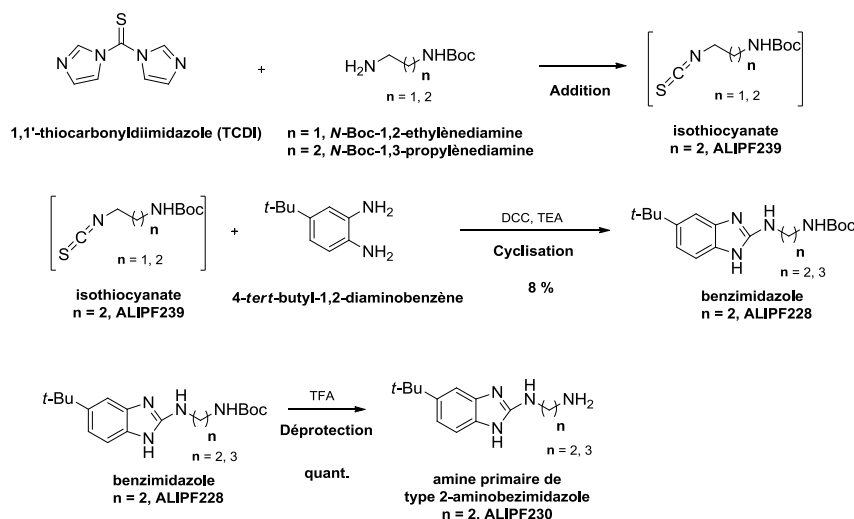


Schéma 3.30. Synthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via un dérivé isothiocyanate

Une amine du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène s'ajoute sur l'isothiocyanate obtenu dans la première étape pour aboutir à une thiourée non isolée. Cette thiourée subit une cyclodésulfuration par la DCC. Deux mécanismes sont proposés pour la formation du benzimidazole : soit via une carbodiimide formée (**voie A**), soit via un intermédiaire thiol tétrahédrique (**voie B**) (**schéma 3.31**). Bien que la mise en évidence de la *N,N'*-dicyclohexylthiourée soutient le mécanisme proposé par la voie A, elle n'exclut pas le mécanisme de la voie B.[161,162]

Mécanismes réactionnels de la formation du benzimidazole

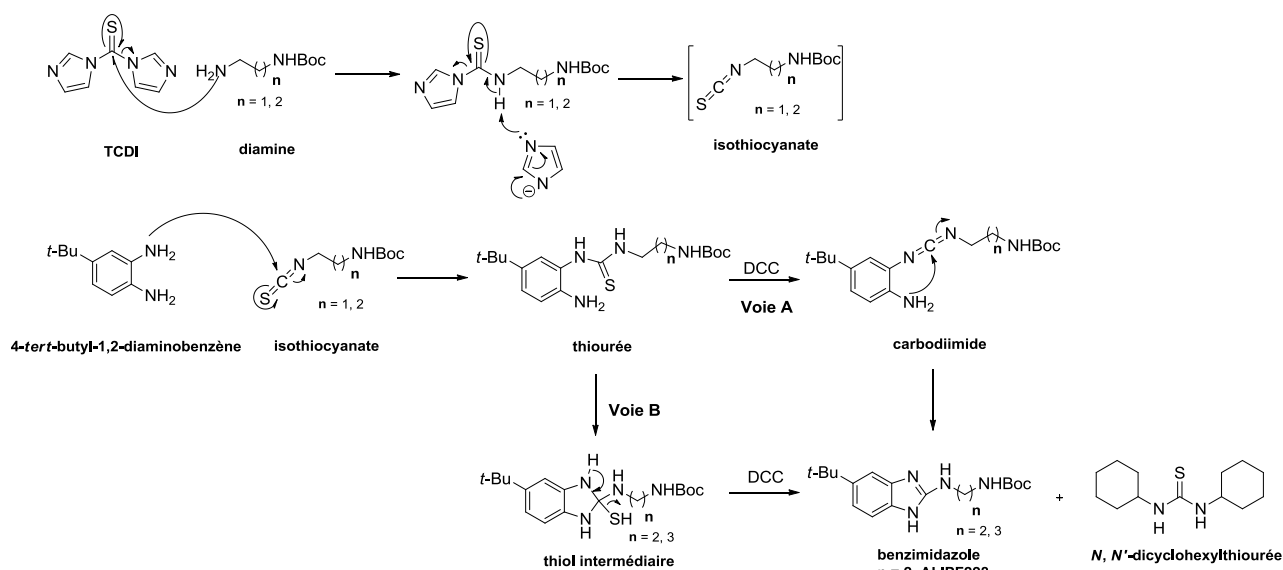


Schéma 3.31. Mécanismes réactionnels proposés pour la formation du benzimidazole

L'isothiocyanate obtenu dans la première étape est difficilement visible en UV, ce qui rend l'analyse difficile et peut expliquer le mauvais rendement global de la synthèse (8 %).

Etant donné le faible rendement de la première étape de cette stratégie de synthèse, une deuxième voie a été évaluée, décrite dans la section suivante.

3.1.4.2 Synthèse du noyau benzimidazole via une benzimidazolone

Les amines de type 2-aminobenzimidazole proviennent de la réaction entre une diamine monoprotégée et le dérivé benzimidazole halogéné en position 2. La déprotection est envisagée lors de la dernière étape de synthèse. Le dérivé benzimidazole halogéné est obtenu à partir de la benzimidazolone correspondante, elle-même synthétisée à partir du 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène et le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) (**schéma 3.32**).

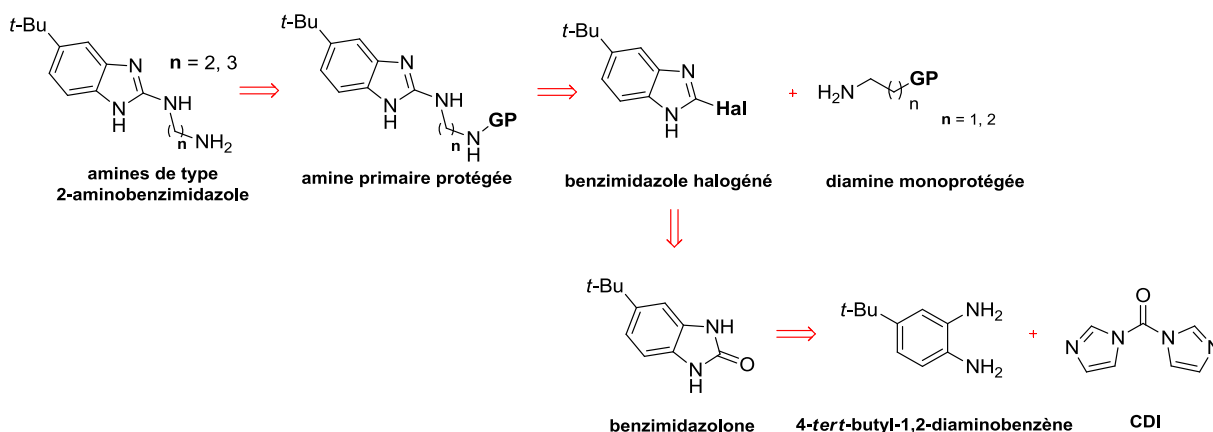


Schéma 3.32. Rétrosynthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via une benzimidazolone

Le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène réagit avec le carbonyldiimidazole (CDI) pour aboutir à la benzimidazolone qui réagit avec le chlorure de phosphoryle (POCl_3) pour obtenir le benzimidazole chloré en position 2.[163,164] L'hétérocycle halogéné participe dans une substitution nucléophile aromatique avec une diamine protégée sur l'une de ses fonctions par un groupement Boc pour donner l'amine substituée par le benzimidazole.[163,164] Ce composé est ensuite déprotégé pour aboutir aux précurseurs amines de type 2-aminobenzimidazole (**schéma 3.33**).

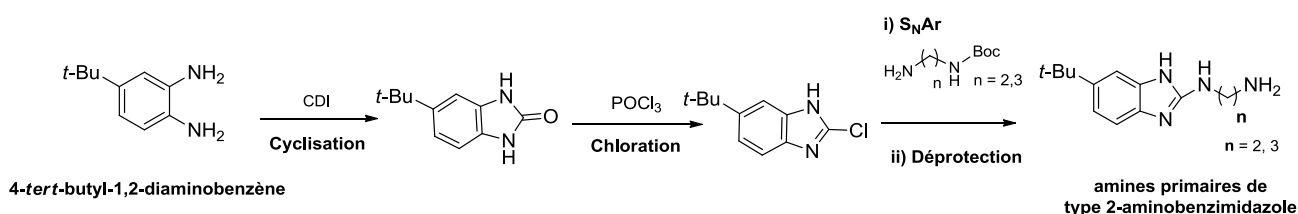


Schéma 3.33. Synthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole via une benzimidazolone

Le 4-*tert*-butyl-1,2-diaminobenzène réagit en présence de 1,1'-carbonyldiimidazole dans un mélange dichlorométhane et tétrahydrofurane[163] pendant 12 heures à température ambiante pour former la benzimidazolone **ALIPF225** avec un rendement de 59 % (**schéma 3.34**).

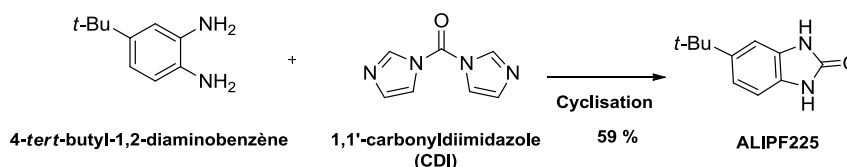


Schéma 3.34. Synthèse de la benzimidazolone

La benzimidazolone obtenue précédemment (**ALIPF225**) subit une réaction de chloration dans le POCl_3 . Lorsque que la réaction est effectuée à température ambiante, le rendement observé est de 41 %. Le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) a donc été ajouté afin d'améliorer le rendement (comme décrit dans la littérature),[164] mais la diamine de départ n'a pas

réagi et a été récupérée quantitativement. Par contre, grâce à un reflux pendant 12 heures, le rendement de la réaction a doublé (82 %) (**schéma 3.35**).

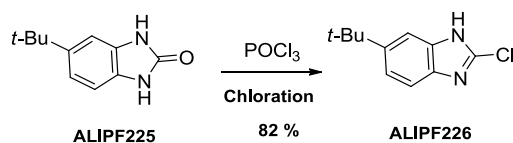


Schéma 3.35. Chloration d'une benzimidazolone

Le benzimidazole chloré **ALIPF226** réagit avec un excès de *N*-Boc-1,2-éthylènediamine ou de *N*-Boc-1,3-propylènediamine en présence d'une base, la DIEA, dans l'éthanol sous microondes[163] avec un rendement moyen de 53 %. Le produit obtenu est ensuite déprotégé quantitativement dans le TFA à température ambiante pendant 4 heures (**schéma 3.36**).

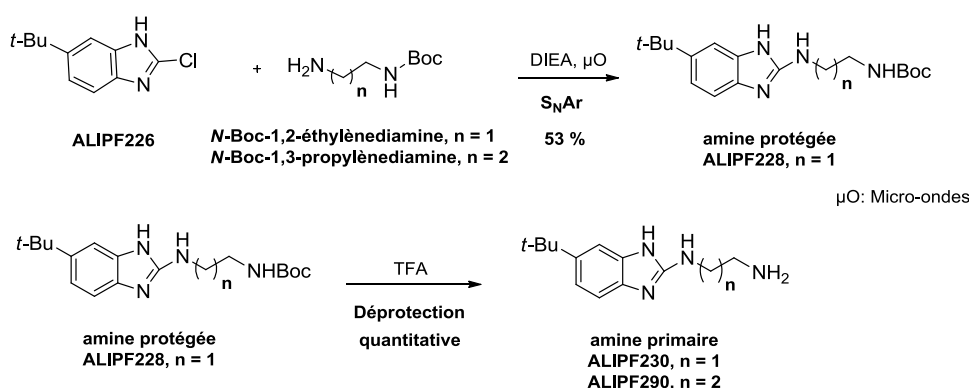


Schéma 3.36. Synthèse des amines primaires de type 2-aminobenzimidazole

Etant donné que le rendement global sur les deux dernières étapes est limité par la purification de la première, la déprotection a été réalisée directement sans isoler l'intermédiaire *N*-Boc, avec un rendement global de 60 %.

3.1.5 Synthèse des amides de type pyrimidinobenzénique

3.1.5.1 Synthèse des amides de type pyrimidinobenzénique via un couplage de type peptidique

L'accès aux amides a été envisagé selon une synthèse convergente entre un précurseur de type acide carboxylique et un précurseur amine (**schéma 3.1 and 3.37**), préparés comme décrits dans les sections 3.1.2 – 3.1.4.

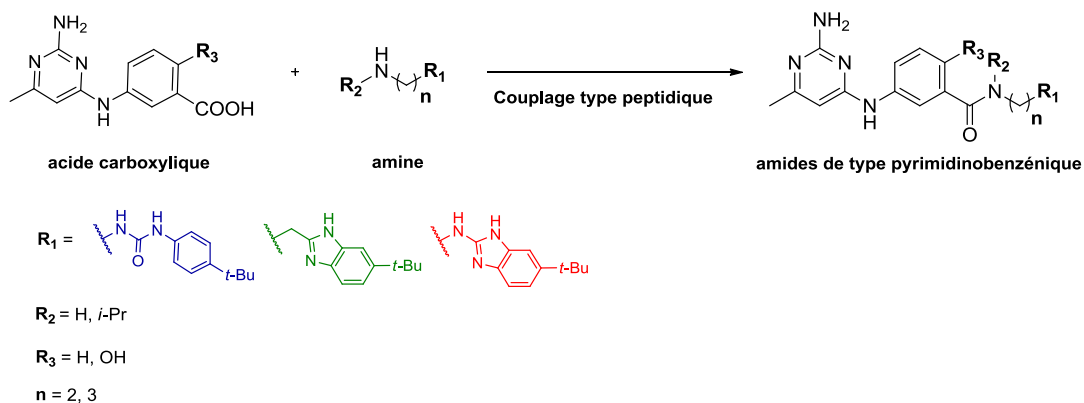
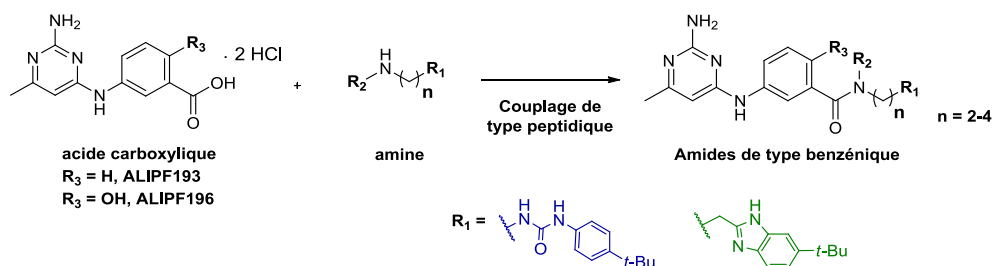


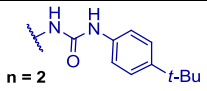
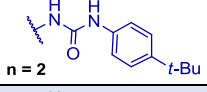
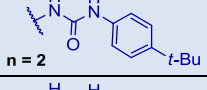
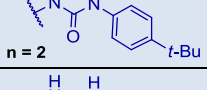
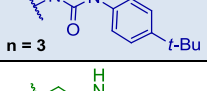
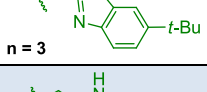
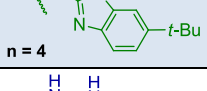
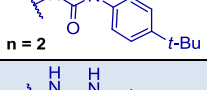
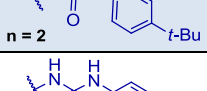
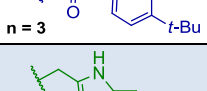
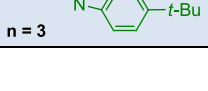
Schéma 3.37. Synthèse des amides de type benzénique via un couplage de type peptidique

Trois types d'agents de couplages ont été initialement évalués dans différents solvants, pendant 12 heures à température ambiante (**tableau 3.3**) :

- (benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidine)phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP)
- 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) / *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)-méthylène]-*N*-méthylméthanaminium hexafluorophosphate *N* oxide) HBTU
- HOBT / 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDCI, aussi nommée EDC, EDAC ou WSC – « water-soluble carbodiimide »)

Tableau 3.3. Optimisation des couplages de type peptidique



	Entrée	Composé	R ₁	R ₂	R ₃	Agents de couplage	Solvant	Rendement (%)
Phényles	1	ALIPF194		H	H	HOBt / EDCI	THF	13
	2	ALIPF194		H	H	PYBOP	DMF	13
	3	ALIPF194		H	H	HOBt / HBTU	DMF	43
	4	ALIPF198		<i>i</i> -Pr	H	HOBt / HBTU	DMF	90
	5	ALIPF199		<i>i</i> -Pr	H	HOBt / HBTU	CH ₂ Cl ₂	4
	6	ALIPF200		H	H	HOBt / HBTU	CH ₂ Cl ₂ -DMF	2
	7	ALIPF242		H	H	HOBt / HBTU	DMF	31
Phénols	8	ALIPF202		<i>i</i> -Pr	OH	HOBt / HBTU	DMF	10
	9	ALIPF202		<i>i</i> -Pr	OH	HOBt / EDCI	DMF	53
	10	ALIPF207		<i>i</i> -Pr	OH	PyBOP	DMF	2
	11	ALIPF203		H	OH	HOBt / EDCI	DMF	41

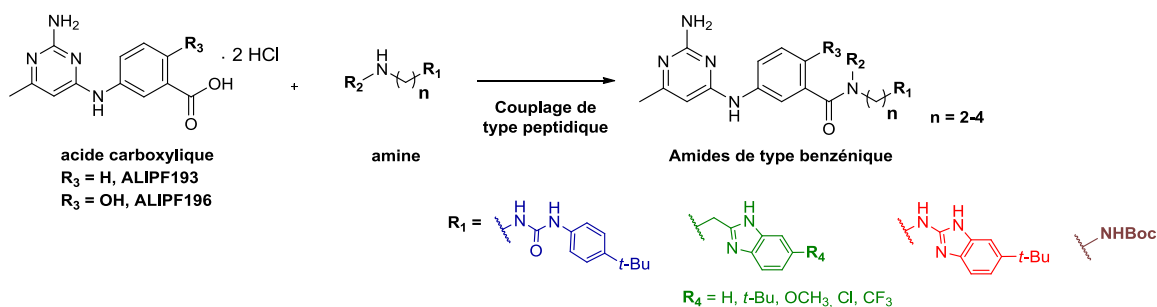
D'une part, il a été observé que les agents HOBt / HBTU donnent de meilleurs rendements avec les dérivés non phénoliques (**tableau 3.3, entrées 3, 4, 7**). En revanche, les agents HOBt / EDCI montrent de meilleurs résultats avec les dérivés phénoliques (**tableau 3.3, entrée 9 et 11**). L'agent de couplage PyBOP ne fournit dans aucun cas un rendement correct. En plus, la réaction avec cet agent n'est pas totale et la plupart du produit de départ est récupérée (**tableau 3.3, entrées 2 et 10**).

D'autre part, le DMF est le solvant approprié vu un manque de solubilité des produits de départ soit dans le THF ou le dichlorométhane, empêchant la réaction (**tableau 3.3, entrées 1 et 5**). Même, un mélange CH₂Cl₂ – DMF (8 :2) ne permet pas la solubilisation des produits empêchant le déroulement de la réaction (**tableau 3.3, entrée 6**).

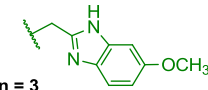
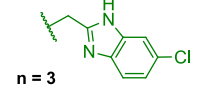
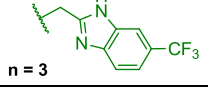
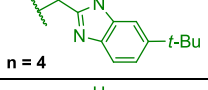
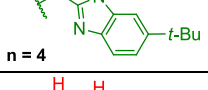
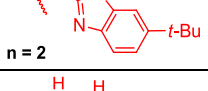
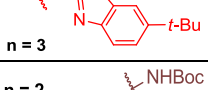
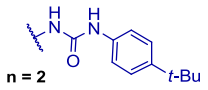
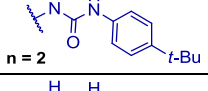
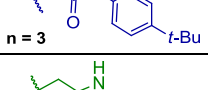
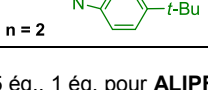
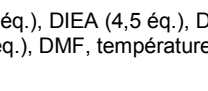
De manière générale, le groupement isopropyle permet d'obtenir de meilleurs rendements dans des bonnes conditions réactionnelles (**tableau 3.3, entrée 4**). Par exemple, la synthèse de l'amide **ALIPF194** (**table 3.3, entrée 2**) présente un rendement moins important (13 %) que la synthèse de son analogue isopropylé **ALIPF198** (43 %) (**tableau 3.3, entrée 3**).

De ce fait, **plusieurs** amides primaires et secondaires ont été synthétisés via un couplage de type peptidique (**tableau 3.4**) utilisant 3 types d'agents de couplage : HOBt (0,5 éq.) / HBTU (1,5 éq.) (méthode A), HOBt (1,5 éq.) /EDCI (2,5 éq.) (Méthode B) et PyBOP (1,2 éq.) (méthode C).

Tableau 3.4. Synthèse des amides de type benzénique via un couplage de type peptidique



	Entrée	Composé	R ₁	R ₂	R ₃	Méthode ^a	Rendement (%)
Phényles	1	ALIPF194		H	H	A	43
	2	ALIPF197		H	H	A	68
	3	ALIPF198		<i>i</i> -Pr	H	A	90
	4	ALIPF199		<i>i</i> -Pr	H	A	4
	5	ALIPF201		H	H	A	13
	6	ALIPF200		H	H	A	2
	7	ALIPF277		H	H	A	69
		Entrée	Composé	R ₁	R ₂	R ₃	Méthode ^a

							(%)
Phényles	8	ALIPF295		H	H	A	26
	9	ALIPF297		H	H	A	48
	10	ALIPF293		H	H	A	37
	11	ALIPF242		H	H	A	31
	12	ALIPF211		<i>i</i> -Pr	H	A	20
	13	ALIPF244		H	H	A	9
	14	ALIPF292		H	H	A	28
	15	ALIPF240		H	H	A	60
Phénols	16	ALIPF205		H	OH	B	20
	17	ALIPF202		<i>i</i> -Pr	OH	B	13
	18	ALIPF207		<i>i</i> -Pr	OH	C	2
	19	ALIPF203		H	OH	B	41

^a Méthode A : HOBt (0,5 éq.), HBTU (1,5 éq., 1 éq. pour **ALIPF297**, **ALIPF293**), DIEA (4 éq.), DMF, température ambiante, 12 h.

^b Méthode B : HOBt (1,5 éq.), EDCI (2,5 éq.), DIEA (4,5 éq.), DMF, température ambiante, 12 h.

^c Méthode C : PyBOP (1,2 éq.), DIEA (4 éq.), DMF, température ambiante, 12 h.

De façon analogue, le dérivé triazinique **ALIPF233** a été synthétisé selon la méthode A avec un rendement de 50 % (**schéma 3.38**).

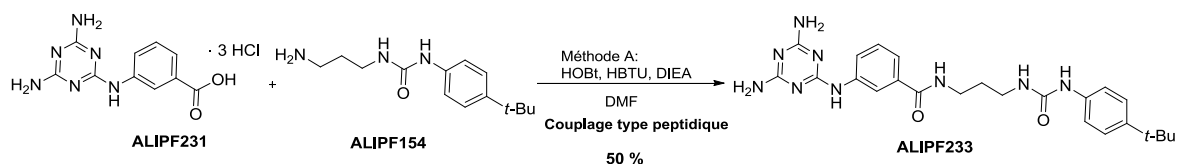


Schéma 3.38. Synthèse de l'amide de type triazinique

L'amine **ALIPF240** est déprotégée avec le TFA à température ambiante pour aboutir à l'analoge porteur d'une fonction amine primaire sur sa chaîne latérale (**ALIPF246**). Le chlorhydrate a été obtenu après traitement de la forme base par l'HCl 5-6N dans l'isopropanol (**schéma 3.39**).

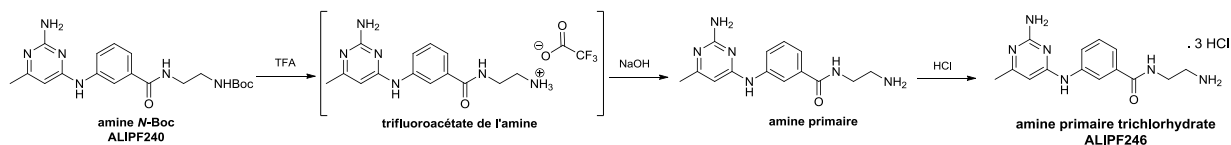


Schéma 3.39. Déprotection d'une amine N-Boc protégée par du TFA

Le couplage de type peptidique avec les agents HOBt/HBTU se déroule selon le mécanisme proposé dans le **schéma 3.40**. [165] La première étape correspond à la déprotonation de l'acide carboxylique par une base non nucléophile (DIEA). L'ion carboxylate ainsi formé attaque le carbone électrophile de l'HBTU et forme l'ester activé 1 qui subit une attaque par l'HOBt pour permettre la formation d'un ester d'HOBt (ester activé 2) libérant la tétraméthylurée. La dernière étape correspond à l'attaque de l'amine sur le carbone électrophile du deuxième ester activé pour conduire à la formation d'une liaison amide.

Mécanisme réactionnel

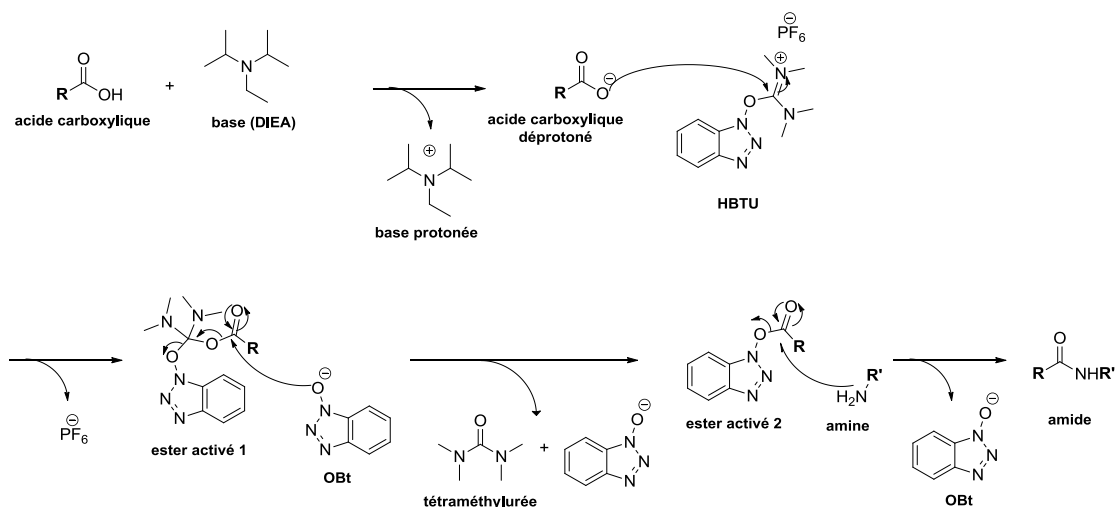
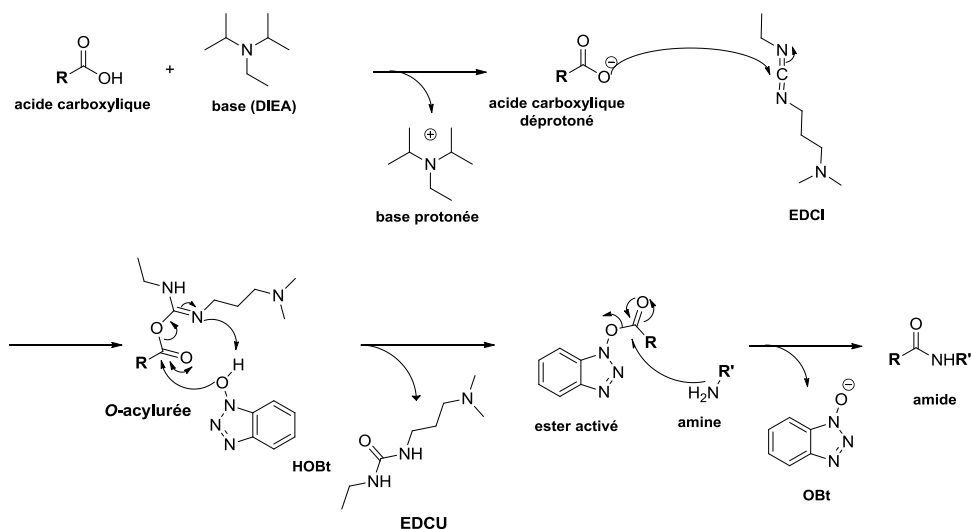
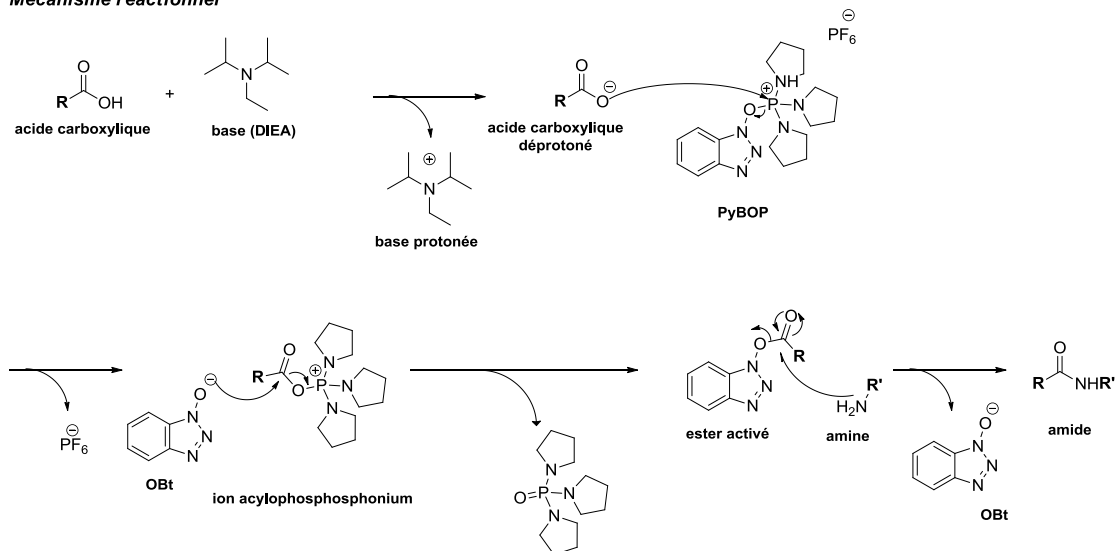


Schéma 3.40. Mécanisme proposé pour le couplage de type peptidique avec les agents HOBt / HBTU

Le couplage de type peptidique avec les agents HOBt/EDCI se déroule selon le mécanisme proposé dans le **schéma 3.41**. [165] L'acide carboxylique est déprotoné par une base non nucléophile (DIEA) afin de former le carboxylate correspondant, qui réagit avec la carbodiimide pour conduire à la formation d'une O-acylurée. Cet intermédiaire réagit avec le HOBt afin de générer un ester activé de type benzotriazole en libérant une urée soluble dans l'eau, la diméthylamino-propyléthylcarbodiimide (EDCU). L'effet attracteur du cycle benzotriazole fragilise la liaison C-O de l'ester et il réagit ainsi plus facilement avec une amine pour former l'amide correspondant.

Mécanisme réactionnel**Schéma 3.41. Mécanisme proposé pour le couplage de type peptidique avec les agents HOBt / EDCI**

Le couplage de type peptidique avec l'agent PyBOP se déroule selon le mécanisme proposé dans le **schéma 3.42**. [165] L'acide carboxylique est déprotoné par une base non nucléophile (DIEA) pour former le carboxylate correspondant, qui réagit avec le PyBOP pour conduire à la formation d'un ion acylophosphonium. Cet intermédiaire réagit avec le HOBt afin de générer un ester activé de type benzotriazole en libérant l'oxide de tris(pyrrolidin-1-yl)phosphine. L'ester réagit ensuite avec une amine pour former l'amide correspondant.

Mécanisme réactionnel**Schéma 3.42. Mécanisme proposé pour le couplage de type peptidique avec l'agent PyBOP**

Une deuxième approche pour l'obtention des amides a été évaluée : via un chlorure d'acide. Cette approche est décrite dans la section suivante.

3.1.5.2 Synthèse des amides de type pyrimidinobenzénique via un chlorure d'acide

Afin d'obtenir les amides de type pyrimidinobenzénique suivant la stratégie de synthèse présentée initialement (**schéma 1**), l'acide carboxylique adéquat est converti en chlorure d'acyle par le chlorure de thionyle (SOCl_2). L'amine partenaire réagit ainsi sur le dérivé obtenu précédemment en présence d'une base via une addition-élimination (**schéma 3.43**).

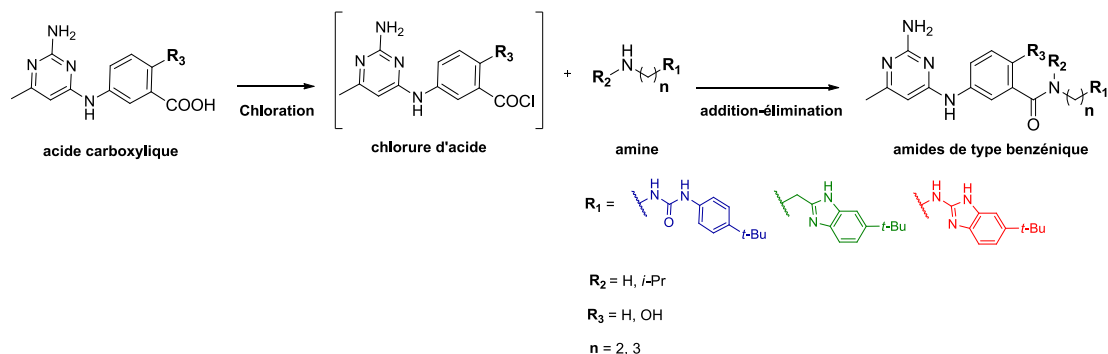


Schéma 3.43. Synthèse des amides de type benzénique via un chlorure d'acide

L'acide carboxylique réagit avec le SOCl_2 à reflux pendant 12 heures pour former le chlorure d'acide correspondant qui réagit, sans être isolé, avec une amine en présence de la TEA comme base pour former l'amide correspondant (**schéma 3.44**).

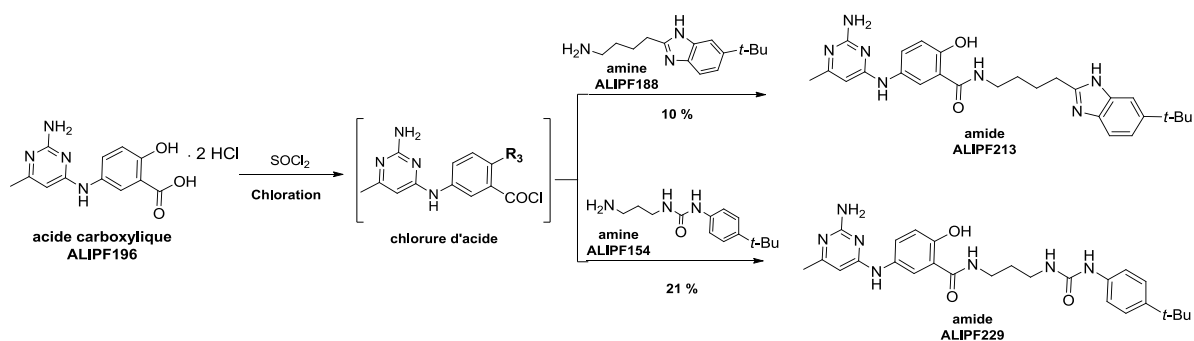


Schéma 3.44. Synthèse des amides via un chlorure d'acide

Le SOCl_2 joue le rôle de réactif et de solvant dans la première étape de cette voie de synthèse. Lorsque cette réaction a été réalisée avec du SOCl_2 dilué dans du dichlorométhane comme solvant, à température ambiante, la formation de chlorure d'acide est moindre. Il semblerait que l'OH en β de la fonction acide carboxylique diminuerait sa réactivité ; une haute température (76 °C, reflux) et une concentration importante de SOCl_2 (30 à 40 équivalents) sont requises. La première étape est donc limitante dans cette stratégie. Même si la purification des amides obtenus par cette voie a été plus simple que celle de ceux obtenus par un couplage de type peptidique, car moins de produits secondaires, le rendement reste inférieur (10 à 20 %).

3.2 Série de composés de type benzylamine

3.2.1 Synthèse de la série de composés de type benzylamine via une réduction d'amide

La synthèse des composés de type benzylamine a été initialement envisagée via une réduction de carbonyle des amides (**schéma 3.45**).

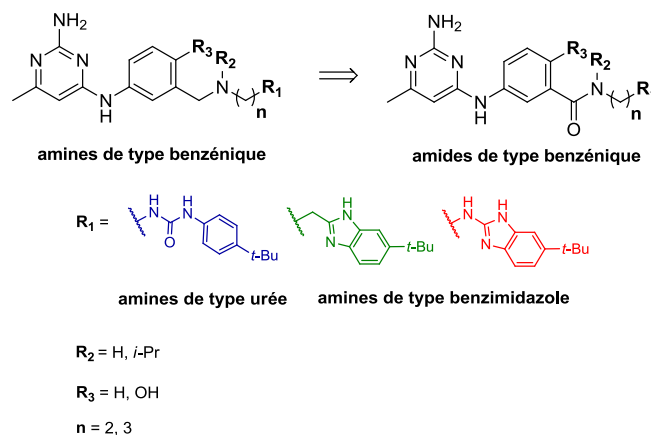


Schéma 3.45. Rétrosynthèse des benzylamines à partir des amides correspondants

Un excès de LiAlH₄ (4 à 11 équivalents) a été utilisé comme agent réducteur dans le THF à température ambiante et à reflux mais sans succès. Un seul composé (**ALIPF206**) a pu être isolé avec un rendement très faible (3 %) (**schéma 3.46**).

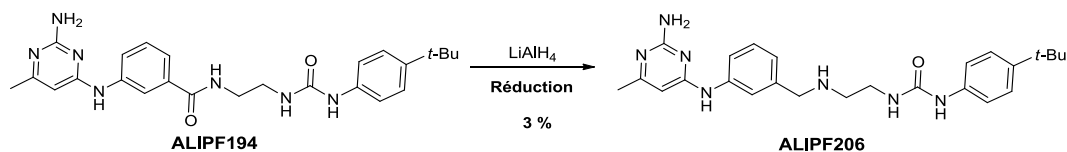


Schéma 3.46. Synthèse de l'amine ALIPF206 via une réduction d'amide

Etant donné la récupération quasi quantitative de l'amide de départ (**ALIPF198**, **ALIPF194**), il a été conclu une non réactivité de ces amides sous les conditions de réductions décrites précédemment. Ainsi, une voie alternative a été envisagée et décrite dans la section suivante.

3.2.2 Synthèse de la série de benzylamines via une amination réductrice

L'accès aux benzylamines a été envisagé via une amination réductrice entre les amines obtenues suivant les stratégies décrites dans les sections 3.1.2 – 3.1.5 et la fonction aldéhyde provenant d'une réduction de la fonction acide carboxylique des précurseurs de type pyrimidinobenzénique décrits dans la section 3.1.1 (**schéma 3.47**).

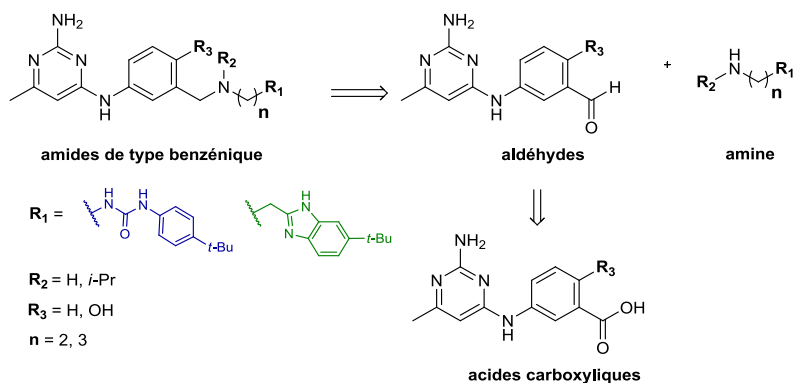


Schéma 3.47. Rétrosynthèse des benzylamines via une amination réductrice

Ainsi, la fonction acide carboxylique des dérivés pyrimidinobenzéniques est réduite pour donner l'alcool primaire correspondant qui est ensuite oxydé en aldéhyde. Finalement, une réaction d'amination réductrice entre le dérivé aldéhyde et une amine aboutit à l'amine correspondante souhaitée (schéma 3.48).

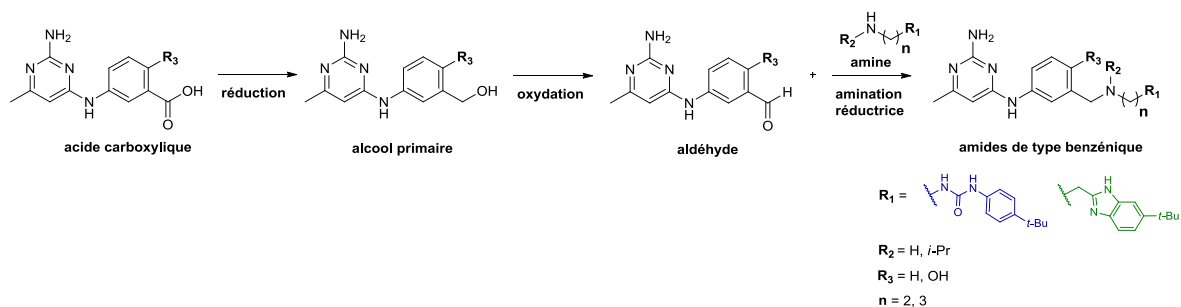


Schéma 3.48. Synthèse des benzylamines via une amination réductrice

La première étape de cette stratégie a été entreprise en utilisant du LiAlH_4 dans le THF. Une faible réactivité a été observée avec le dérivé phénolique (ALIPF223) obtenu montrant un rendement très faible (7 % face au 72 % de l'analogue non phénolique – ALIPF208) probablement dû à l'hydroxyle en position β de l'acide carboxylique et de l'aminopyrimidine puisque l'acide 2-hydroxybenzoïque a été réduit par du LiAlH_4 (schéma 3.49).

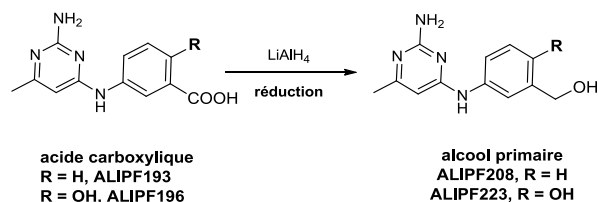


Schéma 3.49. Réduction de la fonction acide carboxylique par un hydrure

Deux méthodes ont été évaluées pour oxyder la fonction alcool des dérivés obtenus dans la première étape : l'utilisation du chlorochromate de pyridinium (PCC) et l'oxydation de Swern (DMSO, chlorure d'oxalyle). Le rendement varie respectivement entre 4 et 30 % (schéma 3.50).

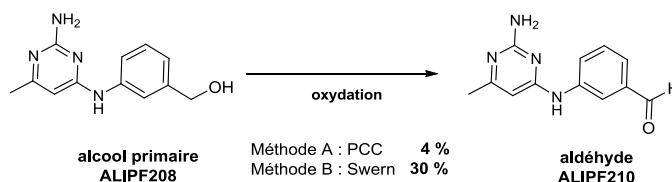


Schéma 3.50. Oxydation de la fonction alcool pour aboutir au dérivé aldéhyde

Il a été observé que dans les deux méthodes étudiées, la réaction n'est pas complète et une quantité de l'alcool de départ a été récupérée.

L'oxydation de Swern permettant d'aboutir à l'**ALIPF210** implique des conditions plus douces avec des réactifs moins toxiques, comparée à l'utilisation de PCC. Dans la première étape de la réaction, le DMSO réagit avec le chlorure d'oxalyle pour fournir l'ion diméthylchlorosulfonium. Cet ion réagit avec un alcool à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour former un ion alcoxysulfonium. La déprotonation de cet intermédiaire aboutit à l'ylure de soufre qui subit une déprotonation intramoléculaire via un état de transition semicyclique à 5 sommets afin de former l'aldéhyde correspondant (**schéma 3.51**). Cette réaction nécessite la présence de protons en α de l'hydroxyle pour compléter la dernière étape aboutissant au dérivé carbonylé, d'où une limite aux alcools primaires et secondaires.

Mécanisme réactionnel

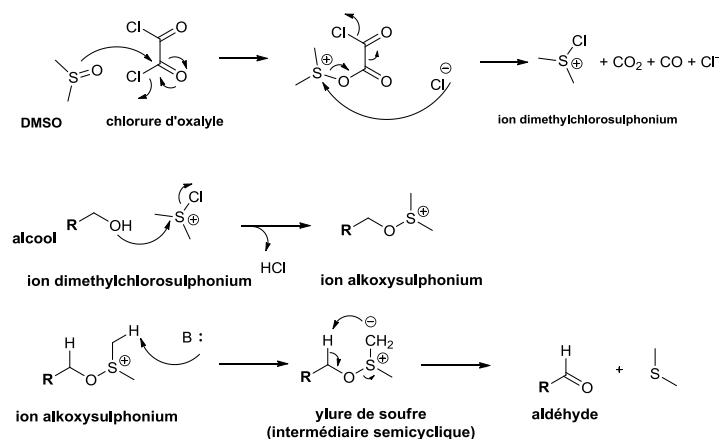


Schéma 3.51. Mécanisme de l'oxydation de Swern

Une réaction d'amination réductrice entre l'aldéhyde (**ALIPF210**) et une amine (**ALIPF140**) a été essayée sans succès, probablement du fait de l'instabilité de l'aldéhyde. Ainsi, une autre voie de synthèse a été conçue et détaillée dans la section suivante.

3.2.3 Synthèse de la série des benzylamines via une substitution nucléophile

L'accès aux amines de type benzénique a été envisagé via une substitution nucléophile des amines obtenues (sections 3.1.2 – 3.1.5) sur le dérivé benzénique correspondant possédant un groupement partant (**schéma 3.52**).

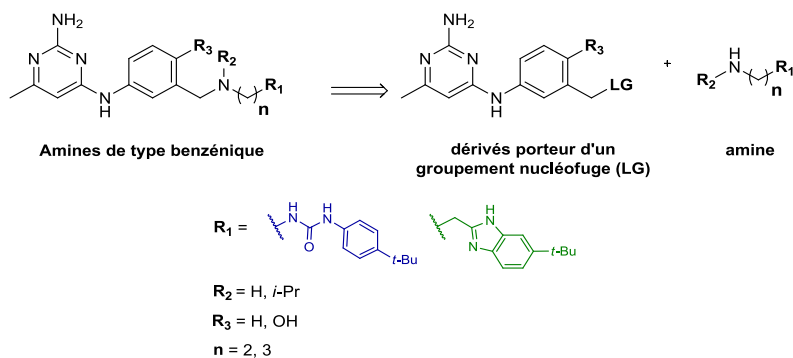


Schéma 3.52. Rétrosynthèse des benzylamines via une substitution nucléophile

L'alcool primaire du dérivé benzénique (détaillé dans la section 3.2.2) subit donc soit une réaction de tosylation soit une réaction d'halogénéation. Les dérivés ainsi obtenus subissent une S_N par une amine pour fournir les composés souhaités (schéma 3.53).

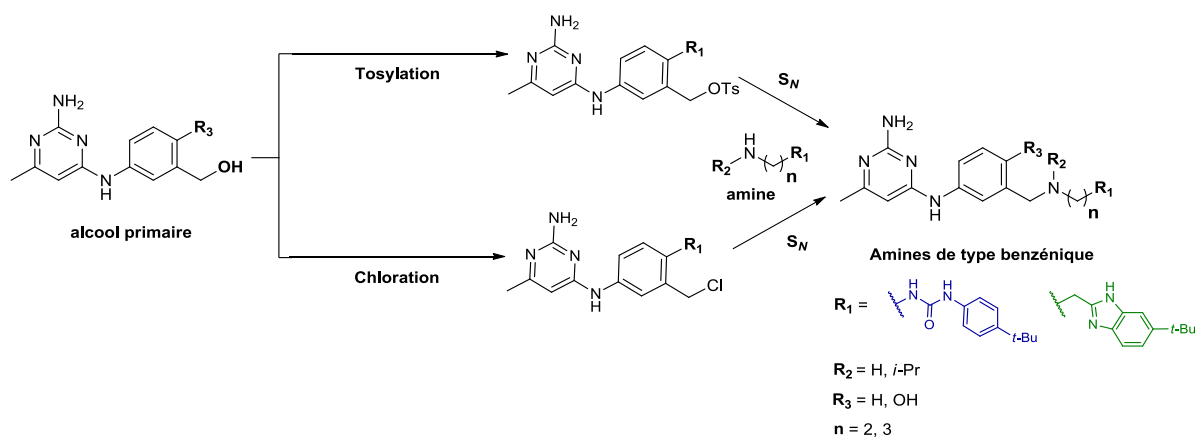


Schéma 3.53. Synthèse des benzylamines via une substitution nucléophile

L'alcool primaire (**ALIPF208**) réagit ainsi avec le chlorure de *p*-toluènesulfonyle en présence d'une base pour aboutir au dérivé tosylé correspondant (**ALIPF216**). Plusieurs solvants ont été évalués (pyridine, acétonitrile et acétone) en présence d'une base organique (TEA, pyridine) ou inorganique (K_2CO_3). Lorsque la pyridine a été utilisée (comme solvant et comme base), le produit tosylé souhaité n'a pas été obtenu et l'alcool de départ est récupéré. La pyridine a été remplacée par l'acétonitrile et la TEA utilisée comme base. Le produit se forme à température ambiante mais la réaction n'est pas complète. Lorsque la TEA a été remplacée par une base inorganique (K_2CO_3), le produit de départ ne réagit pas. Finalement, la réaction a été évaluée dans l'acétone à reflux pendant 16 heures en présence d'une base inorganique (K_2CO_3) et le produit tosylé (**ALIPF216**) a été obtenu avec un rendement de 40 %. Ce dérivé a été mis en réaction avec la TEA et l'amine **ALIPF154**, mais la substitution nucléophile n'a pas eu lieu (schéma 3.54).

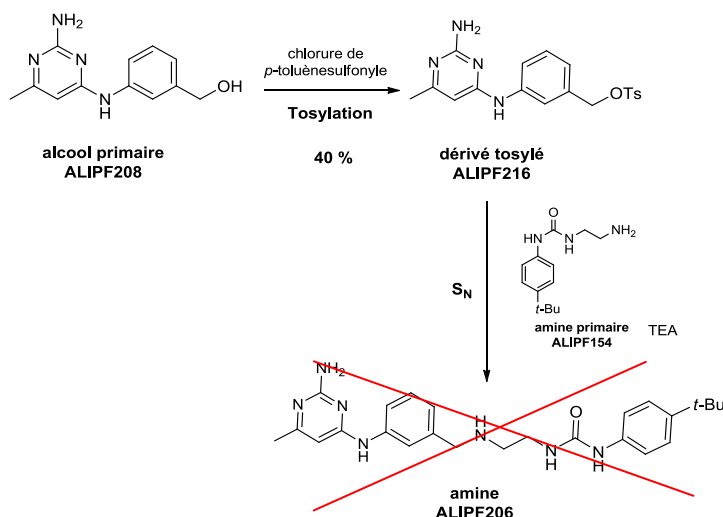


Schéma 3.54. Synthèse d'une benzylamine via un dérivé tosylé

Parallèlement, le dérivé chloré (**ALIPF221**) a été obtenu à partir de la réaction de l'alcool primaire correspondant (**ALIPF208**) avec le chlorure de thionyle à température ambiante et avec un rendement de 79 %. Le SOCl_2 joue à la fois le rôle de réactif et de solvant (**schéma 3.55**).

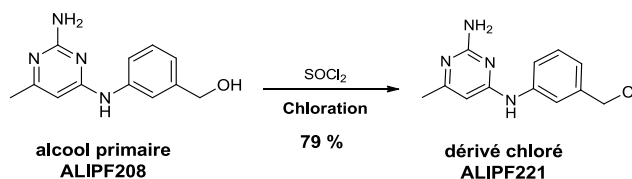


Schéma 3.55. Chloration d'un alcool primaire avec le chlorure de thionyle

Le dérivé phénolique (**ALIPF223**) semble à nouveau être moins réactif dans ces conditions réactionnelles. Malgré l'augmentation de la température de réaction (reflux) ou l'utilisation d'une base (TEA) pour piéger l'HCl libéré, le produit halogéné correspondant n'a pas été obtenu.

Le dérivé chloré **ALIPF221** subit une substitution nucléophile par l'amine correspondante en présence d'une base (Cs_2CO_3) dans le DMF pour donner les benzylamines cibles (**ALIPF220**, **ALIPF222**) (**schéma 3.56**). Le KI a été utilisé afin d'améliorer le rendement faible de cette réaction mais sans succès.

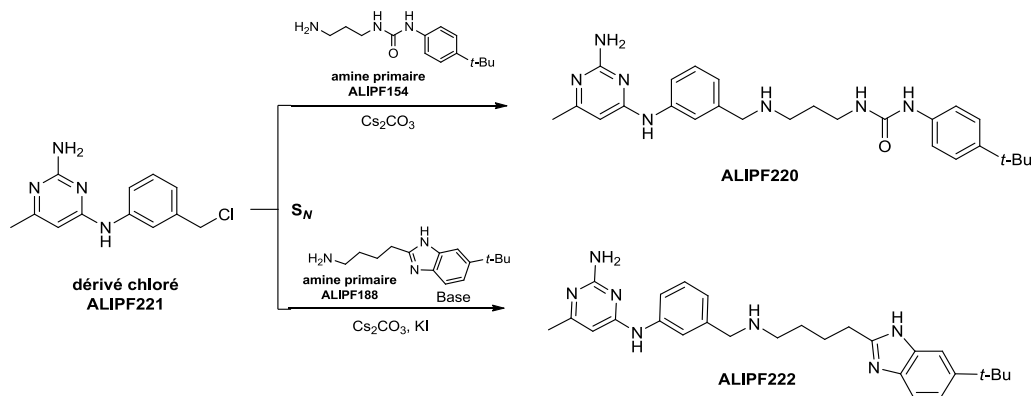


Schéma 3.56. Synthèse des benzylamines via une substitution nucléophile

3.3 Série de composés de type thiophène

3.3.1 Synthèse des composés de type thiophène via une synthèse convergente

Comme pour la série de composés de type benzénique, les amides thiophéniques ont été conçus via une stratégie de synthèse convergente entre un précurseur de type acide carboxylique et une amine de type urée ou benzimidazole préparée au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4). L'accès au précurseur acide carboxylique a été initialement envisagé via une substitution de l'aminopyrimidine sur un thiophène halogéné (**schéma 3.57**).

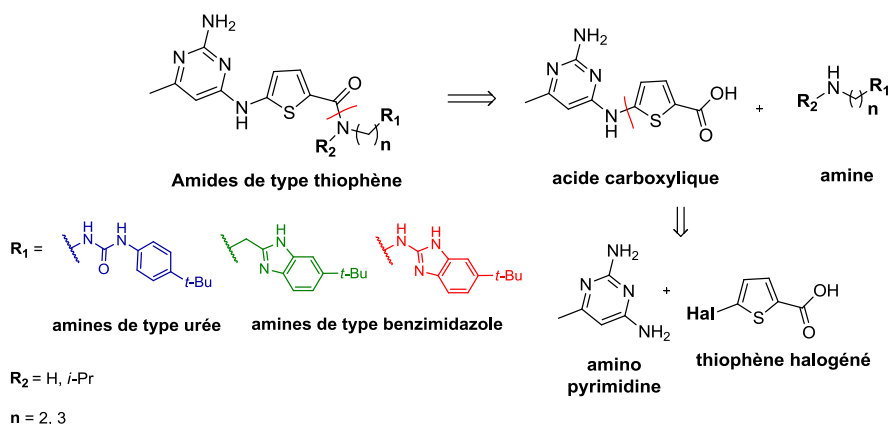


Schéma 3.57. Rétrosynthèse des produits de la série thiophène via une synthèse convergente

3.3.1.1 Synthèse des précurseurs acides carboxyliques de type pyrimidinothiophène

• Synthèse des précurseurs acides carboxyliques via un thiophène halogéné

La synthèse du précurseur acide carboxylique de type thiophène comporte un couplage entre la 2,4-diamine- N^2 -benzyl- N^4 -méthylpyrimidine et l'acide 5-bromothiophène-2-yl-carboxylique (**schéma 3.58**).

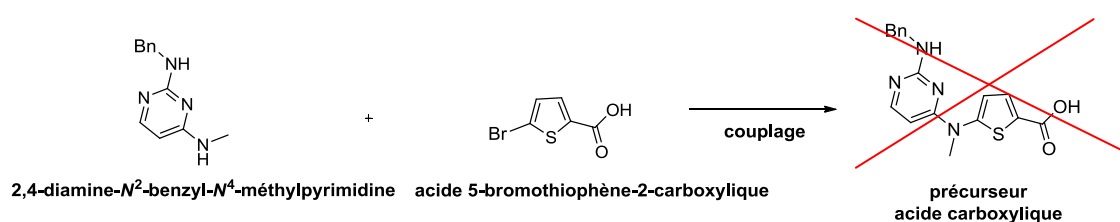


Schéma 3.58. Synthèse des précurseurs acide carboxylique

Deux conditions ont été testées pour réaliser ce couplage :

- Couplage de type Buchwald-Hartwig : BINAP, acétate de palladium, Cs_2CO_3 dans le toluène à reflux.
- Couplage de type Ullman : CuI, Cs_2CO_3 dans l'acétonitrile à reflux.

Aucune condition réactionnelle n'a permis d'obtenir le produit souhaité.

L'aminopyrimidine a été remplacée par la benzylamine et la méthylbenzylamine. Le produit ainsi obtenu serait debenzylé pour fournir le dérivé amine correspondant qui réagirait avec l'aminopyrimidine halogénée pour aboutir au précurseur désiré (**schéma 3.59**).

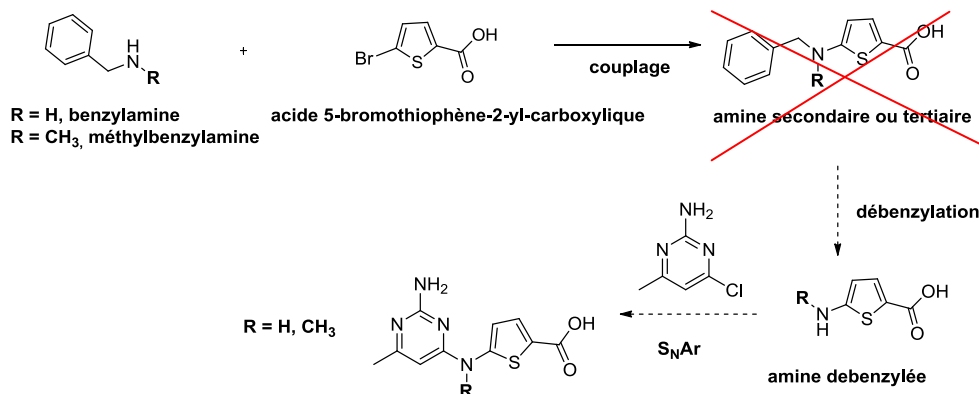


Schéma 3.59. Synthèse des précurseurs de type acide carboxylique

Néanmoins, le couplage de départ n'a pas abouti au dérivé aminé. Une modification de cette stratégie de synthèse a été entreprise.

• Synthèse des précurseurs acides carboxyliques via un aminothiophène

Une amine synthétisée au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4) réagit avec l'acide 5-bromothiophène-2-yl-carboxylique via un couplage de type peptidique. Le dérivé halogéné ainsi obtenu réagit avec la benzylamine. Une étape de débenzylation suivie d'une substitution sur l'aminopyrimidine fournit les produits cibles (**schéma 3.60**).

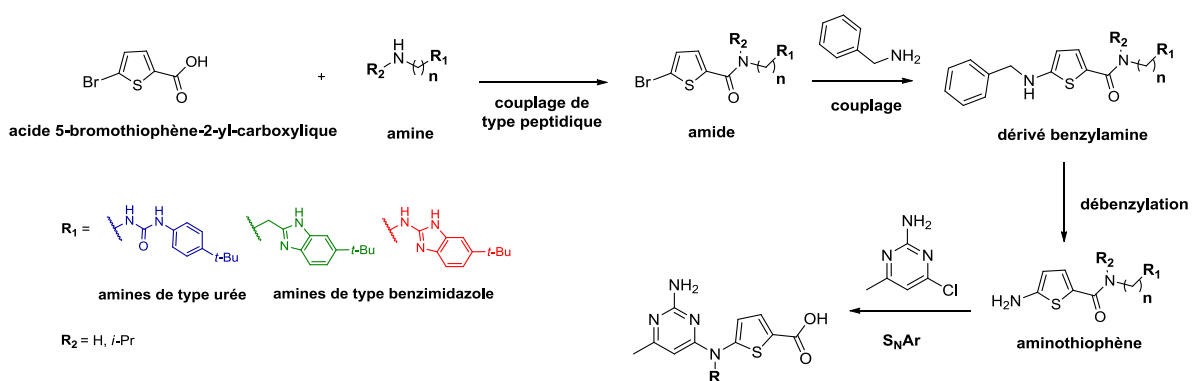


Schéma 3.60. Synthèse des produits de la série thiophène via un aminothiophène

La première étape de cette voie de synthèse a été réalisée en présence d'HOBt/HBTU dans le DMF pour fournir l'amide **ALIPF269** avec un rendement de 52 %. Néanmoins, lorsque cet amide a été mis en réaction avec la benzylamine dans des conditions de Buchwald-Hartwig décrites auparavant, le dérivé aminé attendu n'a pas été obtenu (**schéma 3.61**).

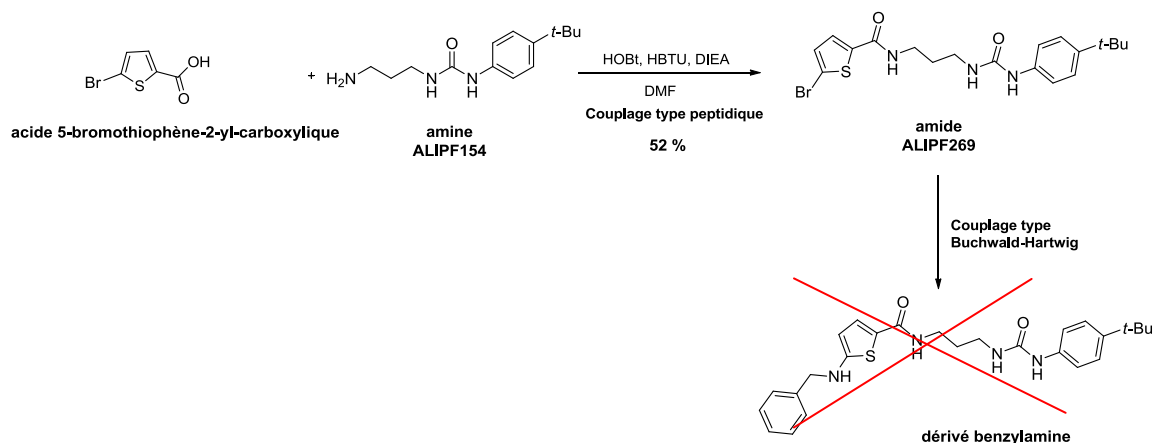
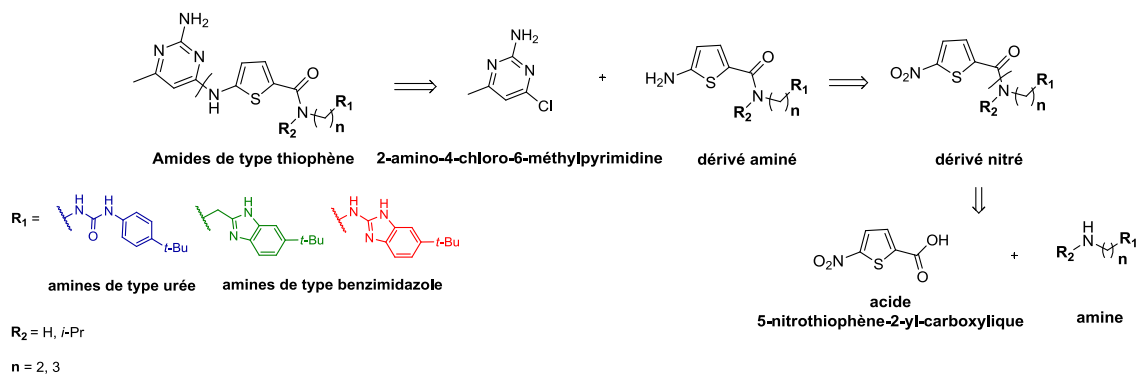


Schéma 3.61. Synthèse des produits de la série thiophène via un aminothiophène

De ce fait, cette stratégie de synthèse a été modifiée comme décrite dans la section suivante.

3.3.2 Synthèse de la série de composés de type thiophène via une S_NAr

L'accès aux dérivés thiophéniques a donc été envisagé à partir d'une réaction de la fonction amine portée par le dérivé thiophénique sur la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine. L'amine portée par le dérivé thiophénique provient de la réduction du groupement nitro du thiophène. Ce dérivé est obtenu via un couplage de type peptidique entre la fonction acide carboxylique de l'acide 5-nitrothiophène-2-yl-carboxylique et une amine primaire ou secondaire synthétisée au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4) (**schéma 3.62**).

Schéma 3.62. Rétrosynthèse des produits de la série thiophène via une S_NAr

Ainsi, l'acide 5-nitrothiophène-2-carboxylique réagit via un couplage de type peptidique avec les amines synthétisées au préalable. La fonction nitro sur le dérivé amide ainsi obtenu subit une réduction en amine.[166] Ce dérivé réagit avec la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine pour fournir les amides cibles (**schéma 3.63**).

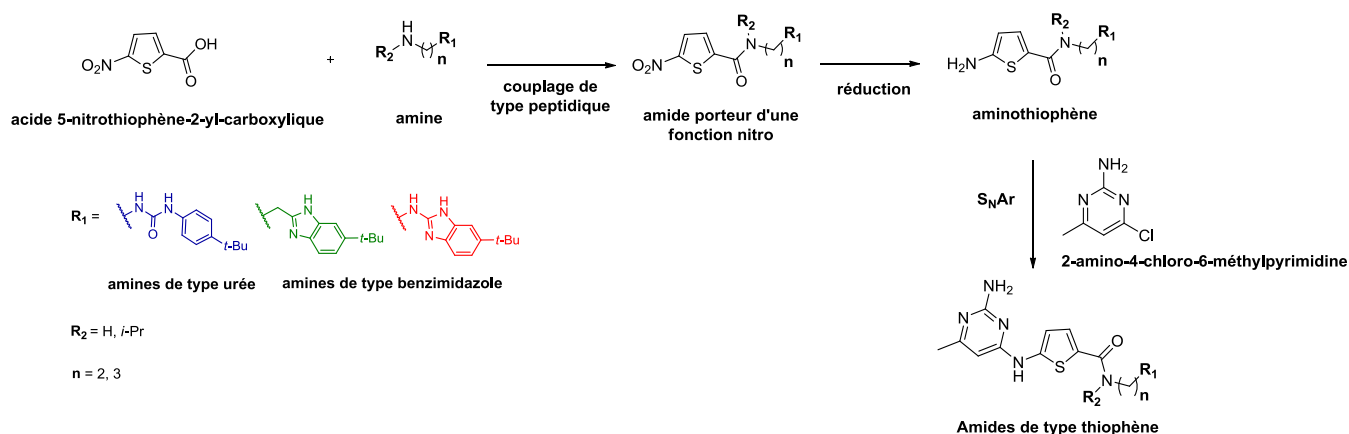
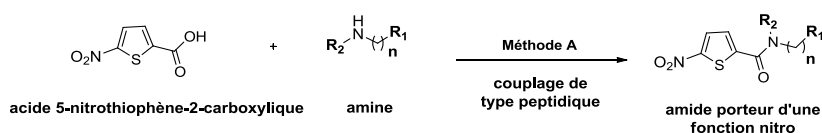


Schéma 3.63. Synthèse des produits de la série thiophène via une SNAr

De ce fait, des amides primaires et secondaires ont été obtenus via un couplage de type peptidique avec les agents de couplage HOBT (0,5 éq.) / HBTU (1,5 éq.) (méthode A, section 3.1.5) (tableau 3.5).[165]

Tableau 3.5. Synthèse des amides de type thiophénique via un couplage de type peptidique

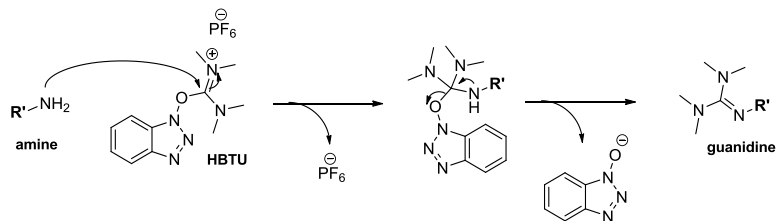


R ₁	R ₂	n = 2	n = 3	n = 4
	H	ALIPF283 (35 %)	ALIPF306 (80 %)	NS
	<i>i</i> -Pr	NS	ALIPF273 (97 %)	NS
	H	ALIPF271 (30 %)	ALIPF275 (60 %)	ALIPF284 (42 %)
	H	NS	ALIPF301 (50 %)	NS

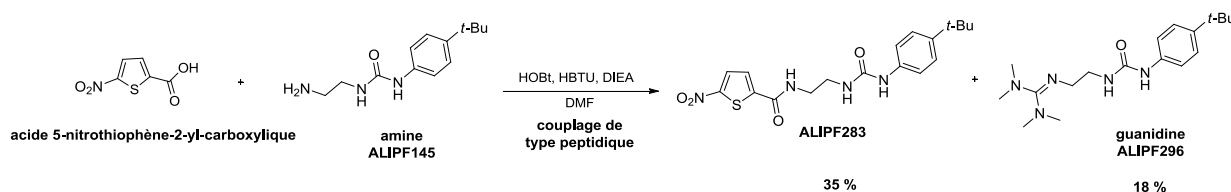
Méthode A : HOBT (0,5 éq.), HBTU (1,5 éq., 1 éq. pour **ALIPF306**, **ALIPF301**), DIEA (4 éq.), DMF, température ambiante, 12 h.

Les rendements des produits isolés sont entre parenthèses. NS : Non synthétisé.

Les rendements parfois très faibles pourraient être dus à la formation de produits secondaires. En effet, il a été décrit que lorsque un excès d'HBTU est utilisé, l'amine peut réagir avec l'HBTU et conduire à la formation d'une guanidine, compromettant ainsi le rendement de la réaction (schéma 3.64).[167]

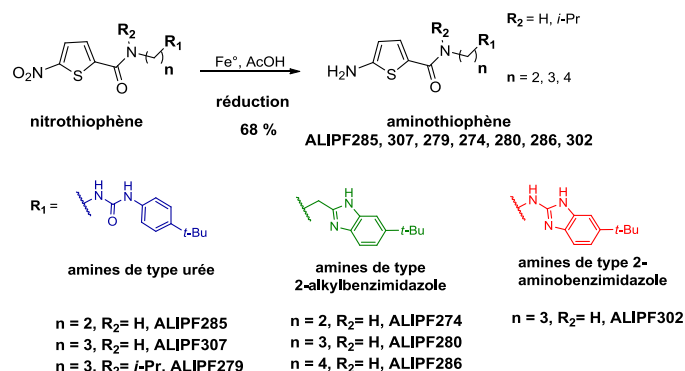
Mécanisme réactionnel**Schéma 3.64. Mécanisme proposé pour la formation d'un dérivé guanidine en présence d'un excès d'HBTU**

Lors de la formation de l'amide **ALIPF283**, un dérivé guanidine a également été obtenu avec un rendement de 18 %. Ce produit secondaire a pu être isolé et caractérisé (**schéma 3.65**).

**Schéma 3.65. Synthèse d'un amide et d'un dérivé guanidine**

Un nombre d'équivalents moindre d'HBTU pourrait favoriser l'obtention d'un rendement plus important. Ainsi, par exemple, l'amide **ALIPF283** est obtenu avec un rendement de 35 % en utilisant 1,5 éq. d'HBTU. Par contre, l'amide **ALIPF306** est obtenu avec un rendement de 80 %, lorsque la réaction a été réalisée avec 1 éq. d'HBTU (**tableau 3.5**). Lorsqu'une amine secondaire est utilisée, le rendement est aussi important (97 %) que lorsque 1 éq. de HBTU est utilisé, comme pour l'obtention de l'amide **ALIPF273**.

Les dérivés nitrés subissent ensuite une réduction par du fer en milieu acide pour aboutir aux amines correspondantes avec un rendement moyen de 68 % (**schéma 3.66**).

**Schéma 3.66. Réduction des dérivés nitrothiophéniques par du fer en milieu acide**

Les aminothiophènes obtenus réagissent sur la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine ou sur la 2,4-diamino-6-chloro-1,3,5-triazine via un mécanisme de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$. De manière analogue aux composés décrits dans la section 3.1.1, cette réaction est réalisée en présence d'HCl en quantité catalytique, dans le méthanol sous microondes pendant 25 minutes, avec un rendement compris entre 11 % et 86 % (**tableau 3.6**).

Tableau 3.6. Synthèse des produits de la série thiophène via une S_NAr

$X = CH, Y = CH_3$, 4-chloro-6-méthylpyrimidin-2-amine amide porteur d'une fonction nitro
 $X = N, Y = NH_2$, 6-chloro-1,3,5-triazine-2,4-diamine Amides de type thiophène

μO : micro-ondes

	R_1	R_2	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$
		H	ALIPF287 (62 %)	ALIPF308 (24 %)	NS
		<i>i</i> -Pr	NS	ALIPF281 (11 %)	NS
		H	ALIPF276 (31 %)	ALIPF282 (86 %)	ALIPF291 (42 %)
		H	NS	ALIPF303 (7 %)	NS
		H	NS	ALIPF318 (11 %)	NS

Les rendements des produits isolés sont indiqués entre parenthèses. *NS* : Non synthétisé.

3.4 Série de composés de type pyrrole

Les composés amides de type pyrrole proviennent d'un couplage de type peptidique entre les amines synthétisées au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4) et la fonction acide carboxylique portée par un pyrrole lié au motif aminopyrimidine. La fonction acide carboxylique de ce précurseur provient d'un groupement ester, porté par un dérivé aminopyrimidinopyrrole obtenu à partir d'une réaction entre la 2-amine-4-chloro-6-méthylpyrimidine et un aminopyrrole, lui-même obtenu à partir du 1-méthyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle (**schéma 3.67**).

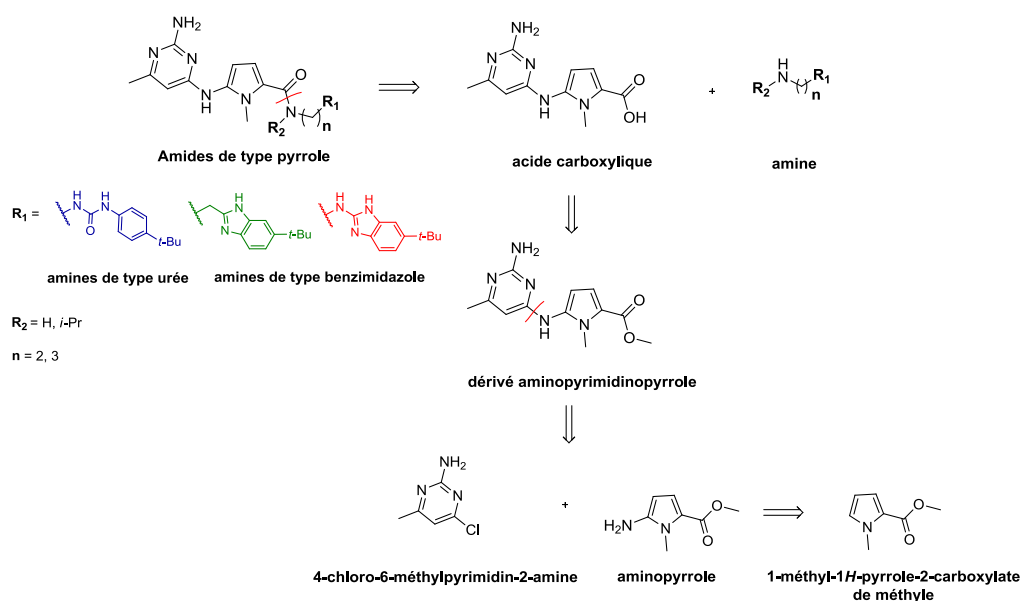


Schéma 3.67. Rétrosynthèse des composés de la série de type pyrrole

3.4.1 Synthèse du précurseur acide carboxylique de type pyrrole

Dans un premier temps, le 1-méthyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle est aminé en position 5. Cet aminopyrrole réagit ensuite sur la 2-amine-4-chloro-6-méthylpyrimidine via une S_NAr pour aboutir au dérivé de type aminopyrimidinopyrrole porteur d'une fonction ester. Cette fonction est finalement saponifiée pour aboutir à l'acide carboxylique du précurseur souhaité (**schéma 3.68**).

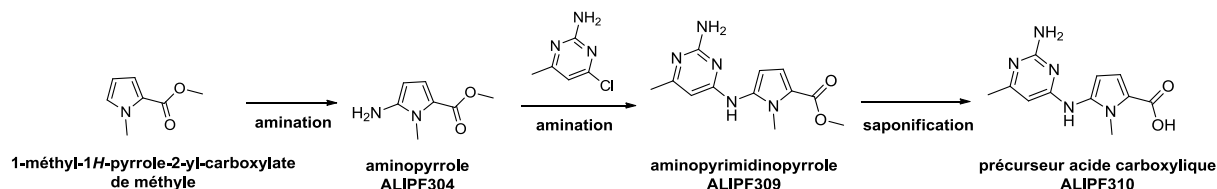


Schéma 3.68. Synthèse du précurseur acide carboxylique de type pyrrole

Le 5-amino-1-méthyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle est obtenu par réduction de l'azoture correspondant, celui-ci obtenu via l'utilisation d'un iodane λ^3 asymétrique. Dans la première étape de la réaction, le diacétate d'iodobenzène (Ph(OAc)₂, DIB), un iodure hypervalent stabilisé, réagit avec l'acide *p*-toluènesulfonique pour obtenir un iodane λ^3 asymétrique, dérivé plus électrophile qui subit l'attaque nucléophile du 1-méthyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle. L'intermédiaire hétéroaryliodonium non isolé subit ensuite une attaque nucléophile par l'azoture de sodium pour fournir l'hétéroarylazoture qui en présence du CuCl (source de Cu(I)) conduit au dérivé 5-azidopyrrole (**ALIPF311**). Ce dérivé, sans être isolé, est réduit *in situ* par le sulfure d'ammonium pour donner l'aminopyrrole souhaité (**ALIPF304**) (**schéma 3.69**). [168, 169]

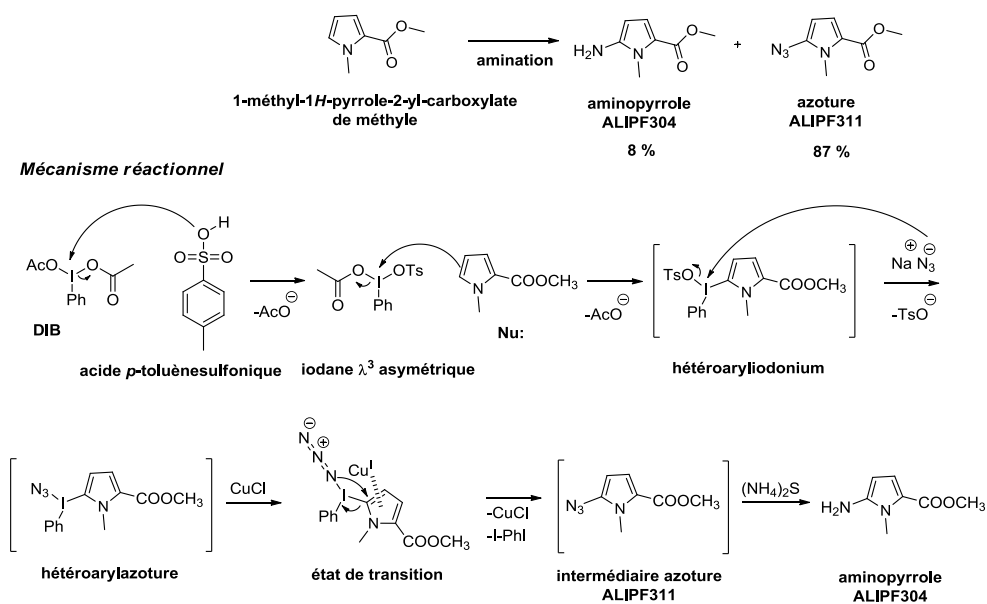


Schéma 3.69. Mécanisme proposé pour l'amination du 1-méthyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate de méthyle via un iodane λ^3 asymétrique

La dernière étape de cette réaction n'a pas été complète. L'azoture (**ALIPF311**) et l'aminopyrrole (**ALIPF304**) sont respectivement obtenus avec un rendement de 87 % et 8 %. Ainsi, une réaction d'hydrogénation catalytique (H_2 , Pd/C) sur l'**ALIPF311** est prévue afin d'améliorer le rendement de la réaction d'amination.

De manière analogue aux synthèses des sections 3.1.1 et 3.3.2, l'aminopyrrole obtenu précédemment réagit sur la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine via une S_NAr , en présence d'HCl en quantité catalytique, dans le méthanol sous microondes pendant 25 minutes, pour aboutir à l'aminopyrimidinopyrrole **ALIPF309** avec un rendement de 20 %. Ce dérivé est mis en suspension dans un mélange NaOH 6 N – éthanol (1 : 2) pendant 12 h pour fournir le précurseur acide carboxylique (**ALIPF310**) (schéma 3.70).

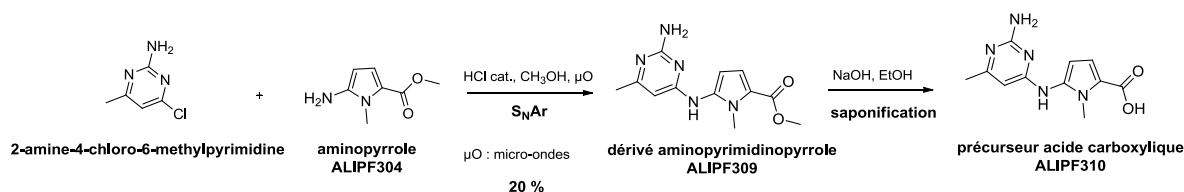


Schéma 3.70. Synthèse du précurseur acide carboxylique via une S_NAr et une saponification

Etant donné la nature de *zwitterion* de l'**ALIPF310**, sa purification a été limitante. Nous envisageons donc de réaliser l'étape de saponification sur l'azoture **ALIPF311**, pour aboutir à l'acide carboxylique qui réagira avec une amine préparée au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4). La fonction azoture de l'amide ainsi obtenu sera réduite par hydrogénation catalytique (H_2 , Pd/C). Le produit ainsi obtenu sera finalement couplé à la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine en présence d'HCl en quantité catalytique pour fournir le produit cible correspondant (schéma 3.71).

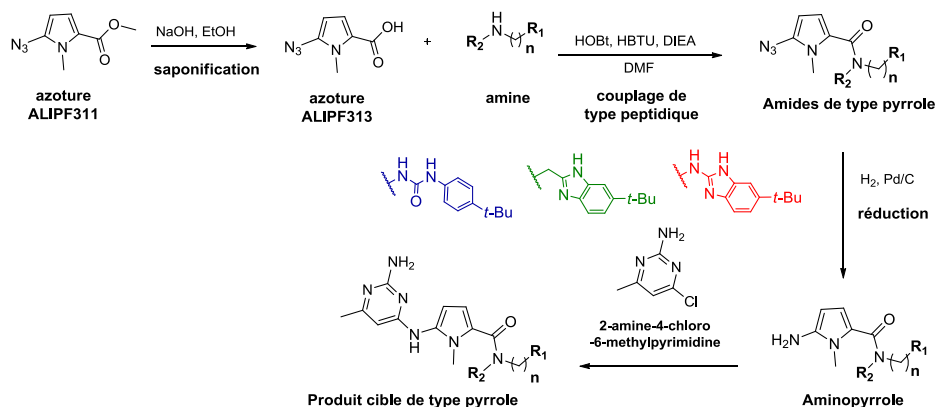


Schéma 3.71. Synthèse du précurseur acide carboxylique via une S_NAr et une saponification

3.5 Série de composés de type 3-hydroxythiophène et 3-hydroxypyrrole

Les composés amides de type 3-hydroxythiophène ou 3-hydroxypyrrole ont été envisagés à partir d'un couplage de type peptidique entre les amines synthétisées au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4) et la fonction acide carboxylique portée par l'hétérocycle respectif lié au motif

aminopyrimidine. La fonction acide carboxylique de ce précurseur provient de l'ester. Ce dérivé est obtenu à partir d'une réaction entre une aminopyrimidine et l'hétérocycle respectif halogéné au préalable (**schéma 3.72**).

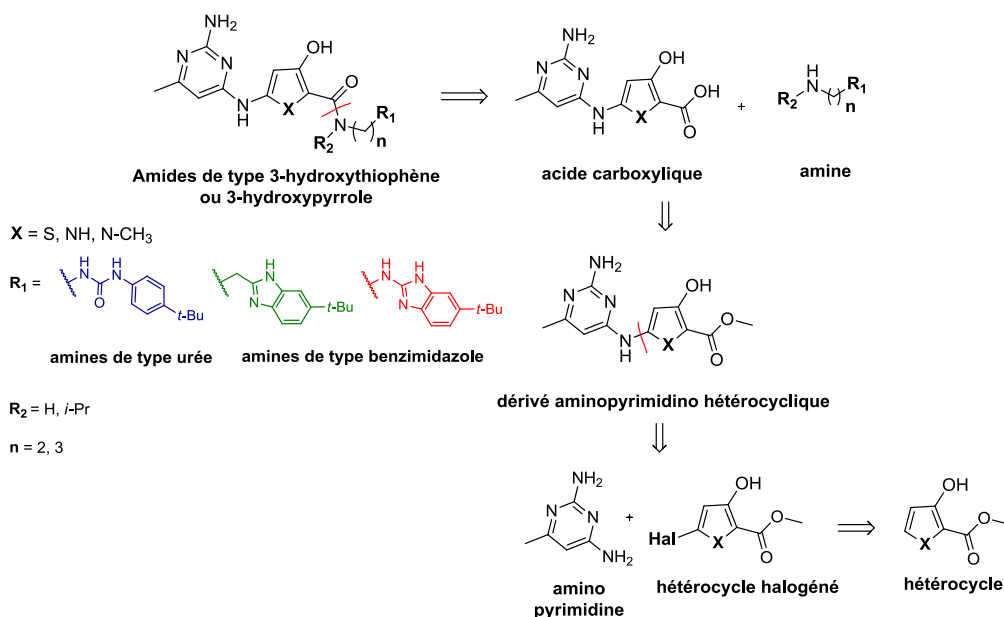


Schéma 3.72. Rétrosynthèse des composés de la série de type 3-hydroxypyrrrole ou 3-hydroxythiophène

Ainsi, l'hétérocycle correspondant, soit de type 3-hydroxythiophène, soit de type 3-hydroxypyrrrole, subit une halogénéation en position 5 pour aboutir au dérivé monohalogéné, bromé ou chloré. Celui-ci réagit dans un couplage de type Buchwald-Hartwig avec une aminopyrimidine commerciale afin d'obtenir le dérivé aminopyrimidine hétérocyclique correspondant. La fonction ester portée par ce dérivé est ensuite saponifiée pour aboutir au dérivé acide carboxylique qui réagit avec une amine synthétisée au préalable (sections 3.1.2 – 3.1.4) via un couplage de type peptidique (**schéma 3.73**).

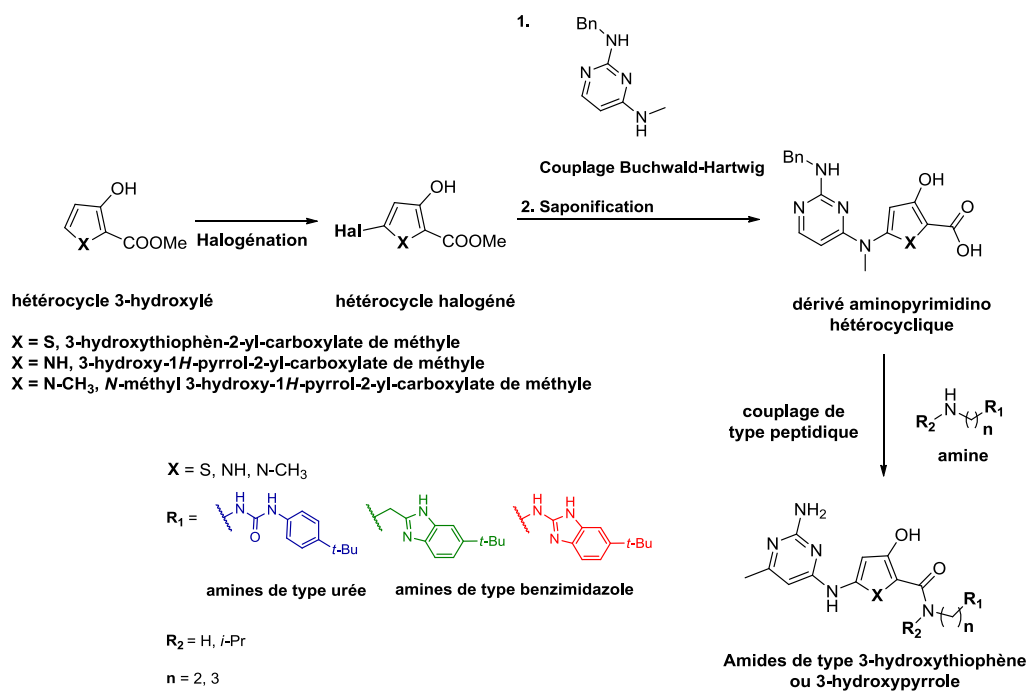
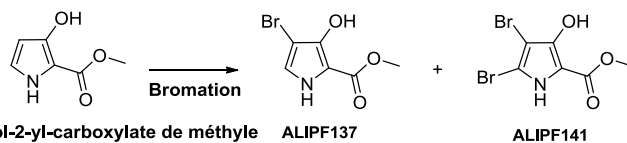


Schéma 3.73. Synthèse des composés de la série de type 3-hydroxypyrrrole ou 3-hydrothiophène

3.5.1 Synthèse du précurseur acide carboxylique de type 3-hydroxythiophène ou 3-hydroxypyrrrole via un couplage de type Buchwald-Hartwig

3.5.1.1 Halogénéation des hétérocycles[170]

Différentes conditions de bromation du 3-hydroxy-1*H*-pyrrol-2-yl-carboxylate de méthyle ont été évaluées (**tableau 3.7**).

Tableau 3.7. Bromation du 3-hydroxy-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle dans différentes conditions réactionnelles

Entrée	Réactif d'halogénéation	Solvant	Température (°C)	Durée (h)	Rapport ALIPF137 : ALIPF141 (%) ^a	Rendement (%) ^b	
						ALIPF137	ALIPF141
1	1,1 éq. NBS 2 Mol % (C ₆ H ₅ CO) ₂ O ₂	DMF	150	24	30 : 70	ND	ND
2	1,1 éq. NBS 2 Mol % (C ₆ H ₅ CO) ₂ O ₂	CH ₃ CN	80	24	5 : 95	ND	ND
3	1,05 éq. NBS h _v	DMF	40	4	70 : 30	51	3
4	0,9 éq. NBS	THF/ CH ₃ OH (1:1, v/v)	20	4	80 : 20	44	0
5	0,9 éq. PTAB	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (1:1, v/v)	20	12	80 : 20	31	0

NBS: *N*-bromosuccinimide; PTAB: tribromure de phényltriméthylammonium; DMF: diméthylformamide; THF: tétrahydrofurane; ND: non déterminé.

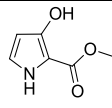
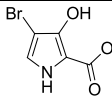
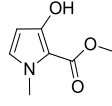
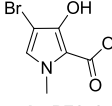
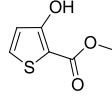
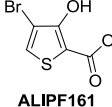
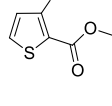
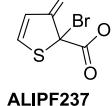
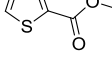
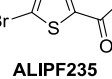
^aCalculé par RMN.

^bRendement des produits isolés.

Lorsque l'hétérocycle est mis en réaction avec un léger excès de *N*-bromosuccinimide (NBS) et une quantité catalytique de peroxyde de benzoyle comme initiateur radicalaire, dans le DMF à reflux, les dérivés monobromé (**ALIPF137**) et dibromé (**ALIPF141**) ont été obtenus dans un rapport 30 : 70 (**tableau 3.7, entrée 1**). Le DMF a été remplacé par l'acétonitrile, mais la dibromation est favorisée : le produit dibromé a été formé majoritairement (95 %) (**tableau 3.7, entrée 2**). Lorsque l'initiateur radicalaire a été remplacé par une irradiation de lumière visible (lampe - 500 W), dans le DMF à basse température, le produit monobromé est obtenu majoritairement (51 %) (**tableau 3.7, entrée 3**). Des solvants plus volatils ont été testés, avec la lumière visible comme initiateur radicalaire. Ainsi, les conditions optimales de monobromation ont été identifiées (conditions expérimentales A) : 0,9 éq. NBS dans un mélange THF - méthanol (1 : 1, v/v) à température pendant 4 heures (**tableau 3.7, entrée 4**). Lorsque le NBS a été remplacé par le tribromure de phényltriméthylammonium (PTAB) dans un mélange CH₂Cl₂ - CH₃OH (1 : 1, v/v) à température ambiante, le temps nécessaire de réaction a été prolongé (**tableau 3.7, entrée 5**).

Les conditions expérimentales optimales A ont été appliquées au *N*-méthyl 3-hydroxy-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle et il a été observé que le groupement *N*-CH₃ n'affecte pas le rendement de la réaction (**tableau 3.8, entrée 2**). Lorsque ces conditions ont été appliquées au 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle, le rendement de la réaction a diminué (**tableau 3.8, entrée 3**). En effet, après 4 heures de réaction, le dérivé monobromé de type carbonyle α, β insaturé (**ALIPF237**) a été formé majoritairement (33 %) (**tableau 3.8, entrée 4**), seul 10 % du produit attendu (**ALIPF161**) est isolé après 6 heures de réaction (**tableau 3.8, entrée 3**).

Table 3.8. Rendement de la réaction de bromation des 3-hydroxypyrrroles et 3-hydroxythiophènes dans les conditions expérimentales A à différentes durées.

Entrée	Produit de départ	Produit monobromé ^a	Durée (h)	Rendement (%) ^b
1		 ALIPF137	4	44
2		 ALIPF171	4	42
3		 ALIPF161	6	10
4		 ALIPF237	4	33 (55 brsm)
5		 ALIPF235	12	59

brsm : based on recovered starting material, basé sur la quantité de produit de départ récupérée.

^aObtenus dans les conditions expérimentales A : 0,9 éq. NBS, THF - méthanol (1 : 1, v/v), T. A.

^bRendement des produits isolés.

Le 3-hydroxythiophèn-2-yl-carboxylate de méthyle coexiste avec sa forme tautomère cétonique, mais c'est la forme hydroxyle qui prédomine étant donné le caractère électro attracteur du groupement ester.[171–174] Il aboutit donc à l'intermédiaire cétonique **ALIPF237** via un mécanisme radicalaire. Cet intermédiaire serait ensuite bromé *in situ* par le NBS pour former le dérivé **ALIPF161** via une β -élimination (**schéma 3.74**). Le rendement faible (10 %) pourrait s'expliquer par l'instabilité de cet intermédiaire dans les conditions expérimentales A.

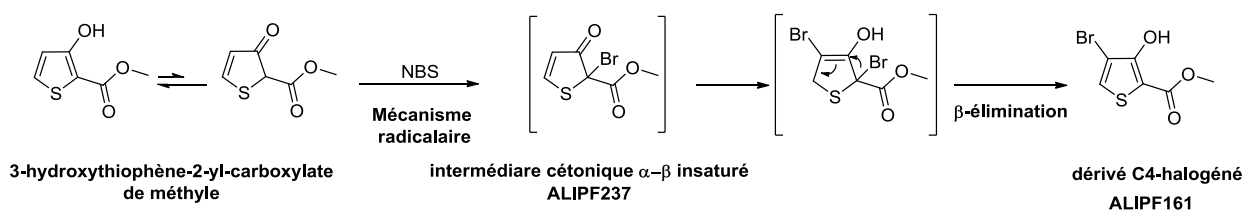


Schéma 3.74. Formation du dérivé monobromé ALIPF161 via un intermédiaire cétonique α - β insaturé

Les dérivés 3-hydroxypyrrrole ou 3-hydroxythiophène monobromés en position 5(α') n'ont été identifiés dans aucun cas. La présence du groupement hydroxyle en position 3 de ces hétérocycles affecterait leur réactivité : ils montrent une sélectivité de substitution inversée par rapport à celle des hétérocycles non hydroxylé (**tableau 3.8, entrée 5**). Il est donc conclu que la fonctionnalisation de la position C5(α') des hydroxypyrrroles et des hydroxythiophènes est particulièrement complexe.

La réactivité de ces hétérocycles a donc été évaluée dans des conditions de chloration.

Le 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle réagit avec le chlorure de sulfuryle (SO_2Cl_2) pour aboutir à un intermédiaire cétonique α - β insaturé chloré en position 2 (**ALIPF155**). L'intermédiaire cétonique ainsi obtenu réagit avec l' HCl gaz dans l'acide acétique pour fournir le composé monochloré en position 5 (α') (5-chloro-3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle), par le biais d'une γ -élimination (**schéma 3.75**).[175,176]

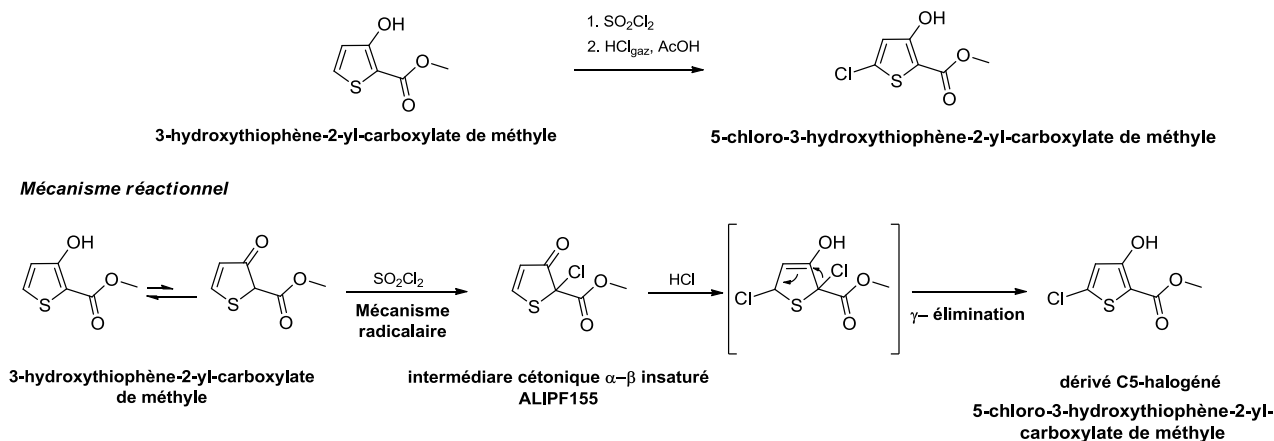


Schéma 3.75. Halogénéation du 3-hydroxy-thiophène-2-yl-carboxylate de méthyle via une élimination γ

La première étape de la réaction a été optimisée : le 3-hydroxy-thiophène-2-yl-carboxylate de méthyle a été mis en réaction avec différentes concentrations de SO_2Cl_2 . Lorsque l'agent de chloration est très concentré (produit commercial, pure 97 %), aucun produit n'a été isolé, suite à une dégradation. En revanche, des concentrations moindres de SO_2Cl_2 (1 M dans CH_2Cl_2) aboutissent à un rapport de conversion (produit de départ : produit cible) entre 8 : 2 et 6 : 4 (calculé par RMN). Finalement, le 3-hydroxy-thiophène-2-yl-carboxylate de méthyle a été mis en réaction avec 1.1 éq. de SO_2Cl_2 à une concentration de 5 M dans le chloroforme ou le dichlorométhane (conditions expérimentales B), en présence d'une irradiation de $h\nu$ (lampe - 500 W), pendant 45 minutes pour obtenir un rendement quantitatif du dérivé **ALIPF155**. Cette réaction a lieu selon un mécanisme radicalaire (**schéma 3.76**).[177]

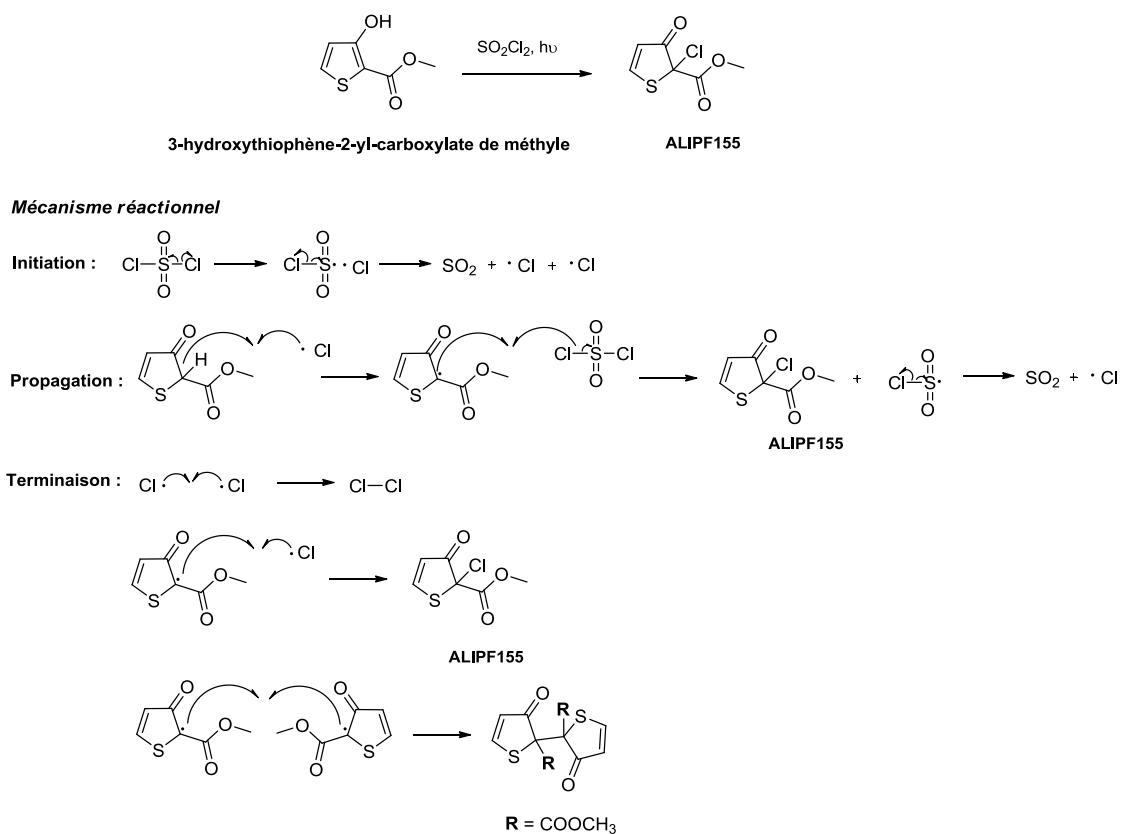


Schéma 3.76. Mécanisme d'halogénéation du 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle par le SO_2Cl_2

Il a été décrit dans la littérature que lorsque l'intermédiaire **ALIPF155** est mis en réaction avec de l'HBr, il oxyde l'HBr en Br_2 et conduit au dérivé bromé en position 4(β') (**ALIPF161**). [175] De manière analogue, lorsque l'intermédiaire **ALIPF155** est mis en réaction avec de l'iode dans l'acide acétique, le produit monoiodé (**ALIPF257**) est obtenu (**schéma 3.77**). Dans les deux cas, le dérivé halogéné en position 5(α') n'a pas été formé.

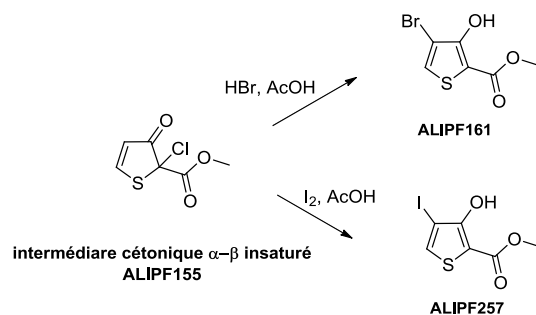
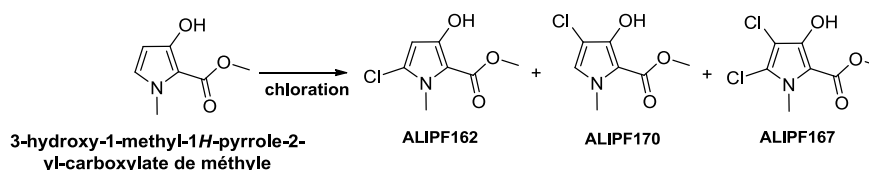


Schéma 3.77. Bromation et iodation du dérivé ALIPF155

La réaction de chloration a été étudiée parallèlement avec le *N*-méthyl 3-hydroxy-1*H*-pyrrol-2-yl-carboxylate de méthyle (**tableau 3.9**).

Table 3.9. Optimisation d'une chloration régiosélective du 3-hydroxy-1-méthyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate de méthyle

Entrée	Concentration de SO ₂ Cl ₂ / CH ₂ Cl ₂ ^a	Température (°C)	Durée (h)	Rendement (%) ^b		
				ALIPF162	ALIPF170	ALIPF167
1	pure 97 %	20	4	0	0	0
2 ^c	10 M	20	24	0	0	11
3	5,5 M	20	12	25	0	0
4	5 M	20	36	52	1	0
5 ^d	5 M	40	1	9	2	4
6	1 M	20	12	7	0	0

^a1.1 éq. SO₂Cl₂ a été utilisé, excepté pour l'entrée 2 (3,1 éq. utilisés).

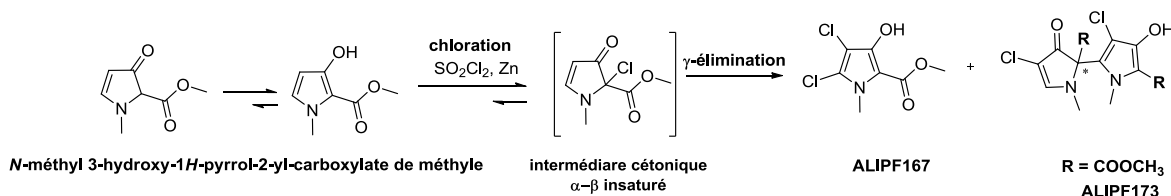
^bRendement des produits isolés.

^c1.1 éq. Zn a été utilisé.

^dEn présence d'irradiation de h_v (lampe - 500 W).

Le produit monochloré en position 5(α') **ALIPF162** a été obtenu sélectivement en une étape et aucun intermédiaire cétonique α-β insaturé n'a été identifié. Comme pour le dérivé 3-hydroxythiophène, la réaction en présence d'une concentration différente de 5 M conduit à l'absence du produit cible ou à des rendements moins importants. Lorsqu'une irradiation (lampe - 500 W) a été utilisée en tant qu'initiateur radicalaire, une halogénéation non sélective a été observée et l'obtention des produits monochlorés en C5(α') (**ALIPF162**), en C4(β') (**ALIPF170**) et du produit dichloré (**ALIPF167**) a été mise en évidence en une proportion de 75 : 8 : 16 (**tableau 3.9, entrée 5**).

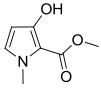
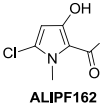
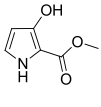
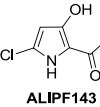
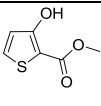
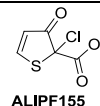
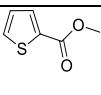
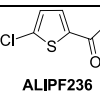
Etant donné le mécanisme d'halogénéation proposé pour le dérivé 3-hydroxythiophène (**schéma 3.75**), la formation du dérivé monochloré en position 2 du 3-hydroxypyrrole est supposée (**schéma 3.78**). Ainsi, du zinc a été utilisé afin d'éviter l'oxydation de cet intermédiaire et de diriger le cours de la réaction vers la formation du produit cible. Néanmoins, le dérivé dichloré **ALIPF167** et un dimère (**ALIPF173**) ont été isolés (**tableau 3.9, entrée 2**).

**Schéma 3.78. Chloration du *N*-méthyl 3-hydroxy-1H-pyrrol-2-yl-carboxylate de méthyle en présence de SO₂Cl₂ et du zinc**

Ces résultats suggèrent qu'un intermédiaire cétonique α - β insaturé pourrait se former lors de cette réaction, mais qu'il réagirait immédiatement avec un dérivé hydroxypyrrole monochloré pour former le dimère **ALIPF173**. Ceci correspondrait à l'étape de terminaison du mécanisme proposé pour l'halogénéation avec le SO_2Cl_2 (**schéma 3.76**).[177] Cependant, l'intermédiaire cétonique α - β insaturé est trop réactif pour être isolé. En effet, le *N*-méthyl 3-hydroxy-1*H*-pyrrol-2-yl-carboxylate de méthyle fournit instantanément le dérivé monochloré **ALIPF162** en présence de 1,1 équivalents de SO_2Cl_2 5 M dans le CH_2Cl_2 (conditions expérimentales B), et le rendement n'est pas amélioré avec une durée de réaction prolongée (**tableau 3.9, entrée 4**).

Les conditions expérimentales B ont été appliquées à d'autres hétérocycles. (**tableau 3.10**).

Table 3.10. Monochloration des 3-hydroxypyrroles et 3-hydroxythiophènes

Entrée	Produit de départ	Produit cible	Durée (h)	Rendement (%) ^c
1 ^a		 ALIPF162	36	52
2 ^b		 ALIPF143	60	20 (brsm)
3 ^a		 ALIPF155	1	Quantitatif
4 ^a		 ALIPF236	12	0

brsm : based on recovered starting material, basé sur la quantité de produit de départ récupérée

^aConditions expérimentales B: 1 éq. SO_2Cl_2 (1 M dans CHCl_3) ou 1,1 éq. SO_2Cl_2 (5 M dans CH_2Cl_2) en présence ou non de $h\nu$ (lampe - 500 W).

^bConditions expérimentales C: i) 2 éq. SO_2Cl_2 (1 M dans CHCl_3), ii) AcOH saturé avec HCl gaz, température ambiante.

^cRendement des produits isolés.

L'absence d'une substitution sur l'azote du pyrrole est défavorable pour la réaction. Lorsque le composé 3-hydroxy-1*H*-pyrrol-2-yl-carboxylate de méthyle a été mis en réaction selon les conditions expérimentales B en présence de lumière visible (lampe - 500 W), aucun produit n'a été isolé. Lorsqu'il a été mis en réaction avec 2 éq. de SO_2Cl_2 1 M dans le CHCl_3 à température ambiante pendant 12 heures, le composé souhaité **ALIPF143** a été obtenu avec un rendement de 8 %. Lorsque le brut réactionnel a été traité avec HCl gaz dans l'acide acétique, le dérivé **ALIPF143** a été obtenu avec un rendement de 17 % (20 % brsm) (**tableau 3.10, entrée 2**, conditions expérimentales C).

Ces différents travaux nous ont amenés à décrire dans une publication les conditions réactionnelles optimales de monobromation en position 4(β') avec du NBS et de monochloration en position 5(α') avec le SO_2Cl_2 des 3-hydroxypyrroles et 3-hydroxythiophènes.[170]

3.5.1.2 Couplage des hétérocycles halogénés avec un dérivé aminopyrimidine

Les dérivés halogénés ont été mis en réaction avec la *N*²-benzyl-*N*⁴-méthylpyrimidine-2,4-diamine dans des conditions de couplage de type Buchwald-Hartwig (schéma 3.79).[178]

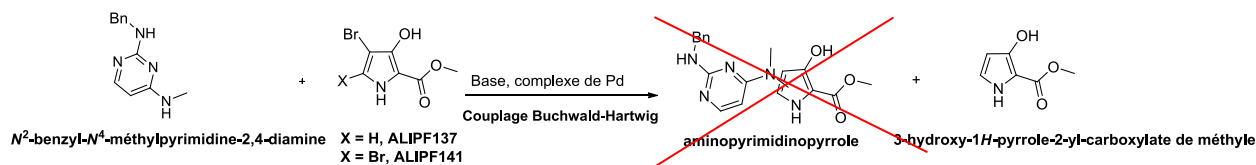


Schéma 3.79. Couplage de type Buchwald-Hartwig entre les dérivés halogénés et une aminopyrimidine

Un ligand (phosphine) et une source de palladium ont été utilisés :

- (dichlorobis(tri-*o*-tolylphosphine)Pd(II))
- tris(dibenzylidèneacétone)Pd et BINAP

Les bases fortes *t*-BuONa et *t*-BuOK ont été évaluées, dans le toluène à reflux et dans un tube scellé, mais le produit attendu n'a pas été obtenu. Seulement la déshalogénéation des produits de départ a été mise en évidence.

L'aminopyrimidine a donc été remplacée par la benzylamine et la méthylbenzylamine. Le produit ainsi obtenu serait débenzylé pour fournir le dérivé amine correspondant. Ce dérivé réagirait sur l'aminopyrimidine halogénée pour aboutir au dérivé aminopyrimidino hétérocyclique souhaité (schéma 3.80).

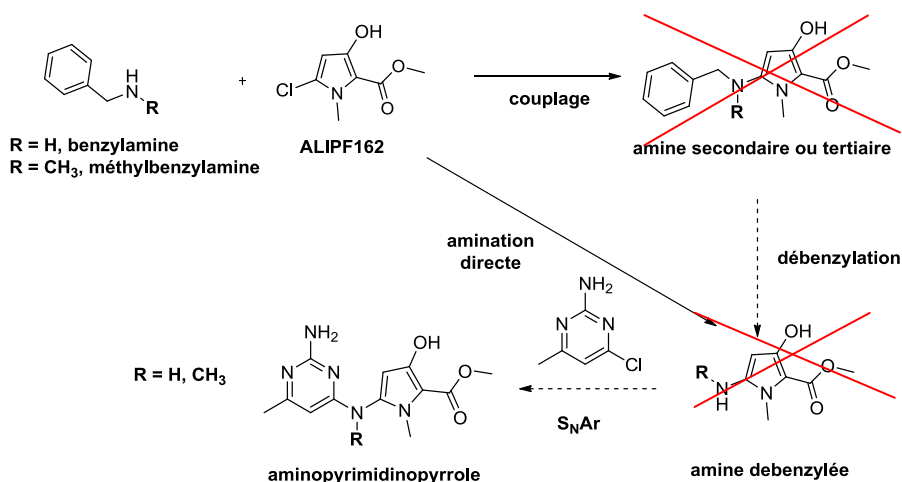


Schéma 3.80. Synthèse du dérivé aminopyrimidino hétérocyclique via une S_NAr

Des conditions de substitution nucléophile classique avec ou sans Et₃N ou Cs₂CO₃, un couplage de type Buchwald-Hartwig (*t*-BuOK, phosphine palladiée)[178] ou couplage de type Ullman (sels de cuivre)[179] ont été évaluées. Il a été essayé une réaction du dérivé halogéné avec l'azoture de sodium en présence de sels de cuivre ou non, afin d'obtenir les dérivés amines

de façon directe (**schéma 3.80**). [180] Au cours de ces expériences aucune réaction n'a eu lieu : le produit de départ a soit été récupéré, déshalogéné ou même dégradé, mais jamais substitué. Nous avons donc conclu que les hétérocycles halogénés utilisés ne réagissent pas dans des réactions de substitution nucléophile ni dans des couplages de type organométallique. Pour ces raisons, la stratégie de synthèse a donc été modifiée.

3.5.2 Synthèse du précurseur acide carboxylique de type 3-hydroxythiophène ou 3-hydroxypyrrrole via une S_NAr

Le précurseur aminopyrimidino hétérocyclique provient donc d'une substitution nucléophile aromatique (S_NAr) entre un hétérocycle aminé au préalable en position 5(α') et une aminopyrimidine halogénée (**schéma 3.81**).

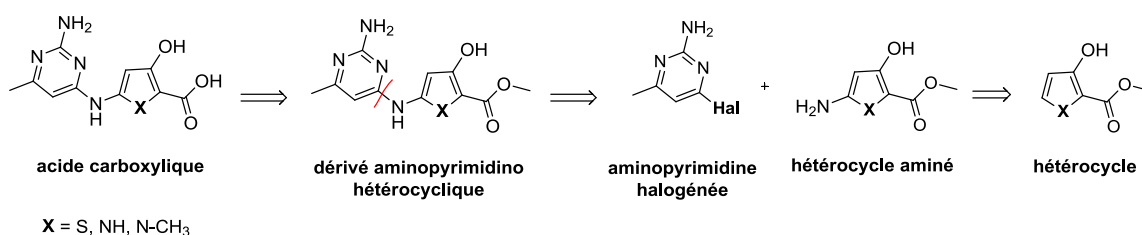


Schéma 3.81. Rétrosynthèse du précurseur aminopyrimidino hétérocyclique via une S_NAr

Le 3-hydroxythiophène ou le 3-hydroxypyrrrole est aminé en position 5(α'). Ce dérivé aminé réagit sur la 4-chloro-6-méthylpyrimidin-2-amine via une S_NAr . La fonction ester du dérivé aminopyrimidino ainsi obtenu est ensuite saponifiée pour aboutir au précurseur acide carboxylique souhaité (**schéma 3.82**).

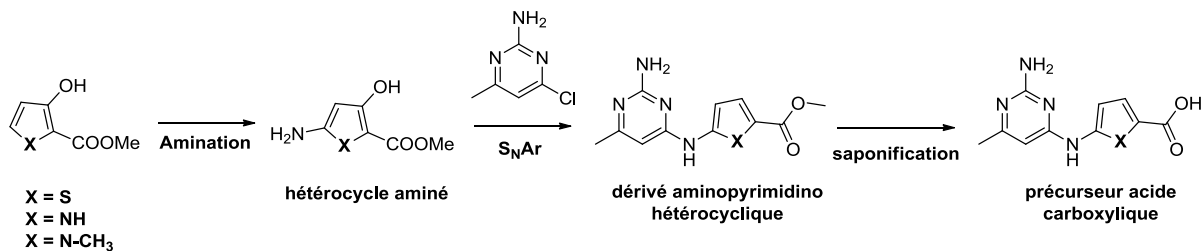


Schéma 3.82. Synthèse des précurseurs de type acide carboxylique via un hétérocycle aminé

Le 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle est donc traité avec le SO_2Cl_2 afin d'obtenir le dérivé cétonique α,β insaturé chloré en position 2 (section 3.5.1.1). [170,175,181]

Dans un premier temps, la réactivité de ce dérivé chloré a été évaluée en tant qu'accepteur de Michaël vis-à-vis de : a) la 2,4-diamine- N^2 -benzyl- N^4 -méthylpyrimidine, b) la benzylamine, c) le phthalimide potassé. Dans le cas (a) une débenzylation aurait abouti au produit cible ; dans les cas (b) et (c), une réaction de débenzylation ou un traitement avec l'hydrazine, respectivement, aurait abouti à l'amine correspondante (**schéma 3.83**). Néanmoins, aucune de ces réactions n'a fourni le produit souhaité.

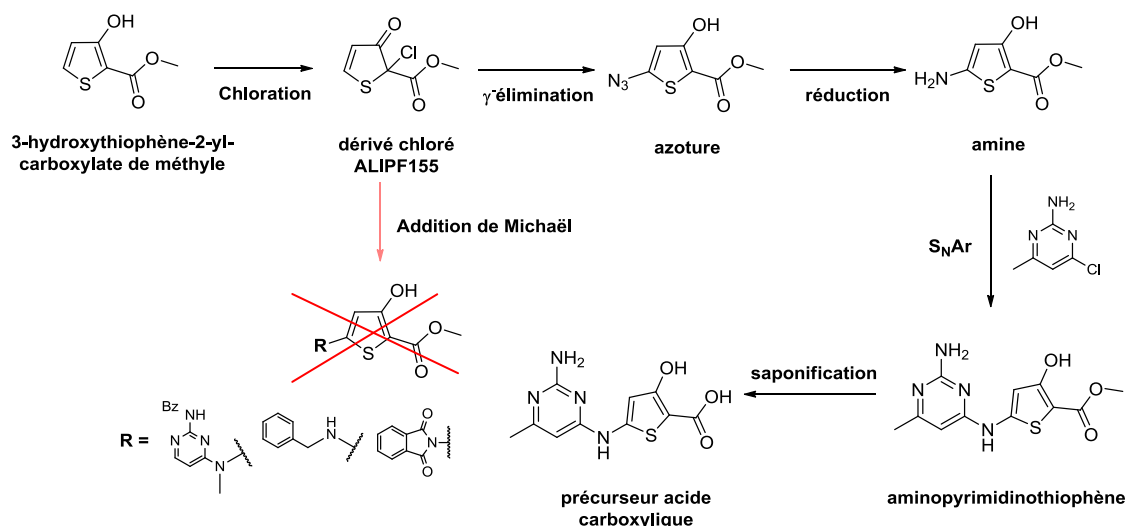
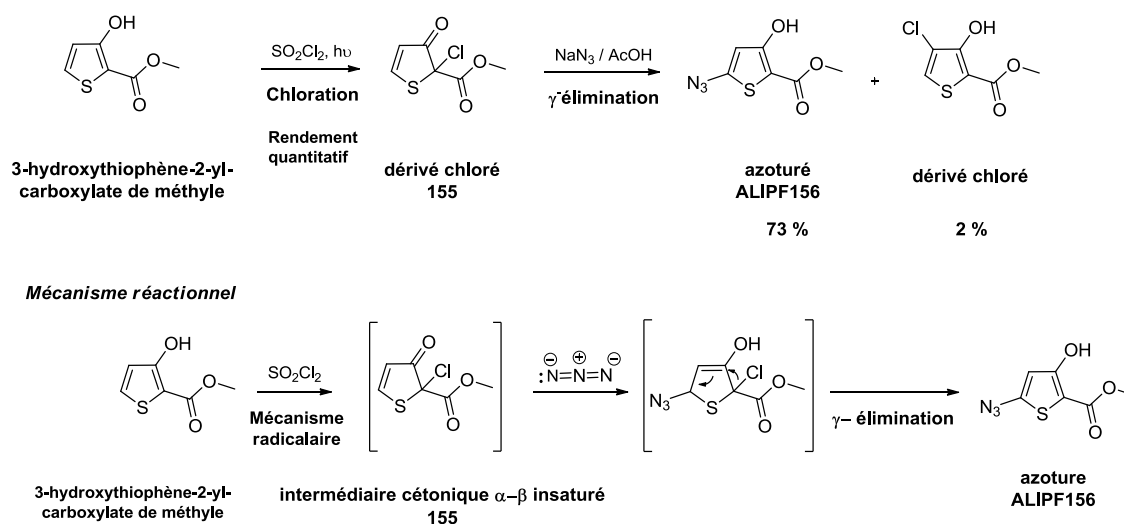


Schéma 3.83. Synthèse du précurseur 3-hydroxythiophène porteur d'une fonction acide carboxylique

Le dérivé chloré (**ALIPF155**) subit ensuite une γ -élimination par l'addition de l'azoture de sodium.[182] L'azoture obtenu est ensuite réduit pour aboutir au dérivé amine qui est couplé à la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine via une S_NAr (schéma 3.83).

Le 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle est donc traité avec le SO_2Cl_2 , irradié par de la lumière visible (lampe - 500 W) pendant 1 heure pour aboutir au dérivé chloré en position 2 (**ALIPF155**).[170,175,181] Le dérivé chloré réagit avec l'azoture de sodium dans l'acide acétique pendant 20 heures à température ambiante via une γ -élimination pour fournir l'azoture (**ALIPF156**)[182] avec un rendement de 73 % (schéma 3.84).

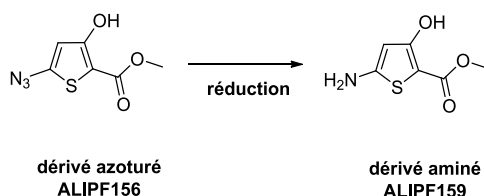
Schéma 3.84. Synthèse du 3-hydroxythiophène azoturé en C5(α')

Cette réaction conduit à la formation du produit cible (**ALIPF156**) et d'un produit secondaire difficilement séparable du produit souhaité car leur R_f sont proches. Ce produit

secondaire a été isolé et caractérisé : il correspond au dérivé hydroxythiophène chloré en position 4. Celui-ci pourrait se former suite à la libération du chlorure lors de la réaction.

L'azoture de l'**ALIPF156** est ensuite réduit pour donner le dérivé aminé correspondant (**ALIPF159**). Plusieurs méthodes de réduction ont été évaluées (**tableau 3.11**).

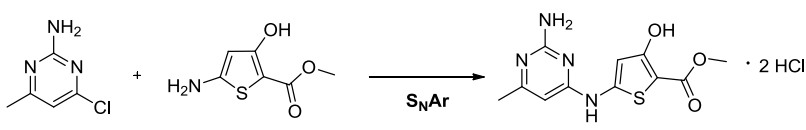
Tableau 3.11. Réduction de l'azoture (ALIPF156) par différentes méthodes



Entrée	Agent réducteur	Solvant	Température (°C)	Durée (h)	Rendement (%)
1	C ₉ Fe ₂ O ₉ , H ₂ O _{cat.}	CH ₃ CN	20 – 82	4 -- 48	0
2	FeCl ₃ , Zn	éthanol	20 – 78	4 -- 48	0
3	NaBH ₄	CH ₂ Cl ₂	20	20	0
4	NaBH ₄	CH ₃ OH	20	16	9
5	LiAlH ₄	THF	20	20	6
6	H ₂ , Pd/C	CH ₃ OH - CH ₂ Cl ₂ (9 : 1, v/v)	20	28	66

C'est en présence de charbon palladié (Pd/C, charge : 10 % poids) sous atmosphère d'hydrogène pendant 28 heures que le dérivé **ALIPF159** a été obtenu avec un rendement de 66 %. La présence de l'atome de soufre qui est susceptible « d'empoisonner » le catalyseur conduit à l'utilisation d'une quantité importante de charbon palladié (30 éq.) et à une durée de réaction importante.

Une fois le dérivé aminé (**ALIPF159**) obtenu, une optimisation des conditions de réaction afin de le coupler à la 2-amino-4-chloro-6-méthylpyrimidine a été réalisée (**tableau 3.12**).

Tableau 3.12. Couplage de l'aminothiophène (ALIPF159) au dérivé aminopyrimidine halogéné


2-amine-4-chloro-6-méthylpyrimidine dérivé aminé ALIPF159 aminopyrimidinothiophène ALIPF174 · 2 HCl

Entrée	Réactifs	Solvant	Température (°C)	Puissance (W)	Durée (h)	Rendement (%)
1	TEA	acétone	20 - 56	NA	52	0
2	TEA, KI	acétone	20 - 56	NA	52	0
3	HCl _{cat.}	CH ₃ OH	65	NA	36	66
4 ^a	HCl _{cat.}	CH ₃ OH	65	100	1,5	79
5 ^a	HCl _{cat.}	toluène	90	300	0,5	74
6 ^a	HCl _{cat.}	toluène –éthanol (9 : 1, v/v)	90	300	0,7	93

^aExpériences réalisées dans un réacteur aux micro-ondes en système ouvert.

Les conditions de substitution nucléophile classique, à température ambiante ou à reflux, n'ont pas conduit à la formation du produit cible (**tableau 3.12, entrées 1, 2**). C'est l'utilisation d'HCl en quantité catalytique qui a permis à la réaction de se dérouler (**tableau 3.12, entrée 3**).^[34,66] Afin d'améliorer le rendement et de diminuer le temps de reflux thermique, cette réaction a été également effectuée aux microondes en système ouvert, et il a été constaté une amélioration du rendement, ainsi qu'une diminution du temps de réaction (**tableau 3.12, entrée 4**). Lorsque le méthanol a été remplacé par du toluène, le temps de réaction a pu être diminué, probablement dû au fait que la température et la puissance dans le réacteur aux micro-ondes ont également pu être augmentées (**tableau 3.12, entrée 5**). Néanmoins, une diminution de la solubilité des produits de départ a été constatée. Ainsi, le toluène a été remplacé par un mélange toluène – éthanol (9 : 1, v/v), permettant non seulement de conserver les paramètres de température et de puissance dans le réacteur tout en assurant la solubilité des produits de départ, mais surtout une amélioration du rendement de la réaction (**tableau 3.12, entrée 6**).

Le dérivé obtenu a été mis en réaction avec plusieurs bases inorganiques (NaOH, KOH, LiOH) afin de saponifier sa fonction ester. Une hydrolyse un milieu acide (HCl_{aq.} 10 %, dioxane) a été également testée. Mais ces tentatives n'ont pas amené au composé souhaité et l'ester de départ a été récupéré. Lorsque **ALIPF174** a été mis en réaction avec du NaOH dans le THF à reflux pendant 12 heures, le produit de décarboxylation a été mis en évidence (**schéma 3.85**).

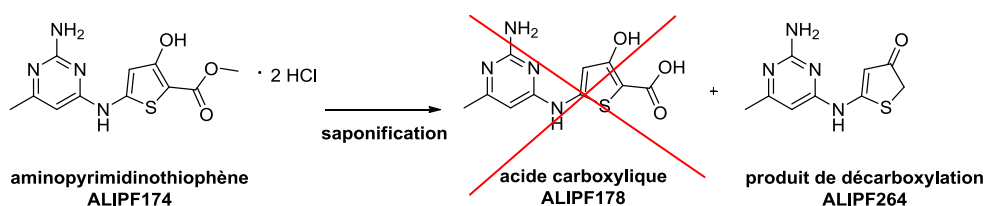


Schéma 3.85. Saponification d'ALIPF174

La présence du groupement hydroxyle et du groupement aminopyrimidine en position 5 sur le dérivé **ALIPF174** affecterait négativement la réactivité de la fonction ester. En effet, lorsqu'**ALIPF174** a été mis en réaction avec des hydrures (DIBAL-H, LiAlH_4) afin de réduire la fonction ester, le produit de départ reste stable, et il est récupéré quantitativement.

Etant donné ces résultats, la stratégie de synthèse a été modifiée afin d'obtenir le précurseur acide carboxylique (schéma 3.86). Des conditions de saponification avec du NaOH ont été testées sans succès sur le dérivé ester **ALIPF156**. Parallèlement, la fonction ester du 3-hydroxythiophène-2-yl-carboxylate de méthyle est saponifiée avec NaOH dans du méthanol pendant 48 heures pour aboutir au dérivé **ALIPF189** avec un rendement de 80 %. Il est ensuite mis en réaction avec le SO_2Cl_2 5 M dans le CH_2Cl_2 en présence d'une irradiation de lumière visible (lampe – 500 W) pour donner le dérivé chloré en position 2(α) (**ALIPF191**) avec un rendement de 60 %. Ce composé réagit ensuite avec l'azoture de sodium dans l'acide acétique, pour donner le dérivé **ALIPF182**. Cependant ce dérivé n'a pas été obtenu et la stratégie de synthèse a été interrompue.

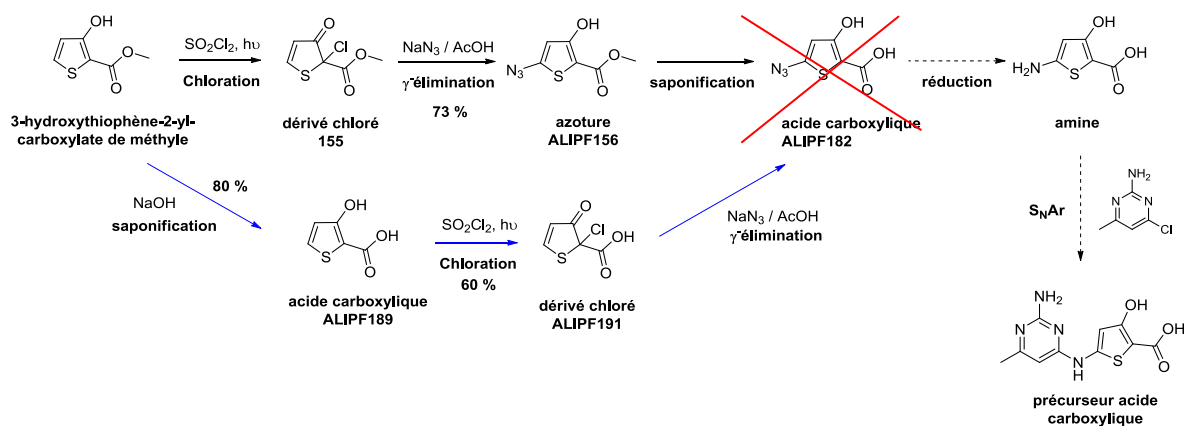


Schéma 3.86. Synthèse aboutissant au précurseur acide carboxylique

Finalement, une aminolyse a été testée sans succès sur le dérivé **ALIPF174** en présence de triméthylaluminium ($\text{Al}_2(\text{CH}_3)_6$, TMA) dans du THF à reflux dans un tube scellé (schéma 3.87).[183]

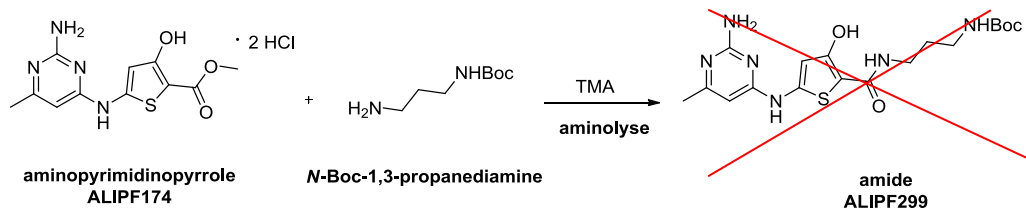


Schéma 3.87. Aminolyse sur le dérivé ALIPF174

Il semblerait que la présence d'un groupement électrodonneur en position 5 du 3-hydroxythiophène, comme l'azoture ou l'aminopyrimidine, affecterait la réactivité de la fonction ester en position 2 de l'hétérocycle.

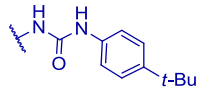
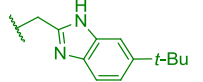
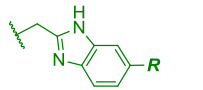
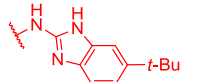


Les produits cibles synthétisés présentant une pureté supérieure à 97 % sont présentés dans le **tableau 3.13**.

Tableau 3.13. Produits intermédiaires et produits cibles synthétisés (partie 1)

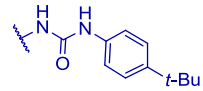
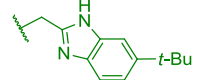
Partie 1 : Produits cibles

La synthèse du produit concerné est détaillée sur la page indiquée en parenthèses.

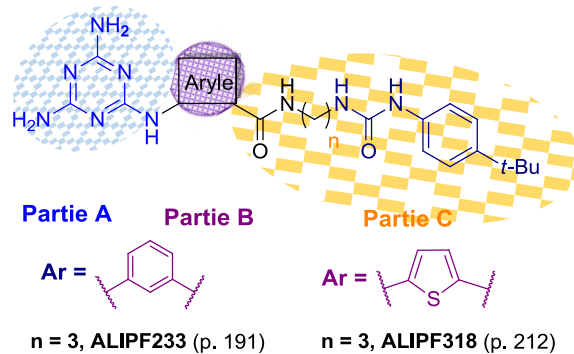
Phénylamides secondaires et tertiaires

R ₁	R ₂ = H	R ₂ = <i>i</i> -Pr
	n = 2, ALIPF194 (p. 185) n = 3, ALIPF197 (p. 185)	n = 2, ALIPF198 (p. 186) n = 3, ALIPF199 (p. 186)
	n = 2, ALIPF201 (p. 187) n = 3, ALIPF200 (p. 187) n = 4, ALIPF242 (p. 188)	n = 3, ALIPF211 (p. 189)
	n = 3, R = H, ALIPF277 (p. 188) n = 3, R = CF ₃ , ALIPF293 (p. 196) n = 3, R = OCH ₃ , ALIPF295 (p. 195) n = 3, R = Cl, ALIPF297 (p. 196)	
	n = 2, ALIPF244 (p. 189) n = 3, ALIPF292 (p. 190)	
	n = 2, ALIPF240 (p. 190)	
	n = 2, ALIPF246 (p. 194)	



Benzylamines secondaires

R ₁	
	n = 2, ALIPF206 (p. 201) n = 3, ALIPF220 (p. 204)
	n = 3, ALIPF222 (p. 205)

Triazines



Hydroxyphénylamides secondaires et tertiaires

R ₁	R ₂ = H	R ₂ = <i>i</i> -Pr
	n = 2, ALIPF205 (p. 197) n = 3, ALIPF229 (p. 201)	n = 2, ALIPF202 (p. 198) n = 3, ALIPF207 (p. 199)
	n = 2, ALIPF203 (p. 199)	n = 3, ALIPF213 (p. 200)

Thiophènes



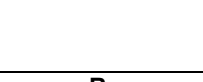
R ₁	R ₂ = H	R ₂ = <i>i</i> -Pr
	n = 2, ALIPF287 (p. 209) n = 3, ALIPF308 (p. 209)	n = 3, ALIPF281 (p. 210)
	n = 2, ALIPF276 (p. 210) n = 3, ALIPF282 (p. 211) n = 4, ALIPF291 (p. 211)	
	n = 3, ALIPF303 (p. 212)	

Tableau 3.13. Produits intermédiaires et produits cibles synthétisés (partie 2)**Partie 2 : Produits intermédiaires et produits cibles***La synthèse de chaque produit est détaillée sur la page indiquée.*

Composé	Page	Composé	Page	Composé	Page
ALIPF137	215	ALIPF201	188	ALIPF275	194
ALIPF138	173	ALIPF202	199	ALIPF276	202
ALIPF139	177	ALIPF203	200	ALIPF277	189
ALIPF140	176	ALIPF205	199	ALIPF278	179
ALIPF141	217	ALIPF206	202	ALIPF279	208
ALIPF143	218	ALIPF207	200	ALIPF280	208
ALIPF144	174	ALIPF208	203	ALIPF281	211
ALIPF145	175	ALIPF210	204	ALIPF282	212
ALIPF147	172	ALIPF211	190	ALIPF283	193
ALIPF148	171	ALIPF212	179	ALIPF284	195
ALIPF153	174	ALIPF213	201	ALIPF285	207
ALIPF154	176	ALIPF216	204	ALIPF286	209
ALIPF155	220	ALIPF217	177	ALIPF287	210
ALIPF156	222	ALIPF220	205	ALIPF288	183
ALIPF159	222	ALIPF221	205	ALIPF289	183
ALIPF161	218	ALIPF222	206	ALIPF290	185
ALIPF162	219	ALIPF223	203	ALIPF291	212
ALIPF167	220	ALIPF225	184	ALIPF292	191
ALIPF170	219	ALIPF226	184	ALIPF293	197
ALIPF171	216	ALIPF228	185	ALIPF294	183
ALIPF173	221	ALIPF229	202	ALIPF295	196
ALIPF174	223	ALIPF230	185	ALIPF296	193
ALIPF175	173	ALIPF231	171	ALIPF297	197
ALIPF180	178	ALIPF233	192	ALIPF301	198
ALIPF181	178	ALIPF234	180	ALIPF302	209
ALIPF183	179	ALIPF235	215	ALIPF303	213
ALIPF184	181	ALIPF237	216	ALIPF304	214
ALIPF186	180	ALIPF240	191	ALIPF306	198
ALIPF187	181	ALIPF241	182	ALIPF307	207
ALIPF188	182	ALIPF242	189	ALIPF308	210
ALIPF189	224	ALIPF244	190	ALIPF309	214
ALIPF190	180	ALIPF246	195	ALIPF311	215
ALIPF193	170	ALIPF257	221	ALIPF315	174
ALIPF194	186	ALIPF264	223	ALIPF316	175
ALIPF196	171	ALIPF269	192	ALIPF318	213
ALIPF197	186	ALIPF271	194		
ALIPF198	187	ALIPF272	182		
ALIPF199	187	ALIPF273	193		
ALIPF200	188	ALIPF274	208		

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1 Evaluation de l'activité sur DOT1L	132
4.2 Evaluation de l'activité sur DNMT	147
4.3 Détermination de la spécificité des molécules vis-à-vis d'autres HMTs	154
4.4 Comparaison de l'activité des composés sur DOT1L, DNMT et autres HMTs	157

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1 Evaluation de l'activité sur DOT1L

4.1.1 Principe du test d'activité sur DOT1L

Les tests d'activité sur DOT1L des composés synthétisés ont été réalisés par la société Eurofins Cerep.

Le test enzymatique est basé sur la détection ou non d'un méthyle radiomarqué avec du tritium (CT_3) transféré sur un nucléosome via la réaction catalysée par DOT1L utilisant le cofacteur SAM radiomarqué ($[^3H]$ -SAM). [120,184] Lorsque DOT1L est inhibée, le nucléosome ne montre pas de signal radioactif (**figure 4.1**). SAH, inhibiteur commun aux HMTs, est prise comme composé de référence ($IC_{50} = 240 \pm 26$ nM pour DOT1L dans le test Cerep).

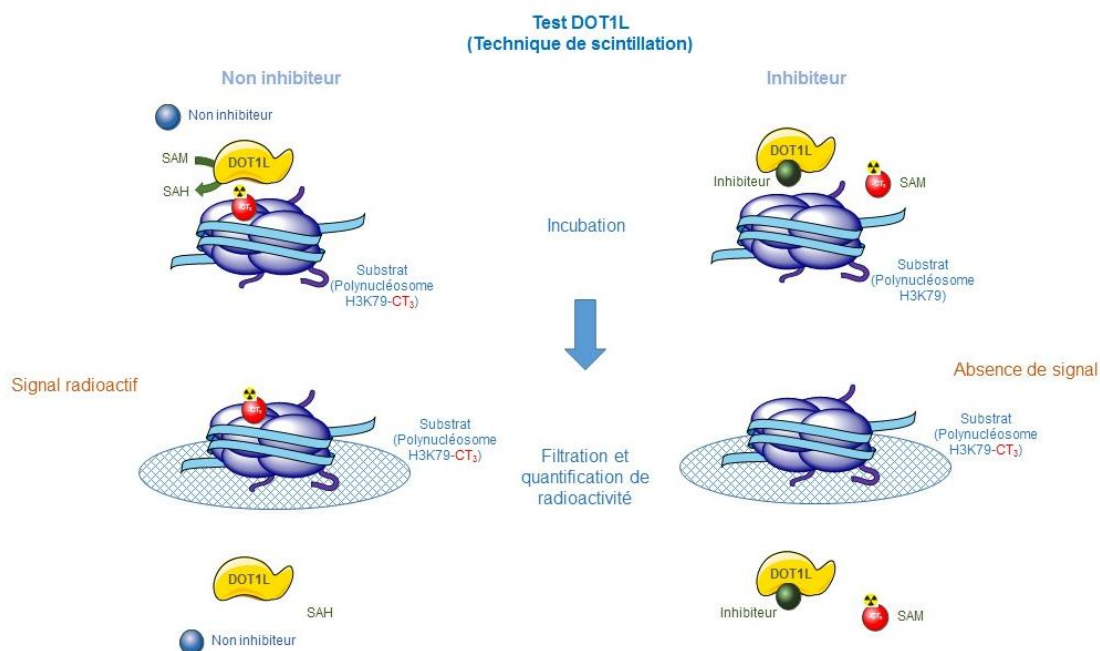


Figure 4.1. Test d'inhibition de DOT1L par scintillation (*Scintillation Proximity Assay, SPA*)

4.1.2 Etude de modélisation moléculaire sur DOT1L

Des études de modélisation moléculaire sur DOT1L (réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. L. Domínguez-Ramírez, *Universidad de las Américas Puebla* (UDLAP, Mexique) ont guidé les différentes pharmacomodulations entreprises sur les séries développées.

Nous avons validé la méthode utilisée (méthode AMBER, considérant la flexibilité de la protéine) via la modélisation moléculaire du SAM dans la structure résolue du co-cristal DOT1L-SAM (PDB : 3QOW) (**figure 4.2**).

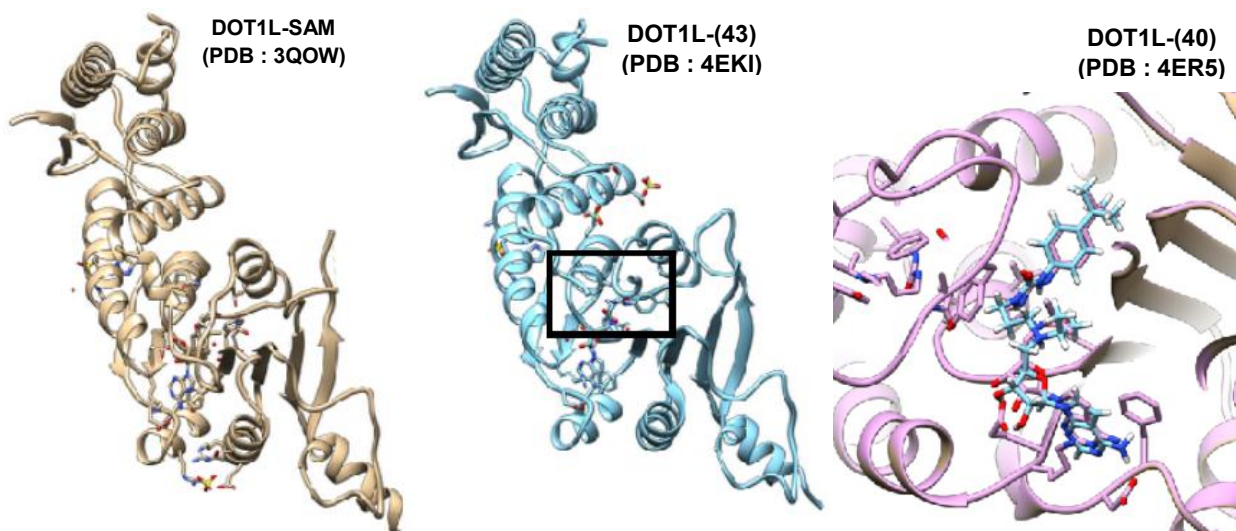


Figure 4.2. Structures des cristaux de A) DOT1L-SAM (PDB : 3QOW) et B) DOT1L-EPZ004777 (43) (PDB : 4EKI), et C) superposition de (43) du cristal 4ER5 (en rose) et le résultat de modélisation moléculaire (couleurs CPK) par notre méthode (AMBER). Les ligands sont bien définis dans les structures. B) montre une région non résolue dans la partie supérieure du site de liaison (signalée avec un carré).

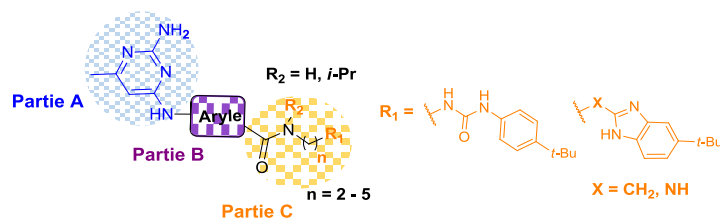
Etant donné que le co-cristal DOT1L-EPZ004777 (**43**) (PDB : 4EKI) présente une région non résolue adjacente au site de liaison à l'enzyme (**figure 4.2-B**), nous avons utilisé le co-cristal de DOT1L avec deux molécules d'EPZ004777 (**43**) (PDB : 4ER5) (**figure 4.2-C**). Ce co-cristal est complètement résolu et nous pouvons explorer le site de liaison secondaire. D'ailleurs, nous avons pu prendre en compte le changement conformationnel de l'enzyme[130–132] (observé dans la structure 4ER5 et absent dans la structure 3QOW)[117] pour accueillir le motif *tert*-butylphényle de l'inhibiteur (**43**), que nous avons gardé dans nos structures.

4.1.3 Evaluation de l'activité sur DOT1L

L'activité de tous les composés cibles synthétisés au cours de ce travail a été déterminée pour DOT1L à une concentration de 32 μM et, pour certains composés, à une concentration de 10 μM , afin de déterminer les premières relations structure-activité (RSA).

Tout d'abord, les précurseurs comportant uniquement la **partie A** (noyau aminopyrimidine) et la **partie B** (phényle ou hétérocycle) ont été testés sur DOT1L (**tableau 4.1**).

Tableau 4.1. Activité des précurseurs (partie A + partie B) sur DOT1L



Entrée	Composé	Inhibition à 32 μ M (%) ^a	
		R ₃ = H	R ₃ = OH
1		ALIPF193 : 0	ALIPF196 : 0
2		ALIPF208 : 0	ALIPF223 : ND
3		NS	ALIPF174 : 0
4		ALIPF240 : 0	NS
5		ALIPF246 : 0	NS

ND : Non déterminé. NS : Non synthétisé. ^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

Comme attendu, aucune activité inhibitrice n'a été observée. La présence du motif aminopyrimidine (**partie A**) substituant le phényle ou l'hétérocycle central (**partie B**) porteur d'un acide, d'un alcool ou d'un ester (**tableau 4.1, entrées 1 à 3**) ne semble pas suffisante pour inhiber l'enzyme. C'est également le cas lorsqu'une chaîne de type amine ou carbamate a été introduite (**tableau 4.1, entrées 4 et 5**).

Nous avons ensuite déterminé l'activité de la série de molécules cibles comportant un phényle comme **partie B** lié à la **partie C** via un linker de type amide secondaire (**tableau 4.2**). La **partie C** comprend une *tert*-butylphénylurée ou son bioisostère le 2-amino-*tert*-butylbenzimidazole. Nous avons également évalué le remplacement du groupement amino en position 2 du benzimidazole par un groupement méthylène. Ce groupement compense la longueur de la liaison quand la fonction NH est éliminée.

Tableau 4.2. Activité sur DOT1L de la série des amides secondaires de type benzénique

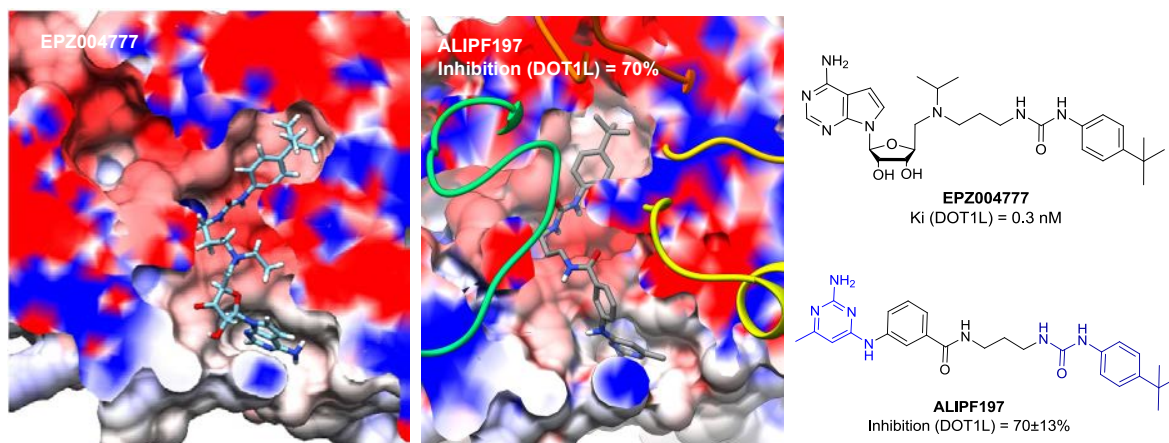
Entrée	Composé	R ₁	n	Inhibition à 32 μM (%) ^a
1	ALIPF194		2	1±18
2	ALIPF197		3	70±13
3	ALIPF201		2	43±1
4	ALIPF200		3	58±1
5	ALIPF242		4	20±15
6	ALIPF244		2	11±8
7	ALIPF292		3	37±2

^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

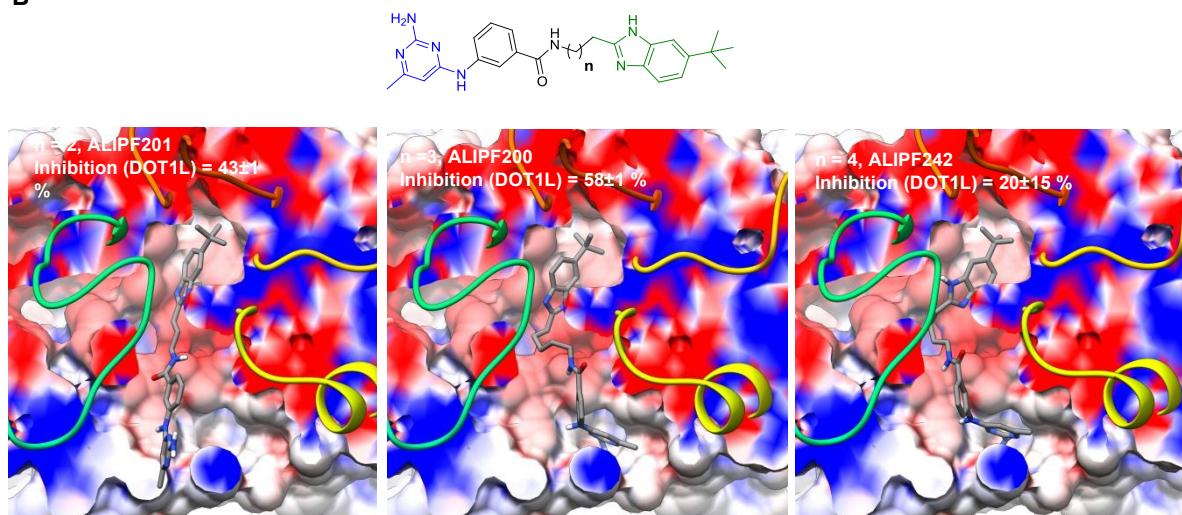
Une longueur optimale de 3 méthylènes séparant la **partie B** et la **partie C** a été déterminée (**tableau 4.2, entrées 2 et 4**). Le 2-aminobenzimidazole semble adopter une conformation moins flexible que le 2-alkylbenzimidazole et que la phénylurée, conduisant à un mauvais positionnement dans le site catalytique de l'enzyme, ce qui expliquerait une diminution d'activité (**tableau 4.2, entrée 7**).

L'étude de modélisation moléculaire montre que le composé de type *tert*-butylphénylurée **ALIPF197** (n = 3) et le composé de type *tert*-butylbenzimidazole **ALIPF200** (n = 3) présentent la même orientation au sein du site catalytique de DOT1L que l'inhibiteur de référence **EPZ004777** (**40**). Cette étude montre également que lorsque la **partie B** est liée à la **partie C** par une chaîne plus ou moins longue (**ALIPF201**, n = 2 ou **ALIPF242**, n = 4), la molécule montre un mauvais positionnement et peu d'interactions dans le site catalytique causant une diminution d'activité (**figure 4.3**).

A



B



C

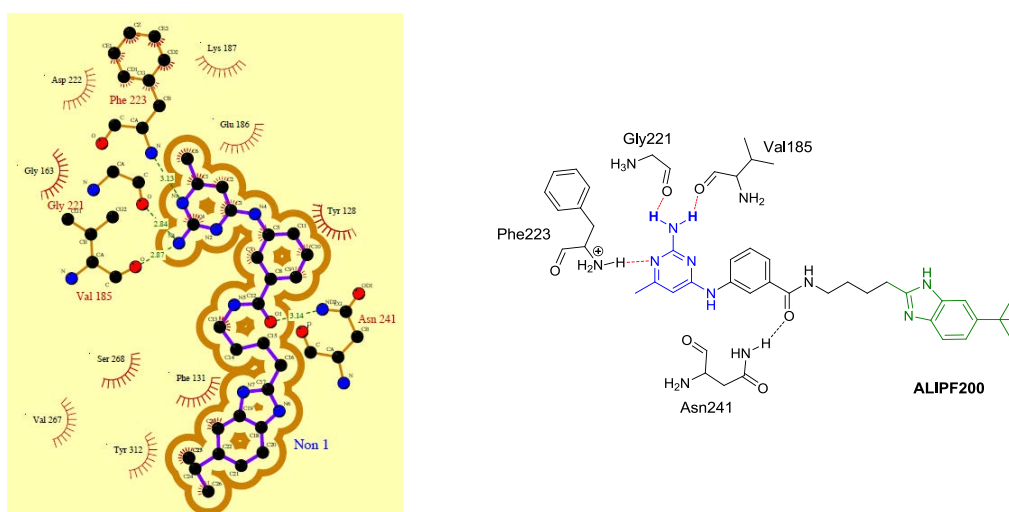
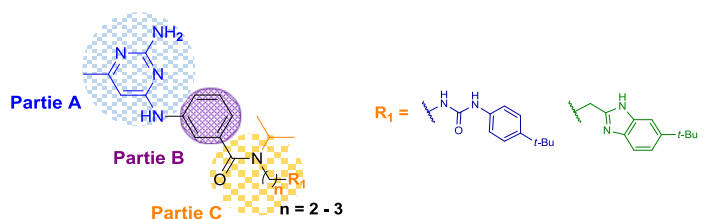
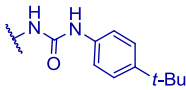
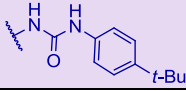
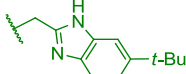


Figure 4.3. Images de modélisation moléculaire des inhibiteurs au site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5). A) Comparaison des dockings d'EPZ004777 (43) et du composé ALIPF197. B) Comparaison des images de modélisation moléculaire des composés ALIPF201, ALIPF200 et ALIPF242. Les pourcentages d'inhibition correspondent à une concentration de 32 μ M des composés testés. C) Interactions d'ALIPF200 dans le site catalytique de DOT1L.

D'autre part, nous avons évalué la substitution de l'amide par un groupement isopropyle (**tableau 4.3**).

Tableau 4.3. Activité sur DOT1L de la série des amides tertiaires de type benzénique



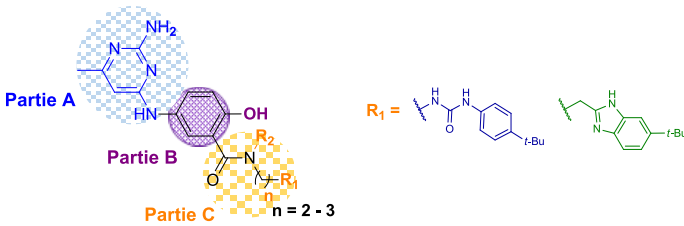
Entrée	Composé	R ₁	n	Inhibition à 32 µM (%) ^a
1	ALIPF198		2	28±1
2	ALIPF199		3	69
3	ALIPF211		3	21±14

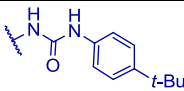
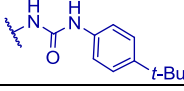
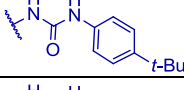
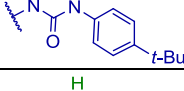
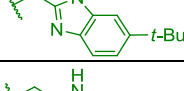
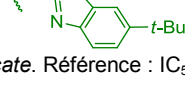
^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

Le groupement isopropyle ne semble pas contribuer à l'activité sur DOT1L pour la série de composés de type phénylurée. En effet, l'amide tertiaire **ALIPF199** présente une activité comparable (69 %) (**tableau 4.3, entrée 2**) que son analogue amide secondaire **ALIPF197** (70±13 %) (**tableau 4.2, entrée 2**). Par contre, pour la série de type benzimidazole, la substitution de l'amide affecte négativement l'activité sur l'enzyme : l'amide tertiaire **ALIPF211** (**tableau 4.3, entrée 3**) montre une activité inférieure (21±14 %) à celle de son analogue de type amide secondaire **ALIPF200** (58±1 %) (**tableau 4.2, entrée 4**).

Ensuite, le rôle d'un groupement hydroxyle sur le noyau benzénique (**partie B**) a été évalué (**tableau 4.4**).

Tableau 4.4. Activité sur DOT1L de la série de type phénolique



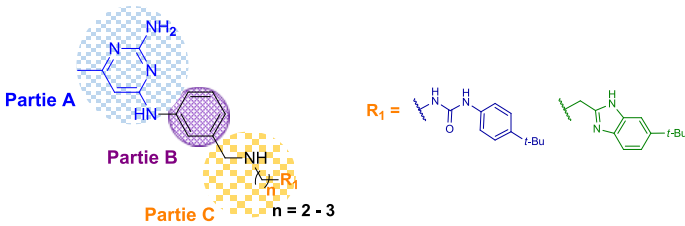
Entrée	Composé	R ₁	R ₂	n	Inhibition à 32 μM (%) ^a
1	ALIPF205		H	2	20±5
2	ALIPF202		<i>i</i> -Pr	2	24±3
3	ALIPF229		H	3	10±4
4	ALIPF207		<i>i</i> -Pr	3	15±2
5	ALIPF203		H	2	19±1
6	ALIPF213		H	3	46±8

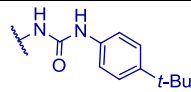
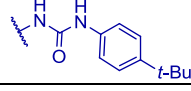
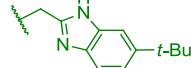
^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

Il a été observé que l'absence du groupement hydroxyle favorise l'activité sur DOT1L, quelle que soit la substitution de l'amide ou la nature de la chaîne latérale (**partie C**, *tert*-butylphénylurée ou *tert*-butylbenzimidazole).

Nous avons également évalué l'importance de la fonction amide en tant que *linker* entre les **parties B** et **C**. Des amines secondaires ont donc été évaluées (**tableau 4.5**).

Tableau 4.5. Activité sur DOT1L de la série de type amine



Entrée	Composé	R ₁	n	Inhibition à 32 µM (%) ^a
1	ALIPF206		2	23±2
2	ALIPF220		3	5±13
3	ALIPF222		3	0

^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

L'absence du carbonyle de l'amide implique une augmentation du degré de liberté de la molécule, ce qui pourrait contribuer à un mauvais positionnement dans le site catalytique de DOT1L comme suggère la modélisation moléculaire (**figure 4.4**). D'ailleurs ceci entraîne une diminution d'activité sur l'enzyme : **ALIPF220** (5±13 %) versus **ALIPF197** (70±13 %).

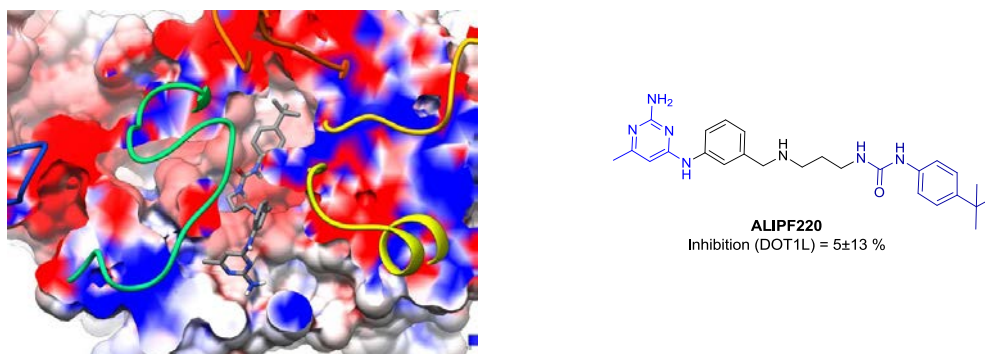
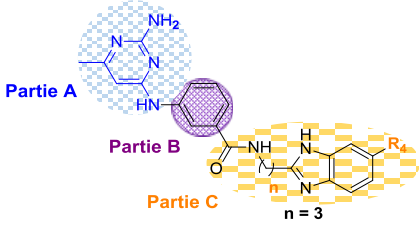


Figure 4.4. Modélisation moléculaire d'ALIPF220 dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5). Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 µM du composé testé.

D'autre part, le rôle du groupement *tert*-butyle sur le benzimidazole (**partie C**) a été évalué (**tableau 4.6**).

Tableau 4.6. Activité sur DOT1L de la série de type benzimidazole



Entrée	Composé	R ₄	Inhibition à 32 μM (%) ^a
1	ALIPF277	H	0
2	ALIPF200	<i>t</i> -Bu	58±1
3	ALIPF295	OCH ₃	0
4	ALIPF297	Cl	0
5	ALIPF293	CF ₃	0

^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

La présence du groupement *tert*-butyle sur le benzimidazole serait essentielle pour l'activité sur DOT1L (tableau 4.6, entrée 2). Lorsque ce groupement est éliminé (tableau 4.6, entrée 1) ou remplacé par d'autres groupements, activateurs ou désactivateurs, plus ou moins encombrants (tableau 4.6, entrées 3-5) l'activité sur DOT1L diminue complètement. Le groupement *tert*-butyle serait suffisamment volumineux pour interagir avec la poche hydrophobe du site catalytique de DOT1L (figure 4.5).

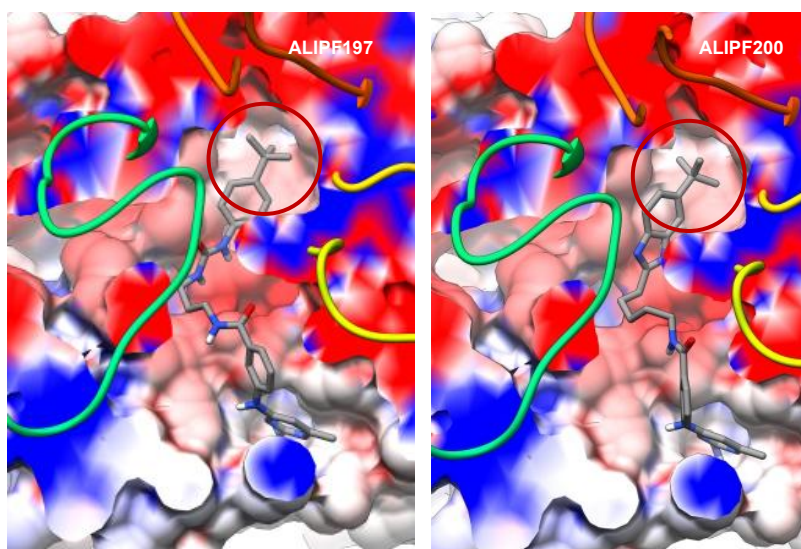


Figure 4.5. Modélisation moléculaire d'ALIPF197 et ALIPF200 dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5). Leur groupement *tert*-butylphényle (cercles rouges) est suffisamment volumineux pour interagir avec la poche hydrophobe (surface blanche) du site catalytique de DOT1L.

D'autre part, le remplacement du noyau aminopyrimidine de nos inhibiteurs par un noyau triazinique conduit à une perte complète de l'activité sur l'enzyme. La modélisation moléculaire de la triazine ALIPF233 au sein de DOT1L montre une orientation complètement opposée à celle de son analogue aminopyrimidine ALIPF197 (figure 4.6). Les interactions du composé triazinique seraient plus faibles, et le cofacteur SAM pourrait donc le déplacer du site d'interaction.

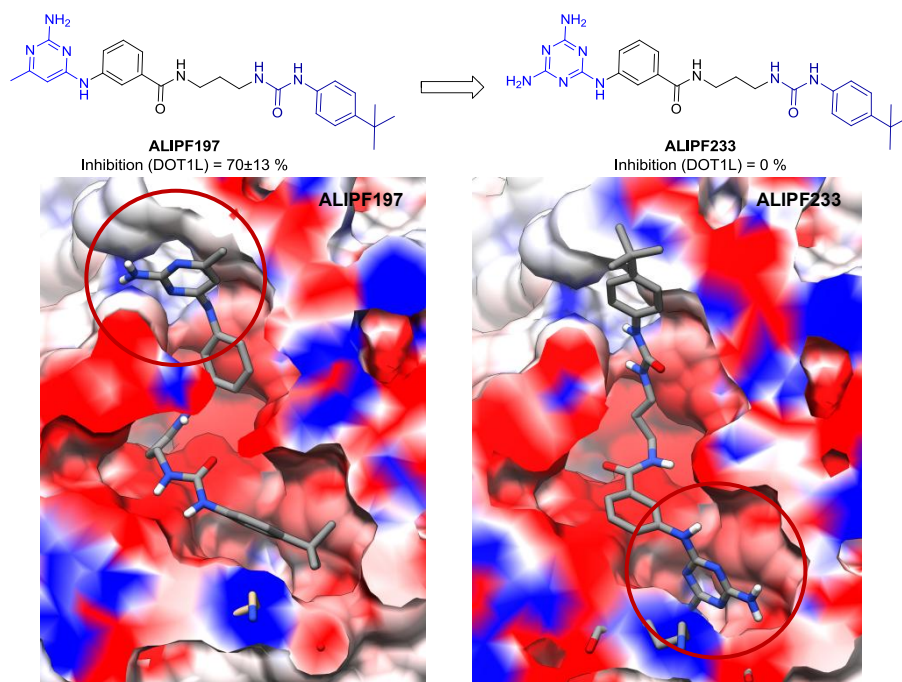
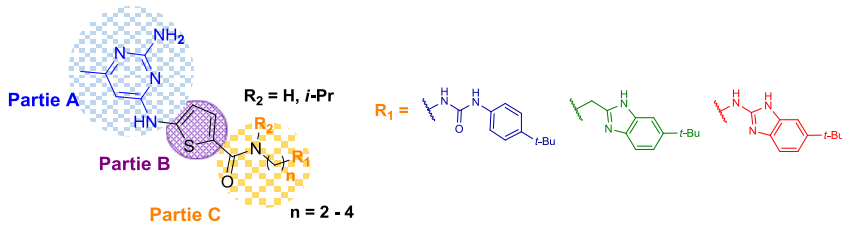
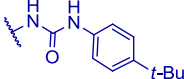
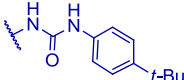
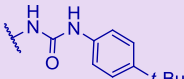
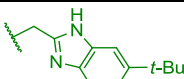
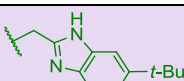
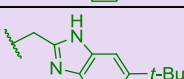
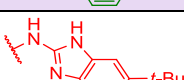


Figure 4.6. Remplacement du motif aminopyrimidine par un motif diaminotriazine. La triazine **ALIPF233** montre une orientation complètement opposée à celle de son analogue **ALIPF197** au sein du site catalytique de DOT1L (3QOW). Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μM des composés testés.

La **partie B** des composés a été modulée. Le phényle des structures des séries précédentes a été remplacé par un hétérocycle à 5 sommets, le thiophène (**tableau 4.7**).

Tableau 4.7. Activité sur DOT1L de la série des composés de type thiophénique



Entrée	Composé	R ₁	R ₂	n	Inhibition à 32 μM (%) ^a
1	ALIPF287		H	2	8±4
2	ALIPF308		H	3	32±8
3	ALIPF281		<i>i</i> -Pr	3	71±3
4	ALIPF276		H	2	5±3
5	ALIPF282		H	3	74±16
6	ALIPF291		H	4	88±1
7	ALIPF303		H	3	51±2

ND : non déterminée. ^a Les tests ont été réalisés en *duplicate*. Référence : IC₅₀ (SAH) = 240 ± 26 nM.

Cette modulation sur la **partie B** a conduit à une augmentation de l'inhibition. Nous constatons qu'une longueur comprise entre 3 et 4 méthylènes semble optimale pour la chaîne liant la **partie B** et la **partie C** des composés (**tableau 4.7, entrées 3, 5, 6**). La modélisation moléculaire montre que le motif aminopyrimidine de la phénylurée **ALIPF281** et du benzimidazole **ALIPF282** est bien positionné dans une poche hydrophobe du site catalytique de DOT1L, comparés à leurs analogues respectifs de type benzénique **ALIPF199** et **ALIPF200** (**figure 4.7**).

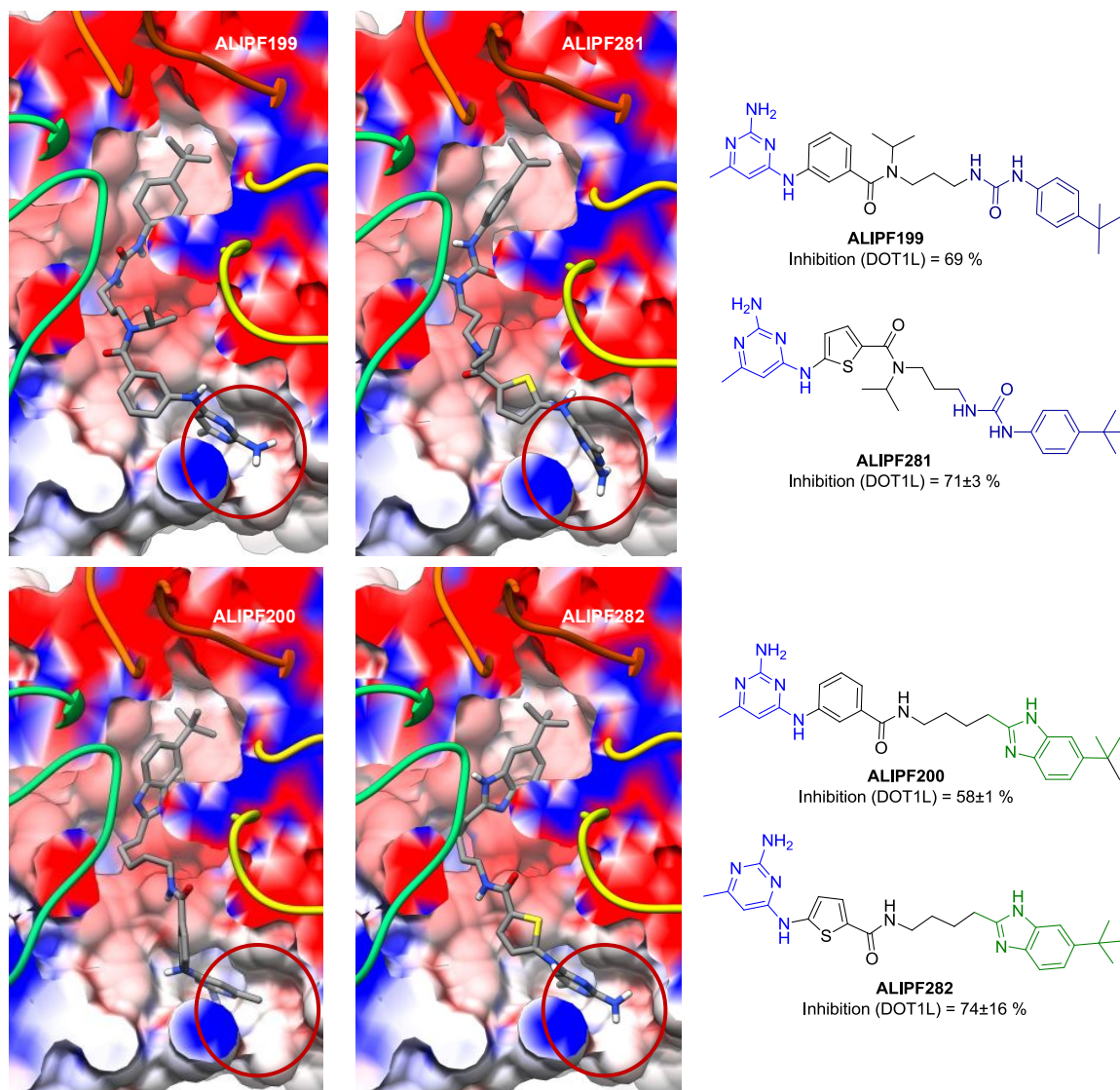


Figure 4.7. Modélisation moléculaire du composé ALIPF282 dans le site catalytique de DOT1L (PDB : 4ER5). Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μM des composés testés.

Il semblerait que le thiophène confère une géométrie aux composés et permet au motif aminopyrimidine de se positionner complètement dans une poche hydrophobe du site catalytique. L'homologation de la chaîne favoriserait l'ancrage du motif aminopyrimidine dans cette poche hydrophobe ce qui permet d'ailleurs d'augmenter l'activité sur DOT1L : **ALIPF282** (n = 3) (74±16 %) versus **ALIPF291** (n = 4) (88±1 %) (tableau 4.7, entrée 6).

Les résultats de l'activité inhibitrice sur DOT1L par les composés cibles synthétisés sont présentés dans la (figure 4.8).

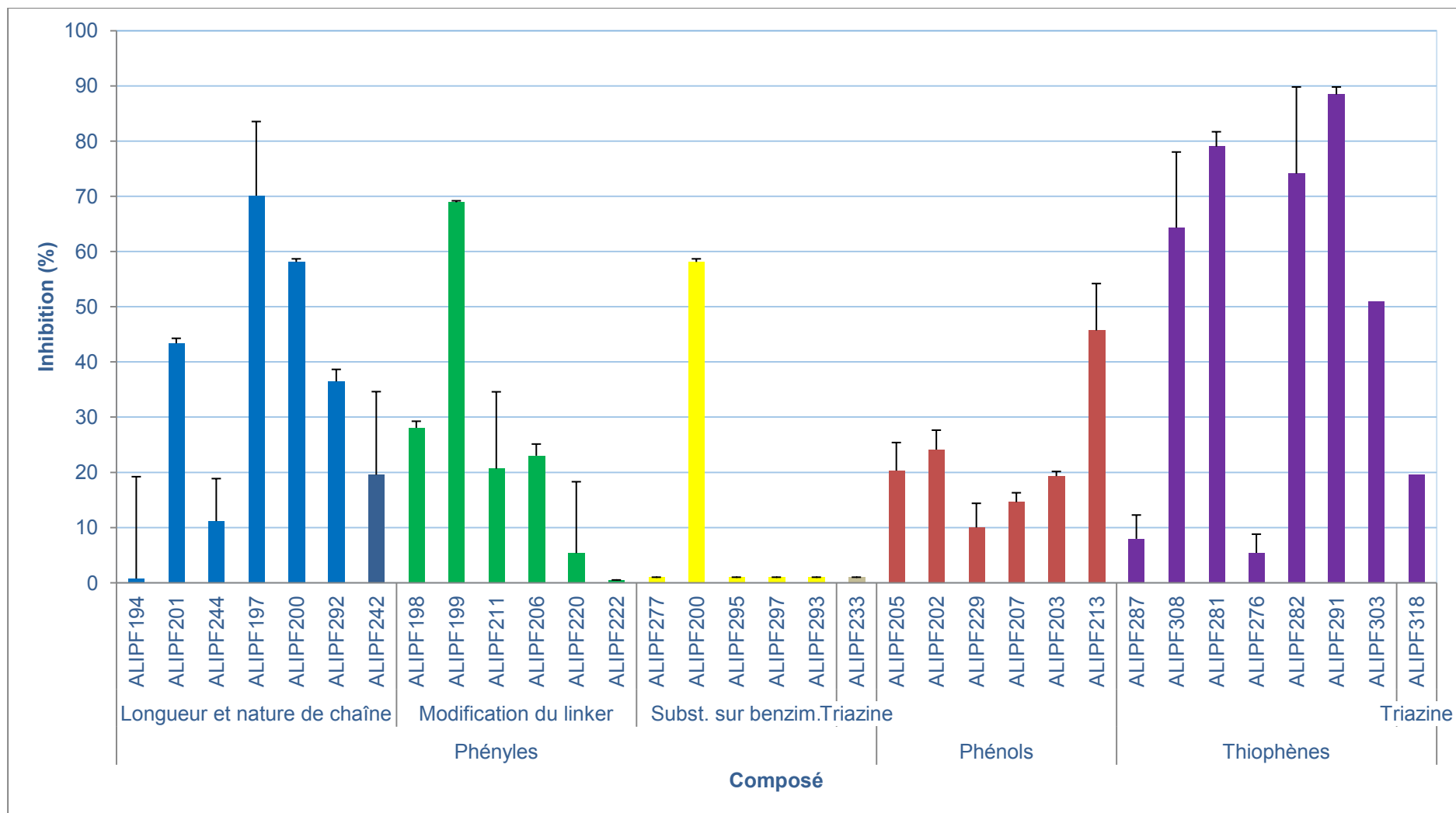


Figure 4.8. Inhibition de DOT1L par les composés synthésés modifiant la nature de la partie A et de la partie B, ainsi que la longueur et la nature de la chaîne liant la partie B et la partie C. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μM du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*. La valeur correspond à la moyenne \pm écart type.

Ces premiers résultats nous ont permis d'identifier des motifs structuraux qui devraient être conservés pour le développement de nouveaux inhibiteurs de DOT1L non nucléosidiques (**figure 4.9**) : le motif aminopyrimidine, un thiophène, un amide liant cet hétérocycle à une chaîne de 3 à 4 méthylènes porteuse d'un *tert*-butylphénylurée ou d'un *tert*-butyl-2-alkyl-benzimidazole.

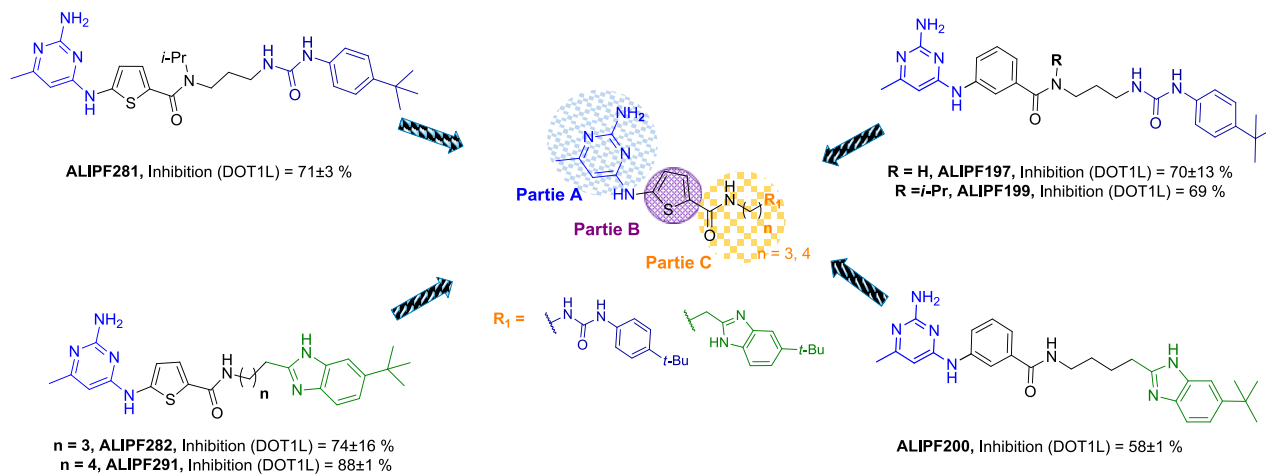


Figure 4.9. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs non nucléosidiques de DOT1L

L'activité à une concentration de 10 μ M a donc été déterminée pour les composés présentant une activité supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M (**figure 4.10**).

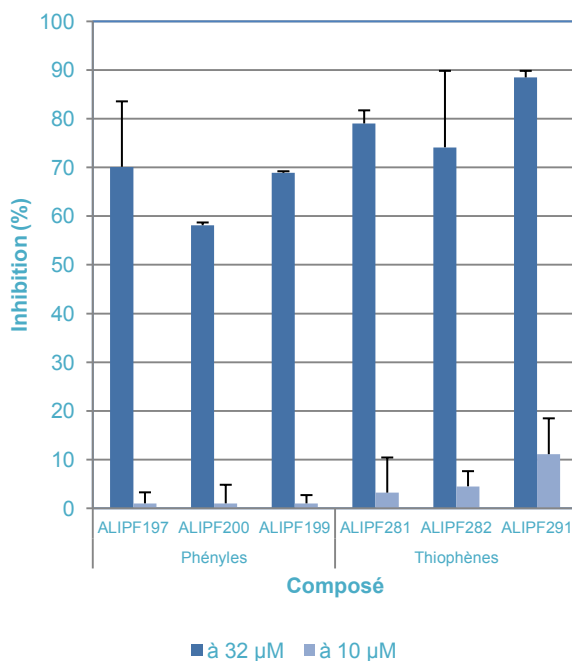


Figure 4.10. Inhibition de DOT1L. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μ M (bleu clair) et de 10 μ M (bleu foncé) du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*. La valeur correspond à la moyenne \pm écart type.

4.1.4 Relation entre l'hydrophobicité des composés et leur activité

Afin de connaître l'hydrophobicité des composés synthétisés, le log P a été calculé pour chaque composé. Les valeurs données correspondent à la moyenne des clogP obtenus par différents logiciels : XlogP (*CDK - Chemistry Development Kit*), ClogP (*DataWarrior*), AlogP (*PipelinePilot - Biovia Dassault Systems*), logP (*AB/LogP v2.0*), LogP (*ACD/Labs*) (c.f. partie expérimentale).

Le clogP des composés actifs et non actifs (à une concentration de 32 μ M) sur DOT1L est compris entre 4 et 5,5 (**figure 4.11**). Nous pouvons donc conclure que l'activité sur l'enzyme ne montre pas de relation directe avec l'hydrophobicité des produits testés et ces activités proviennent bien d'une interaction plus ou moins importante de nos composés avec le site actif.

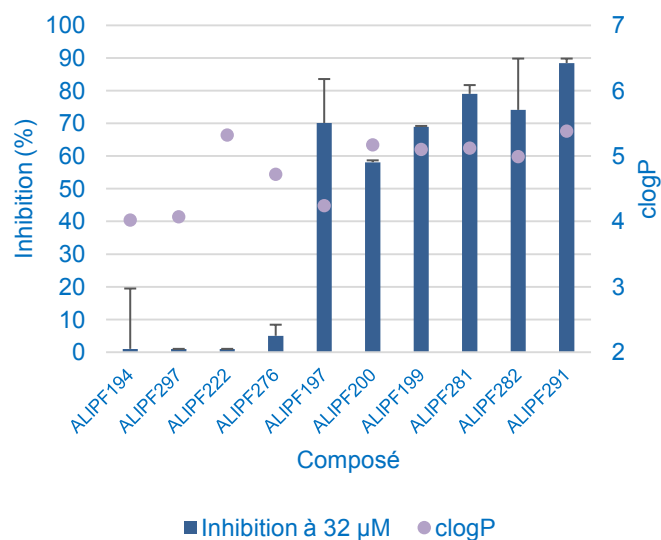


Figure 4.11. cLogP des composés montrant une activité < 5 % et > 50 % sur DOT1L à une concentration de 32 μ M. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μ M du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*. La valeur correspond à la moyenne \pm écart type.

4.1.5 Pharmacomodulations proposées

A partir de ces résultats préliminaires, des fonctions chimiques essentielles seront conservées et des pharmacomodulations seront entreprises. La chaîne latérale de type *tert*-butylphénylurée ou *tert*-butyl-2-alkylbenzimidazole sera conservée avec un certain degré de liberté $(-\text{CH}_2)_n$, $n = 3, 4$. D'après les études de modélisation moléculaire, la flexibilité de la chaîne permettra aux composés de mieux interagir dans la poche hydrophobe de l'enzyme (partie inférieure du site de liaison, **figure 4.12**) via son motif aminopyrimidine (**partie A**). Des pharmacomodulations autour de la **partie A** pourraient être entreprises pour explorer davantage cette poche hydrophobe. Ainsi, l'introduction des substituants sur le N^2 ou le N^4 du motif aminopyrimidine, ainsi que la distance entre la **partie A** et la **partie B** pourraient être évaluées. Ces modifications permettraient de mieux positionner le motif aminopyrimidine dans la poche

hydrophobe tout en augmentant les interactions hydrophobes au sein du site catalytique. Nous allons également remplacer le thiophène par un autre hétérocycle.

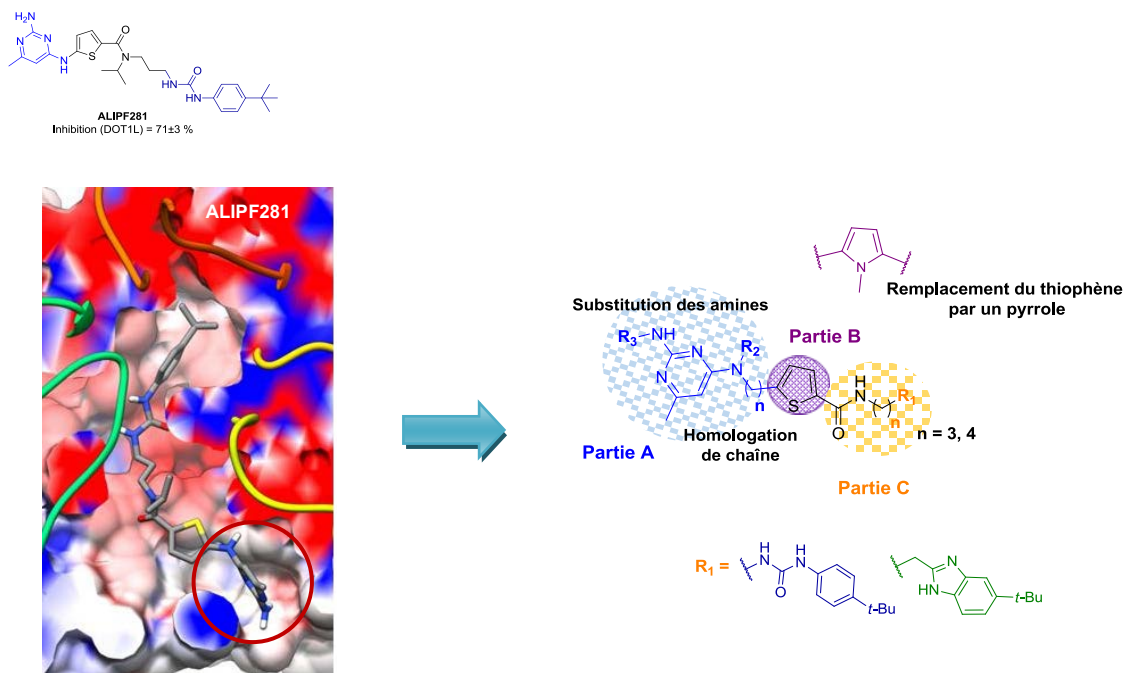


Figure 4.12. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique

4.2 Evaluation de l'activité sur DNMT

Etant donné que la conception de nos molécules est basée en partie sur l'inhibiteur de DNMT SGI-1027 (**17**), nous avons déterminé l'activité des tous les composés synthétisés vis-à-vis de DNMT3a. J'ai pu réaliser une partie de ces tests à l'unité CNRS FRE3600 *Epigenetic Targeting of Cancer* (ETaC) à Toulouse.

4.2.1 Principe du test d'activité sur DNMT

Le test d'inhibition de la méthylation de l'ADN est basé sur la détection de la perte de fluorescence après clivage d'un duplexe d'ADN fluoromarkée par une endonucléase de restriction (HpyCH4IV) sensible à la méthylation. Cette enzyme de restriction est uniquement active lorsque le substrat n'est pas méthylé au niveau du site CpG présent sur le site spécifique de reconnaissance. Lorsque l'incubation se fait en présence d'un inhibiteur, le site CpG n'est pas méthylé, et l'ADN est donc clivé par l'enzyme de restriction : le signal de fluorescence est perdu (**figure 4.13**). [64,185] Pour ces tests, le composé pris comme référence est le **SGI-1027** ($EC_{50} = 0,8 \mu\text{M} \pm 0,2$).

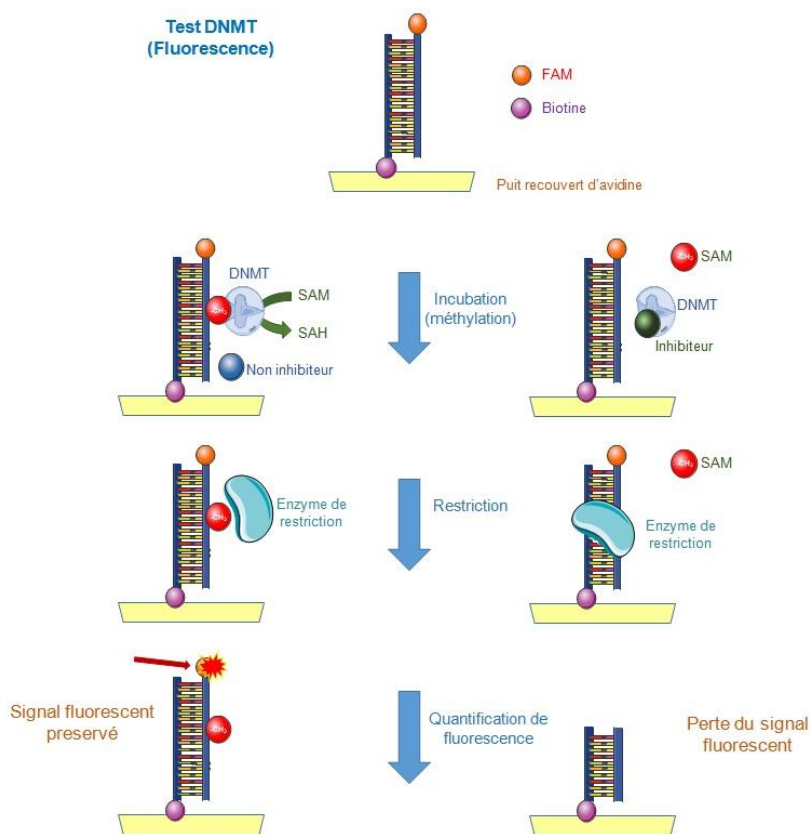


Figure 4.13. Principe du test d'inhibition de DNMT3a par fluorescence

4.2.2 Résultats et discussion de l'activité sur DNMT

L'activité de tous les composés synthétisés au cours de ce travail a été déterminée pour la DNMT à une concentration de 100 μM et 32 μM (figure 4.14).

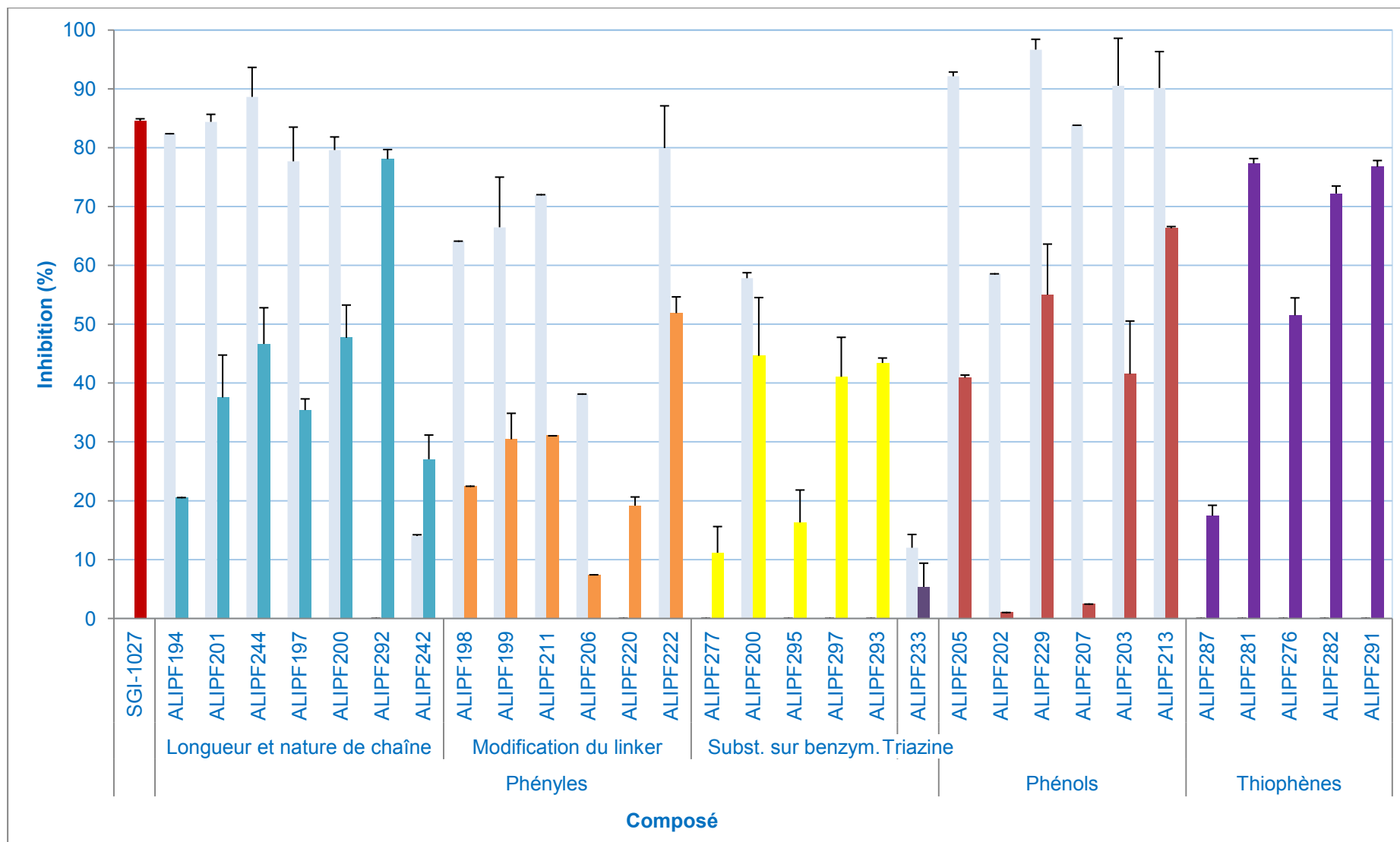


Figure 4.14. Inhibition de DNMT par les composés synthésés. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 100 µM (bleu clair) et 32 µM (différentes couleurs) du composé testé. Les tests ont été réalisés en duplicata. La valeur correspond à la moyenne ± écart type.

Parmi les composés de type benzénique, les composés possédant une chaîne à 3 méthylènes ($n = 3$) liant la **partie B** et la **partie C** montrent un pourcentage d'inhibition plus important que leurs analogues avec une chaîne de longueur inférieure ($n = 2$) (**figure 4.15**).

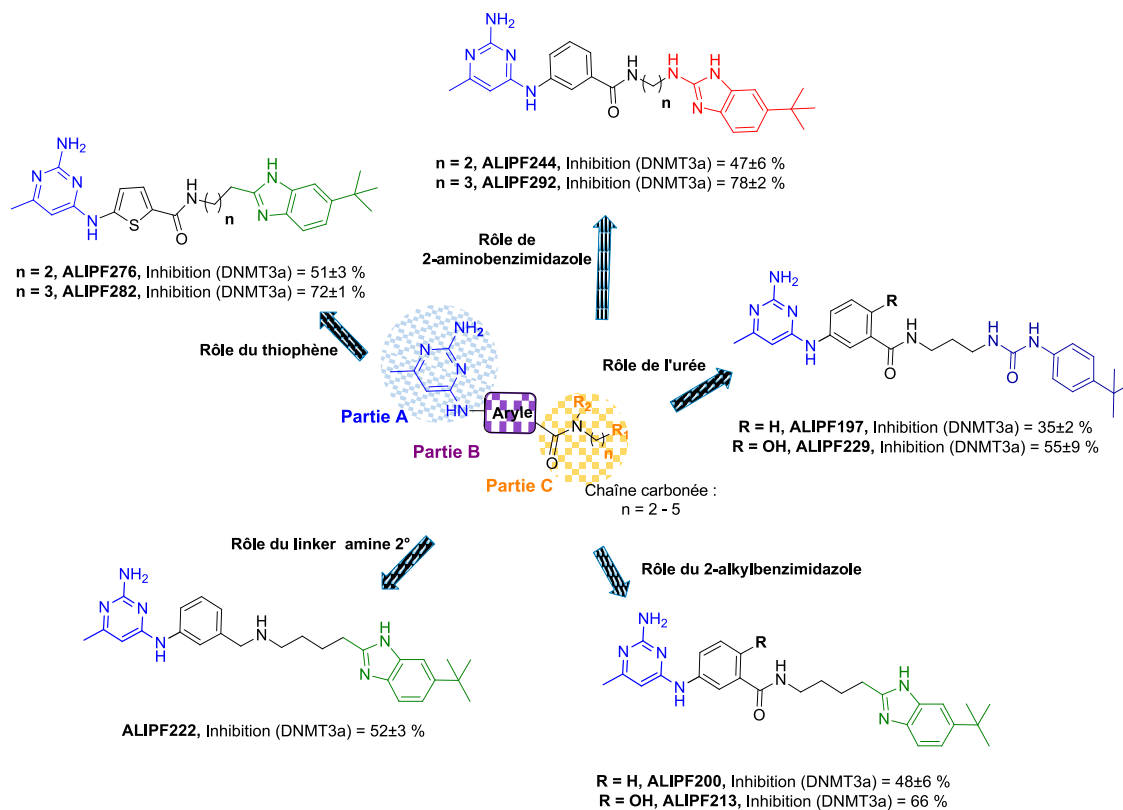


Figure 4.15. Etude des composés montrant une inhibition de DNMT supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M

Concernant les composés possédant un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % à 32 μ M, le composé **ALIPF292** montre le pourcentage d'inhibition le plus important (78 ± 2 %). Son analogue inférieur (**ALIPF244**) montre une inhibition de 47 ± 6 %.

Parmi les composés de type benzénique dépourvus d'un groupement $-OH$ sur l'aryle (**partie B**), une chaîne latérale porteuse d'un benzimidazole semble avoir un effet positif pour l'activité sur DNMT3a. Le benzimidazole **ALIPF292** montre une activité supérieure (78 ± 2 %) à celle de son analogue de type phénylurée **ALIPF197** (35 ± 2 %). Néanmoins, lorsqu'un groupement hydroxyle est introduit sur l'aryle (**partie B**), l'activité sur l'enzyme est améliorée pour les composés tant de type phénylurée que de type benzimidazole : **ALIPF229** (55 ± 9 %) versus **ALIPF197** (35 ± 2 %) et **ALIPF213** (66 %) versus **ALIPF200** (48 ± 6 %). En effet, d'après une étude d'alignement au sein du site catalytique de DNMT, le phénol serait impliqué dans une liaison hydrogène supplémentaire dans le site catalytique de DNMT (**figure 4.16**).

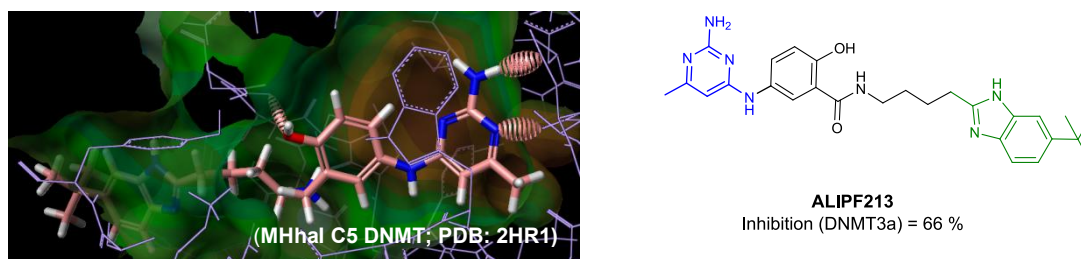


Figure 4.16. Alignement d'ALIPF213 au sein de DNMT (PDB : 2HR1). Le phénol serait impliqué dans une liaison hydrogène au sein du site catalytique de DNMT.

Lorsque le linker amide est remplacé par une amine secondaire, nous n'avons pas observé une activité inhibitrice des composés significativement supérieure : **ALIPF222** (52 ± 3 %) versus **ALIPF200** (48 ± 6 %) (**figure 4.15**).

Nous avons ensuite évalué l'importance du substituant sur le benzimidazole et nous avons constaté une activité du même ordre pour les analogues possédant un *tert*-butyle (**ALIPF200**, 48 ± 6 %), un $-\text{CF}_3$ (**ALIPF293**, 43 ± 1 %) et un $-\text{Cl}$ (**ALIPF297**, 41 ± 7 %).

D'autre part, les composés de type thiophénique montrent une activité comparable, parfois supérieure, que leurs analogues benzéniques à une concentration de $32 \mu\text{M}$. Par exemple, le composé thiophénique **ALIPF282** (72 ± 1 %) versus le composé benzylque **ALIPF292** (78 ± 2 %).

L'analyse de l'activité des dérivés thiophéniques montre l'importance d'une chaîne de 3 méthylènes liant les **parties B et C** : **ALIPF282** (72 ± 1 %) versus **ALIPF276** (51 ± 3 %), à $32 \mu\text{M}$.

A partir de ces résultats nous avons identifié des motifs structuraux à conserver pour le développement des inhibiteurs de DNMT (**figure 4.17**) : le motif aminopyrimidine, un thiophène ou un phénol, un amide liant cet hétérocycle à une chaîne de 3 méthylènes porteuse d'une phénylurée ou d'un benzimidazole. La phénylurée et le benzimidazole peut avoir un groupement volumineux comme un groupement *tert*-butyle ou trifluorométhyle

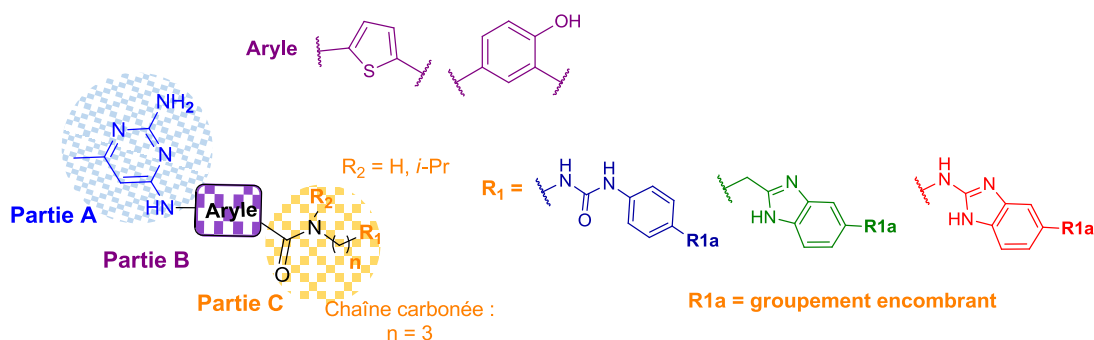


Figure 4.17. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs de DNMT

L'activité à une concentration de $10 \mu\text{M}$ a été déterminée pour les composés présentant une activité supérieure à 50 % à une concentration de $32 \mu\text{M}$ (**figure 4.18**).

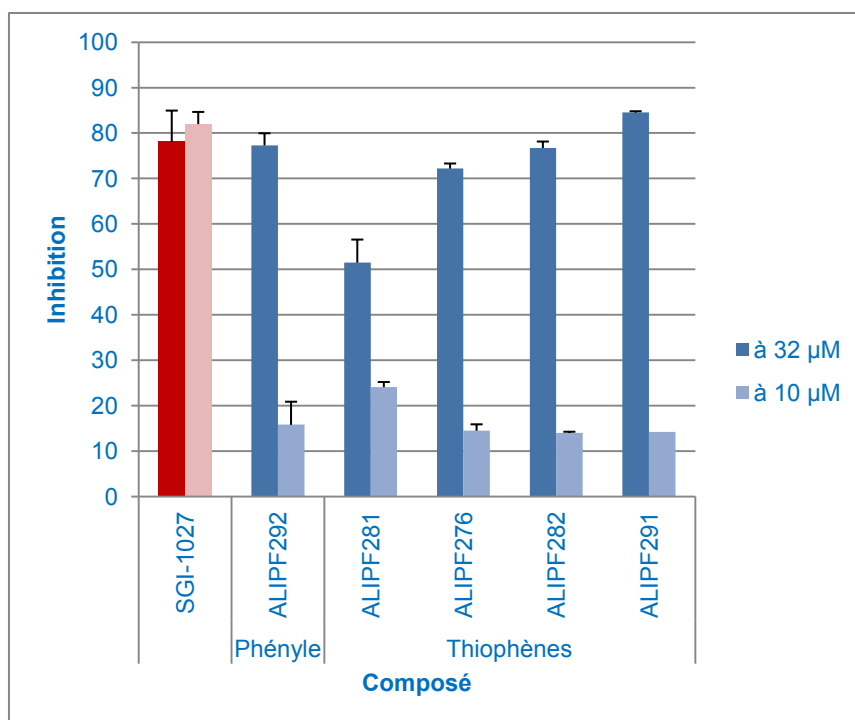


Figure 4.18. Inhibition de DNMT par les composés de type thiophénique. Le composé phényle **ALIPF292** est montré comme référence de la série benzénique. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μ M (bleu foncé) et de 10 μ M (bleu claire) du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*. La valeur correspond à la moyenne \pm écart type.

Etant donné la diminution de l'activité des composés à une concentration de 10 μ M, leurs structures seront optimisées. Ce travail d'optimisation nous permettra ensuite de réaliser sur les composés les plus prometteurs des tests de compétition avec le cofacteur SAM afin de valider le mécanisme d'inhibition de nos produits.

4.2.3 Relation entre l'hydrophobicité des composés et leur activité

Le $\log P$ des composés actifs et non actifs (à une concentration de 32 μ M) sur DNMT est compris entre 4 et 5,5 (**figure 4.19**). Nous observons que l'activité sur l'enzyme ne montre pas de relation directe avec l'hydrophobicité des produits testés ce qui signifie que ces activités proviennent d'une interaction plus ou moins importante de nos composés avec le site actif.

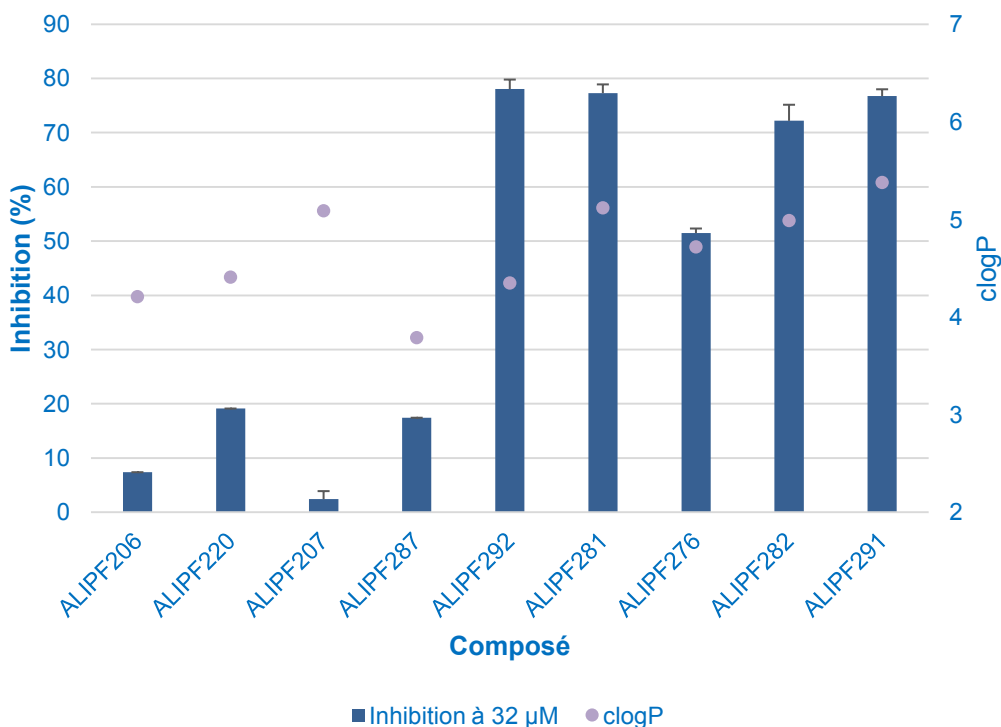


Figure 4.19. cLogP des composés montrant une activité < 20 % et > 50 % sur DNMT à une concentration de 32 µM. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 µM du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*. La valeur correspond à la moyenne ± écart type.

4.2.4 Pharmacomodulations proposées

Des pharmacomodulations autour des dérivés thiophéniques pourraient être entreprises. L'introduction d'un hydroxyle sur le thiophène (**partie B**) pourra être évaluée afin d'établir une liaison hydrogène supplémentaire dans le site catalytique de l'enzyme. La **partie A** pourra également être modulée. De ce fait, l'introduction des substituants sur le N^2 ou le N^4 du motif aminopyrimidine, ainsi que la distance entre la **partie A** et la **partie B** pourraient être modulées. L'aryle sera également remplacé par un autre hétérocycle.

(figure 4.20).

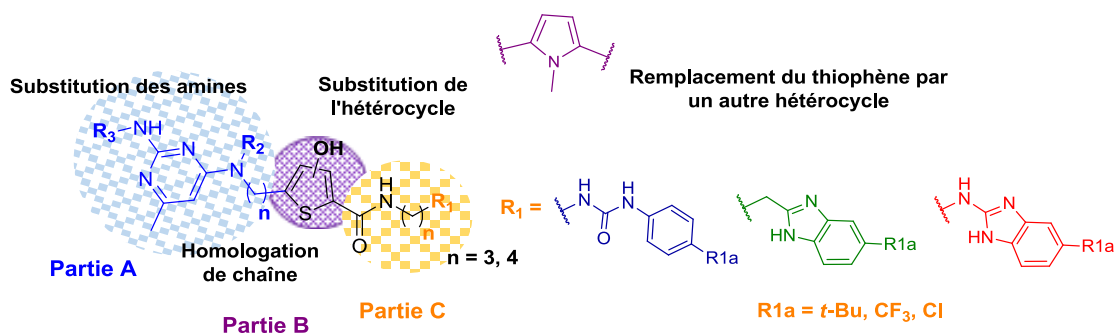


Figure 4.20. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique

4.3 Détermination de la spécificité des molécules vis-à-vis d'autres HMTs

Etant donné que la conception de nos molécules a pour but de mimer le cofacteur SAM, nous avons décidé de déterminer leur activité sur d'autres HMTs SAM dépendantes (EZH2, G9a, PRMT1, PRMT4 et PRMT5) et vérifier leur spécificité. Cette activité a été déterminée pour des composés représentatifs des séries développées. Ces tests ont été réalisés par la société Eurofins Cerep.

4.3.1 Principe du test d'activité sur des HMTs

L'activité sur d'autres HKMTs (EZH2, G9a) et d'autres PRMTs (PRMT1, PRMT4 et PRMT5) a été déterminée via la technique de scintillation expliquée dans la **section 4.1.1**. Le test sur EZH2 se fait avec le complexe PRC2, composé par EZH2, EED, SUZ12. Les données particulières à chaque test sont résumées dans le **tableau 4.8**. La SAH, inhibiteur commun aux différentes HMTs, est pris comme composé de référence.

Tableau 4.8. Conditions des tests enzymatiques sur des HMTs

Test	Source de protéine	Substrat, stimulus et/ou traceur	Incubation	Composant mesuré	Méthode de détection	Réf.
EZH2/EED/SUZ12 (<i>h</i>) (complexe PRC2)	recombinante humaine (cellules Sf9)	Histone 3 (50 nM)/ [³ H]SAM (350 nM)	120 min TA	Histone 3 méthylée	Scintillation	[110]
G9a (<i>h</i>)	recombinante humaine (<i>E. coli</i>)	Histone 3 (5 nM)/ [³ H]SAM (25 nM)	120 min TA	Histone 3 méthylée	Scintillation	[120]
PRMT1 (<i>h</i>)	recombinante humaine (<i>E. coli</i>)	Histone 4 (50 nM)/ [³ H]SAM (700 nM)	20 min TA	Histone 4 méthylée	Scintillation	[186]
PRMT4 (<i>h</i>)	recombinante humaine (cellules Sf9)	Histone 3 (25 nM)/ [³ H]SAM (60 nM)	60 min TA	Histone 3 méthylée	Scintillation	[84]
complex PRMT5 (<i>h</i>)	recombinante humaine (cellules Sf9)	Histone 4 (250 nM)/ [³ H]SAM (600 nM)	120 min TA	Histone 4 méthylée	Scintillation	[120]

h = humain

4.3.2 Résultats et discussion de l'activité sur d'autres HMTs

L'activité des composés représentatifs des séries développées a été déterminée sur un panel d'HMTs à une concentration de 32 µM (**figure 4.21**).

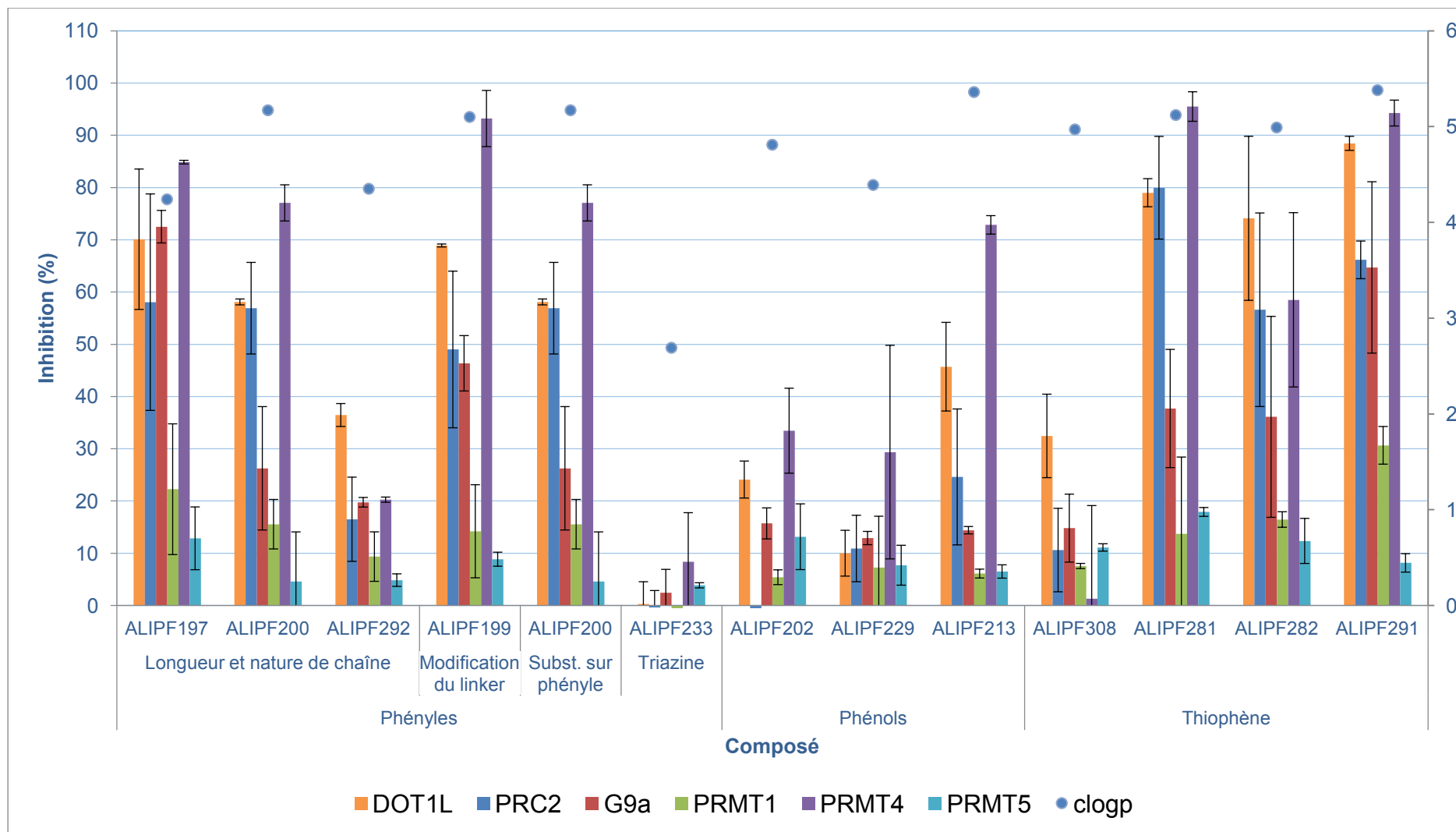


Figure 4.21. Inhibition d'un panel d'HMTs par les composés synthésisés. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μ M du composé testé. Les tests ont été réalisés en duplicate. La valeur correspond à la moyenne \pm écart type. La valeur de clogP est montrée par les cercles bleus.

Nous observons que l'activité des composés sur PRMT4 est comparable ou parfois supérieure à l'activité inhibitrice observée sur DOT1L, que ce soit sur la série de type benzénique ou sur la série de type thiophénique (**figure 4.22**).

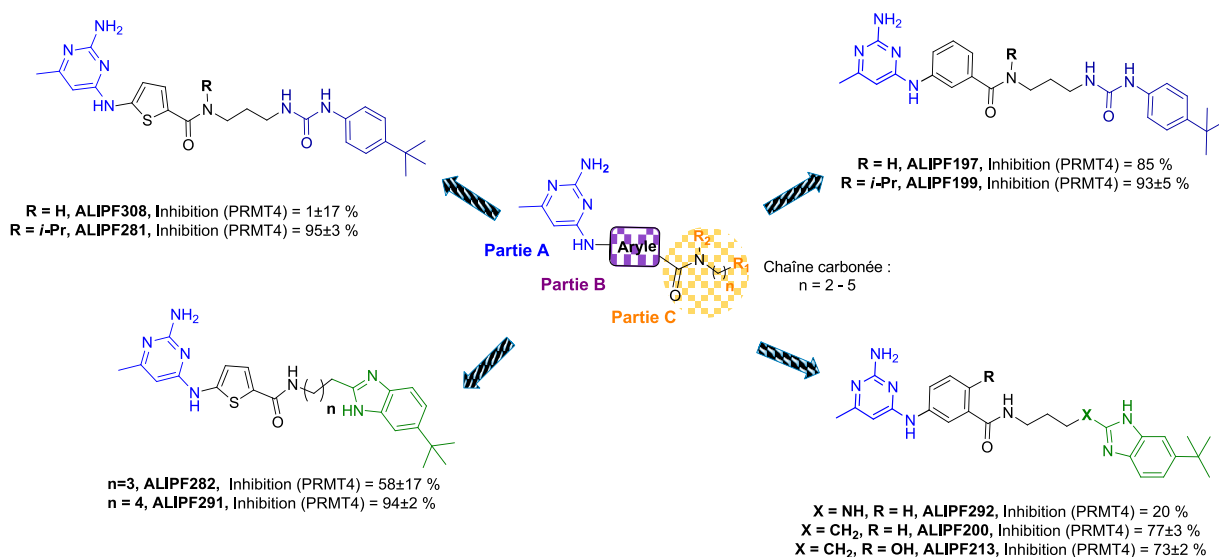


Figure 4.22. Etude des composés montrant une inhibition de PRMT4 supérieure à 70 % à une concentration de 32 µM

Les composés possédant une activité sur PRMT4 identifiés montrent des motifs communs. Les chaînes de type *tert*-butylphénylurée ou *tert*-butylphényl-2-alkylbenzimidazole (**partie C**) semblent avoir un rôle important. D'ailleurs, lorsque le méthylène en position 2 du benzimidazole est remplacé par un groupement amino, l'activité diminue significativement : **ALIPF200** (77±3 %) versus **ALIPF292** (20 %).

Pour la série benzénique, la substitution de l'amide par un groupement isopropyle favorise l'activité sur l'enzyme : **ALIPF199** (93±5 %) versus **ALIPF197** (85 %). Pour la série thiophénique, l'absence de groupement isopropyle entraîne une diminution complète d'activité sur PRMT4 : **ALIPF281** (95±3 %) versus **ALIPF308** (1±17 %), mais aussi sur les autres HMTs.

La présence d'un phénol n'affecte pas significativement l'activité sur PRMT4, mais elle pourrait favoriser la spécificité pour l'enzyme vis-à-vis des autres HMTs. Par exemple, le phénol **ALIPF213** montre une activité plus importante sur PRMT4 (73±2 %) que sur les autres cibles (< 46 %).

L'homologation de la chaîne sur la série thiophénique favorise l'activité sur l'enzyme : **ALIPF291** (94±2 %) versus **ALIPF282** (58±17 %).

Le clogP des composés testés est compris entre 4,5 et 5,5, excepté le composé **ALIPF233** (2.7) possédant le motif diaminotriazine (**partie A**) (**figure 4.21**). Nous n'observons pas de relations entre

l'activité des différents composés et leur hydrophobicité. Nous pouvons donc conclure que l'activité observée pour les composés est due à la structure elle-même.

4.3.3 Pharmacomodulations proposées

A partir de ces résultats préliminaires, des pharmacomodulations pourront être entreprises. L'introduction d'un hydroxyle sur le thiophène (**partie B**) pourra être évaluée afin d'établir une liaison hydrogène supplémentaire dans le site catalytique de l'enzyme en particulier pour DNMT. La **partie A** pourra également être modulée. Ainsi, l'introduction des substituants sur le N^2 ou le N^4 du motif aminopyrimidine, ainsi que la distance entre la **partie A** et la **partie B** pourraient être modulées. L'aryle sera également remplacé par un autre hétérocycle (**figure 4.23**).

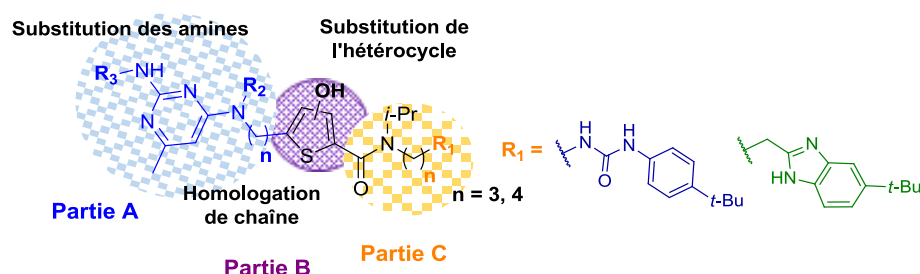


Figure 4.23. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique

4.4 Comparaison de l'activité des composés sur DOT1L, DNMT et autres HMTs

Les composés synthétisés montrent un profil d'inhibition non spécifique vis-à-vis des cibles épigénétiques évaluées (DOT1L, DNMT3a, PRC2, G9a, PRMT1, PRMT4, PRMT5), sauf pour le composé **ALIPF292** qui semble plus actif sur DNMT3a (**figure 4.24**).

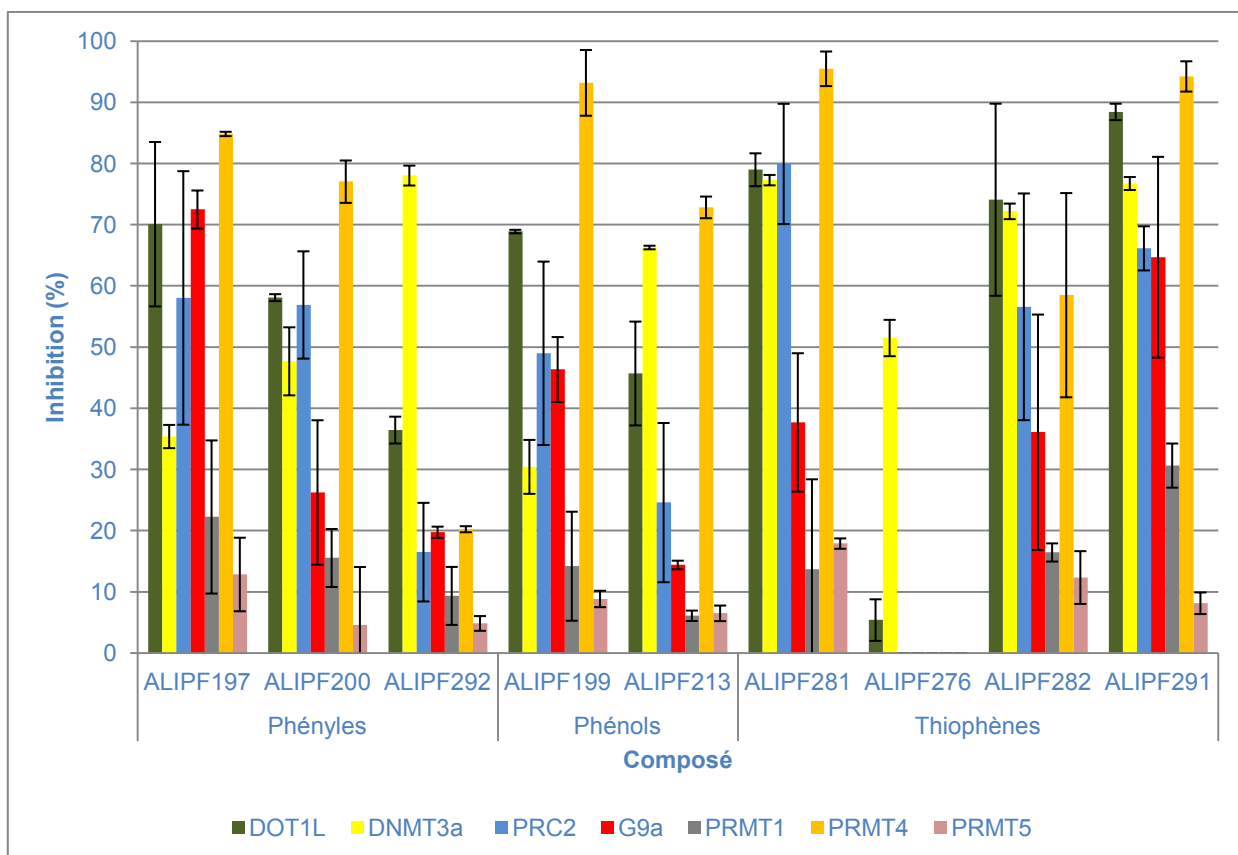


Figure 4.24. Evaluation de l'activité des composés sélectionnés sur différentes cibles épigénétiques. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μM du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*. La valeur correspond à la moyenne ± écart type.

Le profil non spécifique des composés pourrait être dû à des interactions au niveau de l'ADN. Des études complémentaires pourront être réalisées pour déterminer cette hypothèse.

Nous avons identifié des composés avec un profil plus ou moins sélectif (figure 4.25) :

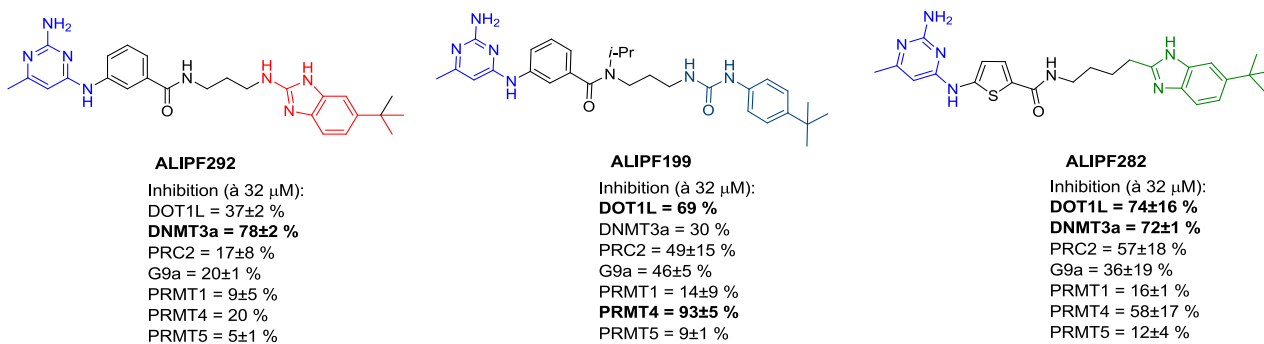


Figure 4.25. Composés montrant un profil d'activité plus ou moins spécifique. Le pourcentage d'inhibition correspond à une concentration de 32 μM du composé testé. Les tests ont été réalisés en *duplicate*.

- Le composé **ALIPF292** montre un pourcentage d'inhibition significativement plus importante sur DNMT3a (78 ± 2 %) que sur les autres cibles épigénétiques (< 36 %).
- Le composé **ALIPF199** présente une activité intéressante sur PRMT4 (93 ± 5 %) et sur DOT1L (69 %), activité supérieure à celle sur les autres cibles biologiques (< 49 %).
- Le composé **ALIPF282** présente une activité comparable vis-à-vis de DOT1L (74 ± 16 %) et de DNMT3a (72 ± 1 %).

L'inhibition mixte des composés **ALIPF199** et **ALIPF282** pourrait être intéressante comme approche multi-cible. En effet, étant donné que DOT1L, DNMT et PRMT4 sont toutes les trois des enzymes impliquées dans le cancer, leur inhibition simultanée serait une approche intéressante.

En effet, étant donné le *crosstalk* de la méthylation de l'ADN et des histones, une approche multi-cible conduirait à des molécules possédant un effet anticancéreux renforcé.[12,13] Par exemple, des inhibiteurs mixtes DNMT / EZH2[14] et DNMT / G9a[15] ont été récemment décrits possédant un effet anticancéreux important.

ALIPF292, **ALIPF199** et **ALIPF282** montrent dans leur structure des motifs essentiels pour l'inhibition de DOT1L et/ou pour l'inhibition de DNMT. Bien que ces inhibitions soient assez faibles, des pharmacomodulations autour de ces molécules pourraient conduire à des produits sélectifs pour DOT1L ou à des inhibiteurs mixtes DOT1L/DNMT.

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail a été le développement d'inhibiteurs de DOT1L, une HMT impliquée dans l'expression des oncogènes liés à la leucémie de type *MLLr*.

Il a été démontré que l'inhibition de DOT1L conduit à l'hypométhylation de ces gènes, permettant de les réprimer. Les inhibiteurs de DOT1L (DOT1Li) stoppent ainsi la prolifération spécifiquement des cellules leucémiques *MLL-r*, tout en arrêtant le cycle cellulaire, et conduisant à la différenciation et à l'apoptose.[9,10,28]

Nous avons donc conçu une structure générale reprenant le motif aminopyrimidine du composé SGI-1027 (**19**), inhibiteur de DNMT, qui mimerait le rôle des motifs (déaz)adénosine des inhibiteurs de DOT1L nucléosidiques EPZ004777 (**43**) et EPZ-5676 (**45**) (**figure 5.1**). Ces composés présentent une activité très élevée et une spécificité sur DOT1L, malgré leur mauvais profil chimique et pharmacocinétique. Nous avons envisagé de remplacer le ribose de ces composés de référence par différents groupements aryles.

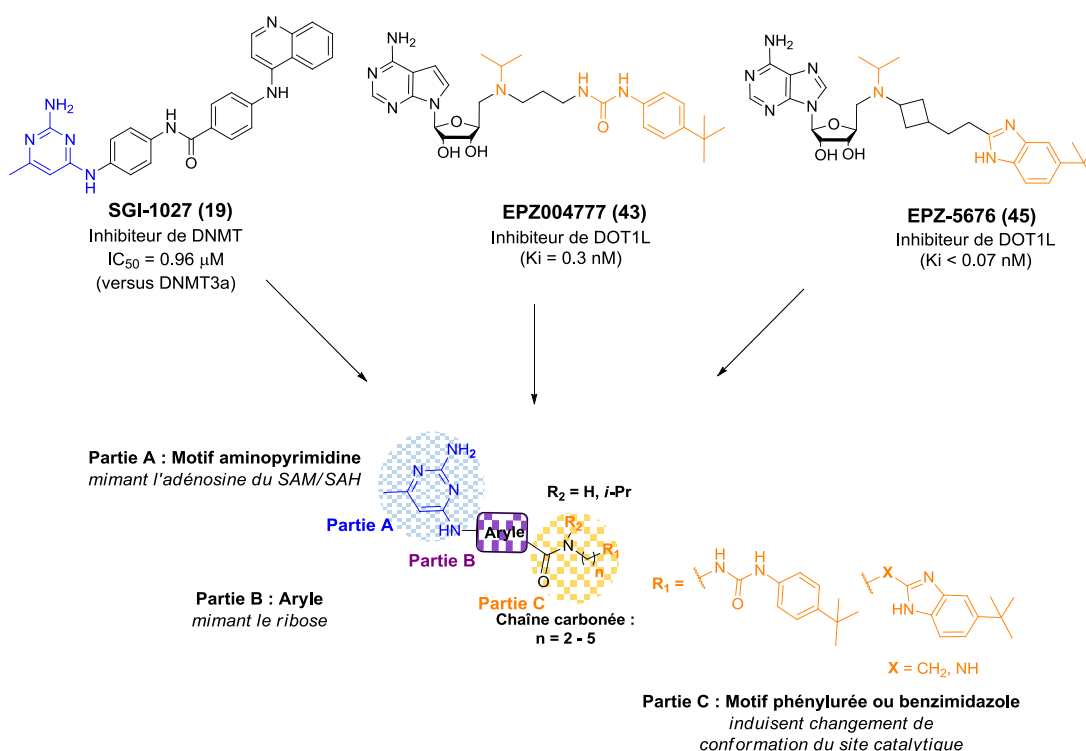
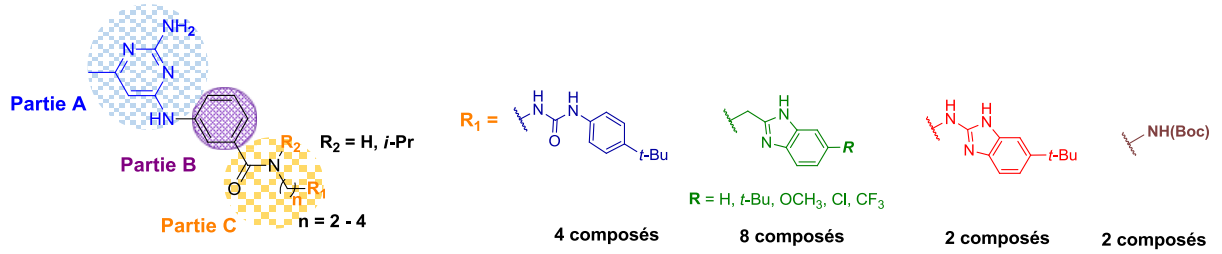


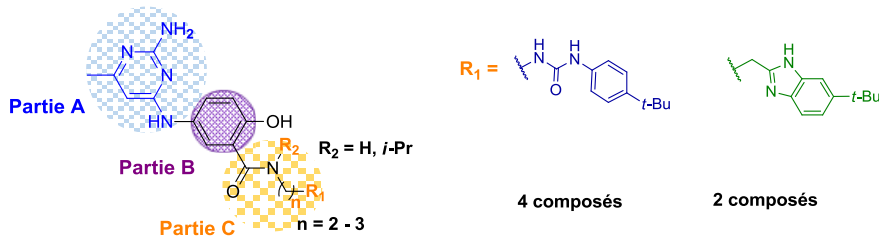
Figure 5.1. Conception des inhibiteurs potentiels de DOT1L

Des modulations ont été réalisées autour de ce pharmacophore et nous avons développé différentes voies de synthèse pour les obtenir. Les composés synthétisés peuvent être classés en 5 séries différentes (**figure 5.2**).

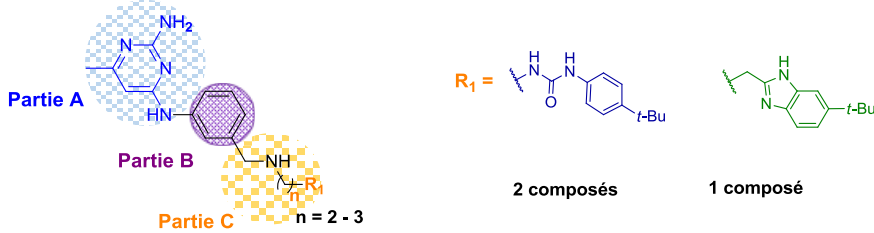
Phénylamides secondaires et tertiaires



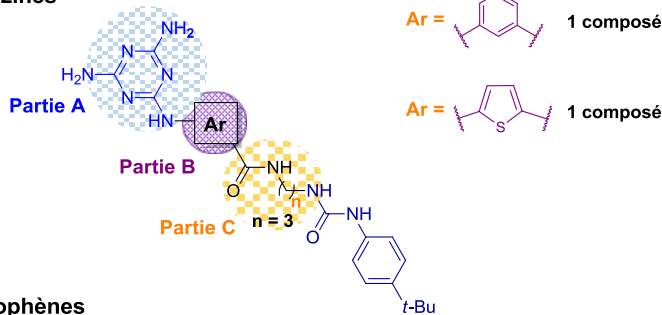
Hydroxyphénylamides secondaires et tertiaires



Benzylamines secondaires



Triazines



Thiophènes

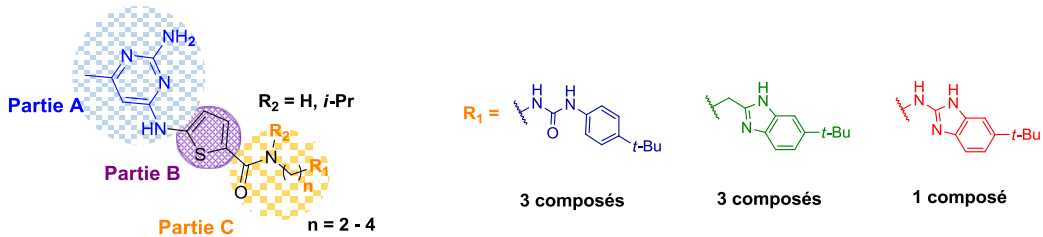


Figure 5.2. Composés cibles de type phénylurée et benzimidazole

Les premiers résultats de leur activité sur DOT1L ainsi que l'étude de modélisation moléculaire sur la structure résolue du co-cristal DOT1L-EPZ-004777 (**43**) (PDB : 4ER5) ont permis de guider notre étude de relations structure-activité.

Les composés benzéniques **ALIPF197**, **ALIPF199** et **ALIPF200**, et thiophéniques **ALIPF281**, **ALIPF282** et **ALIPF291** ont montré un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % (à une concentration de 32 μ M) sur DOT1L (**figure 5.3**).

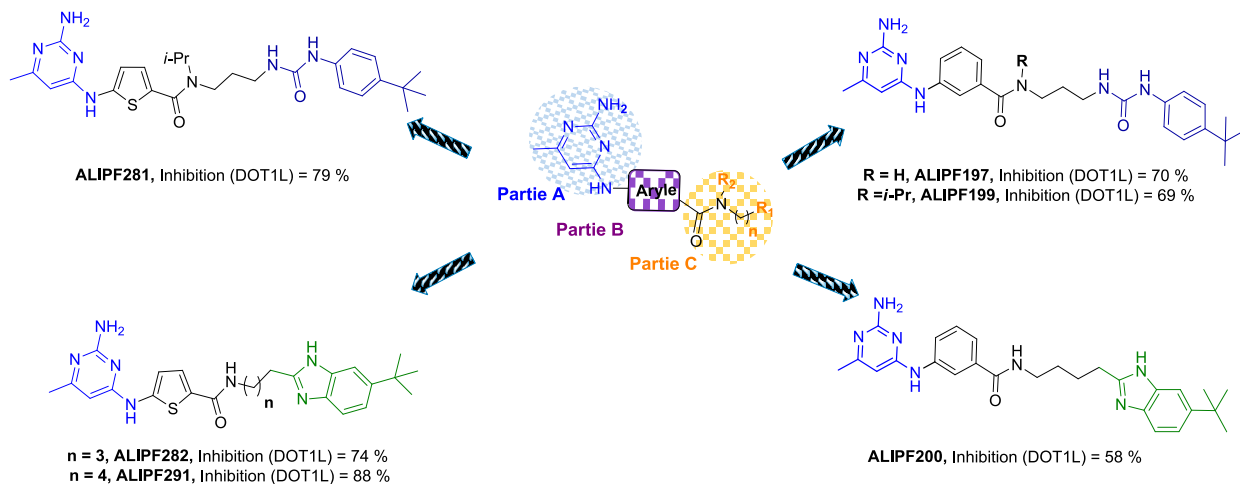


Figure 5.3. Composés possédant une inhibition de DOT1L supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M

Ces premiers résultats nous ont permis d'identifier des motifs structuraux qui devraient être conservés pour le développement de nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de DOT1L (**figure 5.4**) : le motif aminopyrimidine, un thiophène, un amide liant cet hétérocycle à une chaîne de 3 à 4 méthylènes porteuse d'un *tert*-butylphénylurée ou d'un *tert*-butyl-2-alkyl-benzimidazole.

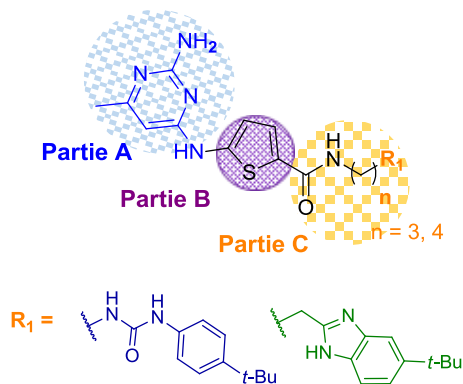


Figure 5.4. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs non nucléosidiques de DOT1L

Ainsi, cette étude a permis d'identifier de nouveaux points de départ à optimiser pour augmenter l'activité de nos composés, étant donné leur faible activité à 10 μM .

Etant donné que nous avons observé une activité supérieure pour les composés thiophéniques, comparés à leurs analogues benzéniques, des pharmacomodulations autour de cette série seront entreprises (**figure 5.5**).

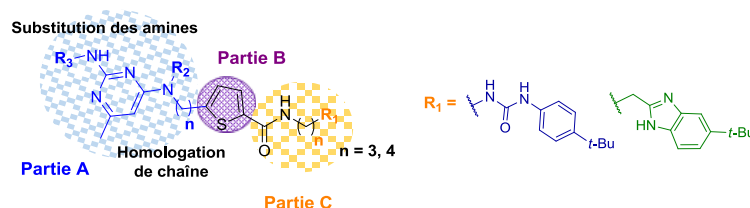


Figure 5.5. Pharmacomodulations autour de la série thiophénique

La chaîne latérale portant un groupement de type *tert*-butylphénylurée ou *tert*-butyl-2-alkylbenzimidazole sera conservée avec un certain degré de liberté ($-\text{CH}_n-$, $n = 3, 4$). La flexibilité de la chaîne permettra aux composés de mieux interagir dans la poche hydrophobe de l'enzyme via son motif aminopyrimidine (**partie A**). Des pharmacomodulations autour de la **partie A** seront proposées pour explorer davantage le site catalytique de DOT1L. Ainsi, l'introduction des substituants sur le N^2 ou le N^4 du motif aminopyrimidine, ainsi que la distance entre la **partie A** et la **partie B** seront évaluées. Ces modifications permettraient de mieux positionner le motif aminopyrimidine dans la poche hydrophobe tout en augmentant les interactions hydrophobes au sein du site catalytique.

L'activité de tous les composés sur DNMT3a a été déterminée à des concentrations de 100 μM , 32 μM et/ou 10 μM . Les composés benzéniques **ALIPF244**, **ALIPF292** et **ALIPF22**, les composés phénoliques **ALIPF229** et **ALIPF213**, ainsi que les composés thiophéniques **ALIPF276** et **ALIPF282**, ont montré un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % (à une concentration de 32 μM) (**figure 5.6**).

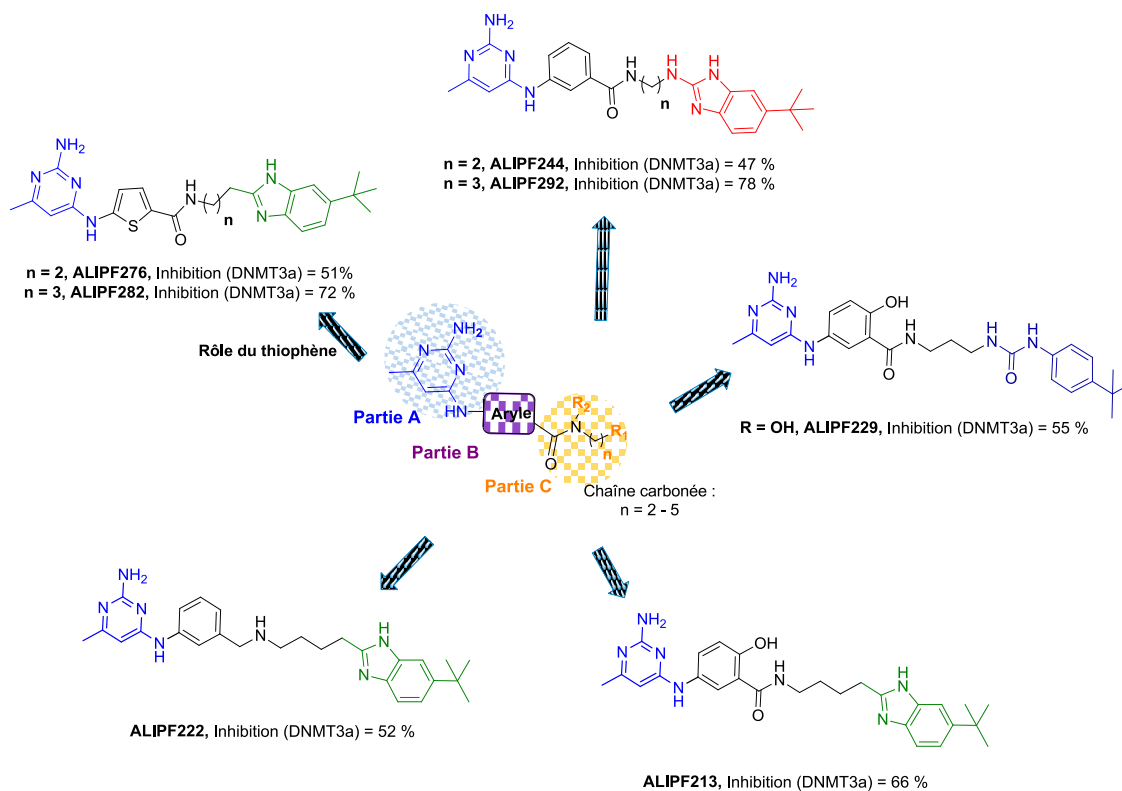


Figure 5.6. Composés possédant une inhibition de DNMT3a supérieure à 50 % à une concentration de 32 μ M

A partir de ces résultats nous avons identifié des motifs structuraux à conserver pour le développement des inhibiteurs de DNMT (**figure 5.7**) : le motif aminopyrimidine, un thiophène ou un phénol, un amide liant cet hétérocycle à une chaîne de 3 méthylènes porteuse d'une phénylurée ou d'un benzimidazole. La phénylurée et le benzimidazole peuvent posséder un groupement volumineux comme un groupement *tert*-butyle ou trifluorométhyle.

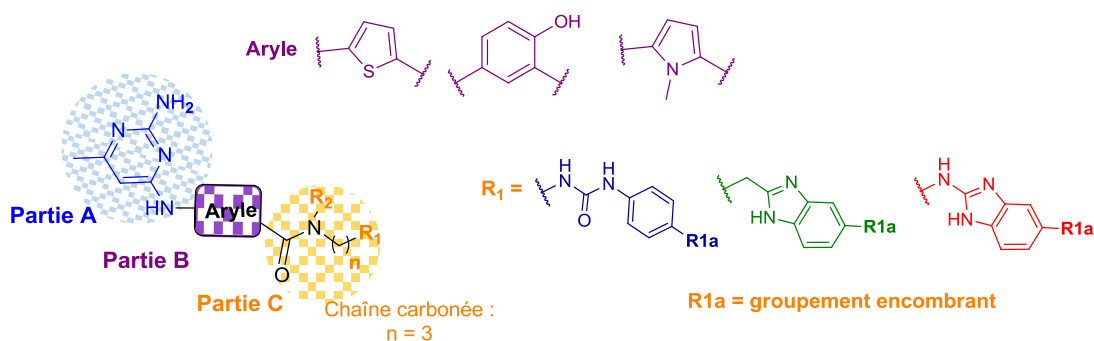


Figure 5.7. Motifs à conserver pour le développement des inhibiteurs de DNMT

Des pharmacomodulations autour ces dérivés seront entreprises (**figure 5.8**).

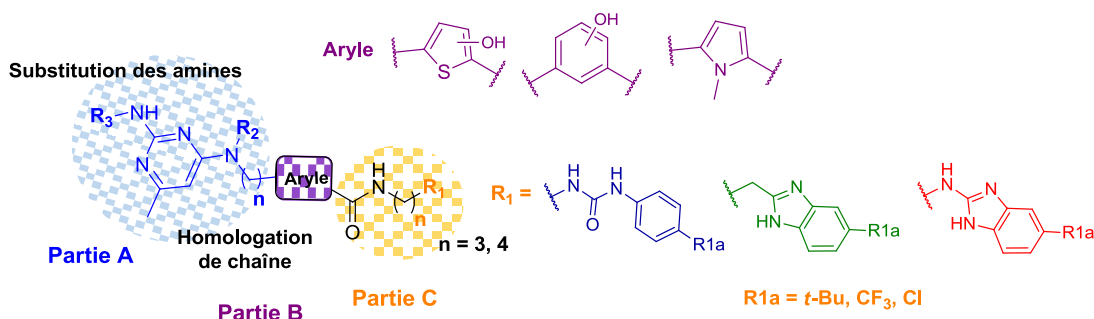


Figure 5.8. Pharmacomodulations pour des inhibiteurs de DNMT

Etant donné que le phénol semble favoriser l'activité sur DNMT, l'introduction d'un hydroxyle sur le thiophène (**partie B**) pourra être évaluée. Egalement, la position optimale de l'hydroxyle sur le phényle pourrait être déterminée. Les substituants sur le N^2 ou le N^4 du motif aminopyrimidine (**partie A**), ainsi que la distance entre la **partie A** et la **partie B** pourraient être modulés.

L'activité des composés représentatifs des séries développées a également été déterminée sur un panel d'HMTs SAM dépendantes (EZH2, G9a, PRMT1, PRMT4 et PRMT5) à une concentration de 32 μM .

D'une part, nous avons identifié les composés **ALIPF199**, **ALIPF281** et **ALIPF291** comme inhibiteurs de PRMT4 (CARM1), montrant un pourcentage d'inhibition supérieur à 90 % à une concentration de 32 μM (**figure 5.9**).

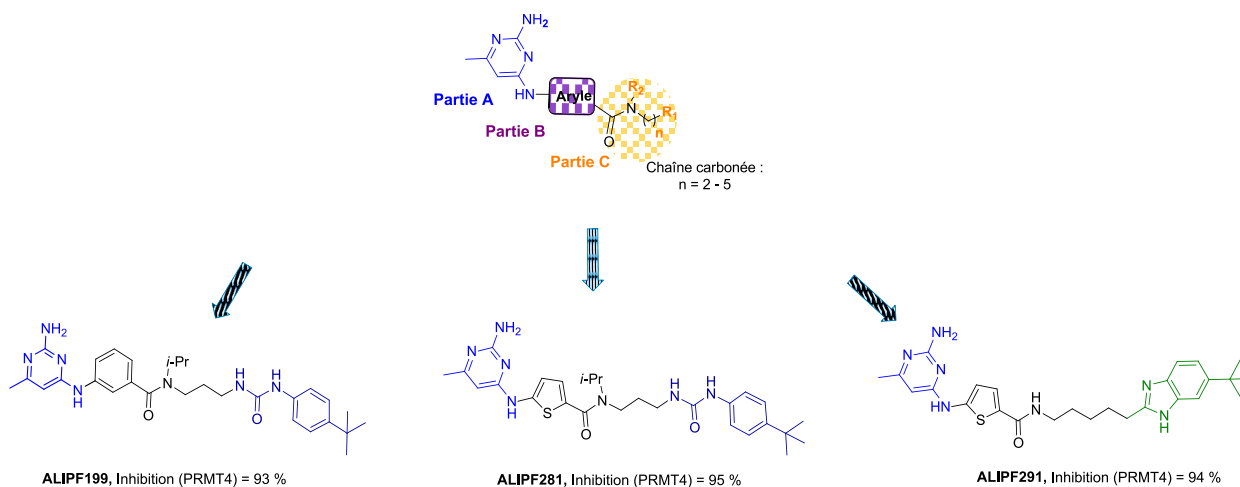


Figure 5.9. Composés possédant une inhibition de PRMT4 supérieure à 90 % à une concentration de 32 μM

L'activité de ces composés sur PRMT4 sera déterminée à une concentration de 10 μM . L'inhibition de cette HMT est intéressante étant donné le rôle de cette enzyme dans le développement du cancer de la prostate et du cancer du sein.[83–86]

D'autre part, d'autres composés ont été identifiés avec un profil plus ou moins sélectif (**figure 5.10**).

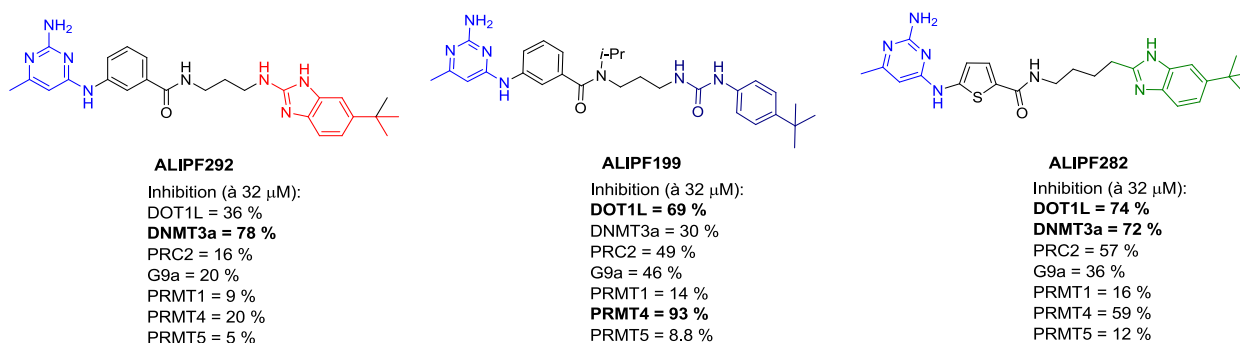


Figure 5.10. Figure 4.23. Composés montrant un profil d'activité plus ou moins spécifique

Nous avons observé que les composés synthétisés ne sont pas spécifiques, probablement dû à des interactions au niveau de l'ADN ou de la chromatine. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, un test de liaison à l'ADN sera réalisée.

Le composé **ALIPF292** présente une spécificité pour DNMT. Les composés **ALIPF199** et **ALIPF282** pourraient être intéressants pour le développement d'inhibiteurs mixtes DOT1L/DNMT. En effet, l'inhibition mixte est une approche intéressante étant donné que l'effet biologique pourrait être maximisé.[12–15] Ces structures peuvent servir comme point de départ pour réaliser des pharmacomodulations et aboutir à des inhibiteurs sélectifs de DOT1L ou de DNMT ou à des inhibiteurs mixtes.

Une fois les pharmacomodulations réalisées, les composés inhibiteurs de DOT1L les plus prometteurs seront évalués pour leur capacité à inhiber la prolifération de la lignée cellulaire MLLr (MV4-11) afin de valider l'effet sur la cible.

Parallèlement, l'évaluation de l'effet des molécules directement sur la di/triméthylation de H3K79 dans les cellules cancéreuses de MLLr sera réalisée par Western Blot.

Chapitre 6 : Modes opératoires

Chapitre 6 : Modes opératoires

6.1 Synthèses

6.1.1 Matériels : Appareillages et techniques d'analyse

- Reagents, chemicals and (anhydrous) solvents were purchased from commercial suppliers and used without further purification.
- Sensitive reactions were performed under a nitrogen atmosphere.
- Reactions were monitored by Thin-Layer Chromatography (TLC), carried out on precoated silica gel Polygram SIL G/UV₂₅₄ plates (Macherey – Nagel). Spots were visualized using an UV lamp ($\lambda = 254$ and 366 nm).
- Preparative-TLC were carried out on SIL G-200/UV₂₅₄, 20 x 20 cm plates (Macherey – Nagel), and spots were visualized using an UV lamp ($\lambda = 254$ and 366 nm).
- Microwave-Assisted Chemistry was performed on a DiscoverSP apparatus (CEM) driven by Synergy software.
- Flash chromatography was performed on a spot flash type apparatus (Armen) using silica gel prepacked Chromabond® Flash RS cartridges (Macherey-Nagel).
- Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS) experiments were performed on a Q Exactive Benchtop LC-MS (Thermo Scientific) using Atmospheric-Pressure Chemical Ionisation (APCI +/-).
- LC-MS was also performed on a HPLC Alliance (Waters) - MS Micromass ZQ2000 (Waters) using ElectroSpray Ionisation (ESI+/-). Data were analyzed on Mass Lynx software. A prepacked C₁₈ reverse-phase column (Waters XBridge, 50 x 4.6 mm, 5 μ m) at 35 °C was used for analytical HPLC with a binary gradient elution (mobile phase A: water + buffer formate 5mM, pH 3.8; mobile phase B: acetonitrile and buffer formate 5mM, pH 3.8 (5% water); gradient 0 – 0.25 min = 2% B, 0.25 – 4.0 min = 100% B, 4.0 – 5.0 min = 2% B) and at a flow rate of 2 mL/min.
- Purity of final compounds was controlled by an analytical HPLC performed on a WATERS 600^E chromatographer, with detection on a UV WATERS 2487 dual absorbance detector (254 and 366 nm). A Chromasile C18 column (Macherey Nagel, 4.6 x 150 mm, 5 μ m, 100 Å) was used with a binary gradient elution (mobile phase: acetonitrile – water (8:2), 0.08% formic acid) and at a flow rate of 1 mL/min/20 min.

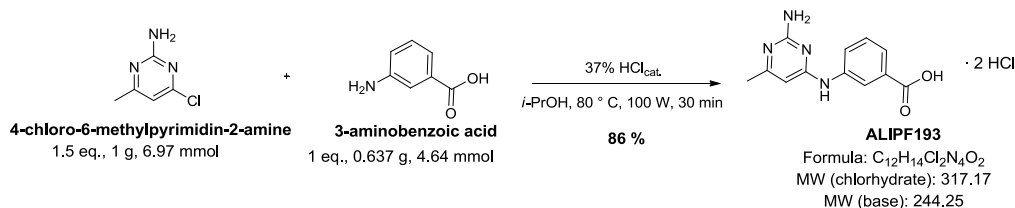
- NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300P spectrometer (300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C). Spectra were performed at room temperature with tetramethylsilane (TMS) as intern reference, and they were treated using TopSpin(Bruker) software.
- High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) was performed on a Q Exactive Benchtop LC-MS/MS (Thermo Scientific) using electrospray ionization (ESI+/-).
- Melting points were determined on a Büchni B-530 apparatus. The values were not corrected.
- Infrared spectra (IR) were performed on a Bruker Alpha-P spectrometer.

6.1.2 Protocoles expérimentaux

General procedure to obtain amines **ALIPF193**, **196**, **231**

A mixture of the corresponding chlorinated pyrimidine (1 - 1.5 eq.), the corresponding amine (1 eq.), and 5 drops of 37% HCl in isopropanol were stirred for 30 minutes (15 min. for **ALIPF231**) in a microwave reactor, at 80 °C, at 100 W. The mixture was filtrated to recover a solid which was washed with ethanol. The resulting filtrate was concentrated in vacuo, and ethanol was added to the residue to recover by filtration a second solid. Both solids were gathered together, and dried over P_2O_5 .

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzoic acid dihydrochloride, **ALIPF193**



Appearance: white powder

mp > 265 ° C

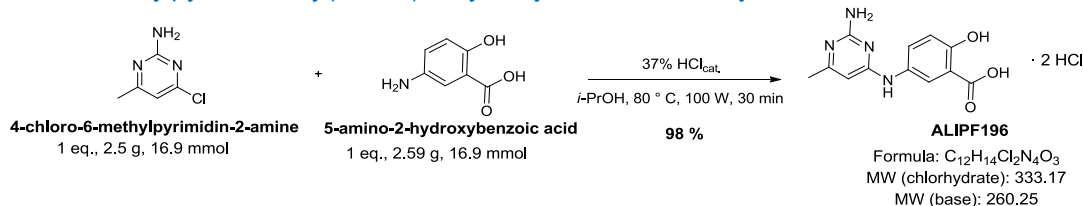
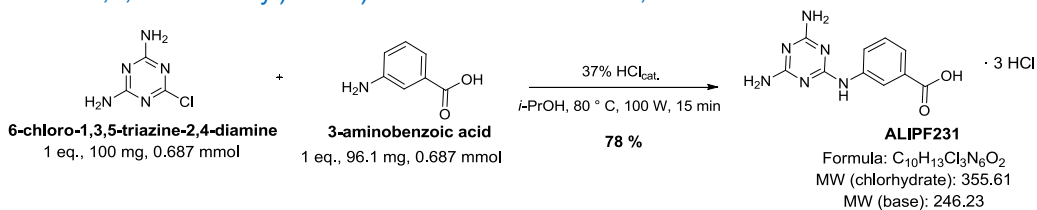
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 2.28 (s, 3H, CH_3), 6.24 (s, 1H, ArH), 7.49 (m, 1H, ArH), 7.71 (m, 1H, ArH), 7.88 (m, 1H, NH), 8.04 (m, 1H, ArH), 8.25 (m, 1H, ArH), 10.93 (bs, 1H, COOH), 13.05 (bs, 2H, NH_2)

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 18.8, 97.7, 122.6, 125.5, 126.1, 129.6, 131.9, 138.7, 153.2, 156.2, 162.2, 167.3

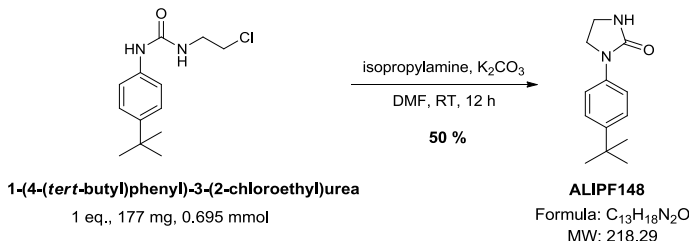
LC-MS (ESI⁺): m/z 245 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2$ [M+H]⁺ 245.1033, found 245.1023

IR, ν (cm^{-1}): 1650 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-2-hydroxybenzoic acid dihydrochloride, **ALIPF196****Appearance:** white powder**mp** = 240 – 242 °C**¹H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.25 (s, 3H, CH₃), 6.02 (s, 1H, ArH), 6.85 (m, 1H, ArH), 7.74 (m, 2H, ArH), 7.81 (bs, 2H, NH₂), 10.29 (bs, 1H, OH), 13.10 (bs, 1H, COOH)**¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 18.7, 97.4, 114.7, 117.6, 124.0, 129.6, 130.4, 153.2, 156.1, 158.9, 162.5, 171.8**LC-MS** (ESI⁺): m/z 261 [M+H]⁺**HRMS** (ESI⁺): m/z calculated C₁₂H₁₃N₄O₃ [M+H]⁺ 261.0982, found 261.0969**IR**, ν (cm⁻¹): 1662 (C=O)3-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzoic acid trichloride, **ALIPF231****Appearance:** white powder**mp** > 265 °C**¹H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6.30 (s, 4H, NH₂), 7.32 (m, 1H, ArH), 7.47 (m, 1H, ArH), 8.04 (m, 1H, ArH), 8.28 (m, 1H, ArH), 9.02 (s, 1H, NH), 12.75 (bs, 1H, COOH)**LC-MS** (ESI⁻): m/z 245 [M-H]⁻**IR**, ν (cm⁻¹): 1644 (C=O)**Procedure to obtain imidazolidinone ALIPF148**

Isopropylamine (1 eq., 0.060 mL, 0.695 mmol) and K₂CO₃ (2 eq., 192 mg, 1.39 mmol) were added to a solution of 1-(4-(tert-butyl)phenyl)-3-(2-chloroethyl)urea (1 eq., 177 mg, 0.695 mmol) in DMF (10 mL), and it was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo and water was added to the residue. The visible solid was recovered by filtration, washed with cyclohexane, and dried over P₂O₅.

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)imidazolidin-2-one, **ALIPF148**

Appearance: white powder

mp = 141 – 142 ° C

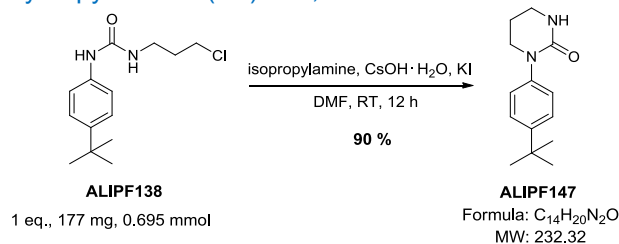
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 3.74 (m, 2H, CH₂-NH), 4.20 (m, 2H, CH₂-N), 7.22 (m, 2H, ArH), 7.45 (m, 2H, ArH), 9.00 (m, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 219 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1682 (C=O), 2952 (NH)

Procedure to obtain pyrimidinone **ALIPF147**

ALIPF138 (1 eq., 200 mg, 0.744 mmol) and KI (1.1 eq., 135 mg, 0.819 mmol) were added to a solution of isopropylamine (1 eq., 0.064 mL, 0.744 mmol) and CsOH·H₂O (1.1 eq., 137 mg, 0.819 mmol) in DMF (10 mL) previously stirred for 30 minutes at room temperature. After stirring for 12 hours, the mixture was concentrated in vacuo, and water was added to the residue. The visible solid was recovered by filtration, washed with cyclohexane, and dried over P₂O₅.

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-one, **ALIPF147**

Appearance: white powder

mp = 226 – 228 ° C

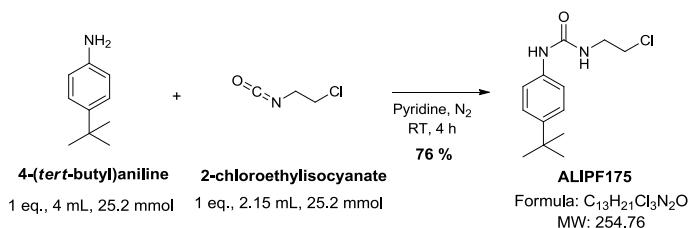
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.26 (s, 9H, *t*-Bu), 1.92 (m, 2H, CH₂), 3.21 (m, 2H, CH₂), 3.58 (m, 2H, CH₂), 6.50 (m, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, Ar)

LC-MS (APCI⁺): m/z 233 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1646 (C=O), 3220 (NH)

General procedure to obtain ureas **ALIPF175**, **138**

A solution of 4-(*tert*-butyl)aniline (1 eq.) in pyridine (5 mL) was added to a solution of the corresponding isocyanate (1 eq.) in pyridine (to give a 0.4 M solution), and the mixture was stirred under nitrogen, at room temperature for 4 hours (24 h for **ALIPF138**). The mixture was concentrated in vacuo and 1N HCl was added to the residue. The visible solid was recovered by filtration, washed with cyclohexane, and dried over P₂O₅.

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(2-chloroethyl)urea dichloride, **ALIPF175**

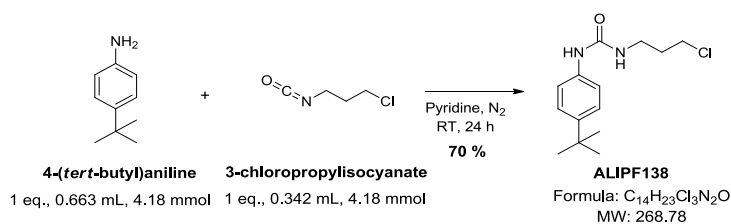
Appearance: white powder

mp = 125 – 127 ° C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 3.40 ppm (td, ³*J* = 6.1 Hz ; ³*J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.64 (t, ³*J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂-Cl), 6.32 (t, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.59 ppm (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 255 [M+H]⁺ for ³⁵Cl and 257 [M+H]⁺ for ³⁷Cl

IR, ν (cm⁻¹): 1644 (C=O), 3301(NH)

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(3-chloropropyl)urea dichloride, **ALIPF138**

Appearance: white powder

mp = 140 – 142 ° C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.87 (tt, ³*J* = 6.4 Hz, ³*J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 3.18 (td, ³*J* = 5.8 Hz, ³*J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.66 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-Cl), 6.16 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.30 (s, 1H, NH)

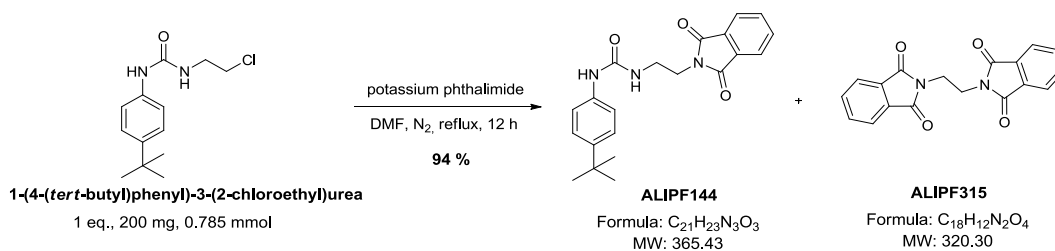
LC-MS (APCI⁺): m/z 269 [M+H]⁺ for ³⁵Cl and 271 [M+H]⁺ for ³⁷Cl

IR, ν (cm⁻¹): 1642 (C=O), 3344 and 3297 (NH)

Procedure to obtain phthalimido derivative ALIPF144

Potassium phthalimide (2 eq., 290 mg, 1.57 mmol) was added to a solution of 1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(2-chloroethyl)urea (1 eq., 200 mg, 0.785 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) under nitrogen, and the mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, cold water was added to the mixture, and the visible solid was recovered by filtration. The powder was recrystallized from acetonitrile. The powder was dried over P₂O₅.

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)ethyl)urea, ALIPF144



Appearance: white powder

mp = 168 – 170 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 3.34 (m, 2H, CH₂-NH), 3.67 (m, 2H, CH₂-N), 6.19 (m, 1H, NH), 7.18 (m, 4H, ArH), 7.84 (m, 4H, ArH), 8.31 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* 366 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1648 (C=O, urea), 1775 and 1709 (C=O, imide), 3400 and 3960 (NH)

Characterization of ALIPF315

Appearance: white powder

mp = 233 – 235 °C

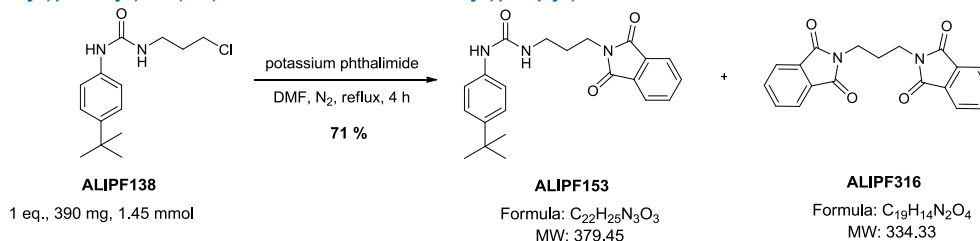
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.84 ppm (s, 4H, CH₂), 7.82 (m, 8H, ArH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 321 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1697 (C=O)

Procedure to obtain phthalimido derivative ALIPF153

Potassium phthalimide (2 eq., 537 mg, 2.9 mmol) was added to a solution of 1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(2-chloroethyl)urea (1 eq., 390 mg, 1.45 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) under nitrogen, and the mixture was refluxed for 4 hours. After cooling to room temperature, cold water was added to the mixture, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was suspended in CH₂Cl₂, and petroleum spirit was added until precipitation. The powder was recovered by filtration, washed with water, 10% K₂CO₃, and cyclohexane. The solid was dried over P₂O₅.

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)urea, **ALIPF153**

Appearance: white powder

mp = 95 – 97 ° C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 1.74 (m, 2H, CH₂), 3.08 (m, 2H, CH₂-NH), 3.60 (m, 2H, CH₂-N), 6.20 (m, 1H, NH), 7.22 (m, 4H, ArH), 7.85 (m, 4H, ArH), 8.50 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 380 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1642 (C=O, urea), 1774 and 1708 (C=O, imide), 3314 (NH)

Characterization of **ALIPF316**

Appearance: white powder

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.97 ppm (tt, ³J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.61 (t, ³J = 7.1 Hz, 4H, CH₂), 7.82 (m, 8H, ArH)

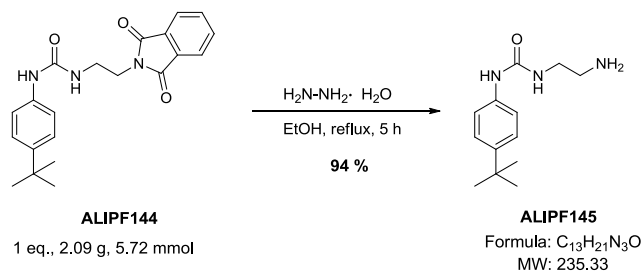
LC-MS (ESI⁺): m/z 335 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1701 (C=O)

General procedure to obtain primary amines **ALIPF145**, **154**

Hydrazine monohydrate (5 eq.) was added to a solution of the corresponding phthalimido-urea (1 eq.) in ethanol (to give a 0.2 M solution) and it was refluxed for 5 hours. After cooling at room temperature, the white solid (phthalhydrazide) was discarded by filtration. The filtrate was concentrated in vacuo, and the residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ – CH₃OH/ammonia, 9 : 1). The oil obtained was dried over P₂O₅.

1-(2-aminoethyl)-3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)urea, **ALIPF145**



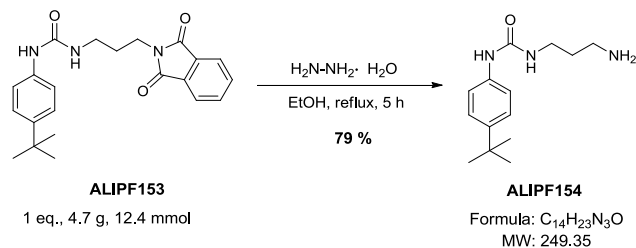
Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 2.65 (m, 2H, CH₂-NH₂), 3.10 (m, 2H, CH₂-NH), 3.31 (m, 2H, NH₂), 6.19 (m, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.49 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 236 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1652 (C=O), 3299 (NH)

1-(3-aminopropyl)-3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)urea, **ALIPF154**



Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.49 (m, 2H, CH₂), 2.58 (m, 2H, CH₂-NH₂), 3.12 (m, 2H, CH₂-NH), 3.31 (m, 2H, NH₂), 6.10 (m, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.35 (s, 1H, NH)

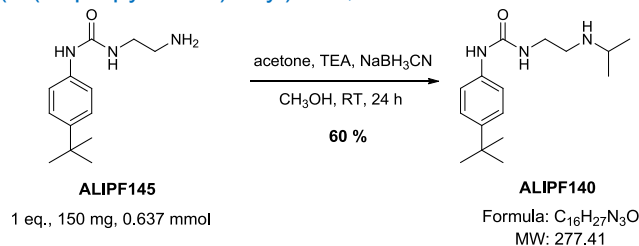
LC-MS (APCI⁺): m/z 250 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1650 (C=O), 3303 (NH)

General procedure to obtain secondary amines **ALIPF140, 139, 195, 209**

TEA (1 eq.) and acetone (1.1 eq.) were added to a solution of the corresponding amine (1 eq.) in CH₃OH (to give a 0.1 M solution) under nitrogen in a balloon flask connected to a 10% NaOH trap. After 30 minutes of stirring at room temperature, sodium cyanoborohydride (1.1 eq.) were added to the mixture and it was stirred 24 hours. For **ALIPF195** acetone (0.5 eq.) and sodium cyanoborohydride (0.5 eq.) were added twice (24 and 27 hours later) and the mixture was stirred 6 hours more. 10% NaOH was added to the mixture and it was stirred 20 minutes. After concentration in vacuo, cold water was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with water, brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ – CH₃OH/ammonia, 9 : 1). The oil obtained was dried over P₂O₅.

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(2-(isopropylamino)ethyl)urea, **ALIPF140**



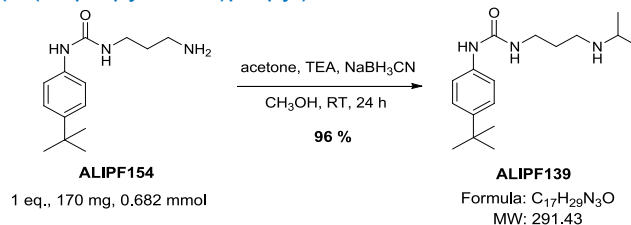
Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.00 (d, ³*J* = 6.3 Hz, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 2.62 (m, 2H, CH₂-NH), 2.78 (m, 1H, CH), 3.15 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.31 (m, 1H, NH), 6.11 (m, 1H, NH), 7.24 (m, 4H, ArH), 8.50 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 278 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1650 (C=O), 3304 (NH)

1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-3-(3-(isopropylamino)propyl)urea, **ALIPF139**



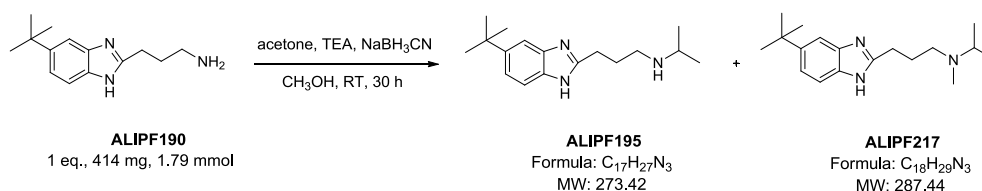
Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.01 (d, ³*J* = 6.2 Hz, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.56 (m, 2H, CH₂), 2.58 (m, 2H, CH₂-NH), 2.78 (m, 1H, CH), 3.10 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.31 (m, 1H, NH), 6.10 (m, 1H, NH), 7.24 (m, 4H, ArH), 8.34 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 291 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1650 (C=O), 3324 (NH)

3-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-*N*-isopropylpropan-1-amine, **ALIPF195**



Appearance: brown oil

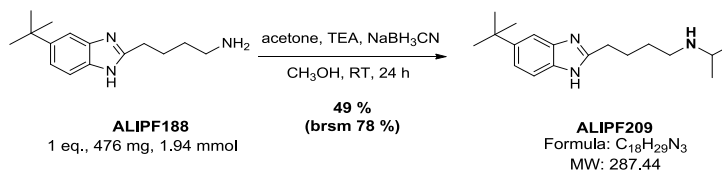
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (m, 6H, *i*-Pr), 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 2.11 (m, 2H, CH₂), 2.93 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.01 (m, 2H, CH₂-NH), 3.31 (m, 1H, CH), 7.20 (m, 1H, ArH), 7.38 (m, 2H, ArH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 274 [M+H]⁺

Characterization of **ALIPF217**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.22 (m, 6H, *i*-Pr), 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 2.17 (m, 2H, CH₂), 2.63 (s, 3H, CH₃), 2.93 (m, 2H, CH₂), 3.10 (m, 2H, CH₂), 3.51 (m, 1H, CH), 7.22 (m, 1H, ArH), 7.42 (m, 2H, ArH), 11.55 (m, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 288.2 [M+H]⁺

4-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-*N*-isopropylbutan-1-amine, **ALIPF209**

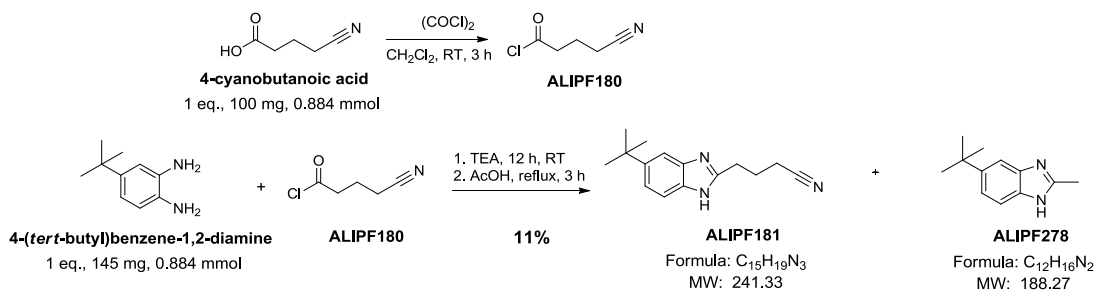
Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.05 (d, ³*J* = 6.4Hz, 6H, *i*-Pr), 1.38 (s, 9H, *t*-Bu), 1.50 (tt, ³*J* = 7.9, 7.8 Hz, 2H, CH₂), 1.80 (tt, ³*J* = 7.9 Hz, 7.7 Hz, 2H, CH₂), 2.66 (t, ³*J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 2.80 (t, ³*J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 2.91 (sp, ³*J* = 6.4Hz, 1H, CH), 7.18 (m, 1H, ArH), 7.38 (m, 2H, ArH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 288 [M+H]⁺

Procedure to obtain benzimidazole **ALIPF181**

A solution of oxalyl chloride (1.1 eq., 0.083 mL, 0.972 mmol) in CH₂Cl₂ (0.5 mL) was added dropwise to a solution of 4-cyanobutanoic acid (1 eq., 100 mg, 0.884 mmol) in CH₂Cl₂ (0.5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ and the organic layer was washed with NaHCO₃, water, and brine, then dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. CH₂Cl₂ (2 mL) was added to the crude product previously obtained. This solution was added dropwise to a solution of 4-(*tert*-butyl)-1,2-diaminobenzene (1 eq., 145 mg, 0.884 mmol) and TEA (1 eq., 89.5 mg, 0.123 mL, 0.884 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo, AcOH (5 mL) was added to the residue, and it was refluxed for 3 hours. The mixture was concentrated in vacuo and 10% NaOH was added. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (gradient CH₂Cl₂ – CH₃OH/ammonia, 1 : 0 to 9 : 1). The oil obtained was dried over P₂O₅.

4-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butanenitrile, **ALIPF181**

Appearance: white powder

mp = 226 – 228 ° C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.26 (m, 2H, CH₂), 1.35 (s, 9H, *t*-Bu), 2.35 (m, 2H, CH₂-CN), 3.33 (m, 2H, CH₂-Ar), 7.49 (m, 1H, ArH), 7.71 (m, 2H, ArH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* 242 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 2247 (CN)

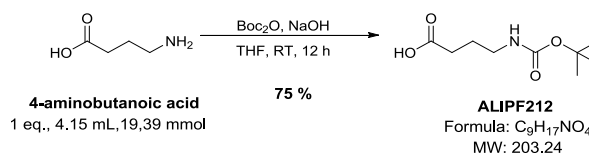
Characterization of 5-(*tert*-butyl)-2-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazole, ALIPF278

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 2.44 (s, 3H, CH₃), 7.17 (m, 1H, ArH), 7.35 (m, 2H, ArH), 11.98 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): *m/z* 189 [M+H]⁺

Procedure to obtain *N*-Boc amine ALIPF212

Di-*tert*-butyl dicarbonate (1 eq., 4.15 mL, 19.39 mmol) was added to a solution of 4-aminobutyric acid (1 eq., 2 g, 19.39 mmol) in a mixture of NaOH – THF (1 : 2) at 0 °C, and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo, and water was added to the residue. The pH of solution was adjusted to pH 2 with 4M HCl, and the aqueous layer was extracted three times with diethyl ether. The organic layers were gathered together, washed with water, brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The solid obtained was dried over P₂O₅.

4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butanoic acid, ALIPF212

Appearance: white powder

mp = 95 – 97 ° C

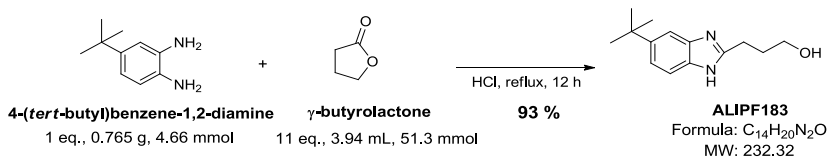
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.36 (s, 9H, *t*-Bu), 1.58 (m, 2H, CH₂), 2.18 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 2.90 (m, 2H, CH₂), 6.80 (s, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 204 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 2980 (C=O), 3348 (OH)

Procedure to obtain benzimidazoles ALIPF183, 186, 234

4-(*tert*-butyl)benzene-1,2-diamine (1 eq.) and the corresponding lactone (4 - 11 eq.) were suspended in 4M HCl in a sealed tube, and the mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, the pH was adjusted to pH 11 at 0 °C with a saturated solution of K₂CO₃. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. Diethyl ether (a mixture of CH₂Cl₂ – CH₃OH for **ALIPF186**) was added to the residue and the solid was recovered by filtration, and dried over P₂O₅.

3-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propan-1-ol, ALIPF183

Appearance: white powder

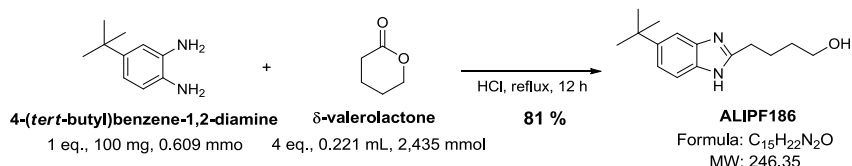
mp = 181 – 183 ° C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.90 (tt, $^3J = 6.0$, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂), 2.81 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂-Ar), 3.46 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂-OH), 4.61 (bs, 1H, OH), 7.20 (m, 1H, ArH), 7.35 (m, 2H, ArH), 11.97 (s, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): m/z 233 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 3117 (OH)

3-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propan-1-ol, ALIPF186



Appearance: white powder

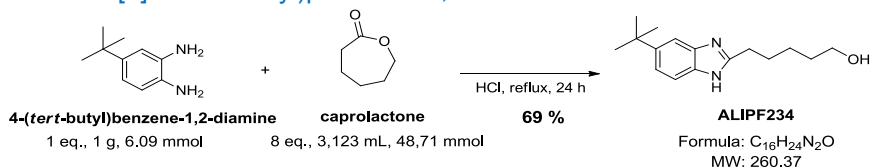
mp = 151 – 153 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.25 (s, 9H, *t*-Bu), 1.50 (tt, $^3J = 7.4$ Hz, 8.1 Hz, 2H, CH₂), 1.75 (tt, $^3J = 8.1$ Hz, 6.2 Hz, 2H, CH₂), 2.81 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂-Ar), 3.44 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, CH₂-OH), 4.39 (bs, 1H, OH), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 11.96 (s, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): m/z 247 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 2963 (OH)

5-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pentan-1-ol, ALIPF234



Appearance: white powder

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.74 (m, 2H, CH₂), 2.18 (m, 2H, CH₂), 2.76 (m, 2H, CH₂), 3.42 (m, 2H, CH₂), 4.36 (bs, 1H, OH), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 11.97 (bs, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁻): m/z 259 [M-H]⁻

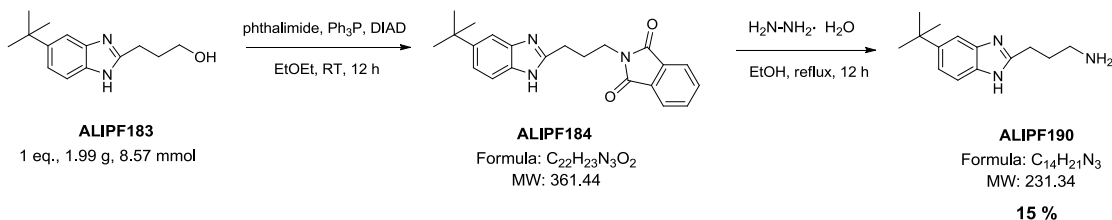
IR, ν (cm⁻¹): 3201 (OH)

Procedure to obtain primary amines ALIPF190, 188

Triphenylphosphine (2 eq.) was added in portions to a solution of the corresponding alcohol derivative (1 eq.), phthalimide (2 eq.) and DIAD (2 eq.) in diethyl ether, and the mixture was stirred overnight at room temperature. The visible solid (triphenylphosphine oxide) was discarded by filtration, and the filtrate was concentrated in vacuo. Diethyl ether was added to the residue and the solid was also discarded by filtration. The filtrate was concentrated in vacuo, and ethanol and hydrazine monohydrate (12 eq.) were added to the viscous residue. After being refluxed overnight, it was cooled to room temperature and the

visible solid (phthalhydrazide) was discarded by filtration. The filtrate was concentrated in vacuo, and ethanol was added to the residue. The visible solid was also discarded by filtration. The filtrate was concentrated in vacuo, and the residue was purified by column chromatography over silica gel (CH_2Cl_2 – $\text{CH}_3\text{OH}/\text{ammonia}$, 9 : 1). The oil obtained was dried over P_2O_5 .

2-(3-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione, ALIPF184



Appearance: yellowish powder

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 1.30 (s, 9H, *t*-Bu), 2.09 (tt, $^3J = 6.8$ Hz, 7.1 Hz, 2H, CH_2), 2.82 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 -Ar), 3.67 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2 - NH_2), 7.13 (m, 1H, ArH), 7.31 (m, 2H, ArH), 7.82 (bs, 4H, ArH), 11.97 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z 362 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

IR, ν (cm^{-1}): 1705 (C=O)

3-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propan-1-amine, ALIPF190

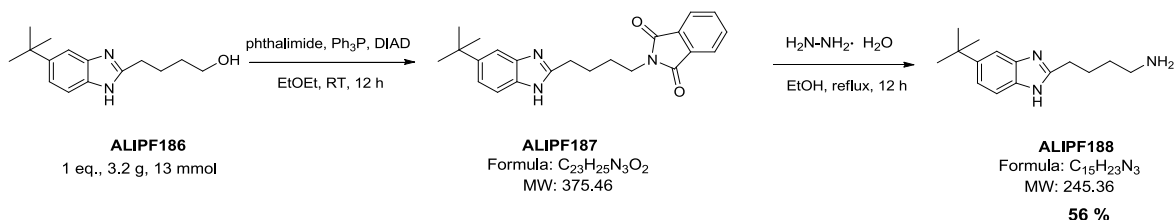
Appearance: brown oil

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 1.32 (m, 9H, *t*-Bu), 1.92 (m, 2H, CH_2), 2.66 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2 -Ar), 2.82 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2 - NH_2), 7.18 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH)

LC-MS (ESI $^+$): m/z 232 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

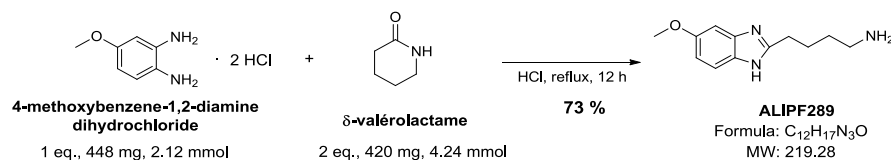
IR, ν (cm^{-1}): 3041 (NH)

2-(4-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)isoindoline-1,3-dione, ALIPF187

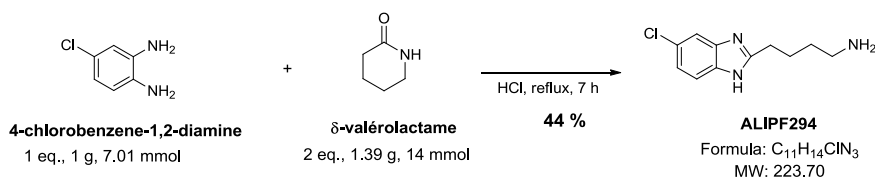


Appearance: yellowish powder

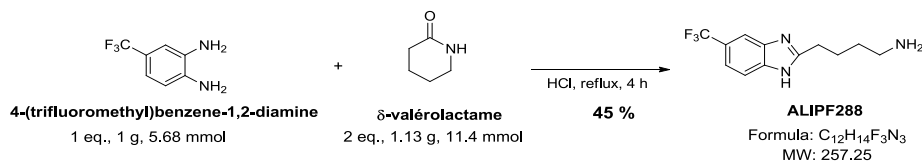
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 1.30 (s, 9H, *t*-Bu), 1.67 (m, 2H, CH_2), 1.74 (m, 2H, CH_2), 2.79 (m, 2H, CH_2 -Ar), 3.50 (m, 2H, CH_2 -NH), 7.15 (m, 1H, ArH), 7.31 (m, 2H, ArH), 7.83 (bs, 4H, ArH), 11.97 (s, 1H, NH)

4-(5-methoxy-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butan-1-amine, **ALIPF289****Appearance:** brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.61 (tt, ³*J* = 7.4, 2H, CH₂), 1.89 (tt, ³*J* = 7.4, 2H, CH₂), 2.82 (m, CH₂-NH₂), 3.04 (t, 2H, ³*J* = 7.4, CH₂-ArH), 3.82 (s, 1H, CH₃), 7.01 (m, 1H, ArH), 7.12 (m, 1H, ArH), 7.55 (m, 1H, ArH), 7.98 (bs, 2H, NH₂)

LC-MS (ESI⁺): m/z 220 [M+H]⁺4-(5-methoxy-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butan-1-amine, **ALIPF294****Appearance:** brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.43 (tt, ³*J* = 7.5, 2H, CH₂), 1.77 (tt, ³*J* = 7.5, 2H, CH₂), 2.60 (t, ³*J* = 7.5, CH₂-NH₂), 2.79 (t, 2H, ³*J* = 7.5, CH₂-ArH), 7.12 (m, 1H, ArH), 7.45 (m, 1H, ArH), 7.51 (m, 1H, ArH)

LC-MS (ESI⁻): m/z 222 [M-H]⁻**IR**, ν (cm⁻¹): 3348 (NH)4-(5-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butan-1-amine, **ALIPF288****Appearance:** brown oil

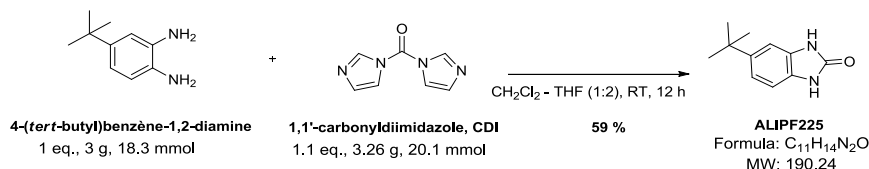
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.60 (tt, ³*J* = 7.2, 2H, CH₂), 1.84 (tt, ³*J* = 7.2, 2H, CH₂), 2.80 (t, ³*J* = 7.2, 2H, CH₂-NH₂), 2.89 (t, 2H, ³*J* = 7.2, CH₂-ArH), 7.44 (m, 1H, ArH), 7.65 (m, 1H, ArH), 7.82 (m, 1H, ArH), 8.78 (bs, 2H, NH₂)

LC-MS (ESI⁻): m/z 256 [M-H]⁻**IR**, ν (cm⁻¹): 3389 (NH)

Procedure to obtain benzimidazolone **ALIPF225**.

A solution of 4-(*tert*-butyl)benzene-1,2-diamine (1 eq., 3 g, 18.3 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added to a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (1.1 eq., 3.26 g, 20.1 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂ – THF (1 : 2, 60 mL), and it was stirred overnight at room temperature under nitrogen. After removing the solvent in vacuo, CH₂Cl₂ was added to the dry residue to give a white powder recovered by filtration. The filtrate was concentrated in vacuo, and last procedure was performed again to give a second precipitate. Both precipitates were gathered together and dried over P₂O₅.

5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-one, **ALIPF225**



Appearance: white powder

mp > 265 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.25 (s, 9H, *t*-Bu), 6.81 (m, 1H, ArH), 6.89 (m, 1H, ArH), 6.95 (m, 1H, ArH), 10.43 (s, 2H, NH).

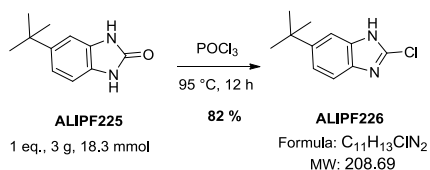
LC-MS (ESI⁺): *m/z* 191 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1701 (C=O)

Procedure to obtain benzimidazol **ALIPF226**.

A solution of **ALIPF225** (1 eq., 2.05 g, 10.8 mmol) in POCl₃ (30 mL) was stirred overnight at 95 °C. Toluene was added to the reaction mixture and it was concentrated in vacuo. Water was added to the resulting oil, and the suspension was extracted with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with 10% K₂CO₃, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. Diethyl ether was added to the residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

5-(*tert*-butyl)-2-chloro-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazole, **ALIPF226**



Appearance: white powder

mp = 196 – 198 °C

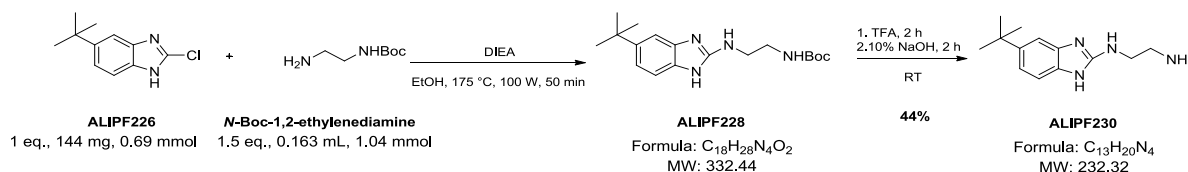
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.32 (s, 9H, *t*-Bu), 7.29 (m, 1H, ArH), 7.41 (m, 2H, ArH), 13.04 (bs, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 210 [M+H]⁺

Procedure to obtain amines **ALIPF230, 290**.

A mixture of **ALIPF226** (1 eq.), the corresponding amine (1.5 eq.) and DIEA (2 eq.) in EtOH (qsp 0.5 M) was stirred for 50 minutes in a microwave reactor, at 175 °C, at 100 W. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the residue was suspended in TFA (30 eq.). After stirring at room temperature for 4 hours, the solvent was removed in vacuo. 10% NaOH was added to the residue at 0 °C and the mixture was stirred for 2 hours. The aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂. The organic layers were gathered together, dried over CaCl₂, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ – CH₃OH/ammonia, 9 : 1). The oil obtained was dried over P₂O₅.

Tert-butyl (2-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)ethyl)carbamate, **ALIPF228**



Appearance: white powder

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.28 (s, 9H, *t*-Bu), 1.32 (s, 9H, *O*-*t*-Bu), 3.13 (m, 2H, CH₂), 3.2 (m, 2H, CH₂), 6.41 (s, 1H, NH-Boc), 6.92 (m, 3H, NH-Ar, ArH), 7.10 (m, 1H, ArH), 10.57 (bs, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 333 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 3327 (NH)

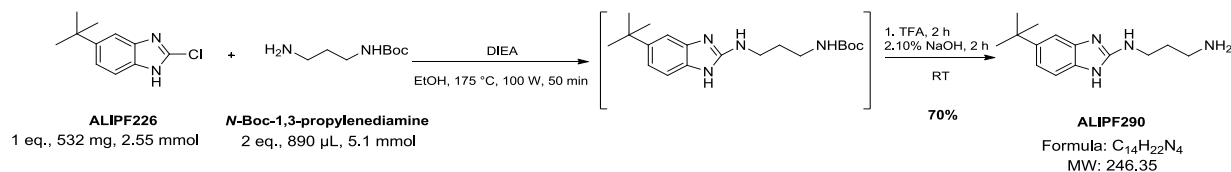
*N*¹-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)ethane-1,2-diamine, **ALIPF230**

Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.28 (s, 9H, *t*-Bu), 3.10 (m, 2H, CH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂), 6.72 (m, 1H, ArH), 7.05 (m, 1H, ArH), 7.16 (m, 1H, ArH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 233 [M+H]⁺

*N*¹-(5-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propane-1,3-diamine, **ALIPF290**



Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.28 (s, 9H, *t*-Bu), 1.62 (m, 2H, CH₂), 2.61 (m, 2H, CH₂-NH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂-NH), 6.88 (m, 1H, ArH), 6.99 (m, 1H, ArH), 7.11 (m, 1H, ArH)

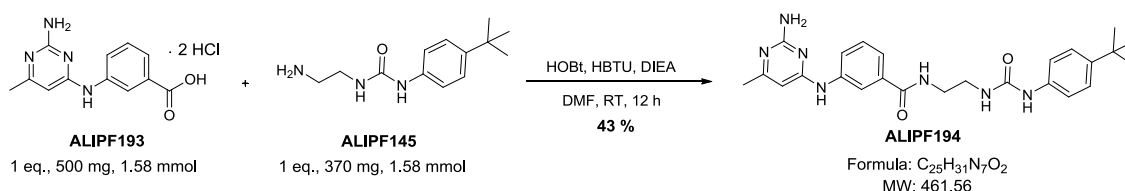
LC-MS (ESI⁺): *m/z* 247 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 3235 (NH)

General procedure to obtain amides **ALIPF194**, **197**, **198**, **199**, **201**, **200**, **277**, **242**, **211**, **244**, **292**, **240**, **233**, **269**, **283**, **273**, **271**, **275**, **284**

A solution of the corresponding amine (1 – 1.6 eq.) in DMF was added to a mixture of the corresponding carboxylic acid (1 – 1.2 eq.), DIEA (4 eq.), HOBT (0.5 eq.), and HBTU (1.5 eq.) in DMF, previously stirred for 20 minutes. After stirring overnight at RT, the reaction mixture was concentrated in vacuo. 10% NaOH was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH/ammonia, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)benzamide, **ALIPF194**



Appearance: white powder

mp = 177 – 179 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.29 (m, 2H, CH₂), 3.34 (m, 2H, CH₂), 6.00 (s, 1H, ArH), 6.31 (m, 1H, NH), 6.81 (bs, 2H, NH₂), 7.34 (m, 4H, ArH), 7.40 (m, 1H, ArH), 7.49 (m, 1H, ArH), 7.95 (s, 1H, ArH), 8.04 (m, 1H, ArH), 8.52 (m, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, NH), 9.75 (bs, 1H, NH)

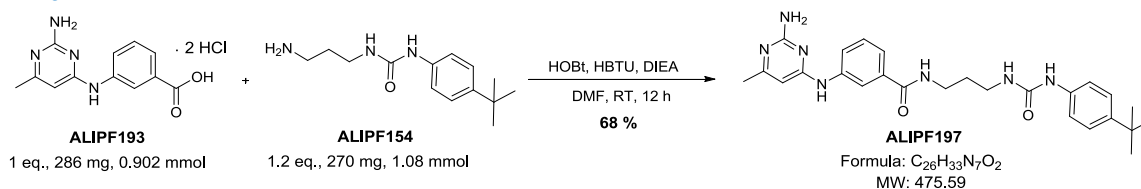
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 21.9, 31.7, 34.2, 96.2, 118.0, 119.8, 121.5, 123.3, 125.6, 129.0, 135.6, 138.3, 140.2, 143.7, 156.0, 160.4, 161.9, 166.8

LC-MS (APCI⁺): m/z 462 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₅H₃₂N₇O₂ [M+H]⁺ 462.2612, found 462.2594

IR, ν (cm⁻¹): 1632 (C=O), 1651 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)benzamide, **ALIPF197**



Appearance: white powder

mp = 220 – 222 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.65 (m, 2H, CH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 3.12 (m, 2H, CH₂), 3.36 (m, 2H, CH₂), 5.90 (s, 1H, ArH), 6.15 (m, 1H, NH), 6.29 (bs, 2H, NH₂), 7.27 (m, 4H, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 8.06 (m, 1H, ArH), 8.40 (m, 1H, NH), 8.42 (bs, 1H, NH), 9.26 (bs, 1H, NH)

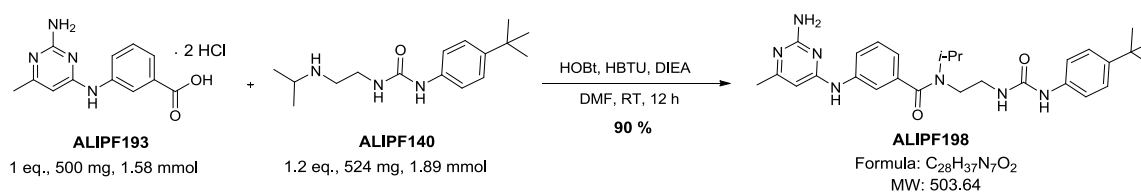
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.3, 30.5, 31.7, 34.2, 37.2, 95.6, 119.0, 120.5, 122.6, 125.6, 129.0, 135.7, 138.3, 141.0, 143.6, 155.9, 161.8, 162.4, 164.4, 166.8, 180.0

LC-MS (APCI⁺): m/z 476 [M+H]⁺

HRMS (ESI): m/z calculated C₂₆H₃₄N₇O₂ [M+H]⁺ 476.2768, found 476.2770

IR, ν (cm⁻¹): 1625 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)-*N*-isopropylbenzamide, **ALIPF198**



Appearance: white powder

mp = 208 – 210 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.11 (m, 6H, *i*-Pr), 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.32 (m, 4H, CH₂), 3.87 (m, 1H, CH), 5.92 (s, 1H, ArH), 6.27 (m, 1H, NH), 6.46 (bs, 2H, NH₂), 6.94 (m, 1H, ArH), 7.20 (m, 5H, ArH), 7.55 (m, 1H, ArH), 7.85 (m, 1H, ArH), 8.44 (bs, 1H, NH), 9.37 (bs, 1H, NH)

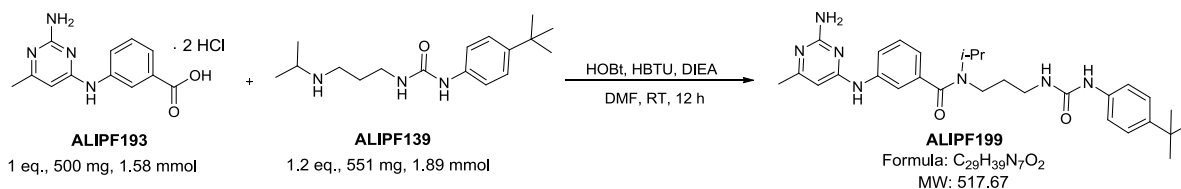
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 21.0, 22.9, 31.7, 34.2, 50.3, 95.8, 117.4, 118.1, 119.9, 120.6, 125.6, 129.3, 138.3, 140.7, 143.7, 155.9, 161.8, 163.4, 171.0, 179.8

LC-MS (APCI⁺): m/z 504 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₈H₃₈N₇O₂ [M+H]⁺ 504.3078, found 504.3078

IR, ν (cm⁻¹): 1660 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-*N*-isopropylbenzamide, **ALIPF199**



Appearance: white powder

mp = 154 - 156 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.08 (m, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.75 (m, 2H, CH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.55 (m, 2H, CH₂-NH), 3.15 (m, 2H, CH₂-N), 3.88 (m, 1H, CH), 5.94 (s, 1H, ArH), 6.14 (m, 1H, NH), 6.24 (bs, 2H, NH₂), 6.86 (m, 1H, ArH), 7.27 (m, 5H, ArH), 7.46 (m, 1H, ArH), 7.90 (m, 1H, ArH), 8.38 (bs, 1H, NH), 9.18 (bs, 1H, NH)

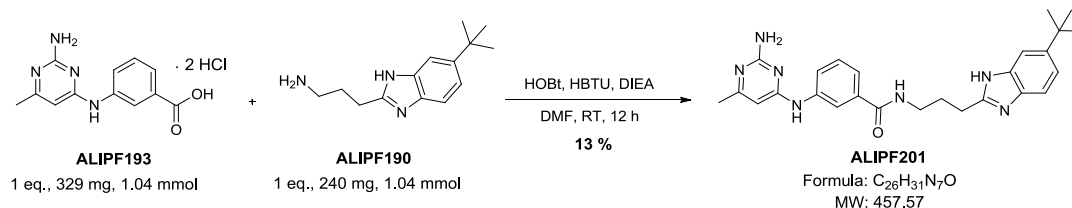
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 21.1, 23.4, 31.7, 34.2, 37.6, 50.2, 95.68, 116.9, 118.0, 119.3, 120.2, 125.6, 129.3, 138.4, 141.0, 143.6, 155.8, 161.8, 162.5, 164.5, 170.7

LC-MS (APCI⁺): m/z 518 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₉H₄₀N₇O₂ [M+H]⁺ 518.3238, found 518.3237

IR, ν (cm⁻¹): 1659 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(3-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propyl)benzamide, **ALIPF201**



Appearance: white powder

mp = 201 - 203 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 2.01 (m, 2H, CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.85 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.35 (m, 2H, CH₂-N), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.16 (bs, 2H, NH₂), 7.18 (m, 1H, ArH), 7.35 (m, 4H, ArH), 7.88 (m, 1H, ArH), 8.08 (m, 1H, ArH), 8.56 (m, 1H, NH), 9.14 (bs, 1H, NH), 12.04 (bs, 1H, NH)

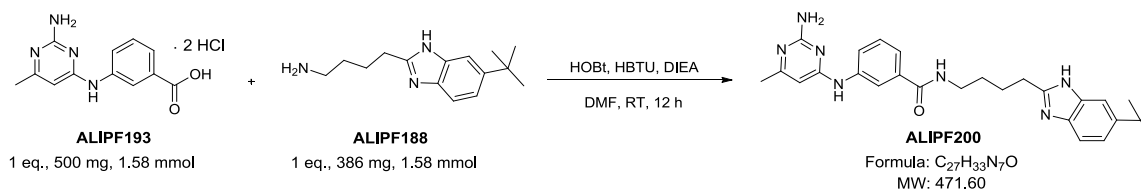
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.8, 26.7, 27.9, 32.2, 34.8, 95.4, 118.8, 119.4, 120.2, 122.4, 128.9, 135.7, 141.3, 144.3, 155.0, 161.8, 163.1, 165.4, 166.9, 180.0

LC-MS (APCI⁺): m/z 458 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₆H₃₂N₇O [M+H]⁺ 458.2662, found 458.2636

IR, ν (cm⁻¹): 1572 (C=O)

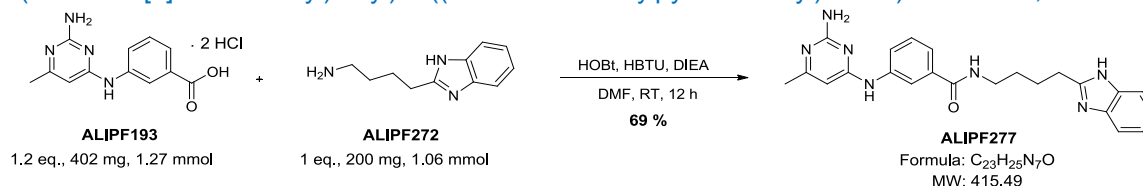
3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, **ALIPF200**



Appearance: white powder**mp** = 137 - 139 °C

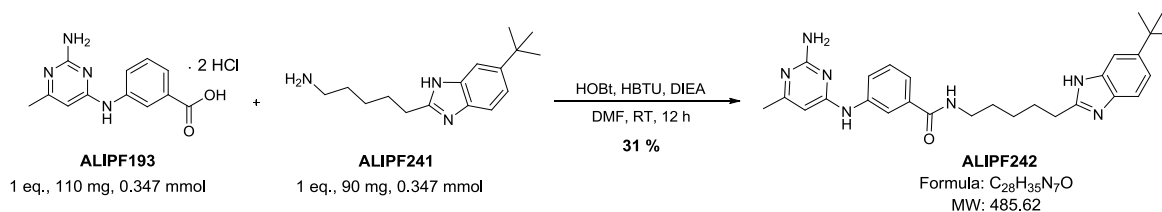
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.33 (s, 9H, *t*-Bu), 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.81 (m, 2H, CH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.83 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.29 (m, 2H, CH₂-N), 5.89 (s, 1H, ArH), 6.18 (bs, 2H, NH₂), 7.17 (m, 1H, ArH), 7.20 (m, 4H, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH), 8.10 (m, 1H, ArH), 8.39 (m, 1H, NH), 9.14 (bs, 1H, NH), 12.01 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.8, 25.5, 28.6, 29.2, 32.2, 34.8, 95.4, 118.8, 119.3, 120.2, 122.4, 128.9, 135.8, 141.2, 144.2, 155.2, 161.8, 163.1, 165.4, 166.7

LC-MS (APCI⁺): *m/z* 472 [M+H]⁺**HRMS** (ESI⁺): *m/z* calculated C₂₇H₃₄N₇O [M+H]⁺ 472.2819, found 472.2798**IR**, ν (cm⁻¹): 1571 (C=O)***N*-(4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)-3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzamide, ALIPF277****Appearance:** white powder**mp** = 245 - 247 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.83 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.85 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.31 (m, 2H, CH₂-N), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.14 (bs, 2H, NH₂), 7.11 (m, 2H, ArH), 7.35 (m, 3H, ArH), 7.50 (m, 1H, ArH), 7.84 (s, 1H, ArH), 8.10 (m, 1H, ArH), 8.39 (m, 1H, NH), 9.11 (s, 1H, NH), 12.16 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.9, 25.5, 28.6, 29.2, 39.9, 95.3, 118.5, 118.8, 120.1, 121.2, 121.7, 122.3, 128.9, 135.7, 141.3, 155.4, 161.8, 163.3, 165.7, 166.7

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 416 [M+H]⁺**HRMS** (ESI⁺): *m/z* calculated C₂₃H₂₆N₇O [M+H]⁺ 416.2193, found 416.2164**IR**, ν (cm⁻¹): 1569 (C=O)**3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(5-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pentyl)benzamide, ALIPF242**

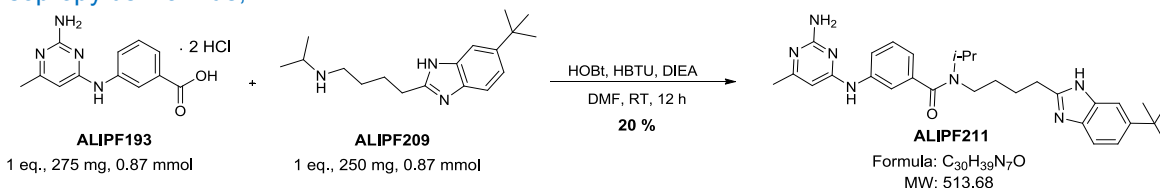
Appearance: white powder**mp** = 150 – 152 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.36 (m, 2H, CH₂), 1.57 (m, 2H, CH₂), 1.78 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.78 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.25 (m, 2H, CH₂-NH), 5.89 (s, 1H, ArH), 6.23 (bs, 2H, NH₂), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.33 (m, 4H, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH), 8.06 (m, 1H, ArH), 8.35 (m, 1H, NH), 9.19 (bs, 1H, NH), 11.92 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.6, 26.5, 27.8, 28.9, 29.3, 32.2, 34.8, 95.4, 118.9, 119.3, 120.3, 122.4, 128.9, 135.8, 141.1, 144.2, 155.3, 161.8, 162.8, 164.9, 166.7

LC-MS (ESI⁻): m/z 484 [M-H]⁻**HRMS** (ESI⁺): m/z calculated C₂₈H₃₆N₇O [M+H]⁺ 486.2975, found 486.2955**IR**, ν (cm⁻¹): 1572 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)-*N*-isopropylbenzamide, **ALIPF211**

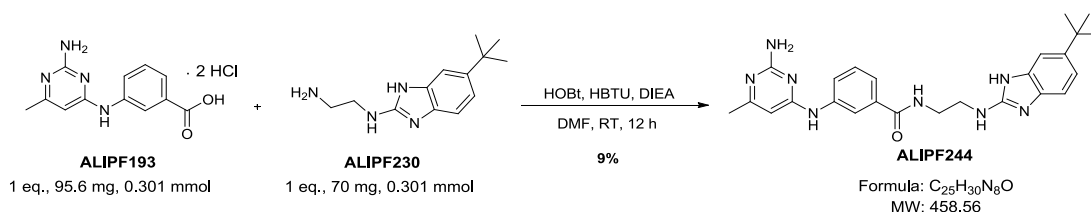
**Appearance:** white powder**mp** = 130 – 132 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (m, 6H, *i*-Pr), 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.65 (m, 2H, CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.83 (m, 2H, CH₂-Ar), 2.97 (m, 2H, CH₂-N), 3.85 (m, 1H, CH), 5.91 (s, 1H, ArH), 6.34 (bs, 2H, NH₂), 6.85 (m, 1H, ArH), 7.38 (m, 1H, ArH), 7.65 (m, 4H, ArH), 7.94 (m, 1H, ArH), 9.30 (bs, 1H, NH), 12.10 (bs, 1H, NH)

(75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 15.63, 21.2, 23.2, 26.0, 28.8, 29.0, 32.2, 34.8, 50.2, 65.3, 95.7, 117.0, 118.2, 119.3, 120.2, 129.2, 137.3, 138.5, 141.0, 144.3, 155.2, 161.8, 162.3, 164.1, 170.5

LC-MS (ESI⁻): m/z 512 [M-H]⁻**HRMS** (ESI⁺): m/z calculated C₃₀H₄₀N₇O [M+H]⁺ 514.2388, found 514.3265**IR**, ν (cm⁻¹): 1571 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(2-((6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)ethyl)benzamide, **ALIPF244**



Appearance: white powder

mp= 182 – 184 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.28 (s, 9H, *t*-Bu), 2.08 (s, 3H, CH₃), 3.48 (m, 4H, CH₂-NH), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.13 (bs, 2H, NH₂), 6.70 (m, 1H, NH), 6.90 (m, 1H, ArH), 7.04 (m, 1H, ArH), 7.16 (s, 1H, ArH), 7.30 (m, 1H, ArH), 7.42 (m, 1H, ArH), 7.89 (m, 1H, ArH), 8.12 (m, 1H, ArH), 8.98 (m, 1H, NH), 9.13 (s, 1H, NH), 10.70 (bs, 1H, NH)

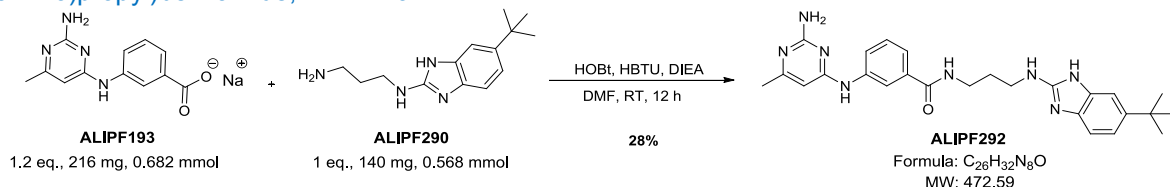
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.9, 29.4, 32.3, 34.6, 41.2, 42.0, 95.4, 118.7, 118.8, 120.1, 122.3, 128.9, 135.5, 141.3, 141.4, 156.2, 161.7, 161.8, 163.2, 165.6, 166.9, 166.9

LC-MS (ESI⁻): m/z 457 [M-H]⁻

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₅H₃₁N₈O [M+H]⁺ 459.2615, found 459.2598

IR, ν (cm⁻¹): 1571 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(3-((6-*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)propyl)benzamide, **ALIPF292**



Appearance: yellowish powder

mp = 160 – 162 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.27 (s, 9H, *t*-Bu), 1.79 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.35 (m, 4H, CH₂), 5.90 (s, 1H, ArH), 6.19 (bs, 2H, NH₂), 6.79 (m, 1H, NH), 6.94 (m, 1H, ArH), 7.04 (m, 1H, ArH), 7.14 (m, 1H, ArH), 7.35 (m, 1H, ArH), 7.46 (m, 1H, ArH), 7.93 (m, 1H, ArH), 8.09 (m, 1H, ArH), 8.71 (m, 1H, NH), 9.18 (bs, 1H, NH), 11.02 (bs, 1H, NH)

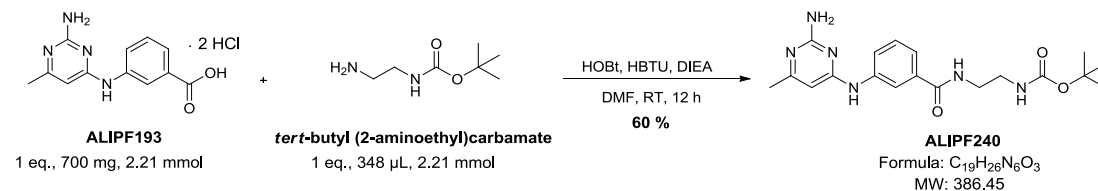
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.7, 30.0, 32.0, 32.1, 32.2, 34.6, 36.8, 95.4, 117.2, 118.9, 120.2, 122.5, 128.9, 135.7, 141.3, 142.6, 155.7, 161.8, 163.0, 165.2, 166.8

LC-MS (ESI⁺): m/z 473 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₂₆H₃₁N₈O [M-H]⁻ 471.2615, found 471.2594

IR, ν (cm⁻¹): 1570 (C=O)

Tert-butyl (2-(3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzamido)ethyl)carbamate, **ALIPF240**



Appearance: beige powder

mp = 163 – 165 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.36 (s, 9H, *t*-Bu), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.09 (m, 2H, CH₂), 3.29 (m, 2H, CH₂), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.17 (bs, 1H, NH₂), 6.90 (m, 1H, NH), 7.34 (m, 2H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 8.06 (m, 1H, ArH), 8.33 (m, 1H, NH), 9.14 (bs, 1H, NH)

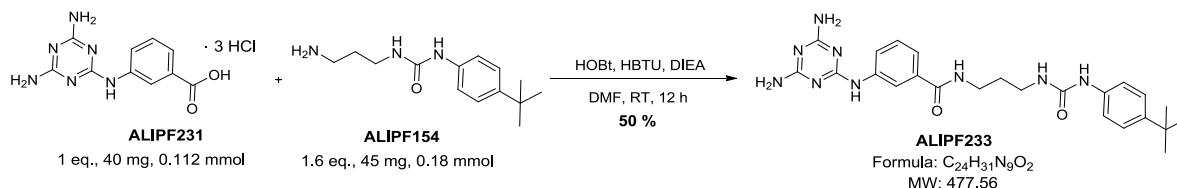
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.8, 28.6, 78.1, 95.3, 118.8, 120.2, 122.4, 128.8, 135.5, 141.3, 156.2, 161.8, 163.1, 165.4, 166.9

LC-MS (ESI⁺): m/z 387 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₁₉H₂₇N₆O₃ [M+H]⁺ 387.2139, found 387.2124

IR, ν (cm⁻¹): 1642 (C=O), 1687 (C=O)

***N*-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-3-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzamide, ALIPF233**



Appearance: beige powder

mp = 140 - 142 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.65 (m, 2H, CH₂), 3.13 (m, 2H, CH₂), 3.32 (m, 2H, CH₂), 6.15 (m, 1H, NH), 6.56 (bs, 4H, NH₂), 7.23 – 7.39 (m, 6H, ArH), 7.98 (m, 2H, ArH), 8.34 (m, 1H, NH), 8.43 (bs, 1H, NH), 9.13 (bs, 1H, NH)

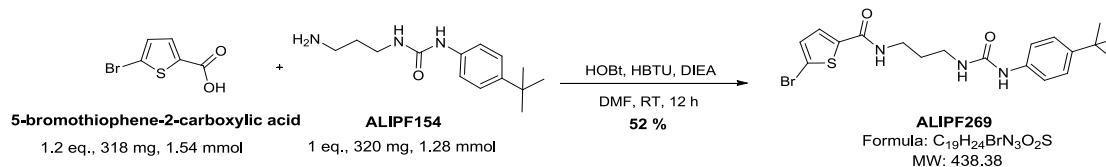
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 19.2, 30.5, 31.7, 34.2, 37.2, 46.7, 118.0, 119.6, 120.6, 123.1, 125.6, 128.6, 135.6, 138.3, 140.7, 143.6, 155.9, 164.8, 166.0, 167.0

LC-MS (ESI⁻): m/z 476 [M-H]⁻

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₄H₃₂N₉O₂ [M+H]⁺ 478.2673, found 478.2662

IR, ν (cm⁻¹): 1536 (C=O), 1594 (C=O)

5-bromo-*N*-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF269



Appearance: white powder

mp = 111 – 113 °C

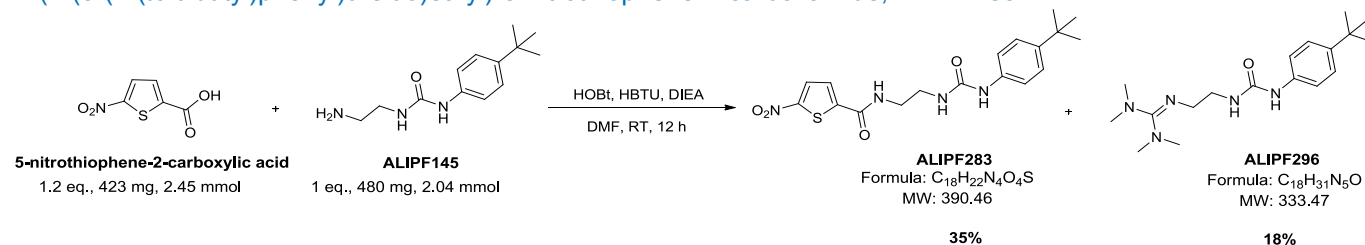
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.64 (tt, ³*J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 3.10 (td, ³*J* = 5.3, 6.3 Hz, 2H, CH₂-amide), 3.25 (td, ³*J* = 5.5, 6.3 Hz, 2H, CH₂-urea), 6.11 (t, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, NH_{urea}), 7.21 (m, 2H, ArH), 7.28 (m, 3H, ArH), 7.56 (d, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, ArH), 8.40 (s, 1H, NH_{urea}), 8.58 (t, ³*J* = 5.3 Hz, 1H, CONH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 30.4, 31.7, 34.2, 37.2, 40.0, 116.9, 117.9, 125.6, 128.9, 131.9, 138.3, 142.3, 143.6, 155.8, 160.5

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 438 [M+H]⁺ for ⁷⁹Br, 440 [M+H]⁺ for ⁸¹Br

IR, ν (cm⁻¹): 1620 (C=O), 1634 (C=O), 3313 (CON-H)

N-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, **ALIPF283**



Appearance: yellow powder

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 3.28 (m, 2H, CH₂), 3.34 (m, 2H, CH₂), 6.20 (m, 1H, NH_{urea}), 7.26 (m, 4H, ArH), 7.78 (d, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, ArH), 8.14 (d, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, ArH), 8.42 (bs, 1H, NH_{urea}), 9.07 (m, 1H, NH_{amide})

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 391 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1649 (C=O), 1710 (C=O)

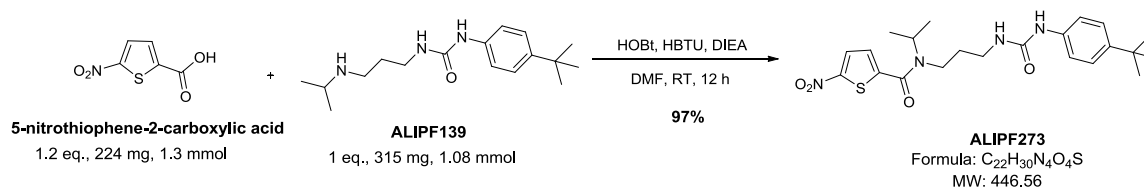
1-(2-((bis(dimethylamino)methylene)amino)ethyl)-3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)urea, **ALIPF296**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 2.88 (bs, 12H, CH₃), 3.24 (m, 4H, CH₂), 6.20 (m, 1H, NH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.52 (s, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 334 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1658 (C=O)

N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-*N*-isopropyl-5-nitrothiophene-2-carboxamide, **ALIPF273**



Appearance: yellow powder

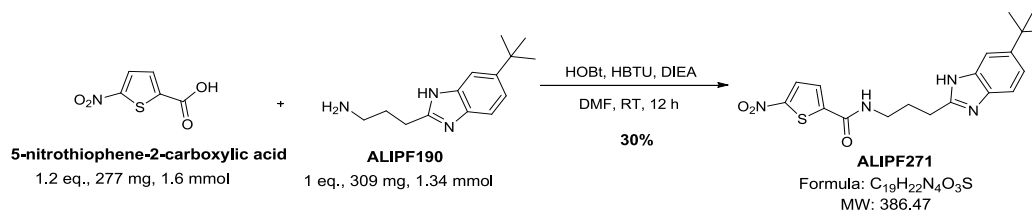
mp = 84 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.19 (m, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.73 (m, 2H, CH₂), 3.09 (m, 2H, CH₂), 3.35 (m, 2H, CH₂), 4.24 (m, 1H, CH), 6.12 (m, 1H, NH_{urea}), 7.23 (m, 4H, ArH), 7.40 (m, 1H, ArH), 8.02 (m, 1H, ArH), 8.34 (bs, 1H, NH_{urea})

LC-MS (ESI⁺): m/z 447 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1653 (C=O), 1597 (C=O), 3340 (N-H)

N-(3-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF271



Appearance: yellow powder

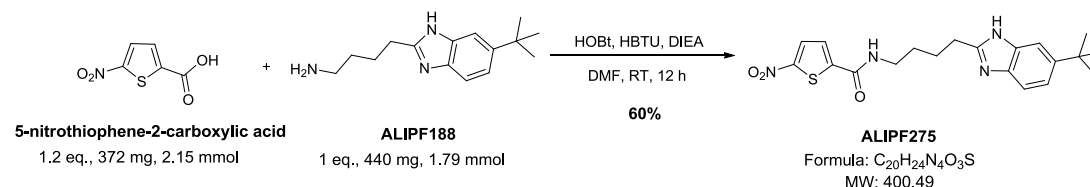
mp = 187 - 189 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 2.03 (tt, ³J = 6.8, 7.3 Hz, 2H, CH₂), 2.85 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, CH₂-Ar), 3.35 (td, ³J = 5.4, 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 7.17 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 7.77 (d, ³J = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.11 (d, ³J = 4.3 Hz, 1H, ArH), 9.09 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, NH_{amide}), 12.07 (bs, 1H, NH_{benz})

LC-MS (ESI⁺): m/z 387 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1633 (C=O), 3344 (CON-H)

N-(4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)butyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, ALIPF275



Appearance: orange powder

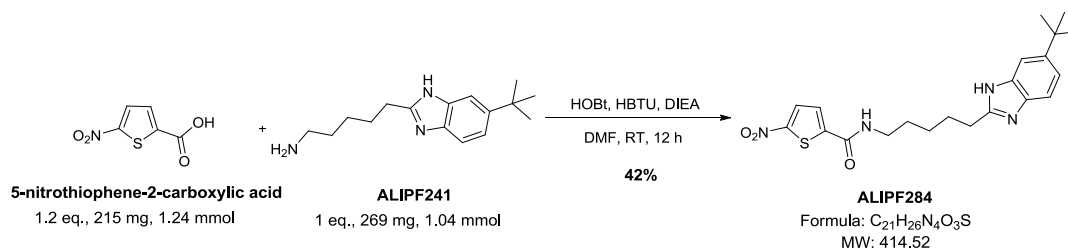
mp = 125 - 127 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.32 (s, 9H, *t*-Bu), 1.57 (tt, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.80 (tt, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 2.84 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂-Ar), 3.30 (td, ³J = 5.3, 7.4 Hz, 2H, CH₂-NH), 7.23 (m, 1H, ArH), 7.40 (m, 2H, ArH), 7.76 (d, ³J = 4.4 Hz, 1H, ArH), 8.12 (d, ³J = 4.4 Hz, 1H, ArH), 8.97 (t, ³J = 5.3 Hz, 1H, NH_{amide}), 12.44 (bs, 1H, NH_{benz})

LC-MS (ESI⁻): m/z 399 [M-H]⁻

IR, ν (cm^{-1}): 1631 (C=O)

N-(5-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pentyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, **ALIPF284**



Appearance: orange powder

mp = 74 – 76 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.36 (tt, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.57 (tt, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.77 (tt, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 2.78 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-Ar), 3.26 (td, ³*J* = 5.2, 7.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 7.75 (d, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.11 (d, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.95 (t, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, NH_{amide}), 12.05 (bs, 1H, NH_{benz})

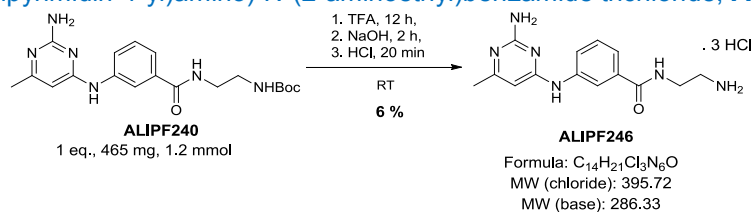
LC-MS (ESI⁻): *m/z* 413 [M-H]⁻

IR, ν (cm^{-1}): 1632 (C=O)

Procedure to obtain amine ALIPF246

ALIPF240 (1 eq., 465 mg, 1.2 mmol) was suspended in TFA (50.7 eq., 4.53 mL, 61 mmol) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed in vacuo, 10% NaOH was added to the residue, and it stirred for 2 hours. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH/ammonia, 9 : 1). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and the residue was suspended in diethyl ether, to which 50 μ L of 5-6N HCl in isopropanol were added dropwise. After stirring for 20 minutes, the visible solid was recovered by filtration, washed with diethyl ether, and dried over P₂O₅.

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(2-aminoethyl)benzamide trichloride, ALIPF246



Appearance: beige powder

mp = 160 - 162 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.99 (m, 2H, CH₂), 3.52 (m, 2H, CH₂), 6.06 (s, 1H, ArH), 7.15 (bs, 3H, NH₃⁺), 7.41 (m, 1H, ArH), 7.58 (m, 1H, ArH), 8.00 (m, 5H, ArH, NH₃⁺), 8.69 (m, 1H, CONH), 10.07 (bs, 2H, NH₂⁺)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 21.0, 37.6, 95.5, 120.2, 122.3, 123.9, 129.1, 135.2, 139.8, 162.0, 167.1

LC-MS (ESI $^+$): m/z 287 [M+H] $^+$

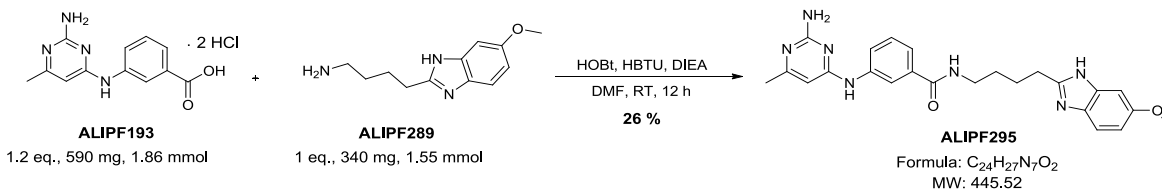
HRMS (ESI $^+$): m/z calculated C $_{14}$ H $_{19}$ N $_6$ O [M+H] $^+$ 287.1614, found 287.1651

IR, ν (cm $^{-1}$): 1653 (C=O)

General procedure to obtain amides 295, 297, 293, 306, 301

A solution of the corresponding amine (1 – 1.6 eq.) in DMF was added to a mixture of the corresponding carboxylic acid (1 – 1.2 eq.), DIEA (4 eq.), HOBt (0.5 eq.), and HBTU (1 eq.) in DMF, previously stirred for 20 minutes. After stirring overnight at RT, the reaction mixture was concentrated in vacuo. 10% NaOH was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO $_4$, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH $_2$ Cl $_2$ - CH $_3$ OH/ammonia, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder (except for **ALIPF306** that is an oil) which was recovered by filtration and dried over P $_2$ O $_5$.

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(4-(6-methoxy-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, **ALIPF295**



Appearance: white powder

mp = 142 - 144 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.58 (m, 2H, CH $_2$), 1.79 (m, 2H, CH $_2$), 2.09 (s, 3H, CH $_3$), 2.80 (m, 2H, CH $_2$ -Ar), 3.31 (m, 2H, CH $_2$ -NH), 3.74 (s, 3H, OCH $_3$), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.19 (bs, 2H, NH $_2$), 6.72 (m, 1H, ArH), 6.96 (m, 1H, ArH), 7.32 (m, 3H, ArH), 7.84 (m, 1H, ArH), 8.09 (m, 1H, ArH), 8.39 (m, 1H, NH), 9.16 (s, 1H, NH), 12.00 (bs, 1H, NH)

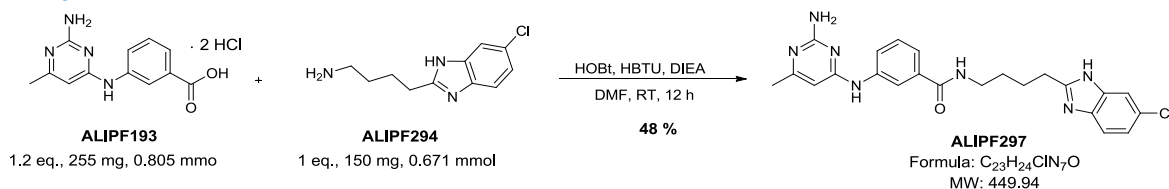
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 23.8, 25.5, 28.6, 29.2, 55.8, 95.4, 110.6, 112.8, 118.8, 120.3, 122.4, 124.5, 128.9, 135.7, 141.2, 155.5, 161.8, 163.0, 165.3, 166.7

LC-MS (ESI $^+$): m/z 446 [M+H] $^+$

HRMS (ESI $^-$): m/z calculated C $_{24}$ H $_{26}$ N $_7$ O $_2$ [M-H] $^-$ 444.2142, found 444.2125

IR, ν (cm $^{-1}$): 1572 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(4-(6-chloro-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, ALIPF297



Appearance: white powder

mp = 143 - 145 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.81 (m, 2H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.49 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.30 (m, 2H, CH₂-NH), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.21 (bs, 2H, NH₂), 7.12 (m, 1H, ArH), 7.34 (m, 2H, ArH), 7.47 (m, 2H, ArH), 7.84 (m, 1H, ArH), 8.08 (m, 1H, ArH), 8.38 (m, 1H, CONH), 9.17 (s, 1H, NH), 12.37 (bs, 1H, NH)

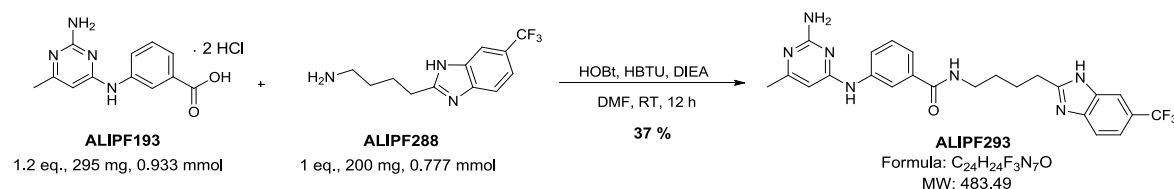
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.7, 25.3, 28.6, 29.2, 95.4, 118.0, 118.9, 120.3, 121.7, 122.4, 125.8, 128.9, 135.7, 141.1, 157.2, 161.8, 162.9, 165.1, 166.7

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 450 [M+H]⁺ for ³⁵Cl and 452 [M+H]⁺ for ³⁷Cl

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated C₂₃H₂₃ClN₇O [M+H]⁺ 448.1647, found 448.1633

IR, ν (cm⁻¹): 1621 (C=O)

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(4-(6-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)butyl)benzamide, ALIPF293



Appearance: white powder

mp = 176 - 178 °C

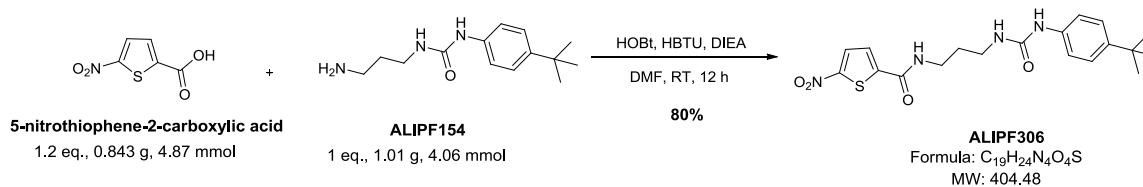
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.84 (m, 2H, CH₂), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.90 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.29 (m, 2H, CH₂-NH), 5.90 (s, 1H, ArH), 6.33 (bs, 2H, NH₂), 7.34 (m, 2H, ArH), 7.44 (m, 1H, ArH), 7.60 (m, 1H, ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 7.84 (m, 1H, ArH), 8.07 (m, 1H, ArH), 8.39 (m, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH), 12.63 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.2, 25.3, 28.6, 29.2, 95.6, 112.0, 115.7, 118.6, 119.1, 120.6, 122.6, 128.9, 135.8, 140.9, 161.8, 162.3, 164.1, 166.7

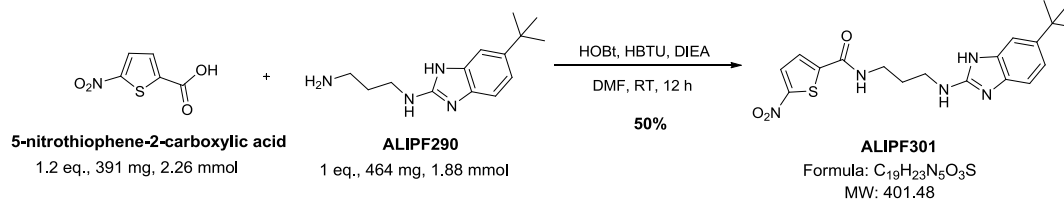
LC-MS (ESI⁺): *m/z* 484 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated C₂₄H₂₃F₃N₇O [M-H]⁻ 482.1910, found 482.1886

IR, ν (cm⁻¹): 1572 (C=O)

N*-3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, **ALIPF306***Appearance:** yellow oil

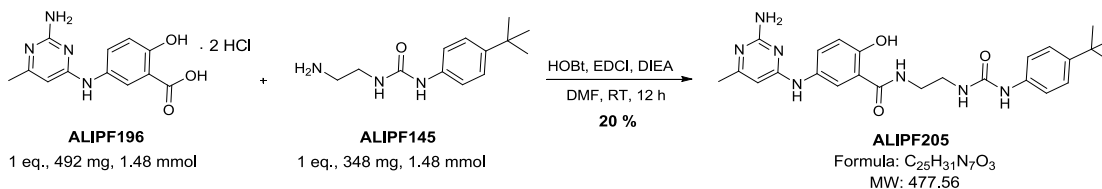
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.68 (m, 2H, CH₂), 3.13 (m, 2H, CH₂), 3.30 (m, 2H, CH₂), 6.12 (m, 1H, NH_{urea}), 7.24 (m, 4H, ArH), 7.77 (d, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.12 (d, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, ArH), 8.39 (bs, 1H, NH_{urea}), 8.99 (m, 1H, NH_{amide})

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 405 [M+H]⁺**IR**, ν (cm⁻¹): 1598 (C=O), 1650 (C=O), 3311 (N-H)***N*-3-(((6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)propyl)-5-nitrothiophene-2-carboxamide, **ALIPF301******Appearance:** brownish powder**mp** = 181 – 183 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.30 (s, 9H, *t*-Bu), 1.88 (m, 2H, CH₂), 2.90 (m, 2H, CH₂-CONH), 3.34 (m, 2H, CH₂-NHAr), 7.25 (m, 3H, ArH), 7.81 (m, 1H, ArH), 8.14 (m, 1H, ArH), 8.55 (bs, 1H, NH-Ar), 9.11 (m, 1H, NH_{amide}), 12.29 (bs, 1H, NH_{benz})

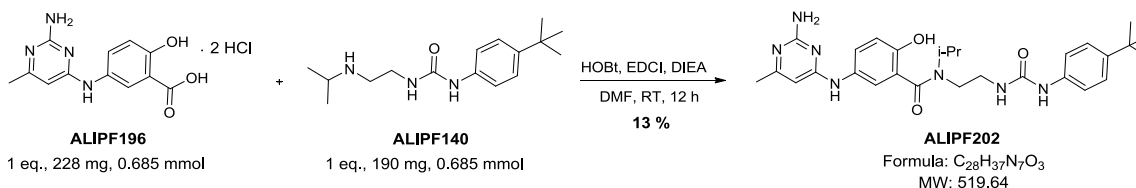
LC-MS (ESI⁺): *m/z* 402 [M+H]⁺**IR**, ν (cm⁻¹): 1628 (C=O)**General procedure to obtain amides **ALIPF205**, **202**, **203**.**

A mixture of **ALIPF196** (1 eq.), the corresponding amine (1 eq.), HOBt (1.5 eq.), EDCI (2.5 eq.), and DIEA (4.5 eq.) in DMF was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated in vacuo and 2N NaOH was added to the residue. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ – CH₃OH/ammonia, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)-2-hydroxybenzamide, **ALIPF205****Appearance:** white powder**mp** = 228 – 230 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.35 (m, 4H, CH₂), 5.87 (s, 1H, ArH), 6.34 (bs, 1H, NH), 6.61 (bs, 2H, NH₂), 6.90 (m, 1H, ArH), 7.20 (m, 4H, ArH), 7.57 (m, 1H, ArH), 7.96 (s, 1H, ArH), 8.55 (bs, 1H, NH), 8.80 (bs, 1H, NH), 9.33 (bs, 1H, NH), 12.19 (bs, 1H, OH)

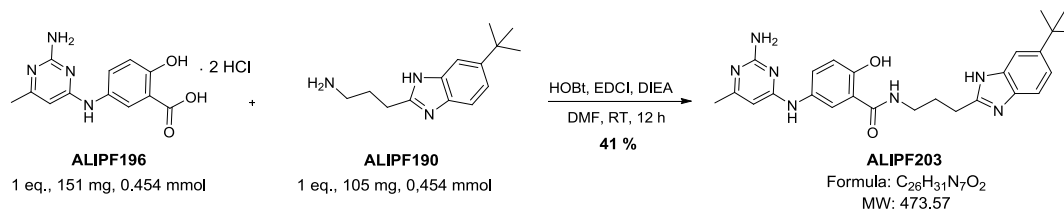
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 22.2, 31.7, 34.2, 95.0, 116.0, 117.9, 118.1, 121.9, 125.6, 128.6, 131.1, 138.2, 143.7, 156.1, 160.9, 161.2, 161.4, 162.4, 168.8

LC-MS (APCI⁺): m/z 478 [M+H]⁺**HRMS** (ESI⁺): m/z calculated C₂₅H₃₂N₇O₃ [M+H]⁺ 478.2561, found 478.2545**IR**, ν (cm⁻¹): 1651 (C=O)5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)-2-hydroxy-*N*-isopropylbenzamide, **ALIPF202****Appearance:** white powder**mp** = 166 – 168 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.12 (m, 6H, *i*-Pr), 1.24 (s, 9H, *t*-Bu), 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.32 (m, 4H, CH₂), 3.77 (m, 1H, CH), 5.75 (s, 1H, ArH), 5.97 (bs, 2H, NH₂), 6.29 (m, 1H, NH), 6.80 (m, 1H, ArH), 7.20 (m, 5H, ArH), 7.52 (m, 1H, ArH), 8.48 (bs, 1H, NH), 8.68 (bs, 1H, OH), 9.39 (m, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 21.2, 23.9, 31.7, 34.2, 49.9, 94.3, 116.1, 118.1, 119.9, 122.8, 125.6, 132.6, 138.2, 143.7, 155.9, 162.1, 163.3, 165.2

LC-MS (APCI⁺): m/z 520 [M+H]⁺**HRMS** (ESI⁺): m/z calculated C₂₈H₃₈N₇O₃ [M+H]⁺ 520.3030, found 520.3034**IR**, ν (cm⁻¹): 1582 (C=O), 1649 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-2-hydroxybenzamide, **ALIPF203**

Appearance: white powder

mp = 178 – 180 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.30 (s, 9H, *t*-Bu), 1.91 (m, 2H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.86 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.34 (m, 2H, CH₂-NH), 5.76 (s, 1H, ArH), 6.10 (bs, 2H, NH₂), 6.86 (m, 1H, ArH), 7.19 (m, 1H, ArH), 7.37 (m, 2H, ArH), 7.60 (m, 1H, ArH), 7.92 (m, 1H, ArH), 8.80 (bs, 1H, OH), 8.87 (m, 1H, NH), 12.09 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.6, 26.6, 27.7, 32.1, 34.8, 94.3, 116.0, 117.7, 119.3, 121.4, 128.3, 131.8, 144.3, 154.8, 155.6, 162.4, 163.0, 164.8, 168.8

LC-MS (APCI⁺): *m/z* 474 [M+H]⁺

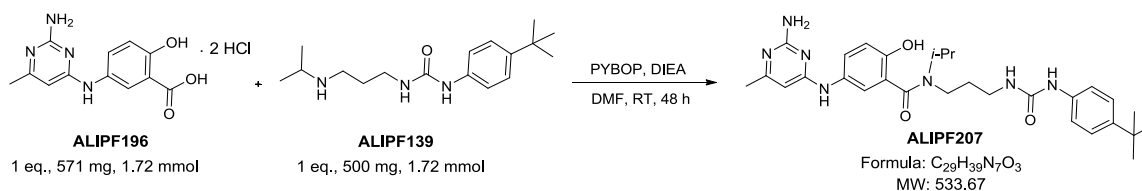
HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated C₂₆H₃₂N₇O₂ [M+H]⁺ 474.2612 found 474.2586

IR, ν (cm⁻¹): 1584 (C=O)

Procedure to obtain amide ALIPF207

A mixture of **ALIPF196** (1 eq., 571 mg, 1.72 mmol), **ALIPF139** (1 eq., 500 mg, 1.72 mmol), PYBOP (1.2 eq., 1.071 g, 2.06 mmol), and DIEA (4 eq., 1.13 mL, 6.86 mmol) in DMF (10 mL) was stirred 48 hours at room temperature. The reaction mixture was concentrated in vacuo and 2N NaOH was added to the residue. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ – CH₃OH/ammonia, 98 : 2). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-2-hydroxy-*N*-isopropylbenzamide, **ALIPF207**



Appearance: white powder

mp = 179 - 181 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.10 (m, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.74 (m, 2H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 3.14 (m, 2H, CH₂-NH), 3.39 (m, 2H, CH₂-N), 3.75 (m, 1H, CH), 5.92 (s, 1H, ArH), 6.17 (m, 1H, NH), 6.85 (m, 1H, ArH), 7.22 (m, 7H, ArH, NH₂), 7.56 (m, 1H, ArH), 8.40 (bs, 1H, NH), 9.67 (bs, 1H, OH), 9.80 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 20.2, 21.3, 31.7, 34.2, 37.6, 37.9, 50.1, 96.1, 116.2, 117.9, 121.2, 124.1, 125.6, 130.5, 138.4, 143.6, 150.3, 155.8, 157.9, 162.1, 168.1

LC-MS (APCI⁺): m/z 534 [M+H]⁺

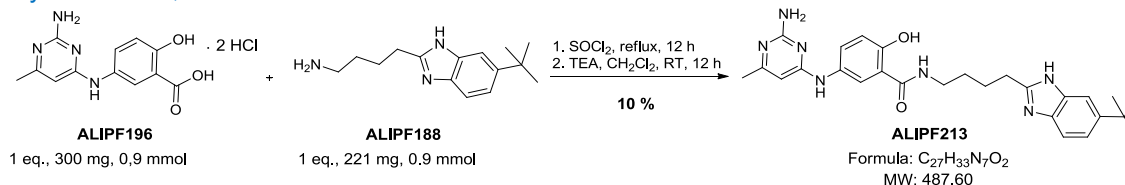
HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₉H₄₀N₇O₃ [M+H]⁺ 534.3187, found 534.3163

IR, ν (cm⁻¹): 1657 (C=O)

General procedure to obtain amides **ALIPF213**, **229**.

A solution of **ALIPF196** (1 eq.) in SOCl₂ (40 eq.) was refluxed overnight. The solvent was removed in vacuo. Triethylamine (1.5 eq.) and dry CH₂Cl₂ (to give a 0.1 M solution) were added to the residue under nitrogen. The corresponding amine suspended in dry CH₂Cl₂ was added to the previous mixture, and it was stirred overnight at room temperature. After removing the solvent in vacuo, water was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with 10% K₂CO₃, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH/ammonia, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)-2-hydroxybenzamide, **ALIPF213**



Appearance: beige powder

mp = 171 – 173 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (m, 9H, *t*-Bu), 1.60 (m, 2H, CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.82 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.34 (m, 2H, CH₂-N), 5.81 (s, 1H, ArH), 6.43 (bs, 2H, NH₂), 6.86 (m, 1H, ArH), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 7.55 (m, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 8.74 (m, 1H, NH), 9.13 (bs, 1H, NH), 12.18 (m, 2H, NH, OH)

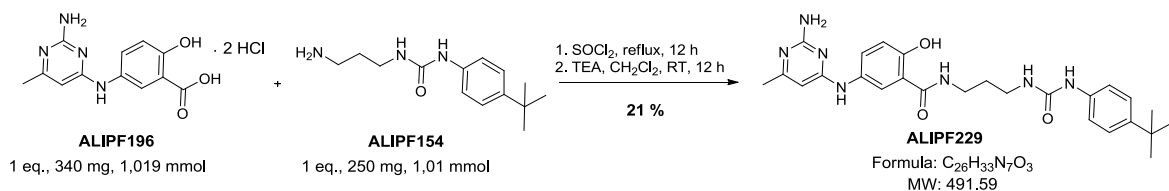
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 22.6, 25.5, 28.6, 28.95, 32.2, 34.8, 39.9, 94.8, 116.1, 117.8, 119.3, 121.8, 128.6, 131.2, 144.2, 155.2, 156.0, 161.5, 162.4, 168.6

LC-MS (ESI⁻): m/z 486 [M-H]⁻

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₇H₃₄N₇O₂ [M+H]⁺ 488.2768, found 488.2755

IR, ν (cm⁻¹): 1653 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-2-hydroxybenzamide, **ALIPF229**



Appearance: white powder

mp = 227 – 229 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.68 (m, 2H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 3.14 (m, 2H, CH₂), 3.34 (m, 2H, CH₂), 5.77 (s, 1H, ArH), 6.12 (m, 3H, NH₂, NH), 6.86 (m, 1H, ArH), 7.25 (m, 4H, ArH), 7.57 (m, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH), 8.43 (bs, 1H, NH), 8.73 (m, 1H, NH), 8.83 (bs, 1H, NH), 12.08 (bs, 1H, OH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.6, 30.3, 31.7, 34.2, 37.0, 94.3, 116.0, 117.7, 118.0, 121.3, 125.6, 128.2, 131.9, 138.3, 143.6, 155.6, 155.9, 162.4, 162.9, 164.6, 168.7

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 492 [M+H]⁺

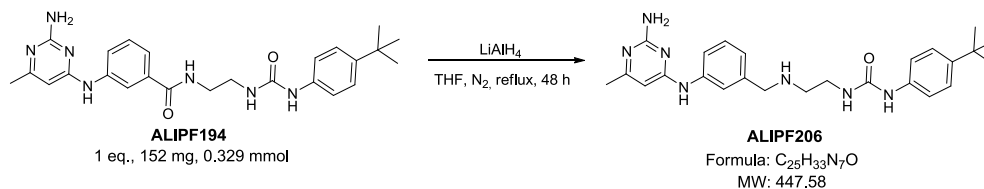
HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated C₂₆H₃₄N₇O₃ [M+H]⁺ 492.2717, found 492.2722

IR, ν (cm⁻¹): 1644 (C=O), 1585 (C=O)

Procedure to obtain amine **ALIPF206**

ALIPF194 (1 eq., 259 mg, 0.561 mmol) suspended in THF (5 mL) was added dropwise via an addition funnel to a solution of LiAlH₄ (4 eq., 85.2 mg, 2.24 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C under nitrogen, and the mixture was refluxed during 48 hours. After cooling to room temperature, the reaction was quenched with 0.3 mL of water, then with 0.3 mL of 2N NaOH, and with 0.9 mL of water, and it was stirred for 2 hours. The precipitate observed was filtered and washed with THF. The resulting filtrate was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (gradient CH₂Cl₂ - CH₃OH/ammonia, 95 : 5 to 90 : 10). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

1-(2-((3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzyl)amino)ethyl)-3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)urea, **ALIPF206**



Appearance: white powder

mp = 141 – 143 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 3H, CH₃), 1.73 (s, 9H, *t*-Bu), 2.03 (m, 2H, CH₂), 2.10 (s, 2H, CH₂), 3.47 (m, 2H, CH₂), 5.91 (s, 1H, ArH), 6.20 (m, 3H, NH, NH₂), 7.37 (m, 5H, ArH), 8.09 (m, 2H, ArH), 8.25 (m, 1H, ArH), 9.33 (s, 1H, NH), 9.98 (s, 1H, NH)

LC-MS (APCI⁺): m/z 448 [M+H]⁺

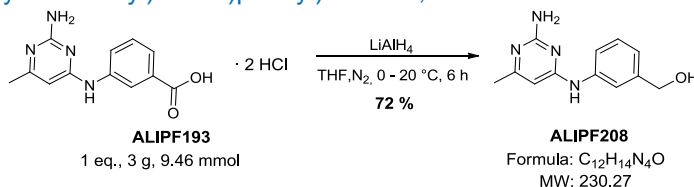
HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₅H₃₄N₇O [M+H]⁺ 448.2819, found 448.2872

IR, ν (cm⁻¹): 1576 (C=O)

General procedure to obtain primary alcohols **ALIPF208**, **223**

The corresponding carboxylic acid (1 eq.) suspended in THF was added dropwise via an addition funnel to a solution of LiAlH₄ (4 eq.) in THF at 0 °C under nitrogen, and the mixture was stirred 6 hours at room temperature (or refluxed during 10 hours for **ALIPF223**). The reaction was quenched with a volume of water, then with a volume of 2N NaOH, and with 3 volumes of water, and it was stirred for 30 minutes. The precipitate observed was filtered and washed with THF. The resulting filtrate was concentrated in vacuo and the residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

(3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)phenyl)metanol, **ALIPF208**



Appearance: white powder

mp = 159 - 161 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.07(s, 3H, CH₃), 4.45 (d, ³J = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 5.13 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, OH), 5.87 (s, 1H, ArH), 6.10 (bs, 2H, NH₂), 6.89 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 6.89 (dd, ³J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.66 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 8.94 (s, 1H, NH)

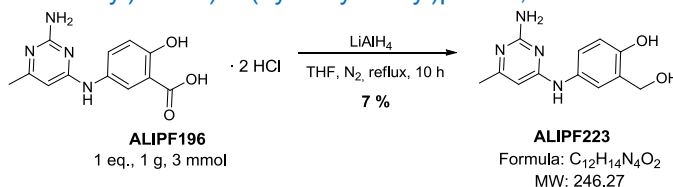
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 14.2, 44.5, 107.0, 127.5, 127.9, 129.1, 129.3, 130.2, 136.8, 137.4, 147.1, 150.8

LC-MS (ESI⁻): m/z 229 [M-H]⁻

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₁₂H₁₅N₄O [M+H]⁺ 231.1240, found 231.1226

IR, ν (cm⁻¹): 3305 (OH)

4-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-2-(hydroxymethyl)phenol, **ALIPF223**



Appearance: white powder

mp = 189 - 191° C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.05(s, 3H, CH₃), 4.46 (m, 2H, CH₂), 4.96 (m, 1H, OH), 5.77 (s, 1H, ArH), 6.11 (bs, 2H, NH₂), 6.68 (m, 1H, ArH), 7.29 (m, 1H, ArH), 7.37 (m, 1H, ArH), 8.76 (bs, 1H, ArOH), 9.07 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.3, 58.6, 94.3, 114.8, 121.0, 121.2, 129.2, 131.9, 150.2, 162.4, 162.5, 163.6

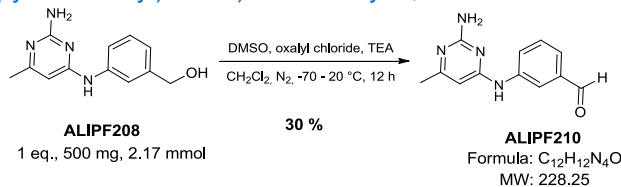
LC-MS (ESI⁻): m/z 245 [M-H]⁻

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₁₂H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺ 247.1189, found 247.1180

General procedure to obtain aldehyde **ALIPF210**

DMSO (4.3 eq., 729 mg, 0.663 mL, 9.34 mmol) suspended in CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise to a solution of oxalyl chloride (2.3 eq., 2 M in CH₂Cl₂, 2.5 mL, 4.99 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) and the solution was stirred for 5 min at -70 °C under nitrogen. **ALIPF208** (1 eq., 500 mg, 2.17 mmol) suspended in CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise to the first solution and the mixture was stirred for 25 min at -70 °C. TEA (20 eq., 4394 mg, 6.04 mL, 43.4 mmol) was added and the mixture was stirred for 12 hours. The reaction was quenched with water, and CH₂Cl₂ was removed in vacuo. The aqueous residue was extracted three times with EtOAc. The resulting aqueous phase was adjusted to pH 10 with 10% K₂CO₃, then extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with water, brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH, 9 : 1). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzaldehyde, **ALIPF210**



Appearance: white powder

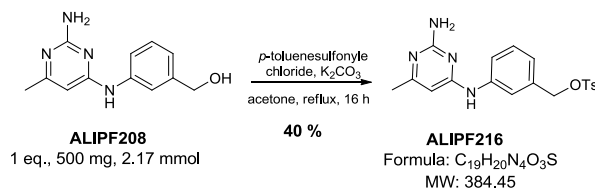
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.11 (s, 3H, CH₃), 5.90 (s, 1H, ArH), 6.21 (bs, 2H, NH₂), 7.46 (m, 2H, ArH), 8.09 (m, 1H, ArH), 8.25 (m, 1H, ArH), 9.29 (bs, 1H, NH), 9.98 (s, 1H, CHO)

LC-MS (ESI⁻): m/z 227 [M-H]⁻

IR, ν (cm⁻¹): 1690 (C=O)

General procedure to obtain tosyl derivative **ALIPF216**

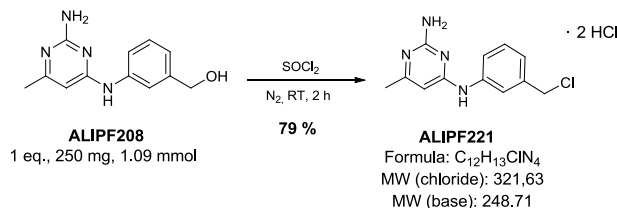
ALIPF208 (1 eq., 500 mg, 2.17 mmol), *p*-toluenesulfonyl chloride (1.1 eq., 455 mg, 2.39 mmol) and K₂CO₃ (1 eq., 300 mg, 2.17 mmol) were suspended in acetone (30 mL) and the mixture was refluxed overnight. *p*-toluenesulfonyl chloride (1.1 eq., 455 mg, 2.39 mmol) was added and the reflux was kept for 4 more hours. The solvent was removed in vacuo and the residue was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with 10% NaOH, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH, 9 : 1). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzyl 4-methylbenzenesulfonate, **ALIPF216****Appearance:** white powder**mp** = 109 -111 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.29 (s, 6H, CH₃), 4.78 (s, 2H, CH₂), 6.14 (s, 1H, ArH), 7.10 (m, 1H, ArH), 7.23 (m, 1H, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 7.47 (m, 1H, ArH), 7.80 (m, 3H, ArH), 10.53 (bs, 1H, NH), 12.45 (m, 2H, NH),

LC-MS (ESI⁻): m/z 383 [M-H]⁻**IR**, ν (cm⁻¹): 1655 (C=O)**General procedure to obtain chloride ALIPF221**

ALIPF208 (1 eq., 250 mg, 1.09 mmol) was suspended in SOCl₂ (3 mL) and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature under nitrogen. The mixture was concentrated in vacuo and water was added to the dry residue. The white precipitate observed was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

N⁴-(3-(chloromethyl)phenyl)-6-methylpyrimidine-2,4-diamine, ALIPF221**Appearance:** white powder**mp** > 250 °C

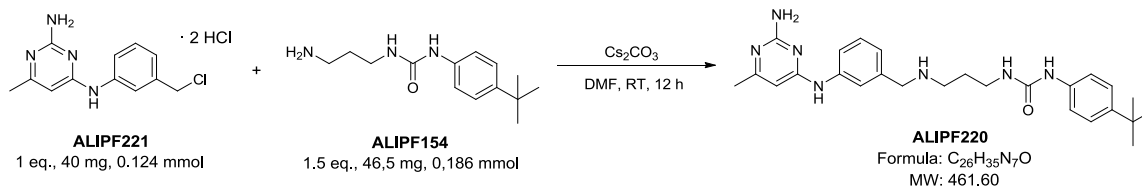
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.24 (s, 3H, CH₃), 4.77 (s, 2H, CH₂), 6.10 (s, 1H, ArH), 7.19 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 1H, ArH), 7.80 (m, 2H, ArH), 10.26 (bs, 2H, NH), 12.69 (m, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): m/z 249 [M+H]⁺**IR**, ν (cm⁻¹): 3304 (NH)**General procedure to obtain amines ALIPF220, 222**

A mixture of **ALIPF221** (1 eq.), the corresponding amine (1 – 1.5 eq.), and Cs₂CO₃ (1.5 eq.) (and KI (1 eq.) for **ALIPF222**) in DMF was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated in vacuo, and 10% K₂CO₃ was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and

concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH_2Cl_2 - CH_3OH /ammonia, 9 : 1). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P_2O_5 .

1-(3-((3-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)benzyl)amino)propyl)-3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)urea, **ALIPF220**



Appearance: beige powder

mp = 101 - 103 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.76 (m, 2H, CH_2), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.16 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$), 3.50 (s, 1H, NH), 4.01 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 5.90 (s, 1H, ArH), 6.17 (bs, 2H, NH_2), 6.30 (m, 1H, NH), 7.03 (m, 1H, ArH), 7.24 (m, 5H, ArH), 7.64 (m, 1H, ArH), 7.87 (m, 1H, ArH), 8.52 (bs, 1H, NH), 9.10 (m, 1H, NH)

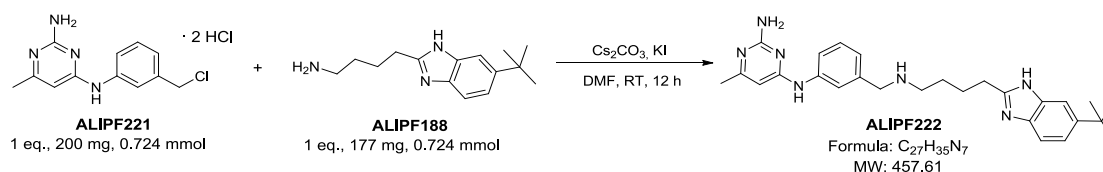
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 23.9, 28.0, 31.7, 34.4, 36.8, 38.2, 57.5, 70.2, 95.3, 118.1, 119.6, 120.8, 122.6, 125.6, 129.2, 134, 138.2, 144., 145.1, 156.2, 161.9

LC-MS (ESI⁺): m/z 462 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}$ [M+H]⁺ 462.2975, found 462.2948

IR, ν (cm⁻¹): 1574 (C=O)

*N*⁴-(3-(((4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)amino)methyl)phenyl)-6-methylpyrimidine-2,4-diamine, **ALIPF222**



Appearance: white powder

mp = 104-106 °C

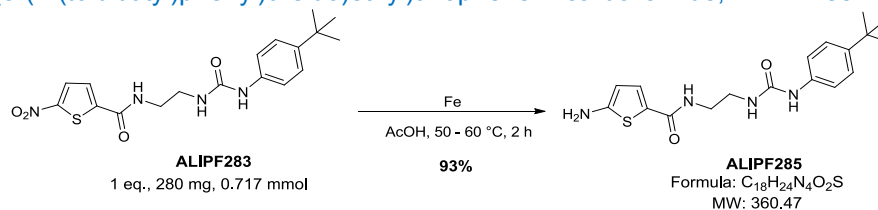
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 1.32 (s, 9H, *t*-Bu), 1.48 (m, 2H, CH_2), 1.78 (m, 2H, CH_2), 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.22 (m, 1H, NH), 2.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.64 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.86 (s, 1H, ArH), 6.08 (bs, 2H, NH_2), 6.89 (m, 1H, ArH), 7.16 (m, 2H, ArH), 7.39 (m, 2H, ArH), 7.48 (m, 1H, ArH), 7.65 (m, 1H, ArH), 8.91 (bs, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): m/z 458 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_7$ [M+H]⁺ 458.3026, found 458.3020

General procedure to obtain amines **ALIPF285, 307, 279, 274, 280, 286, 302**

A solution of the corresponding nitro compound (1 eq.) in AcOH was added dropwise via an addition funnel to a mixture of iron (5 eq.) in AcOH (qsp 0.1 M) at 50 - 60 °C, and it was stirred until the starting product disappeared (around 2 hours). The reaction mixture was cooled to room temperature, then diluted with EtOAc, and adjusted to pH 11 with 6N NaOH. The mixture was filtered over celite, and the layers were separated. The organic layer was washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. Diethyl ether was added to the dry residue to give a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅. If necessary, the residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH/ammonia, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

5-amino-*N*-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF285**

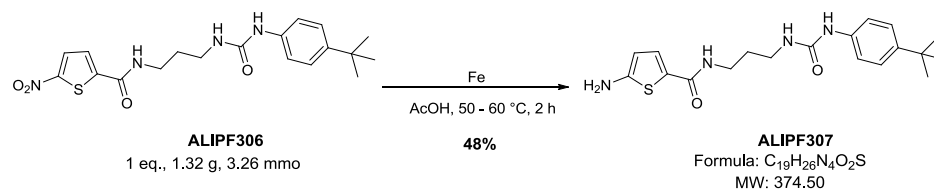
Appearance: orange powder

mp = 103 - 105 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 3.21 (m, 4H, CH₂), 5.80 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 6.18 (m, 3H, NH_{urea}, NH₂), 7.25 (m, 5H, ArH), 7.98 (m, 1H, NH_{amide}), 8.43 (bs, NH_{urea})

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 361 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1651 (C=O), 1722 (C=O)

5-amino-*N*-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF307**

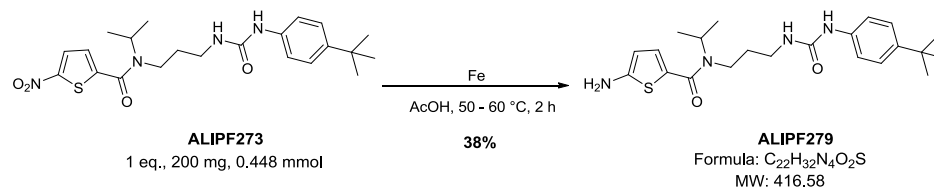
Appearance: yellowish oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.58 (tt, ³*J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 3.08 (td, ³*J* = 5.5, 6.3 Hz, 2H, CH₂-CONH), 3.19 (td, ³*J* = 5.5, 6.3 Hz, 2H, CH₂-NH), 5.80 (d, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, ArH), 6.13 (t, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, NH_{urea}), 6.17 (bs, 2H, NH₂), 7.21 (m, 2H, ArH), 7.25 (d, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, ArH), 7.28 (m, 2H, ArH), 7.90 (t, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, NH_{amide}), 8.43 (bs, 1H, NH_{urea})

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 375 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1655 (C=O), 3315 (NH)

5-amino-*N*-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-*N*-isopropylthiophene-2-carboxamide, **ALIPF279**



Appearance: orange powder

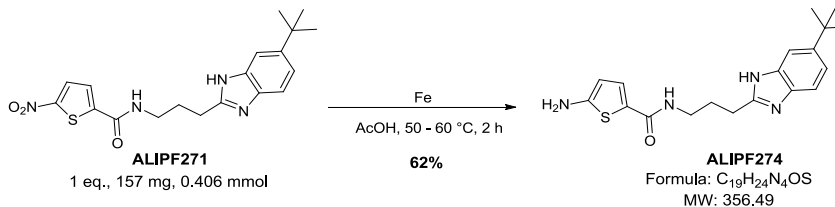
mp = 96 - 98 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.17 (d, ³*J* = 6.6 Hz, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.70 (m, 2H, CH₂), 3.08 (m, 2H, CH₂-N), 3.27 (m, 2H, CH₂-NH), 4.51 (sept, ³*J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 5.80 (d, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, ArH), 6.12 (m, 1H, NH_{urea}), 6.17 (bs, 2H, NH₂), 6.95 (d, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, ArH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.35 (s, 1H, NH_{urea})

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 417 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1650 (C=O), 1657 (C=O)

5-amino-*N*-(3-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF274**

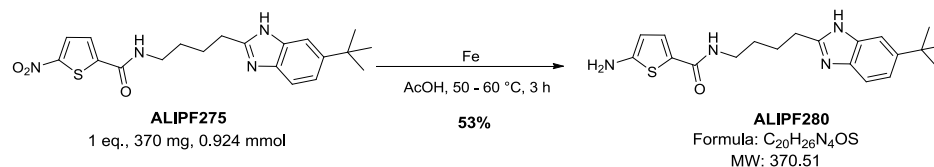


Appearance: white powder

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.32 (s, 9H, *t*-Bu), 1.95 (tt, ³*J* = 6.8, 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.80 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar), 3.24 (td, ³*J* = 5.7, 6.8 Hz, 2H, CH₂-NH), 5.80 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 6.17 (bs, 2H, NH₂), 7.18 (m, 1H, ArH), 7.25 (d, ³*J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 7.32 (m, 1H, ArH), 7.41 (m, 1H, ArH), 8.03 (m, 1H, NH_{amide}), 12.02 (bs, 1H, NH_{benz})

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 357 [M+H]⁺

5-amino-*N*-(4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF280**



Appearance: orange powder

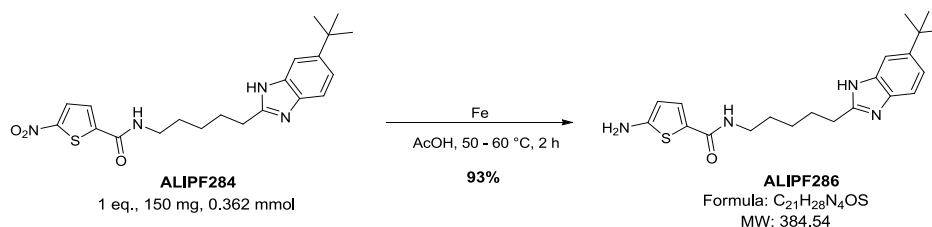
mp = 119 - 121 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.49 (m, 2H, CH₂), 1.75 (m, 2H, CH₂), 2.68 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.17 (m, 2H, CH₂-NH), 5.78 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, ArH), 6.14 (bs, 2H, NH₂), 7.15 (m, 1H, ArH), 7.18 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, ArH), 7.33 (m, 2H, ArH), 7.87 (m, 1H, NH_{amide}), 11.99 (bs, 1H, NH_{benz})

LC-MS (ESI⁺): m/z 371 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1606 (C=O)

5-amino-*N*-(5-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pentyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF286



Appearance: brown powder

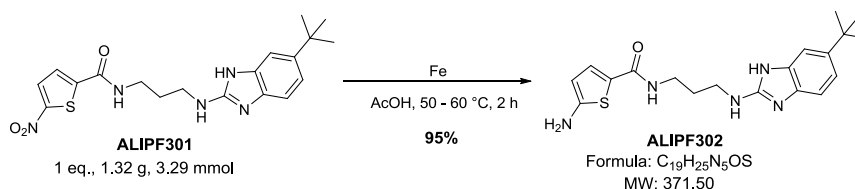
mp = 80 -82 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.25 (m, 2H, CH₂), 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.49 (m, 2H, CH₂), 1.75 (m, 2H, CH₂), 2.76 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.14 (m, 2H, CH₂-NH), 5.77 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, ArH), 6.14 (bs, 2H, NH₂), 7.16 (m, 1H, ArH), 7.23 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, ArH), 7.36 (m, 2H, ArH), 7.85 (m, 1H, NH_{amide}), 11.96 (bs, 1H, NH_{benz})

LC-MS (ESI⁺): m/z 385 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1606 (C=O)

5-amino-*N*-(3-((6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)propyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF302



Appearance: orange oil

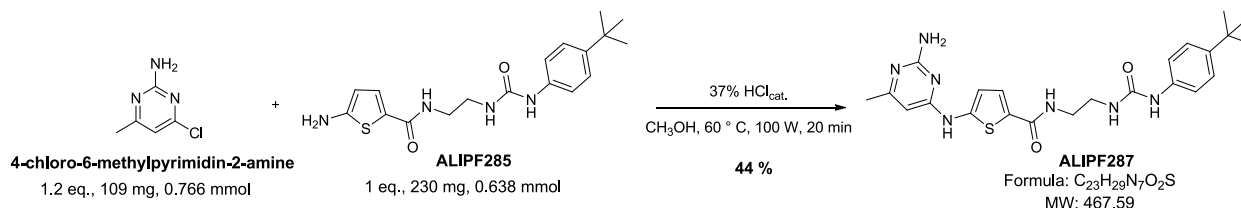
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.28 (s, 9H, *t*-Bu), 1.71 (m, 2H, CH₂), 3.16 (m, 2H, CH₂-CONH), 3.23 (m, 2H, CH₂-NHAr), 5.82 (d, ³J = 3.9 Hz, 1H, ArH), 6.18 (bs, 2H, NH₂), 6.60 (m, 1H, NH-Ar), 6.90 (m, 1H, ArH), 7.02 (m, 1H, ArH), 7.13 (m, 1H, ArH), 7.31 (d, ³J = 3.9 Hz, 1H, ArH), 8.51 (m, 1H, NH_{amide}), 10.71 (bs, 1H, NH_{benz})

LC-MS (ESI⁺): m/z 372 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1671 (C=O), 3241 (NH)

General procedure to obtain amines **ALIPF287**, **308**, **281**, **276**, **282**, **291**, **303**, **309**

A mixture of 2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine (1.2 - 1.5 eq.), the corresponding amine (1 eq.), and 3 drops of 37% HCl in CH₃OH were stirred for 20 min in a microwave reactor, at 60 ° C, at 100 W. The solvent was removed in vacuo, 10% K₂CO₃ was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂ - CH₃OH/ammonia, 95 : 5). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and diethyl ether was added to the dry residue to yield a powder which was recovered by filtration and dried over P₂O₅.

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)ethyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF287**

Appearance: yellowish powder

mp = 248 – 250 °C

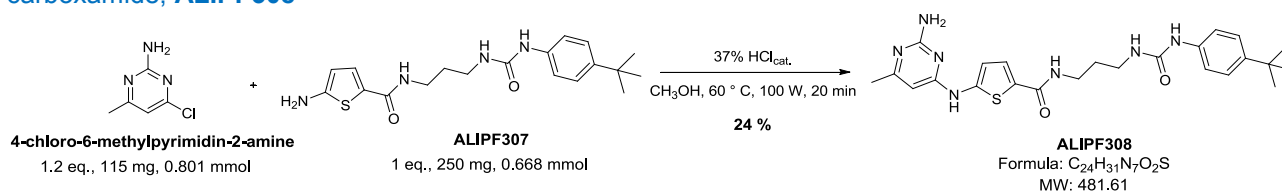
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 2.10 (m, 3H, CH₃), 3.18 (m, 4H, CH₂), 5.87 (s, 1H, ArH), 6.19 (bs, 2H, NH₂), 6.46 (m, 1H, NH), 6.55 (m, 1H, ArH), 7.26 (m, 4H, ArH), 7.49 (m, 1H, ArH), 8.23 (m, 1H, NH), 8.64 (bs, 1H, NH), 10.41 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 22.4, 31.7, 34.2, 95.5, 111.5, 118.0, 125.6, 126.6, 129.4, 138.3, 139.2, 141.4, 143.7, 146.0, 155.9, 158.8, 160.8, 162.8

LC-MS (ESI⁺): *m/z* 468 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated C₂₃H₃₀N₇O₂S [M+H]⁺ 468.2176, found 468.2163

IR, ν (cm⁻¹): 1624 (C=O), 1660 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF308**

Appearance: white powder

mp = 155 – 157 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.63 (m, 2H, CH₂), 1.98 (m, 3H, CH₃), 3.11 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.24 (m, 2H, CH₂-NH_{urea}), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.14 (m, 1H, NH_{urea}), 6.23 (bs, 2H, NH₂),

6.57 (d, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.27 (m, 4H, ArH), 7.46 (d, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, ArH), 8.13 (m, 1H, NH_{amide}), 8.42 (bs, 1H, NH_{urea}), 10.37 (bs, 1H, NH)

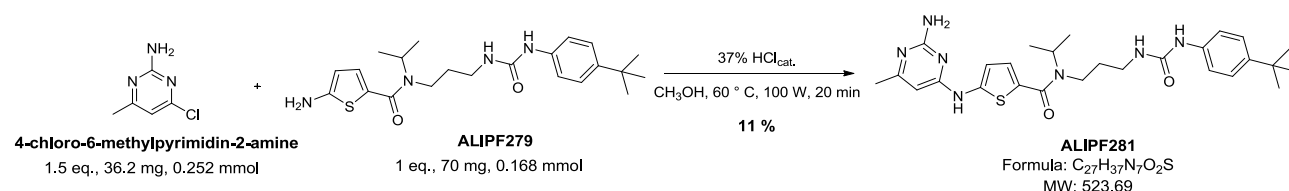
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.9, 30.8, 31.7, 34.2, 36.9, 37.2, 94.8, 110.1, 117.9, 125.6, 126.4, 128.4, 138.4, 143.6, 146.8, 155.8, 158.8, 162.8, 166.1

LC-MS (ESI⁺): m/z 482 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₂₄H₃₀N₇O₂S [M-H]⁻ 480.2176, found 480.2139

IR, ν (cm⁻¹): 1587 (C=O), 1630 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-N-isopropylthiophene-2-carboxamide, **ALIPF281**



Appearance: yellowish powder

mp = 145 – 147 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.19 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 6H, *i*-Pr), 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.73 (m, 2H, CH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.11 (m, 2H, CH₂), 3.33 (m, 2H, CH₂), 4.49 (m, 1H, CH), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.13 (m, 1H, NH), 6.30 (bs, 2H, NH₂), 6.53 (d, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.10 (d, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, ArH), 7.25 (m, 4H, ArH), 8.36 (s, 1H, NH), 10.43 (bs, 1H, NH)

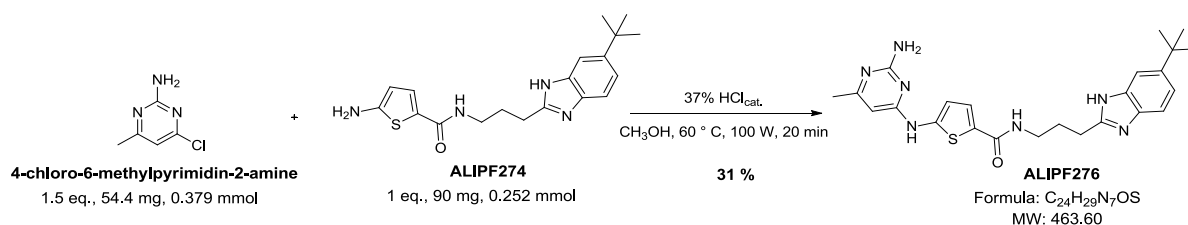
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 21.3, 23.7, 30.9, 31.7, 34.2, 37.5, 39.9, 40.4, 94.8, 109.4, 118.0, 125.6, 126.4, 128.0, 135.1, 138.3, 143.6, 145.5, 155.8, 158.7, 162.5, 164.3

LC-MS (ESI⁺): m/z 524 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₇H₃₈N₇O₂S [M+H]⁺ 524.2802, found 524.2782

IR, ν (cm⁻¹): 1542 (C=O), 1586 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(3-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)propyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF276**



Appearance: yellowish powder

mp = 179 – 181 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.32 (s, 9H, *t*-Bu), 1.98 (m, 2H, CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.83 (m, 2H, CH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.27 (bs, 2H, NH₂), 6.57 (D, $^3J = 3.7$ Hz, 1H, ArH), 7.18 (m, 1H, ArH), 7.38 (m, 2H, ArH), 7.48 (d, $^3J = 3.7$ Hz, 1H, ArH), 8.27 (m, 1H, NH), 10.40 (bs, 1H, NH), 12.07 (bs, 1H, NH)

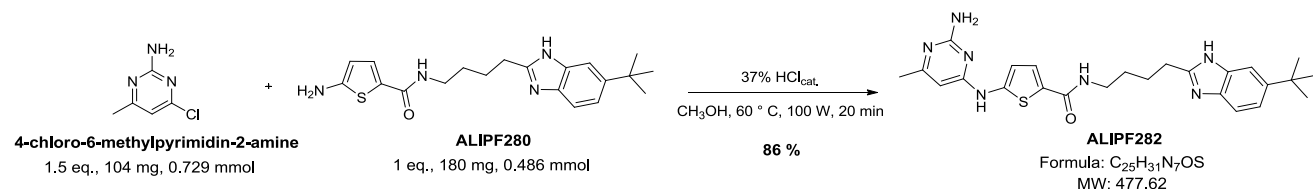
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 23.8, 26.6, 28.2, 32.2, 34.8, 39.9, 94.8, 110.2, 119.3, 126.4, 128.5, 144.3, 146.8, 155.0, 158.8, 165.6, 162.7, 165.8

LC-MS (ESI⁺): m/z 464 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₄H₂₈N₇OS [M-H]⁻ 462.2070, found 462.2062

IR, ν (cm⁻¹): 1538 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(4-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)butyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF282



Appearance: yellowish powder

mp = 174 – 176 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.78 (m, 2H, CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.81 (m, 2H, CH₂), 3.24 (m, 2H, CH₂), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.28 (bs, 2H, NH₂), 6.56 (d, $^3J = 3.8$ Hz, 1H, ArH), 7.17 (m, 1H, ArH), 7.37 (m, 2H, ArH), 7.46 (d, $^3J = 3.8$ Hz, 1H, ArH), 8.11 (m, 1H, NH), 10.39 (bs, 1H, NH), 12.03 (bs, 1H, NH)

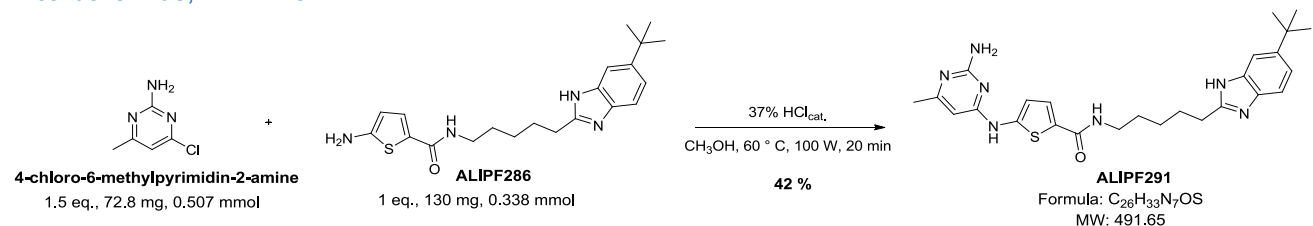
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 23.7, 25.6, 28.6, 29.5, 32.2, 34.8, 39.9, 94.8, 110.2, 119.3, 126.3, 128.7, 144.2, 146.6, 155.2, 158.8, 162.5, 165.7

LC-MS (ESI⁺): m/z 478 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₅H₃₂N₇OS [M+H]⁺ 478.2383, found 478.2361

IR, ν (cm⁻¹): 1584 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(5-(6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pentyl)thiophene-2-carboxamide, ALIPF291



Appearance: yellowish powder

mp = 171 – 173 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.31 (s, 9H, *t*-Bu), 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.77 (m, 2H, CH₂), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.78 (m, 2H, CH₂), 3.19 (m, 2H, CH₂), 3.33 (m, 2H, CH₂), 5.90 (s, 1H, ArH), 6.34 (m, 2H, NH₂), 6.58 (m, 1H, ArH), 7.18 (m, 1H, ArH), 7.37 (m, 2H, ArH), 7.46 (m, 1H, ArH), 8.10 (m, 1H, NH), 10.44 (m, 1H, NH), 12.06 (bs, 1H, NH)

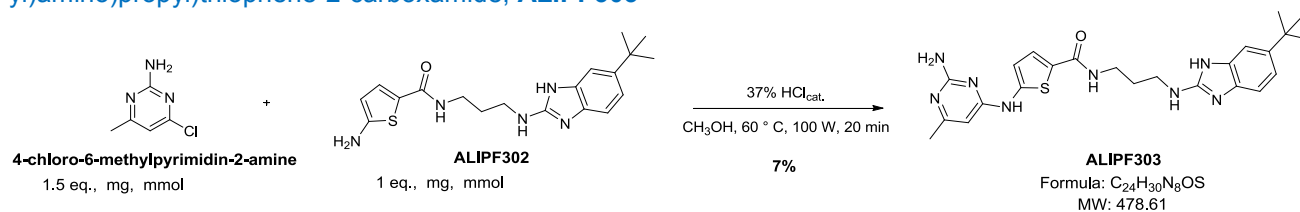
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.7, 26.5, 27.8, 28.9, 29.6, 32.2, 34.8, 94.9, 110.5, 113.5, 119.3, 126.3, 144.4, 155.4, 156.6, 158.9, 162.5

LC-MS (ESI⁺): m/z 492 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₂₆H₃₂N₇OS [M-H]⁻ 490.2383, found 490.2370

IR, ν (cm⁻¹): 1586 (C=O)

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(3-((6-(*tert*-butyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)propyl)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF303**



Appearance: beige powder

mp = 193 – 195 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.04 (m, 1H, CH₂), 1.28 (s, 9H, *t*-Bu), 1.75 (m, 2H, CH₂-CONH), 2.11 (s, 3H, CH₃), 3.29 (m, 2H, CH₂-NHAr), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.23 (m, 2H, NH₂), 6.53 (m, 1H, NHAr), 6.59 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, ArH), 6.91 (m, 1H, ArH), 7.02 (m, 1H, ArH), 7.14 (m, 1H, ArH), 7.53 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, ArH), 8.37 (m, 1H, NH_{amide}), 10.40 (m, 1H, NH), 10.60 (m, 1H, NH_{benz})

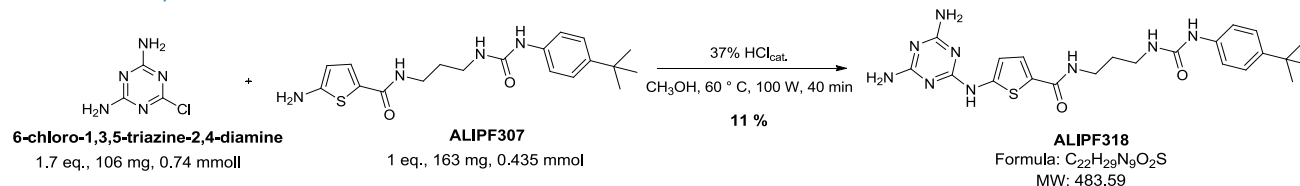
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.9, 30.3, 32.3, 34.6, 36.6, 46.1, 94.8, 110.0, 116.8, 126.4, 128.5, 142.2, 146.8, 156.2, 158.8, 162.7, 162.8, 166.1

LC-MS (ESI⁺): m/z 479 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₄H₃₁N₈OS [M+H]⁺ 479.2336, found 479.2301

IR, ν (cm⁻¹): 1635 (C=O)

N-(3-(3-(4-(*tert*-butyl)phenyl)ureido)propyl)-5-((4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)amino)thiophene-2-carboxamide, **ALIPF318**



Appearance: white powder

mp = 172 – 174 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23 (s, 9H, *t*-Bu), 1.61 (m, 2H, CH₂), 3.10 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.24 (m, 2H, CH₂-NH_{urea}), 6.34 (bs, 4H, NH₂), 6.42 (m, 1H, NH_{urea}), 6.52 (m, 1H, ArH), 7.21 (m, 2H, ArH), 7.30 (m, 2H, ArH), 7.42 (m, 1H, ArH), 8.07 (m, 1H, NH_{amide}), 8.66 (bs, 1H, NH_{urea}), 10.23 (bs, 1H, NH)

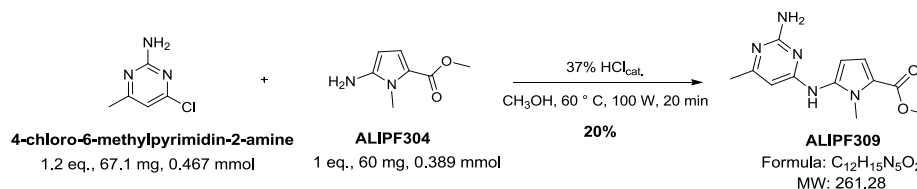
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 31.1, 32.1, 34.6, 37.3, 37.6, 110.6, 118.3, 126.0, 126.8, 139.0, 143.8, 156.3, 163.3, 167.7

LC-MS (ESI⁺): m/z 484 [MH⁺]

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₂₂H₃₀N₉O₂S [M+H]⁺ 484.2237, found 484.2313

IR, ν (cm⁻¹): 1596 (C=O), 1635 (C=O)

Methyl 5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate, **ALIPF309**



Appearance: purple powder

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm):

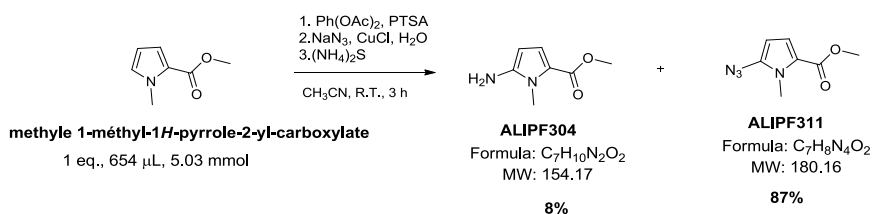
2.05 (s, 3H, Ar-CH₃), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 3H, CH₃), 5.73 (s, 1H, ArH), 6.10 (bs, 2H, NH₂), 6.66 (m, 1H, ArH), 7.62 (m, 1H, ArH), 8.85 (bs, 1H, NH)

LC-MS (ESI⁺): m/z 262 [M+H]⁺

IR, ν (cm⁻¹): 1697 (C=O)

General procedure to obtain aminopyrrole **ALIPF304**

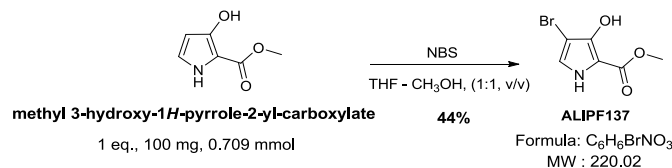
To a solution of iodobenzene diacetate (1.05 eq., 1701 mg, 5.28 mmol) in acetonitrile (40 mL) was added APTS (1.2 eq., 971 μ L, 6.04 mmol) and the resulting suspension was stirred for 5 min at room temperature. A solution of methyl 1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate (1 eq., 654 μ L, 5.03 mmol) in acetonitrile (10 mL) was added to the previous suspension. After 15 min, a solution of NaN₃ (1.5 eq., 490 mg, 7.55 mmol) in water (5 mL) was added, followed by CuCl (0.1 eq., 49.8 mg, 0.503 mmol) was added to the mixture and the mixture turned into brown. After stirring for 30 minutes, aqueous 20% (NH₄)₂S (2.5 eq., 3895 μ L, 12.6 mmol) was added to the mixture and it was stirred for 3 hours at room temperature. The solvent was removed in vacuo, saturated NaHCO₃ was added to the residue, and the aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂. The organic layers were gathered together, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography over silica gel (gradient petroleum spirit – EtOAc, 100-0% to 50 : 50%). The corresponding fractions were concentrated in vacuo and the dry residues were recovered and dried over CaCl₂.

Methyl 5-amino-1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate, **ALIPF304****Appearance:** brown oil¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.97 (bs, 2H, NH₂), 3.79 (s, 3H, CH₃), 3.83 (s, 3H, CH₃), 6.38 (d, 1H, ³J = 3.0 Hz, H₄), 6.47 (d, 1H, ³J = 3.0 Hz, H₃)LC-MS (ES⁺): m/z 155 [M+H]⁺Methyl 5-azido-1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate, **ALIPF311****Appearance:** translucent powder

mp = 66 – 67 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.81 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 6.82 (d, ³J = 3.0 Hz, H₄), 7.01 (d, 1H, ³J = 3.0 Hz, H₃)LC-MS (ES⁺): m/z 139 [M-N₃]⁺IR, ν̄ (cm⁻¹): 1698 (C=O), 2114 (N₃)General procedure to obtain halides **ALIPF137, 171, 237, 235**

NBS (0.5 eq.) was added to a solution of the corresponding heterocycle (1 eq.) in THF – CH₃OH (1:1, v/v, qsp 0.1 M) at 0 °C and the mixture was stirred at room temperature. After 2 hours, NBS (0.4 eq.) was added again to the mixture at 0 °C, and it was stirred at room temperature for 2 hours (10 h for **ALIPF235**). The solvent was removed in vacuo, and water was added to the residue. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. Diethyl ether was added to the dry residue to discard succinimide. The filtrate was concentrated in vacuo, heptane was added to the dry residue, and the target product was recovered by filtration.

Methyl 4-bromo-3-hydroxy-1H-pyrrole-2-carboxylate, **ALIPF137****Appearance:** orange powder

mp = 115 – 117 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 3.73 (s, 3H, CH₃), 6.94 (d, $^3J = 3.6$ Hz, 1H, ArH), 8.69 (m, 1H, OH), 11.48 (s, 1H, NH)

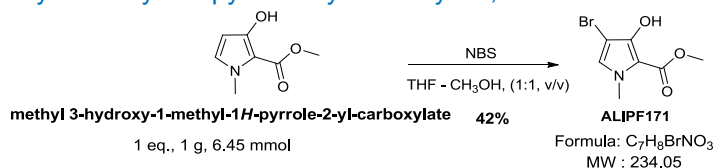
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 51.1, 86.4, 106.8, 122.5, 147.4, 160.8

LC-MS (APCI⁺): m/z 217.9 [M+H]⁺ for ^{79}Br , 219.9 [M+H]⁺ for ^{81}Br

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₆H₇BrNO₃Na [M+Na]⁺ 241.9423, found 241.9421

IR, ν (cm⁻¹): 566 (C-Br), 1660 (C=O), 3298(O-H)

Methyl 4-bromo-3-hydroxy-1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate, **ALIPF171**



Appearance: beige powder

mp = 94 – 96 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 3.69 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 3H, CH₃), 7.10 (s, 1H, ArH), 8.61 (m, 1H, OH)

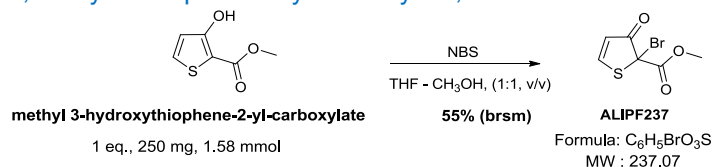
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 37.5, 51.2, 83.7, 107.4, 128.0, 148.9, 161.0

LC-MS (APCI⁺): m/z 233.9 [M+H]⁺ for ^{79}Br , 236.0 [M+H]⁺ for ^{81}Br

HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₇H₇BrNO₃ [M-H]⁻ 231.9603, found 231.9610

IR, ν (cm⁻¹): 588 (C-Br), 1658 (C=O), 3321(O-H)

Methyl 2-bromo-3-oxo-2,3-dihydrothiophene-2-yl-carboxylate, **ALIPF237**



Appearance: purple powder

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 3.77 (s, 3H, CH₃), 6.43 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, ArH), 9.01 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, ArH)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 51.8, 94.7, 121.0, 132.5, 161.7, 163.4

LC-MS (APCI⁻): m/z 235 [M-H]⁻ for ^{79}Br , 237 [M-H]⁻ for ^{81}Br

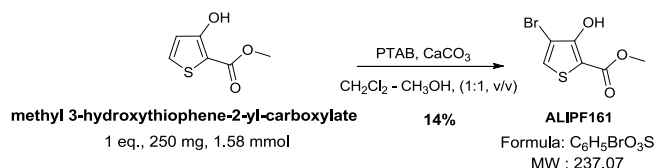
HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₆H₄BrO₃S [M-H]⁻ 234.9059, found 234.9064

IR, ν (cm⁻¹): 552 (C-Br), 1676, 1745 (C=O)

Procedure to obtain halide ALIPF161

Phenyltrimethylammonium tribromide (PTAB) (3 eq., 1782 mg, 4.74 mmol) was added to a solution of methyl 3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate (1 eq., 250 mg, 1.58 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1, v/v). Then calcium carbonate (4 eq., 632 mg, 6.32 mmol) was added to the mixture and it was stirred at room temperature for 20 hours. The suspension was filtered, and the filtrate was concentrated in vacuo. EtOAc was added to the residue and the organic layer was washed with saturated NaHCO₃, then with water, and brine. The organic layer was dried over NaSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (heptane - EtOAc, 9:1). The solid obtained was dried over P₂O₅.

Methyl 4-bromo-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF161



Appearance: white powder

mp = 81 – 83 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.80 (s, 3H, CH₃), 7.98 (s, 1H, ArH), 10.37 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 52.3, 104.3, 105.7, 129.5, 157.3, 162.7

LC-MS (APCI⁻): *m/z* 235 [M-H]⁻ for ⁷⁹Br, 237 [M-H]⁻ for ⁸¹Br

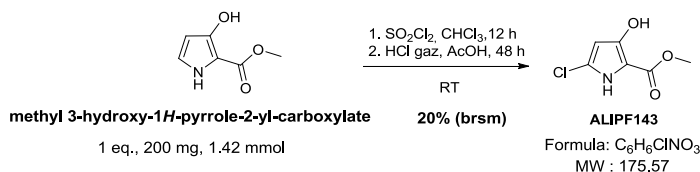
HRMS (ESI⁻): *m/z* calculated C₆H₄BrO₃S [M-H]⁻ 234.9059, found 234.9066

IR, ν (cm⁻¹): 622 (C-Br), 1670 (C=O), 3325 (O-H)

Procedure to obtain halide ALIPF143

SO₂Cl₂ (1 M in CH₂Cl₂, 2 eq., 1.41 mL, 1.41 mmol) was added to a solution of methyl 3-hydroxy-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate (1 eq., 100 mg, 0.709 mmol) in CH₂Cl₂ (17 mL), and the mixture was stirred during 12 hours at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo. The dry residue was suspended in AcOH (20 mL) and HCl gaz was bubbled into the mixture until saturation. The mixture was stirred for 2 days at room temperature. The solvent was removed in vacuo, and the dry residue was purified by column chromatography on silica gel (heptane – EtOAc, 1:1) to give the target compound.

Methyl 5-chloro-3-hydroxy-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF143



Appearance: yellowish powder

mp = 139 – 141 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.69 (s, 3H, CH₃), 5.68 (s, 1H, ArH), 9.21 (s, 1H, OH), 11.78 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 50.9, 98.0, 98.0, 119.2, 150.9, 160.5

LC-MS (APCI): m/z 176 [M-H]⁻ for ³⁵Cl

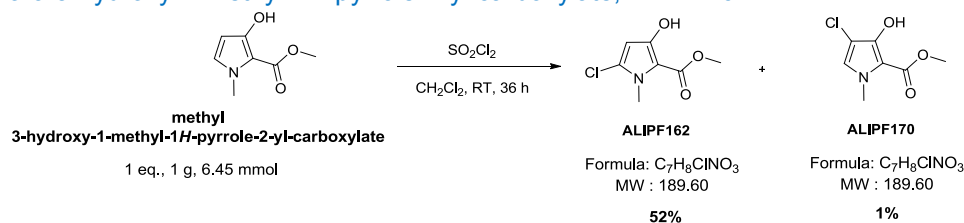
HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₆H₅ClNO₃ [M-H]⁻ 173.9952, found 173.9954

IR, ν (cm⁻¹): 566 (C-Cl), 1731 (C=O), 3301 (O-H)

Procedure to obtain halide **ALIPF162**

SO₂Cl₂ (5 M in CH₂Cl₂, 1.1 eq., 5 M, 1.42 mL, 7.09 mmol) was added to a solution of methyl 3-hydroxy-1-methyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate (1 eq., 1 g, 6.45 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) and the mixture was stirred during 36 hours at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo and the dry residue was purified by column chromatography on silica gel (heptane – EtOAc, gradient 1:0 to 7:3, v/v) to afford the target product.

Methyl 5-chloro-3-hydroxy-1-methyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate, **ALIPF162**



Appearance: yellowish powder

mp = 48 – 50 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.68 (s, 3H, CH₃), 3.71 (s, 3H, CH₃), 5.80 (s, 1H, ArH), 9.10 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 33.0, 51.0, 97.3, 97.3, 123.0, 151.8, 161.2

LC-MS (APCI⁺): m/z 190 [M+H]⁺ for ³⁵Cl, 192 [M+H]⁺ for ³⁷Cl

HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₇H₉ClNO₃ [M+H]⁺ 190.0265, found 190.0262

IR, ν (cm⁻¹): 1648 (C=O), 3308 (O-H)

Methyl 4-chloro-3-hydroxy-1-methyl-1*H*-pyrrole-2-yl-carboxylate, **ALIPF170**

Appearance: white powder

mp = 72 – 74 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.685 (s, 3H, CH₃), 3.686 (s, 3H, CH₃), 7.10 (s, 1H, ArH), 8.68 (s, 1H, OH)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 37.0, 50.7, 97.8, 106.8, 125.5, 146.8, 160.7

LC-MS (APCI $^+$): m/z 190 [M+H] $^+$ for ^{35}Cl , 192 [M+H] $^+$ for ^{37}Cl

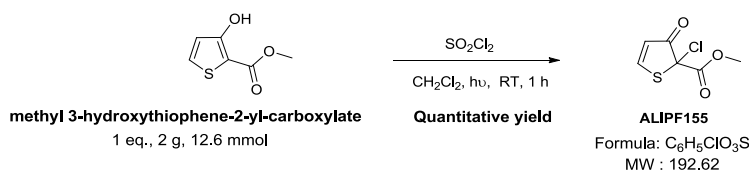
HRMS (ESI $^+$): m/z calculated C $_7$ H $_8$ ClNO $_3$ Na [M+Na] $^+$ 212.0084, found 212.0083

IR, ν (cm $^{-1}$): 1653 (C=O), 3322 (O-H)

Procedure to obtain halide ALIPF155

SO $_2$ Cl $_2$ (5 M in CH $_2$ Cl $_2$, 1.1 eq., 2.78 mL, 13.9 mmol) was added to a solution of methyl 3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate (1 eq., 2 g, 12.6 mmol) in CH $_2$ Cl $_2$ (6 mL) and the mixture was stirred during 45 minutes exposed to visible irradiation (500 W lamp). The mixture was concentrated in vacuo to afford the target product.

Methyl 2-chloro-3-oxo-2,3-dihydrothiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF155



Appearance: grey powder

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 3.78 (s, 3H, CH $_3$), 6.44 (d, 3J = 6.0 Hz, 1H, ArH), 9.07 (d, 3J = 6.0 Hz, 1H, ArH)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 55.2, 118.2, 159.3, 164.8, 165.4, 195.7

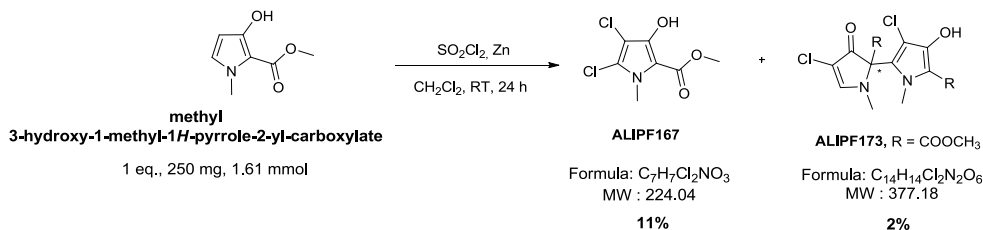
LC-MS (APCI $^+$): m/z 188 [M+H] $^+$ for ^{35}Cl

IR, ν (cm $^{-1}$): 558 (C-Cl), 1692, 1742 (C=O)

Procedure to obtain halide ALIPF167

SO $_2$ Cl $_2$ (10 M in CH $_2$ Cl $_2$, 3.1 eq., 499 μL , 5 mmol) was added to a solution of methyl 3-hydroxy-1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate (1 eq., 250 mg, 1.61 mmol) in CH $_2$ Cl $_2$ at 0 $^\circ\text{C}$, in a sealed tube under an inert atmosphere (N $_2$), and the mixture was stirred during 24 hours at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo at 20 $^\circ\text{C}$, and the dry residue was purified by column chromatography on silica gel (heptane – EtOAc, gradient 1:0 to 6:4, v/v) to afford the target product.

Methyl 4,5-dichloro-3-hydroxy-1-methyl-1H-pyrrole-2-yl-carboxylate, ALIPF167



Appearance: white powder

mp = 108 – 110 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.73 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 3H, CH₃), 9.16 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 33.2, 50.9, 97.8, 106.8, 120.3, 146.3, 160.1

LC-MS (APCI⁺): m/z 222 [M+H]⁺ for ³⁵Cl, 224 [M+H]⁺ ³⁵Cl/³⁷Cl, 226 [M+H]⁺ for ³⁷Cl

HRMS (ESI⁻): m/z calculated C₇H₆Cl₂NO₃ [M-H]⁻ 221.9719, found 221.9725

IR, ν (cm⁻¹): 1651 (C=O), 3312 (O-H)

Dimethyl 3',4-dichloro-4'-hydroxy-1,1'-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*,1'*H*-[2,2'-bipyrrole]-2,5'-yl-dicarboxylate, **ALIPF173**

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2.97 (s, 3H, N-CH₃), 3.710 (s, 3H, N-CH₃), 3.712 (s, 3H, O-CH₃), 3.73 (s, 3H, O-CH₃), 8.66 (s, 1H, ArH), 8.92 (s, 1H, OH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 33.0, 34.1, 51.5, 54.1, 73.5, 73.6, 96.0, 101.0, 122.6, 150.7, 160.2, 164.5, 165.0, 185.3

LC-MS (APCI⁺): m/z 377 [M+H]⁺ for ³⁵Cl, 379 [M+H]⁺ ³⁵Cl/³⁷Cl, 381 [M+H]⁺ for ³⁷Cl

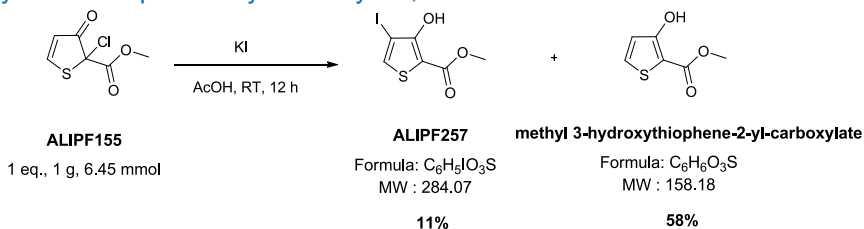
HRMS (ESI⁺): m/z calculated C₁₄H₁₅Cl₂N₂O₆ [M+H]⁺ 377.0301, found 377.0306

IR, ν (cm⁻¹): 1703, 1737 (C=O), 3423 (O-H)

Procedure to obtain halide **ALIPF257**

KI (1 eq., 524 mg, 3.16 mmol) was added to a solution of **ALIPF155** (1 eq., 500 mg, 3.16 mmol) in AcOH (10 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo, and the residue was partitioned between H₂O and EtOAc. The organic layer was concentrated in vacuo, and the residue was purified by column chromatography over silica gel (heptane - EtOAc, 7:3) to afford the target product.

Methyl 3-hydroxy-4-iodothiophene-2-yl-carboxylate, **ALIPF257**



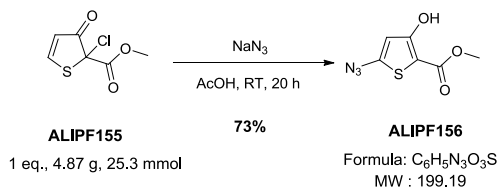
Appearance: brown oil

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.79 (s, 3H, CH₃), 9.30 (s, 1H, ArH)

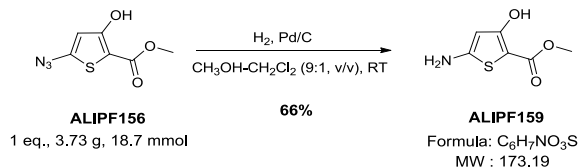
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 52.3, 77.4, 104.5, 134.4, 160.8, 165.6

LC-MS (APCI): m/z 283 [M+H]⁺**Procedure to obtain azide ALIPF156**

NaN₃ (1.1 eq., 1.81 g, 27.8 mmol) was added to a solution of ALIPF155 (1 eq., 4.87 g, 25.3 mmol) in glacial AcOH (60 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. NaN₃ (0.5 eq., 0.822 g, 12.6 mmol) were added again to the mixture, and it was stirred for 6 hours at room temperature. Cold water was added to the mixture to furnish a white precipitate corresponding to the target product that was recovered by filtration, and dried over CaCl₂.

Methyl 5-azido-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF156**Appearance:** brown powder**mp** = 64 – 66 °C¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 3.71 (s, 3H, CH₃), 6.52 (s, 1H, ArH), 10.67 (s, 1H, OH)**LC-MS (APCI⁻):** m/z 171 [M-N₂]⁻**IR,** ν (cm⁻¹): 1750 (C=O), 2125 (N₃), 3291 (O-H)**Procedure to obtain amine ALIPF159**

Pd/C was added to a solution of ALIPF156 (1 eq., 3.73 g, 18.7 mmol) in CH₃OH – CH₂Cl₂ (9:1, v/v) (40 mL) and the mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 28 hours. The catalyzer was removed by filtration, and the filtrate was concentrated in vacuo. It was purified by flash chromatography (gradient cyclohexane – EtOAc, 10:0 to 8/2). The corresponding fraction was concentrated in vacuo, and the dry residue corresponding to the target product was dried over P₂O₅.

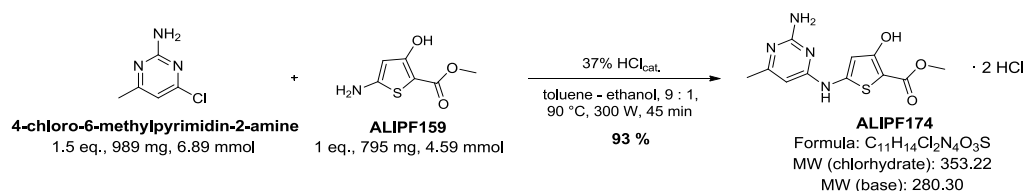
Methyl 5-amino-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate, ALIPF159**Appearance:** white powder**mp** = 6113 – 115 °C¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.65 (bs, 2H, NH₂), 3.82 (s, 3H, CH₃), 5.80 (s, 1H, ArH), 10.02 (s, 1H, OH)**LC-MS (APCI⁺):** m/z 174 [M+H]⁺

IR, ν (cm^{-1}): 1750 (C=O), 3339 (NH), 3291 (O-H)

Procedure to obtain amine **ALIPF174**

A mixture of the corresponding 4-chloro-6-methylpyrimidin-2-amine (1.5 eq., 989 mg, 6.89 mmol), the amine **ALIPF159** (1 eq., 795 mg, 4.59 mmol), and 5 drops of 37% HCl in a mixture of toluene – ethanol, 9 : 1, were stirred for 45 min in a microwave reactor (open system), at 90 °C, at 300 W. The mixture was filtrated to recover a solid which was washed with ethanol. The resulting filtrate was concentrated in vacuo, and ethanol was added to the residue to recover by filtration a second solid. Both solids were gathered together, and dried over P_2O_5 .

Methyl 5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)-3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate dihydrochloride, **ALIPF174**



Appearance: orange powder

mp = 253 – 255 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 2.31 (s, 3H, CH_3), 3.73 (s, 3H, CH_3), 6.21 (s, 1H, ArH), 6.56 (m, 1H, ArH), 10.31 (s, 2H, NH_2), 12.16 (bs, 1H, OH), 12.96 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 19.0, 51.5, 97.2, 98.0, 106.5, 144.4, 154.9, 155.8, 159.5, 160.51, 164.1

LC-MS (APCI $^+$): m/z 281.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

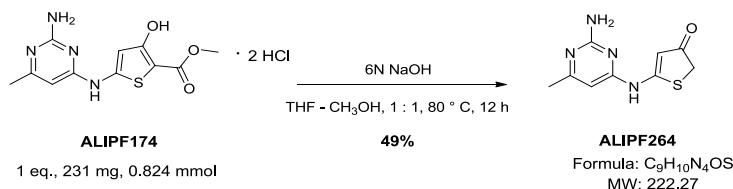
HRMS (ESI $^+$): m/z calculated $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 281.0702, found 281.0689

IR, ν (cm^{-1}): 1650 (C=O)

Procedure to obtain **ALIPF264**

A suspension of **ALIPF174** (1 eq., 231 mg, 0.824 mmol) and 6N NaOH (2.5 eq., 343 μL , 2.06 mmol) in CH_3OH - THF (4 mL, 1:1, v/v) was stirred at 80 °C overnight. The solvent was removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography over silica gel (gradient CH_2Cl_2 – CH_3OH , 95-5% - 90-10%). The corresponding fraction was concentrated in vacuo and the residue was dried over P_2O_5 .

5-((2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)amino)thiophen-3(2H)-one, **ALIPF264**



Appearance: white powder

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 2.15(s, 3H, CH_3), 3.55 (s, 2H, CH_2), 5.97 (s, 1H, ArH), 6.09 (s, 1H, ArH), 6.52 (s, 2H, NH_2), 10.79 (s, 1H, NH)

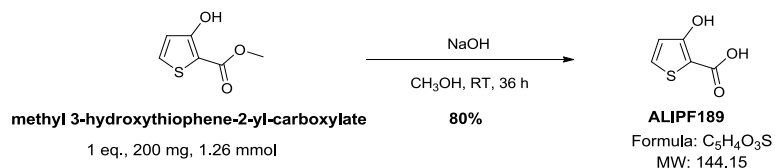
LC-MS (APCI $^+$): m/z 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR, ν (cm^{-1}): 1649 (C=O)

Procedure to obtain the carboxylic acid **ALIPF189**

NaOH (9.25 eq., 468 mg, 11.7 mmol) was added to a solution of methyl 3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylate (1 eq., 200 mg, 1.26 mmol) in CH_3OH (10 mL) and the reaction mixture was stirred for 48 hours at room temperature. 6N NaOH (1 mL) was added to the mixture and it was stirred for 12 hours. The reaction mixture was adjusted to pH 1 with 6N HCl, then extracted three times with EtOAc. The organic layers were gathered together, washed with water, brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated in vacuo. The solid residue was dried over P_2O_5 .

3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylic acid, **ALIPF189**



Appearance: grey powder

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 6.77 (d, $^3J = 5.52$ Hz, 1H, ArH), 7.69 (d, $^3J = 5.52$ Hz, 1H, ArH)

LC-MS (APCI $^+$): m/z 145 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR, ν (cm^{-1}): 1632 (C=O), 3299 (O-H)

6.2 Etude de modélisation moléculaire

The structure of DOT1L was taken from Protein Data Bank (PDB : 4ER5). The ligands were docked using ADT Autodock Tools 4.0 under UCSF Dock and AMBER parameters. The images were prepared with PyMOL (DeLanoScientific, 2009).

6.3 Evaluation pharmacologique

6.3.1 Test d'activité sur DOT1L

Tests of DOT1L activity of the synthesized compounds were performed by Eurofins Cerep, France. **SAH** ($\text{IC}_{50} = 240 \pm 26$ nM) was the reference compound.

Brief description of the test:

The test compound, reference compound, or water (control) was incubated for 15 min at 22°C with 60 ng DOT1L enzyme (human recombinant, *E. coli*), 100 nM [³H]-SAM and 0.125 µg polynucleosome (from HeLa cells, 2,5 µg/mL) in a buffer containing 18 mM Tris-HCl (pH 8), 90 mM NaCl and 1.8 mM dithiothréitol DTT (to prevent inter- and intramolecular disulfide bridges in the nucleosome proteins). For basal control measurements, the enzyme was absent from the reaction mixture. After incubation, the reaction was stopped by adding 33 mM citric acid and the samples were filtered under vacuum through glass fiber filters (GF/B, Packard) presoaked and rinsed several times with ice-cold 33 mM citric acid using a 96-sample cell harvester (Unifilter, Packard). The filters were dried then radioactivity was measured on scintillation counter (Topcount, Packard) using a scintillation cocktail (Microscint 0, Packard). The results are expressed as a percent inhibition of the control enzyme activity (**figure 6.1**). [120,184]

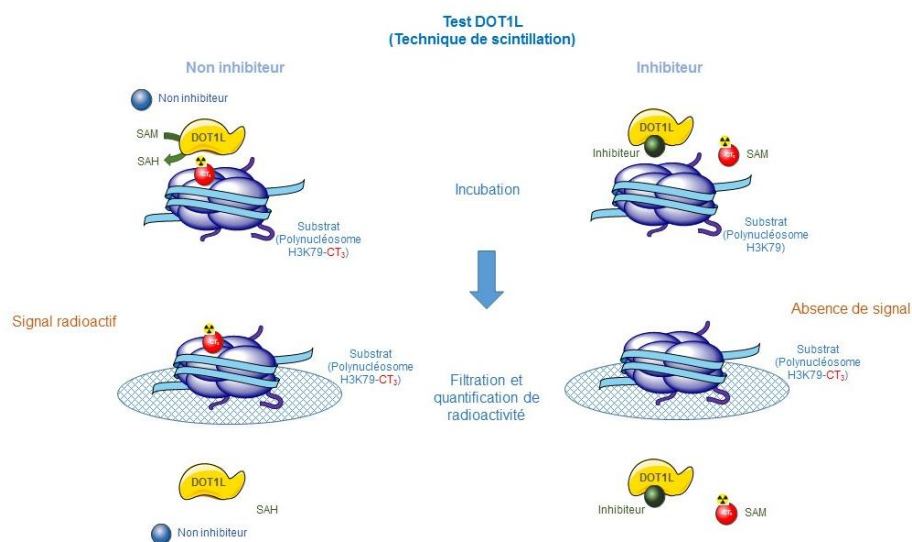


Figure 6.1. DOT1L activity test by Scintillation Proximity Assay (SPA)

6.3.2 Test d'activité sur DNMT

Tests of DNMT3a activity of the synthesized compounds were performed in ETaC, Toulouse by M. Dany PECHALRIEU. I was also trained to test some compounds. **SGI-1027** (IC₅₀ = 0.96 µM) was the reference compound.

Brief description of the test:

A 5'-strand oligonucleotide labelled with biotin was hybridized to its complementary 3'-strand labelled with 6-carboxyfluorescein (FAM) (incubation for 2 h at 37 °C) into a 384-well microplate (black

Optiplates; PerkinElmer) previously precoated with avidin. The duplex has a unique CpG site containing a restriction site of a methylation-sensitive restriction enzyme (HpyCH4IV). The human C-terminal DNMT3A (a.a. 623-908) was added to each well (200 ng/well) and mixed with the tested compound at the desired concentration (in DMSO) and SAM (10 mM final concentration) to start the reaction in a total volume of 40 μ L. After incubation for 1h at 37°C, each well was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 and NaCl (500 mM), and three more times with phosphate-buffered saline Tween-20 (PBST). The methylation-sensitive restriction enzyme HpyCH4IV (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was added to the wells. After incubation for 1 hour at 37 °C, each well was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 and NaCl (500 mM), and three more times with phosphate-buffered saline Tween-20 (PBST). Specific fluorescence signals were measured on a PerkinElmer Envision detector (**figure 6.2**).[64, 185]

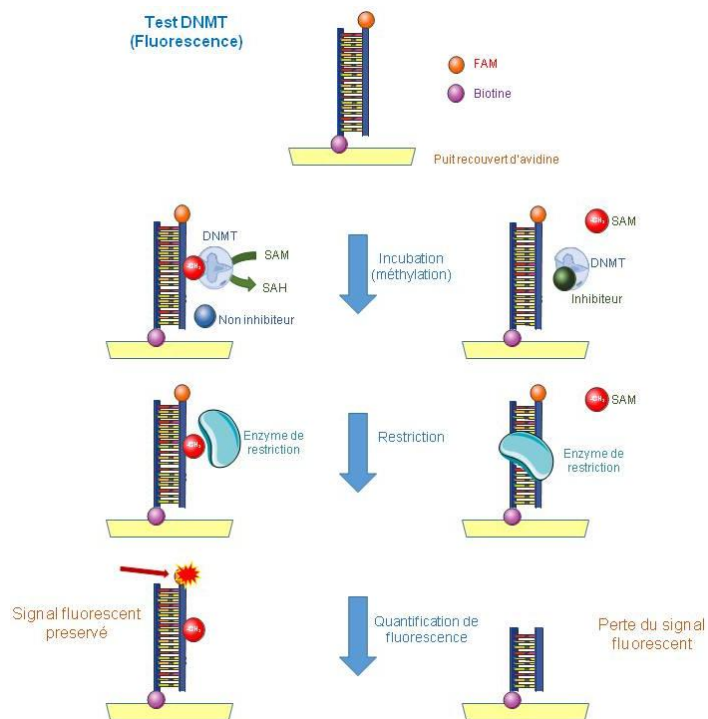


Figure 6.2. DNMT3a activity test by fluorescence

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. www.who.int/cancer/en.
2. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386, doi:10.1002/ijc.29210.
3. Castillo-Aguilera, O.; Depreux, P.; Halby, L.; Arimondo, P. B.; Goossens, L. DNA Methylation Targeting: The DNMT/HMT Crosstalk Challenge. *Biomolecules* **2017**, *7*, 3, doi:10.3390/biom7010003.
4. Dunn, J.; Rao, S. Epigenetics and immunotherapy: The current state of play. *Mol. Immunol.* **2017**, *87*, 227–239, doi:10.1016/j.molimm.2017.04.012.
5. Eckschlager, T.; Plich, J.; Stiborova, M.; Hrabeta, J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1414, doi:10.3390/ijms18071414.
6. Allis, C. D.; Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 487–500, doi:10.1038/nrg.2016.59.
7. Nguyen, A. T.; Zhang, Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1345–1358, doi:10.1101/gad.2057811.
8. Bernt, K. M.; Zhu, N.; Sinha, A. U.; Vempati, S.; Faber, J.; Krivtsov, A. V.; Feng, Z.; Punt, N.; Daigle, A.; Bullinger, L.; Pollock, R. M.; Richon, V. M.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 66–78, doi:10.1016/j.ccr.2011.06.010.
9. Chen, C.-W.; Armstrong, S. A. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Exp. Hematol.* **2015**, *43*, 673–684, doi:10.1016/j.exphem.2015.05.012.
10. Haladyna, J. N.; Yamauchi, T.; Neff, T.; Bernt, K. M. Epigenetic modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Epigenomics* **2015**, *7*, 301–320, doi:10.2217/epi.14.88.

11. Epizyme, Inc. (EPZM) Available online: www.epizyme.com/programs/pinometostat/ (consulté le 19 juillet, **2017**).
12. Hellebrekers, D. M. E. I.; Griffioen, A. W.; van Engeland, M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2007**, *1775*, 76–91, doi:10.1016/j.bbcan.2006.07.003.
13. Rotili, D.; Tarantino, D.; Marrocco, B.; Gros, C.; Masson, V.; Poughon, V.; Ausseil, F.; Chang, Y.; Labella, D.; Cosconati, S.; Di Maro, S.; Novellino, E.; Schnekenburger, M.; Grandjenette, C.; Bouvy, C.; Diederich, M.; Cheng, X.; Arimondo, P. B.; Mai, A. Properly Substituted Analogues of BIX-01294 Lose Inhibition of G9a Histone Methyltransferase and Gain Selective Anti-DNA Methyltransferase 3A Activity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96941, doi:10.1371/journal.pone.0096941.
14. Kanwal, R.; Datt, M.; Liu, X.; Gupta, S. Dietary Flavones as Dual Inhibitors of DNA Methyltransferases and Histone Methyltransferases. *PLoS ONE* **2016**, *11*, doi:10.1371/journal.pone.0162956.
15. José-Enériz, E. S.; Agirre, X.; Rabal, O.; Vilas-Zornoza, A.; Sanchez-Arias, J. A.; Miranda, E.; Ugarte, A.; Roa, S.; Paiva, B.; Mendoza, A. E.-H. de; Alvarez, R. M.; Casares, N.; Segura, V.; Martín-Subero, J. I.; Ogi, F.-X.; Soule, P.; Santiveri, C. M.; Campos-Olivas, R.; Castellano, G.; Barrena, M. G. F. de; Rodriguez-Madoz, J. R.; García-Barchino, M. J.; Lasarte, J. J.; Avila, M. A.; Martinez-Climent, J. A.; Oyarzabal, J.; Prosper, F. Discovery of first-in-class reversible dual small molecule inhibitors against G9a and DNMTs in hematological malignancies. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, ncomms15424, doi:10.1038/ncomms15424.
16. Institut National Du Cancer - Accueil Available online: <http://www.e-cancer.fr/> (consulté le 11 juin, **2017**).
17. ©Les cancers en France, Les Données, INCa, édition **2015**.
18. Tomizawa, D. Recent progress in the treatment of infant acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* **2015**, *57*, 811–819, doi:10.1111/ped.12758.

19. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
20. Plummer, M.; Martel, C. de; Vignat, J.; Ferlay, J.; Bray, F.; Franceschi, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* **2016**, *4*, e609–e616, doi:10.1016/S2214-109X(16)30143-7.
21. Kierszenbaum, A. L. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*; De Boeck Supérieur, **2006**; ISBN 978-2-8041-4910-9.
22. Stein, E. M.; Tallman, M. S. Mixed lineage rearranged leukaemia: pathogenesis and targeting DOT1L. *Curr. Opin. Hematol.* **2015**, *22*, 92–96, doi:10.1097/MOH.000000000000123.
23. Fahy, J.; Jeltsch, A.; Arimondo, P. B. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 1427–1442, doi:10.1517/13543776.2012.729579.
24. Erdmann, A.; Halby, L.; Fahy, J.; Arimondo, P. B. Targeting DNA Methylation with Small Molecules: What's Next? *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2569–2583, doi:10.1021/jm500843d.
25. Deltour, S.; Chopin, V.; Leprince, D. Modifications épigénétiques et cancer. *MEDECINE/SCIENCES* **2005**, *21*, 405–11.
26. Yoo, C. B.; Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 37–50, doi:10.1038/nrd1930.
27. Gros, C.; Fahy, J.; Halby, L.; Dufau, I.; Erdmann, A.; Gregoire, J.-M.; Ausseil, F.; Vispé, S.; Arimondo, P. B. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie* **2012**, *94*, 2280–2296, doi:10.1016/j.biochi.2012.07.025.
28. Anglin, J. L.; Song, Y. A medicinal chemistry perspective for targeting histone H3 lysine-79 methyltransferase DOT1L. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8972–8983, doi:10.1021/jm4007752.
29. Du, J.; Johnson, L. M.; Jacobsen, S. E.; Patel, D. J. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 519–532, doi:10.1038/nrm4043.

30. Helin, K.; Dhanak, D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* **2013**, *502*, 480–488, doi:10.1038/nature12751.
31. Oike, T.; Ogiwara, H.; Amornwicheit, N.; Nakano, T.; Kohno, T. Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2014**, *55*, 613–628, doi:10.1093/jrr/rrt227.
32. de Lartigue, J. Targeting Epigenetics for Cancer Therapy: Scores of Agents Capture Interest of Researchers. *OncLive* **2013**.
33. Ceccaldi, A.; Rajavelu, A.; Ragozin, S.; Sénamaud-Beaufort, C.; Bashtrykov, P.; Testa, N.; Dali-Ali, H.; Maulay-Bailly, C.; Amand, S.; Guianvarc'h, D.; Jeltsch, A.; Arimondo, P. B. Identification of novel inhibitors of DNA methylation by screening of a chemical library. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 543–548, doi:10.1021/cb300565z.
34. Valente, S.; Liu, Y.; Schnekenburger, M.; Zwergel, C.; Cosconati, S.; Gros, C.; Tardugno, M.; Labella, D.; Florean, C.; Minden, S.; Hashimoto, H.; Chang, Y.; Zhang, X.; Kirsch, G.; Novellino, E.; Arimondo, P. B.; Miele, E.; Ferretti, E.; Gulino, A.; Diederich, M.; Cheng, X.; Mai, A. Selective Non-nucleoside Inhibitors of Human DNA Methyltransferases Active in Cancer Including in Cancer Stem Cells. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 701–713, doi:10.1021/jm4012627.
35. Morera, L.; Lübbert, M.; Jung, M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 57, doi:10.1186/s13148-016-0223-4.
36. Plass, C.; Pfister, S. M.; Lindroth, A. M.; Bogatyrova, O.; Claus, R.; Lichter, P. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 765–780, doi:10.1038/nrg3554.
37. Heerboth, S.; Lapinska, K.; Snyder, N.; Leary, M.; Rollinson, S.; Sarkar, S. Use of Epigenetic Drugs in Disease: An Overview. *Genet. Epigenetics* **2014**, *6*, 9–19, doi:10.4137/GEG.S12270.
38. Asgatay, S.; Champion, C.; Marloie, G.; Drujon, T.; Senamaud-Beaufort, C.; Ceccaldi, A.; Erdmann, A.; Rajavelu, A.; Schambel, P.; Jeltsch, A.; Lequin, O.; Karoyan, P.; Arimondo, P. B.; Guianvarc'h, D. Synthesis and Evaluation of Analogues of N-Phthaloyl-L-tryptophan (RG108) as Inhibitors of DNA Methyltransferase 1. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 421–434, doi:10.1021/jm401419p.

39. Tanaka, M.; Roberts, J. M.; Qi, J.; Bradner, J. E. Inhibitors of emerging epigenetic targets for cancer therapy: a patent review (2010-2014). *Pharm. Pat. Anal.* **2015**, *4*, 261–284, doi:10.4155/ppa.15.16.
40. Xu, P.; Hu, G.; Luo, C.; Liang, Z. DNA methyltransferase inhibitors: an updated patent review (2012-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, doi:10.1080/13543776.2016.1209488.
41. Gelato, K. A.; Shaikhibrahim, Z.; Ocker, M.; Haendler, B. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: modulation of bromodomain proteins, methyltransferases, demethylases, and microRNAs. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 783–799, doi:10.1517/14728222.2016.1134490.
42. Ye, T.; Hui, C. Synthesis of lysine methyltransferase inhibitors. *Chem. Biol.* **2015**, *44*, doi:10.3389/fchem.2015.00044.
43. Gopalakrishnan, S.; Van Emburgh, B. O.; Shan, J.; Su, Z.; Fields, C. R.; Vieweg, J.; Hamazaki, T.; Schwartz, P. H.; Terada, N.; Robertson, K. D. A novel DNMT3B splice variant expressed in tumor and pluripotent cells modulates genomic DNA methylation patterns and displays altered DNA binding. *Mol. Cancer Res. MCR* **2009**, *7*, 1622–1634, doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0018.
44. Duymich, C. E.; Charlet, J.; Yang, X.; Jones, P. A.; Liang, G. DNMT3B isoforms without catalytic activity stimulate gene body methylation as accessory proteins in somatic cells. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11453, doi:10.1038/ncomms11453.
45. Lan, J.; Hua, S.; He, X.; Zhang, Y. DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2010**, *42*, 243–252, doi:10.1093/abbs/gmq015.
46. Rondelet, G.; Dal Maso, T.; Willems, L.; Wouters, J. Structural basis for recognition of histone H3K36me3 nucleosome by human de novo DNA methyltransferases 3A and 3B. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194*, 357–367, doi:10.1016/j.jsb.2016.03.013.
47. Jeltsch, A.; Jurkowska, R. Z. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* **2016**, doi:10.1093/nar/gkw723.
48. Gabbara, S.; Bhagwat, A. S. The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5-)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor. *Biochem. J.* **1995**, *307* (Pt 1), 87–92.

49. Stresemann, C.; Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8–13, doi:10.1002/ijc.23607.
50. Yoo, C. B.; Jeong, S.; Egger, G.; Liang, G.; Phiasivongsa, P.; Tang, C.; Redkar, S.; Jones, P. A. Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6400–6408, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0251.
51. Kim, C. H.; Marquez, V. E.; Mao, D. T.; Haines, D. R.; McCormack, J. J. Synthesis of pyrimidin-2-one nucleosides as acid-stable inhibitors of cytidine deaminase. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1374–1380.
52. Cheng, J. C.; Matsen, C. B.; Gonzales, F. A.; Ye, W.; Greer, S.; Marquez, V. E.; Jones, P. A.; Selker, E. U. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 399–409.
53. Champion, C.; Guianvarc'h, D.; Sénamaud-Beaufort, C.; Jurkowska, R. Z.; Jeltsch, A.; Ponger, L.; Arimondo, P. B.; Guieysse-Peugeot, A.-L. Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One* **2010**, *5*, e12388, doi:10.1371/journal.pone.0012388.
54. Brueckner, B.; Rius, M.; Markelova, M. R.; Fichtner, I.; Hals, P.-A.; Sandvold, M. L.; Lyko, F. Delivery of 5-azacytidine to human cancer cells by elaidic acid esterification increases therapeutic drug efficacy. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1256–1264, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1202.
55. Chen, L.-L.; Han, W.-F.; Geng, Y.; Su, J.-S. A genome-wide study of DNA methylation modified by epigallocatechin-3-gallate in the CAL-27 cell line. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 5886–5890, doi:10.3892/mmr.2015.4118.
56. Nandakumar, V.; Vaid, M.; Katiyar, S. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 537–544, doi:10.1093/carcin/bgq285.
57. Fang, M. Z.; Wang, Y.; Ai, N.; Hou, Z.; Sun, Y.; Lu, H.; Welsh, W.; Yang, C. S. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7563–7570.

58. Kuck, D.; Caulfield, T.; Lyko, F.; Medina-Franco, J. L. Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 3015–3023, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0609.
59. Caulfield, T.; Medina-Franco, J. L. Molecular dynamics simulations of human DNA methyltransferase 3B with selective inhibitor nanaomycin A. *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 185–191, doi:10.1016/j.jsb.2011.07.015.
60. Segura-Pacheco, B.; Trejo-Becerril, C.; Perez-Cardenas, E.; Taja-Chayeb, L.; Mariscal, I.; Chavez, A.; Acuña, C.; Salazar, A. M.; Lizano, M.; Dueñas-Gonzalez, A. Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1596–1603.
61. Villar-Garea, A.; Fraga, M. F.; Espada, J.; Esteller, M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4984–4989.
62. Lee, B. H.; Yegnasubramanian, S.; Lin, X.; Nelson, W. G. Procainamide Is a Specific Inhibitor of DNA Methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40749–40756, doi:10.1074/jbc.M505593200.
63. Ruiz-Magaña, M. J.; Martínez-Aguilar, R.; Lucendo, E.; Campillo-Davo, D.; Schulze-Osthoff, K.; Ruiz-Ruiz, C. The antihypertensive drug hydralazine activates the intrinsic pathway of apoptosis and causes DNA damage in leukemic T cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 21875–21886, doi:10.18632/oncotarget.7871.
64. Ceccaldi, A.; Rajavelu, A.; Champion, C.; Rampon, C.; Jurkowska, R.; Jankevicius, G.; Sénamaud-Beaufort, C.; Ponger, L.; Gagey, N.; Dali Ali, H.; Tost, J.; Vríz, S.; Ros, S.; Dauzonne, D.; Jeltsch, A.; Guianvarc'h, D.; Arimondo, P. B. C5-DNA Methyltransferase Inhibitors: From Screening to Effects on Zebrafish Embryo Development. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1337–1345, doi:10.1002/cbic.201100130.
65. Medina-Franco, J. L.; Méndez-Lucio, O.; Dueñas-González, A.; Yoo, J. Discovery and development of DNA methyltransferase inhibitors using in silico approaches. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 569–577, doi:10.1016/j.drudis.2014.12.007.
66. Rilova, E.; Erdmann, A.; Gros, C.; Masson, V.; Aussagues, Y.; Poughon-Cassabois, V.; Rajavelu, A.; Jeltsch, A.; Menon, Y.; Novosad, N.; Gregoire, J.-M.; Vispé, S.; Schambel, P.; Ausseil, F.;

- Sautel, F.; Arimondo, P. B.; Cantagrel, F. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino-N-(4-aminophenyl)benzamide Analogues of Quinoline-Based SGI-1027 as Inhibitors of DNA Methylation. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 590–601, doi:10.1002/cmdc.201300420.
67. Fagan, R. L.; Cryderman, D. E.; Kopelovich, L.; Wallrath, L. L.; Brenner, C. Laccic acid A is a direct, DNA-competitive inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 23858–23867, doi:10.1074/jbc.M113.480517.
68. Kilgore, J. A.; Du, X.; Melito, L.; Wei, S.; Wang, C.; Chin, H. G.; Posner, B.; Pradhan, S.; Ready, J. M.; Williams, N. S. Identification of DNMT1 selective antagonists using a novel scintillation proximity assay. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 19673–19684, doi:10.1074/jbc.M112.443895.
69. Medina-Franco, J. L.; Méndez-Lucio, O.; Yoo, J. Rationalization of activity cliffs of a sulfonamide inhibitor of DNA methyltransferases with induced-fit docking. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3253–3261, doi:10.3390/ijms15023253.
70. Siedlecki, P.; Boy, R. G.; Musch, T.; Brueckner, B.; Suhai, S.; Lyko, F.; Zielenkiewicz, P. Discovery of Two Novel, Small-Molecule Inhibitors of DNA Methylation. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 678–683, doi:10.1021/jm050844z.
71. Brueckner, B.; Garcia Boy, R.; Siedlecki, P.; Musch, T.; Kliem, H. C.; Zielenkiewicz, P.; Suhai, S.; Wiessler, M.; Lyko, F. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6305–6311, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2957.
72. Suzuki, T.; Tanaka, R.; Hamada, S.; Nakagawa, H.; Miyata, N. Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1124–1127, doi:10.1016/j.bmcl.2009.12.016.
73. Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Baguley, B. C.; Cain, B. F. Potential antitumor agents. 29. Quantitative structure-activity relationships for the antileukemic bisquaternary ammonium heterocycles. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 134–150.
74. Gros, C.; Fleury, L.; Nahoum, V.; Faux, C.; Valente, S.; Labella, D.; Cantagrel, F.; Rilova, E.; Bouhlel, M. A.; David-Cordonnier, M.-H.; Dufau, I.; Ausseil, F.; Mai, A.; Mourey, L.; Lacroix, L.;

- Arimondo, P. B. New insights on the mechanism of quinoline-based DNA Methyltransferase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 6293–6302, doi:10.1074/jbc.M114.594671.
75. Datta, J.; Ghoshal, K.; Kutay, H.; Phiasivongsa, P.; Redkar, S.; Jacob, S. Novel DNA hypomethylating agents: non-nucleoside compounds that do not incorporate into DNA selectively induce degradation of DNA methyltransferase I (DNMT1) in human cancer cells by the proteasomal pathway and re-express silenced tumor suppressor genes. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4142–4142.
76. Datta, J.; Ghoshal, K.; Denny, W. A.; Gamage, S. A.; Brooke, D. G.; Phiasivongsa, P.; Redkar, S.; Jacob, S. T. A New Class of Quinoline-Based DNA Hypomethylating Agents Reactivates Tumor Suppressor Genes by Blocking DNA Methyltransferase 1 Activity and Inducing Its Degradation. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4277–4285, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3669.
77. Lilloco, R.; Stesco, N.; Khorshid Amhad, T.; Cortes, C.; Namaka, M. P.; Lakowski, T. M. Inhibitors of enzymes catalyzing modifications to histone lysine residues: structure, function and activity. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 879–897, doi:10.4155/fmc-2016-0021.
78. Suzuki, T.; Terashima, M.; Tange, S.; Ishimura, A. Roles of histone methyl-modifying enzymes in development and progression of cancer. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 795–800, doi:10.1111/cas.12169.
79. Furukawa, Y.; Kikuchi, J. Epigenetic mechanisms of cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **2016**, doi:10.1007/s12185-016-2048-5.
80. Nicholson, T. B.; Chen, T.; Richard, S. The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol. Res.* **2009**, *60*, 466–474, doi:10.1016/j.phrs.2009.07.006.
81. Hu, H.; Qian, K.; Ho, M.-C.; Zheng, Y. G. Small Molecule Inhibitors of Protein Arginine Methyltransferases. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2016**, *25*, 335–358, doi:10.1517/13543784.2016.1144747.
82. Yang, Y.; Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 37–50, doi:10.1038/nrc3409.

83. Feng, Q.; Yi, P.; Wong, J.; O'Malley, B. W. Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 7846–7857, doi:10.1128/MCB.00568-06.
84. Selvi, B. R.; Batta, K.; Kishore, A. H.; Mantelingu, K.; Varier, R. A.; Balasubramanyam, K.; Pradhan, S. K.; Dasgupta, D.; Sriram, S.; Agrawal, S.; Kundu, T. K. Identification of a novel inhibitor of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)-mediated methylation of histone H3 Arg-17. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7143–7152, doi:10.1074/jbc.M109.063933.
85. van Haren, M.; van Ufford, L. Q.; Moret, E. E.; Martin, N. I. Synthesis and evaluation of protein arginine N-methyltransferase inhibitors designed to simultaneously occupy both substrate binding sites. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 549–560, doi:10.1039/c4ob01734j.
86. Jahan, S.; Davie, J. R. Protein arginine methyltransferases (PRMTs): role in chromatin organization. *Adv. Biol. Regul.* **2015**, *57*, 173–184, doi:10.1016/j.jbior.2014.09.003.
87. Sheng, X.; Wang, Z. Protein arginine methyltransferase 5 regulates multiple signaling pathways to promote lung cancer cell proliferation. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 567, doi:10.1186/s12885-016-2632-3.
88. Kanda, M.; Shimizu, D.; Fujii, T.; Tanaka, H.; Shibata, M.; Iwata, N.; Hayashi, M.; Kobayashi, D.; Tanaka, C.; Yamada, S.; Nakayama, G.; Sugimoto, H.; Koike, M.; Fujiwara, M.; Koderu, Y. Protein arginine methyltransferase 5 is associated with malignant phenotype and peritoneal metastasis in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 1195–1202, doi:10.3892/ijo.2016.3584.
89. Bissinger, E.-M.; Heinke, R.; Spannhoff, A.; Eberlin, A.; Metzger, E.; Cura, V.; Hassenboehler, P.; Cavarelli, J.; Schüle, R.; Bedford, M. T.; Sippl, W.; Jung, M. Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsones as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3717–3731, doi:10.1016/j.bmc.2011.02.032.
90. Inc, E. Epizyme Earns \$6 Million Milestone Payment from GlaxoSmithKline for Initiation of Clinical Development with First-in-Class PRMT5 Inhibitor Available online: <http://globenewswire.com/news-release/2016/09/15/872059/0/en/Epizyme-Earns-6-Million-Milestone-Payment-from-GlaxoSmithKline-for-Initiation-of-Clinical-Development-with-First-in-Class-PRMT5-Inhibitor.html> (consulté le 15 juillet, **2017**).

91. Nguyen, C. T.; Weisenberger, D. J.; Velicescu, M.; Gonzales, F. A.; Lin, J. C. Y.; Liang, G.; Jones, P. A. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6456–6461.
92. Andresini, O.; Ciotti, A.; Rossi, M. N.; Battistelli, C.; Carbone, M.; Maione, R. A cross-talk between DNA methylation and H3 lysine 9 dimethylation at the KvDMR1 region controls the induction of Cdkn1c in muscle cells. *Epigenetics* **2016**, *0*, doi:10.1080/15592294.2016.1230576.
93. Das, S.; Chadwick, B. P. Influence of Repressive Histone and DNA Methylation upon D4Z4 Transcription in Non-Myogenic Cells. *PloS One* **2016**, *11*, e0160022, doi:10.1371/journal.pone.0160022.
94. Tachibana, M.; Matsumura, Y.; Fukuda, M.; Kimura, H.; Shinkai, Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* **2008**, *27*, 2681–2690, doi:10.1038/emboj.2008.192.
95. Tachibana, M.; Ueda, J.; Fukuda, M.; Takeda, N.; Ohta, T.; Iwanari, H.; Sakihama, T.; Kodama, T.; Hamakubo, T.; Shinkai, Y. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 815–826, doi:10.1101/gad.1284005.
96. Casciello, F.; Windloch, K.; Gannon, F.; Lee, J. S. Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 487, doi:10.3389/fimmu.2015.00487.
97. Ding, J.; Li, T.; Wang, X.; Zhao, E.; Choi, J.-H.; Yang, L.; Zha, Y.; Dong, Z.; Huang, S.; Asara, J. M.; Cui, H.; Ding, H.-F. The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 896–907, doi:10.1016/j.cmet.2013.11.004.
98. Dong, K. B.; Maksakova, I. A.; Mohn, F.; Leung, D.; Appanah, R.; Lee, S.; Yang, H. W.; Lam, L. L.; Mager, D. L.; Schübeler, D.; Tachibana, M.; Shinkai, Y.; Lorincz, M. C. DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. *EMBO J.* **2008**, *27*, 2691–2701, doi:10.1038/emboj.2008.193.

99. Epsztejn-Litman, S.; Feldman, N.; Abu-Remaileh, M.; Shufaro, Y.; Gerson, A.; Ueda, J.; Deplus, R.; Fuks, F.; Shinkai, Y.; Cedar, H.; Bergman, Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1176–1183, doi:10.1038/nsmb.1476.
100. Chang, Y.; Sun, L.; Kokura, K.; Horton, J. R.; Fukuda, M.; Espejo, A.; Izumi, V.; Koomen, J. M.; Bedford, M. T.; Zhang, X.; Shinkai, Y.; Fang, J.; Cheng, X. MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 533, doi:10.1038/ncomms1549.
101. Zhang, T.; Termanis, A.; Özkan, B.; Bao, X. X.; Culley, J.; de Lima Alves, F.; Rappsilber, J.; Ramsahoye, B.; Stancheva, I. G9a/GLP Complex Maintains Imprinted DNA Methylation in Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 77–85, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.007.
102. Kubicek, S.; O'Sullivan, R. J.; August, E. M.; Hickey, E. R.; Zhang, Q.; Teodoro, M. L.; Rea, S.; Mechtler, K.; Kowalski, J. A.; Homon, C. A.; Kelly, T. A.; Jenuwein, T. Reversal of H3K9me2 by a Small-Molecule Inhibitor for the G9a Histone Methyltransferase. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 473–481, doi:10.1016/j.molcel.2007.01.017.
103. Yuan, Y.; Wang, Q.; Paulk, J.; Kubicek, S.; Kemp, M. M.; Adams, D. J.; Shamji, A. F.; Wagner, B. K.; Schreiber, S. L. A Small-Molecule Probe of the Histone Methyltransferase G9a Induces Cellular Senescence in Pancreatic Adenocarcinoma. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1152–1157, doi:10.1021/cb300139y.
104. Vedadi, M.; Barsyte-Lovejoy, D.; Liu, F.; Rival-Gervier, S.; Allali-Hassani, A.; Labrie, V.; Wigle, T. J.; Dimaggio, P. A.; Wasney, G. A.; Siarheyeva, A.; Dong, A.; Tempel, W.; Wang, S.-C.; Chen, X.; Chau, I.; Mangano, T. J.; Huang, X.-P.; Simpson, C. D.; Pattenden, S. G.; Norris, J. L.; Kireev, D. B.; Tripathy, A.; Edwards, A.; Roth, B. L.; Janzen, W. P.; Garcia, B. A.; Petronis, A.; Ellis, J.; Brown, P. J.; Frye, S. V.; Arrowsmith, C. H.; Jin, J. A chemical probe selectively inhibits G9a and GLP methyltransferase activity in cells. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 566–574, doi:10.1038/nchembio.599.
105. Viré, E.; Brenner, C.; Deplus, R.; Blanchon, L.; Fraga, M.; Didelot, C.; Morey, L.; Van Eynde, A.; Bernard, D.; Vanderwinden, J.-M.; Bollen, M.; Esteller, M.; Di Croce, L.; de Launoit, Y.; Fuks, F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **2006**, *439*, 871–874, doi:10.1038/nature04431.

106. Moison, C.; Senamaud-Beaufort, C.; Fourrière, L.; Champion, C.; Ceccaldi, A.; Lacomme, S.; Daunay, A.; Tost, J.; Arimondo, P. B.; Guieysse-Peugeot, A.-L. DNA methylation associated with polycomb repression in retinoic acid receptor β silencing. *FASEB J* **2013**, *27*, 1468–1478, doi:10.1096/fj.12-210971.
107. Moison, C.; Assemat, F.; Daunay, A.; Tost, J.; Guieysse-Peugeot, A.-L.; Arimondo, P. B. Synergistic chromatin repression of the tumor suppressor gene RARB in human prostate cancers. *Epigenetics* **2014**, *9*, 477–482, doi:10.4161/epi.27869.
108. Ning, X.; Shi, Z.; Liu, X.; Zhang, A.; Han, L.; Jiang, K.; Kang, C.; Zhang, Q. DNMT1 and EZH2 mediated methylation silences the microRNA-200b/a/429 gene and promotes tumor progression. *Cancer Lett.* **2015**, *359*, 198–205, doi:10.1016/j.canlet.2015.01.005.
109. Nichol, J. N.; Dupéré-Richer, D.; Ezponda, T.; Licht, J. D.; Miller, W. H. H3K27 Methylation: A Focal Point of Epigenetic Deregulation in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2016**, *131*, 59–95, doi:10.1016/bs.acr.2016.05.001.
110. Nayak, V.; Xu, C.; Min, J. Composition, recruitment and regulation of the PRC2 complex. *Nucleus* **2011**, *2*, 277–282, doi:10.4161/nucl.2.4.16266.
111. Bradley, W. D.; Arora, S.; Busby, J.; Balasubramanian, S.; Gehling, V. S.; Nasveschuk, C. G.; Vaswani, R. G.; Yuan, C.-C.; Hatton, C.; Zhao, F.; Williamson, K. E.; Iyer, P.; Méndez, J.; Campbell, R.; Cantone, N.; Garapaty-Rao, S.; Audia, J. E.; Cook, A. S.; Dakin, L. A.; Albrecht, B. K.; Harmange, J.-C.; Daniels, D. L.; Cummings, R. T.; Bryant, B. M.; Normant, E.; Trojer, P. EZH2 inhibitor efficacy in non-Hodgkin's lymphoma does not require suppression of H3K27 monomethylation. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1463–1475, doi:10.1016/j.chembiol.2014.09.017.
112. Balasubramanian, V.; Iyer, P.; Arora, S.; Troyer, P.; Normant, E. Abstract 1697: CPI-169, a novel and potent EZH2 inhibitor, synergizes with CHOP in vivo and achieves complete regression in lymphoma xenograft models. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 1697–1697, doi:10.1158/1538-7445.AM2014-1697.
113. Kuntz, K.; Chesworth, R.; Duncan, K.; Keilhack, H.; Warholic, N.; Klaus, C.; Seki, M.; Shirotori, S.; Kawano, S.; Wigle, T. J. N. Aryl-or Heteroaryl-Substituted Benzene Compounds **2012**.

114. Ribrag, V.; Soria, J.-C.; Michot, J.-M.; Schmitt, A.; Postel-Vinay, S.; Bijou, F.; Thomson, B.; Keilhack, H.; Blakemore, S. J.; Reyderman, L.; Kumar, P.; Fine, G.; McDonald, A.; Ho, P. T.; Italiano, A. Phase 1 Study of Tazemetostat (EPZ-6438), an Inhibitor of Enhancer of Zeste-Homolog 2 (EZH2): Preliminary Safety and Activity in Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) Patients. *Blood* **2015**, *126*, 473–473.
115. McCabe, M. T.; Ott, H. M.; Ganji, G.; Korenchuk, S.; Thompson, C.; Van Aller, G. S.; Liu, Y.; Graves, A. P.; Della Pietra, A.; Diaz, E.; LaFrance, L. V.; Mellinger, M.; Duquenne, C.; Tian, X.; Kruger, R. G.; McHugh, C. F.; Brandt, M.; Miller, W. H.; Dhanak, D.; Verma, S. K.; Tummino, P. J.; Creasy, C. L. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* **2012**, *492*, 108–112, doi:10.1038/nature11606.
116. Inc, E. Epizyme Announces Tazemetostat Fast Track Designation for Follicular Lymphoma and Plenary Session on Phase 2 NHL Data at ICML Available online: <http://globenewswire.com/news-release/2017/04/25/970819/0/en/Epizyme-Announces-Tazemetostat-Fast-Track-Designation-for-Follicular-Lymphoma-and-Plenary-Session-on-Phase-2-NHL-Data-at-ICML.html> (consulté le 1 juillet, **2017**).
117. Richon, V. M.; Johnston, D.; Sneeringer, C. J.; Jin, L.; Majer, C. R.; Elliston, K.; Jerva, L. F.; Scott, M. P.; Copeland, R. A. Chemogenetic Analysis of Human Protein Methyltransferases. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78*, 199–210, doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01135.x.
118. Kim, W.; Choi, M.; Kim, J.-E. The histone methyltransferase Dot1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle. *Cell Cycle Georget. Tex* **2014**, *13*, 726–738, doi:10.4161/cc.28104.
119. Min, J.; Feng, Q.; Li, Z.; Zhang, Y.; Xu, R.-M. Structure of the Catalytic Domain of Human DOT1L, a Non-SET Domain Nucleosomal Histone Methyltransferase. *Cell* **2003**, *112*, 711–723, doi:10.1016/S0092-8674(03)00114-4.
120. Yost, J. M.; Korboukh, I.; Liu, F.; Gao, C.; Jin, J. Targets in epigenetics: inhibiting the methyl writers of the histone code. *Curr. Chem. Genomics* **2011**, *5*, 72–84, doi:10.2174/1875397301005010072.
121. Zhang, L.; Deng, L.; Chen, F.; Yao, Y.; Wu, B.; Wei, L.; Mo, Q.; Song, Y. Inhibition of histone H3K79 methylation selectively inhibits proliferation, self-renewal and metastatic potential of breast cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*, 10665–10677.

122. Lee, J.-Y.; Kong, G. DOT1L: a new therapeutic target for aggressive breast cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 30451–30452, doi:10.18632/oncotarget.5860.
123. Kim, W.; Kim, R.; Park, G.; Park, J.-W.; Kim, J.-E. Deficiency of H3K79 histone methyltransferase Dot1-like protein (DOT1L) inhibits cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5588–5599, doi:10.1074/jbc.M111.328138.
124. Singh, V.; Singh, L. C.; Singh, A. P.; Sharma, J.; Borthakur, B. B.; Debnath, A.; Rai, A. K.; Phukan, R. K.; Mahanta, J.; Katakai, A. C.; Kapur, S.; Saxena, S. Status of epigenetic chromatin modification enzymes and esophageal squamous cell carcinoma risk in northeast Indian population. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 979–999.
125. Wong, M.; Tee, A. E. L.; Milazzo, G.; Bell, J. L.; Poulos, R. C.; Atmadibrata, B.; Sun, Y.; Jing, D.; Ho, N.; Ling, D.; Liu, P. Y.; Zhang, X. D.; Hüttelmaier, S.; Wong, J. W. H.; Wang, J.; Polly, P.; Perini, G.; Scarlett, C. J.; Liu, T. The Histone Methyltransferase DOT1L Promotes Neuroblastoma by Regulating Gene Transcription. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2522–2533, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1663.
126. Pareja-Galeano, H.; Sanchis-Gomar, F.; Pérez, L. M.; Emanuele, E.; Lucia, A.; Gálvez, B. G.; Gallardo, M. E. iPSCs-based anti-aging therapies: Recent discoveries and future challenges. *Ageing Res. Rev.* **2016**, *27*, 37–41, doi:10.1016/j.arr.2016.02.007.
127. Yao, Y.; Chen, P.; Diao, J.; Cheng, G.; Deng, L.; Anglin, J. L.; Prasad, B. V. V.; Song, Y. Selective Inhibitors of Histone Methyltransferase DOT1L: Design, Synthesis, and Crystallographic Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16746–16749, doi:10.1021/ja206312b.
128. Anglin, J. L.; Deng, L.; Yao, Y.; Cai, G.; Liu, Z.; Jiang, H.; Cheng, G.; Chen, P.; Dong, S.; Song, Y. Synthesis and Structure–Activity Relationship Investigation of Adenosine-Containing Inhibitors of Histone Methyltransferase DOT1L. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8066–8074, doi:10.1021/jm300917h.
129. Deng, L.; Zhang, L.; Yao, Y.; Wang, C.; Redell, M. S.; Dong, S.; Song, Y. Synthesis, activity and metabolic stability of non-ribose containing inhibitors of histone methyltransferase DOT1L. *MedChemComm* **2013**, *4*, 822–826, doi:10.1039/C3MD00021D.
130. Basavapathruni, A.; Jin, L.; Daigle, S. R.; Majer, C. R. A.; Therkelsen, C. A.; Wigle, T. J.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Pollock, R. M.; Scott, M. P.; Moyer, M. P.; Richon, V. M.; Copeland, R. A.;

- Olhava, E. J. Conformational adaptation drives potent, selective and durable inhibition of the human protein methyltransferase **DOT1L**. *Chem. Biol. Drug Des.* 2012, **80**, 971–980, doi:10.1111/cbdd.12050.
131. Yu, W.; Chory, E. J.; Wernimont, A. K.; Tempel, W.; Scopton, A.; Federation, A.; Marineau, J. J.; Qi, J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Yi, J.; Marcellus, R.; Iacob, R. E.; Engen, J. R.; Griffin, C.; Aman, A.; Wienholds, E.; Li, F.; Pineda, J.; Estiu, G.; Shatseva, T.; Hajian, T.; Al-Awar, R.; Dick, J. E.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Arrowsmith, C. H.; Bradner, J. E.; Schapira, M. Catalytic site remodelling of the DOT1L methyltransferase by selective inhibitors. *Nat. Commun.* **2012**, **3**, 1288, doi:10.1038/ncomms2304.
132. Yu, W.; Chory, E. J.; Wernimont, A. K.; Tempel, W.; Scopton, A.; Federation, A.; Marineau, J. J.; Qi, J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Yi, J.; Marcellus, R.; Iacob, R. E.; Engen, J. R.; Griffin, C.; Aman, A.; Wienholds, E.; Li, F.; Pineda, J.; Estiu, G.; Shatseva, T.; Hajian, T.; Al-awar, R.; Dick, J. E.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Arrowsmith, C. H.; Bradner, J. E.; Schapira, M. Corrigendum: Catalytic site remodelling of the DOT1L methyltransferase by selective inhibitors. *Nat. Commun.* **2013**, **4**, 1893, doi:10.1038/ncomms2845.
133. Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Majer, C. R.; Sneeringer, C. J.; Song, J.; Johnston, L. D.; Scott, M. P.; Smith, J. J.; Xiao, Y.; Jin, L.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Bernt, K. M.; Tseng, J.-C.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M. Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor. *Cancer Cell* **2011**, **20**, 53–65, doi:10.1016/j.ccr.2011.06.009.
134. Olhava, E. J.; Chesworth, R.; Kuntz, K. Carbocycle-Substituted Purine and 7-Deazapurine Compounds **2012**.
135. Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Basavapathruni, A.; Jin, L.; Boriack-Sjodin, P. A.; Allain, C. J.; Klaus, C. R.; Raimondi, A.; Scott, M. P.; Waters, N. J.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* **2013**, **122**, 1017–1025, doi:10.1182/blood-2013-04-497644.
136. Basavapathruni, A.; Olhava, E. J.; Daigle, S. R.; Therkelsen, C. A.; Jin, L.; Boriack-Sjodin, P. A.; Allain, C. J.; Klaus, C. R.; Raimondi, A.; Scott, M. P.; Dovletoglou, A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M.; Copeland, R. A.; Moyer, M. P.; Chesworth, R.; Pearson, P. G.; Waters, N. J. Nonclinical

- pharmacokinetics and metabolism of EPZ-5676, a novel DOT1L histone methyltransferase inhibitor. *Biopharm. Drug Dispos.* **2014**, *35*, 237–252, doi:10.1002/bdd.1889.
137. Waters, N. J.; Smith, S. A.; Olhava, E. J.; Duncan, K. W.; Burton, R. D.; O'Neill, J.; Rodrigue, M.-E.; Pollock, R. M.; Moyer, M. P.; Chesworth, R. Metabolism and disposition of the DOT1L inhibitor, pinometostat (EPZ-5676), in rat, dog and human. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 43–62, doi:10.1007/s00280-015-2929-y.
138. Waters, N. J. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pinometostat (EPZ-5676), a First-in-Class, Small Molecule S-Adenosyl Methionine Competitive Inhibitor of DOT1L. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, doi:10.1007/s13318-017-0404-3.
139. Epizyme DOT1L Inhibitor EPZ-5676 Shows Clinical and Biological Activity in Adult Patients with Acute Leukemias in Phase 1 Trial (NASDAQ:EPZM) Available online: <http://amda-1rbic2.client.shareholder.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=886607> (consulté le 19 juillet, **2017**).
140. Campbell, C. T.; Haladyna, J. N.; Drubin, D. A.; Thomson, T. M.; Maria, M. J.; Yamauchi, T.; Waters, N. J.; Olhava, E. J.; Pollock, R. M.; Smith, J. J.; Copeland, R. A.; Blakemore, S. J.; Bernt, K. M.; Daigle, S. R. Mechanisms of Pinometostat (EPZ-5676) Treatment Emergent Resistance in MLL Rearranged Leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0693.
141. Scheufler, C.; Möbitz, H.; Gaul, C.; Ragot, C.; Be, C.; Fernández, C.; Beyer, K. S.; Tiedt, R.; Stauffer, F. Optimization of a Fragment-Based Screening Hit toward Potent DOT1L Inhibitors Interacting in an Induced Binding Pocket. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 730–734, doi:10.1021/acsmchemlett.6b00168.
142. Chen, C.; Zhu, H.; Stauffer, F.; Caravatti, G.; Vollmer, S.; Machauer, R.; Holzer, P.; Möbitz, H.; Scheufler, C.; Klumpp, M.; Tiedt, R.; Beyer, K. S.; Calkins, K.; Guthy, D.; Kiffe, M.; Zhang, J.; Gaul, C. Discovery of Novel Dot1L Inhibitors through a Structure-Based Fragmentation Approach. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 735–740, doi:10.1021/acsmchemlett.6b00167.
143. Möbitz, H.; Machauer, R.; Holzer, P.; Vaupel, A.; Stauffer, F.; Ragot, C.; Caravatti, G.; Scheufler, C.; Fernandez, C.; Hommel, U.; Tiedt, R.; Beyer, K. S.; Chen, C.; Zhu, H.; Gaul, C. Discovery of Potent, Selective, and Structurally Novel Dot1L Inhibitors by a Fragment Linking Approach. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 338–343, doi:10.1021/acsmchemlett.6b00519.

144. Luo, M.; Wang, H.; Zou, Y.; Zhang, S.; Xiao, J.; Jiang, G.; Zhang, Y.; Lai, Y. Identification of phenoxyacetamide derivatives as novel DOT1L inhibitors via docking screening and molecular dynamics simulation. *J. Mol. Graph. Model.* **2016**, *68*, 128–139, doi:10.1016/j.jmngm.2016.06.011.
145. Wozniak, R. J.; Klimecki, W. T.; Lau, S. S.; Feinstein, Y.; Futscher, B. W. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* **2007**, *26*, 77–90, doi:10.1038/sj.onc.1209763.
146. Schwämmle, V.; Sidoli, S.; Ruminowicz, C.; Wu, X.; Lee, C.-F.; Helin, K.; Jensen, O. N. Systems Level Analysis of Histone H3 Post-translational Modifications (PTMs) Reveals Features of PTM Crosstalk in Chromatin Regulation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2016**, *15*, 2715–2729, doi:10.1074/mcp.M115.054460.
147. Baubec, T.; Colombo, D. F.; Wirbelauer, C.; Schmidt, J.; Burger, L.; Krebs, A. R.; Akalin, A.; Schübeler, D. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature* **2015**, *520*, 243–247, doi:10.1038/nature14176.
148. Shieh, F.-K.; Youngblood, B.; Reich, N. O. The role of Arg165 towards base flipping, base stabilization and catalysis in M.HhaI. *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 516–527, doi:10.1016/j.jmb.2006.07.030.
149. Osborn, H. M. I.; Williams, N. A. O. Development of tyrosinase labile protecting groups for amines. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3111–3113, doi:10.1021/ol040042i.
150. Salvatore, R. N.; Nagle, A. S.; Schmidt, S. E.; Jung, K. W. Cesium Hydroxide Promoted Chemoselective N-Alkylation for the Generally Efficient Synthesis of Secondary Amines. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1893–1896, doi:10.1021/ol9910417.
151. Faghieh, R.; Dwight, W.; Pan, J. B.; Fox, G. B.; Krueger, K. M.; Esbenshade, T. A.; McVey, J. M.; Marsh, K.; Bennani, Y. L.; Hancock, A. A. Synthesis and SAR of aminoalkoxy-biaryl-4-carboxamides: novel and selective histamine H3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1325–1328.

152. Lucas, R. L.; Zart, M. K.; Mukherjee, J.; Murkerjee, J.; Sorrell, T. N.; Powell, D. R.; Borovik, A. S. A modular approach toward regulating the secondary coordination sphere of metal ions: differential dioxygen activation assisted by intramolecular hydrogen bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15476–15489, doi:10.1021/ja063935+.
153. Lee, C.-C.; Huang, K.-F.; Chang, D.-M.; Hsu, J.-J.; Huang, F.-C.; Shih, K.-N.; Chen, C.-L.; Chen, T.-C.; Chen, R.-H.; Lin, J.-J.; Huang, H.-S. Design, synthesis and evaluation of telomerase inhibitory, hTERT repressing, and anti-proliferation activities of symmetrical 1,8-disubstituted amidoanthraquinones. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 102–112, doi:10.1016/j.ejmech.2012.01.044.
154. Zhou, D.; Tuo, W.; Hu, H.; Xu, J.; Chen, H.; Rao, Z.; Xiao, Y.; Hu, X.; Liu, P. Synthesis and activity evaluation of tilorone analogs as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 432–441, doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.050.
155. Abou-Gharbia, M. A.; Childers, W. E.; Fletcher, H.; McGaughey, G.; Patel, U.; Webb, M. B.; Yardley, J.; Andree, T.; Boast, C.; Kucharik, R. J.; Marquis, K.; Morris, H.; Scerni, R.; Moyer, J. A. Synthesis and SAR of Adatanserin: Novel Adamantyl Aryl- and Heteroarylpiperazines with Dual Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₂ Activity as Potential Anxiolytic and Antidepressant Agents. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5077–5094, doi:10.1021/jm9806704.
156. Balboni, G.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Bianchi, C.; Rizzi, D.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H. Evaluation of the Dmt-Tic pharmacophore: conversion of a potent delta-opioid receptor antagonist into a potent delta agonist and ligands with mixed properties. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 713–720.
157. Coffman, K. C.; Hartley, T. P.; Dallas, J. L.; Kurth, M. J. Isoxazolodihydropyridinones: 1,3-Dipolar Cycloaddition of Nitrile Oxides onto 2,4-Dioxopiperidines. *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 280–284, doi:10.1021/co200200u.
158. Balboni, G.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Bianchi, C.; Rizzi, D.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H. Evaluation of the Dmt-Tic Pharmacophore: Conversion of a Potent δ -Opioid Receptor Antagonist into a Potent δ Agonist and Ligands with Mixed Properties. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 713–720, doi:10.1021/jm010449i.
159. Tunoori, A. R.; Dutta, D.; Georg, G. I. Polymer-bound triphenylphosphine as traceless reagent for Mitsunobu reactions in combinatorial chemistry: Synthesis of aryl ethers from phenols and alcohols. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8751–8754, doi:10.1016/S0040-4039(98)01988-1.

160. Keurulainen, L.; Vahermo, M.; Puente-Felipe, M.; Sandoval-Izquierdo, E.; Crespo-Fernández, B.; Guijarro-López, L.; Huertas-Valentín, L.; de las Heras-Dueña, L.; Leino, T. O.; Siiskonen, A.; Ballell-Pages, L.; Sanz, L. M.; Castañeda-Casado, P.; Jiménez-Díaz, M. B.; Martínez-Martínez, M. S.; Viera, S.; Kiuru, P.; Calderón, F.; Yli-Kauhaluoma, J. A Developability-Focused Optimization Approach Allows Identification of in Vivo Fast-Acting Antimalarials: N-[3-[(Benzimidazol-2-yl)amino]propyl]amides. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4573–4580, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00114.
161. OMAR, A.-M. M. E.; HABIB, N. S.; ABOULWAFI, O. M. The Cyclodesulfurization of Thio Compounds; XVI. Dicyclohexylcarbodiimide as an Efficient Cyclodesulfurizing Agent in the Synthesis of Heterocyclic Compounds from Various Thio Compounds. *Synthesis* **1977**, *1977*, 864–865, doi:10.1055/s-1977-24609.
162. Cee, V. J.; Downing, N. S. A one-pot method for the synthesis of 2-aminobenzimidazoles and related heterocycles. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3747–3750, doi:10.1016/j.tetlet.2006.03.112.
163. Ognyanov, V. I.; Balan, C.; Bannon, A. W.; Bo, Y.; Dominguez, C.; Fotsch, C.; Gore, V. K.; Kliensky, L.; Ma, V. V.; Qian, Y.-X.; Tamir, R.; Wang, X.; Xi, N.; Xu, S.; Zhu, D.; Gavva, N. R.; Treanor, J. J. S.; Norman, M. H. Design of Potent, Orally Available Antagonists of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1. Structure–Activity Relationships of 2-Piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3719–3742, doi:10.1021/jm060065y.
164. Shao, B.; Huang, J.; Sun, Q.; Valenzano, K. J.; Schmid, L.; Nolan, S. 4-(2-Pyridyl)piperazine-1-benzimidazoles as potent TRPV1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 719–723, doi:10.1016/j.bmcl.2004.11.021.
165. Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 140–177, doi:10.1021/op500305s.
166. Hornberger, K. R.; Badiang, J. G.; Salovich, J. M.; Kuntz, K. W.; Emmitte, K. A.; Cheung, M. Regioselective synthesis of benzimidazole thiophene inhibitors of polo-like kinase 1. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6348–6351, doi:10.1016/j.tetlet.2008.08.077.
167. Dubey, L. V.; Dubey, I. Y. Side reactions of onium coupling reagents BOP and HBTU in the synthesis of silica polymer supports. *Ukr. Bioorganica Acta* **2005**, *1*, 13–19.

168. Lubriks, D.; Sokolovs, I.; Suna, E. Indirect C–H Azidation of Heterocycles via Copper-Catalyzed Regioselective Fragmentation of Unsymmetrical λ^3 -Iodanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15436–15442, doi:10.1021/ja305574k.
169. Sokolovs, I.; Lubriks, D.; Suna, E. Copper-Catalyzed Intermolecular C–H Amination of (Hetero)arenes via Transient Unsymmetrical λ^3 -Iodanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6920–6928, doi:10.1021/ja502174d.
170. Castillo-Aguilera, O.; Depreux, P.; Halby, L.; Azaroual, N.; Arimondo, P. B.; Goossens, L. Regioselective and efficient halogenation of 4,5-unsubstituted alkyl 3-hydroxypyrrrole/3-hydroxythiophene-2-yl-carboxylates. *Tetrahedron Lett.*, **2017**, *58*, 2537 - 2541 doi:10.1016/j.tetlet.2017.05.025.
171. Momose, T.; Tanaka, T.; Yokota, T.; Nagamoto, N.; Yamada, K. 3-Hydroxypyrrroles. III. Synthesis and Tautomerism of N-Alkyl-3-hydroxypyrrroles. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1979**, *27*, 1448–1453, doi:10.1248/cpb.27.1448.
172. Capon, B.; Kwok, F.-C. The tautomerism of hydroxy derivatives of five-membered oxygen, nitrogen, and sulfur heterocycles. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3275–3278, doi:10.1016/S0040-4039(00)84773-5.
173. Capon, B.; Kwok, F. C. Tautomerism of the monohydroxy derivatives of five-membered oxygen, nitrogen and sulfur heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5346–5356, doi:10.1021/ja00196a046.
174. Mcnab, H.; Monahan, L. C. 3-Hydroxypyrrroles. In *Chemistry of Heterocyclic Compounds*; Jones, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., **1992**; pp. 525–616 ISBN 978-0-470-18734-0.
175. Corral, C.; Lissavetzky, J. Reactions with 3-Hydroxy-2-methoxycarbonylthiophene; I. Synthesis of 3-Thienyloxyacetic Acid and its (Nuclear) Chloro and Bromo Derivatives. *Synthesis* **1984**, *1984*, 847–850, doi:10.1055/s-1984-35467.
176. Fernandez, M. I. F.; Hotten, T. M.; Tupper, D. E. Organic compounds and their use as pharmaceuticals **1990**.

177. Kharasch, M. S.; Brown, H. C. Chlorinations with Sulfuryl Chloride. I. The Peroxide-Catalyzed Chlorination of Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2142–2150, doi:10.1021/ja01877a048.
178. Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L. Scope and limitations of the Pd/BINAP-catalyzed amination of aryl bromides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1144–1157.
179. Wolf, C.; Liu, S.; Mei, X.; August, A. T.; Casimir, M. D. Regioselective copper-catalyzed amination of bromobenzoic acids using aliphatic and aromatic amines. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3270–3273, doi:10.1021/jo060034a.
180. Messaoudi, S.; Brion, J.-D.; Alami, M. Copper-Catalyzed Direct Amination of Halo(hetero)arenes with Sodium Azide as the Amino Source. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2011**, *8*, 448–454, doi:10.2174/157019311797440236.
181. Corral, C.; Lissavetzky, J. Reactions with methyl 3-hydroxythiophene-2-carboxylate. Part 2. A new route to mono- and di-alkyl ethers of thiotetronic and α -halogenothiotetronic acids. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1984**, 2711–2714, doi:10.1039/P19840002711.
182. Corral, C. E.-A. L.; Mazanares, J.; Mazanares, I. Reactions of methyl 3-hydroxythiophene-2-carboxylate. Part 4: Synthesis of methyl 5-azolyl-3-hydroxythiophene-2-carboxylates. *J. Het. Chem.* **1987**, *24*, 1302–1303.
183. Groebke Zbinden, K.; CH; Haap, W.; DE; Hilpert, H.; CH; Panday, N.; CH; Ricklin, F.; FR; Wirz, B.; CH United States Patent: 7820699 - Cyclic amines **2010**.
184. Horiuchi, K. Y. Challenges in profiling and lead optimization of drug discovery for methyltransferases. *Drug Discov. Today Technol.* **2015**, *18*, 62–68, doi:10.1016/j.ddtec.2015.10.010.
185. Jurkowska, R. Z.; Ceccaldi, A.; Zhang, Y.; Arimondo, P. B.; Jeltsch, A. DNA Methyltransferase Assays. In *Epigenetics Protocols*; Tollefsbol, T. O., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2011**; Vol. 791, pp. 157–177 ISBN 978-1-61779-315-8.

186. Cheng, D.; Yadav, N.; King, R. W.; Swanson, M. S.; Weinstein, E. J.; Bedford, M. T. Small Molecule Regulators of Protein Arginine Methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 23892–23899, doi:10.1074/jbc.M401853200.

Design, synthesis and pharmacological evaluation of potent DOT1L inhibitors involved in epigenetic regulation for cancer treatment

Cancer is a serious issue of public health as it is one of the main causes of mortality worldwide. Despite the multiple available treatments, it is necessary to develop more efficient and less invasive therapies against cancer. The knowledge of the human genome and epigenome has directed research to new cancer treatment approaches: it is possible to modulate the biological outcome by controlling the access to the genetic information by means of the epigenetic regulation.

Epigenetics are the changes happening on the genome without modifying its DNA sequence, leading to a heritable and stable phenotype. In the eukaryotic chromatin, epigenetic regulation implies covalent modifications of DNA and histones. These chemical modifications remodel the chromatin structure leading to an "opened" or "closed" configuration, which is related to the expression or repression of genes. The epigenetic landscape is altered in cancers; for example, abnormal methylation leads to the silencing of certain genes (such as tumor suppressor genes), or to the over-expression of oncogenes. Unlike genetic alterations that are irreversible, epigenetic aberrations are reversible. Thus, molecules that can reestablish the epigenetic balance represent potent therapeutic tools for cancer treatment.

Methylation and acetylation are the most studied epigenetic modifications. DNA methylation is carried out by the DNA methyltransferases (DNMTs) and histone methylation by the histone methyltransferases (HMTs).

This PhD project was focused on the histone methyltransferase DOT1L (*DOT1 like, disruptor of telomeric silencing*), responsible of methylation of residue Lys79 of histone 3 (H3K79), which leads to the transcription of some oncogenes. Recent studies have shown that DOT1L is implicated in MLL-rearranged leukemia (MLL-*r*, Myeloid-Lymphoid Leukemia) thus it is a potent target in cancer. As DOT1L and DNMTs share the same cofactor, S-adenosyl-L-methionine (SAM), DNMT and DOT1L inhibitors can present a common inhibition mechanism by competing with SAM.

We present herein the *in silico* – based design, and the multi-step synthesis of some series of molecules containing 3 main moieties: a) an aminopyrimidine motif and b) a benzimidazole or phenylurea motif, linked by c) a phenyl or heterocycle motif. DOT1L activity was determined for the different compounds synthesized and structure-activity relationships (SAR) were established. The activity on DNMT and other HMTs was determined as well, in order to study the DOT1L specificity of our compounds.

Different scaffolds were identified to obtain DOT1L-selective or DOT1L/DNMT dual inhibitors. These molecules are interesting therapeutic tools for cancer treatment.

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'inhibiteurs potentiels de DOT1L impliqués dans la régulation épigénétique du cancer

Le cancer, principale cause de mortalité dans le monde, est un problème majeur de santé publique. Malgré les nombreux traitements disponibles, il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies plus efficaces et moins envahissantes. Aujourd'hui la connaissance du génome humain a dirigé la recherche vers de nouvelles approches: il est possible de moduler la réponse biologique en contrôlant l'accès aux informations génétiques via la régulation épigénétique.

L'épigénétique est l'ensemble des modifications de l'expression des gènes n'entraînant pas de modifications dans la séquence d'ADN, qui mènent à un phénotype héritable et stable. Chez les eucaryotes, la régulation épigénétique implique des modifications covalentes de l'ADN (méthylation) et des histones (acétylation, méthylation...). Ces phénomènes modifient la structure de la chromatine, aboutissant à une configuration "ouverte" ou "fermée" permettant la transcription ou la répression de gènes. Dans une situation cancéreuse, le profil épigénétique est modifié ; la méthylation anormale de l'ADN ou des histones mène à la répression de certains gènes comme des gènes suppresseurs de tumeur, ou à l'expression des oncogènes. Contrairement aux changements génétiques irréversibles, les aberrations épigénétiques sont des modifications chimiques réversibles. Ainsi, des molécules capables de rétablir l'équilibre épigénétique représentent des outils thérapeutiques potentiels contre le cancer.

La méthylation et l'acétylation sont les modifications épigénétiques les plus étudiées. La méthylation de l'ADN est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMTs), et la méthylation des histones par les histones méthyltransférases (HMTs).

Le sujet de ce projet doctoral est porté sur les HMTs et en particulier sur DOT1L (*DOT1 like, disruptor of telomeric silencing*), responsable des méthylations du résidu Lys79 de l'histone 3 (H3K79), conduisant à la transcription des oncogènes. En effet, des études ont montré que DOT1L est liée à la leucémie et se révèle être une cible intéressante à inhiber. DOT1L comme les DNMT ont un même cofacteur : le SAM (S-adenosyl-L-méthionine). Certains de leurs inhibiteurs présentent un mécanisme d'inhibition commun : ils entrent en compétition avec SAM.

Nous présentons la conception basée sur des études de modélisation moléculaire, et la synthèse multi-étapes des séries des molécules formées par 3 motifs principaux : a) un motif aminopyrimidine, b) un motif de type benzimidazole ou phénylurée, liés par c) un groupement phényle ou hétérocyclique. L'activité des composés synthétisés sur DOT1L a été évaluée et des relations structure-activité (RSA) ont été établies. L'activité sur DNMT et d'autres HMTs a été déterminée également afin d'étudier la spécificité de nos composés.

Différents structures ont été identifiées comme point de départ pour aboutir à des inhibiteurs sélectives de DOT1L ou à des inhibiteurs mixtes DOT1L/DNMT. Ces molécules sont considérées comme des outils thérapeutiques intéressants dans le traitement du cancer.