UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DE LILLE I

THESE DE DOCTORAT Discipline : Molécule et matière condensée

Marion GAURIOT

Conception, synthèse et optimisation de modulateurs de l'Insulin-Degrading Enzyme et applications dans la maladie d'Alzheimer et le diabète

soutenue le 12 octobre 2011

JURY

Dr. Muriel AMBLARD Dr. Jean-Claude FLORENT Pr. Rébecca DÉPREZ-POULAIN Pr. Bernard PIROTTE Dr. Julie CHARTON Pr. Jean-Claude GESQUIERE Université Montpellier I Institut Curie Université de Lille II Université de Liège Université de Lille II Université de Lille II Rapporteur Rapporteur Directrice de thèse Examinateur Encadrante Directeur de thèse

INSERM U761 – Faculté de Pharmacie de Lille Laboratoire Biostructures et Découverte de Médicament 3, rue du Professeur Laguesse 59006 Lille

Remerciements

Je remercie Mme Muriel Amblard et Mr Jean-Claude Florent pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon sujet et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie également Mr Bernard Pirotte, Mme Rebecca Déprez-Poulain et Melle Julie Charton d'avoir bien voulu juger mon travail.

Ces travaux ont été réalisés au sein du Laboratoire "Biostructures et Découverte de Médicament" dirigé par le Professeur Benoit Déprez à qui j'adresse mes remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Mon travail été effectué sous la co-direction du Professeur Rébecca Déprez-Poulain et de Melle Julie Charton.

Je remercie en particulier Rébecca Déprez-Poulain de m'avoir permis de travailler sur ce sujet et d'avoir été disponible ces trois années.

J'adresse un grand merci à Melle Julie Charton pour m'avoir encadrée et épaulée à la paillasse ainsi que pour ses bons conseils.

Je remercie Mme Florence Leroux et Mme Valérie Landry pour avoir effectué les tests *in vitro* sans lesquels je n'aurais pas pu avancer.

Je souhaite aussi remercier Mr Hervé Drobecq qui m'a beaucoup aidé avec la nano-LC. Je remercie également Mme Nathalie Hennuyer et Mme Malika Hamdane pour les résultats cellulaires.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du service de RMN pour leur aide et leur disponibilité.

Ma reconnaissance va également au Professeur Wei-Jen Tang qui m'a accueillie dans son équipe à Chicago et grâce à qui j'ai beaucoup appris sur la cristallographie. Je remercie aussi le reste de son équipe avec qui j'ai travaillé : Mr Qing Guo, Mr Vasilios Kalas, Mme Mindy Ren et Mr Luis Ralat.

Ma gratitude va également à Mr Terence Beghyn et Melle Catherine Piveteau pour toutes les fois où ils m'ont aidée avec une HPLC préparative récalcitrante.

J'adresse des remerciements particuliers à Mme Carole Desruelle, Melle Jennifer Matusiak et Mme Tatiana Vandeputte sans qui la vie au laboratoire serait bien compliquée.

Je remercie tout particulièrement Mme Laurence Agouridas, Melle Karen Aknin, Melle Noémie Deguine, Melle Lucie Maingot, Melle Catherine Piveteau, Melle Iréna Reboule et Melle Jane Totobenazara pour leur amitié et les bons moments passés ensembles.

Enfin, je souhaite remercier vivement tous les membres du laboratoire que je n'ai pas déjà cités pour leur accueil et ces trois années passées ensembles :

Melle Marion Flipo, Mr Nicolas Willand, Mr Jamal Elbakali, Mr Xiaoan Wen, Melle Sandra Malaquin, Mr Baptiste Villemagne, Mr Mouhamad Jida, Mme Sandrine Dassonneville, Mr Olivier Busnel, Mr Arthur Pinto, Mr Nicolas Cousaert, Mr Sébastien Gluszok, Melle Céline Crauste, Mr Antoine Henninot, Mr Guillaume Laconde, Mr Arnaud Bourin, Mr Gonzague Berte, Mr Matthieu Desroses, Mr Gabriel Campagne, Mme Sylvie Leroy, Mme Renelde Leroy, Melle Julie Dumont, Melle Hélène Host, Mr Sylvain Delaroche, Mr Cyril Couturier, Mr Adrien Herledan, Mr Jean-Claude Gesquière, Mr André Tartar, Mme Annie Marcincal, Mme Hélène Gras-Masse.

Mes derniers remerciements vont à mes parents, Grégoire, Romain et Nicolas ainsi qu'à Thibault.

Publications

Ce travail a fait l'objet d'un dépôt de brevet ainsi que de plusieurs publications sous forme d'affiches et d'une communication orale. Un article a été soumis et trois autres sont en cours de rédaction.

Communications par affiches

<u>Gauriot</u>, M., Leroux, F., Landry, V., Tang, W.J., Guo, Q., Deprez, B., Charton, J., and Deprez-Poulain, R., Pharmacomodulation of a substrate-dependent modulator of Insulin-Degrading Enzyme, in 46th RICT International Conference on Medicinal Chemistry. **2010**: Reims, France.

<u>Gauriot</u>, M., Charton, J., Leroux, F., Landry, V., Elbakali, J., Wen, X., Tang, W.J., Guo, Q., Deprez, B., and Deprez-Poulain, R., Découverte des premiers modulateurs de l'Insulin-Degrading Enzyme, in *Scientific Day PRIM, Pasteur Institute*. **2011**: Lille, France.

Leroux, F., Landry, V., Host, H., Delaroche, S., <u>Gauriot</u>, M., Déprez, B., Déprez-Poulain, R., and Charton, J., Biological screening for identifying inhibitors of the Insulin-Degrading Enzyme., in *XVIème Journée Jeunes Chercheurs*, *SCT*. **2009**, Société de Chimie Thérapeutique: Paris, France.

Deprez-Poulain, R., Leroux, F., Landry, V., <u>Gauriot</u>, M., Totobenazara, J., Guo, Q., Tang, W.-J., Charton, J., and Deprez, B., Discovery of Insulin-Degrading Enzyme Modulators, in 15th RSC-SCI Medicinal Chemistry. **2009**: Cambridge, UK.

Deprez-Poulain, R., Charton, J., <u>Gauriot</u>, M., Landry, V., Leroux, F., Tang, W.-J., and Deprez, B., A New Concept for the control of protease activity: Substrate-Dependent Modulation, in *EFMC-International Symposium Medicinal Chemistry*. **2010**: Brussels, Belgium.

Communication orale

<u>Gauriot</u>, M., Découverte des premiers modulateurs de l'insulin-degrading enzyme, in *Scientific Day PRIM*. **2011**: Lille, France.

Prix de la communication orale

Brevet

Deprez-Poulain, R., Charton, J., Deprez, B., Leroux, F., <u>Gauriot</u>, M., Tang, W.-J., and Totobenazara, J. Ligands of Insulin Degrading Enzyme and Their Uses. EP_20100330093425, 4th mar, **2010**.

Article soumis

Deprez-Poulain, R., Charton, J., Guo, Q., <u>Gauriot</u>, M., Hennuyer, N., Hamdane, M., Landry, V., Sperandio, O., Flipo, M., Buee, L., Staels, B., Leroux, F., Tang, W.-J., Deprez, B. First substrate-dependent modulators of human insulin degrading enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.*

Articles en cours de rédaction

Substrate-dependent modulators of human insulin degrading enzyme : structure activity relationships. *J. Med. Chem.*

Substrate-dependent modulators of human insulin degrading enzyme : optimisation of stability and cell-permeation. J. Med. Chem.

New Insulin-Degrading Enzyme inhibitors: discovery using original *in situ* orthogonal Cu-Free click reaction and optimization. *ACS Chemical Biology*

Abréviations

Biologie/Biochimie

ACE : Angiotensin-Converting Enzyme ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion **ANP** : Atrial Natriuretic Peptide ApoE : Apoliprotéine E **APP** : Amyloid Precurseur Protein **BSA** : Bovine Serum Albumin BoNT/A : Protéase de la toxine botulique A **DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium **DRC** : Courbe dose-réponse (Dose Response Curve) FCS : Sérum de veau fœtal (Foetal Calf Serum) GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase **GSIS** : Glucose Stimulated Insulin Secretion **HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique **IDE** : Insulin-Degrading Enzyme **IGF** : Insulin Growth Factor **KRBH** : Krebs Ringer bicarbonate HEPES buffer MCI : Mild Cognitive Impairment **NEP** : Néprilysine **PBS** : Phosphate buffered saline **PEPCK** : Phosphoenolpyruvate carboxykinase SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-rays Scattering)

Chimie

ACN : Acétonitrile anh. : anhydre Boc : ter-butyloxycarbonyle **Bz** : benzyle cat. : catalytique **CDI**: 1,1'-Carbonyldiimidazole **DCC** : *N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide DCM : Dichlorométhane **DIEA** : Diisopropyléthylamine **DMAP** : 4-Dimethylaminopyridine **DMF** : Diméthylformamide EDCI: 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid **Fmoc** : Fluorenylmethyloxycarbonyl HOBt : Hydroxybenzotriazole LAH : Lithium aluminium hydride Me : Méthyle **NEM** : *N*-Ethylmaleimide **PSA** : Surface polaire (Polar Surface Area) **PyBrop** : Bromo-tris-pyrrolidino- phosphonium hexafluorophosphate ta : température ambiante **T3P** : Propane phosphonic acid anhydride **TBTU**: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate TEA : Triéthylamine

TFA : Acide trifluoroacétique **TFAA** : Anhydride trifluoroacétique **THF** : Tétrahydrofurane **TIS** : Triisopropylsilane **Trt** : Trityle

Technique/Autres

HBA : nombre d'accepteur de liaison hydrogène (Hydrogen Bond Acceptor)
HBD : nombre de donneur de liaison hydrogène (Hydrogen Bond Donor)
HPLC : High-performance liquid chromatography
LC-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry
RSA : Relations Structure-Activité
ZBG : groupement ligand du zinc (Zinc-Binding Group)

Sommaire

INTROD	UCTION GENERALE	9
CHAPITE	RE I : INSULIN-DEGRADING ENZYME (IDE): UNE ENZYME CLE MECONNUE	. 10
I. C	SENERALITES	. 10
II.	STRUCTURE DE L'ENZYME	. 13
1.	Structure générale	. 13
2.	Site catalytique	. 14
3.	IDE possède un deuxième site essentiel à la catalyse : l'exosite	. 15
4.	Equilibre monomère/multimère	. 16
III.	MECANISME CATALYTIQUE	. 17
IV.	RECONNAISSANCE DES SUBSTRATS	. 19
٧.	REGULATION DE LA FONCTION DE L'INSULIN-DEGRADING ENZYME	. 21
1.	Régulation d'IDE par ses substrats	. 21
2.	L'ubiquitine : un substrat atypique d'IDE	. 21
3.	Régulation d'IDE par l'ATP	. 22
4.	Régulation d'IDE par les filaments intermédiaires	. 23
5.	Régulation du protéasome par IDE	. 25
VI.	IMPLICATION D'IDE DANS PLUSIEURS PATHOLOGIES	. 26
1.	Diabète de type II	. 26
2.	Maladie d'Alzheimer	. 27
3.	IDE : lien entre le diabète et la maladie d'Alzheimer?	. 28
VII.	Modulation d'IDE par des petites molecules	. 30
1.	Généralités : Modulation des protéases	. 30
	a. Inhibition	30
	b. Activation	30
2.	Inhibiteurs d'IDE décrits dans la littérature	. 31
3.	Activatours d'IDE décrits dans la littérature	. 32
	Activateurs a IDE aecrits aans la nitterature	
CHAPIT	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35
CHAPITE	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE Decouverte d'un compose inhibiteur de l'hydrolyse d'Aβ	35 . 35
CHAPITE I. [1.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 . 35 . <i>38</i>
CHAPITE I. [1. 2.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE Decouverte d'un compose inhibiteur de l'hydrolyse d'Aβ Molécules testées Principe du test de criblage	. 35 . 35 . 38 . 40
CHAPITE I. [1. 2. 3.	Re II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE Decouverte d'un compose inhibiteur de l'hydrolyse d'A β Molécules testées Principe du test de criblage Résultats du criblage	35 . 35 . 38 . 40 . 41
CHAPITE I. [1. 2. 3. II.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE Decouverte d'un compose inhibiteur de l'hydrolyse d'Aβ Molécules testées Principe du test de criblage Résultats du criblage 1 : mecanisme enzymatique de modulation et liaison a IDE.	. 35 . 35 . 38 . 40 . 41 . 44
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 1.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	. 35 . 35 . 38 . 40 . 41 . 44 . 44
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 1.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE DECOUVERTE D'UN COMPOSE INHIBITEUR DE L'HYDROLYSE D'A β Molécules testées Principe du test de criblage Résultats du criblage 1 : MECANISME ENZYMATIQUE DE MODULATION ET LIAISON A IDE Mécanisme d'inhibition de l'hydrolyse du peptide A β du composé 1 a. Evaluation de la réversibilité	. 35 . 35 . 38 . 40 . 41 . 44 . 44
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 1.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE DECOUVERTE D'UN COMPOSE INHIBITEUR DE L'HYDROLYSE D'Aβ Molécules testées Principe du test de criblage Résultats du criblage 1 : MECANISME ENZYMATIQUE DE MODULATION ET LIAISON A IDE Mécanisme d'inhibition de l'hydrolyse du peptide Aβ du composé 1 a. Evaluation de la réversibilité b. Caractère et nature de l'inhibition	35 .35 .38 .40 .41 .44 .44 .44 44
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 1.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 .35 .38 .40 .41 .44 .44 .44 46 46
CHAPITE I. [2. 3. II. 1.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 .35 .38 .40 .41 .44 .44 .44 44 46 46 48
CHAPITE I. [2. 3. II. 1. 2.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 .35 .38 .40 .41 .44 .44 .44 .44 46 46 48 .50
CHAPITE I. [2. 3. II. 1. 2.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 .35 .38 .40 .41 .44 .44 .44 44 46 46 48 .50 51
CHAPITE I. [2. 3. II. 1. 2.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 .35 .38 .40 .41 .44 .44 .44 .44 .44 .46 .46 .46 .48 .50 .51 .51
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 1. 2.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 38 40 41 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 45 51 51 51
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 1. 2. 3.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 38 40 41 44 44 44 44 46 46 46 46 46 46 46 47 46 46 46 46 46 46 46 47 46 47 46 47 46 47 46 47 46 47 46 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 47 57 57 57 57 57
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 2. 3.	RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	
CHAPITE I. [2. 3. II. 1. 2. 3.	Re II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 . 35 . 38 . 40 . 41 . 44 . 44 . 44 . 44 44 44 44 44 45
CHAPITE I. [2. 3. II. 2. 3.	Activateurs of DE operies during in interocture RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 38 40 41 44 44 44 44 46 44 46 44 46 51 51 51 53 53 53 54 55
CHAPITI I. [2. 3. II. 1. 2. 3.	Activateurs of DE operies datas to interocture RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	
CHAPITE I. [1. 2. 3. 11. 2. 3.	Activateurs of DE decrits outris to interfacture RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 . 35 . 38 . 40 . 41 . 44 . 44 . 44 . 44 . 44 . 44 . 44
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 2. 3. III.	Activateurs of DL operns of interoture RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	35 38 40 41 44 44 44 44 46 44 44 46 44 46 48 51 51 51 53 53 53 55 56 57 60
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 2. 3. III. 1. 1.	Activateurs of DL Geents during to interformer. RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE	
CHAPITE I. [1. 2. 3. II. 2. 3. III. 1. 2. 3.	Activited is 0 ibL decris datis in interoture RE II : DECOUVERTE DES PREMIERS MODULATEURS SUBSTRAT-DEPENDANTS D'IDE DECOUVERTE D'UN COMPOSE INHIBITEUR DE L'HYDROLYSE D'Aβ Molécules testées Principe du test de criblage Résultats du criblage 1 : MECANISME ENZYMATIQUE DE MODULATION ET LIAISON A IDE Mécanisme d'inhibition de l'hydrolyse du peptide Aβ du composé 1 a. Evaluation de la réversibilité b. Caractère et nature de l'inhibition i. Caractère de l'inhibition liaison du composé 1 à IDE a. Liaison au site catalytique b. Liaison à l'exosite c. Action du composé 1 sur un mutant de l'exosite IDE E341A Modulation substrat-dépendante d'IDE a. Mise au point de l'expérience. i. Optimisation du gradient d'élution pour l'analyse par nano-HPLC ii. Cinétiques d'hydrolyse des substrats. b. Résultats c. Mécanisme de modulation Resultats c. Mécanisme de modulation mise au point de l'expérience. ii. Conditions de mise en solution des peptides iii. Cinétiques d'hydrolyse des substrats. b. Résultats c. Mécanisme de modulation Resultats	

1.		Modification de l'acide aminé au Nord	64
	a.	Synthèses des analogues	64
	b.	Activité des analogues	66
2.		Modification du groupement hydrophobe à l'Ouest	67
	a.	Synthèses des analogues	68
	b.	Activité des analogues	70
	c.	Effet de la chiralité de l'histidine au Nord	
3.		Evaluation de l'impact de la charge positive apportée par l'amine tertiaire	72
	a.	Synthèses des analogues	73
	b.	Activité des analogues	75
4.		Modification de l'ester à l'Est	76
	a.	Synthèses des analogues	77
	b.	Activité des analogues	79
5.		Changement de la fonction acide au Sud	82
	a.	Synthèses des analogues	82
	b.	Activité des analogues	85
6.		Alkylation de l'imidazole en Tau	87
	a.	Le composé 1 accepte une alkylation de l'imidazole	87
	b.	Mise au point de la voie de synthèse	88
	c.	Mise en œuvre	91
7.		Exemplification de l'amide à l'Est	92
	a.	Choix des amines	
	b.	Structures des produits finaux	92
	c.	Etapes de synthèses	
	d.	Mise au point de la voie de synthèse	94
		i. 1 ^{ère} étape : synthèse des amides	
		ii. 2 ^{ème} étape : déprotection des histidines	95
		iii. 3 ^{ème} étape : ouverture d'anhydride	96
	e.	Mise en œuvre	97
		i. 1 ^{ère} et 2 ^{ème} étapes: synthèse et déprotection des amides	
		ii. 3 ^{ème} étape : ouverture d'anhydride	98
		iii. Résultats du criblage	98
۷.	С	ONCLUSION DU CHAPITRE II	99
CHAPITE	RE II	I : DECOUVERTE DE COMPOSES INHIBITEURS PAR CLICK CHEMISTRY IN SITU	101
I. C	CLICK	CHEMISTRY : GENERALITES	101
П.	D	ECOUVERTE D'UN INHIBITEUR D'IDE PAR CLICK-CHEMISTRY IN SITU	102
1.		Click Chemistry in situ avec IDE	104
	a.	Préparation des "building-blocks"	104
	b.	Formation des clusters	105
	c.	Mise au point des synthèses régiosélective des triazoles	106
	d.	Mise en œuvre de la réaction de Click Chemistry in situ	107
	e.	Evaluation de l'activité in vitro des composés	108
2.		Liaison du composé 143 à IDE	110
III.	С	ONCLUSION DU CHAPITRE III	111
CONCLU	SIO	N GENERALE	112
PARTIE I	EXP	ÉRIMENTALE	115
BIBLIOG	RAI	PHIE	228
TABLE D	ES	FIGURES	233
TABLE D	ES S	SCHEMAS	236

Introduction générale

L'Insulin-Degrading Enzyme (IDE) est une enzyme de la famille des métalloprotéases à zinc encore peu connue. Elle est constituée de plus de 1000 résidus acide-aminés et sa cavité catalytique est très grande faisant d'IDE une "cryptidase"¹. Cette enzyme est très bien conservée d'une espèce à l'autre et est ubiquitaire.

IDE est composé de deux parties qui s'articulent autour d'une boucle en équilibre entre une forme ouverte et une forme fermée permettant à l'enzyme d'encapsuler le substrat. La taille de sa "crypte" lui permet d'accueillir des peptides jusqu'à 70 acides aminés de long. IDE possède un grand nombre de substrats dont les fonctions biologiques et structures primaires sont très différentes. Parmi eux, on compte l'insuline, le peptide β -amyloïde, l'amyline, le glucagon, la somatostatine et l'IGF-II.

La diversité de ses substrats et leur implication dans divers processus biologiques font d'IDE, une enzyme potentiellement impliquée dans plusieurs pathologies. En particulier, l'insuline, le glucagon et l'amyline jouent un rôle important dans le diabète et d'autre part, l'agrégation du peptide β -amyloïde serait une des causes du développement de la maladie d'Alzheimer. Un lien entre IDE et ces deux maladies a ainsi été mis en évidence.

A ce jour, peu de modulateurs de l'enzyme sont disponibles pour agir sur la dégradation de ces peptides. La mise au point de composés activant ou inhibant l'activité d'IDE est indispensable pour l'étude de son mode de fonctionnement et ultérieurement pour le développement d'agents thérapeutiques.

Ce mémoire expose les travaux effectués pour la conception et l'optimisation de nouveaux modulateurs d'IDE. Deux méthodes ont été utilisées pour découvrir et concevoir ces nouveaux composés. La majeure partie de ce travail a été le développement d'une série de modulateurs à partir d'un composé trouvé par criblage d'une chimiothèque. Dans un deuxième temps, la méthode de Click Chemistry *in situ*, qui connaît un fort développement ces dernières années, a été appliquée à IDE pour engendrer de nouveaux composés.

¹ Cryptidase : pept<u>idase</u> à large cavité (<u>crypte</u>)

Chapitre I : Insulin-Degrading Enzyme (IDE): une enzyme clé méconnue

I. <u>Généralités</u>

L'insulysine ou IDE (Insulin-Degrading Enzyme ; EC 3.4.24.56) est une métalloprotéase à zinc dégradant un grand nombre de peptides physiologiques. Découverte en 1949 pour sa capacité à dégrader rapidement l'insuline par Mirsky *et al.*, ² elle reste encore mal connue. Depuis quelques années, l'intérêt pour cette enzyme s'est intensifié (Figure 1), en particulier depuis que sa structure tridimensionnelle a été élucidée par diffraction des rayons X en 2006 par l'équipe du Pr. Tang.³



Figure 1. Nombre de publications sur l'Insulin-Degrading Enzyme par an⁴

IDE est une enzyme volumineuse (110 kDa) appartenant à la famille M16 des métalloprotéases. Contrairement à la majorité des métalloprotéases, le site de liaison du zinc est inversé (HxxEH au lieu de HExxH, famille des inverzincines). De plus, elle est considérée comme une "cryptidase" ; en effet elle possède une très grande cavité catalytique (16 000 Å³).

² Mirsky and Broh-Kahn, The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Archiv. Biochem.*, **1949**. 20: p. 1.

³ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.

⁴ Web of Science; mot-clés: "Insulysin", "Insulin-Degrading Enzyme"

IDE est une enzyme très conservée : elle est retrouvée chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (Figure 2).

		Length	Similarity/identity	Sequence ID
	E. coli pitrilysin	904 aa	38%/ 24%	AAB40468
	Human IDE	1019 aa	100%/100%	NP004960
	Chimpanzee, Pan troglodytes	1044 aa	97%/ 97%	XP507922
	Mouse, Mus musculus	1019 aa	96%/ 95%	AAH41675
ЫЧ	H Rat, Rattus norvegicus	1019 aa	96%/ 95%	NP037291
1	Honey bee, Apis mellifera	904 aa	57%/ 44%	XP396981
	Fruit fly, Drosophila melanogaster	990 aa	59%/ 44%	P22817
$H \sim$	Mosquito, Anopheles gambiae	984 aa	58%/ 44%	EAA07246
	Nematode, Caenorhabditis briggsae	934 aa	54%/ 39%	CAE64571
I ———	Nematode, Caenorhabditis elegans	1051 aa	53%/ 39%	AF016421
	Cress, Arabidopsis thaliana	970 aa	50%/ 36%	NP181710
		971 aa	50%/ 46%	CAC67408
	Rice, Oryza sativa	988 aa	50%/ 36%	XP478770
	Fungi, Gibberella zeae	1023 aa	49%/ 36%	EAA76500
		1082 aa	48%/ 35%	XP956166
	Yeast, Candida glabrata	1008 aa	49%/ 35%	CAG60009
┨┌─└──	Yeast, Saccharomyces cerevisiae	1027 aa	49%/ 35%	AAB82351
	Yeast, Kluyveromyces lactis	1004 aa	50%/ 36%	XP454175
ų	Yeast, Candida albicans	1107 aa	44%/ 32%	XP719241
	Yeast, Yarrowia lipolytica	1027 aa	52%/ 38%	XP505854
		1292 aa	42%/ 31%	XP759404
1	fungi, Crystococcus neoformans	1162 aa	45%/ 31%	EAL18851
	Yeast, Schizosaccharomyces pombe	969 aa	48%/ 34%	CAA20142
D !-	A	:	IDE ⁵	

Figure 2. Arbre phylogénétique d'IDE⁵

La séquence d'IDE humaine est à 95 % identique à celle du rat et de la souris. En particulier, les domaines catalytiques sont strictement identiques (Figure 3).

		108	112	
Rat	IGSLSDPPNIF	GLS <mark>H</mark> FC	EHMLFLGTKK	120
Souris	IGSLSDPPNIF	GLS <mark>H</mark> FC	EHMLFLGTKK	120
Humain	IGSLSDPPNIA	GLS <mark>H</mark> FC	EHMLFLGTKK	120

Figure 3. Alignement des séquences IDE humaine, souris et rat⁶

IDE est exprimée dans tous les tissus et pas uniquement dans les cellules insulinosensibles.⁷ Une plus forte concentration est par ailleurs observée dans le foie, les muscles, les testicules et le cerveau. Au niveau cellulaire, elle est abondante dans le cytosol, les peroxysomes et est aussi retrouvée dans le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et le compartiment extracellulaire.

⁵ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.

⁶ CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment; NP_037291.1Rattus/AAH41675.1Mus/NP_004960.1Homo

⁷ Duckworth, et al., Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocr. Rev.*, **1998**. 19: p. 608.

Ses substrats connus⁸ sont nombreux et divers : l'insuline, le glucagon, l'Insulin Growth Factor-II (IGF-II), le Transforming Growth Factor-II (TGF-II), le peptide atrial natriuretique (ANP), l'amyline, la somatostatine, le peptide β -amyloïde (A β), la β endorphine ainsi que l'ubiquitine. L'insulysine les dégrade en les clivant en différents endroits du peptide (Figure 4).



Figure 4. Sites de coupure des principaux substrats par IDE^{9,10} PDB : insuline 1ZNI; ab 1-40: 1AML; IGF-II: 2GF1; glucagon: 1GCN; amyline: 1KUW

Leurs séquences primaires n'ont pas ou peu d'homologie mais pour la plupart (amyline, insuline, IGF-I et II, ANP, peptide β -amyloïde) leurs structures secondaires sont similaires et ils présentent un caractère amyloïdogène.¹¹ En effet, ils sont tous connus pour former des agrégats. Dans le Figure 5 ci-après, les résidus impliqués dans l'agrégation de l'insuline, du peptide A β et de l'amyline sont colorés du jaune au rouge en fonction de leur tendance plus ou moins grande à participer à l'agrégation. La majorité de la séquence de ces trois peptides possède une importante capacité à agréger.

⁸ Duckworth, et al., Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocr. Rev.*, **1998**. 19: p. 608.

⁹ Malito, et al., Amyloid β-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**. 65(16): p. 2574.

¹⁰ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.

¹¹ Qiu and Folstein, Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of Aging*, **2006**. 27(2): p. 190.



Figure 5. Résidus plus ou moins impliqués dans l'agrégation de l'insuline, du peptide $A\beta_{1-42}$ et de l'amyline¹²

II. Structure de l'enzyme

1. Structure générale

IDE est composée de 4 domaines (1, 2, 3 et 4). Les domaines 1 (en vert; 43-285) et 2 (en rouge; 286-515) forment la partie N-terminale de l'enzyme (IDE-N) et les domaines 3 (en jaune; 542-768) et 4 (en bleu; 769-1016), la partie C-terminale (IDE-C)¹³ (Figure 6). IDE-N et C sont reliés par une boucle de 26 acides aminés (516-541) et forment une cavité fermée d'environ 16 000 Å³.



¹² Jahn and Radford, Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**. 469(1): p. 100.

¹³ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, 2006.
443: p. 870.

2. Site catalytique

La région IDE-N est majoritairement neutre ou chargée négativement tandis que la région IDE-C est majoritairement chargée positivement. La partie IDE-N contient le site catalytique où l'ion zinc est coordonné par deux histidines (H108 et H112) et deux glutamates (E111 et E189) (Figure 7). Ce dernier a été montré comme étant essentiel pour l'activité catalytique.¹⁴



Figure 7. L'atome de zinc est coordonné par deux histidines et deux glutamates

Plusieurs résidus appartenant au domaine 1 (IDE-N) et au domaine 4 (IDE-C) forment le site catalytique et interagissent avec les sites de coupure des substrats.¹⁵ Par exemple, dans le cas du peptide $A\beta_{1-40}$ (Figure 8), la majorité des résidus qui interagissent avec le peptide appartiennent au domaine IDE-N (en vert) mais trois d'entre eux proviennent du domaine IDE-C (en bleu).



Figure 8. Détails des interactions entre le peptide $A\beta_{1-40}$ et le site catalytique en vert : résidus appartenant au domaine IDE-N; en bleu : résidus appartenant au domaine IDE-C

IDE peut être comparée à un coquillage où les deux régions IDE-N et IDE-C seraient les deux coquilles. Ces deux régions pivotent autour de la boucle qui fait charnière pour passer d'une forme fermée à une forme ouverte. Lorsque l'enzyme est ouverte les domaines 1 et 4 ne se touchent pas. Le site catalytique n'est donc complètement formé que lorsque l'enzyme est fermée.

¹⁴ Perlman, et al., Functional analysis of conserved residues in the active site of insulin-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.*, **1993**. 268(29): p. 21538.

¹⁵ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.

3. IDE possède un deuxième site essentiel à la catalyse : l'exosite

Les co-cristallisations de l'enzyme avec ses substrats^{16,17} ont montré l'existence d'un deuxième site essentiel à l'hydrolyse des substrats en plus du site catalytique. Ce site appelé exosite est situé à 30 Å de l'atome de zinc (Figure 9).



Figure 9. Localisation du site actif et de l'exosite (PDB : 2JG4)

Ce site est important pour l'ancrage des substrats. En effet, ces derniers se lient tout d'abord à l'exosite avant de venir se positionner au niveau du site catalytique. Pour cela, ils subissent un changement conformationnel^{16,18,19} (Figure 10) en passant d'une hélice α à un feuillet β .²⁰

¹⁶ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.

¹⁷ Malito, et al., Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry*, **2008**. 47(48): p. 12822.

¹⁸ Guo, et al., Molecular Basis for the Recognition and Cleavages of IGF-II, TGF-[alpha], and Amylin by Human Insulin-Degrading Enzyme. *J. Mol. Biol.*, **2010**. 395(2): p. 430.

¹⁹ Manolopoulou, et al., Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.*, **2009**. 284(21): p. 14177.

²⁰ Malito, et al., Amyloid β-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**. 65(16): p. 2574.



Figure 10. Changement conformationnel des substrats après liaison à IDE²¹ structures des substrats liés à IDE (en haut) ou non (en bas) ; en orange : extrémité N-terminale; en rouge : segment se liant au site catalytique

4. Equilibre monomère/multimère

IDE est majoritairement présente sous forme d'un dimère en équilibre avec les formes monomère et tétramère.²² Le dimère a été montré comme étant l'espèce la plus active par rapport au tétramère. Au vu de la structure cristallographique, l'activité du tétramère serait diminuée certainement à cause d'une stabilisation de la forme fermée par encombrement stérique.²³ Song *et al.* ont éliminé une partie (en bleu, Figure 11) des acides aminés (en rouge) impliqués dans l'interaction entre les deux unités d'IDE du dimère. Ce mutant se retrouve alors uniquement sous forme de monomère et n'a pas d'activité.²⁴

²¹ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, 2006.
443: p. 870.

²² Song, et al., Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. *J. Biol. Chem.*, **2003**. 278(50): p. 49789.

²³ Im, et al., Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J. Biol. Chem.*, **2007**. 282(35): p. 25453.

²⁴ Song, et al., A Monomeric Variant of Insulin Degrading Enzyme (IDE) Loses Its Regulatory Properties. *PLoS ONE*, **2010**. 5(3): p. e9719.



Figure 11. Vues orthogonales du dimère

en rouge : les résidus composant l'interface entre les deux unités ; en bleu : les résidus éliminés pour former le mutant

III. Mécanisme catalytique

IDE, au repos, est en équilibre entre sa forme fermée (IDE^c) et sa forme ouverte (IDE^o). IDE^c ne peut pas lier les substrats mais peut les dégrader après qu'ils aient été encapsulés dans la chambre catalytique. La forme ouverte IDE^o peut lier les substrats mais est moins active qu'IDE^c car le site catalytique n'est pas totalement formé (cf. paragraphe 2, p.14). Le mécanisme catalytique (Figure 12) est le suivant :

- **a** Le passage de la forme IDE^c à la forme IDE^o permet l'entrée et la liaison du substrat dans la chambre catalytique.
- **b** Le complexe IDE-substrat bascule alors vers une forme fermée.
- c Une fois piégé dans la "crypte", le substrat se lie à l'exosite par son extrémité Nterminale et change de conformation pour s'ajuster au site catalytique (passage d'une hélice α à un feuillet β). L'enzyme peut alors cliver le substrat.
- d Enfin l'enzyme s'ouvre pour éliminer les produits de dégradation.

Le passage de la forme fermée à la forme ouverte serait l'étape limitante du cycle catalytique mais les phénomènes responsables de ce passage d'un état à l'autre sont encore méconnus.



Figure 12. Cycle catalytique d'IDE²⁵

Shen *et al.*²⁶ ont remarqué que le maintien de l'enzyme en position fermée se fait par la formation de liaisons hydrogène entre les acides aminés situés à la jonction entre les deux extrémités N et C-terminales de l'enzyme créant ainsi un "loquet". Le passage de la forme fermée (IDE^c) à la forme ouverte (IDE^o) pour encapsuler le substrat puis libérer les produits de dégradation sont les étapes lentes du mécanisme catalytique (Figure 13a).

Shen *et al.* ont préparé des mutants d'IDE dont les résidus responsables de ces liaisons hydrogène ont été modifiés, favorisant la forme partiellement ouverte. Les différents mutants ont une activité catalytique 30 à 40 fois supérieure à celle de l'enzyme wild-type. La déstabilisation du "loquet" permet à l'enzyme de s'ouvrir plus rapidement et ainsi accélère le turnover de la réaction catalytique (Figure 13b).²⁶

L'enzyme pourrait être ainsi activée par des petites molécules qui empêcheraient la formation de ces liaisons hydrogène.²⁷

²⁵ Malito, et al., Amyloid β-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**. 65(16): p. 2574.

²⁶ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, 2006.
443: p. 870.

²⁷ Leissring and Selkoe, Structural biology: enzyme target to latch on to. *Nature*, **2006**. 443: p. 761.



IV. Reconnaissance des substrats

Les différents substrats de l'enzyme ne partagent pas d'homologie au niveau de leur structure primaire (voir Figure 4, p.12). La reconnaissance des substrats par IDE est donc le fait d'autres propriétés des peptides²⁸ : la taille du peptide, la liaison à l'exosite, la nature des résidus et la complémentarité de charge.

La taille du peptide doit être inférieure à 6 kDa pour lui permettre d'être encapsulé dans la chambre catalytique. La pro-insuline (~ 9 kDa), par exemple, n'est pas un bon substrat alors que l'insuline (5,8 kDa) a une très bonne affinité pour l'enzyme.

La liaison à l'exosite joue aussi un rôle déterminant ainsi que la stabilisation en feuillet β au niveau du site catalytique après la fixation à l'exosite.

L'enzyme semble, par ailleurs, avoir une préférence pour les résidus hydrophobes ou basiques au niveau des sites P1 et P1' du site catalytique (Figure 14).



Insuline chaine BPeptide $A\beta_{1-40}$ AmylineGlucagonFigure 14.Les résidus en P1 et P1' des substrats sont hydrophobes ou basiques²⁹

La comparaison des séquences se liant au niveau du site catalytique met en évidence l'existence d'un motif général de reconnaissance : hnhhhpsh où h est un résidu partiellement

²⁸ Fernandez-Gamba, et al., Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Current Pharmaceutical Design*, **2009**. 15(31): p. 3644.

²⁹ Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, 2006.
443: p. 870.

ou totalement hydrophobe, **n** est un petit résidu neutre, **p** est un résidu polaire et **s** est un résidu polaire et/ou petit (Figure 15).³⁰

Peptide	Segment	Sequence	-
-		h n h h h p s h	_
Amyloid β	14 - 28	HQKLVFFAEDVGSNK	
peptide	100 200		partiellement ou totalement hydrophobe
Insulin	19B - 30B		* petit et neutre
Glucagon	8 - 20	SDY SKYLDS R RAO	: polaire
Amylin¶	20 - 35	SNNFGA I LSS TNVGSN	+ polaire et/ou petit
		* : +	site de clivage
		a · 1 /	1

Figure 15.	Comparaison des se	équences se liant	au site catalytique ³⁰
0		1	~ 1

Enfin, la sélection des substrats se fait aussi par **complémentarité des charges** avec la chambre catalytique.³¹ En effet, l'intérieur d'IDE-N est chargé négativement et celui d'IDE-C est positif. Il faut donc que le substrat ait une distribution de charge complémentaire (Figure 16).



Figure 16. Complémentarité de charge entre IDE et le substrat

De plus, les peptides n'ayant pas leur extrémité C-terminale chargée positivement, évitant ainsi la répulsion de charge avec IDE-C, sont de meilleurs substrats pour IDE. Par exemple, l'IGF-II a une IC₅₀ de 50 nM et sa dégradation est rapide alors que l'IGF-I, qui possède des résidus basiques en C-terminale, a une IC₅₀ supérieure à 150 nM et sa dégradation est lente (Figure 17).³²

		affinité	dégradation
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	IC50=5.3 μM	rapide
GLP	HADGTFTSDVSSYLKDQAIKDFVDRLKAGQVRRE	n/a	n/a
IGF-II	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCAT-PAKSE	IC50= 50 nM	rapide
IGF-I	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA	IC50> 150 nM	lente

Figure 17. Influence de la charge de l'extrémité C-terminale sur la dégradation par IDE³³ (en rouge : résidu en C-terminale chargé positivement)

³⁰ Kurochkin, Amyloidogenic determinant as a substrate recognition motif of insulin-degrading enzyme. *FEBS Letters*, **1998**. 427(2): p. 153.

³¹ Guo, et al., Molecular Basis for the Recognition and Cleavages of IGF-II, TGF-[alpha], and Amylin by Human Insulin-Degrading Enzyme. *J. Mol. Biol.*, **2010**. 395(2): p. 430.

³² Shen, et al., Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.

³³ GLP: Glucagon like peptide

V. Régulation de la fonction de l'Insulin-Degrading Enzyme

IDE est une enzyme ubiquitaire et ses substrats sont variés, elle est donc potentiellement impliquée dans plusieurs processus biologiques différents. Plusieurs facteurs biologiques sont susceptibles de réguler IDE et inversement, elle agit elle-même sur d'autres éléments cellulaires. Nous allons voir qu'IDE est régulée par ses substrats, l'ubiquitine, l'ATP et enfin les filaments intermédiaires et qu'elle régule le protéasome.

1. <u>Régulation d'IDE par ses substrats</u>

L'activité enzymatique d'IDE semble être régulée par ses propres substrats. La β endorphine, la bradykinine et l'insuline B activent la dégradation du peptide fluorogénique Abz-GGFLRKHGQ-EDDnp.³⁴ La dynorphine B-9, à faible concentration (< 5 μ M), augmente la dégradation de A β_{1-40} d'un facteur 2,5 ; par contre, elle inhibe celle de l'insuline.

Les peptides-substrats affecteraient la cinétique de l'enzyme en diminuant le Km du substrat. Ils se lieraient à une sous-unité du dimère et induiraient un changement conformationnel de la deuxième sous-unité dont l'affinité pour son substrat serait alors augmentée. Un déplacement de l'équilibre tétramère/dimère en présence de bradykinine vers la forme dimère plus active est aussi observé. Il a été également remarqué que seuls les substrats de l'enzyme sont capables de l'activer, d'autres peptides non substrats n'ayant aucun effet sur son activité.

Tang *et al.*³⁵ ont par ailleurs montré que la bradykinine est un peptide trop petit pour se lier à la fois au site catalytique et à l'exosite. L'enzyme peut lier deux molécules de bradykinine à la fois, une au niveau de l'exosite et la deuxième au site catalytique. La bradykinine étant connue pour activer IDE³⁴, la liaison à l'exosite d'une molécule de bradykinine jouerait un rôle dans la liaison des autres substrats. En effet, les petits peptides tels que la bradykinine peuvent réduire la taille de la chambre catalytique en se liant à l'exosite et donc améliorer la liaison et le clivage des autres petits substrats.

2. L'ubiquitine : un substrat atypique d'IDE

Récemment, il a été montré que l'ubiquitine est substrat d'IDE. L'enzyme clive uniquement les deux glycines C-terminales importantes pour l'ubiquitination des protéines, rendant l'ubiquitine inactive.³⁶

La structure cristallographique de l'ubiquitine dans IDE montre que l'ubiquitine se lie de la même manière que les autres substrats : son extrémité N-terminale au niveau de l'exosite et l'autre extrémité au niveau du site catalytique. L'ubiquitine n'étant pas une protéine flexible, elle ne peut pas subir de changement conformationnel comme les autres substrats. Ceci expliquerait qu'elle ne soit pas totalement dégradée.

Par ailleurs, l'ubiquitine inhibe IDE à des concentrations supérieures à 10 μ M, par contre elle active légèrement l'enzyme à de plus faibles concentrations (2-3 μ M).³⁷

³⁴ Song, et al., Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. *J. Biol. Chem.*, **2003**. 278(50): p. 49789.

³⁵ Malito, et al., Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry*, **2008**. 47(48): p. 12822.

³⁶ Ralat, et al., Ubiquitin Is a Novel Substrate for Human Insulin-Degrading Enzyme. J. Mol. Biol., **2011**. 406(3): p. 454.

³⁷ Saric, et al., Non-covalent interaction of ubiquitin with insulin-degrading enzyme. *Mol. Cell. Endo.*, **2003**. 204(1-2): p. 11.

Grasso *et al.*³⁸ ont testé l'effet de l'ubiquitine sur la dégradation de l'insuline par IDE, ils n'ont pas observé la dégradation de l'ubiquitine par IDE mais ont remarqué que le complexe ubiquitine-IDE lie et dégrade l'insuline ; par contre, la dégradation est différente de celle effectuée par IDE seule. En effet, les produits de dégradation ne sont pas produits dans les mêmes proportions que le complexe insuline-IDE sans ubiquitine. L'ubiquitine gênerait la liaison de l'insuline dans l'enzyme. La capacité d'IDE à lier l'insuline serait réduite par la complexation de l'ubiquitine.

3. Régulation d'IDE par l'ATP

Camberos *et al.* ont montré que l'ATP inhibe la dégradation des **grands substrats** comme l'insuline, l'IGF-I ou le peptide β -amyloïde.³⁹ Leurs études mécanistiques suggèrent que soit plus d'une molécule d'ATP interagit avec IDE soit deux unités d'IDE se lient à l'ATP. Par ailleurs, ces études ont montré que l'ATP est un inhibiteur non compétitif de l'enzyme.

Il a ensuite été montré que l'ATP est aussi substrat de l'enzyme (Km = 66μ M).⁴⁰ L'ATP diminue l'affinité de l'insuline pour l'enzyme ainsi que sa dégradation. L'ATP réduit, par ailleurs, la formation du dimère en faveur du monomère, ce qui suggère un changement conformationnel de l'enzyme.

Song *et al.*⁴¹ n'ont pas pu confirmer l'inhibition de l'hydrolyse de l'insuline par l'ATP, par contre ils ont montré un effet d'activation de l'ATP sur la dégradation de **petits substrats** d'IDE. L'activation de l'enzyme serait principalement due au groupement phosphate de l'ATP. IDE possèderait un site allostérique diffèrent du site catalytique et de l'exosite où l'ATP viendrait se lier.

Im *et al.*⁴² postulent que l'ATP augmente l'activité d'IDE vis-à-vis des **petits substrats** en favorisant l'état ouvert par changement conformationnel intramoléculaire plutôt qu'intermoléculaire. En effet, par diffusion dynamique de la lumière, ils ont remarqué que la présence d'ATP augmente la taille de l'enzyme en même temps qu'elle augmente l'hydrolyse des petits substrats. Par électrophorèse, la migration d'IDE en présence d'ATP est ralentie. Ceci indique un changement de conformation de chaque molécule d'IDE individuellement. Enfin, la mesure du dichroïsme circulaire en présence d'ATP montre de façon dose-dépendante un changement dans le spectre dû à une modification de conformation de l'enzyme. Tous ces résultats indiquent que l'ATP active IDE à travers un changement conformationnel intramoléculaire qui favorise l'état ouvert. Pour appuyer cette théorie, Yao et Hersh ont montré que la liaison de l'ATP ne change pas l'état d'oligomérisation d'IDE.⁴³

³⁸ Grasso, et al., How the binding and degrading capabilities of insulin degrading enzyme are affected by ubiquitin. *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**. 1784(7-8): p. 1122.

³⁹ Camberos, et al., ATP Inhibits Insulin-Degrading Enzyme Activity. *Exp. Biol. Med.*, **2001**. 226(4): p. 334.

⁴⁰ Camberos and Cresto, Insulin-Degrading Enzyme Hydrolyzes ATP. *Exp. Biol. Med.*, **2007**. 232(2): p. 281.

⁴¹ Song, et al., ATP Effects on Insulin-degrading Enzyme Are Mediated Primarily through Its Triphosphate Moiety. *J. Biol. Chem.*, **2004**. 279(52): p. 54216.

⁴² Im, et al., Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J. Biol. Chem.*, **2007**. 282(35): p. 25453.

⁴³ Yao and Hersh, Characterization of the binding of the fluorescent ATP analog TNP-ATP to insulysin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2006**. 451(2): p. 175.

4. Régulation d'IDE par les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires constituent le cytosquelette des cellules mammifères. Ils sont composés entre autres de nestine et de vimentine.

IDE se lie à la vimentine et à la nestine⁴⁴ et cette interaction peut moduler l'activité de l'enzyme. L'addition de la vimentine ou de la nestine inhibe la dégradation des grands substrats tels que l'ubiquitine⁴⁵ et l'insuline⁴⁴ mais active celle de petits substrats.

Ralat *et al.* ont testé l'effet de la nestine sur l'inhibition de l'hydrolyse du substrat V (peptide fluorescent dérivé de la bradykinine) par l'ubiquitine 1-72 (forme inactive).⁴⁵ Lorsque l'enzyme est d'abord incubée avec la nestine, l'ubiquitine n'a pas d'action sur la dégradation du substrat V. Par contre, lorsque la nestine n'est ajoutée qu'après l'incubation de l'ubiquitine avec l'enzyme, l'ubiquitine inhibe la dégradation (Figure 18).



Figure 18. Régulation d'IDE par la nestine⁴⁵

La nestine affecterait allostériquement IDE en induisant un changement conformationnel de celle-ci. Ce changement empêcherait l'ubiquitine d'entrer dans la chambre catalytique mais n'empêcherait pas l'entrée de petits substrats comme le substrat V. IDE n'a besoin d'ouvrir que partiellement sa cavité catalytique pour les petits substrats alors que pour accueillir les grands substrats, il faut que la crypte soit totalement ouverte. La liaison de la nestine/vimentine à IDE modifierait l'ouverture de la chambre catalytique de façon à ce que les grands substrats ne puissent plus pénétrer à l'intérieur sans toutefois empêcher l'entrée des petits substrats.

⁴⁴ Chou, et al., Structural changes in intermediate filament networks alter the activity of insulin-degrading enzyme. *FASEB Journal*, **2009**. 23(11): p. 3734.

⁴⁵ Ralat, et al., Ubiquitin Is a Novel Substrate for Human Insulin-Degrading Enzyme. J. Mol. Biol., **2011**. 406(3): p. 454.

L'activité d'IDE est modulée par plusieurs de ses substrats ainsi que par certains des composants des filaments intermédiaires. De manière générale, ils modulent l'activité de l'enzyme de manière substrat-dépendante (Tableau 1) : l'hydrolyse des grands substrats est majoritairement inhibée et celle des petits substrats activée. Cependant, leur mode d'action diffère : certains changent l'état d'oligomérisation de l'enzyme, d'autres modifient l'état conformationnel de l'enzyme favorisant plus ou moins l'état ouvert ou modifiant l'affinité du substrat.

Modulateurs		Action		Explication	
β-endorphine Insuline B Bradykinine		Active	l'hydrolyse d'un substrat 12 aa	Augmente l'affinité du substrat par changement conformationnel de la 2 ^{ème} sous-unité	
Dynorphine B-9		Inhibe l'hydrolyse de l'insuline		_	
		Active	l'hydrolyse d'Aβ		
Ilbiquitino –	$\overline{C} \sim 2-3 \ \mu M$	Inhibe	_ IDE		
Ubiquitille –	C > 10 µM	Active		-	
АТР		Inhibe	l'hydrolyse des grands substrats	Diminue l'affinité de l'insuline Déplace l'équilibre vers la forme monomère	
		Active	l'hydrolyse des petits substrats	Favorise l'état ouvert par un changement conformationnel	
Filaments		Inhibe	l'hydrolyse des grands substrats	Empêche l'entrée du substrat	
intermédiaires		Active	l'hydrolyse des petits substrats	-	

Tableau 1. Récapitulatif de l'effet de certains acteurs biologiques sur IDE

5. Régulation du protéasome par IDE

IDE est régulée par différents acteurs biologiques mais elle est aussi un élément régulateur. En particulier, IDE forme un complexe avec le protéasome⁴⁶ ce qui active ce dernier (étape **a**, Figure 19), certainement *via* un effet allostérique sur le protéasome.^{47,48}

L'insuline interagit avec ce complexe *via* $IDE^{49,48}$ et inhibe indirectement l'activité protéolytique du protéasome (b). L'ajout d'insuline conduit à une dissociation du complexe IDE-protéasome et donc à une activité moindre par rapport à celle du complexe IDE-protéasome (c).^{50,51}



Figure 19. Interactions IDE-protéasome⁵²

Plusieurs substrats d'IDE ont montré un effet inhibiteur sur le protéasome, des peptides non substrats ont aussi été testés sans effet sur le protéasome.⁴⁹ Parmi les substrats d'IDE, la pro-insuline a un effet sur l'activité protéolytique mais de façon moins importante que l'insuline, de même pour l'IGF-1 *vs* l'IGF-2. La pro-insuline et l'IGF-1 sont des ligands d'IDE mais sont peu dégradés par l'enzyme, suggérant que l'inhibition du protéasome *via* IDE nécessite la liaison du peptide à l'enzyme mais aussi sa dégradation.^{48,49}

⁴⁶ Fawcett, et al., Regulation of protein degradation by insulin-degrading enzyme: analysis by small interfering RNAmediated gene silencing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2007**. 468(1): p. 128.

⁴⁷ Bennett, et al., Identification and isolation of a cytosolic proteolytic complex containing insulin degrading enzyme and the multicatalytic proteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1994**. 202(2): p. 1047.

⁴⁸ Duckworth, et al., A direct inhibitory effect of insulin on a cytosolic proteolytic complex containing insulin-degrading enzyme and multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.*, **1994**. 269(40): p. 24575.

⁴⁹ Bennett, et al., Characterization of the insulin inhibition of the peptidolytic activities of the insulin-degrading enzymeproteasome complex. *Diabetes*, **1997**. 46(2): p. 197.

⁵⁰ Duckworth, et al., Insulin acts intracellularly on proteasomes through insulin-degrading enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1998**. 244(2): p. 390.

⁵¹ Bennett, et al., Insulin inhibits the ubiquitin-dependent degrading activity of the 26S proteasome. *Endocrinology*, **2000**. 141(7): p. 2508.

⁵² Fawcett and Duckworth, Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? *Diabetologia*, **2009**. 52(8): p. 1457.

Des inhibiteurs d'IDE (phénantroline, NEM, bacitracine, nelfinavir⁵³) inhibent aussi l'activité protéolytique lorsque le protéasome est complexé avec IDE mais n'ont aucun effet sur le protéasome seul.⁵⁴ Ceci confirme un effet régulateur d'IDE sur le protéasome.

VI. Implication d'IDE dans plusieurs pathologies

IDE est liée à la dégradation de plusieurs peptides physiologiques très divers et qui interviennent dans des processus biologiques très différents. C'est pourquoi IDE est potentiellement impliquée dans plusieurs pathologies.

L'insuline, le glucagon et l'amyline sont trois substrats d'IDE impliqués dans le diabète. Le peptide A β est impliqué dans la maladie d'Alzheimer. L'insuline inhibe la phosphorylation de la protéine tau, protéine responsable de la formation des enchevêtrements neurofibrillaires, impliquée aussi dans la maladie d'Alzheimer.⁵⁵

C'est pourquoi le diabète et la maladie d'Alzheimer sont les deux maladies pour lesquelles l'implication d'IDE est très étudiée.

1. Diabète de type II

L'insuline et le glucagon sont les hormones responsables de la régulation du taux de glucose dans le sang.

L'insuline provoque le stockage du glucose lorsque la glycémie est élevée et inversement le glucagon déclenche la libération du glucose lorsqu'elle est basse. L'amyline est produite en même temps que l'insuline pour inhiber la sécrétion du glucagon (Schéma 1).



Schéma 1. Régulation du taux de glycémie par l'insuline, l'amyline et le glucagon

L'insuline et l'amyline sont sécrétées par les cellules β du pancréas alors que le glucagon est sécrété par les cellules α . Dans le cas du diabète, les cellules deviennent insulinorésistantes, elles ne répondent plus à la stimulation de l'insuline. Le taux de glucose dans le sang ne diminuant pas, les cellules β sécrètent de l'insuline jusqu'à l'épuisement et elles ne pourront plus en produire par la suite. Les dépôts amyloïdes composés d'amyline sont aussi une cause de déficience des cellules β .

⁵³ Hamel, et al., Effect of nelfinavir on insulin metabolism, proteasome activity and protein degradation in HepG2 cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **2006**. 8(6): p. 661.

⁵⁴ Hamel, et al., Regulation of Multicatalytic Enzyme Activity by Insulin and the Insulin-Degrading Enzyme. *Endocrinology*, **1998**. 139(10): p. 4061.

⁵⁵ Craft and Stennis Watson, Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *The Lancet Neurology*, **2004**. 3(3): p. 169.

Plusieurs études ont montré un lien entre IDE et le diabète. En effet, les souris -/- IDE⁵⁶ développent une insulino-résistance.⁵⁷ Ces souris n'expriment pas IDE : l'insuline n'est donc pas dégradée, les récepteurs sont saturés et les cellules deviennent résistantes.

Par ailleurs, des études génétiques⁵⁸ ont mis en évidence que les rats Goto-Kakizaki (GK) sont porteurs d'une mutation de deux acides aminés de la protéine IDE menant à une baisse d'activité de 31 % de l'enzyme. Ces rats présentent également un phénotype de diabète de type II.⁵⁹

Enfin, l'inhibition de la dégradation de l'amyline accélère son agrégation et la formation de dépôts amyloïdes,⁶⁰ ces dépôts étant cytotoxiques pour les cellules β pancréatiques.

2. Maladie d'Alzheimer

Les causes de la maladie d'Alzheimer sont encore mal connues. Néanmoins, l'accumulation de peptide β -amyloïde dans le cerveau en plaques séniles jouerait un rôle dans la neurodégénérescence.

Le peptide A β est produit lors du clivage de l'APP (amyloid precurseur protein) par les sécrétases α , β , γ (Figure 20), s'accumule et finit par s'agréger en plaques chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.



Figure 20. Production du peptide $A\beta$ à partir de l'APP

Tout comme pour le diabète, plusieurs études mettent en évidence un lien entre la maladie d'Alzheimer et IDE.

Miller *et al.*⁶¹ ont montré que le taux de peptide A β est multiplié par 1,5 dans le cerveau des souris -/- IDE. Chez les rats GK (phénotype diabétique et présentant une mutation du gène

⁵⁶ dont le gène de l'enzyme a été éteint.

⁵⁷ Fawcett and Duckworth, Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? *Diabetologia*, **2009**. 52(8): p. 1457.

⁵⁸ Fakhrai-Rad, et al., Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Human Molecular Genetics*, **2000**. 9(14): p. 2149.

⁵⁹ Qiu and Folstein, Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of Aging*, **2006**. 27(2): p. 190.

⁶⁰ Bennett, et al., An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures. *Diabetes*, **2003**. 52(9): p. 2315.

⁶¹ Miller, et al., Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.*, **2003**. 100(10): p. 6221.

IDE rendant l'enzyme moins active), le peptide A β est moins bien dégradé (-20 %).⁶² Chez les humains, l'activité d'IDE est déjà diminuée chez les patients ayant un MCI (mild cognitive impairment : phase de transition entre le vieillissement normal et le début de la maladie d'Alzheimer).⁶³ Il a aussi été montré que l'activité d'IDE dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer est inférieure à celle d'un cerveau sain.⁶⁴

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'apolipoprotéine E (ApoE), une protéine importante pour le métabolisme des lipoprotéines, se lie aux plaques séniles extracellulaires. Une étude épidémiologique a montré que l'allèle ε 4 du gène ApoE est surreprésenté chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer.⁶⁵ Il a aussi été remarqué que la quantité d'IDE dans l'hippocampe est réduite de 50 % chez les patients malades d'Alzheimer et porteurs de l'allèle ε 4 du gène ApoE par rapport à ceux qui ne l'ont pas et aux personnes non atteintes.⁶⁶

De manière encourageante, il a été observé que la surexpression d'IDE dans le cerveau murin conduit à une diminution de la quantité d'A β agrégé et un ralentissement de la progression de la maladie d'Alzheimer.⁶⁷

3. IDE : lien entre le diabète et la maladie d'Alzheimer?

Le lien entre le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer n'est pas clairement défini mais pourrait impliquer l'enzyme IDE. Plusieurs études montrent que les malades du diabète de type II ont plus de risque de développer la maladie d'Alzheimer.^{64,68}

Nous avons vu que la souris knock-out IDE (-/- IDE) est insulino-résistante et que l'on retrouve un niveau élevé d'A β dans son cerveau. De même chez les rats GK, la mutation du gène IDE est responsable d'une diminution de la dégradation de l'insuline (-24 %) et du peptide A β (-20 %).⁶⁹

Les différents substrats d'IDE ont des Km différents pour l'enzyme, ils peuvent donc être compétitifs les uns par rapport aux autres. L'insuline (Km ~ 0,1 μ M) inhibe l'hydrolyse d'A β par IDE. Si le taux d'insuline augmente dans le cerveau, dans le cas d'une insulino-résistance par exemple, le peptide A β ne sera plus dégradé, le peptide va donc s'accumuler, s'agréger et causer la mort neuronale (Figure 21).

⁶² Farris, et al., Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am. J. Path.*, **2004**. 164(4): p. 1425.

⁶³ Zhao, et al., Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, **2007**. 28(6): p. 824.

⁶⁴ Qiu and Folstein, Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of Aging*, **2006**. 27(2): p. 190.

⁶⁵ Strittmatter, et al., Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in lateonset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.*, **1993**. 90(5): p. 1977.

⁶⁶ Cook, et al., Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am. J. Path.*, **2003**. 162(1): p. 313.

⁶⁷ Leissring, et al., Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*, **2003**. 40(6): p. 1087.

⁶⁸ Messier and Teutenberg, The Role of Insulin, Insulin Growth Factor, and Insulin-Degrading Enzyme in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity*, **2005**. 12(4): p. 311.

⁶⁹ Farris, et al., Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am. J. Path.*, **2004**. 164(4): p. 1425.



Figure 21. Compétition entre l'insuline et le peptide $A\beta^{70}$ 1-l'insuline a plus d'affinité qu'A β pour IDE ; 2- lorsque le taux d'insuline augmente, A β n'est plus dégradé car il ne peut entrer en compétition avec l'insuline

De plus, le gène codant pour IDE est porté par le chromosome 10. Il s'agit du même chromosome qui porte potentiellement les gènes importants impliqués dans le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer.

Le diabète et la maladie d'Alzheimer ne sont que deux des pathologies dans lesquelles IDE pourrait être impliquée. En effet, ses autres substrats entrent en jeu dans bien d'autres voies biologiques. Par exemple, le dysfonctionnement du processus d'ubiquitination contribuerait à certaines pathologies comme la chorée de Huntington, la maladie de Parkinson mais aussi la maladie d'Alzheimer,^{71,72} l'ubiquitine s'accumulant aussi dans les neurones des patients malades d'Alzheimer.⁷¹ Par ailleurs, IDE a aussi été identifiée comme étant le récepteur cellulaire du virus varicella zoster.⁷³

La modulation de l'activité de cette enzyme est donc un enjeu majeur pour la compréhension des pathologies et la mise au point de nouveaux traitements.

⁷⁰ Qiu and Folstein, Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of Aging*, **2006**. 27(2): p. 190.

⁷¹ Grasso, et al., How the binding and degrading capabilities of insulin degrading enzyme are affected by ubiquitin. *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**. 1784(7-8): p. 1122.

⁷² Neant-Fery, et al., Molecular basis for the thiol sensitivity of insulin-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad.Sci.*, **2008**. 105(28): p. 9582.

⁷³ Li, et al., Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell*, **2006**. 127(2): p. 305.

VII. Modulation d'IDE par des petites molécules

- 1. <u>Généralités : Modulation des protéases</u>
 - a. Inhibition

Il existe plusieurs façons d'inhiber une protéase. Les premières stratégies développées ont été de concevoir des mimes du substrat naturel de l'enzyme ciblée. Des molécules non-peptidomimétiques peuvent aussi être développées à partir de structures découvertes par criblage de chimiothèque. Ces structures sont ensuite optimisées pour augmenter l'activité grâce aux relations structure-activité et à la cristallographie. Enfin, depuis quelques années, la recherche d'inhibiteurs irréversibles connaît un nouvel essor.⁷⁴

Dans le cas des métalloprotéases à zinc, l'ajout d'une fonction ligand du zinc permet d'augmenter la liaison au niveau du site catalytique.

b. Activation

L'activation d'une enzyme peut être effectuée de plusieurs façons (Figure 22)⁷⁵ :

- Liaison d'une molécule à un site allostérique directement dans le domaine catalytique d'une enzyme "dormante" pour favoriser la conformation active (A1) ;
- Liaison d'une molécule à un site allostérique pour faciliter une modification posttranslationnelle irréversible du précurseur de l'enzyme active (A2) ;
- Liaison d'une molécule à une sous-unité régulatrice pour favoriser la génération de la forme active du domaine catalytique (B1) ;
- Liaison d'une molécule à une sous-unité régulatrice pour favoriser un état d'oligomérisation actif de l'enzyme (B2).



Figure 22. Méthodes d'activation d'une enzyme en rouge : molécule activatrice ; en orange : substrat ; en vert : sous-unité régulatrice

Dans le cas d'IDE, les stratégies A1 et B2 peuvent être utilisées pour activer l'enzyme. En effet, l'état d'oligomérisation est important pour l'activité de l'enzyme : le dimère étant plus

⁷⁴ Jacobsen, et al., To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.Cell Res.*, **2010**. 1803(1): p. 72.

⁷⁵ Zorn and Wells, Turning enzymes ON with small molecules. *Nat Chem Biol*, **2010**. 6(3): p. 179.

actif que le monomère et le tétramère (méthode B2). De même, le passage de la forme fermée à la forme ouverte est critique dans la cinétique de la catalyse (méthode A1).

2. Inhibiteurs d'IDE décrits dans la littérature

Il y a peu d'inhibiteurs d'IDE décrits et la majorité ne sont pas sélectifs et peu puissants. Parmi eux, on peut citer la bacitracine⁷⁶ (IC₅₀ = 400 μ M), utilisée comme antibiotique ; la 1,10-phénantroline⁷⁶ (IC₅₀ = 300 μ M), chélateur de métaux ; la *N*-éthylmaléimide (IC₅₀ = 220 μ M)⁷⁶, inhibiteur irréversible des peptidases à cystéines ; l'EDTA (47 % d'inhibition à 10 mM)⁷⁷, chélateur de métaux (Figure 23).



Figure 23. Inhibiteurs non sélectifs d'IDE

Le nelfinavir (Figure 24), médicament antirétroviral utilisé pour le traitement de l'infection par le virus du sida par inhibition de l'HIV protéase, inhibe aussi IDE^{78} (50 % d'inhibition à 100 μ M).



Figure 24. Structure du Nelfinavir

Récemment, Leissring *et al.*^{79,80} ont décrit le premier peptide hydroxamique inhibiteur d'IDE (Figure 25). Ce peptide a été conçu par design rationnel en déconvoluant les acides aminés aux positions S'1 et S'2 du site catalytique.

⁷⁶ Leissring, et al., Designed Inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme Regulate the Catabolism and Activity of Insulin. *PLoS ONE*, **2010**. 5(5): p. e10504.

⁷⁷ Ding, et al., Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and Escherichia coli protease III. *J. Biol. Chem.*, **1992**. 267(4): p. 2414.

⁷⁸ Hamel, et al., Effect of nelfinavir on insulin metabolism, proteasome activity and protein degradation in HepG2 cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **2006**. 8(6): p. 661.



Figure 25. Ii1 : inhibiteur hydroxamate peptidomimétique d'IDE

Le Ki de cet inhibiteur mesuré avec l'insuline (16,3 nM) est 10 fois plus élevé que celui mesuré avec un substrat plus court (FRET1, 9 aa, Ki = 1,7 nM). Cette différence peut être due au fait que l'inhibiteur ne pourrait être encapsulé dans l'enzyme qu'avec de petits substrats. Dans le cas des grands substrats, l'exosite, auquel ils se lient avant de venir interagir avec le site catalytique, leur servirait de point d'appui pour déplacer l'inhibiteur du site catalytique, diminuant ainsi l'affinité du composé pour l'enzyme.

Au niveau cellulaire, **Ii1** présente une inhibition dose-dépendante de la dégradation de l'insuline extracellulaire. Malheureusement, la nature peptidique du composé ainsi que la présence de la fonction hydroxamique et le résidu arginine sont autant de frein à son développement comme un outil pharmacologique ou un agent thérapeutique.

3. Activateurs d'IDE décrits dans la littérature

La suramine (Figure 26) était utilisée pour le traitement de la maladie du sommeil et est actuellement utilisée pour ses propriétés anti-cancéreuses. Elle inhibe également la transcriptase inverse, enzyme importante dans la réplication des rétrovirus. Plus récemment, elle a été identifiée par Roche⁸¹ comme un activateur d'IDE, cette molécule active d'un facteur 4 l'enzyme. Malheureusement, ses propriétés pharmacocinétiques ne sont pas optimales à cause de son haut poids moléculaire et ses nombreuses fonctions sulfates qui ne lui confèrent pas une bonne biodisponibilité.



Figure 26. Structure de la suramine

⁷⁹ Leissring, et al., Designed Inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme Regulate the Catabolism and Activity of Insulin. *PLoS ONE*, **2010**. 5(5): p. e10504.

⁸⁰ Leissring, et al. Hydroxamate inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme and uses thereof. WO 2008/156701, 13 June 2008, **2008**.

⁸¹ Adessi, et al. Activator for insulin degrading enzyme. WO2006066847, 29th Jun., **2006**.

Leissring *et al.*⁸² ont décrit les premiers activateurs "drug-like" **Ia1** et **Ia2**-(a-d) (Figure 27). Ces composés ont été découverts par criblage et n'ont pas été optimisés. **Ia1** active l'hydrolyse du substrat FRET1⁸³ de ~ 500 % à 200 μ M. **Ia2**-a est moins actif avec une augmentation de ~ 60 % à 6,25 μ M. Ces composés empêchent la liaison de l'ATP à IDE mais ont un effet synergique avec ce dernier. Les auteurs en concluent que les composés occupent un site proche de celui de l'ATP avec une superposition partielle. Par contre, ces composés n'ont pas d'effet sur l'hydrolyse d'A β seul. Ils n'activent sa dégradation qu'en présence d'un autre petit peptide. Enfin, l'effet de ces composés n'a été testé dans aucun test cellulaire.



Comme nous l'avons vu précédemment, IDE jouerait un rôle dans des pathologies qui deviennent de plus en plus préoccupantes. En 2010, 285 millions de diabétiques étaient recensés dans le monde. Ce nombre est estimé à 438 millions en 2030.⁸⁴ La maladie d'Alzheimer touche 25 millions de personnes dans le monde. D'ici à 2050, le nombre de malades pourrait dépasser 50 millions.⁸⁵

Malgré un nombre croissant de publications, le rôle de l'enzyme dans les différentes voies biologiques reste mal connu. Et peu de modulateurs sont décrits, que ce soit en activation ou en inhibition. Les quelques composés décrits sont peu sélectifs et/ou peu puissants ou leur nature n'en font pas des médicaments idéaux.

<u>Inhibiteur</u>	Activité	Usage	<u>Activateur</u>	Activité	Usage
Bacitracine	$IC_{50} = 400 \ \mu M$	Antibiotique	Suramine	*4	Anti-cancéreux
1,10-phénantroline	$IC_{50} = 300 \ \mu M$	Chélateur de métaux	Ia1-2	+ 500 % à 200 μM	_
<i>N-</i> éthylmaléimide	$IC_{50} = 220 \ \mu M$	inhibiteur irréversible des peptidases à cystéines			
EDTA	47 % d'inhibition à 10 mM	Chélateur de métaux			
Nelfinavir	50 % d'inhibition à 100 μM	antirétroviral			
Ii1	Ki = 16,3 nM	_			

Tableau 2.Modulateurs décrits d'IDE

⁸² Cabrol, et al., Small-Molecule Activators of Insulin-Degrading Enzyme Discovered through High-Throughput Compound Screening. *PLoS ONE*, **2009**. 4(4): p. e5274.

⁸³ 9aa, Ki = 1,7 nM

⁸⁴ IDF. IDF Diabetes Atlas, 4th edition. 2009 [cited 2011 05/17]; Available from:

http://www.diabetesatlas.org/sites/default/files/At%20a%20Glance_WORLD.pdf.

⁸⁵ LECMA. Alzheimer en France et dans le monde. 2011 [cited 2011 05/17]; Available from: http://www.maladiealzheimer.fr/maladie_france.php.

Il n'existe donc pas à ce jour d'outils pharmacologiques ciblés et performants permettant l'étude de l'enzyme *in vitro* et *in vivo*. Mon travail de thèse a donc été de concevoir, synthétiser et optimiser de tels composés.

Le criblage d'une chimiothèque focalisée a permis la découverte d'un composé qui a été optimisé et étudié. En parallèle, un autre inhibiteur a été conçu par réaction de Click Chemistry *in situ*.

Chapitre II : Découverte des premiers modulateurs substrat-dépendants d'IDE

I. <u>Découverte d'un composé inhibiteur de l'hydrolyse d'Aβ</u>

La première stratégie utilisée pour découvrir des composés inhibiteurs de l'enzyme a été le criblage d'une chimiothèque du laboratoire ciblée "ligand du zinc". La structure de la tête de série ainsi identifiée sera optimisée pour améliorer son activité et ses propriétés ADME.

La méthode la plus classique pour inhiber une métalloprotéase à zinc est d'empêcher la liaison des substrats à l'ion Zn^{2+} catalytique.⁸⁶ L'inhibiteur doit donc entrer en compétition avec le substrat, il faut que le composé vienne se lier au métal.

Le composé doit, par conséquent, posséder un groupement présentant une grande affinité pour l'ion zinc, la présence d'une fonction ligand du zinc (zinc binding group, ZBG) est indispensable. Ces différents groupements peuvent être :

- la base conjuguée d'un acide faible (acide carboxylique, acide hydroxamique) ;
- une base de Lewis de type thiol ou hétérocyclique.

Les ligands peuvent être monodentates comme l'acide carboxylique ou bidentates comme l'acide hydroxamique (Tableau 3).

⁸⁶ Abbenante and Fairlie, Protease inhibitors in the clinic. *Medecinal Chemistry*, **2005**. 1: p. 71.

ZBG	Structure	Mode de liaison ⁸⁹	ZBG	Structure	Mode de liaison
Ac. hydroxamique	R N OH	bi	Sulfodiimide	NH S ⁵ ⊻H	mono
Ac. hydroxamique inversé	OH R∕ ^N ∭O	bi	Thiodicétopipérazine		-
Ac. carboxylique	R OH	mono	Dérivés acide squarique	R R R R H OH	bi
Thiol	R [^] SH	mono	1,3,4-triazole-thiol	R ∼ N − N R ∼ N − S − R'	-
Mercaptoacétone	R SH	-	Tétrazole		mono
Mercaptoalcool	OH R SH	-	Imidazole		mono
Mercaptoamide	R ^{∕N} ↓ SH	-	1,2,4-oxadiazol-5-one 1,2,4-oxadiazol-5-thione	R N O,S	-
Thiadiazole	R ^{M−N} S ^{M−N} SH	mono	Alcool	RÔH	mono
Ac. barbiturique Ac. thiobarbiturique	$R \xrightarrow{N}_{O} H$ $R \xrightarrow{N}_{H} O,S$	mono -	Nitro	R ^{/N} ,0 ⁻	bi
Ac. phosphonique Ac. phosphinique	0 P X X=OH; R'	mono mono			

Tableau 3.Structure des ZBG les plus courants

Parmi les inhibiteurs de métalloprotéases à zinc sur le marché, la majorité possède un groupement ligand du zinc.⁹⁰ Par exemple, parmi les inhibiteurs de l'Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), le captopril et le zofenopril possèdent une fonction thiol, le fosinopril cible le zinc grâce à une fonction phosphinate et l'énalapril avec une fonction acide carboxylique (Figure 28). Excepté le captopril, les fonctions ligands du zinc sont sous forme pro-drug.

⁸⁷ Puerta and Cohen, A bioinorganic perspective on matrix metalloproteinase inhibition. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**. 4(15): p. 1551.

⁸⁸ Jacobsen, et al., To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.Cell Res.*, **2010**. 1803(1): p. 72.

⁸⁹ bi : bidentate ; mono : monodentate ; - : mode de liaison inconnu

⁹⁰ Abbenante and Fairlie, Protease inhibitors in the clinic. *Medecinal Chemistry*, **2005**. 1: p. 71.


Inhibiteurs d'ACE⁹¹ Figure 28. en vert : fonction ligand du zinc

Les produits acides sont cependant sous-représentés parmi les composés bioactifs⁹² (Figure 29a). De même, l'analyse de deux chimiothèques commerciales⁹³ met en évidence que la majorité des composés sont neutres à pH physiologique (Figure 29b).⁹⁴



répartition des pKA dans la base Current Medicinal Chemistry

Figure 29. a- Proportion de molécules acides dans les chimiothèques commerciales b- % de produits chargés à pH physiologique

а

⁹¹ Abbenante and Fairlie, Protease inhibitors in the clinic. *Medecinal Chemistry*, **2005**. 1: p. 71.

 ⁹² Composés constituant la base MDL[®] Current Medicinal Chemistry (CMC)
 ⁹³ AsinexTM et ChembridgeTM

⁹⁴ Charton, et al., Alkylsquarates as key intermediates for the rapid preparation of original drug-inspired compounds. CCHTS, 2008. 11(4): p. 294.

1. Molécules testées

Une chimiothèque de 2000 composés possédant un groupement acide et/ou ligand du zinc a été synthétisée au laboratoire. Huit groupements ont été choisis pour préparer la chimiothèque : acide carboxylique, acide hydroxamique,⁹⁵ 1,2,4-oxadiazol-5-one, 1,2,4-oxadiazole-5-thione, 1,3,4-triazole-thiol,⁹⁶ tétrazole, dérivé d'acide squarique⁹⁷ (Figure 30).



Les structures synthétisées remplissent en majorité les critères de développabilité. Le Figure 31 ci-après récapitule les statistiques de la chimiothèque en fonction des critères de la règle de Lipinski,⁹⁸ ainsi que de la surface polaire (PSA)⁹⁹ et du score de biodisponibilité (ABS)¹⁰⁰ proposés par Veber et Martin.

Au cours de l'optimisation d'un composé issu d'un criblage, le poids moléculaire du produit est souvent amené à augmenter, modifiant, dans la plupart des cas, les paramètres cidessus. Il est donc préférable de cribler des produits dont les propriétés sont les plus basses possibles afin de pouvoir les augmenter lors de la phase d'optimisation de l'activité du composé. Il est en effet difficile d'optimiser la puissance d'un composé et ses critères de biodisponibilité si la molécule a déjà au départ un haut poids moléculaire.

La règle des 5 de Lipinski⁹⁸ dit que, dans la majorité des cas, une molécule présente une faible perméation si un des critères suivants n'est pas respecté :

- pas plus de 5 donneurs de liaison hydrogène
- pas plus de 10 accepteurs de liaison hydrogène
- un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol
- un coefficient log P inférieur à 5

Veber *et al.*⁹⁹ ont montré que la biodisponibilité d'un composé est inversement proportionnelle à son nombre de liaisons à libre rotation et sa surface polaire (PSA, polar surface area) quelque soit le poids moléculaire. En effet, plus un produit est polaire, moins il

⁹⁵ Flipo, et al., A library of novel hydroxamic acids targeting the metallo-protease family: Design, parallel synthesis and screening. *BMC*, **2007**. 15(1): p. 63.

⁹⁶ Deprez-Poulain, et al., Convenient synthesis of 4H-1,2,4-triazole-3-thiols using di-2-pyridylthionocarbonate. *Tet. Lett.*, **2007**. 48(46): p. 8157.

⁹⁷ Charton, et al., Synthesis of a 200-member library of squaric acid N-hydroxylamide amides. *BMCL*, **2008**. 18(18): p. 4968.

⁹⁸ Lipinski, et al., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**. 46(1-3): p. 3.

⁹⁹ Veber, et al., Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. J. Med. Chem., **2002**. 45(12): p. 2615.

¹⁰⁰ Martin, A Bioavailability Score. J. Med. Chem., **2005**. 48(9): p. 3164.

sera biodisponible. De même, une flexibilité moléculaire réduite (donc un nombre de liaisons rotatives réduit) est préférable pour une bonne biodisponibilité. Une molécule flexible aura plus tendance à se replier sur elle-même, surtout si elle est dans un environnement qui lui est défavorable (une molécule hydrophobe dans un milieu aqueux par exemple).

Martin¹⁰¹ propose un score de biodisponibilité (A bioavailability score (ABS) qui exprime la probabilité qu'un composé ait une biodisponibilité supérieure à 10 % chez le rat ou une perméabilité Caco-2 mesurable. Les anions (chargés négativement à pH 6) ayant une PSA supérieure à 150 Å² ont un ABS de 0,11. Pour ceux dont la PSA est comprise entre 75 et 150 Å², le score ABS est de 0,56. Enfin une PSA inférieure à 75 Å² donne un score ABS de 0,85. Pour les autres composés (non anioniques), le score est de 0,55 s'ils passent la règle des 5 de Lipinski et de 0,17 dans le cas contraire.



Figure 31. Propriétés de drugabilité de la chimiothèque de composés ligands du zinc a) poids moléculaire ; b) ALogP ; c) nombre de liaisons à libre rotation ; d) surface polaire (PSA) ; e) donneurs de liaison hydrogène ; f) accepteurs de liaison hydrogène ; g) pKa ; h) charge à pH 7,4 ; i) Score de biodisponibilité (ABS).

La distribution du poids moléculaire des composés de la chimiothèque est centrée sur la valeur optimale de 350 g/mol et la majorité des composés ont un poids moléculaire ne dépassant pas 500 g/mol. Le log P des composés est majoritairement entre 2 et 4, ce qui est un bon compromis entre bonne perméation et mauvaise solubilité. Le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaison hydrogène est respectivement inférieur à 5 et 10, remplissant ainsi une des conditions de la règle des 5. La grande majorité des composés ont un score ABS supérieur

¹⁰¹ Martin, A Bioavailability Score. J. Med. Chem., **2005**. 48(9): p. 3164.

à 0,5 : ils ont une bonne probabilité d'être biodisponibles et cela malgré une moyenne de liaisons à libre rotation relativement élevée par rapport à leur poids moléculaire.

2. Principe du test de criblage

Le principe du test de criblage est basé sur le phénomène de transfert d'électron photoinduit où, après excitation du fluorophore, soit un photon est émis, soit la fluorescence est inhibée par une réaction de transfert d'électron avec un autre groupement à proximité. Marmé *et al.* ont montré que, pour différents fluorophores, le tryptophane est le meilleur acide aminé pour éteindre ("quencher") la fluorescence.¹⁰²

Un fluorophore et le tryptophane sont incorporés à la séquence peptidique dérivée du peptide A β comportant des sites de clivage.¹⁰³ Lorsque l'enzyme clive le peptide, les deux groupements sont alors trop éloignés pour que le tryptophane puisse agir sur la fluorescence (Figure 32).¹⁰⁴



Figure 32. Principe du test enzymatique¹⁰⁵

Dans notre cas, la séquence des 8 acides aminés de 16 à 23 du peptide A β (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp) contenant des sites de coupure par IDE (Phe-Phe et Phe-Ala) est utilisée (Figure 33).

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

Figure 33. Sites de coupure du peptide $A\beta_{1-40}$

¹⁰² Marmé, et al., Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *Bioconjugate Chemistry*, **2003**. 14(6): p. 1133.

¹⁰³ Adessi, et al. Activator for insulin degrading enzyme. WO2006066847, 29th Jun., **2006**.

¹⁰⁴ Marmé, et al., Highly Sensitive Protease Assay Using Fluorescence Quenching of Peptide Probes Based on Photoinduced Electron Transfer. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**. 43(29): p. 3798.

¹⁰⁵ Un compose inhibiteur diminuera le clivage du peptide, la fluorescence sera inférieure au contrôle ; inversement, un composé activateur augmentera le clivage du peptide, la fluorescence sera alors supérieure.

Une cystéine est ajoutée à l'extrémité C-terminale du peptide pour pouvoir ancrer le fluorophore ainsi qu'un tryptophane à l'extrémité N-terminale qui servira de "quencher" de la fluorescence. Nous avons choisi le fluorophore ATTO655¹⁰⁶ qui, excité à 635 nm, émet à 750 nm. Le choix de ces longueurs d'onde permet de ne pas interférer avec la fluorescence intrinsèque des composés à tester. Le fluorophore est fixé sur la cystéine par addition du soufre de la cystéine sur la double liaison du maléimide¹⁰⁷ du dérivé ATTO en milieu basique (Schéma 2).



* la structure de l'ATTO a été déduite des données disponibles dans le brevet¹⁰⁸

3. Résultats du criblage

Le criblage a été effectué en microplague 96 puits à 37 °C. L'enzyme utilisée est l'IDE humaine recombinante wild-type fournie par le Pr. Tang à une concentration finale de 0,62 µg/mL en présence du substrat à la concentration de 5 µM.¹⁰⁹ Les composés ont été testés à une seule concentration de 30 µM. Le pourcentage final de DMSO a été fixé à 1 %.¹¹⁰ L'enzyme est solubilisée dans du tampon HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM. Après préincubation des produits pendant 10 minutes avec l'enzyme, le substrat est ajouté. La lecture de la fluorescence est ensuite effectuée après 30 minutes d'hydrolyse. L'EDTA, inhibiteur non sélectif des métalloprotéases à zinc, est utilisé comme contrôle positif à une concentration de 2 mM.

Sur les 2080 composés criblés, 30 molécules ont montré un pourcentage d'inhibition de l'hydrolyse du peptide ATTO-A β_{16-23} supérieur à 40 %.

¹⁰⁶https://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p115_ATTO-655.html&XTCsid=98nn9lbcuni0rkohd62kgbj807

¹⁰⁷ Smyth, et al., Some Reactions of N-Ethylmaleimide1. J. Am. Chem. Soc., **1960**. 82(17): p. 4600.

¹⁰⁸ Adessi, et al. Activator for insulin degrading enzyme. WO2006066847, 29th Jun., **2006**.

 $^{^{109}}$ Le Km du peptide A β 16-23 est pourtant supérieur à 100 μ M mais la mauvaise solubilité du substrat ne nous a pas permis d'atteindre cette valeur. ¹¹⁰ IDE est particulièrement sensible à une concentration en DMSO supérieure à 4%



Figure 34. Arbre décisionnel du criblage

Ces composés ont alors été retestés à la même concentration pour confirmation (Figure 34) ; six d'entre eux n'ont pas été validés. Les courbes dose-réponse (DRC) des vingt-quatre composés restants ont été effectuées. Le composé le plus actif 1 (Figure 35) a particulièrement attiré notre attention du fait de sa structure chimique relativement simple d'accès chimiquement.



Figure 35. 1 : inhibiteur de l'hydrolyse du peptide $A\beta$

Outre sa simplicité de synthèse, les propriétés physico-chimiques de ce composé sont intéressantes (Tableau 4) : le poids moléculaire, le nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogène ainsi que la valeur du log P remplissent toutes les conditions de la règle de Lipinski.

-F F						
Paramètres calculés in silico						
M (g/mol)	HBA*	HBD*	Alog P	PSA	рКа	ABS
374	7	3	-2,814	124,62	2,76	0,55
Propriétés physico-chimiques						
Solubilité PBS (µmol/L)			log D (7,4) PBS/octanol			
154			-2			
ADME						
Stabilité plasma souris			Stabilité plasma humain			
$t_{1/2}(h)$			$t_{1/2}$ (h)			
6,4			>24			

Tableau 4.Propriétés du composé 1

^{*}HBA et HBD : respectivement nombre d'accepteur et de donneur de liaison hydrogène

Néanmoins, plusieurs propriétés du composé nécessitent une optimisation de sa structure : son activité est micromolaire ($pIC_{50} = 5,9$); les fonctions acide, amine et imidazole de la molécule apportent des charges responsables de la bonne solubilité, mais poseront aussi un problème de perméation cellulaire (log D < 0), de plus la fonction ester est potentiellement hydrolysable en milieu cellulaire.

Il a donc été nécessaire d'effectuer des modifications de la structure chimique pour augmenter l'activité du composé et ses propriétés ADME.

Tout d'abord, le mécanisme de l'inhibition a été étudié, le composé **1** a également été cocristallisé dans l'enzyme révélant un mode de liaison original. Enfin, l'optimisation de la structure du composé, grâce aux relations structure-activité, a permis de tester son effet en milieu cellulaire.

II. 1 : mécanisme enzymatique de modulation et liaison à IDE

1. <u>Mécanisme d'inhibition de l'hydrolyse du peptide Aβ du composé 1</u>

La courbe dose-réponse (Figure 36) d'inhibition de l'hydrolyse du peptide $A\beta^{111}$ laisse apparaître un pourcentage d'inhibition maximum de 50 % à la concentration maximale. L'inhibition de l'enzyme est donc partielle.



Figure 36. Courbe dose-réponse du composé 1 de l'hydrolyse du peptide Aβ

Le mécanisme d'inhibition a été étudié pour déterminer le type d'inhibiteur, la nature et le caractère de l'inhibition.

a. Evaluation de la réversibilité

Un inhibiteur est réversible s'il se lie de façon non-covalente à sa cible alors qu'un inhibiteur irréversible forme une liaison covalente avec son site de liaison, inhibant sa cible de façon permanente.

La réversibilité d'un inhibiteur est déterminée en comparant le rétablissement du taux d'hydrolyse après une rapide dilution du milieu contenant le complexe enzyme-inhibiteur : si le taux d'hydrolyse est comparable au contrôle (l'inhibiteur à la concentration obtenue après dilution), le composé inhibe l'enzyme de façon réversible. En effet, dans ce cas, la dilution déplace l'inhibiteur et l'enzyme n'est alors en présence que d'une faible concentration de composé, l'enzyme est moins inhibée et le taux d'hydrolyse est augmenté (Figure 37).

Dans le cas d'un inhibiteur irréversible, la dilution ne pourra pas déplacer l'inhibiteur, l'enzyme sera donc inhibée de la même manière qu'avant la dilution, le taux d'hydrolyse n'est pas modifié.

 $^{^{111}}$ Dans les tests in vitro, le substrat utilisé est toujours le peptide ATTO-A $\beta_{16\text{-}23}$



Figure 37. Détermination de la réversibilité de l'inhibition

IDE est incubée avec le composé à 20 μ M. Après 20 minutes, le milieu est dilué 100 fois avec du tampon, le taux d'hydrolyse après dilution est alors comparé à celui du contrôle (i.e. IDE incubé avec 0,2 μ M de composé). Sur le Figure 38, le taux d'hydrolyse en présence de 20 μ L du composé **1** est indiqué en bleu foncé. Après dilution (en bleu clair), le taux retrouve la valeur de l'incubat de contrôle (à 0,2 μ M, en jaune). Ce rétablissement du taux d'hydrolyse montre que le composé est un inhibiteur réversible.



Figure 38. Réversibilité de la liaison du composé 1 à l'IDE

b. Caractère et nature de l'inhibition

Les inhibiteurs sont classifiés en fonction de leur caractère de leur inhibition et leur nature. Le caractère de l'inhibition indique le nombre de sites de liaisons ainsi que le caractère total ou partiel de l'inhibition. La nature de l'inhibiteur est une indication sur son mécanisme d'inhibition.

Antunes *et al.*¹¹² décrivent une approche graphique en deux temps pour déterminer le caractère (linéaire, hyperbolique, etc.) et la nature de l'inhibition (compétitive, incompétitive, etc.).

i. Caractère de l'inhibition

L'inhibition peut être linéaire, hyperbolique, parabolique ou dite "rationnelle 2,2". Les inhibitions linéaire et hyperbolique sont obtenues en considérant un seul site de liaison de l'inhibiteur dans l'enzyme, contrairement aux types d'inhibitions parabolique et "rationnelle 2,2" qui font intervenir deux sites de liaison à la fois.

Les inhibitions linéaire et parabolique sont des inhibitions complètes de l'enzyme alors que les inhibitions hyperbolique et "rationnelle 2,2" sont des inhibitions partielles, le complexe enzyme-inhibiteur étant toujours actif.

Pour déterminer le caractère de l'inhibition (Figure 39), la première étape consiste à analyser l'évolution du degré d'inhibition ε_i ($\varepsilon_i = (\upsilon_0 - \upsilon_i)/\upsilon_0$; υ_0 étant le taux d'hydrolyse de la réaction non-inhibée et υ_i celui de la réaction inhibée) en fonction de $\varepsilon_i/[I]$ ([I] : concentration en inhibiteur). Si la courbe obtenue est une droite, l'inhibition est due à un seul site de liaison de l'inhibiteur et elle est donc linéaire ou hyperbolique. Dans le cas contraire, elle fera intervenir deux sites de liaisons distincts et sera alors soit parabolique, soit "rationnelle 2,2".

¹¹² Antunes, et al., Diagnosis of enzyme inhibition based on the degree of inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **2003**. 1624(1-3): p. 11.



Figure 39. Détermination du caractère de l'inhibition¹¹³

Le Figure 40 ci-dessous montre que, dans notre cas, le degré d'inhibition ε_i est dépendant de la concentration en composé **1** de façon linéaire. Le caractère d'inhibition est donc soit linéaire, soit hyperbolique.

La discrimination entre ces deux cas est effectuée en déterminant le degré d'inhibition maximum $\varepsilon_{i max}$. Celui-ci est mesuré à l'intersection des courbes et de l'axe des ordonnés. Si celui-ci est constant et égal à 1, indépendamment de la concentration en inhibiteur, l'inhibition est linéaire. S'il est inférieur à 1, l'inhibition est hyperbolique.



Figure 40. Détermination du caractère d'inhibition ($\varepsilon_i = f(\varepsilon_i/[I])$)

Dans notre cas (Figure 40), les courbes coupent l'axe des ordonnés en dessous de 1. Le composé **1** est donc un inhibiteur hyperbolique. Ces résultats sont en concordance avec ce que nous avions déjà observé, le pourcentage d'inhibition maximum de la courbe dose-réponse n'est que de 50 % (Figure 36).

¹¹³ Antunes, et al., Diagnosis of enzyme inhibition based on the degree of inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **2003**. 1624(1-3): p. 11.

ii. <u>Nature de l'inhibition</u>

Un inhibiteur peut être :

- compétitif : il se fixe au même site que le substrat.



- *incompétitif* : il ne se fixe pas sur le même site que le substrat mais ne peut se fixer que sur le complexe enzyme-substrat ; il modifie alors la conformation de l'enzyme, et empêche la réaction enzymatique.



- *non compétitif* : il ne se lie pas sur le même site que le substrat mais peut se lier aussi bien sur l'enzyme libre que sur le complexe enzyme-substrat ; il empêche la transformation du substrat en produit.



- *mixte* : le substrat et l'inhibiteur peuvent se lier en même temps à l'enzyme. La liaison de l'un modifie l'affinité de l'autre.



La détermination de la nature de l'inhibition s'effectue en deux temps (Figure 41). Tout d'abord, il faut observer l'évolution du degré d'inhibition ε_i en fonction de la concentration en substrat ([S]) pour une concentration en inhibiteur donné. Si celui-ci diminue en fonction de [S], l'inhibition est alors soit compétitive, soit mixte. Inversement, si ε_i augmente avec [S], l'inhibition est soit incompétitive, soit mixte. Enfin, si le degré d'inhibition est indépendant de la concentration en substrat, l'inhibiteur est non compétitif.



Figure 41. Détermination de la nature de l'inhibition

Dans le cas de notre composé, le degré d'inhibition diminue de façon inversement proportionnelle à la concentration en substrat (Figure 42). L'inhibition est donc soit compétitive soit mixte. La discrimination entre les deux natures s'effectue en traçant la courbe $1/\epsilon_i$ en fonction de [S]. Si celle-ci est linéaire, l'inhibition est compétitive ; si la courbe est hyperbolique, le composé est un inhibiteur mixte. Les courbes du Figure 42 ci-après sont des droites, l'inhibition est donc compétitive.



Figure 42. Détermination de la nature de l'inhibition $(1/\epsilon_i = f([S]))$

Le composé **1** est donc un inhibiteur partiel, compétitif et réversible de l'hydrolyse du peptide A β . Il se lie au même site que le substrat, à un seul site à la fois et de manière non covalente.

2. Liaison du composé 1 à IDE

L'équipe du Pr. Tang a co-cristallisé le composé **1** avec l'enzyme. Il apparaît que le composé peut se lier à deux endroits de la protéine : soit au site catalytique, soit à l'exosite (Figure 43).



Figure 43. Cristallographie du composé **1** dans l'enzyme en bleu foncé : résidus impliqués dans le site catalytique et l'exosite ; en rouge : composé **1** PDB : 3QX0

a. Liaison au site catalytique

L'acide carboxylique et l'imidazole sont tous les deux des groupements ligands du zinc. Dans notre cas, le composé se lie à l'atome de zinc par sa fonction acide (Figure 44). L'imidazole participe aussi à la liaison au site catalytique en créant une liaison hydrogène entre son azote τ et la valine 833 (IDE-C) de l'enzyme. Par ailleurs, deux autres liaisons hydrogène se forment avec les résidus du site catalytique. La première entre l'azote de l'histidine du composé et la fonction phénol de la tyrosine 831 (IDE-C) du site catalytique, la deuxième entre le carbonyle de l'ester et la fonction amide de l'asparagine 139 (IDE-N). De l'autre côté de la molécule, le groupement benzyle entre dans une poche hydrophobe formée par la phénylalanine 115, la leucine 116 et la phénylalanine 820. Enfin l'azote de l'amine tertiaire du composé interagit de manière ionique avec l'acide glutamique 111.



Figure 44. Mode de liaison du composé 1 au site catalytique

Le site catalytique d'IDE est formé par des résidus appartenant aux deux domaines IDE-N (en vert) et IDE-C (en bleu), il n'est donc complet que lorsque l'enzyme est dans sa configuration fermée. Le composé interagit avec des résidus appartenant aux deux domaines de l'enzyme. Il ne peut se lier à ce site qu'après que l'enzyme se soit refermée.

b. Liaison à l'exosite

En adéquation avec une inhibition partielle de l'enzyme, le composé se lie à l'exosite parallèlement au feuillet β 359-364. Ce mode de liaison est encore inédit pour cette enzyme. En effet, aucune molécule n'a encore été décrite comme ligand de l'exosite d'IDE.

Le composé forme une liaison ionique avec le résidu acide glutamique 341 et trois liaisons hydrogène avec les résidus de l'exosite (Figure 45) :

- l'azote π de l'imidazole avec la chaîne principale de la glycine 339
- l'azote τ de l'imidazole avec le squelette de la leucine 359
- · l'azote de l'histidine avec la chaîne principale de la glycine 361



Figure 45. Mode de liaison du composé 1 à l'exosite

La majorité des protéases possèdent un exosite qui permet la reconnaissance des substrats. Parmi elles, on compte les protéases à sérines de la cascade de coagulation comme le facteur Xa.¹¹⁴ Celui-ci est inhibé de façon non-compétitive par la para-aminobenzamidine qui se lie dans la poche S1.

Engel *et al.*¹¹⁵ ont développé une série de composés inhibiteurs sélectifs de la MMP-13. La structure cristallographique a révélé que ces composés ne se lient pas au zinc catalytique mais dans la poche S1'.

Šilhár *et al.*¹¹⁶ ont décrit que l'acide D-chicorique est un inhibiteur de l'exosite de la protéase de la toxine botulique A (BoNT/A). Les études mécanistiques montrent que ce composé est un inhibiteur partiel non compétitif. Couplé à un inhibiteur du site catalytique, il a un effet synergique.

Le composé **1** a également été cristallisé avec l'enzyme IDE-E111Q. Ce mutant n'a pas d'activité catalytique. En effet, l'acide glutamique 111, essentiel pour la réaction enzymatique, a été remplacé par un résidu glutamine. Dans ce cas, le composé **1** n'a été trouvé qu'à l'exosite où il a le même mode de liaison que dans l'enzyme wild-type. Le fait que le composé ne soit pas retrouvé au site catalytique du mutant E111Q peut être expliqué par l'absence de la liaison ionique que fait le composé avec l'acide glutamique 111 (Figure 44).

c. Action du composé 1 sur un mutant de l'exosite IDE E341A

Devant l'impossibilité à ce jour de quantifier la liaison du composé 1 à chacun des sites (k_{on}/k_{off}) , nous avons évalués la liaison à un mutant de l'exosite. Le résidu acide glutamique 341, avec lequel le composé 1 fait une liaison ionique à l'exosite (Figure 45 ci-dessus), a été remplacé par un résidu alanine. Le composé ne peut donc plus se lier à l'exosite de la même manière.

¹¹⁴ Blat, Non-Competitive Inhibition by Active Site Binders. *Chemical Biology & Drug Design*, **2010**. 75(6): p. 535.

¹¹⁵ Engel, et al., Structural Basis for the Highly Selective Inhibition of MMP-13. Chemistry & Biology, 2005. 12(2): p. 181.

¹¹⁶ Šilhár, et al., Botulinum Neurotoxin A Protease: Discovery of Natural Product Exosite Inhibitors. J. Am. Chem. Soc., **2010**. 132(9): p. 2868.

La courbe dose-réponse du composé montre une pIC_{50} plus faible ($pIC_{50} = 5,5$) mais un pourcentage d'inhibition maximum de 70 % à la plus forte concentration testée (Figure 46). Le composé ne pouvant plus se lier à l'exosite, son seul site de liaison est le site catalytique. L'inhibition redevient donc totale.

Cette augmentation du pourcentage d'inhibition maximum indique que la liaison à l'exosite est responsable de l'inhibition partielle et la diminution de l'activité suggère que l'affinité du composé pour l'exosite est supérieure à celle pour le site catalytique.



Figure 46. Courbes dose-réponse du composé 1 de l'hydrolyse d'A β par IDE E341A (•) et par IDE wild type (WT) (•)

3. Modulation substrat-dépendante d'IDE

Le composé a été découvert grâce au criblage en inhibition de l'hydrolyse du peptide A β_{16-23} . Nous avons testé l'effet du composé sur l'hydrolyse par IDE d'autres substrats naturels de l'enzyme : l'insuline, l'IGF-II, la somatostatine, le glucagon.

a. Mise au point de l'expérience

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour effectuer les courbes dose-réponse. La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition d'une solution d'arrêt de 0,1 % TFA/acétonitrile. Les échantillons sont ensuite analysés par nano-HPLC. L'aire du pic du substrat est intégrée et comparée à celle du substrat seul.

i. Optimisation du gradient d'élution pour l'analyse par nano-HPLC

Le gradient d'élution des peptides a été mis au point pour minimiser le temps d'analyse tout en séparant les peptides de leurs fragments formés au cours de l'hydrolyse.

Les expériences ont été réalisées dans un tampon HEPES. La présence de ce tampon produit un pic en début de gradient large (10 min) de très haute intensité qui oblige la mise en place d'un long gradient (30 min) pour éliminer tout d'abord l'HEPES avant d'éluer les peptides. Une colonne de pré-charge a été installée en amont de la colonne d'élution permettant de laver le pic dû au tampon HEPES avant d'éluer les peptides. Ainsi l'élution complète peut être effectuée en 15 minutes.

ii. Conditions de mise en solution des peptides

Les quatre substrats utilisés sont commerciaux. Parmi eux, nous avons remarqué que le glucagon s'agrégeait dans le tampon. En effet, l'aire du pic de glucagon, en présence de l'enzyme totalement inhibée par l'EDTA, était supérieure à celle du glucagon seul dans le tampon. Les aires auraient pourtant dues être comparables.¹¹⁷

Le glucagon est connu pour agréger et former des fibrilles.^{118,119} La présence de l'EDTA ou de l'enzyme permet certainement une resolubilisation du glucagon ou empêche son agrégation.

Pour vérifier cette hypothèse, les aires sous le pic de glucagon ont été comparées dans différentes conditions : glucagon seul, en présence du composé (solubilisé dans le DMSO), de solvant (solution d'arrêt : 0,1 %TFA/ACN) et enfin de l'enzyme dénaturée (Figure 47).



Figure 47. Mise en solution du glucagon en présence de solvant ou de l'enzyme

Dans tous les puits, l'aire du pic est supérieure au contrôle. Il y a bien un effet de solubilisation du glucagon par le solvant apporté par le composé, la solution d'arrêt ou l'enzyme ou encore un effet combiné des trois.

Nous avons alors choisi d'utiliser du Glucagen[®], médicament utilisé en cas d'hypoglycémie sévère chez les diabétiques insulino-traités. Le glucagon se présente sous la forme d'une poudre lyophilisée accompagnée d'un flacon de solution aqueuse acide (pH 2) pour solubiliser la poudre avant l'injection au patient. Cette solution est conçue pour limiter l'agrégation du glucagon.

La non-agrégation du glucagon dans ces conditions a été vérifiée (Figure 48).

¹¹⁷ L'enzyme étant totalement inhibée par l'EDTA, le glucagon n'est pas hydrolysé.

¹¹⁸ De Jong, et al., Amyloid Fibrils of Glucagon Characterized by High-Resolution Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, **2006**. 91(5): p. 1905.

¹¹⁹ Onoue, et al., Mishandling of the Therapeutic Peptide Glucagon Generates Cytotoxic Amyloidogenic Fibrils. *Pharmaceutical Research*, **2004**. 21(7): p. 1274.



Figure 48. Le glucagon préparé à partir du Glucagen[®] ne s'agrège pas

Il n'y a pas d'agrégation du glucagon dans ces conditions. Nous avons donc par la suite utilisé le Glucagen[®] comme source de glucagon.

iii. Cinétiques d'hydrolyse des substrats

Après avoir mis au point un gradient permettant d'analyser les peptides, nous avons effectué les cinétiques d'hydrolyse des différents peptides par IDE pour déterminer le temps d'hydrolyse qui sera utilisé en présence du composé **1**.

L'insuline et le glucagon sont hydrolysés rapidement en 10 et 1 minute(s) respectivement (Figure 49). Par contre, l'IGF-II et la somatostatine sont hydrolysés plus lentement : au bout de 30 minutes, seule la moitié du substrat est dégradé.



Figure 49. Cinétiques d'hydrolyse des substrats par IDE

Le choix a alors été fait d'effectuer l'hydrolyse en présence du composé à 30 minutes pour l'IGF-II et la somatostatine, à 10 minutes pour l'insuline et à 1 minute pour le glucagon.

b. <u>Résultats</u>

Le composé **1** a un effet légèrement activateur de l'hydrolyse de l'insuline et de l'IGF-II. Il n'a par contre aucun effet sur celle du glucagon et de la somatostatine (Figure 50).



Figure 50. résultats d'hydrolyse de 4 substrats par IDE en présence du composé **1** (% substrat restant après hydrolyse)

La courbe dose-réponse du composé **1** de l'hydrolyse de l'insuline a ensuite été effectuée. Elle confirme l'effet d'activation de l'hydrolyse de l'insuline du composé **1** (Figure 51) avec une pEC_{50} de 5,9.



Figure 51. Courbe dose-réponse du composé 1 sur l'hydrolyse de l'insuline

c. Mécanisme de modulation

Le coefficient de Hill des deux courbes dose-réponse (hydrolyse du peptide A β et de l'insuline) est inférieur à 1, ce qui est révélateur d'une coopération négative du ligand : lorsqu'un ligand est lié à l'enzyme, l'affinité pour un autre ligand est diminuée. Ceci confirme qu'une seule molécule se lie à la fois à l'enzyme (inhibition hyperbolique pour l'hydrolyse d'A β) malgré ses deux sites de liaison potentiels.

Le mécanisme de liaison envisagé du composé est le suivant : le composé se fixe en premier au niveau de l'exosite de par sa disponibilité immédiate, puis lorsque l'enzyme se referme le produit peut diffuser jusqu'au site catalytique alors formé (Figure 52).



La modulation de l'activité de l'enzyme par le composé étant substrat-dépendante, le mécanisme d'action du composé est certainement différent en fonction du substrat.

La taille des substrats et leur affinité pour l'enzyme joue certainement un rôle dans cette différence de modulation de notre composé. En effet, le Km de l'insuline est d'environ 100 nM et c'est un grand substrat, le peptide A β est plus petit et son affinité est 100 fois plus faible que celle de l'insuline. Le composé peut entrer en compétition avec le peptide A β mais probablement pas avec l'insuline.

• <u>Cas du peptide Aβ</u>

Plusieurs situations peuvent se produire :

- le substrat est encapsulé avec le composé :
 - si le composé est lié au site catalytique, il inhibe l'hydrolyse en empêchant la liaison du substrat avec le site catalytique.
 - si le composé est lié à l'exosite, il gêne l'ancrage du substrat sur ce site important pour son changement conformationnel et ralentit ainsi son hydrolyse.
- le substrat n'est pas dans la crypte :
 - si le composé est lié au site catalytique : il se lie à des résidus appartenant aux deux domaines et bloque ou ralentit ainsi l'ouverture de l'enzyme.
 - si le composé est lié à l'exosite : il peut diffuser entre les deux sites.

Par conséquent, en présence de notre composé, l'enzyme se comporte de diverses façons et deux populations peuvent être distinguées. La première en configuration fermée avec le composé ancré au site catalytique inhibant l'hydrolyse du substrat s'il est dans la chambre catalytique ou inhibant l'ouverture de l'enzyme, empêchant alors le substrat d'y entrer ; la deuxième avec le composé lié à l'exosite pouvant s'ouvrir mais dont l'ancrage du substrat est modifié.

L'inhibition est donc partielle pour deux raisons :

- la liaison à l'exosite du composé interfère avec la liaison du substrat sans toutefois l'empêcher totalement
- la distribution du composé entre ses deux sites de liaisons induit deux populations d'enzyme (l'une inhibée totalement car fermée et ne pouvant plus s'ouvrir et/ou ne pouvant plus cliver le substrat ; l'autre inhibée partiellement par le composé lié à l'exosite)
- <u>Cas de l'insuline</u>

L'affinité de l'insuline pour l'enzyme est telle qu'elle déplace le composé, celui-ci ne joue plus son rôle d'inhibiteur. Plusieurs hypothèses expliquant l'effet activateur du composé peuvent être émises :

- Le composé change l'état d'oligomérisation du composé favorisant la forme dimère par rapport au tétramère.
- Le composé diminue l'agrégation de l'enzyme favorisant ainsi son activité.
- Le composé modifie l'équilibre entre la forme ouverte et la forme fermée de l'enzyme.

L'influence du composé sur l'état d'oligomérisation d'IDE a été mesuré par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS : small angle X-rays scattering). Cette technique permet la détection de changements subtils dans l'état d'oligomérisation des protéines.

L'échantillon est traversé par un faisceau de rayons X et l'intensité diffusée I est mesurée en fonction du vecteur de diffusion q (q = $[(4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)]$ avec θ : angle de diffusion et λ : longueur d'onde du faisceau incident). L'allure du profil de diffusion (courbe I = f(q)) est révélatrice de l'état d'oligomérisation des particules.¹²⁰

Les profils de diffusion d'IDE seule (en rouge, Figure 53a) et d'IDE en présence du composé 1 (en noir) sont superposables signifiant que le composé ne change pas l'état d'oligomérisation de l'enzyme.

Le tracé de Guinier exprime l'intensité de diffusion I en fonction de q². La non-linéarité de la courbe de Guinier indique la présence d'agrégation dans l'échantillon. L'ajout du composé (en noir, Figure 53b) modifie la courbe par rapport au tracé sans composé (en rouge). Le composé semble diminuer l'agrégation de l'enzyme, expliquant peut-être l'activation observée dans le cas de l'insuline.

¹²⁰ Christopher D. Putnam, et al., X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.*, **2007**. 40(3): p. 191.



Figure 53. a) Profil de diffusion : I = f(q) ; b) Tracé de Guinier : $ln(I) = f(q^2)$

Des expériences sont en cours pour mesurer l'influence du composé sur l'équilibre ouvertfermé de l'enzyme. Si le composé favorise la transition entre les deux états, cela pourrait expliquer l'activation observée pour les grands substrats.

Le composé **1** a donc un comportement différent en fonction du substrat : il inhibe la dégradation du peptide $A\beta$ et active celle de l'insuline. Ces deux peptides sont impliqués dans deux grandes pathologies différentes où IDE jouerait également un rôle. Il était donc important d'étudier l'effet du composé **1** en modèle cellulaire de ces deux maladies.

III. Résultats cellulaires

Le composé **1** a nécessité une optimisation de son activité ainsi que de ses propriétés ADME avant de pouvoir être testé sur les cellules.

Les relations structure-activité seront détaillées au paragraphe IV (p. 64). Nous avons ainsi obtenu le composé **2** (Figure 54) présentant une pIC_{50} de 7,6 (gain d'activité de près de 2 log).



Figure 54. 2 : analogue optimisé du composé 1

Le composé optimisé 2 a été testé sur la néprilysine (NEP), métalloprotéase impliquée aussi dans la dégradation du peptide A β , pour évaluer sa sélectivité vis-à-vis d'IDE. Le composé n'a pas d'activité vis-à-vis de cette enzyme.

Le composé **1** a une stabilité en milieu plasmatique murin relativement faible (6,4 h), due à l'hydrolyse rapide de l'ester méthylique en milieu biologique. L'analogue direct méthylamide a été synthétisé pour augmenter la stabilité (> 24 h) tout en préservant l'activité ($pIC_{50} = 6,1$). Ce composé ne diffuse pas au travers de la membrane cellulaire à cause de la charge négative apportée par la fonction acide. Cette fonction acide a donc été masquée par un ester méthylique. Cet ester permet au composé d'améliorer sa perméation cellulaire (perméabilité caco-2 A-B : $0,2.10^{-6}$ cm/s). Cette fonction sera hydrolysée en milieu cellulaire, libérant l'acide.

Suite à ces résultats, nous avons choisi de préparer l'ester ($\mathbf{3}$, Figure 55) correspondant au composé optimisé $\mathbf{2}$ de la série pour effectuer les essais en modèle cellulaire.



Figure 55. 3 : précurseur ester du composé 2

1. Modèle maladie d'Alzheimer

Les effets du composé **3** ont été testés sur neuroblastomes (lignée cellulaire SH-SY5Y) exprimant APP751 (lignée swe) ou APP696 (lignée wt). L'expression d'IDE a été vérifiée dans les deux lignées (Figure 56) par Western Blot.



Figure 56. Expression d'IDE dans les cellules SY5Y, lignées swe et wt (cellule Mock et expression GAPDH servant de contrôle)

Les cellules ont été incubées avec 1 μ M et 10 μ M de composé. Le taux de peptide A β a été quantifié par ELISA.

Les résultats montrent que les cellules traitées avec le composé ont un taux d'A β_{1-40} et A β_{1-42} augmenté par rapport aux contrôles (Figure 57), l'augmentation est dose-dépendante. Le composé a donc un effet sur l'hydrolyse d'A β par IDE. Le dosage a été effectué à 24 et 48 heures, les différences observées étant probablement dues à la cinétique de perméation du composé.



Figure 57. Effet du composé **3** sur le taux extracellulaire d'A β a) A β **1-40** sur cellules APPswe ; b) A β **1-40** sur cellules APPwt ; c) A β **1-42** sur cellules APPswe ; d) A β **1-42** sur cellules APPwt.

Comme nous l'avons vu précédemment, le composé **1** n'est pas un inhibiteur de l'enzyme NEP, l'autre enzyme-clé du métabolisme d'A β . Le taux d'APP a été dosé et il reste constant, confirmant que l'effet du composé **3** est dû à l'inhibition d'IDE et à l'inhibition de l'hydrolyse et non à une augmentation de la production d'A β ou à l'inhibition de NEP (Figure 58).



Figure 58. Production et dégradation du peptide Aβ extracellulaire

2. Modèle diabète

L'effet du composé a aussi été testé sur la voie de l'insuline. Le taux de glucose stimule la sécrétion d'insuline qui réprime le gène PEPCK, gène de la néoglucogénèse (Figure 59).

Le composé n'a pas d'effet sur l'expression de l'ARNm du gène PEPCK après stimulation par l'insuline sur les cellules IHH (Immortalized Human Hepatocytes). Le composé n'a pas non plus d'effet sur la sécretion d'insuline par les cellules β -pancréatique Min6 après stimulation au glucose (Tableau 5).

	IHH		Min6			
		Expression ARNm PECK [*]	Sécrétion insu	line		
		(%)	(µg/L)			
			1 h après stimulation au	après 24 h		
			glucose	d'incubation		
	DMSO	100 ± 8	41±3	39±6		
	3	107±8	41±1	41±2		
*						

Tableau 5.	Résultats	du com	posé 3	sur la	voie de	l'insuline

* normalisé par rapport à la cyclophiline

Un effet activateur d'IDE vis-à-vis de l'hydrolyse de l'insuline aurait induit une diminution de la quantité d'insuline et donc une baisse de la répression de l'expression du gène PEPCK. La quantité ARNm de ce gène devrait augmenter.

Confirmant l'effet observé dans le test *in vitro*, le composé a une activité inhibitrice de la dégradation du peptide A β en milieu cellulaire. Par contre, l'effet activateur de l'hydrolyse de l'insuline observé *in vitro* n'a pas été confirmé *in cellulo*.

Le criblage d'une chimiothèque de 2080 composés a permis l'identification d'un composé inhibiteur de l'hydrolyse du peptide A β par IDE. Ses propriétés physico-chimiques en font une tête de série intéressante.

Le composé **1** est un modulateur substrat-dépendant de l'enzyme. Il active légèrement l'hydrolyse de l'insuline et de l'IGF-II mais inhibe celle du peptide A β . Dans le cas de l'hydrolyse du peptide A β , les études mécanistiques ont montré que le composé **1** est un inhibiteur partiel, compétitif et réversible.

La structure cristallographique révèle un mode de liaison original, le composé ayant deux sites de liaison dans l'enzyme. Cependant, il ne se fixe pas prioritairement sur le site actif, mais sur un autre site de liaison de l'enzyme : l'exosite. La fixation du composé à ce site entraîne une modification de la conformation du site de liaison du substrat, modifiant la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Après que l'enzyme se soit refermée, dans le cas du peptide $A\beta$, le composé peut venir se lier au second site de liaison, le site catalytique, empêchant cette fois la liaison du peptide et donc son hydrolyse.

Le composé nécessite cependant des modifications de sa structure pour améliorer son affinité pour l'enzyme et son activité ainsi que ses propriétés ADME.

Un composé optimisé a été testé en milieu cellulaire et a confirmé l'effet inhibiteur de l'hydrolyse du peptide $A\beta$ mais pas l'activation de la dégradation de l'insuline.

IV. Etude des relations structure-activité

Comme nous l'avons vu précédemment, la structure du composé **1** nécessite d'être optimisée tant pour augmenter son activité que pour améliorer ses propriétés ADME.

Nous avons défini quatre régions de la molécule pour effectuer l'étude des relations structure-activité du composé (Figure 60) : l'histidine de la partie Nord, le groupement benzyle de la partie Ouest, la fonction ester méthylique de la partie Est et enfin la fonction acide de la partie Sud.



Figure 60. Modifications de la structure du composé 1

Les résultats de ces premières modifications nous ont ensuite mené à explorer deux autres régions de la molécule : l'alkylation en tau de l'imidazole et la modification du substituant à l'Est.



Figure 61. Deuxième modification de la structure du composé 1

1. Modification de l'acide aminé au Nord

La partie Nord de la molécule composée de la fonction histidine a tout d'abord été modifiée: elle a été remplacée par un autre acide aminé tel que l'arginine, protonée à pH physiologique, le tryptophane et la cystéine, neutres à pH physiologique et la phénylalanine, pour apporter un groupement hydrophobe (Figure 62).



Figure 62. Modification de l'histidine

a. Synthèses des analogues

La première étape de la voie de synthèse utilisée (Schéma 3) est la cyclisation en anhydride du *N*-Benzyliminodiacide commercial. Cet anhydride est ensuite ouvert par attaque nucléophile de l'amino-ester voulu pour former le composé fini.



Schéma 3. Synthèse générale des composés

conditions : a) anhydride trifluoroacétique 2 % dans anhydride acétique, 50-70°C, 5 h ; b) R-NH₂, DIEA anh., DMF anh., temp. ambiante, 12-18 h, 17-99 % sur 2 étapes.

Les esters méthyliques de l'histidine, du tryptophane, de l'arginine et de la phénylalanine sont commerciaux. Par contre l'ester méthylique de la cystéine a dû être préparé à partir de la L-S-Trityle-Fmoc-Cystéine commerciale.

L'acide carboxylique a tout d'abord été estérifié en milieu acide puis le groupement fluorenylmethyloxycarbonyle (Fmoc) a été clivé en milieu basique (Schéma 4).



Schéma 4. Préparation de l'ester méthylique de la L-S-trityle Cystéine **10** *conditions* : a) i- chlorure d'oxalyle, DMF cat., DCM, 0°C, 50 min ; ii- MeOH, temp. ambiante, 4 h, 100 % ; b) 20 % Pyridine/DMF, temp. ambiante, 1 h 30, 55 %.

L'anhydride a alors été ouvert avec l'ester méthylique de la L-S-trityle Cystéine **10** pour former le composé attendu protégé par le groupement trityle (**11**). Cette protection a ensuite été enlevée en milieu acide (Schéma 5).



Schéma 5. Synthèse du composé **7** *conditions* : a) TIS, TFA, DCM, temp. ambiante, 1 h 30, 32 %.

b. Activité des analogues

Les analogues synthétisés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur effet sur l'hydrolyse du peptide $A\beta$ en utilisant le test développé précédemment (p.40).

		pIC ₅₀ ¹²¹
1		5,9
4		< 4
5		4,4
6		< 4
7	HN VO	< 4

Tableau 6.Changement d'acide aminé au Nord

Aucun des remplacements effectués par un autre acide aminé que l'histidine ne conduit à un composé actif. La phénylalanine (6) et la cystéine (7) ne peuvent pas faire de liaisons hydrogène avec leur chaîne latérale, le tryptophane (4) peut former une liaison hydrogène mais pas la liaison ionique que l'on observe avec le glutamate 341 à l'exosite, ce qui expliquerait que ces composés ne soient pas actifs. L'arginine (5) peut former des liaisons hydrogène mais la longueur de chaîne plus longue modifie certainement le mode de liaison du composé car l'activité est très faible.

Les interactions entre l'imidazole de la molécule et les résidus appartenant aussi bien au site catalytique qu'à l'exosite expliquent bien l'importance de l'imidazole (Figure 63).

¹²¹ $pIC_{50} = -log (IC_{50})$



Figure 63. L'imidazole est important pour la liaison à l'enzyme

A ce stade des relations structure-activité, il apparaît que l'imidazole présent au départ dans la structure du composé est le meilleur groupement pour l'activité.

2. Modification du groupement hydrophobe à l'Ouest

L'analyse de la structure cristallographique du composé dans l'enzyme nous apprend que le groupement benzyle occupe une poche hydrophobe au niveau du site catalytique (Figure 64).



Figure 64. Groupement benzyle dans la poche au site catalytique

Pour tenter d'ancrer plus profondément le composé dans cette poche, la chaîne a été allongée. Ainsi, quatre longueurs de chaînes différentes ont été insérées entre l'azote et le

groupement phényle. Des chaînes uniquement alcanes ont été aussi introduites pour étudier l'importance de l'aromaticité avec deux longueurs différentes (méthyle et héxyle). Nous avons aussi introduit de la polarité avec un groupement indole et pyridinyle. Quelques substitutions en para du benzyle ont aussi été explorées. L'encombrement avec un groupement *tert*-butylique, les effets électroniques avec un trifluorométhyle ont ainsi pu être étudiés.



Figure 65. Modification du groupement benzyle

a. Synthèses des analogues

La voie de synthèse est la même que pour les modifications de la partie Nord. La majorité des diacides de départ n'étant pas commerciaux, ils ont été préparés par alkylation de l'acide iminodiacetique commercial (Schéma 6). Les anhydrides intermédiaires ont été ouverts soit par l'ester méthylique de la L-Histidine soit par l'ester méthylique de la L-Histidine (1-trityl) pour des facilités de synthèse et de purification. Le groupement trityle a ensuite été clivé en milieu acide.



Schéma 6. Voie de synthèse générale pour la modification Ouest *conditions* : a) R-Br, MeOH, DIEA ou TEA , temp. ambiante, 2-12 h, 27-76 % ; b) anhydride trifluoroacétique 2 % dans anhydride acétique, 20-70°C, 5 h, 100 % ; c) L-H-His-OMe.2HCl ou L-H-His-(1-Trt)-OMe.HCl, DIEA anh., DMF anh., argon, temp. ambiante, 18 h, 20-79 % ; d) TIS, TFA/DCM, temp. ambiante, 1 h, 55-100 %.

Le composé **12** a été synthétisé de la même façon après protection de l'acide iminodiacétique par un groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) (Schéma 7). La cyclisation en anhydride a ensuite été effectuée en présence de *N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour éviter la déprotection du groupement Boc en milieu anhydride trifluoroacétique (TFAA). Le produit a ensuite été déprotégé pour libérer l'amine en milieu acide.



Schéma 7. Synthèse du composé 12

conditions : a) Boc₂O, NaOH, dioxane/H₂O, 0°C puis temp. ambiante, 18 h, 67 % ; b) DCC, THF anh., temp. ambiante, 18 h ; c) L-H-His-OMe.2HCl, DIEA, temp. ambiante, 5 h, 40 % sur 2 étapes; d) HCl(g), DCM, temp. ambiante, 2 h, 77 %.

La formation de l'anhydride nécessaire à la synthèse du composé 23 a aussi été effectuée en présence de DCC (Schéma 8). En effet, les conditions acides (TFAA et anhydride acétique) ne permettent pas d'obtenir le produit voulu mais conduisent à un milieu très complexe.



Schéma 8. Voie de synthèse du composé 23

conditions : a) DCC, THF, temp. ambiante, 5 h, 95 % ; b) L-H-His-(1-Trt)-OMe.HCl, DIEA anh., THF anh., argon, temp. ambiante, 18 h, 41 % sur 2 étapes ; c) TFA, TIS, DCM ; d) purification du sel de TFA par HPLC préparative en milieu HCOOH, 75 % sur 2 étapes.

b. Activité des analogues

Les analogues synthétisés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur effet sur l'hydrolyse du peptide Aβ.

ОСОН		
		pIC ₅₀
12	Н	< 4
13	CH ₃	< 4
14	\sim	6,4
1		5,9
15		6,2
16		6,2
17		6,5
18	F	5,6
19		5,8
20	CF3	5,7
21	K	5,5
22		5,9
23	N	5,2
24		5,5

Tableau 7.Modification du groupement hydrophobe à l'Ouest

N=\

Le remplacement du groupement benzyle par un groupement moins encombrant tel qu'un méthyle (13) ou un hydrogène (12) mène à une perte de l'activité.

Nous avons ensuite étudié l'introduction de substituants en para du benzyle. La présence d'un fluor (18), d'un méthyle (19), d'un *tert*-butyle (21) ou encore d'un trifluorométhyle (20) diminue légèrement l'activité. La modification du groupement aromatique par l'introduction d'un donneur de liaison hydrogène avec l'indole (22) ne modifie pas l'activité. L'introduction d'un groupement aromatique plus encombrant tel que le naphtyle (24) maintient aussi l'activité. Par contre, le remplacement du benzyle par la pyridine (23) diminue l'activité (- 0,6 log).

L'allongement de la chaîne portant le phényle passant du benzyle (1) au phénylbutyle (15, 16 et 17) permet d'atteindre une activité submicromolaire. De même, un groupement aliphatique avec une longue chaîne (14) est bénéfique pour l'activité.

Ces modifications apportées à la chaîne Ouest nous apprennent que l'allongement de la chaîne est bénéfique pour l'activité. Ce résultat concorde avec l'observation faite précédemment au niveau du site catalytique : la poche formée par la leucine 116 et les deux phénylalanines 115 et 820 serait suffisamment grande (Figure 64) pour accueillir des longueurs de chaîne plus longue que le benzyle.

Au niveau de l'exosite, les cristallisations des deux analogues **15** et **16** ainsi que le composé **1** avec l'enzyme IDE-E111Q montrent que le groupement à l'Ouest s'introduit plus loin dans la poche hydrophobe lorsque la longueur de la chaîne est augmentée (Figure 66).



Figure 66. Liaison des analogues à l'exosite a) **1** (PDB : 2YB3) ; b) **15** (PDB : 3RBR) ; c) **16** (PDB : 3RCX)

c. Effet de la chiralité de l'histidine au Nord

Nous avons étudié l'importance du centre asymétrique apporté par l'histidine. Plusieurs composés ont pour cela été préparés dans les deux séries (L) et (D). Les voies de synthèse des analogues (D) sont les mêmes que leur énantiomère en partant de l'histidine (D). L'effet de la chiralité du résidu histidine sur l'activité est exposé dans le Tableau 8.



 Tableau 8.
 Effet de la chiralité sur l'activité

L'ordre de grandeur des activités des composés en série (D) est comparable à celui de leurs analogues (L). Ces résultats nous apprennent que la nature du carbone asymétrique de l'histidine a peu d'incidence sur l'activité.

3. Evaluation de l'impact de la charge positive apportée par l'amine tertiaire

Les composés étant zwitterioniques, nous avons étudié l'importance de la charge apportée par l'azote. Ce dernier a donc été acylé et arylé puis substitué par un carbone.



Figure 67. Impact de la charge positive
a. Synthèses des analogues

Les composés ont été préparés selon la même voie de synthèse utilisée précédemment à partir d'un diacide (Schéma 3).

Les diacides de départ des composés **50**, **51**, **52** et **53** ont été préparés à partir du diester de l'acide iminodiacétique par acylation avec un chlorure d'acide ou *via* une activation par EDCI/HOBt de l'acide carboxylique voulu puis les esters ont été saponifiés (Schéma 9).



Schéma 9. Voie de synthèse générale d'acylation

conditions: a) SOCl₂, MeOH, 0°C puis temp. ambiante, 18 h ; b) RCOCl, DIEA, DCM ou RCOOH, EDCl, HOBt, DIEA, DCM, temp. ambiante, 18 h, 27-99 % sur 2 étapes ; c) NaOH, MeOH, H₂O, 1-6 h, temp. ambiante ; d) anhydride trifluoroacétique 2 % dans anhydride acétique; e) L-H-His-OMe.2HCl, DIEA, DMF, temp. ambiante, 23-77 % sur 2 étapes.

Le carbamate **54** a été préparé par réaction de l'acide iminodiacétique et du chloroformiate de benzyle en milieu basique. Le diacide est alors cyclisé en anhydride puis ouvert avec l'histidine ester méthylique (Schéma 10).



Schéma 10. Synthèse du composé 54

conditions: a) chloroformiate de benzyle, NaOH 2 N, 0°C puis temp. ambiante, 2 h, 64 % ; b) anhydride trifluoroacétique 2 %, anhydride acétique ; c) L-H-His-OMe.2HCl, DIEA, DMF, temp. ambiante, 18 h, 32 % sur 2 étapes.

Le composé **56** nécessite la synthèse du précurseur diacide **69** (Schéma 11). Celui-ci a été préparé par homologation de chaîne du benzylmalonate de diéthyle.¹²² Les deux esters sont tout d'abord réduits en deux fonctions alcools, puis protégés par un groupement tosyle. Ces deux groupements partants sont alors substitués par des groupements nitriles. L'hydrolyse de cette fonction conduit à l'acide carboxylique. Le diacide obtenu est ensuite cyclisé en anhydride qui, après ouverture par le N-méthylamide de la L-Histidine **113**, mène au mélange des deux diastéréoisomères **56** attendus (Schéma 11).



Schéma 11. Synthèse du composé 56

conditions: a) LAH, THF, 0°C puis reflux, 18 h, 70 %; b) TsCl, TEA, DCM, temp. ambiante, 18 h, 44 %; c) KCN, DMSO, 80°C, 3 h 30; d) H_2SO_4 , H_2O , reflux, 3 jrs, 40 % sur 2 étapes; e) i- anhydride trifluoroacétique 2 %, anhydride acétique, 50°C puis temp. ambiante, 5 h; ii- L-H-His-NHMe **113**, DIEA, DMF, temp. ambiante, 18 h, 45 % sur 2 étapes.

Enfin, le composé 44 est l'intermédiaire de synthèse du composé 12 (Schéma 7, p.69).

¹²² Wilkinson, et al., Total Synthesis of Tetracyclines.1 III.2 Synthesis of a Tricyclic Model System. *J. Org. Chem.*, **1961**. 26(3): p. 637.

b. Activité des analogues

Les analogues synthétisés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur effet sur l'hydrolyse du peptide Aβ.

	Х	Y	pIC ₅₀
1	Ν	0	5,9
49	Ν	0	< 4
50	Ν	0	< 4
51	Ν	0	< 4
52	Ν	0	< 4
53	Ν	0	< 4
54	Ν	0	< 4
44	Ν	0	< 4
55	Ν	NH	6,1
56	С	NH	< 4

Tableau 9. Modification de la cl	harge positive
---	----------------

La charge apportée par l'azote centrale de la molécule est cruciale pour l'activité. La liaison ionique entre l'acide glutamique 111 et l'azote centrale de la molécule explique certainement ce résultat (Figure 68).



Figure 68. Détail de la liaison entre E111 et l'amine tertiaire du composé 1

4. Modification de l'ester à l'Est

La fonction ester méthylique de l'histidine du composé **1** risque de ne pas être stable en milieu biologique. Nous avons évalué les différentes modulations possibles de cet ester pour le remplacer (Figure 69) et ainsi avoir un composé aussi actif mais stable.

Nous avons remplacé l'ester méthylique par d'autres esters tels que l'ester isopropylique, isobutylique, *tert*-butylique, puis par l'alcool. Ensuite, nous avons choisi d'effectuer des remplacements par des groupements isostères de l'ester, en particulier nous avons introduit des amides (primaire, secondaire et tertiaire) et un groupement oxadiazole. La fonction ester a aussi été modifiée par la fonction acide qui introduit une charge négative à pH physiologique. L'élimination totale de l'ester a aussi été effectuée en remplaçant l'histidine par l'histamine. Les modifications ont été effectuées dans les deux séries benzyle et phénylpropyle.



Figure 69. Pharmacomodulation de la fonction ester

a. Synthèses des analogues

La voie de synthèse des produits reprend la même stratégie que pour les autres composés. L'anhydride est ouvert avec l'histidine voulue (Schéma 12). Dans certains cas, l'aminolyse du composé **1** a été effectuée.



conditions : a) anhydride trifluoroacétique 2 % dans anhydride acétique ; b) DIEA anh., DMF anh., argon, temp. ambiante, 12-18 h, 23-92 % sur deux étapes ; c) TIS, TFA, DCM, temp. ambiante, 1 h, 7,5-68 %.

Les histidines de départ sont soit commerciales dans le cas de l'histidine ester tertbutylique, l'histamine et l'histidinol, soit synthétisées pour les autres.

L'ester isobutylique de la L-Histidine **84** (L-H-His-OiBu) a été préparé à partir de l'histidine par estérification en milieu acide dans l'isobutanol (Schéma 13).



Schéma 13. Préparation de l'ester isobutylique de la L-Histidine **84** *conditions*: a) SOCl₂, iBuOH, 60°C, 48 h, 100 %.

L'activation par le chlorure de thionyle n'a pas permis de préparer l'ester isopropylique. L'acide a alors été activé avec la DMAP pour obtenir l'ester isopropylique de la L-Histidine **86** (Schéma 14).



Schéma 14. Préparation de l'ester isopropylique de la L-Histidine **86** *conditions*: a) EDCI, DMAP, isopropanol, DCM, reflux, 24 h, 56 % ; b) HCl(g), DCM, 1 h, 100 %.

La L-5-histaminyl-3-méthyl-oxadiazole **88** a été préparée à partir de la L-Boc-Histidine et de la méthylamidoxime (Schéma 15).



Schéma 15. Préparation de la L-5-histaminyl-3-méthyl-oxadiazole **88** *conditions*: a) i- TBTU, DIEA, DMF, temp. ambiante, 10 min, 47 % ; ii- amidoxime, DMF, temp. ambiante 4 h 30 puis reflux 1 h 30, 73 % ; b) HCl(g), DCM, temp. ambiante, 30 min.

La N-diméthylamide de la L-Histidine **90** a été synthétisée par couplage entre la L-Boc-Histidine et la diméthyle amine (Schéma 16).



Schéma 16. Préparation de la N-diméthylamide de la L-Histidine **90** *conditions*: a) EDCI, HOBt, TEA, DMF, temp. ambiante, 16 h, 100 % ; b) HCl(g), DCM, 100 %.

Pour préparer le composé **74**, nous avons procédé à l'aminolyse de l'ester du composé **1** par l'ammoniac (Schéma 17).



Schéma 17. Synthèse du composé **74** *conditions* : a) NH₃(g), dioxane/MeOH, temp. ambiante, 79 %.

De même, les **55** et **2** ont été préparés par aminolyse par la méthylamine de leur analogue ester méthylique correspondant (Schéma 18).



Schéma 18. Synthèse des composés 55 et 2

conditions : a) MeNH₂, EtOH, MeOH, reflux, 16 h, 49-100 % ; b) TFA, TIS, DCM; temp. ambiante, 58-70 %.

Le composé 76 a été obtenu par saponification (Schéma 19) de l'analogue ester 1.



Schéma 19. Saponification du composé **1** *conditions*: a) NaOH, H₂O, MeOH, temp. ambiante, 99 %.

b. Activité des analogues

Les analogues synthétisés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur effet sur l'hydrolyse du peptide Aβ.

N=	NH	
O N		
ООН		
	R	pIC ₅₀
1		5,9
70	₩ o Y	6,1
71		6,2
72		6,6
73	►ОН	5,4
74	NH ₂ O	5,9
55	₩ o	6,1
75		5,2
76		< 4
77	∼н	< 4

Tableau 10.	Modulations de	l'ester hydrolysable à	à l'Est en série benzyle
-------------	----------------	------------------------	--------------------------

Le remplacement de l'ester méthylique par des esters plus encombrés (iPr : **72**, iBu : **71**, tBu : **70**) augmente l'activité de plus d'un demi-log dans le meilleur des cas (iPr : **72**).

L'histidinol (73) n'est pas un changement assez efficace pour améliorer l'activité. Par contre, l'amide primaire (74) donne un composé aussi actif que la référence (1) tout comme le direct analogue avec la méthylamide (55). La disubstitution de l'amide par des groupements méthyles (75) par contre diminue l'activité.

L'apport d'une charge par la fonction acide carboxylique (**76**) est néfaste pour l'activité, de même la suppression complète de la fonction ester (**77**) induit un composé sans effet.

Tableau 11. Modulations de l'ester hydrolysable à l'Est en série phénylpropyle



En série phénylpropyle, l'analogue ester *tert*-butylique (**78**) et le bioisostère avec l'oxadiaxole (**79**) sont des composés aussi actifs que celui avec l'ester méthylique (**16**). Le produit avec l'alcool (**80**) a une activité inférieure. Enfin, le composé avec la méthylamide (**2**) voit son activité augmentée de 1,4 log par rapport à son analogue direct (**16**) et de 1,7 log par rapport à la référence (**1**).

L'importance de la présence d'un carbonyle (ou d'un atome accepteur de liaison hydrogène dans le cas de l'oxadiazole) s'explique par la liaison du composé au site catalytique où une liaison hydrogène se forme avec l'asparagine 139 (Figure 70).



Figure 70. Interaction entre la fonction ester méthylique et N139

La stabilité de ces composés a été évaluée en milieu plasmatique murin et humain. En série benzyle, l'ester isobutylique (**71**) est bien moins stable que l'ester méthylique (**6**,4 h), il est dégradé en environ 10 minutes dans le plasma de souris. L'ester isopropylique (**72**) a une stabilité comparable au composé ester méthylique **1**. Par contre, l'amélioration apporté par

l'ester *tert*-butylique (**70**) est intéressante (> 24 h). L'alcool (**73**) et la méthylamide (**55**) apportent aussi une grande stabilité plasmatique aux composés (> 24 h).

En série phénylpropyle, le passage de l'ester méthylique (16) à la méthylamide (2) permet de gagner en stabilité en passant d'un $t_{1/2}$ d'une heure à plus de 24 heures dans les plasmas de souris et d'humain.

5. Changement de la fonction acide au Sud

Le composé **1** provient de la chimiothèque du laboratoire conçue pour contenir des composés ayant une fonction ligand du zinc. Les résultats de cristallographie nous montrent que l'acide carboxylique joue ce rôle au site catalytique; par contre, cette fonction n'intervient pas dans la liaison à l'exosite.

Nous avons étudié l'effet sur l'activité de la modification de cet acide par d'autres groupements ligands du zinc tels que l'acide hydroxamique, l'acide squarique et le tétrazole; par la suppression de la charge en le remplaçant par l'ester méthylique; par l'introduction d'un donneur de liaison hydrogène grâce à l'amide. La longueur du "linker" entre l'amine tertiaire et la fonction acide a aussi été modifiée en introduisant un carbone de plus; enfin l'acide a été totalement éliminé (Figure 71).



Figure 71. Pharmacomodulation de la fonction acide

a. Synthèses des analogues

Le composé **96** a été préparé de la façon suivante : la première étape est l'alkylation de la *N*-benzylglycine ester méthylique **100** par le 3-bromopropionate de *tert*-butyle. L'ester méthylique est ensuite saponifié pour libérer la fonction acide. Celle-ci est alors couplée à l'histidine pour former la liaison amide. Ce couplage a été effectué *via* la formation du chlorure d'acide correspondant avec le chlorure d'oxalyle pour éviter le clivage de l'ester *tert*-butylique. Les protections ont ensuite été clivées en milieu acide.



Figure 72. Synthèse du composé 96

conditions : a) 20 % SOCl₂/MeOH, temp. ambiante, 18 h, 100 %; b) $Br(CH_2)_2COOtBu, K_2CO_3, KI$, acétone, reflux, 36 h; c) NaOH, MeOH, 5 jrs, 40°C, 35 % sur 3 étapes ; d) i- chlorure d'oxalyle, DCM, DMF cat., 0°C, 30 min ; ii- L-H-His-(1-Trt)-OMe.HCl, DIEA, DCM, temp. ambiante, 18 h, 38 % ; e) TFA, TIS, DCM, temp. ambiante, 72 h, 82 %.

La synthèse du composé **98** s'effectue de façon similaire. La *N*-Benzylglycine est tout d'abord protégée par un groupement Boc puis couplée avec l'histidine pour donner le composé **104** et enfin déprotégée pour donner le produit **98** sans chaîne au sud (Figure 73).



Figure 73. Synthèse du composé 98

conditions : a) Boc₂O, NaOH 2 N, dioxane, 0°C puis temp. ambiante, 18 h, 100 % ; b) L-H-His-OMe.2HCl, EDCI, HOBt, DIEA, DCM, temp. ambiante, 18 h, 51 % ; c) HCl/dioxane, temp. ambiante, 30 min, 74 %.

Dans le cas du composé **93**, en raison de la présence des deux fonctions acides symétriques de l'acide squarique, la double addition de l'amine doit être évitée. La *N*-Benzylglycine a été condensée sur l'ester dissymétrique de l'acide squarique. Cet ester a été préparé à partir de l'ester symétrique commercial par transestérification.¹²³ La suite de la synthèse est classique à savoir couplage avec l'histidine puis déprotection de la fonction acide squarique (Figure 74).



Figure 74. Synthèse du composé 93

conditions : a) *tert*-butylate de potassium 1M dans THF, diéthyle squarate, THF, 4°C, 15 min, 55 % ; b) *N*-Benzylglycine.HCl, TEA, MeOH, temp. ambiante, 18 h, 70 % ; c) EDCI, HOBt, DIEA, L-H-His-OMe 2HCl, DCM, temp. ambiante, 18 h, 37 % ; d) TFA/DCM 50/50, 4°C, 30 min, 99 %.

Les composés **94** et **99** ont été obtenus par ouverture de l'anhydride par le nucléophile voulu puis par couplage de l'histidine sur la fonction acide restante. Les protections ont ensuite été clivées (Figure 75 et Figure 76).



Figure 75. Synthèse du composé 94

conditions : a) TrtO-NH₂, DIEA, DMF, temp. ambiante, 18 h, 93 % ; b) EDCI, HOBt, DIEA, L-H-His-OMe 2HCl, DCM, temp. ambiante, 18 h, 51 % ; c) TFA 5 %, TIS, DCM, temp. ambiante, 98 %.

¹²³ Pirrung, et al., O-Alkyl Hydroxamates as Metaphors of Enzyme-Bound Enolate Intermediates in Hydroxy Acid Dehydrogenases. Inhibitors of Isopropylmalate Dehydrogenase, Isocitrate Dehydrogenase, and Tartrate Dehydrogenase1. *J. Org. Chem.*, **1996**. 61(14): p. 4527.



Figure 76. Synthèse du composé 99

conditions: a) ammoniac, DMF 100 % ; b) EDCI, HOBt, DIEA, DCM, L-H-His-OMe.2HCl, temp. ambiante, 18 h, 7 %.

Le composé **97** possédant une fonction ester en remplacement de la fonction acide a été synthétisé par estérification du composé **1** en présence de chlorure de thionyle (Figure 77).



Figure 77. Synthèse du composé **97** *conditions* : a) SOCl₂, MeOH, 0°C puis temp. ambiante, 2 h, 100 %.

Nous avons aussi remplacé la fonction acide par un tétrazole, groupement bioisostère de l'acide carboxylique. La fonction tétrazole est formée à partir de la fonction amide apportée par l'intermédiaire **110**. Ce précurseur **110** est obtenu par ouverture de l'anhydride dérivé du diacide par l'ammoniac. L'acide carboxylique restant est mis en réaction avec l'histidine méthylamide **113** pour former le composé **111**. La fonction amide est alors déshydratée en nitrile par réaction avec l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) dans la pyridine. Le nitrile est ensuite converti en tétrazole pour donner le composé **95** (Figure 78).



Figure 78. Synthèse du composé 95

conditions: a) EDCI, HOBt, DIEA, DMF, L-H-His-NHMe **113**, temp. ambiante, 18 h, 80 % ; b) TFAA/pyridine, THF, 0°C, 58 % ; c) NaN₃, chlorure d'ammonium, DMF, 90°C, 60 h, 98 %.

b. Activité des analogues

Les analogues synthétisés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur effet sur l'hydrolyse du peptide Aβ.

	≫ ^{NH} -Y_		
		Y	pIC ₅₀
1	орон	0	5,9
93	HO	0	4,9
94	O NH OH	0	5,5
95	HN N=N	NH	< 4
96	ОН	0	< 4
97	0 0	0	< 4
98	Н	Ο	< 4
99	O NH ₂	0	< 4

Tableau 12. Changement de la fonction acide au Su
--

NN

Le remplacement de l'acide par un bioisostère de l'acide carboxylique tel qu'un acide squarique (93) ou une fonction hydroxamate (94) maintient une activité. Mais l'activité est très diminuée (1 log) dans le cas de l'acide squarique. De façon surprenante, le tétrazole (95), groupement bioisostère de l'acide et ligand du zinc, ne donne pas d'activité significative.

Le remplacement de la charge négative par un groupement neutre (97, 98, 99) ne conduit pas à des composés actifs, confirmant l'importance du groupement ligand du zinc. De même, l'allongement du "linker" tout en gardant la fonction acide (96) ne donne aucune activité.

Ces résultats concordent bien avec les données de cristallographie. Le composé a besoin d'une fonction ligand du zinc pour sa liaison au site catalytique. Par contre, au vu de la structure cristallographique, cette fonction n'aurait pas d'influence sur la liaison à l'exosite mais elle joue peut-être sur l'interaction avec le substrat. En effet, lorsque le composé est lié à l'exosite, la fonction acide est dirigée vers l'intérieur de la chambre catalytique et interagit probablement avec l'extrémité N-terminale des substrats.



Figure 79. La fonction acide pointe vers l'intérieur de la chambre catalytique

Il apparaît donc que la fonction acide du composé **1** de départ est importante pour l'activité. La longueur de chaîne entre l'acide carboxylique et l'azote a aussi son importance, un seul carbone est accepté.

6. Alkylation de l'imidazole en Tau

a. Le composé 1 accepte une alkylation de l'imidazole

Dans certains cas, l'histidine ester méthylique protégée en τ par un groupement trityle a été utilisée pour faciliter la purification des produits. En effet, à cause de ses fonctions très hydrophiles et de ses propriétés zwitterioniques, les composés sont solubles dans l'eau, migrent peu sur silice et sortent dans le pic d'injection en phase inverse. Avec le groupement trityle, les composés sont moins solubles dans l'eau, ce qui permet de faire des lavages, et leur temps de rétention sur phase inverse est plus long ce qui permet de les purifier par HPLC préparative.

Les intermédiaires de synthèse tritylés des composés précédents ont été testés *in vitro* (Tableau 13). Il s'avère que le composé alkylé sur l'azote τ de l'imidazole par un groupement trityle (**82**) est légèrement plus actif que son analogue non alkylé (**1**).

Tableau 13.Activité du composé 82



D'autres composés possédant un groupement sur l'imidazole ont alors été synthétisés. Un groupement méthyle a été introduit en π et en τ de l'imidazole (**115** et **114**) ainsi qu'un groupement benzyle sur les deux positions en mélange (**116**) (Tableau 14). Les produits sont synthétisés suivant la méthode générale déjà décrite à partir des histidines N^{τ} -alkylées commerciales.

Tableau 14. Activité des composés alkylés en τ 114-116

	N=χ ^R NHτ		
	R	Position	pIC ₅₀
1	Н	τ	5,9
82	Trityle	τ	6,3
114	Me	π	< 4
115	Me	τ	5,4
116	Bz	π/τ	5,2

L'alkylation en π par un méthyle (114) fait perdre l'activité du composé alors qu'avec l'alkylation en τ (115), l'activité n'est que légèrement diminuée. Le composé alkylé par un

groupement benzyle en π et τ en mélange a une activité diminuée. Il faudrait toutefois synthétiser uniquement le régioisomère τ , ce composé devrait avoir une meilleure activité que le composé de référence.

Ce gain d'activité peut être expliqué par la liaison du composé aux deux sites dans l'enzyme (Figure 80). L'imidazole semble pointer vers une poche hydrophobe formée par la valine 360 et la tyrosine 609 à l'exosite et par la phénylalanine 834 et l'isoleucine 832 au site catalytique. L'introduction d'un groupement hydrophobe comme le benzyle permettrait d'ancrer le composé dans ces poches et ainsi d'augmenter son affinité pour l'enzyme.



a) liaison à l'exosite ; b) liaison au site catalytique.

Pour explorer rapidement les relations structure-activité en cette position, nous avons planifié la préparation d'une chimiothèque de composés en série benzyle et en série phénylpropyle présentant un groupement alkylé sur l'azote τ de l'imidazole (Figure 81).



Figure 81. Structures des composés de la chimiothèque

b. Mise au point de la voie de synthèse

L'alkylation directe de l'imidazole de l'histidine n'est pas régiosélective. La réaction d'un halogénure sur l'ester méthylique de la L-Boc-Histidine (L-Boc-His-OMe) par exemple formera un mélange des composés N^{π} et N^{τ} -alkylé.

La première stratégie a été de préparer les composés en mélange de régioisomères à partir du composé **1**, cette méthode ayant l'avantage d'être très convergente. En effet, la diversité est apportée en une étape à la fin de la synthèse.

La validation des conditions a été effectuée avec le bromure de benzyle (Schéma 20).



Schéma 20. Alkylation de l'imidazole à partir du composé **1** *conditions*: a) BzBr, DIEA, ACN, temp. ambiante, 2 h.

Malheureusement, ces conditions produisent beaucoup de sous-produits de mono et de dialkylation (alkylation de l'azote tertiaire et/ou dialkylation de l'imidazole et ou/ alkylation de l'acide) (Figure 82).



Figure 82. Sous-produits probables¹²⁴

La réactivité des différents azotes est fonction de leur état de protonation et le pH du milieu doit avoir une influence. Le pKa de l'imidazole est de 6,95 et celui d'une amine tertiaire d'environ 10-11 (TEA : 10,75). La réaction a été effectuée dans un mélange PBS¹²⁵/ACN et dans le PBS seul de façon à être à un pH où l'amine tertiaire est protonnée et donc non réactive. Malheureusement, dans les deux cas, le milieu est très complexe et le produit majoritaire formé est certainement l'espèce alkylée sur la fonction acide carboxylique en plus de l'alkylation de l'imidazole, la fonction acide carboxylique étant déprotonée à ce pH.

Devant l'impossibilité d'éviter la dialkylation du composé, une voie de synthèse régiosélective a été investiguée.

Jain et Cohen¹²⁶ décrivent une méthode d'alkylation régiosélective de l'histidine en τ . La protection de l'azote π est effectuée par la formation d'une urée avec l'amine libre de l'acide aminé (Figure 83).

¹²⁴ Structures supposées à partir du poids moléculaire observé en LC-MS

¹²⁵ pH(PBS) = 7,4

¹²⁶ Jain and Cohen, Regiospecific alkylation of histidine and histamine at N-1 ([tau]). Tetrahedron, **1996**. 52(15): p. 5363.



Figure 83. Méthode d'alkylation régiosélective décrite par Jain et Cohen.

L'imidazole ainsi protégé est alors alkylé et les deux azotes sont déprotégés en milieu acide aqueux.

Ils ont aussi développé une autre manière de déprotéger l'imidazole : l'ammonium quaternaire formé par alkylation est mis en réaction avec un alcool libérant l'azote π de l'imidazole et protégeant par le carbamate correspondant l'amine primaire (Figure 84). Le carbamate est ensuite éliminé en milieu acide.



Figure 84. Déprotection par réaction avec un alcool

La première méthode a l'inconvénient de conduire à l'hydrolyse de l'ester méthylique à la dernière étape. La deuxième étape produit un composé carbamate qui, dans le cas du groupement carbamate de *tert*-butyle (Boc), peut être déprotégé en milieu acide non aqueux (par ex. : TFA/DCM) et ainsi préserver l'ester méthylique.

La première voie a l'avantage de ne contenir que deux étapes : l'alkylation puis la déprotection. Nous avons donc choisi d'effectuer la mise au point en suivant cette méthode à partir de l'histidine méthylamide (L-H-His-NHMe **113**) pour éviter l'hydrolyse de l'ester. La mise au point est effectuée avec le bromure de benzyle comme halogénure. Malheureusement, la réaction d'alkylation forme un deuxième composé, le composé dialkylé.



Schéma 21. Première voie envisagée *conditions* : a) CDI, ACN, reflux, 2 h ; b) BzBr, ACN, reflux, 1 h * : non isolé, structure supposée à partir du poids moléculaire observé en LC-MS

Finalement, la réaction a été effectuée en suivant la deuxième méthode *via* la formation de la L-Histidine N^{τ} -alkylé protégée par un groupement Boc (L-Boc-His-OMe-(N^{τ} -Bz)).



Schéma 22. Voie de synthèse *via* l'ouverture de l'urée *conditions* : a) BzBr, ACN, reflux ;b) *tert*-BuOH, DIEA, reflux; c) TFA/DCM 50/50, temp. ambiante

c. Mise en œuvre

L'urée, préparée en grande quantité, sera mise en réaction à l'échelle de 0,2 mmol dans des tubes à hémolyse de 10 mL avec 40 halogénures. Ces halogénures seront choisis de façon à apporter une grande diversité. Les bromures et iodures seront privilégiés. Les produits obtenus seront alors mis en réaction dans le *tert*-butanol pour ouvrir les urées et ainsi obtenir les histidines correspondantes protégées par un groupement Boc. Puis ce dernier sera éliminé en milieu acide. Enfin, chaque histidine N^{t} -alkylée sera mise en réaction en microplaque avec deux anhydrides pour former 80 produits finis (Figure 85).



Figure 85. Mise en œuvre prévue de la chimiothèque

Les puits seront alors criblés sur l'hydrolyse du peptide A β , les composés qui donneront un pourcentage d'inhibition supérieur à 30 % à 30 μ M seront resynthétisés pour confirmation de l'activité et réalisation des courbes dose-réponse. La voie de synthèse pourra être la même que celle utilisée pour la chimiothèque. L'aminolyse des composés resynthétisés pourra être effectuée pour obtenir les analogues méthylamides, combinant ainsi les meilleurs pharmacophores.

7. Exemplification de l'amide à l'Est

Nous avons vu que l'ester méthylique peut être remplacé par une fonction méthylamide avec un gain d'activité et de stabilité.

La liaison du composé à l'exosite montre que l'ester entre dans une poche formée par les deux histidines 332 et 336 tandis qu'au site catalytique, la fonction pointe vers l'intérieur de la chambre catalytique (Figure 86). Il y a donc de la place pour introduire des substituants plus volumineux que le méthyle du composé **55**.



a) liaison à l'exosite ; b) liaison au site catalytique.

Pour affiner rapidement les relations structure-activité en cette position, nous avons choisi de concevoir et synthétiser une chimiothèque de composés apportant de la diversité au niveau des groupements de l'amide (Figure 87).



Figure 87. Structure des composés de la chimiothèque

Les histidines amides de départ (L-H-His-NRR') seront mises en réaction avec deux diacides pour former deux produit finaux en série benzyle et en série phénylpropyle.

a. Choix des amines

40 amines ont été sélectionnées sur la base de leur diversité structurale : amines ayant un gros substituant (Fmoc, benzhydryle, etc.), amines présentant une seconde charge (pipérazine, imidazole, acide carboxylique, etc.) ; certaines amines sont cycliques, aliphatiques, branchées, etc.

b. Structures des produits finaux

La médiane de la distribution des poids moléculaires des composés finaux est à 500 g/mol. L'introduction de gros substituants permettra l'exploration de la grande poche catalytique de l'enzyme. Par ailleurs, les amines introduites permettent d'explorer des molécules dont le log P est positif contrairement au log P des analogues méthylamides en série benzyle (**55**) et en série phénylpropyle (**2**) (Tableau 15). Le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaison hydrogène est légèrement augmenté et répond aux règles de Lipinski. La surface polaire est globalement la même que les analogues et certaines amines apportent de la basicité aux composés donnant un pKa supérieur à 7 pour 40 % des composés formés.



Figure 88. Statistiques des composés finis de la chimiothèque a) poids moléculaire ; b) ALogP ; c) surface polaire (PSA) ; d) donneurs de liaison hydrogène ; e) accepteurs de liaison hydrogène.

Tableau 15.	Propriétés	physico-	chimiques	des analog	ues méthylamides



	HBA	HBD	AlogP	PSA	рКа	ABS
55	6	4	-3,5	127,4	2,76	0,55
2	6	4	-2,7	127,4	2,61	0,55

c. Etapes de synthèses

Les produits sont obtenus en trois étapes. Les deux premières produisent les histidines amides (L-H-His-NRR') et la dernière est la réaction d'ouverture des anhydrides pour l'obtention des produits finaux (Schéma 23).



Schéma 23. Voie de synthèse pour la chimiothèque

d. Mise au point de la voie de synthèse

La mise au point de la synthèse a été effectuée sur 6 amines. Ces dernières ont été choisies de façon à être représentative du panel d'amines. En particulier, nous avons travaillé avec la benzylamine et la diméthylamine (Figure 89).

Figure 89. 2 des amines utilisées pour la mise au point de la chimiothèque

i. <u>1^{ère} étape : synthèse des amides</u>



Schéma 24. Formation des amides

Tableau 10.	Conditions t	esiees			
Echelle	Agent de	Solvant	Solvant	Temps de	Dácultata
de réaction	couplage	agent couplage	Boc-His-OH	réaction	Resultats
	® _{T2} D	DMF	DMF	3 i	conversion $> 85 \%$
	131	DIVIT	Divit	55	dégradation à l'évaporation
15 µmol	CDI	THF	DMF	2 h+3 h ¹²⁷	conversion > 78 %
_	PyBrop	DMF	DMF	18 h	milieu complexe
	TBTU/HOBt	DMF	DMF	4 h	conversion < 60 %

Tableau 16. Conditions testées

Le premier essai a été effectué à l'échelle de 15 μ mol. Plusieurs agents de couplage ont été testés : le [®]T3P¹²⁸, le CDI, le PyBrop et le couple TBTU/HOBt.

Le PyBrop mène à des milieux complexes non exploitables. Le couple TBTU/HOBt ne permet pas d'avoir une conversion suffisante. Le [®]T3P donne de bons résultats en termes de conversion mais malheureusement, les milieux sont dégradés après évaporation. Enfin, la réaction au CDI conduit à des conversions acceptables.

Les réactions effectuées avec le CDI ont été purifiées. Pour éliminer la L-Boc-histidine restante, les bruts réactionnels sont solubilisés avec du dichlorométhane et la phase organique est lavée avec une solution diluée d'ammoniaque.

Ce lavage basique permet d'éliminer l'histidine de départ mais la conversion ne pouvant être calculée avec précision et le produit finit pouvant également passer légèrement dans la phase aqueuse, le nombre de moles restant est difficile à évaluer. Or pour la suite de la synthèse, il est important de connaître le nombre exact de mol pour ne pas mettre de réactifs en excès.

De plus, le lavage n'est pas aisé à l'échelle de 15 μ mol, nous avons donc choisi de poursuivre les essais à l'échelle de 0,2 mmol dans des tubes à hémolyse de 10 mL. Les lavages sont plus aisés et les résidus peuvent être pesés afin de remonter aux quantités de matières (Tableau 17).

 ¹²⁷ La réaction s'effectue en deux temps : le CDI avec la Boc-His-OH pour préparer l'espèce activé puis l'amine est introduite.
 ¹²⁸ Propane phosphonic acid anhydride

Echelle de réaction	Résultats après lavage	Observations	
15 µmol	Pureté 100 %	Difficulté de manipulation Nombre de mol restant inconnu	
0,2 mmol	Pureté 100 %	Facilité de mise en œuvre Pesée possible	

Tableau 17. Modification de l'échelle de réaction

La conversion à cette plus grande échelle est moins bonne (entre 67 et 82 %). Cela est certainement dû à la mauvaise solubilité du CDI et de l'histidine de départ. En effet, le CDI n'est pas totalement soluble dans le THF ainsi que la Boc-His-OH dans le DMF. Les quantités prélevées ne sont alors pas précises. De plus, le premier temps de réaction entre l'acide de la L-Boc-Histidine et le CDI n'est peut être pas assez long, de même que le temps de réaction avec l'amine.

Dans un premier temps, la solubilité du CDI a été améliorée en ajoutant du DMF anhydre dans la solution (1/4). La Boc-Histidine est solubilisée dans du méthanol avec 1 éq de DIEA pour être répartie de façon précise dans les tubes puis le solvant est évaporé. L'histidine est ensuite reprise avec du DMF anhydre.

Deux conditions de temps de réactions ont alors été testées, les premières conditions sont de 2 heures de réaction avec le CDI puis 3 heures de réaction avec l'amine, et les deuxièmes sont de 4 heures avec le CDI et une nuit avec l'amine (Tableau 18).

diffeation du temps de reaction						
Echelle	Solvant	Temps de	Dágultata			
de réaction	agent couplage	réaction	Resultais			
0.2 mmol	THF/DMF	2 h + 3 h	conversion > 67 %			
0,2 111101	75:25	4 h + 18 h	conversion > 69 %			

Tableau 18. Modification du temps de réaction

La conversion est la même quelques soient les temps de réaction utilisés et dans les deux cas, la conversion n'est pas totale. Toutefois, les lavages basiques permettent d'obtenir les produits purs et nous avons choisi de garder ce mode opératoire.

ii. 2^{ème} étape : déprotection des histidines



Schéma 25. Déprotection des amines

conditions : a) TFA, DCM, 50/50.

Les Boc-Histidines amides ont ensuite été déprotégées en milieu acide (Schéma 25). Le solvant est ensuite évaporé et les résidus sont repris avec un mélange DCM/EtOH puis réévaporés pour éliminer les dernières traces de TFA. Les conversions sont de 100 %.

iii. <u>3^{ème} étape : ouverture d'anhydride</u>



Schéma 26. Formation des composés finaux *conditions* : a) anhydride trifluoroacétique 2 % dans anhydride acétique ; b) L-H-His-NRR', DIEA, DMF.

L'étape d'ouverture d'anhydride en microplaque est une procédure précédemment mise au point au laboratoire. Le diacide est fermé en anhydride à l'échelle de 0,255 mmol en milieu 2 % anhydride trifluoroacétique/anhydride acétique (Schéma 26), puis il est réparti dans les microtubes et le solvant est évaporé. Le résidu est repris avec du THF puis les différentes histidines en solution dans le DMF anhydre sont ajoutées.

e. Mise en œuvre



Figure 90. Arbre décisinnel de la mise en œuvre de la chimiothèque

i. <u>1^{ère} et 2^{ème} étapes: synthèse et déprotection des amides</u>

La réaction est totale pour 17 amines et incomplète pour 6 autres dont les milieux réactionnels correspondants ont donc subi un lavage basique. Pour 2 amines, les milieux sont très complexes et ont été mis de côté.

Dans les 12 milieux restants, les analyses LC-MS montrent la formation d'espèces intermédiaires avec le CDI. Nous avons pensé que le temps de réaction n'avait pas été assez long. C'est pourquoi, les milieux ont été repris avec du DMF et ont été agités pendant 48 heures supplémentaires. Malheureusement, les milieux n'ont pas évolué.

Nous avons alors voulu hydrolyser les espèces intermédiaires. Après évaporation, les milieux ont été repris dans un mélange ACN/eau et chauffés à 50°C pendant 18 heures, sans résultats.

La synthèse ayant été effectuée sur 0,2 mmol, les milieux peuvent être purifiés par HPLC préparative. 3 des milieux précipitent dans le méthanol et n'ont pas été purifiés. Après purification, 3 produits n'avaient pas une pureté suffisante et ont été mis de côté.

Après la première étape, il y a donc 29 amides synthétisées avec une pureté satisfaisante.

Ensuite, la déprotection des groupements Boc a été effectuée sans problème.

ii. <u>3^{ème} étape : ouverture d'anhydride</u>

Chaque amide est mise en réaction avec les deux anhydrides. 40 composés sont obtenus avec une conversion satisfaisante mais pas totale, 2 composés ont une conversion complète. 3 amides ne produisent aucun produit, l'amine de départ utilisée possédant un substituant certainement trop encombré. Enfin, dans les 13 puits restants, le produit est formé avec une conversion satisfaisante mais il y a aussi la présence d'impuretés non identifiées.

iii. Résultats du criblage

Le criblage des composés a permis d'identifier, entre autres, les deux composés finaux préparés à partir de l'histidine benzylamide (L-H-His-NHBz). Les deux composés (**122** et **123**) ont été resynthétisés et testés *in vitro* pour déterminer leur pIC₅₀ (Tableau 19). Les deux analogues méthylamides (**55** et **2**) ont aussi donné une activité, en accord avec l'activité observée précédemment.

Tableau 19. Activité des composés actifs issus de la chimiothèque



Les analogues benzylamides sont légèrement moins actifs que leurs analogues méthylamides. Par contre, la présence d'un groupement benzyle ouvre des perspectives en termes de possibilités de diversification.

V. Conclusion du chapitre II

Le criblage de la chimiothèque du laboratoire a permis de découvrir un composé inhibiteur partiel, compétitif et réversible de l'hydrolyse du peptide A β par l'Insulin-Degrading Enzyme. Le composé peut se lier à deux sites de liaison différents dans l'enzyme : au site catalytique, ce qui est cohérent avec son caractère inhibiteur, ainsi qu'à l'exosite, ce qui peut expliquer l'inhibition partielle.

Ce composé s'est par la suite révélé être un modulateur substrat-dépendant. En effet, il active aussi légèrement l'hydrolyse de l'insuline. Une modification de l'état d'agrégation de l'enzyme serait à l'origine de cette activation. Elle pourrait aussi être due à un changement dans l'équilibre forme ouverte-forme fermée de l'enzyme.

Des relations structure-activité ont ensuite été établies : les quatre régions principales du composé ont ainsi été modulées (Figure 91). Il est apparu que l'histidine était indispensable, son noyau imidazole pouvant être alkylé sur la position τ mais surtout pas la position π . La chiralité de l'acide aminé n'a pas contre pas d'importance majeure.

La présence d'une fonction carbonylée est indispensable à l'Est à l'exception de l'acide carboxylique qui est à exclure. La présence de substituants hydrophobes à l'Est est tolérée, ce qui ouvre des perspectives d'autres modulations en cette position.

La charge apportée par l'azote central est essentielle pour la liaison à l'enzyme, de même que la présence d'un groupement ligand du zinc. Par contre, le remplacement bioisostérique de l'acide carboxylique par la fonction tétrazole, réputée être un bon ligand du zinc, n'est pas toléré.

Enfin, la présence de poches hydrophobes au niveau du site catalytique et de l'exosite explique que l'allongement de la chaîne carbonée à l'Ouest est bénéfique pour l'activité.



Figure 91. Relations structure-activité du composé 1

La substitution en position τ de l'imidazole étant possible, l'élaboration d'un chimiothèque de composés alkylés en cette position est programmée pour compléter l'étude des relations structure-activité.

Le composé 2 optimisé a ensuite été modifié de façon à passer les membranes cellulaires et ainsi être testé en modèle cellulaire impliquant les peptides $A\beta$ ou l'insuline. Dans le cas de la dégradation du peptide $A\beta$, l'effet inhibiteur est observé confirmant l'activité évaluée *in vitro*. Par contre, aucun effet n'a été observé sur la dégradation de l'insuline.

Ces composés, du fait de leur profil d'activité substrat-dépendant, activateur de l'insuline et surtout inhibiteur du peptide $A\beta$, peuvent être utilisés comme outils pharmacologiques pour étudier le mode d'action de l'enzyme.

Chapitre III : Découverte de composés inhibiteurs par Click Chemistry in situ

I. <u>Click Chemistry : Généralités</u>

La "Click Chemistry" est un concept introduit par Sharpless en 2001.^{129,130} Les réactions de Click Chemistry sont des réactions d'assemblage de "building blocks" effectuées dans des conditions biocompatibles avec des rendements élevés et ne formant pas de sous-produits. Ce sont des réactions spontanées qui permettent de générer un grand nombre de composés en peu de temps. Il en existe plusieurs¹³¹ : formation d'hydrazone, formation de ponts disulfures, alkylation d'amine ou de thiol, ouverture d'époxyde, métathèse et la plus utilisée : la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen.

Cette dernière réaction conduit à la formation d'un mélange de régioisomères 1,4 et 1,5 triazoles par réaction entre un alcyne et un azoture (Schéma 27).



Cette réaction de cycloaddition est lente à température ambiante. Mock *et al.* ont montré qu'elle est considérablement accélérée quand l'azoture et l'alcyne sont maintenus à proximité l'un de l'autre. Ils ont séquestré les deux composés dans des cucurbituriles (Figure 92) et ont découvert que la vitesse de réaction et sa sélectivité sont grandement augmentées.^{132,133}



Figure 92. Structure du cucurbiturile

Sharpless *et al.*¹³⁴ sont les premiers à avoir effectué cette réaction *in situ* en utilisant l'enzyme comme catalyseur, l'enzyme maintenant les deux partenaires à proximité dans sa poche.

Cette méthode implique la cible biologique dans la sélection et la synthèse de ses propres inhibiteurs. En effet, la protéine cible sélectionne les groupements les plus affins à partir d'un mélange de "buildings blocks" et synthétise son inhibiteur propre. La liaison simultanée de

¹²⁹ Kolb, et al., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**. 40(11): p. 2004.

¹³⁰ Kolb and Sharpless, The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, **2003**. 8(24): p. 1128.

¹³¹ Lewis, et al., Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**. 41(6): p. 1053.

¹³² Mock, et al., Catalysis by cucurbituril. The significance of bound-substrate destabilization for induced triazole formation. *J. Org. Chem.*, **1989**. 54(22): p. 5302.

¹³³ Mocharla, et al., In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**. 44(1): p. 116.

¹³⁴ Lewis, et al., Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**. 41(6): p. 1053.

deux composés à deux sites adjacents de l'enzyme place ceux-ci de manière à ce qu'ils réagissent "spontanément" entre eux (Figure 93).



Figure 93. Principe de la Click Chemistry *in situ*

Cette méthode a permis à Sharpless *et al.* de découvrir des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE).¹³⁵ Par la suite, cette méthode a permis d'identifier des inhibiteurs de la carbonique anhydrase,¹³⁶ de l'HIV protéase¹³⁷. Au sein du laboratoire, elle a permis l'exploration d'une poche flexible d'un récepteur transcriptionnel mycobactérien (EthR).¹³⁸ Dans les deux premiers cas, les différents partenaires sont mis en réaction deux par deux avec l'enzyme. Dans le cas de l'inhibiteur de l'EthR, la réaction a été effectuée de façon multicomposante. En effet, chaque azoture a été mis en présence de 6 alcynes à la fois.

II. Découverte d'un inhibiteur d'IDE par Click-Chemistry in situ

Aucune réaction de Click Chemistry *in situ* n'est, à ce jour, décrite dans une métalloprotéase. En parallèle du développement du composé **1**, une réaction de Click Chemistry *in situ* avec IDE a été mise en œuvre afin de concevoir un nouvel inhibiteur de l'enzyme. C'est la première fois que la réaction de Click Chemistry est effectuée avec cette enzyme. Cette enzyme étant une cryptidase, la chambre catalytique est beaucoup plus vaste que celles des autres enzymes pour lesquelles cette méthode a été utilisée. Les sites de liaisons potentiels des différents "building-blocks" sont donc multiples.

Le but étant d'obtenir des inhibiteurs, une fonction hydroxamate est introduite sur l'un des deux partenaires de la réaction et plus précisément sur le composé azoture, lui permettant de venir s'ancrer au niveau du site catalytique et ainsi d'avoir un point d'accroche dans l'enzyme. La conception des "accroches" s'est inspirée des travaux de Leissring et al.^{139,140} qui ont abouti à la conception de l'inhibiteur peptidomimétique **Ii1**.

Leissring *et al.* ont synthétisé des inhibiteurs peptidomimétiques possédant une fonction hydroxamate pour cibler l'atome de zinc. Leurs inhibiteurs ont été conçus en déterminant les acides aminés préférés de l'enzyme aux sites P1' et P2' de ses substrats. IDE aurait une

¹³⁵ Lewis, et al., Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**. 41(6): p. 1053.

¹³⁶ Mocharla, et al., In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**. 44(1): p. 116.

¹³⁷ Whiting, et al., Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**. 45(9): p. 1435.

¹³⁸ Willand, et al., Exploring Drug Target Flexibility Using in Situ Click Chemistry: Application to a Mycobacterial Transcriptional Regulator. *ACS Chem. Biol.*, **2010**. 5(11): p. 1007.

¹³⁹ Leissring, et al., Designed Inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme Regulate the Catabolism and Activity of Insulin. *PLoS ONE*, **2010**. 5(5): p. e10504.

¹⁴⁰ Leissring, et al. Hydroxamate inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme and uses thereof. WO 2008/156701, 13 June 2008, **2008**.

préférence pour les acides aminés Tyr et Arg en P1'ainsi que Phe dans une moindre mesure, et pour Arg en P2' (Figure 94).¹³⁹



Figure 94. Préférence des acide-aminés au site de clivage d'IDE

Deux inhibiteurs ont ensuite été synthétisés possédant une fonction hydroxamate basés sur la séquence Phe-Arg-Trp-Glu en série (*L*) et en série (*D*) et ayant un Ki respectivement de 0,11 et 4,1 μ M. Après optimisation de ces composés, le composé **Ii1** a été obtenu avec un Ki de 1,7 nM (Figure 95).



Figure 95. Ii1 : inhibiteur peptidomimétique

Cet inhibiteur a été co-cristallisé avec l'enzyme et la structure montre que le composé se lie au zinc catalytique grâce à sa fonction hydroxamate, bloquant ainsi l'accès du site catalytique aux substrats. Il apparaît aussi que cet inhibiteur interagit avec des résidus des deux domaines N et C de l'enzyme et bloque celle-ci dans sa forme fermée inactive (Figure 96).



Figure 96. Interactions de **Ii1** avec le site catalytique d'IDE les résidus de IDE-C sont surlignés en jaune ; PDB : 3E4A

1. Click Chemistry in situ avec IDE

a. Préparation des "building-blocks"

Les groupements naphtyle et benzyle ayant donné les meilleurs résultats en P1' dans les travaux de Leissring *et al.*¹⁴¹, il a été choisi de préparer deux "accroches" dérivées des β -aminoacides correspondant (Figure 97).



Figure 97. Structure des composés azotures hydroxamiques 124 et 125

Les précurseurs azotures ont été préparés en trois étapes à partir de l'acide aminé correspondant (Schéma 28). L'acide est tout d'abord estérifié en milieu acide, puis la fonction azoture est introduite par réaction avec l'azoture imidazole-1-sulfonyle (**130**), un agent de transfert d'azoture efficace et sûr.¹⁴² Enfin la fonction hydroxamate est introduite par aminolyse de l'ester avec l'hydroxylamine (Schéma 28).



Schéma 28. Synthèse des précurseurs azotures

conditions : a) SOCl₂, MeOH, 0°C puis temp. ambiante, 80-100 % ; b) K_2CO_3 , CuSO₄.5H₂O, MeOH, temp. ambiante, 18 h, 71-74 % ; c) NH₂OH.HCl, KOH, MeOH, temp. ambiante, 1 h, 26-29 %

La fonction azoture étant introduit par les "accroches", la diversité est apportée par les alcynes. 90 alcynes ont été compilés, 35 composés commerciaux ainsi que 30 amides et 25 sulfonamides préparées au laboratoire à partir de la propargylamine et respectivement de chlorures d'acyle et de sulfochlorures (Schéma 29).



Schéma 29. Synthèse des alcynes *conditions* : a) DIEA, DCM, 0°C puis temp. ambiante, 18 h, 13-100 %.

¹⁴¹ Leissring, et al. Hydroxamate inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme and uses thereof. WO 2008/156701, 13 June 2008, **2008**.

¹⁴² Goddard-Borger and Stick, An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.*, **2007**. 9(19): p. 3797.

b. Formation des clusters

Afin de tester un grand nombre d'alcynes et d'optimiser le nombre d'analyses, des clusters de 10 et 9 alcynes ont été mis en réaction avec un azoture dans chaque puits. Les alcynes ont été triés en deux sortes de clusters différents et orthogonaux¹⁴³ de façon à ce que chaque alcyne se retrouve dans deux environnements différents et ainsi maximiser les chances de détecter tous les alcynes susceptibles de lier l'enzyme (Figure 98). En effet, si, dans un cluster A1, un couple azoture-alcyne **a** se retrouve de façon optimale dans la poche et forme ainsi un composé en grande quantité, il empêche potentiellement un autre alcyne **b** de réagir. Dans le cluster B1, cet alcyne **b** ne se trouvera plus en compétition avec l'alcyne **a** et aura donc plus de chance de former un composé qui sera détecté.



Figure 98. Principe des clusters orthogonaux

Les alcynes ont été répartis en fonction du linker (amine, amide, sulfonamide, aromatique ; cluster A) et en fonction des propriétés du groupement (donneur ou accepteur de liaisons hydrogène, alkyle et hétéroaromatique, chargé positivement, dérivé phénylique ; cluster B) (Figure 99). Tous les alcynes de chaque cluster ont été classés de façon à ce qu'ils aient un poids moléculaire et un temps de rétention différent pour que les composés formés puissent ensuite être identifiés.



Figure 99.

Répartition des alcynes en fonction des clusters

¹⁴³ Deprez, et al., Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**. 117(19): p. 5405.

c. Mise au point des synthèses régiosélective des triazoles

Il est indispensable d'avoir une référence pour tous les composés qui peuvent être générés dans l'enzyme de façon à pouvoir les identifier grâce à leur temps de rétention en LC-MS. Pour cela, chaque régioisomère doit être préparé. La réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen n'est pas régiosélective mais la même réaction catalysée par du cuivre permet d'obtenir le composé 1,4 triazole de façon régiosélective. Enfin, la synthèse régiosélective des triazoles 1,5 est communément effectuée en présence d'un catalyseur au ruthénium.¹⁴⁴



régioisomère 1,5

Schéma 30. Synthèse des différents régioisomères

Un essai a été effectué pour la synthèse d'un composé 1,4 triazole avec succès. Par contre, la méthode de synthèse des triazoles 1,5 par catalyse au ruthénium ne pouvant pas être utilisée en présence de la fonction hydroxamate qui "empoisonne" le catalyseur, il a fallu mettre au point une autre voie de synthèse. Un premier essai a été effectué à partir de l'azoture porteur d'une fonction ester, qui pourra ensuite être convertie en acide hydroxamique (Tableau 20 ,entrée a). La réaction ne conduit pas à la formation du produit attendu à température ambiante et le milieu se dégrade quand il est porté au reflux.

Les conditions thermiques non régiosélectives ont ensuite été testées pour voir si le régioisomère 1,5 se formait tout de même dans ces conditions classiques. La réaction a été effectuée à partir du β -aminoester (entrée b) ou de l'hydroxamate (entrée c) correspondant mais sans succès : la conversion est très faible même après une semaine. L'encombrement dû au groupement naphtyle étant peut-être un facteur limitant, la réaction a été effectuée dans les mêmes conditions à partir de la β -phénylalanine (entrée d) avec le même résultat.

La formation du triazole substitué en 1,5 a alors été essayée en présence d'un organométallique. La réaction a été effectuée à partir du composé hydroxamique en présence d'un réactif de Grignard (entrée e) ou de butyllithium (entrée g). Un alcyne moins encombré a été aussi utilisé sans résultats (entrée h) ainsi que l'utilisation du β -aminoacide (entrée f) comme produit de départ. Malheureusement aucune de ces conditions n'ont permis d'obtenir le régioisomère 1,5.

¹⁴⁴ Rasmussen, et al., Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Aryl Azides and Alkynes. Org. Lett., **2007**. 9(26): p. 5337.

Tableau 20. Conditions testées pour la synthèse des triazoles 1,5

o *_*^{R'}

$\gamma \xrightarrow{I} N_3 + \xrightarrow{N} R \longrightarrow \gamma \xrightarrow{I} N_N N$						
		NH R				
	Y	R'	R	Conditions	Résultats	
a	OMe			Cp*RuCl(PPh ₃) ₂ DMF ta puis 110°C, 18 h	Pas de produit puis dégradation	
b	OMe		-	Ethanol, 80°C, 18 h		
c	NHOH		\sim	Ethanol, 80°C, 7 jrs	Mélange de régioisomères Faible conversion	
d	NHOH		\sim	Ethanol, 80°C, 7 jrs		
e	NHOH		-	EtMgBr, 50°C puis ta	Faible commission	
f	ОН		-	EtMgBr 50°C puis ta	Faible conversion	
g	NHOH		-	BuLi / THF	Pas de réaction	
h	NHOH		Н	BuLi / THF	Dégradation	

0 ^{R'}

d. Mise en œuvre de la réaction de Click Chemistry in situ

La manipulation a été effectuée en parallèle en plaque de 96 puits. Une plaque "contrôle" a été préparée : les clusters ont été mis en présence des azotures dans le tampon, de façon à vérifier que les composés ne réagissent pas entre eux de façon spontanée. Dans une autre plaque, le catalyseur au cuivre a été ajouté afin de s'assurer que les composés se forment bien et avoir un des régioisomères en référence. Et enfin, dans une troisième plaque, l'enzyme a été ajouté au mélange azoture/clusters pour effectuer la réaction de Click Chemistry *in situ* (Figure 100).



Figure 100. Mise en œuvre de la réaction de Click Chemistry in situ

Chaque puits a alors été analysé par LC-MS-TOF, les produits formés en présence de cuivre servant de référence. Comme attendu, aucun composé ne s'est formé dans l'expérience de contrôle. Après analyse des puits de la réaction *in situ*, 32 composés ont été identifiés, tous sont des dérivés du β -naphtylalanine. En effet, aucun composé ne s'est formé à partir de l'accroche β -phénylalanine. Parmi les composés produits, 14 possèdent le linker amide, 16 la

fonction sulfonamide, 2 ont un linker aromatique ou aliphatique. Par ailleurs, chaque composé formé dans les clusters A s'est également formé dans le cluster B correspondant.

La majorité des composés (23) possèdent un noyau aromatique directement branché après le linker. Parmi eux, 18 sont substitués en para du cycle aromatique par des groupements plus ou moins encombrants.

e. Evaluation de l'activité in vitro des composés

Devant l'impossibilité de préparer les analogues 1,5, seuls les composés triazoles 1,4 ont été resynthétisés. Parmi les 32 composés que l'enzyme a générés, une tendance des préférences de l'enzyme se dessine. Les linkers amide ou sulfonamide semblent être accepté de la même façon. Il apparaît également que le groupement porté par le linker doit être hydrophobe et de préférence aromatique.

Ainsi parmi les 32 composés synthétisés dans l'enzyme, 9 ont été choisis en fonction de leur structure (Figure 101) de façon à pouvoir étudier les relations structure-activité. Aux 9 composés sélectionnés ont été ajoutés 3 analogues¹⁴⁵ pour être resynthétisés.

Les deux linkers amide et sulfonamide ont été sélectionnés par l'enzyme, donc des composés possédant les deux linkers ont été préparés. Le groupement phényle est le groupement majoritairement présent parmi les composés générés *in situ*, des composés porteurs de cet aromatique ont donc été choisi ainsi que certains substitués en para. Enfin des composés sans linker, possédant un carbone en plus entre le linker et l'aromatique ainsi qu'un composé avec un composé aliphatique ont été ajoutés pour compléter l'étude.



Figure 101. Critères de sélection des composés resynthétisés

La synthèse de ces 12 composés a été effectuée en utilisant la réaction de Huisgen catalysé au cuivre (Schéma 31).





¹⁴⁵ 2 dont les alcynes correspondants n'étaient pas dans le criblage et 1 dont l'alcyne était dans la plaque sans former de composé.
Les composés resynthétisés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur effet sur l'hydrolyse du peptide Aβ.¹⁴⁶

	R	pIC ₅₀		R	pIC ₅₀		
142	NH H	6,1	151	O, O N S H	5,1		
143	N H	5,6	152	O, O N S H	5,1		
144	NH F	6,6	153	N ^S ,O H	5,2		
145	NH NO	5,3					
146	NH FFF	N.A ^a					
147	NH NH	6,1					
148	NH CON	4,9					
149	NH C	5,4					
150		5,3					



^a 59 % d'inhibition à 100 μ M

Ces résultats nous apprennent que le linker amide est meilleur pour l'activité que le sulfonamide. En effet, l'activité des composés amides est en moyenne supérieure d'un log par rapport au composé sulfonamide avec les mêmes substituants (143 et 152 ; 142 et 151 ; 144 et 153). Le nombre de carbone entre le linker amide et le groupement phényle influe aussi sur l'activité, le composé directement branché (143) est plus actif que son analogue avec un carbone (148). Le composé 142 a une activité meilleure de 0,7 log par rapport à son analogue direct avec deux carbones (149). La substitution en para du groupement phényle joue sur l'activité. Les groupements donneurs (Me 143, OMe 145) sont moins intéressants que l'analogue sans substituant (142). Le fluor, groupement attracteur, (144) est par contre très intéressant pour l'activité.

 $^{^{146}}$ De même que pour les composes du chapitre II, le susbtrat utilisé pour les testé *in vitro* est l'ATTO-A $\beta_{16:23}$

La stabilité de ce dernier composé a été évaluée en milieu plasmatique murin et humain (Tableau 22). Si la stabilité dans le plasma humain est plutôt bonne, celle en milieu murin est à améliorer. De même, la solubilité n'est pas très élevée, probablement due à son fort caractère hydrophobe.

Paramètres calculés in silico							
M (g/mol)	HBA*	HBD*	Alog P	PSA	рКа	ABS	
447	5	3	3,181	109,14	-2	0,55	
Propriétés physico-chimiques							
Solubilité PBS (µmol/L) log l				log D (7	',4) PBS/	octanol	
58					2,2		
ADME							
Stabilité plasma souris				Stabilité	e plasma	humain	
$t_{1/2}(h)$			$t_{1/2}(h)$				
13,3					> 24		

Tableau 22. Propriétés du composé 144

^{*}HBA et HBD : respectivement nombre d'accepteur et de donneur de liaison hydrogène

Ce composé a un poids moléculaire plus élevé que le composé 1 (447 vs 374 g/mol), sa solubilité est également moindre (58 vs 154 μ M). Par contre, le composé 144 étant plus hydrophobe, sa perméation cellulaire est certainement meilleure (log D > 0 vs log D < 0).

2. Liaison du composé 143 à IDE

Le composé **143** a été co-cristallisé avec l'enzyme et, comme attendu, il se lie au niveau du site catalytique. L'acide hydroxamique fait une liaison bidentate avec l'atome de zinc. Le groupement naphtyle entre dans la poche hydrophobe formée par le F115, L116 et F820. Le groupement toluényle s'ancre aussi dans une poche formé par M634, H679, I849, F834 et I832 (Figure 102). Deux liaisons hydrogène se forment avec une molécule d'eau entre l'azote 3 du triazole et celui de la fonction amide. Cette molécule d'eau est elle-même en interaction avec la chaîne principale de la tyrosine 831 du site catalytique.



Figure 102. Liaison du composé 143 dans l'enzyme

La comparaison de notre inhibiteur avec l'inhibiteur **Ii1** montrent qu'ils se lient de la même façon dans l'enzyme. Les groupements naphtyles se superposent (Figure 103) et le reste du squelette de la molécule s'aligne également sur la chaîne principale de l'inhibiteur peptidomimétique.

De même, le composé **143** se superpose au composé **1** : le groupement benzyle du composé **1** entre dans la même poche que celle du naphtyle et la fonction amide du composé **1** et le triazole du composé **143**, qui interagissent directement ou *via* une molécule d'eau avec la tyrosine 831, se retrouve au même niveau.



Figure 103. Superposition des inhibiteurs 143, Ii1 et 1 en bleu : Ii1 ; en rose : 143 ; en jaune : 1

Au vu de cette superposition, la modification du groupement naphtyle par un groupement phénylpropyle, qui a donné de bons résultats dans le cas du composé **1**, peut être envisagée pour augmenter l'affinité du composé en l'ancrant plus loin dans la poche hydrophobe du site catalytique.

III. Conclusion du chapitre III

La Click Chemistry *in situ* est une méthode rapide de découverte de composés inhibiteurs d'une enzyme. L'enzyme choisit les groupements qui lui sont les plus affins pour former directement à l'intérieur de la chambre catalytique. Grâce à cette méthodologie, 32 composés ont été identifiés. La resynthèse et l'évaluation enzymatique de 12 composés ont permis la découverte d'une série de composés inhibiteurs avec en particulier un composé (144) dont l'activité est submicromolaire. Par contre, ces composés nécessitent encore de l'optimisation pour augmenter leur activité et surtout pour améliorer leurs propriétés physico-chimiques.

Cette expérience multicomposante et orthogonale est la première réaction de Click-Chemistry *in situ* effectuée dans une métalloprotéase ainsi dans une cavité catalytique aussi vaste. Elle a permis d'obtenir les premiers inhibiteurs non peptidomimétiques d'IDE.

Conclusion générale

L'insuline et le peptide β -amyloïde sont deux peptides très différents que ce soit au niveau de leur structure ou de leur implication biologique. Ces deux peptides partagent tout de même la même enzyme de dégradation pour leur hydrolyse : l'Insulin-Degrading Enzyme. Des dysfonctionnements dans la production ou l'élimination de l'insuline et du peptide A β sont à l'origine de pathologies comme le diabète et la maladie d'Alzheimer.

Dans la première de ces pathologies, une surexposition des cellules à l'insuline les rend résistantes à cette hormone, le glucose n'est alors plus stocké. D'un autre côté, lorsque les cellules β du pancréas sont déficientes, elles ne produisent plus d'insuline, la glycémie n'est donc plus régulée. Ainsi, une surconcentration ou le défaut d'insuline participent au développement du diabète. Dans le cas de la deuxième pathologie, l'accumulation du peptide A β due à un défaut de sa dégradation mène à son agrégation en plaques, ce qui pourrait être une des causes de la maladie d'Alzheimer.

La régulation de la production et de la protéolyse de ces peptides sont donc des stratégies à développer pour le traitement de ces maladies. Ces peptides sont tous deux dégradés par la même protéase et des liens entre IDE et le diabète, entre IDE et la maladie d'Alzheimer et enfin entre le diabète et la maladie d'Alzheimer, ont été constatés.

IDE étant peut-être un acteur important entre ces deux maladies, nous nous sommes donc intéressés à la régulation de cette enzyme en développant des composés modulant son activité. Ainsi, au cours de ces travaux, deux séries de modulateurs d'IDE ont été découvertes.

Une première série de composés a été développée à partir de la structure d'un composé inhibiteur de l'hydrolyse du peptide A β découvert par criblage. Les études de ce composé ont montré qu'il n'est pas seulement un inhibiteur de la dégradation du peptide A β mais qu'il module aussi l'activité de l'enzyme en fonction du substrat. En particulier, il active l'hydrolyse de l'insuline par IDE.

La cristallographie du composé dans l'enzyme a dévoilé un mode de liaison atypique où le composé peut se lier soit au site catalytique, soit à un exosite. Cet exosite est un site important dans l'enzyme pour l'ancrage et l'hydrolyse des substrats.

La structure de ce composé a été améliorée pour obtenir une molécule dont l'activité est submicromolaire (2, pIC₅₀ = 7,6). Le précurseur ester 3 de ce composé optimisé a présenté un effet inhibiteur du peptide A β en milieu cellulaire, en corrélation avec les activités observées *in vitro*, mais n'a montré aucun effet sur la dégradation de l'insuline.

La deuxième série a été découverte en se servant de la cavité catalytique de l'enzyme pour concevoir les composés. Une stratégie originale de Click Chemistry *in situ* multicomposante et orthogonale a été utilisée. Le but étant de synthétiser des inhibiteurs, l'un des partenaires de la réaction a été conçu pour cibler le zinc. 30 composés inhibiteurs ont ainsi été générés, 12 molécules ont été resynthétisées permettant une étude de relations structure-activité et l'un des composés a été cristallisé avec l'enzyme. Comme attendu, il se lie au niveau du site catalytique empêchant ainsi tous les substrats d'être dégradés.

Au cours de ces travaux, nous avons, d'une part, mis au point les premiers modulateurs substrat-dépendants d'IDE et d'autre part, les premiers inhibiteurs hydroxamiques non peptidiques de cette enzyme. Ces derniers ont été conçus grâce à la première réaction de Click Chemistry *in situ* d'une métalloprotéase. Enfin, l'ensemble de ces composés pourront être utilisés comme outils pharmacologique pour mieux comprendre les rôles et mécanismes d'action de cette enzyme-clé.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

TABL	ES D	ES MOLECULES	. 116
PAR	LIE E)	XPERIMENTALE DU CHAPITRE II	. 117
١.	DE	ECOUVERTE D'UN COMPOSE INHIBITEUR DE L'HYDROLYSE D'Aβ	. 117
	1	Synthèse du substrat ATTO-A $\beta_{16,22}$. 117
	2	Criblage de la chimiothèque	. 118
	3	Test enzymatique : courbe dose-rénonse de l'hydrolyse du pentide AB	119
	Δ	Evaluation de la réversibilité	119
	5	Caractère et nature de l'inhibition	119
	6	Expression et nurification de la protéine cristallisation collecte et analyse des données	120
	7	Modulation substrat-dénendante d'IDF	120
	, 8	saxs	122
	9	Evaluation de l'effet du composé 1 sur la néprilysine (NFP)	123
	10	Pronriétés ADMF	123
	-0 a	a Solubilité PBS	. 123
	t	۲ در	123
	c	Stabilité plasmatique	124
	11	Modèle Alzheimer	. 125
	а	3 Culture cellulaire lignées SH-SY5Y	125
	k	Incubation avec le composé et préparation des échantillons pour ELISA et Western Blot	125
	C	: Western Blotting	125
	C	1 ELISA	126
	12	Modèle diabète	. 127
	a	Culture cellulaire lignée IHH (Immortalized Human Hepatocytes)	127
	c c	Stimulation de l'expression du gene PECK par l'insuline dans les cellules IHH	. 127
	((Culture cellulaire lignees Mino (cellule β-pancreatique de souris) Sécration d'inculing par les collules β pancreatiques stimulés par le glucese. 	127
п	Ľ		178
	1	Sunthèses analyses et nurifications	120
	2	Procédures générales	120
	2	Modification de l'acide aminé au Nord	120
	Δ	Changement du arounement hydronhohe à l'Auest	136
	5	Elimination de la charge nositive annortée par l'amine tertigire	157
	6	Modification de l'ester à l'Est	170
	7	Changement de la fonction acide au Sud	188
	, Q	Chimiothèque : Alkulation en Tau	201
	g	Chimiothèque : exemplification de l'amide à l'Est	201
	J	Synthèse des Histidines amides (His-NRR') :	. 200
	b	o Synthèse des composés finaux	206
PAR	LIE EX		. 212
	1	Synthèse des Braminoacide hydroxamiaues	212
	2	Synthèse des alcunes	216
	2 2	Click Chemistry in situ avec IDE	220
	л Л	Resunthèse des composés	220
	4 5	Ligicon du composé 11619 à IDE	220
	5		. 221

Tables des molécules

n°	р.	n°	р.	\mathbf{n}°	р.	n°	р.
1	130	41	148	81	170	121	205
2	187	42	152	82	176	122	207
3	210	43	136	83	182	123	209
4	131	44	136	84	171	124	215
5	132	45	154	85	172	125	215
6	133	46	<u>147</u>	86	172	126	212
7	134	47	<u>148</u>	87	184	127	212
8	129	48	<u>149</u>	88	184	128	213
9	134	49	157	89	178	129	214
10	134	50	158	90	178	130	213
11	135	51	161	91	176	131	216
12	136	52	162	92	187	132	216
13	138	53	164	93	188	133	217
14	139	54	166	94	190	134	217
15	141	55	176	95	192	135	217
16	142	56	167	96	195	136	218
17	144	57	158	97	197	137	218
18	145	58	160	98	198	138	218
19	146	59	162	99	200	139	219
20	148	60	164	100	195	140	219
21	150	61	158	101	195	141	219
22	152	62	160	102	196	142	221
23	154	63	162	103	198	143	221
24	156	64	164	104	198	144	222
25	139	65	166	105	188	145	222
26	141	66	167	106	188	146	223
27	142	67	167	107	189	147	223
28	144	68	168	108	190	148	224
29	145	69	168	109	190	149	224
30	146	70	170	110	192	150	225
31	150	71	171	111	193	151	225
32	148	72	172	112	193	152	226
33	152	73	174	113	192	153	226
34	156	74	175	114	201		
35	154	75	178	115	202		
36	138	76	180	116	203		
37	139	77	181	117	204		
38	142	78	182	118	204		
39	146	79	184	119	205		
40	150	80	186	120	205		

 ¹⁴⁷ Enantiomère (D) du composé 1
 ¹⁴⁸ Enantiomère (D) du composé 16
 ¹⁴⁹ Enantiomère (D) du composé 24

Partie expérimentale du Chapitre II

- I. <u>Découverte d'un composé inhibiteur de l'hydrolyse d'A β </u>
 - 1 Synthèse du substrat ATTO-Aβ₁₆₋₂₃

Ac-Cys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Trp-NH2 was synthesized by NeoMPS (PolyPeptide Lab., Strasbourg, France). The fluorophore ATTO655 maleimide was purchased from Atto-tec.

To 1 mg (1.543 μ mol) of the ATTO655 maleimide were added 154 μ L of DMF (directly in the vial). A solution of 2.4 mg (1.85 μ mol) of the peptide in 924 μ L of water was prepared. The two solutions were mixed, the pH was controlled. A solution of NaOH was added dropwise so that the pH was around 7. The mixture was stirred at room temperature until all the fluorophore had reacted.

Category	Parameter	Description
Assay	Type of assay	In vitro fluorescence assay (FRET)
	Target	Recombinant Human Insulin Degrading Enzyme IDE (EC 3.4.24.56).
	Primary measurement	% inhibition of IDE hydrolysis of fluorogenic substrate. Excitation at
		635 nm and emission at 750 nm
	Key reagents	Recombinant human IDE from Ben-May Department for Cancer
		research, University of Chicago. Ac-Cys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-
		prepared in house was ATTO 655- Cys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-
		Asp-Trp where Cys was used as a linker and Trp as a quencher.
		Assay buffer was HEPES at 50 mM with 100 mM NaCl, pH 7.4.
	Assay protocol	The enzymatic activity of IDE was assayed using a fluorogenic amyloid
		β 16-23 (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp) 20 μL of IDE (2.5 $\mu g/mL)$
		were pre-incubated 10 minutes at ambient temperature with 20 μ L of test
		compound at 120 μ M or vehicle in 96 well microtiter plates (dark, non- binding surface). The reaction was then started with the addition of 40
		μ L of substrate at 10 μ M. Incubations were performed at 37°C. Final
		concentrations of IDE, compounds and substrate were 0.625 µg/mL 30
		μ M and 5 μ M, respectively.
Library	Library size	2040
	Library composition	Lead-like and Drug-like molecules
	Source	In -house synthesized library
	Additional comments	0.01 M DMSO stock solutions
Screen	Format	96-well microtiter plates (dark, non-binding surface)
	Concentration(s) tested	30 µM, 1% DMSO
	Plate controls	EDTA 2 mM ($80 \pm 6\%$ inhibition)
		Max fluorescence : IDE+Substrate+vehicle
	Pagant/compound	Min fluorescence : Substrate+vehicle
	dispensing system	Cyblo Cybl wen
	Detection instrument	Victor 3V (Perkin-Elmer) excitation at 635 nm and emission at 750 nm
	and software	
	Assay validation/QC	Z' = 0.75
Post-HTS analysis	Hit criteria	% inhibition > 40% at 30 μ M
	Hit rate	1.1%
	Additional assay(s)	IC ₅₀ DRC on crude library hits (100 μ M to 30 nM, n = 2).
		IC_{50} DRC on resynthesized confirmed hits (n = 4).
	Confirmation of hit purity	LUMS and compound resynthesis at larger scale (LUMS; 'H, 'C NMR)
	Additional comments	IC _{so} values were calculated from concentration-response curves by a
	reactional comments	nonlinear regression analysis using XL fit TM from IDBS software.

2 <u>Criblage de la chimiothèque</u>

3 Test enzymatique : courbe dose-réponse de l'hydrolyse du peptide Aß

Assay buffer was HEPES at 50 mM with 100 mM NaCl, pH 7.4 HEPES, NaCl and EDTA were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). The labelled substrate prepared in house was ATTO 655- Cys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Trp where Cys was used as a linker and Trp as a quencher. Small aliquots of the lyophilized peptide, stored at -20°C, were extemporaneously solubilized to a concentration of 1.25 mM with DMSO and diluted to 10 μ M in HEPES buffer. After sonication and centrifugation (5 min, 3000 g), the supernatant was immediately used in the enzymatic assay. Recombinant human IDE was a gift of Ben-May Department for Cancer research, University of Chicago. Small aliquots of recombinant human IDE solution stored at -80°C, were extemporaneously solubilized to a concentration of 2.5 μ g/mL with the HEPES buffer to be dispensed into the assay plates.

20 μ L of IDE were pre-incubated 10 minutes at ambient temperature with 20 μ L of test compound or vehicle in 96 well microtiter plates (dark, non-binding surface). The reaction was then started with the addition of 40 μ L of substrate. Final concentrations of IDE and substrate were 0.625 μ g/mL and 5 μ M, respectively. Final DMSO was 1.4%. EDTA 2 mM was used as a reference inhibitory control. Incubations were performed for 40 minutes at 37°C. For the kinetic readout a Victor 3V (Perkin-Elmer) was used with excitation at 635 nm and emission at 750 nm.

4 Evaluation de la réversibilité

The reversibility of the inhibition was determined by measuring the recovery of enzymatic activity after a rapid and large dilution of the enzyme-inhibitor complex. IDE was incubated with the inhibitor at a concentration around 10-fold the IC₅₀. After 20 minutes, this mixture was diluted 100-fold into the reaction buffer containing the enzyme substrate to initiate the reaction. After dilution, the inhibitor concentration was around 0.1 x IC₅₀ and final concentrations of IDE and substrate were 3.75 μ g/mL and 5 μ M, respectively. The progress curve was compared to that of similar sample of enzyme incubated and diluted with substrate in the absence of inhibitor. If the inhibitor is rapidly reversible the velocity should be equal to about 91% of the slope of the control (relative rate of 0.9).

5 Caractère et nature de l'inhibition

The character and the nature of the inhibition were diagnosed using the two-step graphical approach described by F. Antunes et al.¹⁵⁰ This method is based on the dependency of the degree of inhibition, ε_{I} , on the inhibitor and substrate concentrations. Data were obtained by incubating IDE with various inhibitor and substrate concentrations and ε_{I} calculated as

follows : $\varepsilon_i = \frac{v_0 - v_i}{v_0}$

Once the type of inhibition identified, inhibition parameters were determined by non-linear fitting of the data to the associated mathematical inhibition model.

¹⁵⁰ Antunes, et al., Diagnosis of enzyme inhibition based on the degree of inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **2003**. 1624(1-3): p. 11.

6 Expression et purification de la protéine, cristallisation, collecte et analyse des données

The expression of cysteine free human IDE (IDE-CF; C110L, C171S, C178A, C257V, C414L, C573N, C590S, C789S, C812A, C819A, C904S, C966N, C974A) and the catalytically inactive IDE-CF-E111Q mutants was performed using E. coli Rosetta (DE3) cells (at 25 °C and 19 hours, IPTG induction) and purified by Ni-NTA, Source-Q, and 3-5 cycles of Superdex S-200 columns.

IDE-CF-E111Q in complex with modulator was crystallized by hanging drop vapor diffusion at 18°C, using 1 μ l of protein (16-20 mg/ml) and 1 μ l of mother liquor (10-13% PEG MME 5000, 100 mM HEPES pH 7.0, 4-14% Tacsimate, 10% dioxane). Clusters of needle crystals appeared in 3 to 5 days and were equilibrated in cryo-protective buffer containing 30% glycerol and mother liquor and were flash frozen in liquid nitrogen.

Diffraction data were collected at the Advance Photon Source 14-BM-C and 19-ID beamlines at Argonne National Laboratory.

The data sets were processed using HKL2000. The structures were solved by molecular replacement (Phaser) using the IDE portion of A β -bound IDE-E111Q structure as a search model (PDB: 2G47). Structure refinement and rebuilding were performed using REFMAC and Coot. The extra electron density at the catalytic chamber of IDE in the structures of IDE in complex with compound were clearly visible based on sA-weighted Fo-Fc map calculated by CNS and manually built.

	IDE-CF-WT	IDE-CF-E111Q	IDE-CF-E111Q	IDE-CF-E111Q
	1	1	15	16
Data Collection				
Beamline	APS 19ID	APS 14ID	APS 19ID	APS 14ID
Wavelength (Å)	0.9795	0.9793	0.9795	0.9793
Space group	P65	P65	P65	P65
Cell dimension(Å)				
а	263.6	263.1	263.8	263.2
b	263.6	263.1	263.8	263.2
c	91.1	90.5	91.1	90.9
Resolution (Å)	50-3.2	50-2.8	50-2.9	50-3.05
Rsym (%) ^a	12.5(41.3) ^e	11.4(34.2) ^e	16.4(45.3) ^e	17.7(57.6) ^e
I/sigma	$18.4(4.0)^{e}$	$13.5(2.0)^{\rm e}$	8.6(2.3) ^e	$9.2(2.0)^{\rm e}$
Redundancy ^b	4.5(4.2) ^e	3.7(3.7) ^e	3.5(2.1) ^e	3.7(3.6) ^e
Completeness (%)	99.6(99.6) ^e	98.4(99.4) ^e	99.9(99.9) ^e	99.8(99.8) ^e
FOM(Figure of Merit)	0.8713	0.8835		
Unique reflections	55194	82996	75029	68272
Refinement				
R _{work} ^c	0.172	0.172	0.195	0.177
R _{free} ^d	0.239	0.225	0.250	0.227
No. atoms				
Protein	15526	15526	15651	15644
Water	135	296	183	105
B-factors				
IDE	43.2	28.9	38.2	33.4
Ligand	85.3	63.5	79.5	78.5
Water	49.9	34.8	41.4	27.8
r.m.s. deviations				
Bond lengths (Å)	0.018	0.017	0.019	0.019
Bond angles (°)	1.785	1.564	1.875	1.899
Ramachandran plot (%)				
Favorable region	88.4/ 87.6	90.3 / 90.5	89.7 / 89.8	90.2 / 89.6
Allowed region	11.2 / 12.3	9.7 / 9.5	10.1 /10.2	9.8 / 10.4
Generously allowed region	0.4 / 0.1	0 / 0	0.1 / 0	0 / 0
Disallowed region	0 /0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
PDE code	3QX0	2YB3	3RBR	3RCX

Tableau 23. XRay data collection and refinement statistics.

^a $R_{\text{merge}} = \sum (I - \langle I \rangle) / \sum \langle I \rangle$ ^b $N_{\text{obs}} / N_{\text{unique}}$ ^c $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - k ||F_{\text{calc}}|| / \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}|$

 ${}^{d}\boldsymbol{R}_{\text{free}}$, calculated the same as for \mathbf{R}_{work} but on the 5% data excluded from the refinement calculation. ^e the outer resolution shell. Values in parentheses indicate the highest resolution shell

7 <u>Modulation substrat-dépendante d'IDE</u>

The enzymatic activity of IDE was assayed using human insulin, IGF-II, somatostatin (Bachem) or glucagon (Glucagen[®]) as substrates in HEPES 50 mM with 100 mM NaCl, pH 7.4.

20 μ L of IDE at 30 μ g/mL were pre-incubated 10 minutes at 37 °C with 20 μ L of vehicle or modulator (400 μ M) in microtiter plates (black, low-binding). The reaction was started with the addition of 40 μ L of substrate at 4 μ M. Final concentrations of IDE, substrate, modulators were 7.51 μ g/mL, 1 μ M, 100 μ M respectively.

The reaction was quenched at 1, 2, 10, 20 and 30 minutes with 20 μ L of a solution of TFA/ACN 0.1%.

Quantification of residual substrate was performed by HPLC analysis (UV 215 nm) using a UltiMateTM nano LC system apparatus, equipped with a Famos® autosampler and a SwitchosTM precolumn switching device all from LC packings (Dionex.Corp).

10 μ L of sample were loaded on a precolumn 5 x 0.3 mm equipped with a guard cartridge Q95961 10 x 1.0 mm from Interchim at a flowrate of 50 μ L/min for preconcentration. Separation was performed using an Uptisphere UP5WTF-A10 C18wtf 5- μ m particle size column, dimensions 0.3 x 100 mm from Interchim at 50 °C. A gradient starting from 75% H₂O / 0.1%TFA and reaching 75% ACN / 0.09% TFA within 10 minutes at a flow rate of 0.3 μ L/min was used and quantification was done at 215/254 nm.

8 <u>SAXS</u>

The purified IDE (9 μ M) was mixed with 100 μ M of compound **1** before the data collection. SAXS data were collected at the 18-ID (BioCAT) beamline using the Mar 165 CCD detector at 20°C using 1.033 Å as the incident X-ray wavelength. All data processing was carried out using Igor Pro (WaveMetrics Inc.) with macros written by the BioCAT staff.

9 Evaluation de l'effet du composé 1 sur la néprilysine (NEP)

Recombinant human NEP was purchased from R&D systems (Lille, France). Fluorogenic NEP substrate, *N*-Dansyl-D-Ala-Gly-*p*-*nitro*-Phe-Gly, and the others chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

The inhibition of enzymatic activity of *h*NEP was assayed using a fluorogenic substrate, *N*-Dansyl-D-Ala-Gly*p*-*nitro*-Phe-Gly. The assay was conducted in 96-well microplates (total volume of 75 μ L) with 200 ng/ mL of *h*NEP and 200 μ M substrate in buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.4). Each compound was tested with 1% final DMSO.

Compounds were pre-incubated at ambient temperature with NEP for 10 minutes before starting the enzymatic reaction with the addition of the substrate. The reaction kinetics performed at room temperature was followed on a Victor 3^{TM} V1420 Perkin Elmer fluorescence spectrophotometer (λ exc = 340 nm and λ em = 535 nm). The control activity was determined by incubating the enzyme in the same conditions without inhibitor. DL-thiorphan was used as the reference inhibitor (IC₅₀ = 1 (±0.3) nM). The statistical Z' factor for the assay was 0.68. Data were normalized to the controls that represent Vmax. For the determination of IC₅₀ values, initial velocities were plotted as a function of inhibitor concentration using XLfitTM software.

10 Propriétés ADME

These experiments use a LCMS-MS triple-quadrupole system (Varian 1200ws) with MRM or SIM detection using the following Mass parameters :

- Mode of ionization: Electro spray;
- Declustering potential: 50 V;
- Collision-activated dissociation: 1.5 mTorr;
- Collision Energy: to be determinate with transitions.

a Solubilité PBS

10 μ L of a 10 mM solution in DMSO of the compound are diluted in 490 μ L of PBS at pH = 7.4 (tube matrix) or organic solvent (ACN, MeOH).

The tubes are gently shacked 24 hours at room temperature. After 24 hours, the solutions are centrifuged for 5 minutes at 5000 rpm and filtered over 0.45 μ m filters (Millex-LH Millipore). 20 μ L of each solution are diluted in 180 μ L of MeOH and analyzed by LCMS-MS. The solubility is determined by the ratio of mass signal area PBS/organic solvent. The experiment were made in triplicate.

b <u>LogD</u>

40 μ L of a 10 mM solution in DMSO of the compound were diluted in 1.960 mL of a 1/1 octanol/PBS at pH = 7.4 solution. The mixture was gently shacked 2 hours at room temperature.

 $20~\mu$ L of each solution was diluted in 180 μ L of MeOH and analysed by LCMS-MS. Log D was determined as the logarithm of the ratio of concentrations of product in octanol and PBS, determined by mass signals.

The experiment were made in triplicate.

c <u>Stabilité plasmatique</u>

Incubations were performed in duplicate in Eppendorf tubes. The mouse or human plasma (Mouse Plasma Lithium Heparine from Sera Laboratories International Ltd/ human plasma) or the William's E medium supplemented with 10% fetal calf serum was pre-incubated 5 minutes at 37°C before the addition of test compounds to a final concentration of 10 µM (1% DMSO maximum). At the defined time points, 50 µL from each tube were removed to another tube containing 450 μ L of cold ACN + internal standard (1 μ M). After centrifugation (10 minutes at 10000 rpm), supernatants are analyzed. Analysis and quantification used a LC-MS/MS triple-quadrupole system (Varian 1200L) under MRM detection using the parameters optimized for each compounds. HPLC analysis was performed using a Luna C_{18} (50 x 2.1 mm, 5 μ m); the gradient and the mobile phase (flow rate 600 μ L/min⁻¹) used are determined in order to detect the compound of interest with satisfying retention time and peak shape. Acquisition and analysis of data were performed with MS WorkstationTM software (version 6.3.0 or higher). The degradation half-life $(t_{1/2})$ values were calculated using the following equation: $t_{1/2} = 0.693/k$ where k is the first-order degradation rate constant. The degradation rate constant (k) was estimated by one-phase exponential decay non-linear regression analysis of the degradation time course data using XlfitTM software (version 2.1.2 or higher) from IDBS.Ltd.

11 Modèle Alzheimer

a <u>Culture cellulaire lignées SH-SY5Y</u>

Human neuroblastoma cell lines SH-SYSY expressing either human APP751 with the Swedish mutation (APPSw) or human APP696 (SY5Y-APPwt) were generated as previously described.¹⁵¹ Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO BRL, France) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM non-essential amino-acids, 50 units/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen, France) in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C.

b Incubation avec le composé et préparation des échantillons pour ELISA et Western Blot

Cells were seeded in 6-well plates (1.94 105 cells/well). 24 hours later, cells were replenished with 2 ml of medium containing either vehicle or drug at 1 mM or 10 mM (from a stock solution at 10 mM in DMSO). Following 24 hours and 48 hours of drug exposure, the cell medium was collected, discarded from cell debris by centrifugation (*1000 X g*, 10 min) and was kept at -80°C for ELISA dosages of $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-40}$. For preparation of total cellular proteins, adherent cells were washed with PBS and scraped with a rubber policeman in 50 ml of RIPA buffer (Thermo Scientific) containing protease inhibitors (Complete Mini, Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). The cell homogenate was sonicated and stirred 10 minutes at 4°C. Cell lysate was recovered in supernatant after centrifugation at *12,000 X g*, 10 minutes at 4°C. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce) and samples were kept at -80°C.

c <u>Western Blotting</u>

Proteins were mixed to LDS Sample Buffer containing a reducing agent (INVITROGEN NP-009) and boiled at 100°C for 10 minutes, as recommended by the manufacturer (Invitrogen). 12 µg of total proteins were loaded onto a 4-12% Bis-Tris-SDS-polyacrylamide gel (NovexNuPAGE® INVITROGEN), blotted onto nitrocellulose membrane (0.44 mm Hybond and Hybond-Phosphate from AMERSHAM/GE HEALTHCARE, France) according to the manufacturer's instructions (X-Cell Blot Module, Invitrogen). For APP-CTF analysis, 30 mg of total proteins were loaded on Tris-Tricine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Criterion precast gel, Bio-Rad Bioresearch division, Marnes la coquette, France). Proteins were transferred to nitrocellulose membrane (0.22 mM Hybond, Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions (Criterion Blotter, Bio-Rad Bioresearch division). Membranes were blocked and incubated with the appropriate antibody according to Tableau 24 and then incubated with a Horseradish peroxidease conjugated secondary antibody (Goat anti-rabbit A4914 from SIGMA-ALDRICH and Horse anti-mouse from Vector Laboratories). Finally, peroxidase activity was revealed with the ECL detection kit and visualized with HyperfilmTM ECLTM (AMERSHAM/GE HEALTHCARE).

			0	
Antibody	Species	Specificity	Dilution	References
APP C1-3	Mice	human and mice APP C-ter	1:2 000 ^a	Innogenetics, Ghent, Belgium
IDE (A-23)	Rabbit	human specific	1:2 000 ^b	Sc-130784, Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	Rabbit	human and mice	1:10 000 ^a	Sc-25778, Santa Cruz Biotechnology
3D1 1	1	1 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0.50/ 75 00	

 Tableau 24.
 Antibodies used in immunoblotting studies.

^aBlocking and antibody incubation: Tris-buffered saline, pH 8, 0.05% Tween 20 + 5% skim milk ^bBlocking and antibody incubation: Tris-buffered saline, pH 8, 0.05% Tween 20 + 1% BSA

¹⁵¹ Vingtdeux, et al., Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiology of Disease*, **2007**. 25(3): p. 686.

d <u>ELISA</u>

Quantitative determinations of β -Amyloid 1-42 and β -Amyloid 1-40 in cell medium at the end of drug treatments were performed using Human β -Amyloid 1-42 and Human β -Amyloid 1-40 Elisa kits (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Following initial experiments fordetermining optimal dilution factors, dosages were performed with 100 ml of cell medium for β -Amyloid 1-42 (undiluted sample) and 10 ml of cell medium for β -Amyloid 1-40 (dilution factor of 1:10).

12 Modèle diabète

a <u>Culture cellulaire lignée IHH (Immortalized Human Hepatocytes)</u>

IHH cells were maintained in standard culture conditions: William's E medium supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine, insulin, dexamethasone and Penicillin/Streptomycin (P/S) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% $CO_2/95\%$ air. Medium was changed every 3 days.

b <u>Stimulation de l'expression du gene PECK par l'insuline dans les cellules IHH</u>

IHH cells were seeded in 6 well plate (gelatin coated plate) at a density of 0.8 x 106 cells/dish in William's Emedium supplemented with 10% FCS insulin, dexamethazone and P/S, and incubated at 37°C overnight prior to insulin starvation in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) supplemented with 0.2% FCS, glucose 11 mM, P/S without insulin and dexamethazone for 10 hours. Cells were pretreated in this medium with compounds (10 μ M) overnight. Cells were then incubated 24 hours in DMEM containing 0.2% FCS, 11 mM Glucose and insulin (1 nM) and compounds (10 μ M) or vehicle (DMSO). At the end of the experiment, cells were washed once with ice-cold PBS before mRNA extraction. mRNA levels of PEPCK were measured by quantitative RT-PCR 24 hours after stimulation.

c <u>Culture cellulaire lignées Min6 (cellule β-pancreatique de souris)</u>

Min6 cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in DMEM glutamax medium (containing 25 mmol/L glucose) supplemented with 10% FCS, β -mercapto-Ethanol 50 μ M, and gentamycin 1%.

d <u>Sécretion d'insuline par les cellules β-pancreatiques stimulée par le glucose</u>

Min6 were seeded in 24 well plate (300 000 cells/well) and cultured for 7 days. The cells are pre-treated for 24 hours before or 1 hour during the Glucose Stimulated Insulin Secretion (GSIS). Each compound is dissolved in DMSO. Before the GSIS experiment the cells were washed and preincubated for 1 hour at 37°C in glucose-free Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer (KRBH) of the following composition : 115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 20 mM NaHCO₃, 16 mM HEPES, BSA free fatty acid 0.5%. Next the cells are stimulated in KRBH (Krebs Ringer bicarbonate HEPES) buffer containing 2.8 mM of glucose or 20 mM of glucose for 1 hour. Incubation was stopped by putting the plate on the ice, the supernatant was collected for insulin secretion. Insulin secretion was measured by ELISA (Mercodia). Compounds activity on insulin secretion in Min6 stimulated by glucose was measured in 2 conditions of treatment: during the GSIS (1 hour of stimulation) or 24 hours of treatment before GSIS.

II. <u>Relations structure-activité</u>

1 Synthèses, analyses et purifications

All commercial reagents and solvents were used without further purification.

NMR spectra were recorded on a Bruker DRX-300 spectrometer. Chemical shifts are in parts per million (ppm). The assignments were made using one dimensional (1D) 1 H and 13 C spectra.

HPLC and mass spectra analysis were performed on a LC-MS :

- <u>Varian</u> 1200L system equipped with a Prostar 430 autosampler, a triple quadrupole mass spectrometry equipped with an electrospray ionisation source, with a Prostar 325 detector, using a C18 TSK-GEL Super ODS (Tosoh Bioscience), 5 µm particle size column, dimensions 50 x 4.6 mm. The injection volume was 20 µL. The pressures of drying and nebulising gas are respectively 18 and 40 psi.
- <u>Waters</u> Alliance system equipped with Waters 2695 pumps, Waters 2996 diode array, Waters 2747 injector, using a C18 TSK-GEL Super ODS (Tosoh Bioscience), 2 μm particle size column, dimensions 50 x 4.6 mm or a XBridge C18 (Waters), 5 μm particle size column, dimensions 50 x 4.6 mm. The injection volume was 20 μL. The pressures of drying and nebulising gas are respectively 50 and 600 L/h.

Two gradients were used :

- 10 min : starting from 100% $H_2O / 0.1\%$ HCOOH and reaching 95% ACN or MeOH / 0.1% HCOOH within 7 minutes at a flow rate of 1 mL.min⁻¹;
- 5 min : starting from 100% H_2O / 0.1% HCOOH and reaching 95% ACN or MeOH / 0.1% HCOOH within 3 minutes at a flow rate of 2 mL.min⁻¹.

Method a : Varian, eluent : H₂O/ACN, 0.1%HCOOH, gradient 10 min, column SODS Method b : Waters, eluent : H₂O/ACN, 0.1%HCOOH, gradient 10 min, column SODS Method c : Waters, eluent : H₂O/MeOH, 0.1%HCOOH, gradient 5 min, column XBridge Method d : Waters, eluent : H₂O/ACN, 0.1%HCOOH, gradient 5 min, column XBridge Method e : Waters, eluent : H₂O/ACN, buffer HCOOH/NH₃ pH 3.8, gradient 5 min, column XBridge Method f : Waters, eluent : H₂O/MeOH, buffer HCOOH/NH₃ pH 3.8, gradient 10 min,

<u>Method f</u> : Waters, eluent : $H_2O/MeOH$, buffer HCOOH/NH₃ pH 3.8, gradient 10 min, column SODS

Method g : Waters, eluent : H₂O/MeOH, 0.1%HCOOH, gradient 10 min, column SODS

Purity (%) was determined using UV detection (215 nM).

Purification by preparative HPLC were performed using :

- Varian PRoStar system using an OmniSphere 10 Column C_{18} 250 * 41.4 mm Dynamax from Varian, Inc. The collect was made by UV detection.
- Waters Alliance system equipped with Waters 2545 pumps, Waters 2487 diode array, Waters 2747 injector, using a XBridge C18 OBD (Waters), 50 μm particle size column, dimensions 50 x 250 mm or 30 x 150 mm. The collect was made by UV and Mass detection.

Melting points were determined on a Büchi B-540 apparatus and are uncorrected.

2 Procédures générales

General procedure A



The diacid (5 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride 2% in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature or 70°C if product was not soluble at room temperature and then evaporated. To a stirred solution of amine (5 mmol) in DMF (20 mL) were added DIEA (2.6 mL) and the anhydride acid (5 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound.

General procedure B



To a stirred solution of TIS and DCM (1 mL / 2 mL) was added the protected compound. Then 500 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 2 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with petroleum ether and diethyl ether to give the product.

<u>8</u>



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride/acetic anhydride 2% was added *N*-Benzyliminodiacetic acid (1.34 g, 6 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 4 hours. The solvent was evaporated and the compound was used immediately.

3 Modification de l'acide aminé au Nord

<u>1</u>

 $(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic\ acid\ methyl\ ester$



To a stirred solution of L-Histidine methyl ester dihydrochloride (324 mg, 1.34 mmol) in DMF (13.4 mL) were added DIEA (704 μ L) and **8** (250 mg, 1.22 mmol) in THF (2.24 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (86.5 mg, 17%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.99 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.23 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 3.59 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.71 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 4.65 (m, 1H), 7.09 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.30 (m, 5H(Ph)), 8.26 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 7.8 Hz, CON<u>H</u>);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.30 \text{ min (method a)};$
- \overline{MS} : (ESI+) m/z = 375(M+H)^+.



4

To a stirred solution of L-Tryptophane methyl ester dihydrochloride (498 mg, 1.97 mmol) in DMF (19.7 mL) were added DIEA (1.18 mL) and **8** (366.9 mg, 1.79 mmol) in DMF (3.58 mL). The mixture was stirred during an hour at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was dissolved in MeOH and HCl (0.1 N). The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (150.6 mg, 18%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 3.14-3.27 (m, 6H), 3.59 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.62 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.68 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 7.2 Hz and 15.0 Hz, 1H), 6.98 (td, J = 1.2 and 8.1 Hz, 1H), 7.08 (td, J = 1.2 Hz and 7.8 Hz, 1H), 7.08-7.10 (m, 2H), 7.16 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.20-7.22 (m, 3H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 7.8 Hz, CON<u>H</u>), 10.9 (s, 1H);
- ¹³<u>C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm</u> : 172.8, 172.6, 170.7, 138.4, 136.7, 128.8, 128.2, 127.1, 124.2, 121.7, 119.2, 118.2, 111.9, 109.3, 58.0, 57.2, 54.2, 52.4, 52.1, 27.4 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.42 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI +) $m/z = 424 (M+H)^+$.

131



5

To a stirred solution of L-Arginine methyl ester dihydrochloride (261 mg, 1 mmol) in DMF (8 mL) were added DIEA (695 μ L, 4 mmol) and 8 (1 mmol). The mixture was stirred during an hour at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was dissolved in MeOH and HCl (0.1N). The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (390 mg, 99%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 1.44-1.51 (m, 2H), 1.70-1.79 (m, 2H), 3.07-3.14 (m, 2H), 3.26 (s, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.63 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.78 (s, 2H), 4.30 (ddd, J = 4.8 Hz, 8.4 Hz and 8.1 Hz, 1H), 7.26-7.35 (m, 5H(Ph)), 7.97 (m, NH), 8.39 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 24.9, 28.1, 41.5, 51.2, 51.9, 54.5, 56.4, 57.6, 127.2, 128.2, 128.8, 138.2, 157.0, 170.6, 172.2, 172.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.51 \text{ min (method a)}$;
- $MS : (ESI+) : m/z = 394 (M+H)^+$.



<u>6</u>

To a stirred solution of L-Phenylalanine methyl ester hydrochloride (360 mg, 1.66 mmol) in DMF (16 mL) were added DIEA (825 μ L) and **8** (340 mg, 1.66 mmol) in DMF (3 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (40%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{^{1}\text{MSO-d6}}$: 8.13 (d, J = 8.10 Hz, CON<u>H</u>), 7.31-7.16 (m, 10H), 5.58 (m, 1H), 3.69 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.61 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.22 (s, 2H), 3.16 (s, 2H), 3.08 (dd, J = 5.4 Hz and 13.8 Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 8.7 Hz and 13.8 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 4.39 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 385(M+H)^+$.

133



Fmoc-L-Cysteine trityle (1 g, 1.7 mmol) was activated with oxalyl chloride (175 μ L, 2.04 mmol) and one drop of anhydrous DMF in dichloromethane at 0°C. The mixture was stirred 50 minutes and the solvent was removed by evaporation. The product was solved in methanol and stirred during 4 hours. The solvent was evaporated to give the compound as a yellow oil (1.34 g, 100%).

- <u>Purity</u> : 89% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 9.47 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+): $m/z = 622 (M+Na)^+$.

```
<u>10</u>
```

L- Cysteine trityle methyl ester



To a stirred solution of pyridine/DMF (20%) was added 9 (1 g, 1.7 mmol). The mixture was stirred for 1.5 hours at room temperature. The solvent was evaporated and the crude product was solubilised in MeOH, the insoluble were eliminated and the filtrate was purified by preparative HPLC to give the product as a brown solid (55%).

- <u>Purity</u> : 61% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-}d6) \ \delta \text{ ppm}}{12.26-2.32}$ (dd, J = 11.4 Hz and 6.6 Hz, 1H), 2.37-2.43 (dd, J = 12 Hz and 6.3 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 6.3 Hz and 6.6 Hz, 1H), 3.57 (s, CO₂Me), 7.29-7.36 (m, 15H(Trt));
- <u>LC</u>: $t_r = 5.16 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 400 (M+Na)^+$.

<u>9</u>

<u>11</u>

 $(R) - 2 - [2 - (Benzyl-carboxymethyl-amino) - acetylamino] - 3 - trityl sulfanyl-propionic \ acid \ methyl \ ester$



To a stirred solution of **8** (205 mg, 1 mmol) in anhydrous DMF were added **10** (377 mg, 1 mmol) and DIEA (330 μ L, 2 mmol). The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (216 mg, 37%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.46 (dd, J = 12 Hz and 4.8 Hz, 1H), 2.61 (dd, J = 7.8 Hz and 12.3 Hz, 1H), 3.26 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.56 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.78 (s, 2H), 4.28 (ddd, J = 5.1 Hz, 7.8 Hz and 8.1 Hz, 1H), 7.26-7.35 (m, 15H(Trt) + 5H(Ph)), 8.26 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 33.3, 51.2, 52.7, 54.2, 56.9, 57.8, 66.6, 127.3, 127.7, 128.5, 129.3, 129.4, 138.5, 144.5, 170.6, 170.9, 172.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 6.93 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 389 (M+H)^+$.

<u>7</u>

 $(R) - 2 - [2 - (Benzyl-carboxymethyl-amino) - acetylamino] - 3 - mercapto-propionic \ acid \ methyl \ ester$



To a stirred solution of TIS and DCM (400 μ L / 3.5 mL) was added **11** (183 mg, 0.31 mmol). Then 400 μ L of TFA were added, the solution became yellow. TIS was added until the solution return colorless. The mixture was stirred at room temperature during 1.5 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with diethyl ether to give the product as an oil (109 mg, 32%).

- <u>Purity</u> : 91% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.82-2.87 (m, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.65 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.99 (s, 2H), 4,55 (m, 1H), 7.35-7.44 (m, 5H(Ph)), 8.57 (d, J = 7.5 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 26.0, 52.8, 54.2, 54.4, 55.9, 58.3, 128.7, 129.0, 130.5, 170.8, 171.0, 172.5 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.39 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+): $m/z = 341 (M+H)^+$.

<u>12</u>

<u>43</u>

 $(tert-Butoxy carbonyl-carboxy methyl-amino)-acetic \ acid$

To a stirred solution of iminodiacetic acid (2 g, 15 mmol) in a dioxane/H₂O (3/1, 40 mL) mixture were added, at 0°C, Boc₂O (3.93 g, 18 mmol) and 10 mL of 2 N NaOH solution. The mixture was stirred overnight at room temperature and dioxane was evaporated. The aqueous layer was acidified with a 20% citric acid solution and extracted by AcOEt. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to give the product as a white solid (2.36 g, 67%).

<u>44</u>

(S)-2-[2-(tert-Butoxycarbonyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To the diacid intermediate **4** (1 g, 4.29 mmol) in solution in dry THF (20mL) was added DCC (0.88g, 4.29 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (1.14 g, 4.67 mmol) and DIEA (2.1 mL) were added. After stirring at room temperature during 5 hours, the precipitate was filtrated and the filtrate was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (660 mg, 40%, 2 steps).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.95 (d, J = 7.4 Hz, 0.5H), 8.90 (d, J = 7.4 Hz, 0.5H), 7.74 (d, J = 0.9 Hz, 0.5H), 7.72 (d, J = 0.9 Hz, 0.5H), 6.88 (s, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.85 (m, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.58 (s, CO₂<u>Me</u>), 2.95 (dd, J = 5.7 Hz and 14.9 Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 8.1 Hz and 14.9 Hz, 1H), 1.33 (s, 4.5H (Boc)), 1.28 (s, 4.5H (Boc));
- <u>LC</u>: $t_r = 2.65 min (method a);$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 385 (M+H)^+$.

<u>12</u>

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.2HCl



44 (300 mg, 0.78 mmol) was deprotected in presence of HClg in DCM during 2 hours at room temperature. DCM was evaporated and the product was precipitated in Et_2O to give the compound as a white solid (214 mg, 77%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) } \delta \text{ ppm}}{(\text{s}, 1\text{H}), 4.66 \text{ (m}, 1\text{H}), 3.85 \text{ (s}, 2\text{H}), 3.82 \text{ (s}, 2\text{H}), 3.65 \text{ (s}, CO_2Me), 3.20 \text{ (dd}, J = 5.2 \text{ Hz and } 15.2 \text{ Hz}, 1\text{H}), 3.10 \text{ (dd}, J = 9.0 \text{ Hz and } 15.4 \text{ Hz}, 1\text{H});$
- <u>LC</u>: $t_r = 0.68 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u> : (ESI+) m/z=285 (M+H)+.

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-methyl-amino)-acetylamino]-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (448 mg, 1 mmol) in DMF (10 mL) were added DIEA (660 μ L) and *N*-Methyliminodiacetic anhydride acid (1 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (33%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.43 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.42-7.37 (m, 9 H), 7.16-7.11 (m, 6H), 6.76 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.73 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 3.48 (s, 2H), 3.09 (dd, J = 5.4 Hz and 15.0 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 7.8 Hz and 14.7 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.21 \text{ min (method a)}$;
- \underline{MS} : (ESI+) m/z = 541 (M+H)⁺.

<u>13</u>

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-methyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester. 2TFA



To a stirred solution of TFA/dichlorometane (50/50) was added **36** (180 mg, 0.33 mmol). The mixture is stirred at room temperature 3 hours and the solvent was evaporated to give the compound as a colorless oil (170 mg, 100%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u> : 9.16 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.99 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.19 (dd, J = 5.4 Hz and 15.3 Hz, 1H), 3.06 (dd, J = 8.7 Hz and 15.3 Hz, 1H), 2.80 (s, 3H) ;
- \underline{LC} : $t_r = 0.70 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 299 (M+H)^+$.

<u>14</u>

<u>25</u>

(Carboxymethyl-hexyl-amino)-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (266 mg, 2 mmol) and DIEA (1 mL, 6 mmol) in methanol (10 mL) was added 1-bromohexane (280 μ L, 2 mmol). The mixture was refluxed at room temperature for 19 hours. The solvent was evaporated and the crude product used directly without further purification.

- <u>LC</u>: $t_r = 2.9 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 218 (M+H)^+$.

<u>37</u>

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-hexyl-amino)-acetylamino]-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



25 (1mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture stirred for 5 hours at room temperature and evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (447 mg, 1 mmol) in DMF (4 mL) were added DIEA (520 μ L) and the anhydride (1 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. Two third of the crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as an oil (210 mg, 52%).

- <u>Purity</u> : 83% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.93 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 611 (M+H)^+$.

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-hexyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.2TFA



To a stirred solution of TIS and DCM (1 mL / 2 mL) was added **37** (210 mg, 0.34 mmol). Then 500 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 6 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with petroleum ether and diethyl ether to give the product as an oil (201 mg, 100%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.99 (s, 1H), 8.80 (m, CON<u>H</u>), 7.41 (s, 1H), 4.70 (m, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.65 (s, 5H(Ph)), 3.19 (dd, J = 5.7 Hz and 15.3 Hz, 1H), 3.07(dd, J = 9.3 Hz and 15.3 Hz, 1H), 2.85 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 1.22 (m, 6H), 0.85 (t, J = 6.3 Hz, 3H);
- ¹³<u>C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm</u> : 171.1, 170.6, 168.5, 134.5, 129.0, 117.1, 56.1, 54.9, 54.7, 52.4, 51.1, 30.9, 26.5, 26.1, 25.9, 21.9, 13.9;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.03 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 369 (M+H)^+$.

<u>15</u>

<u>26</u>

Phenetyliminodiacetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (500 mg, 2.7 mmol) in MeOH (30 mL) was added KOH (454 mg, 8.1 mmol) and (2-bromoethyl)benzene (549 mg, 2.97 mmol). The mixture was refluxed overnight, cooled at room temperature and filtrated. The filtrate was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (230 mg, 36%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-*d6*) δ ppm</u> : 7.28 (m, 5H(Ph)), 3.46 (s, 4H), 2.86 (m, 2H), 2.70 (m, 2H) ;
- <u>LC</u>: $t_r = 1.22 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 236 (M+H)^+$.

<u>15</u>

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-phenethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.HCOOH



The diacid intermediate **26** (210 mg, 0.88 mmol) was stirred in a 2% TFAA in acetic anhydride solution at 40°C during 4 hours and solvent were evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (245 mg, 1.01 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) were added dry DIEA (510 μ L) and the anhydride (0.88 mmol) in anhydrous DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (200 mg, 52%).

- <u>Purity</u> : 96% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.22 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H, <u>H</u>COOH), 7.56 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.28-7.22 (m, 2H), 7.18-7.13 (m, 3H), 6.82 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.38 (s, 2H), 3.25 (s, 2H), 2.92 (m, 2H), 2.76 (m, 2H), 2.66 (m, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.63 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 389(M+H)^+$.

<u>16</u>

<u>27</u>

[Carboxymethyl-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (277 mg, 2.08 mmol) and TEA (870 μ L, 6.24 mmol) in methanol (10 mL) was added 1-bromo-3-phenylpropane (348 μ L, 2.28 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 10 hours and then was refluxed for 24 hours. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white powder (103 mg, 27%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 1.67 (dt, J = 7.5 Hz, 2H), 2.56 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.41 (s, 4H), 7.13-7.26 (m, 5H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.76 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 252 (M+H)^+$.

<u>38</u>

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetylamino}-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using the General procedure A starting from **27** (99 mg, 0.39 mmol), L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (174 mg, 0.39 mmol) and DIEA (200 μ L, 1.17 mmol) in DMF (3 mL). The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (142 mg, 57%).

- <u>Purity</u> : 92% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 1.62 (dt, J = 7.4 Hz, 2H), 2.5 (m, 2H), 2.59 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.88 (m, 2H), 3.19 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 3.51 (s, CO₂<u>Me</u>), 4.58 (ddd, J = 6 Hz and 8.1 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.99-7.38 (m, 15H(Trt) + 1H + 5H(Ph)), 8.49 (d, J = 8.2 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 29.3, 29.8, 32.7, 51.8, 51.8, 53.8, 55.1, 57.8, 119.0, 125.6, 127.5, 127.8, 128.0, 128.2, 129.2, 136.3, 137.6, 142.1, 170.6, 171.7,172.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.21 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 645 (M+H)^+$.

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using the General procedure B starting from **38** (127 mg, 0.19 mmol). The compound was obtained as a white solid (69 mg, 55%).

- <u>Purity</u> :99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 1.79 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 2.90 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 3.62 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.70 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 4.70 (m, 1H), 7.17-7.30 (m, 5H(Ph)), 7.41 (s, 1H), 8.86 (d, J = 7.2 Hz, CON<u>H</u>), 8.98 (s, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 26.1, 26.8, 32.2, 51.2, 52.4, 54.7, 54.8, 55.7, 117.2, 126.0, 128.3, 128.4, 128.9, 133.7, 141.1, 167.5, 169.7, 170.6;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.06 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 403 (M+H)^+$.

<u>17</u>

<u>28</u>

[Carboxymethyl-(4-phenyl-butyl)-amino]-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (266 mg, 2 mmol) and DIEA (1 mL, 6 mmol) in methanol (10 mL) was added 1-bromo-4-phenylbutane (0.351 μ L, 2 mmol). The mixture was refluxed for 20 hours. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white powder (405 mg, 76%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{2.55 (t, J = 7.1 \text{ Hz}, 2\text{H}), 1.54 (m, 2\text{H}), 1.39 (m, 2\text{H}), 3.39 (s, 4\text{H}), 2.65 (t, J = 7.1 \text{ Hz}, 2\text{H}), 1.54 (m, 2\text{H}), 1.39 (m, 2\text{H});}$
- <u>LC</u>: $t_r = 3.59 min (method a);$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 266 (M+H)^+$.

<u>17</u>

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(4-phenyl-butyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



28 (198 mg, 0.75 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was stirred for 5 hours at room temperature then evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (181 mg, 0.75 mmol) in DMF (5 mL) were added DIEA (391 μ L, 2.25 mmol)) and the anhydride (0.75 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. Half the crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (114 mg, 73%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.28 (d, J = 8.6 Hz, CON<u>H</u>), 8.04 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.28-7.12 (m, 5H(Ph)), 7.01 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 3.59 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.30 (s, 2H), 3.19 (s, 2H), 3.02 (dd, J = 6.1 Hz and 15.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 7.3 Hz and 15.2 Hz, 1H), 2.56 (m, 4H), 1.52 (m, 2H), 1.40 (m, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.5, 171.4, 170.6, 142.2, 134.7, 131.9, 128.3, 128.2, 125.6, 116.3, 57.6, 55.0, 54.0, 52.0, 51.5, 35.0, 28.5, 28.0, 26.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.41 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 417 (M+H)^+$.
<u>29</u>

Para fluoro benzyliminodiactic acid

To a stirred solution of iminodiacetic acid (266 mg, 2 mmol) in MeOH (10 mL) was added NEt₃ (820 μ L, 6 mmol) and 4-fluorobenzyl bromide (250 μ L, 2 mmol). The mixture was stirred at room temperature and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (484 mg, 55%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 1.93 \min (\text{method a});$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 242 (M+H)^+$.
 - <u>18</u>

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(4-fluoro-benzyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The diacid intermediate **29** (480 mg, 1.08 mmol) was stirred in a 2% TFAA in acetic anhydride solution at room temperature during 5 hours and solvent were evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (275 mg, 1.13 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) were added dry DIEA (623 μ L, 3.78 mmol) and the anhydride (1.08 mmol) in anhydrous DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (20%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.38 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.58 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 7.35-7.30 (m, 2H), 7.15-7.09 (m, 2H), 6.84 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 4.57 (m, 1H), 3.75 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.23 (s, 2H), 3.22 (s, 2H), 2.98 (dd, J = 6.9 Hz and 15 Hz, 1H), 2.92 (dd, J = 5.4 Hz and 14.7 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.54 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 393(M+H)^+$.

<u>19</u>

<u>30</u>

[Carboxymethyl-(4-methyl-benzyl)-amino]-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (264 mg, 1.98 mmol) and TEA (836 μ L, 6 mmol) in methanol (5 mL) was added 4-methylbenzyl bromide (425 mg, 2.29 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2.5 hours. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (145 mg, 31%).

- <u>Purity</u> : 84% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.27 (s, 3H), 3.34 (s, 4H), 3.75 (s, 2H), 7.10 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 7.8 Hz, 2H);
- \underline{LC} : $t_r = 2.38 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 238 (M+H)^+$.

<u>39</u>

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(4-methyl-benzyl)-amino]-acetylamino}-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using the General procedure A starting from **30** (134 mg, 0.56 mmol), L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (250 mg, 0.56 mmol) and DIEA (292 μ L, 1.68 mmol) in DMF (3 mL). The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (129 mg, 37%).

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.21 (s, 3H), 2.87 (dd, J = 5.0 Hz and 14.5 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 6.2 Hz and 14.5 Hz, 1H), 3.18 (s, 2H), 3.25 (s, 2H), 3.51 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.71 (s, 2H), 4.58-4.64 (m, 1H), 6.64 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.01-7.04 (m, 6H), 7.21 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.35-7.39 (m, 9H), 8.57(d, J = 8.4 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 20.7, 29.6, 51.8, 51.8, 53.2, 57.0, 57.1, 74.5, 119.1, 128.2, 128.3, 128.7, 128.9, 129.2, 135.1, 136.2, 137.7, 142.1, 170.2, 171.6, 172.3;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.28 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 631 (M+H)^+$.

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(4-methyl-benzyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.2TFA



The compound was prepared using the General procedure B starting from 39.

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.29 (s, 3H), 3.08 (dd, J = 9.0 Hz and 15.3 Hz, 1H), 3.19 (dd, J = 5.4 Hz and 15.3 Hz, 1H), 3.41 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.65 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.83 (s, 2H), 4.70 (m, 1H), 7.15 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 8.98 (d, J = 1.2 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 171.0, 170.7, 169.7, 137.1, 133.7, 132.7, 129.5, 129.1, 129.0, 117.1, 57.3, 55.5, 53.6, 52.4, 50.9, 26.2, 20.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.86 \min (\text{method a});$
- <u>MS</u>: $(ESI+) m/z = 389 (M+H)^+$.

<u>20</u>

<u>32</u>

[Carboxymethyl-(4-trifluoromethyl-benzyl)-amino]-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (274 mg, 2.06 mmol) and TEA (836 μ L, 6 mmol) in methanol (10 mL) was added 4-(triflouromethyl)benzylbromide (477 mg, 2.06 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (257 mg, 43%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{= 7.8 \text{ Hz}, 2\text{H}}$; 3.42 (s, 4), 3.91 (s, 2H), 7.58 (d, J = 7.8 \text{ Hz}, 2\text{H}), 7.68 (d, J = 7.8 \text{ Hz}, 2\text{H});
- <u>LC</u>: $t_r = 3.17 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 292 (M+H)^+$.

<u>41</u>

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(4-trifluoromethyl-benzyl)-amino]-acetylamino}-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added *N*-4-(trifluoromethyl)Benzyliminodiacetic acid **32** (250 mg, 0.85 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (3 mL). L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (346 mg, 0.77 mmol) and DIEA (445 μ L, 2.55 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (438 mg, 75%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.87 (dd, J = 5.4 Hz and 14.6 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 6.5 Hz, and 14.6 Hz, 1H), 3.29 (s, 4H), 3.51 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.88 (s, 2H), 4.59 (m, 1H), 6.65 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.00-7.04 (m, 6H), 7.25 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.36 (m, 9H), 7.53 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.50 (d, J = 8.3 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.0, 171.6, 169.9, 143.3, 142.1, 137.9, 136.4, 129.9, 129.6, 128.6, 128.5, 126.4, 125.4, 119.2, 74.5, 56.9, 56.8, 53.3, 51.8, 29.5;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.87 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 685 (M+H)^+$.

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(4-trifluoromethyl-benzyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester. 2TFA



To a stirred solution of TIS and DCM (600 μ L / 5 mL) was added **41** (422 mg, 0.61 mmol). Then 400 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 3 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with diethyl ether to give the product as an oil (408 mg, 100%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{\text{Hz}, 2\text{H}}$: 8.97 (s, 1H), 8.42 (d, J = 8.3 Hz, CON<u>H</u>), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 4.80 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.63 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.35 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 3.18 (dd, J₁ = 5.3 Hz and 15.3 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 9.1Hz and 15.3 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.5, 171.3, 170.6, 143.4, 132.4, 130.0, 129.6, 126.4, 125.5, 117.5, 57.4, 56.6, 54.4, 52.8, 51.2, 26.6;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.68 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 443 (M+H)^+$.

<u>21</u>

<u>31</u>

[(4-tert-Butyl-benzyl)-carboxymethyl-amino]-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (272 mg, 2.04 mmol) and TEA (836 μ L, 6 mmol) in methanol (10 mL) was added 4-(*tert*-butyl)benzylbromide (375 mg, 2.04 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15min. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (218 mg, 43%).

- <u>Purity</u> : 85% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 1.28 (s, 9H), 3.37 (s, 4H), 3.76 (s, 2H), 7.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.88 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 280 (M+H)^+$.

<u>40</u>

(S)-2-{2-[(4-tert-Butyl-benzyl)-carboxymethyl-amino]-acetylamino}-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added *N*-4-(*tert*-butyl)Benzyliminodiacetic acid **31** (210 mg, 0.63 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (3 mL). L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (290 mg, 0.64 mmol) and DIEA (340 μ L, 2 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (339 mg, 79%).

- <u>Purity</u> : 94% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) } \delta \text{ ppm}}{8.47 \text{ (d, J} = 8.1 \text{ Hz, CONH})}$, 7.37 (m, 9H + 1H), 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.03 (m, 6H), 6.65 (s, 1H), 4.62 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.52 (s, CO₂Me), 3.22 (s, 2H), 3.16 (s, 2H), 2.92 (m, 2H), 1.19 (s, 9H(tBu));
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.1, 171.6, 170.1, 149.5, 142.1, 137.9, 136.3, 135.0, 129.2, 128.6, 128.2, 128.0, 124.9, 119.1, 74.5, 56.6, 56.5, 52.6, 34.1, 31.1, 29.9;
- <u>LC</u>: $t_r = 6.32 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 673 (M+H)^+$.

(S)-2-{2-[(4-tert-Butyl-benzyl)-carboxymethyl-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester. 2TFA



To a stirred solution of TIS and DCM (500 μ L / 3.5 mL) was added **40** (303 mg, 0.45 mmol). Then 400 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 4 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with diethyl ether to give the product as a colorless oil (249 mg, 84%).

- <u>Purity</u> : 94% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.96 (s, 1H), 8.40 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.36 (s, 1H), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.70 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.65 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.30 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 3.19 (dd, J = 5.6 Hz and 15.4 Hz, 1H), 3.09 (dd, J = 8.8 Hz and 15.4 Hz, 1H), 1.27 (s, 9H(tBu));
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.5, 171.3, 170.7, 150.2, 134.9, 134.2, 129.6, 129.3, 125.5, 117.6, 57.5, 56.7, 54.1, 52.8, 51.2, 34.7, 31.6, 26.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.13 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 431 (M+H)^+$.

<u>33</u>

{Carboxymethyl-[2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-amino}-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (266 mg, 2 mmol) and DIEA (1 mL, 6 mmol) in methanol (10 mL) was added 3-(2-bromoethyl)-1H-indole (456 mg, 2 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (322 mg, 58%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.77 (sl, N<u>H</u>), 7.49 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.04 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.16 Hz, 1H), 7.04 (td, J = 1.1 Hz, 7.1 Hz and 8.04 Hz, 1H), 6.94 (td, J = 1.1 Hz, 7.1 Hz and 7.7 Hz, 1H), 3.50 (s, 4H), 2.88 (m, 4H);
- \underline{LC} : $t_r = 3.28 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 277 (M+H)^+$.

<u>42</u>

(S)-2-(2-{Carboxymethyl-[2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-amino}-acetylamino)-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added **33** (320 mg, 1.16 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (5 mL). L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (447 mg, 1 mmol) and DIEA (695 μ L, 4 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature 3 days. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the expected compound (302 mg, 45%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 6.93 \text{ min (method f)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 670 (M+H)^+$.

(S)-2-(2-{Carboxymethyl-[2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-amino}-acetylamino)-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.2TFA



To a stirred solution of TIS and DCM (0.5 mL / 4 mL) was added **42** (302 mg, 0.45 mmol). Then 0.5 mL of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 3 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with petroleum ether and diethyl ether to give the product as a white powder (255 mg, 86%).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{^{7.8}\text{Hz}}$: 10.92 (sl, N<u>H</u>), 8.97 (s, 1H), 8.93 (m, CON<u>H</u>), 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.08 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.98 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.71 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.62 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.22-2.98 (m, 6H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 170.5, 169.4, 166.6, 136.3, 134.6, 128.8, 126.8, 123.3, 121.3, 118.5, 118.2, 117.3, 111.6, 109.5, 55.7, 54.4, 54.9, 52.5, 51.4, 26.1, 21;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.17 \text{ min (method f)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 428 (M+H)^+$.

<u>23</u>

<u>35</u>

(Carboxymethyl-pyridin-4-ylmethyl-amino)-acetic acid



To a stirred solution of iminodiacetic acid (266 mg, 2 mmol) and TEA (836 μ L, 6 mmol) in methanol (5mL) were added 4-(bromomethyl)pyridine hydrobromide (584 mg, 2.3 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (213 mg, 95%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.48 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.35 (s, 4H);
- \underline{LC} : $t_r = 0.87 \text{min} (\text{method a})$;
- <u>MS</u> : (ESI-) $m/z = 223 (M-H)^{-}$.

<u>45</u>

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-pyridin-4-ylmethyl-amino)-acetylamino]-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.HCOOH



To a stirred solution of **35** (275 mg, 1.23 mmol) in THF (10 mL) were added DCC (253 mg, 1.23 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 hours. Then L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (537 mg, 1.19 mmol) and DIEA (700 μ L, 3.84 mmol) were added and the solution was stirred overnight. The insoluble were filtrated. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as oil (309 mg, 41%).

- <u>Purity</u> : 95% ;
- $\frac{^{1}\text{H} \text{ NMR} (\text{DMSO-}d6) \ \delta \text{ ppm}}{0.6\text{CONH}}$: 8.65 (d, J = 4.8 Hz, 0.3CONH), 8.62 (d, J = 4.8 Hz, 0.6CONH), 8.48 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.36(d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.2 (s, HCOOH), 7.36-7.18 (m, 15H(Trt)+1H), 7.04-7.01 (m, 2H), 6.85 (s, 0.3H), 6.65 (s, 0.6H), 4.56 (m, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.55 (s, CO_2Me), 3.27 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.95 (m, 2H) ;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.59 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 618 (M+H)^+$.

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-pyridin-4-ylmethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.HCOOH



The compound was prepared using General procedure B starting from **45**. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (135 mg, 75%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) } \delta \text{ ppm}}{\text{Hz}}$: 8.5-8.47 (m, CON<u>H</u>+2H), 8.2 (s, <u>H</u>COOH), 7.59 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.55 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.58 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.27 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.96 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 172.5, 171.9, 170.3, 163.8, 149.6, 147.8, 135.6, 123.8, 116.8, 57.0, 56.6, 54.3, 52.1, 52.0, 28.8;
- <u>LC</u>: $t_r = 0.79 \min (\text{method c})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 376 (M+H)^+$.

<u>24</u>

<u>34</u>

N-(naphthalen-2-ylmethyl)iminodiacetic acid



To a solution of iminodiacetic acid hydrochloride (2 mmol) in MeOH (10 mL) were added NEt₃ (6 mmol) and the naphthalen-2-ylmethyl bromide (2 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white powder (57%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{8.4 \text{ Hz}, 1\text{H}}$; 7.89-7.85 (m, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.57 (dd, J = 1.5 Hz and 8.4 Hz, 1H), 7.51-7.45 (m, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.13 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 274 (M+H)^+$.

<u>24</u>

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-naphthalen-2-ylmethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using the General procedure A starting from **34** and L-H-Histidine methyl ester di hydrochloride (yield 45%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.99 (m, 2H), 3.29 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.59 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.90 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.95 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 6.91 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 7.49-7.56 (m, 3H), 7.71 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.82-7.90 (m, 3H), 8.14 (s, 1H), 8.44 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.46 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 425 (M+H)^+$.

5 Elimination de la charge positive apportée par l'amine tertiaire

<u>49</u>

 $(S)-2-[2-(Carboxymethyl-phenyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic\ acid\ methyl\ ester$

N-Phenyliminodiacetic acid (313 mg, 1.5 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (3 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature then evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (380 mg, 1.57 mmol) in DMF (9 mL) were added DIEA (1 mL) and the anhydride (1.5 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (182 mg, 33%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 9.05 (d, J = 7.6 Hz, CONH), 7.63 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 7.2 Hz and 8.6 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.68 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.13 (s, 2H), 4.02 (s, 2H), 3.57 (s, CO₂Me), 2.94 (dd, J = 5.3 Hz and 14.6 Hz, 1H), 2.83 (dd, J = 8.7 Hz and 14.6 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 173.5, 171.9, 171.6, 147.5, 135.1, 133.2, 129.4, 117.4, 116.7, 111.9, 56.0, 54.6, 52.3, 49.0, 29.0 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.94 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 361 (M+H)^+$.

<u>50</u> <u>57</u>

(Benzoyl-methoxycarbonylmethyl-amino)-acetic acid methyl ester



Iminodiacetic acid (2 g, 14.6 mmol) was stirred overnight in a SOCl₂/MeOH (20/80, 20 mL) solution and evaporated to give the diester (2.8 g, 97%). To a solution of the diester (300 mg, 1.52 mmol) in DCM (10 mL) were added the DIEA (792 μ L, 4.56 mmol) and benzoyl chloride (176 μ L, 1.52 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight, washed with NaHCO₃ 5% solution and HCl 0.5 N solution. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to give a colorless oil (420 mg, 99%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.15 \text{ min (method a)};$
- $MS : (ESI+) m/z = 266 (M+H)^+$.



(Benzoyl-carboxymethyl-amino)-acetic acid



To a solution of the diester **57** (400 mg, 1.5 mmol) in MeOH (5 mL) and H₂O (1 mL) was added NaOH (60 mg, 4.5 mmol). The mixture was stirred 72 hours at room temperature and then acidified with HCl 1N and extracted with AcOEt. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to give the diacid as a colorless oil (350 mg, 98%).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.53 \text{ min (method a)}$;
- MS : (ESI+) m/z = 238 (M+H)+.

<u>50</u>

(S)-2-[2-(Benzoyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The diacid **61** (0.74 mmol) was dissolved in 2% trifluoracetic anhydride in acetic anhydride (3 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature then evaporated. To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (188 mg, 0.77 mmol) in DMF (8 mL) were added DIEA (515 μ L) and the anhydride (0.74 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (75 mg, 26%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- $\frac{^{1}\text{H} \text{ NMR} (\text{DMSO-}d6) \ \delta \text{ ppm}}{\text{CO}_2\text{Me}}$; 2.85-3.02 (m, 2H), 3.59(s, 1.2 CO₂Me), 3.64 (s, 1.8 CO₂Me), 3.88 (s, 2H), 4.02 (s, 1.2H), 4.08 (s, 0.8H), 4.55 (m, 1H), 6.86 (s, 0.6H), 6.91 (s, 0.4H), 7.31-7.44 (m, 5H(Ph)), 7.69 (s, 0.6H), 7.74 (s, 0.4H), 8.78 (d, J = 7.5 Hz, 0.6 H), 8.89 (J = 7.2 Hz, 0.4 H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.48 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 389 (M+H)^+$.

<u>58</u>

(Methoxycarbonylmethyl-phenylacetyl-amino)-acetic acid methyl ester



Iminodiacetic acid was stirred overnight in a $80/20 \text{ MeOH/SOCl}_2$ mixture and evaporated. To the diester obtained (591 mg, 3 mmol) in solution in DCM (15 mL) were added DIEA (2.08 mL, 12 mmol), acide phenylacetique (490 mg, 3.6 mmol), EDCI.HCl (747 mg, 3.9 mmol), HOBt (597 mg, 3.9 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and washed with HCl 1 N solution, NaHCO₃ 10% solution and H₂O. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to give the desired diester as a colorless oil.

- <u>Purity</u> : 95% ;
- \underline{LC} : $t_r = 4.87 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 294 (M+H)^+$.

<u>62</u>

(Carboxymethyl-phenylacetyl-amino)-acetic acid



The diester **58** was saponified with NaOH (15 mmol) in MeOH (10 mL) and H_2O (1 mL). MeOH was evaporated, H_2O was added and the aqueous layer was extracted with DCM. The aqueous layer was acidified to pH 2 and extracted with AcOEt to give the diacid (530 mg, 70% over two steps).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u> : 7.27 (m, 5H(Ph)), 4.22 (s, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.65 (s, 2H) ;
- \underline{LC} : $t_r = 2.83 \min (\text{method a})$;
- MS: (ESI+) m/z = 252 (M+H)+.

(S)-2-[2-(Carboxymethyl-phenylacetyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using the General procedure A starting from **62** (250 mg, 1 mmol) and L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (242 mg, 1 mmol). The compound was obtained as a yellow solid (312 mg, 77%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.87 (d, J = 7.5 Hz, 0.7H, CON<u>H</u>), 8.84 (d, J = 7.5 Hz, 0.3CON<u>H</u>), 7.80 (s, 0.4H), 7.68 (s, 0.6H), 7.30-7.13 (m, 5H(Ph)), 6.92 (s, 0.3H), 6.89 (s, 0.7H), 4.56 (m, 0.7H), 4.46 (m, 0.3H), 4.13 (s, 0.6H), 4.10 (s, 1.4H), 3.95 (s, 2H), 3.63 (s, 0.6H), 3.61 (s, 2.1CO₂<u>Me</u>), 3.57 (s, 0.9CO₂<u>Me</u>), 3.56 (1.4H), 2.96 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 171.6, 171.3, 171.2, 168.7, 135.3, 134.9, 134.7, 132.9, 129.3, 128.1, 126.3, 116.5, 52.3, 52.0, 51.9, 51.2, 49.4, 38.8, 38.7, 28.4 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.81 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 403 (M+H)^+$.

[Methoxycarbonylmethyl-(3-phenyl-propionyl)-amino]-acetic acid methyl ester



Iminodiacetic acid was stirred overnight in a 80/20 MeOH/SOCl₂ mixture and evaporated. To the diester obtained (591 mg, 3 mmol) in solution in DCM (15 mL) were added DIEA (1.5 mL, 9 mmol) and the hydrocinnamoyl chloride (537 μ L, 3.6 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and washed with HCl 0.5 N solution and NaHCO₃ 10% solution. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was used directly in next rection.

- <u>LC</u>: $t_r = 4.37 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 280 (M+H)^+$.

<u>63</u>

[Carboxymethyl-(3-phenyl-propionyl)-amino]-acetic acid



The diester **59** (3 mmol) was saponified with NaOH (15 mmol) in MeOH (10 mL) and H_2O (1 mL). MeOH was evaporated, HCl 1 N was added to the residu and the aqueous layer was extracted with AcOEt to give the diacid (99%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.23 (m, 5H(Ph)), 4.18 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 2.79 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.56 (t, J = 8.1 Hz, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.41 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 266 (M+H)^+$.

59

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(3-phenyl-propionyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using the General procedure A starting from **63** (265 mg, 1 mmol) and L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (242 mg, 1 mmol). The compound was obtained as a white solid (152 mg, 36%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{7.28-7.13 \text{ (m, 5H(Ph))}, 6.89 \text{ (s, 0.4H)}, 6.84 \text{ (s, 0.6H)}, 4.48 \text{ (m, 1H)}, 4.06 \text{ (s, 2H)}, 3.93 \text{ (s, 2H)}, 3.58 \text{ (s, 1.2 CO}_2 \underline{\text{Me}}), 3.54 \text{ (s, 1.8 CO}_2 \underline{\text{Me}}), 2.95 \text{ (m, 2H)}, 2.82 \text{ (m, 2H)}, 2.50 \text{ (m, 2H)};$
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.7, 172.5, 171.6, 171.5, 168.9, 141.2, 134.9, 134.7, 128.3, 128.2, 125.8, 116.8, 116.5, 52.5, 52.4, 51.9, 51.8, 49.5, 33.5, 30.3, 28.5, 28.4 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.25 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 417 (M+H)^+$.

<u>60</u>

[Methoxycarbonylmethyl-(2-phenoxy-acetyl)-amino]-acetic acid methyl ester



Iminodiacetic acid was stirred overnight in a $80/20 \text{ MeOH/SOCl}_2$ mixture and evaporated. To the diester obtained (591 mg, 3 mmol) in solution in DCM (15 mL) were added DIEA (2.08 mL, 12 mmol), phenoxyacetic acid (490 mg, 3.6 mmol), EDCI.HCl (747 mg, 3.9 mmol), HOBt (597 mg, 3.9 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature and washed with HCl 1 N solution, NaHCO₃ 10% solution and H₂O. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to give the desired disester as a colorless oil.

<u>64</u>

[Carboxymethyl-(2-phenoxy-acetyl)-amino]-acetic acid



The diester **60** was saponified with NaOH (15 mmol) in MeOH (10 mL) and H_2O (1 mL). MeOH was evaporated, H_2O was added and the aqueous layer was extracted with DCM. The aqueous layer was acidified to pH 2 and extracted with AcOEt to give the diacid (220 mg, 27% over two steps).

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(2-phenoxy-acetyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The diacid **64** (220 mg, 0.82 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride 2% in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was stirred for 5 hours at room temperature then evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloridee (198 mg, 0.82 mmol) in DMF (2 mL) were added DIEA (427 μ L) and the anhydride (0.82 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (80 mg, 23%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 9.09 (d, J = 7.4 Hz, 0.45CON<u>H</u>), 8.93 (d, J = 7.4 Hz, 0.55CON<u>H</u>), 7.73 (d, J = 1.2 Hz, 0.45H), 7.60 (d, J = 1.2 Hz, 0.55 H), 7.24 (m, 2H), 6.94-6.84 (m, 4H), 4.78 (s, 0.9H), 4.76 (s, 1.1H), 4.54 (m, 0.55H), 4.45 (m, 0.45H), 4.13 (s, 1.1H), 4.08 (s, 0.9H), 3.94 (m, 2H), 3.58 (s, 1.65CO₂<u>Me</u>), 3.56 (s, 1.35CO₂<u>Me</u>), 2.93 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm
 : 171.6, 171.1, 170.8, 168.3, 158.0, 135.1, 132.9, 129.2, 120.7, 116.7, 114.5, 64.9, 52.4, 51.8, 50.4, 49.5, 28.6;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.87 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 419 (M+H)^+$.

<u>54</u>

<u>65</u>

Benzylcarbamate diacid



To a solution of iminodiacetic acid (266 mg, 2 mmol) in 2N NaOH solution (15 mL) at 0°C was added the benzylchloroformate (337 μ L, 2.4 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The mixture was washed with Et₂O, acidified with concentrated HCl and extracted with Et₂O. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and evaporated to give the compound as a colorless oil (340 mg, 64%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.49 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u> : (ESI-) $m/z = 266 (M-H)^{-}$.

<u>54</u>

(S)-2-[2-(Benzyloxycarbonyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)propionic acid methyl ester



The diacid **65** (1.2 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride 2% in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature then evaporated. To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (290 mg, 1.2 mmol) in DMF (10 mL) were added DIEA (834 μ L, 4.8 mmol) and the anhydride (1.2 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a white solid (160 mg, 32%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 2.88-2.97 (m, 2H), 3.54 (s, 1.5CO₂<u>Me</u>), 3.58 (s, 1.5CO₂<u>Me</u>), 3.92 (m, 4H), 4.50 (m, 1H), 5.01 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 6.88 (s, 0.5H), 6.91 (s, 0.5H), 7.25-7.34 (m, 5H(Ph)), 7.75 (s, 0.5H), 7.79 (s, 0.5H), 8.93 (d, J = 7.5 Hz, 0.5CON<u>H</u>), 9.00 (J = 7.2 Hz, 0.5CON<u>H</u>);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.15 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z=419 (M+H)^+$.

<u>56</u>

<u>66</u>

2-Benzyl-propane-1,3-diol

To a stirred solution of LAH (600 mg, 15 mmol) in THF (4 mL) at 0°C were added dropwise a solution of diethyl benzylmalonate (940 μ L, 4 mmol) in THF (4 mL). The mixture was then refluxed overnight. The excess of LAH was quenched with wet Na₂SO₄. The solid was eliminated and the filtrate evaporated to give the crude product (465 mg, 70%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- \underline{LC} : $t_r = 1.93 \min (\text{method c})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 167 (M+H)^+$.

<u>67</u>

2-Benzyl-propane-1,3-ditosylate



To a stirred solution of **66** (623 mg, 3.75 mmol) in DCM (15 mL) were added ptoluenesulfonyl chloride (2.86 g, 15 mmol) and triethylamine (1.56 μ L, 11.25 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight and washed with water. The organic layers were then washed with a saturated solution of Na₂CO₃. The organic layers were dry over MgSO₄ and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel chromatography to yield the compound (792 mg, 44%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u> :7.70 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.19- 7.155 (m, 3H), 6.95-6.92 (m, 2H), 3.91 (dd, J = 10.2 Hz and 4.8 Hz, 2H), 3.80 (dd, J = 10.2 Hz and 6 Hz, 2H), 2.52 (m, 2H), 2.43 (s, 6H), 2.25 (m, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.45 \min (\text{method } d)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 475 (M+H)^+$.

<u>68</u>

3-Benzyl-pentanedinitrile



To a stirred solution of **67** (792 mg, 1.6 mmol) in DMSO (6 ml) were added KCN (458 mg, 7 mmol). The mixture was heated at 80°C 3.5 hours. The mixture was diluted with a solution of NaCl and extracted with DCM. The organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent evaporated to give the crude product used directly in the next reaction.

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.58 \text{ min (method d)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 186 (M+H)^+$.

<u>69</u>

3-Benzyl-pentanedioic acid



To a stirred solution of **68** (1.6 mmol) in water (4 ml) were added H_2SO_4 96% (4 ml). The mixture were refluxed 3 days. The mixture was extracted with DCM. The organic layers were extracted with a diluted solution of NH₄OH. The aqueous layers were lyophylisated to give the compound as a orange powder (141 mg, 40%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.18 \min (\text{method d})$;
- MS: (ESI+) m/z = 223 (M+H)⁺.

 $\label{eq:second} 3-Benzyl-4-[(S)-2-(1H-imidazol-4-yl)-1-methylcarbamoyl-ethylcarbamoyl]-butyric\ acid$



The compound was prepared using the General procedure A starting from **69** (134 mg, 0.6 mmol) and **113** (145 mg, 0.6 mmol). The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (102 mg, 45%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 8.54 (s, CON<u>H</u>), 7.61 (s, 1H) 7.26-7.14 (m, 5H(Ph)) 6.88 (s, 1H), 4.59 (m, 1H), 3.11-2.86 (m, 2H), 2.70 (s, CO₂<u>Me</u>), 2.60-2.49 (m, 2H+1H), 2.31-2.06 (m, 4H);
- ¹³<u>C NMR (MeOD) δ ppm</u> :175.2, 173.9, 141.4, 136.2, 130.4, 129.2, 127.0, 118.0, 54.7 41.3, 41.0, 36.8, 36.6, 30.1, 26.4 ;
- \underline{LC} : $t_r = 1.92 \text{ min (method d)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 373 (M+H)^+$.

6 Modification de l'ester à l'Est

<u>70</u>

<u>81</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid tert-butyl ester



N-Benzyliminodiacetic acid (223 mg, 1 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was heated for 40 minutes in order to solubilized then stirred for 5 hours at room temperature and evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidine-(1-trityl) *tert*-butylester (453 mg, 1 mmol) in DMF (4 mL) were added DIEA (3 mmol, 520 μ L) and the anhydride (1 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by precipitation in water to yield compound as white powder (608 mg, 92%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- \underline{LC} : $t_r = 5.55 \text{ min (method a)}$.

<u>70</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid tert-butyl ester.HCOOH



To a stirred solution of TIS and DCM (0.5 mL / 4 mL) was added **81** (598 mg, 0.9 mmol). Then 500 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 2 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed purified by preparative HPLC to give the product as colourless oil (173 mg, 41%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.38 (s, 1H), 8.32 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.28 (m, 5H(Ph)), 7.14 (s, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.29 (s, 2H), 3.22 (s, 2H), 3.02 (m, 2H), 1.33 (s, 9H(tBu));
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.3, 170.2, 169.9, 138.1, 134.7, 131.2, 128.9, 128.3, 127.3, 116.5, 81.1, 57.5, 56.5, 53.7, 51.8, 27.5, 27.4;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.41 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 417 (M+H)^+$.

<u>84</u>

L-H-Histidine methyl isobutyl ester.2HCl

To a stirred solution of L-H-Histidine (463 mg, 2.98 mmol) in isobutanol (5 mL) were added thionyl chloride at 0°C (2 mL). The resulting solution was heated at 60°C for 2 days and the solvent was evaporated. The crude product was used directly in next reaction.

<u>71</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(3H-imidazol-4-yl)-propionic acid isobutyl ester



The compound was prepared using the General procedure A starting from *N*-Phenyliminodiacetic acid (175 mg, 0.78 mmol) and **84** (198 mg, 0.7 mmol). The crude product was purified by two successive preparative HPLC to yield a white product (22 mg, 7.5%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.44 (d, J = 7.7 Hz, CON<u>H</u>), 7.60 (s, 1H), 7.29-7.22 (m, 5H(Ph)), 6.85 (s, 1H), 4.57 (m, 1H), 3.78 (m, 4H), 3.26 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 3.00 (d, J = 6.7 Hz and 14.7 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 5.4 Hz and 14.7 Hz, 1H), 1.78 (m, 1H), 0.79 (d, J = 7.16 Hz, 6H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.2, 171.3, 170.1, 138.1, 135.4, 134.0, 129.9, 128.3, 127.2, 115.6, 70.3, 57.5, 56.6, 53.4, 51.9, 28.9, 27.2, 18.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.52 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 417 (M+H)^+$.

<u>85</u>

L-Boc-Histidine isopropyl ester



To a stirred solution of L-Boc-Histidine (1.27 g, 5 mmol) in DCM (30 mL) were added iPrOH (5 mL, 65 mmol), DMAP (671 mg, 5.5 mmol), EDCI (1.05 g, 5.5 mmol) and DIEA (956 μ L, 5.5 mmol). The mixture was heated at 50°C 28 hours and washed with a saturated solution of NaHCO₃. The organic layers were dried with MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as colourless oil (832 mg, 56%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.58 (s, 1H), 7.14 (d, J = 7.5 Hz, CON<u>H</u>), 6.80 (s, 1H), 4.83 (sept, J = 6.2 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 2.83 (m, 2H), 1.35 (s, 9H(Boc)), 1.13 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.09 (d, J = 6 Hz, 3H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.6 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 298 (M+H)^+$.

<u>86</u>

L-H-Histidine isopropyl ester.2HCl

85 (830 mg, 2.8 mmol) was deprotected in presence of HClg in dichloromethane during 30 minutes at room temperature. Solvent was evaporated to give the expected product (586 mg, 77%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 9.08 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.93 (sept, J = 6.2 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 2.83 (m, 2H), 1.35 (s, 9H(Boc)), 1.13 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.09 (d, J = 6 Hz, 3H);
- \underline{LC} : $t_r = 0.65 \text{ min (method a)}$.

<u>72</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid isopropyl ester



N-Benzyliminodiacetic acid (156 mg, 0.7 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was heated for 15 minutes in order to solubilized then stirred for 5 hours at room temperature and evaporated.

To a stirred solution of **86** (190 mg, 0.7 mmol) in DMF (4 mL) were added DIEA (2.8 mmol, 490 μ L) and the anhydride (1 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as colourless oil (114 mg, 40%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.41 (d, J = 8.10 Hz, CON<u>H</u>), 7.65 (s, 1H), 7.33-7.27 (m, 5H(Ph)), 6.87 (s, 1H), 4.83 (sept, J = 6.30 Hz, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.80 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.27 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.98 (dd, J = 6.9 Hz and 14.7 Hz, 1H), 2.92 (dd, J = 5.4 Hz and 14.7 Hz, 1H), 1.08 (d, J = 6.0 Hz, 6H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.2, 170.6, 170.1, 138.1, 135.1, 133.5, 128.9, 128.3, 127.2, 68.0, 57.4, 56.7, 53.3, 51.9, 28.7, 21.4;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.23 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 403 (M+H)^+$.

$(Benzyl-\{[(S)-2-hydroxy-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-ethylcarbamoyl]-methyl\}-amino)-acetic acid$



N-Benzyliminodiacetic acid (223 mg, 1 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was heated for 40 minutes in order to solubilized then stirred for 5 hours at room temperature and evaporated.

To a stirred solution of L-H-Histidinol dihydrochloride (219 mg, 1 mmol) in DMF (4 mL) were added DIEA (4 mmol, 695 μ L) and the anhydride (1 mmol) in DMF (1 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as an oil (164 mg, 47%).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.81 (d, J =8.7 Hz, CON<u>H</u>), 7.71 (s, 1H), 7.27 (m, 5H(Ph)), 6.83 (s, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.37 (dd, J = 4.5 Hz and 10.6 Hz, 1H), 3.29 (dd, J = 6.0 Hz and 10.5 Hz, 1H), 3.24 (s, 2H), 3.16 (s, 2H), 2.77 (dd, J = 6.0 Hz and 15.0 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 7.5 Hz and 15.0 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 172.5, 169.7, 138.2, 134.6, 133.4, 128.9, 128.4, 127.3, 117.0, 62.4, 57.7, 57.1, 54.3, 50.2, 28.0;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.24 \text{ min (method a)}$.

(*Benzyl-{[(S)-1-carbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylcarbamoyl]-methyl}-amino)-acetic acid.2HCOOH*



To a stirred solution of **1** (150 mg, 0.5 mg) in dioxane/MeOH (5 mL / 2 mL) were added by portion gaseous NH₃. When the reaction is total, the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (190 mg, 79%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.75 (d, J = 8.4 Hz, CON<u>H</u>), 8.41 (s, 2<u>H</u>COOH), 7.52 (s, 1CON<u>H</u>₂), 7.49 (s, 1H), 7.28-7.24 (m, 5H(Ph)), 7.02 (s, 1CON<u>H</u>₂), 6.76 (s, 1H), 4.40 (m, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.10 (s, 2H), 2.99 (s, 2H), 2.95-2.88 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 173.7, 173.2, 170.6, 165.5, 138.6, 134.8, 132.9, 129.0, 128.2, 127.0, 117.5, 58.4, 57.8, 56.7, 52.4, 29.6;
- <u>LC</u>: $t_r = 1.47 \min (\text{method c})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 360 (M+H)^+$.



The compound was prepared using the General procedure A starting from N-Benzyliminodiacetic acid (1 mmol), L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (448 mg, 1 mmol) and DIEA (520 μ L, 3 mmol) in DMF (8 mL). The compound was obtained with 80% yield (495 mg).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-*d6*) δ ppm</u>: 2.91-2.94 (m, 2H), 3.24 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 3.52 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.77 (s, 2H), 4.58-4.65 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 7.01-7.04 (m, 6H(Trt)), 7.15-7.18 (m, 5H(Ph)), 7.33 (s, 1H), 7.35-7.38 (m, 9H(Trt)), 8.47(d, J = 8.1 Hz, CONH);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 29.5, 51.7, 51.9, 53.1, 56.9, 57.4, 74.7,119.2, 127.2, 127.6, 127.8, 128.1, 128.2, 128.9, 129.3, 136.1, 137.9, 138.1, 142.1, 170.1, 171.6, 172.1;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.08 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 617 (M+H)^+$.

<u>91</u>

 $(Benzyl-\{[(S)-1-methylcarbamoyl-2-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-ethylcarbamoyl]-methyl-amino)-acetic acid$



To a stirred solution of **82** (308 mg, 0.5 mmol) in methanol (1 mL) were added 622 μ L of a solution of methylamine in ethanol (33%). The mixture was refluxed for 17 hours. The solvent was evaporated and the crude product was precipitated in water and filtrated to give the compound (307 mg, 100%).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- \underline{LC} : $t_r = 4.5 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 616 (M+H)^+$.

82

 $(Benzyl-\{[(S)-2-(1H-imidazol-4-yl)-1-methylcarbamoyl-ethylcarbamoyl]-methyl\}-amino)-acetic acid.TFA$



To a stirred solution of TIS and DCM (500 μ L / 4mL) was added **91** (307 mg, 0.5 mmol). Then 500 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 3 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with petroleum ether and diethyl ether to give the product as colourless oil (210 mg, 70%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}$: 8.95 (s, 1H), 8.39 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 8.00 (q, J = 4.5 Hz, CON<u>H</u>Me), 7.33 (m, 5H(Ph)), 7.28 (s, 1H), 4.57 (m, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.14 (dd, J = 5.4 Hz and 15.3 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 8.1 Hz and 15.3 Hz, 1H), 2.60 (d, J = 4.5 Hz, CO₂Me);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 170.8, 169.8, 168.5, 133.9, 135.3, 129.3, 129.8, 128.5, 128.1, 116.8, 57.9, 55.9, 53.7, 51.3, 27.3, 25.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.55 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 374 (M+H)^+$.

<u>89</u>

L-Boc-Histidine dimethyl amide

To a stirred solution of L-Boc-Histidine (765 mg, 3 mmol) in DMF (20 mL) were added dimethylamine.HCl (293 mg, 3.6 mmol), HOBt (551 mg, 3.6 mmol), EDCI (690 mg, 3.6 mmol) and TEA (1 mL, 6.8 mmol). The mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated. The crude product was solubilised in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃. The organic layers were dried with MgSO₄ and evaporated. The crude product was used directly in next reaction.

<u>90</u>

L-H-Histidine dimethyl amide.2HCl



89 (198 mg, 0.7 mmol) was deprotected in presence of gaseous HCl in dichloromethane during 30 minutes at room temperature. The solvent was evaporated to give the expected product used directly in next reaction.

 $(Benzyl-\{[(S)-1-dimethylcarbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylcarbamoyl]-methyl\}-amino)-acetic \ acid. 2HCOOH$



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added N-Benzyliminodiacetic acid (178 mg, 0.8 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (5 mL). **90** (0.7 mmol) and DIEA (417 μ L, 2.4 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as colourless oil (78 mg, 23%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.17 (s, 2<u>H</u>COOH), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, CON<u>H</u>), 7.62 (s, 1H), 7.32-7.23 (m, 5H(Ph)), 6.78 (s, 1H), 4.96 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 3.18 (s, 2H), 2.93 (s, 3H(CON<u>Me₂</u>)), 2.90-2.70 (m, 3H(CON<u>Me₂</u>) + 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.3, 170.5, 169.5, 138.1, 134.7, 132.6, 128.9, 128.3, 127.2, 117.0, 57.6, 56.7, 54.0, 48.4, 36.4, 35.2, 29.5;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.6 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 388 (M+H)^+$.

<u>76</u>

 $(S) - 2 - [2 - (Benzyl-carboxymethyl-amino) - acetylamino] - 3 - (1H-imidazol-4-yl) - propionic acid anion. 2Na^+$



To a stirred solution of **1** (125 mg, 0.30 mmol) in MeOH (3 mL) were added NaOH (36 mg, 0.90 mmol) and 50 μ L of distilled water. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated. The product was obtained as a white solid (162.4 mg, 99%).

- <u>Purity</u> : 89% ;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.45 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 7.33-7.21(m, 5H(Ph)), 6.81 (s, 1H), 4.52 (dd, J = 4.5 Hz and 7.2 Hz, 1H), 3.78 (d, J= 13.2 Hz, 1H), 3.66 (d, J = 13.2 Hz, 1H). 3.25 (m, 2H), 3.19 (dd, J = 11.1 Hz and 15.6 Hz, 1H), 3.13 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.09 (dd, J = 7.8 Hz and 15.3 Hz, 1H) 3.05 (d, J = 16.5 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 1.86 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 361 (M+H)^+$.


<u>77</u>

To a stirred solution of histamine (111 mg, 1.3 mmol) in DMF (13 mL) were added DIEA (330 μ L) and **8** (205 mg, 1 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield the compound as a colorless oil (148 mg, 47%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.94 (t, J = 5.7 Hz, CON<u>H</u>), 7.67 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.33-7.22 (m, 5H(Ph)), 6.85 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.32 (m, 2H), 3.26 (s, 1H), 3.18 (s, 1H), 2.63 (t, J = 6.9 Hz, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 1.99 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 317(M+H)^+$.

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetylamino}-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid tert-butyl ester.4HCOOH



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added 2 (1 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (5 mL). L-H-Histidine-(1-trityl) *tert*-buylester (453 mg, 1 mmol) and DIEA (520 μ L, 3 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the expected compound (333 mg, 48%).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.72 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 8.40 (s, 4<u>H</u>COOH), 7.36-6.99 (m, 15H(Trt)+5H(Ph)+1H), 6.65 (s, 1H), 4.42 (m, 1H), 3.16 (s, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.60-2.54 (m, 4H), 1.60 (qt, J = 7.5 Hz, 2H⁷), 1.29 (s, 9H(tBu));
- <u>LC</u>: $t_r = 6.02 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 686 (M+H)^+$.

<u>83</u>

(S)-2-{2-[Carboxymethyl-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid tert-butyl ester.2HCOOH



To a stirred solution of TIS and DCM (1 mL / 8 mL) was added **83** (321 mg, 0.34 mmol). Then 1 mL of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 4 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to yield the product as colourless oil (124 mg, 68%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.54 (d, J = 8.6 Hz, CON<u>H</u>), 8.32 (s, 2<u>H</u>COOH), 7.48 (s, 1H), 7.27-7.14 (m, 5H(Ph)), 6.81 (s, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.24 (s, 2H), 3.16 (s, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.60-2.54 (m, 4H), 1.60 (qt, J = 7.5 Hz, 2H), 1.29 (s, 9H(tBu));
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 173.2, 170.7, 170.3, 164.6, 142.1, 134.9, 133.0, 128.3, 128.2, 125.6, 116.5, 80.5, 58.0, 56.1, 54.2, 52.5, 32.7, 29.3, 29.0, 27.6;
- <u>LC</u>: $t_r = 4,19 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u> : (ESI-) $m/z = 443 (M-H)^{-}$.

• <u>Preparation of N-Hydroxy-acetamidine</u>

To a stirred solution of hydroxylamine hydrochloride (3.82 mg, 55 mmol) in a solution of ethanol/water (80/20) were added 2.6 mL (50 mmol) of acetonitrile and 2.2 mg (55 mmol) of NaOH. The mixture was refluxed overnight. The solvent was evaporated and the residue was solubilised in 80 mL of ethanol, the suspension was filtrated and the filtrate was evaporated. The crude product was recristallised in iPrOH to give the compound as a white powder (1.75 g, 47%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-*d6*) δ ppm</u> : 8.66 (sl, O<u>H</u>), 5.34 (sl, N<u>H</u>₂), 1.61 (s, <u>Me</u>).

<u>87</u>

79

[(S)-2-(1H-Imidazol-4-yl)-1-(3-methyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-ethyl]-carbamic acid tert-butyl ester



To a stirred solution of L-Boc-Histidine (510 mg, 2 mmol) in DMF (10 mL) were added TBTU (702 mg, 2.2 mmol) and DIEA (1 mL, 6 mmol). The resulting yellow mixture was stirred for 5 minutes. *N*-Hydroxy-acetamidine (150 mg, 2 mmol) was added and the mixture was stirred for 4.5 hours since the intermediate product was formed. The solution was then refluxed 1.5 hours. The solvent was evaporated and the residue was solubilised in AcOEt washed with a saturated solution of NaHCO₃. The organic layers were dried with MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a brown oil (426 mg, 73%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}$: 8.19 (s, $\frac{\text{HCOOH}}{^{1}\text{HCOOH}}$), 7.67 (d, J = 7.8 Hz, CON<u>H</u>), 7.54 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.03 (m, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.35 (s, 9H(Boc));
- <u>LC</u>: $t_r = 3.56 \min (\text{method a});$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 294 (M+H)^+$.

<u>88</u>

(S)-2-(1H-Imidazol-4-yl)-1-(3-methyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-ethylamine.2HCl



87 (416 mg, 1.42 mmol) was deprotected in presence of gaseous HCl in dichloromethane during 30 minutes at room temperature. Solvent was evaporated to give the expected product used directly in next reaction.

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 0.66 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 194 (M+H)^+$.

[{[(S)-2-(1H-Imidazol-4-yl)-1-(3-methyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-ethylcarbamoyl]-methyl}-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetic acid.HCOOH



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added **27** (746 mg, 1.48 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the compound and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated. The residue was solubilised in anhydrous DMF (5 mL). **88** (340 mg, 1.28 mmol) and DIEA (1 mL, 5.92 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature 3 days. The solvent was evaporated and the crude product was purified by

preparative HPLC to give the expected compound (346 mg, 50%).

- Purity : 98% ;
- $\frac{1}{\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{12.72}$: 8.97 (t, J = 7.8 Hz, CON<u>H</u>), 8.27 (s, <u>H</u>COOH), 7.5 (s, 1H), 7.12-7.28 (m, 5H(Ph)), 6.79 (s, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.28 (s, 2H), 3.22 (s, 2H), 2.94 (m, 2H), 2.69-2.50 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 1.64 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 178.8, 173.1, 170.9, 166.1, 164.1, 142.0, 135.0, 132.9, 128.2, 125.6, 119.1, 58.9, 57.9, 46.3, 32.7, 32.6, 30.3, 39.1, 11.0;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.68 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 427 (M+H)^+$.

[{[(S)-2-Hydroxy-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-ethylcarbamoyl]-methyl}-(3-phenyl-propyl)amino]-acetic acid.2HCOOH



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added 2 (1 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (5 mL). L-H-Histidinol dihydrochloride (219 mg, 1 mmol) and DIEA (695 μ L, 4 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as colourless oil (143 mg, 30%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.31 (s, 2<u>H</u>COOH), 8.07 (d, J = 8.5 Hz, CON<u>H</u>), 7.50 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.28-7.15 (m, 5H(Ph)), 6.76 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.35 (dd, J = 4.8 Hz and 10.6 Hz, 1H), 3.28 (dd, J = 6.1 Hz and 10.6 Hz, 1H), 3.19 (s, 2H), 3.10 (s, 2H), 2.75 (dd, J = 5.7 Hz and 14.6 Hz, 1H), 2.63 (dd, J = 7.3 Hz and 14.6 Hz, 1H), 2.5 (m, 4H), 1.62 (qt, J = 8.1 Hz, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 173.2, 170.3, 164.5, 142.1, 134.6, 133.4, 128.3, 128.2, 125.6, 117.8, 62.4, 58.5, 56.6, 54.4, 50.4, 32.7, 29.1, 28.2 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.08 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 375 (M+H)^+$.



To a stirred solution of **38** (175 mg, 0.27 mmol) in methanol (3 mL) were added 337 μ L of a solution of methylamine in ethanol (33%). The mixture was refluxed for 19 hours and stirred 2 days at room temperature. The solvent was evaporated and the crude product was solubilised in water and precipitated by addition of formic acid. The solid was filtrated to give the compound (86 mg, 49%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.27 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 644 (M+H)^+$.

2

[{[(S)-2-(1H-Imidazol-4-yl)-1-methylcarbamoyl-ethylcarbamoyl]-methyl}-(3-phenyl-propyl)amino]-acetic acid.2TFA



To a stirred solution of TIS and DCM (1 mL / 8 mL) was added **92** (86 mg, 0.13 mmol). Then 1 mL of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 3 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with petroleum ether and diethyl ether to give the product as colourless oil (47 mg, 58%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 9.05 (d, J = 8.7 Hz, CON<u>H</u>), 9.01 (s, 1H), 8.22 (q, J = 4.8 Hz, CON<u>H</u>Me), 7.38 (s, 1H), 7.32-7.19 (m, 5H(Ph)), 4.58 (m, 1H), 4.13 (m, 2H+1H), 4.08 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 3.17-3.13 (m, 2H+1H), 2.96 (dd, J = 8.7 Hz and 14.8 Hz, 1H), 2.60-2.57 (m, CONH<u>Me</u>+2H), 1.92 (qt, J = 7.8 Hz, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 169.5, 167.7, 165.2, 140.5, 134.1, 129.2, 128.4, 128.3, 126.1, 116.8, 55.3, 54.9, 54.1, 52.1, 31.8, 27.0, 25.7, 25.3;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.25 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 402 (M+H)^+$.

92

7 Changement de la fonction acide au Sud



<u>105</u>

Ethyl tert-butyl squarate

A solution of potassium *tert*-butylate (17.6 mL, 17.6 mmol) 1 M in tetrahydrofuran was added to a solution of diethyl squarate (3 g, 17.6 mmol) in 50 mL of tetrahydrofuran at 4°C. After 15 minutes of stirring, the reaction was quenched and acidified with 1N HCl (1 eq., pH after hydrolysis: 2-3). The mixture was extracted with ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl, dried over magnesium sulphate, filtered and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/AcOEt (97/3)) to give the desired product (1.95 g, 55%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (CDCl_3) \delta ppm}}{^{1}\text{Hz}, 3\text{H}}$: 4.762 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.601 (s, 9H(tBu)), 1.480 (t, J = 7.2 Hz, 3H);
- <u>LC</u>: $t_r = 5.06 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: $(ESI+) m/z [M-tBu+2H]^+ = 143; [M-tBu-Et+2H]^+ = 115.$

<u>106</u>





To a solution of *N*-Benzylglycine hydrochloride (305 mg, 1.51 mmol) and NEt₃ (424 μ L, 302 mmol) in MeOH (10 mL), was added **105** (300 mg, 1.51 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight and MeOH was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a colorless oil (330 mg, 70%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.28 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u> : (ESI-) $m/z = 316 (M-H)^{-1}$.

(S)-2-{2-[Benzyl-(2-tert-butoxy-3,4-dioxo-cyclobut-1-enyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a solution of the intermediate **106** (160 mg, 0.5 mmol) in DCM (10 mL) were added EDCI (105 mg, 0.55 mmol), HOBt (85 mg, 0.55 mmol), DIEA (412 μ L, 2.5 mmol) and L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (145 mg, 0.6 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was washed with 5% NaHCO₃ aqueous solution. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (87 mg, 37%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.3 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 469 (M+H)^+$.

<u>93</u>

(S)-2-{2-[Benzyl-(2-hydroxy-3,4-dioxo-cyclobut-1-enyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



Squaric ester intermediate was dissolved in dichloromethane (2 mL) and cooled at 4°C in an ice/water bath. After 15 minutes of stirring, trifluoroacetic acid (2 mL) was added and the mixture was stirred at 4°C for 30 minutes then 10 μ L of distilled water were added. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated in Et₂O and filtrated to give the compound as a violet solid (70 mg, 99%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.97 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.57 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.40-7.22 (m, 5H(Ph)), 4.70-4.66 (m, 1H), 4.65 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 4.00 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.95 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 3.67 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.16 (dd, J = 5.1 Hz and 15.0 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 9.0 Hz and 15.0 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.02 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 413 (M+H)^+$.

<u>108</u>

[Benzyl-(trityloxycarbamoyl-methyl)-amino]-acetic acid



To a stirred solution of O-trityl hydroxylamine (550 mg, 2 mmol) in DMF (10 mL) were added DIEA (660 μ L) and **8** (410 mg, 2 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon and the solvent was evaporated. The crude product was dissolved in DCM and washed with water. The product was obtained as orange oil (900 mg, 93%) and was used without further purification in the next step.

<u>109</u>





To a solution of the intermediate **108** (480 mg, 1 mmol) in $_{DCM}$ (10 mL) were added EDCI (230 mg, 1.2 mmol), HOBt (184 mg, 1.2 mmol), DIEA (990 μ L, 6 mmol) and L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (290 mg, 1.2 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was washed with 5% NaHCO₃ aqueous solution. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (320 mg, 51%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.9 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 633 (M+H)^+$.

(S)-2-[2-(Benzyl-hydroxycarbamoylmethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.2TFA



The intermediate **109** was dissolved in a TFA 2% /TIS 5%/ /DCM mixture. The mixture was stirred 10 minutes at room temperature and evaporated. To the crude product was added petroleum ether and the surnageant is removed. The product was obtained as a white solid (140 mg, 98%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u> : 10.66 (s, 1H), 8.97 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.68 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.38-7.30 (m, 5H(Ph)), 4.71 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.64 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.22-3.15 (m, 5H), 3.08 (dd, J = 9.2 Hz and 15.3 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.6 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 390 (M+H)^+$.

<u>95</u>

<u>110</u>

(Benzyl-carbamoylmethyl-amino)-acetic acid

N-Phenyliminodiacetic acid (342 mg, 1.53 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride (2%) in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was heated for 15 minutes and then stirred for 5 hours at room temperature and evaporated.

The crude product was dissolved in DMF (3 mL). The mixture was saturated with gaseous ammoniac and stirred overnight at room temperature. Then the solvent was evaporated to yield the compound as a yellow oil (339 mg, 100%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.36-7.25 (m, 5H (Ph) + 1CONH₂), 7.15 (s, 1CONH₂), 3.76 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.16 (s, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.14 \text{ min (method c)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 223 (M+H)^+$.

```
<u>113</u>
```

L-H-Histidine methyl amide



To a stirred solution of L-Histidine methyl ester dihydrochloride (3 g, 12.4 mmol) in MeOH (40 mL) was added a solution of methylamine in EtOH 33%wt (1.5 mL, 49.6 mmol). The mixture was stirred and refluxed overnight. The solvent was evaporated. The crude product was washed with a solution of triethylamine in MeOH and precipitation in MeOH/Et₂O gave a white solid (2,18 g, 73%).

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ (ppm)</u>: 8.47 (q, J = 4.35 Hz, CON<u>H</u>Me), 7.64 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 3.92 (dd, J = 7.1 Hz and 5.8 Hz, 1H), 3.08-2.86 (m, 2H), 2.61 (d, J = 4.35 Hz, CONH<u>Me</u>);
- <u>LC</u>: $t_r = 0.48 \min (\text{method c})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 169 (M+H)^+$.

<u>111</u>

(S) - 2 - [2 - (Benzyl-carbamoylmethyl-amino) - acetylamino] - 3 - (1H-imidazol-4-yl) - N-methyl-propionamide



To a stirred solution of **113** (1 g, 4.14 mmol) in DMF (20 mL) were added **110** (1,38 g, 6.2 mmol), HOBt (0.84 g, 6.2 mmol), EDCI (1.19 g, 6.2 mmol) and DIEA (1.95 mL, 11.2 mmol). The mixture was stirred two days. The solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give a yellow oil (1.23 g, 80%).

- <u>Purity</u> : 95% ;
- $\frac{^{1}\text{H} \text{ NMR} (\text{DMSO-}d6) \ \delta (\text{ppm})}{\text{CONHMe}}$; 8.46 (d, J = 8.3 Hz, CONH), 7.71 (q, J = 4.6 Hz, CONHMe), 7.52 (d, J = 1.0 Hz, 1H); 7.36-7.23 (m, 5H(Ph)), 6,76 (s, 1H), 4.42 (m, 1H), 3.64 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.14-2.85 (m, CONHMe), 2.54 (d, J = 4,6 Hz, 3H);
- <u>LC</u>: $t_r = 1.47 \min (\text{method c})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 373 (M+H)^+$.

<u>112</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-cyanomethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-N-methyl-propionamide



To a stirred solution of **112** (588 mg, 1.57 mmol) in THF (10 mL) at 0°C were added pyridine (319 μ L, 3.94 mmol) and TFAA (241 μ L, 1.73 mmol) in three times over 3 hours. Water was added and the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed successively with a saturated solution of NaHCO₃ and brine and dried over MgSO₄. The solvent was evaporated and the crude material was purified by preparative HPLC to give an orange oil (324 mg, 58%).

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CD₃OD) δ (ppm)</u>: 7.91 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.36-7.30 (m, 5H(Ph)), 6.97 (s, 1H), 4.67 (ddd, J = 8.2 Hz and 5.4 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.66 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.62 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 3.54 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 3.16 (dd, J = 14.9 Hz and 5.3 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 14.9 Hz and 8.2 Hz, 1H), 3.28 (s, 2H), 2.73 (s, CONH<u>Me</u>);
- <u>LC</u>: $t_r = 1.77 \text{ min (method d)};$
- <u>MS</u> : (ESI+) m/z = 355 (M+H)⁺.

<u>95</u>

 $(S) - 2 - \{2 - [Benzyl-(1H-tetrazol-5-ylmethyl)-amino] - acetylamino\} - 3 - (1H-imidazol-4-yl) - N-methyl-propionamide$



To a stirred solution of **112** (108 mg, 0.3 mmol) in DMF were added sodium azide (198 mg, 3.04 mmol) and ammonium chloride (163 mg, 3.04 mmol). The mixture was heated at 90°C for 60 hours. The solvent was evaporated and the crude material was diluted in EtOH and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum to give an yellow oil (119 mg, 98%).

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (CD₃OD) δ (ppm)</u>: 8.07 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.32-7.25 (m, 5H(Ph) + 1H), 6.95 (s, 1H), 4.63 (dd, J = 8.2 Hz and 5.2 Hz, 1H), 3.95 (d, J = 14.1 Hz, 1H), 3.88 (d, J = 14.1 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.21-3.04 (m, 4H), 2.74 (s, CONH<u>Me</u>);
- $\frac{{}^{13}\text{C NMR (CD_3 \text{OD}) \delta (ppm)}}{128.1, 127.2, 117.2, 58.6, 56.4, 52.5, 28.2, 25.1};$
- <u>LC</u>: $t_r = 1.95 \min (\text{method } d)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 398 (M+H)^+$.

$\underbrace{100}{\cdot Preparation of Benzylamino-acetic acid methyl ester.HCl}$

To a stirred solution of N-Benzylglycine (820 mg, 4 mmol) in methanol (8 mL) was added thionyl chloride (2 mL) dropwise at 0°C. The mixture was stirred at room temperature for 18 hours. Then the solvent was evaporated to give the compound as the chlorhydrate salt (870 mg, 100%).

- <u>Purity</u> :99% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u> : 3.72 (s, CO₂Me), 3.99 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 7.41-7.43 (m, 3H(Ph)), 7.55-7.58 (m, 2H(Ph)) ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.01 \text{ min (method a)};$
- \underline{MS} : (ESI+) m/z = 180 (M+H)⁺.

3-(Benzyl-methoxycarbonylmethyl-amino)-propionic acid tert-butyl ester

To a stirred solution of the *N*-Benzylglycine methyl ester (222 mg, 1.03 mmol) in acetone (10 mL) were added *tert*-Butyl 3-bromopropionate (834 μ L, 5 mmol), K₂CO₃ (290 mg, 2.09 mmol) and KI (174 mg, 1.04 mmol). The mixture was refluxed 24 hours. Then *tert*-Butyl 3-bromopropionate (834 μ L, 5 mmol) and K₂CO₃ (301 mg, 2.17 mmol) were added and the solution was refluxed. After 18 hours, *tert*-Butyl 3-bromopropionate (834 μ L, 5 mmol), K₂CO₃ (341 mg, 2.46 mmol) were added and the mixture was refluxed overnight. The solvent was evaporated and the residue was solubilised in ethyle acetate and washed with water and brine. The organic layer was dried over magnesium sulphate and concentrated to give the product (349 mg, quant. yield).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- \underline{LC} : $t_r = 4.76 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 308 (M+H)^+$.

<u>101</u>

3-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-propionic acid tert-butyl ester

To a stirred solution of **100** (349 mg, 1.13 mg) in methanol (5 mL) was added NaOH (74 mg, 1.85 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5 days. The solvent was evaporated and the residue was solubilised in water, then the aqueous layer was acidified with a solution of HCl 1N, and extracted with DCM. The organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated to give the product (132 mg, 35%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.76 \min (\text{method a});$
- $MS : (ESI+) m/z = 294 (M+H)^+$.

<u>96</u>

(S)-2-{2-[Benzyl-(2-tert-butoxycarbonyl-ethyl)-amino]-acetylamino}-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of **101** (132 mg, 0.4 mmol) and oxalyl chloride (50 μ L, 0.58 mmol) in DCM (3 mL) was added at 0°C one drop of DMF. The mixture was stirred for 30 minutes. Then the solvent was evaporated and the crude compound was solubilized in DCM (3 mL). L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (181 mg, 0.4 mmol) and DIEA (313 μ L, 1.8 mmol) were added and the mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the compound (105 mg, 38%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.43 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.39-7.32 (m, 2H + 9H(Trt)),
 7.27 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.17 (m, 3H), 7.02 (m, 6H(Trt)), 6.63 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.60
 (m, 1H), 3.62 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.54 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.51 (s, CO₂Me), 3.32 (s,
 2H), 3.03-2.89 (m, 4H), 2.64 (m, 2H), 1.31 (s, 9H(tBu));
- <u>LC</u>: $t_r = 6.96 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 687 (M+H)^+$.

<u>96</u>

(S)-2-{2-[Benzyl-(2-carboxy-ethyl)-amino]-acetylamino}-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester. 2TFA



To a stirred solution of TIS and DCM (400 μ L / 3 mL) was added **102** (90 mg, 0.13 mmol). Then 400 μ L of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 3 days. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with diethyl ether to give the product as the trifluoroacetate salt (74 mg, 82%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.98 (s, 1H), 8.90 (s, CON<u>H</u>), 7.40 (m, 5H(Ph) + 1H), 4.68 (m, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.65 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.56 (s, 2H), 3.16-3.03 (m, 4H), 2.67 (t, J = 7.5 Hz, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 172.3, 170.5, 133.9, 130.5, 128.9, 128.7, 117.3, 57.2, 53.8, 52.4, 51.3, 49.3, 29.7, 26.1 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.39 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: $(ESI+) m/z = 389 (M+H)^+$.



1 (60 mg, 0.16 mmol) was stirred overnight at room temperature in a 20% SOCl₂ solution in MeOH (2 mL) and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a colorless oil (50 mg, 73%).

- <u>Purity</u> 100%;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.87 (s, 1H), 7.33-7.25 (m, 5H(Ph)), 6.97 (s, 1H), 7.75 (m, 1H), 3.77 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 3.71 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.36 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.21 (dd, J = 4.5 Hz and 14.1 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 7.5 Hz and 15.0 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.42 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) m/z= 389 (M+H)⁺.

<u>98</u>

<u>103</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of *N*-Benzylglycine hydrochloride (402 mg, 2 mmol) in a H₂O/dioxane mixture (1/4, 5 mL) were added, at 0°C, Boc₂O (524 mg, 2.4 mmol) and 2 mL of 2 N NaOH solution. The mixture was stirred overnight at room temperature and dioxane was evaporated. The aqueous layer was acidified with a 20% citric acid solution and extracted by AcOEt. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to give the product as a colorless oil (530 mg, 100%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.37 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u> : (ESI-) $m/z= 264 (M-H)^{-}$.

<u>104</u>

(S)-2-[2-(Benzyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To the intermediate **103** (500 mg, 1.88 mmol) were added EDCI (470 mg, 2.45 mmol), HOBt (375 mg, 2.45 mmol), DIEA (1.86 mL, 11.3 mmol) and L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (548 mg, 2.26 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was washed with 5% NaHCO₃ aqueous solution. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white solid (398 mg, 51%).

- <u>Purity</u> 100%;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 11.84 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.33-7.18 (m, 5H(Ph)), 6.82 (s, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.59 (s, CO₂<u>Me</u>), 2.88 (m, 2H), 1.34 (s, 9H (Boc));
- <u>LC</u>: $t_r = 4.06 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 417 (M+H)^+$.

(S)-2-(2-Benzylamino-acetylamino)-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.2HCl



104 (180 mg, 0.432 mmol) was deprotected in presence of HClg in dioxane during 30 minutes at room temperature. Dioxane was evaporated and the product was precipitated in Et_2O to give the compound as a white solid (124 mg, 74%).

- <u>Purity</u> 100%;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 9.26 (d, J = 7.5 Hz, CON<u>H</u>), 9.04 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.52-7.38 (m, 5H (Ph) + 1H), 4.67 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.71 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.20 (dd, J = 5.4 Hz and 15.3 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 8.4 Hz and 15.0 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 1.91 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 317 (M+H)^+$.

(S)-2-[2-(Benzyl-carbamoylmethyl-amino)-acetylamino]-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



To a stirred solution of **110** (339 mg, 1.5 mmol) in DCM (15 mL) were added L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (400 mg, 1.65 mmol), HOBt (298 mg, 1.95 mmol), EDCI (374 mg, 1.95 mmol) and DIEA (1.2 mL, 7 mmol). The mixture was stirred 4 days, then EDCI (370 mg, 1.9 mmol) and DIEA (340 μ L, 1.95 mmol) were added. The mixture was stirred overnight and washed with a saturated solution of NaHCO₃. The aqueous layers were extracted with AcOEt and the organic layers were dried with MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by two successive preparative HPLC to yield compound as a white solid (40 mg, 7%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- $\frac{^{1}\text{H} \text{ NMR} (\text{DMSO-}d6) \ \delta \text{ ppm}}{1000 \text{ m}}$: 8.73 (d, J = 7.8 Hz, CON<u>H</u>), 7.63 (s, 1H), 7.59 (s, 1CON<u>H</u>₂), 7.30 (m, 5H (Ph)), 7.23 (s, 1CON<u>H</u>₂), 6.89 (s, 1H), 4.57 (m, 1H), 3.65 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.57 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.08 (s, 2H), 3.02-2.96 (m, 4H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.2, 171.7, 169.9, 137.3, 135.2, 133.8, 129.2, 128.2, 127.3, 115.8, 57.9, 57.5, 56.9, 51.9, 51.8, 28.6;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.77 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) m/z= 374 (M+H)⁺.

8 Chimiothèque : Alkylation en Tau

<u>114</u>

To a stirred solution of L-Histidine-(N^{t} -methyl) (250 mg, 1, 47 mmol) in methanol (2.4 mL) were added dropwise SOCl₂ (600 µL) at 0°C. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated to give the compound with a quantitative yield.

(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester



The compound was prepared using General procedure A starting from *N*-Benzyliminodiacetic acid (307 mg, 1.5 mmol), L-Histidine-(N^{τ} -methyl) methyl ester.HCl (269 mg, 1.47 mmol) and DIEA (1 mL, 6 mmol). The compound was obtained with 19% yield.

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) } \delta \text{ ppm}}{14.5 \text{ Hz}}$: 2.88 (dd, J = 5.3 Hz and 14.5 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 6.8 Hz and 14.5 Hz, 1H), 3.25 (s, 4H), 3.53 (s, 3H), 3.59 (s, CO₂Me), 3.73 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.79 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.57 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 7.25-7.32 (m, 5H(Ph)), 7.55 (s, 1H), 8.36 (d, J = 7.9 \text{ Hz, CONH});
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 172.2, 171.7, 170.1, 138.2, 137.6, 136.2, 128.9, 128.3, 127.3, 118.2, 57.5, 56.8, 53.3, 51.9, 51.7, 32.9, 29.3 ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.35 \text{ min (method a)}$;
- \underline{MS} : (ESI+) m/z = 389 (M+H)⁺.

• <u>Preparation of L-Histidine-(N^{π} -methyl) methyl ester.HCl</u>

115

To a stirred solution of L-Histidine- $(N^{\pi}$ -methyl) (250 mg, 1, 47 mmol) in methanol (2.4 mL) were added dropwise thionylchloride (600 μ L) at 0°C. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated to give the compound with a quantitative yield.

(S)-2-[2-(Benzyl-carboxymethyl-amino)-acetylamino]-3-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)propionic acid methyl ester



The compound was prepared using General procedure A starting from *N*-Benzyliminodiacetic acid (307 mg, 1.5 mmol), L-Histidine-(N^{π} -methyl) methyl ester.HCl (269 mg, 1.47 mmol) and DIEA (1 mL, 6 mmol). The compound was obtained with 46% yield.

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 3.00 (dd, J = 8.6 Hz and 15.6 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 5.6 Hz and 15.6 Hz, 1H), 3.22 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.64 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.68 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 4.60 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 7.22-7.34 (m, 5H (Ph)), 7.62 (s, 1H), 8.26 (d, J = 8.0 Hz, CON<u>H</u>);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 25.03, 31.0, 50.8, 52.2, 54.0, 56.5, 57.5, 126.1, 127.4, 127.3, 128.3, 129.0, 137.9, 138.1, 170.4, 171.5, 172.4;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.35 \min (\text{method a});$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 389 (M+H)^+$.



To a stirred solution of L-H-Histidine-(benzyl) methyl ester dihydrochloride (332 mg, 1 mmol) in DMF (10 mL) were added DIEA (660 μ L) and *N*-Benzyliminodiacetic anhydride acid (205 mg, 1 mmol) in DMF (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to yield compound as a colorless oil (40%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.40 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>), 7.68 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.36- 7.15 (m, 10H(Ph)), 6.90 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 5.1 (s, 2H), 4.57 (m, 1H), 3.78 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.52 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.24 (s, 2H), 2.92 (dd, J = 6.9 Hz and 15.0 Hz, 1H), 2.85 (dd, J = 5.4 Hz and 15.0 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.36 \min (\text{method a})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 465 (M+H)^+$.

(S)-5-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-imidazo[1,5-c]pyrimidine-7-carboxylic acid methyl ester

To a stirred solution of L-H-Histidine methyl ester dihydrochloride (2.42 g, 10 mmol) in anhydrous DMF (30 mL) were added CDI (1.94 g, 12 mmol) and anhydrous DIEA (3.5 mL) under argon. The mixture was heated at 80°C for 1 hour. The solvent was evaporated and the crude residue was solubilized in DCM. The organic layers were washed with a saturated solution of NaCl and a solution of chlorhydric acid 1 N. The pH of aqueous layers was modified in order to be around 7 with a solution of NaOH. The aqueous layers were extracted with DCM. The organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. The crude residue was precipitated in ACN and the solid was filtrated to give the compound as a white powder (1.01 g, 51%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{(m, 1\text{H})}$; 8.56 (d, J = 3.6 Hz, CON<u>H</u>), 8.10 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.63 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.23 (d, J = 4.5 Hz, 2H);
- \underline{LC} : $t_r = 0.55 \text{ min (method e)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 196 (M+H)^+$.

<u>117</u>

The compound was prepared the same way as **118** starting from **113** (720 mg, 4.28 mmol) and CDI (903 mg, 5.57 mmol) in DMF (15 mL).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{1 \text{H}}$: 8.23 (d, J = 3.6 Hz, CON<u>H</u>Me), 8.05-8.03 (m, CON<u>H</u> + 1H), 7. 6.75 (s, 1H), 4.13-4.08 (m, 1H), 3.21-3.03 (m, 2H), 2.55 (d, J = 4.5 Hz, CONH<u>Me</u>);
- <u>LC</u>: $t_r = 0.41 \text{ min (method e)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 195 (M+H)^+$.

<u>118</u>

<u>119</u>

(S)-2-Benzyl-7-methoxycarbonyl-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-imidazo[1,5-c]pyrimidin-2-ium bromide



To a stirred solution of **117** (587 mg, 3 mmol) in acetone (15 mL) were added benzylbromide (359 μ L, 3 mmol). The mixture was reflux overnight. The precipitated was filtrated to give the compound as a white powder (725 mg, 66%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.06 (s, 1H), 9.53 (d, J = 3.9 Hz, CON<u>H</u>), 7.68 (s, 1H), 7.51-7.37 (m, 5H(Ph)), 5.52 (d, J = 5.1 Hz, 1C<u>H</u>₂Ph), 5.48 (d, J = 5.1 Hz, 1C<u>H</u>₂Ph), 4.65 (m, 1H), 3.66 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.33 (d, J = 4.8 Hz, 2H);
- <u>LC</u>: $t_r = 1.67 \min (\text{method } e)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 286 (M+H)^+$.

<u>120</u>

(S)-3-(1-Benzyl-1H-imidazol-4-yl)-2-tert-butoxycarbonylamino-propionic acid methyl ester



119 (0.2 mmol) was solubilised in tBuOH (2 mL) with DIEA (70 μ L, 0.4 mmol) in a kimble tube and the mixture was reflux 4 hours. The solvent was evaporated to give the compound.

- <u>Purity</u> : 85% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.22 \min (\text{method } e)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 360 (M+H)^+$.



(S)-2-Amino-3-(1-benzyl-1H-imidazol-4-yl)-propionic acid methyl ester.TFA



120 was deprotected with a solution of TFA/DCM 50/50 (1mL) with 20 μ L of TIS. After 1 hour of reflux the solvent was evaporated to give the compound.

- Purity : 80%;
- <u>LC</u>: $t_r = 1.60 \text{ min (method e)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 260 (M+H)^+$.

- 9 Chimiothèque : exemplification de l'amide à l'Est
- a <u>Synthèse des Histidines amides (His-NRR') :</u>
 - i. <u>Etape 1</u>

<u>Solution A</u> : DIEA (1 eq, 309 μ L) in DMF (0.5 M, 3.291 mL). <u>Solution B</u> : CDI (0.25 M theorical, 4.04 g) in 25mL anhydrous DMF + 75 mL anhydrous THF. This real concentration of the solution was assay by HPLC. <u>Solution C</u> : Amine at 0.1 M in DMF with 2.2 éq of DIEA.

In each tube was distributed 0.2 mmol of L-Boc-Histidine. 400 μ L of solution A were added and 1.76 mL (1 eq, calculated function of the real concentration) of solution B. The mixtures were stirred for 2 hours at room temperature. Then 2 mL of each solution C were added. The mixtures were stirred for 3 hours at room temperature. 10 μ L of each mixture were sample to do quality control. Every tubes and quality controls were concentrated.

ii. <u>Etape 2</u>

In each tube were added 2 mL of a solution TFA/DCM 50/50. The mixtures were stirred for 1.5 hours. The solvent was evaporated. The crude residues were solubilized with 2 mL of ethanol and re-evaporated in order to eliminate all the TFA.

b Synthèse des composés finaux

 $\underline{Solution \ D}$: benzyle or phenyl propyle iminodiacetic anhydride acid (0.5 M) in anhydrous THF

<u>Solution E</u> : anhydrous DIEA (0.42 M, 3.65 mL) in anhydrous DMF (46.35 mL) Each previously prepared His-NRR' were solubilized with the solution E in order to have solution at 0.1 M.

In each microtube, were added 32 μ L (15 μ M) of the solution D. The solvent was evaporated. Then 32 μ L oh anhydrous THF were added and 195 μ L (1.3 eq) of the solution of His-NRR'. The mixtures were stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated.

• <u>Preparation of [(S)-1-Benzylcarbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethyl]-carbamic acid tert-</u> <u>butyl ester</u>



To a stirred solution of L-Boc-Histidine (500 mg, 1.95 mmol) in DMF (10 mL) were added benzylamine (213 μ L, 1.95 mmol), HOBt (264 mg, 1.95 mmol), EDCI (455 mg, 2.38 mmol) and DIEA (2 mL, 11.7 mmol). The mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated. The residue was solubilised in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ then with brine. The organic layers were dried with MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the expected compound (428 mg, 64%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.28 (t, J = 6 Hz, CON<u>H</u>Bz), 7.57 (s, 1H), 7.29-7.11 (m, 5H(Ph)), 6.98 (d, J = 8.1 Hz, CON<u>H</u>Boc), 6.79 (s, 1H), 4.25 (d, J = 6 Hz, 2H), 4.18 (m, 1H), 2.89-2.75 (m, 2H), 1.36 (s, 9H(Boc));
- <u>LC</u>: $t_r = 2.54 \text{ min (method d)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 345 (M+H)^+$.
- <u>Preparation of L-H-Histidine benzyl amide.2HCl</u>



The L-Boc-His-NHBz (428 mg, 1.2 mmol) was deprotected in presence of HClg in dichloromethane during 30 minutes at room temperature. Solvent was evaporated to give the expected product used directly in next reaction

- <u>Purity</u> : 98% ;
- \underline{LC} : $t_r = 0.75 \min (\text{method } d)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 245 (M+H)^+$.

 $(Benzyl-\{[(S)-1-benzylcarbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylcarbamoyl]-methyl\}-amino)-acetic \ acid$



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added *N*-Benzyliminodiacetic acid (446 mg, 2 mmol). The mixture was heated at 50°C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (10 mL). L-H-Histidine benzylamide dihydrochloride (317 mg, 2 mmol) and DIEA (1.3 mL, 6 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by two preparative HPLC to give the compound (20 mg, 2%).

- <u>Purity</u> : 97% ;
- <u>¹H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.37 (t, J = 5.96 Hz, CON<u>H</u>Bz), 8.32 (d, J = 7.95 Hz, CON<u>H</u>), 7.56 (s, 1H), 7.39-7.11 (m, 10H(Ph)), 6.78 (s, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.26 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.33-3.20 (m, 4H), 2.92 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 172.3, 170.8, 170.0, 139.3, 138.1, 134.7, 128.9, 128.2, 128.1, 127.2, 126.8, 126.6, 116.3, 57.6, 57.0, 53.8, 52.5, 41.9, 29.8;
- <u>LC</u>: $t_r = 1.82 \text{ min (method d)};$
- <u>MS</u>: (ESI+): $m/z = 450 (M+H)^+$.

 $[\{[(S)-1-Benzylcarbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylcarbamoyl]-methyl\}-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetic acid. HCOOH$



To a stirred solution of trifluoroacetic anhydride (2%) in acetic anhydride was added **27** (1 mmol). The mixture was heated at 50° C in order to solubilise the products and then the solution was stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was evaporated.

The residue was solubilised in anhydrous DMF (5 mL). L-H-Histidine benzylamide dihydrochloride (380 mg, 1.2 mmol) and DIEA (700 μ L, 4 mmol) were added. The mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by preparative HPLC to give the expected compound (400 mg, 84%).

- <u>Purity</u> : 98% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.38 (t, J = 5.5 Hz, CON<u>H</u>Bz), 8.30 (d, J = 8.5 Hz, CON<u>H</u>),
 8.28 (s, <u>H</u>COOH), 7.5 (s, 1H), 7.11-7.29 (m, 10H(Ph)), 6.76 (s, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.24
 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.27 (s, 2H), 3.21 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 3.14 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 2.94
 (dd, J = 5.5 Hz and 15 Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 7.4 Hz and 15 Hz, 1H), 2.52 (m, 4H), 1.64
 (dt, J = 7.5 Hz, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 173.0, 170.9, 170.6, 164.2, 142.1, 139.3, 134.7, 133.4, 128.3, 128.25, 128.2, 126.8, 126.6, 125.7, 125.6, 58.1, 55.9, 54.3, 52.9, 41.9, 32.7, 29.8, 29.7;
- <u>LC</u>: $t_r = 5.02 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 478 (M+H)^+$.

• <u>Preparation of [Methoxycarbonylmethyl-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetic acid</u>



<u>3</u>

27 (2 mmol) was dissolved in trifluoracetic anhydride 2% in acetic anhydride (5 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature or 70°C if product was not soluble at room temperature and then evaporated. The residue was dissolved in DMF (2 mL). Methanol (2 mmol) and DIEA (660 μ L) were added. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in DCM and washed with water.

- <u>Purity</u> : 97% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.96 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 266 (M+H)^+$.
- <u>Preparation of L-H-Histidine-(1-trityl) methyl amide</u>



To a stirred solution of L-H-Histidine-(1-trityl) methyl ester hydrochloride (2.5 g, 5.5 mmol) in methanol (10 mL) were added 4 mL of a solution of methylamine in ethanol (33%). The mixture was refluxed overnight. The solvent was evaporated and the crude product was precipitated in water and filtrated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the compound as a white powder (1.43 g, 63%).

- <u>Purity</u> : 74% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.30 (s, 1H), 7.95 (q, J = 4.8 Hz, CON<u>H</u>Me), 7.06-7.43 (m, 15H(Trt)), 6.63 (s, 1H), 3.53 (dd, J = 5.7 Hz and 7.2 Hz, 1H), 2.77 (dd, J = 5.7 Hz and 14.4 Hz, 1H), 2.63 (dd, J = 5.7 Hz and 14.4 Hz, 1H), 2.54 (d, J = 4.8 Hz, CONH<u>Me</u>);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.79 \min (\text{method } a)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 411 (M+H)^+$.

• <u>Preparation of [{[(S)-1-Methylcarbamoyl-2-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-ethylcarbamoyl]-</u> <u>methyl}-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetic acid methyl ester</u>



To a stirred solution of L-H-Histidine-(1-trityl) methyl amide (456 mg, 1.1 mmol) in DMF (5 mL) were added the acid previously prepared (1 mmol), HOBt (149 mg, 1.1 mmol), EDCI (211 mg, 1.1 mmol) and DIEA (690 μ L, 4 mmol). The mixture was stirred overnight. Then 213 mg of EDCI and 200 μ L of DIEA were added and the resulting slurry was stirred overnight. The solvent was evaporated. The crude product was purified by preparative HPLC to give the expected compound (171 mg, 26%).

- <u>Purity</u> : 92% ;
- <u>LC</u>: $t_r = 6.14 \text{ min (method a)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 658 (M+H)^+$.

 $[\{[(S)-2-(1H-Imidazol-4-yl)-1-methylcarbamoyl-ethylcarbamoyl]-methyl\}-(3-phenyl-propyl)-amino]-acetic acid methyl ester. 2TFA$



To a stirred solution of TIS and DCM (0.5 mL / 4 mL) was added the protected compound (171 mg, 0.26 mmol). Then 0.5 mL of TFA were added. The mixture was stirred at room temperature during 2 hours. Then the solvent was evaporated and the crude product was washed with petroleum ether and diethyl ether to give the product as brown oil (165 mg, 99%).

- <u>Purity</u> : 99% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.94 (s, 1H), 8.51 (d, J = 7.9 Hz, CON<u>H</u>), 8.05 (q, J = 4.7 Hz, CON<u>H</u>Me), 7.31-7.14 (m, 5H(Ph) + 1H), 4.58 (m, 1H), 3.82 (s, 2H), 3.65 (s, CO₂<u>Me</u>), 3.62 (s, 1H), 3.13 (dd, J = 5.12 Hz and 15.36 Hz, 1H), 2.92 (dd, J = 8.4 Hz and 15.36 Hz, 1H), 2.84 (t, J = 7.44 Hz, 2H), 2.59 (d, J = 4.2 Hz, CONH<u>Me</u>), 2.53 (m, 2H), 1.75 (qt, J = 7.44 Hz, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 170.2, 169.2, 167.7, 141.2, 134.4, 129.4, 128.4, 126.0, 116.9, 56.3, 54.5, 52.1, 51.5, 32.3, 27.3, 27.2, 25.3;
- <u>LC</u>: $t_r = 4.07 \text{ min (method a)};$
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 644 (M+H)^+$.

Partie expérimentale du Chapitre III

1 <u>Synthèse des β-aminoacide hydroxamiques</u>

Generale procedure for the methyl ester formation

To a stirred solution of β -aminoacide or the corresponding amino acid (2 g, 11.1 mmol) in methanol (48 mL) was added dropwise thionyl chloride (12 mL) at 0°C. After stirring at room temperature overnight, the solvent was evaporated and the crude material precipitated in ether to give the product.

<u>126</u>

Methyl-3-amino-4-phenylbutanoate.HCl

. HCI

White solid (2.56 g, quant.)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{^{1}\text{H} \text{ NMR} (\text{MeOD}) \delta \text{ ppm}}{3.07 (\text{dd}, \text{J} = 6.4 \text{ Hz and } 13.8 \text{ Hz}, 1\text{H}), 2.94 (\text{dd}, \text{J} = 8.3 \text{ Hz and } 13.8 \text{ Hz}, 1\text{H}), 2.72 (\text{dd}, \text{J} = 5.0 \text{ and } 17.4 \text{ Hz}, 1\text{H}) 2.63 (\text{dd}, \text{J} = 7.4 \text{ and } 17.4 \text{ Hz}, 1\text{H});$
- <u>LC</u>: $t_r = 2.70 \min (\text{method } g)$;
- \underline{MS} : (ESI+) m/z = 194 (M+H)⁺.

<u>127</u>

(3R)-Methyl-3-amino-4-naphtylbutanoate.HCl

H_AN O .HCI

White solid (902 mg, 80%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.91-7.84 (m, 3H), 7.77 (sl, 1H), 7.51-7.39 (m, 3H), 4.00-3.91 (m, 1H), 3.66-3.68 (m, CO₂<u>Me</u>), 3.25-3.18 (m, 1H), 3.11 (dd, J = 8.0 Hz and 13.7 Hz, 1H), 2.77 (dd, J = 4.9 Hz and 17.4 Hz, 1H), 2.71-2.61 (m, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.22 \text{ min}$, (method g);
- $MS : (ESI+) m/z = 244 (M+H)^+$.

<u>130</u>

Imidazole-1-sulfonyl azide

To a stirred solution of NaN₃ (784 mg, 12 mmol) in ACN (12 mL) were added dropwise SO2Cl2 (964 μ L, 12 mmol) at 0°C. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. A solution of imidazole (1.58 g, 23 mmol) in ACN (10 mL) were added at 0°C. The mixture turned red. The mixture was stirred at room temperature during 5 hours. Ethyl acetate (25 mL) were added and the mixture was washed with water then with a saturated solution of NaHCO₃. The organic layers were dired over MgSO4.

A solution of HCl in ethanol was prepared by addition of acetyl chloride (2.8 mL) in EtOH (10 mL). This solution was added dropwise at 0°C to the organic layers. The precipitate was filtrated to give the compound as a white solid (1g, 48%)

 ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.54 (dd, J = 0.9 Hz and 1.2 Hz, 1H), 7.96 (dd, J = 1.2 Hz and 1.5 Hz 1H), 7.31 (dd, J = 0.9 Hz and 1.5 Hz, 1H);

General procedure for the azide formation

Imidazole-1-sulfonyl azide¹⁵² hydrochloride **130** previously prepared (1,2 eq) was added to the amino acid (1 eq), K_2CO_3 (n + 0,5, n = number of mol of acid in the system) and CuSO₄.5H₂O (0,01 eq) in methanol and the mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated, diluted with H₂O, acidified with concentrated HCl and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried (MgSO₄), filtered and concentrated. Purification by preparative liquid chromatography gave the azide.

<u>128</u>

Methyl-3-azido-4-phenylbutanoate

Colorless oil (1.01 g, 71%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.37-7.22 (m, 5H(Ph)), 4.12-4.03 (m, 1H), 3.71 (s, CO₂<u>Me</u>), 2.90 (dd, J = 7.4 Hz and 13.7 Hz, 1H), 2.84 (dd, J = 6.6 Hz and 13.7 Hz, 1H), 2.55 (dd, J = 5.3 and 16.1 Hz, 1H) 2.47 (dd, J = 8.2 and 16.1 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 5.83 \min (\text{method } g)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 192 (M-28+H)^+$.

¹⁵² Goddard-Borger and Stick, An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.*, **2007**. 9(19): p. 3797.

(3R)-Methyl-3-azido-4-naphtylbutanoate

Orange oil (622 mg, 74%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.86-7.80 (m, 3H), 7.70 (sl, 1H), 7.52-7.45 (m, 2H), 7.37 (dd, J = 1.7 and 8.4 Hz, 1H), 4.24-4.15 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.08 (dd, J = 7.3 Hz and 13.7 Hz, 1H), 3.01 (dd, J = 6.6 Hz and 13.7 Hz, 1H), 2.59 (dd, J = 5.4 Hz and 16.1 Hz, 1H), 2.52 (dd, J = 7.9 Hz and 16.1 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 6.54 \text{ min (method g)};$
- <u>MS</u>: (ESI-) $m/z= 242 (M-28+H)^+$.

General procedure for formation of hydroxamic acid¹⁵³

[*Note:* concentrations and reagent ratios are critical to the success of this reaction.] The ester (1 eq) was dissolved in MeOH. HONH₂.HCl (7,2 eq) was dissolved in MeOH. KOH (11,4 eq) was dissolved in MeOH. The KOH solution was poured into the HONH₂.HCl solution, and the resulting mixture was cooled to 0 °C for 1 hour. The KOH/HONH₂ solution was then filtered into the solution of the ester, and the reaction mixture was stirred at room temperature until completion. After removal of the solvent, the mixture was dissolved in ethyl acetate and washed successively with a 1 N solution of HCl and brine. Removal of the solvent gave a brown oil which was purified by preparative HPLC.

<u>124</u>

3-azido-N-hydroxy-4-phenylbutanamide

о N, OH

Orange oil (75 mg, 25%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.38-7.24 (m, 5H(Ph)), 4.11-4.02 (m, 1H), 2.91 (dd, J = 5.3 Hz and 13.8 Hz, 1H), 2.79 (dd, J = 8.4 Hz and 13.8 Hz, 1H), 2.34 (dd, J = 4.7 Hz and 14.5 Hz, 1H), 2.22 (dd, J = 9.1 Hz and 14.5 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 168.2, 129.1, 128.2, 128.1, 126.5, 60.8, 40.3, 37.2.
- \underline{LC} : $t_r = 4.04 \min (\text{method } g)$;
- $MS : (ESI-) m/z = 219 (M-H)^{-1}$.

<u>125</u>

(3R)-3-azido-N-hydroxy-4-naphtylbutanamide

Orange oil (144 mg, 29%)

- <u>Purity</u> : 90%
- <u>¹H NMR (MeOD) δ ppm</u>: 7.84-7.80 (m, 3H), 7.74 (sl, 1H), 7.47-7.40 (m, 3H), 4.20 (dddd, J = 4.7, 5.3, 8.2 Hz and 9.1 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 5.3 Hz and 13.7 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 8.2 Hz and 13.7 Hz, 1H), 2.38 (dd, J = 4.7 Hz and 14.6 Hz, 1H) 2.28 (dd, J = 9.1 Hz and 14.6 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-*d6*) δ ppm : 168.3, 134.8, 133.6, 132.5, 127.9, 127.8, 127.3, 127.2, 125.8, 125.4, 60.7, 40.4, 37.3 ;
- \underline{LC} : $t_r = 5.25 \text{ min (method g)}$;
- \overline{MS} : (ESI+) m/z = 271 (M+H)⁺.

¹⁵³ Levy, et al., Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Structure-Activity Study. J. Med. Chem., **1998**. 41(2): p. 199.

2 Synthèse des alcynes

<u>General procedure for the synthesis of N-Prop-2-ynyl-arylamide or N-Prop-2-ynyl-alkylamide</u>

Propargylamine (200 μ L, 1.1 equiv) and diisopropylamine (462 μ L, 1.2 equiv) were solubilized in dichloromethane (4 mL). The reaction media was cooled down to 0°C and the chloride or sulfonyl chloride was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature overnight. The organic layer was washed with HCl 1 N, with NaHCO₃ 5%, with water and with brine, then dried over MgSO₄ and reduced under pressure to give the product.

<u>131</u>

N-prop-2-yn-1-ylbenzamide

White solid (482 mg, 92%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u>: 7.80 (m, 1H), 7.54-7.48 (m, 1H), 7.46-7.40 (m, 2H), 6.36 (sl, 1H), 4.25 (dd, J = 2.6 and 5.2 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 2.6 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 3.64 \min (\text{method } g)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 160 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 105-108°C.

<u>132</u>

4-methyl-N-prop-2-yn-1-ylbenzamide



White solid (395 mg, 86%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u>: 7.70 (dt, J = 2.1 and 8.1 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.39 (bs, 1H), 4.26 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.28 (m, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.17 \text{ min (method g)}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 174 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 116-117°C.
<u>133</u>

4-fluoro-N-prop-2-yn-1-ylbenzamide

White solid (592 mg, 100%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u>: 7.82 (dd, J = 8.9 and 5.3 Hz, 2H), 7.14 (t, J = 8.9Hz, 2H), 6.24 (s, 1H), 4.26 (dd, J = 2.4 and 5.1 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 2.4 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 3.90 \min (\text{method g})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 178 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 144-145°C.

<u>134</u>

4-methoxy-N-prop-2-yn-1-ylbenzamide



White solid (403 mg, 87%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u>: 7.76 (dt, J = 2.1 and 9.6 Hz, 2H), 6.94 (dt, J = 3.0 and 9.6 Hz, 2H), 6.21 (s, 1H), 4.27 (dd, J= 2.7 and 5.1 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.30 (t, J = 2.7 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 3.82 \min (\text{method } g)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z=190 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 132-133°C.

<u>135</u>

N-prop-2-yn-1-yl-4-(trifluoromethyl)benzamide

CF3

White solid (180 mg, 30%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u>: 7.92 (dd, J = 0.6 Hz and 8.7 Hz, 2H), 7.72 (dd, J = 0.6 Hz and 8.7 Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 4.30 (dd, J = 2.7 Hz and 5.4 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 2.7 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 4.87 \min (\text{method } g)$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 228 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 148-149°C.

 $N\-prop\-2\-yn\-1\-ylcyclohexanecarboxamide$



Pale yellow solid (428 mg, 98%)

- <u>Purity</u> : 89% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u> : 5.67 (s, 1H), 4.05 (dd, J = 2.7 Hz and 5.4 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 2.10 (tt, J = 3.6 Hz and 11.7 Hz, 1H), 1.90-1.76 (m, 4H), 1.68-1.64 (m, 1H), 1.50-1.18 (m, 5H);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.03 \text{ min}$, (method g);
- $MS : (ESI+) m/z = 166 (M+H)^+;$
- <u>Pf</u>: 100-101°C.

<u>137</u>

2-(4-methylphenyl)-N-prop-2-yn-1-ylacetamide



Alkyne JLT31019 was prepared starting from p-tolylacetic acid. Formation of the chloride was performed by reaction of the acid with thionyl chloride in dichoromethane at room temperature overnight. The solvent was then evaporated and the crude product was used to react with propargylamine following the standard procedure described. Purification by preparative HPLC gave the pure product as a white solid (250 mg, 35%).

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.43 (sl, 1H), 7.12 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 3.83 (dd, J = 2.5 Hz and 5.4 Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 3.08 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.32 \text{ min}$, (method c);
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 188 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 127°C.

<u>138</u>

3-phenyl-N-prop-2-yn-1-ylpropanamide

Beige solid (371 mg, 75%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (CDCl₃) δ ppm</u>: 7.34-7.20 (m, 5H), 5.59 (s, 1H, NH), 4.04 (dd, J = 2.7 Hz and 5.4 Hz, 2H), 2.99 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.51 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 2.7 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.23 \text{ min}$, (method g);
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 188 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 66-67°C.

N-prop-2-yn-1-ylbenzenesulfonamide

Orange oil (660 mg, quant.)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{1}{\text{H NMR (CDCl_3) \delta ppm}}$: 7.91 (ddd, J = 1.4, 5.2 and 7.4 Hz, 2H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.53-7.48 (m, 1H), 7.56-7.50 (m, 2H), 4.83 (sl, 1H), 3.86 (dd, J = 2.5 Hz and 6.1 Hz, 2H), 2.08 (t, J = 2.5 Hz, 1H);
- <u>LC</u>: $t_r = 4.14 \text{ min}$, (method g);
- $MS : (ESI+) m/z = 196 (M+H)^+$.

<u>140</u>

4-methyl-N-prop-2-yn-1-ylbenzenesulfonamide

White solid (450 mg, 65%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 8.03 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 3.65 (dd, J = 2.5 Hz and 5.8Hz, 2H), 3.04 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H);
- <u>LC</u>: $t_r = 2.30 \min (\text{method c});$
- <u>MS</u>: (ESI+) m/z = 342 (M+H)⁺;
- <u>Pf</u>: 74-75°C.

<u>141</u>

4-fluoro-N-prop-2-yn-1-ylbenzenesulfonamide



White solid (372 mg, 66%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- $\frac{^{1}\text{H NMR (CDCl_{3}) \delta ppm}}{^{1}\text{and } 6.3 \text{ Hz}, 2\text{H}}$; 7.93 (m, 2H), 7.20 (m, 2H), 4.61 (s, 1H), 3.88 (dd, J = 2.7 Hz and 6.3 Hz, 2H), 2.10 (t, J = 2.7 Hz, 1H);
- \underline{LC} : $t_r = 4.83 \min (\text{method g})$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 213 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 84-85°C.

3 <u>Click Chemistry in situ avec IDE</u>

Each of the 90 acetylenes was dissolved in of DMSO to reach final concentration of 51 mM. Cluster A (9 clusters of 10 alkynes): 100 μ L of each of the 10 alkynes were mixed to reach final concentration of 5,1 mM

Cluster B (10 clusters of 9 alkynes): 100 μ L of each of the 9 alkynes were mixed and addition of 100 μ L of the solvent led to final concentration of 5,1 mM

Each of the three azide (BDM_43066 and BDM_43067) was dissolved in DMSO to reach concentration of 10.2 mM and had to react with each preformed cluster of alkyne. The experiments were performed in 96-deep well microplates.

Experiment with IDE

in each well were mixed 2 μ L of an azide, 2 μ L of an alkyne cluster and 200 μ L of the enzyme in a buffer solution (hepes pH = 7.4) at concentration of 4,8 μ L. The plate was shaken at 37°C during 72 hours.

In parallel, the same experiment in a buffer solution in the absence of the enzyme was conducted in the same conditions to get the control experiment.

The copper catalyzed experiment

in each well were mixed 3 μ L of an azide at concentration of 25.5 mM in DMSO, 3 μ L of an alkyne cluster at 51 mM, 2 μ L of a 20 mM water solution of CuSO₄ and 296 μ L of a mixture of *t*-BuOH / H₂O (final solvent ratio: 1/1). The plate was shaken at room temperature during 36 hours.

Samples of the reactions (50 $\mu L)$ were diluted in MeOH (50 $\mu L)$ and injected (20 $\mu L)$ for LC-MS analysis.

<u>Well analysis</u>

The analysis were performed on a LC-MS Time Of Flight (TOF) LCT Premier XE:

<u>Waters</u> Alliance HPLC system equipped with Waters 1525 pumps, Waters 2998 diode array, Waters 2767 injector, using a XBridge C18 (Waters), 3.5 μm particle size column, dimensions 150 x 4.6 mm. The injection volume was 20 μL. The pressures of drying and nebulising gas are respectively 20 and 500 L/h.

The gradient used start from 98% H_2O / 0.1% HCOOH and reach 100% ACN / 0.1% HCOOH within 13 minutes at a flow rate of 1 mL.min⁻¹.

4 <u>Resynthèse des composés</u>

General procedure for the formation of the 1,4- regioisomers analogues¹⁵⁴

The azide (1 eq) and the alkyne (1 eq) were dissolved separately in DMSO (100-150 μ L) then added to a mixture of *tert*-butanol/water (1 mL: 1/1). Copper sulphate (0,1 eq) and sodium ascorbate (1 eq) were added. After 12 hours of stirring at room temperature, the media was filtered. In most cases, concentration of the filtrate gave an oil which precipitated in water. Filtration of the solid followed by washing with ethyl acetate gave a pure product.

¹⁵⁴ Wang, et al., Rapid Assembly of Matrix Metalloprotease Inhibitors Using Click Chemistry. Org. Lett., **2006**. 8(17): p. 3821.

N-[1-((R)-2-Hydroxycarbamoyl-1-naphthalen-2-ylmethyl-ethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl]-benzamide



Beige solid (24 mg, 51%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.51 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8.95 (t, J = 5.9 Hz, CON<u>H</u>), 8,79 (sl, 1H), 7.88-7.67 (m, 5H(Ph)), 7.56-7.35 (m, 7H), 7.15 (dd, J = 1.3 Hz and 8.6 Hz, 1H), 5.28-5.24 (m, 1H), 4.42 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.32 (sl, 2H), 2.77 (dd, J = 8.8 Hz and 15.0 Hz, 1H), 2.65 (dd, J = 5.4 Hz and 15.0 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 166.4, 165.9, 145.0,135.0, 133.6, 133.3, 132.2, 132.2, 131.7, 128.7, 128.2, 127.8, 127.7, 126.4, 126.0, 122.9, 59.2, 41.4, 37.5, 35.2;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.10$ min, method c;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 430 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 192-194°C.

<u>143</u>





White solid (25 mg, 66%)

- <u>Purity</u> : 100% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.54 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8.90 (t, J = 5.7 Hz, CON<u>H</u>), 8,84 (sl, 1H), 7.9 (s, 1H), 7.80-7.68 (m, 5H (Ph)), 7.48-7.36 (m, 3H), 7.27 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.15 (dd, J = 1.6 Hz and 8.6 Hz, 1H), 5.32-5.23 (m, 1H), 4.42 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.30 (d, J = 7.08 Hz, 2H), 2.79 (dd, J = 8.9 Hz and 15.2 Hz, 1H), 2.66 (dd, J = 5.6 Hz and 15.2 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm: 166.4, 166.0, 145.1, 141.6, 135.0, 133.3, 132.2, 131.8, 129.2, 128.2, 127.8, 127.7, 126.4, 126.0, 122.9, 59.2, 41.1, 37.5, 35.1, 21.4;
- <u>LC</u>: $t_r = 3.22$ min, method c ;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 444 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 181-182°C.



Beige solid (36 mg, 57%)

- <u>Purity</u> : 96% ;
- $\frac{1 \text{H NMR (DMSO-d6) \delta ppm}}{8,80 \text{ (s, 1H, OH)}}$; 10.50 (s, 1H, CONHO), 8.99 (t, 1H, J = 5.4 Hz, CONH), 8,80 (s, 1H, OH), 7.93-7.87 (m, 3H), 7.78-7.68 (m, 3H), 7.45-7.36 (m, 3H), 7.29 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 5.28-5.24 (m, 1H), 4.41 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 2.77 (dd, J = 8.7 and 14.9 Hz, 1H), 2.66 (dd, J = 5.4 Hz and 14.9 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm

 165.9, 165.4, 162.5, 135.0, 133.4, 132.2, 131.0, 130.5, 130.3, 128.2, 127.8, 127.7, 126.4, 126.0, 115.8, 115.5, 59.2, 41.3, 37.6, 35.3;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.42$ min, method c;
- $MS: (ESI+) m/z=448 (M+H)^+;$
- <u>Pf</u>: 183-184°C.

<u>145</u>

144

N-[1-((R)-2-Hydroxycarbamoyl-1-naphthalen-2-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl]-4-methoxy-benzamide



Beige solid (43 mg, 68%)

- <u>Purity</u> : 96% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.50 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8,80 (sl, 2H, O<u>H</u>+CON<u>H</u>), 7.86-7.69 (m, 6H), 7.47-7.39 (m, 3H), 7.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.26-5.24 (m, 1H), 4.40 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.77 (dd, J = 9.5 Hz and 15.1 Hz, 1H), 2.65 (dd, J = 5.2 Hz and 15.1 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm
 : 166.0, 162.1, 135.0, 133.3, 132.2, 129.6, 128.2, 127.7, 127.7, 126.8, 126.4, 126.1, 114.1, 59.39, 55.8, 41.5, 37.6, 35.2;
- <u>LC</u>: $t_r = 2.33$ min, method c;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 460 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 178-179°C.

$\label{eq:N-[1-((R)-2-Hydroxycarbamoyl-1-naphthalen-2-ylmethyl-ethyl)-1H-[1,2,3] triazol-4-ylmethyl]-4-trifluoromethyl-benzamide$



Beige solid (36 mg, 40%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.51 (s, 1H, CONHO), 9.20 (sl,1H), 8,80 (s, 1H, OH), 8.02 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.88-7.83 (m, 3H), 7.76-7.65 (m, 3H), 7.46-7.33 (m, 3H), 7.12 (d, J = 8.8Hz, 1H), 5.30-5.23 (m, 1H), 4.44 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.81-2.63 (m, 2H);
 ;
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm
 : 165.9, 165.3, 144.6, 138.3, 134.9, 133.3, 132.2, 131.8, 131.4, 128.6, 128.2, 127.8, 127.7, 126.4, 126.0, 125.8, 125.7, 123.0, 59.4, 41.4, 37.4, 35.2;
- \underline{LC} : $t_r = 2.62 \text{ min, method c}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 498 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 198-200°C.

<u>147</u>

 $\label{eq:cyclohexanecarboxylic acid [1-((R)-2-hydroxycarbamoyl-1-naphthalen-2-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl]-amide$



Beige solid (25 mg, 51%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.51 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8,80 (s, 1H, O<u>H</u>), 8.01 (sl, 1H), 7.82-7.71 (m, 4H), 7.49-7.45 (m, 3H), 7.15 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.35-5.27 (m, 1H), 4.17 (sl, 2H), 2.81-2.63 (m, 2H), 2.07-2.03 (m, 1H), 1.65-1.59 (m, 5H), 1.22-1.15 (m, 6H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm
 : 175.5, 166.0, 135.0, 133.3, 132.3, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 126.5, 126.1, 59.2, 44.2, 41.3, 37.6, 34.4, 29.5, 29.5, 25.9, 25.7;
- \underline{LC} : $t_r = 2.48 \text{ min, method c}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 436 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 176-177°C.

$(R) - N - Hydroxy - 4 - naphthalen - 2 - yl - 3 - \{4 - [(2 - p - tolyl - acetylamino) - methyl] - [1, 2, 3] triazol - 1 - yl\} - butyramide$



Brown oil (21 mg, 55%)

- <u>Purity</u> : 90% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.52 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8,81 (s, 1H, O<u>H</u>), 8.41 (t, J = 5.0 Hz, 1H, CON<u>H</u>), 7.85-7.74 (m, 4H), 7.49-7.44 (m, 3H), 7.15-7.04 (m, 5H), 5.29-5.22 (m, 1H), 4.20 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.31-3.25 (m, 4H), 2.76 (dd, J = 9.3 Hz and 15.3 Hz, 1H), 2.65 (dd, J = 5.4Hz and 15.3 Hz, 1H), 2.24 (s, 3H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 170.7, 166.0, 135.8, 135.1, 133.7, 133.4, 132.4, 129.4, 129.3, 129.2, 128.3, 127.9, 126.6, 126.2, 59.5, 42.2, 41.6, 37.8, 34.7, 21.1;
- \underline{LC} : $t_r = 2.52$ min, method c ;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 458 (M+H)^+$.

<u>149</u>

(*R*)-*N*-Hydroxy-4-naphthalen-2-yl-3-{4-[(3-phenyl-propionylamino)-methyl]-[1,2,3]triazol-1-yl}-butyramide



Brown solid (43 mg, 82%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.52 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8,81 (s, 1H, O<u>H</u>), 8.03-8.01 (m, 2H), 8.27 (sl, 1H), 7.83-7.67 (m, 4H), 7.50-7.40 (m, 3H), 7.27-7.16 (m, 6H), 5.30-5.20 (m, 1H), 4.20 (sl, 2H), 3.32 (sl, 2H), 2.80-2.63 (m, 4H), 2.37-3.32 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm
 : 171.6, 165.9, 141.7, 135.0, 133.3, 132.3, 128.7, 128.6, 128.2, 127.9, 127.7, 126.5, 126.3, 126.1, 59.2, 41.4, 37.7, 37.3, 34.6, 31.4;
- \underline{LC} : $t_r = 2.50 \text{ min}$, method c ;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 457 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 150-151°C.

<u>148</u>

<u>150</u>

(R)-N-Hydroxy-4-naphthalen-2-yl-3-[4-(3-phenyl-propyl)-[1,2,3]triazol-1-yl]-butyramide



Red oil (48 mg, 98%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.54 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8,83 (s, 1H, O<u>H</u>), 7.82-7.65 (m, 4H), 7.46-7.38 (m, 3H), 7.27-7.06 (m, 6H), 5.26-5.16 (m, 1H), 3.30 (sl, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.83-2.67 (m, 2H), 2.46-2.42 (m, 2H), 1.78-1.71 (m, 2H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm

 166.0, 142.2, 135.2, 133.3, 132.3, 128.8, 128.7, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 126.5, 126.1, 126.0, 122.1, 59.1, 41.4, 38.0, 34.7, 31.2, 24.8;
- \underline{LC} : $t_r = 2.78 \text{ min, method c}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 415 (M+H)^+$.

<u>151</u>

(R) - 3 - [4 - (Benzene sulf on ylamino - methyl) - [1,2,3] triazol - 1 - yl] - N - hydroxy - 4 - naphthalen - 2 - yl-butyramide



Beige solid (25 mg, 47%)

- <u>Purity</u> : 96% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u> : 10.51 (s, 1H, CONHO), 8.80 (s, 1H, OH), 8.09 (sl, 1H, CONH), 7.82-7.76 (m, 5H), 7.60-7.45 (m, 7H), 7.14 (d, J = 8.1Hz, 1H), 5.29-5.18 (m, 1H), 3.93 (sl, 2H), 3.28 (sl, 2H), 2.76-2.64 (m, 2H) ;
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 165.9, 140.7, 134.9, 133.4, 132.8, 132.3, 129.6, 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.0, 126.5, 126.1, 59.3, 41.2, 38.6, 37.6;
- \underline{LC} : $t_r = 2.47 \text{ min, method c}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 466 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 137-138°C.

(*R*)-*N*-*Hydroxy*-4-*naphthalen*-2-*yl*-3-{4-[(toluene-4-sulfonylamino)-methyl]-[1,2,3]triazol-1-yl}-butyramide



beige solid (20 mg, 35%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 10.52 (s, 1H, CON<u>H</u>O), 8.81 (s, 1H, O<u>H</u>), 8.00 (t, 1H, J = 6.0 Hz, CON<u>H</u>), 7.85-7.75 (m, 4H), 7.65(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.47-7.44 (m, 3H), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.25-5.21 (m, 1H), 3.92 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.27 (sl, 2H), 2.71 (dd, J = 8.9 Hz and 15.2Hz, 1H), 2.69 (dd, J = 5.7 Hz and 15.2 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm

 165.9, 143.1, 137.8, 135.0, 133.4, 132.3, 130.0, 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.1, 126.6, 126.2, 59.4, 40.9, 38.5, 37.5, 21.4;
- \underline{LC} : $t_r = 2.55 \text{ min, method c}$;
- <u>MS</u>: (ESI+) $m/z = 480 (M+H)^+$;
- <u>Pf</u>: 115-117°C.

<u>153</u>

(*R*)-3-{4-[(4-Fluoro-benzenesulfonylamino)-methyl]-[1,2,3]triazol-1-yl}-N-hydroxy-4-naphthalen-2-yl-butyramide



Beige solid (40 mg, 60%)

- <u>Purity</u> : 95% ;
- ¹<u>H NMR (DMSO-d6) δ ppm</u>: 7.83-7.75 (m, 6H), 7.51-7.33 (m, 5H), 7.15 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.27-5.23 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.28-3.26 (m, 2H), 2.75 (dd, J = 9.1 Hz and 14.9 Hz, 1H), 2.63 (dd, J = 5.6 Hz and 14.9 Hz, 1H);
- ¹³C NMR (DMSO-d6) δ ppm : 166.0, 162.9, 137.0, 134.9, 133.4, 132.3, 130.1, 130.0, 128.3, 127.9, 127.7, 126.5, 126.1, 116.8, 116.5, 59.2, 41.3, 38.4, 37.5;
- \underline{LC} : $t_r = 2.54$ min, method c ;
- $MS: (ESI+) m/z=484 (M+H)^+;$
- <u>Pf</u>: 157-158°C.

226

<u>152</u>

Liaison du composé 44619 à IDE 5

	IDE-CF-WT
	143
Data Collection	
Beamline	APS 19ID
Wavelength (Å)	0.9793
Space group	P65
Cell dimension(Å)	
а	263.0
b	263.0
с	90.6
Resolution (Å)	50-3.3
Rsym (%) ^a	17.9(45.6) ^e
I/sigma	6.8(2.2) ^e
Redundancy ^b	2.9(2.6) ^e
Completeness (%)	98.9(99.6) ^e
Unique reflections	51394
Refinement	
R _{work} ^c	0.173
R _{free} ^d	0.233
No. atoms	
Protein	15516
Water	115
B-factors	
IDE	38.5
Compound	92.9
Water	27.6
r.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.016
Bond angles (°)	1.711
Ramachandran plot (%)	
Favorable region	88.4/ 87.7
Allowed region	11.4 / 12.2
Generously allowed region	0.1 / 0.1
Disallowed region	0 / 0
PDE code	3R3N

 Tableau 25.
 XRay data collection and refinement statistics.

^a $R_{\text{merge}} = \Sigma (I - \langle I \rangle) / \Sigma \langle I \rangle$ ^b $N_{\text{obs}} / N_{\text{unique}}$

 $^{c}R_{\text{work}} = \Sigma_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}|| / \Sigma_{hkl} |F_{\text{obs}}|$

 ${}^{d}\boldsymbol{R}_{\text{free}}$, calculated the same as for \mathbf{R}_{work} but on the 5% data excluded from the refinement calculation. ^e the outer resolution shell. Values in parentheses indicate the highest resolution shell

Bibliographie

- 1. Mirsky, I.A. and Broh-Kahn, R.H., The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Archiv. Biochem.*, **1949**. 20: p. 1.
- 2. Shen, Y., Joachimiak, A., Rosner, M.R., and Tang, W.J., Structures of human insulindegrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*, **2006**. 443: p. 870.
- 3. Duckworth, W.C., Bennett, R.G., and Hamel, F.G., Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocr. Rev.*, **1998**. 19: p. 608.
- 4. Malito, E., Hulse, R., and Tang, W.J., Amyloid β-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**. 65(16): p. 2574.
- 5. Qiu, W.Q. and Folstein, M.F., Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of Aging*, **2006**. 27(2): p. 190.
- 6. Jahn, T.R. and Radford, S.E., Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**. 469(1): p. 100.
- 7. Perlman, R.K., Gehm, B.D., Kuo, W.L., and Rosner, M.R., Functional analysis of conserved residues in the active site of insulin-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.*, **1993**. 268(29): p. 21538.
- 8. Malito, E., Ralat, L.A., Manolopoulou, M., Tsay, J.L., Wadlington, N.L., and Tang, W.J., Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry*, **2008**. 47(48): p. 12822.
- 9. Guo, Q., Manolopoulou, M., Bian, Y., Schilling, A.B., and Tang, W.-J., Molecular Basis for the Recognition and Cleavages of IGF-II, TGF-[alpha], and Amylin by Human Insulin-Degrading Enzyme. *J. Mol. Biol.*, **2010**. 395(2): p. 430.
- Manolopoulou, M., Guo, Q., Malito, E., Schilling, A.B., and Tang, W.J., Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulindegrading enzyme. J. Biol. Chem., 2009. 284(21): p. 14177.
- Song, E.S., Juliano, M.A., Juliano, L., and Hersh, L.B., Substrate activation of insulindegrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. J. Biol. Chem., 2003. 278(50): p. 49789.
- 12. Im, H., Manolopoulou, M., Malito, E., Shen, Y., Zhao, J., Neant-Fery, M., Sun, C.Y., Meredith, S.C., Sisodia, S.S., Leissring, M.A., and Tang, W.J., Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J. Biol. Chem.*, **2007**. 282(35): p. 25453.
- 13. Song, E.S., Rodgers, D.W., and Hersh, L.B., A Monomeric Variant of Insulin Degrading Enzyme (IDE) Loses Its Regulatory Properties. *PLoS ONE*, **2010**. 5(3): p. e9719.
- 14. Leissring, M.A. and Selkoe, D.J., Structural biology: enzyme target to latch on to. *Nature*, **2006**. 443: p. 761.
- 15. Fernandez-Gamba, A., Leal, M.C., Morelli, L., and Castano, E.M., Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Current Pharmaceutical Design*, **2009**. 15(31): p. 3644.
- 16. Kurochkin, I.V., Amyloidogenic determinant as a substrate recognition motif of insulindegrading enzyme. *FEBS Letters*, **1998**. 427(2): p. 153.
- 17. Ralat, L.A., Kalas, V., Zheng, Z., Goldman, R.D., Sosnick, T.R., and Tang, W.-J., Ubiquitin Is a Novel Substrate for Human Insulin-Degrading Enzyme. *J. Mol. Biol.*, **2011**. 406(3): p. 454.
- 18. Saric, T., Muller, D., Seitz, H.J., and Pavelic, K., Non-covalent interaction of ubiquitin with insulin-degrading enzyme. *Mol. Cell. Endo.*, **2003**. 204(1-2): p. 11.
- 19. Grasso, G., Rizzarelli, E., and Spoto, G., How the binding and degrading capabilities of insulin degrading enzyme are affected by ubiquitin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008. 1784(7-8): p. 1122.
- 20. Camberos, M.C., Perez, A.A., Udrisar, D.P., Wanderley, M.I., and Cresto, J.C., ATP Inhibits Insulin-Degrading Enzyme Activity. *Exp. Biol. Med.*, **2001**. 226(4): p. 334.
- 21. Camberos, M.C. and Cresto, J.C., Insulin-Degrading Enzyme Hydrolyzes ATP. *Exp. Biol. Med.*, **2007**. 232(2): p. 281.
- 22. Song, E.S., Juliano, M.A., Juliano, L., Fried, M.G., Wagner, S.L., and Hersh, L.B., ATP Effects on Insulin-degrading Enzyme Are Mediated Primarily through Its Triphosphate Moiety. *J. Biol. Chem.*, **2004**. 279(52): p. 54216.

- 23. Yao, H. and Hersh, L.B., Characterization of the binding of the fluorescent ATP analog TNP-ATP to insulysin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2006**. 451(2): p. 175.
- 24. Chou, Y.H., Kuo, W.L., Rosner, M.R., Tang, W.J., and Goldman, R.D., Structural changes in intermediate filament networks alter the activity of insulin-degrading enzyme. *FASEB Journal*, **2009**. 23(11): p. 3734.
- 25. Fawcett, J., Permana, P.A., Levy, J.L., and Duckworth, W.C., Regulation of protein degradation by insulin-degrading enzyme: analysis by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2007**. 468(1): p. 128.
- 26. Bennett, R.G., Hamel, F.G., and Duckworth, W.C., Identification and isolation of a cytosolic proteolytic complex containing insulin degrading enzyme and the multicatalytic proteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1994**. 202(2): p. 1047.
- 27. Duckworth, W.C., Bennett, R.G., and Hamel, F.G., A direct inhibitory effect of insulin on a cytosolic proteolytic complex containing insulin-degrading enzyme and multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.*, **1994**. 269(40): p. 24575.
- 28. Bennett, R.G., Hamel, F.G., and Duckworth, W.C., Characterization of the insulin inhibition of the peptidolytic activities of the insulin-degrading enzyme-proteasome complex. *Diabetes*, **1997**. 46(2): p. 197.
- 29. Duckworth, W.C., Bennett, R.G., and Hamel, F.G., Insulin acts intracellularly on proteasomes through insulin-degrading enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1998**. 244(2): p. 390.
- 30. Bennett, R.G., Hamel, F.G., and Duckworth, W.C., Insulin inhibits the ubiquitin-dependent degrading activity of the 26S proteasome. *Endocrinology*, **2000**. 141(7): p. 2508.
- 31. Fawcett, J. and Duckworth, W.C., Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulindegrading enzyme the missing link? *Diabetologia*, **2009**. 52(8): p. 1457.
- 32. Hamel, F.G., Fawcett, J., Tsui, B.T., Bennett, R.G., and Duckworth, W.C., Effect of nelfinavir on insulin metabolism, proteasome activity and protein degradation in HepG2 cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **2006**. 8(6): p. 661.
- Hamel, F.G., Bennett, R.G., and Duckworth, W.C., Regulation of Multicatalytic Enzyme Activity by Insulin and the Insulin-Degrading Enzyme. *Endocrinology*, **1998**. 139(10): p. 4061.
- 34. Craft, S. and Stennis Watson, G., Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *The Lancet Neurology*, **2004**. 3(3): p. 169.
- 35. Fakhrai-Rad, H., Nikoshkov, A., Kamel, A., Fernstrom, M., Zierath, J.R., Norgren, S., Luthman, H., and Galli, J., Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Human Molecular Genetics*, **2000**. 9(14): p. 2149.
- 36. Bennett, R.G., Hamel, F.G., and Duckworth, W.C., An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures. *Diabetes*, **2003**. 52(9): p. 2315.
- 37. Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., and Thiele, D.L., Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.*, **2003**. 100(10): p. 6221.
- 38. Farris, W., Mansourian, S., Leissring, M.A., Eckman, E.A., Bertram, L., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., and Selkoe, D.J., Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am. J. Path.*, **2004**. 164(4): p. 1425.
- 39. Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Stetka, B., and Pasinetti, G.M., Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, **2007**. 28(6): p. 824.
- 40. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D., Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.*, **1993**. 90(5): p. 1977.
- 41. Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.W., Kovacina, K.S., and Craft, S., Reduced hippocampal insulindegrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein Eepsilon4 allele. *Am. J. Path.*, **2003**. 162(1): p. 313.

- 42. Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J., Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*, **2003**. 40(6): p. 1087.
- 43. Messier, C. and Teutenberg, K., The Role of Insulin, Insulin Growth Factor, and Insulin-Degrading Enzyme in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity*, **2005**. 12(4): p. 311.
- 44. Neant-Fery, M., Garcia-Ordoñez, R.n.D., Logan, T.P., Selkoe, D.J., Li, L., Reinstatler, L., and Leissring, M.A., Molecular basis for the thiol sensitivity of insulin-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad.Sci.*, **2008**. 105(28): p. 9582.
- 45. Li, Q., Ali, M.A., and Cohen, J.I., Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell*, **2006**. 127(2): p. 305.
- 46. Jacobsen, J.A., Major Jourden, J.L., Miller, M.T., and Cohen, S.M., To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim. Biophys. Acta Mol.Cell Res.*, **2010**. 1803(1): p. 72.
- 47. Zorn, J.A. and Wells, J.A., Turning enzymes ON with small molecules. *Nat Chem Biol*, **2010**. 6(3): p. 179.
- 48. Leissring, M.A., Malito, E., Hedouin, S., Reinstatler, L., Sahara, T., Abdul-Hay, S.O., Choudhry, S., Maharvi, G.M., Fauq, A.H., Huzarska, M., May, P.S., Choi, S., Logan, T.P., Turk, B.E., Cantley, L.C., Manolopoulou, M., Tang, W.-J., Stein, R.L., Cuny, G.D., and Selkoe, D.J., Designed Inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme Regulate the Catabolism and Activity of Insulin. *PLoS ONE*, **2010**. 5(5): p. e10504.
- 49. Ding, L., Becker, A.B., Suzuki, A., and Roth, R.A., Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and Escherichia coli protease III. *J. Biol. Chem.*, **1992**. 267(4): p. 2414.
- 50. Leissring, M.A., Selkoe, D., Cuny, G.D., Choi, S.H., Stein, R.L., Turk, B., and Cantley, L.C. Hydroxamate inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme and uses thereof. WO 2008/156701, 13 June 2008, **2008**.
- 51. Adessi, C., Enderle, T., Grueninger, F., and Roth, D. Activator for insulin degrading enzyme. WO2006066847, 29th Jun., **2006**.
- 52. Cabrol, C., Huzarska, M.A., Dinolfo, C., Rodriguez, M.C., Reinstatler, L., Ni, J., Yeh, L.-A., Cuny, G.D., Stein, R.L., Selkoe, D.J., and Leissring, M.A., Small-Molecule Activators of Insulin-Degrading Enzyme Discovered through High-Throughput Compound Screening. *PLoS ONE*, **2009**. 4(4): p. e5274.
- 53. IDF. IDF Diabetes Atlas, 4th edition. 2009 [cited 2011 05/17]; Available from: http://www.diabetesatlas.org/sites/default/files/At%20a%20Glance WORLD.pdf.
- 54. LECMA. Alzheimer en France et dans le monde. 2011 [cited 2011 05/17]; Available from: http://www.maladiealzheimer.fr/maladie_france.php.
- 55. Abbenante, G. and Fairlie, D.P., Protease inhibitors in the clinic. *Medecinal Chemistry*, **2005**. 1: p. 71.
- 56. Puerta, D.T. and Cohen, S.M., A bioinorganic perspective on matrix metalloproteinase inhibition. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**. 4(15): p. 1551.
- 57. Charton, J., Charruault, L., Deprez-Poulain, R., and Deprez, B., Alkylsquarates as key intermediates for the rapid preparation of original drug-inspired compounds. *CCHTS*, **2008**. 11(4): p. 294.
- 58. Flipo, M., Beghyn, T., Charton, J., Leroux, V.A., Deprez, B.P., and Deprez-Poulain, R.F., A library of novel hydroxamic acids targeting the metallo-protease family: Design, parallel synthesis and screening. *BMC*, **2007**. 15(1): p. 63.
- 59. Deprez-Poulain, R.F., Charton, J., Leroux, V., and Deprez, B.P., Convenient synthesis of 4H-1,2,4-triazole-3-thiols using di-2-pyridylthionocarbonate. *Tet. Lett.*, **2007**. 48(46): p. 8157.
- 60. Charton, J., Déprez, B.P., and Déprez-Poulain, R.F., Synthesis of a 200-member library of squaric acid N-hydroxylamide amides. *BMCL*, **2008**. 18(18): p. 4968.
- 61. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**. 46(1-3): p. 3.
- 62. Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.-Y., Smith, B.R., Ward, K.W., and Kopple, K.D., Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.*, **2002**. 45(12): p. 2615.

- 63. Martin, Y.C., A Bioavailability Score. J. Med. Chem., 2005. 48(9): p. 3164.
- 64. Marmé, N., Knemeyer, J.-P., Sauer, M., and Wolfrum, J., Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *Bioconjugate Chemistry*, **2003**. 14(6): p. 1133.
- 65. Marmé, N., Knemeyer, J.-P., Wolfrum, J., and Sauer, M., Highly Sensitive Protease Assay Using Fluorescence Quenching of Peptide Probes Based on Photoinduced Electron Transfer. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**. 43(29): p. 3798.
- 66. Smyth, D.G., Nagamatsu, A., and Fruton, J.S., Some Reactions of N-Ethylmaleimide1. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**. 82(17): p. 4600.
- 67. Antunes, F., Marinho, H.S., Barreto, M.C., Pavão, M.L., and Pinto, R.E., Diagnosis of enzyme inhibition based on the degree of inhibition. *Biochim. Biophys. Acta General Subjects*, **2003**. 1624(1-3): p. 11.
- 68. Blat, Y., Non-Competitive Inhibition by Active Site Binders. *Chemical Biology & Drug Design*, **2010**. 75(6): p. 535.
- 69. Engel, C.K., Pirard, B., Schimanski, S., Kirsch, R., Habermann, J., Klingler, O., Schlotte, V., Weithmann, K.U., and Wendt, K.U., Structural Basis for the Highly Selective Inhibition of MMP-13. *Chemistry & Biology*, **2005**. 12(2): p. 181.
- 70. Šilhár, P., Capkovà, K., Salzameda, N.T., Barbieri, J.T., Hixon, M.S., and Janda, K.D., Botulinum Neurotoxin A Protease: Discovery of Natural Product Exosite Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**. 132(9): p. 2868.
- De Jong, K.L., Incledon, B., Yip, C.M., and DeFelippis, M.R., Amyloid Fibrils of Glucagon Characterized by High-Resolution Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 2006. 91(5): p. 1905.
- 72. Onoue, S., Ohshima, K., Debari, K., Koh, K., Shioda, S., Iwasa, S., Kashimoto, K., and Yajima, T., Mishandling of the Therapeutic Peptide Glucagon Generates Cytotoxic Amyloidogenic Fibrils. *Pharmaceutical Research*, **2004**. 21(7): p. 1274.
- 73. Christopher D. Putnam, Michal Hammel, Hura, G.L., and Tainer, J.A., X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.*, 2007. 40(3): p. 191.
- 74. Wilkinson, R.G., Fields, T.L., and Boothe, J.H., Total Synthesis of Tetracyclines.1 III.2 Synthesis of a Tricyclic Model System. *J. Org. Chem.*, **1961**. 26(3): p. 637.
- Pirrung, M.C., Han, H., and Chen, J., O-Alkyl Hydroxamates as Metaphors of Enzyme-Bound Enolate Intermediates in Hydroxy Acid Dehydrogenases. Inhibitors of Isopropylmalate Dehydrogenase, Isocitrate Dehydrogenase, and Tartrate Dehydrogenase1. J. Org. Chem., 1996. 61(14): p. 4527.
- 76. Jain, R. and Cohen, L.A., Regiospecific alkylation of histidine and histamine at N-1 ([tau]). *Tetrahedron*, **1996**. 52(15): p. 5363.
- 77. Kolb, H.C., Finn, M.G., and Sharpless, K.B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**. 40(11): p. 2004.
- 78. Kolb, H.C. and Sharpless, K.B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, **2003**. 8(24): p. 1128.
- 79. Lewis, W.G., Green, L.G., Grynszpan, F., Radić, Z., Carlier, P.R., Taylor, P., Finn, M.G., and Sharpless, K.B., Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**. 41(6): p. 1053.
- Mock, W.L., Irra, T.A., Wepsiec, J.P., and Adhya, M., Catalysis by cucurbituril. The significance of bound-substrate destabilization for induced triazole formation. *J. Org. Chem.*, 1989. 54(22): p. 5302.
- Mocharla, V.P., Colasson, B., Lee, L.V., Röper, S., Sharpless, K.B., Wong, C.-H., and Kolb, H.C., In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005. 44(1): p. 116.
- 82. Whiting, M., Muldoon, J., Lin, Y.-C., Silverman, S.M., Lindstrom, W., Olson, A.J., Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., Elder, J.H., and Fokin, V.V., Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**. 45(9): p. 1435.

- Willand, N., Desroses, M., Toto, P., Dirié, B., Lens, Z., Villeret, V., Rucktooa, P., Locht, C., Baulard, A., and Deprez, B., Exploring Drug Target Flexibility Using in Situ Click Chemistry: Application to a Mycobacterial Transcriptional Regulator. *ACS Chem. Biol.*, **2010**. 5(11): p. 1007.
- Goddard-Borger, E.D. and Stick, R.V., An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.*, 2007. 9(19): p. 3797.
- Deprez, B., Williard, X., Bourel, L., Coste, H., Hyafil, F., and Tartar, A., Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**. 117(19): p. 5405.
- 86. Rasmussen, L.K., Boren, B.C., and Fokin, V.V., Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Aryl Azides and Alkynes. *Org. Lett.*, **2007**. 9(26): p. 5337.
- 87. Vingtdeux, V., Hamdane, M., Bégard, S., Loyens, A., Delacourte, A., Beauvillain, J.-C., Buée, L., Marambaud, P., and Sergeant, N., Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiology of Disease*, **2007**. 25(3): p. 686.
- Levy, D.E., Lapierre, F., Liang, W., Ye, W., Lange, C.W., Li, X., Grobelny, D., Casabonne, M., Tyrrell, D., Holme, K., Nadzan, A., and Galardy, R.E., Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Structure-Activity Study. J. Med. Chem., 1998. 41(2): p. 199.
- 89. Wang, J., Uttamchandani, M., Li, J., Hu, M., and Yao, S.Q., Rapid Assembly of Matrix Metalloprotease Inhibitors Using Click Chemistry. *Org. Lett.*, **2006**. 8(17): p. 3821.

Table des figures

F		10
FIGURE 1.	NOMBRE DE PUBLICATIONS SUR L'INSULIN-DEGRADING ENZYME PAR AN	10
FIGURE 2.		11
FIGURE 3.	ALIGNEMENT DES SEQUENCES IDE HUMAINE, SOURIS ET RAT	11
FIGURE 4.		12
FIGURE 5.	RESIDUS PLUS OU MOINS IMPLIQUES DANS L'AGREGATION DE L'INSULINE, DU PEPTIDE AP ₁₋₄₂ ET DE L'AMYLINE	13
FIGURE 6.		13
FIGURE 7.	L ATOME DE ZINC EST COORDONNE PAR DEUX HISTIDINES ET DEUX GLUTAMATES	14
FIGURE 8.	Details des interactions entre le peptide $A\beta_{1-40}$ et le site catalytique	14
FIGURE 9.	LOCALISATION DU SITE ACTIF ET DE L'EXOSITE (PDB : 2JG4)	15
FIGURE 10.	CHANGEMENT CONFORMATIONNEL DES SUBSTRATS APRES LIAISON A IDE	16
FIGURE 11.	VUES ORTHOGONALES DU DIMERE	17
FIGURE 12.	CYCLE CATALYTIQUE D'IDE	18
FIGURE 13.	MECANISME ENZYMATIQUE D'IDE	19
FIGURE 14.	LES RESIDUS EN P1 ET P1' DES SUBSTRATS SONT HYDROPHOBES OU BASIQUES	19
FIGURE 15.	Comparaison des sequences se liant au site catalytique	20
FIGURE 16.	COMPLEMENTARITE DE CHARGE ENTRE IDE ET LE SUBSTRAT	20
FIGURE 17.	INFLUENCE DE LA CHARGE DE L'EXTREMITE C-TERMINALE SUR LA DEGRADATION PAR IDE	20
FIGURE 18.	REGULATION D'IDE PAR LA NESTINE	23
FIGURE 19.	INTERACTIONS IDE-PROTEASOME	25
FIGURE 20.	Production du peptide A eta a partir de l'APP	27
FIGURE 21.	Competition entre l'insuline et le peptide A eta	29
FIGURE 22.	METHODES D'ACTIVATION D'UNE ENZYME	30
FIGURE 23.	INHIBITEURS NON SELECTIFS D'IDE	31
FIGURE 24.	Structure du Nelfinavir	31
FIGURE 25.	II1 : INHIBITEUR HYDROXAMATE PEPTIDOMIMETIQUE D'IDE	32
FIGURE 26.	Structure de la suramine	32
FIGURE 27.	IA1 ET IA2 : ACTIVATEURS D'IDE	33
FIGURE 28.	INHIBITEURS D'ACE	37
FIGURE 29.	A- PROPORTION DE MOLECULES ACIDES DANS LES CHIMIOTHEQUES COMMERCIALES	37
FIGURE 30.	ZBG UTILISES POUR LA CHIMIOTHEQUE	38
FIGURE 31.	PROPRIETES DE DRUGABILITE DE LA CHIMIOTHEQUE DE COMPOSES LIGANDS DU ZINC	39
FIGURE 32.	Principe du test enzymatique	40
FIGURE 33.	Sites de coupure du peptide A $eta_{1\text{-}40}$	40
FIGURE 34.	Arbre decisionnel du criblage	42
FIGURE 35.	f 1 : inhibiteur de l'hydrolyse du peptide A eta	42
FIGURE 36.	Courbe dose-reponse du compose ${f 1}$ de l'hydrolyse du peptide A eta	44
FIGURE 37.	DETERMINATION DE LA REVERSIBILITE DE L'INHIBITION	45
FIGURE 38.	Reversibilite de la liaison du compose ${f 1}$ a l'IDE	46
FIGURE 39.	DETERMINATION DU CARACTERE DE L'INHIBITION	47
FIGURE 40.	Determination du caractere d'inhibition ($\epsilon_i = f(\epsilon_i/[1])$)	47
FIGURE 41.	DETERMINATION DE LA NATURE DE L'INHIBITION	49
FIGURE 42.	Determination de la nature de l'inhibition (1/ ϵ_i = f([S]))	50
FIGURE 43.	Cristallographie du compose 1 dans l'enzyme	50
FIGURE 44.	Mode de liaison du compose 1 au site catalytique	51
FIGURE 45.	Mode de liaison du compose 1 a l'exosite	52
FIGURE 46.	Courbes dose-reponse du compose ${f 1}$ de l'hydrolyse d'A eta	53
FIGURE 47.	MISE EN SOLUTION DU GLUCAGON EN PRESENCE DE SOLVANT OU DE L'ENZYME	54
FIGURE 48.	Le glucagon prepare a partir du Glucagen \degree ne s'agrege pas	55
FIGURE 49.	CINETIQUES D'HYDROLYSE DES SUBSTRATS PAR IDE	55

FIGURE 50.	RESULTATS D'HYDROLYSE DE 4 SUBSTRATS PAR IDE EN PRESENCE DU COMPOSE 1	56
FIGURE 51.	COURBE DOSE-REPONSE DU COMPOSE 1 SUR L'HYDROLYSE DE L'INSULINE	56
FIGURE 52.	LE COMPOSE DIFFUSE D'UN SITE A L'AUTRE	57
FIGURE 53.	A) PROFIL DE DIFFUSION : $I = F(Q)$; B) TRACE DE GUINIER : $LN(I) = F(Q^2)$	59
FIGURE 54.	2 : ANALOGUE OPTIMISE DU COMPOSE 1	60
FIGURE 55.	3 : PRECURSEUR ESTER DU COMPOSE 2	60
FIGURE 56.	EXPRESSION D'IDE DANS LES CELLULES SY5Y, LIGNEES SWE ET WT	61
FIGURE 57.	Effet du compose 3 sur le taux extracellulaire d'A β	61
FIGURE 58.	Production et degradation du peptide A eta extracellulaire	62
FIGURE 59.	PATHWAY DE L'INSULINE	62
FIGURE 60.	MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE DU COMPOSE 1	64
FIGURE 61.	DEUXIEME MODIFICATION DE LA STRUCTURE DU COMPOSE 1	64
FIGURE 62.	MODIFICATION DE L'HISTIDINE	64
FIGURE 63.	L'IMIDAZOLE EST IMPORTANT POUR LA LIAISON A L'ENZYME	67
FIGURE 64.	GROUPEMENT BENZYLE DANS LA POCHE AU SITE CATALYTIQUE	67
FIGURE 65.	MODIFICATION DU GROUPEMENT BENZYLE	68
FIGURE 66.	LIAISON DES ANALOGUES A L'EXOSITE	71
FIGURE 67.	IMPACT DE LA CHARGE POSITIVE	72
FIGURE 68.	DETAIL DE LA LIAISON ENTRE E111 ET L'AMINE TERTIAIRE DU COMPOSE 1	76
FIGURE 69.	PHARMACOMODULATION DE LA FONCTION ESTER	76
FIGURE 70.	INTERACTION ENTRE LA FONCTION ESTER METHYLIQUE ET N139	80
FIGURE 71.	PHARMACOMODULATION DE LA FONCTION ACIDE	82
FIGURE 72.	Synthese DU Compose 96	82
FIGURE 73.	Synthese DU Compose 98	83
FIGURE 74.	Synthese DU Compose 93	83
FIGURE 75.	Synthese DU Compose 94	83
FIGURE 76.	Synthese DU Compose 99	84
FIGURE 77.	SYNTHESE DU COMPOSE 97	84
FIGURE 78.	SYNTHESE DU COMPOSE 95	84
FIGURE 79.	LA FONCTION ACIDE POINTE VERS L'INTERIEUR DE LA CHAMBRE CATALYTIQUE	86
FIGURE 80.	ORIENTATION DE L'IMIDAZOLE DANS L'ENZYME	88
FIGURE 81.	STRUCTURES DES COMPOSES DE LA CHIMIOTHEQUE	88
FIGURE 82.	SOUS-PRODUITS PROBABLES	89
FIGURE 83.	METHODE D'ALKYLATION REGIOSELECTIVE DECRITE PAR JAIN ET COHEN.	90
FIGURE 84.	DEPROTECTION PAR REACTION AVEC UN ALCOOL	90
FIGURE 85.	MISE EN ŒUVRE PREVUE DE LA CHIMIOTHEQUE	91
FIGURE 86.	POSITION DE LA FONCTION ESTER METHYLIQUE AUX DEUX SITES DE LIAISON	92
FIGURE 87.	STRUCTURE DES COMPOSES DE LA CHIMIOTHEQUE	92
FIGURE 88.	STATISTIQUES DES COMPOSES FINIS DE LA CHIMIOTHEQUE	93
FIGURE 89.	2 DES AMINES UTILISEES POUR LA MISE AU POINT DE LA CHIMIOTHEQUE	94
FIGURE 90.	ARBRE DECISINNEL DE LA MISE EN ŒUVRE DE LA CHIMIOTHEQUE	97
FIGURE 91.	RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DU COMPOSE 1	99
FIGURE 92.	STRUCTURE DU CUCURBITURILE	101
FIGURE 93.	PRINCIPE DE LA CLICK CHEMISTRY IN SITU.	102
FIGURE 94.	PREFERENCE DES ACIDE-AMINES AU SITE DE CLIVAGE D'IDE	103
FIGURE 95.	II1 : INHIBITEUR PEPTIDOMIMETIQUE	103
FIGURE 96.	INTERACTIONS DE II1 AVEC LE SITE CATALYTIQUE D'IDE	103
FIGURE 97.	STRUCTURE DES COMPOSES AZOTURES HYDROXAMIQUES 124 ET 125	104
FIGURE 98.	PRINCIPE DES CLUSTERS ORTHOGONAUX	105
FIGURE 99.	REPARTITION DES ALCYNES EN FONCTION DES CLUSTERS	105
FIGURE 100.	MISE EN ŒUVRE DE LA REACTION DE CLICK CHEMISTRY IN SITU	107

FIGURE 101.	CRITERES DE SELECTION DES COMPOSES RESYNTHETISES	108
FIGURE 102.	LIAISON DU COMPOSE 143 DANS L'ENZYME	110
FIGURE 103.	SUPERPOSITION DES INHIBITEURS 143, II1 ET 1	111

Table des schémas

SCHEMA 1.	REGULATION DU TAUX DE GLYCEMIE PAR L'INSULINE, L'AMYLINE ET LE GLUCAGON	26
SCHEMA 2.	Synthese DU Peptide ATTO655-A $\beta_{16\text{-}23}$	41
SCHEMA 3.	Synthese generale des composes	65
SCHEMA 4.	PREPARATION DE L'ESTER METHYLIQUE DE LA L-S-TRITYLE CYSTEINE 10	65
SCHEMA 5.	Synthese du compose 7	65
SCHEMA 6.	VOIE DE SYNTHESE GENERALE POUR LA MODIFICATION OUEST	68
SCHEMA 7.	Synthese DU COMPOSE 12	69
SCHEMA 8.	VOIE DE SYNTHESE DU COMPOSE 23	69
SCHEMA 9.	VOIE DE SYNTHESE GENERALE D'ACYLATION	73
SCHEMA 10.	Synthese DU COMPOSE 54	73
SCHEMA 11.	Synthese DU COMPOSE 56	74
SCHEMA 12.	VOIE DE SYNTHESE GENERALE DES COMPOSES	77
SCHEMA 13.	PREPARATION DE L'ESTER ISOBUTYLIQUE DE LA L-HISTIDINE 84	77
SCHEMA 14.	PREPARATION DE L'ESTER ISOPROPYLIQUE DE LA L-HISTIDINE 86	77
SCHEMA 15.	PREPARATION DE LA L-5-HISTAMINYL-3-METHYL-OXADIAZOLE 88	77
SCHEMA 16.	Preparation de la N-dimethylamide de la L-Histidine 90	78
SCHEMA 17.	Synthese DU COMPOSE 74	78
SCHEMA 18.	Synthese des composes 55 et 2	78
SCHEMA 19.	SAPONIFICATION DU COMPOSE 1	78
SCHEMA 20.	ALKYLATION DE L'IMIDAZOLE A PARTIR DU COMPOSE 1	89
SCHEMA 21.	PREMIERE VOIE ENVISAGEE	91
SCHEMA 22.	VOIE DE SYNTHESE <i>VIA</i> L'OUVERTURE DE L'UREE	91
SCHEMA 23.	VOIE DE SYNTHESE POUR LA CHIMIOTHEQUE	93
SCHEMA 24.	Formation des amides	94
SCHEMA 25.	DEPROTECTION DES AMINES	95
SCHEMA 26.	Formation des composes finaux	96
SCHEMA 27.	REACTION 1,3 DIPOLAIRE DE HUISGEN	101
SCHEMA 28.	Synthese des precurseurs azotures	104
SCHEMA 29.	Synthese des alcynes	104
SCHEMA 30.	Synthese des differents regioisomeres	106
SCHEMA 31.	RESYNTHESE DES COMPOSES 142-153	108

Table des tableaux

TABLEAU 1.	RECAPITULATIF DE L'EFFET DE CERTAINS ACTEURS BIOLOGIQUES SUR IDE	24
TABLEAU 2.	MODULATEURS DECRITS D'IDE	33
TABLEAU 3.	STRUCTURE DES ZBG LES PLUS COURANTS'	36
TABLEAU 4.	PROPRIETES DU COMPOSE 1	43
TABLEAU 5.	RESULTATS DU COMPOSE 3 SUR LA VOIE DE L'INSULINE	62
TABLEAU 6.	CHANGEMENT D'ACIDE AMINE AU NORD	66
TABLEAU 7.	MODIFICATION DU GROUPEMENT HYDROPHOBE A L'OUEST	70
TABLEAU 8.	EFFET DE LA CHIRALITE SUR L'ACTIVITE	72
TABLEAU 9.	MODIFICATION DE LA CHARGE POSITIVE	75
TABLEAU 10.	MODULATIONS DE L'ESTER HYDROLYSABLE A L'EST EN SERIE BENZYLE	79
TABLEAU 11.	MODULATIONS DE L'ESTER HYDROLYSABLE A L'EST EN SERIE PHENYLPROPYLE	80
TABLEAU 12.	CHANGEMENT DE LA FONCTION ACIDE AU SUD	85
TABLEAU 13.	ACTIVITE DU COMPOSE 82	87
TABLEAU 14.	Activite des composes alkyles en τ 114-116	87
TABLEAU 15.	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES ANALOGUES METHYLAMIDES	93
TABLEAU 16.	CONDITIONS TESTEES	94
TABLEAU 17.	MODIFICATION DE L'ECHELLE DE REACTION	95
TABLEAU 18.	MODIFICATION DU TEMPS DE REACTION	95
TABLEAU 19.	ACTIVITE DES COMPOSES ACTIFS ISSUS DE LA CHIMIOTHEQUE	98
TABLEAU 20.	CONDITIONS TESTEES POUR LA SYNTHESE DES TRIAZOLES 1,5	. 107
TABLEAU 21.	ACTIVITÉS DES COMPOSÉS	. 109
TABLEAU 22.	PROPRIETES DU COMPOSE 144	. 110
TABLEAU 23.	XRAY DATA COLLECTION AND REFINEMENT STATISTICS.	. 121
TABLEAU 24.	ANTIBODIES USED IN IMMUNOBLOTTING STUDIES.	. 125
TABLEAU 25.	XRAY DATA COLLECTION AND REFINEMENT STATISTICS.	. 227

Résumé

IDE (Insulin-Degrading Enzyme) est une métalloenzyme à zinc découverte en 1949 mais dont les mécanismes d'actions et les rôles sont encore peu connus. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation de plusieurs peptides physiologiques. Plusieurs études lient la maladie d'Alzheimer et le diabète de type II à IDE. En effet, parmi ses substrats, l'enzyme compte le peptide β -amyloïde (A β) responsable des plaques séniles de la maladie d'Alzheimer et l'insuline régulant la glycémie.

En 2006, l'équipe du Pr. Tang a élucidé la structure cristallographique de l'insulysine qui a révélée que les substrats se lient à deux sites de l'enzyme : le site catalytique et un exosite.

Grâce au criblage de la chimiothèque du laboratoire sur IDE, nous avons découvert un composé modulant de façon substrat-dépendante l'activité d'IDE. Ce composé a été cristallisé dans l'enzyme et il s'avère qu'il peut se lier aux deux sites importants pour l'hydrolyse des substrats: le site catalytique et l'exosite. Ce mode de liaison est cohérent avec le fait que le composé se comporte comme un activateur ou un inhibiteur en fonction du substrat. 80 analogues ont été synthétisés pour améliorer l'activité et la perméation cellulaire du hit.

La modulation substrat-dépendante de la protéase permet d'envisager l'obtention d'outils chimiques pour l'étude de la fonction de cette enzyme et ouvre de nouvelles perspectives dans des pathologies où des substrats d'IDE seraient impliqués.

En parallèle, une réaction de Click Chemistry *in situ* a été effectuée et a permis l'identification de 32 ligands parmi 180 composés potentiels. 12 ont été resynthétisés et ont montré une activité inhibitrice de l'enzyme. Ces composés possèdent une fonction hydroxamate et se lient donc au site catalytique inhibant l'enzyme quelque soit son substrat. La co-cristallisation d'un des composés avec l'enzyme a confirmé ce mode de liaison.

Mots-clés : Insulin-Degrading Enzyme, IDE, exosite, cristallisation, modulation substratdépendante, Click Chemistry *in situ*

Abstract

Insulin-Degrading Enzyme (IDE) is a zinc metalloprotease implicated in the clearance of numerous physiological peptides, in particular beta-amyloid (A β) peptide and insulin, respectively implicated in Alzheimer's disease and Diabetes.

Tang *et al.* elucidated the X-ray structure of the human IDE and found that substrates have two anchoring sites : the catalytic site at the zinc and an exosite which are both key features for the binding and hydrolysis.

In our laboratory, we have screened a 2080-compound library on the enzyme and found a 5 μ M hit inhibitor of A β hydrolysis. X-ray analysis of ligand-enzyme complexes, revealed that unexpectedly these compounds are either ligands of the catalytically site or the exosite of IDE.

Consistently with their peculiar binding mode, these compounds behave as inhibitors or activators of the enzyme in a substrate-dependent manner.

We made several chemical modulations on the hit structure and synthesized about 80 analogues to increase both potency and cell permeation.

The mode of action of our compounds opens new avenues for the study of the function of IDE and for the design of therapeutic interventions.

In the mean time, an *in situ* Click Chemistry experiment led to the identification of 32 ligands over 180 potential compounds. 12 compounds were resynthesised and showed inhibitory activities on the enzyme for all substrats. Co-crystallisation confirmed the binding to the catalytical site thanks to a hydroxamate function.

Keywords : Insulin-Degrading Enzyme, IDE, exosite, crystallisation, substrat-dependent modulation, *in situ* Click Chemistry