UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS DE LA MÉTHYLTRANSFÉRASE 3A DE L'ADN (DNMT3A)

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN CHIMIE

PAR

YARELYS ELENA AUGUSTO JIMENEZ

FÉVRIER 2023

### UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

### Avertissement

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

#### REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse de doctorat a été l'un des plus grands défis de ma vie. Cela n'aurait pas été possible sans le soutien de chacune des personnes et institutions qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenu et guidé au cours de ce long et complexe voyage.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Pr. Alexandre Gagnon à l'UQÀM, qui dès le début n'a pas hésité à m'accepter comme son étudiante et qui m'a donné tout son soutien depuis. Alex, je te serai toujours éternellement reconnaissante, pour l'opportunité d'avoir réalisé cette thèse multidisciplinaire dans ton groupe, pour ta confiance, tes conseils et ton soutien. C'est à toi que je dois mon grand épanouissement professionnel et dans une certaine mesure personnel, au cours de ces quatre années. Merci beaucoup.

Je tiens également à remercier mon co-superviseur, le Pr. Steven LaPlante à l'INRS. Steven, je te suis éternellement reconnaissante pour ta confiance et ton soutien inconditionnel. Je ne pourrais pas être plus satisfaite et heureuse de tout ce que j'ai appris grâce au travail effectué dans ton groupe. Merci beaucoup à toi aussi.

J'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance au Pr. Laurent Cappadocia à l'UQÀM, qui a été comme un superviseur pour moi. Merci infiniment de m'avoir accepté dans votre laboratoire comme si j'appartenais à votre groupe, pour toute l'aide et la confiance que vous m'avez accordées, ainsi que pour tout ce que j'ai appris grâce à la collaboration avec vous. Cette thèse est maintenant largement achevée grâce à cela. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

J'adresse aussi mes remerciements à la Pre. Paola Arimondo de l'Institut Pasteur (à Paris) et au Pr. Vijayaratnam Santhakumar du SGC (à Toronto) et leur groupe, ainsi qu'au Pr. José Medina Franco de l'UNAM (au Mexique). Cette thèse a été grandement enrichie grâce à la collaboration avec vous. Merci beaucoup pour votre soutien et vos conseils durant ce merveilleux voyage dans vos domaines respectifs de la biochimie et de la modélisation moléculaire. Je vous remercie infiniment pour tout ce que vous avez apporté à ma formation professionnelle.

ii

Je suis également reconnaissante à toutes les personnes du département de chimie de l'UQÀM, qui ont également contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de cette thèse. Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance au Pr. Sylvain Canesi et au Pr. Daniel Chapdelaine, lesquels, par leur enseignement de la synthèse et de la chimie organique, ont grandement enrichi ma formation dans ce domaine passionnant. Je tiens également à remercier le Pr. Steve Bourgault et le Pr. Ali Nazemi pour leur soutien et leur contribution durant ces années d'études. Merci beaucoup à vous tous.

Bien sûr, ces années n'auraient pas été les mêmes sans le soutien, l'affection et chaque moment partagé avec chacune des frérots et sœurettes qui composent la grande famille du labo Gagnon. Bianca, M. Hwai-Chien, Ahmed, Adrien, je suis convaincue que nous avons encore à partager de merveilleux temps ensemble. Je n'ai que des mots de remerciement pour vous et Léa. Anna, Emeline, merci aussi pour le temps partagé. À la grande famille qui compose le grand groupe de LaPlante, je veux aussi exprimer ma profonde gratitude et mon affection. À Simon, Sacha, Maria, Jonathan et Mustapha, dont le soutien, les conseils et le travail ont été essentiels à la réalisation de cette thèse. À Luc et Imene, pour leurs conseils toujours justes. À Hala, Fatma, Richard, Tanos, Éléonore, Yann, Michael, Kathleen, Majid et Saba pour tout le soutien et le temps partagé. Merci infiniment aussi aux membres du labo Cappadocia, qui ont toujours été là pour m'aider en cas de besoin. À Faustine, Julien, Antoine, Ali et surtout à Souleimen, dont l'aide, les conseils et la compagnie ont été indispensables durant cette thèse. Mes remerciements également à Trang, pour toute son aide et son soutien.

Je tiens à remercier chaleureusement la grande famille d'amis latinos (cubains, colombiens, mexicains) et québécois que j'ai eu la joie et la chance de rencontrer ici à Montréal, ainsi qu'à ma chère famille française à Repentigny. Surtout à ma chère Anne-Marie qui nous manque beaucoup. Merci aussi à ma grande famille d'amis cubains et mexicains qui, même à distance, sont toujours restés proches. Vous avez tous été un soutien indispensable pendant toutes ces années, mes éternels remerciements pour faire partie de ma vie. Je vous aime.

Enfin, mes plus profonds remerciements à ma famille aimée, qui est mon soutien, mon inspiration et ma motivation. Sans la confiance et la force qu'ils me donnent chaque jour, je n'aurais pas pu terminer ces quatre années sans les avoir rencontrés et avoir surmonté les moments difficiles que nous avons dû vivre à distance. Surtout à ma mère adorée, qui est mon moteur, ma force, que j'admire et que j'aime de toutes mes forces. C'est à toi, Mimi, que je dédie chacune de mes réalisations. À ma belle-famille québécoise, la

iii

vie ne pouvait pas me récompenser mieux. Surtout à mes beaux-parents Lynda et André, merci d'être mon « roc » dans ce beau pays, de m'encourager, de croire en moi et pour tout l'amour que vous me portez. Je vous aime tous de tout mon cœur. À l'amour de ma vie, mon Boubou d'amour, merci de croire en moi comme tu le fais, c'est grâce à toi, à la force que tu me transmets, à l'amour que tu me professes, qu'aujourd'hui je suis capable de terminer ce chapitre enrichissant et complexe de ma vie. Je t'aime à audelà de l'infini.

# DÉDICACE

À la femme et à l'homme de ma vie, ma mère Mimi et mon amour Alex, qui sont mon plus grand soutien et ma source d'inspiration.

À mes frères, ma belle-sœur, mes neveux et nièces, qui sont ma source d'amour et de joie.

À mon aimée famille cubaine-québécoise, qui est mon soutien et ma source de motivation.

À mes amis inconditionnels, qui sont la famille choisie que j'ai la chance d'avoir dans ma vie.

# **TABLE DES MATIÈRES**

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xvii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	.xxvii
RÉSUMÉ	xxviii
ABSTRACT	xxix
CHAPITRE 1 LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES. LA MÉTHYLATION DE L'ADN	1
1.1 Mécanismes épigénétiques	2
1.1.1 Mécanismes impliquant l'ARN non codant	3
1.1.2 Modifications post-traductionnelles des histones	4 6
1.2 Domaines qui composent la famille des DNMTs	12
1.3 Importance des DNMTs comme cibles en chimie médicinale	15
CHAPITRE 2 INHIBITEURS DES DNMTS. APPROCHES DANS L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE I DNMTs	DES 19
2.1 Stratégies d'inhibition des DNMTs	19
2.2 Inhibiteurs nucléosidiques des DNMTs	20
2.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques des DNMTs	21
2.3.1 Inhibiteurs non-nucléosidiques qui se lient à l'ADN	22
2.3.2 Inhibiteurs non-nucléosidiques qui rivalisent pour les sites de l'ADN et du SAM	26
2.3.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques que ciblent les PPIs	30
2.3.4 Inhibiteurs non-nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu	
2.4 Travaux réalisés par le groupe du Pr. Alexandre Gagnon pour l'inhibition de la DNMT3A	42
2.5 Mise en œuvre de la RMN- <sup>1</sup> H pour l'analyse du comportement des composés en solution aqueu	ise
par le groupe du Pr. Steven LaPlante	47
CHAPITRE 3 SYNTHÈSE, ACTIVITÉ BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE ET COMPORTEMENT EN SOLUTION PS-3114 ET DE SES DÉRIVÉS	DU 52
3.1 Contexte de FBLD par RMN	52

3.2	Le PS-3114 : découverte et travaux préliminaires	55
3.3	Le PS-3114 : resynthèse et évaluation biochimique, biophysique et comportement en solution	58
3.4 mol	Synthèse et évaluation biochimique, biophysique et comportement en solution des dérivés de la écule du PS-3114	60
3.5	Conclusion	92
CHA LA P	NPITRE 4 EXPRESSION, PURIFICATION, ANALYSE ENZYMATIQUE ET DE LA STABILITÉ DANS LE TEMPS IN NOTATION NOTATION SE	DE 94
4.1	Expression, purification et activité enzymatique de la hDNMT3Ac	94
4.2	Analyse de la stabilité dans le temps de la hDNMT3Ac1	09
4.3	Conclusion1	11
CHA DE I	APITRE 5 SYNTHÈSE, ÉVALUATION BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE ET COMPORTEMENT EN SOLUTIO DÉRIVÉS PHTALIMIDES INHIBITEURS DE LA DNMT3A1	N 12
5.1	Inhibiteurs de la DNMT3A de la série des phtalimides : découverte et travaux préliminaires1	12
5.2	Synthèse des dérivés de phtalimides rapportés comme étant des inhibiteurs de la DNMT3A1	15
5.3 <b>141</b>	Évaluation biochimique et physico-chimique et comportement en solution des phtalimides <b>137</b> – 123	
5.4	Conclusion1	25
CHA DE (	APITRE 6 SYNTHÈSE, ÉVALUATION BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE ET COMPORTEMENT EN SOLUTIO COMPOSÉS RAPPORTÉS COMME INHIBITEURS DES DNMTS1	N 26
6.1	Resynthèse du composé NSC319745 et de son analogue, la molécule AK-I-851	26
6.2	Évaluation biochimique, physico-chimique et biophysique des inhibiteurs des DNMTs1	28
6.3	Conclusion1	31
CON	ICLUSION	32
ANN	NEXE A TESTS BIOCHIMIQUES. PARTIE EXPÉRIMENTALE1	34
ANN	NEXE B EXPÉRIENCES PAR RMN- <sup>1</sup> H. PARTIE EXPÉRIMENTALE1.	37
ANN	NEXE C EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA hDNMT3AC. PARTIE EXPÉRIMENTALE	39
ANN	NEXE D CHIMIE. ÉQUIPEMENTS, MATÉRIAUX ET MÉTHODES14	40
ANN	NEXE E RESYNTHÈSE DU PS-3114 ET SYNTHÈSE DE SES DÉRIVÉS. PARTIE EXPÉRIMENTALE14	42
ANN EXP	NEXE F SYNTHÈSE DES INHIBITEURS DE LA DNMT3A DÉRIVÉS DE LA PHTALIMIDE. PARTIE ÉRIMENTALE1	74
	ΝΕΧΈ Ο RESYNTHÈSE DU COMPOSÉ NSC319745 ET DE SON ANALOGUE, LA MOLÉCULE AK-L-85, PART	ΊF

ANNEXE H DONNÉES CRISTALLOGRAPHIQUES	182
ANNEXE I SPECTRES RMN ET CHROMATOGRAMMES OBTENUS PAR RP-HPLC	184
RÉFÉRENCES	317

# LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation, extraite de la publication de Yan <i>et al.</i> , (Yan <i>et al.</i> , 2010) des mécanismes de régulation épigénétique des gènes : 1) méthylation de l'ADN, 2) modification post-traductionnelle des histones et, 3) ceux impliquant l'ARN non codant2
Figure 1.2 Centre du nucléosome, extraite de la publication de Luger et <i>al.</i> , (Luger <i>et al.</i> , 1997) vu de la perpendiculaire à l'axe de l'hélice de l'ADN: les principaux brins de l'ADN sont représentés en marron et turquoise tandis que; les huit chaînes principales d'histone sont observées en bleu (H3), vert (H4), jaune (H2A) et rouge (H2B)
Figure 1.3 Représentation de la méthylation de l'ADN, extraite de la publication de Moore et <i>al.(Moore et al., 2013</i> )
Figure 1.4 Représentation de la régulation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN, adaptée du site Web du laboratoire de Hannon:(Laboratory, s.d.) a) les cellules saines avec un niveau de méthylation régulé et ; en présence de b, c) l'hyperméthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses
Figure 1.5 Représentation de la répression transcriptionnelle à médiation épigénétique par MeCP2, extraite de la publication de Géranton et <i>al.</i> (Géranton <i>et al.</i> , 2007)10
Figure 1.6 Représentation de la déméthylation active de l'ADN, adaptée de la publication de Moore <i>et al.</i> , 2013)
Figure 1.7 Représentation des domaines DNMTs, adaptée de la publication de Hervouet et <i>al</i> .(Hervouet <i>et al.</i> , 2018)
Figure 2.1 Approches explorées pour l'inhibition des DNMTs, extraite de la publication de Goossens et al.(Castillo-Aguilera et al., 2017)
Figure 2.2 Structure des DNMTIs nucléosidiques21
Figure 2.3 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques qui se lient à l'ADN25
Figure 2.4 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques qui rivalisent pour les sites de l'ADN et du SAM26
Figure 2.5 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques que ciblent les PPIs
Figure 2.6 Représentation, extraite de la publication de Xi <i>et al.</i> , (Guo <i>et al.</i> , 2015) du mécanisme d'auto- inhibition de la DNMT3A
Figure 2.7 Mécanisme d'inhibition de la DNMT1 par les CROs, adaptée du revue de Liang <i>et al.</i> (Xu <i>et al.</i> , 2016)
Figure 2.8 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu
Figure 2.9 Structure de la quinazoline BIX-01294 et de ses analogues inhibant des DNMTs41

Figure 2.10 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques rapportés par Medina-Franco <i>et al.</i> (Kuck <i>et al.</i> , 2010) 44
Figure 2.11 Structure des analogues du NSC319745 inhibant la DNMT3A45
Figure 2.12 Chromatogramme obtenu, par RP-HPLC, du composé NSC14778 : <b>a)</b> de source commerciale et, <b>b)</b> resynthétisé, extrait de la publication de Gagnon <i>et al.</i> (Leroy <i>et al.</i> , 2019)46
Figure 2.13 Représentation, extraite de la publication de Beaulieu et al., (Ayotte et al., 2019) de l'influence, sur les spectres RMN- <sup>1</sup> H, des trois phases présentes à l'équilibre pour des composés en milieu aqueux : A) soluble, B y C) agrégats et, D) précipités
Figure 2.14 Représentation, extraite de la publication de Beaulieu <i>et al.</i> ,(LaPlante <i>et al.</i> , 2013) de l'influence de la concentration des échantillons sur les spectres RMN- <sup>1</sup> H des composés qui A) ne forment pas et B) qui forment des agrégats
Figure 2.15 Représentation de l'expérience T <sub>2</sub> -CPMG à une séquence d'impulsions d'écho de spin, extraite de la publication de LaPlante <i>et al</i> .(Ayotte <i>et al.</i> , 2019)50
Figure 2.16 Représentation de l'expérience T <sub>2</sub> -CPMG développée par LaPlante <i>et al.</i> , extraite de leur propre publication, (Ayotte <i>et al.</i> , 2019) pour l'analyse du comportement des composés en solution aqueuse
Figure 3.1 Spectres RMN enregistrés lors des expériences <b>a)</b> DLBS et <b>b)</b> T <sub>2</sub> -CPMG du ligand libre (spectre en bleu) et du ligand avec la protéine (spectre en rouge), extraits de la publication de LaPlante <i>et al.</i> (Ayotte <i>et al.</i> , 2022)
Figure 3.2 Représentation de l'expérience STD, extraite de la publication de Cabrita <i>et al</i> .(Viegas <i>et al.,</i> 2011)54
Figure 3.3 Structure, avec valeurs d'inhibition contre la hDNMT3Ac à 500 μM, des ligands trouvés comme liants de l'enzyme lors de la thèse de Maxime Leroy, basée sur le consensus des expériences DLBS/T <sub>2</sub> - CPMG/STD55
Figure 3.4 Structure et activité biologique <b>a)</b> du PS-3114 et <b>b)</b> de son dérivé LM-III-152 obtenu lors de la thèse de Maxime Leroy
Figure 3.5 Résumé de la découverte du PS-311457
Figure 3.6 Région 5.5 – 9 ppm des spectres RMN- <sup>1</sup> H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T <sub>2</sub> -CPMG et STD pour la détection de la liaison entre le PS-3114 et la hDNMT3Ac. Le spectre du ligand libre est en bleu et celui du ligand avec la protéine en rouge. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d <sub>6</sub> , 20 mM HEPES-d <sub>18</sub> , 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d <sub>16</sub> et 10% D <sub>2</sub> O à pH 7.4
Figure 3.7 Analogues de PS-3114 synthétisés par Maxime Leroy et leurs pourcentages d'inhibition sur la hDNMT3A à 500 et 320 μM (celui-ci entre parenthèses)60
Figure 3.8 Représentation <b>a)</b> de meilleurs dérivés obtenus par Maxime Leroy et <b>b)</b> des stratégies de synthèse de nouveaux analogues du PS-311461

Figure 3.9 Interactions **a)** du SAH et **b)** du PS-3114 dans la cavité que le SAH occupe dans la DNMT3A (PDB : 2QRV)......62

- Figure 3.15 Région 5.5 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction de la hDNMT3Ac avec le LM-III-152. Le spectre de la protéine liée au ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4. ......80

Figure 3.17 Représentation du système utilisé pour obtenir le composé 101......86

- Figure 3.18 Région 5 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction du composé **118** avec la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4. ......90
- Figure 4.1 Processus d'insertion du vector dans les bactéries chimiocompétentes, favorisé par le Ca<sup>2+</sup> et les chocs thermiques, extrait de la publication de *Rehman et al.*(Asif *et al.*, 2017)......95

- Figure 4.7 Résultats obtenus pour l'activité catalytique des lots 1 et 3 de la hDNMT3Ac à partir a) d'une analyse visuelle où une couleur bleue signifie que la réaction s'est produite et donc que la DNMT3A est catalytiquement active et b) d'un calcul basé sur les valeurs d'absorbance enregistrées. UA = unités arbitraires.
- Figure 4.9 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) par colonne Ni-NTA et par SEC à partir a) d'échantillons lysés sans et b) avec du mannitol. Abréviations : M, marqueur moléculaire ;
  L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées....104
- Figure 4.10 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des élutions multiples par colonne Ni-NTA à partir de l'injection a) du lysat (première élution), b) du F.T.I (deuxième élution) et c) du F.T.II (troisième élution). Abréviations : M, marqueur moléculaire ; L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées......105
- Figure 4.11 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad) a) des échantillons analysés après précipitation de la hDNMT3Ac avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et les F.T. récupérés après les trois injections par colonne Ni-NTA, ainsi que les fractions récupérées après purification par SEC : b) de la protéine précipitée et c) des fractions 11 13 éluées de la colonne Ni-NTA lors de la première injection. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; SN, surnageant du précipité ; P.r.,

protéine récupérée après précipitation ; S.N.r., surnageant récupéré et injecté dans la colonne SEC ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées et numérotées......106

- Figure 4.13 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies à partir **a**) de la deuxième et **b**) de la troisième élution de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) par colonne Ni-NTA, ainsi que **c**) des fractions éluées après SEC S-200 de la protéine précipitée. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; SN, surnageant du précipité ; S.N.r., surnageant récupéré et injecté dans la colonne SEC ; FX, fractions collectées numérotées. ............108

Figure 4.14 Spectres de RMN-<sup>1</sup>H de la hDNMT3Ac enregistrés pendant la période de 4 jours......110

- Figure 5.1 Représentation de la procédure de criblage virtuel réalisée par Luo *et al.* pour la découverte d'inhibiteurs de la DNMT3A. Figure extraite de la publication des auteurs.(Shao *et al.*, 2017)......113

- Figure 5.5 Représentation de la structure générale des dérivés de la phtalimide et analyse rétrosynthétique. Abréviation : G.A., groupe activateur......116

- Figure 5.7 Région 5 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction du composé **141** et de la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4. ........124
- Figure 6.1 Région 5 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction entre le composé **37** et la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4. .....129
- Figure 6.2 Région 5 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction **a**) du composé **6** et **b**) du composé **31** avec la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre

en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d <sub>6</sub> ,	20 mM HEPES-d <sub>18</sub> , 2	200 mM KCl, 0.2	mM TCEP-d <sub>16</sub> et
10% D <sub>2</sub> O à pH 7.4			

### LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Maladies d	cardiovasculaires	associées à la dé	érégulation de la	a méthylation	de l'ADN16

- Tableau 1.2 Maladies neurologiques associées à la dérégulation de la méthylation de l'ADN. ......16
- Tableau 2.1 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui se lient à l'ADN. Abréviations : ID., identification des composés ; N.D., non déterminé ; <sup>a</sup>, test sur oligonucléotide hémiméthylé ; <sup>b</sup>, test sur oligonucléotide non-méthylé ; MSP, de l'anglais *Methylation-Specific PCR* ; HTS, de l'anglais *High-Throughput Screening* ; DNMT3Ac, de l'anglais *C-terminal domain of DNMT3A*......23
- Tableau 2.2 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui rivalisent pour les sites de l'ADN ou du SAM. Abréviations : ID., identification des composés ; V.S., de l'anglais *Virtual Screening* ; PBMCs, de l'anglais *Peripheral Blood Mononuclear Cells* ; TR-FRET, de l'anglais *Time-Resolved Fluorescence Energy Transfer* ; MTS, de l'anglais *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium* ; AML, de l'anglais *Acute Myeloid Leukaemia* ; ALL, de l'anglais *Acute Lymphoblastic Leukaemia* ; DLBCL, de l'anglais *Diffuse Large B-cell Lymphoma* ; COBRA, de l'anglais *Combined Bisulfite Restriction Analysis*.

Tableau 2.4 Activité biologique des DNMTIs basés sur des dérivés d'oligonucléotides. Abréviations : NTPS,de l'anglais Nucleotide Triphosphates.35

- Tableau 2.5 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu.
   Abréviations : ATM, de l'anglais Ataxia Telangiectasia Mutated ; APC, de l'anglais Adenomatous Polyposis Coli ; PTEN, de l'anglais Phosphatase and Tensin Homolog ; SERPINB5, de l'anglais Mammary Serpin Peptidase Inhibitor ; ER, de l'anglais Estrogen Receptor ; E.S., de l'anglais Enzymatic Screening.
- Tableau 2.6 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu.Abréviations : LUMA, de l'anglais Luminometric Methylation Assay.43

Tableau 3.1 Évaluation biochimique et comportement en solution du PS-3114 resynthétisé......59

Tableau 3.4 Étude de criblage de l'interaction entre les composés sélectionnés et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300 μM. ERETIC à 300 μM : >150 μM, 150 – 90 μM, <90 μM. Abréviations : N.A., non applicable. .....75

- Tableau 3.5 Pourcentage d'inhibition des dérivés modifiés par la propylamine et l'aniline testés à Paris<sup>[a]</sup> à 300 μM (>50%, 50% – 25%, <25%) sur la hDNMT3Ac, ainsi qu'au SGC<sup>[b]</sup> à 50 μM (>25%, 25% – 10%, <10%) contre le complexe DNMT3A/DNMT3L. Les valeurs ERETIC déterminées à 500 μM (>245 μM, 245 – 110 μM, <110 μM) et les observations trouvées sont également rapportées......82
- Tableau 3.6 Étude de criblage de liaison entre les composés sélectionnés et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300 μM. ERETIC à 300 μM : >150 μM, 150 90 μM, <90 μM. .....88
- Tableau 3.7 Pourcentage d'inhibition à 500 μM (>70%, 70% 45%, <45%) et à 300 μM (>50%, 50% 25%, <25%) des dérivés du PS-3114 contre la hDNMT3Ac, ainsi que les résultats de l'étude de criblage de liaison entre les composés sélectionnés et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300 μM, avec les valeurs ERETIC déterminées à 500 μM (>245 μM, 245 110 μM, <110 μM) et à 300 μM (>150 μM, 150 90 μM, <90 μM). Abréviations : ID, identification des composés ; N.T., non testé ; N.A.; non applicable, e.a., en attente des résultats, <sup>[a]</sup>observation à 300 μM.

### LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

5caC : 5-Carboxy cytosine

5fC : 5-Formyl cytosine

5hmC : 5-Hydroxyméthyl cytosine

5hmU : 5-Hydroxyméthyl uracile

5mC: 5-Méthylcytosine

11beta-HSD2 : 11 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2

 $A\beta$  : *Amyloid-beta* 

Ac : Acétyle

AcOEt : Acétate d'éthyle

AD : Alzheimer's Disease

ADD : ATRX-DNMT3-DNMT3L complex

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AID/APOBEC : Activation-Induced Cytidine Deaminase/Apolipoprotein B mRNA-Editing Enzyme complex

al. : alii (autres)

ALL : Acute Lymphoblastic Leukaemia

AML : Acute Myeloid Leukaemia

anh. : Anhydre

APC : Adenomatous Polyposis Coli

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization

aq. : Aqueux

Arg : Arginine

- ARN : Acide ribonucléique
- ARNsnc : ARN non codants

ARNt : ARN de transfert

Asn : Asparagine

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BAH2 : Bromo-Adjacent Homology

BER : Base Excision Repair

Boc : *tert*-Butylcarbamate

BRCA1 : Breast Cancer Susceptibility 1

BRDs : Bromodomains

BRM : Brahma

tBuOK : tert-Butoxyde de potassium

CCM : Chromatographie sur couche mince

CCR : Carbon Catabolic Repression

CD : Catalytic Domain

CFP1 : CXXC Finger Protein 1

CG : Cytosine, guanine

CH<sub>3</sub> : Méthyle

CLC : Chromatographie Liquide sur Colonne

CMV : Cytomégalovirus

COBRA : Combined Bisulfite Restriction Analysis

CRC : Colorectal Cancer

CRO : Chimeric RNA Oligonucleotides

Cy: Cyclohexyle

Cys : Cystéine

DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCC : *N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine

DLBCL : Diffuse Large B-cell Lymphoma

DLS : Dynamic Light Scattering

DMAP: 4-Diméthylaminopyridine

DMAP1BD : DNA Methyltransferase Related Protein 1 Binding Domain

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNA : Deoxyribonucleic acid

DNMTs : DNA Methyltransferases

DNMT3Ac : C-terminal domain of DNMT3A

DNMTIs : DNMT Inhibitors

dG-dC : Désoxyguanine-déoxycytocine

- DLBS : Differential Line Broadening and Shifting
- DOT1L : Disruptor of Telomeric silencing 1 Like Histone Lysine Methyltransferase
- dppf: 1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène
- dsCRO : double-stranded CRO
- DUSP22 : Dual-Specificity Phosphatase 22
- EC<sub>50</sub> : Concentration du composé correspondant à la moitié de la réponse maximale induite
- E. coli. : Escherichia coli
- ecRNA : extra-coding RNA
- EDC : 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- e.g. : exempli gratia
- EGCG : Polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate
- éq.: Équivalent
- ER : Estrogen Receptor
- ERETIC : Electronic Reference To access In vivo Concentrations
- E.S.: Enzymatic Screening
- ESI-MS/MS : Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry
- EtOH : Éthanol
- EZH2 : Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
- FBLD : Fragment-Based Lead Discovery
- FDA : Food and Drug Administration

FKBP5 : FKBP Prolyl Isomerase 5

FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography

G.A. : Groupe activateur

GLP : G9a-Like Protein

Glu : Acide glutamique

Gln : Glutamine

Gly : Glycine

GSH : Glutamate, cystéine et glycine (glutathione)

GSTP1 : Glutathione S-Transferase Pi 1

HATs : Histone Acetyltransferases

HATU : Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium

HDACs : *Histone Deacetyltransferases* 

HDMs : *Histone Demethylases* 

HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

His : Histidine

HMTs : Histone Methyltransferases

HRMS : High-Resolution Mass Spectrometry

HSD11B2 : Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase 2

HSP70 : Heat Shock Proteins 70 kilodalton

HTS : High-Throughput Screening

IC<sub>50</sub> : La moitié de la concentration maximale inhibitrice

i.e. : id est (c'est-à-dire)

inhib. : Inhibition

Ki : constante d'inhibition

LCA : Laccaic acid A

IncRNAs : long non-coding RNAs

LPS : Lipopolysaccharides

LUMA : Luminometric Methylation Assay

Lys : Lysine

MBDs : Methyl-CpG-Binding Domain

MDS : Myelodysplastic Syndrome

M.Hhal : Methyltransferase.Haemophilus parahaemolyticus

Me : Méthyle

MeCN : Acétonitrile

MeCP2 : Methyl CpG Binding Protein 2

MSP : *Methylation-Specific PCR* 

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

N.A. : Non applicable

NBAT-1: Neuroblastoma Associated Transcript-1

NBS : N-bromosuccinimide

N.D. : non déterminé

Ni-NTA : Nickel-Nitrilotriacetic Acid

NLS : Nuclear Localization Signal

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NSNLC : Non-Small Cell Lung Cancer

N.T. : Non testé

**NTPS** : Nucleotide Triphosphates

o.n. : Overnight

<sup>-</sup>OAt : 1-Hydroxylate-7-azabenzotriazole

OAc : Acétate

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

**PBS** : Phosphate-Buffered Saline

PBST : Phosphate-Buffered Saline Tween-20

PCNABD : Proliferating Cell Nuclear Antigen Binding Domain

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDB<sup>[a]</sup> : Proliferating Binding Domain

PDB : Protein Data Bank

Ph : Phényle

PHD : Plant Homeodomain

**PPIs :** *Protein-Protein Interactions* 

Pro: Proline

PS1 : Presenilin-1

- PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
- RAR $\beta$ 2 : Retinoic Acid Receptor  $\beta$ 2
- Rf : *Retention factor*
- **RFTS :** Replication Focus Targeting Sequence
- RING : Really Interesting New Gene
- RMN-<sup>1</sup>H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RNA : Ribonucleic acid

- RP-HPLC : Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
- SAH : S-adénosyl-L-homocystéine
- SAM : S-adényl-L-méthionine
- SAR : Structure–Activity Relationship
- SDS-PAGE : Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- SEC, de l'anglais Size-Exclusion Chromatography

Ser : Sérine

- SERPINB5 : Mammary Serpin Peptidase Inhibitor
- SGK1 : Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1
- Sin3a : Switch-independent 3a
- SN2 : Substitution nucléophile bimoléculaire
- SMUG1 : Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1

SNCG : Synuclein Gamma

sncRNAs : small non-coding RNAs

- SPA : Scintillation Proximity Assay
- SRA : SET- and RING-associated
- ssCRO : single-stranded CRO
- Stat3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
- STD : Saturation Transfer Difference
- Sult1a1 : Sulfotransferase Family 1A Member 1
- SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier
- T<sub>2</sub>-CPMG : spin-spin relaxation Carr-Purcell-Meiboom-Gill
- TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine
- TDG : Thymine DNA Glycosylase
- TET : Ten-Eleven Translocation
- TFA : Acide trifluoroacétique
- THF : Tétrahydrofurane
- Thr : Thréonine
- Thy : Thymine
- TMS : Tétraméthylsilane
- TMZ : Temozolomide
- t.p. : température pièce
- TR-FRET : Time-Resolved Fluorescence Energy Transfer

TRD<sup>[a]</sup>: Transcriptional Repression Domain

TRD : Target Recognition Domain

Trp : Tryptophane

TSG : Tumor Suppressor Genes

Tyr : Tyrosine

UHRF : Ubiquitin like with PHD and RING Finger Domains

USP7 : Ubiquitin Specific Peptidase 7

UV : Ultraviolet

Val : Valine

V.S. : Virtual Screening

XRD : X-ray Diffraction

# LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

- $\delta$  : Déplacement chimique
- μg : Microgramme
- $\mu M$  : Microlitre
- $\mu M$  : Micromolaire
- kD : Kilodalton
- M : Molaire
- mg : Milligramme
- MHz : Mégahertz
- min. : Minutes
- ml : Millilitre
- ng : Nanogramme
- ppm : Parties par million
- rpm : Revolutions per minute
- UA : Unités arbitraires

## RÉSUMÉ

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique stable qui conduit à l'installation d'un groupement méthyle en position C5 de la cytosine. Le processus de méthylation de l'ADN est catalysé par les DNMT1, 3A et 3B. Une dérégulation de ce processus a été observée dans plusieurs types de cancer, entraînant l'inhibition des régions promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs. Heureusement, il a été découvert que le niveau de méthylation de l'ADN peut être restauré en inhibant les DNMTs (de l'anglais *DNA Methyltransferases*). Actuellement, les seuls médicaments approuvés par la FDA capables d'inhiber l'activité enzymatique des DNMTs sont vidaza et dacogen, utilisés pour le traitement du syndrome myélodysplasique. Cependant, l'application clinique de ces médicaments nucléosidiques est limitée en raison de leur faible biodisponibilité, ainsi que de leur nature non sélective et cytotoxique, car ils reposent sur un mécanisme qui implique l'incorporation dans le génome. Pour ces raisons, il existe un besoin urgent en chimie médicinale de développer de nouveaux inhibiteurs de nature non nucléosidique capables d'inhiber les DNMTs avec une toxicité minimale.

À ce jour, la grande majorité des inhibiteurs non nucléosidiques rapportés inhibent la DNMT1, laissant un vaste champ ouvert à la découverte et à la synthèse d'inhibiteurs de la DNMT3A et 3B. Notre groupe de recherche s'intéresse à l'inhibition de l'activité enzymatique de la DNMT3A, ce qui constitue l'objectif principal de cette thèse. Dans ce sens, la première partie de ce travail de doctorat est basée sur la synthèse de dérivés du PS-3114, lequel est une petite molécule qui a été récemment identifiée par un criblage de fragments par RMN-<sup>1</sup>H comme étant capable d'interagir avec le site catalytique de l'enzyme Homo sapiens (hDNMT3Ac) et qui s'est également avérée avoir un IC<sub>50</sub> moyen de 78.5  $\mu$ M sur cette protéine. Dans le chapitre correspondant, la synthèse des dérivés du PS-3114 et l'évaluation de leur puissance par des tests de fluorescence et de radioactivité impliquant le <sup>3</sup>H-SAM sont présentées. En outre, le comportement en solution des composés sélectionnés ainsi que la détection de l'interaction avec la hDNMT3Ac sont illustrés. La deuxième série d'inhibiteurs qui est présentée est basée sur trois dérivés de phtalamide rapportés comme étant capables d'inhiber le complexe DNMT3A/DNMT3L. Le comportement en solution de cinq composés et l'interaction possible avec la hDNMT3Ac sont également discutés. Ces analyses sont également réalisées pour les composés RG-108, EGCG, curcumine, NSC14778, NSC319745 et AK-I-85 qui ont été précédemment publiés comme étant des inhibiteurs des DNMTs. Cependant, l'activité biologique des trois premiers sur la DNMT3A n'a pas encore été apportée, tandis que celle des trois derniers semble dépendre fortement de la nature du test d'inhibition enzymatique réalisé. Finalement, les efforts déployés pour parvenir à l'expression et à la purification de la hDNMT3Ac utilisée lors des expériences par RMN-<sup>1</sup>H de la hDNMT3Ac pour la détection de l'interaction ligand-protéine sont présentés et discutés dans le chapitre correspondant.

Mots clés : chimie médicinale, épigénétique, inhibiteurs non-nucléosidiques, méthylation de l'ADN, DNMTs, DNMT3A, TSG, biochimie, biophysique, effets physico-chimiques, activité enzymatique, amarrage moléculaire.

### ABSTRACT

DNA methylation is a stable epigenetic modification that leads to the installation of a methyl group at the C5 position of cytosine. The DNA methylation process is catalyzed by DNMT1, 3A and 3B. Deregulation of this process has been observed in several types of cancer, resulting in inhibition of the promoter regions of tumor suppressor genes. Fortunately, it has been found that the level of DNA methylation can be restored by inhibiting DNMTs (DNA Methyltransferases). Currently, the only FDA-approved drugs capable of inhibiting the enzymatic activity of DNMTs are vidaza and dacogen, used for the treatment of the myelodysplastic syndrome. However, the clinical application of these nucleoside drugs is limited due to their poor bioavailability, as well as their non-selective and cytotoxic nature, as they rely on a mechanism that involves incorporation into the genome. For these reasons, there is an urgent need in medicinal chemistry to develop new inhibitors of non-nucleoside nature capable of inhibiting DNMTs with minimal toxicity.

To date, the vast majority of non-nucleoside inhibitors reported inhibit DNMT1, leaving a wide-open field for the discovery and synthesis of DNMT3A and 3B inhibitors. Our research group is interested in the inhibition of DNMT3A enzymatic activity, which is the main objective of this thesis. In this sense, the first part of this PhD work is based on the synthesis of PS-3114 derivatives, a small molecule that was recently identified by a fragment screen using <sup>1</sup>H-NMR as being able to interact with an average IC<sub>50</sub> of 78.5  $\mu$ M on the catalytic site of the Homo sapiens enzyme (hDNMT3Ac). In the corresponding chapter, the synthesis of PS-3114 derivatives and the evaluation of their potency by fluorescence and radioactivity assays involving <sup>3</sup>H-SAM is presented. In addition, the solution behavior of the selected compounds as well as the detection of their interaction with hDNMT3Ac is outlined. The second set of inhibitors to be presented is based on the synthesis of three phthalamide derivatives reported to be capable of inhibiting the DNMT3A/DNMT3L complex. The behavior in solution of five compounds and the possible interaction with hDNMT3Ac is also discussed. These analyses are also performed for compounds RG-108, EGCG, curcumin, NSC14778, NSC319745 and AK-I-85, which have been previously published as inhibitors of DNMTs. However, the biological activity of the first three on DNMT3A has not yet been provided, while that of the last three seems to strongly depend on the nature of the assay. Last, the efforts to achieve the expression and purification of hDNMT3Ac used in the <sup>1</sup>H-NMR experiments for the detection of the ligand-protein interaction is presented and discussed in the corresponding chapter.

Keywords: medicinal chemistry, epigenetics, non-nucleoside inhibitors, DNA methylation, DNMTs, DNMT3A, TSG, biochemistry, biophysics, physicochemical effects, enzymatic activity, docking.

#### **CHAPITRE 1**

### LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES. LA MÉTHYLATION DE L'ADN

L'épigénétique a été définie et interprétée de différentes manières depuis 1942 lorsque Conrad Waddington a établi le terme pour la première fois. À cette époque, ce biologiste-embryologiste la définissait comme la branche de la biologie qui étudie la manière dont les interactions entre les gènes et l'environnement déterminent le phénotype d'un organisme particulier.(Waddington, 1942) Seize ans plus tard, David Nanney a proposé une approche différente en postulant que l'épigénétique est responsable du contrôle de l'expression de gènes spécifiques et que la modification épigénétique peut persister à travers la division cellulaire.(Nanney, 1958) Ces deux points de vue ont conduit à une divergence des intérêts au sein de ce domaine. Certains auteurs se sont davantage focalisés sur l'étude épigénétique basée sur la régulation des gènes et la relation génotype-phénotype, tandis que d'autres se sont davantage intéressés à l'aspect de l'hérédité cellulaire.(Carrie et Keith, 2015) Ce n'est qu'en 1994 que Holliday, dans l'une de ses deux définitions, souligne l'importance de l'héritabilité et la relie étroitement au concept de cette discipline. Grâce à cette contribution importante de Holliday à la définition initiale de Waddington, Wu et Morris, en 2001, ont précisé que l'épigénétique étudie les modifications de la fonction des gènes qui sont héritées de la mitose et/ou de la méiose, et qui ne modifient pas la séquence de l'ADN.(Wu et Morris, 2001)

L'état épigénétique d'un être vivant est fortement influencé par différents facteurs externes, tels que l'environnement,(Jirtle et Skinner, 2007) la nutrition,(Heijmans *et al.*, 2008) le style de vie adopté(Alegría-Torres *et al.*, 2011) ainsi que par le comportement maternel envers la progéniture.(Weaver *et al.*, 2004) ll existe trois types de mécanismes de régulation : le premier implique l'ARN non codant, le second concerne la modification des histones et le dernier la modification de l'ADN, plus spécifiquement sa méthylation. Chacun d'eux affecte le niveau de compactage de la chromatine et altère l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, entraînant la régulation de l'expression des gènes dans les cellules et les tissus des organismes multicellulaires.(Handy *et al.*, 2011) Ces mécanismes seront discutés ci-dessous, l'une des enzymes qui catalyse la méthylation de l'ADN étant la cible de cette thèse.

#### 1.1 Mécanismes épigénétiques

Les mécanismes épigénétiques impliquent des altérations, héritables et réversibles, de l'ADN, des histones et de l'ARN (Figure 1.1).(Yan *et al.*, 2010) La régulation de ces processus est fondamentale pour le développement normal et la différenciation des différentes lignées cellulaires souches de l'organisme.



Figure 1.1 Représentation, extraite de la publication de Yan *et al.*, (Yan *et al.*, 2010) des mécanismes de régulation épigénétique des gènes : 1) méthylation de l'ADN, 2) modification post-traductionnelle des histones et, 3) ceux impliquant l'ARN non codant.

Dans le noyau cellulaire, l'ADN se présente sous la forme de chromatine. Les unités de base qui le composent sont les nucléosomes. Ceux-ci sont constitués d'un octamère d'histones, associés à deux copies de chacune des quatre histones existantes (H2A, H2B, H3, H4), autour desquelles s'enroulent approximativement 146 paires de bases de l'ADN (Figure 1.2).(Luger *et al.*, 1997) Les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN font partie des mécanismes qui affectent le niveau de compactage de la chromatine. Selon que celle-ci est à l'état compacté ou non compacté, elle est définie comme hétérochromatine ou euchromatine, respectivement. Le botaniste allemand Emil Heitz a été le premier à décrire les deux formes.(Heitz, 1928)



Figure 1.2 Centre du nucléosome, extraite de la publication de Luger et *al.*, (Luger *et al.*, 1997) vu de la perpendiculaire à l'axe de l'hélice de l'ADN: les principaux brins de l'ADN sont représentés en marron et turquoise tandis que; les huit chaînes principales d'histone sont observées en bleu (H3), vert (H4), jaune (H2A) et rouge (H2B).

L'hétérochromatine, qui existe sous forme hautement condensée, contient des régions chromosomiques observées comme étant inactives. Différents auteurs ont proposé que cet état induit une répression de la transcription génique à cause de l'accès limité de la machinerie transcriptionnelle aux promoteurs.(Fedorova et Zink, 2008) En revanche, l'euchromatine, qui existe sous forme non-condensée, est considérée comme pouvant être activement transcrite.(Trojer et Reinberg, 2007) Cependant, dans différents travaux, il a été observé que ce point de vue classique n'est pas exact, mais plutôt simpliste.(Fedorova et Zink, 2008) L'hypothèse la plus cohérente à ce jour, et étayée par les observations rapportées par Weiler *et al.*,(Weiler et Wakimoto, 1998) tient compte du fait que l'hétérochromatine et l'euchromatine fournissent des milieux différents. Ainsi, le milieu hétérochromatique favorise et est accessible à l'expression de séquences hétérochromatiques, mais n'est pas favorable à l'expression de gènes euchromatiques, et inversement.

Il est difficile de trouver une règle générale décrivant l'implication du degré de condensation de la chromatine dans l'activité transcriptionnelle. L'impact de différents mécanismes sur des *locus* particuliers doit être pris en compte. (Fedorova et Zink, 2008) Les mécanismes épigénétiques et leur influence sur la formation de l'hétérochromatine et de l'euchromatine seront décrits ci-dessous. La relation entre des marqueurs épigénétiques et la régulation de certains gènes sera également abordée.

#### 1.1.1 Mécanismes impliquant l'ARN non codant

Environ 1.5% du génome humain est traduit en protéines, ce qui a conduit à croire que le reste de l'information génétique n'apportait rien.(Alexander *et al.*, 2010) Cependant, des études ont récemment

révélé que, non seulement les ARN non codants (ARNsnc) interagissent avec des protéines, de l'ADN et d'autres ARNs, mais aussi, que ces relations affectent l'environnement épigénétique et l'expression des gènes.(Peschansky et Wahlestedt, 2014),(Mercer *et al.*, 2009) En effet, les ARNsnc, en plus de recruter certains complexes qui favorisent la modification des histones, peuvent réguler l'activité méthyltransférase de la famille DNMTs (de l'anglais *DNA Methyltransferases*),(Morris et Mattick, 2014) les enzymes responsables de la catalyse de la méthylation de l'ADN. Ces faits illustrent l'interrelation entre les différents mécanismes épigénétiques.

Les ARNsnc sont classés selon le nombre de nucléotides qu'ils contiennent. Quand ils sont constitués de moins de 200 unités, on parle de sncRNAs (de l'anglais *small non-coding RNAs*), alors que s'ils sont composés de plus de 200 nucléotides, il sont nommés lncRNAs (de l'anglais *long non-coding RNAs*). (Kapranov *et al.*, 2007) Dans le cas de ce dernier, il a été constaté que l'altération du profil de méthylation de la région promotrice peut être utilisée comme biomarqueur pour le diagnostic de différents cancers. (Esteller *et al.*, 2000) Par exemple, il a été observé que l'utilisation du NBAT-1 (de l'anglais *Neuroblastoma Associated Transcript-1*) comme biomarqueur pour la détection du neuroblastome pouvait permettre de prédire le résultat clinique du cancer. (Pandey *et al.*, 2014) Pandey *et al.* ont trouvé une relation entre la plus faible expression de ce lncRNA chez les patients à haut risque de neuroblastome et l'hyperméthylation de la région promotrice. De plus, à partir de l'interaction de NBAT-1 avec EZH2 (de l'anglais *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*), les gènes associés à la différenciation des cellules tumorales neuronales et à la diminution de la prolifération et de l'invasion cellulaires deviennent inactivés.

En ce qui concerne les sncRNAs, il a été découvert que ceux-ci jouent un rôle fondamental dans la suppression transcriptionnelle de divers gènes. Certains des mécanismes comprennent la désacétylation des histones à travers des complexes épigénétiques que les sncRNAs forment avec certaines protéines argonautes, ainsi que la méthylation des histones et la méthylation de l'ADN.(Kim, D. H. *et al.*, 2008),(Kim, D. H. *et al.*, 2006)

#### 1.1.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Tel que mentionné antérieurement, il existe quatre types d'histones : H2A, H2B, H3 et H4.(Luger *et al.*, 1997) Ceux-ci ont une structure peptidique fondamentalement globulaire, à l'exception de l'extrémité *N*-terminale qui n'a pas de structure spécifique. Les modifications post-traductionnelles ont lieu sur les

4

chaînes latérales des acides aminés qui composent la dite extrémité.(Pereira *et al.*, 2013) Les marqueurs installés permettent le recrutement de divers complexes protéiques qui déterminent la formation de l'hétérochromatine et de l'euchromatine, régulant ainsi l'expression des gènes. Cette observation a été résumée par Strahl et Allis sous la formulation de ce que l'on appelle « l'hypothèse du code des histones ».(Strahl et Allis, 2000)

Les modifications post-traductionnelles des histones incluent la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation (SUMO provient de l'anglais *Small Ubiquitin-like Modifier*).(Kouzarides, 2007) Ces marques épigénétiques sont installées par le groupe d'enzymes appelées « writers », lesquelles sont ensuite lues par les protéines nommées « readers » qui interagissent avec les marques pour générer une réponse cellulaire impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Finalement, ces empreintes, une fois non requises, sont retirées par des enzymes nommées « erasers ».

La phosphorylation des histones se produit principalement sur les acides aminés sérine (Ser), thréonine (Thr), tyrosine (Tyr) et moins fréquemment sur l'histidine (His), tandis que l'ubiquitination et la SUMOylation ont lieu sur les lysines (Lys).(Pereira *et al.*, 2013) La méthylation et l'acétylation des histones sont les modifications les mieux caractérisées à nos jours. La première a lieu sur les lysines et sur les arginines (Arg),(Pereira *et al.*, 2013) les Lys pouvant être mono-, di- ou encore tri-méthylés et les Arg quant à elles mono- et di-méthylés. Les enzymes « writers » qui ajoutent le groupement CH<sub>3</sub> chez les histones sont les HMTs (de l'anglais *Histone Methyltransferases*). L'impact de cette modification épigénétique à l'état transcriptionnel des gènes dépend à la fois de la position de l'acide aminé modifié et du degré de méthylation.(Bannister et Kouzarides, 2011) Des études ont été menées principalement lorsque la modification se produit dans le groupement amine de la chaîne latérale des lysines qui composent l'extrémité *N*-terminale des histones H3 et H4.(Bannister et Kouzarides, 2011; Loscalzo et Handy, 2014) Enfin, les HDMs (de l'anglais *Histone Demethylases*), sont les « erasers » qui éliminent les groupements méthyles.

Concernant l'acétylation des histones, le groupement acétyle est installé par la famille des HATs (de l'anglais *Histone Acetyltransferases*), tandis que les HDACs (de l'anglais *Histone Deacetyltransferases*) sont responsables de leur élimination. Il a été proposé que cette marque épigénétique est liée à l'état euchromatique et à l'activation transcriptionnelle. Le raisonnement est fondé sur le fait qu'avec l'installation des groupements Ac dans les résidus de lysine, la charge de cet acide aminé est neutralisée,

5

ce qui implique que l'affinité de l'ADN pour les histones est affectée.(Pereira *et al.*, 2013) De plus, il a également été rapporté que les lysines acétylées peuvent être reconnues par des protéines contenant du BRDs (de l'anglais *Bromodomains*). En raison du recrutement de ces protéines, y compris les enzymes de remodelage de la chromatine, il a été observé que la compaction de la chromatine est empêchée.

### 1.1.3 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique fondamental dans le développement sain de l'organisme. Parmi les différents processus dans lesquels elle intervient, on peut citer : la modulation du développement embryonnaire, la différenciation et la prolifération cellulaire, l'inactivation des chromosomes X et le vieillissement.(Pop *et al.*, 2019) Il a également été constaté qu'elle joue un rôle important dans le développement du système immunitaire,(Fitzpatrick et Wilson, 2003) des fonctions cérébrales(Sweatt, 2009) et des comportements développés.(McCarthy *et al.*, 2009) L'ajout du groupement CH<sub>3</sub> se produit sur le carbone numéro 5 (C5) de la cytosine, principalement dans les régions où le dinucléotide CpG est contenu. Ces sites de l'ADN sont caractérisés par la présence d'une cytosine nucléotidique (C) suivie d'une guanine (G). Le processus de méthylation de l'ADN est catalysé par la famille des DNMTs, lesquelles transfèrent le groupement méthyle du *S*-adénosyl-*L*-méthionine (SAM) sur le C5 de la cytosine pour générer comme produits finaux le *S*-adénosyl-*L*-homocystéine (SAH) et la 5-méthylcytosine (5mC) (Schéma 1.1).(Jurkowska *et al.*, 2011)



Schéma 1.1 Processus catalytique de la méthylation de l'ADN.

Le processus catalytique est possible grâce au mécanisme connu sous le nom de « flip out » de l'ADN. Les DNMTs sont capables d'induire un retournement (se disant « flip ») dans la base azotée ciblée en les exposant hors (se disant « out ») de l'hélice de l'ADN et en l'insérant dans un site hydrophobe du domaine catalytique. À partir de la M.Hhal, une DNMT de nature bactérienne, Vilkaitis *et al.*(Vilkaitis *et al.*, 2001)
ont montré que la réaction catalytique commence par l'activation de la cytosine via la formation de liaisons hydrogènes avec l'acide glutamique (Glu) 119 (Schéma 1.2). Ensuite, la cystéine (Cys) 81, laquelle est conservée à travers la famille des DNMTs, attaque le carbone 6 du cycle pyrimidine activé par une addition de type Michael. Au cours de cette étape, la protonation de l'azote 3 de la cytosine génère l'énamine intermédiaire correspondante (Schéma 1.2, étape A).(Chen, L. *et al.*, 1993) Par la suite, l'azote est déprotoné, ce qui permet l'attaque du carbone nucléophile numéro 5 sur le groupe méthyle du SAM (Schéma 1.2, étape B). Finalement, l'une des bases présentes dans le milieu catalytique retire le proton lié au C5 de la cytosine méthylée, régénérant ainsi la double liaison C5 – C6 du cycle et reformant la cystéine catalytique (Schéma 1.2, étape C).



Schéma 1.2 Mécanisme de la méthylation de l'ADN.

Au sein de la famille des DNMTs, la DNMT1, la DNMT3A et la DNMT3B, sont les enzymes « writers » qui catalysent l'addition du groupement méthyle sur l'ADN (Figure 1.3).(Moore *et al.*, 2013) Les DNMT3A et 3B sont connues comme les *novae* DNMTs, étant donné leur capacité à établir un nouveau patron de méthylation dans le brin de l'ADN non méthylé (Figure 1.3a). La DNMT1 est appelée DNMT de maintenance, car, précisément, elle maintient le patron original de méthylation pendant le processus de réplication de l'ADN (Figure 1.3b). Les deux autres protéines qui composent la famille des DNMTs sont la DNMT3L et la DNMT2. La première n'a pas le domaine catalytique nécessaire pour installer un groupement CH<sub>3</sub> sur le C5 de la cytosine. Cependant, elle est capable de stimuler l'activité méthyltransférase de la DNMT3A et de la DNMT3B.(Jia *et al.*, 2007) Dans le cas de la DNMT2, il a été constaté que cette enzyme possède une faible activité dans la méthylation de l'ADN et que sa fonction principale porte plutôt sur la catalyse de la méthylation de l'ARNt.(Schaefer et Lyko, 2010)



Figure 1.3 Représentation de la méthylation de l'ADN, extraite de la publication de Moore et *al. (Moore et al., 2013)* 

Les régions où il y a une forte concentration de la paire CG sont connues sous le nom d'îlots CpG et y contiennent le pourcentage le plus élevé de promoteurs de gènes. Dans les cellules saines, la cytosine est fondamentalement déméthylée dans cette zone et les gènes sont accessibles pour le processus de transcription (Figure 1.4a).(Liang *et al.*, 2015) En revanche, dans les cellules cancéreuses, une hyperméthylation de la cytosine a été observée qui conduit à la répression de certains gènes, dont les gènes suppresseurs de tumeurs (TSG, de l'anglais *Tumor Suppressor Genes*). L'un des mécanismes proposés pour l'inactivation de ces gènes repose sur l'interférence stérique exercée par la cytosine méthylée dans la liaison des facteurs de transcription à l'ADN (Figure 1.4b).(Laboratory, s.d.)·(Bell et Felsenfeld, 2000) L'autre mécanisme expliquant le silençage des gènes tient compte du fait que le groupement CH<sub>3</sub> installé dans l'ADN favorise le recrutement de protéines « readers » qui contiennent un domaine de liaison à l'ADN méthylée (Figure 1.4c). En conséquence, la chromatine se compacte, empêchant l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux régions des promoteurs.



Figure 1.4 Représentation de la régulation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN, adaptée du site Web du laboratoire de Hannon:(Laboratory, s.d.) **a**) les cellules saines avec un niveau de méthylation régulé et ; en présence de **b**, **c**) l'hyperméthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses.

Les protéines « readers » qui reconnaissent la méthylation de l'ADN sont les familles MBDs (de l'anglais *Methyl-CpG-Binding Domain*), UHRF (de l'anglais *Ubiquitin like with PHD and RING Finger Domains*) et les protéines dites « zinc fingers ». Parmi celles-ci, les protéines MBDs sont les mieux étudiées à ce jour, lesquelles sont fortement exprimées dans le cerveau et sont très importantes pour le développement et le fonctionnement normal des neurones.(Amir *et al.*, 1999) L'une des protéines appartenant à la famille MBD est la MeCP2 (de l'anglais *Methyl CpG Binding Protein 2*), laquelle contient un domaine de répression transcriptionnelle (TRD<sup>[a]</sup>, de l'anglais *Transcriptional Repression Domain*) qui lui permet de recruter divers complexes répresseurs.(Nan *et al.*, 1998) Parmi celles-ci figurent les HMTs et les HDACs, ainsi que des complexes contenant la protéine Sin3a (de l'anglais *Switch-independent 3a*).(Pereira *et al.*, 2013) Ce dernier est un régulateur transcriptionnel qui a été associé à différentes pathologies cancéreuses.(Bansal *et al.*, 2016) En rapport avec ce sujet, Géranton *et al.* ont publié l'influence du répresseur de transcription MeCP2 dans les états inflammatoires à partir d'une étude chez des rats.(Géranton *et al.*, 2007) Les auteurs ont confirmé la dérégulation de différents transcripteurs de 2 à 24 heures après l'induction de l'inflammation. La répression des gènes SGK1 (de l'anglais *Seum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1*), FKBP5 (de l'anglais *FKBP Prolyl Isomerase 5*) et Sult1a1 (de l'anglais *Sulfotransferase Family 1A Member 1*),

qui jouent un rôle important dans la plasticité synaptique, était liée à l'activation du gène répresseur MeCP2 (Figure 1.5). Ce dernier recrute des complexes contenant Sin3a et Brahma (BRM), ainsi que des HDACs, tout en limitant l'accès de la machinerie transcriptionnelle à la région promotrice, rendant les gènes inactifs.



Figure 1.5 Représentation de la répression transcriptionnelle à médiation épigénétique par MeCP2, extraite de la publication de Géranton et *al.* (Géranton *et al.*, 2007)

D'autre part, la famille des protéines UHRFs semble être liée à la fonction de la DNMT1. Il a été constaté qu'après avoir recruté la DNMT1, les UHRFs la transportent vers l'ADN hémiméthylée lors du processus de réplication, pour assurer le maintien de la méthylation de l'ADN.(Bostick *et al.*, 2007) Fait intéressant, Hashimoto *et al.* ont découvert que la protéine UHRF1 utilise le mécanisme de « flip out » de l'ADN pour interagir avec la cytosine méthylée.(Hashimoto *et al.*, 2008) L'association à l'ADN est réalisée à partir du domaine SRA (de l'anglais *SET– and RING–associated*) que les UHRFs présentent.

Enfin, la famille de protéines « readers » connue sous le nom de « zinc finger » peut se lier à l'ADN méthylé au niveau de son domaine « zinc finger ». Par exemple, il a été trouvé que la protéine Kaiso reconnaît les cytosines méthylées dans les régions où au moins deux dinucléotides CpG consécutifs sont présents.(Prokhortchouk *et al.*, 2001) La liaison est formée par les trois « Krüppel-like C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc fingers » de la protéine (où C et H représentent respectivement les acides aminés cystéine et histidine).(Filion *et al.*, 2006) Il est intéressant de noter que Kaiso semble avoir deux modes de liaison à l'ADN. Celle-ci reconnaît également la séquence nucléotidique TCCTGCNA, où *N* représente n'importe quel nucléotide.(Daniel *et al.*, 2002) En fait, Kaiso a une plus grande affinité pour cette séquence que pour la cytosine méthylée.

En ce qui concerne la déméthylation de l'ADN, elle peut se produire de deux manières, une active et une passive. Comme mentionné au début de cette section, la DNMT1 est la protéine « writer » responsable du maintien de la méthylation de l'ADN pendant le processus de réplication. Par conséquent, l'inhibition ou la dérégulation de cette protéine entraîne une diminution passive du niveau de méthylation de l'ADN au

fur et à mesure de la division cellulaire.(Moore *et al.*, 2013) Concernant la voie active, la famille d'enzymes « eraser » TET (de l'anglais *Ten–Eleven Translocation*) et le complexe AID/APOBEC (de l'anglais *Activation-Induced Cytidine Deaminase/Apolipoprotein B mRNA-Editing Enzyme Complex*), participent aux réactions enzymatiques de déméthylation de la cytosine (Figure 1.6).





Le groupe amine de la 5mC peut être converti en un groupe carbonyle par le complexe AID/APOBEC, résultant en une thymine (Figure 1.6, Thy).(Bhutani *et al.*, 2010) Ce changement de la base donne un décalage T-G qui est corrigé par la TDG (de l'anglais *Thymine DNA Glycosylase*), en remplaçant la thymine par la cytosine. La voie de déméthylation de l'ADN médiée par la famille d'enzymes TET implique l'addition et l'oxydation itérative d'un groupe hydroxyle sur le méthyle de la 5mC. Le premier intermédiaire formé est la 5-hydroxyméthyl cytosine (Figure 1.6, 5hmC) qui peut subir deux transformations différentes. D'une part, le groupement amine qu'il présente peut-être transformée en carbonyle par l'action du complexe AID/APOBEC. En conséquence, le 5-hydroxyméthyl uracile est obtenu (Figure 1.6, 5hmU), lequel est

ensuite corrigé par les composants de la voie BER (de l'anglais *Base Excision Repair*) : la TDG et/ou la SMUG1 (de l'anglais *Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1*). D'autre part, le groupement OH de la 5hmC peut être oxydé en aldéhyde pour obtenir la 5-formyl cytosine (Figure 1.6, 5fC), ou poursuivre son oxydation en acide carboxylique, formant ainsi la 5-carboxy cytosine (Figure 1.6, 5caC). Les deux composés sont finalement reconnus et remplacés par la cytosine via la voie BER.(Ito *et al.*, 2010)

En résumé, la méthylation de l'ADN est un processus hautement régulé et complexe qui implique la machinerie cellulaire décrite ci-dessus. Les complexes que les DNMTs forment avec différentes protéines jouent un rôle important dans le niveau de méthylation globale dans l'organisme et dans la gestion de l'expression des gènes.(Hervouet *et al.*, 2018) Les régions dans lesquelles ces types d'interactions protéine-protéine se produisent seront discutées ci-dessous, lors de l'approfondissement de l'architecture des domaines présents dans la famille des DNMTs.

#### 1.2 Domaines qui composent la famille des DNMTs

Les domaines qui composent les DNMTs sont en général divisés en deux parties (Figure 1.7). Une première partie où se trouvent les domaines qui composent l'extrémité *N*-terminale, dont les fonctions sont à la fois de guider cette famille d'enzymes vers le noyau cellulaire et de médier les interactions qu'elle établit avec d'autres protéines, avec l'ADN et avec la chromatine.(Jurkowska *et al.*, 2011) L'autre partie consiste en l'extrémité *C*-terminale où s'exerce l'activité catalytique des DNMTs. Dans cette région, les enzymes impliquées dans la catalyse de la méthylation de la cytosine présentent dix domaines d'acides aminés avec des rôles particuliers. Ceux trouvés dans les régions I et X sont ceux qui se lient au cofacteur SAM, tandis que l'action catalytique est réalisée par ceux des régions IV, VI et VIII. En fait, la Cys catalytique illustrée dans le Schéma 1.2 est conservée dans la triade Pro-Cys-Gln dans la région IV, alors que le Glu qui assiste l'attaque nucléophile (Schéma 1.2) est conservé dans la triade Glu-Asn-Val de la région VI. Comme on peut le voir sur la Figure 1.7, la région entre les résidus VIII et IX n'est pas conservée au sein de la famille des DNMTs. Cette région, connue sous le nom de TRD (de l'anglais, *Target Recognition Domain*) est ce qui donne aux enzymes la reconnaissance et la spécificité de l'ADN. Une autre caractéristique commune entre ces DNMTs est que le domaine régulateur *N*-terminal est lié au domaine catalytique *C*-terminal par 12 répétitions du dipeptide Lys-Gly.

La DNMT1 est l'enzyme la plus longue de la famille des méthyltransférases de l'ADN. La région *N*-terminale est composée du domaine PDB<sup>[a]</sup> (de l'anglais, *Proliferating Binding Domain*) qui lui permet d'interagir avec différentes protéines. Ainsi trouve-t-on : *i*) le domaine DMAP1BD (de l'anglais, *DNA Methyltransferase Related Protein 1 Binding Domain*), impliqué à la fois dans la stabilité de l'enzyme et dans son interaction avec le répresseur transcriptionnel DMAP1 ;(Rountree *et al.*, 2000) *ii*) le domaine PCNABD (de l'anglais, *Proliferating Cell Nuclear Antigen Binding Domain*) qui participe dans l'interaction de l'enzyme avec la protéine PCNA et permet de cibler la DNMT1 et de l'amener au foyer de réplication de l'ADN,(Chuang *et al.*, 1997) ainsi que, *iii*) les séquences fonctionnelles NLS (de l'anglais *Nuclear Localization Signal*). Fait intéressant, Cardoso *et al.* ont constaté que bien que la DNMT1 ait au moins trois séquences NLS, elle est située dans le cytoplasme au cours du développement embryonnaire précoce.(Chuang *et al.*, 1997)





En outre, la DNMT1 présente le domaine RFTS (de l'angalis *Replication Focus Targeting Sequence*) qui est impliqué dans le recrutement de l'enzyme dans le foyer de réplication de l'ADN.(Leonhardt *et al.*, 1992)

Entre les acides aminés 284 – 287 de ce domaine, on trouve un site allostérique. Bacolat et al. ont déterminé, à partir d'une étude cinétique, que celui-là participe dans le mécanisme de la réaction de méthylation de l'ADN hémiméthylé.(Bacolla et al., 1999) Dans une première étape, l'activation de la DNMT1 se fait via la liaison formée entre les résidus d'acides aminés du site allostérique et la cytosine méthylée. Dans la seconde étape du mécanisme, le cofacteur et le substrat s'intègrent efficacement dans leurs sites respectifs de l'enzyme. Ces observations pourraient expliquer la préférence de la DNMT1 pour l'ADN hémiméthylé. Enfin, il y a le domaine Zn, également appelé CXXC, où C correspond à Cys et X à tout autre acide aminé. Il s'agit d'une région comprenant différentes répétitions de la séquence CXXC, similaires aux domaines de liaison « zinc finger », qui est impliquée dans l'activité catalytique.(Pradhan et al., 2008) De plus, on trouve les domaines BAH1 et BAH2 (de l'anglais Bromo-Adjacent Homology 1 et 2, respectivement), dont la fonction chez la DNMT1 est inconnue, bien qu'il ait été constaté que dans différentes protéines ce domaine est lié à la régulation transcriptionnelle.(Jurkowska et al., 2011) D'autre part, l'extrémité C-terminale de cette enzyme contient dix domaines catalytiques essentiels à l'interaction avec le cofacteur SAM. Cependant, Margot et al. ont remarqué que cette région en elle-même n'est pas active. (Margot et al., 2003) La protéine construite uniquement avec les acides aminés qui composent le domaine C-terminal n'est pas capable de catalyser la méthylation de l'ADN. Les résultats obtenus par les auteurs suggèrent que la structure tertiaire de la protéine est essentielle pour le processus catalytique.

Pour ce qui est des DNMT3A et 3B, leurs domaines *N*- et *C*-terminaux sont très similaires (Figure 1.7). L'extrémité *N*-terminale est composée des domaines : *i*) PWWP (code correspondant à la suite des résidus Pro-Trp-Trp-Pro) et ; *ii*) PHD (de l'anglais *Plant Homeodomain*) ou ADD (du complexe ATRX-DNMT3-DNMT3L). Le premier est essentiel pour la liaison de l'enzyme avec le substrat et son ciblage de la chromatine.(Ge *et al.*, 2004) Quant au second, il contient une région riche en Cys où se lient les ions Zn et qui est impliquée dans différentes interactions protéine-protéine.(Hervouet *et al.*, 2018) Le domaine *C*terminal des deux enzymes contient 10 régions d'acides aminés essentielles à l'activité enzymatique. Contrairement à la DNMT1, ces résidus sont catalytiquement actifs par eux-mêmes.(Gowher et Jeltsch, 2002)

Comme mentionné dans la section 1.1.3, la DNMT3L n'est pas catalytiquement active. Contrairement aux deux autres membres des DNMT3s, elle ne possède pas de domaine PWWP, ni des domaines IX et X (Figure 1.7), qui sont essentiels à l'activité enzymatique. Le travail rapporté par Gowher *et al.* a montré que la DNMT3L n'est pas capable de se lier avec SAM et que la liaison qu'elle forme avec le substrat est très

14

faible.(Gowher *et al.*, 2005) Cependant, l'activité enzymatique des deux autres DNMT3s est stimulée par l'interaction de leur domaine catalytique avec la DNMT3L. Ils ont proposé que cette protéine induit un changement de conformation dans les DNMT3A et 3B, de sorte que la liaison du substrat et du cofacteur à leurs sites respectifs dans chaque enzyme est favorisée.

Enfin, la DNMT2 est uniquement composée du domaine catalytique *C*-terminal (Figure 1.7). La fonction de cette petite enzyme n'a pas été profondément étudiée. Comme mentionné dans la section précédente, son activité enzymatique est plutôt impliquée dans la méthylation de l'ARNt.(Goll *et al.*, 2006) Pour cette raison, elle ne sera pas abordée dans cette thèse.

Comme vu jusqu'ici, la méthylation de l'ADN est orchestrée par une machinerie complexe. La dérégulation de ce processus est associée au développement de diverses maladies, qui seront abordées dans la section suivante.

## 1.3 Importance des DNMTs comme cibles en chimie médicinale

Le développement de maladies telles que l'arthrite, (Karouzakis et al., 2009) la schizophrénie, (Gavin et Sharma, 2010) le diabète, (Arguelles et al., 2016) les troubles neurologiques, (Weng et al., 2013) les maladies cardiovasculaires(Martinez et al., 2015) et différents types de cancers(Jones et Baylin, 2007) a été associé à différents patrons de dérégulation du processus de la méthylation de l'ADN. Par exemple, l'hypertension, qui est un facteur de risque dans le développement des maladies cardiovasculaires, peut être induite par une diminution de l'activité de la 11beta-HSD2 (de l'anglais 11 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2). Friso et al. ont montré que le promoteur HSD11B2 (de l'anglais Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase 2) est hyperméthylé chez les patients qui font de l'hypertension. (Friso et al., 2008) Les résultats obtenus ont révélé que la répression épigénétique du promoteur HSD11B2 est liée au développement de la maladie. D'un autre côté, Smolarek et al. ont constaté que le niveau global de la cytosine méthylée dans le sang des patients souffrant d'hypertension est inférieur à celui des personnes en bonne santé. (Smolarek et al., 2010) Les auteurs ont trouvé une relation entre le niveau global de méthylation de l'ADN et la progression de la maladie. Ces résultats confirment non seulement l'impact de ce marqueur épigénétique sur le développement et l'évolution de l'hypertension, mais soulignent également l'importance de maintenir le bon niveau de méthylation de l'ADN. D'autres types de maladies cardiovasculaires associées à la dérégulation de la méthylation de l'ADN ainsi que les promoteurs affectés sont présentées dans le Tableau 1.1.

15

Maladie	Niveau de méthylation	Promoteurs affectés	Observations	Réf.
Atherosclerosis	Hyperméthylation	C1QL4, CTNNA3 et IMMT	Effet observé dans des tissus indépendants	(Valencia- Morales <i>et</i> <i>al.,</i> 2015)
Cardiomyopathie	Hyperméthylation	PECAM1 (expression réduite) et ARHGAP24 (surexpression)	Gènes liés à l'angiogenèse dérégulée chez les patients transplantés	(Movassagh <i>et al.,</i> 2010)
	Hypométhylation	AMOTL2 (expression réduite)	cardiaques	
Variabilité de la fréquence cardiaque	Hyperméthylation	TLR2	Dérégulation causée par l'exposition des personnes âgées à l'air pollué. Un régime en flavonoïdes semble empêcher cet effet	(Zhong <i>et</i> <i>al.,</i> 2015)

Tableau 1.1 Maladies cardiovasculaires associées à la dérégulation de la méthylation de l'ADN.

La maladie d'Alzheimer (AD de l'anglais *Alzheimer's Disease*) est la forme de démence la plus courante.(Organization) II a été rapporté que le degré de méthylation de diverses régions dans les sites CpG est impliqué dans le développement de cette maladie.(De Jager *et al.*, 2014),(Yu *et al.*, 2015) À partir d'une étude sur l'hippocampe de patients atteints d'AD, Sanchez-Mut *et al.* ont identifié que l'expression du gène DUSP22 (de l'anglais *Dual-Specificity Phosphatase 22*) est réprimée à cause de l'hyperméthylation de son promoteur.(Sanchez - Mut *et al.*, 2014) Les auteurs ont démontré que l'enzyme codée par le gène en question pouvait jouer un rôle majeur dans l'inhibition de deux des voies essentielles de la pathobiologie d'AD. Le Tableau 1.2 montre d'autres maladies neurologiques qui sont influencées par le niveau de méthylation de certains promoteurs.

Tableau 1.2 Maladies neurologiques associées à la dérégulation de la méthylation de l'ADN.

Maladie	Niveau de méthylation	Promoteurs affectés	Observations	Réf.
Maladie de Parkinson	Hypométhylation	SNCA (surexpression)	Effet observé dans les trois régions cérébrales étudiées	(Jowaed <i>et</i> <i>al.,</i> 2010)
Sclérose en plaques	Hypométhylation	PAD2 (surexpression)	Surexpression de la protéine PAD2 chez les patients étudiés	(Mastronardi <i>et al.,</i> 2007)

|--|

Sans aucun doute, le rôle de la méthylation de l'ADN dans le cancer est l'un des plus étudiés. Bien que l'hypométhylation globale de l'ADN soit une marque de la présence de cellules cancéreuses, (Ehrlich, 2009) il a également été constaté que l'hyperméthylation de certaines régions des sites CpG conduit à la répression transcriptionnelle des TSGs. (Shen et Laird, 2013) Par exemple, le TSG BRCA1 (de l'anglais Breast Cancer Susceptibility 1) est réprimé transcriptionnellement dans le cancer du sein et de l'ovaire. Esteller et al. ont rapporté que le silençage est causé par l'hyperméthylation de l'îlot CpG situé près du site de début de la transcription du promoteur. (Esteller et al., 2000) Cette « empreinte » épigénétique chez le gène GSTP1 (de l'anglais Glutathione S-Transferase Pi 1) est aussi caractéristique des premiers stades du déclenchement du cancer de prostate, (Kim, J. H. et al., 2011) laquelle est considérée comme clé dans le diagnostic clinique de ce type de cancer. En revanche, Gupta et al. ont observé que l'expression aberrante de l'oncogène SNCG (de l'anglais Synuclein Gamma), associé au cancer du sein et au cancer de l'ovaire, est favorisée par l'hypométhylation de l'îlot CpG étudié.(Gupta et al., 2003) D'autres travaux montrant l'impact de la dérégulation du niveau de méthylation de certains promoteurs dans d'autres types de cancers sont répertoriés dans le Tableau 1.3. L'ensemble met en évidence l'importance de la méthylation de l'ADN, en tant que modification épigénétique, lors de l'étude des mécanismes de formation, d'évolution et de métastase des cellules tumorales.

Maladie	Niveau de méthylation	Promoteurs/séquences affecté(e)s	Observations	Réf.
Cancer de l'estomac	Hyperméthylation	MLH1 (inactivation)	TSG impliqué dans l'invasion cellulaire, l'apoptose et l'adhésion	(Usui <i>et al.,</i> 2021)
Cancer colorectal	Hypométhylation	Séquence de répétition LINE1 (activation)	Biomarqueurs de la	(Jung
	Hyperméthylation	CDKN2A et APC (TSGs) prog (inactivation)	progression du CRC	2020)
Cancer du poumon	Hyperméthylation	LRP12 (surexpression)	Effet associé à une grande progression du cancer et à une faible probabilité de survie	(Grasse <i>et al.,</i> 2018)

Tableau 1.3 Types de cancers associés à un dérèglement de la méthylation de l'ADN. Acronymes : CRC, de l'anglais *Colorectal Cancer* ; NSNLC, de l'anglais *Non-Small Cell Lung Cancer*.

	Hypométhylation	TDRD9 (surexpression)	Dérégulation entraînant une résistance tumorale aux médicaments	
Mélanomes	Hypométhylation	MAGE1 (activation)	Hypométhylation globale du CpG et expression génique plus prononcée dans les métastases	(De Smet <i>et al.,</i> 1996)

Heureusement, le niveau de méthylation du génome peut être restauré compte tenu de la réversibilité de la réaction. D'une part, le régime alimentaire et d'autres facteurs environnementaux et sociaux peuvent inverser les effets épigénétiques. (Maloney et Lahiri, 2016) Il a été observé que différents types de régimes alimentaires ont un impact sur le niveau de méthylation dans le système nerveux central, principalement chez les adultes. (Allison et al., 2021) Par exemple, l'AD se caractérise par un faible taux de folate et de vitamine B12 dans le sang. (Fuso et al., 2005) Une alimentation déficiente en folate entraîne une déplétion du cofacteur SAM, ce qui diminue par conséquent le niveau de méthylation de l'ADN. Dans ces conditions, la surexpression de PS1 (de l'anglais *Presenilin-1*) et la production du peptide neurotoxique A $\beta$  (de l'anglais Amyloid-Beta) ont été remarqués. Fuso et al. ont vérifié in cellula que l'administration du SAM, dans un milieu déficient en folate, restaure l'expression de PS1 et réduit les niveaux d'A $\beta$ . Un an après ce rapport, Chan et al. ont noté le même effet en alimentant des rats avec un concentré de jus de pomme. (Chan, A. et Shea, 2006) Les résultats obtenus par les auteurs suggèrent que la teneur en SAM dans le jus utilisé peut empêcher la surexpression de PS1 et ses effets. D'autre part, différents rapports ont montré qu'en ciblant la famille des DNMTs, la déméthylation de certains promoteurs et l'activation conséquente de gènes qui avaient été réduits au silence est possible. (Subramaniam et al., 2014) Toutefois, le véritable défi consiste à contrôler le degré de diminution de la méthylation de la cytosine afin de ne pas conduire à l'activation des oncogènes. D'où l'importance de l'étude et du développement d'inhibiteurs sélectifs des DNMTs dans le domaine de la chimie médicinale. Cette approche sera argumentée dans le chapitre suivant.

# **CHAPITRE 2**

# INHIBITEURS DES DNMTS. APPROCHES DANS L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES DNMTS

Plusieurs approches ont été utilisées pour inhiber l'activité catalytique de la famille des DNMTs. Parmi celles-ci, on retrouve l'utilisation de composés naturels et synthétiques comme inhibiteurs. Cependant, comme nous le verrons ci-dessous, toutes ces approches ont eu un succès limité. Dans ce chapitre, nous passerons en revue la liste des inhibiteurs des DNMTs rapportés dans la littérature et leur mode de découverte, leur activité et leurs problèmes intrinsèques seront discutés.

# 2.1 Stratégies d'inhibition des DNMTs

À ce jour, différentes approches ont été explorées pour inhiber la méthylation de l'ADN par les DNMTs (Figure 2.1).(Castillo-Aguilera *et al.*, 2017)



Figure 2.1 Approches explorées pour l'inhibition des DNMTs, extraite de la publication de Goossens et *al*.(Castillo-Aguilera *et al.*, 2017)

Les inhibiteurs des DNMTs (DNMTIs, de l'anglais *DNMT Inhibitors*) sont classés comme nucléosidiques ou non-nucléosidiques, selon que la structure est basée, comme son nom l'indique, sur un nucléoside. Dû à leur structure, les inhibiteurs nucléosidiques, à la suite d'une série de réaction de phosphorylation, s'incorporent dans l'ADN pour former une liaison covalente avec la DNMT correspondante. Dans le cas des inhibiteurs non-nucléosidiques, ils empêchent la

méthylation de l'ADN par différents mécanismes, tels qu'en rivalisant pour le site de liaison du substrat (Figure 2.1, *citydine pocket*) et/ou du cofacteur (Figure 2.1, *SAM pocket*), ou en ciblant leurs sites allostériques (Figure 2.1, *allosteric inhibitors*) ou agissant comme perturbateurs des PPIs (de l'anglais *Protein-Protein Interactions*) (Figure 2.1, *PPI disruptors*). Chacune de ces voies, avec des inhibiteurs qui les composent, sera discutée ci-dessous.

#### 2.2 Inhibiteurs nucléosidiques des DNMTs

Les DNMTIs nucléosidiques sont principalement dérivés de la cytidine. La principale modification est apportée à la position 5 où les dérivés ont un atome d'azote au lieu du groupement CH. Dans une première étape, ce type d'inhibiteur est incorporé dans l'ADN et réagit de la même manière que la cytidine le ferait (Schéma 2.1, A et B). Cependant, dans le cas d'un inhibiteur nucléosidique, la DNMT ne pourra être libérée étant donné l'absence de proton en position 5 qui empêche la reformation de la liaison double C5 – C6 (Schéma 2.1). En conséquence, une liaison covalente et irréversible est formée, ce qui compromet la fonction de l'ADN et déclenche des signaux qui entraînent la dégradation de la DNMT liée.(Stresemann et Lyko, 2008) Ainsi, le niveau de méthylation de l'ADN diminue lors de l'étape de réplication dû à l'absence de DNMT active. Ces types d'inhibiteurs sont également appelés « suicides » ou inhibiteurs mécanistiques.



Schéma 2.1 Représentation du mécanisme du piégeage des DNMTs, en utilisant la DNMT M.Hhal comme exemple, par des inhibiteurs nucléosidiques.

Le 5-azacytidine (ou vidaza) et le 5-aza-2'-désoxycytidine (ou dacogen) (Figure 2.2) sont deux azanucléosides qu'inhibent la méthylation de l'ADN. Ils sont jusqu'à présent les deux seuls inhibiteurs des DNMTs approuvés par la FDA (de l'anglais *Food and Drug Administration*). Ces médicaments ont été approuvés pour le traitement du MDS (de l'anglais *Myelodysplastic* 

*Syndrome*). Ces thérapies sont basées sur la réversibilité de l'hyperméthylation des TSGs dans le but de les réactiver et de rétablir le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des cellules malignes.(Stresemann et Lyko, 2008) Comme nous l'avons vu à la section 1.1.3, cette réactivation se fait soit par un mécanisme passif lors de la division cellulaire en absence de la DNMT active, ou par un mécanisme actif impliquant les épi-enzymes TETs et le complexe AID/APOBEC.



Figure 2.2 Structure des DNMTIs nucléosidiques.

L'un des TSGs les plus étudiés est le p15<sup>INK4b</sup>, lequel est hyperméthylé chez les patients atteints du MDS.(Daskalakis *et al.*, 2002)<sup>,</sup> (Gore *et al.*, 2006) Le silençage épigénétique de ce gène peut entraîner une croissance cellulaire incontrôlée. Bien que les médicaments vidaza et dacogen réussissent à déméthyler et réactiver le p15<sup>INK4b</sup>, leurs applications cliniques sont limitées à cause des niveaux de toxicité qu'ils présentent en raison de leur mécanisme d'action. Ceux composés montrent également des effets secondaires, tels que de la thrombocytopénie et de la neutropénie, ainsi qu'une faible activité contre les formes de cancers solides et de mauvais profils pharmacocinétiques.(Santini *et al.*, 2001; Stresemann et Lyko, 2008) Le plus inquiétant est sans doute que l'insertion d'analogues nucléosidiques dans le génome peut générer de la mutagenèse et de la cancérogenèse.(Cavaliere *et al.*, 1987; Jackson-Grusby *et al.*, 1997)

Afin de surmonter les limitations et les inconvénients des inhibiteurs de nature nucléosidique, des efforts se sont concentrés ces dernières années sur la découverte et la synthèse de composés capables d'inhiber l'activité enzymatique des DNMTs à partir de mécanismes non-nucléosidiques.

## 2.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques des DNMTs

Les inhibiteurs de type non-nucléosidique des DNMTs présentent une grande différence de structure chimique et de mécanismes d'action. Ils ont été découverts à partir de sources

naturelles, (Saldívar-González *et al.*, 2018) ainsi que par l'utilisation de techniques computationnelles et par le criblage virtuel en tandem de composés trouvés dans certaines bases de données. (Brueckner, Boy, *et al.*, 2005; Kuck *et al.*, 2010) II est intéressant de noter que le repositionnement de médicaments (en anglais, *drug repurposing*) déjà approuvés pour le traitement de certaines maladies a permis de trouver des candidats importants capables d'entraîner la déméthylation de l'ADN. (Segura-Pacheco *et al.*, 2003; Villar-Garea *et al.*, 2003) Enfin, la synthèse d'analogues de certains des composés trouvés par les voies précédentes a contribué au développement d'inhibiteurs des DNMTs encore plus puissants. (Garella *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2017) Les mécanismes par lesquels ces composés inhibent la catalyse de la méthylation de l'ADN sont dissemblables. La Figure 2.1 illustre les voies et les sites explorés à ce jour. Dans les sections suivantes, les inhibiteurs non-nucléosidiques seront montrés en fonction de leur mécanisme d'action.

#### 2.3.1 Inhibiteurs non-nucléosidiques qui se lient à l'ADN

La procaïne (Figure 2.3, composé 1) et son analogue amide, le procaïnamide (Figure 2.3, composé 2) sont deux médicaments utilisés respectivement comme antiarythmique et anesthésique local. (Sheikh et Dua, 2021)<sup>,</sup> (Pritchard et Thompson, 2022) Ces deux composés ont été repositionnés comme DNMTIs car ils sont capables de diminuer le niveau de méthylation de l'ADN.(Villar-Garea et al., 2003), (Lee et al., 2005) Leurs mécanismes d'action sont basés sur le lien qu'ils forment avec les îlots CpG de l'ADN, empêchant la liaison entre les cytosines et les DNMTs. En conséquence, le niveau de méthylation de l'ADN diminue, favorisant ainsi la réactivation de certains TSGs. Par exemple, Esteller et al. ont découvert que dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, la procaïne provoque l'hypométhylation globale d'un îlot CpG hyperméthylé situé dans la région promotrice du TSG RAR $\beta$ 2 (de l'anglais *Retinoic Acid Receptor \beta2*) (Tableau 2.1, composé 1).(Villar-Garea et al., 2003) Par conséquent, le médicament a permis de restaurer l'expression du gène et d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses. Dans le cas de la procaïnamide, Nelson et al. ont démontré que le traitement de la lignée cellulaire LNCaP, des cellules humaines de cancer de la prostate, inversait l'hyperméthylation des îlots CpG situés dans la région de régulation transcriptionnelle du gène GSTP1, rétablissant ainsi l'expression du gène (Tableau 2.1, composé 2, entrée 1).(Lin et al., 2001) D'autres résultats de l'activité biologique de ce médicament sont résumés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui se lient à l'ADN. Abréviations : ID., identification des composés ; N.D., non déterminé ; <sup>a</sup>, test sur oligonucléotide hémiméthylé ; <sup>b</sup>, test sur oligonucléotide non-méthylé ; MSP, de l'anglais *Methylation-Specific PCR* ; HTS, de l'anglais *High-Throughput Screening* ; DNMT3Ac, de l'anglais *C-terminal domain of DNMT3A*.

ID	Source	Test	Activité enzymatique	Effet cellulaire	Réf
1		Électrophorèse capillaire à haute performance	N.D.	Réduction de 40% de la 5mC et réactivation du TSG RARβ2 dans la lignée cellulaire MCF-7	(Villar- Garea <i>et al.,</i> 2003)
	Repositionnement des médicaments	MSP	N.D.	Déméthylation des îlots CpG et réactivation du gène GSTP1 dans la lignée cellulaire LNCaP	(Lin <i>et al.,</i> 2001)
2		Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM	K <i>i</i> (DNMT1) <sup>a</sup> : 7.2 μM K <i>i</i> (DNMT1) <sup>b</sup> : 4600 μM K <i>i</i> (DNMT3A) <sup>b</sup> : 1400 μM K <i>i</i> (DNMT3B) <sup>b</sup> : 10000 μM	Réduction de 15.5% de la 5mC dans la lignée cellulaire HCT- 116	(Lee <i>et</i> <i>al.,</i> 2005)
3	HTS sur des cellules	MSP	N.D.	Déméthylation et réexpression des gènes CDH13, E- cadhérine, SFRP1 et TFP12 dans la lignée cellulaire MiaPaCa2 ; ainsi que SFRP1 et SFRP5 dans les cellules RKO et SFRP1, SFRP5 et TFP12 dans HCT-116	(Hossain <i>et al.,</i> 2013)

		Essai de liaison sur filtre échangeur d'ions DE-81	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 6 μM IC <sub>50</sub> (DNMT3A) : 8 μM IC <sub>50</sub> (DNMT3B) : 7.5 μM	Déméthylation et réexpression des TSGs p16, MLH1 et TIMP3 dans les cellules RKO	(Datta <i>et al.,</i> 2009)
4	Synthèse	Essai de filtration sur gel radioactif et essai de fluorescence par restriction	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 10 μΜ IC <sub>50</sub> (DNMT3Ac) : 0.8 μΜ	N.D.	(Gros <i>et</i> <i>al.,</i> 2015)
		Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM	IC₅₀(DNMT1) : 35 μM IC₅₀(DNMT3A/3L) : 10 μM	IC <sub>50</sub> (PBMCs) : 57.4 μM	(Valente <i>et al.,</i> 2014)
5	Produit naturel	Test de méthylation de l'ADN basé sur la fluorescence	IC₅₀(DNMT1) : 650 nM	Réexpression des gènes VGF et MAL dans la lignée cellulaire MCF-7	(Fagan <i>et al.,</i> 2013)

Le composé 5175328 (Figure 2.3, composé **3**) est un dérivé de l'acridine qui a été rapporté comme s'intercalant dans l'ADN.(Sakore *et al.*, 1977) Kern *et al.* ont découvert que cet analogue inhibe l'activité enzymatique de la DNMT1 et favorise la déméthylation de l'ADN avec une réactivation ultérieure de différents gènes qui avaient été réduits au silence de manière épigénétique.(Hossain *et al.*, 2013) Parmi les gènes réexprimés figurent le CDH13 et l'E-cadhérine dans la lignée de cancer du pancréas MiaPaCa2, ainsi que le SFRP1 et le SFRP5 dans la lignée de cancer colorectal HCT-116. Le reste des gènes réactivés est décrit dans le Tableau 2.1.

Jacob *et al.* ont synthétisé le composé SGI-1027 (Figure 2.3, composé **4**), lequel est un dérivé de la quinoléine capable d'inhiber l'activité méthyltransférase de l'ADN des DNMT1, 3A et 3B.(Datta *et al.*, 2009) Les auteurs ont mesuré l'activité enzymatique des DNMTs en faisant varier les concentrations du substrat et du cofacteur et ont observé que l'inhibition des enzymes était médiée par la compétition du SGI-1027 avec le SAM pendant la réaction de méthylation. Cependant, six ans après ce rapport, des études de compétition enzymatique sur la DNMT1 par Arimondo *et al.* ont montré que le SGI-1027 n'est pas en compétition pour le site SAM, mais qu'il

se lie plutôt à l'ADN.(Gros *et al.*, 2015) De plus, les auteurs ont trouvé une déviation du modèle de Michaelis-Menten(Copeland et Horiuchi, 1998) dans les expériences de compétition du substrat, suggérant que le SGI-1027 interagit avec l'ADN. Cette dichotomie des résultats a été constatée dans différentes études sur divers DNMTIs, ce qui entrave le développement d'inhibiteurs efficaces. Ces différences sont reflétées dans le Tableau 2.1 où l'on peut remarquer la variabilité des valeurs d'inhibition enzymatique pour un même composé en fonction de la nature des essais réalisés. Les résultats de l'activité biologique du SGI-1027 sont présentés dans le Tableau 2.1.



Figure 2.3 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques qui se lient à l'ADN.

D'autre part, des DNMTIs ont également été trouvés à partir de sources naturelles. Le LCA (de l'anglais *Laccaic acid A*) (Figure 2.3, composé **5**) est une anthraquinone substituée extraite des écailles rouges de l'insecte *Kerria lacca*.(Fagan *et al.*, 2013) Les essais de Brenner *et al.* ont montré que le LCA se lie à l'ADN et inhibe l'activité de la DNMT1. Les auteurs ont constaté que le traitement des cellules cancéreuses du sein MCF-7 avec ce composé permet de réactiver les gènes inactivés par la méthylation de l'ADN (Tableau 2.1, composé **5**).

Malgré la capacité d'inhibition des DNMTs des composés susmentionnés, le fait qu'ils se lient à l'ADN pour exercer leur effet biologique limite leurs applications, car ils peuvent interférer avec

d'autres enzymes interagissant avec l'ADN. De plus, un mécanisme d'intercalation dans l'ADN est normalement considéré comme non-souhaitable puisque celui-ci peut entraîner des effets cancérigènes. Des efforts restent donc nécessaires pour développer des inhibiteurs non nucléosidiques sélectifs des DNMTs.

# 2.3.2 Inhibiteurs non-nucléosidiques qui rivalisent pour les sites de l'ADN et du SAM

L'une des approches les plus intéressantes pour inhiber l'activité des DNMTs consiste à cibler les sites auxquels le substrat et le cofacteur se lient dans ces enzymes. Parmi les composés capables d'entrer en compétition pour le site du SAM figure le RG-108 (Figure 2.4, composé **6**). Ce phtalimido-*L*-tryptophane a été la première molécule rapportée capable de rivaliser pour le site du SAM et de réactiver certaines TSGs (Tableau 2.2, composé **6**).(Brueckner, Garcia Boy, *et al.*, 2005)



Figure 2.4 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques qui rivalisent pour les sites de l'ADN et du SAM.

Sur la base de la modification chimique du RG-108, des analogues présentant une activité biologique pertinente ont été synthétisés.(Asgatay *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2010) Parmi eux, le dérivé maléimide RG108-1 (Figure 2.4, composé **7**) s'est révélé être un inhibiteur plus puissant de la DNMT1 que le RG-108 (Tableau 2.2).(Suzuki *et al.*, 2010) Récemment, Wouters *et al.* ont réalisé des études supplémentaires sur cet analogue, ainsi que sur le RG119-1 (Figure 2.4, composé **8**), dans le but d'élucider leurs mécanismes d'inhibition.(Rondelet *et al.*, 2017) Au cours de ces travaux, les auteurs ont proposé que les deux composés entrent en compétition avec le SAM. Les résultats biochimiques obtenus sont résumés dans le Tableau 2.2 (composés **7** et **8**).

Tableau 2.2 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui rivalisent pour les sites de l'ADN ou du SAM. Abréviations : ID., identification des composés ; V.S., de l'anglais Virtual Screening ; PBMCs, de l'anglais Peripheral Blood Mononuclear Cells ; TR-FRET, de l'anglais Time-Resolved Fluorescence Energy Transfer ; MTS, de l'anglais 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium ; AML, de l'anglais Acute Myeloid Leukaemia ; ALL, de l'anglais Acute Lymphoblastic Leukaemia ; DLBCL, de l'anglais Diffuse Large B-cell Lymphoma ; COBRA, de l'anglais Combined Bisulfite Restriction Analysis.

ID	Source	Test	Activité enzymatique	Effet cellulaire	Réf	
6	V.S.	Électrophorèse capillaire	N.D.	Déméthylation de l'ADN dans les cellules HCT-116 et NALM-6 et réactivation des gènes p16 <sup>INK4a</sup> , SFRP1 et TIMP-3 dans HCT-116	(Brueckner, Garcia Boy, <i>et al.,</i> 2005)	
			EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibitor Assay Kit		N.D.	(Suzuki <i>et</i> <i>al.,</i> 2010)
		EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibitor Assay Kit	DNMT1 : 60% d'inhibition @ 10µM	N.D.	(Suzuki <i>et</i> <i>al.,</i> 2010)	
7	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H- SAM et essai de méthylation de l'ADN basé sur la fluorescence	IC₅₀(DNMT3A) : 28 μM	N.D.	(Rondelet <i>et al.,</i> 2017)	

		EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibitor Assay Kit	DNMT1 : 10% d'inhibition @ 10µM	N.D.	(Suzuki <i>et</i> <i>al.,</i> 2010)
8		Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H- SAM et essai de méthylation de l'ADN basé sur la fluorescence	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 19 μΜ IC <sub>50</sub> (DNMT3A) : 3.2 μΜ	N.D.	(Rondelet <i>et al.,</i> 2017)
9	Conjugaison procaïnamide- RG108	Essai radioactif impliquant l'incorporation du <sup>3</sup> H-SAM et essai MTS	IC₅₀(DNMT1) : 4.9 μM IC₅₀(DNMT3A/3L) : 8.2 μM	Cytotoxicité de l'ordre du µM dans les cellules cancéreuses de la prostate DU145 et HCT- 116	(Halby <i>et</i> <i>al.,</i> 2012)
10	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H- SAM et tests d'exclusion au bleu trypan	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 9 μM IC <sub>50</sub> (DNMT3A/3L) : 2.8 μM	Viabilité cellulaire relative pendant 48 h : $IC_{50}(PBMCs)$ : $57.4 \mu M$ $IC_{50}(U-937)$ : $4.3 \mu M$ $IC_{50}(RAJI)$ : $8.8 \mu M$ $IC_{50}(PC-3)$ : $6.6 \mu M$ $IC_{50}(MDA-MB-231)$ : 9.7 $\mu M$	(Valente <i>et</i> <i>al.,</i> 2014)
11	Optimisation « hit-to-lead »	TR-FRET, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation et essai MTS	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 382 nM IC <sub>50</sub> (DNMT3A) : 85 μM IC <sub>50</sub> (DNMT3B) : 1.200 nM	Diminution du niveau global de la 5mC dans les lignées cancéreuses ALL, AML et DLBCL	(José- Enériz <i>et</i> <i>al.,</i> 2017)
12	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H- SAM et COBRA	DNMT1 : 40% d'inhibition @ 2 mM	Légère diminution du niveau global de la 5mC dans la lignée cellulaire HL60	(Castellano <i>et al.,</i> 2008)

				sans effets toxiques	
13	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H- SAM et tests d'exclusion au bleu trypan	IC₅₀(DNMT1) : 150 μM	GI₅₀ : 360 μM dans les cellules HCT-116	(Castellano <i>et al.,</i> 2011)

D'autre part, Arimondo *et al.* ont exploré une nouvelle approche pour la synthèse de nouveaux DNMTIs.(Halby *et al.*, 2012) Les auteurs ont conjugué la procaïnamide, qui comme mentionné cidessus se lie à l'ADN, au RG-108. Ils ont ainsi obtenu un conjugué (Figure 2.4, composé **9**) capable de se localiser dans les îlots CpG grâce à la reconnaissance par la procaïnamide, favorisant une localisation optimale du composant RG-108 pour exercer sa fonction inhibitrice. Ainsi, le conjugué synthétisé a montré des valeurs d'inhibition plus puissantes que les composés de départ.

À partir d'un processus d'optimisation « hit-to-lead » du SGI-1027, Mai *et al.* ont synthétisé le dérivé méta/méta (Figure 2.4, composé **10**), lequel s'est avéré être un inhibiteur plus puissant que le composé de départ.(Valente *et al.*, 2014) En outre, cet analogue a présenté un effet antiprolifératif et une induction de la mort cellulaire dans les lignées cellulaires cancéreuses U-937, MDA-MB-231, RAJI et PC-3 similaires à ceux du SGI-1027, mais avec une toxicité moindre (Tableau 2.2, composé **10**). Les études de compétition réalisées par les auteurs sur la DNMT1 suggèrent que cet analogue entre en compétition avec l'ADN.

Récemment, Prosper *et al.* ont construit une nouvelle série chimique de 4-aminoquinolines.(José-Enériz *et al.*, 2017) La stratégie employée était basée sur la conception de composés capables d'inhiber, simultanément, la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones. Cette nouvelle approche était basée sur l'interrelation entre les deux mécanismes épigénétiques.(Estève *et al.*, 2006) Parmi les composés synthétisés, le CM-272 (Figure 2.4, composé **11**) est capable d'inhiber, dans différentes hémopathies malignes, l'activité méthyltransférase des trois DNMTs (DNMT1, 3A et 3B) et de l'HMT G9a (Tableau 2.2, composé **11**). Cette dernière enzyme est responsable de la double méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2), une marque épigénétique également liée au silençage des TSGs.(Scheer et Zaph, 2017) De plus, il a été trouvé que l'interaction de cette enzyme avec la DNMT1 favorise la répression de l'expression de certains gènes.(Tachibana *et al.*, 2008) Les auteurs ont constaté que la molécule CM-272 a inhibé la prolifération cellulaire et favorisé l'apoptose cellulaire dans les lignées cancéreuses étudiées. À partir d'essais de compétition sur la DNMT1 avec le cofacteur et le substrat, ils ont déterminé que le CM-272 entre en compétition pour le site de l'ADN mais pas pour le site du SAM.

D'autre part, le groupe de Sbardella et al. ont rapporté en 2008 des analogues de la procaïne où la liaison ester est remplacée par un bioisostère conformationnellement plus rigide, soit un cycle oxazoline. (Castellano et al., 2008) Le dérivé qui a montré le plus haut pourcentage d'inhibition contre la DNMT1 (Figure 2.4, composé 12) a également induit une légère diminution de la 5mC dans les répétitions satellites chromosomiques des lignées cellulaires de leucémie myéloïde humaine HL60 (Tableau 2.2, composé **12**). Deux ans plus tard, ce même groupe a synthétisé, dans le but d'explorer de nouvelles contraintes conformationnelles, une série de  $\Delta^2$ -ioxazolines dérivées de la procaïne et de la procaïnamide. (Castellano et al., 2011) L'inhibiteur le plus puissant (Figure 2.4, composé 13) a montré des effets antiprolifératifs contre les cellules cancéreuses HCT-116 (Tableau 2.2, composé 13). Intéressés par le mode de liaison à la DNMT1, les auteurs ont réalisé des études de compétition, qui ont montré que le composé 13 entre en compétition pour le site du cofacteur. Bien que les résultats obtenus pour les deux composés soient prometteurs, leurs structures doivent encore être optimisées afin d'améliorer leur pouvoir inhibiteur et leurs activités biologiques. Il est intéressant de noter que ni la procaïnamide, ni la procaïne n'ont montré d'activité contre la DNMT1 dans les conditions employées par les auteurs dans leurs essais d'activité enzymatique. Ce fait souligne une fois de plus l'importance du développement d'un test biochimique universel et standardisé pour obtenir des valeurs d'inhibition fiables et reproductibles pour les DNMTIs.

Malgré l'étude approfondie de ces types d'inhibiteurs, leurs mécanismes d'action présentent des inconvénients qui doivent être surmontés. La sélectivité des DNMTIs compétitifs vis-à-vis des îlots CpG de la région promotrice des gènes hyperméthylés de l'ADN doit être améliorée afin d'éviter l'activation d'oncogènes. Dans le cas des inhibiteurs compétitifs du SAM, la spécificité envers le site de ce cofacteur dans les DNMTs est primordiale, car d'autres méthyltransférases, telles que les HMTs, utilisent également la SAM comme cofacteur.

#### 2.3.3 Inhibiteurs non-nucléosidiques que ciblent les PPIs

L'une des voies les plus spécifiques pour inhiber les DNMTs consiste à perturber les PPIs qu'elles forment avec leurs protéines partenaires, lesquelles sont indispensables pour l'activité

30

catalytique des enzymes. En 2016, Cartron et al. ont proposé une stratégie innovante pour le développement des DNMTIs de nature peptidique. (Cheray et al., 2014) Les auteurs ont synthétisé les séquences peptidiques 163-174<sup>DNMT1</sup>, 551-567<sup>DNMT1</sup> et 1081-1097<sup>DNMT1</sup>, lesquelles sont dérivées des domaines d'acides aminés impliqués dans l'interaction que présente la DNMT1 avec les protéines USP7 (de l'anglais Ubiquitin Specific Peptidase 7), CFP1 (de l'anglais CXXC Finger Protein 1) et Stat3 (de l'anglais Signal Transducer and Activator of Transcription 3), respectivement. Ces complexes sont surexprimés dans certaines lignées cellulaires de cancer du cerveau, du sein et du poumon. (Felle et al., 2011; Zhang et al., 2005) Par conséquent, les peptides correspondants aux séquences 163-174<sup>DNMT1</sup>, 551-567<sup>DNMT1</sup> et 1081-1097<sup>DNMT1</sup> ont spécifiquement perturbé les complexes DNMT1/PCNA, DNMT1/USP7 et DNMT1/CFP1, respectivement. En outre, les deux premiers ont significativement diminué le niveau de la 5mC dans la lignée cellulaire cancéreuse U251 dérivée du glioblastome, tandis que le dernier n'a pas affecté le niveau global de méthylation de l'ADN. Cependant, l'administration du peptide 1081-1097<sup>DNMT1</sup> (Figure 2.5, composé 14) avec le médicament TMZ (de l'anglais Temozolomide), utilisé dans les chimiothérapies pour le traitement de certains cancers du cerveau, (Kaina et Christmann, 2019) a augmenté l'efficacité du médicament (Tableau 2.3, composé 14), grâce à un effet synergique.



Figure 2.5 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques que ciblent les PPIs.

Ces résultats laissent ouverte la question intrigante de savoir si le complexe DNMT1/CFP1 affecte l'expression des gènes associés à l'apoptose induite par le TMZ. De plus, le même groupe a montré que la dissociation du complexe DNMT1/PCNA/UHRF1 provoque une hypométhylation globale de l'ADN, entraînant l'activation d'oncogènes fréquemment associés au cancer du sein et du poumon.(Pacaud *et al.*, 2014) Ces travaux renforcent l'importance de maintenir le bon niveau de méthylation de l'ADN.

Un autre rapport basé sur des études de modulation du niveau de méthylation de l'ADN a été publié par Mikros *et al.* qui ont étudié l'interaction de la DNMT1 avec la protéine « reader » UHRF1.(Myrianthopoulos *et al.*, 2016) L'objectif était d'inhiber la fonction d'UHRF1 par l'action de petites molécules capables de se lier au site de la 5mC qu'elle présente. Le composé le plus actif, le dérivé oxime-uracile NSC232003 (Figure 2.5, composé **15**), s'est avéré réduire l'interaction de la protéine avec la DNMT1 dans la lignée cellulaire U251 (Tableau 2.3, composé **15**), ainsi que le niveau global de la méthylation.

N° de composé	Source	Test	Activité enzymatique	Effet cellulaire	Réf
14	Synthèse	Methylamp Global DNA Methylation Quantification Kit	N.D.	Aucun effet sur le niveau global de la 5mC. Augmentation du pourcentage de mort cellulaire induite par le TMZ	(Cheray <i>et al.,</i> 2014)
15	V.S.	Essai de ligature de proximité <i>in</i> <i>situ</i>	N.D.	Inhibition de 50% @ 15 μM du complexe DNMT1/UHRF1 dans les cellules U251. Déméthylation globale de la 5mC	(Myrianthopoulos <i>et al.,</i> 2016)

Tableau 2.3 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui ciblent les PPIs.

Il est intéressant de noter que les analyses structurelles et biochimiques menées par Xu *et al.* ont montré que la DNMT3A existe en équilibre entre deux conformations : l'une active et l'autre autoinhibée, médiée par l'histone 3 (H3) déméthylée (H3K4Me0) (Figure 2.6).(Guo *et al.*, 2015) Dans la forme auto-inhibée, la DNMT3A interagit avec son domaine ADD, qui bloque le site de l'ADN. Par conséquent, l'activité enzymatique du CD (de l'anglais *Catalytic Domain*) de l'enzyme est réprimée. Cependant, l'interaction de la H3K4Me0 avec le domaine ADD provoque un changement de conformation de l'enzyme vers la forme active, ce qui favorise la méthylation de l'ADN. En fait, les auteurs ont constaté que même un analogue du peptide qui constitue la H3 est capable de se lier au domaine ADD, empêchant ainsi l'interaction intramoléculaire ADD-CD et libérant la forme auto-inhibitrice de la DNMT3A.





Ces résultats ouvrent une nouvelle porte dans la conception de régulateurs de l'activité méthyltransférase de l'ADN spécifique de la DNMT3A. Le défi serait de synthétiser des analogues peptidiques dont l'interaction avec la H3K4Me0 est plus puissante que la liaison de cette partie de la H3 au domaine ADD, de manière à forcer la DNMT3A à rester dans sa forme auto-inhibée. Une autre approche possible pourrait être d'interagir avec le domaine CD de la DNMT3A qui se lie au domaine ADD. Encore une fois, l'affinité d'un tel composé pour le site de liaison du CD de la DNMT3A devra être plus forte qu'avec l'ADD.

#### 2.3.4 Inhibiteurs non-nucléosidiques dérivés d'oligonucléotides

L'étude de dérivés d'oligonucléotides est un vaste champ de recherche pour la synthèse des inhibiteurs spécifiques des DNMTs. En 2014, des chercheurs du Beth Israel Deaconess Medical Center *et al.* ont breveté un CRO (de l'anglais *Chimeric RNA Oligonucleotides*) capable de cibler des gènes spécifiques de l'ADN et de réduire l'activité enzymatique des DNMTs (Tableau 2.4, composé **16**).(Beth Israel Deaconess Medical Center, 2014) Le CRO synthétisé se compose de 15 à 30 nucléotides et complémente une partie de l'ecRNA (de l'anglais *extra-coding RNA*) du gène C/EBPa d'au moins 80%. En outre, certains des oligonucléotides sont modifiés, comme la cytosine (Figure 2.7, Aza). Le gène C/EBPa code pour un facteur de transcription qui reconnaît le domaine CCAAT dans les promoteurs des gènes qu'il cible. Les auteurs ont proposé que le dsCRO (de l'anglais *double-stranded CRO*), une fois lié au gène, se lie à la DNMT1, réduisant ainsi la méthylation du gène (Figure 2.7a). Dans le cas d'un ssCRO (de l'anglais *single-stranded CRO*), il inhibe la DNMT1 soit par un complexe double avec l'ARN naturel (Figure 2.7b), soit par une structure triple avec l'ADN (Figure 2.7c).



Figure 2.7 Mécanisme d'inhibition de la DNMT1 par les CROs, adaptée du revue de Liang *et al*.(Xu *et al.*, 2016)

D'autre part, New England Biolabs Inc. a breveté la découverte de sRNAs et de miRNAs (de l'anglais *microRNAs*) capables de cibler sélectivement la DNMT1.(New England Biolabs, 2015) La

sélectivité a été mesurée par rapport aux méthyltransférases bactériennes : M. Sssl, M. Hhal et M. Hpall. Parmi tous les ARNs testés, le miRNA miR-155-5p, dont la séquence est UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU, s'est avéré le plus puissant, avec la plus petite valeur de constante d'inhibition (*Ki*) de nature compétitive (Tableau 2.4, composé **17**). Les auteurs ont proposé, sur la base de tests de co-immunoprécipitation du miR-155-5p avec la DNMT1 dans la lignée de cancer du côlon HCT-116, que ce miRNA forme un complexe avec l'enzyme qui pourrait être responsable de l'inhibition de son activité catalytique.

N° de composé	Source	Test	Activité enzymatique	Effet cellulaire	Réf
16	Synthèse	Essai de transcription et de méthylation <i>in vitro</i> utilisant la polymérase T7, des NTPs et la DNMT1	Inhibition d'au moins 10% de la DNMT1	Diminution de la méthylation du gène C/EBPa dans les lignées cellulaires HL-60 et U937	(Beth Israel Deaconess Medical Center, 2014)
17	Synthèse	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM	K <i>i</i> (DNMT1) : 0.02788 μΜ	Hypométhylation globale dans les cellules HCT-116	(New England Biolabs, 2015)

Tableau 2.4 Activité biologique des DNMTIs basés sur des dérivés d'oligonucléotides. Abréviations : NTPS, de l'anglais *Nucleotide Triphosphates*.

En dépit des résultats prometteurs de cette approche, les oligonucléotides et leurs dérivés obtenus à ce jour sont toxiques et présentent une faible biodisponibilité et stabilité dans le milieu physiologique, (Klisovic *et al.*, 2008; Winquist *et al.*, 2006) raisons pour lesquelles leur application clinique n'a pas encore été atteinte.

## 2.3.5 Inhibiteurs non-nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu

Tel que vu dans la section 1.1.3, la méthylation de l'ADN est un processus complexe impliquant un mécanisme « flip-out ». De plus, l'activité catalytique des DNMTs est régulée par de nombreuses protéines et enzymes et pars divers facteurs externes compliquant l'étude des mécanismes par lesquels divers composés inhibent l'activité enzymatique des DNMTs. Ainsi, de nombreux DNMTIs ont été identifiés ou synthétisés sans pour autant connaître leur mécanisme d'action. Par exemple, parmi les produits naturels qui se sont révélés efficaces pour déméthyler l'ADN, on trouve la génistéine (Figure 2.8, composé **18**) et l'EGCG (de l'anglais *polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*) (Figure 2.8, composé **19**).



Figure 2.8 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu.

Ces deux flavonoïdes présents dans le thé vert ont un effet anticarcinogène sur le cancer du sein et de la peau, respectivement.(Katiyar *et al.*, 2007; King - Batoon *et al.*, 2008) Le premier réactive les TSGs, tels que le p16 et RARβ2 (Tableau 2.5, composé **18**), par le biais de leur interaction et de l'inhibition de la DNMT1.(Xie *et al.*, 2014) Le second diminue l'activité enzymatique des trois DNMTs actives et réactive les TSGs dans la lignée cellulaire de carcinome épidermoïde humain A431 (Tableau 2.5, composé **19**).(Nandakumar *et al.*, 2011) En effet, grâce à ces résultats prometteurs, ce composé est en essai clinique de phase II. Un autre produit naturel qui s'est avéré déméthyler l'ADN est le curcumine (Figure 2.8, composé **20**),(Liu *et al.*, 2009) lequel inhibe la DNMT1 plus puissamment que la DNMT3B (Tableau 2.5, composé **20**).(Kuck *et al.*, 2010)

Tableau 2.5 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu. Abréviations : ATM, de l'anglais *Ataxia Telangiectasia Mutated* ; APC, de l'anglais *Adenomatous Polyposis Coli* ; PTEN, de l'anglais *Phosphatase and Tensin Homolog* ; SERPINB5, de l'anglais *Mammary Serpin Peptidase Inhibitor* ; ER, de l'anglais *Estrogen Receptor* ; E.S., de l'anglais *Enzymatic Screening*.

ID	Source	Test	Activité enzymatique	Effet cellulaire	Réf
18		SuperSense Methylated DNA Quantification Kit et EpiQuik DNA Methyl- transferase Activity Assay Kit	DNMT1 : 40% d'inhibition @ 100 µM dans les lignées cellulaires MCF- 7 et MDA-MB- 231	Diminution du niveau global de la 5mC ainsi que de l'expression de la DNMT1 dans les cellules cancéreuses MCF-7 et MDA- MB-231. Augmentation de l'expression des TSGs ATM, APC, PTEN et SERPINB5 par déméthylation dans la région promotrice	(Xie <i>et al.,</i> 2014)
19	Produit naturel	MethylampTM Global DNA Methylation Quantification Kit et Epiquik DNMT Activity Assay Kit	DNMTs : ~ 80% d'inhibition @ 20 µg/ml dans la lignée cellulaire A431	Diminution du niveau global de la 5mC ainsi que de l'expression des DNMTs dans la lignée cellulaire A431. Réexpression des TSGs p16 <sup>ΙΝΚ4α</sup> et Cip1/p21	(Nandaku mar <i>et al.,</i> 2011)
20		Méthode LC- MS/MS	N.D.	Hypo- méthylation de l'ADN dans les cellules leucémiques MV4-11	(Liu <i>et al.,</i> 2009)
		Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM	DNMT1 : 34% d'inhibition @ 100 µM DNMT3B :	N.D.	(Kuck <i>et</i> <i>al.,</i> 2010)

			20% d'inhibition @ 100 μM		
21	Repositionnement des médicaments	PCR spécifique à la méthylation	N.D.	Déméthylation et réexpression des TSGs ER, p16, RARβ dans les lignées cancéreuses MDA-231, T24 et MCF-7, respectivement. Déméthylation et réexpression du gène ER <i>in</i> <i>vivo</i> sans toxicité	(Segura- Pacheco <i>et al.,</i> 2003)
22	E.S. et optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM, essai de fluorescence par restriction et système d'analyse Brite-lite	EC <sub>50</sub> (DNMT3A): 1.6 μM DNMT1 : 30% d'inhibition @ 100 μM	Réactivation du gène luciférase dans les cellules KG-1. Inhibition à 10 μM de la croissance cellulaire des cellules cancéreuses KG- 1, MDA-MB-231 et HCT116 de 40, 33 et 22 %, respectivement	(Erdmann <i>et al.,</i> 2016)
23	V.S.	EpiQuik DNA methyl- transferase activity /inhibition assay kit, essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM et essai MTT	$\begin{array}{l} \text{IC}_{50}(\text{DNMT1}):\\ 10.3 \ \mu\text{M}\\\\ \text{IC}_{50}(\text{DNMT3A}):\\ >200 \ \mu\text{M}\\\\ \text{IC}_{50}(\text{DNMT3B}):\\ >200 \ \mu\text{M}\\\\ \text{IC}_{50}(\text{G9a}):\\ >150 \ \mu\text{M}\\\\ \text{IC}_{50}(\text{SUV39H1}):\\ >150 \ \mu\text{M}\\\\ \text{IC}_{50}(\text{SET7/9}):\\ >150 \ \mu\text{M}\\\\ \text{IC}_{50}(\text{PRMT1}):\\ 37.1 \ \mu\text{M}\\ \end{array}$	Inhibition de la prolifération cellulaire dans les lignées cancéreuses HCT-116 et Capan-1	(Chen, S. <i>et al.,</i> 2014)

			IC <sub>50</sub> (DNMT1) :		
24			2.5 μM		
25	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM et essai MTT	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 1.7 μM	Inhibition de la prolifération cellulaire dans les lignées cancéreuses Capan-1 et HCT- 116. Dans cette dernière, induction de la mort cellulaire apoptotique	
27			DNMT1 et DNMT3A : 0 et 67% d'inhibition, respectivement @ 100 $\mu$ M EC <sub>50</sub> (DNMT3A): 10 $\mu$ M IC <sub>50</sub> (G9a) : > 400 $\mu$ M	Réactivation du gène luciférase dans les cellules KG-1. IC <sub>50</sub> (U-937) : 16.6 μM IC <sub>50</sub> (RAJI) : 21.1 μM	
28	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM, essai de fluorescence par restriction, système d'analyse Brite-lite et analyse d'exclusion au bleu trypan	DNMT1 et DNMT3A : 47 et 70% d'inhibition, respectivement @ 100 $\mu$ M EC <sub>50</sub> (DNM3A) : 35 $\mu$ M EC <sub>50</sub> (DNMT1) : 144 $\mu$ M IC <sub>50</sub> (G9a) : 643 $\mu$ M	Réactivation du gène luciférase dans les cellules KG-1. IC <sub>50</sub> (U-937) : 14.7 μM IC <sub>50</sub> (RAJI) : 18.7 μM	(Rotili <i>et</i> al., 2014)
29			DNMT1 et DNMT3A : 0 et 62% d'inhibition,	Réactivation du gène luciférase dans les cellules KG-1.	

	respectivement	IC <sub>50</sub> (U-937) :
	@ 100 μM	18.8 μM
	EC <sub>50</sub> (DNMT3A) :	IC <sub>50</sub> (RAJI) :
	12 μM	19.7 μM
	IC50(G9a) :	
	> 400 μM	
	DNMT1 et	
	DNMT3A :	Réactivation du
	0 et 63%	gène luciférase
	d'inhibition,	dans les cellules
30	respectivement	KG-1.
30	@ 100 μM	IC₅₀(U-937) :
	EC <sub>50</sub> (DNMT3A):	4.4 μM
	9 μM	IC <sub>50</sub> (RAJI) :
	IC50(G9a) :	3.4 μM
	>400 μM	

Un autre DNMTI non nucléosidique actuellement en phase III d'essais cliniques est l'hydralazine (Figure 2.8, composé **21**).(Coronel *et al.*, 2011) Ce médicament, initialement utilisé dans le traitement des maladies cardiovasculaires, a été repositionné comme agent déméthylant capable de réactiver les TSGs chez les patients atteints de cancer du col de l'utérus, du sein et du cou (Tableau 2.5, composé **21**).(Segura-Pacheco *et al.*, 2003) Bien que le mécanisme d'action de cette molécule soit encore inconnu, Messner *et al.* ont découvert que l'hydralazine se lie aux séquences de l'ADN riches en dG-dC (désoxyguanine-déoxycytocine),(Thomas et Messner, 1986) une interaction qui pourrait interférer avec le contact des DNMTs avec l'ADN.

Récemment, Arimondo *et al.* ont rapporté l'optimisation de dérivés d'hydrazone-gallate, lesquels sont composés des fragments gallate et benzothiazole liés par une fonction hydrazone.(Erdmann *et al.*, 2016) Le composé le plus puissant (Figure 2.8, composé **22**) a non seulement montré une inhibition sélective de la DNMT3A par rapport à la DNMT1 (Tableau 2.5, composé **22**), mais a également été capable de réactiver le gène de la luciférase dont le promoteur CMV (cytomégalovirus) dans les cellules de leucémie KG-1 était méthylé. Des informations supplémentaires sur l'activité biologique de cet inhibiteur sont présentées dans le Tableau 2.5.

D'autre part, Luo *et al.* ont identifié le composé DC\_05 (Figure 2.8, composé **23**) comme un inhibiteur remarquablement sélectif de la DNMT1 (Tableau 2.5, composé **23**).(Chen, S. *et al.*, 2014) En outre, à partir d'un processus de recherche basé sur la similarité de structures, les auteurs ont trouvé les analogues DC\_501 (Figure 2.8, composé **24**) et DC\_517 (Figure 2.8, composé **25**),

lesquels se sont avérés plus puissants que le composé initial (Tableau 2.5, composés **24** et **25**). Motivés par ces résultats, à partir d'une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, les auteurs ont déterminé si les composés se liaient au substrat ou non. Les résultats obtenus suggèrent que les molécules n'empêchent pas la DNMT1 de se lier à l'ADN, laissant ainsi ouverte la question du mécanisme d'action de ces inhibiteurs.

En 2014, Mai *et al.* ont exploré une nouvelle approche pour la conception de nouveaux DNMTIs.(Rotili *et al.*, 2014) En procédant à l'optimisation de la structure chimique du BIX-01294 (Figure 2.9, composé **26**), un inhibiteur des méthyltransférases de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), les G9a et GLP (de l'anglais *G9a-Like Protein*). Ils ont ainsi obtenu une série de déméthoxyquinazolines qui inhibent sélectivement la DNMT3A par rapport à la DNMT1 et aux G9a/GLP. Les inhibiteurs les plus puissants (Figure 2.9, composés **27 – 30**) ont été capables d'inverser le silençage épigénétique du gène luciférase dans les cellules KG-1, où son promoteur CMV était méthylé. De plus, ils ont été cytotoxiques et ont diminué la prolifération cellulaire des cellules de lymphome U-937 et RAJI (Tableau 2.5, composés **27 – 30**). Le reste des résultats obtenus de l'activité biologique de ces composés est présenté dans le Tableau 2.5.



Figure 2.9 Structure de la quinazoline BIX-01294 et de ses analogues inhibant des DNMTs.

Malgré les efforts déployés à ce jour pour mettre au point des DNMTIs non nucléosidiques, il n'a pas encore été possible d'obtenir des inhibiteurs puissants sélectifs pour chacun des membres de la famille des DNMTs ou, plus important encore, spécifiques des méthyltransférases de l'ADN par rapport aux autres familles d'enzymes qui utilisent l'ADN et le SAM comme substrat et cofacteur, respectivement. Sans aucun doute, comme mentionné ci-dessus, l'absence d'un test biochimique qui reproduit les valeurs de l'activité des inhibiteurs rapportés et à l'étude a ralenti les progrès dans ce domaine. Pour ces raisons, il est essentiel de poursuivre les recherches chimiques, biochimiques, biophysiques et informatiques menant à la découverte de DNMTIs puissants et sélectifs, ainsi qu'au développement de tests universels dans chacune de ces branches scientifiques contribuant à la chimie médicinale.

#### 2.4 Travaux réalisés par le groupe du Pr. Alexandre Gagnon pour l'inhibition de la DNMT3A

Les études sur l'inhibition de la DNMT3A menées par le groupe du Pr. Alexandre Gagnon, à l'UQÀM, ont débuté il y a près de 10 ans. Depuis lors, l'objectif est d'inhiber cette enzyme par l'action de petites molécules. La stratégie a été principalement basée sur des modifications chimiques de structures potentielles rapportées dans la littérature, qui pourraient conduire à la synthèse de nouveaux dérivés présentant des valeurs d'inhibition enzymatique plus élevées. Le premier travail publié par ce groupe de recherche a été inspiré par la publication en 2010 de Medina-Franco et al. (Kuck et al., 2010) où 24 nouveaux composés ont été rapportés comme inhibiteurs possibles de la DNMT1. Les structures ont été obtenues par un criblage virtuel réalisé à partir de la base de données du NCI (de l'anglais National Cancer Institute). Parmi eux, 13 composés ont montré un meilleur score calculé en termes de valeurs d'affinité de liaison par rapport à la molécule RG-108 (Figure 2.4, composé 6) utilisée comme référence. Afin de connaître leurs valeurs d'activité expérimentale, les auteurs ont effectué des tests biochimiques. Les résultats ont révélé que non seulement sept de ces composés étaient capables d'inhiber la DNMT1 (Figure 2.10, composés 31 - 37), mais aussi que six d'entre eux présentaient une sélectivité vis-à-vis de la DNMT1 par rapport à la DNMT3B (Figure 2.10, composés **31 — 36**). Seulement le composé identifié comme étant le NSC14778 (Figure 2.10, composé 37) a inhibé l'activité des deux enzymes (Tableau 2.6, composé **31**, entrée 1).

42
N° de composé	Source	Test	Activité enzymatique	Effet cellulaire	Réf
31	V.S.	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM	DNMT1 : 34% d'inhibition @ 100 μM DNMT3B : 0% d'inhibition @ 100 μM	N.D.	(Kuck <i>et al.,</i> 2010)
	Resynthèse	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM et essai de fluorescence par restriction	DNMT1 : 2.9% d'inhibition @ 100 μM DNMT3A : 8% d'inhibition @ 100 μM	N.D.	(Kabro <i>et al.,</i> 2013)
	V.S.	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM	DNMT1 : 29% d'inhibition @ 100 μM DNMT3B : 60% d'inhibition @ 100 μM	N.D.	(Kuck <i>et al.,</i> 2010)
37	Commercial	Essai radioactif impliquant le	IC <sub>50</sub> (DNMT1) : 47 μM IC <sub>50</sub> (DNMT3A/3L) : 1.4 μM IC <sub>50</sub> (DNMT3B/3L) : 45 μM	N.D.	(Leroy <i>et al.,</i> 2019)
	Resynthèse	- T-SAIVI	DNMT3A/3L : 0% d'inhibition @ 2 mM	N.D.	
38	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM et essai de fluorescence par restriction	DNMT3A : 75% d'inhibition @ 100 μM EZH2 et DOT1L : 0% d'inhibition @ >80 μM EC <sub>50</sub> (DNMT3A) : 36 μM	Cytotoxique à 100 μM dans la lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB-231	(Kabro <i>et al.,</i> 2013)
39	Optimisation « hit-to-lead »	Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup> H-SAM, essai de	DNMT3A : 79% d'inhibition @ 100 μM EZH2 et DOT1L :	Légère diminution du niveau de méthylation à 200 μM dans	

Tableau 2.6 Activité biologique des DNMTIs non nucléosidiques qui agissent par un mécanisme inconnu. Abréviations : LUMA, de l'anglais *Luminometric Methylation Assay*.

		fluorescence	0% d'inhibition	les cellules	
		par restriction	@ >80 μM	MDA-MB-231	
		et LUMA			
			DNMT1 :		
			22% d'inhibition		114 - 1
	VC	Essai	@ 100 μM		(KUCK
	V.5		DNMT3B :	N.D.	2010)
22		radioactif	4% d'inhibition @		
32		impliquant le	100 μM		
		<sup>3</sup> H-SAM	DNMT1 :		()
	Degunthèse		0% d'inhibition @		(Leroy
	Resynthese		1 mM	IN.D.	2019)
					2010)

Ces structures sont sans aucun doute des candidats prometteurs qui peuvent être optimisés par des modifications chimiques, afin d'améliorer leur pouvoir inhibiteur. Une observation intéressante est que les inhibiteurs bien connus, le RG-108 et l'hydralazine, utilisés comme référence lors des tests biochimiques, ont montré de faibles taux d'inhibition, à 100  $\mu$ M, de la DNMT1 (17 et 14%, respectivement), soulignant une fois de plus l'impact de la nature du test biochimique et de la source de production de la protéine (exprimée cette fois-ci par baculovirus dans des cellules d'insectes) sur les résultats de l'activité enzymatique des molécules.



Figure 2.10 Structure des DNMTIs non-nucléosidiques rapportés par Medina-Franco *et al.* (Kuck *et al.*, 2010)

En 2013, le groupe du Pr. Alexandre Gagnon a publié ses premiers travaux dans le domaine de l'inhibition de la DNMT3A basé sur la synthèse et la détermination de l'activité biologique d'analogues du composé NSC319745 (Figure 2.10, composé **31**),(Kabro *et al.*, 2013) rapportée dans la publication susmentionnée de Medina-Franco *et al.* La première étape de ce projet, comme d'habitude, a été de resynthétiser le composé « hit », afin de confirmer son activité enzymatique dans les conditions expérimentales utilisées. De manière surprenante, une très faible activité inhibitrice de la DNMT3A et de la DNMT1 a été obtenue (Tableau 2.6, composé **31**, entrée 2 et 3). Cependant, bien que les 29 dérivés synthétisés aient inhibé la DNMT1 de moins de 20% à 100 μM, sept d'entre eux ont inhibé de plus de 60% l'activité enzymatique de la DNMT3A, à la même concentration. De plus, ces inhibiteurs se sont révélés sélectifs vis-à-vis de la DNMT3A par rapport aux HMTs l'EZH2 et le DOT1L (de l'anglais *Disruptor of Telomeric silencing 1 Like Histone Lysine Methyltransferase*), lesquelles utilisent également le SAM comme cofacteur. Les résultats de l'activité biologique des composés les plus prometteurs (Figures 2.11, composés **38** et **39**) sont dans le Tableau 2.6.



Figure 2.11 Structure des analogues du NSC319745 inhibant la DNMT3A.

Récemment, Gagnon *et al.* ont publié un autre travail sur la synthèse et l'évaluation biologique de deux autres composés qui avaient été précédemment rapportés par Medina-Franco et *al.* (Leroy *et al.*, 2019) Dans la publication d'origine, le NSC106084 (Figure 2.10, composé **32**) avait montré un faible pourcentage d'inhibition de la DNMT1. Cependant, lors de la resynthèse et de l'évaluation de l'activité enzymatique par le groupe du Pr. Gagnon, aucune activité inhibitrice envers la DNMT1 n'a été observée, même à 1 mM (Tableau 2.6, composé **32**, entrée 2). D'autre part, le composé NSC14778 (Figure 2.10, composé **37**) était le seul composé capable d'inhiber l'activité des DNMT1 et DNMT3B dans la publication initiale (Tableau 2.6, composé **37**, entrée 1). Au cours du projet réalisé par Gagnon *et al.*, non seulement l'activité inhibitrice de la molécule

resynthétisée a été testée, mais le produit de source commercial a également été étudié (Tableau 2.6, composé **37**, entrée 2). Au grand étonnement des auteurs, alors que la molécule commerciale s'est révélée capable d'inhiber l'activité enzymatique de la DNMT1 et des DNMT3A et 3B en complexe avec la DNMT3L (DNMT3A/3L et DNMT3B/3L, respectivement), le produit resynthétisé n'a montré aucune activité inhibitrice face à la DNMT3A (Tableau 2.6, composé **37**, entrée 3), enzyme sur laquelle le composé commercial s'est révélé plus puissant.

Afin de comprendre ces résultats, les auteurs ont analysé par HPLC en phase inverse (RP-HPLC, de l'anglais *Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography*) la pureté du composé acheté et du resynthétisé (Figure 2.12). Incroyablement, le composé commercial présentait de nombreuses impuretés (Figure 2.12a) lesquelles, d'une certaine manière, ont probablement contribué à son activité inhibitrice. Ces résultats inattendus ont été un signal d'alarme important, car ils nous ont alertés sur des facteurs qui, bien qu'ils puissent sembler évidents, sont parfois négligés dans la recherche de nouveaux composés actifs. Ainsi, l'importance de la pureté des composés à analyser est devenue évidente, de même que l'importance de réaliser des essais complémentaires pour confirmer que les inhibiteurs identifiés ne sont pas des faux positifs.





Les faux positifs dans les tests biochimiques peuvent être causés par une contamination croisée ou d'impuretés dans les échantillons, ainsi que par des effets physico-chimiques qui peuvent se produire en solution, comme la formation d'agglomérats et de précipités (à la fois du composé et de la protéine) pendant la réalisation des tests. Le Pr. Steven LaPlante et son groupe ont développé une méthode par RMN-<sup>1</sup>H (Résonance Magnétique Nucléaire du proton) pour identifier la formation d'agrégats de composés en solution. Cette méthode, laquelle est très précieuse en chimie médicinale, et ses applications seront expliquées dans la section suivante.

## 2.5 Mise en œuvre de la RMN-<sup>1</sup>H pour l'analyse du comportement des composés en solution aqueuse par le groupe du Pr. Steven LaPlante

L'une des propriétés physico-chimiques qui peut être prédite et qui influence l'activité biologique d'un composé, est la lipophilie. Ceci peut être estimé à partir du calcul de clogP, défini comme le logarithme du coefficient de partage du composé entre les solvants n-octanol et l'eau. Ce paramètre peut être déterminé par différents programmes utilisés dans le milieu académique, tels que le ChemDraw et le DataWarrior. Cependant, il est impossible de prédire la formation d'agrégats en solution. Ceci est l'un des phénomènes physico-chimiques les plus courants qui conduit à des faux positifs et négatifs, ainsi qu'à une non-spécificité du ligand pour l'enzyme et à des effets dits « off-target » lors des essais biologiques. (Ayotte et al., 2019) Bien que dans la grande majorité des cas les composés organiques soient solubles dans des tampons contenant du DMSO (diméthylsulfoxyde) et d'autres solvants organiques, ils peuvent se comporter de manière complètement différente lorsqu'ils sont dissous dans une solution aqueuse. L'une des techniques traditionnelles pour étudier ces phénomènes est la DLS (de l'anglais Dynamic Light Scattering). Bien qu'il s'agisse d'une méthode très utile, les mesures sont limitées à des échantillons transparents (c'est-à-dire qui laisse passer facilement la lumière) et à des particules d'une taille de l'ordre de guelgues dizaines de nanomètres, ce qui restreint son application. (Stetefeld et al., 2016)

En 2013, Beaulieu *et al.* ont rapporté une stratégie innovante et simple, par RMN-<sup>1</sup>H, pour l'analyse du comportement des composés en solution aqueuse.(LaPlante *et al.*, 2013) Ce groupe de recherche a démontré que les spectres RMN-<sup>1</sup>H dépendent des trois phases possibles présentes à l'équilibre pour un composé en milieu aqueux : soluble (Figure 2.13, A), agrégats (Figure 2.13, B et C) et précipités (Figure 2.13, D).

47



Figure 2.13 Représentation, extraite de la publication de Beaulieu *et al.*, (Ayotte *et al.*, 2019) de l'influence, sur les spectres RMN-<sup>1</sup>H, des trois phases présentes à l'équilibre pour des composés en milieu aqueux : **A**) soluble, **B** y **C**) agrégats et, **D**) précipités.

En plus, à partir d'expériences de dilution, les auteurs ont constaté que la technique utilisée est également sensible aux espèces multimériques formées en solution (Figure 2.14). Ceci est prévisible puisque la formation et le type d'agrégat dépendent de la concentration. Ainsi, plus la concentration est élevée, plus les molécules sont proches les unes des autres, plus elles sont susceptibles de s'agglomérer. Le degré de formation de petits multimères diminue au fur et à mesure que le milieu est dilué. Cet effet est observé dans les spectres RMN-<sup>1</sup>H, car dans les composés qui forment des agrégats, chacun des paramètres obtenus par cette technique est affecté et varie en fonction de la nature des espèces présentes en solution (Figure 2.14B). Ainsi, le nombre de signaux peut varier si différentes espèces sont formées en solution à la suite du changement de concentration. De plus, la taille des espèces en solution affectera la forme et la largeur des pics enregistrés. Les échantillons plus concentrés ont tendance à contenir de plus gros agglomérats, c'est pourquoi le temps de relaxation des espèces devrait être plus court et donc les pics du spectre devraient être élargis.



Figure 2.14 Représentation, extraite de la publication de Beaulieu *et al.*, (LaPlante *et al.*, 2013) de l'influence de la concentration des échantillons sur les spectres RMN-<sup>1</sup>H des composés qui **A**) ne forment pas et **B**) qui forment des agrégats.

En outre, le décalage du pic est également affecté. Celui-ci peut varier en raison de changements dans l'environnement local et dans le champ magnétique généré par les différents agrégats formés autour des molécules. Cependant, dans les échantillons aqueux de composés qui sont complètement solubles, le seul changement attendu dans les spectres est une diminution de l'intensité des pics avec la diminution de la concentration (Figure 2.14A).

Malgré les avantages significatifs de la méthodologie développée, la préparation d'échantillons à différentes concentrations et les longs temps d'acquisition des spectres, surtout aux plus faibles concentrations des solutions, retardent et limitent les analyses par cette voie. Pour ces raisons, le groupe du Pr. Steven LaPlante, à l'INRS à Laval, a poursuivi ses recherches pour développer de nouvelles stratégies pour l'identification du comportement des composés en solution.

Récemment, LaPlante *et al.* ont réussi à analyser le phénomène d'agrégation dans des échantillons aqueux à partir d'expériences de RMN basées sur le type de relaxation T<sub>2</sub>-CPMG (de l'anglais *spin-spin relaxation Carr-Purcell-Meiboom-Gill*).(Ayotte *et al.*, 2019) D'un point de vue

pratique, la méthodologie est simple et chaque composé n'est analysé qu'à une seule concentration. Au cours de cette expérience, les auteurs ont utilisé le schéma dit « spin-echo » (écho de spin), où la durée totale de la séquence (Figure 2.15, T) est déterminée par le temps de retard (Figure 2.15,  $\tau$ ) et le nombre d'impulsions données (Figure 2.15, n).



Figure 2.15 Représentation de l'expérience T<sub>2</sub>-CPMG à une séquence d'impulsions d'écho de spin, extraite de la publication de LaPlante *et al.* (Ayotte *et al.*, 2019)

L'une des applications des expériences de T<sub>2</sub>-CPMG est que lorsqu'elles sont réalisées, avec un délai d'écho de spin suffisamment grand, dans un mélange contenant de petites et de grosses molécules, il est possible d'enregistrer uniquement le spectre de résonance de la petite molécule étant donné son temps de relaxation transversal (T<sub>2</sub>) plus long. C'est sur cette base que le groupe du Pr. Steven LaPlante a pu étudier l'agrégation de composés en solution aqueuse en soumettant les échantillons à une séquence d'impulsions d'écho de spin pendant les expériences de T<sub>2</sub>-CPMG (Figure 2.16). Ainsi, dans les échantillons de composés qui ne forment pas d'agrégats, des spectres RMN présentant une légère perte de résonance seront obtenus lorsque le temps de retard augmente (Figure 2.16, en bas). Cependant, dans les échantillons où des espèces agglomérées sont formées, l'agrégat peut être observé par RMN à des temps de retard faibles (par exemple à 1 ou 25 ms), mais au fur et à mesure que le temps de retard augmente, l'intensité de résonance diminuera en raison du temps de relaxation plus court des plus gros agglomérats (Figure 2.16, haut).



Figure 2.16 Représentation de l'expérience T<sub>2</sub>-CPMG développée par LaPlante *et al.*, extraite de leur propre publication, (Ayotte *et al.*, 2019) pour l'analyse du comportement des composés en solution aqueuse.

Sans aucun doute, cette expérience établie par Steven *et al.* doit être considérée comme une étape fondamentale dans la recherche et le développement d'inhibiteurs dans le domaine de la chimie médicinale et la pharmaceutique. Un avantage majeur de cette expérience est la possibilité d'analyser différents composés dans le même tube RMN. Le seul aspect à considérer est de s'assurer que certaines molécules n'induisent pas l'agrégation d'autres.

Il est intéressant de noter que les expériences de T<sub>2</sub>-CPMG ont été précédemment rapportées pour la détection de liaisons formées par de petits ligands à de grandes protéines.(Hajduk, P. J. *et al.*, 1997; Pellecchia *et al.*, 2002) Cette variante a également été très exploitée dans le groupe du Pr. Steven LaPlante et sera discutée dans le chapitre suivant lors de l'explication de l'origine du premier projet de cette thèse.

#### **CHAPITRE 3**

### SYNTHÈSE, ACTIVITÉ BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE ET COMPORTEMENT EN SOLUTION DU PS-3114 ET DE SES DÉRIVÉS

Dans ce chapitre, le premier projet réalisé au cours de cette thèse, basé sur la molécule nommée PS-3114 et ses dérivés, sera décrit. Son origine, les travaux préliminaires et les efforts déployés dans l'étude de la possibilité d'une SAR (de l'anglais *Structure–Activity Relationship*) autour de cette molécule seront présentés. La synthèse et les résultats de l'activité inhibitrice contre la DNMT3A des composés obtenus, ainsi que de l'étude de leur comportement en solution et de la détection de la liaison du ligand à la protéine produite dans cette thèse, seront discutés ci-après.

#### 3.1 Contexte de FBLD par RMN

Malgré les progrès technologiques, les stratégies explorées à nos jours pour la découverte de nouveaux composés en chimie médicinale sont encore limitées et, dans la plupart des cas, coûteuses. Dans le domaine de la biotechnologie, les produits biologiques à base de protéines (en anglais protein-based biologics) se sont révélés efficaces dans le traitement des maladies auto-immunes et du cancer. (Chan, A. C. et Carter, 2010) Malgré leur efficacité et leur spécificité, le coût élevé des processus de purification et de la caractérisation fonctionnelle de ces composés rend le développement de ces biomolécules, même à petite échelle, considérablement plus onéreux.(Yi et al., 2014) Dans le domaine de l'informatique, le criblage virtuel a été très utile pour proposer de nouvelles molécules de type « lead », mais le fait que de nombreuses protéines et enzymes n'ont pas encore été cristallisées avec des ligands, comme la DNMT3A, limite l'utilisation de cette voie pour prédire les sites et types de liaison, des inhibiteurs potentiels à la cible d'intérêt. L'une des méthodes de criblage les plus utilisées dans l'identification de composés pour le développement de médicaments est appelée HTS. Cette technique permet de tester un grand nombre de molécules (> 1 million), ce qui rend l'analyse difficile et longue.(List *et al.*, 2016) En fait, dans la grande majorité des cas, un second criblage est effectué sur un nombre limité de molécules pour confirmer les composés « lead » identifiés. Par conséquent, la grande majorité des composés découverts dans le premier crible sont rejetés. Toutes ces particularités de la HTS la rendent très coûteuse, raison pour laquelle c'est une technique plutôt utilisée par les entreprises pharmaceutiques.

Une proposition, à faible coût et accessible aux institutions académiques, trouvée pour la découverte rapide de nouvelles molécules qui servent de guide est ce qu'on appelle le FBLD (de l'anglais Fragment-Based Lead Discovery). Cette stratégie implique le criblage de fragments, c'est-à-dire de molécules de faible poids moléculaire, dans le but de trouver de nouvelles structures présentant des valeurs d'affinité pour la protéine d'intérêt de l'ordre de micro- à millimolaire.(Hajduk, P. et Greer, 2007) L'une des méthodes expérimentales permettant d'effectuer ce criblage de fragments est la RMN. Ceci est possible grâce aux changements observés dans les spectres, tels que les déplacements chimiques ou la forme et l'intensité du signal, en raison de l'interaction formée entre les ligands testés et la protéine utilisée. À cet égard, le Pr. Steven LaPlante, en s'appuyant sur sa grande expertise dans le domaine de la RMN, a mis en œuvre une approche basée sur le FBLD par des expériences de la RMN.(Farahani et al., 2022) Les bibliothèques moléculaires explorées par ce groupe de recherche sont analysées sur la base du consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD. Premièrement, dans la méthodologie développée, la détection DLBS (l'anglais Differential Line Broadening and Shifting) est appliquée, où une différence dans le décalage et la forme des pics enregistrés dans le spectre RMN du ligand avec la protéine par rapport à celui du ligand libre est une indication d'une interaction formée entre le ligand et la protéine (Figure 3. 1a). (Ayotte et al., 2022) Ensuite, pour confirmer que les variations observées sont dues à des changements dans l'environnement chimique du ligand à cause de la liaison formée avec la protéine, une expérience T<sub>2</sub>-CPMG est réalisée. Comme expliqué dans la section 2.5, les molécules plus grandes, comme un complexe ligandprotéine par rapport au ligand libre, ont des temps de relaxation plus courts après l'excitation, ce qui équivaut à un taux de décroissance T<sub>2</sub> plus rapide. Par conséquent, si une comparaison des spectres T<sub>2</sub>-CPMG du ligand avec la protéine (enregistrés avec des temps de retard différents dans les séquences d'impulsions) montre un taux de décroissance  $T_2$  plus rapide par rapport aux spectres du ligand libre, alors la liaison du ligand à la protéine est confirmée (Figure 3.1b).



Figure 3.1 Spectres RMN enregistrés lors des expériences **a)** DLBS et **b)** T<sub>2</sub>-CPMG du ligand libre (spectre en bleu) et du ligand avec la protéine (spectre en rouge), extraits de la publication de LaPlante *et al.*(Ayotte *et al.*, 2022)

Une application de cette expérience est que, si le ligand étudié forme des agrégats en solution, ses spectres T<sub>2</sub>-CPMG vont montrer un taux de décroissance T<sub>2</sub> rapide à mesure que le temps de retard dans les séquences d'impulsions augmente. De cette façon, les composés qui forment des agrégats, et qui seraient donc de faux positifs lors des tests biochimiques, peuvent être détectés pendant l'étude de la liaison aux protéines.

La dernière méthode de consensus réalisée par le groupe du Pr. Steven LaPLante est l'expérience STD (de l'anglais *Saturation Transfer Difference*). Cette technique génère un spectre STD diff qui résulte de la différence entre les spectres enregistrés avec et sans saturation sélective de la protéine. Dans la Figure 3.2, ces derniers sont identifiés respectivement comme « on-resonance » et « off-resonance ». Le premier est obtenu en irradiant exclusivement la région du spectre contenant la protéine (par exemple, de 0 - 1 ppm).(Viegas *et al.*, 2011) Ainsi, les ligands liés à la protéine subiront, via la diffusion de spin par l'effet NOE (de l'anglais *Nuclear Overhauser Effect*), un transfert de saturation de la protéine. En conséquence, le spectre « on-resonance » montrera une diminution de l'intensité des pics du ligand lié à la protéine, par rapport à l'intensité des pics enregistrés dans le spectre « off-resonance ». C'est pourquoi, dans le spectre STD diff généré (Figure 3.2, « difference spectra »), seuls les signaux des composés qui se lient à la cible étudiée seront observés. Un aspect important à prendre en compte est que l'expérience RMN-<sup>1</sup>H STD n'est réalisée que pour les ligands qui sont faiblement liés à la protéine (0.01  $\mu$ M < Kd < 1 mM), car l'équilibre d'échange du ligand dans les états libre et lié est suffisamment rapide pour que les pics correspondants soient enregistrés (Figure 3.2, partie supérieure).



Figure 3.2 Représentation de l'expérience STD, extraite de la publication de Cabrita *et al*.(Viegas *et al.*, 2011)

Dans la littérature, plusieurs articles rapportent l'étude de l'interaction de différents composés, tels que la procaïnamide (Figure 2.3, composé **2**) et le RG-108 (Figure 2.4, composé **6**), à la DNMT3A.(Asgatay *et al.*, 2014; Halby *et al.*, 2012) Cependant, l'utilisation de la stratégie FBLD, basée sur le consensus des expériences par RMN-<sup>1</sup>H DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD, pour cribler les fragments qui se lient à la DNMT3A, lesquels pourraient guider les efforts pour inhiber l'activité catalytique de cette enzyme, n'a pas été réalisée jusqu'à présent. C'est précisément de la mise en œuvre d'une telle initiative qu'est née la collaboration entre les groupes du Pr. Alexandre Gagnon et du Pr. Steven LaPlante, donnant ainsi naissance à ce projet de thèse.

### 3.2 Le PS-3114 : découverte et travaux préliminaires

Le composé PS-3114 a été identifié lors de la thèse de doctorat de Maxime Leroy. À l'époque, les résidus 612 – 912 du site catalytique de l'enzyme *Homo sapiens* (hDNMT3Ac), lequel avait été produit par le groupe de la Pre. Paola Arimondo à l'Institut Pasteur à Paris, avaient été utilisés en tant que cible. Avec seulement 5 mg de protéine produite, le groupe du Pr. Steven LaPlante a créé une petite chimiothèque contenant 223 fragments de type « drug-like », ce qui a permis de s'assurer que les composés sélectionnés ne comportaient pas de groupements indésirables en chimie médicinale, tels que des cétones et des phénols. Parmi tous les composés criblés par les expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD, seule l'interaction de deux d'entre eux à la hDNMT3Ac a été confirmée par les trois techniques de RMN-<sup>1</sup>H employées (Figure 3.3). Le pourcentage d'inhibition des deux composés a été déterminé à partir du test de fluorescence par la restriction des enzymes mis au point par le groupe de notre collaboratrice à Paris. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.3, où l'on peut voir que le composé SS-6015 s'est révélé être un inhibiteur modéré de l'activité catalytique de la hDNMT3Ac, tandis que la molécule FF-0208 était un inhibiteur faible.



**40 :** SS-6015 51.6% @ 500 μM



**41 :** FF-0208 28.1% @ 500 μM

Figure 3.3 Structure, avec valeurs d'inhibition contre la hDNMT3Ac à 500  $\mu$ M, des ligands trouvés comme liants de l'enzyme lors de la thèse de Maxime Leroy, basée sur le consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD.

Au vu des résultats de l'essai biochimique, Maxime Leroy a procédé à une optimisation du composé SS-6015. Malgré les efforts déployés, aucun de la vingtaine des dérivés testés ne s'est avéré actif à 500 μM, c'est pourquoi un second criblage par RMN-<sup>1</sup>H a été effectué. Ainsi, le groupe du Pr. Steven LaPlante a identifié 18 fragments ayant une structure similaire à celle du SS-6015 dans sa base de données. Le pourcentage d'inhibition sur la DNMT3A, par ces molécules, déterminé par le groupe de la Pre. Paola Arimondo a révélé que la molécule nommée PS-3114 (Figure 3.4a, composé **42**), présentait le pouvoir d'inhibition le plus élevé. Encouragés par ces résultats, la valeur de l'IC<sub>50</sub> de cette molécule a été déterminée (Figure 3.4a) et le processus d'optimisation « hit-to-lead » a été lancé.



Figure 3.4 Structure et activité biologique **a**) du PS-3114 et **b**) de son dérivé LM-III-152 obtenu lors de la thèse de Maxime Leroy.

Le pourcentage d'inhibition contre la hDNMT3Ac par le PS-3114 resynthétisé par Maxime Leroy (73.3% @ 500 μM, 58.1% @ 320 μM, 17.8% @ 100 μM, 11.2% @ 50 μM) ainsi que par une vingtaine de dérivés de

cette molécule, a été déterminé dans le groupe de notre collaboratrice à Paris. Parmi eux, le dérivé LM-III-152 s'est avéré le plus puissant, avec des valeurs d'activité biologique (pourcentage d'inhibition et IC<sub>50</sub>) de l'ordre de celles obtenues pour le PS-3114 (Figure 3.4b). Ces résultats suggèrent l'existence probable d'une SAR autour de la molécule de PS-3114. Pour cette raison, l'objectif du premier projet de cette thèse a été de poursuivre l'optimisation du PS-3114 dans le but d'améliorer son pouvoir d'inhibition et d'établir le SAR qu'il pourrait présenter. La Figure 3.5 résume la découverte du PS-3114.



Figure 3.5 Résumé de la découverte du PS-3114.

Dans la section suivante, la resynthèse du PS-3114 et la synthèse de dérivés sera décrite et discutée, ainsi que les résultats de l'analyse de l'activité biochimique et biophysique et du comportement en solution des composés.

#### 3.3 Le PS-3114 : resynthèse et évaluation biochimique, biophysique et comportement en solution

Comme dans tous les projets de chimie médicinale, la première étape de ce projet a consisté à resynthétiser le composé principal et à vérifier son activité biologique. Ainsi, le PS-3114 a été resynthétisé dans une séquence de synthèse en deux étapes (Schéma 3.1). Tout d'abord, la condensation du 3bromopyruvate d'éthyle avec la 2-amino-pyridine a été réalisée (Schéma 3.1, obtention du composé **44**). Le composé **44** est formé avec un faible rendement de 20% en raison des nombreux produits secondaires formés au cours de la réaction, tel que démontré par la présence de cinq taches sur une CCM observée sous une lampe UV. Cela peut s'expliquer par le fait que le 3-bromopyruvate d'éthyle possède trois centres électrophiles (l'ester, la cétone et le groupement brome) qui peuvent chacun être attaqué par les nucléophiles présents dans le milieu réactionnel, soit l'amine, l'azote pyridinique et même l'éthanol utilisé comme solvant. Enfin, la bromation du composé **44** avec de la NBS a été réalisée, laquelle a permis d'obtenir le composé **42** avec un rendement de 91%.



Schéma 3.1 Séquence de synthèse pour l'obtention du PS-3114 (Annexe E).

Une fois le PS-3114 obtenu, quelques milligrammes ont été envoyés au laboratoire de la Pre. Paola Arimondo, qui a remarqué un pouvoir inhibiteur modéré contre la hDNMT3Ac en utilisant le test enzymatique développé dans son labo (Tableau 3.1). Le groupe du Pr. Steven LaPlante a également analysé le comportement du composé resynthétisé en solution (Tableau 3.1). À cette fin, les échantillons ont été préparés à une concentration nominale de 500 µM, concentration à laquelle le pouvoir inhibiteur des échantillons avait été déterminé. Ensuite, à partir de l'expérience T<sub>2</sub>-CPMG, il a été possible de calculer la valeur ERETIC, c'est-à-dire la concentration nominale (Tableau 3.1) indique que le composé se comporte bien en solution.

Tableau 3.1 Évaluation biochimique et comportement en solution du PS-3114 resynthétisé.

<b>N°</b> (nom) <b>de</b>	<b>Source</b>	% d'inhibition	ERETIC @ 500 μM	Agrégation
composé	Source	@ 500 μM	de C <sub>nominale</sub>	
<b>42</b> (PS-3114)	Resynthèse	50	574 μM	Non

La capacité du PS-3114 à interagir avec la protéine produite dans cette thèse (Chapitre 4) a également été confirmée par le consensus des techniques DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD. Les essais ont été réalisés à une concentration de 300 µM du PS-3114 et de 7 µM de la hDNMT3Ac. La Figure 3.6 montre les spectres obtenus pour le composé libre (en bleu) et pour le composé avec la protéine (en rouge). Dans les spectres DLBS, il existe une légère différence entre ceux du ligand libre et du ligand avec la protéine. Cependant, dans les spectres obtenus par T<sub>2</sub>-CPMG, il est évident que le taux de décroissance T<sub>2</sub> est plus rapide dans les échantillons du PS-3114 avec la protéine, ce qui confirme l'interaction formée entre eux. Enfin, dans le spectre STD diff généré, les pics correspondants au ligand sont observés, démontrant par cette expérience que le PS-3114 interagit avec la hDNMT3Ac.



Figure 3.6 Région 5.5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de la liaison entre le PS-3114 et la hDNMT3Ac. Le spectre du ligand libre est en bleu et celui du ligand avec la protéine en rouge. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

À ce stade, il a été confirmé que le PS-3114 inhibe modérément la hDNMT3A et qu'il n'est pas affecté par des phénomènes d'agrégation. En outre, la liaison formée entre le ligand et l'enzyme a été détectée. Alors, la synthèse et l'évaluation de nouveaux dérivés ont suivi.

# 3.4 Synthèse et évaluation biochimique, biophysique et comportement en solution des dérivés de la molécule du PS-3114

Comme indiqué à la section 3.2, l'analyse de la SAR du PS-3114 a été initiée par Maxime Leroy. À l'époque, les modifications visaient principalement les substituants présents sur le système bicycle de la molécule (Figure 3.7).



Figure 3.7 Analogues de PS-3114 synthétisés par Maxime Leroy et leurs pourcentages d'inhibition sur la hDNMT3A à 500 et 320  $\mu$ M (celui-ci entre parenthèses).

Après avoir analysé les résultats préliminaires obtenus lors de la thèse de Maxime, la synthèse des nouveaux dérivés dans cette thèse a été basée sur deux stratégies. D'une part, il a été décidé d'étudier l'influence de la liaison ester. Ce type de liaison étant facilement hydrolysable en milieu physiologique, donc indésirable en chimie médicinale, les efforts se sont également concentrés sur son remplacement par une liaison amide. En autre, il a été décidé de poursuivre les modifications autour du bicycle, en commençant par la combinaison des meilleurs substituants qui avaient déjà été trouvés (Figure 3.8).



Figure 3.8 Représentation **a**) de meilleurs dérivés obtenus par Maxime Leroy et **b**) des stratégies de synthèse de nouveaux analogues du PS-3114.

Avant la synthèse des dérivés esters et amides, un amarrage moléculaire a été réalisé avec l'application MOE, afin de prédire des fonctions chimiques qui pourraient améliorer l'activité inhibitrice du PS-3114. À cette fin, les interactions du SAH, qui est l'inhibiteur naturel des DNMTs, dans le site qu'il occupe dans la DNMT3A (PDB : 2QRV) ont été analysées, ainsi que les interactions que le PS-3114 pourrait avoir avec l'enzyme s'il occupait la cavité dans laquelle se trouve le SAH (Figure 3.9).



Figure 3.9 Interactions **a)** du SAH et **b)** du PS-3114 dans la cavité que le SAH occupe dans la DNMT3A (PDB : 2QRV).

Comme illustré à la Figure 3.9a, le SAH présente une interaction de type arène••H entre le cycle aromatique de l'adénosine et l'hydrogène du carbone alpha de la Val661 de la DNMT3A, ainsi que deux liaisons hydrogène : l'une entre les hydroxyles de l'adénosine et le Glu660 et l'autre entre l'amine de

l'homocystéine et le Glu752. Subséquemment, il a été décidé d'étudier l'influence de substituants de nature amino-acide et, notamment, par des fonctions qui pourraient imiter les interactions polaires que le SAH présente dans la cavité de l'enzyme, telles que les amines et les acides carboxyliques, sur l'activité inhibitrice du PS-3114.

Par ailleurs, le logiciel a suggéré que, au niveau du site du SAH, le PS-3114 ne pourrait former qu'une interaction H••arène entre les hydrogènes du méthyle de la fonction ester éthylique de la molécule avec le Trp889 de la DNMT3A, laissant la majeure partie du PS-3114 exposée au milieu (Figure 3.9b). Ainsi, afin de créer des interactions supplémentaires entre le PS-3114 et l'enzyme, il est nécessaire d'élargir la molécule. Selon le modèle proposé à partir de l'amarrage moléculaire, les positions les plus internalisées de la molécule dans la cavité de l'enzyme sont la fonction ester et le groupement brome, de sorte que la modification de ces positions avec des fonctions plus importantes pourrait favoriser l'augmentation des interactions supplémentaires avec les acides aminés qui composent le site choisi. Sur la base de ces observations, il a été décidé d'étudier l'effet de substituants de nature alkyle et aromatique (de tailles diverses) sur l'activité biologique du composé « hit », ce qui permettra également d'explorer le SAR possible dans le PS-3114.

Pour accomplir la synthèse des dérivés esters et amides, la saponification de la molécule PS-3114 a été faite (Schéma 3.2, obtention du composé **45**). Ensuite, deux tentatives infructueuses ont été réalisées pour obtenir les esters. La première provient des conditions d'estérification de Steglich et la seconde de la formation, *in situ* avec du chlorure de thionyle, du chlorure d'acyle correspondant (Schéma 3.2, obtenant les composés **46** et **47**, respectivement). Heureusement, la réaction S<sub>N</sub>2 du carboxylate du composé **45**, formé *in situ* avec la base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> avec les halogénures respectifs a permis d'obtenir la plupart des esters désirés (Schéma 3.2, obtenant les composés **46** – **55**). Les rendements modérés obtenus pourraient être expliqués par la désactivation du carboxylate formé due à l'effet inductif du groupement brome en position bêta. Par ailleurs, le brome peut nuire à la réaction de substitution nucléophile par un effet stérique. En particulier, les composés **54** et **55** ont été synthétisés dans le but de générer de nouvelles interactions polaires entre ces dérivés et la DNMT3A. En outre, il a été supposé que le composé **55** contenant le substituant 2-(diéthylamino)éthyle pourrait imiter les interactions présentes dans la procaïne (Figure 2.3, composé **2**). Notons que sous ces conditions, la séparation du composé **46** d'une impureté de Rf similaire n'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante de la molécule pour les analyses ultérieures, ainsi une nouvelle voie pour sa synthèse a été réalisée.



Schéma 3.2 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés esters du PS-3114 (Annexe E).

Pour l'obtention du composé **46**, une troisième tentative a été faite à partir d'une séquence de synthèse en deux étapes (Schéma 3.3). Grâce à la condensation du bromopyruvate de méthyle avec la 2aminopyridine et à la bromation de l'intermédiaire **56**, il a été possible d'obtenir le composé **46** et de compléter la série de dérivés esters du PS-3114.



Schéma 3.3 Conditions utilisées pour la synthèse du dérivé ester méthylique, composé **46**, du PS-3114 (Annexe E).

Une fois que les composés avec les différents substituants de la fonction ester ont été synthétisés, cette liaison a été remplacée par une liaison amide. Un intérêt particulier a été porté à la formation de ce type

de liaison avec différents acides aminés dans le but de mimer les interactions de l'homocystéine présente dans la molécule du SAH. Dans la première tentative, le DCC a été utilisé comme agent de couplage (Schéma 3.4, obtention du composé **57**).



Schéma 3.4 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés amides du PS-3114 (Annexe E).

Cette réaction implique la formation d'une *O*-acylisourée active qui réagit avec l'amine pour donner l'amide correspondant. Cependant, par cette voie de synthèse, il n'a pas été possible d'obtenir une quantité suffisante de produit **57** pur pour sa caractérisation ultérieure. Cela était dû au sous-produit *N*,*N'*-dicyclohexylurée qui se forme, dont les traces étaient difficiles à éliminer. Ainsi, il a été décidé d'utiliser le HATU (Schéma 3.4, obtention des composés **57** – **76**). Dans la première étape du mécanisme de réaction l'anion <sup>-</sup>OAt (1-hydroxylate-7-azabenzotriazole) est formé, lequel est un excellent nucléophile compte tenu de l'effet alpha qu'il présente. De plus, il a été proposé que l'intermédiaire actif qu'il forme avec le carboxylate correspondant (un ester-benzotriazole) facilite la formation de la liaison amide par un effet de groupe voisin exercé par l'azote dans le cycle pyridine.(Carpino *et al.*, 2000) Celui-ci stabilise, par une liaison hydrogène, l'amine attaquante à travers un état de transition cyclique à 7 chaînons. Ces conditions

de réaction ont permis d'obtenir une variété d'amides de taille et de substitution (secondaire et tertiaire) différentes. Dans le cas des bromophényléthylamides obtenus (Schéma 3.4, composés **69** et **70**), l'objectif était d'inclure dans les composés des fonctions qui pourraient permettre l'augmentation future de la taille de la molécule à partir de réactions de couplage ultérieures impliquant l'halogène sur le groupe phényle.

La seule molécule qui n'a pas pu être obtenue par la voie ci-dessus est la **65**. Ce composé est intéressant étant donné que le substituant *N*,*N*-diéthyléthylènediamine utilisé se retrouve sur la molécule de procaïnamide (Figure 2.3, composé **2**), ce qui pourrait fournir de nouvelles interactions avec le PS-3114 afin d'améliorer son activité inhibitrice. Des efforts ont donc été poursuivis pour obtenir le composé **65**, cette fois à partir de l'aminolyse du PS-3114. Ce type de réaction a été proposé, à partir d'études quantiques, comme étant favorisé par un mécanisme de type addition/élimination, plutôt que par une voie concertée.(Oie *et al.*, 1982) Cependant, Schaefer *et al.* ont suggéré, à partir d'études computationnelles, que la voie de réaction la plus favorable se déroule par un mécanisme impliquant plusieurs étapes et des intermédiaires neutres (Figure 3.10).(Ilieva *et al.*, 2003)



Figure 3.10 Diagramme énergétique, adapté de la publication de Schaefer *et al.*, (Ilieva *et al.*, 2003) des mécanismes concertés (en pointillés) et par étapes (en trait plein), avec la représentation des principales structures impliquées dans l'aminolyse autocatalysée du formiate de méthyle.

La première structure identifiée est un complexe réactif (C1<sub>s</sub><sup>catal</sup>), lequel, en passant par l'état de transition TS1<sup>catal</sup>, devient le premier intermédiaire I1<sup>catal</sup>. Celui-là, en franchissant la barrière de rotation impliquant TSR<sup>catal</sup>, évolue en son rotamère I2<sup>catal</sup>, qui se transforme en produits en passant par l'état de transition TS2<sup>catal</sup>. D'autre part, il a également été rapporté que différentes bases azotées catalysent l'aminolyse des esters.(Lima *et al.*, 2011; Vigante *et al.*, 2015) En fait, Costa *et al.*, pour la réaction catalysée par le DBU, ont proposé que le mécanisme se déroule en plusieurs étapes, mais avec la formation d'intermédiaires à charge séparée.(Lima *et al.*, 2011) Les espèces chargées ont été détectées et caractérisées en suivant l'avancement de la réaction par ESI-MS/MS (de l'anglais *Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry*).

Compte tenu des travaux cités ci-dessus, la première tentative d'aminolyse du PS-3114 a été réalisée dans le DMF en utilisant la base *t*BuOK, toutefois sans succès (Schéma 3.5). Par la suite, une deuxième variante, utilisant le DBU, a été tentée. Cependant, le succès a été atteint lorsque la réaction a été réalisée sans l'utilisation d'un solvant (Schéma 3.5).



Schéma 3.5 Tentatives réalisées pour synthétiser le composé 65 par l'aminolyse du PS-3114 (Annexe E).

Pour conclure la synthèse des premiers dérivés de cette série, il a été décidé de déprotéger les groupes ester méthylique et *tert*-butylcarbamate (Boc) des composés **71** et **72**, respectivement (Schéma 3.6). L'objectif était d'étudier l'effet des fonctions acide carboxylique et amine, respectivement, dans chaque composé. La saponification du composé **71** s'est déroulée quantitativement. Cependant, la déprotection

du Boc du composé **72** avec le TFA n'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante du composé **78** pour une analyse ultérieure.



Schéma 3.6 Conditions utilisées pour la déprotection des composés 77 et 78 (Annexe E).

Une fois les dérivés ester et amide du PS-3114 obtenus, les composés ont été envoyés au laboratoire de notre collaboratrice à Paris qui a réalisé le test enzymatique (Annexe A) pour déterminer les pourcentages d'inhibition des composés contre la hDNMT3Ac (Tableau 3.2). Les composés ont été testés à des concentrations de 500 et 300 µM. Les mesures ont été effectuées sur la base du test de fluorescence par enzyme de restriction développé par ce groupe en utilisant la molécule SGI-1027 comme référence. De plus, le comportement en solution de certains des composés a été étudié à partir de l'expérience T<sub>2</sub>-CPMG dans le groupe du Pr. Steven LaPlante (Tableau 3.2). Les déterminations ont été effectuées à une concentration nominale de 500 µM (ou 300 µM) des composés testés.

Tableau 3.2 Pourcentage d'inhibition à 500  $\mu$ M (**>70%**, **70%** – 45%, <mark><45%</mark>) et à 300  $\mu$ M (**>50%**, **50%** – 25%, <25%) des dérivés ester et amide du PS-3114 contre la hDNMT3Ac, ainsi que les valeurs ERETIC déterminées à 500  $\mu$ M (**>245 \muM**, **245 – 110 \muM**, **<110 \muM**) ou à 300  $\mu$ M<sup>[a]</sup> (**>150 \muM**, **150 – 90 \muM**, **<90 \muM**). Abréviations : N.T., non testé ; N.A.; non applicable, e.a., en attente des résultats.

N° (nom) de composé	Structure	% d'inhibition @ 500 μM	% d'inhibition @ 300 μM	ERETIC @ 500 µM de C <sub>nominale</sub>	Agrégation
46		N.T.	11	22 μM	Oui
<b>42</b> (PS-3114)		50	12	574 μM	Non

48	8	N.T.	227 μM	Possible
49	6	N.T.	5 μΜ	Oui
50	11	N.T.	1 μΜ	Oui
51	N.T.	12	707 μM	Non
52	7	17	116 μM	Possible
53	23	10	143 μM	Possible
47	-10	N.T.	135 μM	Possible
54	21	N.T.	N.T.	N.A.
55	12	N.T.	166 μM	Possible
58	e.a	e.a.	N.T.	N.A.
59	e.a	e.a	230 <sup>[a]</sup>	Non
<b>60</b> (YAR101)	47	17	1150 μM	Non
61	10	5	N.T.	N.A.

62	2	0	N.T.	N.A.
63	e.a	e.a	N.T.	N.A.
64	9	N.T.	N.T.	N.A.
65	N.T.	13	909 µM	Non
66	7	2	433 μM	Non
67	8	7	41 μM	Oui
68	12	9	N.T.	N.A.
69	-122	14	N.T.	N.A.
70	-26	5	N.T.	N.A.
71	17	N.T.	N.T.	N.A.
77	10	N.T.	172 μΜ	Possible

72		9	N.T.	N.T.	N.A.
73	MeO <sub>2</sub> CN	31	6	N.T.	N.A.
74		25	5	N.T.	N.A.
57	MeO <sub>2</sub> C Br	2	N.T.	N.T.	N.A.
75		19	15	N.T.	N.A.
76		9	6	N.T.	N.A.

Comme on peut le voir dans le Tableau 3.2, aucune des modifications sur l'ester éthylique du PS-3114 n'a été tolérée. En outre, le seul remplacement légèrement toléré sous forme d'amide était le propylamide (composé **60**). Quant au comportement en solution des dérivés sélectionnés, la grande majorité a montré une tendance à l'agrégation ou ont une faible solubilité dans le tampon utilisé (Annexe B). Cependant, le composé **60** s'est bien comporté en solution, ce qui renforce que son pourcentage d'inhibition n'a pas été influencé par des problèmes de solubilité à la concentration utilisée.

Après avoir conclu l'étude des modifications autour de la fonction ester du PS-3114, la synthèse des dérivés combinant les groupes fonctionnels qui ont montré la meilleure activité dans les analogues obtenus par le doctorant Maxime Leroy (Figure 3.8a) a été commencée. Ainsi, une séquence de synthèse rapide a été conçue pour obtenir les 4 composés souhaités (Figure 3.8b), lesquels combinent le groupe éthyle en position 6 (du composé LM-III-152) avec la position 3 substituée par : *i*) un brome (du PS-3114) (Schéma 3.7, composé **82**), *ii*) un biphényle (du composé LM-III-159) (Schéma 3.7, composé **83**), iii) un styryle (du composé LM-III-134) (Schéma 3.6, composé **84**) et, iv) un phénéthyle (Schéma 3.7, composé

**85**). Ce dernier a été obtenu dans le but de connaitre l'influence de la double liaison sur le styryle sur l'activité inhibitrice des dérivés.

La séquence de synthèse est présentée dans le Schéma 3.7. Les conditions de réaction de Stille et de Suzuki ont été déterminantes pour l'obtention des composés **80** et **83** – **85**, respectivement. L'étape la plus laborieuse a été la purification sur colonne chromatographique du composé **85**. L'hydrogénation catalytique du précurseur **84** a donné un rendement de 43%. Cette faible valeur est due au fait que la réaction a été arrêtée avant l'achèvement, car la formation collatérale du composé **86** a été observée. De plus, la séparation chromatographique sur colonne du composé **85** a été ardue, car son Rf est très similaire à celui du composé **86** (0.48 et 0.4, respectivement, dans hexanes : AcOEt / 2 : 8).



Schéma 3.7 Conditions utilisées pour la synthèse des composés **82** – **85**, qui combinent les fonctions les plus actives trouvées par Maxime Leroy (Annexe E).

Après avoir obtenu les quatre composés souhaités, leur pourcentage d'inhibition contre la hDNMT3Ac a été déterminé, ainsi que leur comportement en solution (Tableau 3.3). Chacune de ces études a été réalisée grâce à nos collaborateurs à l'Institut Pasteur et à l'INRS, sur la base des tests et expériences

mentionnés ci-dessus. Étonnamment, aucun des composés synthétisés n'a montré une quelconque activité à la concentration testée.

Tableau 3.3 Pourcentage d'inhibition contre la hDNMT3Ac, à 500  $\mu$ M (**>70%**, 70% – 45%, <45%), des dérivés combinant les fonctions les plus actives trouvées par Maxime Leroy, ainsi que les valeurs ERETIC à 500  $\mu$ M (**>245 \muM**, 245 – 110  $\mu$ M, <110  $\mu$ M) déterminées.

N° (nom) de composé	Structure	% d'inhibition @ 500 μM	ERETIC @ 500 µM de C <sub>nominale</sub>	Agrégation
<b>82</b> (YAR138)		9	664 μM	Non
<b>83</b> (YAR160)		8	15 μΜ	Oui
<b>84</b> (YAR158)		12	113 μM	Possible
<b>85</b> (YAR165)		-6	242 μM	Possible

Afin de mieux interpréter les résultats obtenus, un graphique a été construit par l'application DataWarrior, lequel relie le pourcentage d'inhibition des composés à leur solubilité (valeur ERETIC déterminée) (Figure 3.11). Les analogues qui avaient été synthétisés par Maxime (identifiés comme LM-III suivi du numéro de réaction) ont également été inclus pour l'analyse. Le graphique a été divisé en quatre quadrants. Dans le coin supérieur gauche figurent les composés présentant les valeurs d'inhibition supérieures à 50% à 500 μM, mais qui forment des agrégats ou présentent une faible solubilité à cette concentration dans le tampon utilisé (Annexe B). C'est le cas des composés LM-III-159 et LM-III-134. L'activité rapportée a donc pu être faussée par des phénomènes physico-chimiques. En dépit de cela, la relation observée dans le quadrant inférieur gauche a révélé que la double substitution, trouvée dans les analogues YAR160 (composé **83**), YAR158 (composé **84**) et son dérivé hydrogéné YAR165 (composé **85**), entraîne une perte totale de l'activité des molécules. Cette observation a été soutenue par les résultats obtenus pour la molécule YAR138 (composé **82**) dérivé de LM-III-152. Ces deux composés sont situés dans la partie droite du graphique, ce qui indique qu'ils se comportent bien en solution. Cependant, l'activité de LM-III-152 est

pratiquement perdue dans le dérivé YAR138 (composé **82**), situé en bas du graphique, après avoir installé le groupement Br, trouvé dans le PS-3114, en position 3 de LM-III-152. Ces résultats conduisent à deux conclusions partielles importantes : 1) une double substitution aux positions 3 et 6 du PS-3114 n'est pas tolérée et 2) le groupement Br n'est pas indispensable à son activité biologique. Cette dernière conclusion est très importante, car ce groupement fonctionnel n'est pas souhaitable en chimie médicinale parce qu'il pourrait réagir, dans certains cas, avec des protéines contenant des cystéines, comme le GSH (glutathion). En ce qui concerne le comportement en solution des autres dérivés obtenus par Maxime Leroy, il a été constaté que, malgré leur taille relativement petite, ils présentent une forte tendance à former des agrégats au fur et à mesure que le nombre d'atomes de carbone dans les structures augmente. Enfin, le comportement du SAH en solution a également été déterminé, confirmant son bon comportement dans le milieu utilisé.



Figure 3.11 Relation entre le pourcentage d'inhibition contre la hDNMT3A et la solubilité des dérivés à 500  $\mu$ M. Abréviations : N.T., non testé.

Afin de guider nos efforts, il a été décidé d'exploiter davantage le potentiel des substituants qui, jusqu'à présent, avaient permis d'expliquer une possible SAR du PS-3114, sans affecter grandement sa solubilité.

De ce fait, pour les analyses suivantes, le groupe fonctionnel éthyle en position 6 du système bicycle du PS-3114 (*i.e.* composés LM-III-152 et YAR138) a été pris en compte. Bien que les composés LM-III-134 et YAR158 ne se soient pas bien comportés en solution aqueuse à 500  $\mu$ M, le groupement styryle en position 3 n'a pas été écarté. Le composé LM-III-134 ayant conservé son activité inhibitrice à 320  $\mu$ M (73 % d'inhibition) (Figure 3.8a), son comportement en solution à cette concentration restait à vérifier. Dans le cas du remplacement du groupement ester éthylique du PS-3114 par un amide, le seul qui a conservé le pouvoir inhibiteur du composé « hit » était le propylamide (*i.e.* composé **60**, nommé YAR101), il a donc été gardé en considération. Les composés LM-III-159 et son analogue YAR160 (composé **83**) suggèrent que la fonction biphényle affecte grandement la solubilité du PS-3114, c'est pourquoi ce groupe fonctionnel a été écarté des modifications ultérieures. Ainsi, pour chacun des composés sélectionnés, l'interaction avec la protéine a été évaluée par les trois expériences développées par le groupe du Pr. Steven LaPlante à 300  $\mu$ M (Tableau 3.4). Il est à noter que la protéine utilisée lors de ce projet a été exprimée et purifiée au cours de cette thèse, en collaboration avec le Pr. Laurent Cappadocia, à l'UQAM. Les détails de ce processus seront abordés au chapitre 4.

Tableau 3.4 Étude de criblage de	e l'interac	tion entre les	compos	és sélectionnés et la	a hDNMT3Ac (	+++,	++,
<mark>+</mark> ) à 300 μM. ERETIC à 300 μM :	>150 μM,	<mark>150 – 90 μΜ</mark> ,	<mark>&lt;90 μΜ</mark>	. Abréviations : N.A.	, non applicat	ole.	

N° (ou nom) de composé	Structure	ERETIC @ 300 µM de C <sub>nominale</sub>	Score DLBS	Score CPMG	Score STD	Agrégation
LM-111-134		200 µM				Non
<b>90</b> (YAR191)		254 μΜ				Non
<b>82</b> (YAR138)		344 μM				Non
<b>42</b> (PS-3114)		335 μΜ				Non
LM-III-152		327 μM				Non
<b>60</b> (YAR101)		707 μM				Non



Le Tableau 3.4 présente les composés organisés en fonction du score obtenu pour les consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD. Pour des raisons de confidentialité, les valeurs ne peuvent pas être fournies. Ainsi, un gradient allant du vert au jaune et représentant la diminution numérique des scores obtenus a plutôt été utilisé, le vert indiquant un meilleur score que le jaune. Plus l'interaction entre le ligand est la protéine est forte, plus les effets observés par chacune des méthodes utilisées sont importants. Comme expliqué dans la section 3.1, le score DLBS quantifie les changements moyens du déplacement chimique. Dans le cas du T<sub>2</sub>-CPMG, le score obtenu reflète les changements moyens de T<sub>2</sub>, tandis que ceux obtenus par STD concernent l'ampleur de la différence de transfert de saturation. Il est important de noter que les scores ne sont pas organisés mécaniquement de la plus haute à la plus basse valeur, mais que l'analyse visuelle des spectres résultants est tout aussi importante pour déterminer l'ordre établi. Les données obtenues pour le PS-3114 (composé **42**) ont été ajoutées à titre de comparaison. En outre, pour valider les déterminations, le SAH a été utilisé comme contrôle et l'interaction entre l'inhibiteur SGI-1027 (Figure 2.3, composé **4**) et l'enzyme a été déterminée. Les valeurs obtenues pour le dérivé YAR191, dont il sera question plus loin, ont également été ajoutées au tableau à des fins pratiques.

Les expériences de détection de la liaison des ligands avec la hDNMT3Ac ont été validées avec le SAH, un inhibiteur naturel des DNMTs, lequel a montré un bon comportement en solution (Figure 3.12a). Cependant, dans le cas du composé SGI-1027, une valeur ERETIC beaucoup plus faible que la concentration nominale a été trouvée, ce qui suggère que le composé forme des agrégats en solution ou qui a une faible solubilité dans le tampon utilisé (Annexe B). De plus, des différences importantes ont été observées dans la région 5 – 10.5 ppm dans les spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés pour la protéine libre (Figure 3.12b, en bleu) et la protéine avec le SGI-1027 (Figure 3.12b, en rouge). Le fait que les signaux enregistrés dans les

premiers soient plus intenses que dans les échantillons contenant le mélange ligand-protéine suggère que le composé SGI-1027 précipite la protéine.



Figure 3.12 Région 5 – 10.5 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz pour la protéine libre (en bleu), **a)** pour la protéine avec le SAH (en rouge) et le SAH libre (en vert), ainsi que **b)** pour la protéine avec le SGI-1027 (en rouge) et le SGI-1027 libre (en vert). Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

D'autre part, la liaison du SAH à la hDNMT3Ac n'a pu être que faiblement détectée par STD (Figure 3.13a). Ce résultat peut être expliqué par un probable échange lent dans l'équilibre entre les états libre et complexe ligand-enzyme, lequel correspond à la formation d'une liaison forte entre les deux espèces. Comme mentionné dans la section 3.1, l'expérience STD est limitée aux ligands qui se lient faiblement à la protéine, car il est nécessaire que l'équilibre d'échange du ligand dans les états libre et lié soit suffisamment rapide pour que les pics correspondants soient enregistrés dans les spectres (Figure 3.2, partie supérieure).



Figure 3.13 Région 5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction de la hDNMT3Ac **a**) avec le SAH et **b**) avec le SGI-1027. Le spectre de la protéine liée au ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

Dans le cas du SGI-1027, aucune liaison à la protéine n'a été détectée. L'absence de signaux dans la région aromatique pour les trois expériences (Figure 3.13b) indique que le composé s'agrège ou a une très faible solubilité dans le tampon utilisé. Ces résultats remettent en question les valeurs d'inhibition rapportées pour ce composé. En outre, les divergences, mentionnées à la section 2.3.1, dans les essais biologiques réalisés pour cette molécule pourraient être dues à son mauvais comportement en solution. Ces résultats soulignent l'importance de réaliser des études physico-chimiques sur les composés proposés comme inhibiteurs ou « lead » afin de connaître leur comportement dans le milieu des expériences et ainsi réduire la possibilité d'être en présence de molécules donnant de faux positifs.
Une fois la méthodologie validée, nous avons procédé à l'analyse du reste des composés synthétisés jusqu'à ce moment et inclus dans le Tableau 3.4. Parmi tous ces composés, le seul qui a montré une possible agrégation à 300 µM en solution était YAR158 (composé **84**). Les expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD ont indiqué que le composé LM-III-134 se lie très fortement à la hDNMT3Ac. La Figure 3.14a montre les changements prononcés dans les spectres enregistrés par DLBS et T<sub>2</sub>-CPMG pour le ligand libre (en bleu) par rapport au ligand avec la protéine (en rouge). D'après le spectre STD diff généré, la formation du complexe en solution était également évidente.



Figure 3.14 Région 5.5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction de la hDNMT3Ac **a**) avec le LM-III-134 et **b**) avec le YAR138 (composé **82**). Le spectre de la protéine liée au ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

Les effets moins prononcés détectés pour la molécule YAR138 (composé **82**) (Figure 3.14b) suggèrent qu'elle se lie à la protéine moins fortement que le LM-III-134, mais plus fortement que le PS-3114 (Figure 3.6).

Dans le cas du composé LM-III-152, un effet très faible de liaison à la protéine a été détecté, tandis que pour la molécule YAR101 (composé **60**), les effets observés étaient encore plus faibles. La Figure 3.15 montre les spectres enregistrés, à partir de chaque expérience, pour le composé LM-III-152, afin d'illustrer que les changements observés sont moins prononcés que ceux détectés à partir des spectres présentés dans la Figure 3.14.



Figure 3.15 Région 5.5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction de la hDNMT3Ac avec le LM-III-152. Le spectre de la protéine liée au ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

Sur la base des résultats discutés jusqu'à présent, deux nouvelles stratégies ont été mises en œuvre. D'une part, il a été décidé de remplacer la fonction éthyle ester des composés LM-III-134 et LM-III-152, par le propylamide présent dans la molécule YAR101 (composé **60**), l'objectif étant de connaître l'impact d'une telle substitution sur la solubilité et l'activité des deux composés. Les conditions utilisées pour la synthèse des dérivés de propylamide YAR203 (composé **87**) et YAR209 (composé **88**) sont présentées dans le Schéma 3.8. La première étape a consisté à synthétiser les intermédiaires **60** et **81** (conditions indiquées dans les Schémas 3.4 et 3.7, respectivement). Dans le cas de la molécule YAR203 (composé **87**), une réaction de Suzuki a permis d'installer la fonction styryle en position 3 du système bicyclique, tandis que la molécule YAR209 (composé **88**) a été obtenue via l'aminolyse du composé **81**.



Schéma 3.8 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés propylamide de LM-III-134 et de LM-III-152 : composés **87** et **88**, respectivement (Annexe E).

D'autre part, afin de connaître l'influence des groupements polaires qui pourraient améliorer le comportement en solution des dérivés contenant des groupes aromatiques en positions 3 et 6 du bicycle du PS-3114, il a été décidé d'installer l'aniline et l'indole dans les deux positions. Le premier essai a été fait dans les conditions d'amination de Buchwald-Hartwing, en utilisant le Pd(OAc)<sub>2</sub> comme catalyseur avec le BINAP comme ligand. Cependant, les dérivés contenant de l'aniline n'ont pu être obtenus qu'en utilisant le précatalyseur BrettPhos Pd de première génération (G1) (Schéma 3.9).



Schéma 3.9 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés YAR173 (composé **89**) et YAR191 (composé **90**) contenant l'aniline aux positions 6 et 3, respectivement, du système bicycle (Annexe E).

Dans le cas des analogues contenant l'indole, différentes tentatives ont été faites pour les obtenir en utilisant différentes sources de [Pd] et de Cu(I) pour la catalyse (Schéma 3.10). Cependant, aucune des conditions testées ne s'est avérée efficace pour le couplage des substrats d'intérêt, le composé **79** et l'indole ont été récupérés après le traitement des réactions.



Schéma 3.10 Tentatives faites pour synthétiser le dérivé **91** contenant l'indole en position 3 du système bicycle.

Ensuite, le pourcentage d'inhibition contre la hDNMT3Ac à 300 µM et sur le complexe DNMT3A/DNMT3L à 50 µM a été déterminé sur les composés **87** – **90**. Le premier test a été effectué par le groupe de notre collaboratrice à Paris, tandis que le second a été réalisé au SGC (de l'anglais *Structural Genomics Consortium*) à Toronto, par le groupe du Pr. Santha Santhakumar, en utilisant un test radioactif impliquant le <sup>3</sup>H-SAM (Annexe A). En outre, le comportement en solution des quatre nouveaux dérivés a été étudié (Tableau 3.5). Seuls les dérivés YAR173 (composé **89**) et YAR191 (composé **90**) ont montré un pourcentage modéré d'inhibition de l'enzyme. Cependant, puisque le premier semble former d'agrégats (ou avoir une faible solubilité), il n'a pas été soumis à une analyse plus approfondie. Les dérivés de la propylamide, YAR203 (composé **87**) et YAR209 (composé **88**), quant à eux, ont montré une perte d'activité lors du remplacement de l'ester éthylique et ont donc également été écartés à ce stade.

Tableau 3.5 Pourcentage d'inhibition des dérivés modifiés par la propylamine et l'aniline testés à Paris<sup>[a]</sup> à 300  $\mu$ M (>50% - 25%, <25%) sur la hDNMT3Ac, ainsi qu'au SGC<sup>[b]</sup> à 50  $\mu$ M (>25%, 25% - 10%, <10%)

N° (ou nom) de composé	Structure	% d'inhibition @ 300 μM <sup>[a]</sup>	% d'inhibition @ 50 μM <sup>[b]</sup>	ERETIC @ 500 µM de C <sub>nominale</sub>	Agrégation
<b>87</b> (YAR203)		15	3	104 μM	Oui
<b>88</b> (YAR209)		4	21	642 μM	Non
<b>89</b> (YAR173)		37	35	12 μM	Oui
<b>90</b> (YAR191)		56	26	331 μM	Non

contre le complexe DNMT3A/DNMT3L. Les valeurs ERETIC déterminées à 500 μM (245 μM, 245 – 110 μM, <110 μM) et les observations trouvées sont également rapportées.</p>

Ensuite, seules les expériences de détection de liaison de la molécule YAR191 (composé **90**) avec la hDNMT3Ac ont été réalisées. Les scores du YAR191, présentés dans le Tableau 3.4, avec les autres composés analysés précédemment, ont montré que ce composé est le deuxième dérivé de la série à se lier le plus fortement à l'enzyme. Dans les spectres enregistrés par les trois expériences (DLBS, T2- CPMG et STD), des effets très forts ont été observés, mettant en évidence la forte interaction formée entre le ligand et la hDNMT3Ac (Figure 3.16).



Figure 3.16 Région 5.5 - 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction de la molécule YAR191 (composé **90**) avec la hDNMT3Ac.

Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

En résumé, les seuls dérivés qui, jusqu'à ce moment-là, avaient été obtenus et qui étaient capables de maintenir à la fois l'activité modérée et le bon comportement en solution (à 300 µM) du PS-3114 sont LM-III-152, LM-III-134 et YAR191 (composé **90**). De plus, les deux derniers ont montré des signes de forte liaison avec la hDNMT3Ac. Pour ces raisons, deux nouvelles stratégies ont été développées dans l'espoir d'améliorer l'activité inhibitrice du PS-3114. D'une part, sur la base des résultats obtenus pour le LM-III-152, il a été décidé d'explorer la position 6 de ce dérivé en installant des substituants avec des fonctions alkyle et aryle, afin de déterminer s'il y a présence d'une SAR dans cette partie de la molécule. D'autre part, les molécules LM-III-134 et YAR191 (composé **90**) s'étant révélées capables de maintenir l'activité modérée du PS-3114 et de former une liaison forte avec l'enzyme, il a été décidé de poursuivre l'exploration de la position 3 du système bicyclique. Inspiré par LM-III-134, différents substituants sur la fonction styryle ont été étudiés. Par ailleurs, guidée par la structure de YAR191 (composé **90**), l'installation d'autres groupes fonctionnels aromatiques avec des hétéroatomes a été explorée.

La synthèse des analogues du LM-III-152 a dû être réalisée en utilisant plusieurs voies. Les deux premières molécules synthétisées ont été obtenues par la réaction de condensation entre le bromopyruvate d'éthyle et les aminopyridines correspondantes (Schéma 3.11). Dans le cas du dérivé contenant le substituant isopropyle (composé **95**), deux étapes précédentes ont été nécessaires pour installer cette fonction sur l'intermédiaire **94**, soit un couplage de Suzuki sur la 2-amino-5-bromopyridine avec le 4,4,5,5-tétraméthyl-2-(prop-1-ène-2-yl)-1,3,2-dioxaborolane suivi d'une réaction d'hydrogénation de l'oléfine. Une condensation classique de l'amino pyridine **94** avec le bromopyruvate a donné le composé souhaité **95**.



Schéma 3.11 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés alkyles 92 et 95 (Annexe E).

Par la suite, plusieurs tentatives ont été faites pour obtenir les dérivés avec les fonctions pentyle et hexyle (Schéma 3.12). Tout d'abord, la fonction alcyne correspondante a été couplée à l'halogénure de départ issu de la réaction de Sonogashira, puis réduite à l'alcane souhaité par hydrogénation catalytique. La première condition de réaction réalisée a donné le dérivé alcyne **97**, mais pas le **96**. Heureusement, un changement de catalyseur a résolu le problème. L'hydrogénation de **97** catalysée par 10% Pd/C a également fonctionné sans problème, cependant, la réduction du dérivé **96** a été un défi.



Schéma 3.12 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés alkylés 98 et 100 (Annexe E).

Lors des deux premières tentatives, à température ambiante et légèrement chauffée à 30°C, seul un mélange du composé de départ et de l'alcène correspondant a été récupéré. Cependant, l'utilisation de Pd(OH)<sub>2</sub> comme catalyseur a permis à la réaction de se dérouler dans son intégralité, donnant le composé **100** souhaité.

La synthèse des dérivés avec des substituants propyle et butyle a été plus complexe, car les alcynes propyne et 1-butyne sont gazeux à température ambiante. Ainsi, une première tentative de synthèse a été faite à partir du propyne protégé par un silane. Celui-ci a été déprotégé en milieu basique dans un ballon indépendant et le gaz libéré a été insufflé dans le ballon de réaction contenant le reste des réactifs de la réaction de Sonogashira selon le système illustré à la Figure 3.17.



Figure 3.17 Représentation du système utilisé pour obtenir le composé **101**.

Malheureusement, la réaction n'a pas abouti. Une deuxième tentative a été faite à partir de la réaction de Suzuki en utilisant le trifluoroborate de potassium correspondant (Schéma 3.13). Bien que l'intermédiaire **102** ait été obtenu sans problème, l'hydrogénation catalytique a conduit à une réduction supplémentaire de la double liaison conjuguée sur le côté droit du bicycle. Une dernière tentative a été faite dans les conditions de Knochel, qui a rapporté la formation d'organozincs via la transmétallation du Grignard correspondant.(Feng *et al.*, 2016; Piller *et al.*, 2009) Cependant, après avoir tenté de titrer la solution avec une solution d'iode dans du THF (anh.), il a été constaté que l'organométallique n'avait pas été formé sur le substrat utilisé.



Schéma 3.13 Tentatives faites pour synthétiser des dérivés contenant des substituants propyle et butyle à partir des réactions de Suzuki et de Knöchel.

Enfin, deux dérivés avec des groupements aromatiques ont été obtenus à partir de l'utilisation des boranes correspondants dans les conditions de la réaction de Suzuki (Schéma 3.14). Dans le cas du composé **105**, un changement de catalyseur et des conditions de réaction ont été nécessaires pour l'obtenir, tandis que pour le composé **107**, une étape supplémentaire d'hydrogénation catalytique a été réalisée.



Schéma 3.14 Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés **105** et **107** avec des groupements aromatiques (Annexe E).

Une fois que les composés modifiés en position 6 du système bicyclique ont été obtenus, la position 3 a été transformée. Le premier composé synthétisé a été le dérivé phénéthylique du LM-III-134 (Schéma 3.15), afin de déterminer l'influence de la double liaison sur l'activité et la liaison du composé à la protéine. Le composé visé n'a pu être obtenu précédemment par Maxime Leroy, l'hydrogénation ayant mené au composé LM-III-154 où le cycle de droite est saturé (Figure 3.7). Le couplage par la réaction de Suzuki s'est bien déroulé, mais comme pour son homologue, le composé **85**, la purification après l'étape d'hydrogénation catalytique de l'intermédiaire **108** a été ardue à cause de la formation du produit collatéral **110** (composé nommé LM-III-154 par Maxime Leroy).



Schéma 3.15 Conditions utilisées pour la synthèse du dérivé phénéthylique 109 (Annexe E).

Pour conclure cette série, des analogues contenant la fonction styryle avec des groupes électrodonneurs (composés **111** et **112**) et accepteurs (composés **113** – **115**) ont été synthétisés dans le but de déterminer leur influence sur l'activité et la liaison à l'enzyme. En outre, dans les mêmes conditions (Schéma 3.16), différents analogues avec des groupements aromatiques contenant des hétéroatomes ont été obtenus (composés **116** – **119**). Dans le cas des dérivés **112**, **116** et **117**, une quantité insuffisante du produit pur a été obtenue. Leur séparation du composé de départ **42** a été laborieuse par colonne chromatographique,

parce qu'ils ont pratiquement la même valeur Rf (0.36, 0.35, 0.39 et 0.32, respectivement, dans hexanes : AcOEt / 2 : 8).



Schéma 3.16 Conditions utilisées pour la synthèse des analogues des composés LM-III-134 et YAR191 (composé **90**): composés **111 – 115** et composés **116 – 119**, respectivement (Annexe E).

Après avoir obtenu les molécules d'intérêt, un échantillon des composés a été envoyé à l'Institut Pasteur pour déterminer leur pouvoir inhibiteur sur la hDNMT3Ac. De plus, leur comportement en solution ainsi que leur pouvoir d'interaction avec l'enzyme, a été déterminé à 300 μM grâce à nos collaborateurs à l'INRS. Les résultats de ces derniers sont présentés ci-après.

N° de composé	Structure	ERETIC @ 300 µM de C <sub>nominale</sub>	Score DLBS	Score CPMG	Score STD	Agrégation
118		212 μM				Non
95		164 μM				Non

Tableau 3.6 Étude de criblage de liaison entre les composés sélectionnés et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300  $\mu$ M. ERETIC à 300  $\mu$ M : >150  $\mu$ M, 150 – 90  $\mu$ M, <90  $\mu$ M.

92		182 μM	Non
98		47 μM	Possible
105		94 µM	Possible
100		113 μM	Possible
115	P P F <sub>3</sub> C	39 µM	Possible
114		30 µM	Possible
113		34 μM	Possible
111		23 μΜ	Oui
119	O N N O N N N N N N	51 μΜ	Oui

Dans le Tableau 3.6, les composés sont organisés en fonction du score obtenu pour les consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD et ceux-ci sont mises en évidence dans une gamme de couleurs allant du vert au jaune, indiquant ainsi la diminution des valeurs de scores obtenus. Il convient de préciser que le vert indique un meilleur score que le jaune. La grande majorité des composés se sont avérés former des agrégats ou avoir une faible solubilité dans le tampon aqueux utilisé (Annexe B). En effet, le composé **105** et les dérivés à fonction styryle substituée (**115**, **114**, **113**, **111**) ne présentant pas de bon comportement

en solution, les essais sur les composés **107** et **109** n'ont pas été poursuivis. Seulement les composés **118**, **95** et **92** n'ont présenté aucun problème de solubilité. Bien que seule une interaction modérée à nulle avec la protéine ait été détectée pour les deux derniers, les effets observés par les trois méthodes pour le composé **118** suggèrent qu'une forte interaction entre celui-ci et la protéine est établie (Figure 3.18).



Figure 3.18 Région 5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction du composé **118** avec la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

Sur la base de ces résultats, on peut résumer que la substitution de la fonction styryle de la molécule LM-III-134 entraîne des problèmes de solubilité dans les dérivés **115**, **114**, **113** et **111**. Le même effet a été trouvé pour les composés **98** et **100** en augmentant la quantité de méthylènes dans LM-III-152. De plus, la substitution de son groupement éthyle par un méthyle (composé **92**) ou un isopropyle (composé **95**) n'a pas entraîné d'amélioration de l'interaction avec la protéine. Enfin, seul le remplacement de la fonction aniline du composé **90** (YAR191) par la 3-quinoléine (composé **118**) n'a pas affecté sa solubilité ou son interaction avec la hDNMT3Ac. Les résultats des tests biochimiques réalisés par notre collaboratrice à Paris sont encore attendus pour tirer des conclusions sur l'effet de ces dérivés du PS-3114 sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la cible.

Le Tableau 3.7 ci-dessous présente, à titre de résumé, tous les composés synthétisés au cours de ce chapitre avec les résultats respectifs obtenus.

Tableau 3.7 Pourcentage d'inhibition à 500  $\mu$ M (>70%, 70% – 45%, <45%) et à 300  $\mu$ M (>50%, 50% – 25%, <25%) des dérivés du PS-3114 contre la hDNMT3Ac, ainsi que les résultats de l'étude de criblage de liaison entre les composés sélectionnés et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300  $\mu$ M, avec les valeurs ERETIC déterminées à 500  $\mu$ M (>245  $\mu$ M, 245 – 110  $\mu$ M, <110  $\mu$ M) et à 300  $\mu$ M (>150  $\mu$ M, 150 – 90  $\mu$ M, <90  $\mu$ M). Abréviations : ID, identification des composés ; N.T., non testé ; N.A.; non applicable, e.a., en attente des résultats, <sup>[a]</sup>observation à 300  $\mu$ M.

ID	% d'inhib. @ 500 μM	ERETIC @ 500 μM	% d'inhib. @ 300 μM	ERETIC @ 300 μΜ	Score DLBS	Score CPMG	Score STD	Agrégation @ 500 μM <sup>[a]</sup>
46	N.T.	<b>22</b> μΜ	11	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
42	50	574 μM	12	335 μM				Non
48	8	227 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
49	6	5 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
50	11	1 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
51	N.T.	707 μM	12	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Non
52	7	116 μM	17	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
53	23	143 μM	10	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
47	-10	135 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
54	21	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
55	12	166 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
58	e.a	N.T.	e.a.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
59	e.a	N.T.	e.a	230 μM	N.T.	N.T.	N.T.	Non <sup>[a]</sup>
60	47	1150 μM	17	707 μM				Non
61	10	N.T.	5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
62	2	N.T.	0	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
63	e.a	N.T.	e.a	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
64	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
65	N.T.	909 μM	13	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Non
66	7	433 μM	2	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Non
67	8	<b>41</b> μM	7	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
68	12	N.T.	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
69	-122	N.T.	14	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
70	-26	N.T.	5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
71	17	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
	10	172 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
72	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
73	19	N.T.	6	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
	21	N.T.	5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
57	2	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.A.
75	19	N.I.		N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.A.
/6	9	N.I.	6	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.A.
82	9	664 μM	N.I.	344 μM	N 7	N 7		Non
83	8	15 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
84	12	113 μM	N.T.	90 μM				Possible

85	-6	242 μM	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Possible
87	N.T.	104 μM	15	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
88	N.T.	642 μM	4	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Non
89	N.T.	12 μM	37	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Oui
90	N.T.	331 μM	56	254 μM				Non <sup>[a]</sup>
92	e.a	N.T.	e.a	182 μM				Non <sup>[a]</sup>
95	e.a	N.T.	e.a	164 μM				Non <sup>[a]</sup>
100	e.a	N.T.	e.a	113 μM				Possible <sup>[a]</sup>
98	e.a	N.T.	e.a	47 μM				Possible
105	e.a	N.T.	e.a	94 μM				Possible
111	e.a	N.T.	e.a	23 μM				Oui
115	e.a	N.T.	e.a	39 μM				Possible
113	e.a	N.T.	e.a	34 μM				Possible
114	e.a	N.T.	e.a	30 μM				Possible
118	e.a	N.T.	e.a	212 μM				Non
119	e.a	N.T.	e.a	51 μM				Oui

## 3.5 Conclusion

Le PS-3114 a été découvert par une analyse FBLD par RMN-<sup>1</sup>H. Les expériences ont été réalisées par le groupe du Pr. Steven LaPlante sur la hDNMT3Ac. Ensuite, le test biochimique de fluorescence par la restriction des enzymes, réalisé par le groupe de la Pre. Paola Arimondo, a révélé que la molécule inhibe l'activité catalytique de l'enzyme de 76.8 % à 500  $\mu$ M et que le PS-3114 a une valeur moyenne d'IC<sub>50</sub> égale à 78.5 µM. Des résultats préliminaires, réalisés par Maxime Leroy, de modifications autour du système bicycle, ont révélé les molécules LM-III-152, LM-III-159 et LM-III-134 comme analogues ayant un pouvoir d'inhibition de l'activité enzymatique de la hDNMT3Ac similaire à celui obtenu pour le PS-3114. Cependant, des études ultérieures, réalisées au cours de cette thèse, sur le comportement en solution des trois dérivés, ont montré que le seul composé qui se comportait bien dans le tampon utilisé (Annexe B), à la concentration à laquelle les essais biochimiques ont été réalisés (500 μM), était le LM-III-152. Ceci suggère que le pourcentage d'inhibition obtenu pour le reste des dérivés a pu être influencé par des effets physicochimiques en solution. Sur la base des résultats préliminaires, de nouveaux dérivés du PS-3114 combinant les meilleures fonctions trouvées dans ces composés ont été conçus et synthétisés. En outre, de nouveaux analogues ont été synthétisés à partir de la substitution de la fonction éthyle ester ainsi que de son remplacement par une liaison amide. Les résultats des tests biochimiques ont montré que seul le remplacement par un amide secondaire pouvait être toléré. Conjointement, il a été observé que la double substitution aux positions 3 et 6 du PS-3114 conduit à une perte totale de l'activité inhibitrice. Cependant,

la fonction brome peut être retirée ou substituée par des groupements aromatiques, des anilines ou des indoles, ce qui est avantageux en chimie médicinale. Des études réalisées pour cribler la liaison de composés sélectionnés à la hDNMT3Ac, sur la base du consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD réalisées par le groupe du Pr Steven LaPlante, ont révélé que les composés LM-III-152 et YAR191, à 300 μM, se lient le plus fortement à la protéine. Sur la base de ces deux composés et de la molécule LM-III-152, de nouveaux dérivés ont été synthétisés. Bien que la force de l'interaction protéique n'ait pas été intensifiée, les résultats de l'essai biochimique sont encore attendus pour savoir si l'activité du PS-3114 a été augmentée par les derniers analogues synthétisés.

#### **CHAPITRE 4**

# EXPRESSION, PURIFICATION, ANALYSE ENZYMATIQUE ET DE LA STABILITÉ DANS LE TEMPS DE LA hDNMT3Ac

Au cours du présent travail, afin d'évaluer l'interaction des composés synthétisés avec la hDNMT3Ac utilisée dans les expériences par RMN-<sup>1</sup>H, celle-ci a été exprimée et purifiée à partir de cultures de cellules bactériennes en collaboration avec le Pr. Laurent Cappadocia à l'UQAM. Dans le but d'obtenir la quantité de protéine nécessaire pour réaliser les analyses par DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD, tout au long de cette thèse, des efforts ont été faits pour optimiser les étapes de production et de purification de la région contenant les résidus 612 – 912 du site catalytique de l'enzyme *Homo sapiens* (hDNMT3Ac) (36.7 kDa). L'activité catalytique de la protéine obtenue a été évaluée à partir du kit *EpiQuick DNMT Activity/Inhibition Colorimetric Assay Ultra*, acquis chez EpiGentek. Enfin, dans le groupe du Pr. Steven LaPlante, la stabilité de la protéine dans le temps a été déterminée par RMN-<sup>1</sup>H. Cette analyse est essentielle avant les études de détection de l'interaction avec les ligands. Chacune de ces étapes sera discutée dans les sections suivantes.

## 4.1 Expression, purification et activité enzymatique de la hDNMT3Ac

Le lot de protéine utilisé lors de la thèse de Maxime Leroy était daté de 2018. Puisque le stock de glycérol bactérien était encore stocké à - 80°C, les premiers lots de protéines obtenus au cours de cette thèse ont été exprimés à partir de l'ADN extrait du stock de glycérol de 2018 en utilisant une procédure Minipreps. Le vecteur utilisé pour exprimer la hDNMT3Ac a été le pET-28a, contenant une séquence His•Tag à l'extrémité *N*-terminale avec un gène résistant à la kanamycine.

Les étapes de transformation bactérienne ont été réalisées dans des cellules chimiocompétentes DH5α. Cette souche bactérienne, issue de l'ingénierie de cellules d'*Escherichia coli (E. coli)*, est connue pour maximiser l'efficacité de la transformation, raison pour laquelle elle est largement utilisée pour le clonage et le séquençage du génome. La manipulation des cellules avec des cations (tels que Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> et Rb<sup>1+</sup>) neutralise, dans une certaine mesure, les charges négatives de l'ADN et des LPS (Lipopolysaccharides). Ceux-ci constituent un pourcentage élevé de la membrane de la cellule externe bactérienne.(Panja *et al.*, 2008) Ainsi, tant la répulsion électrostatique entre l'ADN et la membrane que la perméabilité de la membrane sont réduites. De plus, ce fait combiné à un choc thermique (un cycle de chauffagerefroidissement) fragilise la membrane cellulaire, facilitant l'introduction du vecteur dans la bactérie et

94

donc l'efficacité de la transformation (Figure 4.1). Dans le cas qui nous occupe, après avoir transformé les bactéries et les colonies formées, une culture bactérienne a été réalisée, dont une aliquote a été prélevée pour être envoyée au service de séquençage, ce qui a permis de confirmer la séquence de l'ADNc (ADN complémentaire).



Figure 4.1 Processus d'insertion du vector dans les bactéries chimiocompétentes, favorisé par le Ca<sup>2+</sup> et les chocs thermiques, extrait de la publication de *Rehman et al.*(Asif *et al.*, 2017)

Une fois la séquence de l'ADNc confirmée, la protéine a été exprimée à partir de la culture de cellules *E. coli* transformées BL21-CodonPlus(DE3) et Rosetta-gami<sup>™</sup> 2(DE3)pLysS contenant un gène de résistance au chloramphénicol. La structure de la surface cellulaire des souches étant différente, l'efficacité de la transformation et de l'expression des protéines peut varier d'une souche à l'autre. Les conditions de la préculture, de la culture et de l'induction ont été guidées par le protocole développé par le groupe de la Pre. Paola Arimondo. De légères modifications ont été apportées sur la base des conditions établies dans le groupe du Pr. Laurent Cappadocia pour l'expression des protéines. Une des modifications a été l'ajout d'une solution de glucose (concentration finale 2%) au milieu de la préculture. L'utilisation de ce sucre

permet de diminuer le risque de mort des bactéries lorsqu'elles se développent et atteignent le plateau de la courbe de croissance. En outre, il a été rapporté précédemment que le glucose, dans certaines conditions, est la source de carbone préférée des bactéries *E. coli*. En effet, il a été constaté qu'en présence d'autres sucres, ce type de bactérie consomme en priorité le glucose du milieu, ce qui se traduit par une augmentation de leur taux de croissance. Une fois que son sucre préféré est épuisé, la bactérie ralentit son taux de croissance en consommant les autres sucres du milieu.(Magasanik, 1961) Ce phénomène est connu sous le nom de CCR (de l'anglais *Carbon Catabolic Repression*).

Une deuxième modification du protocole original a été effectuée après l'induction avec l'isopropyl-D-1thiogalactopyranoside (IPTG) et la centrifugation de la culture bactérienne. Une fraction du culot récupéré a été prélevée pour la lyse et le reste a été dissous dans une solution de sucrose (20%) contenant du Tris-HCI (50 mM à pH 8), congelé et stocké à -20°C pour une purification ultérieure. Afin de faciliter le processus de lyse des parois cellulaires bactériennes, du lysozyme a été ajoutée au tampon. Cette enzyme, qui endommage les cellules bactériennes, est largement utilisée pour améliorer l'efficacité du processus de sonication. Une fois les échantillons lysés et centrifugés , la protéine a été purifiée manuellement sur une colonne d'affinité Ni-NTA (de l'anglais *Nickel-Nitrilotriacetic Acid*) par gravité. Cette chromatographie d'affinité est basée sur la haute spécificité et l'affinité des résidus histidine, dans le His•Tag présent dans la protéine, pour les ions Ni<sup>2+</sup>, lesquels sont immobilisés sur la résine utilisée. Dans ce système de purification Ni-NTA, la chélation des ions Ni<sup>2+</sup> pour le NTA se fait via quatre sites (Figure 4.2), lesquels assurent une liaison forte entre les deux, empêchant la perte de métal pendant la purification.





Chacun des échantillons recueillis par la colonne Ni-NTA a été analysé par SDS-PAGE (de l'anglais *Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Figure 4.3). En général, les gels ont montré que la protéine était exprimée par les deux souches. Le seul inconvénient est qu'après la lyse (L), une grande partie de la protéine n'a pas pu être récupérée dans le surnageant (SN), ce qui suggère que la solubilité de la protéine est limitée et qu'une grande partie est perdue dans les corps d'inclusion cellulaire. Cependant, l'intensité des bandes observées sur le gel pour chacune des trois fractions recueillies dans chaque cas (F1 – F3) a suggéré que la production de la protéine était plus efficace à partir de l'expression dans les cellules CodonPlus. Ainsi, cette souche a été maintenue tout au long de l'étude.



Figure 4.3 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la colonne Ni-NTA de la hDNMT3Ac (36.7 kD) exprimée dans des cellules bactériennes **a)** Rosetta-gami et **b)** CodonPlus. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; C, culture ; I, induction ; L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées énumérées.

Dans le gel obtenu avec les échantillons de protéines exprimées dans la souche CodonPlus, de légères bandes ont été observées près (mais en dessous) de 75 kD, ce qui suggère la présence de chaperonne dans les échantillons. Compte tenu de son poids moléculaire, nous sommes probablement en présence de l'HSP70 (de l'anglais *Heat Shock Proteins 70 kilodalton*). Ce type de chaperonne est connu pour interagir avec les régions hydrophobes des protéines, pendant ou après la synthèse des protéines, qui sont partiellement repliées.(Mayer et Bukau, 2005) Sa fonction est de stabiliser et d'empêcher l'agrégation des protéines auxquelles il se lie. En fait, une fois que la protéine liée a atteint le repliment natif, la chaperonne

perd son affinité pour elle et l'interaction entre elles est terminée. Cette observation n'est pas surprenante, étant donné que la DNMT3A a été rapportée comme formant des homodimères et homotétramères en solution.(Holz-Schietinger *et al.*, 2011; Russler-Germain *et al.*, 2014) Afin d'éviter ce phénomène, lors de la seconde purification, il a été décidé d'ajouter du glycérol (10%) aux tampons de lyse et de chromatographie d'affinité. De plus, ce composé est couramment utilisé comme cryoprotecteur pour réduire les dommages qui peuvent être causés à la structure de la protéine par les cycles de gel-dégel auxquels elle peut être soumise.(Pegg, 2002) De plus, l'élution sur colonne Ni-NTA et par la chromatographie d'exclusion moléculaire (SEC, de l'anglais *Size-Exclusion Chromatography*) a été réalisée à 4°C, afin de réduire le risque de formation d'oligomères de la protéine à des températures plus élevées. En tenant compte de toutes les modifications mentionnées, le premier lot de protéines a été obtenu. Dès lors, la purification par chromatographie d'affinité a été réalisée de manière automatisée par FPLC (de l'anglais *Fast Protein Liquid Chromatography*) AKTA. Sur les huit fractions recueillies, les cinq contenant la plus grande quantité de protéines (en mg/ml) ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 4.4a).



Figure 4.4 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) a) par colonne Ni-NTA et b) par SEC

S-75. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; C, culture ; I, induction ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées.

L'injection dans la colonne SEC étant limitée à un volume de 5 ml, seules les fractions 4 – 6, qui étaient les plus concentrées, ont été injectées. La colonne pour la SEC utilisée était la S-75 (Superdex-75). Sur le gel SDS-PAGE (Figure 4.4b) a été constaté que dans les échantillons les plus concentrés (4 – 5), la protéine n'était pas séparée de l'impureté de poids moléculaire plus élevé, raison pour laquelle il a été décidé d'utiliser la colonne S-200 (Superdex-200) dans les purifications par SEC ultérieures. Comme l'expression de la hDNMT3Ac devait être utilisée pour des études de détection de l'interaction avec des ligands, la pureté de la protéine était cruciale. Pour les expériences de RMN-<sup>1</sup>H, la protéine doit être pure à au moins 85%, mais plus elle est pure, plus les données recueillies pendant les essais seront précises et fiables. En fait, l'idéal serait de pouvoir isoler uniquement le monomère, ou un oligomère spécifique, afin de s'assurer que les observations ci-dessus, le deuxième lot de la protéine a été exprimé et purifié. Bien qu'une quantité considérable de la protéine ait été récupérée sur la colonne Ni-NTA, il était évident qu'une quantité significative était piégée dans les corps d'inclusion lors de la lyse (Figure 4.5). Après purification par SEC, les fractions les plus pures ont été concentrées à 1 ml. Ce lot de protéine a été appelé **1** dont concentration calculée à partir des valeurs d'absorbance enregistrées était de 0.94 mg/ml.



M (kDa) I P L SN F.T. F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11

Figure 4.5 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) par colonne Ni-NTA. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; I, induction ; P, culot ; L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées.

L'une des limites des expériences biophysiques par RMN-<sup>1</sup>H est la quantité de protéine nécessaire aux essais. Afin de pouvoir analyser les composés mentionnés au chapitre 3, il a été nécessaire d'obtenir des lots supplémentaires de protéine. Dans une deuxième tentative d'expression, les conditions étaient les mêmes que précédemment. Dans la SDS-PAGE réalisée après l'élution sur la colonne du Ni-NTA (Figure 4.6a), il a été observé que la protéine avait élué dans toutes les fractions recueillies. Après purification par SEC, sur le gel les fractions les plus pures se sont révélées être 7 – 9 (Figure 4.6b), elles ont donc été concentrées à 400 µl. La concentration calculée à partir de la valeur d'absorbance à 280 nm était de 2.42 mg/ml. Ce lot de protéines, appelé **3**, a également été stocké à -80°C. Un volume de 1  $\mu$ l de ce lot et du lot 1 a été utilisé pour vérifier l'activité enzymatique à partir du kit colorimétrique acquis de la compagnie EpiGentek (Annexe A).







Figure 4.6 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la purification de la protéine (36.7 kD) a) par colonne Ni-NTA et b) par SEC S- 200. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; CX, cultures réalisées ; IX, inductions réalisées ; L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées.

Dans le kit de dosage colorimétrique EpiQuik, un mélange de la DNMT1 avec les DNMT3A et 3B, toutes de nature bactérienne, a été fourni comme contrôle. La détermination de l'activité enzymatique des lots **1** et **3** de la protéine à analyser a été effectuée selon les instructions du manuel d'utilisation. Le lot **3** a été préparé par dilution en série à différentes concentrations afin de déterminer comment la concentration de la protéine pouvait affecter son activité catalytique. Avant d'enregistrer les valeurs d'absorbance avec un lecteur de microplaques, différents changements colorimétriques ont été observés visuellement. Le premier a été observé lors de l'ajout de la solution de révélateur de couleur, où les échantillons de contrôle et les échantillons de la protéine analysée à 200 ng/ml (concentration maximale recommandée pour l'analyse) sont devenus bleus après quelques minutes de réaction (Figure 4.7a). Cette observation indique qu'il y avait suffisamment d'ADN méthylé dans les échantillons. Après l'ajout de la solution pour arrêter la réaction enzymatique, ces échantillons sont devenus instantanément jaunes, indiquant la fin de la réaction. Enfin, l'absorbance a été mesurée à 450 nm et à 655 nm. Cette dernière a été utilisée comme longueur d'onde de référence pour corriger les valeurs de fond non spécifiques (*e.g.* les empreintes digitales).



Figure 4.7 Résultats obtenus pour l'activité catalytique des lots **1** et **3** de la hDNMT3Ac à partir **a**) d'une analyse visuelle où une couleur bleue signifie que la réaction s'est produite et donc que la DNMT3A est catalytiquement active et **b**) d'un calcul basé sur les valeurs d'absorbance enregistrées. UA = unités arbitraires.

L'activité catalytique des échantillons de protéines (Figure 4.7b) a été calculée à partir de l'Équation 4.1. Bien que les valeurs obtenues pour les échantillons testés soient significativement inférieures à celles du témoin, cette différence n'est pas comparable, car il s'agit de protéines différentes. Comme mentionné cidessus, le kit contient un mélange de DNMT1, 3A et 3B alors que nos fractions ne contiennent que la DNMT3A. Néanmoins, l'activité de la hDNMT3Ac obtenue dans chaque lot a été confirmée visuellement. D'autre part, en comparant les valeurs d'activité pour les trois concentrations analysées du lot **3**, une forte dépendance de l'activité par rapport à la concentration en protéine a été observée. Compte tenu du fait que différents travaux ont rapporté une dépendance de l'activité catalytique de la DNMT3A à la formation de l'homotétramère,(Holz-Schietinger *et al.*, 2011; Russler-Germain *et al.*, 2014) il est donc possible qu'à des concentrations plus élevées, un équilibre s'établisse dans la solution monomère-oligomère, ce qui conduit à la détection d'une activité catalytique plus élevée lorsque la concentration des échantillons augmente. Enfin, une des preuves les plus importantes relevées après le test est que l'activité catalytique des protéines obtenues dans les lots **1** et **3** était la même, ce qui montre que l'activité de l'enzyme ne change pas d'un lot à l'autre.

Activité DNMT 
$$\left(\frac{UA}{mg * h}\right) = \frac{A(\acute{e}chantillon) - A(blanc)}{\text{quantité de protéine (µg) * temps d'incubation (h)}} * 1000$$

Équation 4.1 Formule utilisée pour le calcul de l'activité enzymatique de la protéine. Abréviations : A, absorbance ; UA, unités arbitraires.

Une fois que la hDNMT3Ac obtenue s'est avérée active, les efforts se sont poursuivis avec l'expression de nouveaux lots de protéine afin d'obtenir une quantité suffisante pour réaliser à la fois les tests de stabilité et les études de détermination de l'interaction avec le plus grand nombre possible de composés. La stratégie utilisée a consisté à exprimer la protéine dans un plus grand volume de culture. Après lyse et centrifugation, le volume total récupéré a été divisé en deux (lots **4** et **5**) qui ont été purifiés indépendamment. La pureté observée sur le gel après la purification par la SEC (Figure 4.8a et b, respectivement) n'était pas satisfaisante, dans les deux lots. Il semble que la concentration plus élevée de la protéine exprimée ait conduit à une plus grande agglomération de protéines et donc à une plus grande quantité de chaperonne présents dans le milieu, qui n'a pas pu être résolu par la SEC.



Figure 4.8 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) par SEC des lots **a**) **4** et **b**) **5**. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées énumérées.

Par la suite, un nouveau stock de glycérol a été préparé à partir du plasmide récemment envoyé par notre collaboratrice à Paris. À partir de là, un nouveau lot de protéine, appelé lot **6**, a été exprimé et purifié à partir de 4 l de culture. Après élution par SEC, trois fractions ont été collectées et concentrées à 700 µl. La concentration calculée à partir de la valeur d'absorbance enregistrée était de 1.4 mg/ml. Le regroupement de ce lot avec les lots **1** et **3** a permis d'obtenir une quantité suffisante de protéines pour réaliser l'analyse de stabilité dans le temps ainsi que l'étude de détection de l'interaction aux 9 composés présentés précédemment dans le Tableau 3.4. Afin de compléter l'étude avec les composés restants, il était nécessaire de poursuivre le travail pour obtenir plus de protéines. Dans le but d'améliorer les résultats de la lyse, il a été décidé d'ajouter du mannitol au tampon de la sonication.(Leibly *et al.*, 2012) Ainsi, un nouveau lot de la hDNMT3Ac a été exprimé dans 8 l de culture, lesquels ont été divisés en deux fractions de 4 l après l'étape d'induction. Pour les différencier, ils ont été appelés respectivement lots **7** et **8**. Le premier a été traité dans les mêmes conditions que précédemment, tandis que le second a été traité au mannitol au stade de la lyse. La Figure 4.9 montre les gels réalisés après les étapes de purification.





Figure 4.9 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies lors de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) par colonne Ni-NTA et par SEC à partir **a)** d'échantillons lysés sans et **b)** avec du mannitol. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées.

En comparant l'intensité de la bande correspondant à la protéine dans le lysat (L) et dans le surnageant récupéré (SN), il a été constaté que le rapport entre eux est plus similaire lorsque le mannitol est utilisé pendant la sonication (Figure 4.9b) qu'en l'absence de ce sucre (Figure 4.9a). Ces résultats suggèrent que l'utilisation du mannitol favorise la solubilisation des protéines pendant la lyse. Malgré cela, la quantité de protéines récupérées après la purification par la SEC était encore très faible. Une observation qui avait attiré notre attention après les purifications par colonne Ni-NTA était que dans le F.T. après la première élution (F.T.I) y avait une quantité remarquable de protéine. Par conséquent, le F.T. de la deuxième élution (F.T.II), une quantité significative de protéine restait. Sur la base de ces observations, il a été décidé d'effectuer des élutions multiples à partir des F.T. récupérés, dans le but d'avoir le plus de protéine possible. De plus, étant donné que sur le gel il a été constaté que la protéine élue dans pratiquement toutes les fractions récupérées après la colonne du Ni-NTA, et que la plupart de ces fractions n'ont pas pu

être injectées dans la colonne de la SEC en raison de la limite d'injection de 5 ml, il a été décidé de réaliser un deuxième essai. L'approche consistait à mélanger toutes les fractions éluées de la colonne d'affinité et à précipiter la protéine avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Comme les fractions après la colonne du Ni-NTA ont été récupérées avec un haut degré de pureté, le pourcentage de sel ajouté était de 60% pour assurer la précipitation totale des protéines. Enfin, afin d'éluer la protéine dans le plus petit volume possible au cours de la colonne du Ni-NTA, un tampon d'élution contenant de l'EDTA (100 mM) a été utilisé.

Pour tester les modifications ci-dessus, un nouveau lot de protéines a été préparé. Pendant la lyse, l'utilisation du mannitol a été maintenue. Une première élution a été effectuée sur la colonne du Ni-NTA (Figure 4.10a) et le F.T. récupéré (F.T. I) a été réinjecté. Les fractions éluées de la deuxième injection (Figure 4.10b) ont été mélangées et précipitées avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Enfin, une troisième élution, cette fois avec de l'EDTA, a été effectuée à partir de l'injection de F.T.II (Figure 4.10c). Comme on peut le voir sur la Figure 4.10, l'élution multiple a permis de récupérer une quantité importante de protéine à partir des F.T. respectifs, c'est pourquoi cette variante a été incorporée dans les purifications ultérieures. Cependant, l'élution à l'EDTA n'a pas donné le résultat escompté. Non seulement la protéine a continué à éluer dans un nombre considérable de fractions, mais un nombre plus élevé d'impuretés a été incorporé, de sorte que cette modification a été écartée des futurs essais.



Figure 4.10 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des élutions multiples par colonne Ni-NTA à partir de l'injection **a)** du lysat (première élution), **b)** du F.T.I

(deuxième élution) et **c)** du F.T.II (troisième élution). Abréviations : M, marqueur moléculaire ; L, lysat ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées.

La Figure 4.11a montre que la précipitation avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, des fractions éluées de la deuxième injection (Figure 4.10b), a bien fonctionné. Dans le surnageant du précipité (SN), seule une légère bande qui correspondait à la protéine a été observée. Pratiquement toute la protéine a été précipitée et ensuite récupérée (P.r.) dans le tampon de la colonne de la SEC. L'échantillon a ensuite été rapidement centrifugé et le surnageant récupéré (SN.r) a été injecté dans l'équipement de la SEC.



**c)** F11 F12 F13 F14 F15 F16 F17 F18 F19 F20 F21 F22 F23 F25 M(kDa)



Figure 4.11 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad) **a)** des échantillons analysés après précipitation de la hDNMT3Ac avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et les F.T. récupérés après les trois injections par colonne Ni-NTA, ainsi que les fractions récupérées après purification par SEC : **b**) de la protéine précipitée et **c**) des fractions 11 – 13 éluées de la colonne Ni-NTA lors de la première injection. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; SN, surnageant du précipité ; P.r., protéine récupérée après précipitation ; S.N.r., surnageant récupéré et injecté dans la colonne SEC ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées et numérotées.

La Figure 4.11b montre que la protéine a été éluée dans au moins cinq fractions et à la pureté souhaitée. Les fractions 11 - 17 ont été concentrées à 200 µl et la concentration calculée, pour ce neuvième lot, était de 0.48 mg/ml. Dans le gel de la Figure 4.11a, des échantillons des trois F.T. récupérés ont été inclus, montrant que même après la troisième élution, une quantité considérable de protéine restait dans la F.T.III. Enfin, les fractions 11 - 13, éluées après la première injection de la protéine lysée sur la colonne du Ni-NTA (Figure 4.10a), ont été injectées dans l'équipement de la SEC pour purification (Figure 4.11c). Comme pour les résultats obtenus lors de la purification par la SEC de la protéine précipitée (Figure 4.11b), au moins 7 fractions présentant le niveau de pureté souhaité ont été observées sur le gel. Ainsi, les fractions 11 - 17 ont constitué le lot **10**. Après concentration à 850 µl, la concentration calculée était de 0.52 mg/ml.

Sur la base des observations et des résultats ci-dessus, les variantes nouvellement établies ont été mises en œuvre. Un nouveau lot de 3 l de la hDNMT3Ac a été exprimé. Après lyse avec du mannitol, une première élution a été effectuée à travers la colonne Ni-NTA (Figure 4.12a). Les fractions éluées ont été divisées en deux groupes : 10 - 13 ont été injectées dans l'équipement de la SEC, tandis que 14 - 26 ont été mélangées et précipitées avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ainsi, les fractions 10 - 13 ont été purifiées par la SEC. Sur le SDS-PAGE, il a été observé que les fractions éluées les plus pures étaient les fractions 12 - 16 (Figure 4.12b). Celles-ci ont été regroupées et concentrées à  $300 \mu$ l, avec une concentration calculée de 0.67 mg/ml. Celle-ci a été identifiée comme le lot **11**.



**b)** M(kDa) F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16



Figure 4.12 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies à partir de la première élution de la purification de la hDNMT3Ac (36.7 kD) par **a**)

colonne Ni-NTA et **b)** SEC S-200. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; SN, surnageant ; F.T., de l'anglais *Flow Through* ; FX, fractions collectées numérotées.

Dans l'intervalle, une double élution supplémentaire des F.T. récupérés lors de purifications consécutives par chromatographie d'affinité a été réalisée. Les fractions présentant la plus grande pureté dans chaque cas (Figure 4.13a, fractions 5 – 12 et Figure 4.13b, fractions 5 – 11, respectivement) ont été mélangées et regroupées avec les fractions 10 - 15 obtenues par la première élution (Figure 4.12a). Ensuite, du  $(NH_4)_2SO_4$  a été ajouté au volume total de la solution pour précipiter la protéine, qui a ensuite été redissoute dans le tampon de la SEC et purifiée. Le gel présenté à la Figure 4.13c montre que la précipitation s'est produite comme prévu. Dans le surnageant du précipité, il n'y avait pas de traces de la protéine, et celle-ci a été bien redissoute et injectée (SN.r.), après centrifugation, sur la colonne de d'exclusion moléculaire. Les fractions 9 – 18 présentaient le plus haut niveau de pureté sur le gel, elles ont donc été concentrées à 350  $\mu$ l. Cet échantillon, pour lequel une concentration de 0.47 mg/ml a été calculée, a été appelé lot **12**.





c) SN SN.r. M(kDa) F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F15 F18



Figure 4.13 SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane), observés via un ChemiDoc (BioRad), des fractions recueillies à partir **a**) de la deuxième et **b**) de la troisième élution de la purification de la

hDNMT3Ac (36.7 kD) par colonne Ni-NTA, ainsi que **c)** des fractions éluées après SEC S-200 de la protéine précipitée. Abréviations : M, marqueur moléculaire ; SN, surnageant du précipité ; S.N.r., surnageant récupéré et injecté dans la colonne SEC ; FX, fractions collectées numérotées.

Grâce à la combinaison des stratégies utilisées, il a été possible d'obtenir la quantité de protéine nécessaire pour la suite des études visant à déterminer la liaison des ligands restants : à la fois ceux présentés dans le Tableau 3.6, et ceux qui seront présentés dans les chapitres 5 et 6.

# 4.2 Analyse de la stabilité dans le temps de la hDNMT3Ac

Comme mentionné dans la section précédente, afin de réaliser les études sur la détermination de la liaison entre la protéine et les composés d'intérêt, il est nécessaire que la hDNMT3Ac exprimée soit stable dans le temps. Rappelons de la section 3.1 que l'analyse est basée sur la comparaison des effets observés entre les spectres des ligands libres et ceux du complexe avec la protéine. Pour cette raison, il est nécessaire de s'assurer que les changements reflétés dans les spectres sont dus à la liaison formée, et non à la nonstabilité de la protéine dans le temps.

Afin d'analyser le comportement en solution de la hDNMT3Ac obtenue au cours de cette thèse, le groupe du Pr. Steven LaPlante a analysé ses spectres RMN-<sup>1</sup>H au cours du temps (Figure 4.14). L'expérience s'est déroulée sur 3 jours. Le premier jour, trois spectres ont été enregistrés toutes les 4 heures. Les suivantes ont eu lieu à 11 puis à 24 heures après le lancement de l'expérience. Les deux derniers spectres ont été enregistrés à 24 heures d'intervalle. En général, le déplacement et la largeur des pics n'ont pas changé d'un spectre à l'autre, ce qui suggère que la protéine est dans une certaine mesure stable en solution, c'est-à-dire qu'elle ne se dénature pas avec le temps. Cependant, une augmentation de l'intensité du signal des spectres a été observée lorsque le temps de la protéine en solution augmente. Cela suggère qu'il existe un équilibre, impliquant des oligomères, établis en solution.



Figure 4.14 Spectres de RMN-<sup>1</sup>H de la hDNMT3Ac enregistrés pendant la période de 4 jours.

L'inconvénient de la formation d'oligomères de la hDNMT3Ac en solution est que, lors des études de détection de la liaison du ligand par des expériences de RMN-<sup>1</sup>H, il n'est pas possible de savoir avec certitude avec quelle espèce l'interaction est formée. Cependant, les résultats du consensus des trois expériences de RMN-<sup>1</sup>H (DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD) constituent un outil important pour guider les efforts visant à inhiber l'activité catalytique de la hDNMT3Ac avec des inhibiteurs qui interagissent également directement avec la protéine. Compte tenu des travaux rapportés démontrant l'importance de la formation de l'espèce homotétramère pour l'activité enzymatique de la DNMT3A,(Holz-Schietinger *et al.,* 2011; Russler-Germain *et al.,* 2014) une ligne de recherche qui pourrait être poursuivie serait de cibler le tétramère plutôt que le monomère.

### 4.3 Conclusion

Dans ce chapitre, la hDNMT3Ac a été exprimée et purifiée en collaboration avec le Pr. Laurent Cappadocia. La procédure était basée sur le protocole établi par le groupe de la Pre. Paola Arimondo. Cependant, différentes modifications ont été apportées afin d'augmenter le rendement et la pureté des lots de protéines obtenus. Après plusieurs essais et tentatives, les démarches de la lyse et de la purification ont été optimisées. L'utilisation du mannitol a permis d'améliorer considérablement les résultats de la sonication, tandis que l'élution multiple par chromatographie d'affinité a contribué à la récupération d'une quantité significative de protéine à partir des F.T. Enfin, la précipitation avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis la redissolussion de la protéine avec le tampon de la SEC, ont permis d'injecter une plus grande quantité de protéine dans l'appareil. L'activité catalytique de la hDNMT3Ac exprimée a été confirmée par un test colorimétrique, lequel a révélé que l'activité enzymatique varie avec la concentration de la solution. Enfin, l'analyse par RMN-<sup>1</sup>H a montré que la protéine a tendance à s'agglomérer en solution avec le temps, mais elle ne se dégrade pas.

## **CHAPITRE 5**

# SYNTHÈSE, ÉVALUATION BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE ET COMPORTEMENT EN SOLUTION DE DÉRIVÉS PHTALIMIDES INHIBITEURS DE LA DNMT3A

Récemment, Luo *et al.* ont rapporté la découverte de trois nouveaux dérivés de la phtalimide en tant qu'inhibiteurs de la DNMT3A.(Shao *et al.*, 2017) Dans cette publication, les auteurs ont uniquement décrit la procédure de découverte des composés et les tests biologiques réalisés. Les molécules testées ayant été achetées auprès d'une source commerciale, le projet de thèse discuté dans ce chapitre vise à rapporter la synthèse des cinq meilleurs inhibiteurs découverts. En outre, la confirmation de l'activité enzymatique par le test développé par le groupe de la Pre. Paola Arimondo, ainsi que l'analyse biophysique et le comportement en solution des composés par les expériences de RMN-<sup>1</sup>H mises en place par le groupe du Pr. Steven Laplante, ont présenté un intérêt au cours de ce travail. Les résultats obtenus pendant ce projet seront discutés ci-dessous.

### 5.1 Inhibiteurs de la DNMT3A de la série des phtalimides : découverte et travaux préliminaires

Avant d'entrer dans le détail des résultats obtenus lors des travaux sur la série des phtalimides, une brève introduction sur le processus par lequel ils ont été découverts sera donnée et les résultats de l'activité biologique déterminée seront résumés.

En 2017, Luo *et al.* ont réalisé une analyse de criblage virtuel dans laquelle ils ont combiné la cartographie des pharmacophores avec des études d'amarrage moléculaire (Figure 5.1). Les pharmacophores ont été générés à partir des informations fournies par la structure cristalline du complexe formé entre le SAH et la DNMT3A (PDBs 4U7P et 4U7T). Environ 200 000 composés commercialement disponibles dans la base de données SPECS ont été analysés. Après application d'une série de filtres, 77 205 structures ont été sélectionnées pour une analyse plus approfondie par amarrage moléculaire. Les auteurs ont donc procédé à un criblage virtuel, dont l'amarrage au niveau du site SAH de l'enzyme a été réalisé à l'aide des programmes Glide 5.5 et DOCK 6.7. Ensuite, les 2 000 molécules les mieux classées ont été soumises à une analyse en grappes, qui a abouti à la sélection de 107 composés qui ont été achetés pour la confirmation de leur activité inhibitrice.



Figure 5.1 Représentation de la procédure de criblage virtuel réalisée par Luo *et al.* pour la découverte d'inhibiteurs de la DNMT3A. Figure extraite de la publication des auteurs.(Shao *et al.*, 2017)

Les auteurs ont déterminé le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique du complexe DNMT3A/DNMT3L à partir d'un test basé sur une méthode radioactive utilisant le SAM tritié. Parmi les 107 composés testés, il a été démontré que le composé dit 40 (Figure 5.2, composé **120**) inhibe, à 100  $\mu$ M, pratiquement 100% de l'activité du complexe enzymatique. De plus, ils ont obtenu la courbe d'inhibition à partir de laquelle ils ont pu déterminer que la valeur IC<sub>50</sub> de ce composé est de 46.5  $\mu$ M. Encouragés par ces résultats, une recherche d'analogues du composé 40 basée sur la similarité a été effectuée. Celle-ci a permis d'identifier 15 composés très similaires à la molécule 40. Après avoir été achetés et évalués à partir du test enzymatique, les composés 40\_3 (Figure 5.2, composé **121**) et 40\_8 (Figure 5.2, composé **122**) ont montré les pourcentages d'inhibition les plus élevés à 100  $\mu$ M (67% et 92%, respectivement). En outre, les valeurs IC<sub>50</sub> obtenues (41  $\mu$ M et 64  $\mu$ M) se situent dans la même fourchette que celle déterminée pour la molécule 40, bien que celle du composé 40\_8 se soit révélée légèrement plus basse.



Figure 5.2 Structure et valeurs d'inhibition des composés de la série des phtalimides rapportés comme inhibiteurs du complexe DNMT3A/DNMT3L.

Enfin, les auteurs se sont intéressés à la détermination de l'activité cellulaire des composés 40 et 40\_3. Les lignées cellulaires testées étaient des cellules cancéreuses de l'AML : Kasumi-1, KG-1, MV4-11 et THP-1. L'intérêt pour ce type de cellules est dû au fait que plusieurs études ont rapporté que la DNMT3A est mutée dans différentes maladies hématologiques (telles que l'AML et la MDS).(Hamidi *et al.*, 2015; Norvil *et al.*, 2019) Il a même été constaté que de telles aberrations affectent l'expression de gènes impliqués dans la pathogenèse de ce type de cancer. À titre d'illustration, la Figure 5.3 montre que les aberrations de la DNMT3A sont plus fréquemment trouvées dans l'AML que dans d'autres maladies oncologiques.(Khrabrova *et al.*, 2021)



Figure 5.3 Diagramme montrant la fréquence à laquelle certaines aberrations de la DNMT3A, différenciées par leur couleur, sont trouvées dans différentes maladies oncologiques. Extrait de la publication de Gromova *et al.* (Khrabrova *et al.*, 2021)

Après avoir testé l'activité cellulaire des deux inhibiteurs, les auteurs ont constaté que les deux composés présentaient des valeurs d'inhibition similaires sur presque toutes les lignées cellulaires (Figure 5.4). Puisque les valeurs d'inhibition ont été trouvées à des concentrations supérieures à 50 μM, il aurait donc été important de déterminer si de telles concentrations ne sont pas cytotoxiques pour les cellules saines.


Figure 5.4 Activité cellulaire obtenue pour les composés 40 et 40\_3 sur les lignées cellulaires cancéreuses Kasumi-1, MV4-11, THP-1 et KG-1, à différentes concentrations. L'essai sur les premières lignées cellulaires a été réalisé sur 48 h, tandis que pour la dernière, il a été réalisé sur 72 h. Figure extraite de la publication de *Luo et al.* (Shao *et al.*, 2017)

Intéressés par tous ces résultats, nous avons décidé de réaliser la synthèse des composés rapportés comme inhibiteurs et de confirmer le pouvoir inhibiteur de ces composés sur la DNMT3A à partir du test développé par notre collaboratrice à l'Institut Pasteur à Paris. En outre, pour fournir de nouvelles informations sur le comportement de ces composés, il a été décidé d'étudier leur comportement en solution et de voir s'ils sont capables de se lier à l'enzyme. Ces déterminations ont été rendues possibles grâce à la collaboration avec le Pr. Steven LaPlante. Les étapes de la synthèse et les résultats des analyses seront discutés dans les sections suivantes.

## 5.2 Synthèse des dérivés de phtalimides rapportés comme étant des inhibiteurs de la DNMT3A

La structure des composés 40, 40\_3 et 40\_8 peut être représentée sous une forme générale comme le montre la Figure 5.5a. Par conséquent, pour l'analyse rétrosynthétique, le noyau commun des molécules peut être séparé en trois parties. Ainsi, à partir de réactions de type addition-élimination, les phtalimides souhaitées peuvent être obtenues par la réaction entre l'amine correspondante et le dérivé de l'anhydride phtalique, obtenu dans une étape précédente par la formation de la liaison amide entre l'aniline

appropriée et l'anhydride phtalique substitué avec une fonction acide carboxylique en position 4, qui devrait être activée *in situ* pour que la réaction de couplage ait lieu (Figure 5.5b).



Figure 5.5 Représentation de la structure générale des dérivés de la phtalimide et analyse rétrosynthétique. Abréviation : G.A., groupe activateur.

Comme on a pu le voir sur la Figure 5.2, les composés 40 et 40\_3 ont un centre stéréogénique. Cependant, dans la publication de Luo *et al.* il n'était pas précisé si l'activité inhibitrice était déterminée sur l'un des deux énantiomères ou sur le mélange racémique de ceux-ci. C'est pourquoi, au cours de ce travail, il a été proposé de synthétiser les deux énantiomères de chaque composé, de sorte qu'au final, cinq composés finaux ont été obtenus.

Dans une première tentative, lors de la première étape de réaction, la formation de la liaison amide a été réalisée (Schéma 5.1). La fonction acide carboxylique, sur les anilines correspondantes, a été protégée sous la forme d'un ester méthylique. Dans le cas de l'anhydride phtalique, il a été décidé d'utiliser le dérivé de l'anhydride 4-chloroformylphtalique car la réaction directe avec le chlorure d'acyle éviterait l'utilisation d'agents de couplage. En outre, la liaison amide serait formée par cette partie de la molécule et non par l'ouverture de l'anhydride cyclique également présent dans le composé de départ. Bien que, dans les conditions utilisées, les composés **123** et **125** aient été obtenus à environ 30%, l'intermédiaire **124** a été obtenu quantitativement.



Schéma 5.1 Conditions utilisées pour la synthèse des intermédiaires **123** – **125** par formation d'une liaison amide.

Une fois la première étape de la séquence réactionnelle achevée, la synthèse des phtalamides s'est poursuivie. Une première tentative a été faite dans le toluène, auquel il a fallu ajouter un peu de DMF pour homogénéiser le mélange réactionnel. Le système a été chauffé à 130°C, o.n. (de l'anglais *overnight*) et, après traitement de la réaction, il a été constaté que seule l'aniline disubstituée **127** a été récupérée, suggérant qu'une réaction de trans-amidation a eu lieu (Schéma 5.2a). Cette observation pourrait être expliquée par la combinaison de l'effet inductif du brome avec l'effet -M de l'ester méthylique sur le cycle du composé **127**. Par conséquent, cette aniline s'avère moins basique et constitue donc un bon groupe partant dans la substitution nucléophile d'acyle détectée. Le même résultat a été observé en effectuant la réaction avec le DBU à 60°C, sans solvant (Schéma 5.2b). Pour confirmer si la formation des phtalamides est possible dans ces conditions, la réaction a été testée en utilisant l'anhydride phtalique comme composé de départ, donnant le produit désiré de manière quantitative (Schéma 5.2c).



Schéma 5.2 Premières tentatives de synthèse des phtalamides.

Une fois qu'il a été confirmé que la fonction phtalamide pouvait être obtenue, la réaction a été suivie par CCM. La réaction a été réalisée à  $120^{\circ}$ C et après 3 h, deux bandes avec des valeurs Rf très proches (0.33 et 0.25 dans hexanes : AcOEt / 8 : 2) ont été observées. La première bande est apparue après 1 h (celle avec Rf = 0.25) ; celle-ci correspondrait à la formation du composé **126**. Cependant, après 3 h, l'apparition de l'autre bande était clairement perçue, indiquant la formation du composé collatéral **127**. Ainsi, 3 heures après le début de la réaction et après purification sur colonne, il a été possible d'obtenir la molécule désirée **126** avec 25% (Schéma 5.3). Dans les mêmes conditions, il a été possible d'obtenir le reste des phtalamides (Schéma 5.3, composés **129 – 132**).



Schéma 5.3 Conditions utilisées pour la synthèse des phtalimides 126, 129 – 132.

À ce stade, il restait à saponifier les groupements esters méthyliques des phtalamides **126**, **129** – **132**. Une première tentative a été faite sur le composé **126**, mais malheureusement, dans les conditions utilisées, la phtalamide s'est ouvert (Schéma 5.4).



Schéma 5.4 Tentative de saponification de la phtalamide **126**.

Comme les conditions basiques nécessaires à la saponification des phtalamides synthétisés, affectent cette fonction, il a été décidé de réaliser les synthèses à partir des acides carboxyliques correspondants. Connaissant les risques de la formation possible de produits collatéraux, une première tentative de synthèse a été faite en utilisant les mêmes conditions qui ont permis d'obtenir les intermédiaires **123** – **125**, avec la différence que le temps de réaction a été réduit à 3 h (Schéma 5.5).



Schéma 5.5 Conditions utilisées pour la synthèse des intermédiaires **134 – 136** par formation d'une liaison amide (Annexe F).

La seule réaction qui n'a pas fonctionné dans ces conditions était celle de la formation du composé **134**, et une nouvelle tentative a donc été faite (Schéma 5.6). En chauffant légèrement le système réactionnel, le produit souhaité a été obtenu avec succès.



Schéma 5.6 Conditions utilisées pour la synthèse de l'intermédiaire 134 (Annexe F).

Une fois les trois intermédiaires de l'anhydride phtalique obtenus, les phtalamides **137** – **141** ont été synthétisées (Schéma 5.7). Les conditions utilisées étaient les mêmes que celles utilisées pour obtenir les phtalamides **126**, **129** – **132**.



Schéma 5.7 Conditions utilisées pour la synthèse des phtalimides 137 – 141 (Annexe F).

L'étape la plus laborieuse a été la purification des phtalamides par colonne chromatographique, principalement en raison de la polarité induite par l'acide carboxylique. En effet, les composés **137** et **138** ont dû être purifiés par une étape supplémentaire par recristallisation à partir d'un mélange THF/MeOH. Ces conditions ont permis d'obtenir des cristaux des deux composés ainsi que de la molécule **139**, de sorte que leur analyse structurelle a pu être réalisée par XDR (de l'anglais *X-ray Diffraction*). Grâce à la qualité des cristaux obtenus des composés **138** et **139**, il a été possible de déterminer la structure absolue des molécules (Figure 5.6), liée à l'empilement des cristaux, ce qui a permis de définir la configuration absolue des centres chiraux respectifs des molécules **138** et **139**.



Figure 5.6 Structure absolue obtenue par XRD des composés a) 138 et b) 139.

Dans la Figure 5.6, on peut voir que l'unité cristalline de **138** et **139** contient deux molécules des composés respectifs. D'une part, les molécules de **138** ont une disposition asymétrique et antiparallèle. Elles sont liées de manière intermoléculaire par deux liaisons hydrogène, chacune formée par le proton de la fonction acide carboxylique et l'un des carbonyles de la fonction phtalimide de l'une des molécules, avec l'un des carbonyles de la fonction phtalimide et le proton de la fonction acide carboxylique. En outre, un total de quatre liaisons hydrogène intramoléculaires ont été identifiées. Chacun d'entre eux forme un cycle à 6 chaînons, ce qui peut contribuer à la stabilité relative des conformations dans lesquelles ils sont impliqués. Enfin, il a été possible de déterminer que le centre chiral de **138** possède une configuration absolue « R ». Dans le cas du composé **137**, la même structure que son énantiomère **138** a été trouvé (*i.e.* avec une maille similaire contenant deux molécules

indépendantes dans l'unité asymétrique). Cependant, les cristaux de **137** ont été trouvés maclés en raison de la présence d'au moins deux cristaux rapprochés. Pour cette raison, le paramètre de Flack, utilisé pour déterminer la structure absolue des molécules, n'a pas pu être calculé de façon fiable.

D'autre part, l'analyse de la structure absolue obtenue par XDR du composé **139** (Figure 5.6b) a montré que chacune des molécules de ce composé est liée à une molécule de THF (utilisée dans le mélange de solvants pour la recristallisation) par une liaison hydrogène. Pour chacune des molécules de **139**, il a été confirmé que le centre chiral présente une configuration « S ».

Une fois que la structure des composés a été confirmée, il ne restait plus qu'à effectuer les analyses pour déterminer leur pourcentage d'inhibition, ainsi que leur comportement en solution et leur capacité à interagir avec la hDNMT3Ac obtenue. Les résultats de chacune des expériences réalisées seront discutés dans la section suivante.

# 5.3 Évaluation biochimique et physico-chimique et comportement en solution des phtalimides 137 – 141

En général, tous les composés ont montré un mauvais comportement en solution (Tableau 5.1). Ce n'est que le composé **141** qui pourrait se bien comporter à la concentration utilisée lors des tests biochimiques réalisés par Luo *et al.* (100  $\mu$ M) dans leur publication.(Shao *et al.*, 2017) Par conséquent, les valeurs d'activité biologique obtenues par les auteurs ont pu être faussées par les effets physicochimiques que **137 – 140** peuvent subir en solution.

Tableau 5.1 Étude de criblage de liaison entre les ligands et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300 μM. ERETIC à 300 μM : >150 μM, 150 – 90 μM, <90 μM. Abréviations : N.A.; non applicable.

N° de composé	Structure	ERETIC @ 300 µM de C <sub>nominale</sub>	Score DLBS	Score CPMG	Score STD	Agrégation
141		173 μM				Possible
137		22 μM	N.A.	N.A.	N.A.	Oui

138	26 μΜ	N.A.	N.A.	N.A.	Oui
139	16 μM	N.A.	N.A.	N.A.	Oui
140	12 μΜ	N.A.	N.A.	N.A.	Oui

Dans le Tableau 5.1, il a été utilisé un code couleur à partir d'un gradient allant du vert au jaune (*i.e.* le vert indique un meilleur score que le jaune), représentant ainsi la diminution numérique des scores obtenus pour les expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD de **141** avec la hDNMT3Ac exprimée. Pour ce composé, il a été possible de détecter une interaction avec la protéine. Bien que les effets observés soient forts, ils n'ont été mis en évidence que par les expériences T<sub>2</sub>-CPMG et STD (Figure 5.8). Il est intéressant de noter que la concentration mesurée de cette molécule dans l'échantillon libre (sans protéine) était plus élevée que celle déterminée dans l'échantillon contenant la protéine. Ce résultat suggère que la hDNMT3Ac induit la précipitation ou l'agrégation du composé **141**.



Figure 5.7 Région 5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS,  $T_2$ -CPMG et STD pour la détection de l'interaction du composé **141** et de la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

Les résultats des tests biochimiques effectués dans le laboratoire de notre collaboratrice à Paris sont encore attendus afin de vérifier s'il est possible de confirmer l'activité biologique des composés synthétisés.

## 5.4 Conclusion

Les molécules 40, 40\_3 et 40\_8 ont été rapportées par Luo *et al.* comme inhibiteurs de l'activité enzymatique du complexe DNMT3A/DNMT3L. Les auteurs les ont découvertes à partir d'une procédure de criblage virtuel. Dans cette thèse, il est rapporté pour la première fois la synthèse de la molécule 40\_8 (composé **141**) et de chacun des deux énantiomères de 40 (composés **137** et **138**) et de 40\_3 (composés **139** et **140**). La structure des composés **137** – **139**, ainsi que la configuration absolue du centre chiral des composés **138** (« R ») et **139** (« S ») ont été déterminées par XRD à partir de l'analyse des cristaux obtenus. L'expérience de RMN-<sup>1</sup>H T<sub>2</sub>-CPMG a montré que seulement le composé **141** pourrait se bien comporter en solution à 100  $\mu$ M, la concentration à laquelle le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique de la cible par les molécules avait été déterminé dans la publication originale. Ceci suggère que les valeurs d'inhibition des trois autres composés (**137** – **140**) auraient pu être faussées lors des tests biochimiques en raison des effets physico-chimiques en solution. De plus, dans le cas du composé **141**, il semble que la protéine provoque la précipitation ou l'agrégation du composé. Néanmoins, il a été possible de détecter une forte interaction entre ce composé et la protéine par les méthodes T<sub>2</sub>-CPMG et STD. Il reste à confirmer l'activité inhibitrice des composés à partir de l'assai biochimique réalisé par le groupe de la Pre. Paola Arimondo à l'Institut Pasteur à Paris.

#### **CHAPITRE 6**

## SYNTHÈSE, ÉVALUATION BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE ET COMPORTEMENT EN SOLUTION DE COMPOSÉS RAPPORTÉS COMME INHIBITEURS DES DNMTS

Comme on peut le remarquer au chapitre 2 lors de la présentation des inhibiteurs de DNMTs, la grande majorité des composés ont été testés sur la DNMT1. À ce jour, très peu de composés ont été rapportés comme inhibiteurs de la DNMT3A. En outre, à plusieurs reprises, le pouvoir inhibiteur de certaines des molécules découvertes n'a pu être confirmé par différentes analyses biochimiques. Les travaux menés dans le cadre de ce projet de thèse avaient deux intérêts particuliers. D'une part, nous souhaitions connaître les valeurs d'inhibition de certaines des molécules trouvées capables d'inhiber la catalyse de la méthylation de l'ADN, mais dont l'activité inhibitrice n'avait pas encore été rapportée sur la DNMT3A. D'autre part, nous étions également intéressés par la réalisation de nouvelles analyses sur certains des composés dont les valeurs d'activité ont considérablement varié avec la nature de l'assai biochimique effectué. Ces dernières expériences ont été menées dans le but de trouver de nouveaux arguments pour expliquer ces disjonctions. Dans les sections suivantes, les résultats obtenus par cette étude seront discutés.

#### 6.1 Resynthèse du composé NSC319745 et de son analogue, la molécule AK-I-85

Les composés choisis pour les analyses biochimiques et biophysiques ainsi que pour connaître leur comportement en solution sont mentionnés ci-dessous. D'une part, il y a la molécule RG-108 (Figure 2.4, composé 6), ainsi que les produits naturels EGCG et curcumine (Figure 2.8, composés 19 et 20, respectivement), dont les valeurs d'inhibition sur la DNMT3A n'ont pas encore été rapportées. D'autre part, il y a les composés de la série NSC : NSC14778 et NSC319745 (Figure 2.10, composés 37 et 31, respectivement), précédemment étudiés par notre groupe montrant que leur activité biologique dépend fortement de la nature du test réalisé. Enfin, il y a le dérivé du NSC319745, la molécule identifiée comme AK-I-85 (Figures 2.12, composé 38). Parmi tous ces composés, seuls le NSC319745 et son dérivé, la molécule AK-I-85, ont été synthétisés, les autres composés étant disponibles au laboratoire.

La synthèse du composé AK-I-85 a été réalisée en deux étapes (Schéma 6.1). Tout d'abord, la formation du chlorure d'acyle à partir du chlorure d'oxalyle et du DMF comme catalyseur a donné le chlorure d'acide désiré de manière quantitative. Ensuite, la formation de la liaison amide avec la tyramine a été effectuée en présence de triéthylamine. L'étape la plus laborieuse a été la purification du composé final, car de nombreux lavages en milieu acide ont été nécessaires pour éliminer les résidus de l'amine.



Schéma 6.1 Conditions utilisées pour la synthèse de la molécule AK-I-85 (composé 38) (Annexe G).

Le composé NSC319745 a quant à lui été obtenu par une séquence en six étapes (Schéma 6.2) débutant par la protection du groupement amine de la 4-bromophénéthylamine par un Boc suivi par une réaction de Heck pour obtenir l'intermédiaire **144**. L'hydrogénation de l'oléfine a fourni l'intermédiaire **145** sur lequel le Boc a été enlevé à l'aide de l'acide trifluoroacétique. La réaction avec le chlorure d'acyle **142**, obtenu lors de la synthèse de la molécule AK-I-85, a donné l'amide **147** qui a finalement été saponifié pour fournir la molécule NSC319745 (composé **31**). Celui-là a été obtenu avec une pureté de presque 97%, vérifiée par RP-HPLC. Dans cette séquence, le seul produit qui a exigé une purification par colonne chromatographique était l'intermédiaire **144**.



Schéma 6.2 Conditions utilisées pour la synthèse de la molécule NSC319745 (composé 31) (Annexe G).

Une fois que tous les composés d'intérêt sont disponibles, les analyses ont été menées par les expériences réalisées dans le laboratoire de notre collaboratrice à Paris et dans le groupe du Pr Steven LaPlante à l'INRS. Les résultats obtenus sont discutés dans la section suivante.

## 6.2 Évaluation biochimique, physico-chimique et biophysique des inhibiteurs des DNMTs

Les résultats de l'analyse de la détection de l'interaction des composés avec la hDNMT3Ac par RMN-<sup>1</sup>H sont présentés dans le Tableau 6.1. Dans celui-ci, les composés sont organisés en fonction du score obtenu pour les consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD et ceux-ci sont mises en évidence dans une gamme de couleurs allant du vert au jaune, indiquant ainsi la diminution des valeurs des scores obtenus. Rappelons que le vert indique un meilleur score que le jaune.

N° de composé	Structure	300 μM de C <sub>nominale</sub>	Score DLBS	Score CPMG	Score STD	Agrégation
37		199 μM				Non
6		212 μM				Non
31		209 μM				Non
19		183 μM				Non
38	OMe O H CI	42 μM				Oui
20	но	25 μΜ				Oui

Tableau 6.1 Étude de criblage de liaison entre les ligands et la hDNMT3Ac (+++, ++, +) à 300  $\mu$ M. ERETIC à 300  $\mu$ M : >150  $\mu$ M, 150 – 90  $\mu$ M, <90  $\mu$ M.

De manière intéressante, de forts effets ont été observés pour la molécule NSC14778 (composé **37**) par les trois méthodes de la RMN-<sup>1</sup>H (Figure 6.1), suggérant la formation d'une forte interaction avec la protéine. De plus, il a été constaté que ce composé se comporte bien en solution. Ces résultats indiquent que la différence des valeurs d'activité obtenues par les différents essais biochimiques réalisés (Tableau 2.6) n'a pas été affectée par des effets physico-chimiques en solution.



Figure 6.1 Région 5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction entre le composé **37** et la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

Les molécules RG-108 (composé **6**), NSC319745 (composé **31**) et EGCG (composé **19**), se sont également bien comportées dans le tampon aqueux utilisé (Annexe B). Ce n'est que pour les deux premiers que des effets modérés ont été observés par les expériences de RMN-<sup>1</sup>H (Figure 6.2), indiquant un certain degré d'interaction entre eux et la hDNMT3Ac.

En revanche, il a été constaté que la molécule AK-I-85 (composé **38**) et la curcumine (composé **20**) forment des agrégats ou ont une faible solubilité dans le tampon utilisé. Ces résultats soulèvent la question de savoir si les valeurs d'inhibition de l'activité enzymatique des cibles utilisées auraient pu être faussées en raison des effets physico-chimiques que ces composés pourraient subir en solution pendant les essais d'inhibition enzymatique. Cependant, les résultats des tests biochimiques effectués dans le laboratoire de notre collaboratrice à Paris sont encore attendus afin de connaître les valeurs d'inhibition de l'activité catalytique de la hDNMT3Ac par les composés d'intérêt.



Figure 6.2 Région 5 – 9 ppm des spectres RMN-<sup>1</sup>H enregistrés à 600 MHz à partir des expériences DLBS, T<sub>2</sub>-CPMG et STD pour la détection de l'interaction **a**) du composé **6** et **b**) du composé **31** avec la hDNMT3Ac. Le spectre de la protéine avec le ligand est représenté en rouge et celui du ligand libre en bleu. Tampon composé de 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>, 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub> et 10% D<sub>2</sub>O à pH 7.4.

#### 6.3 Conclusion

Au cours de ce travail, l'analyse biophysique et la détermination du comportement en solution des inhibiteurs de DNMTs RG-108 (composé **6**), EGCG (composé **19**), curcumine (composé **20**), NSC14778 (composé **37**), NSC319745 (composé **31**) et AK-I-85 (composé **38**) ont été rapportées pour la première fois. Ces derniers, ainsi que la curcumine (composé **20**), ont été les seuls à former des agrégats ou à avoir une faible solubilité dans la solution aqueuse utilisée, un effet qui a pu fausser les résultats des valeurs d'activité biologique déjà publiées pour ces composés. Il est intéressant de noter que la molécule NSC14778 (composé **37**) se comporte bien en solution et interagit fortement avec la hDNMT3Ac. On ignore encore pourquoi ses pourcentages d'inhibition varient fortement en fonction de la nature du test biochimique. Enfin, le produit naturel EGCG (composé **19**) ne semble pas interagir avec la hDNMT3Ac, tandis que RG-108 (composé **6**) et NSC319745 (composé **31**) interagissent modérément. Au moment de soumettre cette thèse, les résultats des analyses biochimiques sur ces composés et effectuées par le groupe de la Pre. Paola Arimondo à l'Institut Pasteur ne sont pas encore disponibles.

#### CONCLUSION

Au cours de cette thèse, l'impact sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la hDNMT3Ac par différents composés a été étudié. La première série était basée sur la synthèse de dérivés du PS-3114 dans le but d'améliorer son pouvoir d'inhibition et d'établir le SAR qu'il pourrait présenter. Les modifications ont été guidées par les interactions trouvées pour le SAH et le PS-3114, par un amarrage moléculaire, sur le site occupé par le SAH dans la DNMT3A, ainsi que par les valeurs de pourcentage d'inhibition obtenues au fur et à mesure de la synthèse et de l'évaluation des dérivés. En outre, le comportement en solution des composés a également été pris en compte. Bien qu'aucune amélioration de l'activité du composé du PS-3114 n'ait été observée par rapport aux valeurs d'inhibition obtenues jusqu'à présent, des informations importantes ont été récoltées sur les sites sur le composé qui pourraient (ou non) être modifiés davantage. Ainsi, il a été constaté que la double substitution des positions 3 et 6 du PS-3114 n'est pas tolérée. Cependant, le groupe brome en C3 peut être remplacé ou même retiré, ce qui est très avantageux en chimie médicinale. En effet, la substitution de ce groupe par une aniline (composé **90**) ou une 3-quinoléine (composé **118**) renforce l'interaction établie avec la protéine ; il est donc conseillé de poursuivre l'exploration de ce site avec d'autres fonctions chimiques contenant des hétéroatomes.

La deuxième série de composés étudiés s'est appuyée sur la publication de 2017 de Luo *et al.* qui ont rapporté les dérivés de phtalamide 40, 40\_3 et 40\_8, découverts par une procédure de criblage virtuel, comme inhibiteurs de l'activité catalytique du complexe DNMT3A/DNMT3L. Ainsi, au cours de cette thèse, la synthèse de 40\_8 (composé **141**) et de chacun des énantiomères de 40 (composés **137** et **138**) et de 40\_3 (composés **139** et **140**) a été rapportée pour la première fois. L'analyse du comportement en solution de ces composés par RMN-<sup>1</sup>H a indiqué que seul le composé **141** (molécule 40\_8) pouvait se comporter correctement en solution aqueuse, bien qu'il soit possible que la protéine induise une précipitation ou une agrégation de ce ligand. Pour ces raisons, les résultats biologiques de 40, 40\_8 et 40\_3 peuvent avoir été faussés par des effets physico-chimiques. Néanmoins, à partir des méthodes T<sub>2</sub>-CPMG et STD, des effets remarquables ont été détectés, indiquant qu'une forte interaction entre le composé **141** (molécule 40\_8) et la hDNMT3Ac est établie. Les résultats de l'activité biologique de ces composés sur cette protéine sont encore en attente ; ils sont réalisés dans le laboratoire de notre collaboratrice la Pre. Paola Arimondo à Paris. Les données qui seront obtenues permettront de savoir s'il est possible de confirmer l'activité inhibitrice des composés analysés.

Les derniers inhibiteurs étudiés au cours de cette thèse ont été le RG-108 (composé 6), les produits naturels EGCG et curcumine (composés 19 et 20, respectivement), qui n'avaient pas été testés auparavant sur la DNMT3A. Bien que les pourcentages d'inhibition de l'activité méthyltransférase de la hDNMT3Ac n'aient pas encore été reçus, l'expérience T<sub>2</sub>-CPMG a permis d'identifier que seule la curcumine ne se comporte pas bien en solution, de sorte que les valeurs d'activité biologique obtenues pourraient être affectées par des effets d'agrégation ou par une faible solubilité. Le même effet a été constaté pour la molécule AK-I-85 (composé 38) également testée. Une découverte surprenante après l'analyse du SGI-1027 pour les trois expériences par RMN-<sup>1</sup>H a été que cet inhibiteur, qui est également largement utilisé comme référence dans différents essais biochimiques, non seulement a un mauvais comportement en solution, mais précipite également la protéine lorsqu'ils sont en solution. Ces résultats peuvent expliquer les divergences constatées dans les activités biologiques de ce composé dans les différents travaux publiés. Enfin, les molécules NSC14778 (composé 37) et NSC319745 (composé 31) n'ont présenté aucun problème de solubilité, ce qui indique que les écarts constatés dans les valeurs d'inhibition du NSC14778 (composé 37) ne sont pas dus à des effets physico-chimiques. En fait, ce composé s'est avéré interagir fortement avec la hDNMT3Ac.

La protéine utilisée lors des études de détection de l'interaction des ligands avec la hDNMT3Ac a été exprimée et purifiée au cours de ce travail de thèse. Après un travail ardu, le protocole a été optimisé afin d'obtenir la quantité nécessaire de protéine, avec une pureté supérieure à 85% (vérifiée sur SDS-PAGE), pour pouvoir réaliser les études par des expériences de RMN-<sup>1</sup>H avec le plus grand nombre possible de composés. L'activité catalytique de la hDNMT3Ac a été estimée grâce au kit *EpiQuick DNMT Activity/Inhibition Colorimetric Assay Ultra*, acheté chez EpiGentek.

Cette thèse de doctorat a mis en évidence l'importance d'inclure des études physiques et biophysiques pendant la recherche complexe d'inhibiteurs de la DNMT3A. Le consensus des expériences DLBS/T<sub>2</sub>-CPMG/STD est un excellent outil pour la découverte de fragments qui interagissent avec l'enzyme et pourraient être des « hits ». Sans aucun doute, l'application de cette stratégie sur des bases de données plus diversifiées pourrait conduire à la découverte de nouveaux composés qui pourraient être capables d'inhiber l'activité catalytique de la DNMT3A par un mécanisme « *on-target* ».

#### **ANNEXE A**

## **TESTS BIOCHIMIQUES. PARTIE EXPÉRIMENTALE**

I. Essai de fluorescence par restriction

Les tests d'inhibition de l'enzyme hDNMT3Ac utilisant l'essai de fluorescence basée sur la restriction ont été réalisés à l'Institut Pasteur à Paris, par le groupe de la Pre. Paola Arimondo. Au cours du protocole, un oligonucléotide de biotine marqué en 5' a été hybridé à sa chaîne complémentaire marquée avec de la 6carboxyfluorescéine à l'extrémité 3' et transféré sur une microplaque de 384 puits (*black Optiplates*, PerkinElmer) prérevêtue d'avidine. Le duplex contenait un seul site CpG chevauchant un site de restriction d'une enzyme de restriction sensible à la méthylation. La hDNMT3Ac, produite par le même groupe, a été ajoutée (200 ng) à chaque puits et mélangée aux produits chimiques (à la concentration souhaitée) et au SAM (20 µM). La réaction a été lancée dans un volume total de 50 µl. Après 1 h d'incubation à 37°C, chaque puits a été lavé trois fois avec une solution tampon saline au phosphate (PBS, de l'anglais *Phosphate-Buffered Saline*) contenant 0.05% de Tween-20 et du NaCl (500 mM) et trois autres fois avec une solution tampon saline au phosphate Tween-20). Les signaux de fluorescence spécifiques avec l'enzyme de restriction sensible à la méthylation HpyCH4IV (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ont été mesurés sur un détecteur PerkinElmer Envision. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante, où X est le signal déterminé en l'absence de l'inhibiteur et Y est le signal obtenu en présence de l'inhibiteur.

% d'inhibition = 
$$\frac{X - Y}{X} * 100$$

II. Essai radioactif impliquant le <sup>3</sup>H-SAM

Le pourcentage d'inhibition des composés sur l'activité enzymatique du complexe DNMT3A/DNMT3L a été réalisé par le groupe du Pr. Masoud Vedadi au SGC à Toronto. Au cours du protocole, l'incorporation des groupements méthyles marqués au tritium du <sup>3</sup>H-SAM dans un oglionucléotide biotinylé, contenant un îlot CpG hémiméthylé, a été suivie à l'aide du SPA (de l'anglais, *Scintillation Proximity Assay*). Les essais ont été réalisés dans un mélange réactionnel contenant les composés à tester (50  $\mu$ M), un mélange de SAH/<sup>3</sup>H-SAM (1  $\mu$ M), le substrat de l'ADN poly(dI-dC) (de l'anglais poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid) (0.5  $\mu$ M) et le complexe DNMT3A/3L (10 nM). La réaction a été réalisée dans une solution tampon (20 mM

Tris pH 9.0, 0.01% Triton X-100 et 2 mM DTT) sur une plaque. L'incubation a été réalisée pendant 60 min à 37°C. Après ce temps, la réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de chlorhydrate de guanidine (7.5 M), puis du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8.0. Le mélange a été transféré sur une plaque SPA et incubé pendant 1 h avant de procéder à la mesure du signal à partir d'un lecteur de plaques SPA TopCount (PerkinElmer).

### III. Kit d'essai colorimétrique

L'activité enzymatique de la hDNMT3Ac, exprimée et purifiée au cours de cette thèse en collaboration avec le Pr. Laurent Cappadocia, a été confirmée à l'aide du kit EpiQuick DNMT Activity/Inhibition Colorimetric Assay Ultra (Catalogue # P-3009), acheté chez EpiGentek. Le protocole réalisé était basé sur les instructions fournies par le fabricant à partir du guide de l'utilisateur. Tous les matériaux et tampons utilisés étaient inclus dans le kit. Brièvement, dans une bande à huit puits, 1 µl de chaque échantillon de protéine a été mélangé à 49 μl du tampon de travail (Adomet 50X), qui avait été préalablement dilué avec le tampon de dosage de la DNMT (1:50 v:v). L'un des puits contenait 50 μl du tampon de travail (dilué avec le tampon de dosage de la DNMT, 1:50 v:v), qui a été utilisé comme un blanc. Dans deux autres puits, des contrôles positifs ont été préparés avec des rapports v:v de 1:50 et 0.5:50, respectivement, de l'enzyme de contrôle DNMT (50 µg/ml), fournie par le fabricant, dans le tampon de travail précédemment dilué. La bandelette contenant les mélanges réactionnels a été recouverte du film de couverture adhésif et incubée pendant 120 minutes à 37°C. Après ce temps, chaque puits de la microplague a été lavé trois fois avec 150  $\mu$ l du tampon de lavage (1X, dans de l'eau nanopure). Par la suite, 50  $\mu$ l de l'anticorps de capture (1  $\mu$ g/ml) ont été ajoutés à chaque puits. L'incubation a été réalisée à température ambiante et après 60 min, 3 lavages de 150 μl ont été effectués avec un tampon de lavage (1X, dans de l'eau nanopure). Ensuite, 50 μl d'anticorps de détection (0.2 µg/ml) ont été ajoutés à chaque puits et laissés à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Après ce temps, chaque puits a été à nouveau lavé 3 fois avec 150 µl de tampon de lavage (1X, dans de l'eau nanopure) et 50  $\mu$ l de la solution de potentialisation ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les 3 derniers lavages de chaque puits ont été effectués avec 150 µl de tampon de lavage 1X (1X, dans de l'eau nanopure).

Pour la détection du signal, 100 µl de la solution de développement ont été ajoutés à chaque puits et incubés à température ambiante, à l'abri de la lumière directe, pendant 8 minutes. Pendant ce temps, les changements de couleur ont été suivis dans les puits contenant les échantillons et les contrôles. Une fois

que la coloration bleu moyen du puits du contrôle positif a été observée, ce qui indique la détection d'une quantité suffisante de l'ADN méthylée, 100 µl de solution d'arrêt ont été ajoutés à chaque puits afin d'arrêter la réaction. Enfin, l'absorbance a été enregistrée avec un lecteur de microplaques (Victor<sup>®</sup> Nivo Multimode Microplate Reader, PerkinElmer) à 450 nm et à une longueur d'onde de référence de 655 nm. L'activité de la hDNMT3Ac a été calculée selon l'Équation 1.

#### **ANNEXE B**

## EXPÉRIENCES PAR RMN-<sup>1</sup>H. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les expériences par RMN-<sup>1</sup>H ont été réalisées dans le laboratoire du groupe du Pr. Steven LaPlante à l'INRS, à Laval, dans des tubes RMN de 3 mm à 600 MHz sur le spectromètre Bruker Avance III, qui était équipé d'une cryosonde à hélium et d'un passeur d'échantillons SampleJet.

I. Étude du comportement des composés en solution

L'étude du comportement des composés en solution a été réalisée sur la base de l'expérience T<sub>2</sub>-CPMG par RMN-<sup>1</sup>H. Les échantillons ont été initialement préparés sous forme de solutions mères de DMSO-d<sub>6</sub> à 100, 50 ou 20  $\mu$ M, en fonction de la quantité et de la solubilité des composés. Ces derniers ont ensuite été dilués à une concentration nominale de 500  $\mu$ M, avec un tampon composé de 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub>, 10% D<sub>2</sub>O, pH 7.4, de telle sorte que la solution contenait 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>. La séquence d'impulsions standard 1D <sup>1</sup>H de Bruker avec sculpture d'excitation (zgesgp) a été utilisée avec un délai de relaxation de 10 s et 64 scans. Tant le traitement des spectres que la détermination des concentrations des composés par la méthode ERETIC ont été effectuées avec le logiciel Bruker Topspin. Pour l'étalonnage du pic ERETIC, l'acide maléique a été utilisé comme référence.

#### II. Détection de la liaison ligand-hDNMT3Ac

Les études pour la détection de la liaison des composés à la hDNMT3Ac ont été réalisées sur la base du consensus des résultats obtenus à partir des expériences DLBS/T2-CPMG/STD. Des échantillons d'espèces à l'état libre (FS, de l'anglais *Free State*) ont été initialement préparés sous forme de solutions mères de DMSO-d<sub>6</sub> à 100, 50 ou 20  $\mu$ M, selon la quantité et la solubilité des composés. Ceux-ci ont ensuite été dilués à une concentration nominale de 300  $\mu$ M, avec un tampon composé de 20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub>, 10% D<sub>2</sub>O, pH 7.4, de sorte que la solution contenait 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>. Pour effectuer la préparation des échantillons contenant des protéines (SP, de l'anglais *Sample – Protein*), tout d'abord, le tampon contenant la protéine a été échangé en utilisant une colonne de dessalage : du tampon de stockage (20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) au tampon aqueux de la RMN (20 mM HEPES-d<sub>18</sub>, 200 mM KCl, 0.2 mM TCEP-d<sub>16</sub>, 10% D<sub>2</sub>O, pH 7.4). La protéine a été préparée à une concentration d'environ 7  $\mu$ M, laquelle a été utilisée pour diluer les stocks des composés préparés dans le

DMSO-d<sub>6</sub> (à 100, 50 ou 20  $\mu$ M, selon le cas). Ainsi, la concentration finale de la protéine dans les échantillons SP était entre 6 – 7  $\mu$ M et la concentration nominale des composés était de 300  $\mu$ M, contenant 3.6% de DMSO-d<sub>6</sub>. Les spectres RMN-<sup>1</sup>H ont été enregistrés en utilisant l'expérience zgesgp avec un délai de relaxation de 5 s et 256 scans. Le traitement des spectres a été réalisé à l'aide du logiciel Bruker Topspin.

#### **ANNEXE C**

## **EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA hDNMT3AC. PARTIE EXPÉRIMENTALE**

Le plasmide pET28a-hDNMT3Ac de la séquence codant pour le domaine C-terminal (résidus 624-912) de la DNMT3A humaine (hDNMT3Ac) a été fourni par le groupe de la Pre. Paola Arimondo à l'Institut Pasteur à Paris. Le vecteur contenait une séquence His•Tag à l'extrémité N-terminale avec un gène résistant à la kanamycine. La transformation pour l'expression de la hDNMT3Ac a été effectuée dans des souches d'Escherichia coli BL21-CodonPlus(DE3) et Rosetta-gami<sup>™</sup> 2(DE3)pLysS (fournies par le Pr. Laurent Cappadocia) contenant un gène de résistance au chloramphénicol. Les cellules ont été cultivées dans du milieu SB (de l'anglais Super Broth) avec les antibiotiques kanamycine (50 mg/ml) et chloramphénicol (34 mg/ml) à 37°C jusqu'à ce que la DO600 atteigne environ 0.7. La température a ensuite été modifiée à 18°C et l'induction de l'expression de la protéine a été réalisée par l'isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (300 μM) pendant la nuit. Les cellules ont été recueillies par centrifugation (30 min, 8000 rpm à 4°C) et mises en suspension dans une solution de sucrose (20%) contenant du Tris-HCl (50 mM, pH 8), congelées et stockées à -20°C. Le jour de la lyse, les cellules ont été décongelées et soniquées dans un tampon composé d'imidazole (20 mM), NaCl (500 mM),  $\beta$ -mercaptoéthanol (5 mM), glycérol (10%), mannitol (0.5 M) et du lysozyme. La protéine a été récupérée dans le surnageant obtenu après centrifugation (30 min, 18 000 rpm à 4°C). La première étape de purification a été réalisée sur une colonne d'affinité Ni-NTA (His-Trap Fast Flow, Cytiva), dont les tampons contenaient : Tris-HCl (20 mM, pH 8), NaCl (500 mM), βmercaptoéthanol (5 mM), glycérol (10%) et imidazole (20 mM et 500 mM, pour le tampon d'équilibrage et d'élution, respectivement). Les fractions éluées ont été précipitées avec du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%), redissoutes dans le tampon de la SEC, centrifugées (5 min, 14 000 rpm à 4°C) et ensuite injectées sur la colonne Superdex 200 10/300 (Cytiva) pour séparer la protéine des impuretés. Le tampon de la SEC était composé de Tris-HCl (20 mM, pH 8), NaCl (150 mM),  $\beta$ -mercaptoéthanol (5 mM). La pureté de la hDNMT3Ac a été évaluée sur gels SDS-PAGE contenant du TCE (1,1,1-trichloroéthane) observés via un ChemiDoc (BioRad) et a été estimée à > 85%. Enfin, la concentration en protéine totale a été déterminée par dosage à 280 nm (NanoDrop Onec, Thermo Scientific).

## **ANNEXE D**

## CHIMIE. ÉQUIPEMENTS, MATÉRIAUX ET MÉTHODES

## I. Réactifs, matériaux et solvants

Les réactifs et solvants non anhydres utilisés dans les processus de synthèse et de purification des composés ont été utilisés sans purification supplémentaire. Sauf indication contraire, l'éthanol utilisé était à 95%. Pour les réactions en milieu anhydre, la verrerie a été utilisée avec un séchage à la flamme et les solvants anhydres ont été obtenus à l'aide d'un système de purification des solvants encapsulés (MB-SPS, MBRAUN) et conservés sur des tamis moléculaires de 4 Å sous atmosphère d'argon.

## II. Méthodes chromatographiques

L'évolution des réactions a été suivie par CCM sur des plaques de gel de silice (60F<sub>254</sub>, Merck). La visualisation des taches a été effectuée par une lampe UV (Entela) à 250 nm et en chauffant les plaques après immersion dans une solution de KMnO<sub>4</sub>. Les produits ont été purifiés par chromatographie liquide sur colonne (CLC) avec du gel de silice 60 (230 - 400 mesh, Merck) ou sur plaques CCM préparatives avec support en verre (60F<sub>254</sub>, Merck). Le système de solvant est indiqué pour chaque purification. La détermination de la pureté a été effectuée par RP-HPLC sur un équipement HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity ou Waters Alliance, selon le cas) avec une colonne Kinetex<sup>®</sup> 5 µm EVO C18 100 Å (150 x 4.6 mm). Il a été réalisé avec un gradient linéaire de 5 à 95 % de B pendant 20 min, avec un débit de 1 ml/min. Les phases mobiles étaient : A (0.06% TFA dans H<sub>2</sub>O) et B (0.06% TFA dans MeCN). Les chromatogrammes ont été acquis à une longueur d'onde de 254 nm.

## III. Enregistrement des spectres RMN-<sup>1</sup>H

Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance-III, avec une fréquence de résonance de 300 MHz ou 600 MHz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) ont été enregistrés en partie par million (ppm) en utilisant le TMS (tétraméthylsilane) comme référence interne et la résonance du solvant comme étalon interne.(Fulmer *et al.*, 2010) Dans les spectres par RMN-<sup>1</sup>H, les constantes de couplage (J) sont indiquées en Hz et les données sont rapportées comme suit :  $\delta$ , multiplicité (s = singulet,

s(e) = singulet élargi, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, sext = sextuplet, sept = septuplet, m=multiplet, dd = doublet de doublets, dt = doublet de triplets), J et intégration.

#### **ANNEXE E**

## **RESYNTHÈSE DU PS-3114 ET SYNTHÈSE DE SES DÉRIVÉS. PARTIE EXPÉRIMENTALE**

I. Conditions générales utilisées

i) Conditions de réaction pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (Schéma 3.2) : Le composé **45** (1.0 éq.) a été dissous dans le DMF (anh.) (2.0 ml \* mmol de **45**), à 90°C pendant 15 min, avec le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 éq). Ensuite, l'halogénure approprié (4.0 éq.) a été ajouté et la réaction a été maintenue à 90°C pendant la nuit, puis refroidie à température ambiante. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau et extrait avec un mélange Et<sub>2</sub>O : hexanes (1:1 v:v). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) et NaCl (aq., saturé), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. La purification par CLC a permis d'obtenir le composé attendu.

ii) Conditions de réaction pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant l'HATU comme agent de couplage (Schéma 3.4) : Le composé **45** (1.0 éq.), avec de la DIPEA (5.0 éq.), a été dissous dans le DMF (anh.) (5.0 ml \* mmol de **45**), à 0°C sous Ar. Ensuite, le HATU (1.2 éq) a été dissous dans le plus petit volume de DMF et ajouté goutte à goutte. La réaction a été maintenue à 0°C pendant 45 min, après ce temps, l'amine (1.3 éq) a été additionnée doucement et la réaction a été agitée sous atmosphère d'argon pendant 24 h. À la fin de ce temps, le brut de la réaction a été dilué avec du DCM et lavé plusieurs fois avec de l'eau. Après un lavage supplémentaire avec du NaCl (aq., saturé), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. La purification par CLC a permis d'obtenir le composé attendu.

iii) Conditions de réaction pour la synthèse de dérivés d'amides par l'aminolyse d'esters (Schéma 3.5) : Le composé ester (1.0 éq.) a été dissous dans un tube scellé avec l'amine (10.0 éq) sous argon. Ensuite, le DBU (0.25 éq) a été ajouté et la réaction a été maintenue à 60°C pendant 48 h, puis refroidie à température ambiante. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'acétate d'éthyle (40 ml \* mmol de l'ester). Après deux lavages consécutifs avec du NH<sub>4</sub>Cl (aq., saturé) (40 ml \* mmol de l'ester) et NaCl (aq., saturé), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. La purification par CLC, si nécessaire, a permis d'obtenir le composé attendu.

iv) Conditions de réaction pour l'hydrogénation catalytique : Le composé, avec la fonction insaturée à réduire, a été dissous dans du méthanol (ou dans un mélange DCM : MeOH (10%)). La solution a été

soumise à trois cycles vide-argon. Après avoir ajouté le catalyseur (10% Pd/C ou du Pd(OH)<sub>2</sub>), le système a été laissé sous vide et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé. La réaction a été laissée pendant la nuit à température ambiante, puis soumise à trois cycles vide-argon. Ensuite, la solution a été filtrée sur célite, sous Ar, tandis qu'elle était lavée avec un mélange de DCM : MeOH (10%). Après évaporation, le brut de la réaction a été purifié par CLC, si nécessaire, pour obtenir le composé attendu.

v) Conditions de réaction pour le couplage de Suzuki : L'halogénure correspondant (1.0 éq.) a été dissous dans un tube scellé dans du dioxane (ou du THF, selon le cas) et l'acide boronique indiqué (1.35 éq.) et le Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.6 éq.) (ou K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.0 éq.) ont été ajoutés. La solution a été purgée avec de l'argon pendant 5 min et le catalyseur à base de [Pd] (0.05 ou 0.015 éq.) a été additionné. Ensuite, de l'eau, qui avait été préalablement purgée avec de l'argon, a été ajoutée dans un rapport spécifique par rapport au volume du solvant organique. La réaction a été laissée sous argon à 80°C pendant la nuit, puis refroidie à température ambiante. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau et extrait avec de l'acétate d'éthyle. Après deux lavages avec du NaCl (aq., saturé), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.), filtrée sur célite et évaporée. La purification par CLC et/ou par CCM préparatif a permis d'obtenir le composé attendu.

vi) Conditions de réaction pour le couplage de Buchwald-Hartwig : L'halogénure correspondant (1.0 éq.) a été dissous, dans un tube scellé, dans du *tert*-butanol et l'amine indiquée (1.2 éq.) et le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 éq.) ont été ajoutés. La solution a été purgée avec de l'argon pendant 5 min et le catalyseur BrettPhos Pd G1 (0.1 éq.) a été additionné. La réaction a été laissée sous argon à 115°C pendant la nuit, puis refroidie à température ambiante. Le brut de la réaction a été filtré sur célite, lavé avec du DCM et évaporé. La purification par CLC a permis d'obtenir le composé attendu.

vii) Conditions de réaction pour le couplage de Sonogashira : Le composé **79** (1.0 éq.) a été dissous, dans un tube scellé, dans du THF (anhydre) et le DIPEA (3.0 ou 3.5 éq.) a été ajouté. La solution a été purgée avec de l'argon pendant 5 min et le catalyseur à base du [Pd] (0.01 ou 0.015 éq.), le CuI (0.2 ou 0.03 éq.) et l'alcyne indiqué (1.3 ou 1.5 éq.) ont été additionnés. La réaction a été laissée sous argon à température ambiante pendant 48 ou 72 h, selon le cas. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau et extrait avec du DCM. Après deux lavages avec du NaCl (aq., saturé), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.), filtrée sur célite et évaporée. La purification par CLC a permis d'obtenir le composé attendu.



Imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**44**) : La 2-aminopyridine (2.00 g, 21.3 mmol) a été dissoute dans l'éthanol (10 ml) et le bromopyruvate d'éthyle (3.5 ml, 28 mmol) a été ajouté. La solution a été chauffée à 80°C pendant 6 h, puis laissée refroidir à la température ambiante. L'éthanol a été évaporé et l'huile résultante a été diluée avec du DCM (40 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60) a permis d'obtenir le composé **44** (820 mg, 20%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 0.6 Hz, 1H), 8.12 (dt, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (dd, 9.2 Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 6.84 (td, 6.8 Hz, 1.1 Hz, 1H), 4.44 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.42 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  163.36, 145.32, 136.92, 126.15, 126.09, 119.10, 116.90, 113.87, 61.14, 14.43.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**42**) : Le composé **44** (1.0 g, 5.3 mmol) a été dissous dans le MeCN (15 ml) et le NBS (1.2 g, 6.8 mmol) a été ajouté. La solution a été lancée à température ambiante pendant 3 h. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau (30 ml) et extrait de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle (3 fois avec 30 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 50 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 50 ml), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  50 : 50) a permis d'obtenir le composé **42** (1.3 g, 91%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.20 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.69 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 7.01 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.45 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.45 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  162.29, 145.11, 133.71, 126.66, 124.45, 119.12, 114.53, 100.25, 61.42, 14.38. Pureté par HPLC : 97%.



Acide 3-bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylique (**45**) : Le composé **42** (1.0 g, 3.7 mmol) a été dissous dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (10 ml/3 ml) et le LiOH (181 mg, 7.54 mmol) a été ajouté. La solution a été lancée à température ambiante pendant 16 h. Le brut de la réaction a été ajusté à pH 3 avec du HCl (aq., 1 M) et l'éthanol a été évaporé. Du DCM a été ajouté à la solution et la phase aqueuse a été extraite avec du NaCl (aq., saturé), puis lavés avec du DCM. Après lyophilisation de la phase aqueuse recueillie, le produit organique a été redissous dans du DMSO, les sels ont été filtrés et la phase organique a été diluée avec de l'H<sub>2</sub>O et lyophilisée. Ainsi, le composé **45** (890 mg, quantitatif) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  8.37 (d, 6.7 Hz, 1H), 7.65 (d, 9.1 Hz, 1H), 7.45 (t, 7.5 Hz, 1H), 7.17 (t, 6.6 Hz, 1H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  163.01, 144.35, 133.31, 128.67, 125.94, 118.04, 115.86, 101.17.



Méthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate (**56**) : La 2-aminopyridine (250 mg, 2.66 mmol) a été dissoute dans l'éthanol (1.5 ml) et le bromopyruvate d'éthyle (0.4 ml, 3.5 mmol) a été ajouté. La solution a été chauffée à 60°C pendant 24 h, puis laissée à refroidir à la température ambiante. L'éthanol a été évaporé et l'huile résultante a été diluée avec du DCM (30 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 30 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 30 ml), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80) a permis d'obtenir le composé **56** (151 mg, 32%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 0.6 Hz, 1H), 8.13 (dt, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.66 (dd, 9.2 Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 6.86 (td, 6.8 Hz, 1.1 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.71, 145.19, 136.38, 126.19, 119.10, 116.91, 113.94, 52.16.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**46**) : Le composé **56** (58 mg, 0.3 mmol) a été dissous dans le MeCN (2 ml) et le NBS (76 mg, 0.4 mmol) a été ajouté. La solution a été lancée à la température ambiante pendant 5 h. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau (20 ml) et extrait de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle (3 fois avec 20 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 30 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 30 ml), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  50 : 50) a permis d'obtenir le composé **46** (56 mg, 67%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.22 (dt, 7.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.69 (dt, 9.2 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 1H), 7.03 (td, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.70, 145.15, 133.48, 126.77, 124.49, 119.18, 114.61, 52.33. Pureté par HPLC : 99%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate de propyle (**48**) : Le composé **45** (167 mg, 0.69 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (144 mg, 1.04 mmol) et du 1-bromopropane (0.3 ml, 2.8 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60), le composé **48** (40 mg, 20%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.21 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.70 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.01 (td, 6.9 Hz, 0.8 Hz, 1H), 4.39 (t, 6.9 Hz, 2H), 1.87 (sext, 7.2 Hz, 2H), 1.04 (t, 7.4 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.59, 145.53, 133.94, 126.55, 124.49, 119.26, 114.51, 100.37, 67.01, 22.10, 10.51. Pureté par HPLC : 97%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate de butyle (**49**) : Le composé **45** (327 mg, 1.36 mmol) a été mis en réaction avec du  $K_2CO_3$  (281 mg, 2.04 mmol) et du 1-bromobutane (0.6 ml, 5.4 mmol) selon les

conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  50 : 50), le composé **49** (52 mg, 13%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.16 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.65 (d, 9.1 Hz, 1H), 7.30 (d, 7.1 Hz, 1H), 6.97 (t, 6.8 Hz, 1H), 4.40 (t, 6.8 Hz, 2H), 1.79 (quint, 5.7 Hz, 2H), 1.87 (sext, 7.4 Hz, 2H), 0.94 (t, 7.4 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.39, 145.15, 133.88, 126.56, 124.46, 119.17, 114.51, 100.11, 65.27, 30.73, 19.19, 13.73. Pureté par HPLC : 95%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'hexyle (**50**) : Le composé **45** (159 mg, 0.66 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (137 mg, 0.99 mmol) et du 1-bromohexane (0.4 ml, 2.6 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60), le composé **50** (43 mg, 20%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.20 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.69 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 6.97 (td, 6.8 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.42 (t, 6.9 Hz, 2H), 1.83 (quint, 7.2 Hz, 2H), 1.45 (sext, 5.7 Hz, 2H), 1.33 (quint, 3.6 Hz, 4H), 0.88 (t, 7.0 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.44, 145.19, 133.94, 126.55, 124.48, 119.24, 114.51, 100.15, 65.61, 31.47, 29.69, 25.62, 14.03. Pureté par HPLC : 97%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'isopropyle (**51**) : Le composé **45** (457 mg, 1.90 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (393 mg, 2.84 mmol) et du 2-bromopropane (0.7 ml, 7.6 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60), le composé **51** (62 mg, 12%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.16 (dt, 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.66 (dt, 9.2 Hz, 1 Hz, 1H), 7.31 – 7.25 (m, 1H), 6.96 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.34 (sept, 6.3 Hz, 1H), 1.41 (d, 6.3 Hz, 6H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.92, 145.12, 134.08, 126.52, 124.45, 119.17, 114.46, 100.17, 69.13, 21.93. Pureté par HPLC : 96%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'isopentyle (**52**) : Le composé **45** (300 mg, 1.25 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (258 mg, 1.87 mmol) et du 1-bromo-3-méthylbutane (0.6 ml, 5.0 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60), le composé **52** (58 mg, 15%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.20 (dt, 7.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.69 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 7.00 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.45 (t, 6.9 Hz, 2H), 1.86 – 1.79 (m, 1H), 1.77 – 1.70 (m, 2H), 0.96 (d, 6.3 Hz, 6H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.44, 145.19, 133.93, 126.54, 124.48, 119.24, 114.50, 100.14, 64.14, 37.38, 29.70, 25.09, 22.52. Pureté par HPLC : 97%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate de benzyle (**53**) : Le composé **45** (393 mg, 1.63 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (338 mg, 2.45 mmol) et du chlorure de benzyle (0.8 ml, 6.5 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 60$  : 40), le composé **53** (70 mg, 13%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.67 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.53 – 7.50 (m, 2H), 7.39 – 7.26 (m, 4H), 6.98 (t, 6.6 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.17, 145.21, 133.75, 133.60, 128.66, 128.54, 128.29, 126.67, 124.48, 119.24, 114.59, 100.48, 67.01. Pureté par HPLC : 97%.



3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate de phénéthyle (**47**) : Le composé **45** (408 mg, 1.69 mmol) a été mis en réaction avec du  $K_2CO_3$  (351 mg, 2.54 mmol) et du bromure de phénéthyle (0.9 ml, 6.8 mmol)

selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40), le composé **47** (70 mg, 12%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.13 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.64 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.30 – 7.27 (m, 5H), 7.21 – 7.16 (m, 1H), 6.94 (t, 6.8 Hz, 1H), 4.60 (t, 7.6 Hz, 2H), 3.13 (t, 7.6 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.21, 145.15, 137.42, 133.63, 129.03, 128.56, 126.66, 126.63, 124.46, 119.15, 114.57, 100.30, 65.86, 35.20. Pureté par HPLC : 96%.



3-Méthoxypropyl 3-bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate (**54**) : Le composé **45** (300 mg, 1.25 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (258 mg, 1.87 mmol) et du 1-bromo-3-méthoxypropane (0.6 ml, 5.0 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (DCM : MeOH / 100 :  $0 \rightarrow 97$  : 3), le composé **54** (30 mg, 8%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.21 (dd, 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.70 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.36 – 7.30 (m, 1H), 7.02 (t, 6.9 Hz, 1H), 4.52 (t, 6.6 Hz, 2H), 3.56 (t, 6.3 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.11 (quint, 6.4 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.33, 145.28, 134.24, 126.60, 124.50, 119.25, 114.56, 69.24, 62.72, 58.70, 29.06. Pureté par HPLC : 97%.



2-(Diéthylamino)éthyl 3-bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate (**55**) : Le composé **55** (443 mg, 1.84 mmol) a été mis en réaction avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (381 mg, 2.76 mmol) et du 2-bromo-*N*,*N*-diéthyléthan-1-amine (1.9 g, 7.4 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'esters par SN2 (i). Après purification par CLC (silice/Et<sub>3</sub>N (3%), DCM : MeOH / 100 :  $0 \rightarrow 95$  : 5), le composé **55** (49 mg, 8%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.21 (dt, 7.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.65 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.02 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.63 (t, 6.6 Hz, 2H), 3.11 (t, 6.2 Hz, 2H), 2.86 (q, 4H), 1.19 (t, 7.2 Hz, 6H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.98, 145.22, 133.25, 126.89, 124.50, 119.17, 114.74, 100.64, 61.40, 50.45, 47.43, 10.67. Pureté par HPLC : 63%.



3-Bromo-*N*-méthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**58**) : Le composé **45** (369 mg, 1.53 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.3 ml, 7.7 mmol), du HATU (699 mg, 1.84 mmol), et du chlorhydrate de méthanamine (134 mg, 1.99 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt /  $100 : 0 \rightarrow 40 : 60$ ), le composé **58** (46 mg, 12%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.19 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.52 (d, 9.1 Hz, 1H), 7.43 (s(e), 1H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 6.96 (t, 6.8 Hz, 1H), 3.00 (d, 5.0 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.35, 144.42, 135.63, 126.56, 124.54, 118.14, 113.99, 97.23, 25.78. Pureté par HPLC : 99%.



3-Bromo-*N*-éthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**59**) : Le composé **45** (492 mg, 2.04 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.8 ml, 10 mmol), du HATU (931 mg, 2.45 mmol), et du chlorhydrate d'éthanamine (216 mg, 2.65 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (silice/Et<sub>3</sub>N (3%), DCM : MeOH / 100 : 0  $\rightarrow$  95 : 5), le composé **59** (116 mg, 21%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.46 – 8.45 (m, 1H), 8.17 (dd, 8.4 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.24 – 7.20 (m, 2H), 3.21 (q, 7.3 Hz, 2H), 1.29 (t, 7.3 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  164.53, 148.85, 139.52, 134.87, 127.82, 120.02, 46.32, 8.72. Pureté par HPLC : 99%.



3-Bromo-*N*-propylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**60**) : Le composé **45** (326 mg, 1.35 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.2 ml, 6.8 mmol), du HATU (617 mg, 1.62 mmol), et de la propan-1-amine (0.2 ml, 1.8 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides
utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0 → 40 : 60), le composé **60** (110 mg, 29%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.08 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.43 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.23 – 7.17 (m, 1H), 6.87 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 3.34 (q, 6.8 Hz, 2H), 1.57 (sext, 7.2 Hz, 2H), 0.89 (t, 7.4 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 161.70, 144.30, 135.63, 126.44, 124.40, 118.02, 113.91, 97.06, 40.78, 22.92, 11.48. Pureté par HPLC : 100%.



3-Bromo-*N*-pentylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**61**) : Le composé **45** (292 mg, 1.21 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.1 ml, 6.1 mmol), du HATU (553 mg, 1.45 mmol), et de la pentan-1-amine (0.2 ml, 1.6 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **61** (57 mg, 15%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.52 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.46 (s(e), 1H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 6.95 (t, 6.9 Hz, 1H), 3.44 (q, 6.8 Hz, 2H), 1.60 (quint, 7.1 Hz, 2H), 1.38 – 1.32 (m, 4H), 0.87 (t, 7.0 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.69, 144.38, 135.70, 126.47, 124.48, 118.10, 113.93, 97.16, 39.13, 29.37, 29.13, 22.36, 13.98. Pureté par HPLC : 100%.



3-Bromo-*N*-hexylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**62**) : Le composé **45** (321 mg, 1.33 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.2 ml, 6.7 mmol), du HATU (608 mg, 1.60 mmol), et de la hexane-1-amine (0.2 ml, 1.7 mmol), selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  40 : 60), le composé **62** (121 mg, 28%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.03 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.19 – 7.13 (m, 1H), 6.82 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 3.33 (q, 6.8 Hz, 2H), 1.49 (quint, 7.3 Hz, 2H), 1.27 – 1.14 (m, 6H), 0.73 (t, 6.9 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.60, 144.24, 135.62, 126.38, 124.34, 117.97, 113.86, 97.98, 39.09, 31.42, 29.60, 26.60, 22.46, 13.96. Pureté par HPLC : 100%.



3-Bromo-*N*,*N*-dimethylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**63**) : Le composé **45** (382 mg, 1.59 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.4 ml, 7.9 mmol), de le HATU (723 mg, 1.90 mmol), et du chlorhydrate de diméthylamine (168 mg, 2.06 mmol), selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant l'HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 0$  : 100), le composé **63** (43 mg, 10%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.13 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.57 (d, 9.1 Hz, 2H), 7.30 – 7.24 (m, 1H), 6.95 (t, 6.8 Hz, 1H), 3.22 (s, 3H), 3.12 (s, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  164.06, 144.38, 138.34, 125.92, 124.18, 118.26, 113.96, 96.20, 38.60, 35.51. Pureté par HPLC : 99%.



3-Bromo-*N*,*N*-dibutylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**64**) : Le composé **45** (381 mg, 1.58 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.4 ml, 7.9 mmol), du HATU (721 mg, 1.90 mmol), et de la dibutylamine (0.4 ml, 2.1 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt /  $100 : 0 \rightarrow 20 : 80$ ), le composé **64** (126 mg, 23%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.04 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.48 (d, 9.1 Hz, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 1H), 6.86 (td, 6.8 Hz, 0.9 Hz, 1H), 3.45 (q, 7.4 Hz, 4H), 1.59 (quint, 7.6 Hz, 2H), 1.45 (quint, 7.5 Hz, 2H), 1.38 – 1.25 (m, 2H), 1.17 – 1.01 (m, 2H), 0.86 (t, 7.3 Hz, 3H), 0.68 (t, 7.3 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.90, 144.31, 139.27, 125.57, 124.03, 118.13, 113.73, 95.40, 48.33, 45.24, 30.93, 29.64, 20.28, 19.70, 13.88, 13.58. Pureté par HPLC : 99%.



3-Bromo-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**65**) : Le composé **42** (215 mg, 0.80 mmol) a été mis en réaction avec du DBU (30 µl, 0.2 mmol) et de la  $N^1$ , $N^1$ -diéthyléthane-1,2-diamine (1.1 ml, 8.0 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides par l'aminolyse d'esters (iii). Ainsi, le composé **65** (164 mg, 61%) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.76 (s(e), 1H), 7.54 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.31 – 7.25 (m, 1H), 6.94 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 3.52 (q, 6.3 Hz, 2H), 2.67 (t, 6.5 Hz, 2H), 2.58 (q, 7.1 Hz, 4H), 1.02 (t, 7.1 Hz, 6H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.85, 144.47, 135.78, 126.33, 124.46, 118.32, 113.91, 97.10, 51.76, 47.06, 36.96, 11.79. Pureté par HPLC : 97%.



3-Bromo-*N*,*N*-dibutylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**66**) : Le composé **45** (264 mg, 1.10 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.0 ml, 5.5 mmol), du HATU (500 mg, 1.31 mmol), et de la pyridin-2ylméthanamine (0.2 ml, 1.4 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt /  $100 : 0 \rightarrow 20 : 80$ ), le composé **66** (36 mg, 10%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.58 (d, 4.6 Hz, 1H), 8.35 (s(e), 1H), 8.21 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.68 – 7.57 (m, 2H), 7.38 – 7.29 (m, 2H), 7.20 – 7.16 (m, 1H), 6.98 (t, 6.5 Hz, 1H), 4.79 (d, 5.7 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.94, 157.04, 149.28, 144.58, 136.80, 135.57, 126.47, 124.51, 122.32, 122.02, 118.43, 114.03, 44.44. Pureté par HPLC : 65%.



*N*-Benzyl-3-bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**67**) : Le composé **45** (257 mg, 1.07 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.9 ml, 5.3 mmol), du HATU (486 mg, 1.28 mmol), et de la phénylméthanamine (0.2 ml, 1.4 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **66** (70 mg, 20%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.21 (dt, 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.78 (s(e), 1H), 7.52 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.39 – 7.25 (m, 2H), 6.97 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.65 (d, 6.1 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.67, 144.47, 138.22, 135.49, 128.54, 128.02, 127.45, 126.56, 124.55, 118.23, 114.03, 97.51, 43.19. Pureté par HPLC : 100%.



3-Bromo-*N*-phenethylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**68**) : Le composé **45** (254 mg, 1.05 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.9 ml, 5.3 mmol), du HATU (481 mg, 1.27 mmol), et de la 2-phényléthan-1-amine (0.2 ml, 1.4 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **68** (67 mg, 19%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.18 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.60 (s(e), 1H), 7.52 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.34 – 7.20 (m, 7H), 6.96 (t, 6.8 Hz, 1H), 3.73 (q, 7.0 Hz, 2H), 2.97 (t, 7.4 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.84, 144.40, 139.00, 135.56, 128.80, 128.60, 126.50, 126.43, 124.49, 118.20, 113.99, 97.25, 40.61, 36.04. Pureté par HPLC : 100%.



3-Bromo-*N*-(3-bromophenethyl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**69**) : Le composé **45** (200 mg, 0.83 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.7 ml, 4.2 mmol), du HATU (379 mg, 1.00 mmol), et de la 2-(3-bromophényl)éthan-1-amine (0.2 ml, 1.1 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40), le composé **69** (70 mg, 20%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.59 (s(e), 1H), 7.51 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.34 – 7.29 (m, 2H), 7.17 – 7.11 (m, 2H), 6.96 (t, 6.8 Hz, 1H), 3.67 (q, 7.0 Hz, 2H), 2.90 (t, 7.3 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.84, 144.38, 141.32, 135.31, 131.86, 130.16, 129.59, 127.47, 126.70, 124.52, 122.60, 118.15, 114.12, 97.42, 40.38, 35.64. Pureté par HPLC : 99%.



3-Bromo-*N*-(4-bromophénéthyl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**70**) : Le composé **45** (227 mg, 0.94 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.8 ml, 4.7 mmol), du HATU (430 mg, 1.13 mmol), et de la 2-(4-bromophényl)éthan-1-amine (0.2 ml, 1.2 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **70** (63 mg, 16%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.18 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.51 (d, 9.2 Hz, 2H), 7.40 (d, 8.3 Hz, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.11 (d, 8.3 Hz, 2H), 6.96 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 3.67 (q, 6.9 Hz, 2H), 2.89 (t, 7.3 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  161.87, 144.43, 137.98, 135.44, 131.65, 130.56, 126.56, 124.52, 120.29, 118.23, 114.04, 97.32, 40.34, 35.42. Pureté par HPLC : 100%.



4-(3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamido)butanoate de méthyle (**71**) : Le composé **45** (319 mg, 1.32 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.2 ml, 6.6 mmol), du HATU (604 mg, 1.59 mmol), et du chlorhydrate de 4-aminobutanoate de méthyle (264 mg, 1.72 mmol), selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant l'HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **71** (96 mg, 21%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.12 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.57 (t, 5.7 Hz, 1H), 7.47 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.28 – 7.23 (m, 1H), 6.92 (t, 6.6 Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.47 (q, 6.7 Hz, 2H), 2.39 (t, 7.4 Hz, 2H), 1.98 – 1.88 (m, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.58, 161.93, 144.36, 135.39, 126.59, 124.44, 118.08, 114.03, 97.14, 51.63, 38.39, 31.42, 24.94. Pureté par HPLC : 100%.



*tert*-Butyl (3-(3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamido)propyl)carbamate (**72**) : Le composé **45** (311 mg, 1.29 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (1.1 ml, 6.5 mmol), du HATU (589 mg, 1.55 mmol) et du *tert*-butyl (3-aminopropyl)carbamate (0.3 ml, 1.7 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **72** (84 mg, 16%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.20 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.62 (s(e), 1H), 7.55 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 6.98 (td, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 5.12 (s(e), 1H), 3.52 (q, 6.5 Hz, 2H), 3.20 (q, 6.3 Hz, 2H), 1.77 (quint, 6.4 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.31, 156.21, 144.47, 135.50, 126.56, 124.53, 118.25, 114.04, 97.24, 37.45, 36.08, 30.34, 28.45. Pureté par HPLC : 97%.



*N*-(3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carbonyl)-*L*-aspartate de diméthyle (**73**) : Le composé **45** (543 mg, 2.25 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (2.0 ml, 11 mmol), de l'HATU (1.0 g, 2.7 mmol), et du chlorhydrate de diméthyl *L*-aspartate (579 mg, 2.93 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 20$  : 80), le composé **73** (69 mg, 8%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.29 (d, 8.4 Hz, 1H), 8.20 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.59 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 6.98 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 5.14 – 5.08 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.18 – 3.11 (m, 1H), 3.01 – 2.93 (m, 1H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  171.37, 171.11, 161.61, 144.60, 134.94, 126.50, 124.45, 118.61, 114.13, 97.57, 52.87, 52.09, 48.22, 36.34. Pureté par HPLC : 98%.



*N*-(3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carbonyl)-*L*-glutamate de diméthyle (**74**) : Le composé **45** (667 mg, 2.77 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (2.4 ml, 14 mmol), du HATU (1.3 g, 3.3 mmol), et du chlorhydrate de diméthyl *L*-glutamate (761 mg, 3.60 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **74** (103 mg, 9%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.91 (d, 8.4 Hz, 1H), 7.56 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 6.97 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.87 – 4.80 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 2.51 – 2.44 (m, 2H), 2.40 – 2.29 (m, 1H), 2.19 – 2.09 (m, 1H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.00, 171.98, 161.72, 144.51, 134.90, 126.63, 124.48, 118.42, 114.16, 97.60, 52.57, 51.78, 51.30, 30.25, 27.67. Pureté par HPLC : 99%.



*N*-(3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carbonyl)-*L*-valinate de méthyle (**57**) : Le composé **45** (100 mg, 0.42 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.4 ml, 2.1 mmol), du HATU (189 mg, 0.50 mmol), et du chlorhydrate de *L*-valinate de méthyle (91 mg, 0.5 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40), le composé **57** (26 mg, 18%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.20 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.88 (d, 9.0 Hz, 1H), 7.59 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 6.98 (t, 6.8 Hz, 1H), 4.78 – 4.73 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.36 – 2.25 (m, 1H), 1.04 – 1.01 (m, 6H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  172.21, 161.74, 144.53, 135.20, 126.48, 124.49, 118.48, 114.06, 97.53, 56.98, 52.16, 31.47, 19.17, 18.03. Pureté par HPLC : 100%.



 $N^{6}$ -(3-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carbonyl)- $N^{2}$ -(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-lysinate de méthyle (**75**) : Le composé **45** (214 mg, 0.89 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.8 ml, 4.4 mmol), du HATU (405 mg, 1.07 mmol) et du chlorhydrate de méthyl (*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-lysinate (342 mg, 1.15 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0 → 20 : 80), le composé **75** (70 mg, 18%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.19 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.53 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.46 (t, 5.5 Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 6.97 (td, 6.8 Hz, 0.7 Hz, 1H), 5.09 (d, 7.9 Hz, 1H), 4.25 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.44 (q, 6.7 Hz, 2H), 1.84 – 1.77 (m, 1H), 1.70 – 1.60 (m, 3H), 1.48 – 1.43 (m, 2H), 1.40 (s, 9H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.30, 161.85, 155.42, 144.43, 135.57, 126.55, 124.53, 118.16, 114.00, 97.27, 79.82, 53.32, 52.26, 38.72, 32.33, 29.30, 28.30, 22.74. Pureté par HPLC : 99%.



 $N^2$ -((Benzyloxy)carbonyl)- $N^6$ -(3-bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carbonyl)-*L*-lysinate de méthyle (**76**) : Le composé **45** (245 mg, 1.02 mmol) a été mis en réaction avec de la DIPEA (0.9 ml, 5.1 mmol), du HATU (464 mg, 1.22 mmol) et du chlorhydrate de méthyl ((benzyloxy)carbonyl)-*L*-lysinate (437 mg, 1.32 mmol) selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides utilisant le HATU comme agent de couplage (ii). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **76** (155 mg, 30%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.12 (d, 6.9 Hz, 1H), 7.51 (t, 8.9 Hz, 2H), 7.29 – 7.25 (m, 6H), 6.93 (td, 6.8 Hz, 0.8 Hz, 1H), 5.67 (d, 8.1 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.34 (q, 6.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.44 – 3.38 (m, 2H), 1.88 – 1.43 (m, 6H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.00, 161.97, 156.11, 144.38, 136.28, 135.47, 128.43, 128.05, 128.01, 126.58, 124.48, 118.09, 114.01, 97.25, 66.87, 53.80, 52.35, 38.52, 31.90, 29.20, 22.55. Pureté par HPLC : 99%.



Acide 4-(3-bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamido)butanoïque (**77**) : Le composé **71** (42.0 mg, 0.12 mmol) a été dissous dans un mélange de DMSO/H<sub>2</sub>O (3 ml/1 ml) et le LiOH (1 M, 4.0 mmol) a été ajouté. La réaction a été maintenue à 0°C pendant 5 h puis laissée atteindre la température ambiante. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau et le pH a été ajusté à 3 avec du HCl (aq., 1 M). Le produit a été extrait avec du DCM et après des lavages avec du NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. Ainsi, le composé **77** (39 mg, quantitatif) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  8.48 (s, 1H), 8.37 (d, 6.6 Hz, 1H), 7.62 (d, 9.0 Hz, 1H), 7.43 (t, 7.7 Hz, 1H), 7.12 (t, 6.6 Hz, 1H), 3.25 – 3.23 (m, 2H), 2.20 – 2.18 (m, 2H), 1.71 (t, 6.8 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  174.83, 161.68, 144.28, 136.05, 127.59, 125.54, 118.09, 114.97, 39.14, 31.94, 25.24. Pureté par HPLC : 93%.



6-Bromoimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**79**) : La 5-bromopyridine-2-amine (2.0 g, 12 mmol) a été dissoute dans l'éthanol (15 ml) et le bromopyruvate d'éthyle (1.9 ml, 15 mmol) a été ajouté. La solution a été chauffée à 70°C pendant 16 h, puis laissée refroidir à la température ambiante. L'éthanol a été évaporé et l'huile résultante a été diluée avec du DCM (40 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40) a permis d'obtenir le composé **79** (1.9 g, 62%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.16 (d, 0.9 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.23 (d, 9.6 Hz, 1H), 6.97 (dt, 9.6 Hz, 1.7 Hz, 1H), 4.16 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.13 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.63, 143.28, 136.96, 129.55, 126.39, 119.06, 117.11, 108.34, 61.01, 14.22.



6-Vinylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**80**) : Le composé **79** (600 mg, 2.23 mmol) a été dissous, dans un tube scellé, dans du dioxane (anh.) (5 ml) et le tributyl(vinyl)étain (1.2 ml, 4.0 mmol) a été ajouté. La solution a été purgée avec de l'argon pendant 5 min et le transdichlorobis(triphénylphosphine)palladium(II) (15.7 mg, 0.02 mmol) a été additionné. La réaction a été laissée sous argon à 80°C pendant la nuit, puis refroidie à température ambiante. Le brut de la réaction a été traité avec du NH<sub>4</sub>OAc (aq., saturé) et extrait avec de l'acétate d'éthyle. Après deux lavages consécutifs avec de l'eau et du NaCl (aq., saturé), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.), filtré sur célite et évaporé. Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  50 : 50) a permis d'obtenir le composé **80** (199 mg, 41%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.10 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.58 (d, 9.5 Hz, 1H), 7.40 (dd, 9.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.59 (dd, 17.5 Hz, 10.9 Hz, 1H), 5.72 (d, 17.5 Hz, 1H), 5.33 (d, 10.9 Hz, 1H), 4.40 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.39 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.12, 144.78, 137.04, 131.91, 124.95, 124.16, 123.97, 118.63, 117.32, 115.80, 61.13, 14.40.



6-Éthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**81**) : Le composé **80** (72 mg, 0.3 mmol) a été dissous dans MeOH (10 ml), du 10% Pd/C a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé, selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Ainsi, le composé **81** (71 mg, quantitatif) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.94 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.36 (d, 9.3 Hz, 1H), 6.91 (d, 9.2 Hz, 1H), 4.24 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.41 (q, 7.4 Hz, 2H), 1.22 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.04 (t, 7.5 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.25, 144.32, 136.29, 129.61, 128.35, 122.82, 118.03, 116.75, 60.77, 25.49, 14.41, 14.27.



3-Bromo-6-éthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**82**) : Le composé **81** (75 mg, 0.3 mmol) a été dissous dans l'acétonitrile (2 ml) et le NBS (80 mg, 0.5 mmol) a été ajouté. La solution a été lancée à la température ambiante pendant 3 h. Le brut de la réaction a été dilué avec de l'eau (20 ml) et extrait de la phase aqueuse avec de l'AcOEt (3 fois avec 20 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 30 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 30 ml), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  50 : 50) a permis d'obtenir le composé **82** (74 mg, 73%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.93 (s, 1H), 7.57 (d, 9.3 Hz, 1H), 7.17 (dd, 9.3 Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.46 (q, 7.2 Hz, 2H), 2.68 (q, 7.4 Hz, 2H), 1.42 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.28 (t, 7.5 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.42, 144.39, 133.52, 130.70, 128.96, 121.09, 118.59, 99.95, 61.31, 25.98, 14.65, 14.39. Pureté par HPLC : 98%.



3-([1,1'-Biphényl]-4-yl)-6-éthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**83**) : Le composé **82** (69 mg, 0.2 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide [1,1'-biphényl]-4-ylboronique (62 mg, 0.3 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (121 mg, 0.37 mmol) et du PdCl<sub>2</sub>(dppf) (8.5 mg, 0.01 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40), le composé **83** (61 mg, 71%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.79 – 7.76 (m, 3H), 7.69 – 7.64 (m, 3H), 7.59 (d, 8.4 Hz, 2H), 7.50 – 7.45 (m, 2H), 7.40 – 7.38 (m, 1H), 7.17 (dd, 9.3 Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.37 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.58 (q, 7.5 Hz, 2H), 1.33 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.21 (t, 7.6 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.52, 143.71, 142.06, 140.40, 132.96, 131.01, 129.80, 128.93, 128.52, 127.76, 127.46, 127.18, 127.13, 120.64, 118.57, 60.91, 25.99, 14.88, 14.34. Pureté par HPLC : 98%.



Éthyl (*E*)-6-éthyl-3-styrylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate (**84**) : Le composé **82** (85 mg, 0.3 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-styrylboronique (57 mg, 0.4 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (149 mg, 0.5 mmol) et du PdCl<sub>2</sub>(dppf) (10.5 mg, 0.01 mmol) dans un mélange THF : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40), le composé **84** (61 mg, 67%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.22 (s, 1H), 7.78 (d, 17.0 Hz, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 3H), 7.41 – 7.28 (m, 4H), 7.16 (dd, 9.3 Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.47 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.68 (q, 7.5 Hz, 2H), 1.45 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.29 (t, 7.5 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.94, 144.21, 136.85, 133.64, 132.29, 130.16, 128.83, 128.49, 128.41, 126.82, 126.68, 121.72, 118.91, 115.15, 61.12, 26.16, 14.88, 14.51. Pureté par HPLC : 96%.



6-Éthyl-3-phénéthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**85**) : Le composé **84** (113 mg, 0.35 mmol) a été dissous dans MeOH (10 ml), du 10% Pd/C a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  0 : 100), le composé **85** (49 mg, 43%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.51 (d, 9.3 Hz, 1H), 7.26 (s(e), 1H), 7.20 – 7.05 (m, 5H), 7.02 – 6.98 (m, 1H), 4.43 (q, 7.1 Hz, 2H), 3.51 (t, 7.4 Hz, 2H), 2.97 (t, 7.4 Hz, 2H), 2.48 (q, 7.5 Hz, 2H), 1.43 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.15 (t, 7.5 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 161.11, 143.21, 140.74, 132.16, 129.88, 128.94, 128.54, 128.47, 127.57, 126.35, 119.73, 118.38, 60.78, 34.73, 26.08, 25.88, 14.64, 14.52. Pureté par HPLC : 94%.



(*E*)-*N*-propyl-3-styrylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**87**) : Le composé **60** (124 mg, 0.44 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-styrylboronique (88 mg, 0.6 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (229 mg, 0.70 mmol) et du PdCl<sub>2</sub>(dppf) (16.1 mg, 0.02 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  70 : 30), le composé **87** (78 mg, 58%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.52 (d, 7.1 Hz, 1H), 8.06 (d, 17.1, 1H), 7.63 – 7.57 (m, 4H), 7.39 – 7.24 (m, 5H), 6.93 (td, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 3.44 (q, 6.8 Hz, 2H), 1.68 (sext, 7.3 Hz, 2H), 1.01 (t, 7.4 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.50, 144.37, 137.10, 136.39, 130.92, 128.71, 128.12, 126.68, 126.04, 125.47, 118.46, 115.68, 113.65, 40.91, 23.06, 11.57. Pureté par HPLC : 92%.



6-Éthyl-*N*-propylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide (**88**) : Le composé **81** (190 mg, 0.87 mmol) a été mis en réaction avec du DBU (32.5 μl, 0.22 mmol) et de la propan-1-amine (0.7 ml, 8.7 mmol), selon les conditions de réaction décrites pour la synthèse de dérivés d'amides par l'aminolyse d'esters (iii). Ainsi, le composé **88** (103 mg, 51%) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.04 (d, 0.5 Hz, 1H), 7.87 – 7.86 (m, 1H), 7.41 (d, 9.3 Hz, 2H), 7.06 (dd, 9.4 Hz, 1.7 Hz, 1H), 3.42 – 3.34 (m, 2H), 2.58 (q, 7.4 Hz, 2H), 1.60 (sext, 7.3 Hz, 2H), 1.23 – 1.17 (m, 3H), 0.93 (t, 7.4 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 162.83, 143.67, 139.89, 129.23, 128.26, 123.21, 117.33, 114.02, 40.83, 25.78, 23.03, 14.78, 11.45. Pureté par HPLC : 95%.



6-(Phénylamino)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**89**) : Le composé **79** (75 mg, 0.3 mmol) a été mis en réaction avec de l'aniline (30.5 μl, 0.33 mmol), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (96 mg, 0.7 mmol) et du BrettPhos Pd G1 (22.2 mg, 0.03 mmol) dans du *tert*-butanol (1 ml) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Buchwald-Hartwig (vi). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0 → 30 : 70), le composé **89** (39 mg, 50%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.04 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.56 (d, 9.6 Hz, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.12 (d, 8.8 Hz, 1H), 7.02 – 6.95 (m, 3H), 5.81 (s, 1H), 4.42 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.40 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.28, 142.76, 136.53, 132.56, 129.67, 129.67, 124.51, 121.91, 119.00, 117.95, 117.25, 113.17, 61.07, 14.43. Pureté par HPLC : 98%.



3-(Phénylamino)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**90**) : Le composé **42** (80 mg, 0.3 mmol) a été mis en réaction avec de l'aniline (32.5  $\mu$ l, 0.36 mmol), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (103 mg, 0.74 mmol) et du BrettPhos Pd G1 (23.7 mg, 0.03 mmol) dans du *tert*-butanol (1.5 ml) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Buchwald-Hartwig (vi). Après purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80), le composé **90** (20 mg, 24%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.68 – 7.59 (m, 2H), 7.27 – 7.20 (m, 3H), 7.00 – 6.94 (m, 2H), 6.77 (td, 6.8 Hz, 1.1 Hz, 1H), 6.61 (d, 7.7 Hz, 2H), 4.43 (q, 7.2 Hz, 2H), 1.42 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  164.42, 142.42, 141.16, 130.62, 129.58, 125.54, 124.56, 124.13, 121.77, 119.33, 116.70, 112.89, 61.07, 14.44. Pureté par HPLC : 90%.



6-Méthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**92**) : La 5-méthylpyridin-2-amine (250 mg, 2.31 mmol) a été dissoute dans l'éthanol (5 ml) et le bromopyruvate d'éthyle (0.4 ml, 3.5 mmol) a été ajouté. La solution a été chauffée à 60°C pendant 24 h, puis laissée refroidir à la température ambiante. L'éthanol a été évaporé et l'huile résultante a été diluée avec du DCM (40 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40) a permis d'obtenir le composé **92** (372 mg, 79%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.08 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.56 (d, 9.3 Hz, 1H), 7.07 (dd, 9.3 Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.43 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.42 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.39, 144.35, 136.57, 129.51, 123.70, 123.58, 118.28, 116.56, 61.06, 18.17, 14.43. Pureté par HPLC : 80%.



6-Isopropylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (95) : La 2-amino-5-bromopyridine (500 mg, 2.89 mmol) a été mis en réaction avec du 4,4,5,5-tétraméthyl-2-(prop-1-ène-2-yl)-1,3,2-dioxaborolane (0.8 μl, 3.9 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 g, 4.6 mmol) et du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (167 mg, 0.15 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une fois l'intermédiaire 5-(prop-1-èn-2-yl)pyridin-2-amine (composé 93) obtenu (383 mg, quantitatif), une fraction de ce composé (200 mg, 1.49 mmol) a été dissous dans du méthanol (15 ml), du 10% Pd/C a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Après avoir synthétisé l'intermédiaire 5-isopropylpyridine-2-amine (composé 94) (197 mg, quantitatif), une quantité donnée de ce composé (100 mg, 0.73 mmol) a été dissoute dans l'éthanol (5 ml) et le bromopyruvate d'éthyle (0.1 ml, 1.1 mmol) a été ajouté. La solution a été chauffée à 60°C pendant 24 h, puis laissée refroidir à la température ambiante. L'éthanol a été évaporé et l'huile résultante a été diluée avec du DCM (40 ml). Après des lavages consécutifs avec du NaHCO₃ (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml) et NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 40 ml), le brut de la réaction a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60) a permis d'obtenir le composé **95** (54 mg, 32%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.11 (s, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.61 (d, 9.4 Hz, 1H), 7.20 - 7.16 (m, 1H), 4.44 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.91 (sept, 6.9 Hz, 1H), 1.43 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.29 (d, 6.9 Hz, 6H); RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.36, 144.52, 134.46, 127.29, 124.35, 121.91, 118.51, 116.95, 61.09, 31.45, 23.12, 14.43. Pureté par HPLC : indéterminée.



6-(Pent-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**96**) : Le composé **79** (180 mg, 0.67 mmol) a été mis en réaction avec du DIPEA (0.4 ml, 2.3 mmol), du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (11.6 mg, 0.01 mmol), du Cul (3.8 mg, 0.02 mmol) et de l'hex-1-yne (99  $\mu$ l, 1.0 mmol) dans du THF (anh.) (3 ml), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Sonogashira (vii). Ainsi, le composé **96** (169 mg, quantitatif) a été obtenu sans

purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.17 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.56 (d, 9.5 Hz, 1H), 7.18 (dd, 9.4 Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.42 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.37 (t, 7.0 Hz, 2H), 1.62 (sext, 7.1 Hz, 2H), 1.41 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.03 (t, 7.4 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.02, 156.22, 137.28, 129.85, 129.64, 128.34, 118.40, 116.87, 111.73, 93.07, 61.23, 21.97, 21.35, 14.41, 13.54.



6-(Hex-1-yn-1-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**97**) : Le composé **79** (160 mg, 0.60 mmol) a été mis en réaction avec du DIPEA (0.3 ml, 1.8 mmol), du PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4.2 mg, 0.01 mmol), du Cul (2.3 mg, 0.01 mmol) et du hex-1-yne (88.8 µl, 0.77 mmol) dans du THF (anh.) (2 ml) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Sonogashira (vii). La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0 → 60 : 40) a permis d'obtenir le composé **97** (118 mg, 73%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.17 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.56 (d, 9.4 Hz, 1H), 7.18 (m, 1H), 4.43 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.39 (t, 6.9 Hz, 2H), 1.62 – 1.51 (m, 2H), 1.49 – 1.39 (m, 5H), 0.93 (t, 7.2 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.09, 153.49, 144.01, 137.37, 129.60, 128.32, 118.42, 116.87, 111.70, 93.18, 61.21, 30.54, 22.01, 19.07, 14.42, 13.60.



6-Hexylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**98**) : Le composé **97** (30 mg, 0.1 mmol) a été dissous dans un mélange DCM/MeOH (10%) (6 ml), du 10% Pd/C a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé, selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Ainsi, le composé **98** (29 mg, quantitatif) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.09 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.58 (d, 9.4 Hz, 1H), 7.10 (d, 9.0 Hz, 1H), 4.44 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.57 (t, 6.9 Hz, 2H), 1.67 – 1.57 (m, 2H), 1.42 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.36 – 1.24 (m, 6H), 0.87 (t, 6.2 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.45, 144.41, 136.66, 128.69, 128.54, 123.27, 118.42, 116.69, 61.05, 32.59, 31.58, 30.34, 28.76, 22.55, 14.44, 14.05. Pureté par HPLC : 98%.



6-Pentylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**100**) : Le composé **96** (45 mg, 0.2 mmol) a été dissous dans un mélange DCM/MeOH (10%) (5 ml), du Pd(OH)<sub>2</sub> a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé, selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Ainsi, le composé **100** (44 mg, quantitatif) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.10 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.59 (d, 9.4 Hz, 1H), 7.11 (dd, 9.4 Hz, 1 .6 Hz, 1H), 4.45 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.58 (t, 7.7 Hz, 2H), 1.64 (quint, 2H), 1.43 (t, 7.1 Hz, 3H), 1.36 – 1.31 (m, 4H), 0.90 (t, 6.9 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 167.24, 146.73, 128.66, 124.56, 118.46, 116.46, 61.05, 32.56, 31.26, 30.06, 22.44, 14.45, 13.98. Pureté par HPLC : 99%.



6-Phénylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**105**) : Le composé **79** (100 mg, 0.37 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide phénylboronique (61 mg, 0.5 mmol), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (103 mg, 0.74 mmol), et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> • DCM (4.6 mg, 0.01 mmol) dans un mélange THF : H<sub>2</sub>O (3 : 1 v : v), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0 → 20 : 80) a permis d'obtenir le composé **105** (96 mg, quantitatif). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.28 (m, 1H), 8.22 (d, 0.6 Hz, 1H), 7.74 (d, 9.5 Hz, 1H), 7.57 – 7.41 (m, 6H), 4.47 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.45 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 165.53, 144.67, 137.41, 136.63, 129.24, 128.48, 128.34, 127.17, 126.98, 123.17, 118.92, 117.29, 61.20, 14.45. Pureté par HPLC : 99%.



(*E*)-6-Styrylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**106**) : Le composé **79** (250 mg, 0.93 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-styrylboronique (186 mg, 1.25 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (484 mg, 1.49 mmol)

et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (34.0 mg, 0.05 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  50 : 50) a permis d'obtenir le composé **106** (125 mg, 46%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.12 (d, 8.12 Hz, 2H), 7.65 (d, 9.6 Hz, 1H), 7.56 – 7.48 (m, 3H), 7.39 – 7.26 (m, 3H), 7.03 (q, 16.2 Hz, 2H), 4.44 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.43 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.19, 144.69, 137.13, 136.39, 130.49, 128.87, 128.32, 126.58, 124.95, 124.25, 124.07, 123.46, 118.83, 117.30, 61.19, 14.45.



6-Phénéthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**107**) : Le composé **106** (63 mg, 0.2 mmol) a été dissous dans un mélange DCM/MeOH (10%) (10 ml), le catalyseur 10% Pd/C a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé, selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 :  $0 \rightarrow 40$  : 60) a permis d'obtenir le composé **107** (60 mg, quantitatif) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.04 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.58 (d, 9.3 Hz, 1H), 7.28 – 7.07 (m, 6H), 4.43 (q, 7.0 Hz, 2H), 2.91 (s, 4H), 1.41 (t, 7.0 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.41, 144.50, 140.35, 136.74, 128.54, 128.48, 127.28, 126.37, 123.74, 118.50, 116.78, 61.06, 36.72, 34.47, 14.45. Pureté par HPLC : 86%.



(*E*)-3-Styrylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**108**) : Le composé **42** (357 mg, 1.33 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-styrylboronique (265 mg, 1.79 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (692 mg, 2.12 mmol) et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (48.6 mg, 0.07 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  30 : 70) a permis d'obtenir le composé **108** (238 mg, 61%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.49 (dt, 7.1 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.82 (d, 17.0 Hz, 1H), 7.73 (dt, 9.2 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.59 (d, 7.1 Hz, 2H), 7.42 – 7.27 (m,

5H), 6.95 (td, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 4.49 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.47 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 163.98, 144.94, 136.70, 132.44, 128.87, 128.52, 127.02, 126.70, 126.27, 125.11, 119.52, 114.99, 114.16, 61.24, 14.51.



3-Phénéthylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**109**) : Le composé **108** (132 mg, 0.45 mmol) a été dissous dans du MeOH (10 ml), du 10% Pd/C a été ajouté et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé, selon les conditions de réaction décrites pour l'hydrogénation catalytique (iv). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80) a permis d'obtenir le composé **109** (27 mg, 20%) a été obtenu. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.69 – 7.63 (m, 2H), 7.22 – 7.10 (m, 6H), 6.73 (td, 6.8 Hz, 1.2 Hz, 1H), 4.47 (q, 7.1 Hz, 2H), 3.56 (t, 7.59 Hz, 2H), 2.99 (t, 7.57 Hz, 2H), 1.47 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.62, 140.44, 130.01, 128.64, 128.42, 127.67, 126.48, 125.82, 123.13, 118.86, 113.44, 61.07, 34.55, 26.01, 14.50. Pureté par HPLC : 95%.



(*E*)-3-(4-Méthylstyryl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**111**) : Le composé **42** (125 mg, 0.47 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-2-(4-méthylphényl)vinylboronique (102 mg, 0.63 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (242 mg, 0.74 mmol) et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (17.0 mg, 0.02 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  40 : 60) a permis d'obtenir le composé **111** (45 mg, 32%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.49 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.80 – 7.71 (m, 2H), 7.49 (d, 8.1 Hz, 2H), 7.34 – 7.20 (m, 5H), 6.94 (t, 6.9 Hz,

1H), 4.49 (q, 7.1 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.47 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.94, 145.97, 133.90, 132.40, 129.58, 126.64, 125.99, 125.28, 119.68, 114.02, 101.72, 61.20, 21.36, 14.53. Pureté par HPLC : 97%.



(*E*)-3-(4-Fluorostyryl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**113**) : Le composé **42** (125 mg, 0.47 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-(4-fluorostyryl)boronique (104 mg, 0.63 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (242 mg, 0.74 mmol) et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (17.0 mg, 0.02 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  40 : 60) a permis d'obtenir le composé **113** (37 mg, 26%), lequel a ensuite été purifié par CCM préparative (hexanes : AcOEt / 20 : 80). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.47 (d, 7.1 Hz, 1H), 7.76 – 7.71 (m, 2H), 7.59 – 7.54 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 2H), 7.09 (t, 8.7 Hz, 2H), 6.96 (td, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 4.49 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.47 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  162.71, 150.51, 145.45, 137.92, 131.05, 128.32, 126.90, 124.30, 116.13, 114.05, 110.94, 61.24, 19.98. Pureté par HPLC : 91%.



(*E*)-3-(3-Fluorostyryl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**114**) : Le composé **42** (125 mg, 0.47 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-(3-fluorostyryl)boronique (104 mg, 0.63 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (242 mg, 0.74 mmol), et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (17.0 mg, 0.02 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v), selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  40 : 60) a permis d'obtenir le composé **114** (25 mg, 17%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$ 

8.47 (d, 7.1 Hz, 1H), 7.83 (d, 17 Hz, 1H), 7.74 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.37 – 7.25 (m, 5H), 7.04 – 6.95 (m, 2H), 4.49 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.47 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.83, 144.97, 134.24, 131.25, 130.27, 126.38, 125.13, 122.58, 119.64, 116.30, 115.22, 114.31, 113.10, 61.32, 14.50. Pureté par HPLC : 73%.



(*E*)-3-(4-(Trifluorométhyl)styryl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**115**) : Le composé **42** (125 mg, 0.47 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (*E*)-(4-(trifluorométhyl)styryl)boronique (135 mg, 0.63 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (242 mg, 0.74 mmol) et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (17.0 mg, 0.02 mmol) dans un mélange dioxane :  $H_2O$  (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  40 : 60) a permis d'obtenir le composé **115** (58 mg, 35%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.43 (dt, 7.1 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.72 – 7.67 (m, 2H), 7.55 – 7.50 (m, 2H), 7.28 – 7.21 (m, 2H), 7.06 (t, 8.7 Hz, 2H), 6.92 (td, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 4.46 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.44 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.96, 145.18, 131.16, 128.34, 128.23, 126.22, 125.00, 119.59, 116.03, 115.74, 114.79, 114.16, 61.25, 14.51. Pureté par HPLC : 89%.



3-(Quinolin-3-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**118**) : Le composé **42** (150 mg, 0.56 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide quinoléin-3-ylboronique (130 mg, 0.75 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (291 mg, 0.89 mmol) et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (20.4 mg, 0.03 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  20 : 80) a permis d'obtenir le composé **118** (76 mg, 43%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.99 (d, 2.1 Hz, 1H), 8.35 (d, 1.8 Hz, 1H), 8.18 (d, 8.5 Hz, 1H), 7.98 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.88 (d, 7.9 Hz, 1H), 7.82 – 7.75 (m, 2H), 7.61 (t, 7.5 Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 6.85 (td, 6.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.33 (q, 7.1 Hz, 2H), 1.26 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.14, 151.38, 147.96, 144.94, 137.87, 134.34, 130.67, 129.51, 128.13, 127.40, 126.68, 125.84, 123.60, 121.60, 119.37, 114.32, 61.18, 14.25. Pureté par HPLC : 99%.



3-(1H-Indazol-5-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylate d'éthyle (**119**) : Le composé **42** (125 mg, 0.47 mmol) a été mis en réaction avec de l'acide (1H-indazol-5-yl)boronique (102 mg, 0.63 mmol), du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (242 mg, 0.74 mmol) et du Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (17.0 mg, 0.02 mmol) dans un mélange dioxane : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v : v) selon les conditions de réaction décrites pour le couplage de Suzuki (v). Une purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  10 : 90) a permis d'obtenir le composé **119** (33 mg, 23%), lequel a ensuite été purifié par CCM préparative (DCM : MeOH / 95 : 5). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.15 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.77 (d, 9.2 Hz, 1H), 7.64 (d, 8.6 Hz, 1H), 7.49 (d, 8.8 Hz, 1H), 7.31 – 7.29 (m, 1H), 6.82 (t, 6.7 Hz, 1H), 4.37 (q, 7.0 Hz, 2H), 1.31 (t, 7.1 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  166.92, 156.54, 144.36, 136.24, 129.47, 126.24, 124.03, 123.49, 119.11, 113.91, 110.53, 61.13, 14.33. Pureté par HPLC : 96%.

#### ANNEXE F

# SYNTHÈSE DES INHIBITEURS DE LA DNMT3A DÉRIVÉS DE LA PHTALIMIDE. PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Conditions générales utilisées

i) Conditions de réaction pour la formation de liaisons amides : L'anhydride 4-chloroformylphtalique (1 éq.) a été dissous dans le THF (8.0 ml \* mmol de l'anhydride), à 0°C sous argon. Ensuite, l'amine (1 éq), dissoute dans le THF (4.0 ml \* mmol de l'amine), a été additionnée doucement et la réaction a été laissée à la température ambiante pendant 3 h, sous atmosphère d'argon. À la fin de ce temps, le brut de la réaction a été filtré et lavé avec du THF froid. Le solide obtenu a ainsi été utilisé dans l'étape suivante de synthèse.

ii) Conditions de réaction pour la formation des phtalimides : Le composé amide correspondant (1 éq.) a été dissous dans le toluène (10.0 ml \* mmol de l'amide) sous argon. Ensuite, l'amine (1.17 éq) et la triéthylamine (0.01 éq.) ont été additionnées. Après l'ajout du DMF (2 ml \* mmol de l'amide), le mélange réactionnel a été homogénéisé et la réaction a été maintenue sous argon à 120°C pendant 3 h, puis refroidie à température ambiante. Le brut de la réaction a été dilué avec du HCl (aq., 1 M) et extrait avec de l'acétate d'éthyle. Après deux lavages avec du NaCl (aq., saturé), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.), filtrée et évaporée. Une purification par CLC a permis d'obtenir le composé attendu.



Acide (*S*)-5-bromo-2-(1,3-dioxo-2-(1-phényléthyl)isoindoline-5-carboxamido)benzoïque (**137**) : L'anhydride 4-chloroformylphtalique (488 mg, 2.30 mmol) et l'acide 2-amino-5-bromobenzoïque (500 mg, 2.31 mmol) ont été dissous dans le THF (20 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de liaisons amide (i), avec la particularité que la réaction a été effectuée à 60°C. Après avoir synthétisé l'intermédiaire acide 5-bromo-2-(1,3-dioxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxamido)benzoïque (**134**) (920 mg, quantitatif), une quantité donnée de ce composé (100 mg, 0.26 mmol) avec la (*S*)-1-phényléthan1-amine (38.7 µl, 0.30 mmol) et la triéthylamine (0.3 ml, 0.002 mmol) ont été dissous dans le toluène/DMF (3 ml/0.6 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de phtalimides (ii). Une purification par CLC (DCM : MeOH / 100 : 0 → 96 : 4) a permis d'obtenir le composé **139** (38 mg, 30%). Un échantillon de ce composé a été recristallisé à partir d'un mélange THF/MeOH. RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSOd<sub>6</sub>) :  $\delta$  12.79 (s, 1H), 8.56 (d, 8.9 Hz, 1H), 8.37 (dd, 7.8 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.12 (d, 2.1 Hz, 1H), 8.05 (d, 7.7 Hz, 1H), 7.80 (dd, 8.9 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.41 (d, 7.7 Hz, 2H), 7.34 (t, 7.7 Hz, 2H), 7.27 (t, 7.3 Hz, 1H), 5.49 (q, 7.2 Hz, 1H), 1.85 (d, 7.3 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  168.89, 167.47, 167.44, 163.43, 140.89, 140.25, 140.00, 136.48, 134.25, 134.04, 133.81, 132.58, 128.92, 127.79, 127.07, 124.30, 122.83, 121.62, 115.47, 49.49, 17.95. Pureté par HPLC : 87%. HRMS (ESI) calculée pour [C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> : 493.0394, trouvée : 493.0395.



Acide (*R*)-5-bromo-2-(1,3-dioxo-2-(1-phényléthyl)isoindoline-5-carboxamido)benzoïque (**138**): Le composé **134** (100 mg, 0.26 mmol), la (*R*)-1-phényléthan-1-amine (38.2 µl, 0.30 mmol) et la triéthylamine (0.3 ml, 0.002 mmol) ont été dissous dans le toluène/DMF (3 ml/0.6 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de phtalimides (ii). Une purification par CLC (DCM : MeOH / 100 :  $0 \rightarrow 96$  : 4) a permis d'obtenir le composé **138** (39 mg, 31%). Un échantillon de ce composé a été recristallisé à partir d'un mélange THF/MeOH. RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  12.92 (s, 1H), 8.56 (d, 8.9 Hz, 1H), 8.37 (dd, 7.8 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.13 (d, 2.4 Hz, 1H), 8.05 (d, 7.7 Hz, 1H), 7.80 (dd, 8.9 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.41 (d, 7.5 Hz, 2H), 7.34 (t, 7.7 Hz, 2H), 7.27 (t, 7.3 Hz, 1H), 5.49 (q, 7.2 Hz, 1H), 1.85 (d, 7.3 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  168.82, 167.48, 167.45, 163.42, 140.90, 140.30, 139.99, 136.35, 134.51, 134.04, 133.80, 132.59, 128.92, 127.79, 127.06, 124.29, 122.79, 121.63, 115.45, 49.49, 17.95. Pureté par HPLC : 99%. HRMS (ESI) calculée pour [C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> : 493.0394, trouvée : 493.0397.



Acide (S)-4-chloro-2-(1,3-dioxo-2-(1-phényléthyl)isoindoline-5-carboxamido)benzoïque (139) : L'anhydride 4-chloroformylphtalique (1.2 g, 5.7 mmol) et l'acide 2-amino-4-chlorobenzoïque (978 mg, 5.70 mmol) ont été dissous dans le THF (60 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de liaisons amide (i). Après avoir synthétisé l'intermédiaire acide 4-chloro-2-(1,3-dioxo-1,3dihydroisobenzofuran-5-carboxamido)benzoïque (135) (673 mg, 34%), une quantité donnée de ce composé (100 mg, 0.29 mmol) avec la (S)-1-phényléthan-1-amine (43.6 μl, 0.34 mmol) et la triéthylamine (0.4 ml, 0.003 mmol) ont été dissous dans le toluène/DMF (3 ml/0.6 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de phtalimides (ii). Une purification par CLC (DCM : MeOH / 100 : 0 → 95 : 5) a permis d'obtenir le composé 139 (75 mg, 58%). Un échantillon de ce composé a été recristallisé à partir d'un mélange THF/MeOH. RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 12.78 (s, 1H), 8.72 (d, 1.6 Hz, 1H), 8.37 (d, 7.8 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.07 - 8.05 (m, 2H), 7.41 (d, 7.7 Hz, 2H), 7.34 (t, 7.6 Hz, 2H), 7.30 - 7.26 (m, 2H), 5.49 (q, 7.2 Hz, 1H), 1.85 (d, 7.3 Hz, 3H); RMN- $^{13}$ C (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  167.43, 167.40, 163.70, 141.98, 140.88, 140.02, 138.63, 134.65, 134.05, 133.39, 132.62, 128.92, 127.80, 127.07, 124.35, 123.82, 121.59, 119.98, 49.52, 17.95. Pureté par HPLC : 97%. HRMS (ESI) calculée pour [C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> : 449.0899, trouvée : 449.0906.



Acide (*R*)-4-chloro-2-(1,3-dioxo-2-(1-phényléthyl)isoindoline-5-carboxamido)benzoïque (**140**) : Le composé **135** (100 mg, 0.29 mmol), la (*R*)-1-phényléthan-1-amine (43.6  $\mu$ l, 0.34 mmol) et la triéthylamine (0.4 ml, 0.003 mmol) ont été dissous dans le toluène/DMF (3 ml/0.6 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de phtalimides (ii). Une purification par CLC (DCM : MeOH / 100 : 0  $\rightarrow$  95 : 5) a

permis d'obtenir le composé **140** (73 mg, 56%). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  12.87 (s, 1H), 8.71 (d, 2.0 Hz, 1H), 8.37 (d, 7.8 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.07 – 8.05 (m, 2H), 7.41 (d, 7.7 Hz, 2H), 7.34 (t, 7.7 Hz, 2H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 5.49 (q, 7.2 Hz, 1H), 1.85 (d, 7.3 Hz, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  169.65, 167.43, 163.69, 141.98, 140.88, 140.05, 134.64, 134.05, 133.39, 132.62, 128.92, 127.79, 127.07, 124.35, 123.78, 121.60, 119.55, 49.52, 17.95. Pureté par HPLC : 98%. HRMS (ESI) calculée pour [C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> : 449.0899, trouvée : 449.0905.



Acide 4-(2-(furan-2-ylméthyl)-1,3-dioxoisoindoline-5-carboxamido)benzoïque (**141**) : L'anhydride 4chloroformylphtalique (1.5 g, 7.1 mmol) et l'acide 4-aminobenzoïque (977 mg, 7.12 mmol) ont été dissous dans le THF (84 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de liaisons amide (i). Après avoir synthétisé l'intermédiaire acide 4-(1,3-dioxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxamido)benzoïque (composé **136**) (1.5 g, 68%), une quantité donnée de ce composé (100 mg, 0.32 mmol) avec le furan-2ylméthanamine (33.2 µl, 0.38 mmol) et la triéthylamine (0.4 ml, 0.003 mmol) ont été dissous dans le toluène/DMF (3 ml/0.6 ml) selon les conditions de réaction décrites pour la formation de phtalimides (ii). La purification par CLC (DCM : MeOH / 100 : 0  $\rightarrow$  85 : 15) a permis d'obtenir le composé **141** (19 mg, 15%). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  10.84 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.40 (d, 7.8 Hz, 1H), 8.06 (d, 7.7 ppm, 1H), 7.97 – 7.93 (m, 5H), 7.58 (s, 1H), 6.41 (s, 2H), 4.81 (s, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  167.36, 167.13, 167.04, 164.54, 149.66, 143.25, 143.21, 140.44, 134.90, 130.74, 126.52, 124.00, 122.75, 120.22, 111.14, 108.69, 34.86. Pureté par HPLC : 62%. HRMS (APCI) calculée pour [C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> - H]<sup>-</sup> : 389.0779, trouvée : 389.0787.

#### **ANNEXE G**

# RESYNTHÈSE DU COMPOSÉ NSC319745 ET DE SON ANALOGUE, LA MOLÉCULE AK-I-85. PARTIE EXPÉRIMENTALE



Chlorure de 5-chloro-2-méthoxybenzoyle (**142**) : L'acide 5-chloro-2-méthoxybenzoïque (500 mg, 2.68 mmol) a été dissous dans du DCM (10 ml) et trois gouttes de DMF ont été ajoutées. La solution a été soumise à trois cycles vide-argon et refroidie à 0°C. Ensuite, une solution du chlorure d'oxalyle (0.6 ml, 6.7 mmol) dans du DCM (10 ml) a été additionnée doucement. La réaction a été laissée, sous atmosphère d'argon pendant 30 min à 0°C, puis à température ambiante pendant la nuit. Ensuite, le brut de la réaction a été évaporé et le composé **142** obtenu (538 mg, quantitatif) a ainsi été utilisé dans l'étape suivante de synthèse. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.02 (d, 2.66 Hz, 1H), 7.53 (dd, 9.0 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.95 (d, 9.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  163.03, 158.04, 135.77, 133.65, 125.39, 123.58, 113.58, 56.48.



5-Chloro-*N*-(4-hydroxyphénéthyl)-2-méthoxybenzamide (**38**) : Le 4-(2-aminoéthyl)phénol (134 mg, 0.98 mmol) a été dissous dans le DCM (anh.) (5 ml) et la triéthylamine a été ajoutée (0.5 ml, 3.4 mmol). La solution a été soumise à trois cycles vide-argon et refroidie à 0°C. Ensuite, une solution du composé **142** (200 mg, 0.98 mmol) dans du DCM (anh.) (5 ml) a été additionnée doucement. La réaction a été laissée, sous atmosphère d'argon pendant 3 h à 0°C, puis à température ambiante pendant la nuit. Le brut de la réaction a été dilué avec du DCM (20 ml) et après deux lavages consécutifs avec du HCl (aq., 1 M) (15 ml), NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (30 ml) et NaCl (aq., saturé) (30 ml), la phase organique a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  60 : 40) a permis d'obtenir le composé **38** 

(162 mg, 54%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) :  $\delta$  8.28 (s, 1H), 8.10 ppm (s(e), 1H), 8.02 ppm (d, 2.8 Hz, 1H), 7.46 ppm (dd, 8.5 Hz, 2.9 Hz, 1H), 7.17 – 7.12 ppm (m, 3H), 6.83 ppm (d, 8.5 Hz, 2H), 3.90 ppm (s, 3H), 3.66 – 3.59 ppm (m, 2H), 2.83 ppm (t, 7.1 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) :  $\delta$  163.15, 156.43, 155.99, 131.92, 130.89, 130.13, 129.75, 125.43, 123.68, 115.32, 113.81, 55.93, 41.30, 34.47. Pureté par HPLC : 94%.



Méthyl (E)-3-(4-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)éthyl)phényl)acrylate (144) : Le 2-(4-bromophényl)éthan-1-amine (1.5 ml, 10 mmol) a été dissous dans iPr-OH (60 ml) et la triéthylamine (2.7 ml, 19 mmol) a été ajoutée. Ensuite, le dicarbonate de di-tert-butyle (2.1 ml, 10 mmol) a été additionné doucement. La réaction a été laissée, sous atmosphère d'argon, à température ambiante pendant la nuit. Ensuite, le brut de la réaction a été évaporé. Après avoir synthétisé l'intermédiaire tert-butyl (4bromophénéthyl)carbamate (composé 143) (3 g, quantitatif), une quantité donnée de ce composé (500 mg, 1.67 mmol) a été dissoute, dans un tube scellé, dans du DMF (anh.) (5 ml) et la triéthylamine (0.5 ml, 3.3 mmol) a été ajoutée. La solution a été purgée avec de l'argon pendant 5 min et le  $PdCl_2(PPh_3)_2$  (58.5 mg, 0.08 mmol), le LiCl (141 mg, 3.33 mmol) et l'acrylate de méthyle (0.2 ml, 2.1 mmol) ont été additionnés. La réaction a été laissée sous argon à 130°C pendant la nuit. Le brut de la réaction a été dilué avec du DCM (20 ml) et après deux lavages consécutifs avec du NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (25 ml) et NaCl (aq., saturé) (25 ml), la phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporée. La purification par CLC (hexanes : AcOEt / 100 : 0  $\rightarrow$  80 : 20) a permis d'obtenir le composé **144** (244 mg, 48%). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.64 (d, 16.0 Hz, 1H), 7.43 (d, 8.1 Hz, 2H), 7.18 (d, 8.0 Hz, 2H), 6.38 (d, 16.0 Hz, 1H), 4.67 (s(e), 1H), 3.77 (s, 3H), 3.35 (q, 6.3 Hz, 2H), 2.79 (t, 7.0 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 167.48, 155.85, 144.58, 141.74, 132.60, 129.39, 128.30, 117.24, 79.24, 51.65, 41.56, 36.14, 23.38.



3-(4-(2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)éthyl)phényl)propanoate de méthyle (**145**) : Le composé **144** (243 mg, 0.79 mmol) a été dissous dans MeOH (15 ml). La solution a été soumise à trois cycles vide-Ar. Après avoir ajouté du 10% Pd/C, le système a été laissé sous vide et un ballon contenant de l'hydrogène a été installé. La réaction a été laissée pendant la nuit à température ambiante, puis soumise à trois cycles vide-Ar. Ensuite, la solution a été filtrée sur célite, sous argon, tandis qu'elle était lavée avec un mélange de DCM/MeOH (10%). Après évaporation, le composé **145** obtenu (242 mg, quantitatif) a ainsi été utilisé dans l'étape suivante de synthèse. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.09 (s, 4H), 4.72 (s(e), 1H), 3.62 (s, 3H), 3.34 – 3.28 (m, 2H), 2.88 (t, 7.7 Hz, 2H), 2.72 (t, 6.9 Hz, 2H), 2.58 (t, 7.7 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.29, 155.89, 138.51, 136.96, 128.93, 128.43, 79.02, 51.55, 41.81, 35.79, 35.64, 30.49, 28.40.



3-(4-(2-(5-Chloro-2-méthoxybenzamido)éthyl)phényl)propanoate de méthyle (**147**) : Le composé **145** (242 mg, 0.79 mmol) a été dissous dans du DCM (20 ml) et refroidie à 0°C sous argon. Ensuite, le TFA (4.2 ml, 0.1 mmol) a été additionné doucement et la réaction a été laissée à température ambiante pendant la nuit. Le brut de la réaction a été évaporé, redissous dans du DCM et concentré à nouveau (le cycle a été répété deux fois). Après avoir synthétisé l'intermédiaire 3-(4-(2-aminoéthyl)phényl)propanoate de méthyle (composé **146**) (159 mg, quantitatif), une quantité donnée de ce composé (100 mg, 0.48 mmol) a été dissoute dans le DCM (anh.) (5 ml) et la triéthylamine a été ajoutée (0.2 ml, 1.7 mmol). La solution a été soumise à trois cycles vide-argon et refroidie à 0°C. Ensuite, une solution du composé **142** (99 mg, 0.5 mmol) dans du DCM (anh.) (5 ml) a été additionnée doucement. La réaction a été laissée, sous atmosphère d'argon pendant 3 h à 0°C, puis à température ambiante pendant la nuit. Le brut de la réaction a été dilué avec du DCM (20 ml) et après deux lavages consécutifs avec du HCl (aq., 1 M) (15 ml), NaHCO<sub>3</sub> (aq., saturé) (30 ml) et NaCl (aq., saturé) (30 ml), la phase organique a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. Le

composé **147** obtenu (143 mg, 79%) a ainsi été utilisé dans l'étape suivante de synthèse. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.12 (d, 2.7 H, 1H), 7.81 (s(e), 1H), 7.29 (dd, 8.8 Hz, 2.7 Hz, 1H), 7.14 (s, 4H), 6.81 (d, 8.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.70 – 3.65 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.94 – 2.82 (m, 4H), 2.60 (t, 7.7 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.25, 163.83, 155.95, 138.70, 137.07, 132.16, 131.79, 129.01, 128.49, 126.51, 122.90, 112.83, 56.07, 51.60, 40.92, 35.65, 35.07, 30.48.



Acide 3-(4-(2-(5-chloro-2-méthoxybenzamido)éthyl)phényl)propanoïque (**31**) : Le composé **147** (140 mg, 0.37 mmol) a été dissous en THF (25 ml), à 0°C sous argon, et le LiOH (aq., 1 M, 1.9 mmol) a été ajouté doucement. La réaction a été laissée atteindre la température ambiante pendant la nuit. Le brut de la réaction a été concentré et redissous dans de l'Et<sub>2</sub>O (20 ml). Après extractions avec de l'eau (2 fois avec 20 ml), la phase aqueuse a été portée à pH 3 avec du HCl (aq., 1 M). La molécule organique a été extraite avec DCM (4 fois avec 10 ml), lavée avec NaCl (aq., saturé) (2 fois avec 20 ml), séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh.) et évaporé. Ainsi, le composé **31** (118 mg, 88%) a été obtenu sans purification additionnelle. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.14 (d, 2.8 H, 1H), 7.89 (t, 5.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, 8.8 Hz, 2.8 Hz, 1H), 7.17 (s, 4H), 6.82 (d, 8.9 Hz, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 5H), 2.95 (t, 7.7 Hz, 2H), 2.86 (t, 6.8 Hz, 2H), 2.67 (t, 7.6 Hz, 2H) ; RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  177.85, 164.12, 156.00, 138.58, 137.06, 132.32, 131.89, 129.06, 128.54, 126.62, 122.67, 112.82, 56.09, 40.97, 35.61, 35.00, 30.25. Pureté par HPLC : 97%.

### ANNEXE H

### DONNÉES CRISTALLOGRAPHIQUES

Acide (*R*)-5-bromo-2-(1,3-dioxo-2-(1-phényléthyl)isoindoline-5-carboxamido)benzoïque (138) :

## Datablock: gagn181

Bond precision:	C-C = 0.0196 A	= 0.0196 A Wavelength=1.34139				
Cell:	a=6.1053(5) alpha=90	b=39.553(3) beta=97.028(5)	c=8.4990(7) gamma=90			
Temperature:	150 K					
	Calculated	Reported				
Volume	2036.9(3)	2037.0(3)				
Space group	P 21	P 1 21 1				
Hall group	P 2yb	P 2yb				
Moiety formula	C24 H17 Br N2 O5	C24 H17 Br	N2 05			
Sum formula	C24 H17 Br N2 O5	C24 H17 Br	N2 05			
Mr	493.30	493.30				
Dx,g cm-3	1.609	1.609				
Z	4	4				
Mu (mm-1)	2.044	2.044				
F000	1000.0	1000.0				
F000'	998.40					
h,k,lmax	7,48,10	6,48,10				
Nref	7806[ 3964]	6995				
Tmin, Tmax	0.842,0.941	0.141,0.254	4			
Tmin'	0.736					
Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.141 Tmax=0.254 AbsCorr = MULTI-SCAN						
Data completeness= 1.76/0.90 Theta(max)= 55.044						
R(reflections) = 0.0668(4750) WR2(reflections) =						
s = 1 081	Nnar- 5	80	0.1001( 0332)			
3 - 1.001	Npar- 50	50				

Acide (S)-4-chloro-2-(1,3-dioxo-2-(1-phényléthyl)isoindoline-5-carboxamido)benzoïque (139) :

# Datablock: gagn121

Bond precision:	C-C = 0.0022 A	Wavelength=1.34139				
Cell: Temperature:	a=10.4124(3) alpha=90 150 K	b=9.4943(3 beta=100.2	3) 272(1)	c=25.7334(8) gamma=90		
Volume Space group Hall group Moiety formula Sum formula Mr Dx,g cm-3 Z Mu (mm-1) F000 F000' h,k,lmax Nref Tmin,Tmax Tmin'	Calculated 2503.19(13) P 21 P 2yb C24 H17 Cl N2 O5, C28 H25 Cl N2 O6 520.95 1.382 4 1.144 1088.0 1091.83 15,13,37 16338[ 8610] 0.728,0.882 0.660	С4 Н8 О	Reported 2503.19(13) P 1 21 1 P 2yb C24 H17 C1 C28 H25 C1 520.95 1.382 4 1.144 1088.0 15,13,37 13822 0.219,0.329	N2 05, C4 H8 0 N2 06		
Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.219 Tmax=0.329 AbsCorr = MULTI-SCAN						
R(reflections) = S = 1.071	s= 1.61/0.85 0.0339( 13679) Npar= 6	Ineta (ma 81	1x)= /8.394	wR2(reflections)= 0.0881( 13822)		

### **ANNEXE I**

#### SPECTRES RMN ET CHROMATOGRAMMES OBTENUS PAR RP-HPLC





#### Area % Report



100.00

2720126

100.00

33098450

Page 1 of 1






### Area % Report

Data File: Method: Acquired: Printed: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\Coup\_fev2021.rslt\YAR193ppA.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/18/2021 5:55:46 PM (GMT -05:00) 2/19/2021 9:32:27 AM (GMT -05:00)



### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.621	6134	0.00	331	0.00
1.611	2550239	0.41	228138	0.38
2.000	46348	0.01	3908	0.01
2.465	80801	0.01	3800	0.01
2.796	28582	0.00	2242	0.00
3.223	31296	0.01	2541	0.00
3.999	1206660	0.20	58246	0.10
5.086	605049705	98.42	59808940	99.07
5.805	1284481	0.21	67002	0.11
6.853	373927	0.06	20142	0.03
7.649	98133	0.02	4012	0.01
7.940	37132	0.01	3018	0.00
8.231	43035	0.01	2152	0.00
8.794	3176	0.00	258	0.00
9.183	8674	0.00	769	0.00
9.920	145062	0.02	6537	0.01
10.367	514827	0.08	25806	0.04
10.600	381270	0.06	22855	0.04
11.066	683945	0.11	18166	0.03
11.842	181787	0.03	11229	0.02
12.211	69002	0.01	4184	0.01
13.065	48990	0.01	2019	0.00
13.453	69255	0.01	3571	0.01
13.919	14275	0.00	1413	0.00
14.288	90653	0.01	9400	0.02
15.104	735339	0.12	29946	0.05
16.055	443071	0.07	17172	0.03
16.676	516997	0.08	12754	0.02

					Page 2 of 2
Totals					
	614742796	100.00	60370551	100.00	



 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YARR111D.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 12:57:00 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:54:22 PM (GMT -04:00)



### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.679	278	0.00	21	0.00
1.592	3655	0.00	522	0.01
1.883	167663	0.23	14175	0.19
2.407	16321	0.02	1014	0.01
2.796	20226	0.03	1364	0.02
3.591	58416	0.08	1810	0.02
4.465	472806	0.64	13489	0.18
5.067	43268	0.06	2373	0.03
5.572	130956	0.18	8573	0.12
6.601	67477365	90.74	7161052	96.84
9.338	171400	0.23	4983	0.07
12.696	804166	1.08	52460	0.71
12.968	1957694	2.63	45205	0.61
14.346	1229223	1.65	37478	0.51
15.201	1720211	2.31	45656	0.62
16.385	87751	0.12	4878	0.07
Totals				
	74361399	100.00	7395053	100.00



 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR136IIB.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 1:23:48 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:48:46 PM (GMT -04:00)



#### VWD: Signal A, 254 nm Results

234	nm	Results	

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.835	861	0.00	51	0.00
1.553	5638	0.00	675	0.00
1.864	108495	0.05	8580	0.06
2.834	16176	0.01	840	0.01
3.669	77721	0.04	2368	0.02
4.426	233424	0.11	13720	0.09
4.620	108860	0.05	9501	0.06
5.009	87814	0.04	2958	0.02
5.766	32852	0.02	1206	0.01
6.542	2753758	1.34	97739	0.65
7.125	1377743	0.67	74592	0.50
8.387	55708	0.03	4465	0.03
9.183	194983714	94.78	14261657	95.27
10.367	4180052	2.03	354619	2.37
11.085	181696	0.09	10232	0.07
11.415	67557	0.03	5698	0.04
11.997	93900	0.05	6217	0.04
12.269	86412	0.04	7735	0.05
12.502	141996	0.07	12568	0.08
12.716	109148	0.05	10623	0.07
13.026	25972	0.01	2656	0.02
13.356	72402	0.04	4454	0.03
13.667	5744	0.00	802	0.01
14.152	192834	0.09	14648	0.10
14.560	51562	0.03	3037	0.02
15.045	296263	0.14	23311	0.16
15.492	315161	0.15	30410	0.20
15.802	26450	0.01	2665	0.02

16.113	24799	0.01	1819	0.01	Page 2 of 2
Totals	205714712	100.00	14969846	100.00	



 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR115B.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 2:17:20 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:44:10 PM (GMT -04:00)



### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.107	1929	0.00	61	0.00
1.903	463287	0.55	43472	0.52
2.407	60727	0.07	3223	0.04
2.718	49121	0.06	3290	0.04
3.689	51904	0.06	1623	0.02
4.135	122926	0.15	5239	0.06
4.620	68800	0.08	4169	0.05
5.145	97224	0.11	2890	0.03
5.610	43173	0.05	2138	0.03
6.154	50161	0.06	2535	0.03
6.426	33752	0.04	2162	0.03
7.455	152215	0.18	5857	0.07
7.959	57442	0.07	3707	0.04
8.930	77474744	91.39	8166583	96.88
9.474	3346890	3.95	112120	1.33
10.619	681365	0.80	24738	0.29
13.046	887726	1.05	28050	0.33
14.463	584405	0.69	11466	0.14
14.987	57703	0.07	3732	0.04
17.608	485206	0.57	2950	0.03
Totals				
	84770700	100.00	8430005	100.00



Data File: Method: Acquired: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\Coup\_fev2021.rslt\YAR186C.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/18/2021 6:22:31 PM (GMT -05:00) 2/19/2021 9:30:42 AM (GMT -05:00)

Printed:



VWD: Signal A, 254 nm Besults				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.194	736	0.00	65	0.00
0.485	2992	0.00	216	0.00
0.699	6477	0.01	321	0.00
1.398	20628	0.02	891	0.01
1.767	109566	0.13	5694	0.07
2.834	102855	0.12	7401	0.09
3.145	125212	0.14	10668	0.13
3.475	155382	0.18	9092	0.11
3.921	206112	0.24	8093	0.10
4.310	121991	0.14	9027	0.11
4.582	167337	0.19	10068	0.12
4.873	323046	0.37	10059	0.12
5.630	75555	0.09	5784	0.07
6.076	192755	0.22	7657	0.09
6.639	364074	0.42	24875	0.29
6.931	246028	0.28	8586	0.10
8.794	82020842	94.28	8132919	96.36
9.377	533251	0.61	43247	0.51
9.629	90725	0.10	10218	0.12
9.862	182366	0.21	12554	0.15
10.541	100316	0.12	5599	0.07
10.871	102815	0.12	8194	0.10
11.124	191103	0.22	11451	0.14
11.920	333236	0.38	22542	0.27
12.444	485077	0.56	26348	0.31
12.871	185018	0.21	17443	0.21
13.453	36782	0.04	3118	0.04
14.075	292554	0.34	8017	0.09
14.638	72897	0.08	4057	0.05
				Page 2 o
15.007	33752	0.04	3166	0.04
15.298	27586	0.03	2894	0.03
15.531	9262	0.01	997	0.01
16.152	41777	0.05	3549	0.04
10.812	38181	0.04	4977	0.00
Totals				
	86998286	100.00	8439787	100.00



 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR115B.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 2:17:20 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:44:10 PM (GMT -04:00)



### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.107	1929	0.00	61	0.00
1.903	463287	0.55	43472	0.52
2.407	60727	0.07	3223	0.04
2.718	49121	0.06	3290	0.04
3.689	51904	0.06	1623	0.02
4.135	122926	0.15	5239	0.06
4.620	68800	0.08	4169	0.05
5.145	97224	0.11	2890	0.03
5.610	43173	0.05	2138	0.03
6.154	50161	0.06	2535	0.03
6.426	33752	0.04	2162	0.03
7.455	152215	0.18	5857	0.07
7.959	57442	0.07	3707	0.04
8.930	77474744	91.39	8166583	96.88
9.474	3346890	3.95	112120	1.33
10.619	681365	0.80	24738	0.29
13.046	887726	1.05	28050	0.33
14.463	584405	0.69	11466	0.14
14.987	57703	0.07	3732	0.04
17.608	485206	0.57	2950	0.03
Totals				
	84770700	100.00	8430005	100.00



### Area % Report

Data File:

 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR137IIB.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 2:44:06 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:49:26 PM (GMT -04:00)



VWD: Signal A,
254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.679	1353	0.00	85	0.00
0.912	674	0.00	59	0.00
1.572	8707	0.01	807	0.01
1.883	52297	0.04	4303	0.03
2.912	7033	0.00	668	0.00
3.669	63129	0.04	1956	0.01
4.407	233361	0.16	12197	0.08
4.970	53219	0.04	2676	0.02
5.222	29745	0.02	2031	0.01
5.805	36656	0.03	1455	0.01
6.096	40793	0.03	2969	0.02
6.562	67788	0.05	3466	0.02
6.814	8410	0.01	922	0.01
7.474	146149	0.10	7504	0.05
7.785	60172	0.04	4324	0.03
8.309	54080	0.04	3719	0.02
8.891	257534	0.18	14558	0.09
9.435	191479	0.13	9066	0.06
9.959	12319	0.01	1177	0.01
10.483	54128	0.04	4596	0.03
10.794	19357	0.01	2023	0.01
11.085	35471	0.02	4003	0.03
11.706	138936662	96.43	15031933	97.21
12.211	2024954	1.41	202762	1.31
13.026	69323	0.05	5738	0.04
13.279	72467	0.05	7402	0.05
13.551	158980	0.11	14530	0.09
14.308	39851	0.03	2447	0.02
				Page 2 of 2
14.793	126308	0.09	7598	0.05
15.434	1166028	0.81	102223	0.66
15.725	24556	0.02	2731	0.02
16.191	21572	0.01	1649	0.01
Totals				
	144074555	100.00	15463577	100.00





Data File:

```
      Data File:

      D:\Resultats\Yare\PS_3114\PS3114_Combinations\PS3114_CombinationsOctobre.rslt\YAR139B.DAT

      Method:
      C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

      Acquired:
      10/13/2020 3:10:50 PM (GMT -04:00)

      Printed:
      10/13/2020 4:50:40 PM (GMT -04:00)
```



VWD: Signal A,
254 nm Results

	Height %	Height	Area %	Area	Retention Time
	0.00	47	0.00	1069	0.815
	0.12	29192	0.15	355256	1.864
	0.02	4657	0.04	94817	2.368
	0.01	2092	0.01	33310	2.737
	0.00	1117	0.02	42991	3.708
	0.02	5245	0.05	115185	4.679
	0.02	5924	0.03	73318	5.009
	0.04	9356	0.11	262458	5.630
	0.02	4574	0.04	97061	6.115
	0.02	5397	0.03	76653	6.601
	0.00	1033	0.00	8864	6.911
	0.15	37412	0.17	410764	7.241
	0.06	15113	0.14	322922	7.785
	0.09	21546	0.11	265421	8.367
	0.06	15829	0.11	265900	8.911
	0.05	13519	0.14	323206	9.454
	0.12	28981	0.29	697055	10.483
	0.38	93617	0.57	1345325	11.104
	0.71	176649	0.76	1797391	11.629
	95.78	23755635	94.05	223682581	12.036
	0.88	218094	1.10	2619902	12.541
	0.22	55254	0.28	656263	12.852
	0.21	51004	0.30	707779	13.337
	0.12	30903	0.19	448635	13.686
	0.09	22619	0.13	311083	13.919
	0.08	20016	0.18	424027	14.249
	0.06	14683	0.10	246685	14.948
	0.17	40934	0.36	854252	15.239
Page 2 of					
	0.39	97760	0.43	1027490	15.997
	0.00	1137	0.00	10147	16.463
	0.02	5008	0.02	48657	16.754
	0.01	3278	0.03	60479	17.045
	0.05	12624	0.05	116834	17.336
	0.01	3190	0.01	29217	17.744
					Totals
	100.00	24803439	100.00	237832997	



### Area % Report

Data File:

 Data File:

 D:\Resultas\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR116BppB.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 3:37:34 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:48:01 PM (GMT -04:00)



VWD: Signal A,	
254 nm Results	

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	_
1.864	816068	0.14	66940	0.11	
2.368	161684	0.03	8573	0.01	
2.679	67621	0.01	5258	0.01	
3.941	336214	0.06	8401	0.01	
4.310	172958	0.03	10329	0.02	
4.640	305710	0.05	24228	0.04	
5.145	856028	0.15	50636	0.09	
5.727	231805	0.04	14989	0.03	
6.096	602549	0.10	40265	0.07	
6.368	223758	0.04	18527	0.03	
6.795	1293568	0.22	96486	0.16	
7.183	1266750	0.22	99485	0.17	
7.494	6698779	1.14	640411	1.08	
8.018	1397862	0.24	79301	0.13	
8.736	558550093	95.47	57117999	96.56	
9.280	1718815	0.29	141917	0.24	
9.629	3060399	0.52	192870	0.33	
9.901	901903	0.15	69953	0.12	
10.289	1169802	0.20	58564	0.10	
10.755	466251	0.08	33562	0.06	
11.066	215278	0.04	16912	0.03	
11.337	295298	0.05	16653	0.03	
11.726	1070687	0.18	94434	0.16	
12.114	234687	0.04	15110	0.03	
12.347	195724	0.03	16542	0.03	
12.988	765324	0.13	63333	0.11	
13.318	124401	0.02	8030	0.01	
13.803	89986	0.02	7905	0.01	
					Page 2 of 2
14.269	544459	0.09	48807	0.08	
14.812	41043	0.01	4612	0.01	
15.123	587271	0.10	41481	0.07	
15.647	185438	0.03	13747	0.02	
15.997	260368	0.04	11420	0.02	
16.443	13169	0.00	1887	0.00	
16.754	71805	0.01	6294	0.01	
17.025	39246	0.01	2796	0.00	
17.433	23168	0.00	1247	0.00	
Totals					
	585055969	100.00	59149904	100.00	





 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR147B.dat

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 4:04:20 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:51:11 PM (GMT -04:00)



### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.155	332	0.00	44	0.00
1.903	961638	0.41	59354	0.41
2.330	315847	0.14	15894	0.11
3.223	652996	0.28	24439	0.17
4.504	70958072	30.40	4534968	31.50
5.028	8097849	3.47	419076	2.91
6.309	140587775	60.23	9037150	62.76
7.959	583588	0.25	21373	0.15
9.066	300400	0.13	7357	0.05
10.425	1351485	0.58	52844	0.37
10.794	606359	0.26	33222	0.23
11.493	4537206	1.94	82435	0.57
12.541	3698894	1.58	68576	0.48
14.113	185225	0.08	6864	0.05
17.161	442959	0.19	27731	0.19
19.763	143178	0.06	7592	0.05
Totals				
	233423803	100.00	14398919	100.00



Volts

Data File:	: D:\Resultats\Y	'are\2022_03_18 Var	ios PS			
NSC_MS	20220318_Varios_PS	3114_NSC_MS.rslt\Y	YAR155B.dat			
Method:	C:\Enterprise\l	Projects\Etudiant\Met	thod\Trang\Ana	lyse manuelle.me	t	
Acquired	: 3/19/2022 9:10	):08 PM (GMT -04:0	0)	•		
Printed:	3/21/2022 10:2	22:32 AM (GMT -04:	:00)			
			,			
-	VWD: Signal A. 229	nm		1	1	
	Retention Time					-
4000 -						4000
						Ę
 د						-
2000 -				<u>+</u>		2000
		0.10				-
-	15	27(				Ē
	4 00	യ്ത്				-
0-	6					0
(	0 5	10	15	20	25	30
			Minutes			
VWD: S	Signal A,					
229 nm	Results					
Ret	tention Time	Area	Area %	Height	Height %	
	4.154	2804844	0.33	39581	0.05	
	6.406	833170490	99.46	75985378	99.84	

8.270	708734	0.08	31339	0.04
9.415	982090	0.12	53030	0.07
Totals	837666158	100.00	76109328	100.00



















Data File: D:\Resultats\Yare\2022\_03\_18 Varios PS NSC\_MS\20220318\_Varios\_PS3114\_NSC\_MS.rslt\YAR156B.dat Method: C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\Analyse manuelle.met Acquired: 3/19/2022 9:41:54 PM (GMT -04:00) Printed: 3/21/2022 10:24:28 AM (GMT -04:00) Retention Time 2000 2000 Volts Volts 1000 1000 8.542 9.357 3.747 6.795 992 0 0 5 10 15 Minutes 20 25 30 0 VWD: Signal A, 229 nm Results Retention Time Area % Height Height % Area 3.747 2290698 0.49 40456 0.09 5.766 452227287 42313715 98.54 97.67 6.795 6997016 500120 1.51 1.16 8.542 893228 0.19 24766 0.06 9.357 595726 0.13 62646 0.15 Totals 463003955 100.00 42941703 100.00

Page 1 of 1

220






#### Area % Report

Data File: Method: Acquired: Printed: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_fev2021\_II.rslt\YAR213.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/22/2021 11:33:39 AM (GMT -05:00) 2/22/2021 2:35:00 PM (GMT -05:00)



### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.204	279830628	96.04	16826236	97.25
2.077	1322971	0.45	87334	0.50
3.126	1522625	0.52	85241	0.49
3.456	129936	0.04	14603	0.08
3.844	289484	0.10	17706	0.10
4.562	335696	0.12	11837	0.07
4.931	286492	0.10	10496	0.06
5.552	142984	0.05	5260	0.03
6.329	191043	0.07	4448	0.03
6.717	1042645	0.36	59696	0.35
6.931	2424203	0.83	56563	0.33
8.115	245716	0.08	6979	0.04
9.144	133623	0.05	7191	0.04
9.454	189491	0.07	7923	0.05
10.017	140926	0.05	5143	0.03
12.327	20236	0.01	700	0.00
13.958	74109	0.03	2816	0.02
15.104	791156	0.27	22798	0.13
15.511	470893	0.16	19869	0.11
15.841	384292	0.13	17905	0.10
16.385	669280	0.23	17238	0.10
17.472	98810	0.03	4744	0.03
19.258	645475	0.22	8764	0.05
Totals				
	291382714	100.00	17301490	100.00









Data File: Method: Acquired: Printed:	D:\Resultats\Yare\PS_3114\Couplage3\Coplageamines3.rslt\YAR074.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\0-65 13min purif N21Q-Alexa.met 11/22/2019 11:39:18 AM (GMT -05:00) 11/25/2019 3:00:18 PM (GMT -05:00)								
100 -		254 nm		<u>-</u>			       	100	
sto > 50 -		6.038						50	Volts
- - 0 -		9 9	8.87				V	0	
0.	0 2.5 5	.0 7.5	10.0	12.5 Minutes	15.0	17.5 20	.0 22.5	25.0	

VWD: Signal A,				
254 nm Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.038	15856981	46.95	953861	33.06
6.406	17181518	50.87	1879979	65.16
8.872	734474	2.17	51211	1.78
Totals				
	33772973	100.00	2885051	100.00











D:\Resultats\Yare\PS\_3114\Couplage\_amines\_2\Coplageamines2.rslt\YAR065.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\0-65 13min purif N21Q-Alexa.met 11/19/2019 5:20:12 PM (GMT -05:00) Data File: Method: Acquired: Printed: 11/20/2019 9:43:47 AM (GMT -05:00) Retention Time 300 300 200 200 Volts Volts 11.745 100 100 3.046 0 0 12.5 0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 15.0 17.5 20.0 22.5 25.0 Minutes VWD: Signal A, 254 nm Results Height % Retention Time Area Area % Height 11.745 186483 0.52 0.38 26480 13.046 48510438 99.62 5034995 99.48 Totals

100.00

5061475

100.00

48696921

Page 1 of 1

## 232











Data File:	D:\Resu	ltats\Yaı	e\PS_31	14\Coup	lage4.rsl	t\YAR(	)94.dat					
Method:	C:\Enter	rprise\Pro	ojects\E	tudiant\M	lethod 1	rang\0-0	55 13mi	n purif N	21Q-AI	exa.met		
Acquired:	1/14/20	20 5:58:2	50 PM (9	JMI -05	:00)							
Printed:	1/15/202	20 11:32	:55 AM	(GM1 -(	J5:00)							
300 -	VAND, Ciam	01 0 254 mm										
-	Retention Tim	e i									-	
200		 		<u> </u> -			-			<del> </del> 	200	
olts												olts
> 100 -						5						>
				8.87	120	13.5						
0				┍┤╴┟	<u> </u>					<u> </u>		
1 0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	1	5.0	17.5	20.0	22.5	25.0	
					Minute	S						
VWD: Sig	gnal A,											
254 nm R	esults											
Reter	ntion Time			Area	Ar	ea %		Height		Height %		
	8.872			749068		1.71		47276		1.02		
	10.697		42	122826	ç	96.39	4	478510		97.02		
	13.551			827477		1.89		90501		1.96		
	Totals											
			43	699371	10	00.00	4	616287		100.00		







D:\Resultats\Yare\PS\_3114\Couplage4.rslt\YAR087.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\0-65 13min purif N21Q-Alexa.met 1/14/2020 5:31:45 PM (GMT -05:00) Data File: Method: Acquired: Printed: 1/15/2020 11:31:42 AM (GMT -05:00) 2000 2000 Retention Time Volts Volts 1000 1000 10.658 11.978 8.872 6.251 745 0 · 0 0.0 2.5 5.0 12.5 15.0 17.5 20.0 22.5 25.0 7.5 10.0 Minutes VWD: Signal A, 254 nm Results Height % Retention Time Area Area % Height 6.251 0.13 686460 0.21 42035 8.872 926101 0.28 59224 0.18 9.745 321803284 98.66 32406257 98.87 10.658 1578969 143393 0.48 0.44 11.978 1176379 0.36 126638 0.39 Totals 326171193 100.00 100.00 32777547







Data File:	D:\Resultats\Yare\PS_3114\PS3114CoupAmide_feb2.rslt\YAR107.dat
Method:	C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\0 100 20min good 254nm.met
Acquired:	2/26/2020 10:19:48 AM (GMT -05:00)
Printed:	2/26/2020 12:23:57 PM (GMT -05:00)
3000	VWD: Signal A, 254 nm



VWD: Signal A, 254 nm Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
10.774	1997628	0.43	198536	0.40
11.570	466574236	99.38	48794360	99.48
12.172	904509	0.19	57435	0.12
Totals				
	469476373	100.00	49050331	100.00



Data Meth Acqu Print	File: nod: uired: ted:	D:\Resultats\Yare\PS_3114\PS3114_CoupAminefeb2020.rslt\YAR104.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\0 100 20min good 254nm.met 2/17/2020 5:15:13 PM (GMT -05:00) 2/19/2020 5:01:19 PM (GMT -05:00)							
	-	Retention	: Signal A, 254 nr Time	n I I					
	500 -						·		
Volts	250 -				172 12.755 13.162				
	0								0
	0.0	2.5	5.0	7.5 10	0.0 12.5 Minutes	15.0 17.	5 20.0	22.5	25.0
VW 254	VD: Sig I nm R	gnal A, esults							
	Reter	ntion Time		Are	ea Area	6 He	ight	Height %	
		12.172		9941727	4 99.9	0 10482	701	99.92	
		12.755		9789	0.1	0 7	59/	0.07	
		13.162		421	0.0	U	572	0.01	
		Totals		9951938	33 100.0	0 10490	870	100.00	













#### Area % Report

Data File:





#### VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.572	12198	0.01	1096	0.01
1.864	81743	0.04	3863	0.02
2.737	107186	0.06	5011	0.03
3.067	135267	0.07	5583	0.03
3.475	70003	0.04	4072	0.02
4.135	137061	0.07	4076	0.02
4.853	128244	0.07	3065	0.02
5.164	43507	0.02	2682	0.01
5.727	52934	0.03	1844	0.01
6.503	60276	0.03	2005	0.01
6.911	193073	0.10	16433	0.08
7.377	69038	0.04	3670	0.02
7.979	57675	0.03	3637	0.02
8.425	36794	0.02	3597	0.02
9.047	875046	0.47	45764	0.23
9.415	585607	0.31	48612	0.25
10.250	182064654	97.08	19405401	98.06
10.813	393536	0.21	36636	0.19
11.221	420983	0.22	29898	0.15
11.900	570020	0.30	33232	0.17
12.483	291841	0.16	29707	0.15
12.813	145687	0.08	15043	0.08
13.085	165256	0.09	15765	0.08
13.356	42064	0.02	4518	0.02
13.822	448318	0.24	39274	0.20
14.385	18773	0.01	1891	0.01
15.104	310847	0.17	20575	0.10
15.608	26898	0.01	2031	0.01

#### Page 2 of 2

Totals				
	187544529	100.00	19788981	100.00



#### Area % Report



# VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	_
0.874	4857	0.00	213	0.00	-
1.242	8564	0.01	455	0.00	
1.553	9550	0.01	883	0.01	
1.903	50484	0.03	3396	0.02	
2.427	5195	0.00	299	0.00	
2.912	14254	0.01	895	0.01	
3.650	63593	0.04	1908	0.01	
4.290	91951	0.06	3097	0.02	
5.222	127859	0.08	2494	0.01	
5.766	49450	0.03	1911	0.01	
6.503	585870	0.37	36214	0.22	
7.338	73393	0.05	3720	0.02	
7.707	33987	0.02	2112	0.01	
8.425	9516	0.01	310	0.00	
8.872	237590	0.15	13481	0.08	
9.629	235122	0.15	12983	0.08	
9.920	14377	0.01	1485	0.01	
10.328	92195	0.06	10076	0.06	
10.677	32452	0.02	3369	0.02	
11.124	375430	0.24	33908	0.20	
11.570	563924	0.36	63237	0.38	
11.959	152068834	96.91	16260018	97.60	
12.522	1313620	0.84	131040	0.79	
13.143	68286	0.04	4117	0.02	
13.648	28513	0.02	3012	0.02	
14.308	130704	0.08	9069	0.05	
14.618	35112	0.02	3899	0.02	
15.104	281443	0.18	19772	0.12	
					Page 2 of 2
15.608	191114	0.12	18532	0.11	
15.841	30495	0.02	3693	0.02	
16.230	24246	0.02	2623	0.02	
17.297	24833	0.02	2674	0.02	
18.676	41381	0.03	4514	0.03	
Totals					
	156918194	100.00	16659409	100.00	


Data File: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR158C.DAT Method: C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met Acquired: 10/13/2020 11:36:41 AM (GMT -04:00) 10/13/2020 4:52:13 PM (GMT -04:00) Printed: Retention Time al A.<sup>1</sup>254 nm 1000 1000 Volts Volts 500 500 17.919 18.753 19.336 12.929 2.446 2.970 3.941 9.085 9.474 0.641 0 0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 Minutes 15.0 17.5 20.0 22.5 25.0 0.0 VWD: Signal A, 254 nm Results Retention Time Area % Height Height % Area 0.641 5143 0.00 134 0.00 5905389 258381 1.301 2.46 1.29 107151 2.446 3414346 1.42 0.53 2.970 1819546 0.76 103596 0.52 3.941 27386 0.01 851 0.008.425 216864096 90.32 19276133 95.92 9.085 3446581 1.44 201232 1.00 9.474 6300481 2.62 106681 0.53 12.929 366789 0.15 0.04 7146 17.919 1751508 0.73 24043 0.12 18.753 161725 0.07 7705 0.04 19.336 54648 0.02 2202 0.01 Totals 240117638 100.00 20095255 100.00



 Data File:

 D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_Combinations\PS3114\_CombinationsOctobre.rslt\YAR165C.DAT

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met

 Acquired:
 10/13/2020 12:30:13 PM (GMT -04:00)

 Printed:
 10/13/2020 4:53:41 PM (GMT -04:00)



VWD: Signal A,	
254 nm Results	

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.204	16021	0.02	432	0.01
1.553	12376	0.02	886	0.01
1.844	28645	0.03	2629	0.04
2.077	7897	0.01	810	0.01
2.368	3998	0.00	287	0.00
2.912	9623	0.01	698	0.01
3.669	47471	0.06	1458	0.02
4.271	72850	0.09	2905	0.04
5.242	96960	0.12	1906	0.03
5.805	26922	0.03	1153	0.02
6.678	235607	0.29	14461	0.20
7.571	365337	0.44	21477	0.29
7.901	95252	0.12	10161	0.14
8.309	25532	0.03	2386	0.03
8.833	255385	0.31	14339	0.20
9.357	226461	0.28	10589	0.14
9.843	117682	0.14	11192	0.15
10.347	76285666	92.77	6889422	94.12
11.143	2559966	3.11	209184	2.86
11.706	55463	0.07	4859	0.07
12.133	110986	0.13	7844	0.11
12.813	1028630	1.25	63554	0.87
13.609	66908	0.08	6645	0.09
13.939	237144	0.29	15214	0.21
14.346	5712	0.01	652	0.01
14.657	81990	0.10	9021	0.12
15.065	128064	0.16	13333	0.18
15.569	23702	0.03	2434	0.03

Page 2 of 2

Totals				
	82228250	100.00	7319931	100.00



Data File: Method: Acquired: Printed: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_fev2021\_II.rslt\YAR203B.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/22/2021 11:06:54 AM (GMT -05:00) 2/22/2021 2:33:40 PM (GMT -05:00)



## VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.349	366	0.00	41	0.00
0.621	291	0.00	34	0.00
1.553	4655050	0.95	289209	0.72
2.058	232692	0.05	9514	0.02
2.388	188070	0.04	10003	0.02
3.203	1260192	0.26	83815	0.21
3.475	1426515	0.29	126461	0.31
4.154	35615229	7.25	1958644	4.86
6.154	539414	0.11	19420	0.05
6.931	415859498	84.63	36940115	91.64
8.561	196911	0.04	7462	0.02
9.202	469880	0.10	23228	0.06
9.687	192119	0.04	9649	0.02
10.173	475622	0.10	22255	0.06
10.522	222204	0.05	11986	0.03
11.337	6430407	1.31	341160	0.85
11.590	21066623	4.29	365910	0.91
14.191	31545	0.01	2236	0.01
15.065	266269	0.05	8505	0.02
15.647	18212	0.00	1121	0.00
16.890	895123	0.18	27123	0.07
17.142	315202	0.06	20318	0.05
17.472	281075	0.06	15062	0.04
18.190	518008	0.11	13433	0.03
18.870	204885	0.04	3819	0.01
Totals				
	491361402	100.00	40310523	100.00



### Area % Report

Data File: Method: Acquired: Printed: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\Coup\_fev2021.rslt\YAR209B.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/18/2021 5:29:02 PM (GMT -05:00) 2/19/2021 9:36:52 AM (GMT -05:00)



# VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.272	2807	0.00	129	0.00
0.582	9310	0.01	382	0.00
1.029	18008	0.02	744	0.01
1.398	16468	0.02	1238	0.02
1.747	127169	0.15	5237	0.06
2.893	111780	0.13	5524	0.07
3.553	189254	0.22	4565	0.06
5.028	381781	0.45	6372	0.08
5.300	109557	0.13	6109	0.08
5.533	123084	0.14	5552	0.07
6.057	112514	0.13	5858	0.07
6.309	76594	0.09	5911	0.07
6.756	74736042	87.91	7681244	94.81
7.105	268930	0.32	21016	0.26
7.668	1702265	2.00	90805	1.12
8.212	948041	1.12	57940	0.72
8.425	791809	0.93	55828	0.69
8.717	959985	1.13	29712	0.37
9.668	246845	0.29	12195	0.15
10.017	301153	0.35	12048	0.15
12.036	2240056	2.64	41552	0.51
12.386	1199283	1.41	37474	0.46
13.803	79660	0.09	3483	0.04
14.968	257596	0.30	11141	0.14
Totals				
	85009991	100.00	8102059	100.00



Data File: Method: Acquired: Printed: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_fev2021\_II.rslt\YAR173B.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/22/2021 10:13:25 AM (GMT -05:00) 2/22/2021 2:31:50 PM (GMT -05:00)



## VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.447	29177	0.01	362	0.00
1.262	35056	0.01	2004	0.01
1.611	1847243	0.61	166881	0.48
2.194	108861	0.04	4320	0.01
2.854	1489914	0.49	94136	0.27
3.708	59767	0.02	4988	0.01
4.193	292733227	96.72	33785889	98.14
5.222	20242	0.01	906	0.00
7.688	244357	0.08	6686	0.02
8.794	776373	0.26	36614	0.11
9.415	482194	0.16	24655	0.07
9.745	164089	0.05	11667	0.03
10.250	277019	0.09	16491	0.05
10.541	92544	0.03	8207	0.02
10.891	1083001	0.36	102150	0.30
11.609	405502	0.13	19316	0.06
11.939	476904	0.16	26612	0.08
12.522	151107	0.05	8738	0.03
13.123	491462	0.16	25366	0.07
13.453	556581	0.18	24648	0.07
13.861	215281	0.07	15128	0.04
14.094	616908	0.20	14152	0.04
15.589	116627	0.04	9286	0.03
15.900	107931	0.04	10616	0.03
16.346	63892	0.02	5516	0.02
16.754	10485	0.00	638	0.00
Totals				



Data File:D:\Resultats\Yare\PS\_3114\PS3114\_fev2021\_II.rslt\YAR191B.datMethod:C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.metAcquired:2/22/2021 10:40:10 AM (GMT -05:00)Printed:2/22/2021 2:32:57 PM (GMT -05:00)



Page 1 of 1

## VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.272	1786	0.00	85	0.00
0.563	4123	0.01	248	0.00
0.932	7207	0.01	450	0.01
1.398	20695	0.03	1077	0.02
1.708	115507	0.19	6825	0.11
2.951	96185	0.16	3625	0.06
3.553	165585	0.28	5239	0.09
3.960	70937	0.12	4118	0.07
4.349	93821	0.16	4613	0.08
5.164	3372721	5.69	185654	3.06
5.999	301212	0.51	10874	0.18
6.872	1012243	1.71	76649	1.26
7.086	1057100	1.78	103854	1.71
7.629	48637315	82.04	5469200	90.22
8.367	345357	0.58	22740	0.38
8.697	175881	0.30	13326	0.22
9.318	2313732	3.90	80071	1.32
9.687	1315080	2.22	60998	1.01
11.415	12681	0.02	610	0.01
13.046	36569	0.06	315	0.01
14.191	50718	0.09	4250	0.07
15.337	43814	0.07	3073	0.05
17.977	37051	0.06	4046	0.07
Totals				
	59287320	100.00	6061940	100.00



### Area % Report

Data File:D:\Resultats\Yare\2022\_03\_18 Varios PSNSC\_MS\20220318\_Varios\_PS3114\_NSC\_MS.rslt\YAR215ppA.datMethod:C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\Analyse manuelle.metAcquired:3/19/2022 10:13:39 PM (GMT -04:00)Printed:3/21/2022 10:26:07 AM (GMT -04:00)



VW	D:	Sig	nal	A,
229	nn	R R	sul	te

229 IIII Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3.397	1150149	0.38	28352	0.13
4.892	100991869	33.46	4404959	19.60
5.300	197749577	65.51	17895060	79.63
7.921	742738	0.25	29242	0.13
8.911	1205626	0.40	116112	0.52
Totals				
	301839959	100.00	22473725	100.00











### Area % Report





VWD: Signal A,

229 nm Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3.766	1307163	0.50	17747	0.07
4.426	836519	0.32	25044	0.10
9.454	2996533	1.14	76927	0.30
10.425	251574503	96.03	25171488	98.11
11.609	2153894	0.82	174748	0.68
13.570	3113034	1.19	191492	0.75
16.346	5207	0.00	0	0.00
Totala				
Totals	2(108(852	100.00	25657446	100.00
	201980855	100.00	2365/446	100.00



### Area % Report

Data File:D:\Resultats\Yare\2022\_03\_18 Varios PSNSC\_MS\20220318\_Varios\_PS3114\_NSC\_MS.rslt\YAR258ppA.datMethod:C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\Analyse manuelle.metAcquired:3/20/2022 2:59:37 AM (GMT -04:00)Printed:3/21/2022 10:31:57 AM (GMT -04:00)



229 nm Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3.689	1622779	0.53	21368	0.07
7.416	3444097	1.14	270450	0.93
9.415	297913620	98.20	28898421	98.87
12.657	402622	0.13	38952	0.13
Totals				
	303383118	100.00	29229191	100.00



Data File: D:\Resultats\Yare\2022\_03\_18 Varios PS 

 Msc Ms/20220318\_Varios\_PS3114\_NSC\_MS.rsl/YAR235ppA.dat

 Method:
 C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\Analyse manuelle.met

 Acquired:
 3/20/2022 1:56:04 AM (GMT -04:00)

 Printed:
 3/21/2022 10:31:16 AM (GMT -04:00)

 Retention Time al A, 229 nm 2000 2000 Volts 1000 1000 Volts 16.346 7.416 11.454 3.921 8.697 0 0 10 15 Minutes 20 25 30 0 5 VWD: Signal A, 229 nm Results Retention Time Area % Height Height % Area 3.921 1944012 0.61 19693 0.06 7.416 5151006 447405 1.61 1.35 312262403 32594002 98.53 8.697 97.77 11.454 31224 0.01 19831 0.06 16.346 1459 0.00 0.000 Totals 319390104 100.00 33080931 100.00









### Area % Report





#### VWD: Signal A, 229 nm Results

and min recourts				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
3.475	1615265	0.20	32042	0.06
6.562	3410268	0.42	122278	0.22
7.804	3662384	0.45	151931	0.27
8.581	3134525	0.39	1753763	3.09
9.280	732114490	90.85	48627202	85.56
10.270	48856441	6.06	5380458	9.47
11.299	2359945	0.29	106762	0.19
11.570	1680525	0.21	135655	0.24
12.599	8899631	1.10	508049	0.89
14.482	123457	0.02	14116	0.02
17.433	0	0.00	0	0.00
Totals				
	805856931	100.00	56832256	100.00





### Area % Report

Data File: Method: Acquired: Printed: D:\Resultats\Yare\PS\_3114\Coup\_fev2021.rslt\YAR198ppA.dat C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Nadjib\5-95 20min.met 2/18/2021 4:08:46 PM (GMT -05:00) 2/19/2021 9:33:13 AM (GMT -05:00)



# VWD: Signal A, 254 nm Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.777	250869	0.45	7472	0.20
1.262	51554684	91.57	3640885	95.29
2.135	790661	1.40	50310	1.32
2.990	244583	0.43	17999	0.47
3.456	179440	0.32	11502	0.30
3.708	341240	0.61	11344	0.30
4.698	277741	0.49	9464	0.25
5.145	99143	0.18	5820	0.15
5.572	93711	0.17	3614	0.09
6.115	50609	0.09	2784	0.07
12.871	29327	0.05	724	0.02
14.016	155960	0.28	5804	0.15
15.104	87861	0.16	1230	0.03
16.521	176867	0.31	5937	0.16
17.550	520854	0.93	11992	0.31
18.520	902717	1.60	18767	0.49
19.200	461273	0.82	10768	0.28
19.743	82205	0.15	4236	0.11
Totals				
	56299745	100.00	3820652	100.00



Data File: D:\Resultats\Yare\2022\_03\_18 Varios PS  $\label{eq:NSC_MS_20220318_Varios_PS3114_NSC_MS.rslt} NSC_MS.rsltVAR269ppA.dat \\ Method: C:\Enterprise\Projects\Etudiant\Method\Trang\Analyse manuelle.met \\ \end{tabular}$ 3/20/2022 2:27:52 AM (GMT -04:00) 3/21/2022 10:35:43 AM (GMT -04:00) Acquired: Printed: Retention Time 2000 2000 Volts Volts 1000 1000 11.900 9.823 -7.455 3.689 H 0 0 10 15 Minutes 20 25 30 0 5 VWD: Signal A, 229 nm Results Retention Time Area % Height Height % Area 3.689 1405974 0.37 23306 0.06 7.455 459497 42489 0.11 0.12 9.823 1043886 3051186 0.81 2.63 370354891 10.541 97.91 38410318 96.61 11.900 2972732 0.79 238616 0.60 Totals 378244280 100.00 39758615 100.00


















































## Page 1 of 1

## Area % Report





VWD: Signal A, 229 nm Results

229 nm Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
4.038	1933441	0.35	18429	0.03
9.105	1222268	0.22	21867	0.04
10.561	665500	0.12	55602	0.10
11.784	523128389	93.67	52761846	94.00
12.657	854833	0.15	80130	0.14
14.832	488889	0.09	42961	0.08
16.851	30178979	5.40	3147524	5.61
Totals				
	558472299	100.00	56128359	100.00









## Area % Report

Data File: D:\Resultats\Yare\2022\_03\_18 Varios PS NSC\_MS\20220318\_Varios\_PS3114\_NSC\_MS.rslt\YAR274.dat Method: Acquired: 3/20/2022 6:10:15 AM (GMT -04:00) Printed: 3/21/2022 10:42:04 AM (GMT -04:00) 3000 3000 Retention Time 2000 2000 Volts Volts 1000 1000 10.561 11.415 18.598 14.579 17.025 9.241 4.057 0 0 5 10 15 Minutes 20 25 30 0 VWD: Signal A, 229 nm Results Retention Time Area % Height Height % Area 4.057 1899640 0.41 16992 0.04 9.241 638175 6625271 1.44 1.36 10.561 544030 0.12 53564 0.11 11.415 4857570 1.05 489119 1.05 12.425 443918376 96.30 45298638 96.86 14.579 1323657 0.29 111674 0.24 17.025 634984 0.14 46864 0.10 18.598 1184734 0.26 111859 0.24

Page 1 of 1

Totals				
	460988262	100.00	46766885	100.00

## RÉFÉRENCES

- Alegría-Torres, J. A., Baccarelli, A. et Bollati, V. (2011). Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*, 3(3), 267-277.
- Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M. et Gerstein, M. B. (2010). Annotating non-coding regions of the genome. *Nature reviews genetics*, *11*(8), 559-571.
- Allison, J., Kaliszewska, A., Uceda, S., Reiriz, M. et Arias, N. (2021). Targeting DNA Methylation in the Adult Brain through Diet. *Nutrients*, *13*(11), 3979.
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U. et Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature* genetics, 23(2), 185-188.
- Arguelles, A. O., Meruvu, S., Bowman, J. D. et Choudhury, M. (2016). Are epigenetic drugs for diabetes and obesity at our door step? *Drug discovery today*, *21*(3), 499-509.
- Asgatay, S., Champion, C., Marloie, G., Drujon, T., Senamaud-Beaufort, C., Ceccaldi, A., Erdmann, A., Rajavelu, A., Schambel, P. et Jeltsch, A. (2014). Synthesis and evaluation of analogues of Nphthaloyl-I-tryptophan (RG108) as inhibitors of DNA methyltransferase 1. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(2), 421-434.
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R. et Rehman, Y. (2017). Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. *Frontiers in microbiology*, *8*, 2169.
- Ayotte, Y., Marando, V. M., Vaillancourt, L., Bouchard, P., Heffron, G., Coote, P. W., Larda, S. T. et LaPlante,
   S. R. (2019). Exposing small-molecule nanoentities by a nuclear magnetic resonance relaxation assay. *Journal of medicinal chemistry*, 62(17), 7885-7896.
- Ayotte, Y., Woo, S. et LaPlante, S. R. (2022). Practical Considerations and Guidelines for Spectral Referencing for Fluorine NMR Ligand Screening. *ACS omega*, 7(15), 13155-13163.
- Bacolla, A., Pradhan, S., Roberts, R. J. et Wells, R. D. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase: II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated DNA. *Journal* of Biological Chemistry, 274(46), 33011-33019.
- Bannister, A. J. et Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395.
- Bansal, N., David, G., Farias, E. et Waxman, S. (2016). Emerging roles of epigenetic regulator Sin3 in cancer. Advances in cancer research, 130, 113-135.
- Bell, A. C. et Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, 405(6785), 482-485.
- Beth Israel Deaconess Medical Center, I. (2014). *Chimeric rna oligonucleotides and uses thereof* (n° US20140171492).
- Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S. Y. et Blau, H. M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, *463*(7284), 1042-1047.
- Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S. et Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, *317*(5845), 1760-1764.
- Brueckner, B., Boy, R. G., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H. C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M. et Lyko, F. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer research*, 65(14), 6305-6311.
- Brueckner, B., Garcia Boy, R., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H. C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M. et Lyko, F. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer research*, *65*(14), 6305-6311.

Carpino, L. A., Imazumi, H., Foxman, B. M., Vela, M. J., Henklein, P., El-Faham, A., Klose, J. et Bienert, M. (2000). Comparison of the Effects of 5-and 6-HOAt on Model Peptide Coupling Reactions Relative to the Cases for the 4-and 7-Isomers. *Organic letters*, 2(15), 2253-2256.

Carrie, D. et Keith, M. (2015). What do you mean, "epigenetic". *Genetics*, 199, 887-896.

- Castellano, S., Kuck, D., Sala, M., Novellino, E., Lyko, F. et Sbardella, G. (2008). Constrained analogues of procaine as novel small molecule inhibitors of DNA methyltransferase-1. *Journal of medicinal chemistry*, *51*(7), 2321-2325.
- Castellano, S., Kuck, D., Viviano, M., Yoo, J., López-Vallejo, F., Conti, P., Tamborini, L., Pinto, A., Medina-Franco, J. L. et Sbardella, G. (2011). Synthesis and biochemical evaluation of Δ2-isoxazoline derivatives as DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, *54*(21), 7663-7677.
- Castillo-Aguilera, O., Depreux, P., Halby, L., Arimondo, P. B. et Goossens, L. (2017). DNA methylation targeting: the DNMT/HMT crosstalk challenge. *Biomolecules*, 7(1), 3.
- Cavaliere, A., Bufalari, A. et Vitali, R. (1987). 5-Azacytidine carcinogenesis in BALB/c mice. *Cancer letters*, 37(1), 51-58.
- Chan, A. et Shea, T. B. (2006). Supplementation with apple juice attenuates presenilin-1 overexpression during dietary and genetically-induced oxidative stress. *Journal of Alzheimer's Disease*, *10*(4), 353-358.
- Chan, A. C. et Carter, P. J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *10*(5), 301-316.
- Chen, L., MacMillan, A. M. et Verdine, G. L. (1993). Mutational separation of DNA binding from catalysis in a DNA cytosine methyltransferase. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(12), 5318-5319.
- Chen, S., Wang, Y., Zhou, W., Li, S., Peng, J., Shi, Z., Hu, J., Liu, Y.-C., Ding, H. et Lin, Y. (2014). Identifying novel selective non-nucleoside DNA methyltransferase 1 inhibitors through docking-based virtual screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(21), 9028-9041.
- Cheray, M., Nadaradjane, A., Bonnet, P., Routier, S., Vallette, F. M. et Cartron, P.-F. (2014). Specific inhibition of DNMT1/CFP1 reduces cancer phenotypes and enhances chemotherapy effectiveness. *Epigenomics*, *6*(3), 267-275.
- Chuang, L. S.-H., Ian, H.-I., Koh, T.-W., Ng, H.-H., Xu, G. et Li, B. F. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, *277*(5334), 1996-2000.
- Copeland, R. A. et Horiuchi, K. Y. (1998). Kinetic effects due to nonspecific substrate-inhibitor interactions in enzymatic reactions. *Biochemical pharmacology*, *55*(11), 1785-1790.
- Coronel, J., Cetina, L., Pacheco, I., Trejo-Becerril, C., González-Fierro, A., De La Cruz-Hernandez, E., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Arias-Bofill, D. et Candelaria, M. (2011). A double-blind, placebocontrolled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Medical oncology*, *28*(1), 540-546.
- Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B. et Baig, A. (2002). The p120 ctn-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic acids research*, *30*(13), 2911-2919.
- Daskalakis, M., Nguyen, T. T., Nguyen, C., Guldberg, P., Köhler, G., Wijermans, P., Jones, P. A. et Lübbert, M. (2002). Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2<sup>'</sup> -deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(8), 2957-2964.
- Datta, J., Ghoshal, K., Denny, W. A., Gamage, S. A., Brooke, D. G., Phiasivongsa, P., Redkar, S. et Jacob, S. T. (2009). A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer research*, 69(10), 4277-4285.

- De Jager, P. L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L. C., Yu, L., Eaton, M. L., Keenan, B. T., Ernst, J. et McCabe, C. (2014). Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nature neuroscience*, *17*(9), 1156-1163.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. et Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(14), 7149-7153.
- Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239-259.
- Erdmann, A., Menon, Y., Gros, C., Masson, V., Aussagues, Y., Ausseil, F., Novosad, N., Schambel, P., Baltas, M. et Arimondo, P. B. (2016). Identification and optimization of hydrazone-gallate derivatives as specific inhibitors of DNA methyltransferase 3A. *Future Medicinal Chemistry*, 8(4), 373-380.
- Esteller, M., Silva, J. M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes,
  I. C. et Repasky, E. A. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *92*(7), 564-569.
- Estève, P.-O., Chin, H. G., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F. et Pradhan,
   S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation
   during replication. *Genes & development*, 20(22), 3089-3103.
- Fagan, R. L., Cryderman, D. E., Kopelovich, L., Wallrath, L. L. et Brenner, C. (2013). Laccaic acid A is a direct, DNA-competitive inhibitor of DNA methyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 23858-23867.
- Farahani, M. D., França, T. C., Alapour, S., Shahout, F., Boulon, R., Iddir, M., Maddalena, M., Ayotte, Y. et LaPlante, S. R. (2022). Jumping from Fragment to Drug via Smart Scaffolds. *ChemMedChem*, e202200092.
- Fedorova, E. et Zink, D. (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*)-*Molecular Cell Research*, *1783*(11), 2174-2184.
- Felle, M., Joppien, S., Nemeth, A., Diermeier, S., Thalhammer, V., Dobner, T., Kremmer, E., Kappler, R. et Längst, G. (2011). The USP7/Dnmt1 complex stimulates the DNA methylation activity of Dnmt1 and regulates the stability of UHRF1. *Nucleic acids research*, 39(19), 8355-8365.
- Feng, C., Cunningham, D. W., Easter, Q. T. et Blum, S. A. (2016). Role of LiCl in generating soluble organozinc reagents. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(35), 11156-11159.
- Filion, G. J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E. et Defossez, P.-A. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Molecular and cellular biology*, *26*(1), 169-181.
- Fitzpatrick, D. R. et Wilson, C. B. (2003). Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clinical immunology*, *109*(1), 37-45.
- Friso, S., Pizzolo, F., Choi, S.-W., Guarini, P., Castagna, A., Ravagnani, V., Carletto, A., Pattini, P., Corrocher, R. et Olivieri, O. (2008). Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis*, *199*(2), 323-327.
- Fulmer, G. R., Miller, A. J., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., Bercaw, J. E. et Goldberg, K. I. (2010). NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. Organometallics, 29(9), 2176-2179.
- Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R. A., D'Anselmi, F. et Scarpa, S. (2005). Sadenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 28(1), 195-204.
- Garella, D., Atlante, S., Borretto, E., Cocco, M., Giorgis, M., Costale, A., Stevanato, L., Miglio, G., Cencioni, C. et Fernández - de Gortari, E. (2016). Design and synthesis of N - benzoyl amino acid derivatives as DNA methylation inhibitors. *Chemical biology & drug design*, *88*(5), 664-676.

- Gavin, D. P. et Sharma, R. P. (2010). Histone modifications, DNA methylation, and schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *34*(6), 882-888.
- Ge, Y.-Z., Pu, M.-T., Gowher, H., Wu, H.-P., Ding, J.-P., Jeltsch, A. et Xu, G.-L. (2004). Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(24), 25447-25454.
- Géranton, S. M., Morenilla-Palao, C. et Hunt, S. P. (2007). A role for transcriptional repressor methyl-CpGbinding protein 2 and plasticity-related gene serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 in the induction of inflammatory pain states. *Journal of Neuroscience*, *27*(23), 6163-6173.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. et Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, *311*(5759), 395-398.
- Gore, S. D., Baylin, S., Sugar, E., Carraway, H., Miller, C. B., Carducci, M., Grever, M., Galm, O., Dauses, T. et Karp, J. E. (2006). Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer research*, *66*(12), 6361-6369.
- Gowher, H. et Jeltsch, A. (2002). Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20409-20414.
- Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G. et Jeltsch, A. (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13341-13348.
- Grasse, S., Lienhard, M., Frese, S., Kerick, M., Steinbach, A., Grimm, C., Hussong, M., Rolff, J., Becker, M. et Dreher, F. (2018). Epigenomic profiling of non-small cell lung cancer xenografts uncover LRP12 DNA methylation as predictive biomarker for carboplatin resistance. *Genome medicine*, *10*(1), 1-16.
- 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. et Arimondo, P. B. (2015). New insights on the mechanism of quinoline-based DNA Methyltransferase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6293-6302.
- Guo, X., Wang, L., Li, J., Ding, Z., Xiao, J., Yin, X., He, S., Shi, P., Dong, L. et Li, G. (2015). Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. *Nature*, *517*(7536), 640-644.
- Gupta, A., Godwin, A. K., Vanderveer, L., Lu, A. et Liu, J. (2003). Hypomethylation of the synuclein γ gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer research*, *63*(3), 664-673.
- Hajduk, P. et Greer, J. (2007). Nat Rev Drug Discov, № 6. A decade of fragment-based drug design: Strategic advances and lessons learned, 6, 211-219.
- Hajduk, P. J., Olejniczak, E. T. et Fesik, S. W. (1997). One-dimensional relaxation-and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, *119*(50), 12257-12261.
- Halby, L., Champion, C., Sénamaud Beaufort, C., Ajjan, S., Drujon, T., Rajavelu, A., Ceccaldi, A., Jurkowska,
   R., Lequin, O. et Nelson, W. G. (2012). Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide. *Chembiochem*, 13(1), 157-165.
- Hamidi, T., Singh, A. K. et Chen, T. (2015). Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*, 7(2), 247-265.
- Handy, D. E., Castro, R. et Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, *123*(19), 2145-2156.
- Hashimoto, H., Horton, J. R., Zhang, X., Bostick, M., Jacobsen, S. E. et Cheng, X. (2008). The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature*, *455*(7214), 826-829.

- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E. et Lumey, L. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.
   *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(44), 17046-17049.
- Heitz, E. (1928). Das heterochromatin der moose. Bornträger.
- Hervouet, E., Peixoto, P., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M. et Cartron, P.-F. (2018). Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clinical epigenetics*, *10*(1), 1-18.
- Holz-Schietinger, C., Matje, D. M., Harrison, M. F. et Reich, N. O. (2011). Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of de novo DNA methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41479-41488.
- Hossain, M. Z., Healey, M. A., Lee, C., Poh, W., Yerram, S. R., Patel, K., Azad, N. S., Herman, J. G. et Kern, S.
   E. (2013). DNA-intercalators causing rapid re-expression of methylated and silenced genes in cancer cells. *Oncotarget*, 4(2), 298.
- Ilieva, S., Galabov, B., Musaev, D. G., Morokuma, K. et Schaefer, H. F. (2003). Computational study of the aminolysis of esters. The reaction of methylformate with ammonia. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(4), 1496-1502.
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. et Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129-1133.
- Jackson-Grusby, L., Laird, P. W., Magge, S. N., Moeller, B. J. et Jaenisch, R. (1997). Mutagenicity of 5-aza-2<sup>'</sup> -deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(9), 4681-4685.
- Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A. et Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, 449(7159), 248-251.
- Jirtle, R. L. et Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews genetics*, 8(4), 253-262.
- Jones, P. A. et Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, *128*(4), 683-692.
- José-Enériz, S., Agirre, X., Rabal, O., Vilas-Zornoza, A., Sanchez-Arias, J. A., Miranda, E., Ugarte, A., Roa, S., Paiva, B. et Estella-Hermoso de Mendoza, A. (2017). Discovery of first-in-class reversible dual small molecule inhibitors against G9a and DNMTs in hematological malignancies. *Nature communications*, *8*(1), 1-10.
- Jowaed, A., Schmitt, I., Kaut, O. et Wüllner, U. (2010). Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *Journal of Neuroscience*, *30*(18), 6355-6359.
- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F. et Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *17*(2), 111-130.
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P. et Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*, *12*(2), 206-222.
- Kabro, A., Lachance, H., Marcoux-Archambault, I., Perrier, V., Doré, V., Gros, C., Masson, V., Gregoire, J. M., Ausseil, F. et Cheishvili, D. (2013). Preparation of phenylethylbenzamide derivatives as modulators of DNMT3 activity. *MedChemComm*, 4(12), 1562-1570.
- Kaina, B. et Christmann, M. (2019). DNA repair in personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas. *DNA repair*, *78*, 128-141.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Duttagupta, R., Willingham, A. T., Stadler, P. F., Hertel, J., Hackermüller, J. r. et Hofacker, I. L. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, *316*(5830), 1484-1488.

- Karouzakis, E., Gay, R. E., Gay, S. et Neidhart, M. (2009). Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Nature Reviews Rheumatology*, *5*(5), 266.
- Katiyar, S., Elmets, C. A. et Katiyar, S. K. (2007). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *The Journal of nutritional biochemistry*, *18*(5), 287-296.
- Khrabrova, D. A., Yakubovskaya, M. G. et Gromova, E. S. (2021). AML-associated mutations in DNA methyltransferase DNMT3A. *Biochemistry (Moscow)*, *86*(3), 307-318.
- Kim, D. H., Sætrom, P., Snøve, O. et Rossi, J. J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(42), 16230-16235.
- Kim, D. H., Villeneuve, L. M., Morris, K. V. et Rossi, J. J. (2006). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), 793-797.
- Kim, J. H., Dhanasekaran, S. M., Prensner, J. R., Cao, X., Robinson, D., Kalyana-Sundaram, S., Huang, C., Shankar, S., Jing, X. et Iyer, M. (2011). Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer. *Genome research*, 21(7), 1028-1041.
- King Batoon, A., Leszczynska, J. M. et Klein, C. B. (2008). Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, 49(1), 36-45.
- Klisovic, R. B., Stock, W., Cataland, S., Klisovic, M. I., Liu, S., Blum, W., Green, M., Odenike, O., Godley, L. et Burgt, J. V. (2008). A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, 14(8), 2444-2449.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705.
- Kuck, D., Singh, N., Lyko, F. et Medina-Franco, J. L. (2010). Novel and selective DNA methyltransferase inhibitors: docking-based virtual screening and experimental evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(2), 822-829.
- Laboratory, H. (s.d.). Récupéré le May 22 de http://www.hannonlab.org/epigenetics/
- LaPlante, S. R., Carson, R., Gillard, J., Aubry, N., Coulombe, R., Bordeleau, S., Bonneau, P., Little, M., O'Meara, J. et Beaulieu, P. L. (2013). Compound aggregation in drug discovery: implementing a practical NMR assay for medicinal chemists. *Journal of medicinal chemistry*, *56*(12), 5142-5150.
- Lee, B. H., Yegnasubramanian, S., Lin, X. et Nelson, W. G. (2005). Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40749-40756.
- Leibly, D. J., Nguyen, T. N., Kao, L. T., Hewitt, S. N., Barrett, L. K. et Van Voorhis, W. C. (2012). Stabilizing additives added during cell lysis aid in the solubilization of recombinant proteins. *PloS one*, 7(12), e52482.
- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H.-U. et Bestor, T. H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, *71*(5), 865-873.
- Leroy, M., Mélin, L., LaPlante, S. R., Medina-Franco, J. L. et Gagnon, A. (2019). Synthesis of NSC 106084 and NSC 14778 and evaluation of their DNMT inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(6), 826-831.
- Liang, L., Lutz, B. M., Bekker, A. et Tao, Y.-X. (2015). Epigenetic regulation of chronic pain. *Epigenomics*, 7(2), 235-245.
- Lima, E. C. d., Souza, C. C. d., Soares, R. d. O., Vaz, B. G., Eberlin, M. N., Dias, A. G. et Costa, P. R. (2011). DBU as a catalyst for the synthesis of amides via aminolysis of methyl esters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *22*, 2186-2190.
- Lin, X., Asgari, K., Putzi, M. J., Gage, W. R., Yu, X., Cornblatt, B. S., Kumar, A., Piantadosi, S., DeWeese, T. L. et De Marzo, A. M. (2001). Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of πclass glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer research*, *61*(24), 8611-8616.

- List, M., Schmidt, S., Christiansen, H., Rehmsmeier, M., Tan, Q., Mollenhauer, J. et Baumbach, J. (2016). Comprehensive analysis of high-throughput screens with HiTSeekR. *Nucleic acids research*, 44(14), 6639-6648.
- Liu, Z., Xie, Z., Jones, W., Pavlovicz, R. E., Liu, S., Yu, J., Li, P.-k., Lin, J., Fuchs, J. R. et Marcucci, G. (2009). Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *19*(3), 706-709.
- Loscalzo, J. et Handy, D. E. (2014). Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series). *Pulmonary circulation*, 4(2), 169-174.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. et Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, *389*(6648), 251-260.
- Magasanik, B. (1961). Catabolite repression. (p. 249-256). Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Magdeldin, S. (2012). *Affinity chromatography*. BoD–Books on Demand.
- Maloney, B. et Lahiri, D. K. (2016). Epigenetics of dementia: understanding the disease as a transformation rather than a state. *The Lancet Neurology*, *15*(7), 760-774.
- Margot, J. B., Ehrenhofer-Murray, A. E. et Leonhardt, H. (2003). Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC molecular biology*, *4*(1), 1-9.
- Martinez, S. R., Gay, M. S. et Zhang, L. (2015). Epigenetic mechanisms in heart development and disease. Drug discovery today, 20(7), 799-811.
- Mastronardi, F. G., Noor, A., Wood, D. D., Paton, T. et Moscarello, M. A. (2007). Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *Journal of neuroscience research*, *85*(9), 2006-2016.
- Mayer, M. et Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), 670-684.
- McCarthy, M. M., Auger, A. P., Bale, T. L., De Vries, G. J., Dunn, G. A., Forger, N. G., Murray, E. K., Nugent, B. M., Schwarz, J. M. et Wilson, M. E. (2009). The epigenetics of sex differences in the brain. *Journal of Neuroscience*, *29*(41), 12815-12823.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E. et Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews genetics*, *10*(3), 155-159.
- Moore, L. D., Le, T. et Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 23-38.
- Morris, K. V. et Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature reviews genetics*, 15(6), 423-437.
- Movassagh, M., Choy, M.-K., Goddard, M., Bennett, M. R., Down, T. A. et Foo, R. S.-Y. (2010). Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure. *PloS one*, *5*(1), e8564.
- Myrianthopoulos, V., Cartron, P. F., Liutkevičiūtė, Z., Klimašauskas, S., Matulis, D., Bronner, C., Martinet, N. et Mikros, E. (2016). Tandem virtual screening targeting the SRA domain of UHRF1 identifies a novel chemical tool modulating DNA methylation. *European journal of medicinal chemistry*, *114*, 390-396.
- Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. et Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386-389.
- Nandakumar, V., Vaid, M. et Katiyar, S. K. (2011). (–)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p 16 INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis*, *32*(4), 537-544.
- Nanney, D. L. (1958). Epigenetic control systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7), 712.

- Nardone, S., Sharan Sams, D., Reuveni, E., Getselter, D., Oron, O., Karpuj, M. et Elliott, E. (2014). DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Translational psychiatry*, *4*(9), e433-e433.
- New England Biolabs, I. (2015). *Dnmt inhibitors* (n° WO2015073360).
- Norvil, A. B., Saha, D., Dar, M. S. et Gowher, H. (2019). Effect of disease-associated germline mutations on structure function relationship of DNA methyltransferases. *Genes*, *10*(5), 369.
- Oie, T., Loew, G. H., Burt, S. K., Binkley, J. S. et MacElroy, R. D. (1982). Quantum chemical studies of a model for peptide bond formation: formation of formamide and water from ammonia and formic acid. *Journal of the American Chemical Society*, *104*(23), 6169-6174.
- Organization, W. H. Récupéré le May 29 de <u>https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia</u>
- Pacaud, R., Brocard, E., Lalier, L., Hervouet, E., Vallette, F. M. et Cartron, P.-F. (2014). The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- Pandey, G. K., Mitra, S., Subhash, S., Hertwig, F., Kanduri, M., Mishra, K., Fransson, S., Ganeshram, A., Mondal, T. et Bandaru, S. (2014). The risk-associated long noncoding RNA NBAT-1 controls neuroblastoma progression by regulating cell proliferation and neuronal differentiation. *Cancer cell*, 26(5), 722-737.
- Panja, S., Aich, P., Jana, B. et Basu, T. (2008). Plasmid DNA binds to the core oligosaccharide domain of LPS molecules of E. coli cell surface in the CaCl2-mediated transformation process. *Biomacromolecules*, 9(9), 2501-2509.
- Pegg, D. (2002). The history and principles of cryopreservation. (p. 005-014). Seminars in reproductive medicine, Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ....
- Pellecchia, M., Sem, D. S. et Wüthrich, K. (2002). NMR in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(3), 211-219.
- Pereira, V., Ferrier, J., Balayssac, D., Libert, F. et Busserolles, J. (2013). Mécanismes épigénétiques impliqués dans la douleur chronique. *Douleur et analgésie*, *26*(4), 234-240.
- Peschansky, V. J. et Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*, 9(1), 3-12.
- Piller, F. M., Metzger, A., Schade, M. A., Haag, B. A., Gavryushin, A. et Knochel, P. (2009). Preparation of polyfunctional arylmagnesium, arylzinc, and benzylic zinc reagents by using magnesium in the presence of LiCl. *Chemistry–A European Journal*, 15(29), 7192-7202.
- Pop, S., Enciu, A. M., Tarcomnicu, I., Gille, E. et Tanase, C. (2019). Phytochemicals in cancer prevention: modulating epigenetic alterations of DNA methylation. *Phytochemistry Reviews*, *18*(4), 1005-1024.
- Pradhan, M., Esteve, P.-O., Chin, H. G., Samaranayke, M., Kim, G.-D. et Pradhan, S. (2008). CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry*, *47*(38), 10000-10009.
- Pritchard, B. et Thompson, H. (2022). Procainamide. Dans *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A. et Prokhortchouk,
   E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & development*, *15*(13), 1613-1618.
- Rondelet, G., Fleury, L., Faux, C., Masson, V., Dubois, J., Arimondo, P. B., Willems, L. et Wouters, J. (2017).
   Inhibition studies of DNA methyltransferases by maleimide derivatives of RG108 as nonnucleoside inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, *9*(13), 1465-1481.
- Rotili, D., Tarantino, D., Marrocco, B., Gros, C., Masson, V., Poughon, V., Ausseil, F., Chang, Y., Labella, D. et Cosconati, S. (2014). Properly substituted analogues of BIX-01294 lose inhibition of G9a histone methyltransferase and gain selective anti-DNA methyltransferase 3A activity. *PLoS One*, *9*(5), e96941.

- Rountree, M. R., Bachman, K. E. et Baylin, S. B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature genetics*, *25*(3), 269-277.
- Russler-Germain, D. A., Spencer, D. H., Young, M. A., Lamprecht, T. L., Miller, C. A., Fulton, R., Meyer, M. R., Erdmann-Gilmore, P., Townsend, R. R. et Wilson, R. K. (2014). The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer cell*, 25(4), 442-454.
- Sakore, T., Jain, S. C., Tsai, C.-C. et Sobell, H. M. (1977). Mutagen-nucleic acid intercalative binding: structure of a 9-aminoacridine: 5-iodocytidylyl (3'-5') guanosine crystalline complex. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 74(1), 188-192.
- Saldívar-González, F. I., Gómez-García, A., Chavez-Ponce de Leon, D. E., Sánchez-Cruz, N., Ruiz-Rios, J., Pilón-Jiménez, B. A. et Medina-Franco, J. L. (2018). Inhibitors of DNA methyltransferases from natural sources: A computational perspective. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 1144.
- Sanchez Mut, J. V., Aso, E., Heyn, H., Matsuda, T., Bock, C., Ferrer, I. et Esteller, M. (2014). Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease. *Hippocampus*, *24*(4), 363-368.
- Santini, V., Kantarjian, H. M. et Issa, J.-P. (2001). Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Annals of internal medicine*, *134*(7), 573-586.
- Schaefer, M. et Lyko, F. (2010). Solving the Dnmt2 enigma. Chromosoma, 119(1), 35-40.
- Scheer, S. et Zaph, C. (2017). The lysine methyltransferase G9a in immune cell differentiation and function. *Frontiers in immunology*, *8*, 429.
- Segura-Pacheco, B., Trejo-Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Mariscal, I., Chavez, A., Acuna, C., Salazar, A. M., Lizano, M. et Duenas-Gonzalez, A. (2003). Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 9(5), 1596-1603.
- Shao, Z., Xu, P., Xu, W., Li, L., Liu, S., Zhang, R., Liu, Y.-C., Zhang, C., Chen, S. et Luo, C. (2017). Discovery of novel DNA methyltransferase 3A inhibitors via structure-based virtual screening and biological assays. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(2), 342-346.
- Sheikh, N. K. et Dua, A. (2021). Procaine. Dans *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Shen, H. et Laird, P. W. (2013). Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, *153*(1), 38-55.
- Smolarek, I., Wyszko, E., Barciszewska, A. M., Nowak, S., Gawronska, I., Jablecka, A. et Barciszewska, M. Z. (2010). Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension. *Med Sci Monit*, 16(3), 155.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A. et Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, *8*(4), 409-427.
- Strahl, B. D. et Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45.
- Stresemann, C. et Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer*, *123*(1), 8-13.
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A. et Anant, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in oncology*, *4*, 80.
- Suzuki, T., Tanaka, R., Hamada, S., Nakagawa, H. et Miyata, N. (2010). Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *20*(3), 1124-1127.
- Sweatt, J. D. (2009). Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biological psychiatry*, 65(3), 191-197.
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H. et Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *The EMBO journal*, *27*(20), 2681-2690.

- Thomas, T. et Messner, R. P. (1986). Effects of lupus inducing drugs on the B to Z transition of synthetic DNA. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 29*(5), 638-645.
- Trojer, P. et Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Molecular cell*, 28(1), 1-13.
- Usui, G., Matsusaka, K., Mano, Y., Urabe, M., Funata, S., Fukayama, M., Ushiku, T. et Kaneda, A. (2021). DNA methylation and genetic aberrations in gastric cancer. *Digestion*, *102*(1), 25-32.
- Valencia-Morales, M. d. P., Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., Ramírez-Ruz, J., Gomez, A. et Moran, S. (2015). The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC medical genomics*, 8(1), 1-9.
- Valente, S., Liu, Y., Schnekenburger, M., Zwergel, C., Cosconati, S., Gros, C., Tardugno, M., Labella, D., Florean, C. et Minden, S. (2014). Selective non-nucleoside inhibitors of human DNA methyltransferases active in cancer including in cancer stem cells. *Journal of medicinal chemistry*, 57(3), 701-713.
- Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L. et Cabrita, E. J. (2011). Saturation-transfer difference (STD) NMR: a simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *Journal of chemical Education*, *88*(7), 990-994.
- Vigante, B., Rucins, M., Plotniece, A., Pajuste, K., Luntena, I., Cekavicus, B., Bisenieks, E., Smits, R., Duburs, G. et Sobolev, A. (2015). Direct Aminolysis of Ethoxycarbonylmethyl 1, 4-Dihydropyridine-3-carboxylates. *Molecules*, 20(11), 20341-20354.
- Vilkaitis, G., Serva, S., Weinhold, E. et Klimašauskas, S. (2001). The mechanism of DNA cytosine-5 methylation: kinetic and mutational dissection of Hhal methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(24), 20924-20934.
- Villar-Garea, A., Fraga, M. F., Espada, J. et Esteller, M. (2003). Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer research*, *63*(16), 4984-4989.
- Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. Endeavour, 1, 18-20.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. et Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7(8), 847-854.
- Weiler, K. S. et Wakimoto, B. T. (1998). Chromosome rearrangements induce both variegated and reduced, uniform expression of heterochromatic genes in a development-specific manner. *Genetics*, *149*(3), 1451-1464.
- Weng, Y.-L., An, R., Shin, J., Song, H. et Ming, G.-I. (2013). DNA modifications and neurological disorders. *Neurotherapeutics*, 10(4), 556-567.
- Winquist, E., Knox, J., Ayoub, J.-P., Wood, L., Wainman, N., Reid, G. K., Pearce, L., Shah, A. et Eisenhauer,
   E. (2006). Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide
   MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical
   Trials Group investigational new drug study. *Investigational new drugs*, 24(2), 159-167.
- Wu, C.-T. et Morris, J. R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293(5532), 1103-1105.
- Xie, Q., Bai, Q., Zou, L. Y., Zhang, Q. Y., Zhou, Y., Chang, H., Yi, L., Zhu, J. D. et Mi, M. T. (2014). Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *53*(5), 422-431.
- Xu, P., Hu, G., Luo, C. et Liang, Z. (2016). DNA methyltransferase inhibitors: an updated patent review (2012-2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, *26*(9), 1017-1030.
- Yan, M. S.-C., Matouk, C. C. et Marsden, P. A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of Applied Physiology*, *109*(3), 916-926.

- Yi, H., Kim, Y., Kim, J., Jung, H., Rim, Y. A., Jung, S. M., Park, S.-H. et Ju, J. H. (2014). A new strategy to deliver synthetic protein drugs: self-reproducible biologics using minicircles. *Scientific reports*, 4(1), 1-11.
- Yu, L., Chibnik, L. B., Srivastava, G. P., Pochet, N., Yang, J., Xu, J., Kozubek, J., Obholzer, N., Leurgans, S. E. et Schneider, J. A. (2015). Association of Brain DNA methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 with pathological diagnosis of Alzheimer disease. JAMA neurology, 72(1), 15-24.
- Yuan, Z., Sun, Q., Li, D., Miao, S., Chen, S., Song, L., Gao, C., Chen, Y., Tan, C. et Jiang, Y. (2017). Design, synthesis and anticancer potential of NSC-319745 hydroxamic acid derivatives as DNMT and HDAC inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, *134*, 281-292.
- Zhang, Q., Wang, H. Y., Marzec, M., Raghunath, P. N., Nagasawa, T. et Wasik, M. A. (2005). STAT3-and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), 6948-6953.
- Zhong, J., Colicino, E., Lin, X., Mehta, A., Kloog, I., Zanobetti, A., Byun, H. M., Bind, M. A., Cantone, L. et Prada, D. (2015). Cardiac autonomic dysfunction: particulate air pollution effects are modulated by epigenetic immunoregulation of toll - like receptor 2 and dietary flavonoid intake. *Journal of the American Heart Association*, 4(1), e001423.