

N° d'ordre : 1309

50376
1994
147

50376
1994
147

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN CHIMIE

spécialité : Chimie organique et macromoléculaire

par

Martine HE-HOUDIN

Maître ès Sciences

CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'INHIBITEURS BISUBSTRAT DE LA PROTÉINE KINASE C

soutenue publiquement le 16 mai 1994 devant la Commission d'Examen :

Président
Rapporteurs

Directeur du travail
Examineurs

H. SLIWA
A. MARCINCAL
M. PRUDHOMME
C. SERGHERAERT
A. TARTAR
E. BUISINE



A mon époux,

A mes parents.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie des Biomolécules à l'Institut Pasteur de Lille, (Professeur André TARTAR) URA CNRS 1309, sous la direction du Professeur Christian SERGHERAERT.

Ce travail a pu être réalisé grâce à une bourse financée par le ministère de la Recherche et de la Technologie et grâce à un financement Pasteur (Institut Pasteur de Lille).

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur SERGHERAERT, Professeur à l'Université de Pharmacie (Lille II) pour m'avoir guidée dans ce travail et pour avoir su me faire profiter de son expérience et de ses connaissances qui m'ont permis de le mener à bien.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur TARTAR pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir examiner cette thèse.

Je suis très honorée que Monsieur SLIWA, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille ait accepté de présider le Jury de cette thèse.

Je suis très reconnaissante à Madame MARCINCAL, Professeur à l'Université de Pharmacie (Lille II), d'avoir bien voulu juger ce travail.

Ma gratitude va également à Madame PRUDHOMME, Maître de conférences à l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie également Monsieur BUISINE, Maître de conférences à l'Université de Lille II pour l'aide qu'il m'a apportée, les nombreuses discussions que nous avons eues et sa participation au Jury.

Je remercie Monsieur COSTE de la société Glaxo, pour nous avoir offert gracieusement la protéine kinase C et Monsieur BOUTIN de l'Institut Servier pour nous avoir effectué les tests d'inhibition de la tyrosine kinase des composés bis-ATP.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur RICART de l'USTL pour les études en spectrométrie de masse et à Monsieur MOUCHEL de l'USTL pour les études de RMN.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres du service de Chimie des Biomolécules pour ces années passées en leur compagnie. En particulier, j'adresse mes plus vifs remerciements à Pascal LEMIERE, à Petra JOOS, à Sylvie LAZURE, à Carole DESOIGNIES et à Christelle VANHUYSE pour leur contribution à la réalisation de ce travail et à Messieurs AUMERCIER et GESQUIERE pour leurs précieux conseils.

Ce travail a fait l'objet de la communication et de la publication suivantes :

Poster :

Inhibition of protein kinases by BIS-ATP mimics.

M. HOUDIN, A. TARTAR and C. SERGHERAERT.

27^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Caen (2-5 juillet 1991).

Publication :

Inhibition of protein kinases by BIS-ATP mimics.

M. HOUDIN and C. SERGHERAERT.

Eur. J. Med. Chem. (1992), 27, 925-930.

Sont en préparation les communications et les publications suivantes :

Posters :

Conception rationnelle d'inhibiteurs de la protéine kinase C : utilisation des techniques de modélisation moléculaire.

M. He, E. Buisine, A. Tartar and C. Sergheraert.

8^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Liège, (26-27 Mai 1994).

Design and synthesis of PKC inhibitors : starting material for a bisubstrate approach.

C. Sergheraert, M. He, E. Buisine and A. Tartar.

XIII th International Symposium on Medicinal Chemistry, Paris (19-23 Septembre 1994).

Publications :

Design and synthesis of PKC inhibitors : starting material for a bisubstrate approach.

Martine He, Eric Buisine, André Tartar and Christian Sergheraert*

A rational approach in the design and the synthesis of specific pattern kinase C bisubstrat inhibitors.

Martine He, Eric Buisine, André Tartar and Christian Sergheraert*

Table des matières

ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	3

Chapitre I

Protéines Ser/Thr kinases : rappels sur la protéine kinase C et sur la protéine kinase A.....	7
--	----------

I. LA PROTEINE KINASE C.....	8
1. Isoformes de la PKC.....	8
2. Structure primaire de la PKC.....	10
3. Activation de la PKC.....	15
4. Rôle de la PKC.....	20
II. LA PROTEINE KINASE A.....	25
1. Définition.....	25
2. Activation de la PKA par l'AMPc.....	25
3. Détermination de la séquence spécifique de reconnaissance pour la PKA.....	26

Chapitre II

Inhibiteurs de type bis-ATP.....	27
---	-----------

I. Choix d'un modèle susceptible de se fixer sur les deux sites ATP potentiels de l'enzyme et ébauche d'une structure bis-ATP.....	28
II. Synthèse d'inhibiteurs de type bis-ATP.....	30
1. Voie de synthèse utilisée.....	30
2. Synthèse de l'acide 5-isoquinoléine sulfonique : 1.....	33
3. Synthèse du chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle : 2 et du N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide : 3.....	34
4. Synthèse du N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionate de méthyle : 4.....	36
5. Synthèse de l'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique : 5.....	37
6. Synthèse de l'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionique : 6.....	38

7. Synthèse du N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionate de N-hydroxysuccinimide : 7	39
8. Synthèse des composés 8, 9 et 10.....	41
9. Synthèse des composés bis-ATP (11, 12 et 13).....	43
III. Résultats.....	46
1. Tests d'inhibition des composés bis-ATP.....	46
2. Mode d'action du composé 11-Evaluation du Ki.....	47
3. Évaluation de la distance séparant les deux sites de reconnaissance de l'ATP de la PKC.....	48

CHAPITRE III

Inhibiteurs bisubstrat potentiels.....	53
---	-----------

PREMIÈRE PARTIE

Généralités sur les molécules possédant une structure indolocarbazole et sur les molécules 2,3-bis-indolylmaléimide	59
--	-----------

I. INHIBITION DE LA PKC PAR DES MOLECULES POSSEDANT UNE STRUCTURE INDOLOCARBAZOLE.....

1. La staurosporine.....	60
2. UCN-01	61
3. CGP 41 251.....	62
4. CGP 42 700.....	63
5. Les composés K-252a, K-252b, KT5720 et K-252c.....	64
6. Conclusion.....	65

II. INHIBITION DE LA PKC PAR DES MOLECULES 2,3-BIS-INDOLYLMALÉIMIDE.....

1. Préparation des composés 2,3-bis-indolylmaléimide	66
2. 2,3-bis-indolylmaléimide.....	67
3. Introduction de groupements alkyle sur les deux azotes indoliques.....	72
4. Conclusion.....	75

DEUXIÈME PARTIE

Synthèse du mime ATP	76
-----------------------------------	-----------

Voie de synthèse utilisée.....	77
--------------------------------	----

I. Préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide

1. Synthèse du 2,3-dibromomaléimide : 15	81
2. Synthèse du 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide : 16.....	83

3. Synthèse du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide : 17.....	84
4. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide	86
5. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide	93
6. Tests d'inhibition des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide (25 à 30).....	96
II. Préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide...98	
1. Clivage du groupement méthyle	98
2. Choix d'un groupement pour la protection de la fonction imide.....	101
3. Synthèse du 2,3-dibromo-N-tritylmaléimide : 31.....	102
4. Synthèse du 2,3-dibromo-N-4-méthoxytritylmaléimide : 32.....	104
5. Synthèse du 2,3-dibromo-N-4,4'-diméthoxytritylmaléimide : 32 bis.....	104
6. Clivage des groupements trityle et 4-méthoxytrityle	106
7. Synthèse des composés 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 33 et 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide : 37	107
8. Synthèse des composés 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 34 et 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide : 38.....	109
9. Synthèse du trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 36.....	110
10. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide (40 à 47)	118
11. Synthèse des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (48 à 55).....	120

TROISIÈME PARTIE

Définition d'une structure bisubstrat potentielle susceptible de fixation sur le site ATP et sur le site substrat de la PKC..... 121

I. DÉFINITION D'UN MODÈLE SUSCEPTIBLE DE SE FIXER SUR LE SITE ATP DE L'ENZYME..... 122

1. Trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 36 et trifluoroacétate de 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 48.....	123
3. Trifluoroacétate de 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 49.....	124
2. Trifluoroacétate de 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 50	125
4. Tests d'inhibition des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (36, 48, 49 et 50).....	126

5. Tests d'inhibition des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (51 à 55).....	128
6. Introduction d'un groupement guanidinium sur l'inhibiteur 53	130
II. EBAUCHE D'UNE STRUCTURE BISUBSTRAT.....	136
1. Synthèse du 2-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 70.....	140
2. Addition d'un acide aminé de nature variable (Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Boc-Phe-OH et Fmoc-Glu(tBu)-OH) sur le composé 45 : produits 62, 63 et 64 et sur le composé 70 : produits 72, 73 et 63 bis	141
3. Synthèse des composés : 59, 66, 68, 69, 71, 75 et 76.....	144
4. Tests d'inhibition des composés 66, 68, 69, 71, 75 et 76	146
5. Synthèse des composés 79, 80 et 81.....	149
6. Tests d'inhibition des dérivés 78, 79, 80 et 81	159
7. Mode d'action des composés 53, 55 et 75	160
8. Conclusion	161
III. Conception d'inhibiteurs bisubstrat de la PKC.....	162
1. Introduction	162
2. Structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la PKA	162
3. Comparaisons PKA-PKC.....	165
4. Conception d'inhibiteurs bisubstrat de la PKC.....	167
5. Préparation des peptides.....	175
6. Tests d'inhibition.....	182
7. Conclusion	191
CONCLUSION.....	192

Partie expérimentale

Indications générales	196
Préparation d'inhibiteurs bis-ATP	199
1. L'acide 5-isoquinoléine sulfonique : 1.....	200
2. Le chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle : 2	200
3. N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide : 3.....	200
4. N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionate de méthyle : 4.....	201
5. L'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique : 5	202
6. L'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionique : 6.....	202
7. N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butyl oxycarbonyl-3-aminopropionate de N-hydroxysuccinimide : 7	203

8. Synthèse des composés 8, 9 et 10.....	203
9. Synthèse des composés bis-ATP (11, 12 et 13).....	205

Préparation d'inhibiteurs bisubstrat208

I. Synthèse d'inhibiteurs PKC réalisée en phase homogène 209

1. 3,4-dibromo-2,5-furandione : 14.....	209
2. 3,4-dibromo pyrrole-2,5-dione : 15.....	209
3. 3,4-dibromo-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 16.....	210
4. Synthèse des composés 31 et 32	210
5. Synthèse des composés 17, 33 et 37.....	211
6. Synthèse des composés 18, 34 et 38.....	213
Synthèse des composés 19, 20, 21, 22, 23, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 et 47	214
8. 3-[hexadécylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1- méthyl pyrrole-2,5-dione : 24	223
9. 3-[5-guanidinopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 60.....	224
10. 3-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentylamino]-4-[1- tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 70	224
11. 3-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentylamino]-4-[1- tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 77	225
12. Synthèse des composés 57, 62, 63, 64, 72 et 73	226
13. Synthèse des trifluoroacétates de 3-R-amino-4-[1H-indol-3- yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione (25 à 30)	230
14. Synthèse des trifluoroacétates de 3-R-amino-4-[1H-indol- 3yl] pyrrole-2,5-dione (36, 48 à 55, 69, 71 et 76)	233
15. Synthèse des composés 3-R-amino-4-[1H-indol-3yl] pyrrole-2,5-dione (58, 65, 67 et 74)	239
16. Synthèse des trifluoroacétates de 3-R-amino-4-[1H-indol- 3yl] pyrrole-2,5-dione (59, 66 et 75).....	241

II. Synthèse d'inhibiteurs PKC réalisée en phase hétérogène... 244

1. Préparation du réacteur	244
2. Test de Kaiser	244
3. Contrôle et purification	245
4. Synthèse des composés 79, 80 et 81.....	246
5. Préparation des peptides 90 à 97	249

Tests d'inhibition de la PKA et de la PKC254

I. Méthodes générales d'étude enzymatique 255

1. Propriétés des enzymes.....	255
2. Cinétique des réactions enzymatiques.....	255

II. TESTS DE PHOSPHORYLATION IN VITRO.....	261
1. Méthodes.....	261
Annexes.....	264
Annexe 1 : les nomenclatures.....	265
Annexe 2 : fragments observés en spectrométrie de masse (IE) pour les composés 19 à 30.....	272
BIBLIOGRAPHIE	273

ABREVIATIONS

AA	: acide aminé
βAla	: β alanine
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
ATP	: adénosine triphosphate
Boc	: tert.butyloxycarbonyle
Boc₂O	: pyrocarbonate de di-tert.butyle
BOP	: benzotriazol-1- yloxytris(diméthylamino)phosphoniumhexafluorophosphate
BSA	: sérum albumine bovine
CCM	: chromatographie sur couche mince de silice
CCE	: chromatographie sur couche épaisse de silice
DAG	: diacylglycérol
DCC	: dicyclohexylcarbodiimide
DCU	: dicyclohexylurée
DIEA	: diisopropyléthylamine
DMAP	: diméthylaminopyridine
DMF	: diméthylformamide
DMSO	: diméthylsulfoxyde
Fmoc	: 9-fluorényl méthyloxycarbonyle
GMPc	: guanosine monophosphate cyclique
HOBt	: hydroxybenzotriazole
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
IC₅₀	: concentration inhibitrice 50
K_m	: constante de Michaelis
K_i	: constante d'inhibition
LysoPc	: Lysophosphatidylcholine
NMP	: N-méthylpyrrolidone

- Osu** : ester de N-hydroxysuccinimide
- PK** : phosphorylase kinase
- PKA** : protéine kinase AMP cyclique dépendante
- PKC** : protéine kinase C
- PKG** : protéine kinase GMP cyclique dépendante
- Pmc** : 2, 2, 5, 7, 8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle
- PS** : phosphatidylsérine
- TEA** : triéthylamine
- TFA** : acide trifluoroacétique
- TPK** : protéine tyrosine kinase
- tBu** : tert.butyle

INTRODUCTION

Le transfert d'information entre organes différents, fait appel chez les animaux comme chez les plantes, à des signaux chimiques. Les signaux chimiques de la communication cellulaire sont reconnus par chaque cellule grâce à des récepteurs. La reconnaissance au niveau de chaque couple signal-récepteur est basée sur la complémentarité de leur structure tridimensionnelle ainsi que sur la distribution de leurs charges électriques.

Lorsqu'un récepteur membranaire ou cytoplasmique est stimulé, deux possibilités se présentent :

- soit le récepteur change de structure et provoque l'ouverture de canaux ionophores, dans ce cas la réponse (excitatrice ou inhibitrice) au signal est rapide,
- soit le récepteur, en se transformant, provoque l'activation de seconds messagers, entraînant une réponse lente : certaines voies métaboliques de la cellule sont alors déclenchées.

Il existe deux systèmes de couplage à un second messenger : le système enzymatique de l'adénylate cyclase (activation de la protéine kinase A) et le système du phosphatidyl inositol (activation de la protéine kinase C). Tous deux aboutissent à des phosphorylations qui changent les propriétés structurales et biochimiques des protéines modifiant ainsi certaines propriétés physiologiques de la cellule.

La phosphorylation est assurée par des protéines kinases qui catalysent la fixation d'un reste phosphate sur un acide aminé hydroxylé : sérine ou thréonine et tyrosine. La nature de l'acide aminé phosphorylé permet de classer les protéines kinases en deux groupes :

- Les protéines Tyrosine kinases qui sont en général des récepteurs membranaires,
- Les protéines Sérine/Thréonine kinases, généralement intracytoplasmiques, régulées par des médiateurs chimiques ou seconds messagers sécrétés en réponse à un message extra cellulaire. La famille des Ser/Thr kinases se compose de trois sous-familles d'enzymes, distinctes en fonction de la nature du second messenger engagé dans la réponse cellulaire :
 - Les kinases dépendantes des nucléotides cycliques telles que l'AMPc et le GMPc (appelées respectivement protéines kinases A et G),
 - Les kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline,
 - La famille des protéines kinases C qui se compose de trois sous-familles d'enzymes :

- Les isoformes α , β_1 , β_2 , γ dépendantes du diacylglycérol, du calcium et des phospholipides,
- Les isoformes δ , ϵ , η (L), θ dépendantes du diacylglycérol et des phospholipides,
- Les isoformes ζ et λ (ces différents sous-types ne sont pas encore bien déterminés).

Parmi ces protéines kinases, la protéine kinase C ou PKC est particulièrement étudiée car son rôle est fondamental dans la cellule :

- La PKC peut réguler la sécrétion et l'exocytose de constituants cellulaires de nombreux tissus exocrines ou endocrines activant ainsi de nombreuses fonctions cellulaires.
- La PKC peut régir le rétrocontrôle qui suit la stimulation de certains récepteurs, ce qui évite une réponse prolongée et restaure ainsi la sensibilité du récepteur à de nouveaux signaux.
- Elle peut moduler les échanges ioniques cellulaires en phosphorylant des protéines membranaires : canaux, pompes et protéines échangeuses d'ions. Elle participerait ainsi à l'exclusion du calcium après sa mobilisation induite par un signal extra cellulaire.

Mais surtout, elle serait impliquée dans de nombreux phénomènes de cancérisation. Elle se révèle en effet être le récepteur physiologique de certains promoteurs tumoraux, tels que les esters du phorbol, qui activent alors la prolifération cellulaire par un mécanisme de phosphorylation anarchique. Pour cette raison mais aussi dans un but fondamental, de nombreuses équipes travaillent à la recherche d'inhibiteurs spécifiques de la PKC.

La PKC comportant un domaine hydrophobe ayant une capacité régulatoire et un domaine hydrophile à activité catalytique, il existe donc plusieurs approches d'inhibition :

- inhibition vis à vis du domaine régulatoire de la PKC

Le domaine régulatoire de la PKC renferme les sites respectifs d'accueil du calcium, des phospholipides et du diacylglycérol nécessaires à son activation.

La calphostine C isolée à partir de cultures de *fungus Cladosporium Cladosporoides* est actuellement l'un des inhibiteurs les plus puissants et les plus sélectifs de la protéine kinase C avec une concentration inhibitrice 50 (ou IC₅₀) de 50 nM qui interagit vraisemblablement avec le site de liaison du diacylglycérol du domaine régulatoire [TAMAOKI 1991, AZZI 1992].

- inhibition vis à vis du domaine catalytique de la PKC

Le domaine catalytique de l'enzyme renferme les sites respectifs d'accueil de l'ATP nécessaire à la phosphorylation et de la protéine ou du peptide substrat à phosphoryler.

La PKC peut donc être inhibée par des molécules agissant au niveau du site de liaison du substrat ou entrant directement en compétition avec le site ATP de l'enzyme. Dans le second cas, on peut s'attendre à une non-spécificité de l'inhibiteur ; ainsi la staurosporine isolée à partir de cultures de *Streptomyces* et décrite dans la littérature comme l'un des inhibiteurs les plus puissants de la PKC avec un K_i de 2,7 nM, a pour défaut majeur l'absence de sélectivité [TAMAOKI 1991].

Toutes les molécules déjà répertoriées pour inhiber la PKC, ont d'une part, la particularité d'interagir avec l'enzyme en se fixant directement sur un seul site de reconnaissance de l'enzyme et d'autre part, très peu d'entre elles présentent une spécificité satisfaisante pour la PKC. La découverte d'inhibiteurs spécifiques reste donc un objectif primordial.

Afin d'accroître la spécificité et l'activité d'inhibiteurs pour la protéine kinase C, nous nous sommes proposés de développer la synthèse d'inhibiteurs bisubstrat, c'est à dire susceptibles de se fixer simultanément sur deux sites de reconnaissance de la PKC. L'association covalente de deux parties actives devait accroître l'affinité globale de la molécule et ainsi mener à l'obtention d'inhibiteurs très puissants. On constate en effet, que les affinités très élevées sont obtenues à partir de molécules oligomériques, c'est à dire formées de plusieurs sous-unités. Dans une telle association, la constante d'affinité de la molécule augmente de façon exponentielle avec le nombre de sous-unités. Par exemple, en utilisant des polyamines naturelles : spermine ou spermidine, et en les "branchant" sur des molécules intercalantes appropriées, des analogues de l'ellipticine, J. B. PECK a obtenu des molécules dimères pouvant se fixer sur l'ADN avec une très forte affinité (constante d'affinité supérieure à 10^{10} M^{-1}) et possédant une activité antitumorale [LE PECK].

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés exclusivement à la conception d'inhibiteurs bisubstrat du domaine catalytique ; deux axes de recherche ont ainsi été développés :

Nous avons dans un premier temps préparé des inhibiteurs de type bis-ATP susceptibles de se fixer simultanément au niveau de deux sites de reconnaissance de l'ATP par la PKC : le premier bien défini, le second putatif. De tels inhibiteurs pouvaient en outre permettre de mieux connaître le rôle du second site potentiel de fixation de l'ATP.

Nous avons dans un deuxième temps élaboré des inhibiteurs bisubstrat susceptibles de se fixer simultanément sur le site de reconnaissance du substrat et sur le site de

reconnaissance de l'ATP de l'enzyme. De tels inhibiteurs devaient par conséquent être constitués d'une partie peptidique analogue d'un bon substrat et d'une partie non peptidique présentant une analogie avec l'ATP.

Toutes les molécules synthétisées ont été testées sur la protéine kinase C de cerveau de boeuf (isoforme β) et sur l'unité catalytique de la protéine kinase A de coeur de boeuf, une Ser/Thr kinase présentant une forte homologie avec la PKC, ceci afin d'évaluer le caractère spécifique de l'inhibition pour la PKC.

Chapitre I

Protéines Ser/Thr kinases : rappels sur la protéine kinase C et sur la protéine kinase A

I. LA PROTEINE KINASE C

La protéine kinase C fut identifiée pour la première fois par NISHIZUKA dans le cerveau de rat en 1977. Son activation par protéolyse libérant la fraction appelée protéine kinase M fut mise en évidence par NISHIZUKA [NISHIZUKA 1978].

L'équipe de TAKAI montra par la suite que cette enzyme était activée par le calcium, dépendante des phospholipides et indépendante de nucléotides cycliques comme l'AMPc et le GMPc [TAKAI 1977, TAKAI 1979, STABEL et PARKER 1991]. La PKC fait partie du groupe des kinases constituées d'une seule chaîne polypeptidique de 77 à 84 KDa qui phosphorylent leurs substrats protéiques au niveau d'une sérine ou d'une thréonine [AZZI 1992].

1. Isoformes de la PKC

Des techniques de clonage de gènes ont permis de mettre en évidence, à ce jour, 10 isoformes de la PKC [ONO 1987, NISHIZUKA 1988, KIKAKKA 1989, ASAOKA 1992, AZZI 1992].

Ces sous-types peuvent être regroupés en trois catégories (tableau 1) [ASAOKA 1992] :

- Groupe n°1 : (PKC classique : cPKC)

Les isoformes α , β_1 , β_2 , γ (identifiées par PARKER 1986).

Ces isoformes sont activées par le calcium et le diacylglycérol et dépendantes des phospholipides. Cette activation peut être rehaussée par des acides gras cis-insaturés et par la lysophosphatidylcholine [ASAOKA 1992].

- Groupe n°2 : (PKC nouvelle : nPKC)

Les isoformes δ , ϵ , η (L), θ (identifiées par ONO 1987, ONO 1988, AZZI 1992).

Ces sous-types sont insensibles au calcium.

-Groupe n°3 : (aPKC).

Les isoformes ζ , λ

Ces différents sous-types de la PKC ne sont pas encore bien déterminés [ASAOKA 1992]. La sous-espèce ζ n'est pas activée par le calcium, le diacylglycérol ou les esters du phorbol mais cette enzyme nécessite pour son

activation de la phosphatidylcholine et des acides gras cis-insaturés. Le signal d'activation des aPKC n'est pas encore connu [ASAOKA 1992].

Tableau 1 : les différentes sous-espèces de la PKC (FFA : acides gras cis-insaturés) [ASAOKA 1992]

Groupe	Sous-types	Masse moléculaire (kDa)	Activateurs	Localisation
cPKC	α	76799	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFA, LysoPC	partout
	β_1	76790	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFA, LysoPC	quelques tissus
	β_2	76933	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFA, LysoPC	nombreux tissus
	γ	78366	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFA, LysoPC	cerveau
nPKC	δ	77517	DAG, PS	partout
	ϵ	83474	DAG, PS, FFA	cerveau et autres
	η (L)	77972	?	poumon, peau et cœur
	θ	81571	?	muscles
aPKC	ζ	67740	PS, FFA	partout
	λ	67200	?	ovaire, testicule et autres

La PKC est largement répandue dans la nature [EDELMAN 1987]. Elle est présente dans la plupart des tissus avec des taux variables.

Les taux les plus élevés sont observés dans les tissus nerveux et à un degré moindre dans les plaquettes sanguines et la rate. Les taux les plus faibles sont trouvés dans les muscles striés, le tissu cardiaque et le tissu adipeux [EDELMAN 1987].

2. Structure primaire de la PKC

1	MADPAAGPPP	SEGEESTVRF	ARKGALRQKN	VHEVKNKFT	ARFFKQPTFC	SHCTDFIWGF
61	GKQGFQCQVC	CFVVHKRCHE	FVTFSCPGAD	KGPASDDPRS	KHKFIHTYS	SPTFCDHCGS
121	LLYGLIHQGM	KCDTCMMNVH	KRCVMNVPSL	CGTDHTERRG	RIYIQAHIER	EVLIVVVRDA
181	KNLVMPDPNG	LSDPYKLLK	IPDPKSESKG	KTKTIKCSLN	PEWNETFRFQ	LKESDKDRRL
241	SVEIWDWDLT	SRNDFMGSL	FGISELQKAG	VDGWFKLLSQ	EEGEYFNVPV	PPEGSEGNEE
301	LRQKFERAKI	GPGKTPEEK	TTNTISKFDN	NGNRDRMKLT	DFNFLMVLGK	GSPGKVMLSE
361	RKGTDELYAV	KILKKDVVIQ	DDDVECTMVE	KRVLALPGKP	PFLTQLHSCF	QTMDRLYFVN
421	EYVNGGDMY	HIQQVGRFKE	PHAVFYAAEI	AIGLFFLQSK	GIYRDLKLD	NVMLDSEGHI
481	KIADFGMCKE	NIWDGVTTKT	FCGTPDYIAP	EIIAYQPYGK	SVDWWAFGL	LYEMLAGQAP
541	FEGEDELEF	QSIMEHNVAF	PKSMSKEAVA	ICKGLITKHP	GKRLGCGPEG	ERDIKEHAFF
601	RYDWEKLER	KEIQPPYKPK	ACGRNAENFD	RFTRHPPVL	TPPDQEVIRN	IDQSEFEGFS
661	FVNSEFLKPE	VKS				

Figure 1 : séquence d'acides aminés de l'isoforme $\beta 1$ de cerveau de boeuf. (L'isoforme $\beta 2$ ne diffère de $\beta 1$ que par certains résidus C-terminaux, les deux sous-types sont codés par deux ARN messagers issus d'un seul gène [COUSSENS 1986, NISHIZUKA 1988]).

La protéolyse catalysée par une protéase calcium dépendante (la calpaïne [NELSESTUEN 1991]) ou la trypsine [NELSESTUEN 1991] *in vitro* clive la chaîne polypeptidique au niveau de la région V₃ en deux éléments [EDELMAN 1987] :

- La protéine kinase M (ou PKM) de 45 à 55 kDa qui possède une activité phosphorylante ne nécessitant pas la présence de calcium, de phosphatidylsérine et de diacylglycérol.
- La plus petite partie de 32-36 kDa qui conserve la capacité de fixer les phospholipides et les esters du phorbol.

Ceci suggère que la PKC comporte un domaine hydrophobe ayant une capacité régulatoire et un domaine hydrophile à activité catalytique.

Les différentes isoformes de la PKC sont faites d'une simple chaîne polypeptidique qu'on peut diviser en 5 zones variables (V₁ à V₅) et 4 zones constantes de très forte homologie (C₁ à C₄). Il est à noter que les nPKC ne possèdent pas de région conservée C₂ [KIKKAWA 1987, ONO 1987].

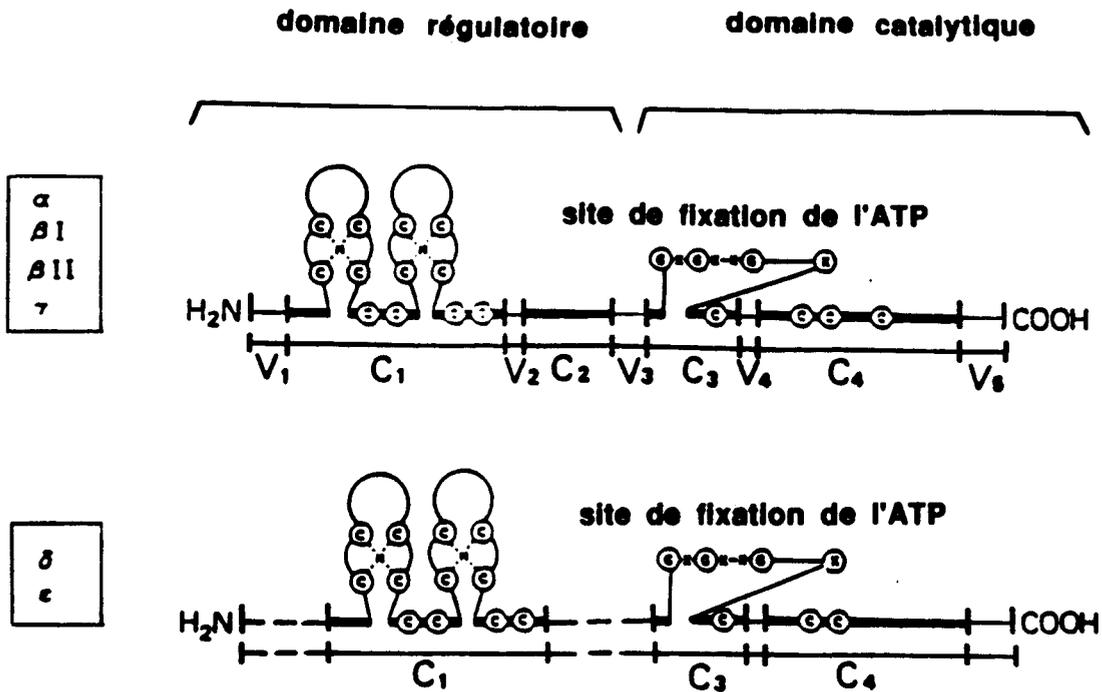


Figure 2 : structure commune des sous-espèces α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ , δ , ϵ de la protéine kinase C [KIKKAWA 1987, KIKKAWA 1989, NISHIZUKA 1988]

La région N-terminale contient les zones C₁, C₂ ainsi que V₁ et V₂ et une partie de la zone V₃, qui constituent le domaine régulateur de l'enzyme.

Ce dernier interagit avec le calcium, les phospholipides et le diacylglycérol ou les esters du phorbol. Il renferme également la séquence pseudosubstrat : une séquence possédant les caractéristiques correspondant aux substrats de la PKC [HOUSE et KEMP 1987].

La région C-terminale contient les zones C₃, C₄ et V₄ qui forment le domaine catalytique de l'enzyme [NISHIZUKA 1988, KIKKAWA 1989].

2.1. Domaine régulateur de la PKC

2.1.1. Séquence pseudosubstrat

alpha	19	RFARKGALRQKNVHERVKD
beta	19	RFARKGALRQKNVHEVRN
gamma	18	LFCRKGALRQKVVEVKS
delta	141	TMNRRGAIKQAKIHYIKN
epsilon	153	PRKRQGAVRRR-VHQVNG
dzeta	113	SIYRRGARRWRKLYRANG

Figure 3 : séquence pseudosubstrat des isoformes α , β , γ , δ , ϵ , ζ de rat [STABEL et PARKER 1991]

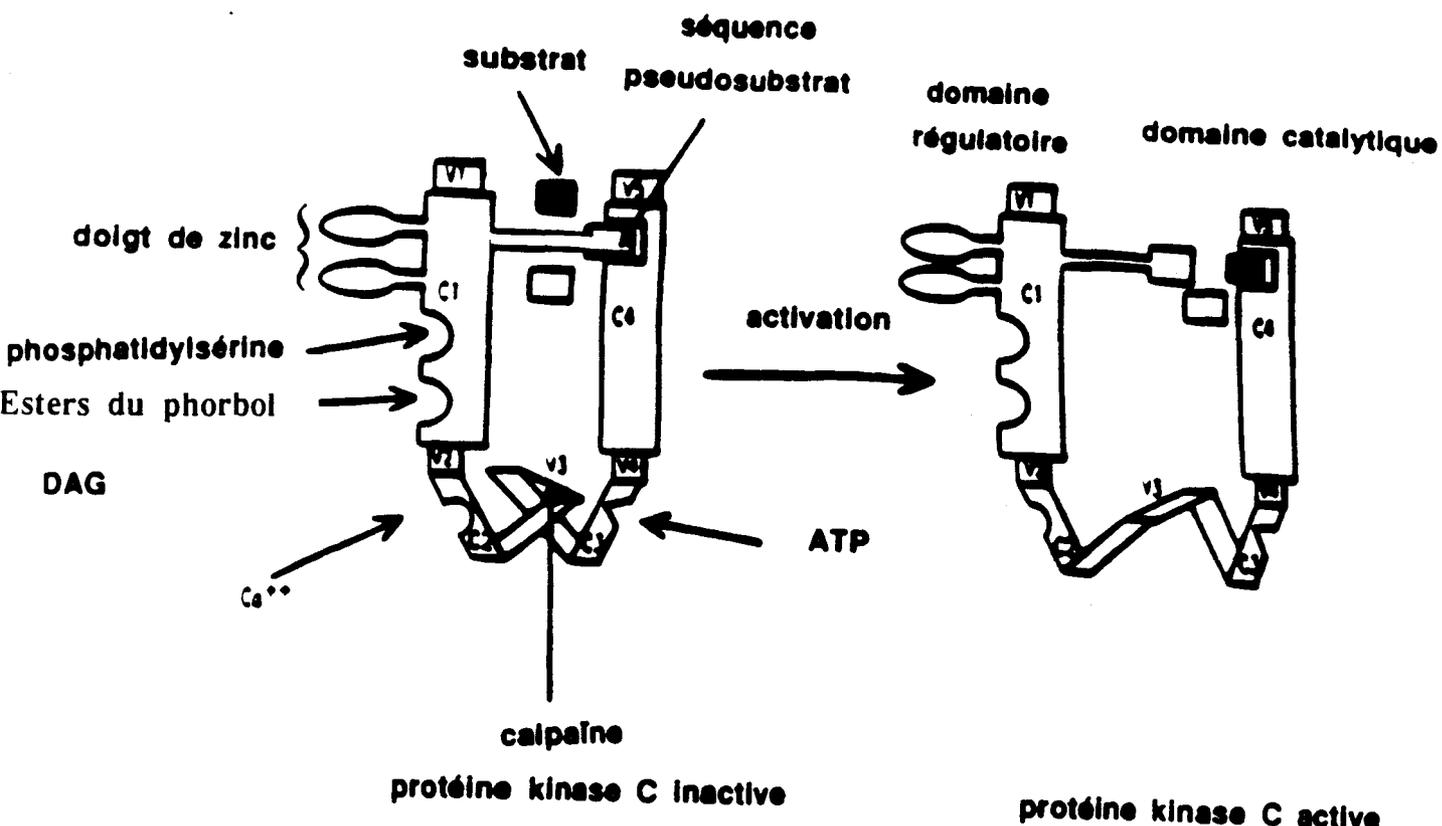


Figure 4 : structure et mécanisme d'activation de la PKC [AZZI 1992]

HOUSE et KEMP ont mis en évidence dans le domaine régulateur de la PKC une séquence très conservée de 18 acides aminés nommée pseudosubstrat, qui en l'absence de seconds messagers, était responsable de l'inhibition de la PKC [HOUSE et KEMP 1987, KIKKAWA 1989]. Cette séquence viendrait se positionner au niveau du site actif de l'enzyme et empêcherait ainsi toute approche des substrats maintenant donc la PKC dans une conformation inactive. Un clivage protéolytique entre le domaine régulateur et le domaine catalytique ou la fixation des activateurs provoqueraient un changement de conformation qui détacherait le pseudosubstrat du site actif, autoriserait l'accès de substrats protéiques, permettant ainsi l'activation de la PKC (figure 4).

Une séquence analogue a été mise en évidence pour chaque isoforme de la PKC, localisée entre les résidus 13 et 30 précédant la structure en "doigt de zinc". [figure 3, STABEL et PARKER 1991, AZZI 1992]. Cette séquence constituée d'un ou plusieurs résidus basiques est analogue aux séquences de reconnaissance du substrat pour la PKC, mais elle présente un résidu neutre (alanine) à la place du résidu phosphorylable (sérine ou thréonine) [HOUSE et KEMP 1987].

Le peptide synthétique correspondant aux résidus 19-36 s'avère être un inhibiteur puissant et sélectif de la PKC ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$) mais malheureusement il ne pénètre pas la cellule [AZZI 1992, NIXON 1992]. La substitution de l'alanine 25 par une sérine

transforme comme attendu la séquence pseudosubstrat en un bon substrat de la PKC ($K_m = 200 \text{ nM}$) [HOUSE ET KEMP 1987].

2.1.2. Région C₁

Pour toutes les isoformes de la PKC, excepté l'isoforme ζ , la région conservée C₁ contient deux séquences riches en cystéine avec la structure caractéristique : Cys—X₂—Cys—X₁₃ (ou 14) —Cys—X₂—Cys—X₇—Cys—X₇—Cys, où X est un acide aminé quelconque [PARKER 1986, AZZI 1992].

L'isoforme ζ ne contient qu'une seule séquence de six cystéines [EDELMAN 1987, ONO 1988].

Ce type de structure ressemble à une séquence consensus de "doigt de zinc", présente dans de nombreuses métallo-protéines ou autres protéines se liant à l'ADN. Dans le cas de la PKC, son rôle fonctionnel est encore inconnu (il n'existe aucune preuve que la PKC se lie à l'ADN [NISHIZUKA 1988]).

La délétion de cette région et des études de mutation semblent montrer que ces séquences sont essentielles pour la liaison des esters du phorbol [AZZI 1992].

2.1.3. Région C₂

Les sites de liaison du calcium et de la phosphatidylsérine ne sont pas encore connus. Les isoformes α , β_1, β_2 , γ activées par le Ca^{2+} et le DAG, présentent une région conservée C₂ qui contient une structure appropriée pour la coordination du calcium et pourrait ainsi correspondre à son site de liaison. La délétion de cette région rend l'activité de la kinase indépendante du calcium.

De plus, les isoformes δ , ϵ , η (L), θ insensibles au Ca^{2+} ne présentent pas de région conservée C₂ [ONO 1987]. Toutes ces données semblent donc indiquer que la région conservée C₂ contient le site de liaison du calcium [STABEL et PARKER 1991, AZZI 1992].

2.2. Domaine catalytique de l'enzyme

Pour toutes les isoformes de la PKC, la région conservée C₃ contient le site de fixation de l'ATP avec la séquence caractéristique : Gly—X—Gly—X—X—Gly—X₁₆—Lys (X est un acide aminé quelconque) [HUNTER 1985, ONO 1988, KIKKAWA 1989]. La délétion de cette région rend en effet la PKC inactive.

Pour quatre des sept isoformes α , β_1, β_2 , γ , il existe dans la région C₄ un autre site potentiel de fixation de l'ATP (pour l'isoforme γ , la lysine est remplacée par l'arginine) dont le rôle est encore inconnu [KIKKAWA 1987, NISHIZUKA 1988, HUANG 1989, KIKKAWA 1989, AZZI 1992].

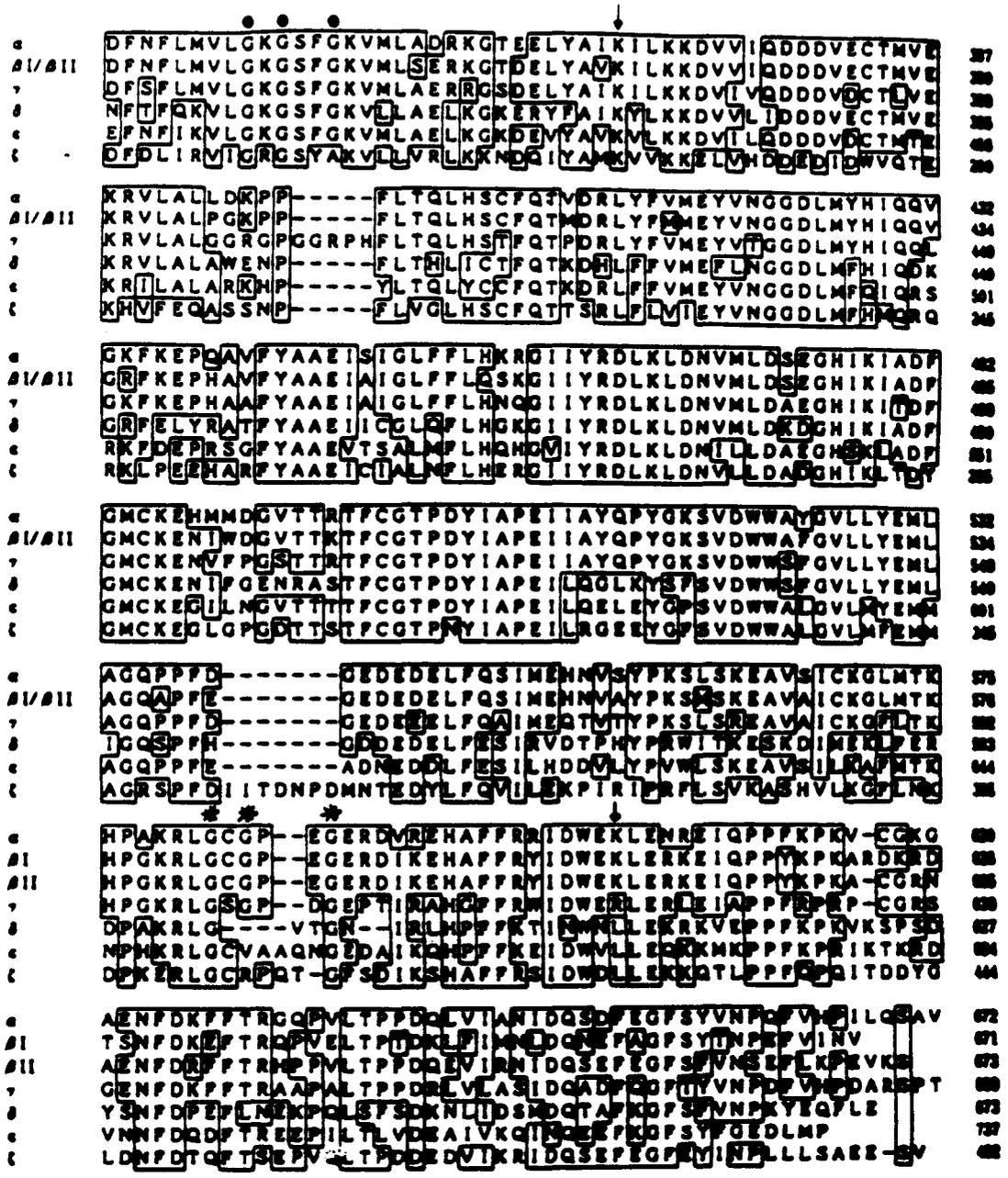


Figure 5 : séquences des isoformes α , $\beta 1, \beta 2$, γ , δ , ϵ et ζ (• : mise en évidence du site de fixation de l'ATP dans la région conservée C3, * : mise en évidence du site de fixation de l'ATP dans la région conservée C4 pour les isoformes α , $\beta 1, \beta 2$, γ [ONO 1988])

3. Activation de la PKC

Le premier système connu pour activer la protéine kinase C impliquait les phosphoinositides et la phospholipase C. Ce n'est qu'en 1987 qu'une nouvelle voie utilisant la 1,2-diacyl-sn-glycérol-phosphocholine (PC) comme source de seconds messagers s'est imposée comme une alternative à la voie conventionnelle des phosphoinositides [ASAOKA 1992].

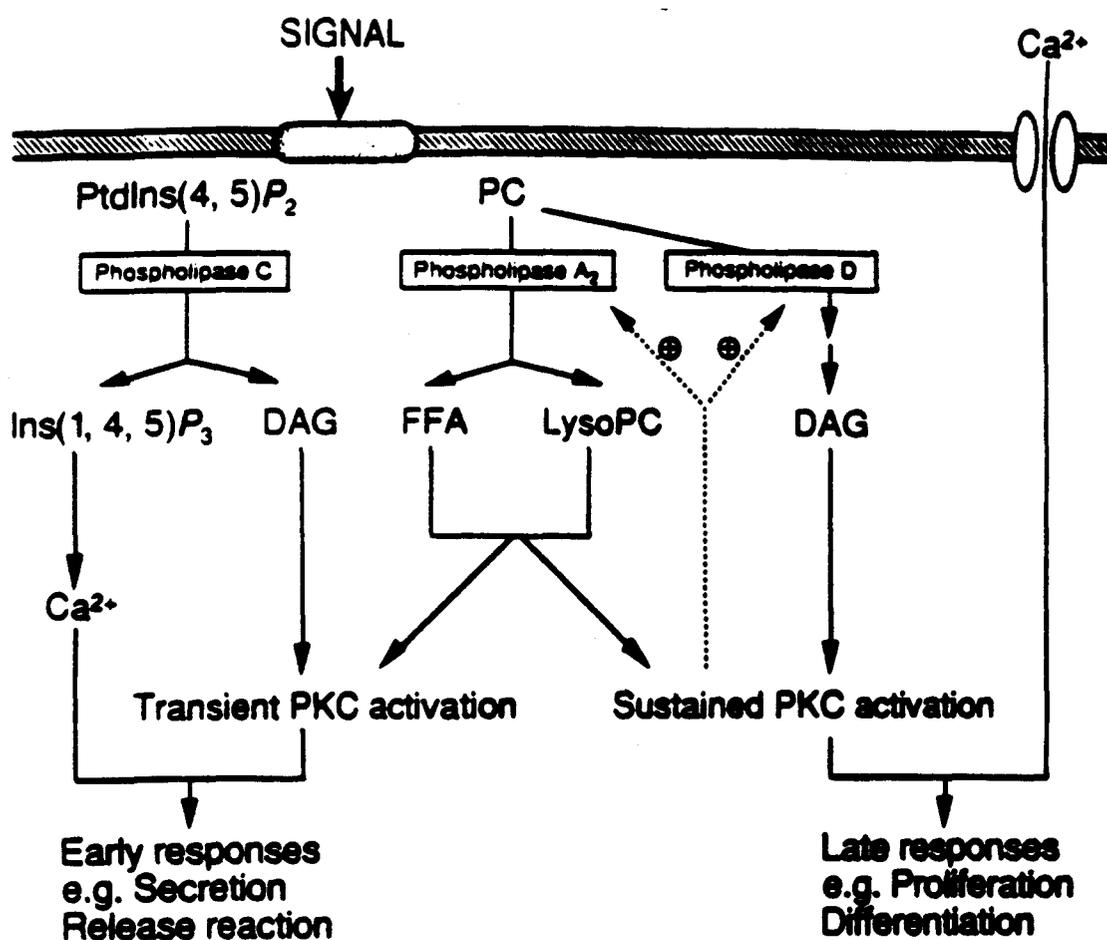


Figure 6 : activation de la protéine kinase C par la voie des phosphoinositides et par la 1,2-diacyl-sn-glycérol-phosphocholine [ASAOKA 1992]

3.1. Activation de la PKC par la voie des phosphoinositides

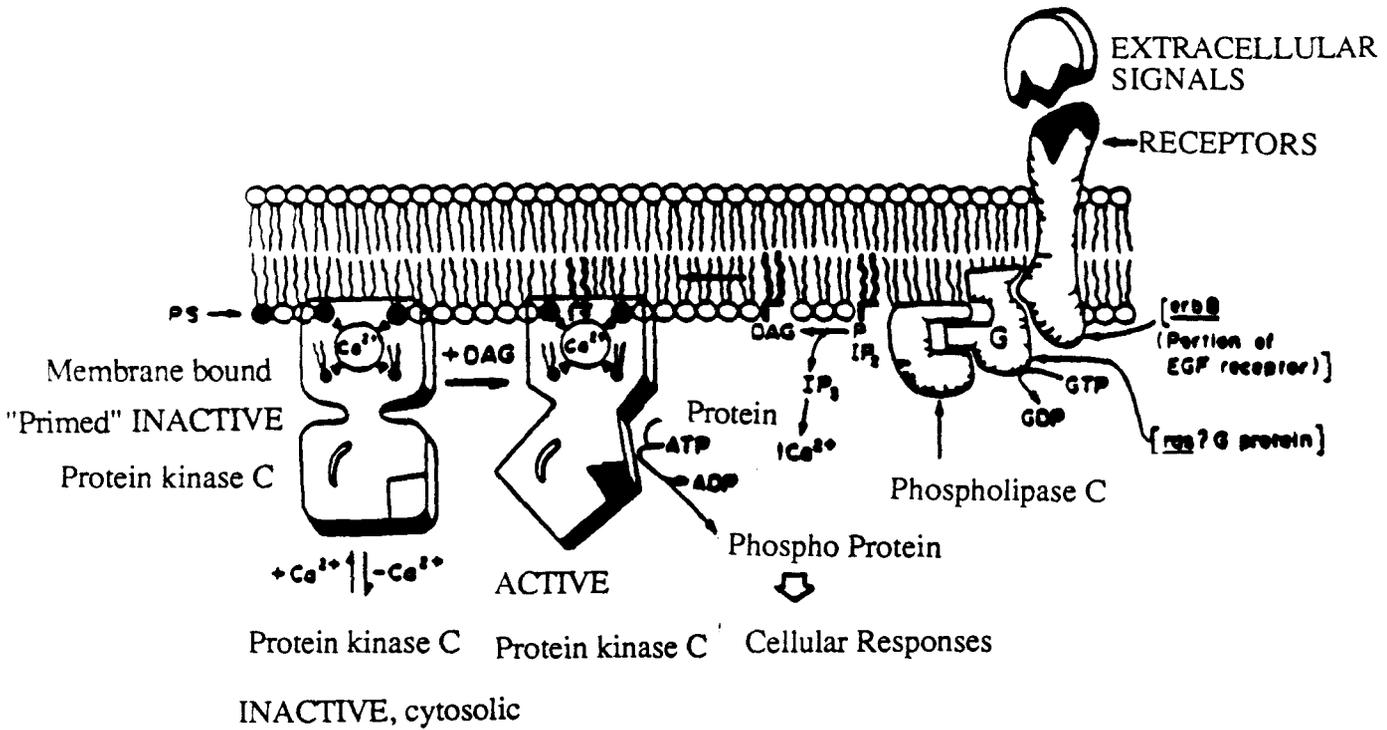


Figure 7 : modèle d'activation de la protéine kinase C *in vitro* [BELL 1986]

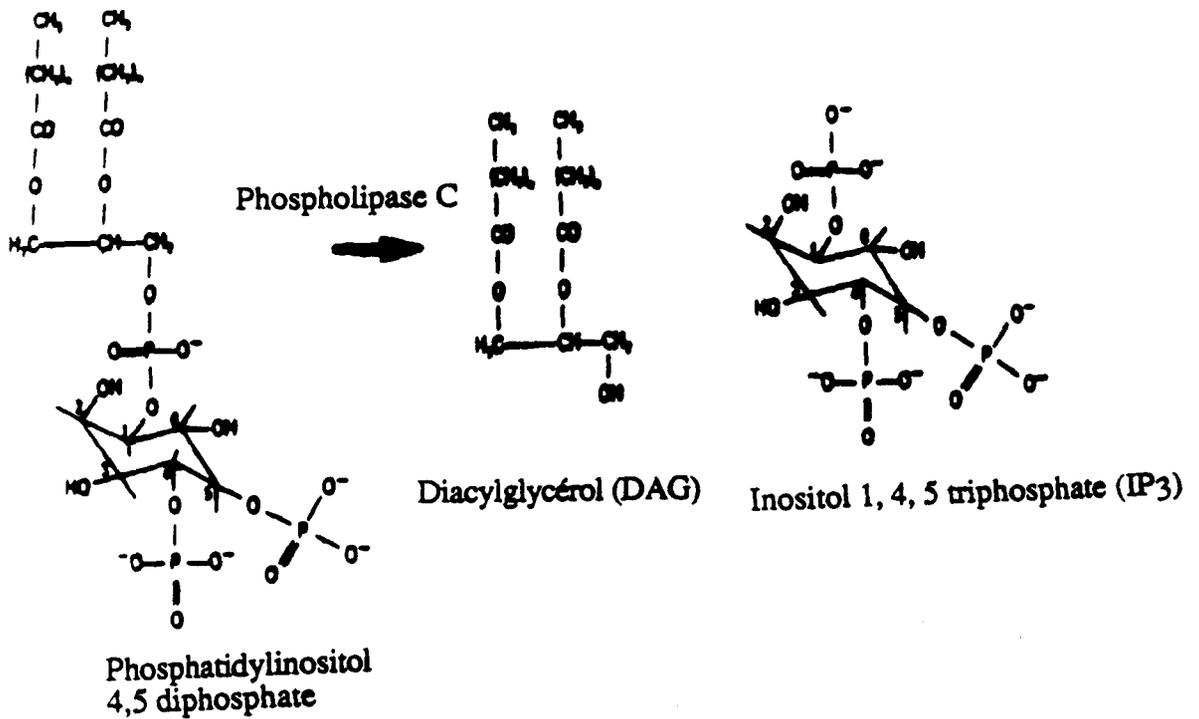


Figure 8 : action de la phospholipase C

Quand un ligand se lie à certains récepteurs de la membrane cellulaire, le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate est hydrolysé par une phospholipase C (phosphomonoestérase) produisant ainsi l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) agissant tous deux comme seconds messagers [EDELMAN 1987, HUANG 1989, ASAOKA 1992, AZZI 1992].

Le rôle de l'IP₃ est de libérer le calcium séquestré dans des réserves intracellulaires comme le réticulum endoplasmique.

Le DAG reste intégré dans les membranes cellulaires, son existence est de très courte durée. Son action de "second messenger" se traduit par l'activation de la PKC. Son activation est dépendante du calcium et nécessite la présence de phosphatidylsérine. D'autres phospholipides comme le phosphatidyléthanolamine et la sphingomyéline sont inactifs [EDELMAN 1987].

La transformation de la PKC sous forme active s'établit très rapidement et elle est de durée brève. Cependant les conséquences de son activité sont durables en raison de la stabilité des protéines phosphorylées, une grande partie d'entre elles constituant de mauvais substrats pour les phosphatases [NISHIZUKA 1986]. Le processus d'activation est complexe.

D'une part, le calcium favorise l'insertion membranaire de la PKC, présente dans le cytoplasme sous forme inactive, afin qu'elle se localise à proximité du DAG lors de sa stimulation [EDELMAN 1987, AZZI 1992].

D'autre part, le calcium et la phosphatidylsérine accroissent l'affinité de la protéine pour le DAG. Ce dernier assure la stabilisation d'un complexe quaternaire comprenant une molécule de protéine kinase C, quatre molécules de phosphatidylsérine et un ion calcium (figure 7) [BELL 1986].

En apportant des modifications à la molécule de DAG, on a pu montrer que son effet activateur dépendait de la présence de trois hydroxyles, de leur substitution en 1 et 2 par des acides gras dont l'un au moins doit comporter une chaîne longue (accroissement d'activité en passant de 3 à 11 carbones) [EDELMAN 1987, HUANG 1989].

3.2. Activation de la PKC par la 1,2-diacyl-sn-glycérol-3-phosphocholine

La 1,2-diacyl-sn-glycérol-3-phosphocholine ou PC est un substrat pour diverses phospholipases : PLA₂, PLC et PLD et à ce titre donne naissance à des seconds messagers très variés.

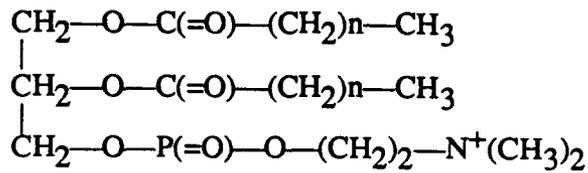
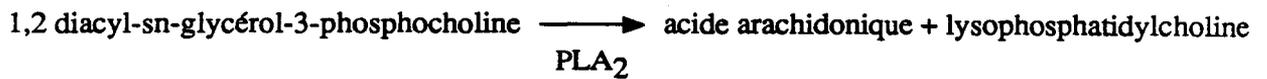


Figure 9 : phosphatidylcholine

3.2.1. La voie de la phospholipase A₂



Certaines hormones stimulent l'hydrolyse de la PC par la PLA₂ libérant ainsi de l'acide arachidonique et de la lysophosphatidylcholine (lysoPC) [HUANG 1989, PELECH et VANCE 1989, EXTON 1990, ASAOKA 1992].

Ces deux métabolites sont des modulateurs de l'activité des protéines kinases C et à ce titre, interfèrent avec le métabolisme cellulaire [HUANG 1989, ASAOKA 1992].

3.2.2. Les voies des phospholipases C et D

Ce n'est que très récemment que les voies produisant du DAG par l'hydrolyse de la PC sont considérées comme des alternatives à la voie des phosphoinositides (figure 10) [ASAOKA 1992, AZZI 1992].

La voie de la PLC est directe. Elle hydrolyse la PC en DAG et en phosphocholine. En revanche, la voie de la PLD est indirecte. Elle scinde en effet la PC en acide phosphatidique et choline [PELECH et VANCE 1989, HUANG 1989, RANDELL 1992, ASAOKA 1992, AZZI 1992]. Une phosphohydrolase est nécessaire pour convertir ensuite l'acide phosphatidique en DAG [KROLL et SCHAFER 1989]. Les métabolites issus des deux voies, DAG et acide phosphatidique, sont impliqués dans les réponses cellulaires soit en activant les protéines kinases C, soit en mobilisant éventuellement le calcium intracellulaire.

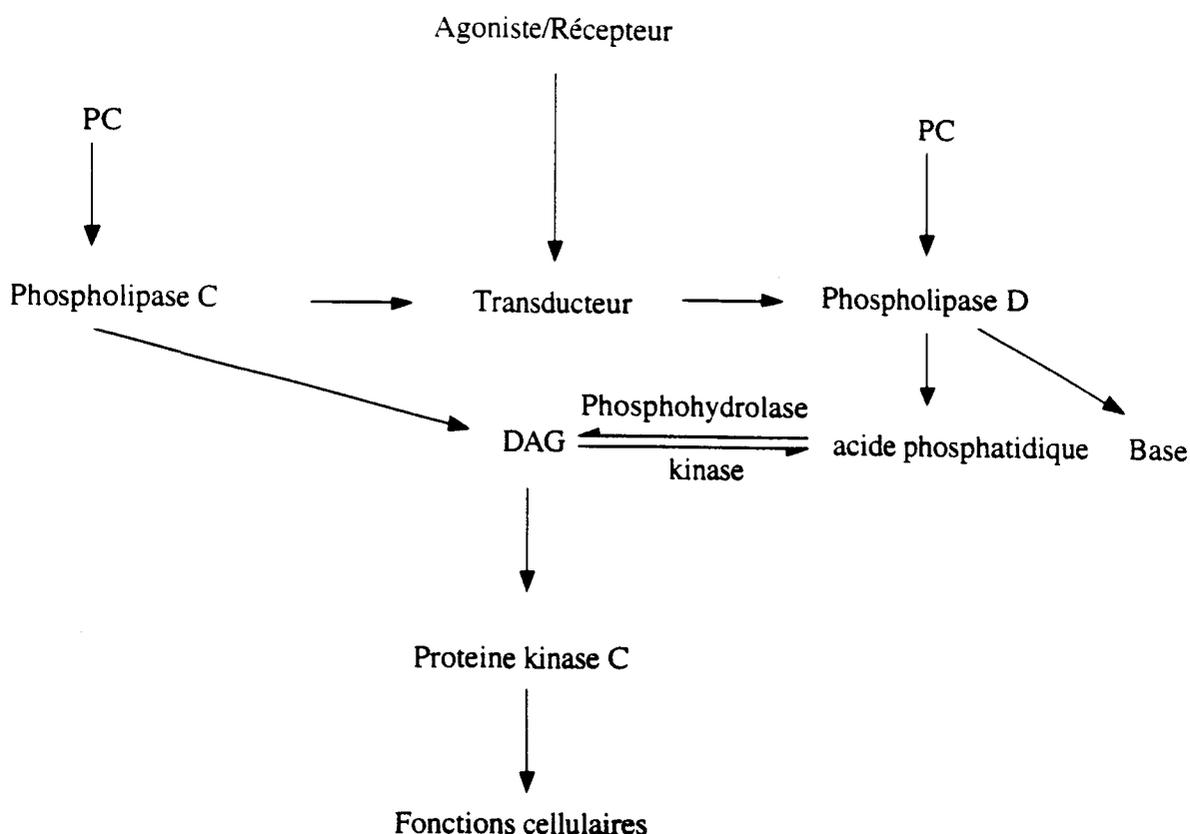


Figure 10 : rôle des phospholipases C et D dans la production du DAG à partir de la phosphatidylcholine [SHUKLA et HALENDA 1991]

3.3. Activation par les esters du phorbol

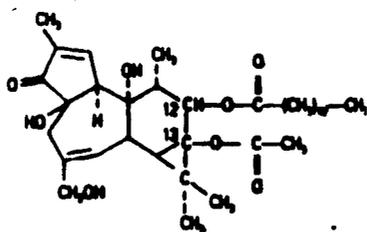


Figure 11 : TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate

Les esters du phorbol comme le TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate, un groupe de substances à activité tumorigène dont le caractère lipophile permet le passage à travers la membrane peut activer la PKC directement *in vitro* et *in vivo* [NISHIZUKA 1984, NISHIZUKA 1986, EDELMAN 1987, HANKS 1988].

La présence de deux sites d'estérification en 12 et 13 dont l'un doit être occupé par un substituant à longue chaîne ainsi que la position d'atomes d'oxygène constituent des

éléments de structure qui sont superposables à ceux du DAG [NISHIZUKA 1984]. Le processus d'activation de la PKC par les esters du phorbol est comparable à l'activation physiologique. Cependant, il y a une différence majeure entre l'activation par le DAG en réponse à la mise en jeu d'un récepteur et l'action de ces agents : ces derniers produisent une activation permanente alors que l'action du DAG est brève.

4. Rôle de la PKC

4.1. Phosphorylation de substrats peptidiques

In vitro, la PKC phosphoryle un très grand nombre de substrats peptidiques au niveau d'une sérine ou d'une thréonine [EDELMAN 1987, WOODGETT 1986, NISHIZUKA 1986]. Mais il n'est pas prouvé que ces protéines soient substrat *in vivo*. Le tableau suivant rassemble quelques protéines phosphorylées *in vitro* et supposées substrat de la PKC *in vivo* [NISHIZUKA 1986].

Tableau 2 : substrats physiologiques possibles de la protéine kinase C [NISHIKUKA 1986]

Protéines récepteurs

Récepteurs à l'EGF

Récepteur de l'insuline

Récepteur de la somatomédine C

Récepteur de la transferrine

Récepteur de l'IL-2

Récepteur de l'acétylcholine nicotinique

Récepteur β adrénergique

Récepteur de l'immunoglobuline E

Protéines membranaires

ATPase transporteuse du Ca^{2+} .

Na^+/K^+ ATPase

Canal à Na^+

Système échangeur de Na^+/H^+

Transporteur du glucose

Antigène HLA

Protéines contractiles et du cytosquelette

Chaînes légère de myosine

Troponine

Vinculine

Filamine

Caldesmone

Protéine C cardiaque

Protéines associées aux microtubules

Enzymes

Glycogène phosphorylase kinase

Glycogène synthétase

Tyrosine oxydase

NADPH oxydase

Cytochrome P 450

Guanylate cyclase

DNA méthylase

Kinase de la chaîne légère de myosine

Facteur d'initiation

Autres protéines

Fibrogène

Rétinoïde

Protéines liées à la vitamine D

Protéines S6 ribosomales

Moduline GABA

Protéine de myéline basique

4.2. Détermination des séquences spécifiques de reconnaissance pour la PKC

La spécificité des substrats pour une kinase est liée à la séquence d'acides aminés entourant le résidu phosphorylable. De nombreuses équipes ont essayé de déterminer une séquence spécifique minimale de reconnaissance pour la PKC [FERRARI 1985, TURNER 1985, WOODGETT 1986, EDELMAN 1987, FERRARI 1987, HOUSE 1987, HOUSE et KEMP 1987, NELSESTUEN 1991, AZZI 1992].

En dépit de certaines divergences d'opinion, les auteurs s'accordent sur plusieurs critères de reconnaissance :

- l'enzyme exige au moins une arginine à proximité du résidu phosphorylable,
- l'affinité croît avec le nombre de résidus basiques, qu'ils soient situés en C-term ou en N-term,
- le résidu arginine est le plus efficace pour induire la reconnaissance par l'enzyme.

Il existe également des "déterminants négatifs" de reconnaissance, ainsi la présence d'acides aminés de type acide comme l'acide aspartique en position N-terminale par rapport au site de phosphorylation peut abolir totalement l'effet positif apporté par un cluster de résidus basiques [RICOUART 1989].

Depuis 1993, des études de peptides synthétiques issus de la neurogranine (protéine spécifique du cerveau) ont montré l'importance de résidus hydrophobes comme la phénylalanine proche du résidu phosphorylable [CHEN 1993].

Le peptide synthétique NG (28-43) dont la séquence est A₂₄NAAAQIQA₅FRGHMARKKIKSGER₄₉, s'avère être un bon substrat et très spécifique de la PKC (constante de MICHAELIS (K_m) = 150 nM).

Le tableau ci-après montre l'importance de l'arginine³⁶ et de la phénylalanine³⁵ proche de la sérine³⁴ phosphorylable.

Tableau 3 : importance des résidus K³⁶ et F³⁴ dans le peptide NG (28-43)

	K_m (μM)
NG (28-43) = AAKIQASFRGHMARKK	0,15
[R ³⁰] NG (28-43) = AARIQASFRGHMARKK	0,10
[A ³⁵] NG (28-43) = AAKIQASARGHMARKK	150
[I ³⁵] NG (28-43) = AAKIQASIRGHMARKK	5
[I ³⁶] NG (28-43) = AAKIQASFIGHMARKK	46

4.3. Rôle physiologique de la PKC

Le rôle des PKC dans les réponses cellulaires est extrêmement diversifié. Les réponses cellulaires consécutives à la phosphorylation des substrats de la protéine kinase C sont répertoriées dans le tableau 4 (rôle dans les systèmes hormonaux, nerveux, immunitaires, musculaires) [NISHIZUKA 1984, NISHIZUKA 1989].

Tableau 4 : rôle de la PKC dans les réponses cellulaires [NISHIZUKA 1986, NISHIZUKA 1988, NISHIZUKA 1989]

CELLULES ET TISSUS

Système endocrine

Glandes surrénales

Ilôts pancréatiques

Hypothalamus

Cellules pituitaires

Cellules de la parathyroïde

Cellules C de la Thyroïde

Cellules de Leydig

Système exocrine

Acini du Pancréas

Parotide

Glande sousmandibulaire

Glande gastrique

Cellules alvéolaires

Système nerveux

Synapses de neurones

Jonctions neuromusculaires

Cellules PC12

Neurones

Système musculaire

Muscle cardiaque

Systèmes inflammatoires et immunologiques

Plaquettes

Neutrophiles

Basophiles

Mastocytes

Lymphocytes

Autres systèmes cellulaires

Adipocytes

Hépatocytes

Cellules épidermiques

RÉPONSES CELLULAIRES

Sécrétion de Catécholamines,
stéroïdogénèse, sécrétion d'aldostérones,
libération d'Insuline

Libération d'hormones

Libération d'hormones de croissance

Libération d'hormones lutéinisantes

Libération de prolactine

Libération de tyrotropine

Libération d'hormones

Libération de calcitonine

Stéroïdogénèse

Sécrétion d'amylases

Sécrétion d'amylases de mucines

Sécrétion de mucines

Sécrétion de pepsinogènes

Sécrétion de l'acide gastrique

Sécrétion du surfactant

Libération de neurotransmetteurs

Libération de neurotransmetteurs

Libération de la dopamine

Conductance de la membrane

Contraction musculaire

Libération de sérotonine

Libération d'enzymes lysosomiales

Synthèse de thromboxane

Production de superoxydes

Libération d'enzymes lysosomiales

Transport d'hexoses

Libération d'histamine

Libération d'histamine

Libération d'histamine

Lipogénèse, transport du glucose

Glucogénèse, transport du glucose

Inhibition des jonctions communicantes

II. LA PROTEINE KINASE A

1. Définition

La protéine kinase A (ou PKA) est une sérine/thréonine kinase dépendante de nucléotides cycliques, qui présente des fonctions physiologiques analogues à la PKC et de nombreux substrats communs.

A l'état natif, la protéine kinase A est sous forme d'un tétramère comprenant deux sous-unités catalytiques C et deux sous-unités régulatrices R.

Sur chaque sous-unité C, on trouve au moins trois sites spécifiques : l'un se lie au Mg^{2+} ATP, l'autre au substrat (peptide ou protéine) à phosphoryler, le troisième est le site de catalyse proprement dit au niveau duquel s'effectue la réaction de transfert du groupement phosphate.

2. Activation de la PKA par l'AMPc

L'adénylate-cyclase transforme l'ATP en adénosine monophosphate cyclique (AMPc).

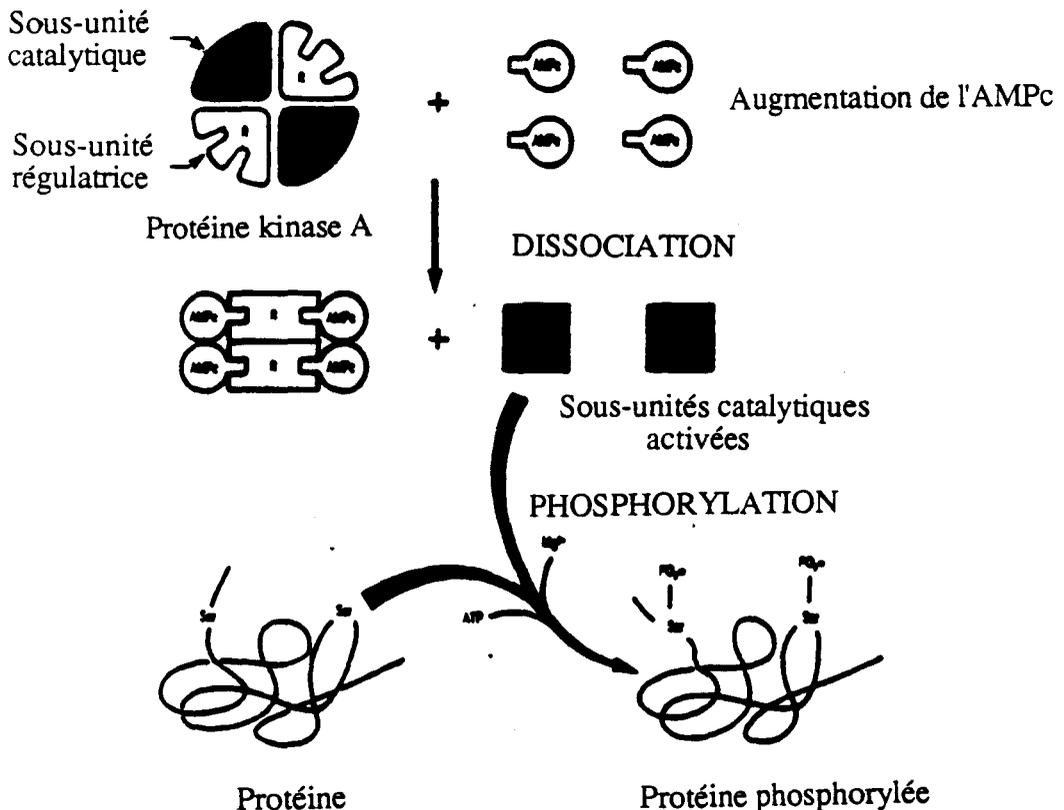


Figure 12 : activation de la PKA par l'AMPc [EDELMAN 1987]

L'activation de la PKA correspond à une dissociation des sous-unités catalytiques (figure 12). Quand le taux d'AMPc augmente, il se fixe avec une forte affinité à raison de 2 AMPc par sous-unité R. Ceci entraîne une baisse d'affinité entre R et C, provoquant ainsi la dissociation de l'enzyme en un dimère R₂ portant 4 AMPc et deux sous-unités catalytiques C libérées. Ces sous-unités catalytiques constituées de deux lobes, vont ainsi pouvoir phosphoryler de nombreuses protéines.

3. Détermination de la séquence spécifique de reconnaissance pour la PKA

1	GNAAAARKGS	EQESVKEFLA	KAKEDFLKKW	ENPAQNTAHL	DQFERIKTLG	TGSFGRVMLV
61	KHMETGNHYA	MKILDKQKVV	KLKQIEHTLN	EKRILQAVNF	PFLVKLEFSF	KDNSNLYMVM
121	EYVPGGEMFS	HLRRIGRFSE	PHARFYAAQI	VLTFEYLHSL	DLIYRDLKPE	NLLIDQQGYI
181	QVTDFGFAKR	VKGRTWTLCG	TPEYLAPEII	LSKGYNKAVD	WWALGVLIYE	MAAGYPPFFA
241	DQPIQIYEKI	VSGKVRFP SH	FSSDLKDLLR	NLLQVDLTKR	FGNLKDG VND	IKNHKWFATT
301	DWIAIYQRKV	EAPFIPKFKG	PGDTSNFDDY	EEEEIRVSIN	EKCGKEFSEF	

Figure 13 : séquence d'acides aminés de la sous-unité catalytique de la PKA de coeur de boeuf [BRAMSON 1982, SHOJI 1983]

Une séquence minimale de reconnaissance a également été déterminée pour la PKA. Elle reconnaît des structures de type Arg—Arg—X—Ser/Thr (X est un acide aminé quelconque) [KEMP 1977].

La nature des résidus situés en C-term de cette séquence influence fortement la reconnaissance :

- effet positif pour les résidus hydrophobes,
- effet négatif pour les résidus basiques.

Chapitre II

Inhibiteurs de type bis-ATP

I. Choix d'un modèle susceptible de se fixer sur les deux sites ATP potentiels de l'enzyme et ébauche d'une structure bis-ATP

Dans le but de réaliser des inhibiteurs bis-ATP, il nous fallait concevoir les deux mimes ATP et les lier de façon covalente.

Comme monomère susceptible de reconnaître chacun des deux sites accepteurs de l'ATP, le composé **4** : N-[2-(5-isoquinoléine sulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionate de méthyle a été choisi.

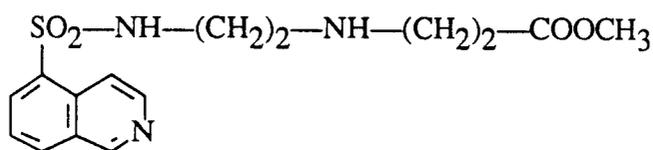
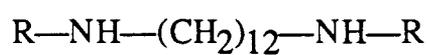
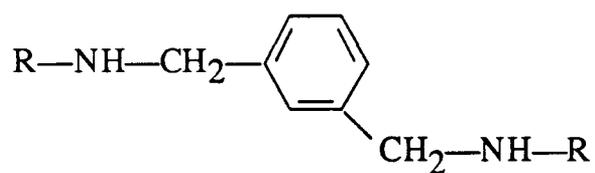
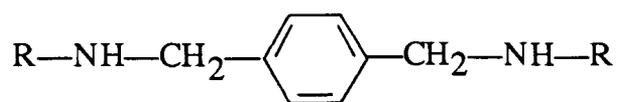


Figure 14 : composé **4**

Ce dérivé d'isoquinoléine sulfonamide connu pour inhiber la PKC et les kinases dépendantes de nucléotides cycliques en interagissant avec le site de liaison de l'ATP (IC_{50} PKC = 20 μ M), possède une fonction ester pouvant mener à la liaison à un bras espaceur ou "linker".

En l'absence de résultats cristallographiques concernant la PKC, la distance séparant les deux sites potentiels de fixation de l'ATP n'était pas évaluable et les deux mimes ATP ont donc été reliés par deux types de bras espaceurs (figure 15).

- Comme première hypothèse, nous avons supposé que ces deux sites étaient très proches l'un de l'autre. Nous avons donc utilisé comme bras espaceurs le métaxylène diamine et le paraxylène diamine. La structure de ces deux isomères correspondait à une localisation proche des deux mimes ATP mais à une orientation spatiale différente.
- Nous avons émis comme deuxième hypothèse que ces deux sites pouvaient être assez éloignés l'un de l'autre. Nous avons donc opté pour un bras espaceur beaucoup plus flexible consistant en la chaîne aliphatique du 1,12 diaminododécane. La flexibilité de ce linker devait permettre une plus grande tolérance de l'inhibiteur vis à vis de la distance et de l'orientation respectives des deux sites ATP.



avec R : $\text{SO}_2\text{NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO}$

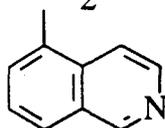


Figure 15 : bras espaceurs utilisés



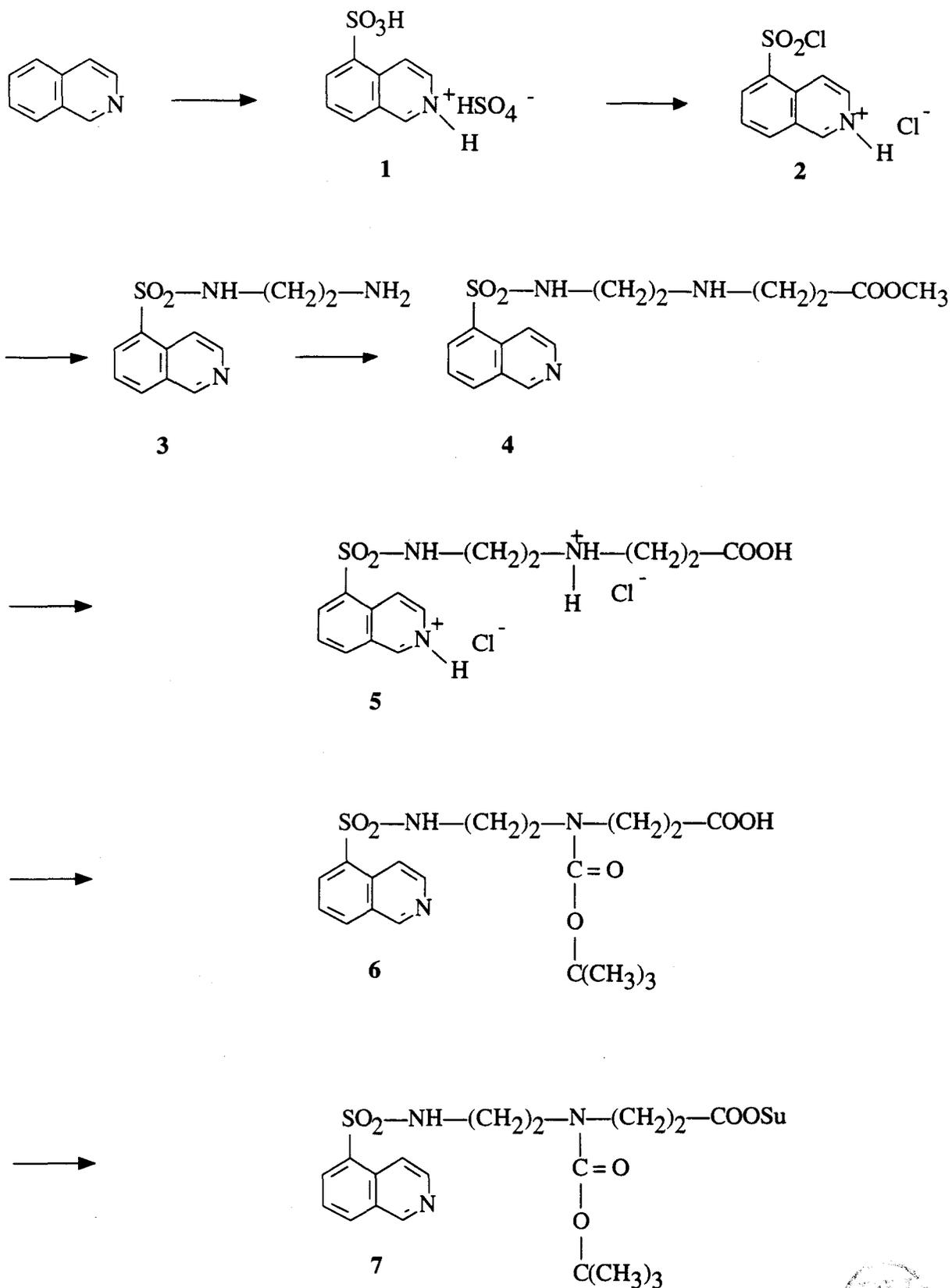
II. Synthèse d'inhibiteurs de type bis-ATP

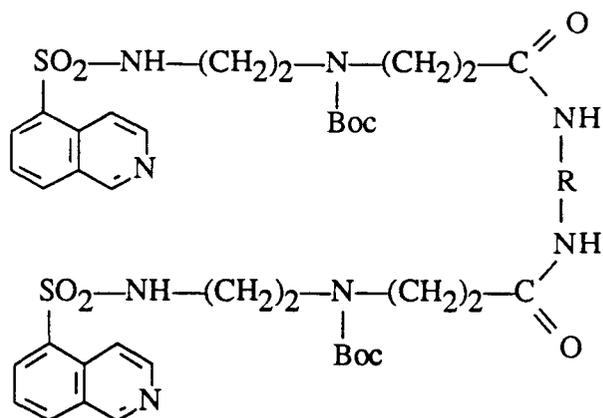
1. Voie de synthèse utilisée

Les composés **11**, **12** et **13** sont obtenus de la manière suivante (tableau synoptique 1) :

L'acide N-[2-(5-isoquinoléine sulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique est obtenu à partir du composé **4** préalablement décrit [RICOUART 1991] par saponification avec de la soude méthanolique. Après protection de l'amine secondaire par un groupement tert.butyloxycarbonyle et activation de la fonction acide par formation d'un ester de N-hydroxysuccinimide, le composé **7** est alors préparé. Sa condensation avec le métaxylène diamine, le paraxylène diamine et le 1,12 diaminododécane donne respectivement les composés **8**, **9** et **10**. Les produits finaux **11**, **12** et **13** sont obtenus par clivage du groupement tert.butyloxycarbonyle sous l'action de l'acide trifluoroacétique à 50 % (v/v) dans le chlorure de méthylène.

Tableau synoptique 1 : voie de synthèse pour préparer les composés 11, 12 et 13

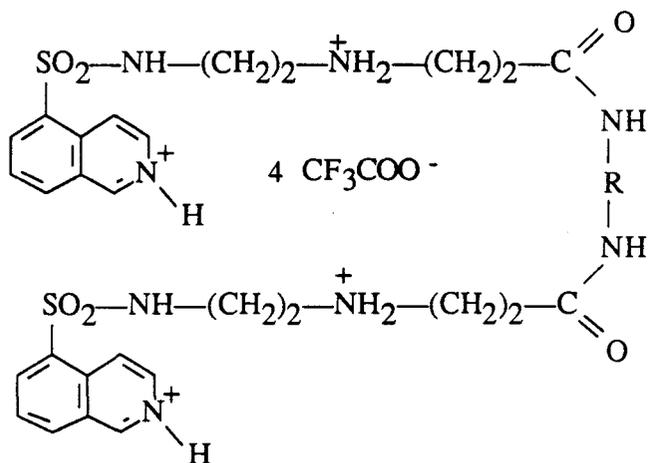




composé 8 : $R = \text{CH}_2\text{---C}_6\text{H}_4(\text{méta})\text{---CH}_2$

composé 9 : $R = \text{CH}_2\text{---C}_6\text{H}_4(\text{para})\text{---CH}_2$

composé 10 : $R = (\text{CH}_2)_{12}$

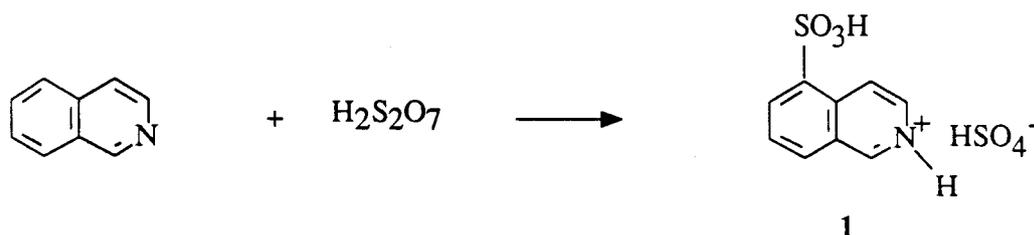


composé 11 : $R = \text{CH}_2\text{---C}_6\text{H}_4(\text{méta})\text{---CH}_2$

composé 12 : $R = \text{CH}_2\text{---C}_6\text{H}_4(\text{para})\text{---CH}_2$

composé 13 : $R = (\text{CH}_2)_{12}$

2. Synthèse de l'acide 5-isoquinoléine sulfonique : 1

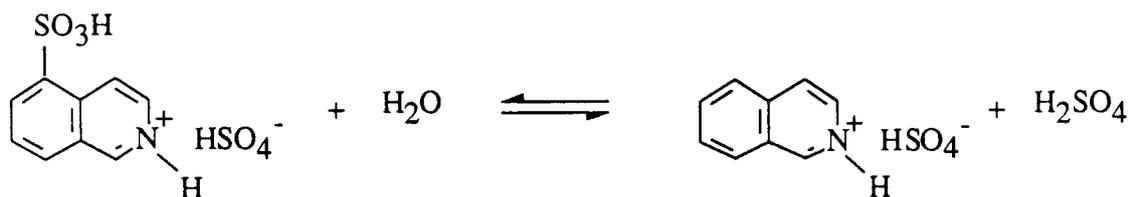


La synthèse de l'acide 5-isoquinoléine sulfonique est réalisée selon la méthode de C. F. KOESCH par addition d'acide sulfurique fumant sur l'isoquinoléine [KOESCH et ALBERSON 1953].

Lors de la sulfonation, on peut obtenir des acides mono, di et trisulfoniques et même des sulfones. Pour la synthèse d'acides monosulfoniques aromatiques, l'acide sulfurique concentré est additionné à froid.

La sulfonation est une réaction réversible et équilibrée. Les dérivés sulfonés régénèrent le dérivé aromatique initial en s'hydrolysant facilement en présence d'eau. Pour éviter cette réaction parasite, on utilise de l'acide sulfurique fumant (oléum) afin de déplacer l'équilibre réactionnel dans le sens de la formation du composé **1**.

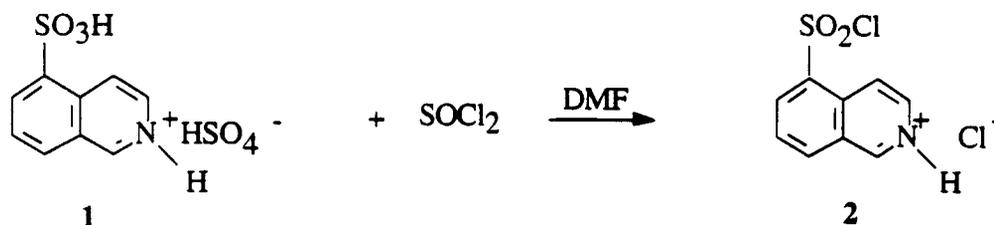
Réaction d'hydrolyse :



Les acides sulfoniques peuvent donner naissance à des liaisons ester ou amide. La préparation de ces molécules est facilitée grâce au sulfochlorure dont la réactivité est supérieure à celle de l'acide sulfonique correspondant.

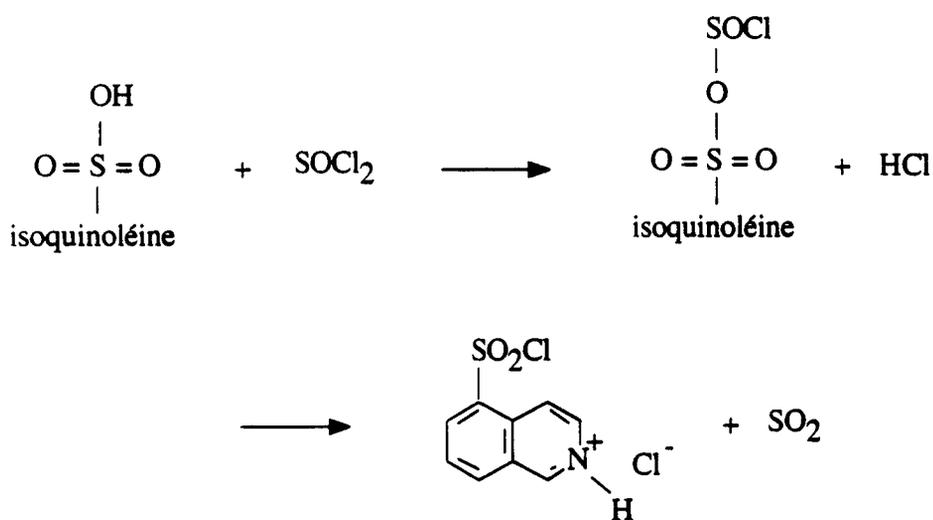
3. Synthèse du chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle : 2 et du N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide : 3

La préparation du chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle est réalisée selon la méthode proposée par A. MORIKAWA [MORIKAWA 1989].

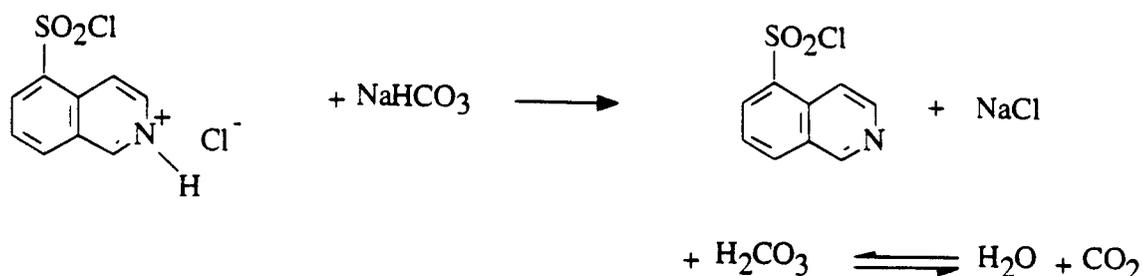


Ce procédé consiste à porter à reflux un mélange d'acide 5-isoquinoléine sulfonique, de chlorure de thionyle (SOCl₂) et de diméthylformamide pendant 3 heures. L'excès de chlorure de thionyle est éliminé par distillation.

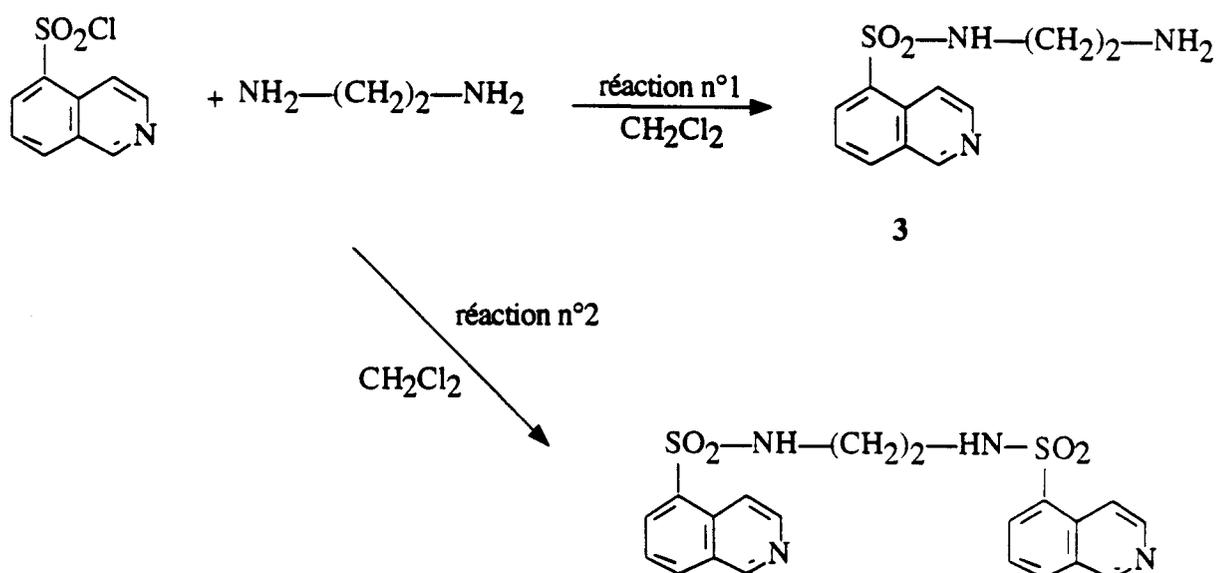
Le chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle (sous forme de sel d'isoquinolénium) est alors obtenu avec un rendement de 90 %. Le mécanisme de la réaction se décrit de la façon suivante.



En amenant le pH entre 7 et 8, le chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle passe en phase organique et peut ainsi réagir avec l'éthylène diamine pour former le N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide.



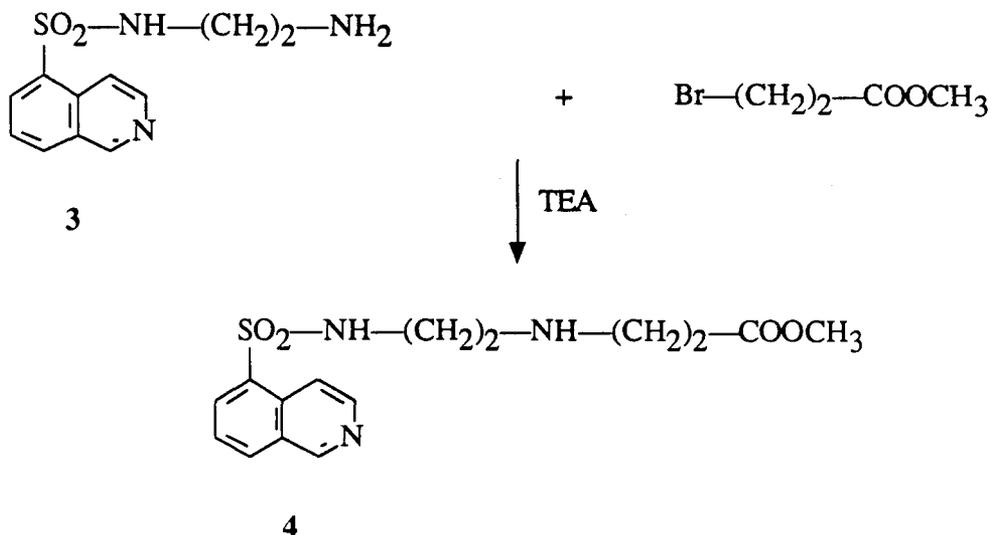
La substitution du groupement sulfochlorure par l'éthylène diamine peut conduire à des produits de monosubstitution (réaction n°1) ou de disubstitution (réaction n°2) selon le schéma suivant :



L'addition goutte à goutte d'une solution de chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle dans le chlorure de méthylène à l'éthylène diamine en excès conduit au produit de monosubstitution attendu. La réaction est effectuée à température ambiante pendant 2 heures. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince de silice et la présence de la fonction amine primaire est révélée par la réaction à la ninhydrine qui, par chauffage, développe une coloration rouge. Après purification par CCE, le produit désiré est obtenu à l'état pur. Son point de fusion (Pf = 104°C) est identique à celui décrit dans la littérature.

Le rendement de cette réaction avoisine 30 %. Cette valeur faible est due à l'hydrolyse facile du chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle en milieu aqueux. L'acide 5-isoquinoléine sulfonique régénéré n'est pas assez réactif pour réagir avec l'éthylène diamine.

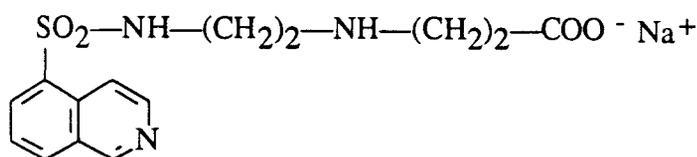
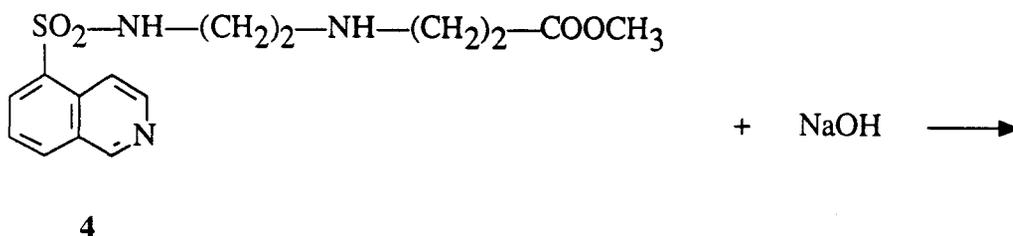
4. Synthèse du N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionate de méthyle : 4



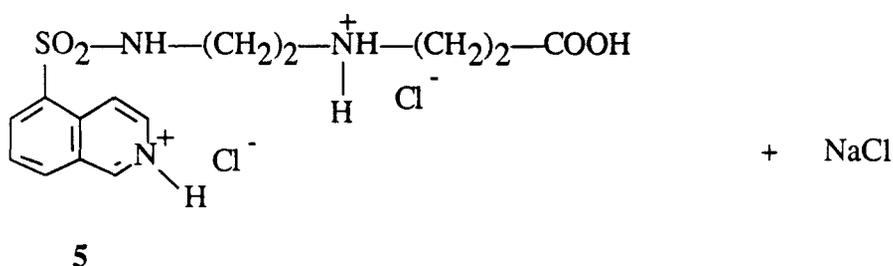
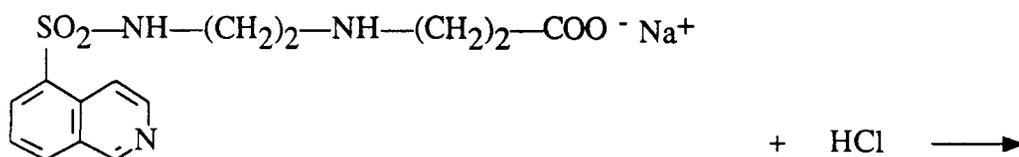
Le N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide est traité par le 3-bromopropionate de méthyle dans le chlorure de méthylène en présence de triéthylamine. Il est nécessaire de travailler en présence d'un mélange stoechiométrique du dérivé 3 et du 3-bromopropionate de méthyle afin d'éviter l'alkylation poussée de l'amine primaire conduisant à la formation d'un sel d'ammonium. L'évolution de la réaction est suivie en CCM. La disparition de la fonction amine primaire est contrôlée par le test à la ninhydrine. La structure de 4 est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

5. Synthèse de l'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique : 5

pH basique



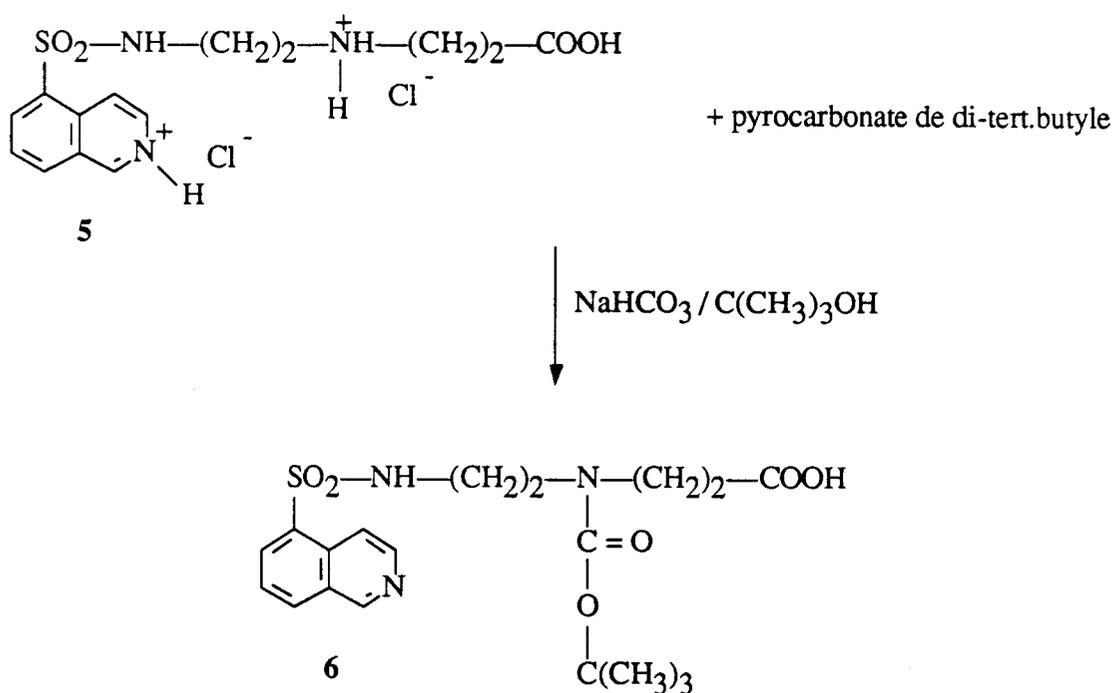
pH = 3



L'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique est obtenu à partir du composé 4 par saponification (soude méthanolique, à reflux pendant 30 minutes). Après évaporation du solvant, le pH de la solution aqueuse est ajusté à 3 par l'addition d'acide chlorhydrique 1N. Après évaporation de l'eau et ajout d'éthanol, le chlorure de sodium précipité à froid est éliminé par filtration de la solution. L'acide 5 est alors obtenu avec un rendement de 90 %.

6. Synthèse de l'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butyloxycarbonyl-3-aminopropionique : 6

Afin d'éviter par la suite les réactions secondaires menant à la formation de polymères, il est nécessaire de protéger temporairement la fonction amine secondaire de l'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique. Cela ne concerne pas l'azote de la fonction sulfonamide qui n'est pas nucléophile. Cette fonction amine secondaire est protégée par le groupement tert.butyloxycarbonyle ou Boc couramment utilisé en synthèse peptidique correspondant à une liaison uréthane sensible aux acides forts.



Le composé **5** solubilisé dans un mélange alcool tertiobutylique-hydrogénocarbonate de sodium aqueux 1N est traité par le pyrocarbonate de di-tert.butyle en excès pendant 15 heures. Lors de la réaction, un dégagement de dioxyde de carbone se produit, abaissant ainsi le pH de la solution. Une solution de carbonate de sodium 1N est alors additionnée afin de maintenir le pH de la solution entre 8 et 9 et permettre à la réaction de se poursuivre. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince de silice et la présence de la fonction uréthane est révélée par le réactif de Reindel-Hoppe qui, par chauffage, développe une coloration bleue foncée. Après purification par CCE, le dérivé **6** est obtenu à l'état pur avec un rendement de 60 %. Sa structure est confirmée

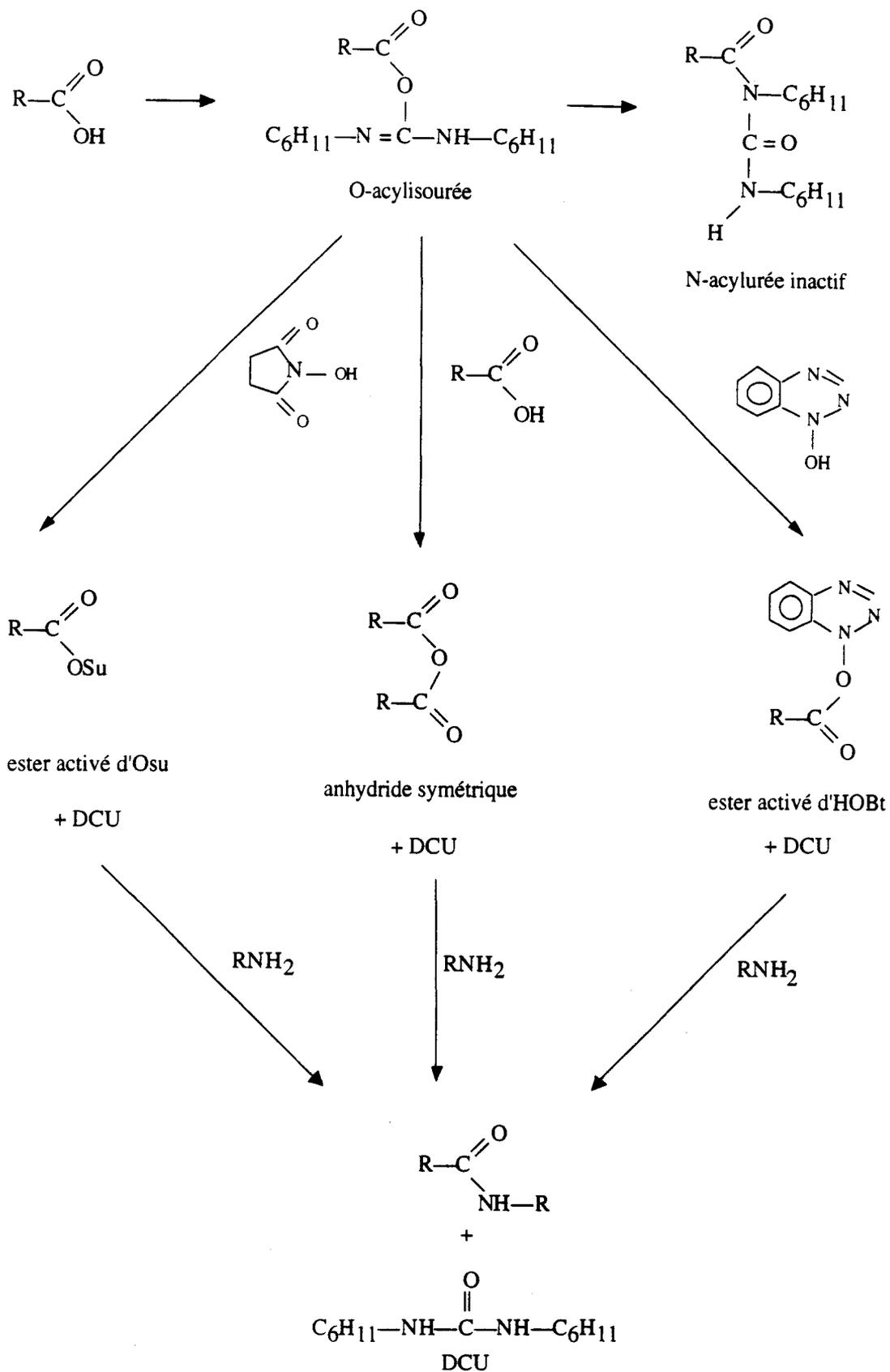
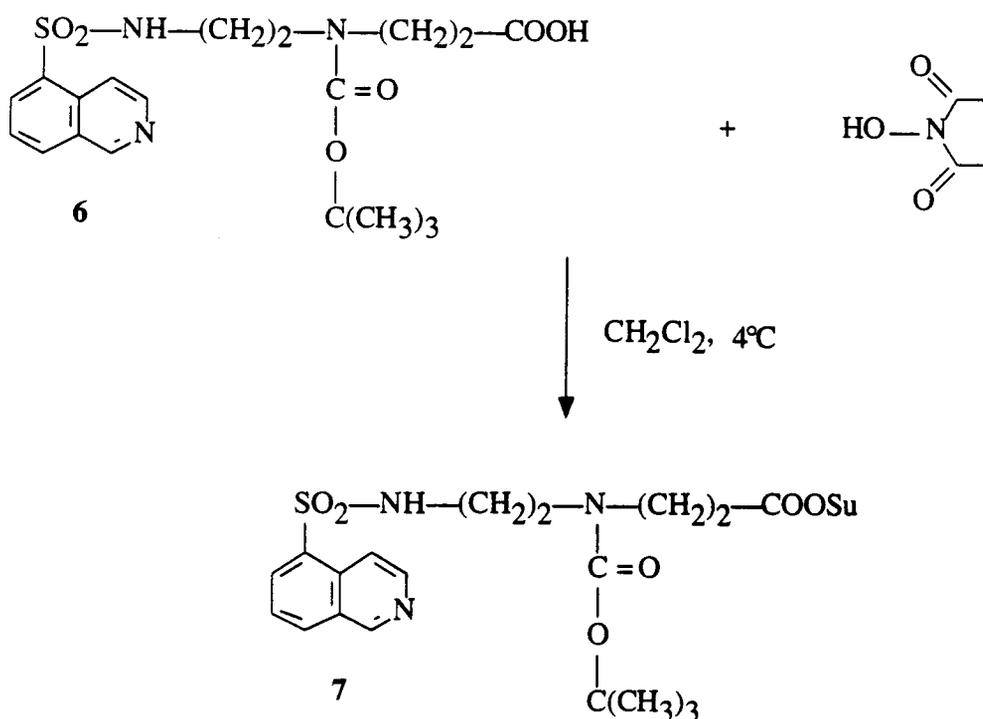


Figure 16 : formation d'espèces activées (ester de N-hydroxysuccinimide, ester d'hydroxybenzotriazole et anhydride symétrique) pour la création de liaisons amides

Nous avons choisi d'activer cette fonction acide carboxylique par formation d'ester de N-hydroxysuccinimide, ainsi le composé **6** est additionné à un équivalent de N-hydroxysuccinimide en présence de DCC dans le chlorure de méthylène.



L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Après séparation de la dicyclohexylurée formée, et concentration de la solution, le N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionate de N-hydroxysuccinimide obtenu est traité directement.

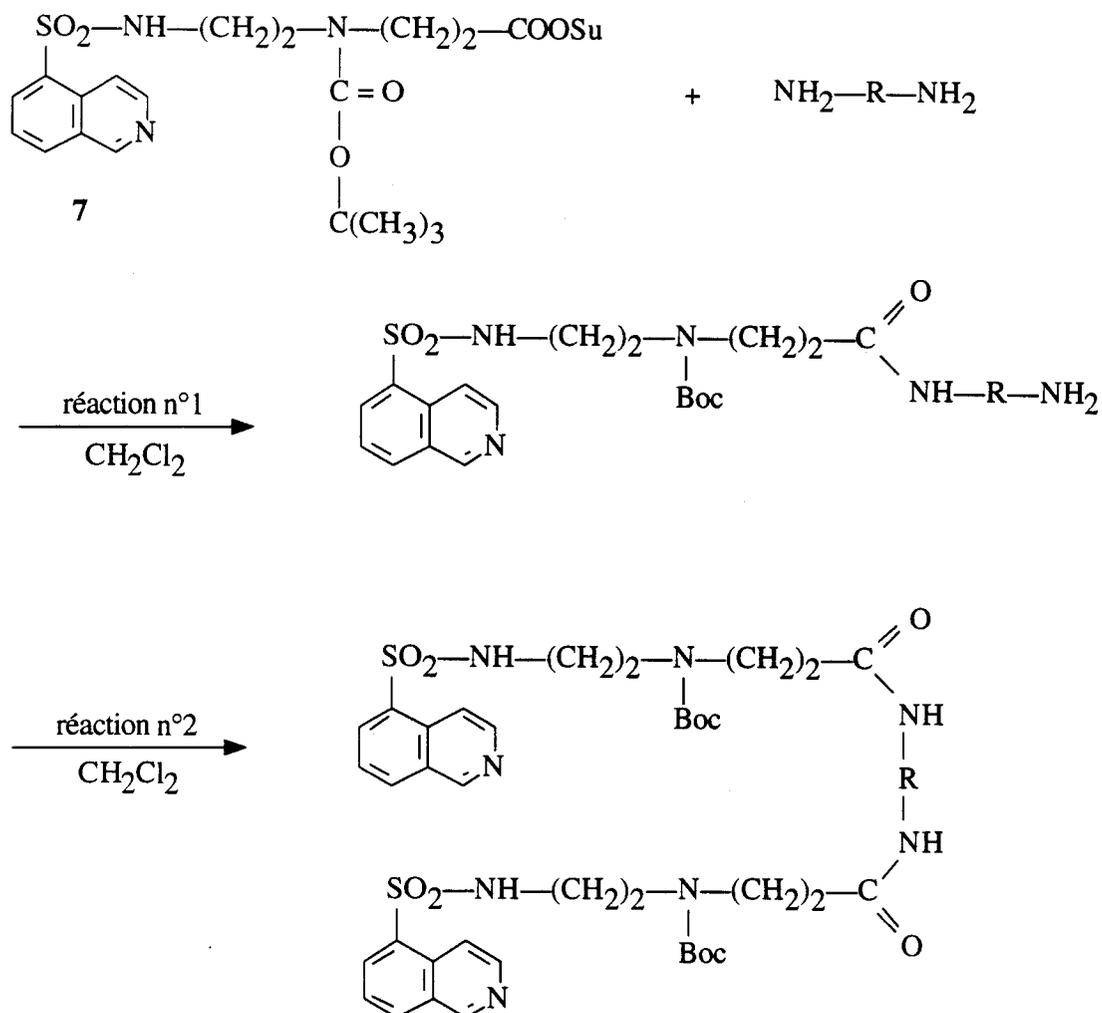
8. Synthèse des composés **8**, **9** et **10**

Composé **8** : Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N'-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionamide]-N-métaxylène,

Composé **9** : Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N'-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionamide]-N-paraxylène,

Composé **10** : Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N'-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionamide]-N-dodécane.

La condensation de polyamines comme le paraxylène diamine, le métaxylène diamine et le 1,12 diaminododécane peut conduire à des produits de monosubstitution (réaction n°1) ou de disubstitution (réaction n°2) selon le schéma suivant :



réaction n°2 : composé **8** : R = CH₂—C₆H₄(méta)—CH₂
 composé **9** : R = CH₂—C₆H₄(para)—CH₂
 composé **10** : R = (CH₂)₁₂

Ces deux produits sont facilement séparables par chromatographie sur couche épaisse de silice.

L'addition goutte à goutte d'une solution de polyamine (un équivalent) dans le chlorure de méthylène au composé **7** (deux équivalents) dans le chlorure de méthylène conduit au produit de disubstitution attendu. La réaction est effectuée à température ambiante pendant

12 heures. Le milieu réactionnel est suivi en chromatographie sur couche mince de silice. Après purification par CCE, le produit désiré est obtenu à l'état pur. Sa structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

Selon ce mode opératoire, nous avons préparé les analogues **8**, **9** et **10**.

Tableau 5 : caractéristiques des composés **8**, **9** et **10**

composés	Rdt	Test Reindel-Hoppe	Leur structure est confirmée par le spectre de RMN ¹ H dans lequel on observe les signaux caractéristiques des composés préparés.
8	20 %	positif	4,3 (4H, d, benzyl) 7,2 (4H, m, benzène)
9	20 %	positif	4,3 (4H, d, benzyl) 7,2 (4H, s, benzène)
10	25 %	positif	1,2 (16H, -(CH ₂) ₈ -) 1,4 (4H, t, CH ₂ -CH ₂ -NR-C(=O)) 2,4 (4H, t, CH ₂ -NR-C(=O)O)

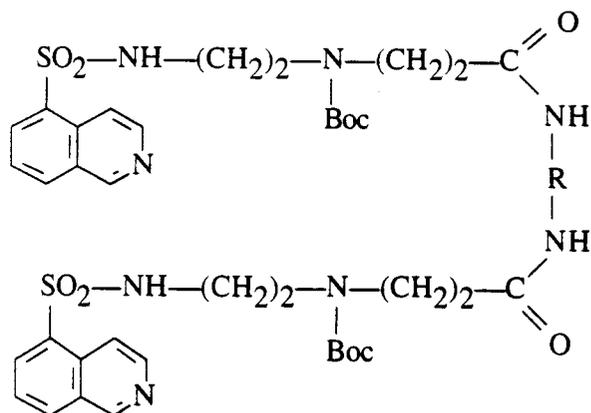
9. Synthèse des composés bis-ATP (**11**, **12** et **13**)

Composé **11** : trifluoroacétate de Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionamide]-N-métaxylène,

Composé **12** : trifluoroacétate de Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionamide]-N-paraxylène,

Composé **13** : trifluoroacétate de Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionamide]-N-dodécane.

La déprotection du groupement tert.butylloxycarbonyle est largement décrite dans la littérature. Elle peut être réalisée en milieu acide.

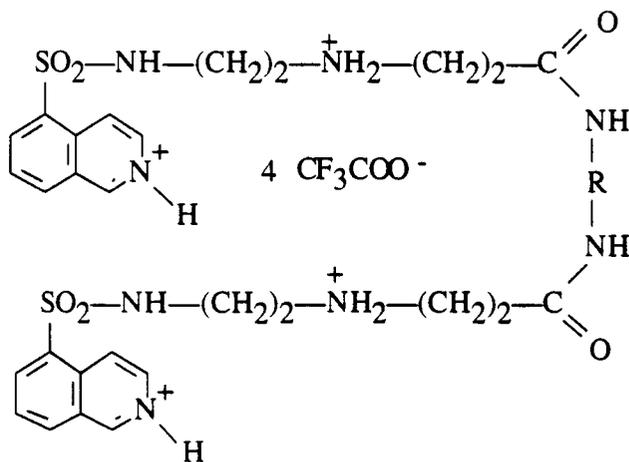


composé **8** : R = CH₂-C₆H₄(méta)-CH₂

composé **9** : R = CH₂-C₆H₄(para)-CH₂

composé **10** : R = (CH₂)₁₂

TFA-CH₂Cl₂ (50-50v/v)



composé **11** : R = CH₂-C₆H₄(méta)-CH₂

composé **12** : R = CH₂-C₆H₄(para)-CH₂

composé **13** : R = (CH₂)₁₂

III. Résultats

1. Tests d'inhibition des composés bis-ATP

L'activité des composés **11**, **12** et **13** a été testée en comparaison du produit de référence **4** vis à vis de la PKC, de la PKA et de la tyrosine kinase HL60 [BOUTIN 1989] en présence de leurs substrats respectifs (histones IIIS, histones IIA et angiotensine II). Les IC₅₀ obtenues sont détaillées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : inhibition de protéines kinases par les composés bis-ATP

Composés	IC ₅₀ PKC (μ M)	IC ₅₀ PKA (μ M)	IC ₅₀ tyrosine kinase HL60 (μ M)
11	5,5	3	inactif
12	8	7,3	80
13	25	10,5	inactif
4	22	12	1700

De façon générale, le pouvoir inhibiteur de nos dérivés **11**, **12** et **13** comparé à **4** est maintenu vis à vis de la PKC et de la PKA indiquant que les modifications chimiques introduites ont préservé la capacité du noyau isoquinoléine à interagir avec le site de reconnaissance de l'ATP de l'enzyme.

Excepté le produit **13** qui présente une activité du même ordre que celle du composé parent **4**, les inhibiteurs **11** et **12** se sont révélés plus actifs pour la PKC avec une IC₅₀ de 5,5 μ M et de 8 μ M respectivement. Malheureusement, leur défaut majeur est l'absence de spécificité pour la PKC. En effet, leur activité vis à vis de la PKA est supérieure à celle observée pour la PKC. Seul le dérivé **12** présente une activité inhibitrice vis à vis de la tyrosine kinase HL60.

2. Mode d'action du composé 11-Evaluation du K_i

Le composé **11** semblant être le dérivé le plus intéressant de la série, a été étudié plus en détail.

Une étude de compétition avec l'ATP a été réalisée. Le K_i du composé **11** a été évalué selon la méthode de Dixon pour des concentrations d'ATP variables. Pour les deux enzymes PKC et PKA, l'inhibiteur s'est révélé compétitif vis à vis du substrat. Les K_i obtenus sont respectivement $1,2 \mu\text{M}$ pour la PKC (figure 17) et $2,5 \mu\text{M}$ pour la PKA.

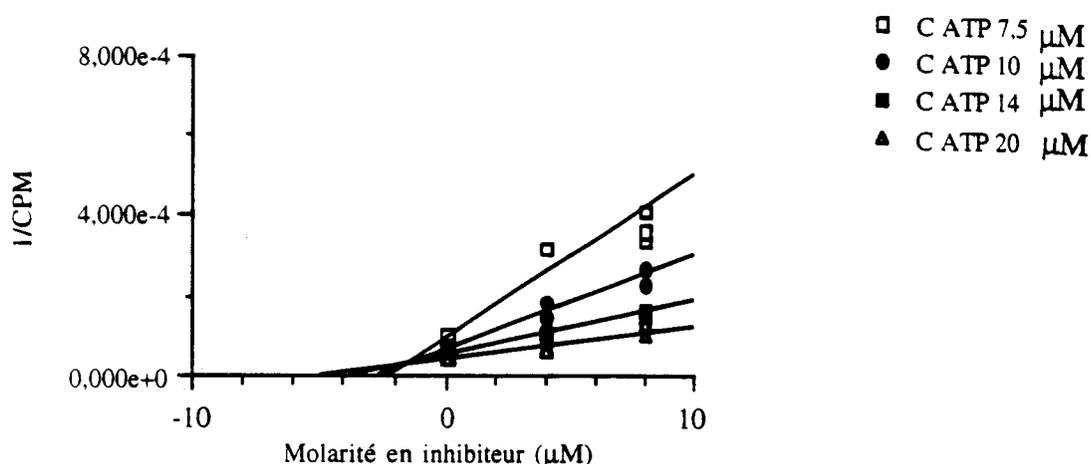
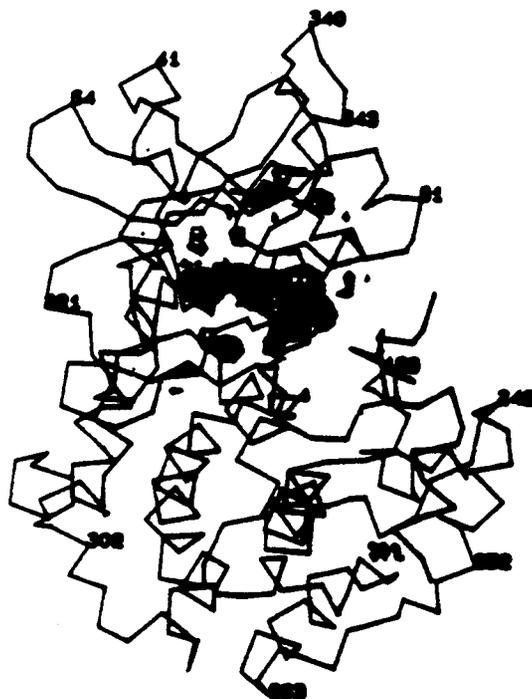


Figure 17 : compétition composé 11/ATP, détermination du K_i pour la PKC

D'après les résultats obtenus, il est peu probable que nos inhibiteurs bis-ATP interagissent simultanément avec les deux sites de reconnaissance de l'ATP de la PKC. En effet, d'une part, l'inhibition observée pour tous nos dérivés est inférieure à celle que l'on pouvait attendre d'un inhibiteur bisubstrat et d'autre part, nous n'avons observé aucune apparition de spécificité, l'inhibition étant même plus importante sur la PKA.

3. Évaluation de la distance séparant les deux sites de reconnaissance de l'ATP de la PKC

Au cours de l'avancement de notre travail, la structure cristallographique de l'un des deux domaines catalytiques de la protéine kinase A recombinante de souris complexée au peptide inhibiteur PKI (5-24) a été déterminée par D. R. KNIGHTON en 1991 (figure 18) [KNIGHTON 1991a et b].



- au complexe ternaire PKA-PKI (5-24)-ATP (figure 19) disponible depuis 1992 dans la banque de données PDB (Protein Data Bank, BROOKHAVEN National Laboratory),

- et à son étude par modélisation moléculaire réalisée par ERIC BUISINE à l'Institut Pasteur de Lille.

Une distance de 34 Å a ainsi été déterminée (figure 20).

Une étude tridimensionnelle de l'un de nos inhibiteurs bis-ATP a été réalisée à l'aide du logiciel INSIGHT II. Une distance de 30 Å a été mesurée entre les deux noyaux isoquinoléines (figure 21).

Ces résultats montrent clairement que même si le second site de reconnaissance de l'ATP de la PKC est fonctionnel, les deux sites de l'ATP semblent trop éloignés l'un de l'autre pour que nos inhibiteurs bis-ATP puissent interagir simultanément avec ceux-ci. Cependant, comme l'activation de la PKC implique sa translocation du cytoplasme vers la membrane cellulaire, il est possible que de fortes concentrations en PKC apparaissent. Dans ce cas, l'interaction de nos composés avec le site ATP fonctionnel de deux molécules PKC est envisageable. Des études cellulaires seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse.



Figure 19 : structure tridimensionnelle d'une des deux sous-unités catalytiques de la protéine kinase A complexée à l'ATP et au peptide inhibiteur PKI (5-24). Seuls les carbones α de l'enzyme sont représentés. Le peptide inhibiteur est quant à lui représenté par un ruban.

LES DEUX SITES ATP

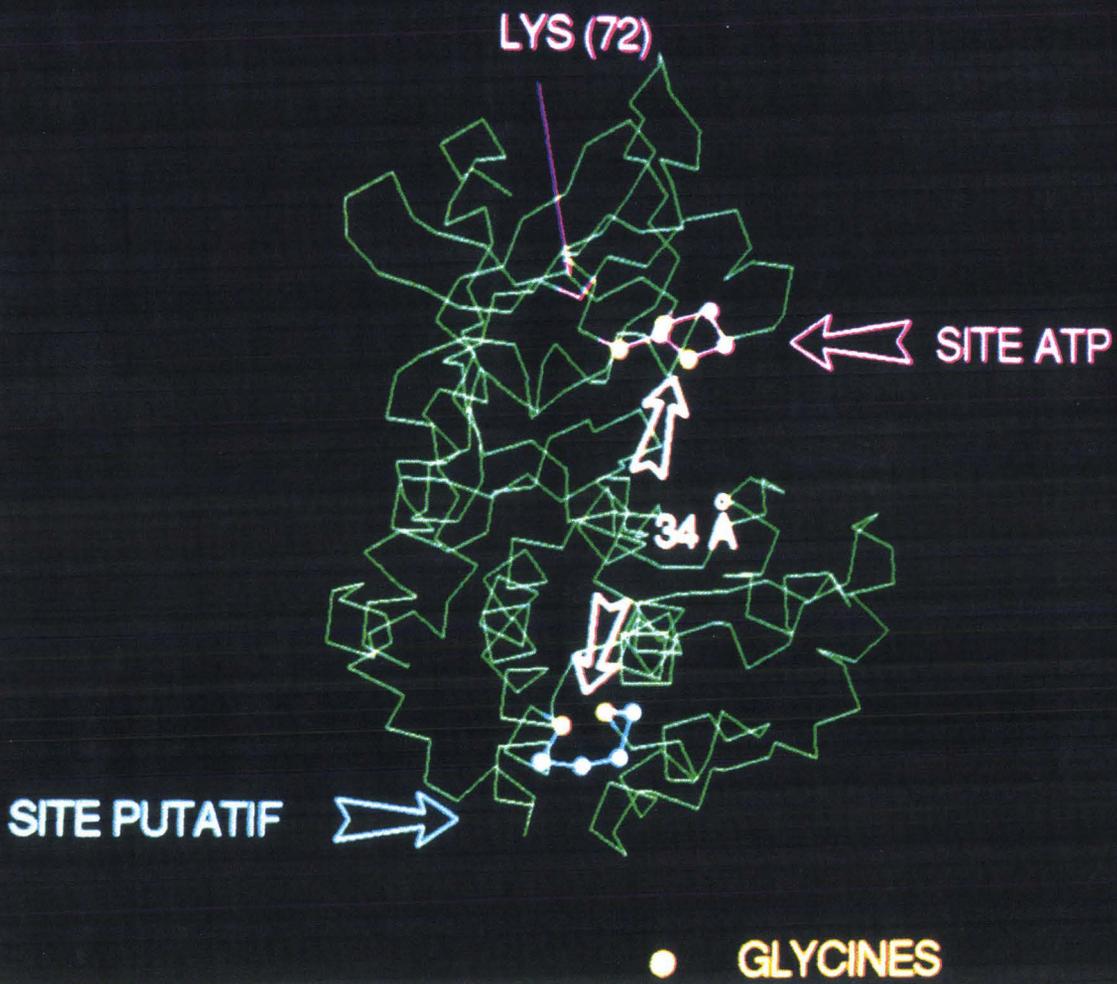


Figure 20 : évaluation de la distance séparant les deux sites de reconnaissance de l'ATP

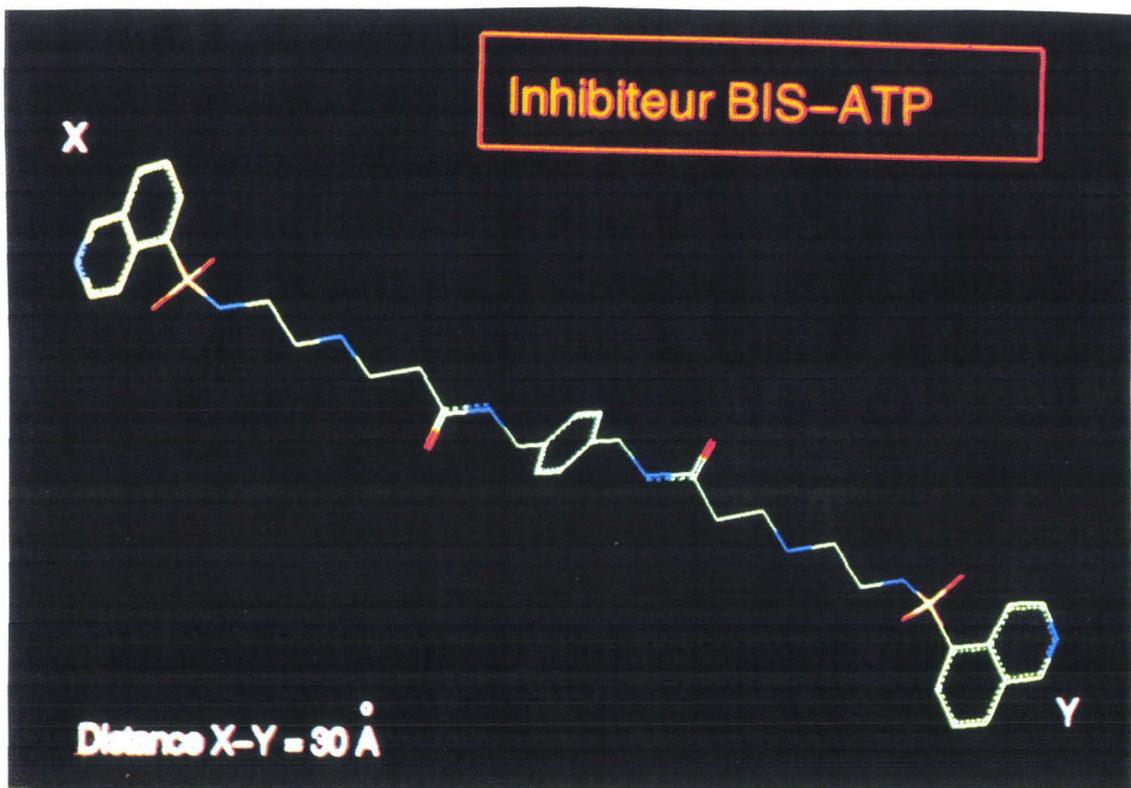


Figure 21 : évaluation de la distance séparant les deux noyaux isoquinoléines

CHAPITRE III

Inhibiteurs bisubstrat potentiels

Ébauche d'une structure bisubstrat

Une première série d'inhibiteurs PKC utilisant la notion de bisubstrat a été conçue et préparée au laboratoire [RICOUART 1989]. Ces molécules étaient constituées d'un analogue de H-7 : 1(5-isoquinoléine sulfonyl)-2-méthylpipérazine comme mimes ATP et d'enchaînements comme Ser-(Arg)₄, Ser-(Arg)₆, Ala-(Arg)₄... susceptibles de se fixer sur le site peptidique.

En l'absence de résultats cristallographiques concernant la PKC, la distance devant séparer les deux mimes avait été évaluée grâce à une phosphoglycérate kinase cristallisée avec ses deux substrats : le phosphoglycérol et l'ATP [BRYANT 1974]. Une distance de 16,3 Å avait été déterminée entre le carbone portant l'hydroxyle phosphorylé et l'atome numéro 9 de l'adénine liée au ribose (figure 22) [RICOUART 1989].

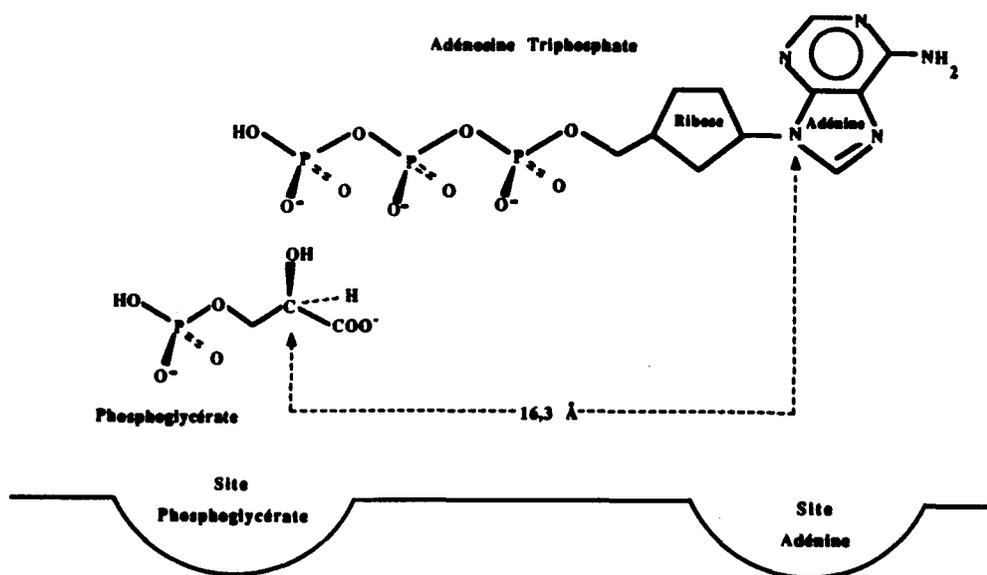


Figure 22 : représentation schématique du site actif de la phosphoglycérate kinase [RICOUART 1989]

Dans l'optique d'un bisubstrat, il fallait donc relier le résidu sérine et le noyau isoquinoléine mimant l'adénine par un bras espaceur ou "linker" de longueur convenable. Ce bras avait été constitué à partir de deux résidus β alanine dont la longueur correspondait bien à la distance existant entre le site ATP et le site protéique d'après la modélisation moléculaire (G.VERGOTEN).

Parmi ces composés préparés au laboratoire, le plus actif comportait un motif isoquinoléine 5-sulfonamide pour le site ATP et le peptide Ser-Arg₆ comme substrat protéique, associés par l'enchaînement -NH-(CH₂)₂-NH-(CH₂)₂-CO.

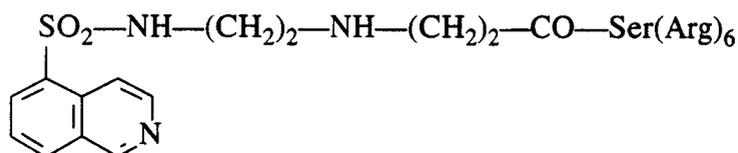


Figure 23 : N-(5-isoquinoléine sulfonyl),N'-(3-propionyl-Ser-Arg)₆ éthylène diamine

Ce composé avec un K_i de 100 nM pour la PKC et de 4 nM pour la PKA, est respectivement 60 fois et 750 fois plus actif que l'inhibiteur commercial H-7. L'activité vis à vis de la PKC aurait été considérée satisfaisante sans le manque évident de spécificité.

D'autre part, il était difficile de conclure en une activité inhibitrice de type bisubstrat puisque dans les tests de compétition avec l'ATP et les histones, l'inhibiteur ne se montrait compétitif de façon univoque que vis à vis de l'ATP [RICOUART 1989].

En reprenant ces différentes données, nous avons cherché à préparer des inhibiteurs bisubstrat aussi efficaces mais présentant en plus, la spécificité PKC.

Dans ce but, il nous fallait donc concevoir et synthétiser :

- un mime substrat optimal*
- un mime ATP optimal*
- un bras permettant de lier de façon covalente ces deux mimes.

SYNTHESE DU MIME SUBSTRAT

Certaines règles de reconnaissance de séquences peptidiques pour la PKC ayant été définies (chapitre 1, paragraphe 4.2.), ceci pouvait nous permettre de sélectionner et de synthétiser en phase solide une séquence bien spécifique de cette protéine kinase.

SYNTHESE DU MIME ATP

La PKC peut être inhibée par des molécules pouvant agir au niveau du site de liaison de l'ATP de l'enzyme.

Parmi ces inhibiteurs, on trouve :

* : actif et spécifique PKC

◇ des dérivés d'isoquinoléine sulfonamide, des métabolites de microorganismes comme la staurosporine, les composés UCN-01, CGP 41 251, K-252 a,b et KT 5720,

◇ et plus récemment décrits des composés de type 2,3-bis-indolylmaléimide.

Les dérivés d'isoquinoléine sulfonamide sont connus comme des inhibiteurs des kinases dépendantes de nucléotides cycliques et de la PKC par interaction avec le site de liaison de l'adénosine triphosphate. Dans cette série, le composé H-7 présente la meilleure activité sur la PKC avec un K_i de 6 μM [HIDAKA 1984, HIDAKA 1987].

Des métabolites de microorganismes comme la staurosporine, les dérivés UCN et K-252 possédant un aglycone indolo [2,3-a] carbazole plan sont décrits dans la littérature comme les inhibiteurs les plus puissants de la PKC. Ils lient la PKC de façon compétitive avec l'ATP. Malheureusement mais logiquement, la plupart de ces molécules ne présentent pas de spécificité satisfaisante pour la PKC.

Parallèlement à nos travaux de recherche, plusieurs publications décrivent la préparation d'un grand nombre d'analogues de la staurosporine s'avérant aussi efficaces mais présentant en plus une forte spécificité pour la PKC, particulièrement surprenante étant donné que la compétition s'effectue vis à vis du substrat ATP commun à toutes les kinases [DAVIS 1989, NIXON 1991, TOULLEC 1991, DAVIS 1992 a et b, NIXON 1992 et BIT 1993].

SYNTHESE DU BRAS ESPACEUR

Jusqu'en août 1991, en l'absence de résultats de diffraction de rayons X publiés pour les protéines kinases, nous pensions utiliser la structure cristalline de la phosphoglycérate de sucre permettant de définir une distance inter-sites d'environ 16 Å [BRYANT 1974].

Depuis cette date, la publication de la structure cristalline de la PKA [KNIGHTON 1991] et l'homologie forte existant entre les différentes protéines kinases devaient nous permettre par la modélisation moléculaire d'affiner la conception du bras espaceur.

ELABORATION D'INHIBITEURS BISUBSTRAT

Dans le but d'élaborer une structure entrant directement en compétition avec l'ATP qui soit spécifique PKC, nous avons cherché à mimer la staurosporine (figure 24) mais en ne conservant qu'un seul noyau indole jugé à priori suffisant pour reconnaître le site ATP. En lieu et place du second noyau indole de la staurosporine, une chaîne aminée a été fixée.

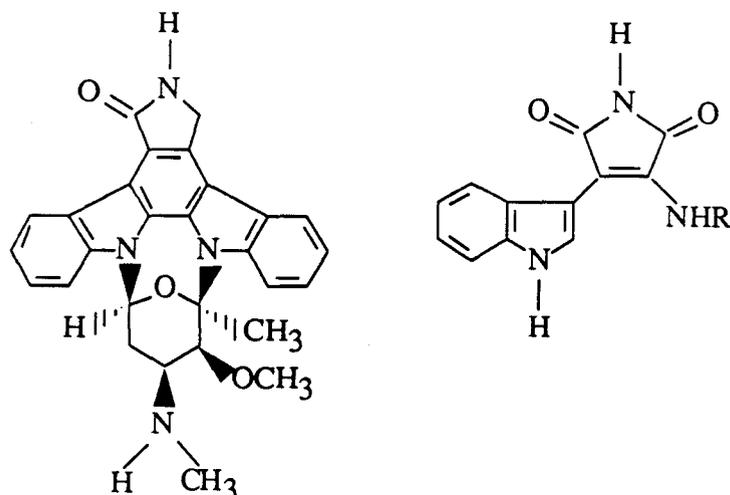


Figure 24 : composés : 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide et staurosporine

Cette chaîne aminée pouvait, d'une part, interagir avec un site carboxylate de l'enzyme et d'autre part, permettre l'introduction d'une séquence peptidique spécifique PKC, capable de se fixer sur le site de reconnaissance du substrat de l'enzyme. Différentes amines ou polyamines ont été greffées par une réaction d'addition-élimination sur le 2-bromo-[1H-indol-3-yl]maléimide.

Le noyau indole a été introduit sous la forme d'un organo-métallique réagissant avec le dérivé 2,3-dibromomaléimide. Un mode original de protection temporaire rendu obligatoire dans le chemin de synthèse a été mis au point pour le noyau maléimide. La protection du cycle maléimide par le groupement "trityle" et la protection du noyau indole par le groupement "tert.butylloxycarbonyle" permettent par un traitement acide final unique, la libération de l'inhibiteur "mime ATP" : 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (figure 24).

Plusieurs produits s'étant avérés actifs et sélectifs pour la PKC avec des valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice 50) pour les plus faibles aux environs de la micro-mole, nous avons entrepris la préparation d'inhibiteurs bisubstrat.

Sur la chaîne aminée réactive du mime ATP ont été introduits différents acides aminés ou des structures peptidiques répondant aux critères de reconnaissance par la PKC synthétisés en phase solide selon la méthode de Merrifield.

En l'absence de résultats cristallographiques concernant la protéine kinase C, nous avons utilisé la publication récente de la structure cristalline du domaine catalytique de la protéine kinase A et l'homologie forte existant entre les deux kinases pour tenter d'affiner par la modélisation moléculaire la conception de nos inhibiteurs bisubstrat.

L'action inhibitrice de tous les dérivés préparés a été testée sur la PKC et sur la PKA en présence de leurs substrats respectifs (histones IIIS et histones IIA) et des tests de

compétition avec deux substrats de l'enzyme : histones et ATP ont été réalisés pour le meilleur inhibiteur.

PREMIÈRE PARTIE

**Généralités sur les molécules
possédant une structure indolo-
carbazole et sur les molécules
2,3-bis-indolylmaléimide**

I. INHIBITION DE LA PKC PAR DES MOLECULES POSSEDANT UNE STRUCTURE INDOLOCARBAZOLE

Des métabolites de microorganismes possédant un aglycone [2,3-a] carbazole plan comme la staurosporine, les dérivés UCN-01, CGP 41 251, K-252 a, K-252 b et KT 5720 sont considérés dans la littérature comme les inhibiteurs les plus puissants de la protéine kinase C, ils interagissent avec le site de liaison de l'adénosine triphosphate (ATP).

1. La staurosporine

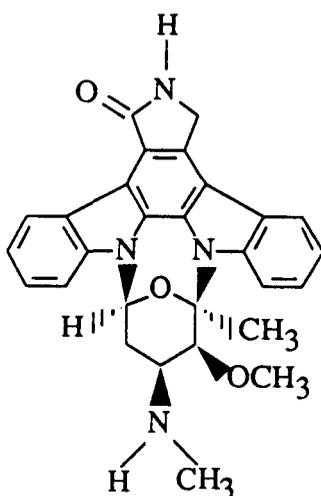


Figure 25 : staurosporine

La staurosporine est un alcaloïde qui peut être produit par des espèces de *Streptomyces* [OMURA 1977] ou par voie chimique [JOYCE 1987].

La staurosporine connue tout d'abord pour ses propriétés antifongiques est actuellement l'un des inhibiteurs les plus puissants de la PKC avec une constante d'inhibition (K_i) de 2,7 nM, mais son défaut est l'absence de spécificité. En effet, elle présente une activité inhibitrice du même ordre pour la PKA et pour la tyrosine kinase $p60^{V-Src}$ avec des K_i respectivement de 8,2 nM et de 6,4 nM comme le montre le tableau ci-après [TAMAOKI 1986, TAMAOKI 1991].

Tableau 7 : inhibition de protéines kinases par les composés staurosporine et UCN-01 [TAMAOKI 1991]

Composés	Ki PKC (nM)	Ki PKA (nM)	Ki tyrosine kinase p60 ^{v-src} (nM)
staurosporine	2,7	8,2	6,4
UCN-01	4,1	42	45

La staurosporine interagit avec le domaine catalytique de l'enzyme, mais son mode d'action exact n'est pas encore élucidé [WARD 1991].

- En effet, d'une part, K-252a, un analogue de la staurosporine, est décrit pour inhiber la PKC en interagissant avec le site de liaison de l'ATP (première partie, paragraphe 5.1., [KASE 1987]). Il diffère de la staurosporine par le cycle tétrahydrofurannique qui remplace le cycle tétrahydropyrannique. Dans ce cas, il est donc possible que la staurosporine se lie sur le site de fixation de l'ATP ou sur un site qui recouvre partiellement le site de liaison de l'ATP [WARD 1991].

- Mais, d'autre part, des tests de compétition avec les deux substrats de la PKC (histones et ATP), réalisés par T. TAMAOKI et W. E. WARD, n'ont pas abouti aux résultats escomptés [TAMAOKI 1986, WARD 1991]. Un site de liaison autre que ceux de fixation de l'ATP et des histones pouvait donc être impliqué [WARD 1991].

Tous ces résultats ne permettent donc pas encore actuellement d'avancer un mode d'action univoque.

2. UCN-01

UCN-01 fut trouvé dans les cultures d'*espèces de Streptomyces* qui produisent la staurosporine [TAMAOKI 1991]. Sa structure diffère de la staurosporine au niveau du carbone C7 qui porte un groupement hydroxyle. L'introduction de ce groupement entraîne un accroissement de spécificité pour la PKC. En effet, l'addition de cette fonction diminue l'activité d'un facteur 10 pour la PKA (IC₅₀ = 42 nM) et d'un facteur 11 pour la tyrosine kinase p60 v-src (IC₅₀ = 45 nM).

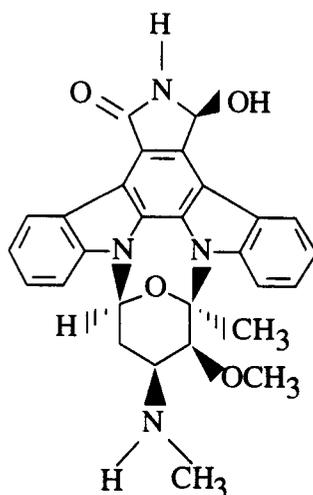


Figure 26 : UCN-01

3. CGP 41 251

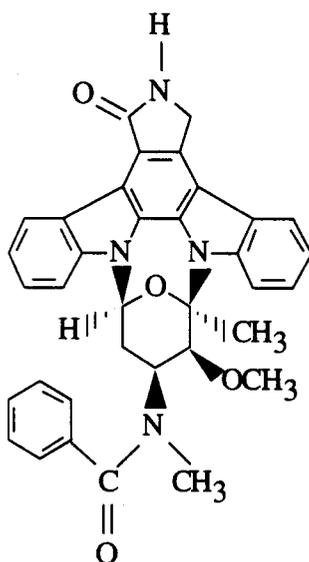


Figure 27 : CGP 41 251

CGP 41 251 est un inhibiteur puissant de la PKC avec une IC_{50} de 50 nM. Par rapport à la staurosporine, ce composé montre un fort degré de sélectivité quand il est testé sur différentes kinases comme la PKA, la phosphorylase kinase (PK) et la protéine tyrosine kinase du récepteur de facteur de croissance épidermique (TPK) [MEYER 1989]. En effet, la simple substitution de l'hydrogène du radical N-méthylamino par un groupement benzoyle diminue le pouvoir inhibiteur d'un facteur 48 pour la PKA et d'un facteur 60 pour la TPK. En revanche, il présente une activité inhibitrice du même ordre pour la phosphorylase kinase (48 nM) et pour la PKC (50 nM) (tableau 8).

Tableau 8 : inhibition de protéines kinases par les composés CGP 41 251 et CGP 42 700 [MEYER 1989]

Composés	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)	IC ₅₀ PK (μM)	IC ₅₀ TPK (μM)
CGP 41 251	0,050	2,4	0,048	3,0
CGP 42 700	> 100	>100	>100	>100

4. CGP 42 700

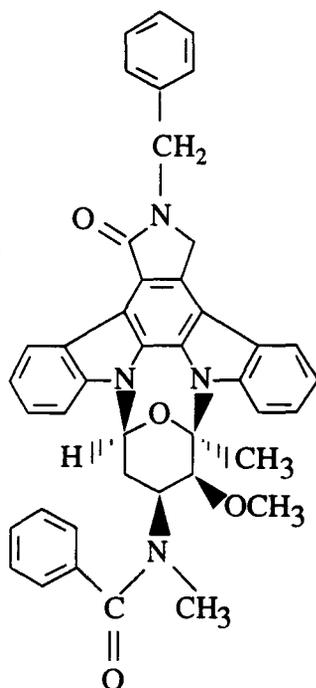
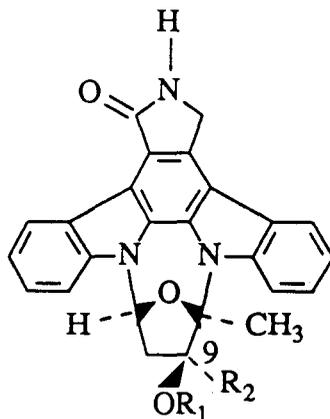


Figure 28 : CGP 42 700

CGP 42 700 qui présente des similitudes structurales avec CGP 41 251 est inactif (IC₅₀ >100 μM) sur les différentes kinases testées [MEYER 1989]. L'introduction du groupement benzyle sur le cycle maléamide supprime donc toute activité inhibitrice.

5. Les composés K-252a, K-252b, KT5720 et K-252c

Tableau 9 : inhibition de différentes kinases par les composés K-252 [KASE 1987]



Composés	R ₁	R ₂	Ki PKA (nM)	Ki PKC (nM)	Ki PKG (nM)
K-252a	H	COOCH ₃	18	25	20
K-252b	H	COOH	90	20	100
KT5720	H	COO(CH ₂) ₅ -CH ₃	60	>2000	>2000

5.1. K-252a

K-252a isolé à partir de cultures de différentes espèces de *Nocardopsis* possède des propriétés antibactériennes et antifongiques [NAKANISKI 1986]. Il inhibe la PKC en entrant directement en compétition avec l'ATP (K_i = 25 nM). Tout comme la staurosporine, cet inhibiteur ne possède aucune spécificité pour la PKC. Il présente en effet une activité du même ordre avec des K_i respectivement de 18 nM et de 20 nM pour la PKA et pour la PKG [KASE 1987].

5.2. K-252b

K-252b isolé également à partir de cultures d'espèces de *Nocardopsis* diffère du K-252a au niveau du carbone C₉. Le fait de saponifier la fonction ester réduit l'activité inhibitrice d'un facteur 5 pour la PKA (K_i = 100 nM) et pour la PKG (K_i = 100 nM) entraînant ainsi un accroissement de spécificité pour la PKC (K_i = 20 nM).

5.3. KT5720

La différence d'activité est nette entre les composés K-252a et KT5720. La simple substitution du groupement méthoxy par un groupement méthoxyhexyle fournit un très bon inhibiteur de la PKA, avec un K_i de 60 nM, qui ne présente plus qu'une faible activité pour la PKC ($K_i > 2000$ nM) et pour la PKG ($K_i > 2000$ nM) [KASE 1987].

6. Conclusion

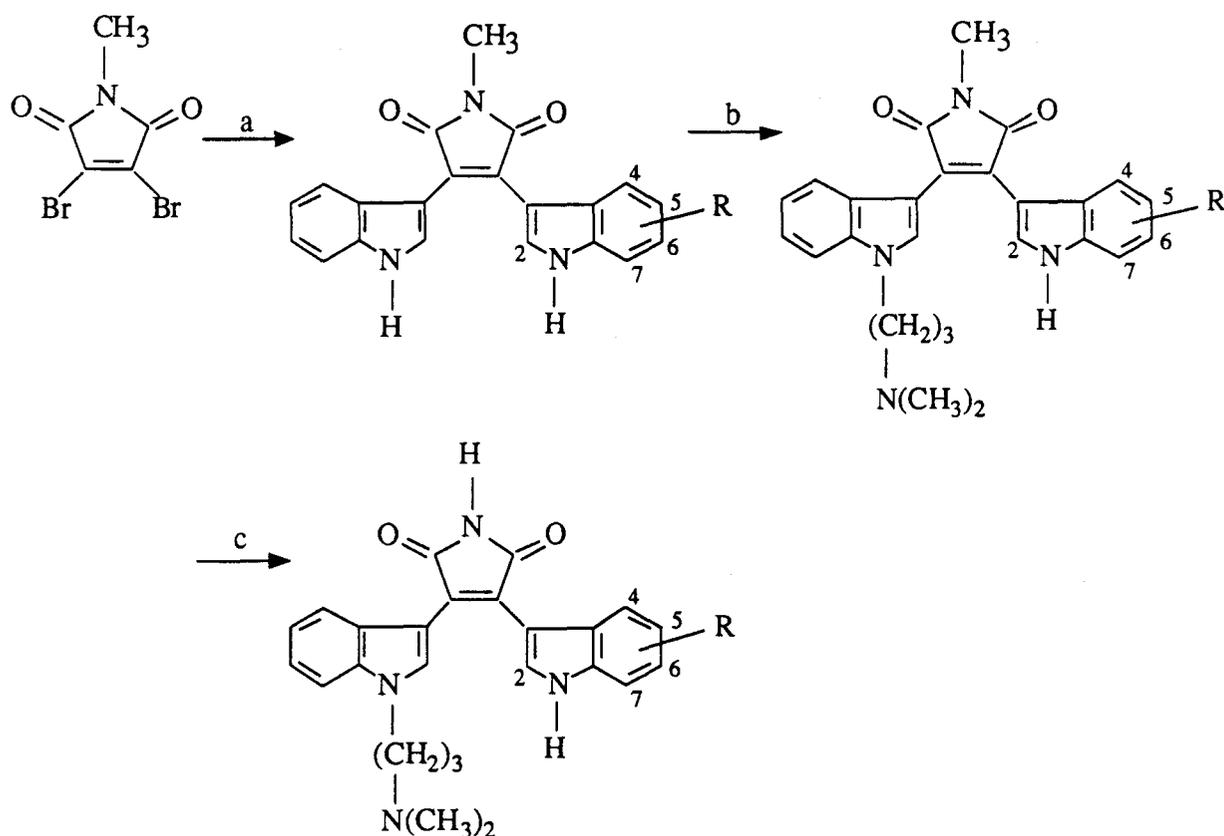
Le mode d'inhibition de ces molécules possédant un aglycone [2,3-a]carbazole plan (staurosporine, UCN-01, CGP 41 251, K-252a, K-252b et KT5720) est dû essentiellement à leur interaction avec le site de l'ATP, mais aucune d'entre elles ne présente une spécificité satisfaisante pour la PKC. Ce manque de spécificité n'est pas surprenant étant donné que la compétition s'effectue vis à vis d'un substrat commun à toutes les kinases. D'après ces résultats, il semble que la forte activité de la staurosporine soit due à la présence :

- du groupement N-méthylamino,
- du noyau maléamide,
- et de l'hétérocycle oxygéné à 6 chaînons.

II. INHIBITION DE LA PKC PAR DES MOLECULES 2,3-BIS-INDOLYLMALÉIMIDE

Au cours de l'avancement de nos travaux, des chercheurs des laboratoires ROCHE et GLAXO ont publié successivement la synthèse de nouveaux analogues de la staurosporine basés sur la structure 2,3-bis-indolylmaléimide s'avérant aussi efficaces que la molécule initiale mais présentant l'avantage d'une spécificité prononcée pour la PKC.

1. Préparation des composés 2,3-bis-indolylmaléimide



R = H : GF 109203X

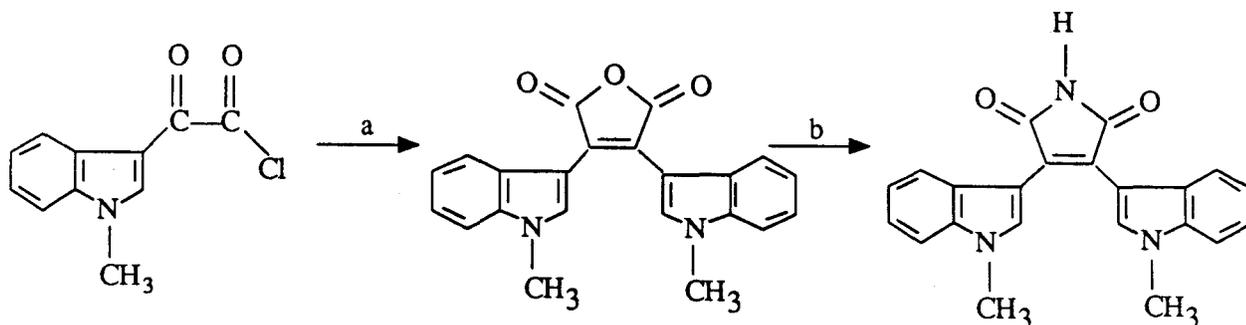
a) bromure d'indolylmagnésium

b) NaH, DMF, $\text{Cl}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$

c) NaOH, HCl 2N; NH_4AcO à 140 °C

La synthèse du 2,3-bis-indolylmaléimide et de ses analogues développée par D. TOULLEC a été réalisée selon la méthode de M. BRENNER [TOULLEC 1991].

Celle-ci consiste à condenser le bromure d'indolylmagnésium avec le 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide [BRENNER 1988].



a) acide 1- méthyl-3-indolylacétique, TEA, CH₂Cl₂

b) HMDS, méthanol, DMF

Une autre méthode de synthèse originale des 2,3-bis-indolylmaléimide développée par P. D. DAVIS comprend deux étapes :

L'acide 1-méthyl-3-indolyl acétique est traité avec le chlorure de 1-méthylindol-3-glyoxylyl en présence de triéthylamine dans le chlorure de méthylène pour fournir l'anhydride bis [1-méthyl-3-indolyl]maléique avec un rendement de 40% [DAVIS 1990a].

Ce dernier en solution dans le DMF est traité avec le 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexaméthyl disilazane (HMDS) dans le méthanol pendant 16 heures pour fournir le bis [1-méthyl-3-indolyl]maléimide attendu avec un rendement de 95 % [DAVIS 1990b].

2. 2,3-bis-indolylmaléimide

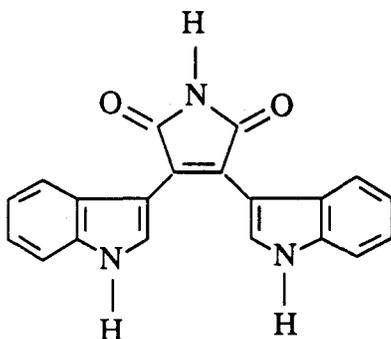


Figure 29 : 2,3-bis-indolylmaléimide (Ro 31-6233)

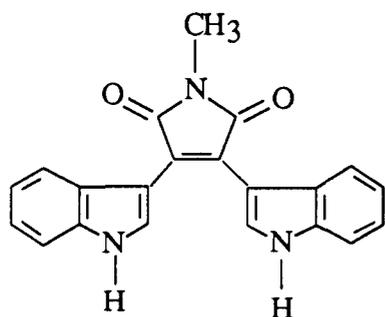
Le 2,3-bis-indolylmaléimide (Ro 31-6233) s'est révélé un très bon inhibiteur de la PKC avec une IC₅₀ de 0,1 µM. Ce produit diffère de la staurosporine par l'absence

de l'hétérocycle tétrahydropyranique, de la liaison de connexion entre les deux noyaux indoles et par la présence d'une seconde fonction carbonyle introduite sur le cycle maléimide. Toutes ces modifications chimiques entraînent un accroissement de spécificité pour la PKC. En effet, Ro 31-6233 possède une activité inhibitrice 20 fois inférieure pour la PKA ($IC_{50} = 2 \mu M$) et 32 fois inférieure pour la phosphorylase kinase ($IC_{50} = 3,2 \mu M$) [TOULLEC 1991, DAVIS 1992a, NIXON 1992].

2.1. Importance du noyau maléimide dans les 2,3-bis-indolylmaléimide

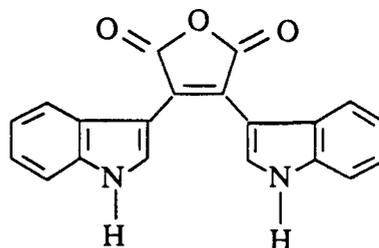
Des études de relation structure-activité ont montré l'importance du noyau maléimide dans l'activité de l'inhibiteur 2,3-bis-indolylmaléimide [TOULLEC 1991, DAVIS 1992a] (tableau 10).

Tableau 10 : inhibition de la PKC par des composés de type 2,3-bis-indolylmaléimide [TOULLEC 1991 et DAVIS 1992a]



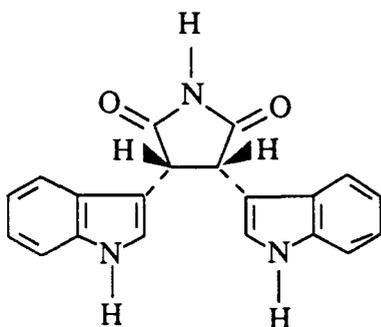
2,3-bis-indolyl-N-méthylmaléimide : 1

$IC_{50} > 50 \mu M$



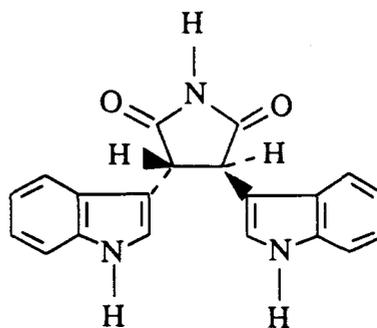
anhydride 2,3-bis-indolylmaléique : 2

$IC_{50} > 50 \mu M$



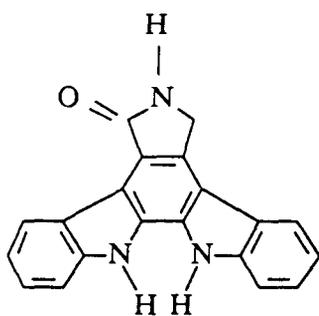
cis 2,3-bis-indolylmaléimide : 3

$IC_{50} > 100 \mu M$

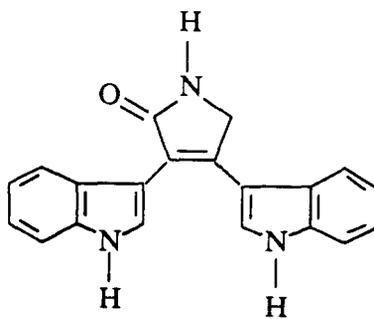


trans 2,3-bis-indolylmaléimide : 4

$IC_{50} > 100 \mu M$



5: $IC_{50} > 25 \mu M$



6: $IC_{50} = 2 \mu M$

- Le remplacement du noyau maléimide par l'anhydride maléique (2) ou la méthylation de l'atome d'azote du noyau maléimide (1) du 2,3-bis-indolylmaléimide s'avère néfaste pour l'activité inhibitrice. Ces deux composés présentent en effet une $IC_{50} > 50 \mu M$ pour la PKC [TOULLEC 1991 et DAVIS 1992a].

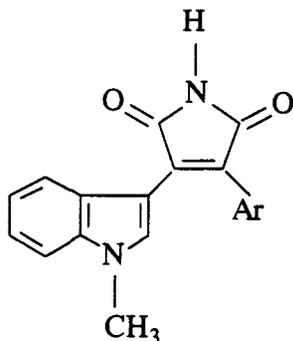
- Les deux groupements carbonyles contribuent au pouvoir inhibiteur. En effet, l'hémiréduction du noyau maléimide (5) du 2,3-bis-indolylmaléimide fait chuter l'activité inhibitrice d'un facteur 20 ($IC_{50} = 2 \mu M$) [DAVIS 1992a].

- La liaison éthylénique s'avère également indispensable dans l'activité d'un inhibiteur de type 2,3-bis-indolylmaléimide. En effet, les deux isomères cis 2,3-bis-indolylsuccinimide (3) et trans 2,3-bis-indolylsuccinimide (4) sont inactifs sur la protéine kinase C ($IC_{50} > 100 \mu M$) [DAVIS 1992a].

L'inhibiteur 2,3-bis-indolylmaléimide s'est donc révélé moins actif mais plus sélectif que la staurosporine.

2.2. Importance des deux noyaux indoles dans les 2,3-bis-indolylmaléimide

Tableau 11 : inhibition de la PKC par des 2-aryl-3-[1-méthylindol-3-yl]maléimide [DAVIS 1992a]

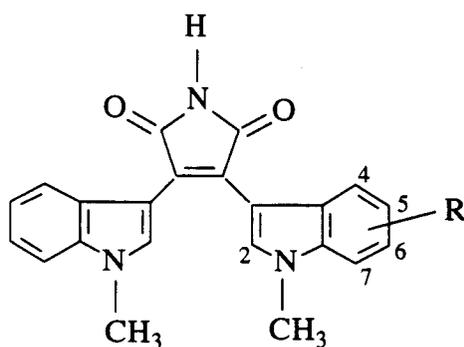


N°	Ar	IC ₅₀ (μM)	N°	Ar	IC ₅₀ (μM)
7	2-thienyl	5,2	10	1-indolyl	0,22
8	1-naphthyl	0,81	11	phényl	7,7
9	3-pyrrolyl	4	12	3-thienyl	13,8

Le remplacement de l'un des deux noyaux indoles par une variété d'autres groupements aryles comme les groupements naphthyle, thiènyle, furanyle, 3-pyrrolyle dans le 2,3-bis-indolylmaléimide diminue l'activité inhibitrice [DAVIS 1992a]. Les deux noyaux indoles sont donc importants pour l'activité de l'inhibiteur 2,3-bis-indolylmaléimide (tableau 11).

Parmi les 2-[R-1-méthylindol-3-yl]-3-[1-méthylindol-3-yl]maléimide, les composés 13, 20 et 23 présentent une activité inhibitrice supérieure à celle du 2-[1-méthylindol-3-yl]-3-[1-méthylindol-3-yl]maléimide (IC₅₀ = 0,3 μM). Les petits substituants sont relativement bien tolérés en position 2, 4, 5, 6 et 7 (composés 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 31 et 32). En revanche, les substituants plus encombrants en position 4, 5, 6 et 7 sont défavorables à l'activité inhibitrice (composés 17, 25, 26, 27 et 29) [DAVIS 1992 a] (tableau 12).

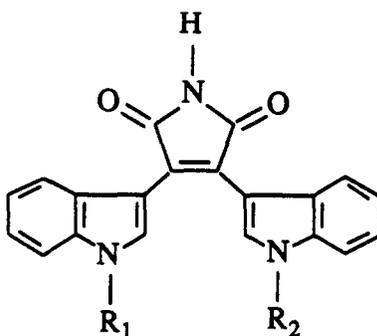
Tableau 12 : inhibition de la PKC par des 2-[R-1méthylindol-3-yl]-3-[1-méthylindol-3-yl]maléimide [DAVIS 1992a]



N°	R	IC ₅₀ (μM)	N°	R	IC ₅₀ (μM)
13	5-Cl	0,11	23	5-Me	0,17
14	5-NH ₂	0,49	24	5-OH	0,92
15	5-OMe	0,60	25	5-OCH ₂ Ph	6,9
16	5-SMe	0,38	26	5-NO ₂	2,5
17	5-CO ₂ Me	1,4	27	5-CO ₂ H	> 50
18	6-Cl	1,6	28	6-NH ₂	0,31
19	6-OMe	1,1	29	6-CO ₂ H	27
20	7-Me	0,28	30	7-NH ₂	1
21	7-OMe	1	31	4-Me	0,59
22	2-Me	0,47	32	2-SMe	0,44

3. Introduction de groupements alkyle sur les deux azotes indoliques

Tableau 13 : inhibition de la PKC par les 2-[1-alkylindol-3-yl]-3-[1-alkylindol-3-yl]maléimide [DAVIS 1989, TOULLEC 1991, DAVIS 1992a et b et NIXON 1992]



N°	R ₁	R ₂	PKC IC ₅₀ (μM)	Références
33	CH ₃	H	0,22	[DAVIS 1992a]
34	CH ₃	CH ₃	0,3	[DAVIS 1989]
35	CH ₃	propyl	0,48	[DAVIS 1992a]
36	CH ₃	phényl	0,36	[DAVIS 1992a]
37	CH ₃	benzyl	1,2	[DAVIS 1992a]
38	CH ₃	(CH ₂) ₂ OH	0,34	[DAVIS 1992b]
39	CH ₃	(CH ₂) ₃ OH	0,13	[DAVIS 1992b]
40	CH ₃	(CH ₂) ₄ OH	0,17	[DAVIS 1992b]
41	CH ₃	(CH ₂) ₅ OH	0,28	[DAVIS 1992b]
42	CH ₃	(CH ₂) ₂ NH ₂	0,064	[DAVIS 1992b]
43 = Ro 31-7549	CH ₃	(CH ₂) ₃ NH ₂	0,075	[DAVIS 1989] [DAVIS 1992b]
44	CH ₃	(CH ₂) ₄ NH ₂	0,055	[DAVIS 1992b]
45	CH ₃	(CH ₂) ₅ NH ₂	0,076	[DAVIS 1992b]
46	CH ₃	(CH ₂) ₃ NHCH ₃	0,035	[DAVIS 1992b]

47	CH ₃	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0,045	[DAVIS 1992b] [TOULLEC 1991]
48	CH ₃	(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	0,093	[DAVIS 1992b]
49 = GF109203X	H	(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0,01	[TOULLEC 1991]
50	H	(CH ₂) ₃ NH ₂	0,026	[TOULLEC 1991]
51	CH ₃	(CH ₂) ₂ SC(=NH)NH ₂	0,041	[DAVIS 1992b]
52 = Ro 31-8220	CH ₃	(CH ₂) ₃ SC(=NH)NH ₂	0,01	[DAVIS 1992b] [NIXON 1992b]
53	CH ₃	(CH ₂) ₄ SC(=NH)NH ₂	0,028	[DAVIS 1992b]
54	CH ₃	(CH ₂) ₅ SC(=NH)NH ₂	0,047	[DAVIS 1992b]
55	CH ₃	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂	0,019	[DAVIS 1992b]
56	CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₂ C(=NH)NH ₂	0,031	[DAVIS 1992b]

A la recherche d'inhibiteurs plus puissants et plus sélectifs, des analogues du 2,3-bis-indolylmaléimide ont été synthétisés dans lesquels des groupements R : alkyle, hydroxyalkyle ou aminoalkyle ont été introduits sur l'un des deux azotes indoliques. D'après la modélisation moléculaire (P.D. DAVIS), de tels groupements peuvent avoir accès au site de liaison de l'amine de la staurosporine [DAVIS 1992b, NIXON 1992].

L'introduction de groupements : méthyle (33 et 34), propyle (35), phényle (36), benzyle (37), et hydroxyalkyle (38 à 41) n'influence que très légèrement l'activité inhibitrice du 2,3-bis-indolylmaléimide [DAVIS 1992a].

Au contraire, une très nette différence d'activité apparaît pour les composés possédant une fonction amine. Ainsi, l'addition de groupements : aminoalkyle (42 à 45 et 50), méthylaminopropyle (46), diméthylaminopropyle (47 et 49) se traduit par un accroissement d'affinité et de sélectivité pour la PKC suggérant que la fonction amine (primaire, secondaire ou tertiaire) interagit favorablement avec l'enzyme [DAVIS 1989, DAVIS 1992b].

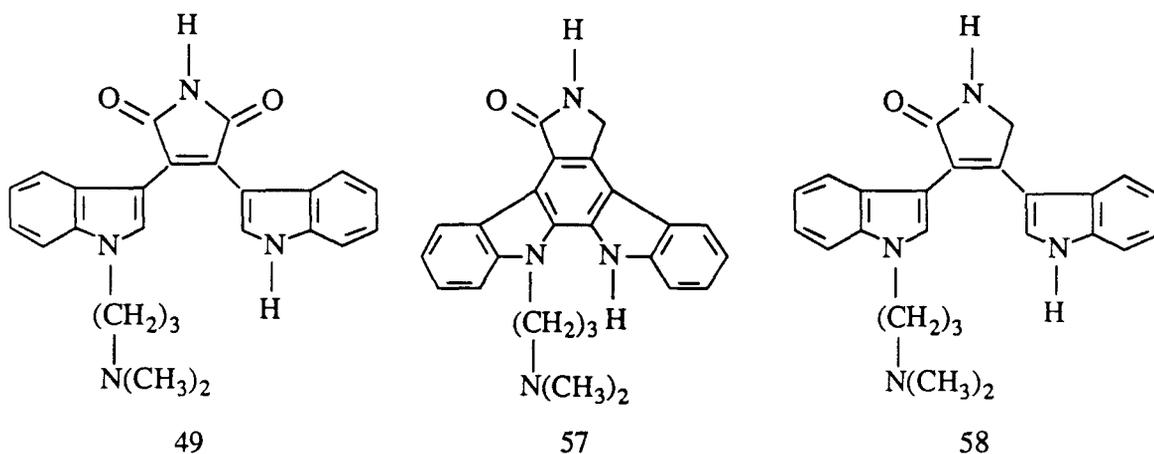
Le partenaire idéal pour la reconnaissance d'un carboxylate est le groupement guanidinium ou amidinium [DAVIS 1989, DAVIS 1992b]. La substitution de l'amine primaire du composé 43 (Ro 31-7549) par une amidine (56), une guanidine (55) ou une isothiourée (51, 52 : Ro 31-8220, 53 et 54) accroît l'activité inhibitrice d'un facteur 2,4 ; 4 ; 7,5 ; 2,7 et 1,6 respectivement [DAVIS 1992b].

Dans la série des 2,3-bis-indolylmaléimide, les composés 49 (GF 109203X) et 52 (Ro 31-8220) ont été étudiés plus en détail.

L'activité du Ro 31-8220 a été étudiée à différentes concentrations en ATP. L'inhibiteur s'est montré compétitif vis à vis de ce substrat avec un K_i de 3 nM [DAVIS 1989, DAVIS 1992b].

GF 109203X s'est révélé très bon inhibiteur de la PKC ($IC_{50} = 10$ nM) avec de surcroît une faible activité vis à vis de la PKA ($IC_{50} = 2$ μ M) et vis à vis de la phosphorylase kinase (PK) ($IC_{50} = 0,7$ μ M) [TOULLEC 1991].

Tableau 14 : l'aromatisation ou l'hémiréduction du composé 49 réduit considérablement son activité et sa spécificité pour la PKC [TOULLEC 1991]



N°	PKC IC_{50} (μ M)	PKA IC_{50} (μ M)	PK IC_{50} (μ M)
49	0,01	2	0,7
57	0,26	0,5	0,2
58	2,75	> 10	2,75

L'hémiréduction du noyau maléimide de GF 109203X (58, IC_{50} PKC = 2,75 μ M) ou l'aromatisation pour fournir un aglycone indolocarbazole plan (57, IC_{50} PKC = 0,26 μ M) réduisent considérablement l'activité inhibitrice.

Des tests de compétition avec l'ATP et les histones ont été réalisés. Les résultats obtenus suggèrent fortement que GF 109203X inhibe l'activité de la PKC exclusivement au niveau du site de liaison de l'ATP avec un K_i de 14 nM [TOULLEC 1991].

4. Conclusion

Les dérivés de type 2,3-bis-indolylmaléimide sont actuellement les inhibiteurs les plus intéressants de la PKC. Ils inhibent spécifiquement cette kinase de façon inattendue en entrant directement en compétition avec l'ATP.

Des études de relation structure-activité réalisées par P. D. DAVIS et D. TOULLEC ont montré que le noyau maléimide et les deux noyaux indoles étaient indispensables dans l'activité d'un tel inhibiteur. La forte activité des inhibiteurs GF 109203X et Ro 31-8220 semble due à la présence du groupement diméthylaminopropyle ou de la fonction isothiourée sur l'un des deux noyaux indoles.

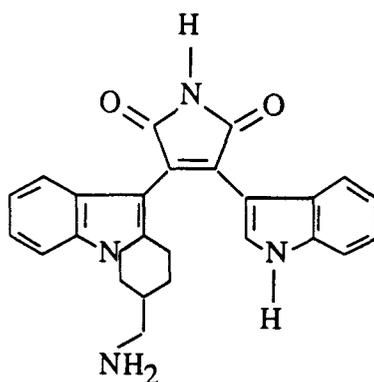


Figure 30 : Ro 31-8425

L'étude tridimensionnelle de la staurosporine et de Ro 31-7549 réalisée par modélisation moléculaire a suggéré que l'activité de ces inhibiteurs pouvait être augmentée par une restriction conformationnelle de l'amine primaire du composé 43 (Ro 31-7549) par formation d'un cycle entre l'azote et le carbone C2 du noyau indole [BIT 1993]. Parmi toutes les molécules synthétisées, Ro 31-8425 s'est révélé le meilleur inhibiteur de la PKC ($IC_{50} = 8 \text{ nM}$) [BIT 1993]. Il est actuellement testé comme nouvelle médication contre l'arthrite rhumatoïde [NIXON 1991, NIXON 1992].

DEUXIÈME PARTIE

Synthèse du mime ATP

Voie de synthèse utilisée

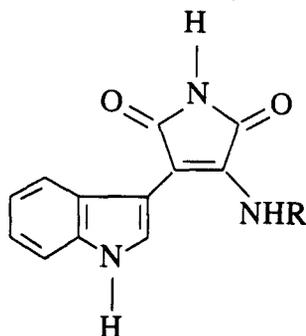


Figure 31 : synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide

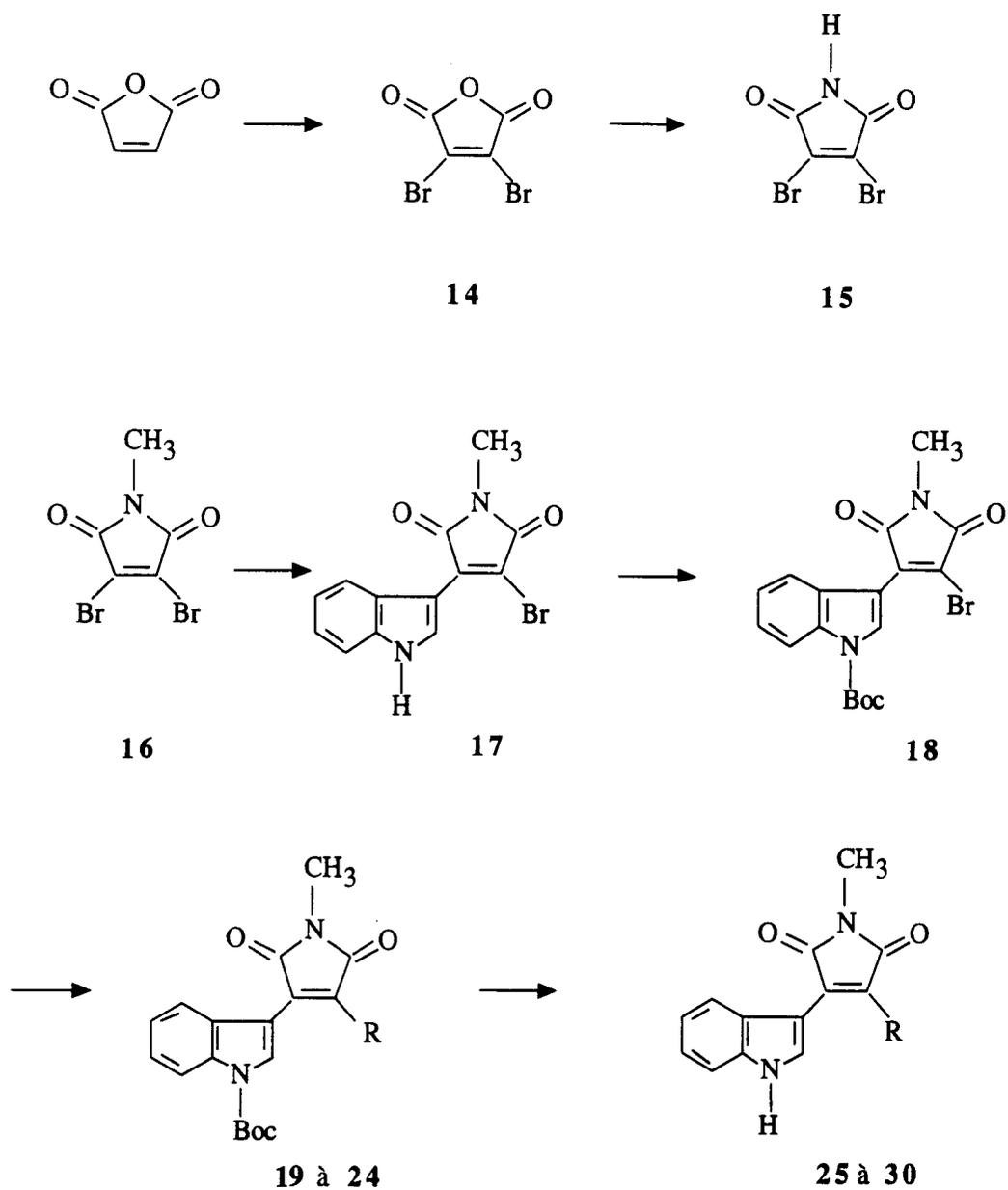
La synthèse du mime ATP : 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide nécessite la protection temporaire des noyaux indole et maléimide.

Nous avons tout d'abord tenté de réaliser la préparation du mime ATP en nous inspirant de la méthode de M. BRENNER [BRENNER 1988].

Celle-ci consiste à condenser le bromure d'indolylmagnésium avec le 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide **16** pour fournir le 2-bromo-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide **17**. Après protection du noyau indole par le groupement tert.butylloxycarbone, l'atome de brome du composé **18** ainsi obtenu est alors substitué par différentes amines ou polyamines pour donner les composés **19**, **20**, **21**, **22**, **23** et **24** (tableau synoptique 2). Malheureusement, il a été ensuite impossible de cliver le groupement protecteur méthyle selon la méthode de M. BRENNER pour fournir les 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide attendus [BRENNER 1988].

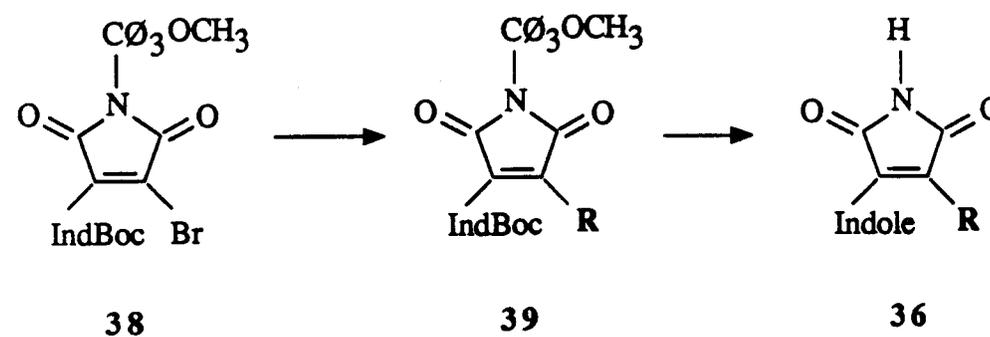
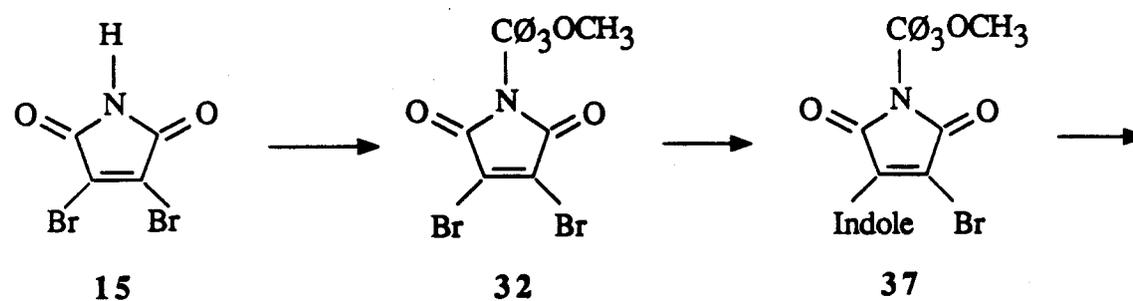
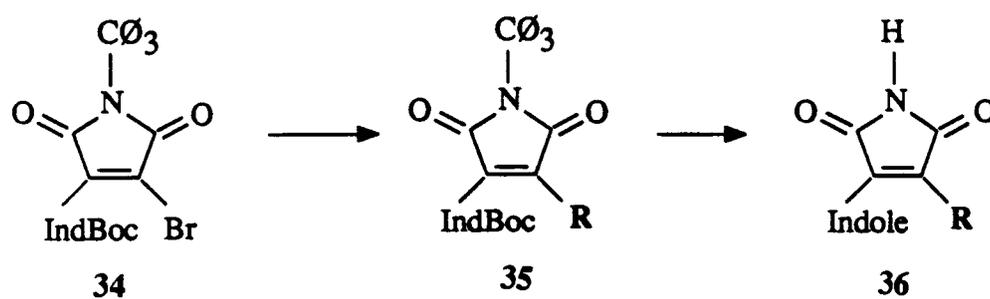
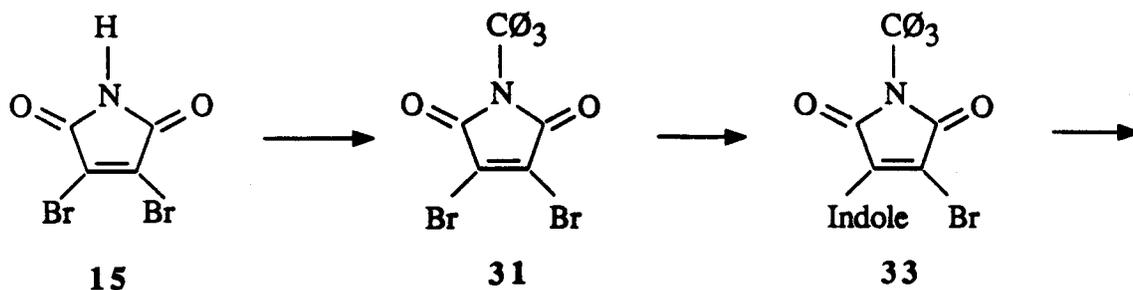
Depuis peu, les fonctions carboxamides des acides aminés asparagine et glutamine sont protégées par le groupement trityle stable vis à vis des nucléophiles et des bases mais labile en milieu acide dans la préparation de peptides réalisée en phase hétérogène. D'après ces données, il nous a paru très intéressant de réaliser la synthèse de notre mime ATP en utilisant les groupements trityle, 4-méthoxytrityle et 4, 4' diméthoxytrityle pour la protection de la fonction imide et d'étudier leurs conditions de clivage (tableaux synoptiques 3 et 4).

Tableau synoptique 2 : voie de synthèse pour préparer le mime ATP



19	: R = éthylène diamine	→	25
20	: R = paraxylène diamine	→	26
21	: R = tris-2(aminoéthylamine)	→	27
22	: R = 3-diméthylaminopropylamine	→	28
23	: R = tryptamine	→	29
24	: R = hexadécylamine	→	30

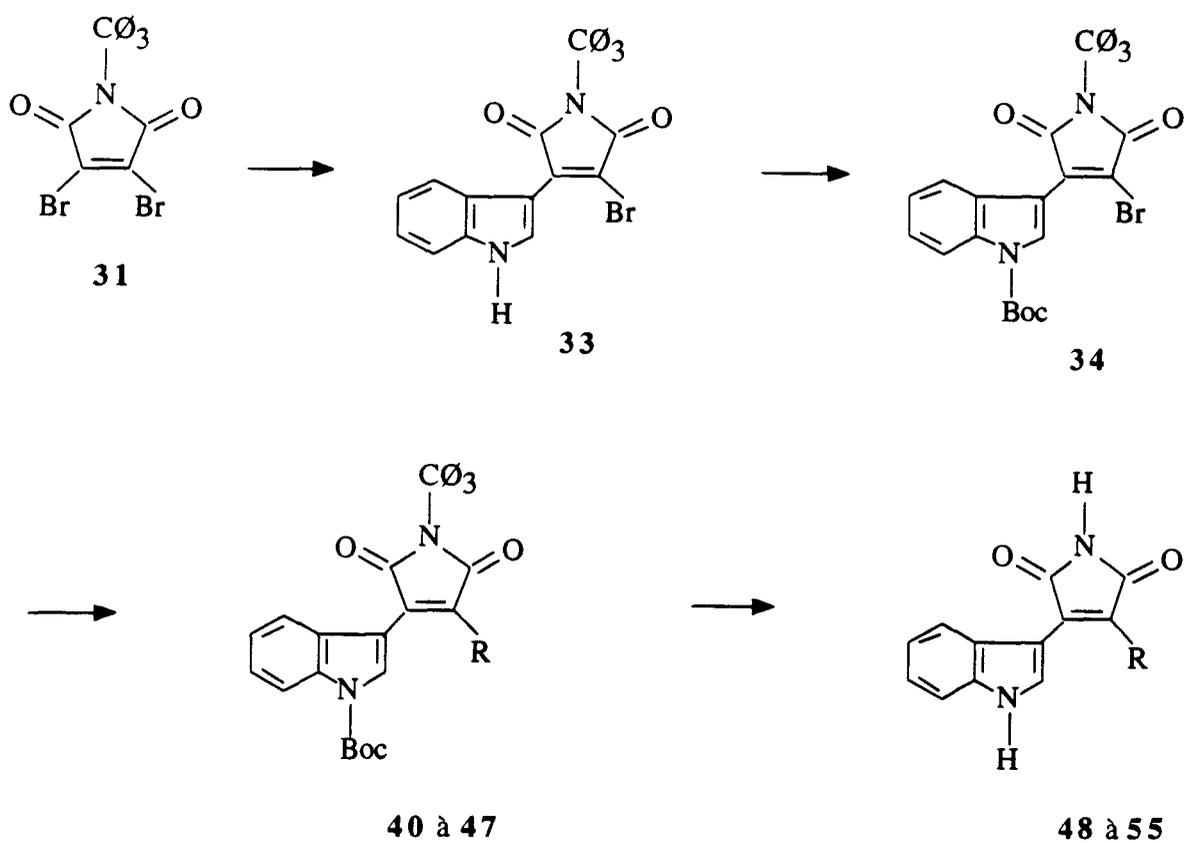
Tableau synoptique 3 : voie de synthèse pour préparer le mime ATP



avec $R = \text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{—N}((\text{CH}_2)_2\text{NH}_2)_2$



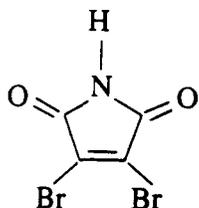
Tableau synoptique 4 : voie de synthèse pour préparer le mime ATP



40 : R = éthylène diamine	→	48
41 : R = 3-diméthylaminopropylamine	→	49
42 : R = tryptamine	→	50
43 : R = diéthylène diamine	→	51
44 : R = bis-(3aminopropyl)amine	→	52
45 : R = 1,5 diaminopentane	→	53
46 : R = 1,6 diaminohexane	→	54
47 : R = 1,7 diaminoheptane	→	55

I. Préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide

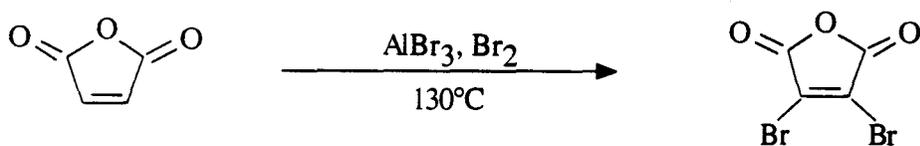
1. Synthèse du 2,3-dibromomaléimide : 15



Le 2,3-dibromomaléimide a été essentiellement décrit dans la littérature par G. L. CIAMICIAN [CIAMICIAN 1884] et par J. A. ELVIDGE [ELVIDGE 1957].

Dans un premier temps, nous avons tenté de réaliser la synthèse de ce dérivé selon la méthode de J. A. ELVIDGE à savoir par action de l'urée sur l'anhydride 2,3-dibromomaléique, largement décrit dans la littérature [DIELS 1910, BASKAKOV 1954, ROEDIG 1961, BROWN 1966].

1.1. Synthèse de l'anhydride 2,3-dibromomaléique : 14

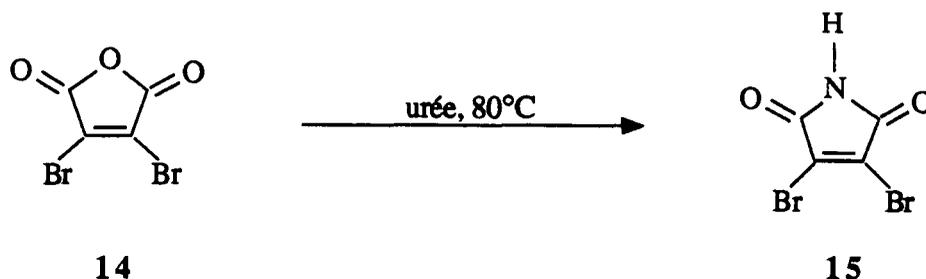


14

La méthode de synthèse la plus intéressante a été développée par J. P. BROWN [BROWN 1966].

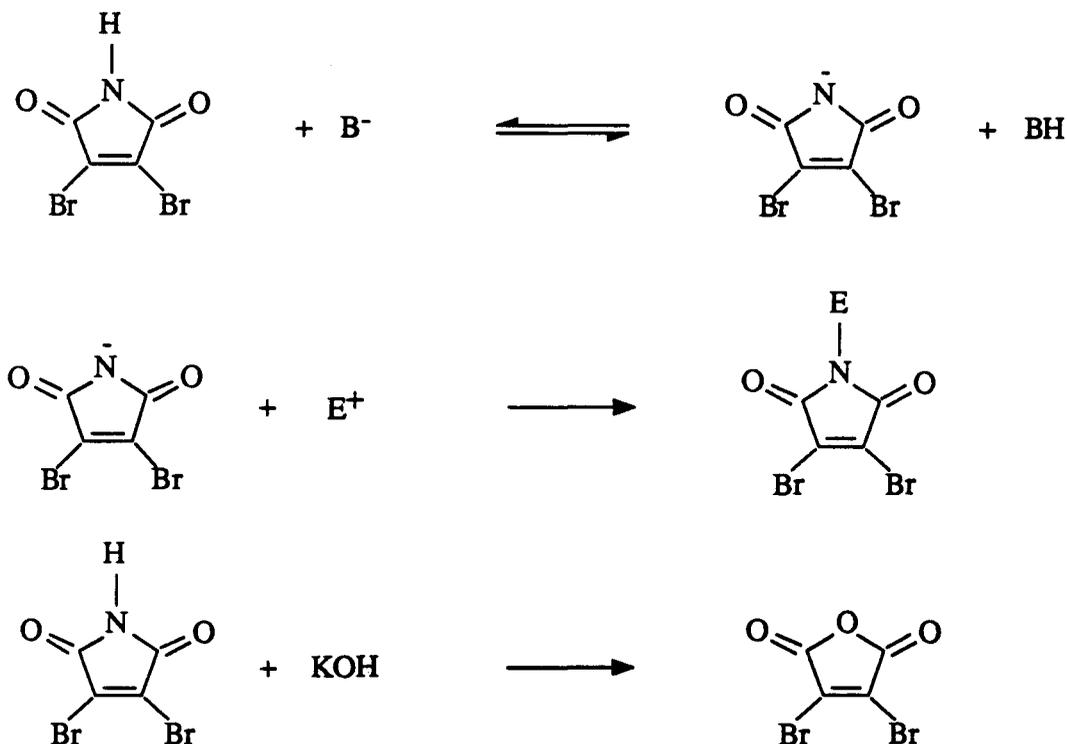
Ce procédé consiste à porter à la température de 130°C un mélange d'anhydride maléique (1 équivalent), de brome (2 équivalents) et de bromure d'aluminium (0,01 équivalent) pendant 6 heures. Après distillation sous pression réduite, l'anhydride 2,3-dibromomaléique 14 est alors obtenu à l'état pur avec un rendement de 80 %. Son point de fusion (Pf = 117°C) est identique à celui décrit dans la littérature.

1.2. Synthèse du 2,3-dibromomaléimide : 15



L'anhydride 2,3-dibromomaléique réagit avec l'urée à la température de 85°C pour former le 2,3-dibromomaléimide **15**. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 85°C pendant 2 heures. Après purification par CCE, le produit **15** est obtenu à l'état pur avec un rendement de 20 %. Malgré toutes nos tentatives (variation des conditions de réaction : durée, température et réactifs), nous n'avons pu optimiser le rendement de cette réaction. Le point de fusion de **15** (Pf = 225 °C) est identique à celui décrit dans la littérature.

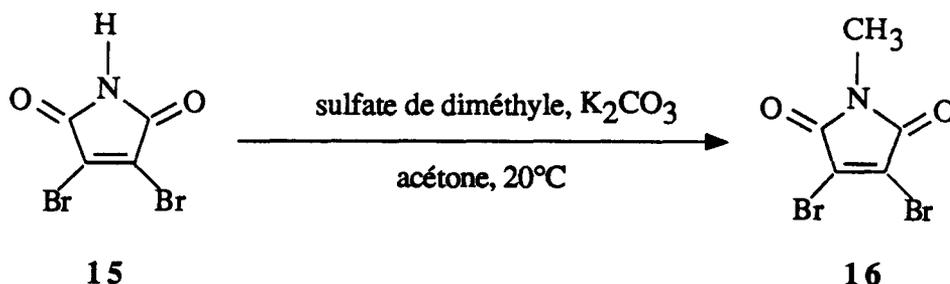
La fonction imide du 2,3-dibromomaléimide est très réactive, le schéma ci-dessous résume les réactions secondaires possibles :



Des groupements protecteurs pour la fonction imide du cycle maléimide comme les groupements benzyle [JOYCE 1987], benzyloxyméthyle [KANEKO 1985, GALLANT

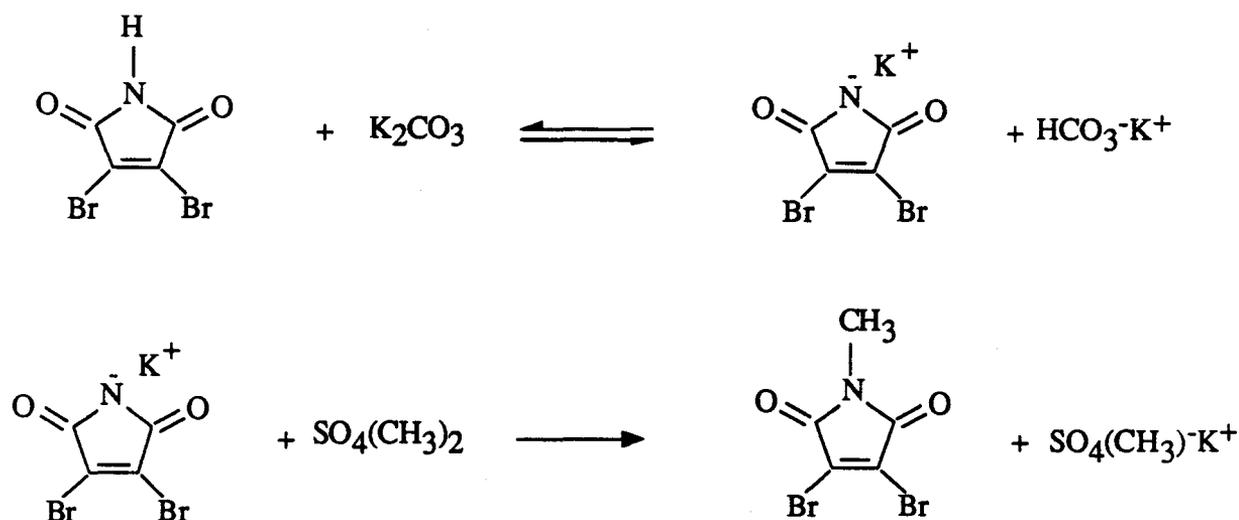
1993] ou méthyle [SCHARF 1965, BRENNER 1988] ayant déjà été proposés, nous avons donc tenté de réaliser la préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide en utilisant l'un de ces groupements : le groupement méthyle, pour la protection de la fonction imide.

2. Synthèse du 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide : 16



Le groupement protecteur méthyle est introduit par action du sulfate de diméthyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétone selon la méthode de H. D. SCHARF [SCHARF 1965]. Ce procédé consiste à porter à reflux un mélange équimolaire de 2,3-dibromomaléimide, de sulfate de diméthyle et de carbonate de potassium dans l'acétone pendant 2 heures. Des essais réalisés en faisant varier les conditions de réaction : durée et température ont montré que le produit se décompose par chauffage. En maintenant le milieu réactionnel à température ambiante pendant 12 heures, le 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide est obtenu avec un rendement de 90 %. Son point de fusion (Pf = 121°C) est identique à celui décrit dans la littérature.

Le mécanisme général de la réaction se décrit de la façon suivante :

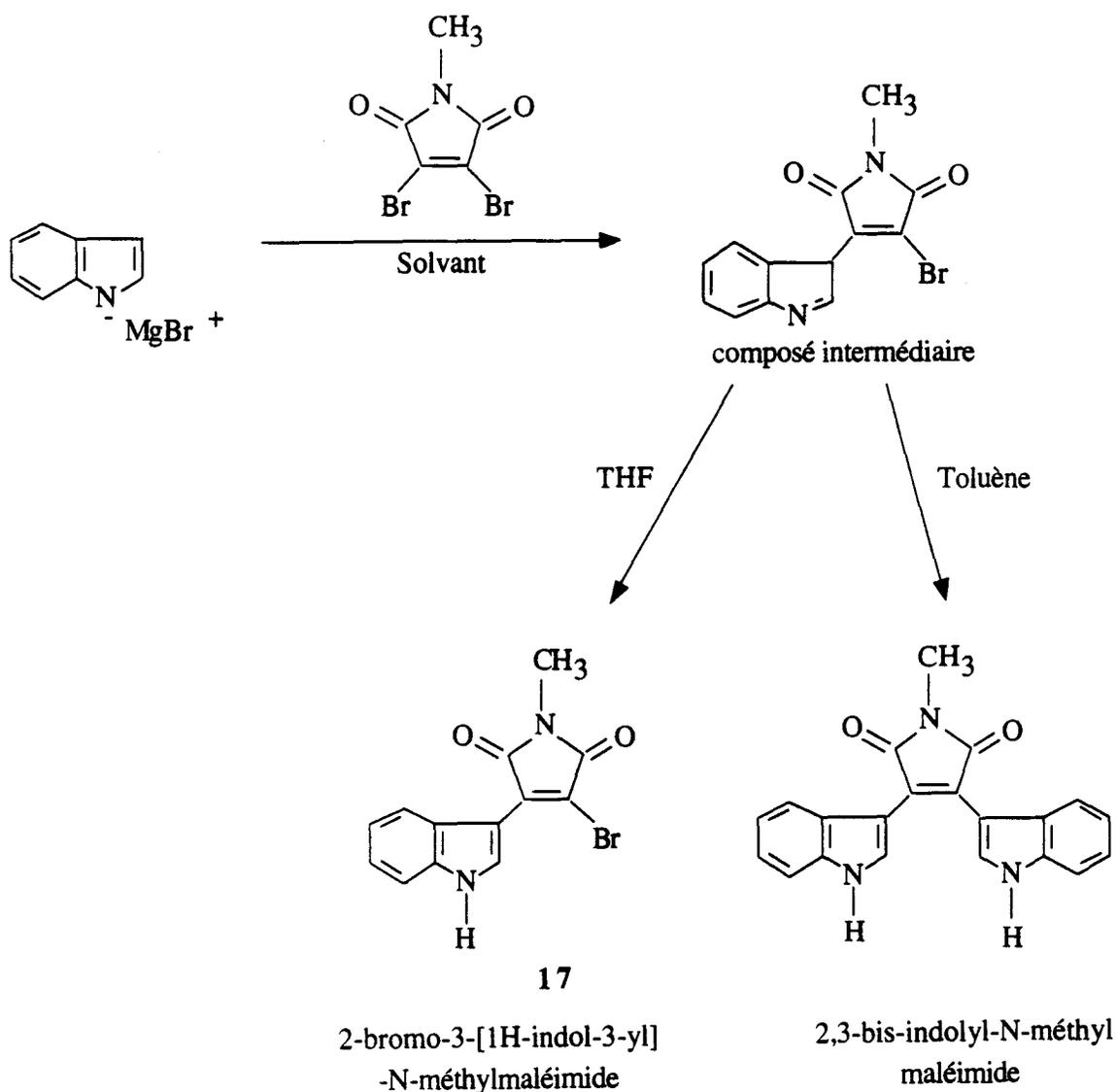


Le sulfate de diméthyle est un composé commercial bon marché qui réagit rapidement par une substitution nucléophile de type II, le groupement partant est le sulfate de méthyle.

Le carbonate de potassium (pKa = 10,2) agit en tant que base de Brönsted pour former l'anion du 2,3-dibromomaléimide (pKa du maléimide = 9,6) qui peut ainsi réagir avec le sulfate de diméthyle. Les pKa étant très proches (une unité de différence), un équilibre doit probablement s'établir puis être déplacé par la consommation du produit, rendant ainsi complète la réaction acido-basique.

3. Synthèse du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide : 17

La préparation du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide est réalisée selon la méthode proposée par M. BRENNER [BRENNER 1988].



La condensation du bromure d'indolylmagnésium avec le 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide peut donner le 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide (de

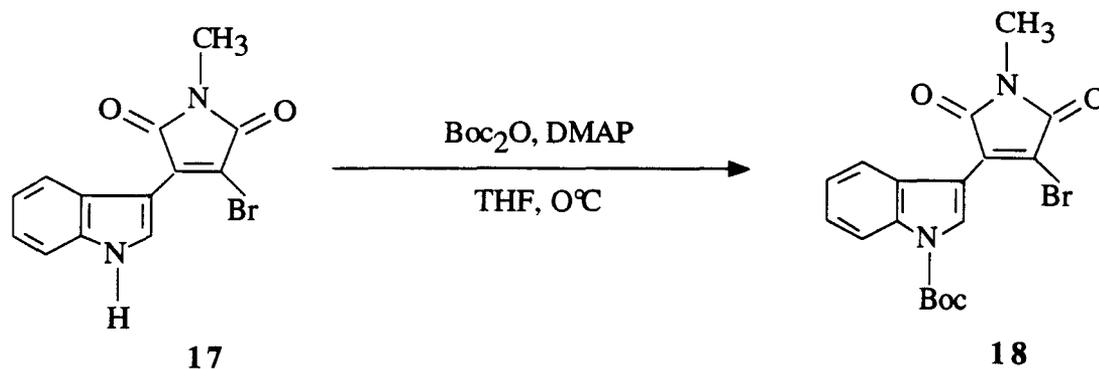
coloration jaune) accompagné par des quantités variables du 2,3-bis-indolyl-N-méthylmaléimide (de coloration rouge). Ces deux produits peuvent facilement être séparés par chromatographie sur couche épaisse de silice.

La proportion des deux dérivés est déterminée par la vitesse à laquelle le composé intermédiaire s'isomérisse pour donner le 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ou réagit avec une deuxième molécule de bromure d'indolylmagnésium pour fournir le 2,3-bis-indolyl-N-méthylmaléimide. W. STEGLICH et M. BRENNER ont montré que la réaction dépendait fortement du solvant. Dans le toluène, la réaction donne le 2,3-bis-indolyl-N-méthylmaléimide avec 70 % de rendement, tandis que dans le tétrahydrofurane le 2-bromo-3-[1H-indol-3yl]-N-méthylmaléimide est obtenu avec un rendement de 75%.

A une solution de bromure d'éthylmagnésium est additionnée une solution d'indole dans le toluène, le milieu réactionnel est alors maintenu à 40°C pendant 45 minutes. La condensation du bromure d'indolylmagnésium ainsi formé avec une solution de 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide dans le THF conduit à la formation du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide **17** attendu. Après purification par CCE, on obtient le composé **17** à l'état pur avec un rendement de 80 %, conformément à la littérature. Son point de fusion (Pf = 145°C avec décomposition) est identique à celui décrit dans la littérature. Dans le spectre de RMN ¹H (acétone d₆), on distingue l'apparition d'un nouveau massif entre 7,5 et 8,1 ppm correspondant aux 5 hydrogènes du noyau indole et l'apparition d'un singulet assez large à 11 ppm correspondant à l'hydrogène de l'azote indolique.

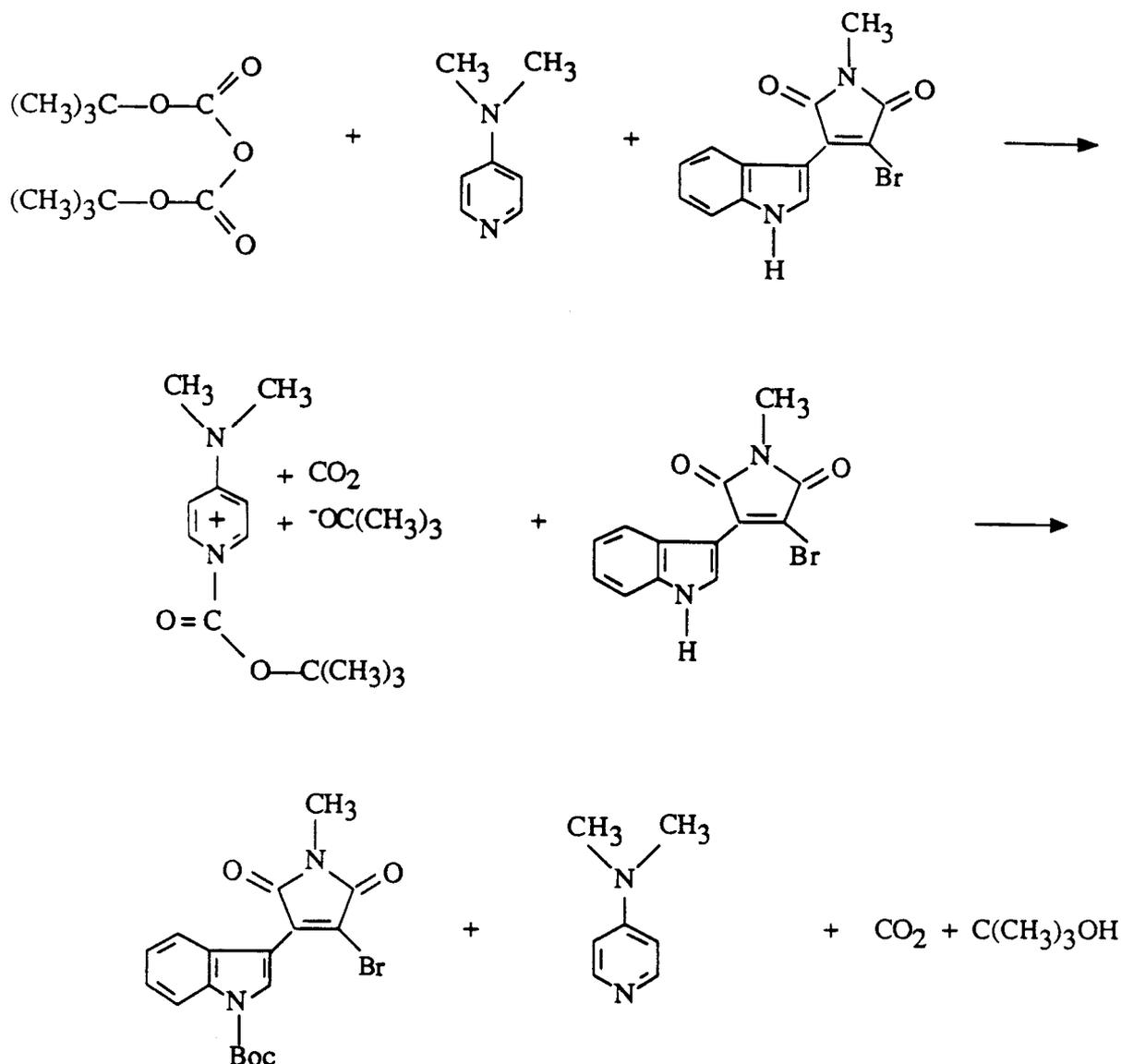
4. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide

4.1. Synthèse du 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide : 18



Afin d'éviter des réactions secondaires menant à la formation de sous-produits, il est nécessaire de protéger temporairement le noyau indole du composé **17** par le groupement tert.butylloxycarbonyle. Celui-ci est introduit par action de pyrocarbonate de di-tert.butyle en présence de quantité catalytique de 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP) dans le tétrahydrofurane selon la méthode de L. GREHN et de U. RAGNARSSON [GREHN 1984]. En l'absence de 4-(diméthylamino)pyridine, nous n'avons pas noté la présence du composé attendu.

Le mécanisme général de la réaction se décrit de la façon suivante :

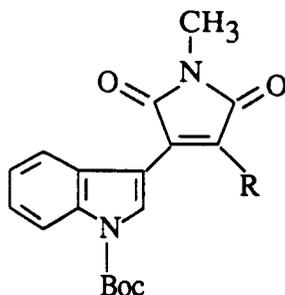


La DMAP peut attaquer le pyrocarbonate de di-tert.butyle en formant un sel intermédiaire qui s'avère plus apte à transférer l'agent acylant sur le nucléophile que le pyrocarbonate de di-tert.butyle lui-même [HÖFLE 1978].

Après purification par CCE, le 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide est obtenu à l'état pur avec un rendement de 80 %. Son point de fusion ($\text{Pf} = 138^\circ\text{C}$) est identique à celui décrit dans la littérature. Sa structure est confirmée par le spectre de RMN du proton (acétone d_6) dans lequel on distingue la disparition du singulet large correspondant à l'hydrogène de l'azote indolique observé à 11 ppm pour le composé 17 et l'apparition d'un nouveau singulet à 1,7 ppm correspondant aux 9 hydrogènes du groupement Boc.

4.2. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide

4.2.1. Synthèse des composés 19, 20, 21, 22 et 23



composé 19 : R = éthylène diamine

composé 20 : R = paraxylène diamine

composé 21 : R = tris-2(aminoéthylamine)

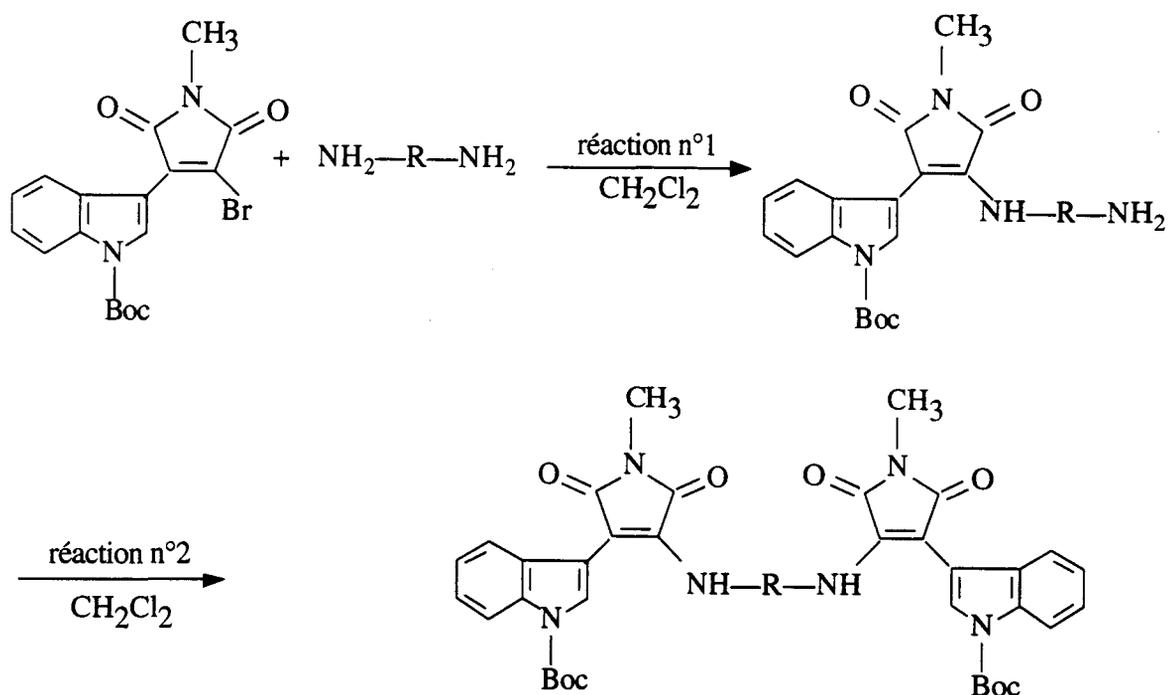
composé 22 : R = 3-diméthylaminopropylamine

composé 23 : R = tryptamine

Figure 32 : composés 2-alkylamino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide

Différentes amines (la 3-diméthylaminopropylamine, la tryptamine) et polyamines (l'éthylène diamine, le paraxylène diamine et la tris-2(aminoéthylamine)) ont été introduites par une réaction d'addition-élimination sur le 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide.

La substitution de l'atome de brome par des polyamines comme l'éthylène diamine, le paraxylène diamine et la tris-2(aminoéthylamine) peut conduire à des produits de monosubstitution (réaction n°1) ou de disubstitution (réaction n°2) selon le schéma suivant :



Ces deux produits sont facilement séparables par chromatographie sur couche épaisse de silice.

L'addition goutte à goutte d'une solution de 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide dans le chlorure de méthylène à la polyamine en excès conduit au produit de monosubstitution attendu. On favorise la réaction n°1 et on améliore son rendement en diluant au maximum le composé **18**, en mettant en oeuvre 5 équivalents de polyamine et en la concentrant au maximum. La réaction est effectuée à température ambiante pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est suivi en CCM et par le test à la ninhydrine. Après purification par CCE, le produit désiré est obtenu à l'état pur. Sa structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

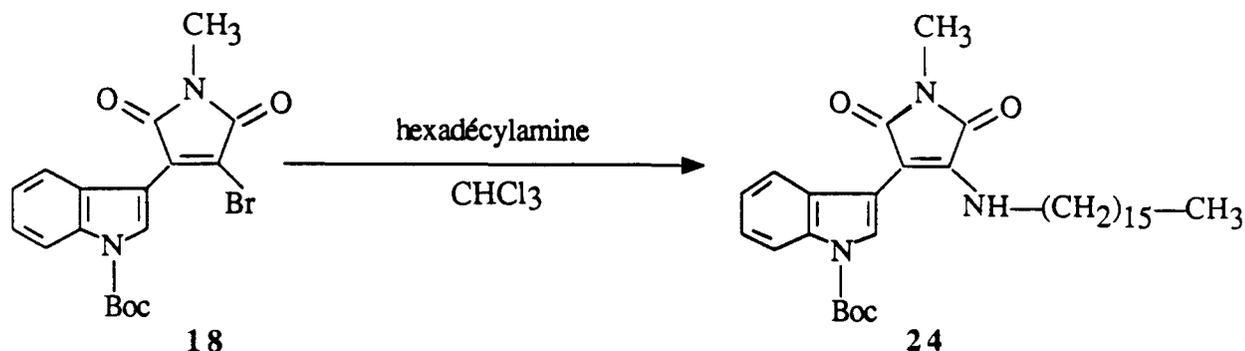
Selon ce mode opératoire, nous avons préparé les analogues suivants :

- Composé **19** : 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **20** : 2-[4-aminoxylène]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **21** : 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **22** : 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **23** : 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide.

Tableau 15 : caractéristiques des composés **19, 20, 21, 22 et 23**

Composés	Rdt	Test ninhydrine	Leur structure est confirmée par le spectre de RMN ¹ H dans lequel on observe les signaux caractéristiques des composés préparés.
19	60%	positif	2,75 (s large, 2H, RNH ₂) 3,1 (t, 2H, CH ₂ -NHR) 3,3 (t, 2H, CH ₂ -NHR)
20	65 %	positif	2,9 (s large, 2H, RNH ₂) 4,35 (s, 2H, CH ₂ benzylique) 4,4 (s, 2H, CH ₂ benzylique)
21	70 %	positif	1,9 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,1 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,5 (m, 4H, CH ₂ -NR ₂) 2,7 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,8 (s large, 2H, RNH ₂) 3,2 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂)
22	90 %	négatif	1,6 (m, 2H, CH ₂ aliphatique) 2,1 (s, 6H, (CH ₃) ₂ -NR ₂) 2,2 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,3 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂)
23	50 %	négatif	2,8 (t, 2H, CH ₂ -NHR) 3,5 (t, 2H, CH ₂ -indole) 6,9-8,2 (m, 5H, H indoliques) 10 (s large, 1H, H de l'azote indolique)

4.2.2. Synthèse du 2-[hexadécyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide : 24



Dans un premier temps, nous avons repris pour effectuer cette synthèse les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la préparation des 2-alkylamino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide.

Malheureusement, nous n'avons pu obtenir le produit escompté, alors que ce protocole s'était avéré satisfaisant pour toutes les autres synthèses. Nous avons donc fait varier les conditions de réaction : durée, solvant et concentration en nucléophile, mais, dans tous les cas, nous n'avons pu observer la présence du composé attendu.

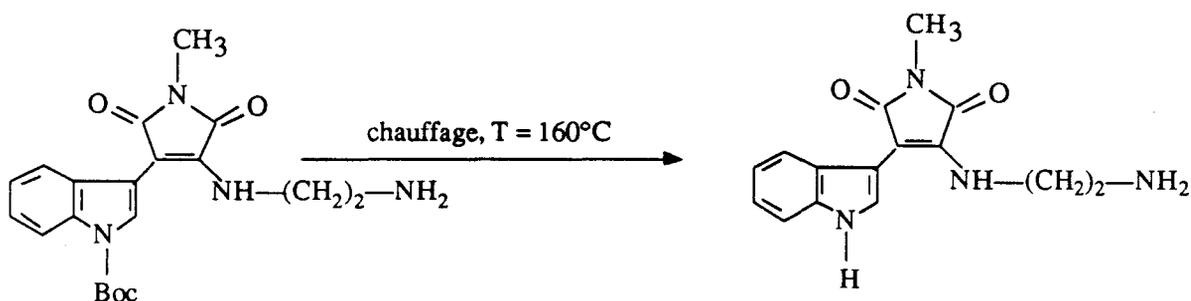
La préparation de ce nouveau dérivé a été réalisée en portant à reflux un mélange de 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide et d'hexadécylamine en excès dans le chloroforme pendant 6 heures. La réaction a été suivie en chromatographie sur couche mince de silice. Après purification sur CCE, le composé a été obtenu à l'état pur avec un rendement de 70 %. Sa structure a été confirmée par le spectre de RMN du proton dans lequel on distingue l'apparition d'un massif à 1,3 ppm correspondant aux 31 hydrogènes de la chaîne aliphatique.

5. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide

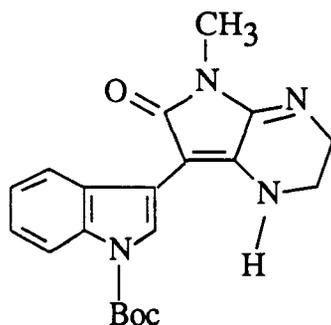
Le clivage du groupement tert.butylloxycarbone peut être réalisé en milieu acide ou par chauffage.

5.1. Clivage du groupement Boc par chauffage

Le groupement tert.butylloxycarbone peut facilement être clivé par simple chauffage selon la méthode de V. H. RAWAL [RAWAL 1985]. Cette thermolyse ne nécessite pas l'utilisation de solvants, ni d'aucun acide et se fait généralement avec d'assez bons rendements. Nous avons tenté de cliver le groupement Boc du 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide en utilisant ce procédé.



Le produit a été chauffé à 160°C (température du bain d'huile) pendant une heure. On obtient, après purification par CCE, un composé (rendement = 65 %) qui ne présente pas les caractéristiques spectroscopiques du 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide attendu. En effet, dans le spectre de masse réalisé selon la technique d'impact électronique (figure 33), le pic à 284 correspondant à l'ion moléculaire n'est pas visible. En revanche, on observe la présence de deux pics à 366 et à 266 pouvant correspondre à la molécule suivante (**19 bis**) avec ou sans le groupement Boc.



MM = 366 g/mol

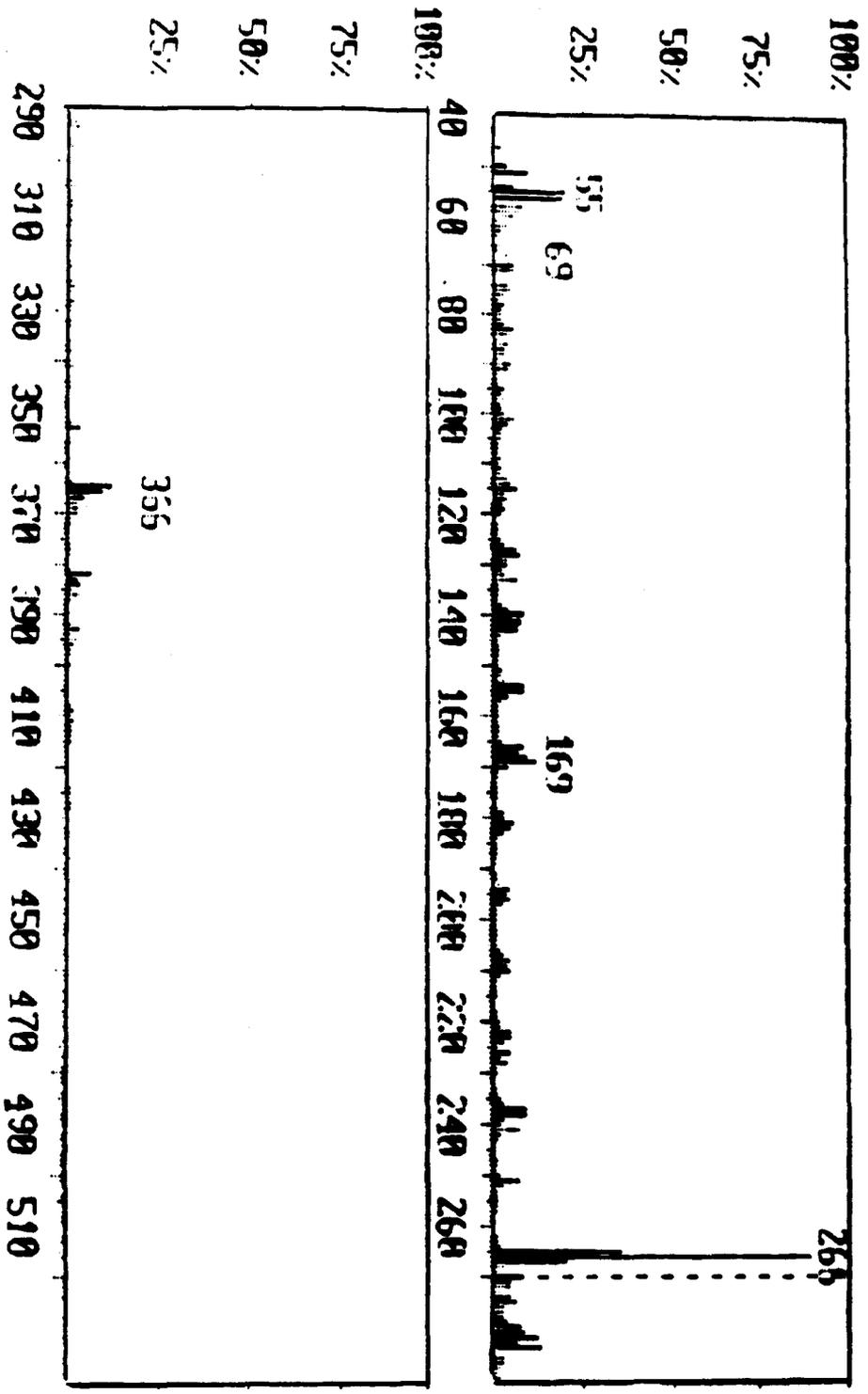
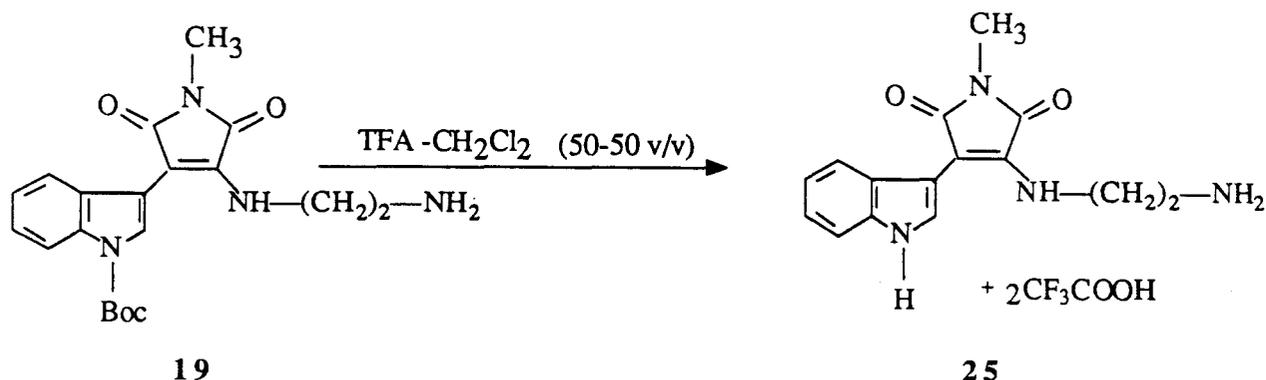


Figure 33 : spectre de masse du (IE) du composé 19 bis

5.2. Clivage du groupement Boc en milieu acide



Le groupement Boc du 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide est clivé par action de l'acide trifluoroacétique à 50 % (v/v) dans le chlorure de méthylène. La déprotection est terminée après 30 minutes de réaction à température ambiante. Après plusieurs lavages à l'éther éthylique, le produit désiré relativement visqueux est obtenu à l'état pur avec un rendement de 50 %. Dans le spectre de RMN ^1H (acétone d_6), on ne trouve plus le signal des protons (9H) du groupement Boc précédemment observé à 1,7 ppm.

Selon le même mode opératoire, nous avons préparé les composés suivants :

- Composé **25** : trifluoroacétate de 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide,
- Composé **26** : trifluoroacétate de 2-[4-aminoxylène]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide,
- Composé **27** : trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **28** : trifluoroacétate de 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **29** : trifluoroacétate de 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide,
- Composé **30** : trifluoroacétate de 2-[hexadécyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide.

6. Tests d'inhibition des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide (25 à 30)

Avant de cliver le groupement méthyle de ces différents analogues pour fournir les 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide, leur activité inhibitrice a été testée vis à vis de la PKC et de la PKA en présence de leurs substrats respectifs (histones IIIS et histones IIA). Les tests de phosphorylation *in vitro* des composés **29** et **30** n'ont pu être effectués car la nature hydrophobe de ces deux inhibiteurs les rend totalement insolubles dans les conditions utilisées pour réaliser ces tests enzymologiques. Les IC₅₀ obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 16 : inhibition des protéines Ser/Thr kinases par les composés **25**, **26**, **27**, **28**, **29** et **30**

Composés	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)
25	inactif (même à 350 μM)	inactif (même à 500 μM)
26	255	315
27	90	260
28	inactif	inactif
29	non testé	non testé
30	non testé	non testé

Quelle que soit l'enzyme étudiée, la plupart de nos trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide se sont avérés de très mauvais inhibiteurs.

Les composés **25** et **28** préparés se sont révélés inactifs sur ces deux enzymes. En revanche, les produits **26** et **27** montrent une légère activité inhibitrice vis à vis de la PKC et de la PKA. Le meilleur composé de la série, le composé **27** présente une IC₅₀ de 90 μM pour la PKC et de 260 μM pour la PKA.

A ce niveau, si la nécessité d'une fonction amide observée pour la staurosporine ou les composés de type 2,3-bis-indolylmaléimide était retrouvée pour nos composés, la

déméthylation du composé **27** en 2[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide pouvait laisser espérer l'obtention d'un inhibiteur puissant et spécifique de PKC.

II. Préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide

1. Clivage du groupement méthyle

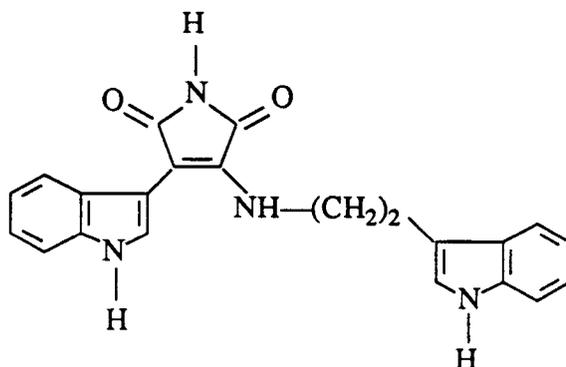
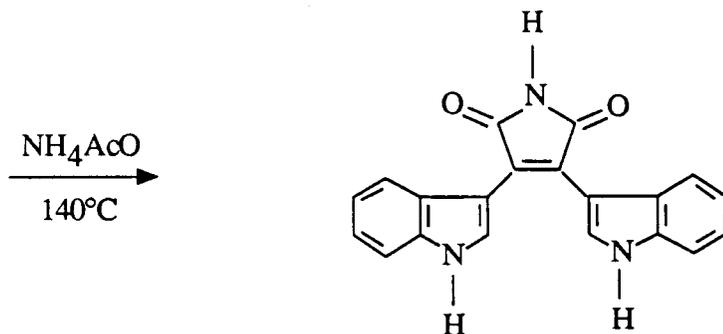
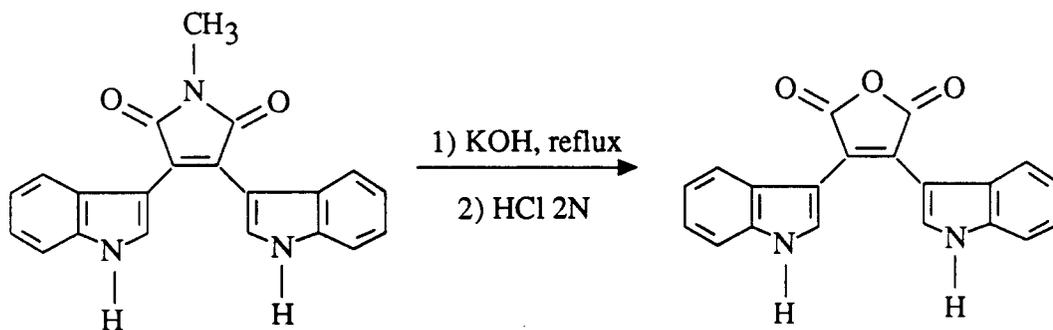


Figure 34 : synthèse du 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide

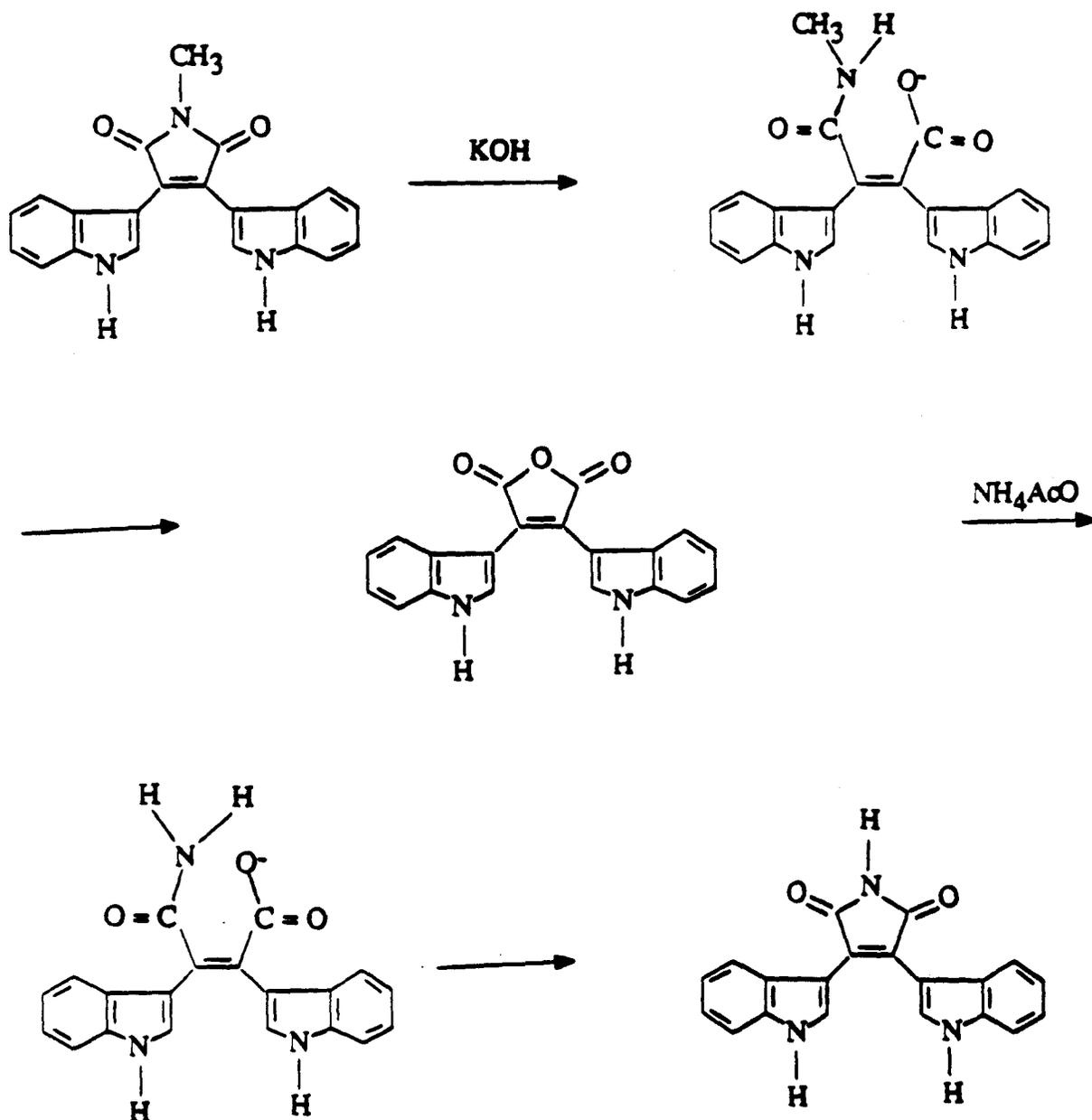
Pour réaliser la synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide, nous avons, dans un premier temps, tenté de cliver le groupement protecteur méthyle du composé **23** selon la méthode de M. BRENNER [BRENNER 1988].



La préparation du 2,3-bis-[1H-indol-3-yl]maléimide est décrite en deux étapes à partir du 2,3-bis-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide.

L'anhydride 2,3-bis-[1H-indol-3-yl]maléique est formé par hydrolyse alcaline (hydroxyde de potassium aqueux 10 % (p/v), à reflux pendant 30 minutes). Après acidification, celui-ci est ensuite chauffé avec de l'acétate d'ammonium à 140°C (température du bain d'huile) pour former le 2,3-bis-[1H-indol-3-yl]maléimide attendu avec un rendement de 80 %.

Le mécanisme de la réaction peut s'expliquer de la façon suivante :



Pour la préparation du 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide, nous avons repris le même mode opératoire, puis fait varier les conditions de réaction : durée, température et solvant, mais dans tous les cas, nous n'avons pas noté la présence du composé attendu alors que cette réaction s'avère satisfaisante dans la synthèse précédemment décrite. L'examen du dérivé ainsi obtenu en CCM et en spectrométrie de masse a montré que le composé **23** s'était totalement dégradé lors de la réaction :

- L'examen de la CCM présentait en effet de nombreuses taches absorbant dans l' UV.

- Le pic à 470 correspondant à l'ion moléculaire n'a pas été observé dans le spectre de masse réalisé selon la technique de FAB (+) (figure 35).

Il n'est donc pas possible de cliver le groupement méthyle des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide pour obtenir les 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide.



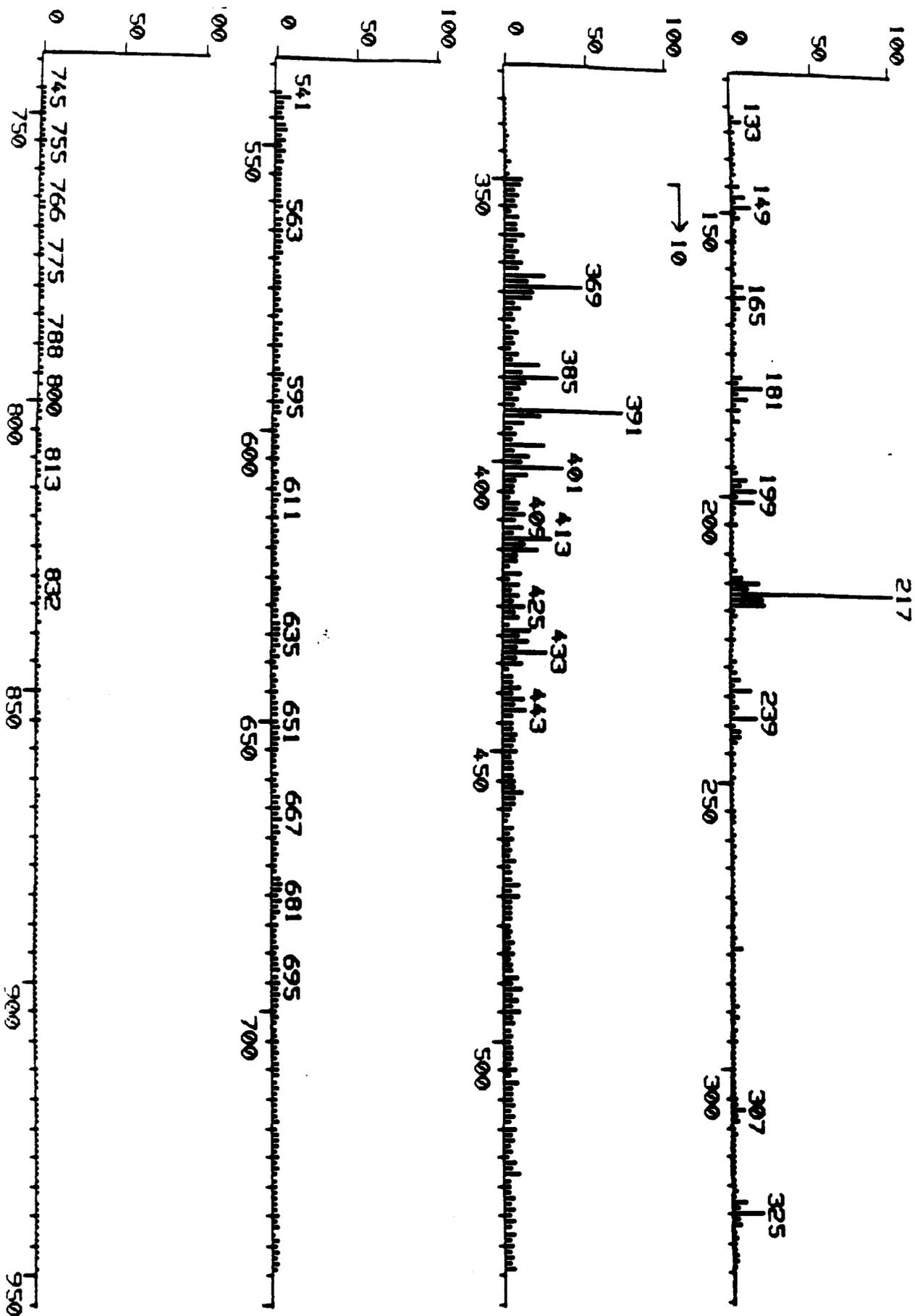


Figure 35 : spectre de masse (FAB) du composé 23 dégradé

2. Choix d'un groupement pour la protection de la fonction imide

De nombreux groupements protecteurs pour la fonction imide du cycle maléimide ont déjà été proposés. Mais, dans de nombreux cas, les essais de déprotection se sont révélés infructueux. Ainsi, I HUGHES a proposé pour la synthèse de la staurosporinone de nombreux groupements protecteurs pour la fonction imide comme le 4 méthoxybenzyle, le 3,4 diméthoxybenzyle, l'anisyle, l'allyle ou le benzyloxyméthyle mais malheureusement, il lui a été ensuite impossible d'éliminer ces groupements pour fournir la staurosporinone [HUGHES 1990].

La protection du noyau indole par le groupement tert.butylloxycarbonyle clivable en milieu acide et la protection du cycle maléimide par un radical stable en milieu basique mais labile en milieu acide, pouvaient nous permettre par un traitement acide final d'obtenir les dérivés escomptés.

Les groupements trityle, 4-méthoxytrityle et 4,4'-diméthoxytrityle sont généralement employés pour la protection de fonctions alcools ou amines. Leurs utilisations sont détaillées dans le tableau 17.

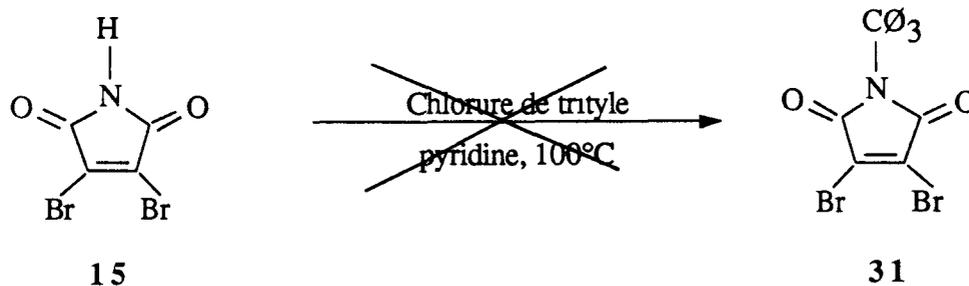
Très récemment, le groupement trityle a été employé dans la préparation de peptides en phase hétérogène pour protéger la fonction carboxamide des acides aminés asparagine et glutamine [SIEBER 1991]. Ce groupement trityle est labile en milieu acide (acide trifluoroacétique à 50 % dans le chlorure de méthylène) mais stable vis à vis de nucléophiles et de bases. Il nous a donc paru particulièrement intéressant de réaliser la synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide en utilisant les groupements trityle, 4-méthoxytrityle ou 4,4'-diméthoxytrityle pour la protection de la fonction imide et d'étudier leurs conditions de clivage.

Tableau 17 : caractéristiques d'utilisation des groupements trityle, 4-méthoxytrityle et 4,4'-diméthoxytrityle pour la protection de fonctions alcools et amines

Groupements protecteurs	références	Synthèse	Déprotection
trityle	[PFITZNER 1964] synthèse de dérivés 2'-deoxy-5'-O- trityluridine	chlorure de trityle pyridine, 100°C	acide acétique à 80°C
trityle	[AMIARD 1957] synthèse de N α ,N β , ditrityllysine	chlorure de trityle, TEA, CHCl ₃ , 0°C	acide acétique aqueux à 100°C
4-méthoxytrityle	[CONOLLY 1987] synthèse de N- méthoxytrityl-3- aminopropan(1)ol	chlorure de 4- méthoxytrityle 3-aminopropan(1)ol, CH ₂ Cl ₂ , 25°C.	
4,4'- diméthoxytrityle	[MÖLLER 1990] synthèse de 9-[2- (4,4'diméthoxytrityl oxyléthyl]acridine	chlorure de 4,4'- diméthoxytrityle pyridine	TFA 2% dans le chlorure de méthylène

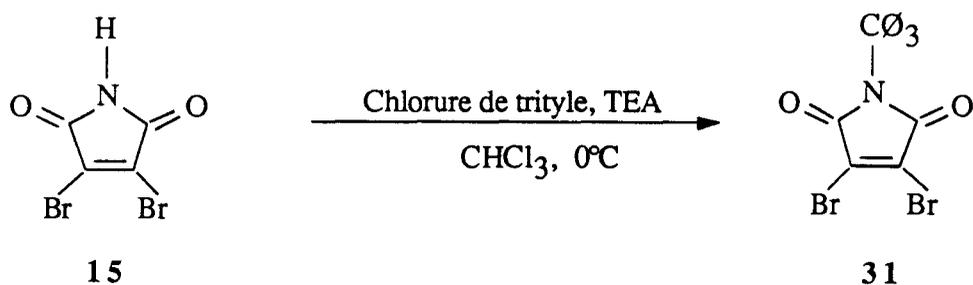
3. Synthèse du 2,3-dibromo-N-tritylmaléimide : 31

Tout d'abord, nous avons tenté de préparer le 2,3-dibromo-N-tritylmaléimide en nous inspirant de la méthode de K. E. PFITZNER [PFITZNER 1964].



Un mélange de 2,3-dibromomaléimide et de chlorure de trityle en léger excès dans de la pyridine est porté à reflux pendant une heure. Le milieu réactionnel est suivi en chromatographie sur couche mince de silice et par le test à l'acide trichloroacétique (après vaporisation d'une solution d'acide trichloroacétique, les groupements trityle, 4-méthoxytrityle ou 4,4-diméthoxytrityle sont révélés en CCM par l'apparition de taches jaunes).

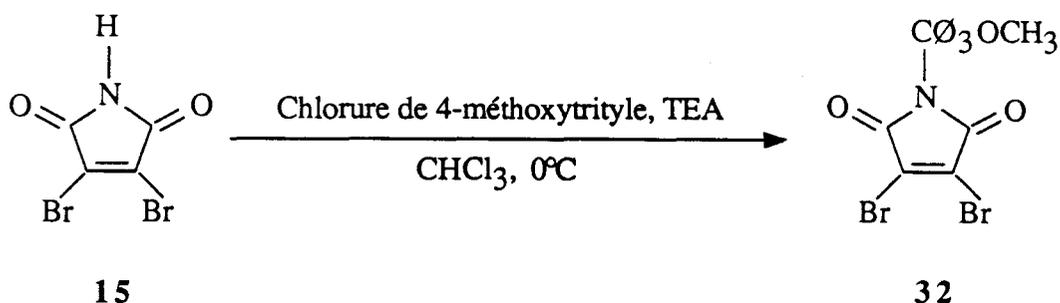
Malheureusement, nous n'avons pas observé la présence du composé attendu. Nous avons, ensuite, essayé de réaliser la synthèse de ce nouveau dérivé en nous inspirant de la méthode de G. AMIARD [AMIARD 1957].



Pour cela, le 2,3-dibromomaléimide est traité par le chlorure de trityle en excès dans le chloroforme en présence de triéthylamine. La réaction est réalisée à 0°C pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est suivi en CCM et par le test à l'acide trichloroacétique. Après purification par CCE, le composé est obtenu à l'état pur avec un rendement de 70 %. Sa structure est confirmée par le spectre de RMN du proton dans lequel on distingue l'apparition d'un massif à 7,2-7,3 ppm et l'apparition d'un doublet à 7,5 ppm correspondant aux 15 hydrogènes du groupement trityle.

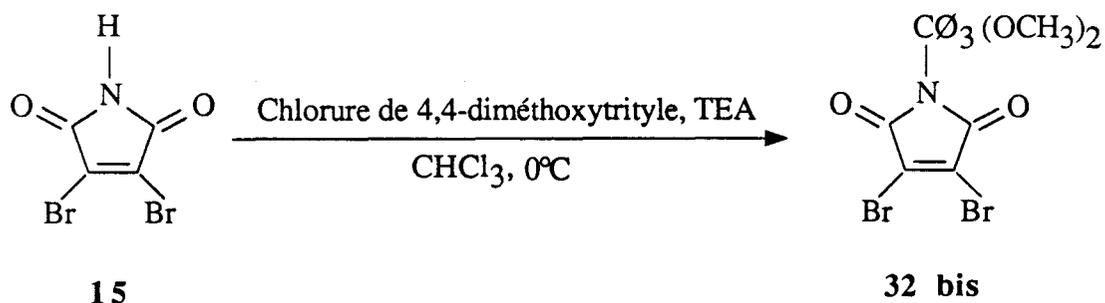
Des essais réalisés en faisant varier le temps de réaction, les quantités de réactifs (chlorure de trityle, triéthylamine) ont montré que le rendement de la réaction était optimal en mettant en oeuvre deux équivalents de chlorure de trityle, 7 équivalents de triéthylamine et en effectuant cette réaction à la température de 0°C pendant 12 heures.

4. Synthèse du 2,3-dibromo-N-4-méthoxytritylmaléimide : 32



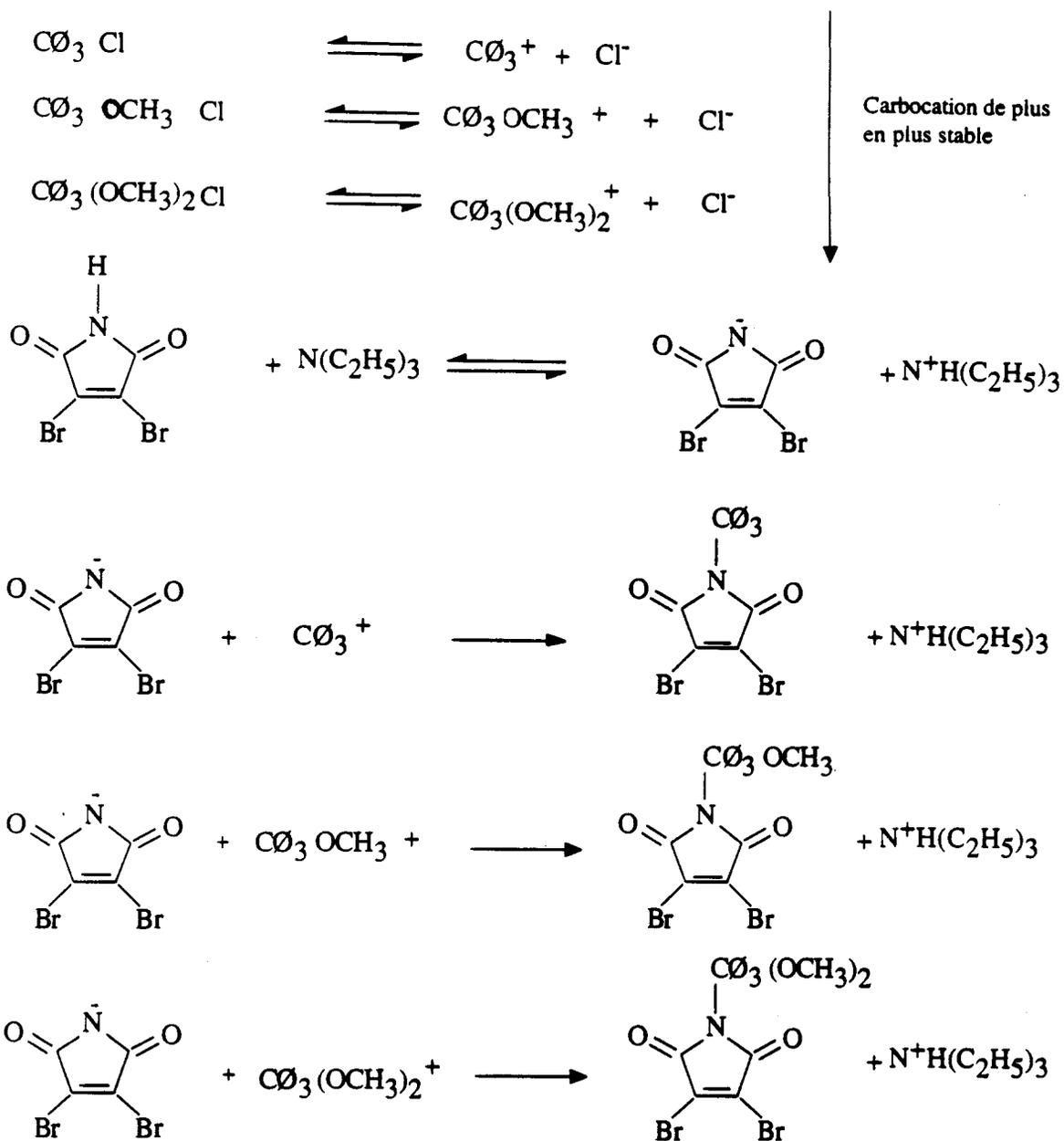
La préparation de ce composé a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour le groupement trityle. Après purification par CCE, le produit est obtenu avec un rendement de 40 %. Malgré toutes nos tentatives (variation des conditions de réaction : durée, température et réactifs), nous n'avons pu optimiser le rendement de cette réaction. Sa structure a été confirmée par le spectre de RMN du proton dans lequel on distingue l'apparition d'un singulet à 3,7 ppm correspondant aux hydrogènes du groupement méthoxy et l'apparition d'un massif à 6,8-7,4 ppm correspondant aux 14 hydrogènes du groupement trityle.

5. Synthèse du 2,3-dibromo-N-4,4'-diméthoxytritylmaléimide : 32 bis



Malgré toutes nos tentatives (variation des conditions de réaction : durée et température), nous n'avons pu observer la présence du 2,3-dibromo-N-4,4'-diméthoxytritylmaléimide alors que cette réaction s'était avérée satisfaisante dans le cas des synthèses des composés 2,3-dibromo-N-tritylmaléimide et 2,3-dibromo-N-4-méthoxymaléimide.

Le mécanisme général de la préparation des produits **31**, **32** et **32 bis** se décrit de la façon suivante :



Les halogénures tertiaires benzyles (chlorure de trityle, chlorure de 4-méthoxytrityle et chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle) subissent très facilement les réactions $\text{S}_{\text{N}}1$, ceci étant dû à la formation du carbocation stabilisé par résonance.

L'utilisation de la triéthylamine permet de piéger l'acide chlorhydrique libéré lors de la réaction.

Il est à noter que la préparation des composés 31, 32 et 32 bis s'effectue avec des rendements très différents. Ils sont décrits dans le tableau suivant :

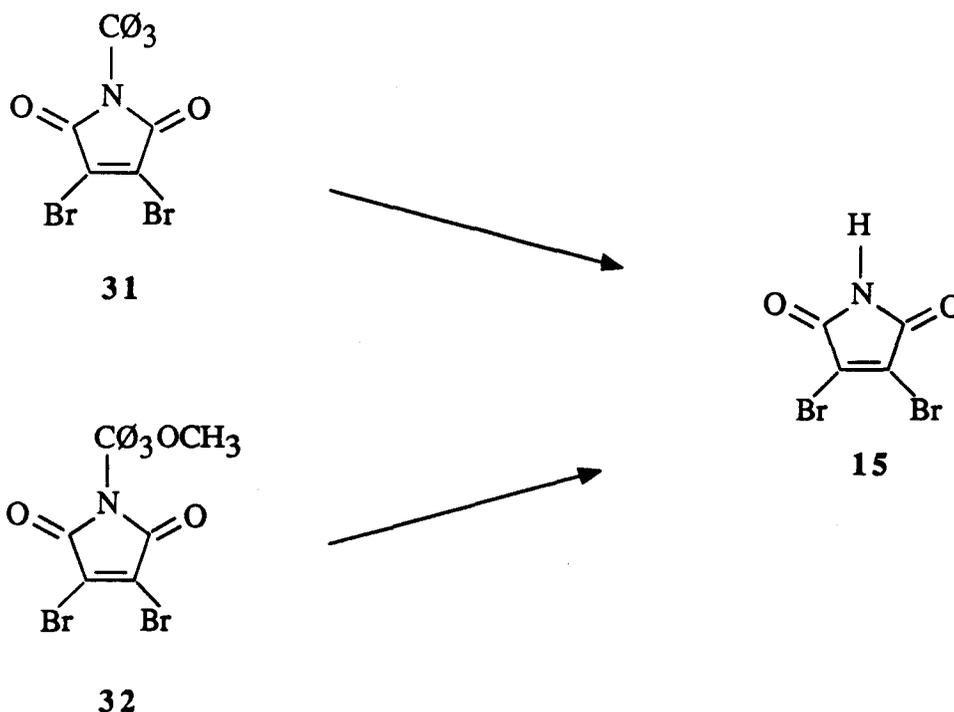
Tableau 18 : rendements des composés 31, 32 et 32 bis

Composés	31	32	32 bis
Rendement	70 %	40 %	0 %

Ceci peut s'expliquer par le fait que le carbocation trityle formé réagira d'autant moins vite qu'il sera stabilisé par résonance par les groupements électrodonneurs méthoxy.

6. Clivage des groupements trityle et 4-méthoxytrityle

Avant de poursuivre la synthèse des dérivés 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 35 et 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide : 39, nous avons tenté de cliver le groupement trityle du produit 31 et le groupement 4-méthoxytrityle de son analogue 32 selon le schéma ci-dessous :

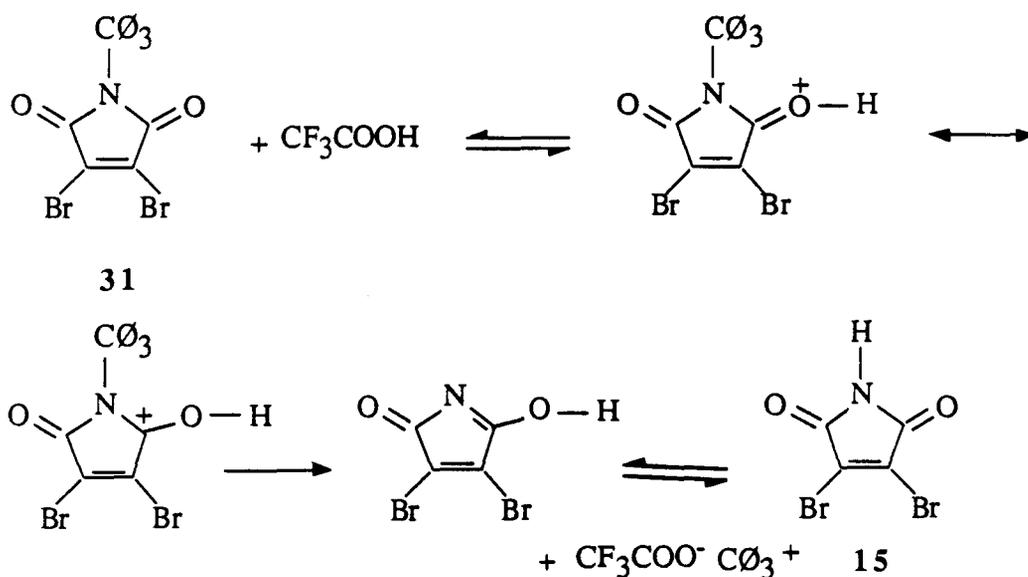


Le clivage des groupements trityle et 4-méthoxytrityle peut se faire en milieu acide. Des essais réalisés en faisant varier le temps de réaction, les pourcentages en TFA et en

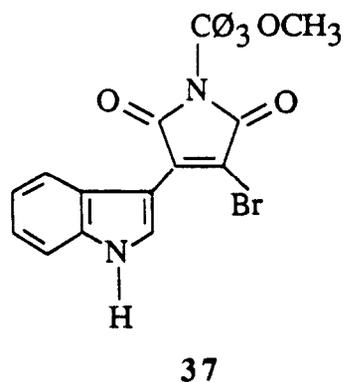
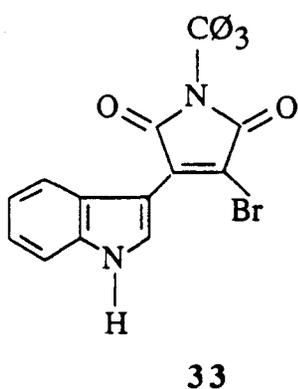
CH₂Cl₂ ont montré qu'ils étaient éliminés dans des conditions acides différentes. Le groupement 4-méthoxytrityle est éliminé dans le mélange TFA-CH₂Cl₂ (20-80 (v/v)). En revanche, le groupement trityle n'est clivé que par action de l'acide trifluoroacétique à 80 % dans le chlorure de méthylène.

La réaction est maintenue (dans les deux cas) à température ambiante pendant 2 heures et suivie en chromatographie sur couche mince de silice. Après plusieurs lavages à l'éther éthylique pour éliminer les restes trityle et 4-méthoxytrityle libérés, on obtient le 2,3-dibromomaléimide attendu.

Le mécanisme de la réaction peut se décrire de la façon suivante :

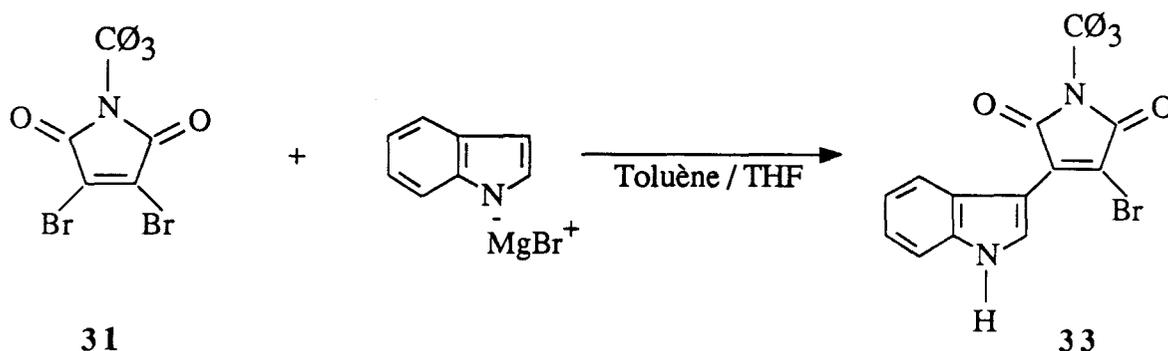


7. Synthèse des composés 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 33 et 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide : 37



Nous avons repris pour effectuer la synthèse de ces deux analogues les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la préparation du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide **17**. La réaction amène plusieurs remarques essentielles selon le produit synthétisé.

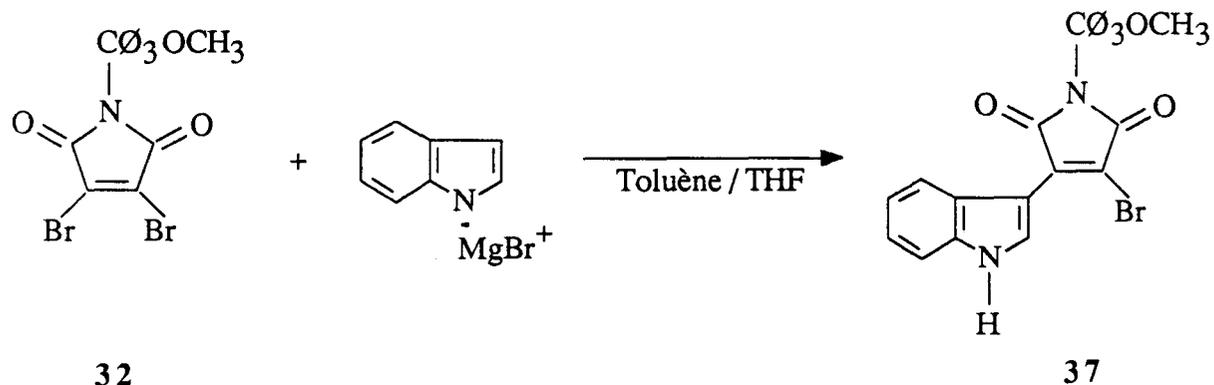
7.1. cas de la préparation du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : **33**



La synthèse du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide nécessite une température plus élevée et un temps de réaction plus important que dans le cas de la préparation du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide.

- La température passe de 20°C à 50°C et le temps de réaction passe de 2 à 12 heures.
- La synthèse du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide s'effectue avec un rendement analogue (de l'ordre de 80 %) à celle du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide à condition de travailler sous atmosphère inerte.

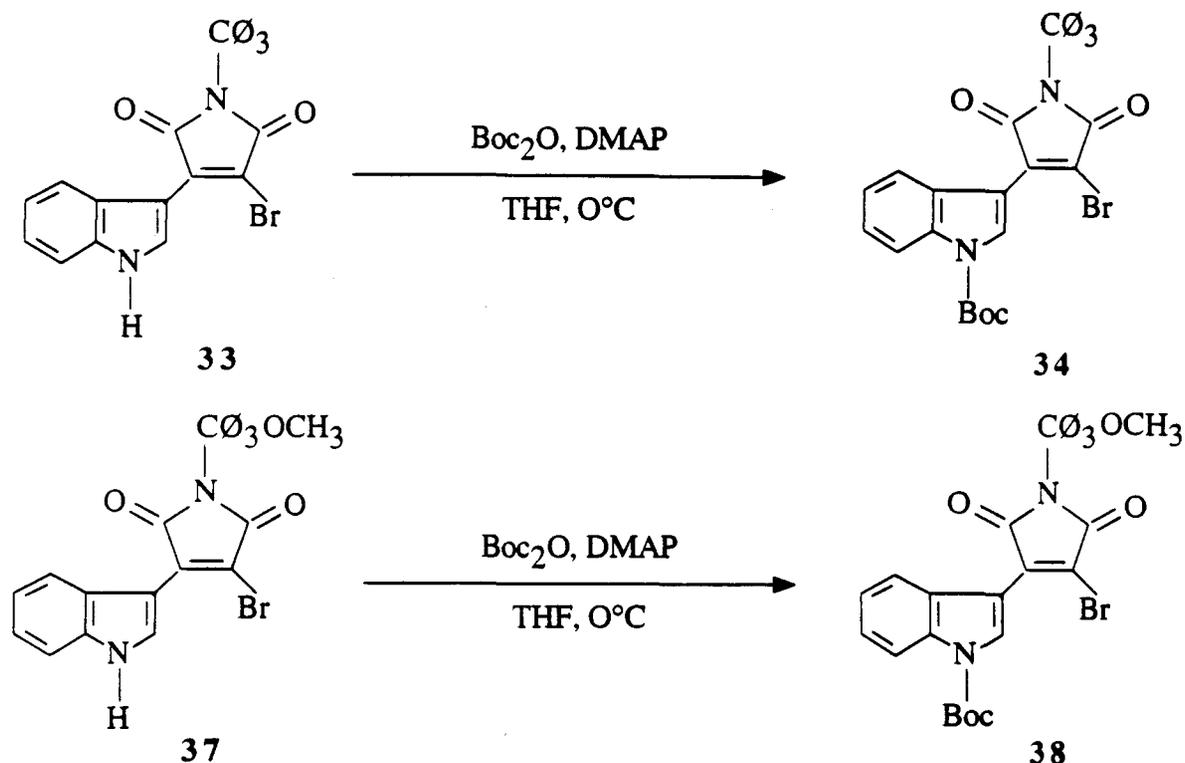
7.2 cas de la préparation du 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide : **37**



La synthèse du composé **37** nécessite un temps de réaction beaucoup plus important que pour la préparation du produit **33**.

- Le temps de réaction passe de 12 à 24 heures.
- Le rendement de cette réaction avoisine 40 %. Malgré toutes nos tentatives (variation des conditions de réaction : durée et température), nous n'avons pu améliorer le rendement de cette réaction.

8. Synthèse des composés 2-bromo-3-[1-tert.butyl-oxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : **34 et 2-bromo-3-[1-tert.butyl-oxycarbonyl-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide : **38****



La préparation de ces deux analogues se déroule dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la synthèse du 2-bromo-3-[1-tert.butyl-oxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide. Il est à noter que contrairement au 2-bromo-3-[1-tert.butyl-oxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide, ces deux dérivés sont relativement instables. Ils se décomposent à température ambiante en quelques heures. Ils sont donc utilisés rapidement et directement pour la synthèse suivante qui consiste à passer aux dérivés **35** et **39** par action de la tris-2(aminoéthylamine).

La préparation du dérivé **35** est réalisée selon le même mode opératoire que pour la synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide. Sa structure est confirmée par le spectre de masse selon la technique de FAB (+) dans lequel on observe l'apparition d'un pic à 699,4 correspondant à l'ion moléculaire $[M + H]^+$.

Selon le même mode opératoire, le dérivé **39** est obtenu avec un rendement de 30 %. Sa pureté est contrôlée par CCM et sa structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

9. Synthèse du trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : **36**

9.1. Clivage des groupements tert.butylloxycarbone et trityle

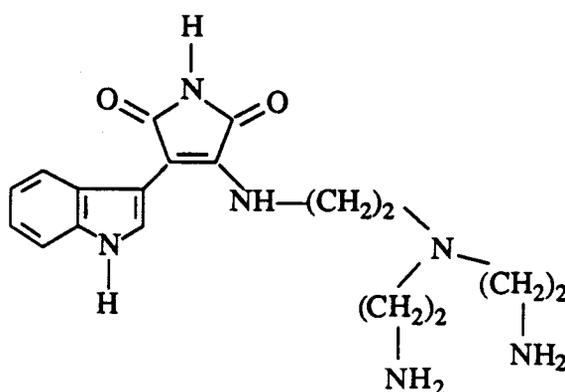
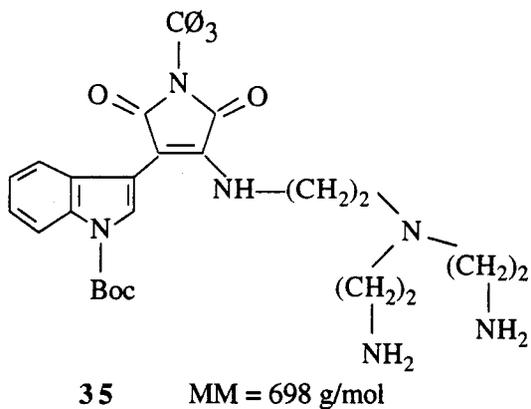


Figure 36 : synthèse du trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : **36**

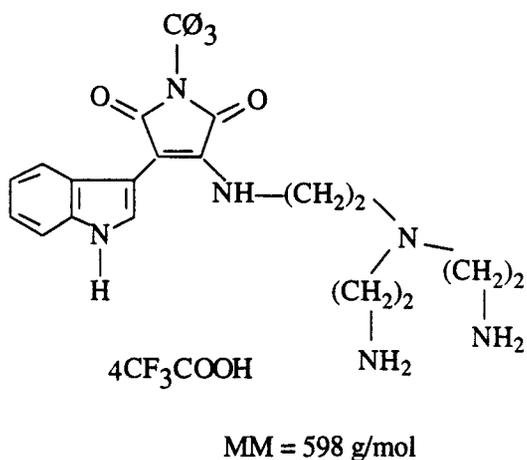
Nous avons cherché à éliminer dans une même étape les deux groupements protecteurs trityle et tert.butylloxycarbone du composé **35**.

A cette fin, le dérivé **35** est dissous dans un mélange acide trifluoroacétique-chlorure de méthylène. Après évaporation du solvant et plusieurs lavages à l'éther éthylique, le milieu réactionnel est contrôlé par CCM et par spectrométrie de masse réalisée selon la technique de FAB (+). Des essais réalisés en faisant varier le temps de réaction, les pourcentages en TFA et en CH_2Cl_2 ont montré que les groupements trityle et tert.butylloxycarbone sont éliminés dans des conditions acides différentes.

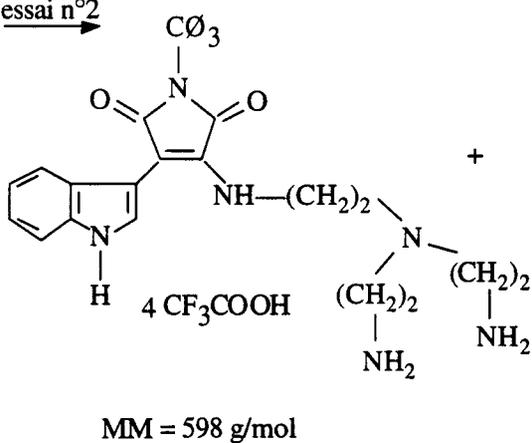
Ces différents essais sont détaillés dans la figure ci-dessous et dans le tableau suivant :



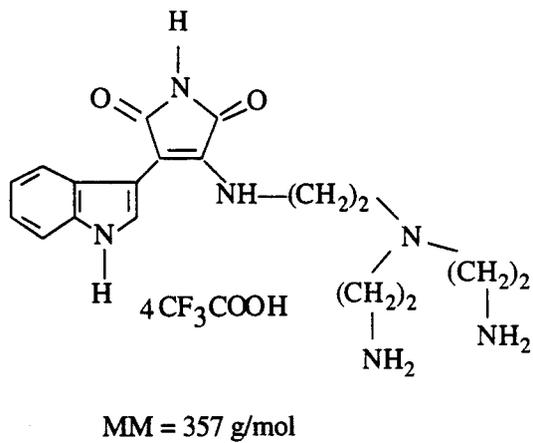
essai n°1 →



essai n°2 →



+



essai n°3 →

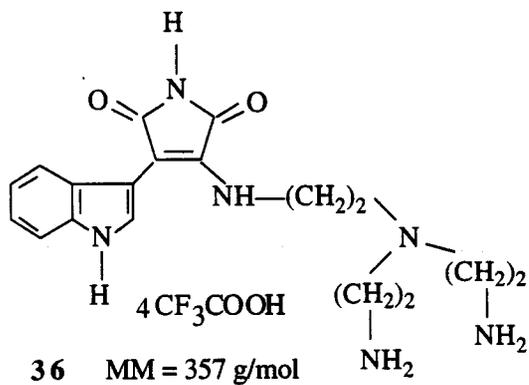


Tableau 19 : clivage des groupements trityle et tert.butyloxycarbonyle du composé 35

	Rf	
Spectre n°1	Rf = 0,75 (isopropanol- eau-NH ₄ OH (70-10-20 v/v))	Le spectre de masse n°1 montre un pic à 699,4 correspondant à [M + H] ⁺ .
essai n°1 TFA (50 %)- CH ₂ CL ₂ (50 %) Spectre n°2	RF = 0,59 (isopropanol- eau-NH ₄ OH (70-10-20)).	Le spectre de masse n°2 montre deux pics à 599 et à 357 correspondant à [M - Boc + H] ⁺ et à [M- Boc - trityle + H] ⁺ respectivement. On observe également un pic à 243 correspondant au groupement [trityle] ⁺ .
essai n°2 TFA (75 %) -CH ₂ Cl ₂ (25 %) Spectre n°3		Le pic à 357 correspondant à [M - Boc - trityle + H] ⁺ augmente d'intensité lorsque la concentration en TFA augmente.
essai n°3 TFA pur Spectre n°4	Rf = 0,31 (isopropanol- eau-NH ₄ OH (70-10-20 v/v))	Dans le spectre de masse n°4, on n'observe que le pic à 357 correspondant à [M - Boc - trityle + H] ⁺ .

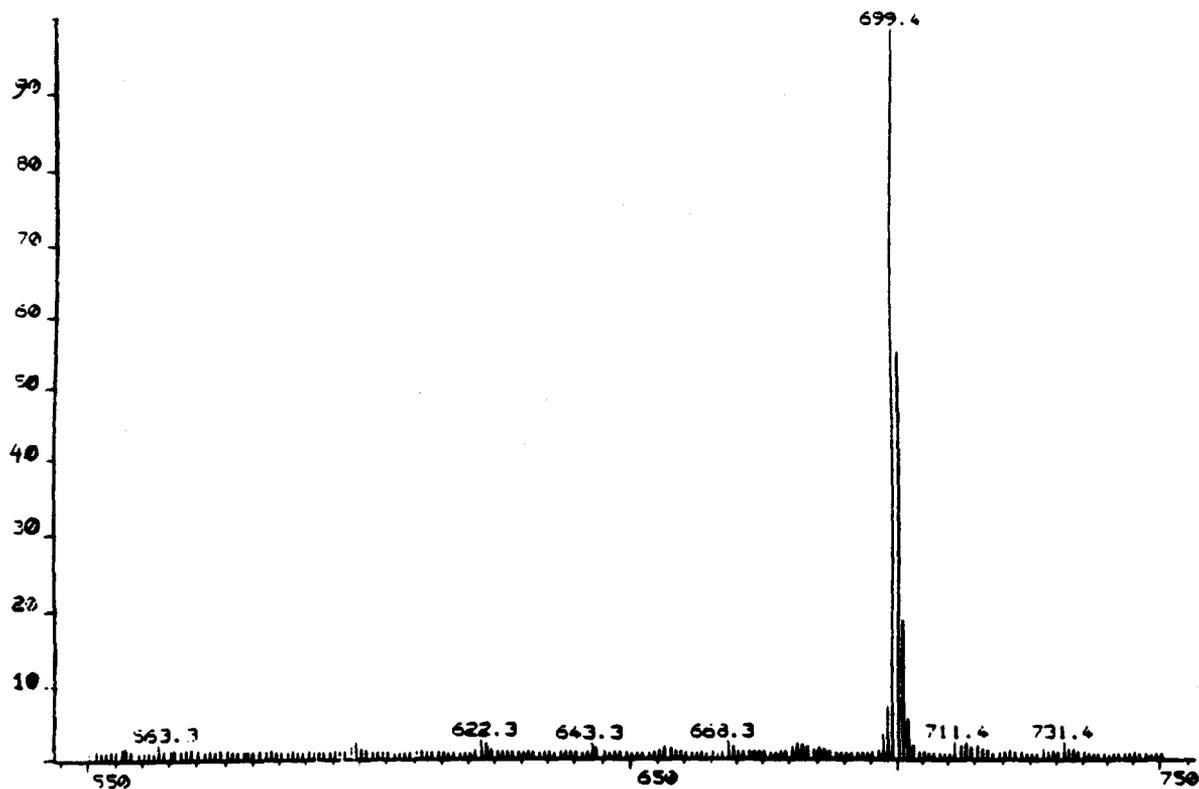


Figure 37 : spectre de masse n°1 (FAB) du composé 35

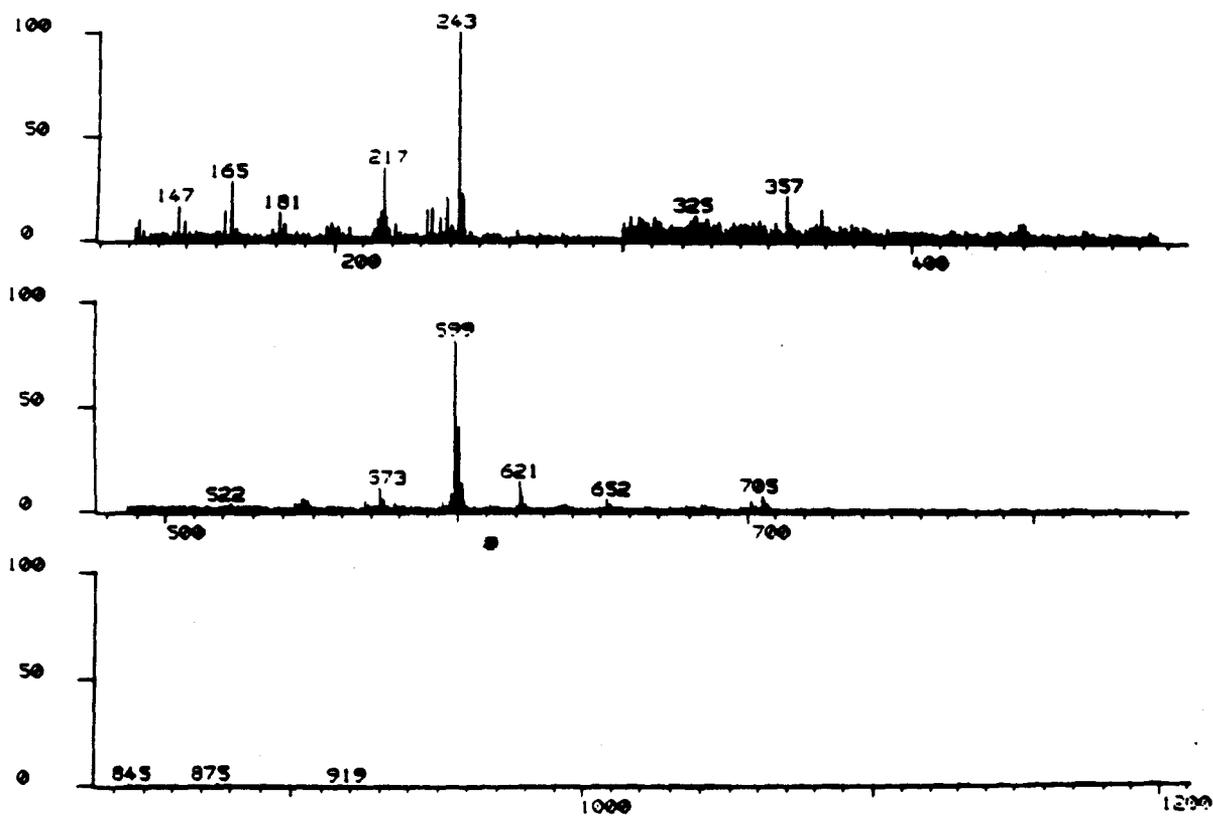


Figure 38 : spectre de masse n°2 (FAB)



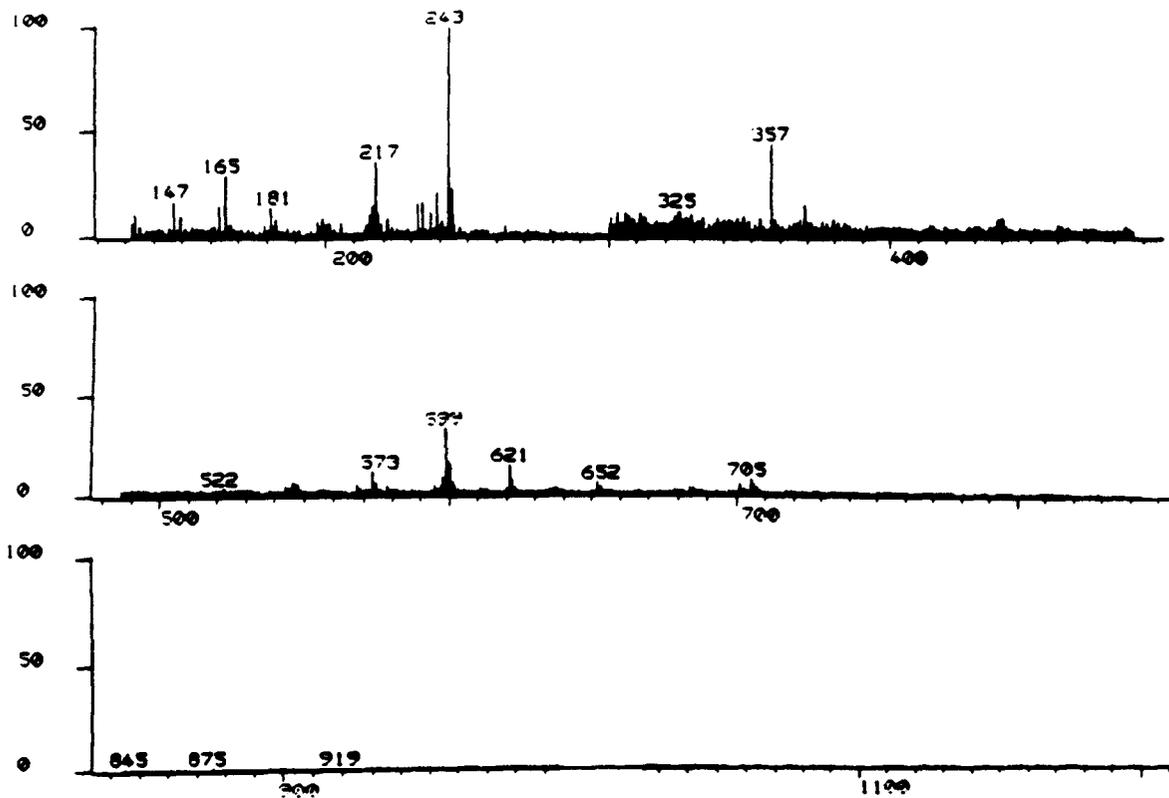


Figure 39 : spectre de masse n°3 (FAB)

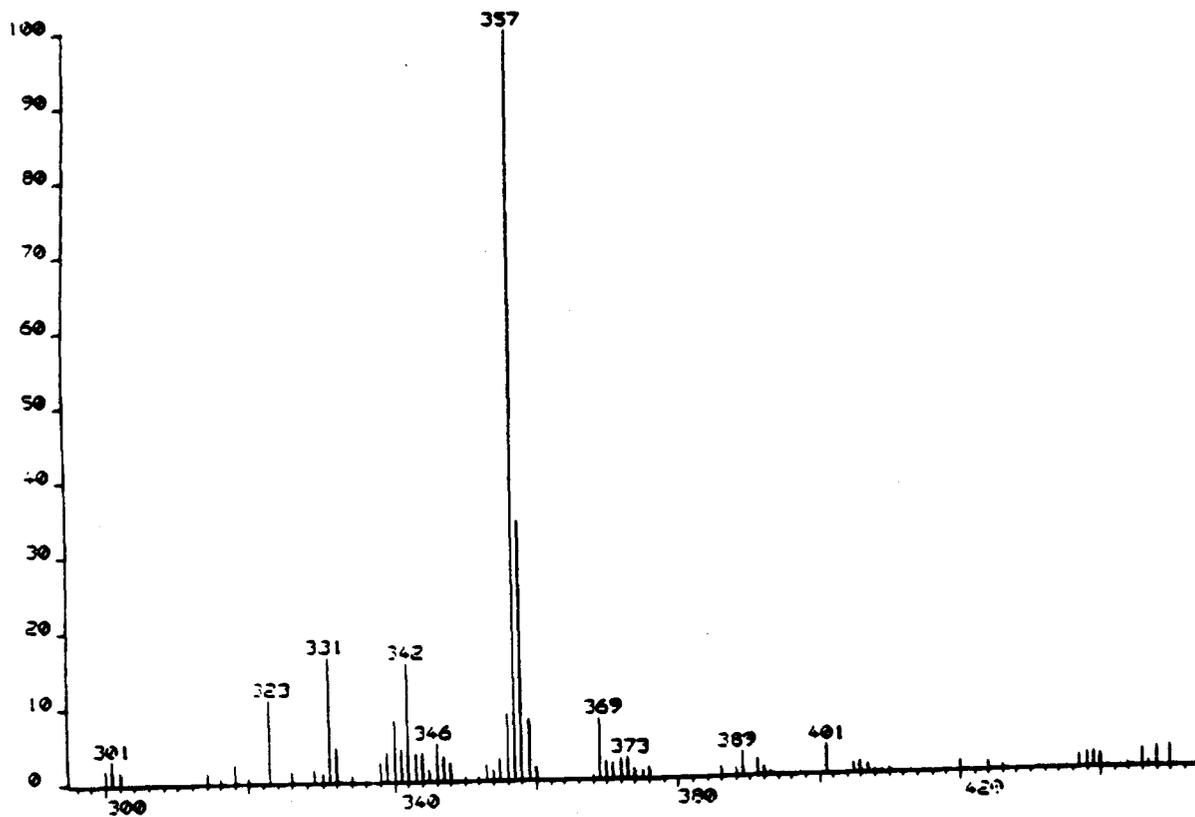


Figure 40 : spectre de masse n°4 (FAB) du composé 36



Le groupement tert.butyloxycarbonyle peut être éliminé sélectivement dans le mélange acide trifluoroacétique-chlorure de méthylène (50-50 (v/v)). Comme le montre le spectre de masse n°2 (figure 38), le pic observé à 699 correspondant à [l'ion moléculaire (M) + H]⁺ a totalement disparu.

La déprotection du groupement trityle est réalisée par action de l'acide trifluoroacétique pur. En effet, dans le spectre de masse n°4 (figure 40), on n'observe que le pic à 357 correspondant à [M - Boc - trityle + H]⁺. En revanche, dans le mélange acide trifluoroacétique-chlorure de méthylène (70-30 v/v), la déprotection du groupement trityle n'est pas totale. En effet, dans le spectre de masse n°3 (figure 39), on observe le pic à 357 correspondant à [M - Boc - trityle + H]⁺ mais également la présence du pic à 599 correspondant à [M - Boc + H]⁺.

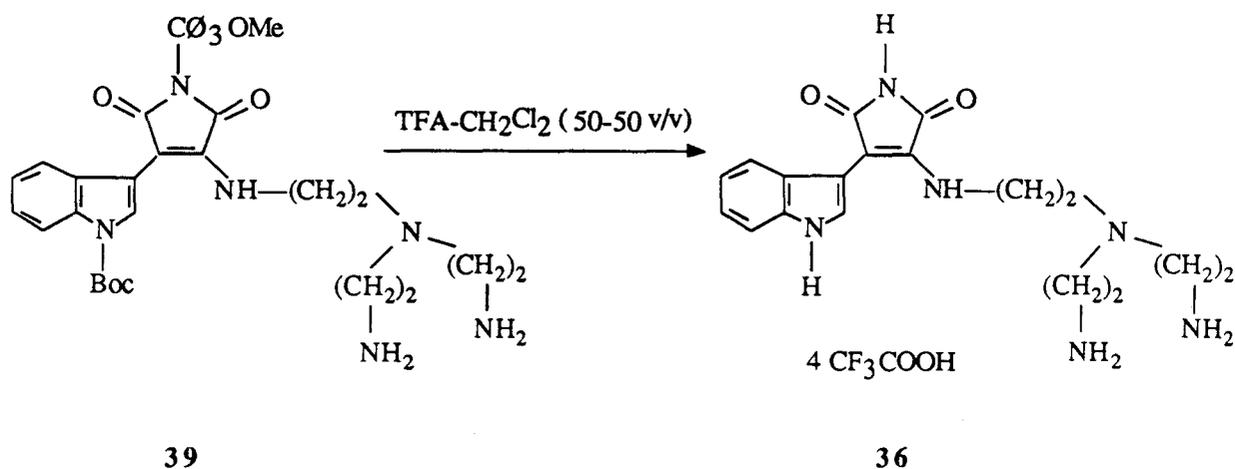
Il est à noter que le noyau indole en milieu acide peut subir de nombreuses réactions secondaires (réactions d'oxydation pouvant mener à des dégradations du noyau indole, réactions de substitutions sur le noyau indole). Pour éviter de telles réactions, il est possible de travailler sous atmosphère inerte et à la température de 0°C avec des capteurs de carbocations comme l'éthanedithiol, le thioanisole ou l'anisole [GROSS a, et b].

Des essais de purification du composé obtenu par chromatographie sur couche épaisse de silice se sont tous révélés infructueux. Ils ont montré que ce dérivé se dégradait sur silice. Nous avons donc essayé d'obtenir le composé **36** par précipitation de sa solution dans le TFA dans l'éther éthylique.

Cette simple précipitation a bien permis d'obtenir le composé "déprotégé" débarrassé de toutes ses impuretés (élimination du carbocation trityle formé). Sa structure a été confirmée par le spectre de RMN ¹H (acétone d₆) dans lequel les signaux des protons des groupements Boc et trityle précédemment observés à 1,7 ppm et à 7 ppm ne sont plus observables.

9.2. Clivage des groupements tert.butyloxycarbone et 4-méthoxytrityle

Le produit **36** peut également être obtenu à partir du composé **39** par clivage des groupements tert.butyloxycarbone et 4-méthoxytrityle.



Des essais réalisés en faisant varier le temps de réaction, les pourcentages en TFA et en CH₂Cl₂ ont montré que les groupements tert.butyloxycarbone et 4-méthoxytrityle peuvent être clivés en une seule et même étape dans le mélange TFA-CH₂Cl₂ (50-50 (v/v)). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures et suivi en chromatographie sur couche mince de silice et en spectrométrie de masse réalisée selon la technique de FAB (+) (figures 41 et 42). Le composé **36** est obtenu à l'état pur sous forme de cristaux après précipitation dans le système TFA-éther éthylique.

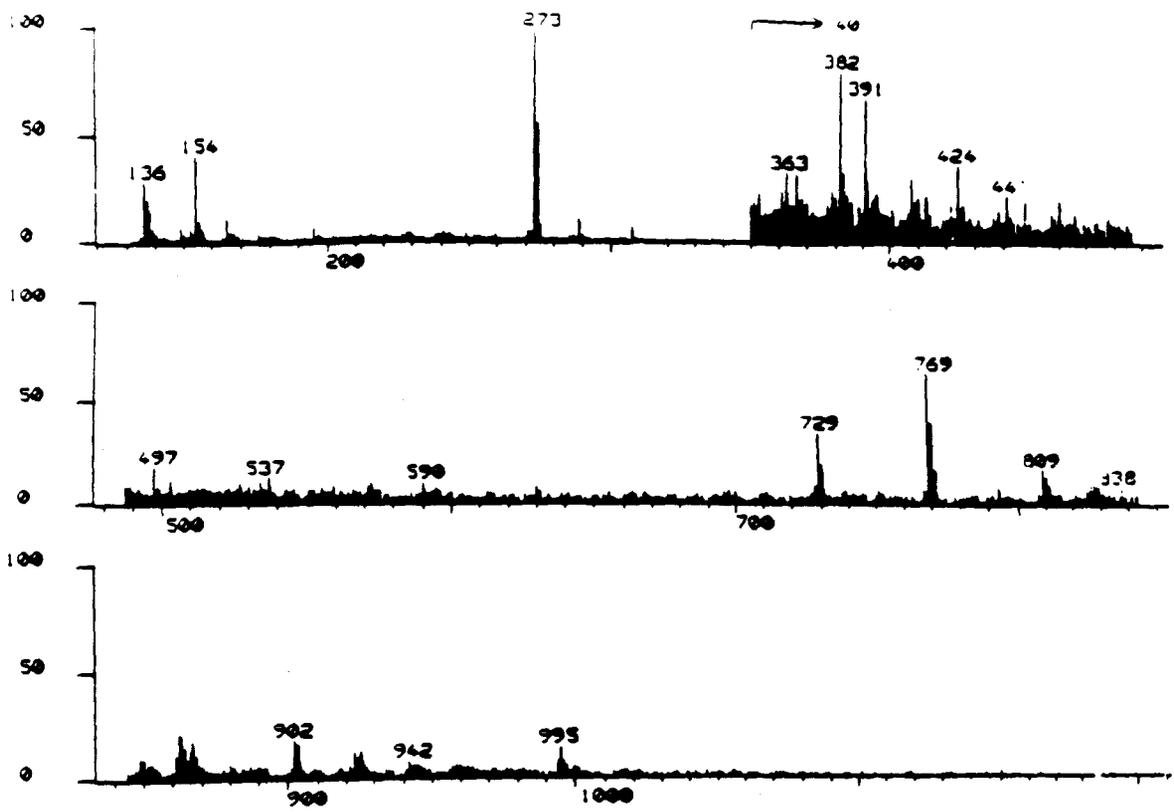


Figure 41 : spectre de masse (FAB) du composé 39

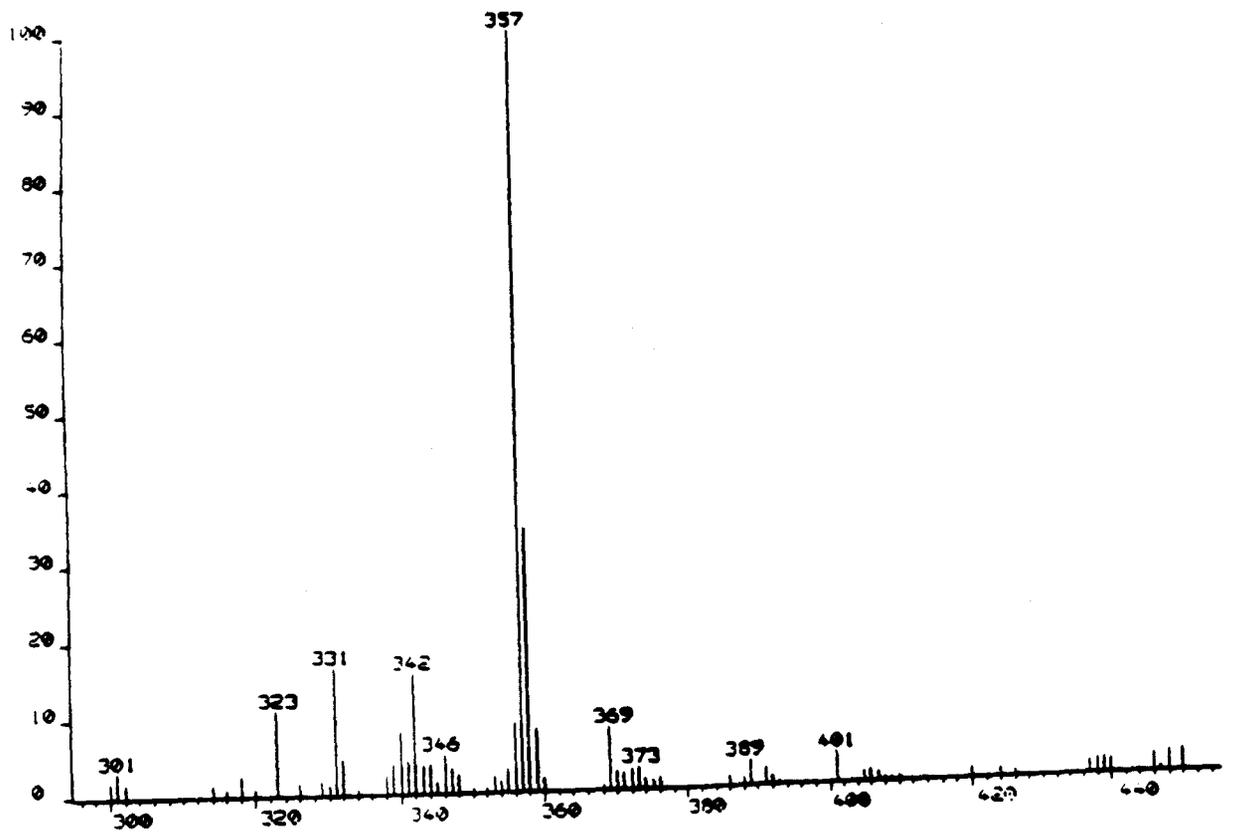


Figure 42 : spectre de masse (FAB) du composé 36



9.3. Conclusion sur le clivage des groupements trityle, 4-méthoxytrityle et tert.butyloxycarbonyle

Les groupements trityle et tert.butyloxycarbonyle peuvent être clivés en une seule et même étape par action de l'acide trifluoroacétique. Il est également possible d'éliminer sélectivement le groupement Boc dans le mélange TFA-CH₂Cl₂ (50-50 v/v). En revanche, le clivage des groupements 4-méthoxytrityle et Boc se fait dans des conditions plus douces (acide trifluoroacétique à 50 % dans le chlorure de méthylène) que celles utilisées lors de la déprotection des groupements trityle et Boc.

Malgré cet avantage, nous avons choisi de protéger le cycle maléimide par le radical trityle et le noyau indole par le groupement tert.butyloxycarbonyle pour réaliser la préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide. En effet, les conditions de synthèse pour la préparation des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide sont beaucoup plus faciles que celles décrites précédemment lors de la synthèse des 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide :

- rendements meilleurs,
- temps de réaction moins important,
- purification par chromatographie sur couche épaisse de silice des produits intermédiaires plus facile,
- composés intermédiaires plus stables.

10. Synthèse des 2-alkylamino-3-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide (40 à 47)

Nous avons repris pour effectuer la synthèse de ces différents analogues les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la préparation du composé 35. L'atome de brome du dérivé 34 a donc été substitué par différentes amines comme :

composé 40 : R = éthylène diamine

composé 41 : R = 3-diméthylaminopropylamine

composé 42 : R = tryptamine

composé 43 : R = diéthylène diamine

composé 44 : R = bis-(3-aminopropyl)amine

composé 45 : R = 1,5 diaminopentane

composé 46 : R = 1,6 diaminohexane

composé 47 : R = 1,7 diaminoheptane

Après purification par CCE, ces analogues sont caractérisés par les méthodes spectroscopiques usuelles.

Tableau 20 : caractéristiques des composés 40 à 47

composés	Rdt	Test ninhydrine	Leur structure est confirmée par le spectre de RMN ¹ H dans lequel on observe les signaux caractéristiques des composés préparés
40	85 %	positif	2,3 (s large, 2H, RNH ₂) 2,5 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3,1 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂)
41	92 %	négatif	1,5 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 2,15 (s, 6H, (CH ₃) ₂ -NR ₂) 2,25 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3,2 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂)
42	50 %	négatif	2,75 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3,35 (t, 2H, CH ₂ -indole) 7,1-7,65 (m, 5H, H indoliques)
43	58 %	positif	2,4 (s large, 3H, RNH ₂) 2,45 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,55 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,6 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂)
44	65 %	positif	1,55 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 2,5 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,65 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,8 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3,2 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3,3 (s large, 3H, RNH ₂)
45	55 %	positif	0,9-1,4 (m, 6H, CH ₂ -aliphatique) 2,7 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,85 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3 (s large, 2H, RNH ₂)
46	70 %	positif	0,9 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 1,15 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 1,3 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 1,4 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 1,7 (s large, 2H, RNH ₂) 2,5 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 3 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂)
47	65 %	positif	1 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 1,15-1,3 (m, 6H, CH ₂ -aliphatique) 1,4 (m, 2H, CH ₂ -aliphatique) 1,65 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,7 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 2,9 (t, 2H, CH ₂ -NR ₂) 1,7 (s large, 2H, RNH ₂)

11. Synthèse des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (48 à 55)

Nous avons repris pour effectuer ces préparations les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la synthèse du composé **36**.

Selon ce mode opératoire, nous avons préparé les analogues suivants :

- composé **48** : trifluoroacétate de 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **49** : trifluoroacétate de 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **50** : trifluoroacétate de 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **51** : trifluoroacétate de 2-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **52** : trifluoroacétate de 2-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **53** : trifluoroacétate de 2-[5-aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **54** : trifluoroacétate de 2-[6-aminohexyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide,
- Composé **55** : trifluoroacétate de 2-[7-aminoheptyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide.

TROISIÈME PARTIE

**Définition d'une structure
bisubstrat potentielle susceptible
de fixation sur le site ATP et
sur le site substrat de la PKC**

I. DÉFINITION D'UN MODÈLE SUSCEPTIBLE DE SE FIXER SUR LE SITE ATP DE L'ENZYME

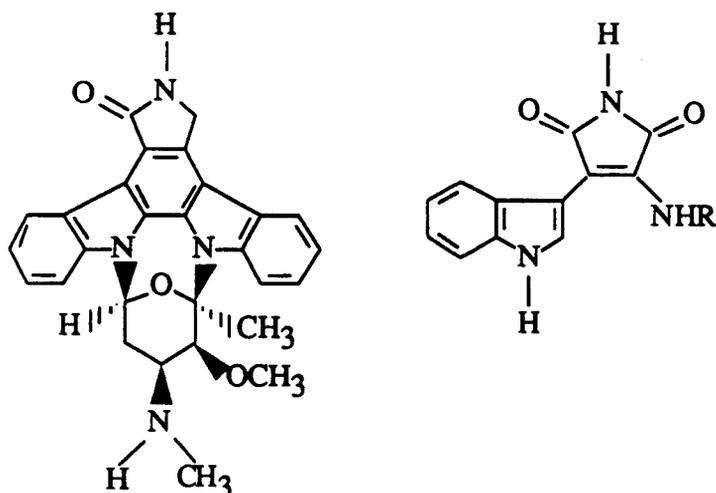


Figure 43 : composés 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide et staurosporine

Pour élaborer une structure entrant directement en compétition avec l'ATP qui soit spécifique PKC, nous avons repris le modèle de la staurosporine dans lequel le second noyau indole a été substitué par une chaîne aminée.

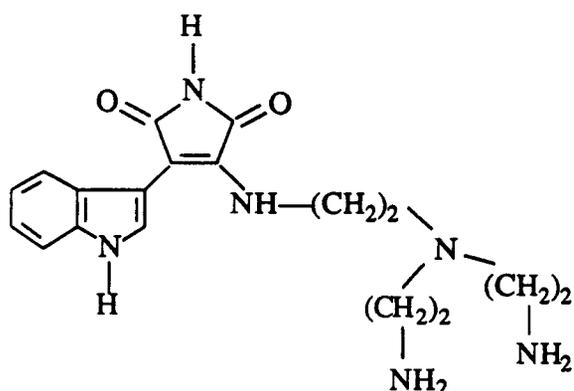
Cette chaîne aminée serait susceptible, d'une part, de renforcer l'affinité au niveau d'un site putatif carboxylate de l'enzyme et d'autre part, de permettre la réalisation de structures bisubstrat grâce à l'introduction d'une séquence peptidique spécifique PKC, capable de se fixer sur le site substrat de l'enzyme.

Comme chaînon aminé, nous avons d'abord choisi la tris-2(aminoéthyl)amine : composé 36, l'éthylène diamine : composé 48 et la 3-diméthylaminopropylamine : composé 49.

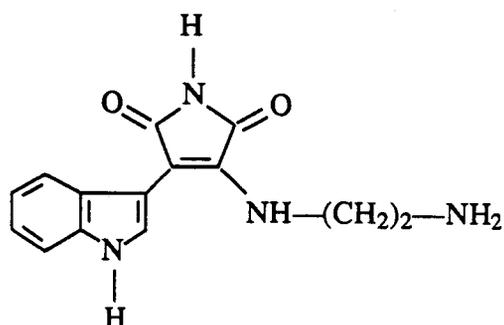
Nous avons également synthétisé le composé 50 présentant la tryptamine comme chaînon aminé afin d'évaluer l'influence de la position du noyau indole sur l'activité inhibitrice.

La préparation de ces produits est détaillée dans le paragraphe II.10. de la deuxième partie.

1. Trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 36 et trifluoroacétate de 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 48



36

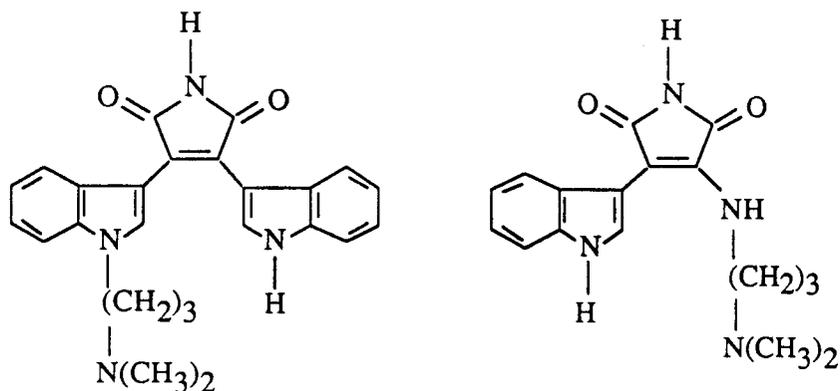


48

La tris-2(aminoéthyl)amine et l'éthylène diamine permettent par la présence de leurs fonctions amines primaires libres réactives :

- d'introduire un chaînon basique susceptible de se fixer sur un site putatif carboxylate de l'enzyme.
- de greffer, si nécessaire, un acide aminé ou une séquence peptidique dans le but de synthétiser des inhibiteurs bisubstrat.

3. Trifluoroacétate de 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl] amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 49



GF 109203X

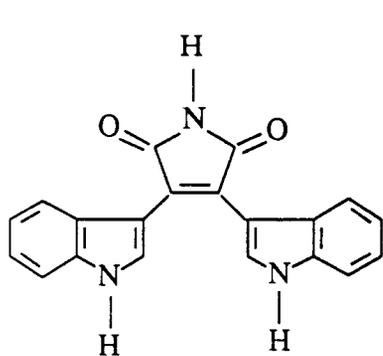
49

GF 109203X synthétisé par les laboratoires GLAXO inhibe l'activité de la PKC exclusivement contre le site de liaison de l'ATP avec un K_i de 14 nM (première partie, paragraphe 3.). La forte activité de ce dérivé est liée à la présence du groupement 3-diméthylaminopropyle sur l'un des deux noyaux indoles. Pour vérifier l'importance de cet enchaînement dans l'activité inhibitrice, nous avons introduit sur notre structure monoindolylmaléimide, la 3-diméthylaminopropylamine.

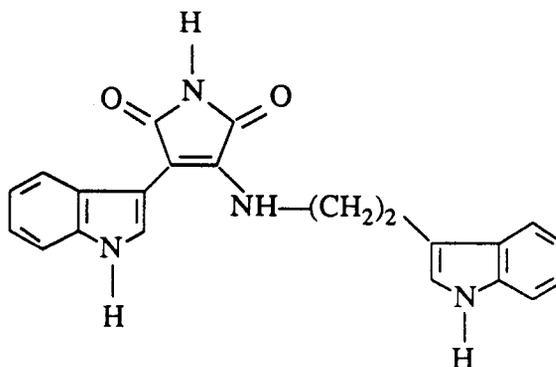
L'introduction de cette 3-diméthylaminopropylamine pouvait permettre :

- de juger si la présence des deux noyaux indoles est indispensable pour l'activité inhibitrice.
- d'évaluer l'influence de la position de la 3-diméthylaminopropylamine sur l'activité inhibitrice.

2. Trifluoroacétate de 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 50



2,3-bis-indolylmaléimide



50

P. D. DAVIS a montré que le 2,3-bis-indolylmaléimide (Ro 31-6233) est un très bon inhibiteur de la PKC avec une IC₅₀ de 0,1 μ M.

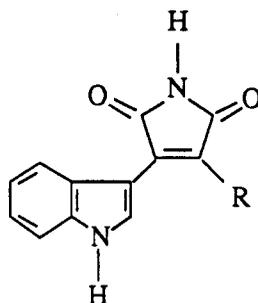
Nous avons préparé le dérivé **50** analogue au Ro 31-6233 dans lequel le second noyau indole était substitué par la tryptamine.

- L'introduction de la tryptamine pouvait permettre d'évaluer l'influence de la position du noyau indole sur l'activité inhibitrice.

4. Tests d'inhibition des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (36, 48, 49 et 50)

Leur activité inhibitrice a été testée vis à vis de la PKC et de la PKA en présence de leurs substrats respectifs (histone H1S et histones H2A). Les IC₅₀ obtenues sont données dans le tableau suivant :

Tableau 21 : inhibition des protéines Ser/Thr kinases par les composés 36, 48, 49 et 50



Composés	R	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)
36	NH-(CH ₂) ₂ -N((CH ₂) ₂ -NH ₂) ₂	25	175
48	NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	90	100
49	NH-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	125	350
50	NH-(CH ₂) ₂ -indole	inactif	inactif
Ro 31-6233		0,1	2
GF 109203X		0,01	2

Le dérivé 50 préparé est inactif sur les deux kinases. Le fait de remplacer le second noyau indole du Ro 31-6233 par la tryptamine supprime donc toute activité inhibitrice. Ceci confirme l'importance des noyaux indoles dans l'activité des inhibiteurs 2,3-bis-indolylnaléimide.

Néanmoins, la substitution du second noyau indole du Ro 31-6233 par la 3-diméthylaminopropylamine, l'éthylène diamine ou la tris-2-(aminoéthyl)amine pour fournir les dérivés **49**, **48** et **36** est beaucoup moins néfaste sur l'activité puisque ces composés montrent un pouvoir inhibiteur vis à vis de ces kinases.

Nous remarquons une très nette différence d'activité entre le composé **36** et les dérivés **48** et **49**.

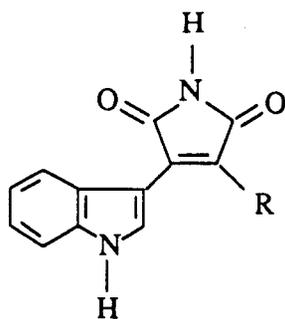
Le dérivé **49** diffère du GF 109203X par la perte du second noyau indole et par le changement de position du groupement 3-diméthylaminopropylamine. Ces modifications structurales entraînent une chute importante d'activité. En effet, il présente une activité inhibitrice 12500 fois inférieure pour la PKC avec une IC₅₀ de 125 µM et 175 fois inférieure pour la PKA avec une IC₅₀ de 350 µM.

Le dérivé **48** s'est révélé également très mauvais inhibiteur pour la PKC. Il présente en effet une IC₅₀ de 90 µM vis à vis de la PKC et de 100 µM vis à vis de la PKA.

Le composé **36**, s'est avéré, quant à lui, assez bon inhibiteur de la PKC (IC₅₀ = 25 µM), présentant de plus une certaine sélectivité vis à vis de la PKA (IC₅₀ = 175 µM). Comparé au dérivé **27** (deuxième partie, paragraphe 6), la simple disparition du groupement méthyle du noyau maléimide accroît l'activité d'un facteur 4. La nécessité d'une fonction amide observée pour la staurosporine ou les composés de type 2,3-bis-indolylmaléimide est retrouvée ici pour les 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide. Néanmoins, l'inhibition observée par nos dérivés était inférieure à celle attendue. En effet, la perte du groupement méthyle dans les 2,3-bis-indolylmaléimide accroît l'activité d'un facteur 500.

La substitution des deux hydrogènes de la fonction amine primaire du dérivé **48** par le groupement bis(aminoéthyle) accroît l'activité d'un facteur 4. L'introduction de la tris-2-(aminoéthyl)amine se traduit donc par un accroissement d'affinité et de spécificité pour la PKC suggérant ainsi que les fonctions amines primaires interagissent favorablement avec l'enzyme. Il est donc possible que ce dérivé, par le fait de la présence des deux fonctions amines primaires et de leur flexibilité, reconnaisse un site carboxylate de l'enzyme.

D'après ces résultats, nous avons entrepris la synthèse de nouveaux dérivés analogues au composé **36**, susceptibles d'interagir avec ce site putatif carboxylate de l'enzyme.



R : diéthylène diamine : composé **51**

R : bis-(3-aminopropyl)amine : composé **52**

R : 1,5 diaminopentane : composé **53**

R : 1,6 diaminohexane : composé **54**

R : 1,7 diaminoheptane : composé **55**

Les produits **51** et **52** analogues au dérivé **36** dans lequel la tris-2-(aminoéthyl)amine a été substituée par la diéthylène diamine et la bis(3-aminopropylamine) respectivement ont été préparés.

La perte du groupement aminoéthyle permettait d'étudier son influence sur l'activité inhibitrice.

La substitution de l'amine secondaire présente dans les composés **51** et **52** par un groupement méthylène pour donner les dérivés **53** et **55** pouvait permettre d'évaluer l'influence de cette amine secondaire sur l'activité inhibitrice.

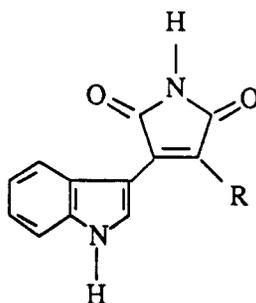
Nous avons également synthétisé le composé **54** présentant le 1,6 diaminohexane comme chaînon aminé.

La préparation des produits **51** à **55** est détaillée dans le paragraphe II. 10. de la deuxième partie.

5. Tests d'inhibition des trifluoroacétates de 2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (**51** à **55**)

Les IC₅₀ obtenues sont données dans le tableau suivant :

Tableau 22 : inhibition des protéines Ser/Thr kinases par les composés **51** à **55**



Composés	R	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)
36	NH-(CH ₂) ₂ -N((CH ₂) ₂ -NH ₂) ₂	25	175
51	NH-(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	120	310
52	NH-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₃ -NH ₂	100	390
53	NH-(CH ₂) ₅ -NH ₂	8	300
54	NH-(CH ₂) ₆ -NH ₂	40	50
55	NH-(CH ₂) ₇ -NH ₂	5	150

Nous remarquons une très nette différence d'activité entre le composé **36** et les dérivés **51** et **52**.

Quelle que soit l'enzyme, les inhibiteurs **51** et **52** sont très peu actifs et leur IC₅₀ est toujours supérieure à 100 μM. La disparition du groupement aminoéthyle présent dans la structure du composé **36** diminue l'activité inhibitrice d'un facteur 5. Ce radical semble donc régir l'affinité et la spécificité pour la PKC.

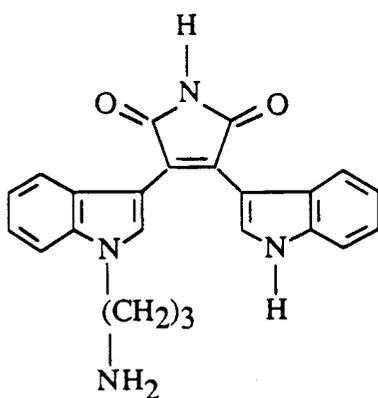
En revanche, les dérivés **53** et **55** se sont révélés très bons inhibiteurs de la PKC avec des IC₅₀ de 8 μM et de 5 μM respectivement. Ces deux inhibiteurs montrent un fort degré de sélectivité pour la PKC. En effet, les concentrations nécessaires pour inhiber la PKA sont au moins 35 fois supérieures à celles utilisées pour la PKC.

Contrairement à ce qui a pu être observé pour les inhibiteurs **53** et **55** et de façon assez surprenante, le composé **54** possédant un chaînon aminé à 6 carbones est beaucoup

moins actif pour la PKC. Il présente en effet une IC_{50} de 40 μM vis à vis de la PKC et de 50 μM vis à vis de la PKA.

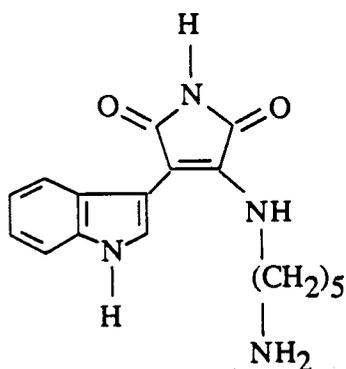
En conclusion, parmi toutes les polyamines introduites sur notre structure monoindolylmaléimide, les composés les plus intéressants étaient les inhibiteurs **53** et **55**. Outre leur bonne affinité, ils offrent une bonne spécificité pour la PKC.

6. Introduction d'un groupement guanidinium sur l'inhibiteur **53**



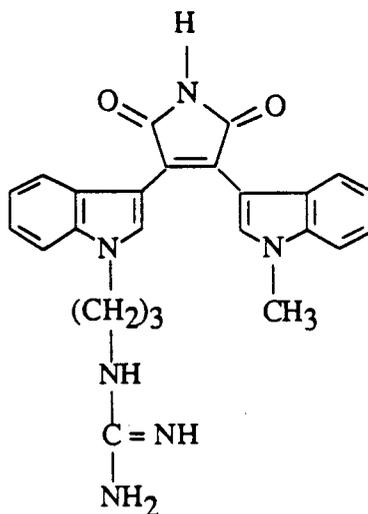
Ro 31-7549

IC_{50} PKC = 0,075 μM



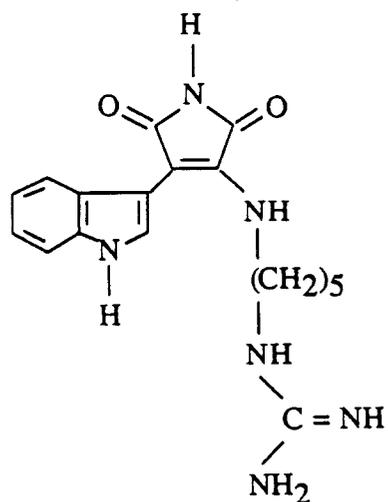
Composé **53**

IC_{50} = 8 μM



2-[1-(3-guanidinopropyl)indol-3-yl]-3-[1-méthyl-indol-3-yl]maléimide

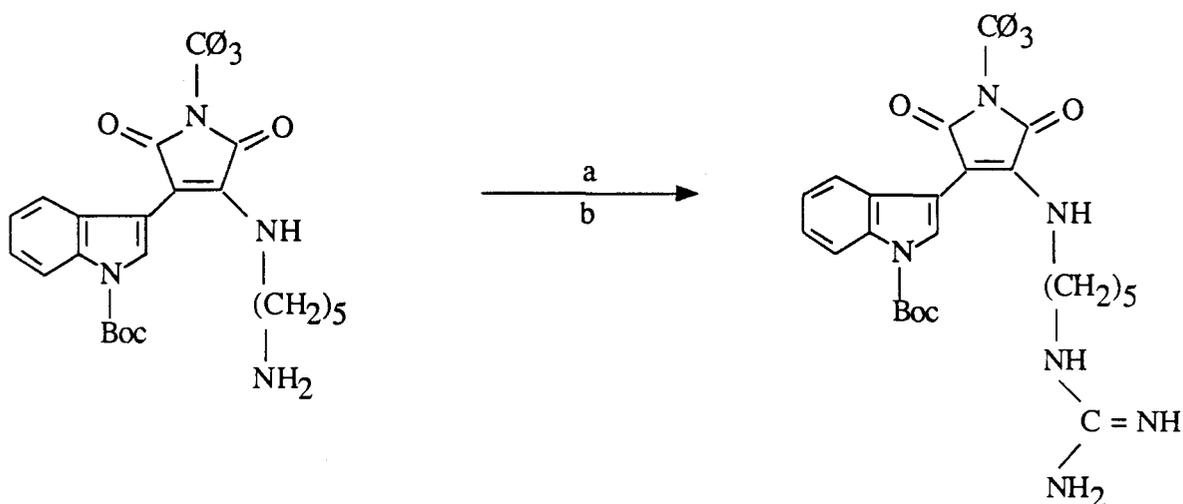
IC_{50} PKC = 0,019 μM



Le 2-[1-(3-guanidinopropyl)indol-3-yl]-3-[1-méthyl-indol-3-yl]maléimide présentant un groupement guanidinium montre un pouvoir inhibiteur amélioré par rapport au composé parent Ro 31-7549 possédant une fonction amine primaire [première partie ; paragraphe 3.]. L'augmentation d'activité peut s'expliquer par le fait que le groupement guanidinium est le partenaire idéal pour la reconnaissance d'un site carboxylate.

Le composé **53** étant l'inhibiteur le plus actif et le plus sélectif de notre série, nous avons tenté de coupler à ce dérivé le groupement guanidinium afin d'en accroître l'affinité et la spécificité pour la PKC.

6.1. Synthèse du 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1-tert.butyl-oxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 60



- a) 3,5-diméthylpyrazole-1-carboxamide nitrate, sodium bicarbonate
 b) éthanol

La synthèse de ce nouveau dérivé est réalisée selon la méthode de P. D. DAVIS [DAVIS 1992]. Ce procédé consiste à porter à reflux un mélange du dérivé **45** (1 équivalent), de 3,5-diméthylpyrazole-1-carboxamide nitrate (1,5 équivalents) et de carbonate de sodium dans l'éthanol pendant 16 heures. On obtient, après purification par CCE, un produit (rendement = 90 %) qui ne présente pas les caractéristiques spectroscopiques du dérivé attendu. En effet, dans le spectre de masse réalisé selon la technique de FAB (+) (figure 44), le pic à 697 correspondant à [l'ion moléculaire (M) + H]⁺ n'est pas visible, en revanche un pic à 597 correspondant à [M - Boc + H]⁺ a pu être observé. L'examen de ce spectre montre qu'il s'agit du 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide correspondant à la perte du groupement tert.butyl-oxycarbone lors de la réaction.

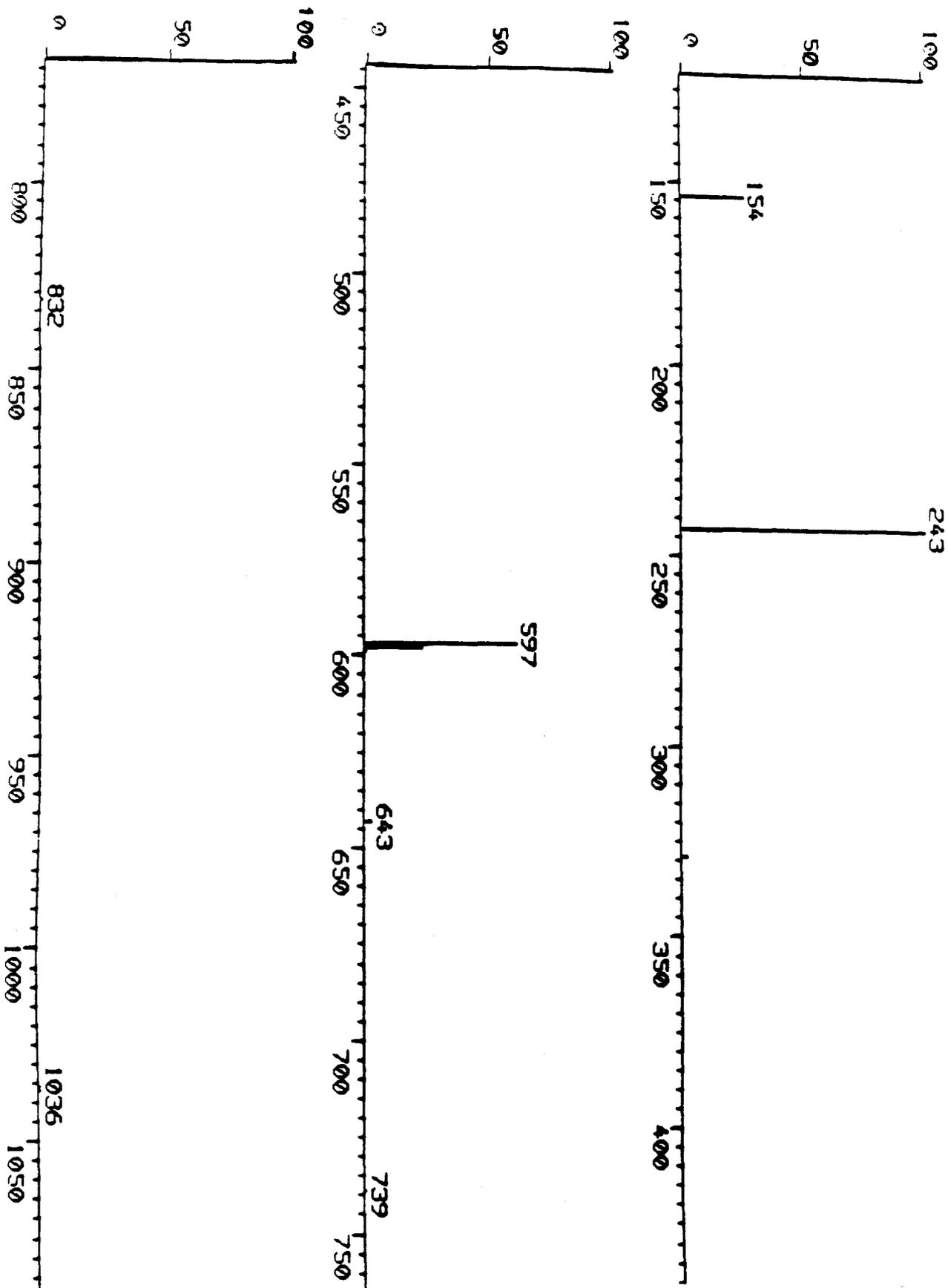
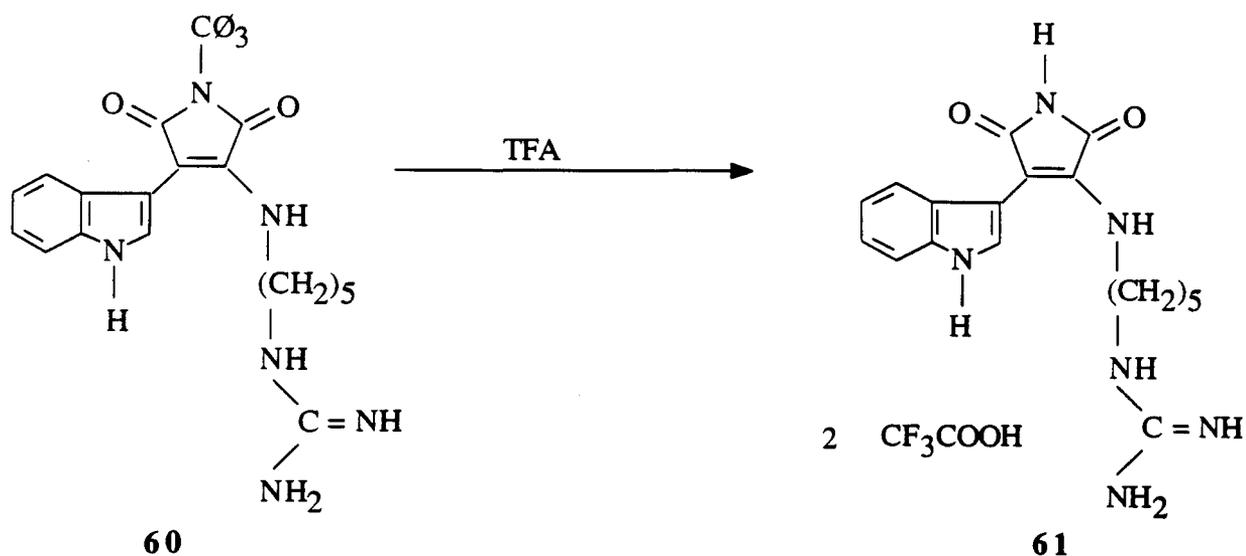


Figure 44 : spectre de masse (FAB) du 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide

6.2. Synthèse du trifluoroacétate de 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 61



La déprotection du groupement trityle du 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide a été réalisée selon le même mode opératoire que pour le composé **36** à savoir par action de l'acide trifluoroacétique à température ambiante pendant 2 heures. Malheureusement, l'examen du dérivé ainsi obtenu en CCM et en spectrométrie de masse (figure 45) a montré que le produit s'était dégradé lors de la déprotection acide finale.

- l'examen de la CCM a montré de nombreuses taches absorbant dans l'UV.
- Le pic à 335 correspondant à l'ion moléculaire n'était pas visible dans le spectre de masse réalisé selon la technique de FAB (+) (figure 45).

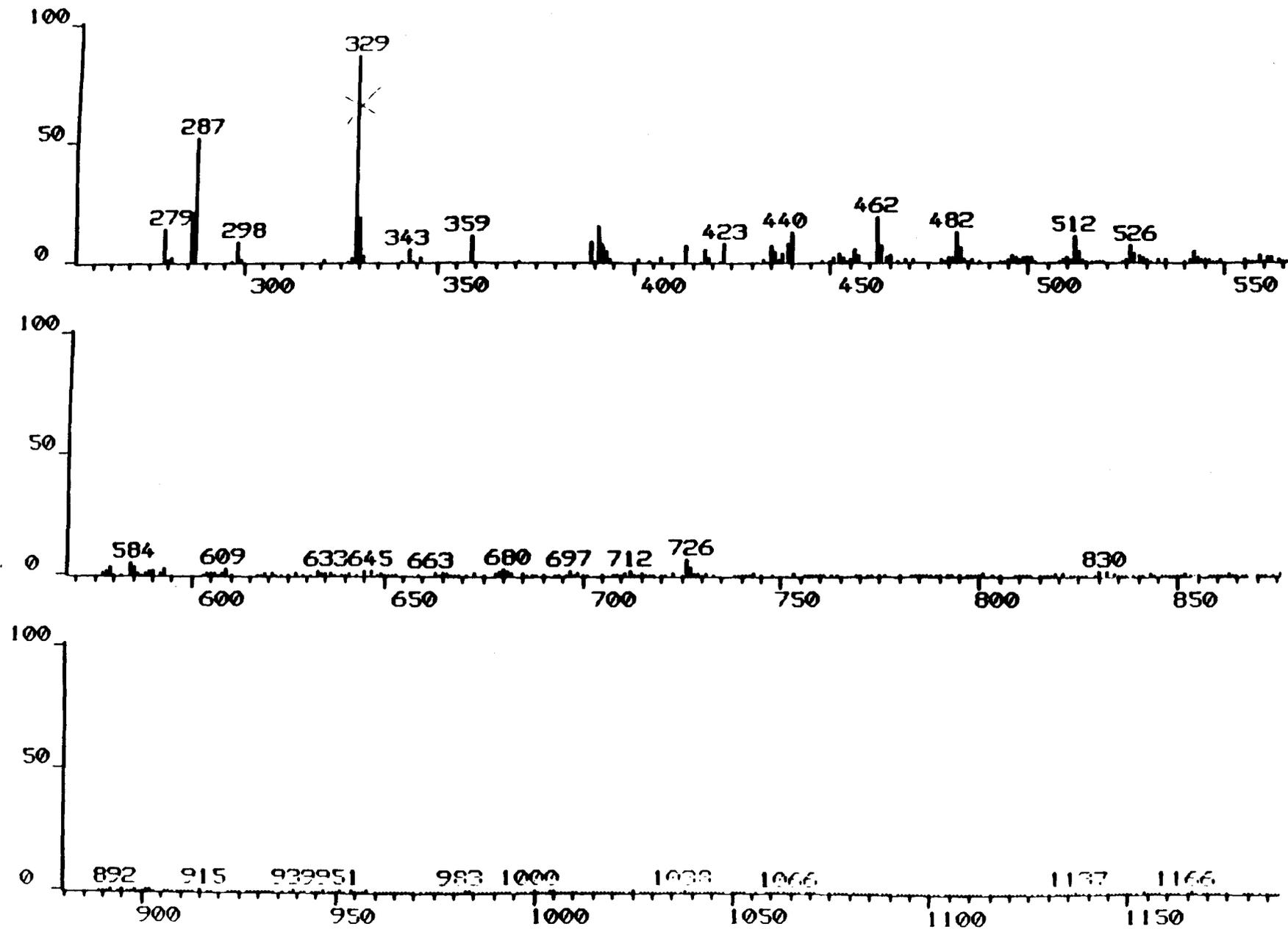
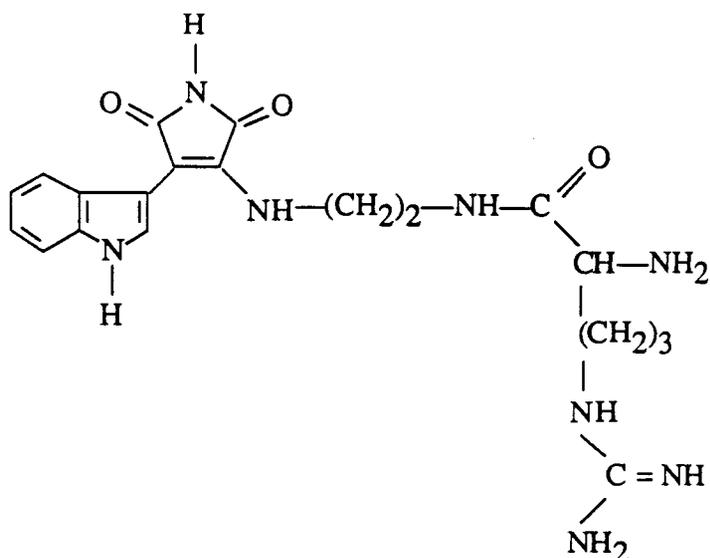


Figure 45 : spectre de masse (FAB) du composé 60 dégradé

6.3. Synthèse du trifluoroacétate de 2-[2-arginylamidoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 59



Composé **59** : trifluoroacétate de 2-[2-arginylamidoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (3 CF₃COOH).

Pour introduire assez facilement un groupement guanidinium susceptible d'accéder au site de liaison de l'amine primaire du composé **53**, nous avons choisi de coupler le composé **40** possédant un reste éthylène diamine à la Fmoc-Arg(Pmc)-OH.

6.3.1. Pouvoir inhibiteur du dérivé **59**

Le dérivé **59** s'est révélé un très mauvais inhibiteur de la PKC. Il présente en effet une IC₅₀ de 155 μM vis à vis de la PKC et de 140 μM vis à vis de la PKA.

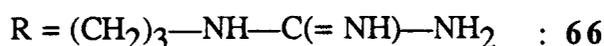
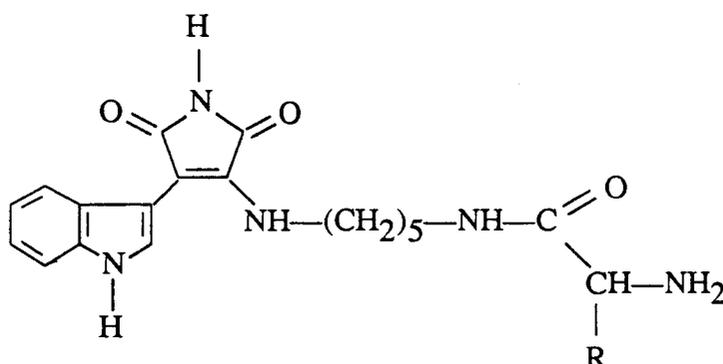
La substitution des deux hydrogènes de la fonction amine primaire du dérivé **48** par l'arginine fait chuter l'IC₅₀ d'un facteur 1,7. L'introduction d'une arginine n'a donc pas d'influence intéressante sur l'activité.

II. EBAUCHE D'UNE STRUCTURE BISUBSTRAT

Avant d'introduire sur notre mime ATP une séquence peptidique spécifique PKC répondant aux critères de reconnaissance par la PKC dans le but d'obtenir des structures bisubstrat, nous nous sommes proposés, dans un premier temps, de greffer un acide aminé de nature variable sur l'inhibiteur le plus actif et le plus sélectif de la série afin de connaître l'ébauche peptidique la plus favorable.

Nous venons de voir dans la première partie de notre étude que l'inhibiteur le plus intéressant de la série était le dérivé **53** ayant le 1,5 diaminopentane comme chaînon aminé.

Comme acide aminé, l'arginine a été choisie pour son caractère basique : dérivé **66**, l'acide glutamique pour son caractère acide : dérivé **68** et la phénylalanine pour son caractère hydrophobe : dérivé **69**.



Composé **66** : trifluoroacétate de 2-[5-arginylamidopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (3 CF₃COOH),

Composé **68** : trifluoroacétate de 2-[5-glutamylamidopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (2 CF₃COOH),

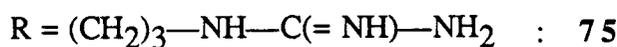
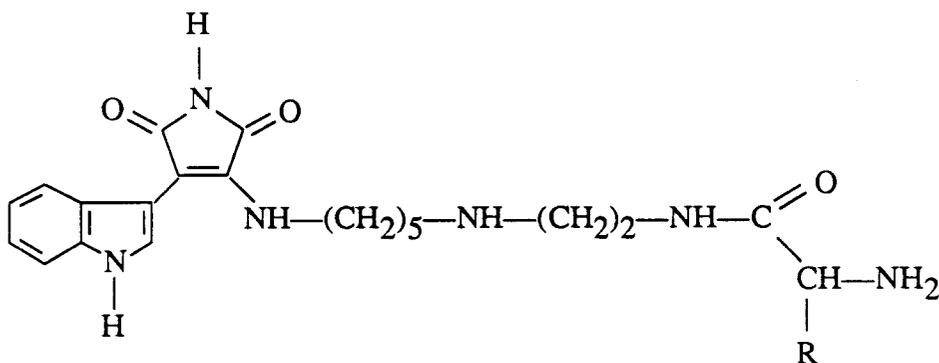
Composé **69** : trifluoroacétate de 2-[5-phénylalaninylamidopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (2 CF₃COOH)

La comparaison des résultats obtenus (troisième partie, paragraphe II. 4.) devait nous permettre à ce premier niveau :

- de déduire le caractère de l'environnement pour la PKC,
- de savoir si la fonction amine (mono ou disubstituée) était indispensable pour l'activité inhibitrice ou si la seule présence du groupement NH participant à une liaison peptidique était suffisante.

Le pouvoir inhibiteur du dérivé **53** pouvant être dû à la présence de l'amine primaire, et le couplage de cette fonction avec l'acide carboxylique des différents acides aminés fournissant une liaison amide, on pouvait alors s'attendre à une disparition de l'activité. Pour conserver une fonction amine dans nos couplages, nous avons donc introduit par une réaction de substitution nucléophile la 2-bromoéthylamine menant au dérivé **70**.

L'amine primaire terminale du composé **70** permettait de coupler à nouveau l'arginine : dérivé **75**, l'acide glutamique : dérivé **75 bis** et la phénylalanine : dérivé **76**.



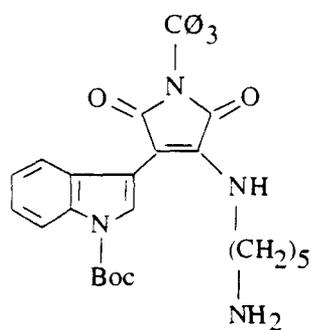
Composé **75** : trifluoroacétate de 2-[5-(N-2-arginylamidoéthyl)amino pentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (4 CF₃COOH),
(NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂NH-Arg)

Composé **75 bis** : trifluoroacétate de 2-[5-(N-2-glutamylamidoéthyl)amino pentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide (3 CF₃COOH),
(NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂NH-Glu)

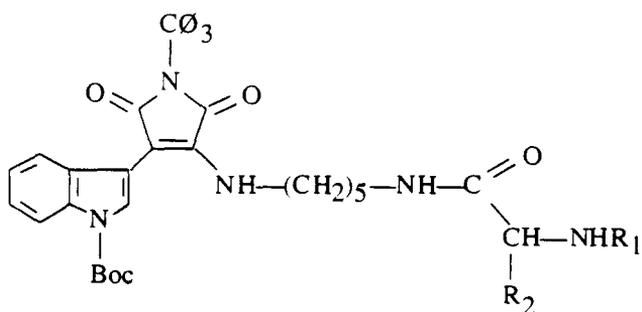
Composé **76** : trifluoroacétate de 2-[5-(2-phénylalaninylamidoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-maléimide (3 CF₃COOH).
(NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂NH-Phe)

Les composés **66**, **68**, **69**, **75**, **75 bis** et **76** sont obtenus de la manière suivante (tableaux synoptiques 5 et 6).

Tableau synoptique 5 : voie de synthèse pour préparer les composés **66**, **68** et **69**



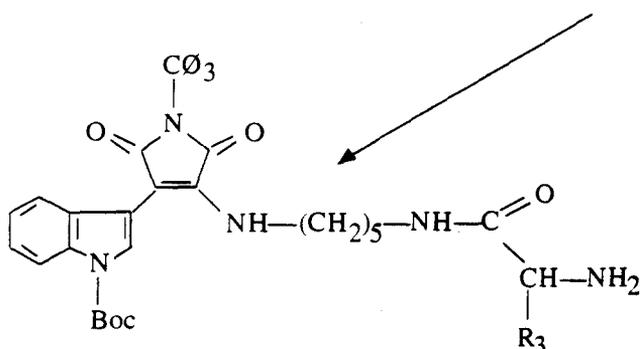
45



Composé **62** : $R_1 = \text{Fmoc}$ et $R_2 = (\text{CH}_2)_3\text{—NH—C(=NH)—NHPmc}$

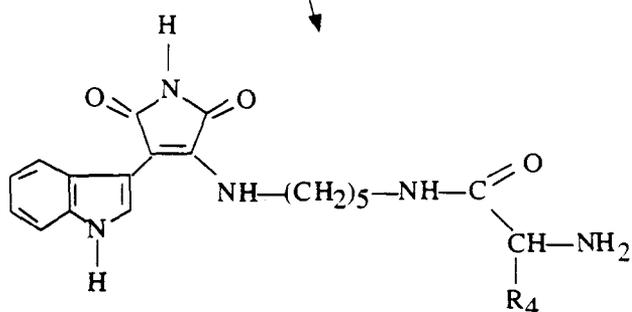
Composé **63** : $R_1 = \text{Fmoc}$ et $R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{—COOtBu}$

Composé **64** : $R_1 = \text{Boc}$ et $R_2 = \text{CH}_2\text{—C}_6\text{H}_5$

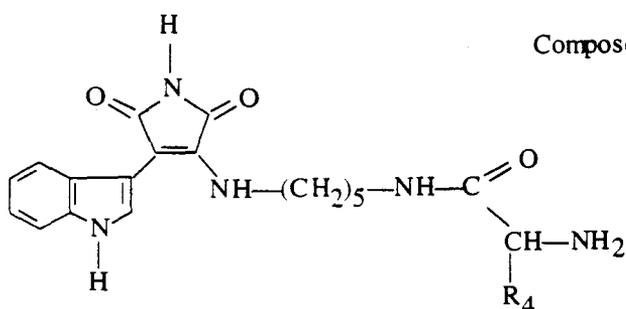


Composé **65** : $R_3 = (\text{CH}_2)_3\text{—NH—C(=NH)—NHPmc}$

Composé **67** : $R_3 = (\text{CH}_2)_2\text{—COOtBu}$



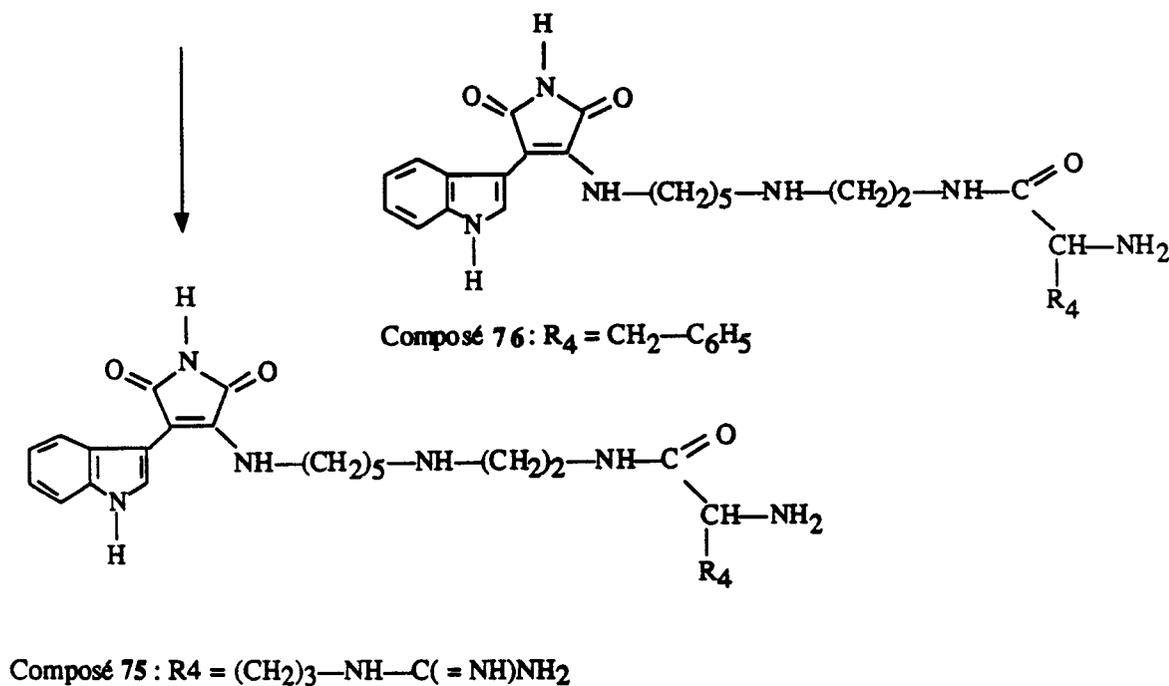
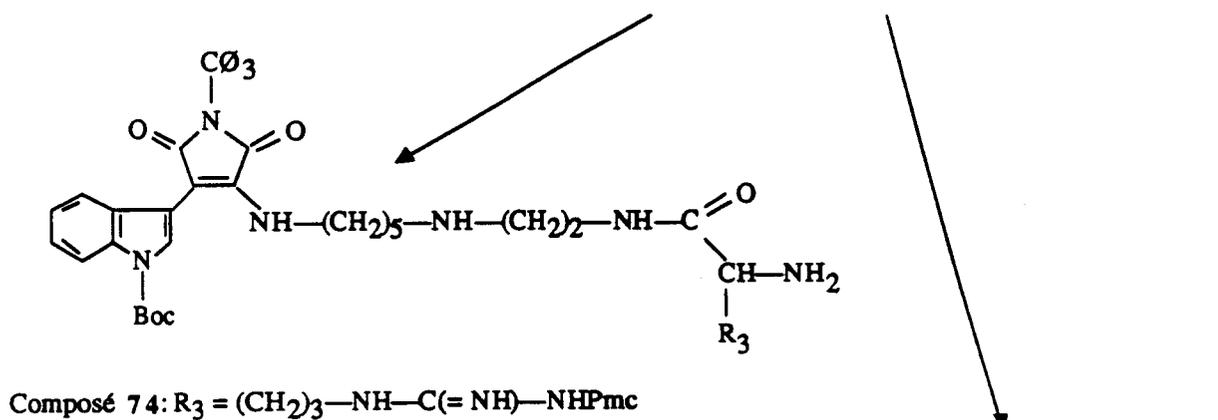
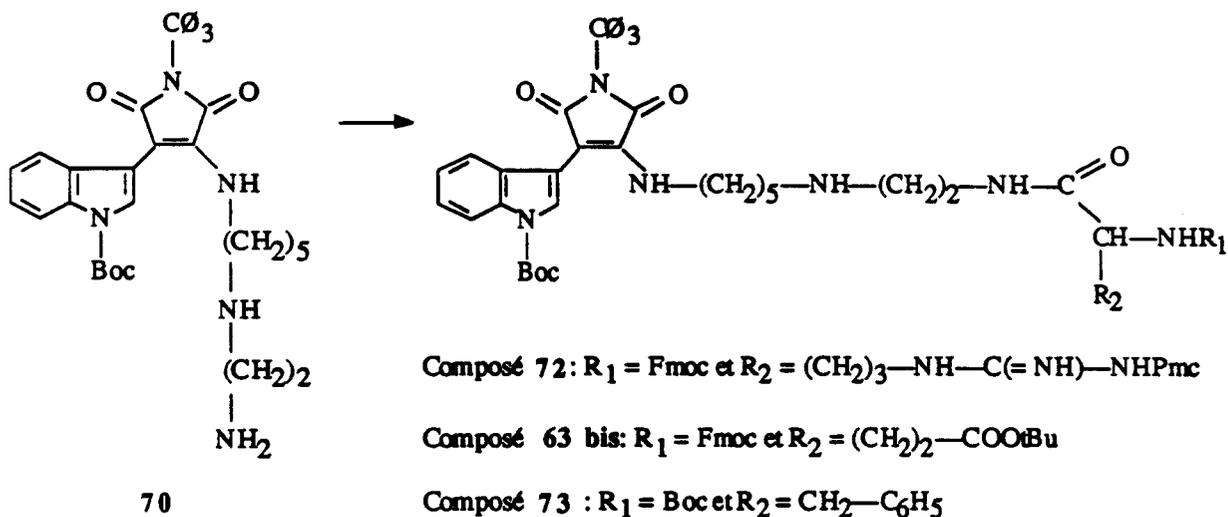
Composé **69** : $R_4 = \text{CH}_2\text{—C}_6\text{H}_5$



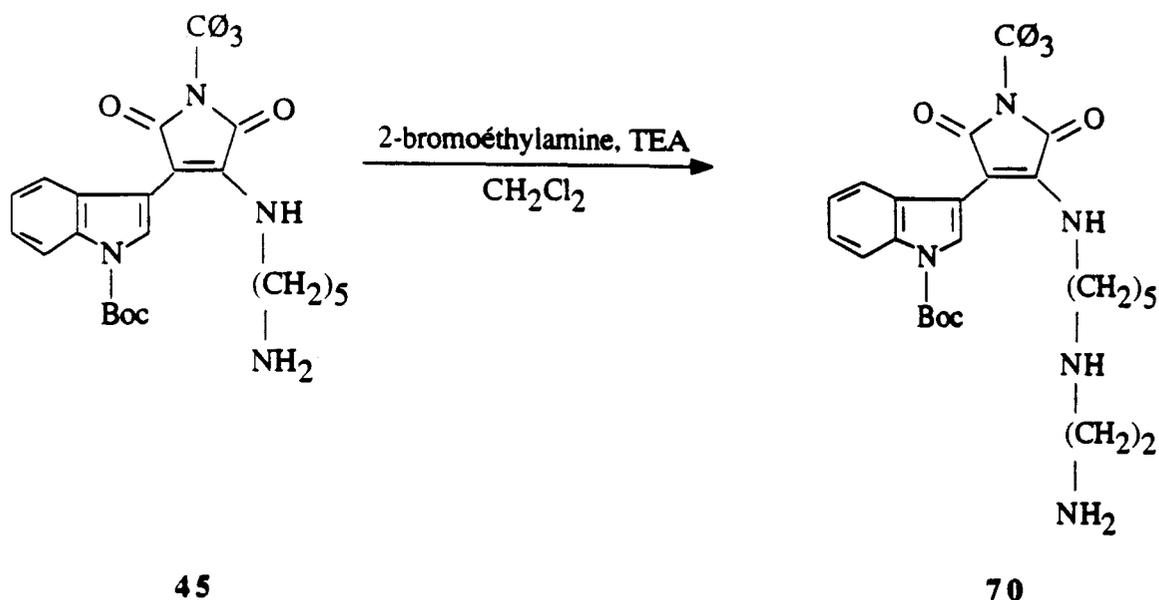
Composé **66** : $R_4 = (\text{CH}_2)_3\text{—NH—C(=NH)—NH}_2$

Composé **68** : $R_4 = (\text{CH}_2)_2\text{—COOH}$

Tableau synoptique 6 : voie de synthèse pour préparer les composés 75 et 76



1. Synthèse du 2-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 70



Le composé **45** est traité par le dérivé 2-bromoéthylamine, bromhydrate dans le chlorure de méthylène en présence de triéthylamine. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 15 heures à température ambiante. Il est nécessaire d'utiliser un mélange stoechiométrique de 2-bromoéthylamine, bromhydrate et du dérivé **45** pour éviter l'alkylation de l'amine primaire conduisant à la formation d'un sel d'ammonium.

La triéthylamine en excès (4 équivalents) permet :

- de fixer l'acide bromhydrique du dérivé 2-bromoéthylamine, bromhydrate,
- de piéger l'acide chlorhydrique libéré lors de la réaction.

Après purification sur CCE, le composé **70** est obtenu à l'état pur avec un rendement de 50 %. Au lieu de modifier les conditions de réaction : durée, solvant, réactifs afin d'optimiser le rendement de cette réaction, nous avons préféré recycler le produit de départ. Pour cela, le milieu réactionnel est purifié par CCE avec l'éluant suivant : acétone-éther de pétrole-NH₄OH (59-39-2 v/v) permettant ainsi de récupérer à la fois le produit de départ qui n'a pas réagi et le produit d'arrivée.

2. Addition d'un acide aminé de nature variable (Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH et Boc-Phe-OH sur le composé 45 : produits 62, 63 et 64 et sur le composé 70 : produits 72, 63 bis et 73

2.1. Synthèse des composés 2-[5-N α Boc-phénylalaninylamido pentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-trityl maléimide : 64 (NH-(CH₂)₅-NH-Phe(Boc)) et 2-[5-(N-2-N α Boc-phénylalaninylamido éthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 73 (NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂-NH-Phe(Boc))

L'acide carboxylique de la phénylalanine est couplé à la fonction amine primaire réactive des composés 45 et 70 par la méthode de couplage DCC/HOBt.

Les groupements protecteurs trityle et tert.butylloxycarbonyle étant clivables en milieu acide, nous avons protégé la fonction alpha-aminée de la phénylalanine par le groupement tert.butylloxycarbonyle. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 12 heures à 0°C. Le couplage est réalisé dans le mélange chlorure de méthylène-tétrahydrofurane (95-5 (v/v)) ; le THF permet quant à lui, de dissoudre l'HOBt. Après filtration de la dicyclohexylurée (DCU), sous-produit de la réaction, les dérivés 64 et 73 sont obtenus à l'état pur après purification par CCE avec un rendement de 65 % et de 30 % respectivement. La réaction est contrôlée par CCM par le réactif de Reindel-Hoppe.

2.2. Synthèse des composés 57, 62, 63, 63 bis et 72

Nous avons repris pour effectuer ces préparations les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la préparation des composés 64 et 73.

Selon ce mode opératoire, nous avons préparé les analogues suivants :

Composé 57 : (NH-(CH ₂) ₂ -NH-Arg(Pmc)Fmoc)	2-[2-N α Fmoc N ϵ Pmc-arginylamidoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide,
Composé 62 : (NH-(CH ₂) ₅ -NH-Arg(Pmc)Fmoc)	2-[5-N α Fmoc N ϵ Pmc-arginylamidopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide,
Composé 63 : (NH-(CH ₂) ₅ -NH-Glu(OtBu)Fmoc)	2-[5-N α Fmoc γ Tu-glutamylamidopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide
Composé 63 bis : (NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-Glu(OtBu)Fmoc)	2-[5-(2-N α Fmoc γ Tu-glutamylamidoéthyl)amino pentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide,
Composé 72 : (NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-Arg(Pmc)Fmoc)	2-[5-(N-2-N α Fmoc N ϵ Pmc-arginylamidoéthyl)amino pentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide.

Les fonctions alpha-aminée de l'arginine et de l'acide glutamique sont protégées par le groupement 9-fluorénylméthylloxycarbonyle ou Fmoc qui fournit une liaison uréthane sensible aux bases faibles.

La fonction guanidine de l'arginine est protégée par le groupement 2, 2, 5, 7, 8 pentaméthylchroman-6-sulfonyle ou Pmc clivable en milieu acide.

La fonction acide carboxylique latérale de l'acide glutamique est protégée par le groupement tert.butyle ou tBu éliminable lors de la déprotection acide finale.

Après purification par CCE, les dérivés **57**, **62**, **63** et **72** sont obtenus à l'état pur sous forme de cristaux. Leur structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

Malheureusement, nous n'avons pu coupler le dérivé Fmoc-Glu(OtBu)-OH à la fonction amine primaire du dérivé **70** pour fournir le dérivé **63 bis** alors que cette réaction s'avère satisfaisante dans les synthèses précédemment décrites. Les différents essais réalisés en faisant varier les conditions de réaction : durée, température et agents de couplage se sont tous révélés infructueux ; le produit majeur formé se décompose rapidement.

Toujours, pour introduire un acide aminé de type acide, nous avons donc tenté de coupler l'acide aminé protégé Fmoc-Asp(OtBu)-OH à la fonction amine primaire réactive du dérivé **70**. Malheureusement, comme dans le cas de l'acide glutamique, nous n'avons pu vérifié la présence du composé attendu.

Il est à noter que la préparation des composés **72** et **73** s'effectue avec des rendements beaucoup plus faibles que ceux des dérivés **62** et **64** bien que cette réaction s'effectue dans les mêmes conditions. Les rendements pour les synthèses des dérivés **62**, **63**, **63 bis**, **64**, **72** et **73** sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : rendements des composés **62**, **63**, **63 bis**, **64**, **72** et **73**

Composés	Rdt	Composés	Rdt
62	68 %	72	30 %
63	70 %	63 bis	0 %
64	65 %	73	30 %

Le faible rendement des composés **72** et **73** peut s'expliquer par le fait que le composé **70** présente par rapport au produit **45** une fonction amine secondaire libre. Celle-ci peut donner lieu à des réactions secondaires lors du couplage.

3. Synthèse des composés : 59, 66, 68, 69, 71, 75 et 76

3.1. Synthèse du composé 71 : trifluoroacétate de 2-[5-(N-2-aminoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide

Le clivage des groupements protecteurs trityle et tert.butyloxycarbonyle du dérivé 70 est réalisée comme précédemment pour fournir le produit 71.

3.2. Synthèse des composés 59 (NH-(CH₂)₂-NH-Arg), 66 (NH-(CH₂)₅-NH-Arg), 68 (NH-(CH₂)₅-NH-Glu), 69 (NH-(CH₂)₅-NH-Phe), 75 (NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂-NH-Arg) et 76 (NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂-NH-Phe)

3.2.1. Clivage du groupement Fmoc

Il est nécessaire de cliver au préalable, le groupement Fmoc des composés 57, 62, 63 et 72 pour fournir les dérivés 58, 65, 67 et 74 avant la déprotection acide finale.

Le réactif utilisé pour éliminer le groupement Fmoc est la pipéridine à 20 % dans le diméthylformamide. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 30 minutes. Le dibenzofulvène et le fulvène-pipéridine libérés lors de la réaction sont éliminés par plusieurs lavages à l'éther éthylique. La réaction est contrôlée par CCM et par le test à la ninhydrine.

3.2.2. Clivage des groupements protecteurs : Boc, tBu, Pmc et trityle

3.2.2.1. Synthèse des composés 68, 69 et 76

Nous avons repris pour effectuer la synthèse de ces différents analogues les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la préparation du composé 36.

Les composés 68, 69 et 76 sont obtenus sous forme de cristaux après précipitation dans le système TFA-éther éthylique. Leur structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

3.2.2.2. Synthèse des dérivés 59, 66 et 75

La clivage des groupements Boc, Pmc et trityle des composés 58, 65 et 74 pour fournir les produits 59, 66 et 75 est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, le groupement protecteur 2, 2, 5, 7, 8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle est éliminé par action de l'acide trifluoroacétique à 85 % pendant 90 minutes.

B. RINIKER a montré qu'en présence de l'acide aminé tryptophane, le groupement Pmc pouvait donner lieu à de nombreuses réactions secondaires en se fixant sur le noyau indole en position 2, 5 et 6. Pour éviter de telles réactions, des capteurs de carbocations

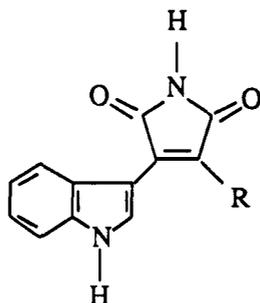
comme l'éthanedithiol et le thioanisole sont alors additionnés [RINKER]. Les réactifs utilisés pour éliminer le groupement Pmc correspondaient au mélange suivant : acide trifluoroacétique (85 %), eau (5 %), éthanedithiol (5 %) et thioanisole (5 %).

Dans ces conditions, le groupement tert.butyloxycarbone est également clivé. En revanche, la déprotection du groupement trityle n'est pas totale. Pour cliver le groupement trityle, le milieu réactionnel est donc maintenu dans l'acide trifluoroacétique à température ambiante pendant 30 minutes. Après précipitation dans le système TFA-éther éthylique, les dérivés **59**, **66** et **75** sont alors obtenus sous forme de cristaux. Leur structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

4. Tests d'inhibition des composés 66, 68, 69, 71, 75 et 76

Les IC₅₀ obtenues sont détaillées dans le tableau suivant :

Tableau 24 : inhibition des protéines Ser / Thr kinases par les composés 66, 68, 69, 71, 75 et 76



Composés	R	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)
53	NH-(CH ₂) ₅ -NH ₂	8	350
66	NH-(CH ₂) ₅ -NH-Arg	60	inactif
68	NH-(CH ₂) ₅ -NH-Glu	105	390
69	NH-(CH ₂) ₅ -NH-Phe	120	inactif
71	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	110	500
75	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-Arg	8	210
76	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-Phe	95	120

Nous remarquons une très nette différence d'activité entre le composé 53 et les dérivés 66, 68 et 69.

Nous constatons que l'activité de ces différents analogues est dépendante de la nature de l'azote substitué :

Le composé de départ 53 dont l'azote est sous forme d'amine primaire, est le plus actif avec une IC₅₀ de 8 μM pour la PKC. En revanche, l'amidification de cet azote par l'acide carboxylique de la phénylalanine, de l'acide glutamique et de l'arginine entraîne une chute

importante d'activité et de sélectivité. Les composés **66**, **68** et **69** présentent en effet des IC₅₀ de 60 μM, 105 μM et de 120 μM pour la PKC et sont inactifs vis à vis de la PKA. La substitution de l'hydrogène de la fonction amine primaire du dérivé **53** par la phénylalanine, l'acide glutamique et l'arginine diminue l'activité d'un facteur 15, 13 et 7,5 respectivement pour la PKC. Ceci confirme l'importance de la fonction amine primaire dans l'activité de l'inhibiteur **53** ; cette fonction est protonable alors qu'en revanche, dans les composés **66**, **68** et **69**, l'implication de cet azote dans une fonction amide interdit toute ionisation, ceci pouvant expliquer la faible activité observée.

Le composé **71**, permet, par la présence de ces deux fonctions amines :

- de conserver une fonction amine secondaire potentiellement protonable,
- de coupler sur la fonction amine terminale, la phénylalanine : dérivé **76** et l'arginine : dérivé **75**. Malheureusement, il a été impossible de coupler un acide aminé de type acide comme l'acide glutamique ou l'acide aspartique à la fonction amine terminale réactive du composé **70**.

Quelle que soit l'enzyme étudiée, le dérivé **71** est très peu actif et son IC₅₀ est supérieure à 100 μM. La substitution de l'hydrogène de la fonction amine primaire du dérivé **53** par le groupement aminoéthyle fait chuter l'IC₅₀ d'un facteur 13 pour la PKC. L'introduction de ce radical est donc néfaste pour l'activité.

En revanche, nous remarquons une très nette différence d'activité entre les composés **75** et **76** ; l'activité de ces analogues est dépendante de la nature de l'acide aminé couplé.

Le dérivé **76** possédant un reste phénylalanine hydrophobe est très peu actif. Il présente une IC₅₀ de 95 μM vis à vis de la PKC et de 120 μM vis à vis de la PKA.

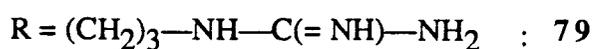
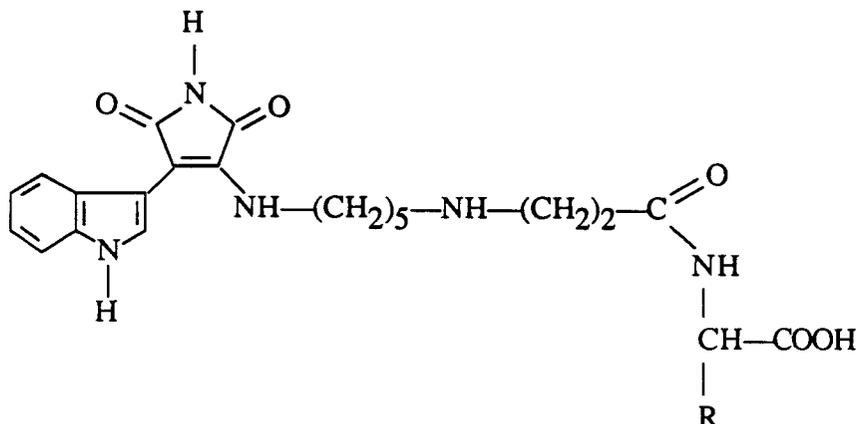
Le dérivé **75** s'est révélé, quant à lui, un très bon inhibiteur de la PKC avec une IC₅₀ de 8 μM pour la PKC. Outre sa bonne affinité, il offre une bonne spécificité pour la PKC. En effet, les concentrations nécessaires pour inhiber la PKA sont au moins 25 fois supérieures à celles utilisées pour la PKC. L'introduction de l'arginine sur le dérivé **71** semble donc convenir à l'enzyme.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes proposés de greffer sur notre mème ATP l'arginine par sa fonction alpha-aminée.

L'introduction du groupement 3-bromopropionate de méthyle sur l'inhibiteur **53** par une réaction de substitution nucléophile permet :

- de conserver une fonction amine secondaire potentiellement protonable,
- de coupler à l'acide carboxylique générée après saponification de la fonction ester, l'arginine : dérivé **79**.

Nous avons également préparé les dérivés **80** et **81** analogues au dérivé **79** dans lesquels l'arginine est remplacée respectivement par l'acide glutamique et par la phénylalanine.



Composé **79** : trifluoroacétate de $N\alpha$ -(3-(-5-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-(NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂-CO-Arg) dione pyrrol-3-ylamino)pentylamino)propanoyl)arginine (3 CF₃COOH),

Composé **80** : trifluoroacétate de l'acide $N\alpha$ -(3-(-5-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)pentylamino)propanoyl) glutamique (2 CF₃COOH),

Composé **81** : trifluoroacétate de $N\alpha$ -(3-(-5-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-(NH-(CH₂)₅-NH-(CH₂)₂-CO-Phe) dione pyrrol-3-ylamino)pentylamino)propanoyl) phénylalanine (2 CF₃COOH).

La comparaison des résultats obtenus (paragraphe II. 6.) devait nous permettre :

- de déduire le caractère de l'environnement pour la PKC,
- d'évaluer l'influence de la liaison peptidique sur l'activité inhibitrice,
- d'étudier l'influence des fonctions acide carboxylique et amine primaire sur l'activité inhibitrice.

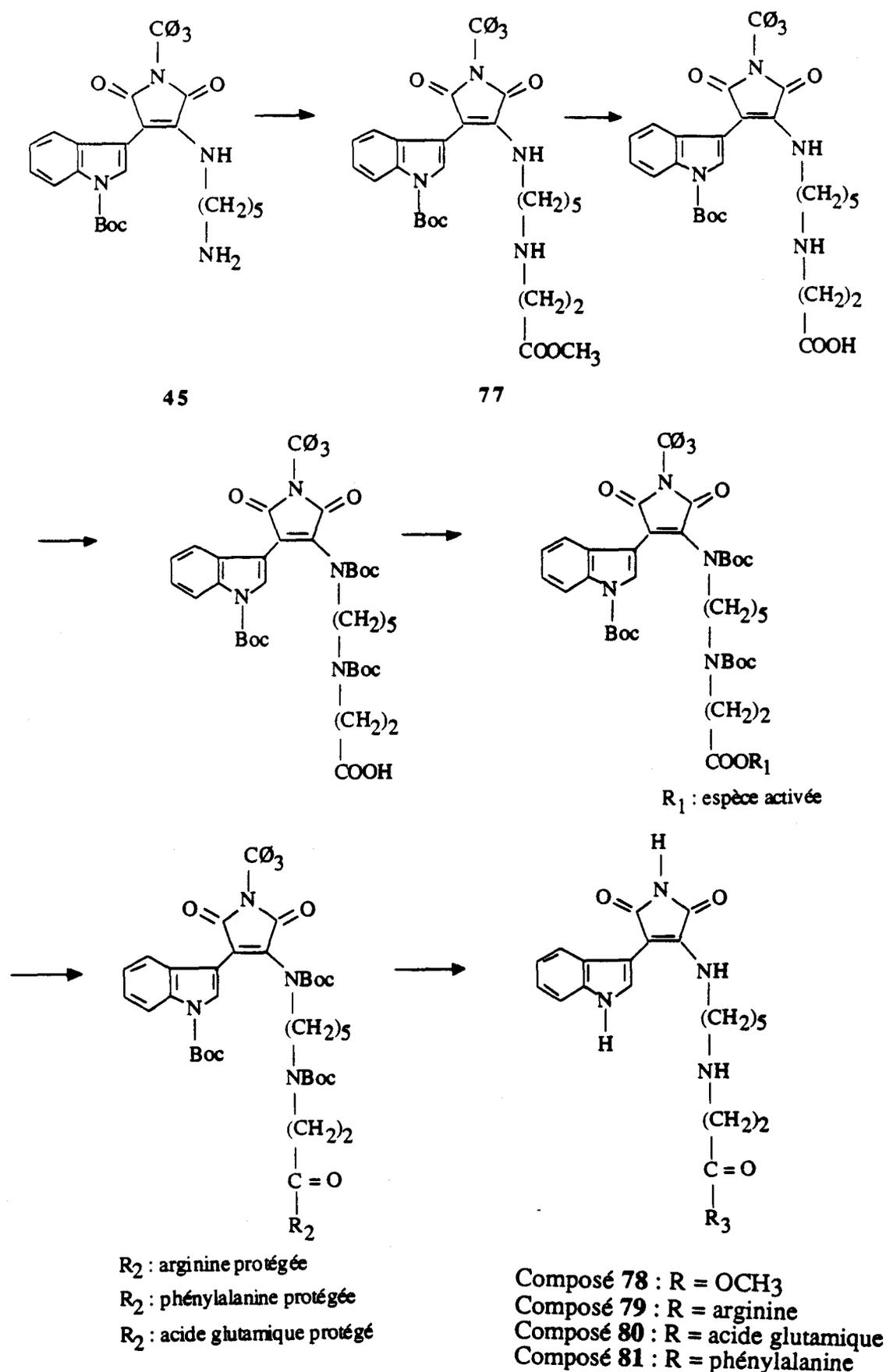
5. Synthèse des composés 79, 80 et 81

Les composés **79**, **80** et **81** peuvent être obtenus en phase homogène de la manière suivante (tableau synoptique n°7) :

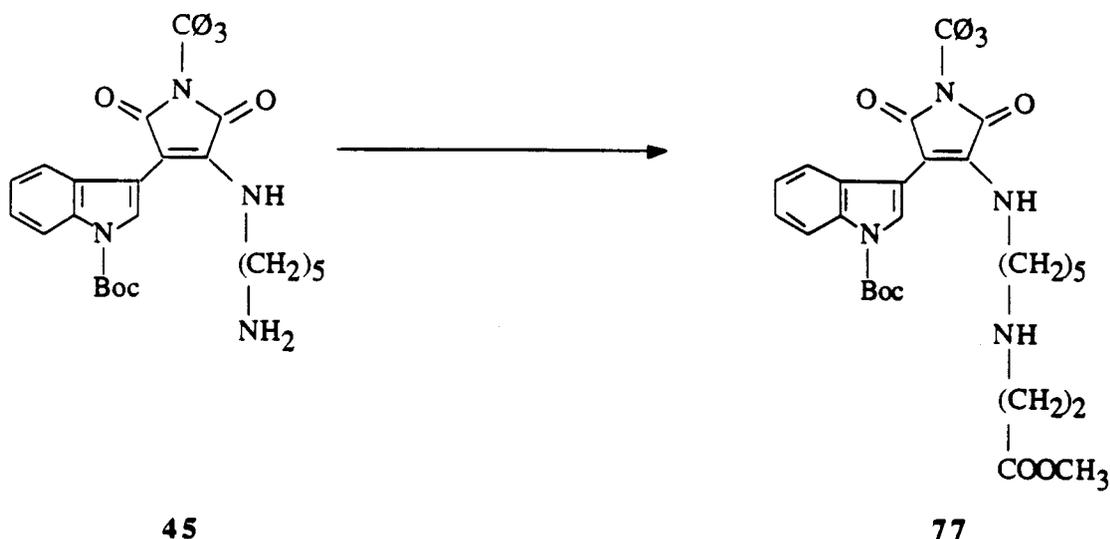
La substitution de l'atome de brome du 3-bromopropionate de méthyle par la fonction amine primaire du dérivé **45** peut se faire selon les méthodes usuelles pour fournir le 2-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : **77**. L'acide peut être obtenu à partir de cet ester par saponification avec de la soude méthanolique. Pour coupler l'arginine : dérivé **79**, l'acide glutamique : dérivé **80** ou la phénylalanine : dérivé **81**, il est préférable de préparer une espèce activée. Il existe plusieurs méthodes pour activer une fonction acide carboxylique dont la formation d'ester d'hydroxysuccinimide ou la formation d'ester d'hydroxybenzotriazole. La méthode de couplage DCC/HOBt beaucoup plus réactive que celle DCC/Osu nécessite la protection temporaire de la fonction acide carboxylique des acides aminés à coupler. Pour éviter des réactions secondaires possibles lors de ces couplages, il est nécessaire de protéger temporairement les fonctions amines secondaires du dérivé **77**. Le groupement protecteur tert.butylloxycarbonyle peut être utilisé.

Nous avons dans un premier temps tenté de réaliser la synthèse du dérivé **77**.

Tableau synoptique n° 7 : voie de synthèse possible pour préparer les composés 79, 80 et 81



5.1. Synthèse du 2-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentyl] amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide : 77



La préparation de **77** est réalisée en portant à reflux un mélange du dérivé **45**, de 3-bromopropionate de méthyle et de triéthylamine dans le chlorure de méthylène pendant 5 heures. L'utilisation de triéthylamine permet de capter l'acide bromhydrique libéré lors de la réaction. Après purification par CCE, le composé **77** est alors obtenu à l'état pur avec un rendement de 30 %. Malgré toutes nos tentatives (variation des conditions de réaction : durée, température, solvant et réactifs), nous n'avons pu améliorer le rendement de cette réaction.

Cette première étape pour **79**, **80** et **81** nous paraissant limitante par la suite, nous avons donc choisi de réaliser leurs synthèses en nous inspirant de la méthode de R. N. ZUCKERMANN qui décrit la préparation de polymères de type glycine N-substituée [ZUCKERMANN 1992].

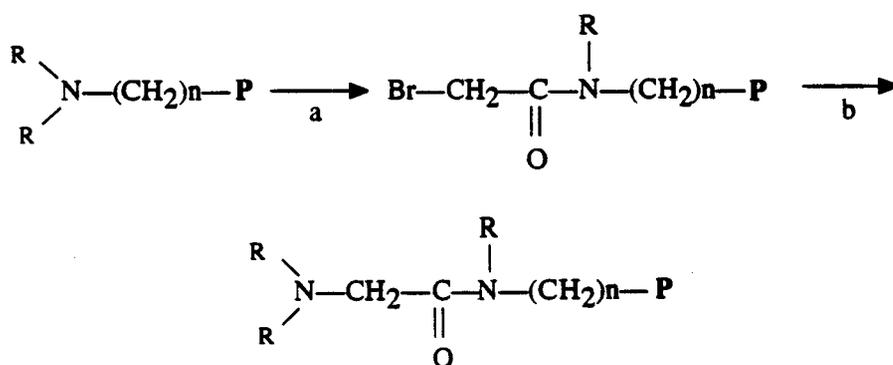


Figure 46 : synthèse de polymères de type glycine N-substituée réalisée en phase hétérogène [a) acide bromoacétique, N, N'-diisopropylcarbodiimide, DMF, 30 minutes. b) amine primaire, DMSO, 2 heures]

5.2. Synthèse du composé 79

La voie de synthèse pour préparer ce composé est détaillée dans la figure ci-dessous :

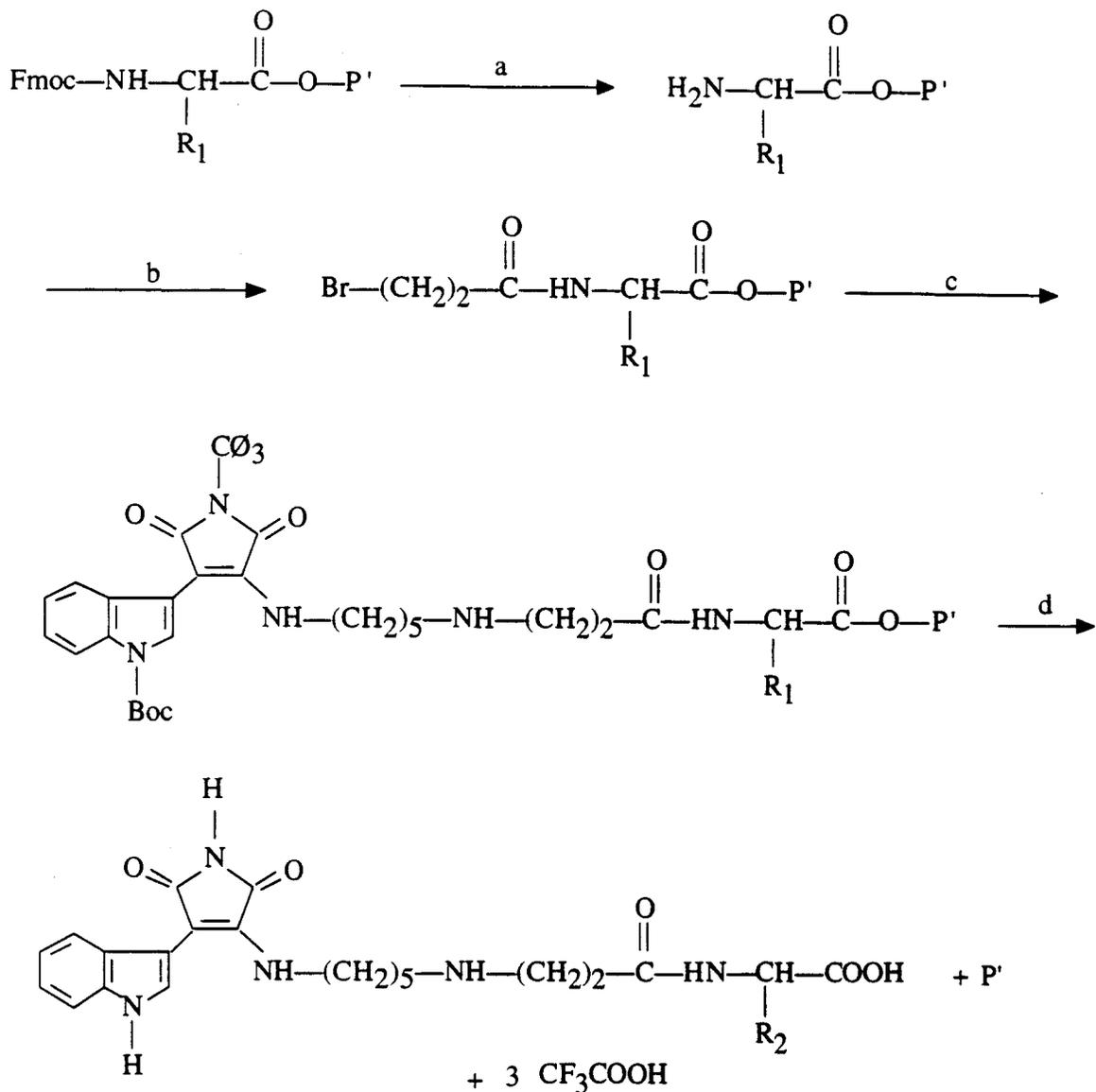
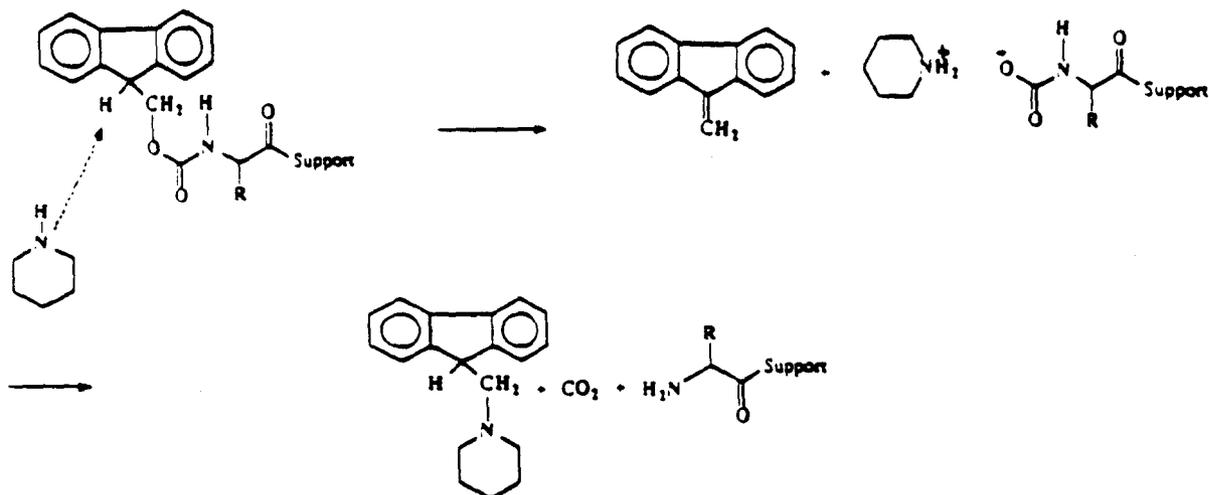


Figure 47 : voie de synthèse pour préparer le dérivé **79** (avec $\text{R}_1 = (\text{CH}_2)_3\text{NH-C(=NH)NHPmc}$ et $\text{R}_2 = (\text{CH}_2)_3\text{NH-C(=NH)NH}_2$)

- a) pipéridine-DMF (20-80 (v/v))
- b) acide 3-bromopropanoïque, DCC, CH_2Cl_2
- c) composé **45**, DMSO
- d) TFA (85 %), eau (5%), éthanedithiol (5%), thioanisole (5%)

Pour cela, nous avons utilisé comme support la résine paraalcoxyhydroxybenzylique (figure 48) introduite par WANG [WANG 1973, WANG 1975, et LU 1981].



La résine est ensuite lavée selon le protocole suivant : DMF : 5 x 2', CH₂Cl₂ : 5 x 2'. L'évolution de la déprotection du groupement Fmoc est suivie par le test de Kaiser [KAISER 1970] qui par chauffage, développe une coloration bleue en présence de fonctions amines primaires. Ce test doit être négatif avant la déprotection du groupement Fmoc et positif après clivage de celui-ci.

Pour pallier le manque de réactivité de la fonction acide carboxylique, il est préférable de préparer une espèce activée. R. N. ZUCKERMANN ayant montré que l'introduction de l'HOBt dans la réaction d'acylation faisait chuter considérablement le rendement de cette réaction (< à 5 %), la fonction acide carboxylique a donc été activée par formation d'anhydride symétrique [ZUCKERMANN 1992]. Sa préparation nécessite une quantité double d'acide 3-bromo propanoïque par rapport à la DCC. Le temps de couplage est de 30 minutes et l'excès en réactif est de 10 par rapport à la charge de la résine. La réaction est réalisée dans le chlorure de méthylène. Après réaction, la dicyclohexylurée (DCU), sous-produit de la réaction, précipite. La solution est de ce fait filtrée et additionnée à l'arginyl(Pmc)résine pour le couplage proprement dit (figure 47). Le temps de couplage est de 2 heures. En fin de réaction, la résine est lavée par filtration selon le protocole suivant : CH₂Cl₂ : 5 x 2' et DMSO : 5 x 2'. L'évolution de la synthèse est suivie par le test de Kaiser. Ce test doit être négatif après couplage de l'anhydride bis (3-bromo-propanoïque). Si celui-ci n'est pas complet, on procède à un deuxième couplage.

La réaction de substitution nucléophile étant plus rapide dans les solvants polaires, le dérivé **45** a donc été couplé à la résine dans le diméthylsulfoxyde (figure 47). Le temps

de couplage est de 15 heures. Nous avons pu améliorer le rendement de cette réaction en mettant en oeuvre 10 équivalents de dérivé **45** par rapport à la charge de la résine et en effectuant cette réaction dans un minimum de solvant. En fin de réaction, la résine est lavée par filtration selon le protocole suivant : CH₂Cl₂ 5 x 2', DMSO 2 x 2' et CH₂Cl₂ 3 x 2'.

Le produit **79** désiré est obtenu après clivage des groupements protecteurs trityle, Boc, Pmc et coupure de la liaison produit-résine (figure 47). Le réactif utilisé est le mélange suivant : acide trifluoroacétique : 85 %, eau 5 %, éthanedithiol 5 % et thioanisole 5 %.

Celui-ci réalise simultanément la déprotection des groupements Boc, Pmc et la coupure de la liaison produit-résine. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Cette réaction est effectuée en présence d'éthanedithiol et de thioanisole capables de piéger le groupement Pmc libéré [RINIKER]. Pour cliver le groupement trityle, le milieu réactionnel est maintenu dans l'acide trifluoroacétique pendant 30 minutes à température ambiante. Après précipitation dans le système TFA-éther éthylique, le "produit brut" subit différentes étapes de contrôle et de purification qui s'échelonnent selon l'ordre suivant :

- analyse du "produit brut" par chromatographie liquide haute performance (HPLC) qui nous indique la proportion du produit désiré dans le mélange (figure 50).
- purification par HPLC préparative :

Les différentes fractions recueillies sont ensuite analysées par HPLC analytique, le produit attendu avec un degré de pureté de 100 % à 215 nM, a été lyophilisé (figure 51).

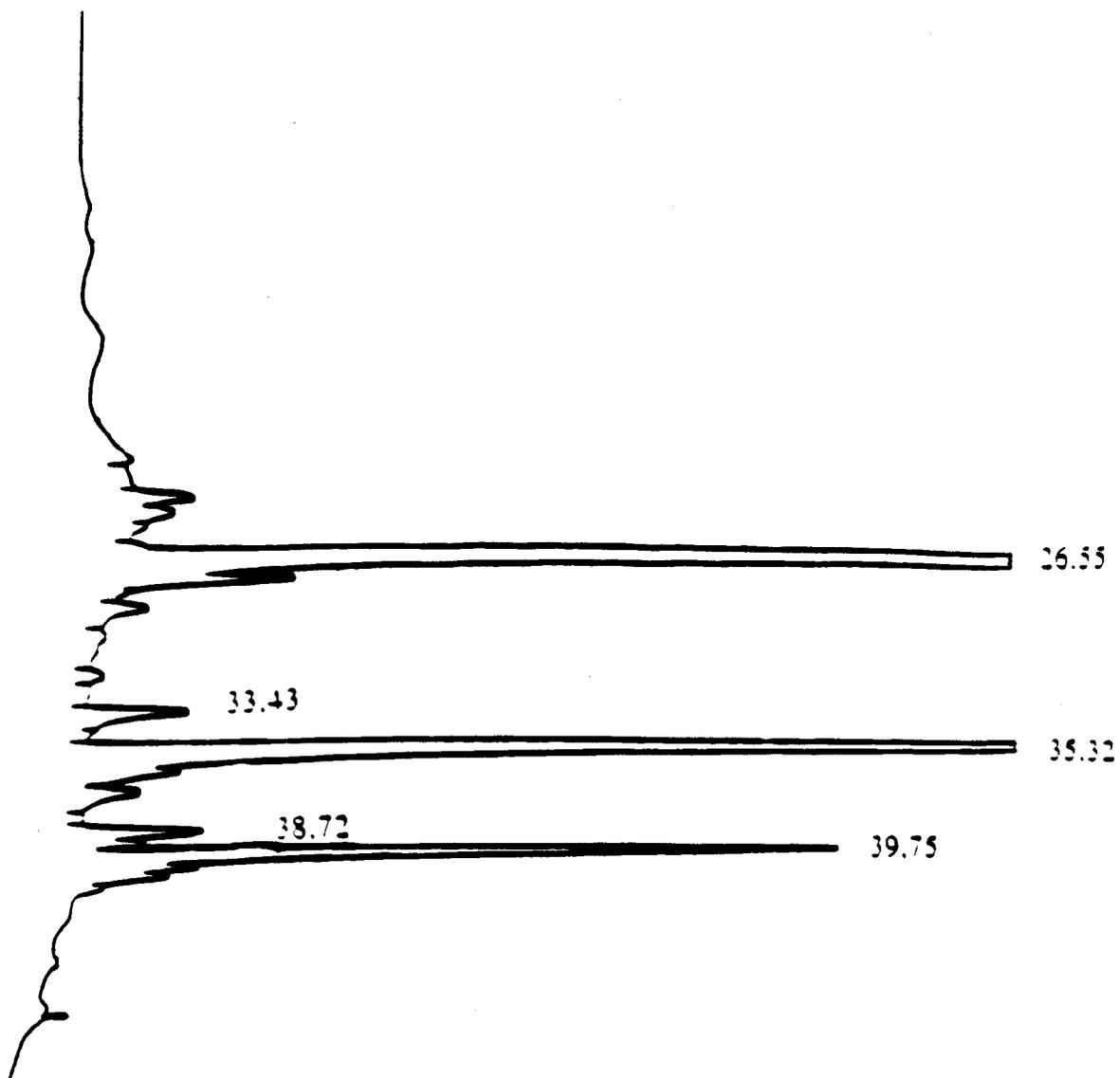
Nous avons obtenu le produit pur sous forme de cristaux. Le spectre de masse réalisé selon la technique de FAB (+) (figure 52) montre un pic à 541 correspondant à [l'ion moléculaire (M) + H]⁺.

5.3. Synthèse des composés 80 et 81

Nous avons repris pour effectuer la synthèse des dérivés **80** et **81** les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors de la préparation du composé **79**.

5.4. Synthèse du trifluoroacétate de 2-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide : 78

La déprotection des groupements protecteurs trityle et tert.butylloxycarbone du dérivé **77** est réalisé comme précédemment pour fournir le produit **78**.



Pic à 26.55 mn : 39.89 %
 Pic à 27.48 mn : 1.51 %
 Pic à 33.43 mn : 1.91 %
 Pic à 35.32 mn : 42.44 %
 Pic à 38.72 mn : 1.45 %
 Pic à 39.75 mn : 12.75 %

Figure 50 : profil de l'HPLC analytique du produit brut



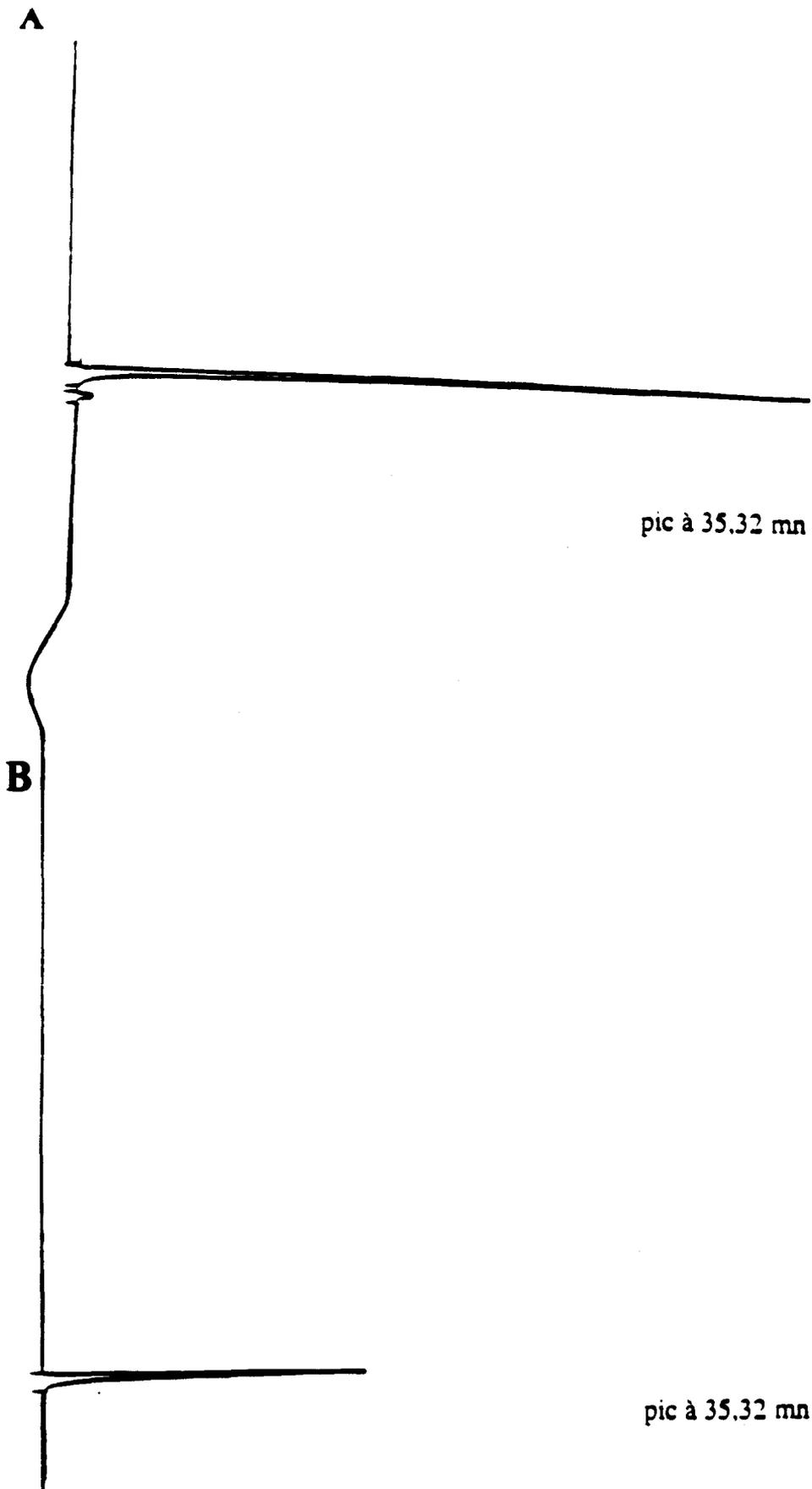


Figure 51 : HPLC analytique du composé 79 : (A) à 215 nM . (B) à 280 nM

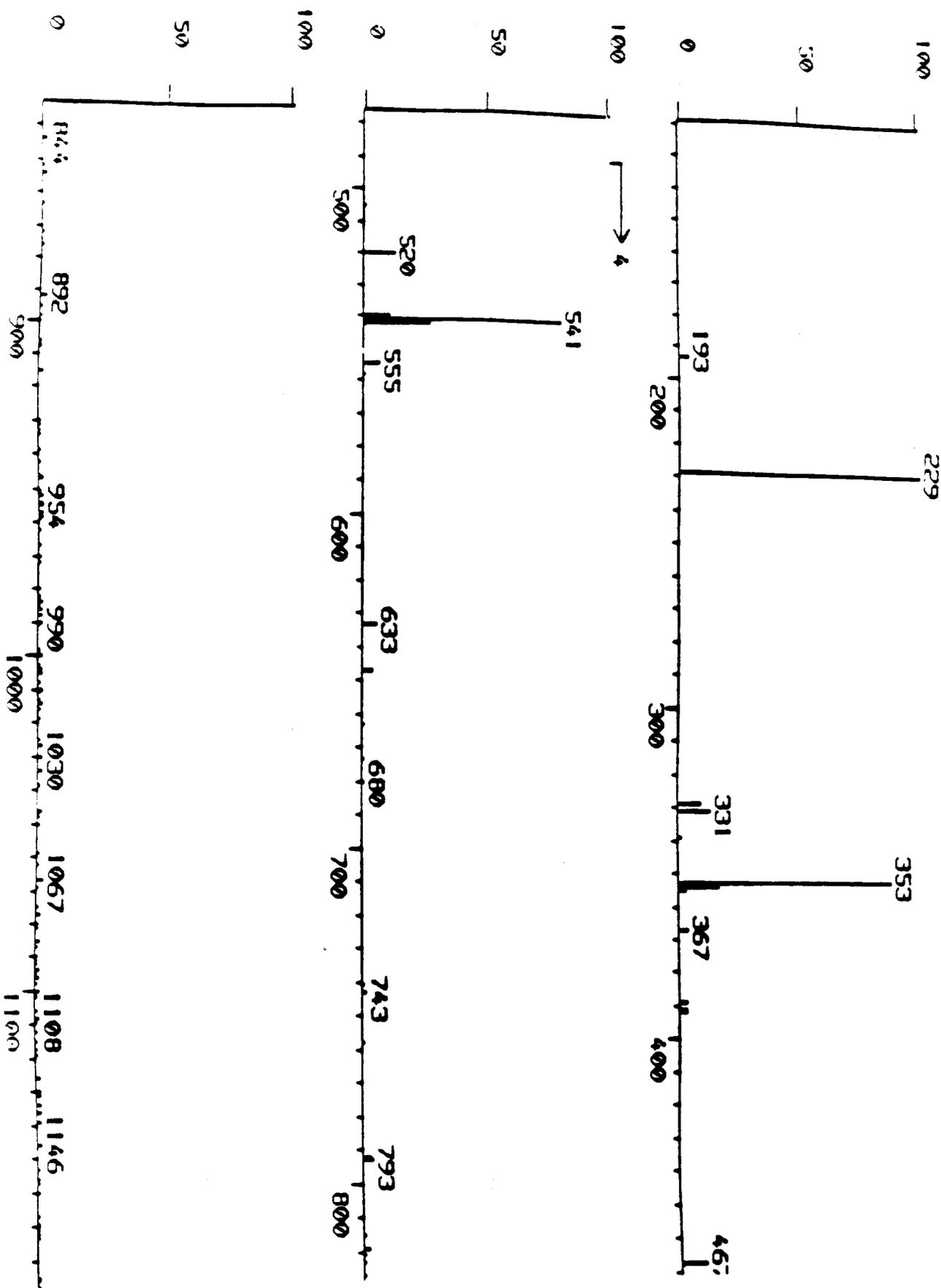
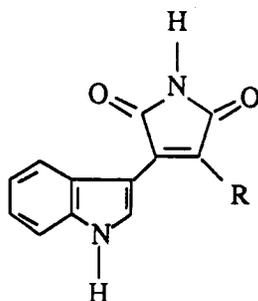


Figure 52 : spectre de masse (TOF) du composé 79

6. Tests d'inhibition des dérivés 78, 79, 80 et 81

Les IC₅₀ obtenues sont données dans le tableau suivant :

Tableau 25 : inhibition des protéines Ser/Thr kinases par les composés 78, 79, 80 et 81



Composés	R	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)
53	NH-(CH ₂) ₅ -NH ₂	8	350
71	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	110	500
75	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-Arg	8	210
76	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-Phe	95	120
78	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -COOCH ₃	135	100
79	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -CO-Arg	90	420
80	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -CO-Glu	150	inactif
81	NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₂ -CO-Phe	90	420

Nous remarquons une très nette différence d'activité entre les composés 53, 71 et 78.

La substitution de l'hydrogène de la fonction amine primaire du dérivé 53 par les groupements aminoéthyle et propionate de méthyle fait chuter l'IC₅₀ d'un facteur 13 et

16 respectivement. L'introduction de ces deux groupements semble donc néfaste sur l'activité inhibitrice.

Quelle que soit la nature de l'acide aminé couplé, les dérivés **79**, **80** et **81** se sont avérés de très mauvais inhibiteurs vis à vis de PKC et de PKA ; leur IC₅₀ est toujours supérieure à 90 μM quelle que soit l'enzyme étudiée.

Comparé au dérivé **75**, le dérivé **79** s'est révélé très mauvais inhibiteur pour la PKC. Il présente en effet une IC₅₀ de 90 μM vis à vis de la PKC et de 420 μM vis à vis de la PKA.

Le meilleur composé de la série, le dérivé **75** présente une IC₅₀ de 8 μM pour la PKC. L'introduction de l'arginine par sa fonction acide carboxylique sur le dérivé **71** semble favorable à l'enzyme ; en revanche l'introduction de l'arginine par sa fonction alpha aminée s'avère néfaste sur l'activité inhibitrice.

7. Mode d'action des composés **53**, **55** et **75**

Les composés **53**, **55** et **75** les plus intéressants de la série ont été étudiés en détail.

Ces dérivés se sont révélés de très bons inhibiteurs de la PKC avec une valeur d'IC₅₀ aux environs de la micro-mole. Ils présentent une activité analogue à l'inhibiteur commercial H-7 vis à vis de la PKC mais nettement inférieure pour la PKA.

Pour tenter de définir leur mode d'action vis à vis de la PKC, nous avons réalisé des compétitions avec l'ATP et les histones.

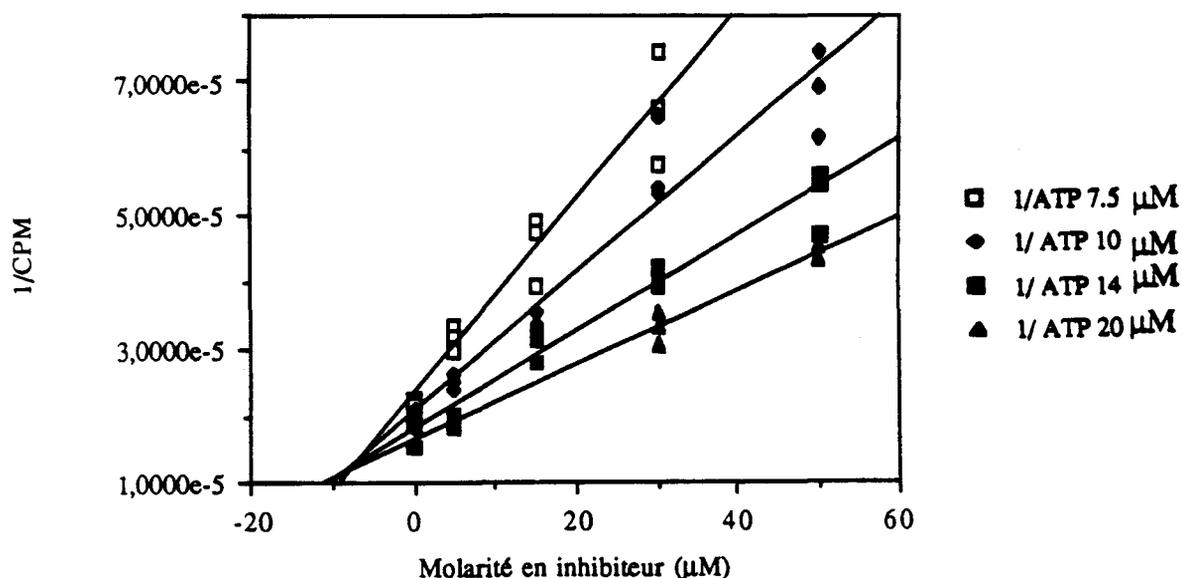


Figure 53 : compétition composé **55**/ATP-Détermination du K_i pour la PKC

Le K_i du composé **55** a été évalué selon la méthode de Dixon pour des concentrations d'ATP variables. L'inhibiteur **55** s'est révélé compétitif vis à vis de l'ATP. Le K_i obtenu est de $8 \mu\text{M}$ pour la PKC (figure 53).

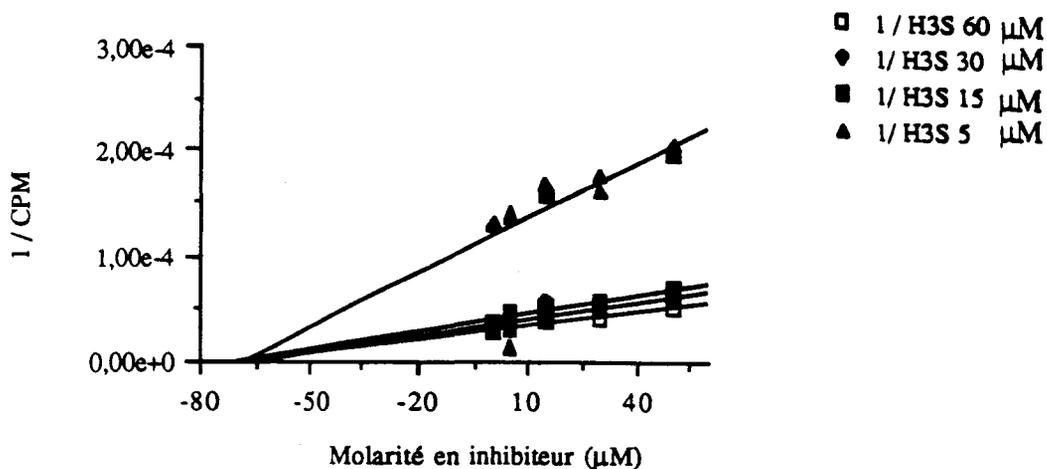


Figure 54 : compétition composé **55**/Histones III

La figure 54 suggère une inhibition non compétitive de l'inhibiteur **55** vis à vis des histones III.

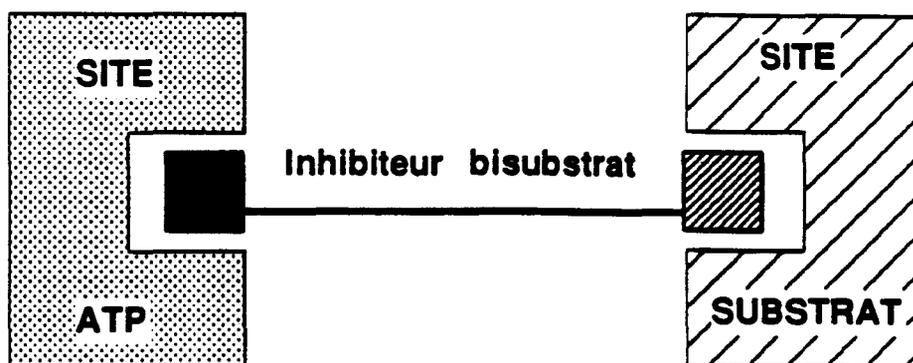
8. Conclusion

Parmi toutes les molécules synthétisées, les composés **53**, **55** et **75** sont les inhibiteurs les plus intéressants de la série. Ils inhibent cette kinase en entrant directement en compétition avec l'ATP. Outre leur bonne affinité, ils offrent une bonne sélectivité pour la PKC. Cette spécificité est assez inattendue dans la mesure où les sites ATP des enzymes PKC et PKA sont homologues. Il nous a donc paru important de rechercher le ou les modes d'action du mime ATP pour tenter d'expliquer les résultats obtenus. Le mode d'action que nous proposons sera détaillé dans la partie suivante.

III. Conception d'inhibiteurs bisubstrat de la PKC

1. Introduction

L'un de nos objectifs était de concevoir le plus rationnellement possible des inhibiteurs bisubstrat spécifiques de la protéine kinase C. De tels inhibiteurs sont susceptibles d'interagir simultanément au niveau du site de reconnaissance de l'ATP et du site de reconnaissance du substrat de l'enzyme.



Récemment, la structure tridimensionnelle d'un des domaines catalytiques d'une protéine kinase recombinante de souris très homologue à la PKC, la protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (PKA) a été déterminée par radiocristallographie [KNIGHTON 1991a et b]. La structure résolue est en fait celle de deux complexes : l'un binaire où la PKA est complexée au peptide inhibiteur synthétique PKI (5-24), l'autre ternaire où la PKA est complexée au même peptide mais également à l'adénosine triphosphate (ATP).

Ces structures, déposées à la Protein Data Bank et disponibles depuis peu, nous ont servi de point de départ à la conception par modélisation moléculaire d'inhibiteurs bisubstrat spécifiques de la PKC.

2. Structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la PKA

La structure décrite dans ce paragraphe et présentée ci-après (figure 55), est celle du complexe ternaire PKA-ATP-PKI(5-24). Il est à noter que la séquence de la PKA dont la structure a été résolue et celle de la protéine kinase A utilisée dans les tests sont pour ainsi dire identiques (uniquement 7 mutations).



Figure 55 : structure tridimensionnelle d'une des deux sous-unités catalytiques de la protéine kinase A complexée à l'ATP et au peptide inhibiteur PKI (5-24). Seuls les carbones α de l'enzyme sont représentés. Le peptide inhibiteur est quant à lui représenté par un ruban.

2.1. L'enzyme

Le domaine catalytique (sous-unité C) de la PKA est constitué de deux lobes. Le plus petit correspond à la partie N-terminale et est essentiellement constitué de feuillets β . Son rôle est de fixer l'ATP. Le motif caractéristique de reconnaissance du nucléotide GXGXXG(X)₁₆K strictement conservé dans la série des kinases, se retrouve dans la PKA sous la forme d'une boucle reliant deux brins β antiparallèles : la boucle G₅₀TGSFG(X)₁₆K₇₂.

Le grand lobe qui est principalement constitué d'hélices α , a quant à lui un triple rôle. Il fixe le substrat peptidique, il oriente le groupement phosphate γ de l'ATP en vue de son transfert et il dirige l'activité catalytique de l'enzyme.

Deux boucles se situant en surface au niveau de la crevasse entre les 2 lobes sont essentielles à la catalyse, il s'agit des boucles R₁₆₅D L K P E N₁₇₁ et D₁₈₄F G₁₈₆ [TAYLOR 1992, TAYLOR 1993].

2.2. Le nucléotide

L'ATP se fixe au niveau de la boucle riche en glycine décrite au paragraphe précédent. Cette boucle stabilise le groupement phosphate non transférable β par des liaisons de type hydrogène. Ce groupement phosphate ainsi que l'autre groupement phosphate non transférable α , sont tous deux impliqués dans des interactions ioniques fortes avec la lysine 72 de l'enzyme. D'autres interactions par liaison hydrogène ou de type hydrophobe (en ce qui concerne la base adénine) contribuent également à la stabilisation de la molécule d'ATP dans son site.

2.3. Le peptide inhibiteur

Ce peptide qui dérive d'un inhibiteur de protéine kinase, le PKI, est un inhibiteur puissant et sélectif de la PKA [GLASS 1989]. Sa constante d'inhibition pour l'enzyme est de l'ordre de 2 nM et sa séquence est la suivante :

T5TYADFIASGRTGRRNΔIHD24

Figure 56 : séquence du peptide inhibiteur PKI (5-24) cocrystallisé avec la sous-unité catalytique de la PKA. L'acide aminé souligné (alanine 21) correspond au site de phosphorylation lorsqu'il est remplacé par une sérine ou une thréonine.

Le PKI (5-24) est constitué dans sa région N-terminale d'une hélice α amphiphile et dans sa région C-terminale d'une partie "étendue" (figure 55). C'est dans cette dernière partie que le peptide présente le motif consensus de reconnaissance pour la PKA : Arg-Arg-X-Ser/Thr-Y, X étant un acide aminé variable et Y un acide aminé hydrophobe. Dans le PKI

(5-24), l'acide aminé X est une asparagine (Asn 20) et l'acide aminé Y une isoleucine (Ile 22).

La stabilisation du PKI (5-24) complexé à la PKA est assurée par des interactions ioniques et par des liaisons hydrogènes impliquant respectivement les trois arginines 15, 18 et 19 et les acides aminés Gly 14 et Ile 22 du peptide, mais également par des interactions de type hydrophobe faisant intervenir la Phe 10 et l'Ile 22.

Il faut également noter qu'il existe des interactions directes entre le peptide inhibiteur et l'ATP. Le groupement guanidinium de l'arginine 18 du PKI(5-24) est en effet en interaction avec le groupement hydroxyle OH-3' du cycle ribose de l'ATP (en position vicinale du carbone portant la chaîne phosphorylée), de même qu'un des atomes d'oxygène du phosphate transférable γ avec l'hydrogène porté par l'atome d'azote amide de l'Ala 21 (position normalement phosphorylable).

3. Comparaisons PKA-PKC

L'alignement de séquence de la figure 57 montre la forte homologie entre le domaine catalytique de la protéine kinase A et le domaine catalytique de la protéine kinase C.

Dans les régions alignées des deux protéines, 40 % des acides aminés sont conservés. Nous pouvons donc supposer qu'à l'exception de certaines régions très localisées, les deux protéines possèdent des structures tridimensionnelles similaires. Dans ce paragraphe, nous nous attacherons tout particulièrement à comparer les sites de reconnaissance de l'ATP et du substrat peptidique, ainsi que les sites catalytiques des deux enzymes.

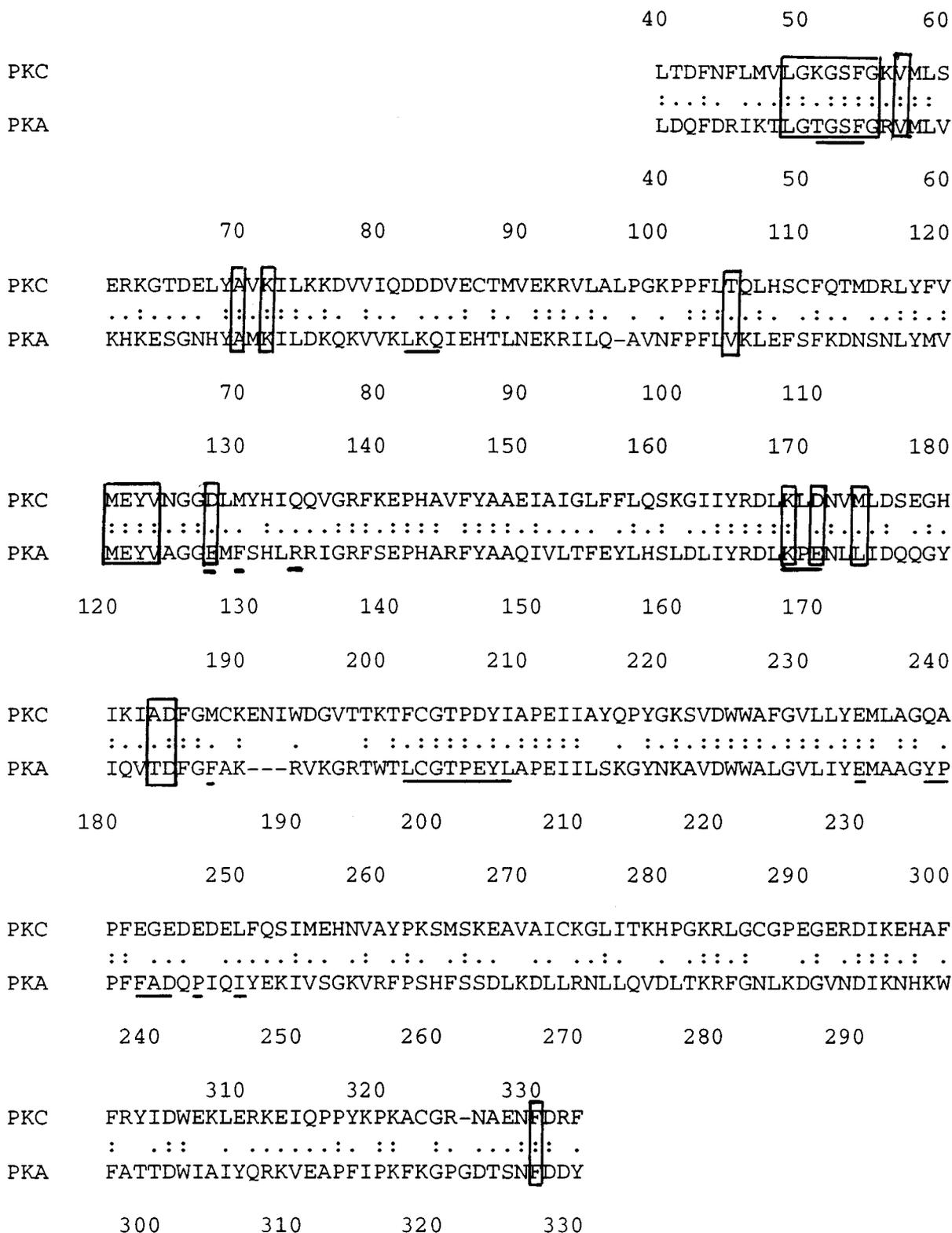


Figure 57 : alignement des régions conservées du domaine catalytique de la protéine kinase A et du domaine catalytique de la protéine kinase C. Les symboles : et . sont respectivement utilisés pour désigner deux acides aminés identiques et deux acides aminés de même nature chimique. Les résidus de la PKA se trouvant à une distance < 3 Å de la molécule d'ATP sont encadrés, ceux se trouvant à une distance < 3 Å du PKI (5-24) sont soulignés.

D'après la figure 57, sur les 22 résidus de la PKA situés à une distance inférieure à 3 Å de la molécule d'ATP, 16 sont conservés et sur 30 résidus situés à une distance inférieure à 3 Å du PKI (5-24), 11 sont conservés. Les sites de reconnaissance de l'ATP et du peptide des deux enzymes sont donc très homologues.

La majorité des substitutions observées ne concerne pas les acides aminés essentiels, c'est à dire ceux intervenant dans l'activité catalytique ou plus généralement impliqués dans les interactions avec l'ATP, le substrat peptidique ou les deux simultanément. Les substitutions des acides aminés essentiels sont quant à elles "très" conservatrices. Les acides glutamiques 127, 170 et 203 de la PKA sont par exemple tous remplacés par des acides aspartiques dans la PKC, respectivement Asp 128, Asp 171 et Asp 207.

La grande majorité des acides aminés hydrophobes de la PKA concernés sont remplacés par des acides aminés hydrophobes dans la PKC (Phe 129 par Met 130, Phe 187 par Met 188, Leu 198 par Phe 202, Leu 205 par Ile 209, Ile 246 par Leu 250). Il est intéressant de noter que la poche hydrophobe où se place l'Ile 22 du PKI (5-24) définie par les acides aminés Leu 198, Leu 205 et Pro 202 se retrouve aussi au niveau de la PKC (acides aminés Phe 202, Ile 209 et Pro 206).

La différence la plus marquante concerne la séquence L₈₂KQ₈₄ de la PKA qui est alignée avec la séquence D₈₂DD₈₄ de la PKC. Cette séquence se situe dans le proche voisinage du peptide, plus exactement au niveau de sa région C-terminale (région où se trouve la séquence spécifique de reconnaissance par PKA).

L'ensemble de ces résultats montre que les sites de reconnaissance de l'ATP et du substrat peptidique sont similaires dans les deux enzymes. Il est donc possible, sur la base de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la protéine kinase A et en utilisant les techniques de modélisation moléculaire, de concevoir de façon rationnelle des inhibiteurs spécifiques de la protéine kinase C et en ce qui nous concerne ici plus particulièrement des inhibiteurs bisubstrat.

4. Conception d'inhibiteurs bisubstrat de la PKC

Un inhibiteur bisubstrat peut être décrit schématiquement comme une molécule présentant 3 parties : une première censée interagir au niveau du site ATP (partie mime ATP), une deuxième censée interagir au niveau du site substrat (partie mime substrat) et une troisième reliant entre elles les deux premières (bras espaceur). La structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la PKA complexé à l'ATP et au PKI (5-24) montre que cette approche "bisubstrat" est réellement envisageable dans la mesure où les sites de reconnaissance de l'ATP et du substrat sont très proches. Notre

travail a donc consisté à rechercher les combinaisons mime ATP-bras espaceur-mime substrat susceptibles d'inhiber le plus spécifiquement possible la protéine kinase C. Dans une première partie, nous donnerons en les justifiant, les principaux critères qui nous ont guidé dans le choix des différents mimes ATP et substrat. Dans une seconde partie, nous présenterons les inhibiteurs bisubstrat synthétisés et discuterons ensuite les résultats des tests d'inhibition et de compétition ATP et histones effectués pour ces composés.

Les mimes substrat sont des peptides dont la longueur et la séquence ont été choisies selon plusieurs critères.

Nous avons tout d'abord recherché, sur la base de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la PKA, les différentes longueurs possibles de peptides qui une fois greffés en leur position N-terminale aux différents mimes ATP *via* le bras espaceur permettent effectivement à ces derniers de venir interagir au niveau du site de reconnaissance de l'ATP.

L'analyse des interactions ATP-PKI(5-24) montre que l'arginine 18 est l'un des acides aminés du peptide inhibiteur le plus proche de la molécule d'ATP. Une distance de 2,14 Å est en effet observée entre l'atome d'oxygène du groupement OH-3' du cycle ribose de l'ATP et un atome d'hydrogène de l'une des deux fonctions NH₂ du groupement guanidinium de cette arginine. Cette région de forte proximité entre l'ATP et le PKI (5-24) nous a paru être le seul endroit possible où l'on puisse espérer établir une connexion entre un mime ATP et un mime substrat. Il est important de signaler que ce raisonnement suppose que le mime substrat interagisse au niveau de la PKC d'une manière analogue à celle du PKI (5-24) au niveau de la PKA. Dans ce cas, un mime substrat peut être imaginé sur la base maximale des 6 derniers acides aminés du PKI (5-24), c'est à dire la séquence C-terminale R₁₉NAIHD₂₄ du peptide inhibiteur (figure 58). Un tel hexapeptide dont la ou les séquences possibles restent à définir pour que celui-ci soit spécifique PKC, peut laisser supposer comme nous l'avons évoqué précédemment qu'un bras espaceur greffé en sa position N-terminale puisse par analogie à l'Arg 18 du PKI (5-24) s'orienter en direction du site de reconnaissance du nucléotide et de se fait favoriser l'interaction du mime ATP. Nous verrons également que des tétrapeptides ont été envisagés et synthétisés.

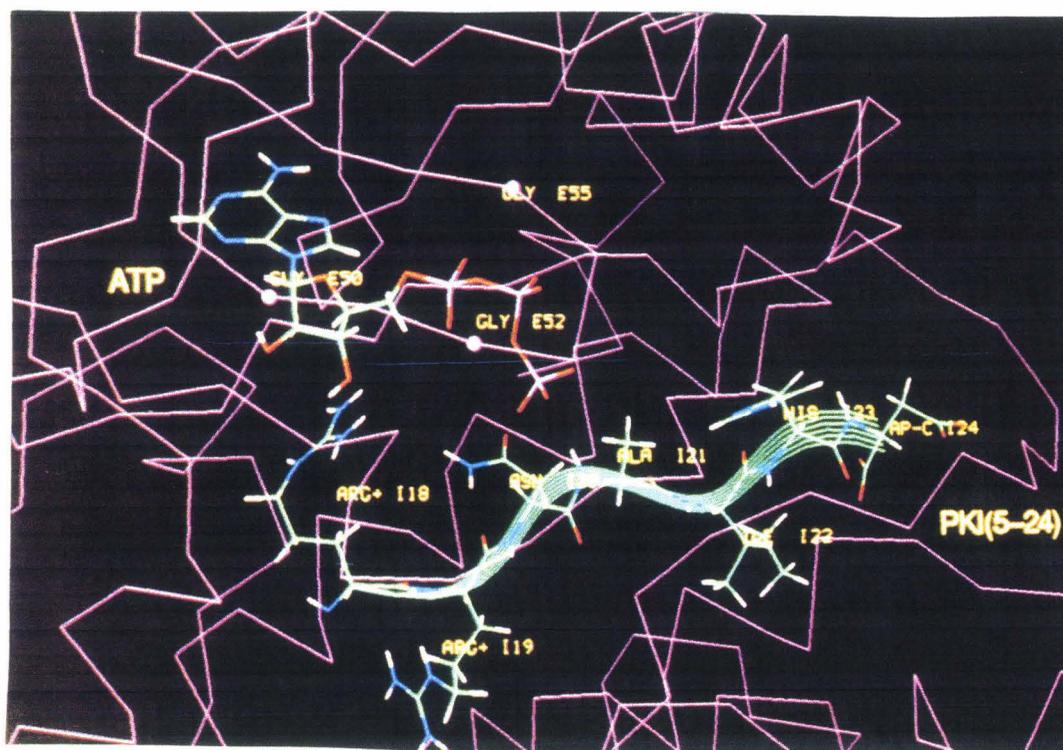


Figure 58 : vue du site catalytique de la protéine kinase A montrant la molécule d'ATP dans son site ainsi que les 7 derniers acides aminés R18RNAIHD24 du PKI (5-24). Le squelette peptidique de cette séquence est mis en évidence à l'aide d'une représentation en "ruban".

La longueur des mimes substrat semble donc être un critère important et relativement restrictif dans la conception d'inhibiteurs bisubstrat. En nous référant à l'étude comparative PKA-PKC du paragraphe 3, nous allons maintenant décrire les différentes séquences d'hexapeptides et tétrapeptides choisies de façon à ce que les mimes substrat puissent être spécifiques de la protéine kinase C.

Les résidus Leu 82, Lys 83 et Gln 84 de la PKA se situant à proximité de la région C-terminale du PKI (5-24) sont remplacés dans la PKC par trois acides aspartiques respectivement Asp 82, Asp 83 et Asp 84. Par conséquent, uniquement à partir de la structure 3D de la PKA, nous pouvons nous attendre à ce que les mimes substrat présentant des résidus basiques dans leur région C-terminale soient spécifiques de la PKC, même si la structure de la PKC dans cette région peut être légèrement différente de celle de la PKA. En fait, nous ne faisons ici que corroborer des hypothèses qui ont déjà été émises et vérifiées bien avant que cette structure 3D ne soit disponible (chapitre I, paragraphe 4.2.). Dans les inhibiteurs que nous avons synthétisés, toutes les parties mimes substrat présentent deux arginines en position C-terminale en remplacement de l'His 23 et de l'Asp 24 du PKI (5-24).

La poche hydrophobe où se place la chaîne latérale de l'Ile 22 du PKI (5-24) au niveau de la PKA et définie par les résidus Leu 198, Leu 205 et Pro 202, se retrouve également au niveau de la PKC. Cela signifie que la présence d'un résidu hydrophobe à droite du site de phosphorylation du peptide inhibiteur doit également être importante pour l'affinité vis à vis de la PKC. De plus, dans la mesure où la leucine 198 de la PKA est remplacée dans la PKC par une phénylalanine (Phe 202), un résidu hydrophobe à caractère aromatique en remplacement de l'Ile 22 du PKI (5-24) pouvait s'avérer judicieux. Des études portant sur des peptides synthétiques dérivant de la protéine neurogranine ont montré effectivement l'importance de résidus hydrophobes tels que la phénylalanine proche de la position phosphorylable [CHEN 1993, chapitre I, paragraphe 4.2.].

Les mimes substrat que nous avons synthétisés présentent tous une phénylalanine en remplacement de l'Ile 22 du PKI (5-24). L'Ala 21 du peptide inhibiteur de la PKA se retrouve également au niveau des différents mimes. Dans le cas d'inhibiteurs, un résidu Ser ou Thr peut également contribuer à l'affinité pour l'enzyme. Nous avons donc envisagé des peptides présentant un résidu sérine en remplacement de l'alanine 21.

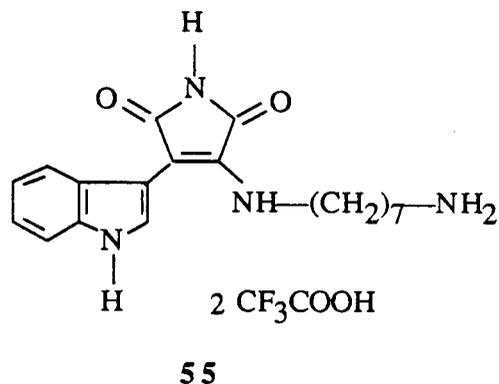
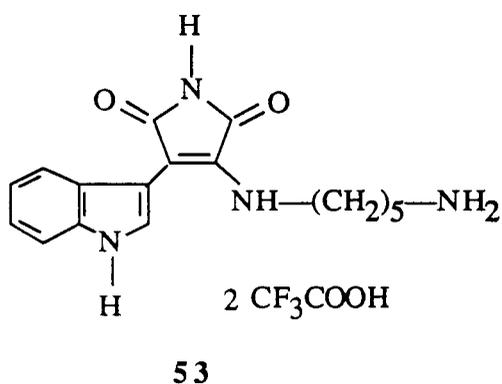
Les deux premiers résidus des hexapeptides synthétisés sont de manière invariante une arginine et une asparagine. Ces résidus correspondent respectivement à l'Arg 19 et à l'Asn 20 du PKI (5-24). Ils sont conservés pour deux raisons complètement différentes : l'Arg 19 est essentielle car elle contribue de manière prépondérante aux interactions PKI (5-24)-PKA et l'Asn 20 car son rôle est difficile à définir et que nous avons voulu éviter des remplacements qui auraient pu s'avérer nuisibles à l'affinité vis à vis de la PKC.

Nous avons toutefois testé des térapeptides (intermédiaires de synthèse) dérivant des hexapeptides et ne comportant pas les deux acides aminés Arg 19 et Asn 20. Le tableau suivant présente toutes les séquences de térapeptides et d'hexapeptides susceptibles d'interagir au niveau du site substrat et qui selon nos critères devaient être plus spécifiques de la PKC.

Tableau 26 : séquences des différents mimes substrat synthétisés

PKI (5-24)	T₅TYADFIASGRTGRR₁₉NA₂₁IHD₂₄
composé 90	A₂₁FRR₂₄
composé 91	S₂₁FRR₂₄
composé 92	R₁₉NA₂₁FRR₂₄
composé 93	R₁₉NS₂₁FRR₂₄

L'avant dernière étape de notre approche "bisubstrat" a consisté à rechercher des molécules qui puissent être reliées simplement *via* un bras espaceur aux différents peptides présentés ci-dessus (au niveau de leur position N-terminale), qui soient compétitives ATP et spécifiques PKC. De telles molécules ont été présentées dans la partie précédente. Il s'agit des composés **53** et **55** qui se sont révélés être de très bons inhibiteurs spécifiques de la PKC et compétitifs ATP. Les IC₅₀ de ces composés sont respectivement 8 μ M et 5 μ M.



De la même manière, le composé **75** (IC₅₀ = 8 μ M) aurait pu être pris en considération. Mais dans la mesure où au moment de ces travaux, les résultats des tests d'inhibition de ce composé n'étaient pas connus, cela n'a pas été possible.

La toute dernière étape a consisté, à rechercher un bras espaceur qui permette de relier entre elles les parties mime ATP et mime substrat. Ce bras espaceur ne devait en aucun cas être susceptible de gêner les interactions espérées de ces deux mimes au niveau de leurs sites respectifs. La figure 59 montre que la distance entre la base adénine du nucléotide et le carbone α de l'arginine N-terminale du mime substrat **92** remplacé ici dans le site de la PKA d'une manière identique à celle des 6 derniers acides aminés du PKI (5-24) est de l'ordre de 16 Å. L'estimation de cette distance est totalement arbitraire étant donné qu'elle requiert le choix d'une référence ici le centre du cycle pyrimidine de l'adénine, l'ordre de grandeur est néanmoins important. Cette figure montre également une distance du même ordre de grandeur entre le carbone α de l'alanine 21 et la base adénine du nucléotide.

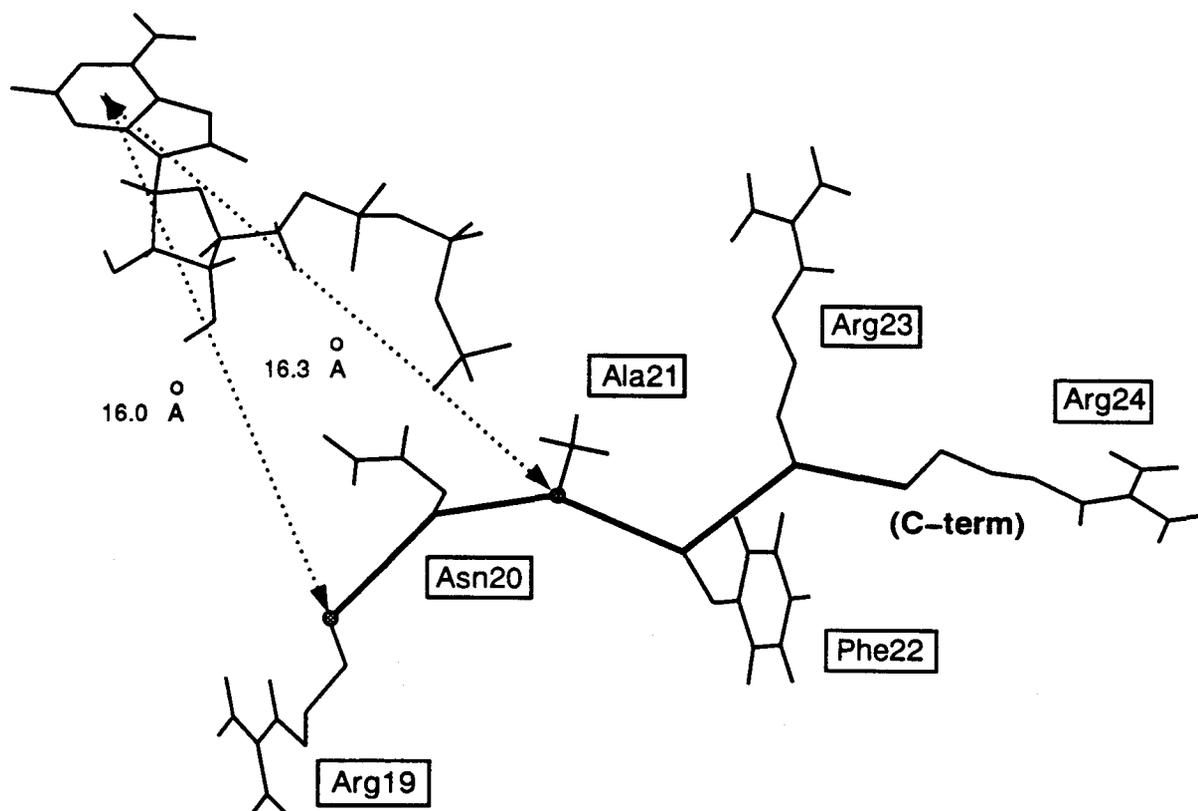


Figure 59 : vue montrant la molécule d'ATP et le mime substrat hexapeptidique **92** remplacé dans le site de la PKA d'une manière identique aux 6 derniers acides aminés du PKI (5-24).

En supposant que le cycle indole des composés **53** et **55** interagisse au niveau de la partie du site ATP occupée normalement par la base du nucléotide, le bras espaceur devra alors permettre à ce cycle de se placer correctement. La figure 60 met clairement en évidence qu'un maillon succinique ($C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)$) peut être utilisé comme bras espaceur. Greffé à l'une de ses extrémités à la fonction NH_2 du chaînon 1,7 diaminoheptane du composé **55** et à son autre extrémité à la fonction NH_2 terminus du mime substrat, ce bras place en effet le carbone α de l'arginine N-terminale du mime substrat et le cycle indole du mime ATP à une distance de l'ordre de 21 Å.

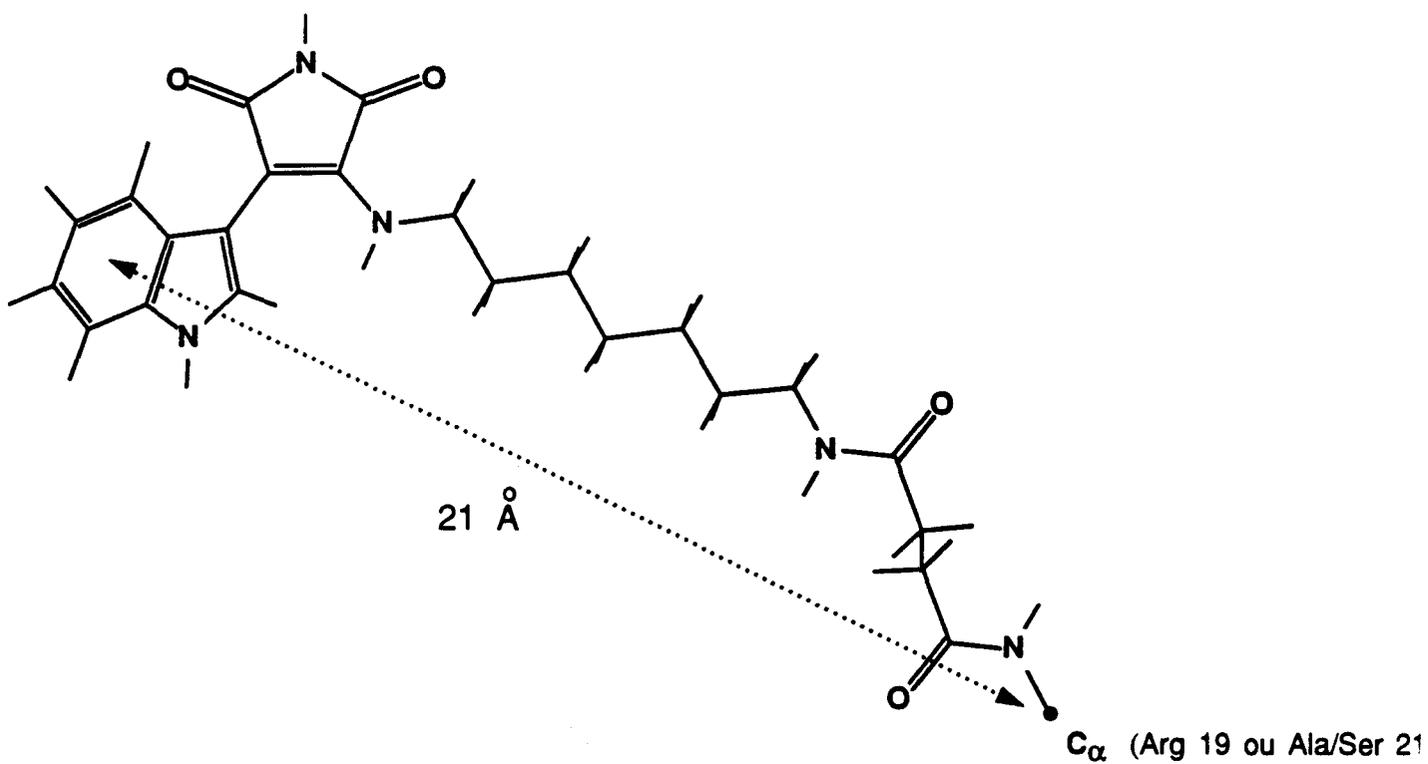
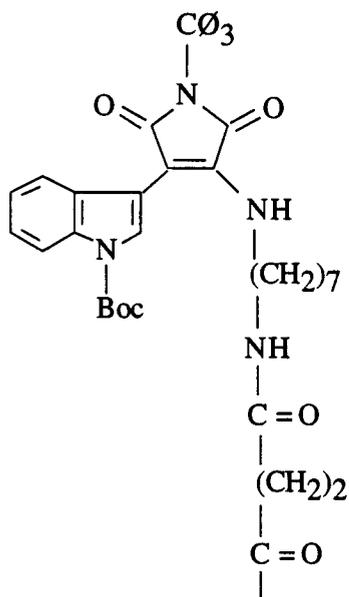


Figure 60 : composé 55 dont le chaînon 1,7 diaminoheptane représenté en mode "étendu" est greffé au niveau de sa fonction NH₂ libre à l'une des extrémités du bras succinique, l'autre extrémité de ce bras étant greffé à la fonction NH₂ de l'acide aminé N-terminale du mime substrat (Arg 19 ou Ala/Ser 21).

Le tableau 27 donne la structure de tous les inhibiteurs bisubstrat que nous avons synthétisés et testés.

- composé **90** : (NH₂)Ala—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **91** : (NH₂)Ser—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **92** : (NH₂)Arg—Asn—Ala—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **93** : (NH₂)Arg—Asn—Ser—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **94** : R-Ala—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **95** : R-Ser—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **96** : R—Arg—Asn—Ala—Phe—Arg—Arg(COOH)
 composé **97** : R—Arg—Asn—Ser—Phe—Arg—Arg(COOH)

avec **R** =



5. Préparation des peptides

5.1. Synthèse des peptidylrésines 82 à 85

Composé **82** : $\text{NH}_2\text{—Ala—Phe—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)—P}$

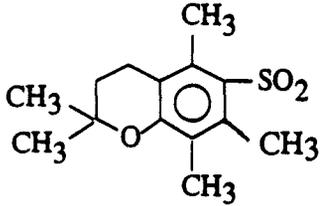
Composé **83** : $\text{NH}_2\text{—Ser(tBu)—Phe—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)—P}$

Composé **84** : $\text{NH}_2\text{—Arg(Pmc)—Asn(Trityl)—Ala—Phe—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)—P}$

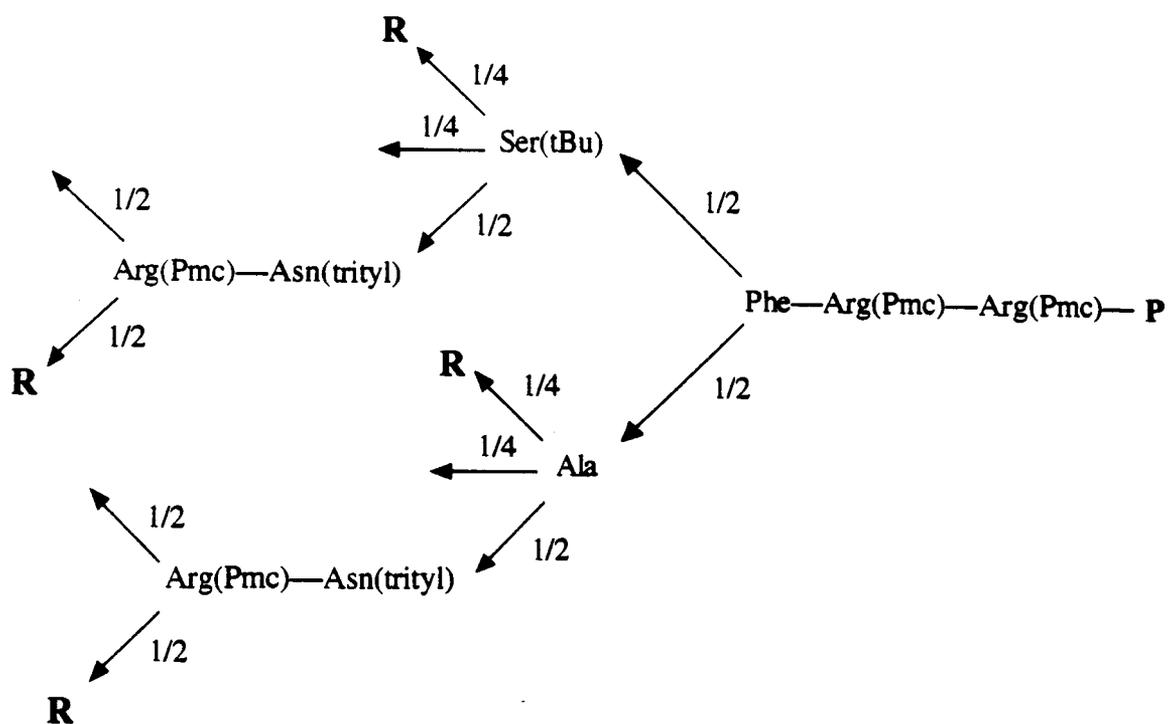
Composé **85** : $\text{NH}_2\text{—Arg(Pmc)—Asn(Trityl)—Ser(tBu)—Phe—Arg(Pmc)—}$
 Arg(Pmc)—P

La synthèse des peptides est réalisée en phase solide selon la méthode de Merrifield [MERRIFIELD 1963]. Le premier acide aminé est ancré par sa fonction acide carboxylique sur la résine insoluble, la fonction alpha-aminée est protégée par le groupement semi-permanent Fmoc. L'élimination de ce groupement protecteur régénère l'amine primaire qui va pouvoir ainsi réagir avec le deuxième acide aminé. L'élongation des peptides se fait ensuite par répétition de ces différentes étapes de déprotection et de couplage. Actuellement, la résine la plus utilisée pour cette chimie utilisant le groupement Fmoc est de type paraalcoxyhydroxybenzylique introduite par WANG. Elle permet de cliver le peptide de son support polymère par action d'acide trifluoroacétique. Pendant toute la durée de la synthèse, les fonctions réactives des chaînes latérales sont protégées par des groupements permanents, qui ne seront éliminés qu'en fin de synthèse. Les groupements protecteurs les plus couramment employés en combinaison avec le groupement Fmoc sont du type : tert.butyléther, tert.butyloxycarbonyle, trityle, 2, 2, 5, 7, 8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle. Ceux-ci sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 28 : groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés employés dans la synthèse de peptides 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 et 89

Nom (Abréviation)	Formule	Acide aminé protégé
Tert.butyle (tBu)	$C(CH_3)_3$	Sérine (Ser)
Trityle (Trt)	$C(C\emptyset)_3$	Asparagine (Asn)
2, 2, 5, 7, 8- pentaméthylchroman-6- sulfonyle (PMC)		Arginine (Arg)

Les 8 peptides présentent une séquence C-terminale analogue et ont de ce fait, été préparés à partir d'une même peptidylrésine. La figure 61 retrace les différentes étapes de synthèse.



avec R =

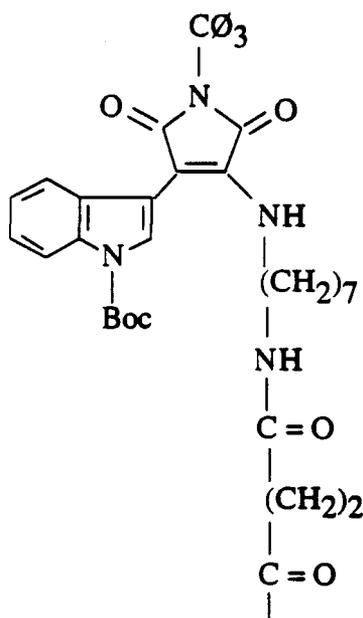


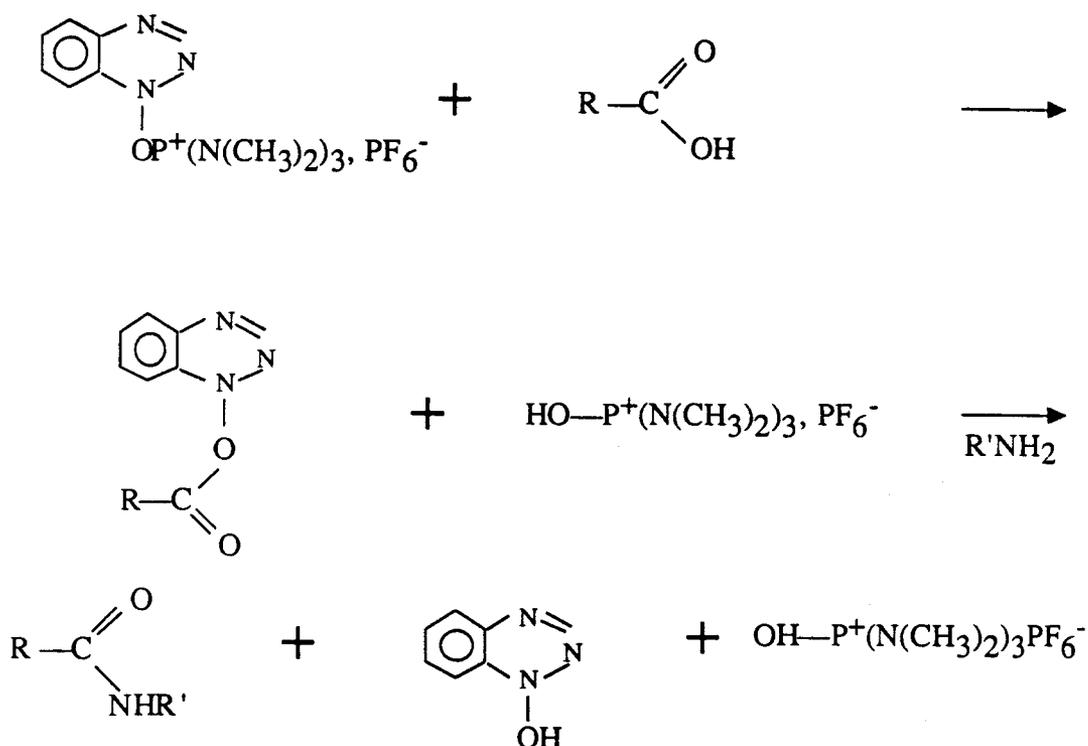
Figure 61 : stratégie de synthèse des peptidylrésines 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 et 89

La première étape a consisté à préparer une quantité importante de Phe—Arg—Arg—P utilisable pour les synthèses suivantes. L'élongation de la chaîne s'effectue en deux étapes qui seront répétées autant de fois qu'il y a d'acides aminés à coupler.

Dans un premier temps, le groupement Fmoc de l'acide aminé présent sur la résine est éliminé. Le réactif utilisé est la pipéridine à 20 % dans le diméthylformamide pendant 30 minutes.

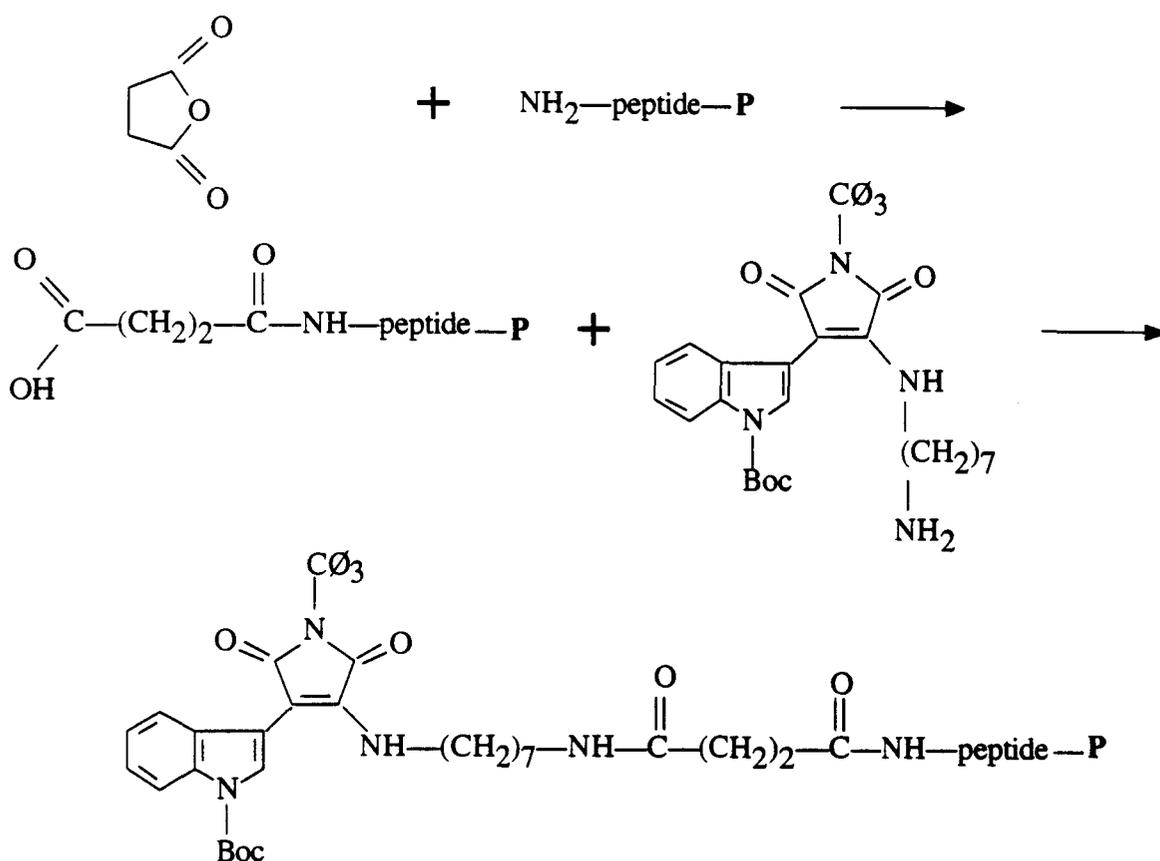
En fin de réaction, la résine est ensuite lavée par filtration selon le protocole suivant : DMF 3 x 2', CH₂Cl₂ 3 x 2'. L'évolution de la réaction est suivie par le test de Kaiser. Ce test doit être négatif avant la déprotection du groupement Fmoc et positif après clivage de celui-ci. Les différents acides aminés sont alors couplés à la fonction amine réactive libérée par la méthode de couplage BOP/HOBt.

Le mécanisme de la réaction se décrit de la façon suivante :



L'acide aminé à coupler et les agents de couplage sont mis en excès (HOBt : 3 équivalents, BOP : 3 équivalents, DIEA : 10 équivalents) par rapport à la charge de la résine, la réaction est réalisée dans la N-méthylpyrrolidone pendant une heure. La résine est ensuite lavée selon le protocole suivant : NMP 1 x 2', DMF 2 x 1' et CH₂Cl₂ 3 x 1'. La réaction est contrôlée par le test de KAISER qui doit être négatif après couplage. Si celui-ci n'est pas complet, on procède à un deuxième couplage.

5.2. Synthèse des peptidylrésines 86 à 89



avec

- composé **86** : peptide = Ala—Phe—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)
 composé **87** : peptide = Ser(tBu)—Phe—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)
 composé **88** : peptide = Arg(Pmc)—Asn(trityl)—Ala—Phe—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)
 composé **89** : peptide = Arg(Pmc)—Asn(trityl)—Ser(tBu)—Arg(Pmc)—Arg(Pmc)

L'anhydride succinique est couplé à la fonction amine primaire N-terminale libre des différents peptides. La réaction est réalisée dans le mélange N-méthylpyrrolidone -DIEA (90-10 v/v) pendant 2 heures. La réaction est contrôlée par le test de Kaiser. Avant de coupler le dérivé **47** à la fonction carboxylique générée, celle-ci est, au préalable, activée par formation d'un ester activé préparé par la méthode de couplage BOP/HOBt.

Les agents de couplage BOP et HOBt sont mis en excès (5 équivalents) par rapport à la charge de la résine. L'activation est réalisée dans le mélange N-méthylpyrrolidone-DIEA pendant 20 minutes. La résine est ensuite lavée selon le protocole suivant : NMP 1 x 1', CH₂Cl₂ 1 x 1'. Le dérivé **47** est alors couplé sur l'ester activé obtenu, le couplage est réalisé dans le chlorure de méthylène.

5.3. Synthèse des peptides 90 à 97

Le peptide est séparé de la résine par action d'acide trifluoroacétique (85 %), eau (2,5 %), phénol (2,5 %), éthanedithiol (5 %) et thioanisole (5 %) qui réalise simultanément la déprotection des chaînes latérales. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 2 heures à 0°C. Après précipitation dans le système TFA-éther éthylique, le "produit brut" est contrôlé par HPLC analytique et par spectrométrie de masse réalisée selon la technique TOF. Dans ces conditions, la déprotection des groupements Pmc et trityle n'est pas totale. Le spectre de masse n°1 du composé **94** (figure 62) montre en effet la présence du pic à 972 correspondant à [l'ion moléculaire (M) + H]⁺ mais également la présence des pics à 1237 et à 1481 correspondant à [M + Pmc]⁺ et à [M + trityle + Pmc]⁺ respectivement. Pour cliver tous les groupements permanents, nous avons donc dû procéder à une deuxième étape de déprotection. L'examen des spectres de masse ne montre plus que le pic correspondant à l'ion moléculaire (figure 63). Après précipitation dans le système TFA-éther éthylique, le "produit brut" subit alors différentes étapes de contrôle et de purification. Les peptides **90** à **97** sont alors obtenus à l'état pur sous forme de cristaux. Leur structure est confirmée par les méthodes spectroscopiques usuelles.

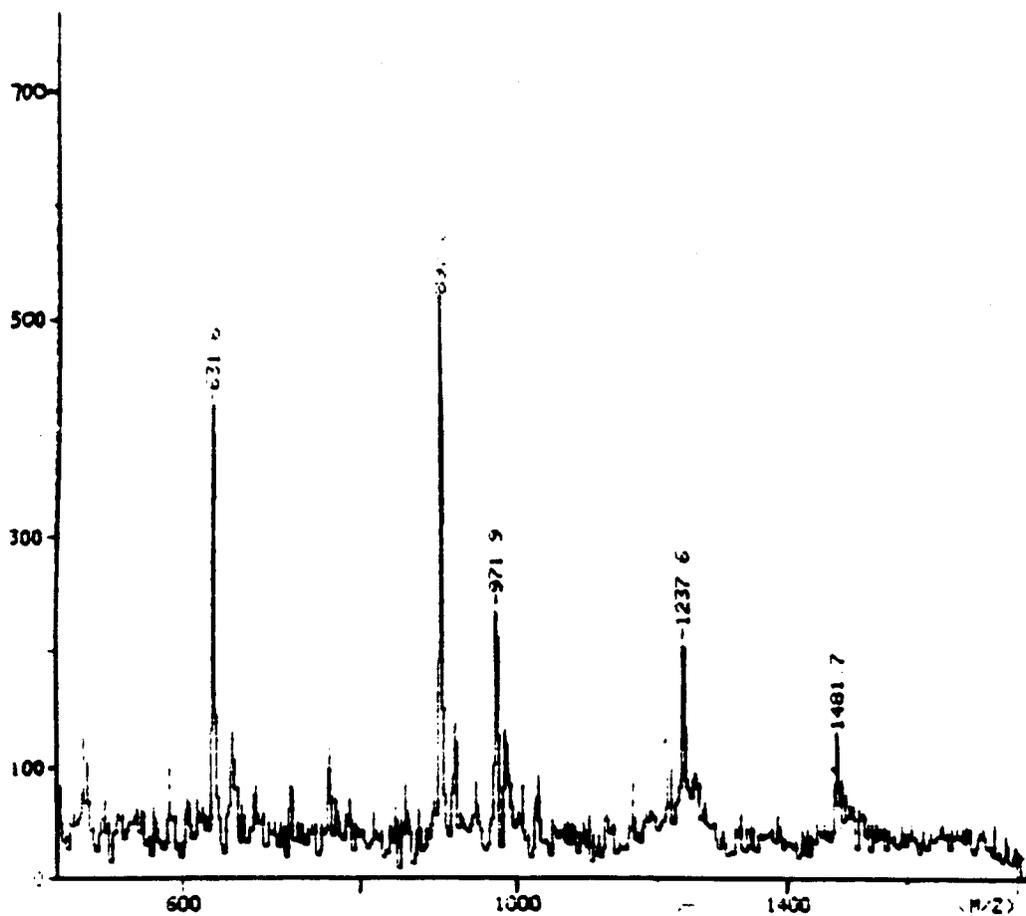


Figure 62 : spectre de masse n°1 (TOF) du composé 94 ($(M + H)^+ = 971,9$; $(M + Pmc + H)^+ = 1237$; $(M + trityle + Pmc + 2H)^+ = 1481,7$)

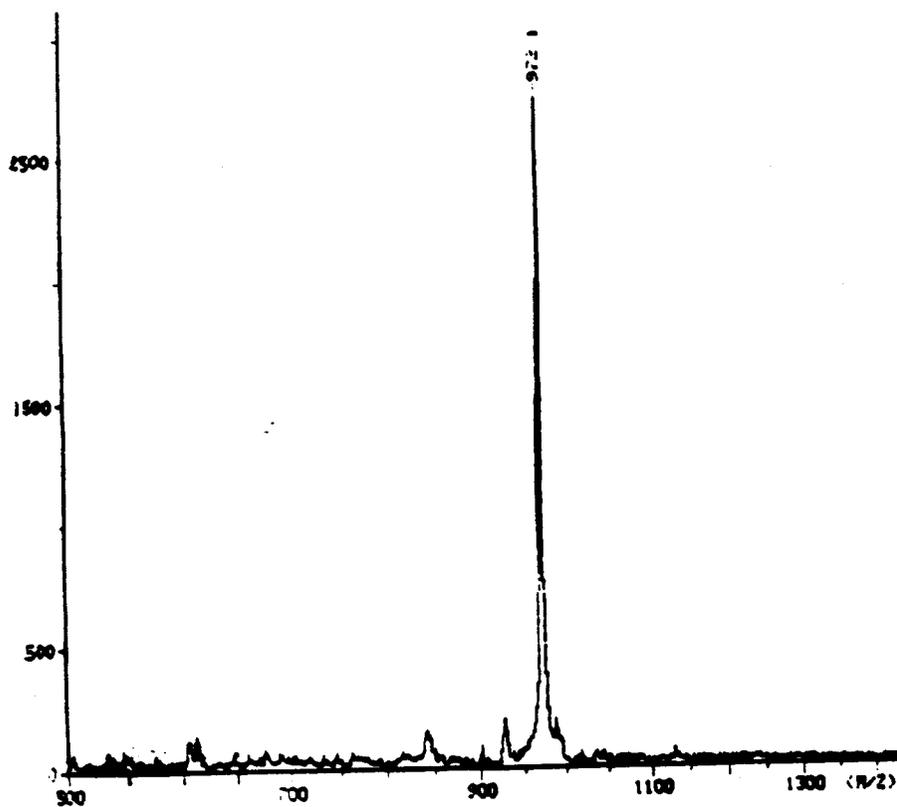


Figure 63 : spectre de masse n°2 (TOF) du composé 94 ($(M + H)^+ = 972,1$)

6. Tests d'inhibition

6.1. Résultats

L'activité du mime ATP (55), des mimes substrat (90 à 93) et des composés bisubstrat (94 à 97) a été évaluée vis à vis de la phosphorylation des histones H3 pour la PKC et des histones H2A pour la PKA. Les IC₅₀ obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 29 : inhibition des protéines Ser/Thr kinases par les composés 90 à 97

avec X :	peptides	IC ₅₀ PKC (μM)	IC ₅₀ PKA (μM)
		55(a)	5
90(b) : AFRR		inactif	inactif
91(b) : SFRR		inactif	inactif
92(b) : RNAFRR		inactif	inactif
93(b) : RNSFRR		375	375
94(c) : X-AFRR		25	50
95(c) : X-SFRR		25	30
96(c) : X-RNAFRR		10	20
97(c) : X-RNSFRR		15	20

(a) mime ATP ; (b) mime substrat ; (c) structures bisubstrat

Ces résultats montrent que les mimes substrat (90-93) sont totalement inactifs alors que les composés bisubstrat correspondants (94-97) sont de bons inhibiteurs et ceci quelque soit l'enzyme. Concernant la PKC, les résultats obtenus peuvent paraître normaux dans la mesure où même si les mimes substrat ne présentent aucune affinité pour l'enzyme, le mime ATP (55) présente lui une bonne affinité (IC₅₀ = 5 μM). Pour la PKA, les résultats sont par contre surprenants. En effet, le tableau 29 montre clairement qu'à partir d'un mime substrat et d'un mime ATP (55) qui ne présente

qu'une faible affinité ($IC_{50} = 150 \mu M$), il est possible d'observer une bonne affinité lorsque ces deux mimes sont réunis sous la forme d'un composé bisubstrat. Il est aussi intéressant de remarquer que le remplacement Ala/Ser (en position phosphorylable) n'a aucune influence sur l'activité inhibitrice. Le composé bisubstrat **96** qui est le plus actif de la série a fait l'objet d'une étude détaillée.

Mode d'action du composé **96** pour la PKC-Evaluation du K_i

Nous avons donc effectué des compétitions avec les deux substrats de l'enzyme : histones et ATP.

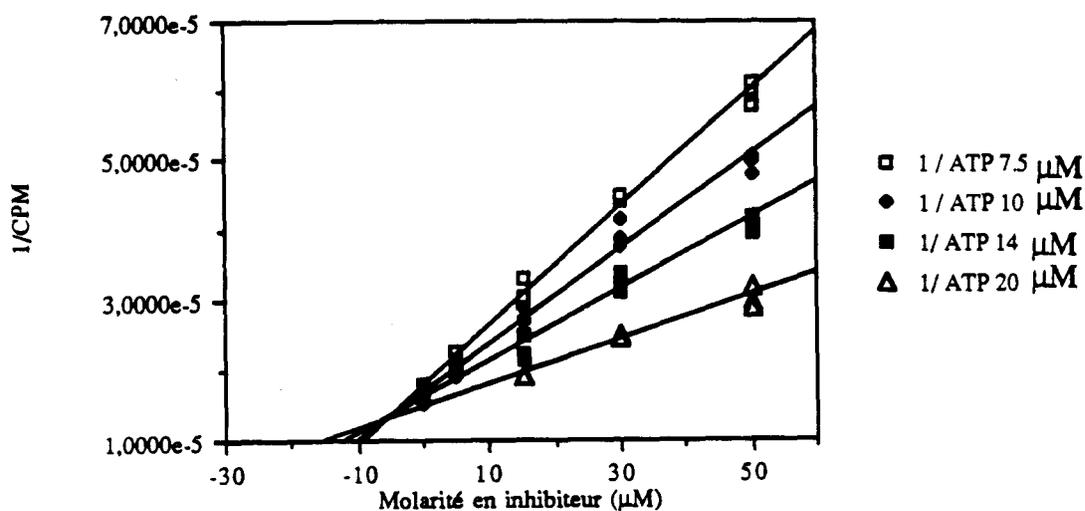


Figure 64 : compétition composé **96**/ATP- Détermination du K_i pour la PKC.

Le K_i du composé **96** a été évalué selon la méthode de Dixon pour des concentrations d'ATP variables. L'inhibiteur s'est révélé compétitif vis à vis de l'ATP. Le K_i obtenu est de $5 \mu M$ pour la PKC (figure 64).

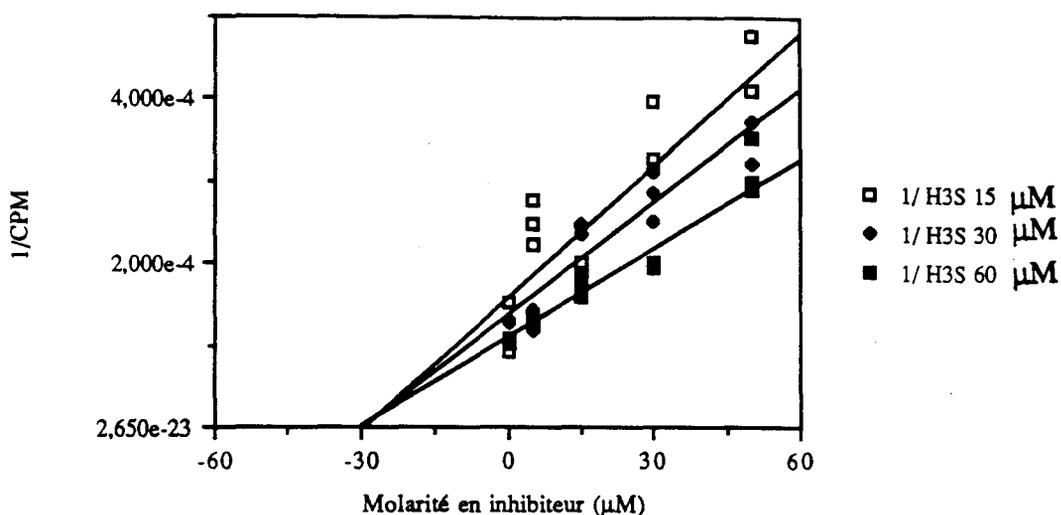


Figure 65 : compétition composé 96/histones H3S

La figure 65 suggère une inhibition non compétitive du composé 96 vis à vis des histones H3S.

Mode d'action du composé 96 pour la PKA-Détermination du K_i

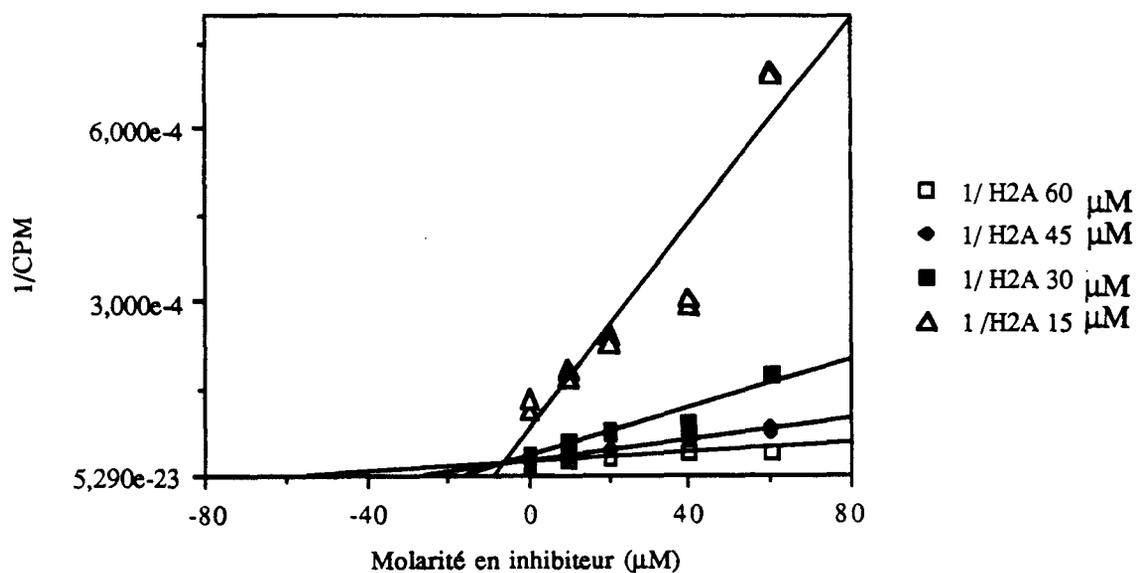


Figure 66 : compétition composé 96/histones H2A



Le K_i du composé **96** a été évalué selon la méthode de Dixon pour des concentrations de substrats variables. L'inhibiteur s'est révélé compétitif vis à vis des histones ΠA . Le K_i obtenu est de $10 \mu M$ pour la PKA (figure 66).

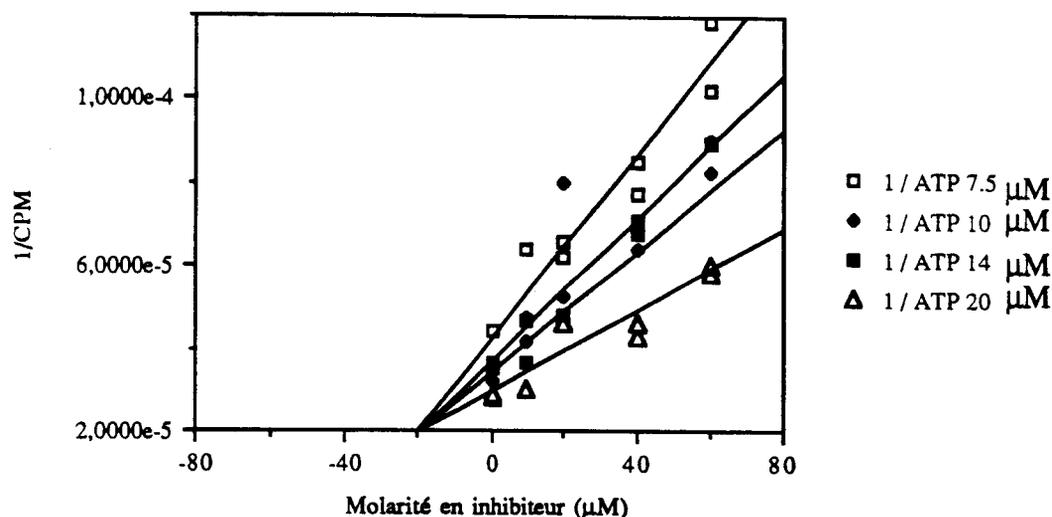


Figure 67 : compétition composé 96/ATP- Détermination du K_i pour la PKA

La figure 67 suggère une inhibition non compétitive du composé **96** vis à vis de l'ATP.

6.2. Discussion

Avant de discuter les résultats assez surprenants obtenus pour les inhibiteurs bisubstrat, il est important de signaler que des résultats tout aussi surprenants ont été mis en évidence pour les différents mimes ATP. Le composé **55** par exemple présente un bon pouvoir inhibiteur pour la PKC ($IC_{50} = 5 \mu M$) mais est faiblement actif au niveau de la PKA ($IC_{50} = 150 \mu M$) ce qui est inattendu dans la mesure où les sites ATP des deux enzymes sont très homologues (paragraphe 3). Ce résultat démontre donc que très probablement les mimes ATP n'agissent pas de la même façon au niveau des deux enzymes. Ces mimes ATP peuvent donc très bien se fixer à des endroits différents au niveau de la PKA et de la PKC, entraînant des interactions également différentes. Dans le cas de la PKC, les mimes ATP interagissent très certainement au niveau de l'enzyme en occupant partiellement le site ATP ou tout au moins à proximité du site ATP en gênant fortement la fixation du nucléotide. Dans le cas de la PKA, cette hypothèse est peu vraisemblable. Il nous a alors paru important de rechercher un ou plusieurs modes d'action possibles des mimes ATP de manière à pouvoir expliquer de manière rationnelle les résultats obtenus. Le mode d'action que nous proposons et qui est présenté dans les

figures 68a et 68b permet aussi, on le verra ultérieurement, d'expliquer les résultats obtenus pour les inhibiteurs bisubstrat.

La figure 68a montre qu'à proximité du site ATP et du site substrat de la PKA, il existe trois acides aminés respectivement Leu 82, Lys 83 et Gln 84 qui pourraient être responsables des différences d'activité observées au niveau des deux enzymes. Dans la PKC, ces trois acides aminés sont en effet remplacés par trois acides aspartiques respectivement Asp 82, Asp 83, et Asp 84. La figure 68b présente un mode d'action possible du mime ATP **55** au niveau de la PKC. D'après cette figure, l'azote terminal de la chaîne 1,7 diaminoheptane du mime ATP serait impliqué dans des interactions ioniques avec les groupements carboxylates de ces acides aspartiques. Le noyau indole pourrait dans ce cas par effet hydrophobe se placer au niveau du site ATP par analogie à ce qui est observé pour la base adénine de l'ATP. Selon ce mode d'interaction, le composé **55** pourrait apparemment interagir au niveau du site du nucléotide sans entrer en compétition avec le substrat peptidique lorsque celui-ci se fixe à l'enzyme et serait donc un bon mime ATP pour la PKC comme le démontre les résultats des tests d'inhibition (chapitre 3 - partie 2). Ces résultats ont permis par exemple de mettre clairement en évidence l'importance de la présence d'une chaîne basique en position -2 du cycle maléimide (chaînes aminées, groupement guanidinium) pour l'inhibition de la PKC.

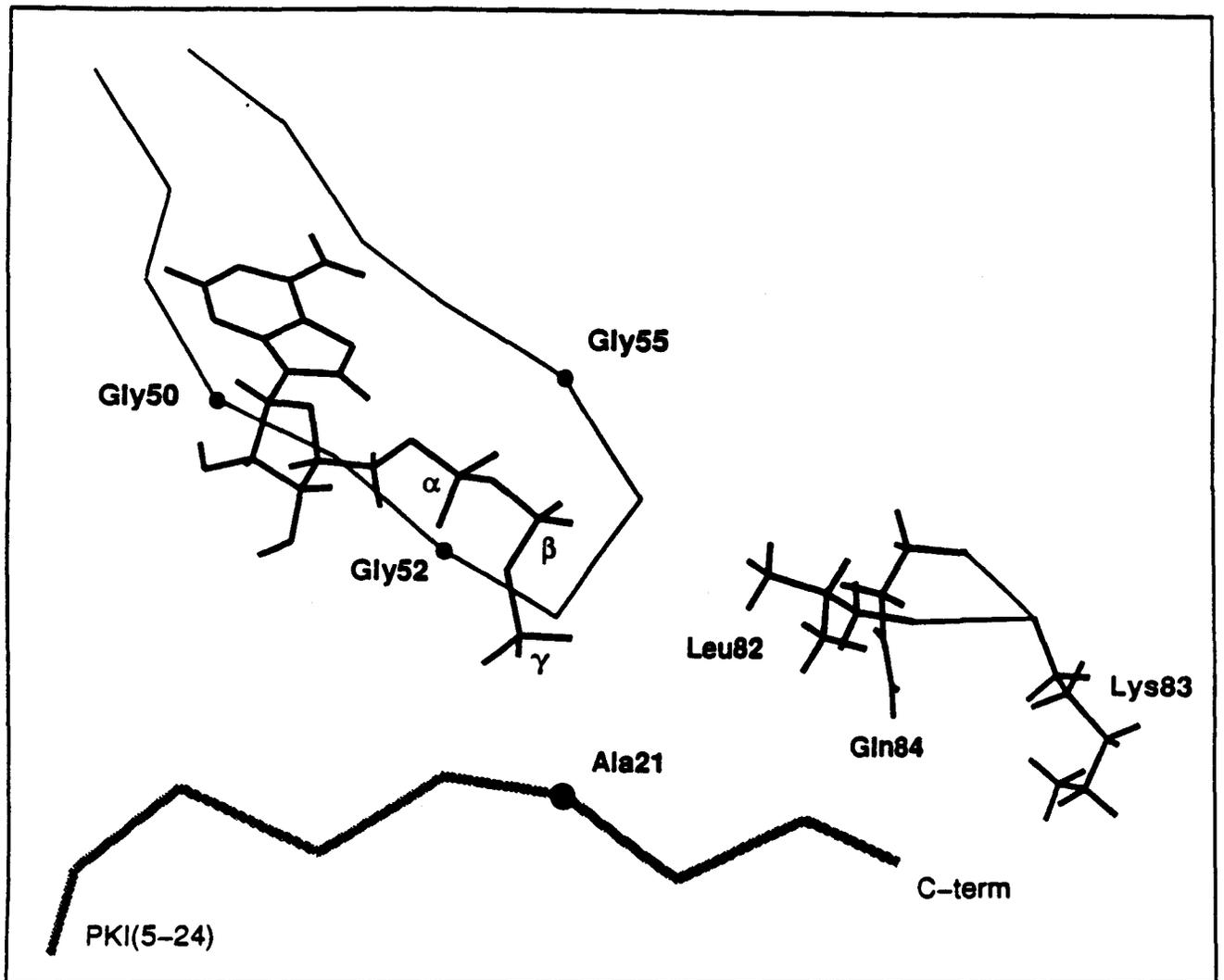


Figure 68 a : Vue montrant la molécule d'ATP dans son site de la PKA ainsi qu'une partie du peptide inhibiteur PKI (5-24) d'après la structure 3D du complexe PKA-ATP-PKI(5-24). Sont également représentés les acides aminés Leu 82, Lys 83 et Gln 84 qui se situent à proximité du site ATP et de la partie C-terminale du peptide inhibiteur.

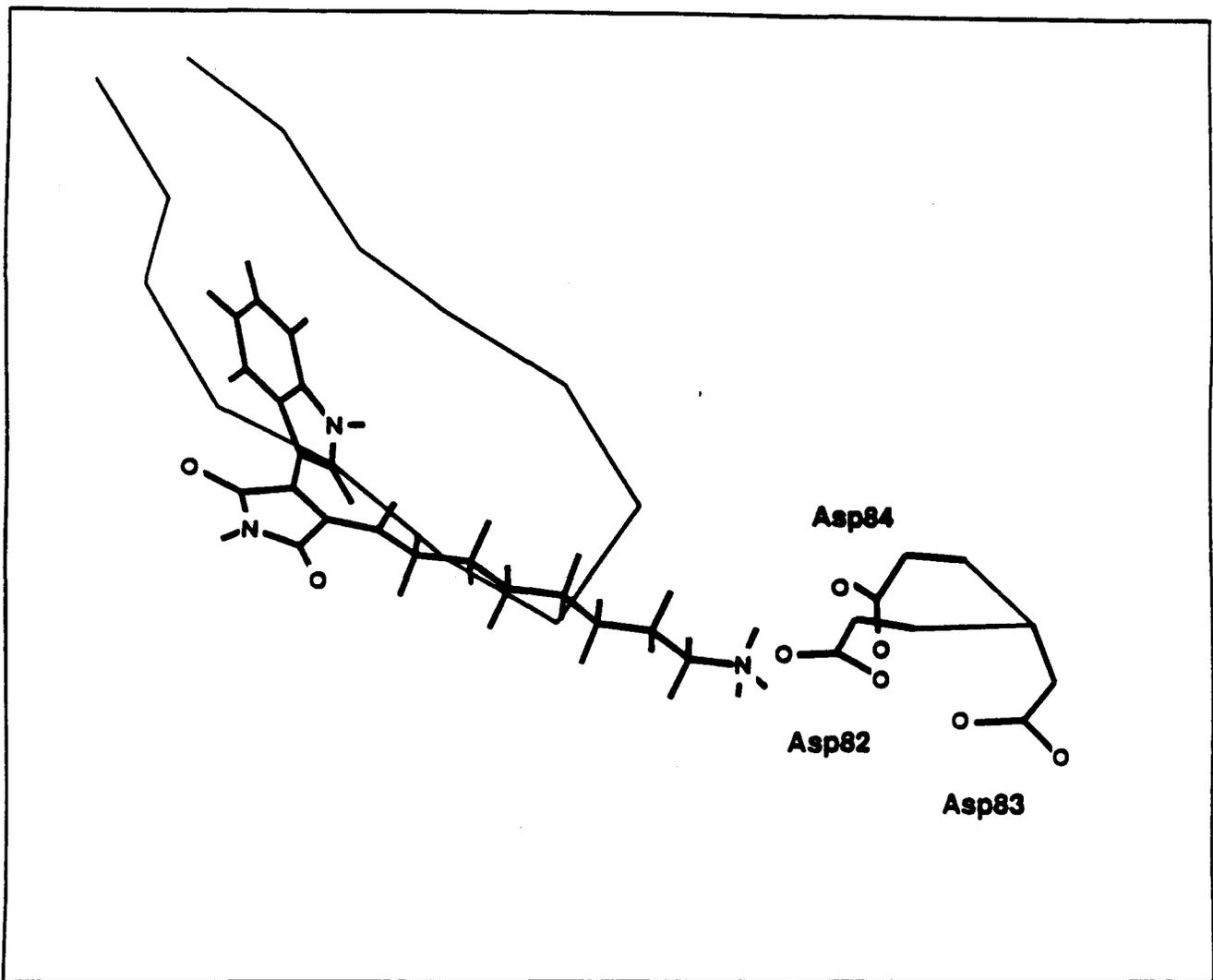
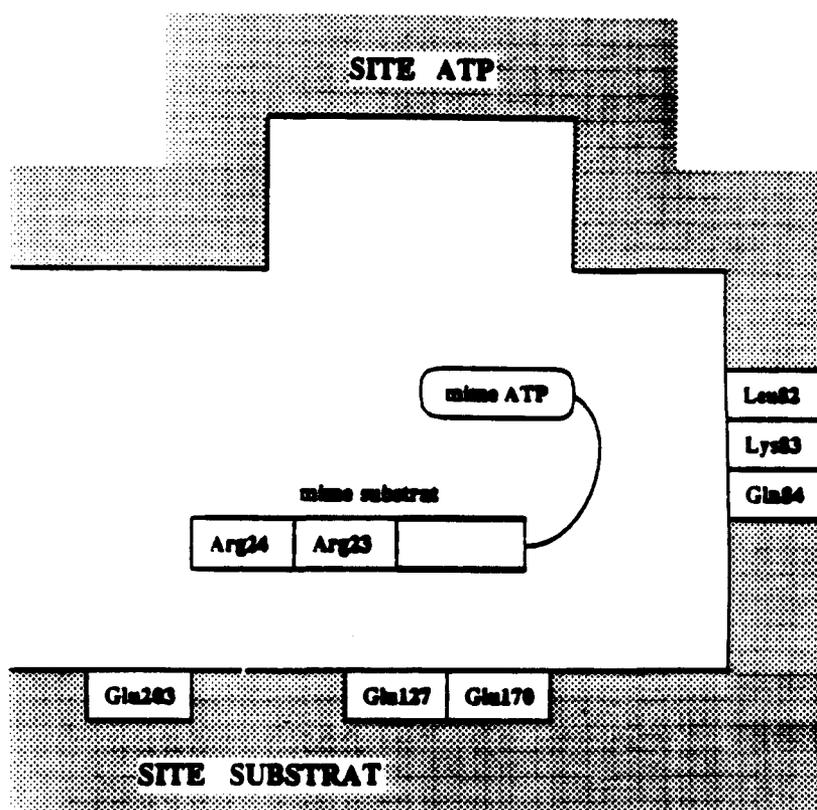
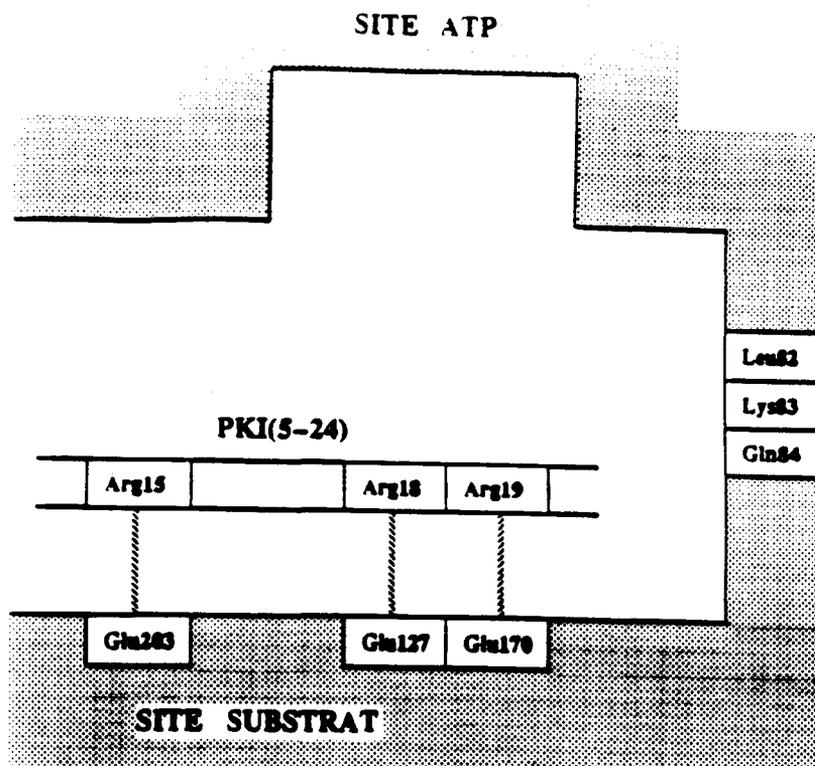


Figure 68b : Vue montrant le mime ATP 55 en interaction au niveau du site de reconnaissance du nucléotide dans la PKC tel que cela peut être prédit à partir de la structure 3D du complexe PKA-ATP-PKI (5-24). Sont également représentés les acides aminés Asp 82, Asp 83 et Asp 84 de la PKC qui remplacent respectivement les acides aminés Leu 82, Lys 83 et Gln 84 de la PKA.

En ce qui concerne les mimes substrat tétrapeptidiques (composés **90-91**) et hexapeptidiques (composés **92-93**), le tableau 29 indique clairement qu'ils ne sont reconnus ni par la PKA ni par la PKC. Ce résultat est logique dans la mesure où ces peptides sont trop courts et ne comportent pas les motifs consensus minimaux de reconnaissance pour la PKA et pour la PKC.

La question qui pour l'instant reste entière est la suivante : comment un composé bisubstrat peut-il être actif alors que les mimes ATP et substrat qui le constituent pris séparément ne le sont pas? Le but du dernier paragraphe sera donc d'apporter une réponse à cette question.

Les résultats des tests d'inhibition montrent que les inhibiteurs bisubstrat **94-97** sont reconnus par la PKA alors que le mime ATP **55** et les mimes substrat correspondants **90-93** ne le sont pas. Ces composés bisubstrat agissent au niveau des deux enzymes selon deux modes différents, ce qui a été confirmé par les tests de compétition ATP et substrat. Ces tests indiquent nettement que l'inhibiteur bisubstrat le plus actif à la fois au niveau de la PKA et de la PKC (composé **96**), est compétitif ATP mais non compétitif des histones IIIS dans le cas de la PKC, et non compétitif ATP mais compétitif des histones IIA dans le cas de la PKA. Nous en avons déduit que les inhibiteurs bisubstrat pouvaient interagir au niveau de la PKC selon un mode analogue à celui proposé pour le mime ATP à la figure 68b. Selon ce mode d'action, les groupements guanidinium des arginines Arg 23 et Arg 24 (éventuellement Arg 19) du composé **96** interagiraient avec les trois acides aspartiques Asp 82, Asp 83 et Asp 84 et la partie mime ATP se retrouverait au niveau du site de reconnaissance du nucléotide. Le composé **96** pourrait également se fixer à l'enzyme sans interférer avec les substrats (histones IIIS pour la PKC). On peut en effet supposer qu'en interagissant au niveau de ces 3 acides aspartiques, la partie devant théoriquement mimer le substrat n'interagisse pas au niveau du site substrat. Toujours selon ce mode d'action, le remplacement des fonctions carboxylates terminales des différents mimes substrat par des fonctions carboxamides aurait peut être permis de gagner en affinité et en spécificité pour la PKC.



Dans la PKA, l'absence des 3 acides aspartiques remplacés respectivement par les acides aminés Leu 82, Lys 83 et Gln 84 suggérerait alors que les arginines Arg 23 et Arg 24 de la partie mime substrat puissent interagir avec les acides glutamiques Glu 127, Glu 170 et

Glu 203. Dans le complexe PKA-ATP-PKI(5-24), ces acides glutamiques sont impliqués dans des ponts ioniques avec les arginines 15, 18 et 19 du peptide inhibiteur.

7. Conclusion

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre était de concevoir des inhibiteurs spécifiques de la protéine kinase C susceptibles d'interagir simultanément au niveau du site ATP et du site substrat de cet enzyme. Cette approche "bisubstrat" s'est effectuée de façon rationnelle sur la base de la structure tridimensionnelle d'une protéine kinase très homologue, la protéine kinase A (PKA), et en utilisant les techniques de modélisation moléculaire. Les différents composés issus de cette étude ont été synthétisés et testés au niveau de la PKC et de la PKA.

Les tests d'inhibition ont montré que les composés bisubstrat étaient actifs au niveau des deux enzymes alors que prises séparément, les parties mime substrat étaient complètement inactives et que les parties mime ATP n'étaient reconnues que par la PKC. Les tests de compétition des différents inhibiteurs bisubstrat ont également montré qu'au niveau de la PKA ces composés étaient compétitifs substrat mais non compétitif ATP et qu'au niveau de la PKC le contraire se vérifiait. Une étude comparative PKA-PKC ayant mis clairement en évidence que les sites ATP et substrat de ces deux enzymes étaient homologues, ces résultats ne pouvaient alors s'expliquer que si les mimes ATP et les composés bisubstrat agissaient au niveau de la PKA et de la PKC selon des modes différents. Les modes d'action que nous avons proposés permettent d'expliquer de façon rationnelle les différences d'activité observées.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent de manière évidente que l'approche "bisubstrat" peut constituer une nouvelle voie d'investigation dans la recherche et la conception d'inhibiteurs spécifiques de la protéine kinase C. L'étude que nous avons menée montre également que la connaissance des structures tridimensionnelles des différents sites possibles de fixation au niveau des enzymes était essentielle et rendait indispensable l'utilisation des techniques de modélisation moléculaire.

CONCLUSION

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire était de concevoir puis de synthétiser des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) susceptibles d'interagir simultanément avec deux sites de reconnaissance du domaine catalytique de l'enzyme. L'association covalente de deux parties présentant respectivement une affinité élevée pour ces deux sites devait, à notre avis, accroître l'affinité globale de la molécule pour l'enzyme.

Notre étude a été menée selon deux approches. Dans une première partie, nos efforts se sont portés sur la préparation d'inhibiteurs bis-ATP. Ces inhibiteurs étaient supposés agir à la fois au niveau du site de fixation de l'ATP et d'un second site putatif. Nous nous sommes ensuite intéressés à des inhibiteurs associant dans une même structure une partie peptidique susceptible de se fixer sur le site substrat et une partie mimant la molécule d'ATP.

La comparaison de la structure primaire de différentes isoformes de la PKC a montré que la région conservée C₄ du domaine catalytique présentait un second site (putatif) de fixation de l'ATP. Nous avons par conséquent préparé des inhibiteurs bis-ATP, associant dans une même structure deux mimes ATP. Comme mime ATP, nous avons utilisé le N-[2-(5-isoquinoléine sulfonamido éthyl)]-3-aminopropionate de méthyle issu d'une précédente étude. La distance séparant ces deux sites n'étant pas évaluable, ces deux mimes ont été condensés par des bras espaceurs de longueur variable.

Les composés bis-ATP synthétisés sont de bons inhibiteurs. Néanmoins, les valeurs des constantes d'inhibition obtenues (de l'ordre de la micro-mole) étaient inférieures à celles escomptées, ce qui laissait supposer que l'inhibition ne s'effectuait pas par interaction simultanée au niveau des deux sites du domaine catalytique. La structure cristallographique du domaine catalytique de la protéine kinase A très homologue à la PKC, a montré par la suite que les deux sites étaient en fait trop éloignés.

Dans une deuxième partie, nous avons entrepris la synthèse d'inhibiteurs pouvant interagir simultanément au niveau du site ATP et du site substrat. Il nous a fallu, dans cette optique, concevoir des mimes ATP et substrat spécifiques de la PKC et les lier de façon covalente à l'aide d'un bras espaceur.

Pour élaborer une structure entrant directement en compétition avec le site ATP de la PKC, nous nous sommes inspirés de la structure de la staurosporine. Sur les deux

noyaux indoles de cet alcaloïde, un seul jugé à priori suffisant pour reconnaître le site ATP a été conservé. En remplacement du second, une chaîne aminée a été fixée. Cette chaîne a permis par la suite l'addition aisée de séquences peptidiques susceptibles de se fixer au niveau du site de reconnaissance du substrat. Différentes chaînes mono- ou polyamines ont ainsi été greffées par une réaction d'addition-élimination sur le 2-bromo-[1H-indol-3-yl]maléimide. En ce qui concerne la synthèse de ce dernier composé, le noyau indole a été introduit sous la forme d'un organo-métallique réagissant avec le 2,3-dibromomaléimide. Un mode original de protection temporaire rendu obligatoire dans le chemin de synthèse suivi a dû être mis au point pour le cycle maléimide. La protection de ce cycle par le groupement "trityle" et celle du noyau indole par le groupement "tert.butylloxycarbonyl" ont permis en dernier lieu, après un seul traitement acide, de libérer le mime ATP. Parmi les molécules synthétisées, plusieurs se sont révélées de bons inhibiteurs de la PKC avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de la micro-mole. Outre leur bonne affinité, ces molécules offrent une bonne sélectivité pour la PKC et sont compétitives de l'ATP.

Dans l'optique d'un inhibiteur bisubstrat, comme mime ATP, la structure 2-heptylamino-3-(1H-indol-3-yl)maléimide a été choisie. Il a été possible sur la base de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de la protéine kinase A et en utilisant les techniques de modélisation moléculaire, de concevoir des séquences peptidiques susceptibles de se fixer sur le site de reconnaissance du substrat. Ces peptides ont été synthétisés en phase hétérogène selon la méthode de Merrifield. En l'absence de données cristallographiques concernant la PKC, la distance site ATP / site substrat a été évaluée d'après la structure cristalline de la PKA.

L'association d'une séquence peptidique et d'un mime ATP nous a fourni de bons inhibiteurs de la PKC. Le composé le plus actif de la série présente un K_i de 5 μM. Malheureusement, ces inhibiteurs ne sont plus spécifiques de l'enzyme.

Les tests de compétition ont de plus clairement mis en évidence que dans le cas de la PKC, les inhibiteurs bisubstrat n'agissent que par interaction avec le site ATP de l'enzyme. En revanche pour la PKA, ces structures interagissent uniquement avec le site substrat. Nous avons donc été amené à proposer un mode d'interaction possible pour les composés bisubstrat et pour le mime ATP afin d'expliquer les différences d'activités observées.

A la vue de tous nos résultats, la conception et la synthèse d'autres bisubstrat potentiels pour la PKC pourraient être envisagées :

Il serait intéressant d'étudier des composés dans lesquels le mime ATP est greffé au niveau de la chaîne latérale d'un acide aminé, ce qui permettrait l'utilisation de peptides mime substrat beaucoup plus longs donc vraisemblablement plus spécifiques de l'enzyme. Dans ce cadre, afin d'augmenter la spécificité des inhibiteurs bisubstrat pour les différentes isoformes de la PKC, ces séquences peptidiques pourraient être choisies dans les régions pseudosubstrat spécifiques à chaque isoforme.

Partie expérimentale

Indications générales

Point de fusion

Les points de fusion (Pf) ont été mesurés à l'aide d'un appareil Büchi 530.

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été obtenus sur les appareils Riber 10-10 (70 eV) et Kratos Concept II NH en mode Fab (1 mA ; 7 Kv ; Xe).

Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AM 400 WB (^1H , 400 MHz).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. Les spectres sont décrits avec les abréviations suivantes : s = singulet ; d = doublet ; t = triplet ; q = quadruplet ; m = multiplet.

Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été effectuées par le service Central d'Analyses de Vernaison.

Chromatographie sur couche mince de silice

La pureté des différents produits a été vérifiée par chromatographie sur couche mince de silice (CCM ; gel de silice 60 F254 Merck ; détection à 254 nm).

Les chromatographies sont réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'une fine couche de silice. Les substances à analyser sont déposées en spot en bas de la plaque. Les points sont ensuite élués avec une phase mobile constituée d'un ou de plusieurs solvants organiques. Cette phase mobile doit être chimiquement inerte vis à vis de l'échantillon à analyser. Le choix de l'éluant est dicté par une échelle de polarité. Pour éluer, on place la plaque dans une chambre de développement contenant la phase mobile appropriée. Par effet capillaire, l'éluant se déplace progressivement sur la couche d'absorbant et sépare les différents constituants du mélange.

Chaque composé est caractérisé par son Rf dans un mélange de solvants donnés. Le Rf correspond au rapport entre la distance de migration du composé et la distance de migration du solvant.

Révélation par un marquage de fluorescence :

Ce type de révélation nécessite l'utilisation d'un gel de silice contenant un produit luminescent à 254 nM. Les substances qui absorbent la lumière UV apparaissent sous forme de taches foncées sur fond fluorescent vert-clair de la plaque.

Réactions de révélation :

On peut modifier, à l'aide de réactifs chimiques, une substance incolore en une substance colorée ou active à la lumière UV ; ceci est effectué soit par vaporisation d'un réactif spécifique sur la plaque soit par introduction de la plaque dans une cuve saturée de vapeurs de réactifs.

Révélation à la ninhydrine

La ninhydrine réagit spécifiquement avec les fonctions amines primaires. Après vaporisation du réactif ninhydrine sur la plaque (ninhydrine à 20 % (p/v) dans l'acétone), les fonctions amines primaires sont révélées après chauffage par l'apparition de taches rouges.

Révélation par le réactif de Reindel-Hoppe

Le réactif de Reindel-Hoppe permet la détection de fonctions amides et uréthanes. La révélation est réalisée selon le protocole suivant :

- Pulvérisation d'hypochlorite de sodium à 8 %.
- Neutralisation de l'excès par l'acide acétique à 20 %.
- Chauffage 1 minute à 110°C.
- Pulvérisation du mélange suivant en proportion 1/1 (v/v) :

* tétraméthyl-diaminodiphénylméthane (TDM) à 5 % (v/v) dans l'acide acétique à 20 %.

* iodure de potassium à 5 % dans l'eau distillée.

Les fonctions amides et uréthanes sont révélées par l'apparition de taches bleues foncées.

Révélation par l'acide trichloroacétique

La révélation de composés comportant un groupement trityle ou 4-méthoxytrityle se fait par pulvérisation d'une solution d'acide trichloroacétique (acide trichloroacétique à 30 % (p/v) dans le chlorure de méthylène). Les groupements trityle et 4-méthoxytrityle sont révélés par l'apparition de taches jaunes.

Chromatographie sur couche épaisse de silice

La purification des produits a été effectuée par chromatographie sur couche épaisse de silice (CCE ; gel de silice 60 PF254 Merck). Le principe est identique à celui de la chromatographie sur couche mince de silice. Cependant, il s'agit là d'une méthode préparative : le gel de silice est appliqué sur une plaque de verre sous forme de pâte d'épaisseur très régulière d'environ 0,3 mm. Après l'étendage, cette couche est séchée et éventuellement activée par chauffage à haute température. Après migration, les composés formant des taches sous rayonnement UV à différents niveaux peuvent être séparés et récupérés : grattage du gel de silice, extraction des différents produits à l'aide de divers solvants.

Préparation d'inhibiteurs bis-ATP



1. L'acide 5-isoquinoléine sulfonique : 1

L'acide 5-isoquinoléine sulfonique est obtenu selon la méthode de C. F. KOESCH [KOESCH et ALBERSON 1953].

L'isoquinoléine (47,5 ml ; 0,37 mole) est additionnée par fraction dans de l'oléum fumant (H_2SO_4 ; 110 ml). Après agitation du milieu réactionnel pendant 24 heures à 4 °C, de la glace est alors additionnée. Le précipité blanc ainsi obtenu est alors filtré sur verre fritté de porosité 4, lavé par de l'eau glacée et stocké dans un dessiccateur sur P_2O_5 .

Formule moléculaire(+ H_2SO_4) : $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_7\text{S}_2$.

MM = 307 g/mol.

Rdt = 50 %.

2. Le chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle : 2

La préparation du chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle est réalisée selon la méthode proposée par A. MORIKAWA [MORIKAWA 1989].

On porte à reflux pendant 3 heures l'acide 5-isoquinoléine sulfonique (30 g ; 0,1 mmole), le chlorure de thionyle (100 ml ; 1,37 mole) et la N, N-diméthylformamide (0,8 ml). La réaction est contrôlée par CCM. L'excès de chlorure de thionyle est éliminé par distillation. Le précipité jaune alors obtenu est filtré sur verre fritté de porosité 4 et lavé par du chlorure de méthylène.

Formule moléculaire: $\text{C}_9\text{H}_6\text{NClO}_2\text{S}$.

Formule moléculaire(+ HCl): $\text{C}_9\text{H}_7\text{NCl}_2\text{O}_2\text{S}$.

MM = 227,67 g/mol.

MM (+ HCl) = 263 g/mol.

Rdt = 90 %.

3. N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide : 3

A une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (3,69 g ; 43,9 mmole), on ajoute rapidement le chlorure de 5-isoquinoléine sulfonyle (10 g ; 43,9 mmole). La solution aqueuse est alors reprise par du chlorure de méthylène (100 ml). Après extraction, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Elle est ensuite additionnée goutte à goutte à une solution d'éthylène diamine (14,68 ml ; 2,19 mmole) dans le chlorure de méthylène (2 ml). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 1 heure et contrôlé par CCM. Après extraction et séchage sur sulfate de sodium

de la phase organique, le solvant est évaporé jusqu'à l'obtention d'une huile qui cristallise dans l'éther de pétrole.

Formule moléculaire: $C_{11}H_{13}N_3O_2S$.

MM = 251,3 g/mol.

Pf = 104°C.

Rdt = 30 %.

Rf = 0,25 (méthanol-acétate d'éthyle (33-67 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%S	%O
théo	52,57	5,21	16,72	12,76	12,74
exp	52,07	5,21	16,42	12,56	

4. N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-amino propionate de méthyle : 4

Le 3-bromopropionate de méthyle (0,308 ml ; 2,83 mmole) et la triéthylamine (0,787 ml ; 5,65 mmole) sont additionnés à une solution de N-[2-aminoéthyl]-5-isoquinoléine sulfonamide (0,71 g ; 2,83 mmole) dans du méthanol (30 ml). Le milieu réactionnel, sous agitation, est porté à reflux pendant 4 heures. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par un mélange chlorure de méthylène (30 ml)-eau (30 ml). La phase organique séchée sur sulfate de sodium, fournit après évaporation, un résidu huileux qui cristallise dans l'éther de pétrole.

Formule moléculaire: $C_{15}H_{19}N_3O_4S$.

MM = 337 g/mol.

Rdt = 95 %.

Pf = 105°C.

Rf = 0,3 (méthanol-acétate d'éthyle (33-67 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%S	%O
théo	53,40	5,67	12,45	9,50	18,98
exp	53,11	5,80	12,28	9,79	

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 338$.

RMN 1H (acétone d_6) δ (ppm) : 2,3 (t, 2H, CH_2COOCH_3) ; 2,4 (m, 4H, CH_2-NH) ; 3 (m, 2H, $CH_2-NH-SO_2$) ; 3,62 (s, 3H, $COOCH_3$) ; 7,7 (t, 1H, isoquinoléine) ; 8,2-8,7 (m, 4H, isoquinoléine) ; 9,3 (s, 1H, isoquinoléine).

5. L'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique : 5

Le N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionate de méthyle (2,57 g ; 7,6 mmole) et quelques pastilles de soude (1,5 g) sont dissous dans du méthanol (40 ml). Le milieu réactionnel est alors porté à reflux pendant 30 minutes. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par de l'eau (50 ml), et par ajout d'HCl (1N), la solution est acidifiée jusqu'à l'obtention d'un pH égal à 1. Après évaporation de la phase aqueuse, le résidu est dissous dans de l'éthanol (50 ml), le précipité de NaCl obtenu est alors éliminé. L'évaporation du solvant fournit une huile qui cristallise dans l'acétone.

Formule moléculaire: $C_{14}H_{17}N_3O_4S$.

Formule moléculaire(+ 2 HCl): $C_{14}H_{19}N_3O_4SCl_2$.

MM = 323,06 g/mol.

MM (+ 2 HCl) = 396,29 g/mol.

Rdt = 92 %.

Pf = 182°C.

Rf = 0,05 (méthanol-acétate d'éthyle (33-67 v/v)).

6. L'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butylloxycarbonyl-3-aminopropionique : 6

Le pyrocarbonate de di-tert.butyle (7,62 g ; 35 mmole) est additionné à une solution d'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-3-aminopropionique (4,6 g ; 11,6 mmole) dans un mélange alcool tert.butylique (26 ml)-hydrogénocarbonate de potassium (12,5 ml). Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 12 heures. Le pH de la solution est maintenu entre 8 et 9 par ajout de carbonate de sodium 1N. Après évaporation du solvant, on revient à pH égal à 2,5 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique 1N, il se forme alors à la surface une masse huileuse que l'on dissout dans de l'acétate d'éthyle (50 ml). Après extraction de la phase organique et séchage sur sulfate de sodium, l'évaporation du solvant fournit une huile qui est purifiée par CCE.

Formule moléculaire: $C_{19}H_{25}N_3O_6S$.

Formule moléculaire(+ HCl): $C_{19}H_{26}ClN_3O_6S$.

MM = 423 g/mol.

MM (+ HCl) = 459 g/mol.

Rdt = 60 %.

Pf = 52°C.

Rf = 0,1 (acétate d'éthyle).

Analyse :	%C	%H	%N	%S	%O
théo	49,61	5,67	9,13	6,97	28,62
exp	47,60	5,64	8,36	6,01	

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 424.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,35 (s, 9H, t-butyl) ; 2,4-3,2 (8H, m, CH₂-NH) ; 7,8 (1H, t, isoquinoléine) ; 8,3-8,6 (4H, m, isoquinoléine) ; 9,4 (1H, m, isoquinoléine).

7. N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butyl oxycarbonyl-3-aminopropionate de N-hydroxysuccinimide : 7

L'acide N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butyl oxycarbonyl-3-aminopropionique (1,3 g ; 3 mmole) et la N-hydroxysuccinimide (0,345 g ; 3 mmole) sont dissous dans le chlorure de méthylène (50 ml). Après avoir refroidi la solution dans un bain de glace, la dicyclohexylcarbodiimide (0,618 g ; 3 mmole) est alors additionnée. Le milieu réactionnel est maintenu à 0°C pendant 12 heures. Après filtration de la dicyclohexylurée sur verre fritté de porosité 4 et évaporation du chlorure de méthylène, le N-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N-tert.butyl oxycarbonyl-3-aminopropionate de N-hydroxysuccinimide obtenu est traité directement.

Formule moléculaire: C₂₃H₂₈N₄O₈S.

MM = 520,56 g/mol.

Rdt = 81 %.

Pf = 80°C.

Rf = 0,4 (chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

8. Synthèse des composés 8, 9 et 10

La préparation des composés 9 et 10 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du produit 8.

8.1. Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N'-tert. butyloxycarbonyl-3-aminopropionamide]-N-métaxylène : 8

La solution de métaxylène diamine (100 μ l ; 0,75 mmole) dans le chlorure de méthylène (200 ml) est additionnée goutte à goutte à la solution de N-[2-(5-isoquinoléine sulfonamidoéthyl)]-N-tert.butyloxycarbonyl-3-aminopropionate de N-hydroxy-succinimide (0,795 g ; 1,5 mmole) dans le chlorure de méthylène (10 ml). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Après extraction de la phase organique et séchage sur sulfate de sodium, l'évaporation du solvant fourni un résidu qui est repris par un minimum de méthanol. On note alors la formation d'un précipité blanc de N-hydroxysuccinimide. Après filtration du précipité ainsi obtenu sur verre fritté de porosité 4, le filtrat est déposé sur des plaques de silice pour purification en chromatographie sur couche épaisse de silice.

Formule moléculaire: $C_{46}H_{58}N_8O_{10}S_2$.

MM = 946 g/mol.

Rdt = 20 %.

Pf = 104°C avec DEC.

Rf = 0,35 (chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%S	%O
exp	57,45	6,30	11,29	6,56	
théo	58,33	6,17	11,83	6,77	16,9

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 947.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,35 (s, 18H, t-butyl) ; 2,45 (t, 4H, CH₂-C(=O)NH) ; 3,01 (t, 4H, CH₂-NRC(=O)O) ; 3,25 (t, 4H, CH₂-NR-C(=O)O) ; 3,3 (t, 4H, CH₂-NH₂SO₂) ; 4,3 (d, 4H, benzyl) ; 7,2 (m, 4H, benzène) ; 7,8 (t, 2H, isoquinoléine) ; 8,3-8,6 (m, 8H, isoquinoléine) ; 9,4 (s, 2H, isoquinoléine).

8.2. Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N'-tert. butyloxycarbonyl-3-aminopropionamide]-N-paraxylène : 9

Formule moléculaire: $C_{46}H_{58}N_8O_{10}S_2$.

MM = 946 g/mol.

Rdt = 20 %.

Pf = 110°C avec DEC.

Rf = 0,55 (chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%S	%O
exp	56,11	6,30	10,64	6,05	
théo	58,33	6,17	11,83	6,77	16,9

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 947.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,35 (s, 18H, t-butyl) ; 2,45 (t, 4H, CH₂-C(=O)NH) ; 3,1 (t, 4H, CH₂-NRC(=O)O) ; 3,25 (t, 4H, CH₂-NR-C(=O)O) ; 3,3 (t, 4H, CH₂-NH₂SO₂) ; 4,3 (d, 4H, benzyl) ; 7,2 (s, 4H, benzène) ; 7,8 (t, 2H, isoquinoléine) ; 8,3-8,6 (m, 8H, isoquinoléine) ; 9,4 (s, 2H, isoquinoléine).

8.3. Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamidoéthyl)]-N'-tert. butyloxycarbonyl-3-aminopropionamide]-N-dodécane : 10

Formule moléculaire : C₅₀H₇₄N₈O₁₀S₂.

MM = 1010 g/mol.

Rdt = 25 %.

Pf = 58°C.

Rf = 0,59 (chlorure de méthylène-méthanol (95-5 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%S	%O
exp	58,10	7,50	10,96	6,73	
théo	59,38	7,37	11,08	6,34	15,83

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 1011.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,2 (16 H, -(CH₂)₈) ; 1,35 (s, 18H, t-butyl) ; 1,4 (t, 4H, CH₂-CH₂-C(=O)NH) ; 2,4 (t, 4H, CH₂-C(=O)NH) ; 3,05 (t, 4H, CH₂-NHC(=O)) ; 3,1 (t, 4H, CH₂-NRC(=O)O) ; 3,25 (t, 4H, CH₂-NR-C(=O)O) ; 3,3 (t, 4H, CH₂-NH₂SO₂) ; 7,8 (t, 2H, isoquinoléine) ; 8,3-8,6 (m, 8H, isoquinoléine) ; 9,4 (s, 2H, isoquinoléine).

9. Synthèse des composés bis-ATP (11, 12 et 13)

La préparation des composés 12 et 13 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du dérivé 11.

9.1. Trifluoroacétate de Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamido éthyl)]-3-aminopropionamide]-N-métaxylène : 11

Le composé **9** (0,140 g ; 0,15 mmole) est dissous dans une solution d'acide trifluoroacétique à 50 % dans le chlorure de méthylène. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 minutes. Après évaporation du solvant, le résidu est lavé trois fois à l'éther éthylique.

Formule moléculaire: $C_{36}H_{42}N_8O_6S_2$.

Formule moléculaire (+ 4 CF_3COOH) : $C_{44}H_{46}N_8F_{12}O_{14}S_2$.

MM = 746 g/mol.

MM (+ 4 CF_3COOH) = 1203 g/mol.

Rdt = 53 %.

Pf = 200°C.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 747$.

RMN 1H (D_2O) δ (ppm) : 2,8 (t, 4H, $CH_2-C(=O)NH$) ; 3,3 (s, 8H, CH_2-N-) ; 3,4 (t, 4H, CH_2-NHSO_2) ; 4,4 (s, 4H, benzyl) ; 7,3 (m, 4H, benzène) ; 8,2 (t, 2H, isoquinoléine) ; 8,8-9 (m, 8H, isoquinoléine) ; 9,8 (s, 2H, isoquinoléine).

9.2. Trifluoroacétate de Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamido éthyl)]-3-aminopropionamide]-N-paraxylène : 12

Formule moléculaire: $C_{36}H_{42}N_8O_6S_2$.

Formule moléculaire (+ 4 CF_3COOH) : $C_{44}H_{46}N_8F_{12}O_{14}S_2$.

MM = 746 g/mol.

MM (+ 4 CF_3COOH) = 1203 g/mol.

Rdt = 55 %

Pf = 195°C.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 747$.

RMN 1H (D_2O) δ (ppm) : 2,8 (t, 4H, $CH_2-C(=O)NH$) ; 3,3 (s, 8H, CH_2-N-) ; 3,4 (t, 4H, CH_2-NHSO_2) ; 4,4 (s, 4H, benzyl) ; 7,3 (s, 4H, benzène) ; 8,2 (t, 2H, isoquinoléine) ; 8,8-9 (m, 8H, isoquinoléine) ; 9,8 (s, 2H, isoquinoléine).

9.3. Trifluoroacétate de Bis [N'-[2-(5-isoquinoléinesulfonamido éthyl)]-3-aminopropionamide]-N-dodécane : 13

Formule moléculaire: $C_{40}H_{58}N_8O_6S_2$.

Formule moléculaire(+ 4 CF_3COOH) : $C_{48}H_{62}N_8F_{12}O_{14}S_2$.

MM = 810 g/mol.

MM (+ 4 CF_3COOH) = 1266 g/mol.

Rdt = 37 %

Pf = 135°C.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 811$.

RMN 1H (D_2O) δ (ppm) : 1,2 (s, 16H, $(CH_2)_8$) ; 1,6 (s, 4H, $CH_2-CH_2-NHC(=O)$) ; 2,8 (t, 4H, $CH_2-C(=O)NH$) ; 3,2 (t, 4H, $CH_2-NH-C(=O)$) ; 3,3 (s, 8H, CH_2-N-) ; 3,4 (t, 4H, CH_2-NHSO_2) ; 8,2 (t, 2H, isoquinoléine) ; 8,8-9 (m, 8H, isoquinoléine) ; 9,8 (s, 2H, isoquinoléine).

Préparation d'inhibiteurs bisubstrat

Pour des raisons de clarté, nous n'avons utilisé la nomenclature officielle que dans la partie expérimentale. Les deux nomenclatures sont détaillées dans l'annexe 1.

I. Synthèse d'inhibiteurs PKC réalisée en phase homogène

1. 3,4-dibromo-2,5-furandione : 14

Le 3,4-dibromo-2,5-furandione est obtenu selon la méthode de J. P. BROWN [BROWN 1966].

Le 2,5-furandione (10 g ; 0,1 mole), le bromure d'aluminium (0,306 g ; 1,1 mmole) et le brome (10,5 ml ; 0,2 mole) sont portés à reflux pour une durée de 6 heures à 130°C. Après distillation sous pression réduite, le 3,4-dibromo-2,5-furandione est obtenu à l'état pur avec un rendement de 80 %.

Formule moléculaire : C₄Br₂O₃.

MM = 256 g/mol.

Rdt = 80 %.

2. 3,4-dibromo pyrrole-2,5-dione : 15

Le 3,4-dibromo pyrrole-2,5-dione est préparé selon la méthode de J. A. ELVIDGE [ELVIDGE 1957].

Le 3,4-dibromo-2,5-furandione (10 g ; 39 mmole) et l'urée (3,5 g ; 58 mmole) sont portés à la température de 80°C pendant 2 heures. Après refroidissement de la solution, le milieu réactionnel est repris par de l'eau glacée (100 ml), le précipité obtenu est alors filtré sur verre fritté de porosité 4, puis purifié par CCE.

Formule moléculaire : C₄HBr₂NO₂.

MM = 255 g/mol.

Rdt théo = 15 % ; Rdt exp = 20 %.

Pf théo = 225 °C ; Pf exp = 225°C.

Rf = 0,57 (éther de pétrole-éther (70-30 v/v)).

Rf = 0,71 (chlorure de méthylène-acétone (95-5 v/v)).

Br) - (trityle)⁺ = 254 (1,86 %) ; M⁺ (2 ⁷⁹Br) - (trityle)⁺ = 252 (0,62 %) ; (trityl)⁺ = 243 (59,05 %) ; (C₆H₅)⁺ = 77 (100 %) ; (C₄H₃)⁺ = 51 (82,61%).

Analyse :	%C	%H	%N	%O
exp.	55,95	3,14	2,87	
théo	55,56	3,04	2,82	6,43

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 7,2-7,3 (massif, 9H, H du groupement trityle) ; 7,5 (d, 6H, H du groupement trityle).

4.2. 3,4-dibromo-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione : 32

Quantités :

3,4 dibromo pyrrole-2,5-dione : 1 g ; 3,92 mmole ; chlorure de 4 méthoxytrityle : 5,31 g ; 15,68 mmole ; triéthylamine : 3,82 ml ; 27,44 mmole.

Formule moléculaire : C₂₄H₁₇Br₂NO₃.

MM = 527 g/mol.

Rdt = 40 %.

Rf = 0,6 (éther de pétrole-éther (85-15 v/v)).

Révélation acide trichloroacétique : positif.

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 528 ; M⁺ = 527 ; (4-méthoxytrityle)⁺ = 273.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 3,7 (s, 3H, CH₃-O-R-) ; 6,8 (d, 2H, H du groupement trityle) ; 7,1-7,4 (m, 12H, H du groupement trityle).

5. Synthèse des composés 17, 33 et 37

La préparation des produits 33 et 37 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du composé 17.

5.1. 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 17

Après avoir recouvert les copeaux de magnésium (0,406 g ; 14,84 mmole) d'un minimum de tétrahydrofurane fraîchement distillé, on additionne le bromoéthane (1,24 ml ; 14,84 mmole). A cette solution de bromure d'éthyl magnésium, on ajoute une solution d'indole (1,95 g ; 14,84 mmole) dans le toluène (10 ml). Le milieu réactionnel est alors maintenu à 40°C pendant 45 minutes. Une solution de 3,4-dibromo-1-méthyl pyrrole-2,5-dione (1 g ; 3,71 mmole) dans le toluène (40 ml) est alors additionnée goutte à goutte. Le magnésien est maintenu 2 heures à température ambiante. Après refroidissement du milieu réactionnel, le magnésien est neutralisé par ajout d'acide

citrique à 20 % (p/v) dans l'eau. La phase organique est ensuite reprise par un mélange acétate d'éthyle (40 ml)-eau (40 ml). La phase organique séchée sur sulfate de sodium fournit, après évaporation, une huile qui est alors purifiée par CCE.

Formule moléculaire : $C_{13}H_9BrN_2O_2$.

MM = 305 g/mol.

Rdt théo = 74 % ; Rdt exp = 80 %.

Pf théo = 145°C avec décomposition (DEC) ; Pf exp = 145°C avec DEC.

Rf = 0,63 (chloroforme-acétate d'éthyle (85-15 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%Br	%O
exp.	52,33	3,03	8,86		
théo.	51,17	2,97	9,18	26,18	10,48

SM (IE) : M^+ (^{81}Br) = 306 (25,14 %) ; M^+ (^{79}Br) = 304 (29,7 %) ; $(C_{13}H_9N_2O_2)^+$ = 225 (2,26 %) ; $(C_{11}H_6NO)^+$ = 168 (100 %) ; $(C_{10}H_6N)^+$ = 140 (25,63 %).

RMN 1H (acétone d_6) δ (ppm) : 3 (s, 3H, $CH_3-N(C(=O)_2-$) ; 7,2 (t, 2H, H₅ et H₆ indoliques) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,9 (d, 1H, H₇ indolique) ; 8,1 (s, 1H, H₂ indolique) ; 11 (s large, 1H, hydrogène de l'azote indolique).

5.2. 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 33

Quantités :

3,4-dibromo-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 1 g ; 2 mmole, bromoéthane : 0,675 ml ; 9 mmole, magnésium : 0,220 g ; 9 mmole, indole : 1 g ; 9 mmole.

Temps de réaction : 12 heures à 50°C.

Formule moléculaire : $C_{31}H_{21}BrN_2O_2$.

MM = 533 g/mol.

Rdt = 70 %.

Pf = 200 °C.

Rf = 0,38 (chloroforme-éther de pétrole-méthanol (39-59-2 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%Br	%O
exp.	68,39	4,09			
théo.	69,80	3,98	5,99	14,98	5,25

SM (IE/ NH_4^+) : $(M(^{81}Br) + NH_4)^+$ = 552 (0,83%) ; $(M(^{79}Br) + NH_4)^+$ = 550 (0,63 %) ; M^+ (^{81}Br) = 534 (non visible) ; M^+ (^{79}Br) = 532 (non visible) ; M^+ (^{81}Br) - (trityle + 2H) $^+$ = 293 (1,17 %) ; M^+ (^{79}Br) - (trityle + 2H) $^+$ = 291 (2,17 %) ; (trityle) $^+$ = 243 (84 %).

RMN ¹ H : (acétone d₆) δ (ppm) : 7-7,3 (massif, 11H, 9H du groupement trityle et 3H du noyau indolique) ; 7,6 (d, 6H, H du groupement trityle); 7,9 (d, 1H, H₇ indolique) ; 8,1(s, 1H, H₂ indolique) ; 11,2 (s large, 1H, H de l'azote indolique).

5.3. 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione : 37

Quantités :

3,4-dibromo-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione : 1 g ; 1,9 mmole, bromoéthane : 0,637 ml ; 8,5 mmole, magnésium : 0,207 g ; 8,5 mmole, indole : 1 g ; 8,5 mmole.

Temps de réaction : 24 heures à 35°C.

Formule moléculaire : C₃₂H₂₃N₂O₃Br₁.

MM = 563 g/mol.

Rdt = 40 %.

Pf = 140°C.

Rf = 0,58 (chloroforme-éther de pétrole-méthanol (60,4-40,4-2 v/v)).

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 564 ; M⁺ = 563 ; (4-méthoxytrityle)⁺ = 273.

RMN ¹ H : (CDCl₃) δ (ppm) : 3,7 (s, 3H, CH₃-OR) ; 6,3 (d, 2H, H du groupement trityle) ; 7-7,3 (massif, 9H, 6H du groupement trityle et 3H du noyau indolique); 7,4 (d, 6H, H du groupement trityle) ; 7,9 (d, 1H, H₇ indolique) ; 8,5 (s, 1H, H₂ indolique).

6. Synthèse des composés 18, 34 et 38

La préparation des composés 34 et 38 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la préparation du produit 18.

6.1. 3-bromo-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 18

Le 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione (0,3 g ; 0,98 mmole) est dissous dans le tétrahydrofurane (20 ml). Après ajout de di-tert.butyldicarbonate (0,536 g ; 2,45 mmole) et de la diméthylaminopyridine en quantité catalytique, le milieu réactionnel est maintenu à 0°C pendant 45 minutes. La réaction est suivie en chromatographie sur couche mince de silice. Après évaporation du solvant, le composé cristallise dans le pentane.

Formule moléculaire : C₁₈H₁₇N₂O₄Br₁.

MM = 405 g/mol.

Rdt = 80 %

Pf théo. = 138°C ; Pf exp. = 138°C.

Rf = 0,5 (éther de pétrole-éther (80-20 v/v)).

SM (IE) : M^+ (^{81}Br) = 406 (4,69 %) ; M^+ (^{79}Br) = 404 (4,78 %) ; $(M (^{81}\text{Br}) - (\text{C}_4\text{H}_8))^+$ = 350 (16,17 %) ; $(M (^{79}\text{Br}) - (\text{C}_4\text{H}_8))^+$ = 348 (16,09 %) ; $(M (^{81}\text{Br}) - \text{Boc} + \text{H})^+$ = 306 (30,04 %) ; $(M (^{79}\text{Br}) - \text{Boc} + \text{H})^+$ = 304 (30,04 %) ; $(\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2)^+$ = 225 (4,66 %) ; $(\text{C}_{11}\text{H}_6\text{NO})^+$ = 168 (27,45 %) ; $(\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N})^+$ = 140 (8,75 %) ; $(\text{C}(\text{CH}_3)_3)^+$ = 57 (100 %).

RMN ^1H (acétone d_6) δ (ppm) : 1,6 (s, 9H, Nind.- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 3 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{N}(\text{C}(=\text{O})_2)-$) ; 7,2 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,3 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,7 (d, 1H, H_4 indolique) ; 8,1 (s, 1H, H_2 indolique) ; 8,15 (d, 1H, H_7 indolique).

6.2. 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 34

Quantités :

3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,56 mmole, di-tert.butylcarbonate : 0,3g ; 1,4 mmole.

Formule moléculaire : $\text{C}_{36}\text{H}_{29}\text{BrN}_2\text{O}_4$.

MM = 633 g/mol.

Rf = 0,65 (Chloroforme-éther de pétrole-méthanol (39-59-2 v/v)).

6.3. 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione : 38

Quantités :

3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl]pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,532 mmole, di-tert.butylcarbonate : 0,348 g ; 1,33 mmole.

Formule moléculaire : $\text{C}_{37}\text{H}_{31}\text{BrN}_2\text{O}_5$.

MM = 663 g/mol.

Rf = 0,6 (éther de pétrole-éther éthylique (70-30 v/v)).

7. Synthèse des composés 19, 20, 21, 22, 23, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 et 47

Les fragments observés en spectrométrie de masse réalisée selon la technique IE pour les composés 19 à 30 sont détaillés dans l'annexe 2.

La préparation des composés 20, 21, 22, 23, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 et 47 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la préparation du produit 19.

7.1. 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 19

Une solution de 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione (0,3 g ; 0,74 mmole) dans du chlorure de méthylène (200 ml) est additionnée goutte à goutte à une solution d'éthylène diamine (0,25 ml ; 3,7 mmole) dans le chlorure de méthylène (10 ml). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 15 heures à température ambiante. La phase organique est alors lavée par de l'eau et séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation du solvant fournit une huile qui est purifiée par CCE.

Formule moléculaire : $C_{20}H_{24}N_4O_4$

MM = 384 g/mol.

Rdt = 60 %.

Pf = 170°C.

Rf = 0,36 (acétate d'éthyle-méthanol (40-60 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	58,07	6,36		
théo.	62,48	6,29	14,57	16,64

SM (IE) : $M^+ = 384$ (6,01 %) ; $M^+ - Boc = 283$ (7,34 %) ; $(C_{15}H_{15}N_2O_2)^+ = 255$ (58,89 %) ; $(C_{15}H_{14}NO_2)^+ = 240$ (4,19 %) ; $(C_{19}H_9N_2O)^+ = 197$ (11,01 %) ; $(C_{11}H_6NO)^+ = 168$ (5,51 %) ; $(C(CH_3)_3)^+ = 57$ (100 %).

RMN 1H (acétone d_6) δ (ppm) : 1,6 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,75 (s large, 2H, RNH₂, échangeable avec D₂O) ; 2,85 (s, 3H, CH₃-N(C(=O))₂-) ; 3,1 (t, 2H, -CH₂-NR₂) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,5 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,1 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,35 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (s, 1H, H₂ indolique) ; 8 (d, 1H, H₇ indolique).

7.2. 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 40

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, éthylène diamine : 0,16 ml ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : $C_{38}H_{36}N_4O_4$.

MM = 612 g/mol.

Rdt = 85 %.

Pf = 158°C.

Rf = 0,4 (Chlorure de méthylène-méthanol (95-5 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	73,44	6,09	8,61	
théo.	74,49	5,92	9,14	10,44

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 613$; $(M - \text{Boc} + H)^+ = 512$; $(M - \text{trityle} + 2H)^+ = 371$; $(M - \text{Boc} - \text{trityle} + 2H)^+ = 270$; $(\text{trityle})^+ = 243$.

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-D}_2\text{O}$) δ (ppm) : 1,65 (s, 9H, Nind.- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,3 (s large, 2H, RNH_2 échangeable avec D_2O) ; 2,5 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-NR}_2$) ; 3,1 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-NR}_2$) ; 6,05 (s large, 1H, NHR_2 échangeable avec D_2O) ; 7-7,5 (4H indoliques + 15 H du groupement trityle) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

7.3. 3-[4-aminoxylèneamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 20

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ;
0,74 mmole, paraxylène diamine : 0,5 g ; 3,7 mmole.

Formule moléculaire : $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$.

MM = 460 g/mol.

Rdt = 65 %.

Pf = 95°C.

Rf = 0,2 (acétate d'éthyle-méthanol (73-27)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	65,88	6,42		
théo.	67,81	6,12	12,16	13,89

SM (IE) : $M^+ = 460$ (0,22 %) ; $(M - \text{Boc} + H)^+ = 360$ (1,02 %) ; $(\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2)^+ = 240$ (4,56 %) ; $(\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_2)^+ = 155$ (1,36 %) ; $(\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N})^+ = 140$ (0,95 %) ; $(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N})^+ = 120$ (2,71 %) ; $(\text{C}_7\text{H}_8\text{N})^+ = 106$ (1,90 %) ; $(\text{C}_8\text{H}_8)^+ = 104$ (2,58 %) ; $(\text{C}_7\text{H}_7)^+ = 91$ (2,57 %) ; $(\text{C}(\text{CH}_3)_3)^+ = 57$ (12,98 %).

RMN ^1H (acétone d_6) δ (ppm) : 1,7 (s, 9H, Nind.- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,9 (s large, 2H, RNH_2 , échangeable avec D_2O) ; 3,05 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}(\text{C}(=\text{O})_2\text{-})$) ; 4,35 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$ benzylique) ; 4,4 (s, 2H, CH_2 -benzylique) ; 6,9-7,5 (4H indoliques + 5H aromatiques) ; 8,2 (d, 1H, H7 indolique).

7.4. 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 21

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,74 mmole, tris-2(aminoéthylamine) : 0,554 ml ; 3,7 mmole.

Formule moléculaire : C₂₄H₃₄N₆O₄.

MM = 470 g/mol.

Rdt = 70 %.

Rf = 0,36 (acétone-NH₄OH (95-5 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

SM (IE) : M⁺ = 470 ; (C₁₅H₁₅N₂O₂)⁺ = 255 (1,83 %) ; (C₆H₁₆N₃)⁺ = 130 (7,95 %) ; (C₅H₁₄N₃)⁺ = 116 (13,77 %) ; (C₂H₆N₂)⁺ = 58 (14,57 %) ; (C(CH₃)₃)⁺ = 57 (48,05 %).

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,7 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 1,9 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,1 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,5 (m, 4H, CH₂-NR₂) ; 2,7 (2H, t, CH₂-NR₂) ; 2,8 (s large, 4H, RNH₂ échangeable avec D₂O) ; 3,2 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,3 (s, 3H, CH₃-N(C(=O)₂-) ; 7,2 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,3 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (s, 1H, H₂ indolique) ; 8,15 (d, 1H, H₇ indolique).

7.5. 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 35

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, tris-2(aminoéthylamine) : 0,354 ml ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₂H₄₆N₆O₄.

MM = 698 g/mol.

Rdt = 75 %.

Pf = 165°C.

Rf = 0,65 (acétone-NH₄OH (99-1 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	70,05	6,23	11,70	
théo.	72,18	6,63	12,02	9,16

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 699 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1,7 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 1,9 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2 (m, 6H, CH₂-NR₂) ; 2,3 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,9 (s large, 4H, RNH₂ échangeable avec D₂O) ; 3 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,1 (s large, 1H, NHR₂)

échangeable avec D₂O) ; 7,15-7,5 (4H indoliques + 15 H du groupement trityle) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

7.6. 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione : 39

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, tris-2(aminoéthylamine) : 0,338 ml ; 2,25 mmole.

Formule moléculaire : C₄₃H₄₈N₆O₅.

MM = 728 g/mol.

Rdt = 30 %.

Rf = 0,55 (acétone-NH₄OH (95,30-4,70 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 729 ; M⁺ = 728 ; (4-méthoxytrityle)⁺ = 273.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1,7 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,1 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,5 (m, 6H, CH₂-NR₂) ; 3,2 (s large, 4H, RNH₂ échangeable avec D₂O) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,8 (d, 2H, Hydrogènes du groupement trityle) ; 7,2-7,6 (4H indoliques + 12 H du groupement trityle) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

7.7. 3-[3-N', N' diméthylaminopropylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 22

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,74 mmole, 3-diméthylaminopropylamine : 0,465 ml ; 3,7mmole.

Formule moléculaire : C₂₃H₃₀N₄O₄.

MM = 426 g/mol.

Rdt = 90 %.

Pf = 155 °C.

Rf = 0,61 (CH₂Cl₂-méthanol (95-5)).

Révélation ninhydrine : négatif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	64,14	7,04	12,70	
théo.	64,77	7,08	13,13	15

SM (IE) : M⁺ = 426 (1,98 %) ; M⁺ - Boc = 325 (0,29 %) ; (C₁₅H₁₅N₂O₂)⁺ = 255 (3,34 %) ; (C₁₁H₆NO)⁺ = 168 (5,51 %) ; (C₁₀H₇N₂)⁺ = 155 (1,32 %) ; (C₁₀H₆N)⁺ = 140 (1,98 %) ; (C₃H₈N)⁺ = 58 (100 %) ; (C(CH₃)₃)⁺ = 57 (52,64 %).

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,6 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,75 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,1 (s, 6H, (CH₃)₂-NR₂) ; 2,2 (t, 2H, CH₂-NR₂-) ; 3 (s, 3H, CH₃-N(C = O)₂-) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,1 (s, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,3 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,4 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,65 (s, 1H, H₂ indolique) ; 8,2 (d, 1H, H₇ indolique).

7.8. 3-[3-N', N' diméthylaminopropylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 41

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, 3-diméthylaminopropylamine : 0,3 ml ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₁H₄₂N₄O₄.

MM = 654 g/mol.

Rdt = 92 %.

Pf = 204°C.

Rf = 0,45 (chlorure de méthylène-méthanol (95-5 v/v)).

Rf = 0,93 (acétone-NH₄OH (95-5 v/v)).

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	72,13	6,49	8,23	
théo.	75,21	6,46	8,56	9,77

SM (IE) : M⁺ : non visible ; (M - Boc + H)⁺ = 554 (0,39 %) ; (M - trityle - boc + 2H)⁺ = 312 (5,97 %) ; (trityle)⁺ = 243 (41,70 %) ; (C₃H₈N)⁺ = 58 (100 %).

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1,5 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,65 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,15 (s, 6H, (CH₃)₂-NR₂) ; 2,25 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,2 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,35 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,1-7,5 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,1 (d, 1H, H₇ indolique).

7.9. 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 23

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,74 mmole, tryptamine 0,6 g ; 3,7 mmole.

Formule moléculaire : C₂₈H₂₈N₄O₄.

MM = 484 g/mol.

Rdt = 88 %.

Pf = 134°C.

Rf = 0,7 (chloroforme-acétate d'éthyle (85-15 v/v)).

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	68,93	6,26	10,76	
théo.	69,40	5,82	11,56	13,20

SM (IE/ NH₃): (M + NH₄)⁺ = 502 ; (M + H)⁺ = 485.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,7 (s, 9H, Nind-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,8 (t, 2H, CH₂-NHR) ; 3 (s, 3H, CH₃-N(C = O)₂) ; 3,5 (t, 2H, CH₂-indole) ; 6,75 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 6,9 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,05 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,3 (d, 1H, H₇ indolique) ; 7,35 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,65 (s, 1H, H₂ indolique) ; 8,2 (d, 1H, H₇ indolique) ; 10 (s large, 1H, H de l'azote indolique).

7.10. 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 42

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, tryptamine : 0,38 g ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₆H₄₀N₄O₄.

MM = 712 g/mol.

Rdt = 50 %.

Pf = 157°C.

Rf = 0,61 (chloroforme-éther de pétrole-méthanol (49-50-1 v/v)).

Rf = 0,36 (chloroforme).

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	73,50	5,64	7,46	
théo.	77,51	5,66	7,86	8,97

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 713 ; M⁺ = 712 ; (M - C₄H₉)⁺ = 655 ; (M - Boc + H)⁺ = 612 ; (M - trityle + H)⁺ = 470 ; (M - trityle - C₄H₉ + 2H)⁺ = 414.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1,6 (s, 9H, Nind-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,75 (t, 2H, (CH₂-NR₂)) ; 3,35 (t, 2H, CH₂-indole-) ; 5,3 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 6,75 (s, 1H, H₂ indolique) ; 6,95 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,1-7,65 (massif, 24 H, 9H du noyau indolique + 15H appartenant au groupement trityle) ; 8,2 (d, 1H, H₇ indolique).

7.11. 3-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 43

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, diéthylène diamine : 0,255 ml ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₀H₄₁N₅O₄.

MM = 655 g/mol.

Rdt = 58 %.

Pf = 160°C.

Rf = 0,6 (acétone-NH₄OH (95-5 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	68,06	6,30		
théo.	73,26	6,30	10,68	9,75

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 656 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃-acétone d₆) δ (ppm) : 1,7 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,4 (s large, 3H, RNH₂ et R₂NH échangeable avec D₂O) ; 2,45 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,55 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,6 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,05 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,1-7,5 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,1 (d, 1H, H₇ indolique).

7.12. 3-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione :
44

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, bis(3-aminopropyl)amine : 0,331 ml ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₂H₄₅N₅O₄.

MM = 683 g/mol.

Rdt = 65 %.

Rf = 0,64 (acétone-NH₄OH (93-7 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	69,92	6,24	10,81	
théo.	73,77	6,63	10,24	9,35

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 684 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃-acétone d₆) δ (ppm) : 1,3 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,55 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,6 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,5 (t, 2H, (CH₂-NR₂) ; 2,65 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,8 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,2 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,3 (s large, 3H, NH₂R et NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 6,4 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,1-7,5 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,1(d, 1H, H₇ indolique).

7.13. 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 45

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, 1,5 diaminopentane 0,240 g ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₁H₄₂N₄O₄.

MM = 654 g/mol.

Rdt = 55 %.

Pf > 220°C.

Rf = 0,41 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (59,7-39,8-0,5 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	80,51	6,65		
théo.	75,21	6,47	8,57	9,77

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 655 ; (M - Boc + H)⁺ = 554 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 0,9-1,4 (m, 6H, CH₂-aliphatique) ; 1,4 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 2,7 (t, 2H, (CH₂-NR₂)) ; 2,85 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3 (s large, 2H, NH₂R échangeable avec D₂O) ; 6 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,2-7,5 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,1(d, 1H, H7 indolique).

7.14. 3-[6-aminohexylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 46

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, 1,6 diaminohexane : 0,275 g ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : C₄₂H₄₄N₄O₄.

MM = 668 g/mol.

Rdt = 70%.

Pf = 125°C.

Rf = 0,41 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (69,7-29,8-0,5 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	70,75	6,83	7,88	
théo.	75,42	6,63	8,38	9,57

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 669 ; (M - Boc + H)⁺ = 568 ; (M - C₄H₉ + H)⁺ = 613 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH_2 -aliphatique) ; 1,15 (m, 2H, CH_2 -aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH_2 -aliphatique) ; 1,4 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,6 (s, 9H, Nind.- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,7 (s large, 2H, RNH_2 échangeable avec D_2O) ; 2,5 (t, 2H, CH_2 - NR_2) ; 3 (t, 2H, CH_2 - NR_2) ; 5,1 (s large, 1H, NHR_2 échangeable avec D_2O) ; 7,1-7,5 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,1(d, 1H, H7 indolique).

7.15. 3-[7-aminoheptylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 47

Quantités :

3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,3 g ; 0,47 mmole, 1,7 diaminoheptane : 0,308 g ; 2,35 mmole.

Formule moléculaire : $\text{C}_{43}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4$.

MM = 682 g/mol.

Rdt = 65%.

Pf = 140°C.

Rf = 0,64 (acétone-éther de pétrole- NH_4OH (70-29,9-0,1 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	73,54	7,01	8,05	
théo.	75,63	6,80	8,20	9,37

SM (FAB) : $(\text{M} + \text{H})^+ = 683$; $(\text{M} - \text{Boc} + \text{H})^+ = 582$; $(\text{trityle})^+ = 243$.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1 (m, 2H, CH_2 -aliphatique) ; 1,15-1,3 (m, 6H, CH_2 -aliphatique) ; 1,4 (m, 2H, CH_2 -aliphatique) ; 1,65 (s, 9H, Nind.- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,7 (t, 2H, CH_2 - NR_2) ; 2,9 (t, 2H, CH_2 - NR_2) ; 3 (s large, 2H, NH_2R échangeable avec D_2O) ; 5,2 (s large, 1H, NH_2R échangeable avec D_2O) ; 7,1-7,5 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

8. 3-[hexadécylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 24

La préparation du composé 24 est réalisée en portant à reflux, pendant 6 heures, un mélange de 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione (0,3 g ; 0,74 mmole) et hexadécylamine (0,535 ; 2,22 mmole) dans le chloroforme (20 ml). La phase organique est lavée par de l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation du solvant fournit une huile qui est purifiée par CCE.

Formule moléculaire : $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_4$.

MM = 565 g/mol.

Rdt = 70%.

Rf = 0,47 (éther de pétrole-éther (80-20 v/v)).

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	71,94	9,50		
théo.	72,21	9,02	7,43	11,32

SM (IE/NH₃) : (M + NH₄)⁺ = 583 ; (M + H)⁺ = 566 ; (M - Boc + H)⁺ = 465 ; (C₁₄H₂₉)⁺ = 197 ; (C₁₄H₂₈)⁺ = 196 ; (C₁₄H₂₇)⁺ = 195 ; (C₁₃H₂₇)⁺ = 183 ; (C₁₃H₂₆)⁺ = 182 ; (C₁₃H₂₅)⁺ = 181 ; (C₁₂H₂₅)⁺ = 169 ; (C₁₂H₂₄)⁺ = 168 ; (C₁₂H₂₃)⁺ = 167 ; (C₁₁H₂₃)⁺ = 155 ; (C₁₁H₂₂)⁺ = 154 ; (C₁₁H₂₁)⁺ = 153.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,2-1,4 (massif, 31H, CH₂-aliphatique + CH₃-R) ; 1,75 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 3 (s, 3H, (CH₃-N-(C=O))₂) ; 3,2 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,35 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7,25 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,35 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,65 (s, 1H, H₂ indolique) ; 8,2 (d, 1H, H₇ indolique).

9. 3-[5-guanidinopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 60

Le 3,5 diméthylpyrazole-1-carboxamide nitrate (0,093 g ; 0,45 mmole) et l'hydrogénocarbonate (0,04 g ; 0,45 mmole) sont additionnés à une solution de 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione (0,2 g ; 0,3 mmole) dans de l'éthanol (5 ml). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 15 heures. L'évaporation du solvant fournit une huile qui est purifiée par CCE.

Formule moléculaire : C₃₇H₃₆N₆O₂.

MM = 596 g/mol.

Rdt = 90 %.

Pf > 210°C.

Rf = 0,24 (CH₂Cl₂-méthanol-acide acétique (88,6-9,8-1,6 v/v)).

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 597 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H : (acétone d₆) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,9 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,1 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 6,3 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 7-7,5 (massif, 20H, 15 H du groupement trityle et 4 H du noyau indolique) ; 11 (s large, 1H, hydrogène de l'azote indolique).

10. 3-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 70

Le 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione (0,44 g ; 0,66 mmole) est traité par le 2-bromoéthylamine,

bromhydrate (0,138 g ; 0,66 mmole) dans le chlorure de méthylène (4 ml) en présence de triéthylamine (0,14 ml ; 2 mmole). Le milieu réactionnel est maintenu pendant 15 heures à température ambiante. L'évaporation du solvant fournit une huile qui est purifiée par CCE.

Formule moléculaire : $C_{43}H_{47}N_5O_4$.

MM = 697 g/mol.

Rdt = 50 %.

Pf = 185°C.

Rf = 0,26 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (59-39-2 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 698$; $M^+ = 697$; $(M - Boc - C_4H_9 + H)^+ = 541$.

RMN ¹H (acétone d₆-D₂O-CDCl₃) δ (ppm) : 1-1,4 (m, 6H, CH₂ aliphatique) ; 1,7 (s, 9H, Nind-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 3-3,4 (massif, 8H, CH₂-NR₂) ; 7-7,5 (massif, 20H, 15 H du groupement trityle et 4 H du noyau indolique) ; 8 (1H, d, H₇ indolique).

11. 3-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 77

On porte à reflux pendant 5 heures le 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione (0,240 g ; 0,37 mmole), le bromopropionate de méthyle (0,04 ml ; 0,37 mmole) et la triéthylamine (0,238 ml ; 0,74 mmole) dans le chlorure de méthylène (5 ml). Après extraction, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation du solvant fournit alors une huile qui est purifiée par CCE.

Formule moléculaire : $C_{45}H_{48}N_4O_6$.

MM = 740 g/mol.

Rdt = 30 %.

Pf = 175°C.

Rf = 0,7 (Chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

Analyse :	%C	%H	%N	%O
exp.	68,46	6,34	6,96	
théo.	72,97	6,48	7,56	12,97

SM (FAB) : $(M + Na)^+ = 763$; $(M + H)^+ = 741$; $M^+ = 740$; $(M - Boc + H)^+ = 640$; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃-D₂O) δ (ppm) : 1,05 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,35 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,7 (s, 9H, Nind.-C(=O)O-

C(CH₃)₃) ; 1,9 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 2,4 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,5 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,85 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,1 (t, 2H, (CH₂-C(=O)OCH₃)) ; 3,7 (s, 3H, CH₃-O-C(=O)-CH₂) ; 5,2 (s large, 1H, échangeable avec D₂O) ; 7,15-7,6 (4H indoliques + 15H du groupement trityle) ; 8,15 (d, 1H, H₇ indolique).

12. Synthèse des composés 57, 62, 63, 64, 72 et 73

La préparation des composés 62, 63, 64, 72 et 73 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du produit 57.

12.1. 3-[2-(N α Fmoc N ϵ Pmc-arginylamido)éthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 57

L'acide aminé N α Fmoc N ϵ Pmc arginine (0,24 g ; 0,36 mmole) et les agents de couplage : l'hydroxybenzotriazole (0,07 g ; 0,49 mmole), la diisopropyléthylamine (0,2 ml ; 1,15 mmole) et la dicyclohexylcarbodiimide (0,1 g ; 0,49 mmole) sont additionnés à une solution de 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione (0,2 g ; 0,327 mmole) dans le mélange chlorure de méthylène (9ml)-tétrahydrofurane (1 ml). Le milieu réactionnel est maintenu pendant 12 heures à 0°C. Après filtration de la dicyclohexylurée formée, la phase organique est lavée par de l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation du solvant fournit une huile qui est purifiée par CCE. Il est à noter que tous les acides aminés utilisés sont de configuration L.

Formule moléculaire : C₇₃H₇₆N₈S₁O₁₀.

MM = 1256 g/mol.

Rdt = 60 %.

Pf = 184°C.

Rf = 0,65 (Chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

Révélation Reindel-Hoppe: positif.

Analyse :	%C	%H	%N	%O
exp.	66,16	6,34	8,63	
théo.	69,73	6,09	8,91	12,72

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 1257 ; M⁺ = 1256 ; (M - Boc + H)⁺ = 1156 ; (C₁₄H₁₁)⁺ = 179 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1,3 (s, 6H, CH₃ du groupement Pmc) ; 1,7 (9H, s, Nind-C(=O)O-C(CH₃)₃) ; 1,75 (m, 4H, CH₂ aliphatique) ; 2 (s, 3H, -CH₃-aromatique) ; 2,1 (t, 3H, -CH₃-aromatique) ; 2,6 (t, 3H, -CH₃-aromatique) ; 2,65 (t, 2H, CH₂-

NR₂) ; 3 (t, 2H, -CH₂-) ; 3,1 (t, 2H, -CH₂-); 4 (t, 1H, NH-C(=O)-CH(R)C(=O)OR) ; 4,3 (d, 2H, CH₂ du groupement Fmoc) ; 5,6 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D₂O) ; 6,2 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 7,1-7,5 (massif, 27H, 15 H du groupement trityle, 4H indoliques et 8H du groupement Fmoc) ; 8 (d, 1H, H₇ indolique).

12.2. 3-[5-(N α Fmoc N ϵ Pmc-arginylamido)pentylamino]-4-[1-tert. butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 62

Quantités :

3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,2 g ; 0,3 mmole, N α Fmoc N ϵ Pmc arginine 0,22 g ; 0,33 mmole, HOBT: 0,062 g ; 0,45 mmole, DIEA : 0,187 ml ; 1,05 mmole, DCC : 0,095 g ; 0,45 mmole.

Formule moléculaire : C₇₆H₈₂N₈O₁₀S₁.

MM = 1298 g/mol.

Rdt = 68 %.

Pf = 192°C.

Rf = 0,4 (chlorure de méthylène-méthanol (95-5 v/v)).

Révélation Reindel-Hoppe: positif.

Analyse :	%C	%H	%S	%N	%O
exp.	72,14	6,56		8,39	
théo.	70,24	6,36	2,43	8,62	12,31

SM (FAB) : (M + Na)⁺ = 1321 ; (M + H)⁺ = 1299 ; M⁺ = 1298 ; (M - Boc + H)⁺ = 1198 ; (M - trityle - Pmc - Boc + 3H)⁺ = 691 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1,1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,3 (s, 6H, CH₃ du groupement Pmc) ; 1,4 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,6 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,7 (9H, s, Nind-C (= O)O-C(CH₃)₃) ; 1,9 (m, 2H, CH₃ aliphatique) ; 2,1 (s, 3H, -CH₃-aromatique) ; 2,6 (s, 3H, -CH₃-aromatique) ; 2,65 (s, 3H, -CH₃-aromatique) ; 2,65 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 3,1 (t, 2H, -CH₂-) ; 3,21 (t, 2H, -CH₂-); 4 (t, 1H, NH-C(=O)-CHRC(=O)OR) ; 4,3 (d, 2H, CH₂ du groupement Fmoc) ; 5,5 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D₂O) ; 5,9 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 6 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 7-7,5 (massif, 27H, 15 H du groupement trityle, 4H indoliques et 8H du groupement Fmoc) ; 8 (d, 1H, H₇ indolique).

12.3. 3-[5-(N α Fmoc γ tBu-glutamylamido)pentylamino]-4-[1-tert. butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 63

Quantités :

3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butyloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,2 g ; 0,3 mmole, l'acide N α Fmoc γ tBu glutamique : 0,143 g ; 0,33 mmole, HOBT : 0,062 g ; 0,45 mmole, DIEA : 0,187 ml ; 1,05 mmole, DCC : 0,095 g ; 0,45 mmole..

Formule moléculaire : C₆₅H₆₇N₅O₉.

MM = 1061 g/mol.

Rdt = 70 %.

Pf = 163°C.

Rf = 0,86 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (39,5-59,5-1 v/v)).

Révélation Reindel-Hoppe: positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	71,71	6,32	6,72	
théo.	73,49	6,36	6,59	13,56

SM (FAB) : (M + Na)⁺ = 1084 ; (M + H)⁺ = 1062 ; M⁺ = 1061 ; (M - C₄H₉)⁺ = 1004 ; (M - Boc + H)⁺ = 961 ; (M - Boc - C₄H₉ + 2H)⁺ = 905 ; (M - Boc - trityle + 2H)⁺ = 719 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,4 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,6 (9H, s, Nind-C (= O)O-C(CH₃)₃) ; 1,8 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,2 (t, 2H, CH₂-COOtBu) ; 2,95 (t, 2H, -CH₂-) ; 3,05 (t, 2H, -CH₂-) ; 4,2 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-NH-Fmoc) ; 4,3 (d, 2H, CH₂ du groupement Fmoc) ; 5,1 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D₂O) ; 6,35 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 6,5 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 7-8,2 (massif, 28H, 15 H du groupement trityle, 5H indoliques et 8H du groupement Fmoc).

12.4. 3-[5-(N α boc-phénylalaninylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 64

Quantités :

3-[5-aminopentylamino]-4-[N-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylpyrrole-2,5-dione : 0,2 g ; 0,45 mmole, N α Boc phénylalanine : 0,09 g ; 0,45 mmole, HOBT : 0,062 g ; 0,43 mmole, DIEA : 0,187 ml ; 1,015 mmole, DCC : 0,095 g ; 0,45 mmole.

Formule moléculaire : C₅₅H₅₉N₅O₇.

MM = 901 g/mol.

Rdt = 65 %.

Pf = 138°C.

Rf = 0,70 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (39,5-59,5-1 v/v)).

Révélation Reindel-Hoppe: positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	71,62	6,81		
théo.	70,48	6,30	8,93	14,29

SM (FAB) : $M^+ = 901$; $(M - C_4H_9)^+ = 844$; $(M - Boc + H)^+ = 801$; $(M - Boc - C_4H_9 + H)^+ = 745$; $(M - 2Boc + 2H)^+ = 701$; $(M - trityle + H)^+ = 659$; $(M - trityle - Boc + 2H)^+ = 559$; $(M - 2Boc - trityle + 3H)^+ = 460$; $(trityle)^+ = 243$.

RMN 1H (acétone- d_6) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,1 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,3 (s, 11H, $NH-C(=O)O-C(CH_3)_3$ + CH_2 aliphatique) ; 1,7 (9H, s, $NindC(=O)O-C(CH_3)_3$) ; 2,8-3,2 (massif, 6H, $-CH_2-$) ; 4,35 (t, 1H, $NH-C(=O)-CHR-NHBoc$) ; 5,8 (s large, 1H, $NH-C(=O)$ échangeable avec D_2O) ; 6,35 (s large, 1H, R_2NH échangeable avec D_2O) ; 6,9 (s large, 1H, R_2NH échangeable avec D_2O) ; 7,1-7,6 (massif, 24H, 15 H du groupement trityle, 4H indoliques et 5H aromatiques) ; 8,2 (d, 1H, H7 indolique).

12.5 3-[5-(2-($N\alpha$ Fmoc $N\epsilon$ Pmc-arginylamidoéthylamino)pentylamino)-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-tritylpyrrole-2,5-dione] : 72

Quantités :

3-[5-(N^2 -aminoéthyl)aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-tritylpyrrole-2,5-dione : 0,2 g ; 0,29 mmole, $N\alpha$ Fmoc $N\epsilon$ Pmc arginine 0,2 g ; 0,32 mmole, HOBT : 0,059 g ; 0,43 mmole, DIEA : 0,174 ml ; 1,015 mmole, DCC : 0,089 g ; 0,43 mmole.

Formule moléculaire : $C_{78}H_{87}N_9O_{10}S$.

MM = 1341 g/mol.

Rdt = 32 %.

Pf = 147°C.

Rf = 0,45 (chlorure de méthylène-méthanol- NH_4OH (88-10-2 v/v)).

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

Analyse :	%C	%H	%S	%N	%O
exp.	70,77	6,57	2,20	6,71	
théo.	69,77	6,54	2,38	6,54	11,92

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 1342$; $M^+ = 1341$; $(M - Boc + H)^+ = 1241$.

RMN 1H (acétone d_6) δ (ppm) : 0,8 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,2 (s, 6H, CH_3 du groupement Pmc) ; 1,3 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,6 (9H, s, $Nind-C(=O)O-C(CH_3)_3$) ; 1,7 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,8 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 2,1 (s, 3H, $-CH_3$ -aromatique) ; 2,5 (s, 3H, $-CH_3$ -aromatique) ; 2,65 (s, 3H, $-CH_3$ -aromatique) ; 2,6 (t, 2H, CH_2-NR_2) ; 3 (t, 2H, CH_2-NR_2) ; 3,2 (t, 2H, CH_2-NR_2) ; 3,4 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,5 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 4,2 (t, 1H, $NH-C(=O)-CHR-NH-Fmoc$) ; 4,3 (d, 2H, CH_2 du groupement Fmoc) ; 6,3 (s large, 1H, $NH-C(=O)$ échangeable avec D_2O) ; 6,5 (s large, 1H, R_2NH échangeable avec D_2O) ; 6,7 (s large, 1H, R_2NH échangeable avec D_2O) ; 7,1-7,8 (massif, 27H, 15 H du groupement trityle, 4H indoliques et 8H du groupement Fmoc) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

12.6. 3-[5-(2-N α Boc-phénylalaninylamidoéthyl)aminopentyl amino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 73

Quantités :

3-[5-(N²-2aminoéthyl)aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 0,2 g ; 0,29 mmole, N α Boc phénylalanine : 0,083 g ; 0,32 mmole, HOBT : 0,059 g ; 0,43 mmole, DIEA : 0,174 ml ; 1,015 mmole, DCC : 0,089 g ; 0,43 mmole.

Formule moléculaire : C₅₇H₆₄N₆O₇.

MM = 944 g/mol.

Rdt = 30 %.

Pf = 135°C.

Rf = 0,77 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (59-39-2 v/v)).

Révélation Reindel-Hoppe: positif.

Analyse	%C	%H	%N	%O
exp.	72,10	6,34	8,49	
théo.	72,42	6,89	8,90	11,85

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 945 ; M⁺ = 944 ; (trityle)⁺ = 243.

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 0,8 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,3 (s, 9H, NH-C(=O)OC(CH₃)₃) ; 1,65 (s, 9H, Nind-C(=O)OC(CH₃)₃) ; 2,2 (s large, 1H, NHR₂ échangeable avec D₂O) ; 4,2 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-NHR) ; 5,1 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D₂O) ; 5,3 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 6,8 (s large, 1H, R₂NH échangeable avec D₂O) ; 7,1-7,6 (massif, 24H, 15 H du groupement trityle, 4H indoliques et 5H aromatiques) ; 8,2 (1H, d, H₇ indolique).

13. Synthèse des trifluoroacétates de 3-R-amino-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione (25 à 30)

La préparation des produits 26 à 30 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du composé 25.

13.1. Trifluoroacétate de 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 25

Le composé 25 (0,1 g ; 0,26 mmole) est dissous dans une solution d'acide trifluoroacétique à 50 % dans le chlorure de méthylène. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 minutes. Après évaporation du solvant, le résidu est lavé trois fois à l'éther éthylique.

Formule moléculaire : C₁₅H₁₆N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₁₇H₁₈N₄O₆F₆.

MM = 284 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 512 g/mole

Rdt = 50 %.

Pf = 180°C.

Rf = 0,2 (acétate d'éthyle-méthanol (40-60 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

SM (IE/NH₃) : (M + NH₄)⁺ = 302 ; (M + H)⁺ = 285 ; (C₁₅H₁₄N₃O₂)⁺ = 268 ;
(C₈H₇N + H)⁺ = 118.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 3 (s, 3H, CH₃-N-(C(=O)₂) ; 3,6 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ;
3,8 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4
(s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,6 (d, 1H, H₇ indolique).

13.2. Trifluoroacétate de 3-[4-aminoxylèneamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 26

Formule moléculaire : C₂₁H₂₀N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₅H₂₂N₄O₆F₆.

MM = 360 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 588 g/mole

Rdt = 50 %.

Pf >230°C.

Rf = 0,1 (acétate d'éthyle-méthanol (40-60 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

SM (IE/NH₃) : (M + NH₄)⁺ = 379 ; (M + H)⁺ = 361 ; (C₂₁H₁₈N₃O₂)⁺ = 344 ;
(C₁₃H₁₄N₃O₂)⁺ = 244 ; (C₁₃H₁₀N₃O₂)⁺ = 240 ; (C₁₀H₇N₂)⁺ = 155 ;
(C₁₁H₉N₂)⁺ = 169.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 3,05 (s, 3H, CH₃-N(C(=O)₂-) ; 4,3 (s, 2H, -CH₂-
benzylique) ; 4,4 (s, 2H, CH₂-benzylique) ; 6,9-7,5 (massif, 9H, 4H indoliques +
5H aromatiques).

13.3. Trifluoroacétate de 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl amino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 27

Formule moléculaire : C₁₉H₂₆N₆O₂.

Formule moléculaire (+4 CF₃COOH) : C₂₇H₃₀N₆O₁₀F₁₂.

MM = 370 g/mol.

MM (+4 CF₃COOH) = 826 g/mole

Rdt = 90 %.

Rf = 0,54 (isopropanol-eau-NH₄OH (70-10-20 v/v)).

SM (IE/NH₃) : (M + NH₄)⁺ = 388 ; (M + H)⁺ = 371 ; M⁺ = 370 ; (C₁₀H₇N₂)⁺ = 155.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 2,6 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 2,65 (t, 2H, CH₂-NR₂) ; 2,85 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 2,95 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,05 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,3 (s, 3H, CH₃-N(C(=O)₂-) ; 3,4 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,15 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₇ indolique).

13.4. Trifluoroacétate de 3-[3-N', N' diméthylaminopropyl amino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 28

Formule moléculaire : C₁₈H₂₂N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₂H₂₄N₄O₆F₆.

MM = 326 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 554 g/mole

Rdt = 50 %.

Pf = 184°C.

Rf = 0,36 (chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

SM (IE/NH₃) : (M + NH₄)⁺ = 344 ; (M + H)⁺ = 327.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) : 1,55 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,5 (s, 6H, (CH₃)₂-N⁺R₂) ; 2,6 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,1 (s, 3H, CH₃-N-(C = O)₂) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,25 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,35 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,5 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,65 (d, 1H, H₇ indolique).

13.5. Trifluoroacétate de 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 29

Formule moléculaire : C₂₃H₂₀N₄O₂.

Formule moléculaire (+1 CF₃COOH) : C₂₅H₂₁N₄O₄F₃.

MM = 384 g/mol.

MM (+ CF₃COOH) = 498 g/mole

Rdt = 50 %.

SM (IE/NH₃) : (M + NH₄)⁺ = 402 ; (M + H)⁺ = 385.

RMN ¹H (acétone d₆-D₂O) δ (ppm) : 3 (s, 3H, CH₃-N-(C = O)₂) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-indole) ; 3,6 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 6,7-7,8 (massif, 10H, hydrogènes indoliques).

13.6. Trifluoroacétate de 3-[hexadécylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione : 30

Formule moléculaire : $C_{29}H_{43}N_3O_2$.

Formule moléculaire (+1 CF_3COOH) : $C_{31}H_{44}N_3O_4F_3$.

MM = 465 g/mol.

MM (+1 CF_3COOH) = 579 g/mole

Rdt = 50 %.

Pf produit non cristallin.

Rf = 0,51 (éther de pétrole-éther (67-33 v/v)).

SM (IE/ NH_3) : $(M + NH_4)^+ = 483$; $(M + H)^+ = 466$; $(C_{14}H_{29})^+ = 197$; $(C_{14}H_{28})^+ = 196$; $(C_{14}H_{27})^+ = 195$; $(C_{13}H_{27})^+ = 183$; $(C_{13}H_{26})^+ = 182$; $(C_{13}H_{25})^+ = 181$; $(C_{12}H_{25})^+ = 169$; $(C_{12}H_{24})^+ = 168$; $(C_{12}H_{23})^+ = 167$; $(C_{11}H_{23})^+ = 155$; $(C_{11}H_{22})^+ = 154$; $(C_{11}H_{21})^+ = 153$.

RMN 1H (acétone d_6) δ (ppm) : 1,2-1,4 (m, 31H, CH_2 aliphatique + CH_3-R) ; 2,9 (s, 3H, $CH_3-N-(C=O)_2$) ; 3,25 (t, 2H, $CH_2-N^+R_3$) ; 7,1 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,2 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,35 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,5 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,55 (d, 1H, H_7 indolique).

14. Synthèse des trifluoroacétates de 3-R-amino-4-[1H-indol-3yl] pyrrole-2,5-dione (36, 48 à 55, 69, 71 et 76)

La préparation des dérivés 36, 49 à 55, 69, 71, 76 et 78 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du produit 48.

14.1. Trifluoroacétate de 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl) aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 36

Le composé 36 (0,1 g ; 0,13 mmole) dissous dans de l'acide trifluoroacétique (2 ml) est maintenu sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Le produit "déprotégé" est obtenu après précipitation dans le système TFA-éther éthylique : le composé 36 dissous dans l'acide trifluoroacétique est versé goutte à goutte dans l'éther éthylique (200 ml). Après centrifugation 2 minutes à 3000 rpm et élimination du surnageant, le résidu cristallise dans le pentane.

Formule moléculaire : $C_{18}H_{24}N_6O_2$.

Formule moléculaire (+4 CF_3COOH) : $C_{26}H_{28}N_6O_{10}F_{12}$.

MM = 356 g/mol.

MM (+4 CF_3COOH) = 812 g/mol.

Rdt = 50 %.

Pf = [170-180°C].

Rf = 0,26 (acétone-NH₄OH (91-9 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 357.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 2,55 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 2,65 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 2,8 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 2,9 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,4 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,1 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₇ indolique).

14.2. Trifluoroacétate de 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 48

Formule moléculaire : C₁₄H₁₄N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₁₈H₁₆N₄O₆F₆.

MM = 270 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 498 g/mol.

Rdt = 50 %.

Pf = 160°C.

Rf = 0,66 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (79-20-1 v/v)).

Révélation ninhydrine: positif.

SM (FAB) : (M + Na)⁺ = 293 ; (M + H)⁺ = 271.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 3,6 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,8 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,1 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,6 (d, 1H, H₇ indolique).

14.3. Trifluoroacétate de 3-[3-N', N' diméthylaminopropyl amino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 49

Formule moléculaire : C₁₇H₂₀N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₁H₂₂N₄O₆F₆.

MM = 312 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 540 g/mol.

Rdt = 30 %.

Pf = 210°C.

Rf = 0,55 (acétone-NH₄OH (95-5 v/v)).

SM (IE) : (M + H)⁺ = 313 (1,1 %) ; M⁺ = 312 (4,93 %) ; (C₃H₈N)⁺ = 58 (100 %).

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,8 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,65 (s 6H, (CH₃)₂-N⁺R₃) ; 2,95 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,4 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,1 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,6 (d, 1H, H₇ indolique).

14.4. Trifluoroacétate de 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 50

Formule moléculaire : C₂₂H₁₈N₄O₂.

Formule moléculaire (+1 CF₃COOH) : C₂₄H₁₉N₄O₄F₃.

MM = 370 g/mol.

MM (+1 CF₃COOH) = 484 g/mol.

Rdt = 70 %.

Pf = 175°C.

Rf = 0,27 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (57-38-5 v/v)).

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 371.

RMN ¹H (acétone d₆-D₂O) δ (ppm) : 3,3 (t, 2H, CH₂-indole) ; 3,7 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) 6,6-7,5 (massif, 10H, H indoliques).

14.5. Trifluoroacétate de 3-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 51

Formule moléculaire : C₁₆H₁₉N₅O₂.

Formule moléculaire (+3 CF₃COOH) : C₂₂H₂₂N₅O₈F₉.

MM = 313 g/mol.

MM (+3 CF₃COOH) = 655 g/mole

Rdt = 30 %.

Pf = 175°C.

Rf = 0,25 (acétone-NH₄OH (91-9 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 314 ; (2M - H)⁺ = 625.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 3,1 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,4 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,6 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,7 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,05 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,15 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,45 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₇ indolique).

14.6. Trifluoroacétate de 3-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropyl amino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 52

Formule moléculaire : C₁₈H₂₃N₅O₂.

Formule moléculaire (+3 CF₃COOH) : C₂₄H₂₆N₅O₈F₉.

MM = 341 g/mol.

MM (+3 CF₃COOH) = 683 g/mol.

Rdt = 30 %.

Pf = 145°C.

Rf = 0,14 (acétone-NH₄OH (91-9 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 342; (2M + H)⁺ = 681.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,5 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,7 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,8 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,1 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,2 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,05 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,15 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,45 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₇ indolique).

14.7. Trifluoroacétate de 3-[5-aminopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 53

Formule moléculaire : C₁₇H₂₀N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₁H₂₂N₄O₆F₆.

MM = 312 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 540 g/mol.

Rdt = 29 %.

Pf = produit non cristallin.

Rf = 0,73 (acétone-NH₄OH (91-9 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 313 ; (2M - H)⁺ = 623.

RMN ¹H (acétone d₆-D₂O) δ (ppm) : 1,3 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,6 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,8 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 3,45 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,8 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,05 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,35 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,6 (d, 1H, H₇ indolique).

14.8. Trifluoroacétate de 3-[6-aminohexylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 54

Formule moléculaire : C₁₈H₂₂N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₂H₂₄N₄O₆F₆.

MM = 326 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 554 g/mol.

Rdt = 30 %.

Pf = [190-195°C].

Rf = 0,3 (acétone-NH₄OH (95-5 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 327 ; (2M - H)⁺ = 651.

RMN ¹H (CDCl₃-D₂O) δ (ppm) : 1-1,5 (m, 6H, CH₂ aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,5 (t, 2H, N⁺R₃) ; 3 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,1 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,2 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,3 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₇ indolique).

14.9. Trifluoroacétate de 3-[7-aminoheptylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 55

Formule moléculaire : C₁₉H₂₄N₄O₂.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₃H₂₆N₄O₆F₆.

MM = 340 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 568 g/mol.

Rdt = 30 %.

Pf = 165°C.

Rf = 0,58 (acétone-NH₄OH (97-3 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 341 ; (2M - H)⁺ = 679.

RMN ¹H (acétone d₆) δ (ppm) : 1,15 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,3-1,5 (m, 4H, CH₂ aliphatique) ; 1,65 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,8 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 3,2 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,65 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 7,05 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,15 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,35 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₇ indolique).

14.10. Trifluoroacétate de 3-[5-phénylalaninylamidopentylamino]-4-[1H-indol-yl] pyrrole-2,5-dione : 69

Formule moléculaire : C₂₆H₂₉N₅O₃.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₃₀H₃₁N₅O₇F₆.

MM = 459 g/mol.

MM (+3 CF₃COOH) = 687 g/mol.

Rdt = 22 %.

Pf = 215°C.

Rf = 0,65 (butanol-acide acétique-eau (75-10-15 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 460 ; M⁺ = 459 ; (2M-H)⁺ = 917.

RMN ^1H (acétone d_6) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,1 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 2,9 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,1 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,3 (d, 2H, $-\text{CH}_2$ benzylique) ; 4,35 (t, 1H, $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CHR}-\text{NH}_2$) ; 4,7 (s large, 1H, $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})$ échangeable avec D_2O) ; 7 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,1 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,2 (s, 5H, H aromatiques) ; 7,3 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,4 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,5 (d, 1H, H_7 indolique).

14.11. Trifluoroacétate de 3-[5-(N' -2-aminoéthyl)aminopentyl amino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 71

Formule moléculaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2$.

Formule moléculaire (+4 CF_3COOH) : $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{F}_{12}$.

MM = 355 g/mol.

MM (+4 CF_3COOH) = 811 g/mol.

Rdt = 40 %.

Rf = 0,25 (isopropanol-eau- NH_4OH (78-11-11 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif

SM : SM (FAB) : $(\text{M} + \text{H})^+ = 356$; $\text{M}^+ = 355$.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1-1,5 (m, 6H, CH_2 aliphatique) ; 2,6 (t, 2H, $\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}_3$) ; 2,9 (t, 2H, $\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}_3$) ; 3 (t, 2H, $\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}_3$) ; 3,2 (t, 2H, $\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}_3$) ; 7 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,1 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,2 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,3 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,4 (d, 1H, H_7 indolique).

14.12. Trifluoroacétate de 3-[5-(2-phénylalaninylamidoéthyl)amino pentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 76

Formule moléculaire : $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_3$.

Formule moléculaire (+3 CF_3COOH) : $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_9\text{F}_9$.

MM = 502 g/mol.

MM (+3 CF_3COOH) = 844 g/mol.

Rdt = 60 %.

Pf = 194°C.

Rf = 0,7 (isopropanol- NH_4OH -eau (74,4-10,6-15 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM : SM (FAB) : $(\text{M} + \text{H})^+ = 503$; $(2\text{M}-\text{H})^+ = 1003$.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,5 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 2,9 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,2 (t, 2H,

-CH₂N⁺R₃) ; 3,6 (d, 2H, CH₂benzylique) ; 3,8 (t, 2H, -CH₂N⁺R₃) ; 4 (t, 2H, -CH₂N⁺R₃) ; 4,3 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-N⁺H₃) ; 5,1 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D₂O) ; 7-7,6 (massif, 10H, 5H indoliques + 5H aromatiques).

14.13. Trifluoroacétate de 3-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)amino pentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 78

Formule moléculaire : C₂₁H₂₆N₄O₄.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH) : C₂₅H₂₈N₄O₈F₆.

MM = 398 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 626 g/mol.

Rdt = 50 %.

Pf = 190°C.

Rf = 0,19 (acétone-éther de pétrole-NH₄OH (58-40-2 v/v)).

SM : SM (FAB) : (M + Na)⁺ = 421 ; (M + H)⁺ = 399 ; M⁺ = 398 ; (2M - H)⁺ = 795 ; (2M + H)⁺ = 797.

RMN ¹H (acétone d₆-D₂O) δ (ppm) : 1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 1,5 (m, 2H, CH₂-aliphatique) ; 2,9 (massif, 4H, CH₂-N⁺R₃) ; 3,1 (t, 2H, CH₂-NR₃⁺) ; 3,3 (t, 2H, CH₂-C(=O)O-CH₃) ; 3,7 (s, 3H, CH₃-O(C=O)CH₂) ; 7,1 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,2 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,4 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,5 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,55 (d, 1H, H₇ indolique).

15. Synthèse des composés 3-R-amino-4-[1H-indol-3yl] pyrrole-2,5-dione (58, 65, 67 et 74)

La préparation des composés 65, 67 et 74 est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du produit 58.

15.1. 3-[2-(Nε Pmc-arginylamido)éthylamino]-4-[1-tert.butyl oxy carbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 58

Le composé 58 (0,1 g ; 0,1 mmole) est dissous dans une solution de pipéridine à 20 % dans le diméthylformamide. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est lavé trois fois à l'éther éthylique.

Formule moléculaire : C₅₈H₆₅N₈O₈S₁.

MM = 1034 g/mol.

Rdt = 75 %.

Pf = [190-200°C].

Rf = 0,4 (chlorure de méthylène-méthanol (90-10 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 1035$; $M^+ = 1034$; $(M - \text{boc} + H)^+ = 934$; $(\text{trityle})^+ = 243$.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1,3 (s, 6H, CH_3 du groupement Pmc) ; 1,6 (s large, 2H, RNH_2 échangeable avec D_2O) ; 1,7 (9H, s, Nind-C (= O)O-C(CH_3) $_3$) ; 1,75 (m, 4H, CH_2 aliphatique) ; 2,1 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -aromatique) ; 2,6 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -aromatique) ; 2,65 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -aromatique) ; 2,65 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}^+\text{R}_3$) ; 3 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,1 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,4 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-NH_2) ; 5,3 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D_2O) ; 6,1 (s large, 1H, R_2NH échangeable avec D_2O) ; 7,1-7,5 (massif, 19H, 15 H du groupement trityle et 4H indoliques) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

15.2. 3-[5-(NePmc-arginylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butyl oxy carbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 65

Formule moléculaire : $\text{C}_{61}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}$.

MM = 1076 g/mol.

Rdt = 95 %.

Pf > 220°C.

Rf = 0,33 (CH_2Cl_2 -méthanol (93-7 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : $(M + \text{Na})^+ = 1099$; $(M + H)^+ = 1077$; $M^+ = 1076$; $(M - \text{boc} + H)^+ = 976$; $(M - \text{trityle} + H)^+ = 834$; $(M - \text{trityle} - \text{boc} + 2H)^+ = 734$; $(M - \text{trityle} - \text{boc} - \text{Pmc} - 3H)^+ = 469$; $(\text{Pmc} + \text{Na})^+ = 289$; $(\text{trityle})^+ = 243$.

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1,1 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,3 (s, 6H, CH_3 du groupement Pmc) ; 1,4 (2H, m, CH_2 aliphatique) ; 1,55 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,6 (s large, 2H, RNH_2 échangeable avec D_2O) ; 1,7 (9H, s, Nind-C (= O)O-C(CH_3) $_3$) ; 1,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 2,1 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -aromatique) ; 2,6 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -aromatique) ; 2,65 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ -aromatique) ; 2,65 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}^+\text{R}_3$) ; 3 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,1 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$) ; 3,4 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-NH_2) ; 5,3 (s large, 1H, NH-C(=O) échangeable avec D_2O) ; 6,1 (s large, 1H, R_2NH échangeable avec D_2O) ; 7,1-7,5 (massif, 19H, 15 H du groupement trityle et 4H indoliques) ; 8,1 (d, 1H, H7 indolique).

15.3. 3-[5-(γ tBu-glutamylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butyl oxy carbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione : 67

Formule moléculaire : $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_7$.

MM = 839 g/mol.

Rdt = 80 %.

Rf = 0,6 (acétone-éther de pétrole- NH_4OH (38,5-57,7-3,8 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

15.4. 3-[5-(2-Nε Pmc-arginylamidoéthylamino)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione :
74

Formule moléculaire : C₆₃H₇₇N₉O₈S.

MM = 1119 g/mol.

Rdt = 80 %.

Rf = 0,16 (CH₂Cl₂-méthanol-NH₄OH(86,5-9,6-3,9 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

16. Synthèse des trifluoroacétates de 3-R-amino-4-[1H-indol-3yl] pyrrole-2,5-dione (59, 66 et 75)

La préparation des composés **66** et **75** est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du produit **59**.

16.1. Trifluoroacétate de 3-[2-arginylamidoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 59

Le composé **59** (0,1 g ; 0,13 mmole) dissous dans le mélange : acide trifluoroacétique (85 %), eau (5 %), éthanedithiol (5 %) et thioanisole (5 %) est maintenu sous agitation pendant 90 minutes à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par de l'acide trifluoroacétique (2 ml). Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 minutes. Cette solution est alors versée goutte à goutte dans l'éther éthylique (200 ml). Après centrifugation 2 minutes à 3000 rpm et élimination du surnageant, le résidu cristallise dans le pentane.

Formule moléculaire : C₂₀H₂₆N₈O₃.

Formule moléculaire (+3 CF₃COOH) : C₂₆H₂₉N₈O₉F₉.

MM = 426 g/mol.

MM (+3 CF₃COOH) = 768 g/mol.

Rdt = 40 %.

Pf = 225°C.

Rf = 0,1 (isopropanol-NH₄OH-eau (70-20-10 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 427$; $M^+ = 426$.

RMN 1H (acétone d_6) δ (ppm) : 1,75 (m, 4H, CH_2 aliphatique) ; 3,45 (t, 2H, $CH_2-N^+R_3$) ; 3,2 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,25 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 4,2 (t, 1H, $NH-C(=O)-CHR-N^+H_3$) ; 4,75 (s large, 1H, $NH-C(=O)$ échangeable avec D_2O) ; 7,05 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,15 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,3 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,45 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,5 (d, 1H, H_7 indolique).

16.2. Trifluoroacétate de 3-[5-arginylamidopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 66

Formule moléculaire : $C_{23}H_{32}N_8O_3$.

Formule moléculaire (+3 CF_3COOH) : $C_{29}H_{35}N_8O_9F_9$.

MM = 468 g/mol.

MM (+3 CF_3COOH) = 810 g/mole

Rdt = 50 %.

Pf = 190°C.

Rf = 0,22 (isopropanol- NH_4OH -eau (77,8-11,1-11,1 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 469$; $M^+ = 468$; $(indole + H)^+ = 112$.

RMN 1H (acétone- D_2O) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,7 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 3,3 (t, 2H, $CH_2-N^+R_3$) ; 3 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,1 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 4 (t, 1H, $NH-C(=O)-CHR-N^+H_3$) ; 7,05 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,1 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,3 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,4 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,5 (d, 1H, H_7 indolique).

16.3. Trifluoroacétate de 3-[5-(2-arginylamidoéthyl)aminopentyl amino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 75

Formule moléculaire : $C_{25}H_{37}N_9O_3$.

Formule moléculaire (+4 CF_3COOH) : $C_{33}H_{41}N_9O_{11}F_{12}$

MM = 511 g/mol.

MM (+4 CF_3COOH) = 967 g/mole

Rdt = 30 %.

Pf = 220°C.

Rf = 0,15 (isopropanol- NH_4OH -eau (73,7-10,5-15,8 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 512$; $M^+ = 511$.

RMN 1H (acétone- D_2O) δ (ppm) : 0,85 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,1 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,6 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 2,7 (t, 2H, $CH_2-N^+R_3$) ; 3 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,1 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,2 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,35 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 4 (t, 1H, $NH-C(=O)-CHR-N^+H_3$) ; 6,9 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,1 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,25 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,35 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,4 (d, 1H, H_7 indolique).

16.4. Trifluoroacétate de 3-[5-glutamylamidopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione : 68

La préparation de ce composé est réalisée selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du composé 48.

Formule moléculaire : $C_{22}H_{27}N_5O_5$.

Formule moléculaire (+2 CF_3COOH) : $C_{26}H_{29}N_5O_9F_6$.

MM = 441 g/mol.

MM (+2 CF_3COOH) = 669 g/mole

Rdt = 30 %.

Pf = 177°C.

Rf = 0,6 (isopropanol- NH_4OH -eau (73,7-10,5-15,8 v/v)).

Révélation ninhydrine : positif.

Révélation Reindel-Hoppe : positif.

SM (FAB) : $(M + H)^+ = 442$; $(2M-H)^+ = 881$

RMN 1H (acétone- D_2O) δ (ppm) : 0,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,1 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 1,9 (m, 2H, CH_2 aliphatique) ; 2,35 (t, 2H, CH_2-COOH) ; 2,9 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3 (t, 2H, $-CH_2-$) ; 3,9 (t, 1H, $NH-C(=O)-CHR-N^+H_3$) ; 6,9 (t, 1H, H_5 indolique) ; 7,1 (t, 1H, H_6 indolique) ; 7,25 (s, 1H, H_2 indolique) ; 7,35 (d, 1H, H_4 indolique) ; 7,4 (d, 1H, H_7 indolique).

II. Synthèse d'inhibiteurs PKC réalisée en phase hétérogène

1. Préparation du réacteur

La résine a tendance à adhérer aux parois des réacteurs, ce qui diminue le contact avec les réactifs et provoque des pertes lors des transferts de récipients. Pour éviter ce phénomène, le réacteur est préalablement silanisé selon les étapes suivantes :

- lavages du réacteur avec :
 - méthanol,
 - lessive de soude,
 - et chlorure de méthylène.
- contact 3 heures avec une solution du dichlorodiméthylsilane
- rinçage du réacteur avec :
 - chlorure de méthylène,
 - méthanol,
 - chlorure de méthylène.

2. Test de Kaiser

Un test calorimétrique employant la ninhydrine (test de Kaiser) révèle la présence d'amines primaires libres par apparition d'une coloration bleue des grains de résine. Ce test est effectué dans des tubes de verre sur quelques mg de peptidyl-résine, un témoin ne contenant pas de résine est toujours préparé en parallèle.

Il nécessite la préparation de trois solutions :

- solution 1 : phénol à 4 g / ml dans l'éthanol absolu.
- solution 2 : cyanure de potassium $10^{-3}M$ (dans l'eau) à 2 % dans la pyridine distillée.
- solution 3 : ninhydrine à 50 mg / ml dans l'éthanol.

Dans un tube, on ajoute 3 gouttes des solutions précédentes. Le mélange est ensuite porté à $110^{\circ}C$ pendant 5 minutes. Le développement d'une couleur bleue dans la suspension traduit la présence sur la résine d'amines primaires dont la concentration est proportionnelle à l'intensité de la coloration.

3. Contrôle et purification

3.1. La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance est effectuée sur un appareil de Gilson équipé d'un spectrophotomètre.

Dans l'HPLC en phase inverse, la phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile. Les supports utilisés sont des billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes hydrocarbonnées en C₁₈ (colonne d'acier (250 * 4,6 mm) garnies de nucléosil C₁₈ 5 µ 100 Å). L'éluant est constitué d'un gradient de solvants aqueux et organiques. Les solvants d'éluion sont choisis en fonction de leur viscosité, leur hydrophilie et leur capacité à dissoudre les échantillons. Les molécules sont séparées en fonction de leur affinité vis à vis des phases stationnaire et mobile, leur temps de rétention augmente avec leur caractère hydrophobe.

3.2. HPLC préparative

Le principe est identique à celui de l'HPLC analytique, la différence provient des quantités d'échantillon injectées, d'où l'utilisation de colonnes de taille supérieure. Nos composés sont élués par un gradient de concentration croissante en acétonitrile maintenu à pH acide par l'acide trifluoroacétique. Cet acide volatil est éliminé facilement par lyophilisation.

4. Synthèse des composé 79, 80 et 81

La synthèse des composés 79, 80 et 81 est détaillée dans la troisième partie, paragraphe II. 5.

4.1. Trifluoroacétate de N α -(3-(-5-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)pentylamino)propanoyl)arginine : 79

Quantités :

Masse de résine Fmoc-Arg(Pmc)—P chargée à 0,38 mmol/g mise en jeu : 120 mg ; 0,046 mmole ; anhydride bis (3-bromopropanoïque) : 0,131 g ; 0,46 mmole ; 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole 2,5 dione : 45 : 0,3 g ; 0,46 mmole.

Contrôle HPLC analytique

le brut issu du TFA est analysé par HPLC analytique.

Conditions d'analyse :

- phase stationnaire : Nucléosil 100 Å 5 μ C₁₈.
- phase mobile : eau, acétonitrile, acide trifluoroacétique.

Solvant A : eau-acide trifluoroacétique (99,95-0,05 v/v).

Solvant B : acétonitrile-eau-acide trifluoroacétique (49,97-49,97-0,06 v/v).

Gradient de solvant :

5 minutes d'isocratique en A, 30 minutes de gradient linéaire de A (100 %) vers B (100 %), 5 minutes d'isocratique en solvant B.

Débit : 0,5 ml / minute.

Longueur d'onde :

- 215 nM pour détecter la liaison peptidique.
- 280 nM pour détecter le noyau indole.

Sensibilité 0,64.

Purification par HPLC préparative

Conditions : Gel nucléosil 100 Å 5 µ C₁₈ .

Phase mobile : eau, acétonitrile, acide trifluoroacétique.

Solvant A : eau-acide trifluoroacétique (99,95-0,05 v/v).

Solvant B : acétonitrile-eau-acide trifluoroacétique (49,97-49,97-0,06 v/v).

Gradient de solvant :

5 minutes d'isocratique en A, 75 minutes de gradient linéaire de A (100 %) vers B (100 %), 5 minutes d'isocratique en solvant B.

Débit : 2,5 ml / minute.

Longueur d'onde : 215 nM

Sensibilité 2,56.

Quantité déposée : m = 100 mg.

Après purification par HPLC préparative, les fractions ont été analysées par HPLC analytique, les tubes contenant le produit désiré avec un degré de pureté de 100 % à 215 nM ont été lyophilisés.

masse obtenue après purification par HPLC préparative : 10 mg.

Formule moléculaire : C₂₆H₃₆N₈O₅.

Formule moléculaire (+ 3 CF₃COOH): C₃₂F₉H₃₉N₈O₁₁.

MM = 540 g/mol.

MM (+ 3 CF₃COOH) = 882 g/mol.

HPLC analytique : pic à 34,96 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

Pf = 205°C.

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 541 ; M⁺ = 540.

RMN ¹H (acétone-D₂O) δ (ppm) : 1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,2 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,3 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,7 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,9 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,7 (t, 2H, CH₂-N⁺R₃) ; 2,9 (t, 2H, -CH₂-) ; 3,1 (t, 2H, -CH₂-) ; 3,2 (t, 2H, -CH₂-) ; 4,3 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-COOH) ; .7 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,15 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,3 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,4 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,54 (d, 1H, H₇ indolique).

4.2. trifluoroacétate de l'acide N α -(3-(-5-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)pentylamino)propanoyl)glutamique : 80

Quantités :

Masse de résine Fmoc—Glu(OtBu)—P chargée à 0,48 mmol/g mise en jeu : 95 mg ; 0,046 mmole ; anhydride bis (3-bromopropanoïque) : 0,131 g ; 0,46 mmole ; 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl maléimide : **45** : 0,3 g ; 0,46 mmole.

masse obtenue après purification par HPLC préparative : 10 mg.

Formule moléculaire : C₂₅H₃₁N₅O₇.

Formule moléculaire (+ 2 CF₃COOH): C₂₉F₆H₃₃N₅O₁₁.

MM = 513 g/mol.

MM (+ 2 CF₃COOH) = 741 g/mol.

HPLC analytique : pic à 36,5 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

Pf = 175°C.

SM (FAB-ve) : (M - H)⁻ = 512 ; M⁻ = 513 ; (2M - H)⁻ = 1025.

RMN ¹H (acétone-D₂O) δ (ppm) : 1 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,35 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,5 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 1,9 (m, 2H, CH₂ aliphatique) ; 2,35 (t, 2H, CH₂-COOH) ; 2,8 (t, 2H, CH₂-C(=O)NH) ; 2,9 (t, 2H, -CH₂-N⁺R₃) ; 3,1 (t, 2H, -CH₂-N⁺R₃) ; 3,3 (t, 2H, -CH₂-N⁺R₃) ; 4,45 (t, 1H, NH-C(=O)-CHR-COOH) ; .7 (t, 1H, H₅ indolique) ; 7,1 (t, 1H, H₆ indolique) ; 7,3 (s, 1H, H₂ indolique) ; 7,45 (d, 1H, H₄ indolique) ; 7,54 (d, 1H, H₇ indolique).

4.3. trifluoroacétate de N α -(3-(-5-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)pentylamino)propanoyl)phénylalanine : 81

Quantités :

Masse de résine Fmoc—Phe—P chargée à 0,59 mmol/g mise en jeu : 78 mg ; 0,046 mmole ; anhydride bis (3-bromopropanoïque) : 0,131 g ; 0,46 mmole ; dérivé **45** : 0,3 g ; 0,46 mmole.

masse obtenue après purification par HPLC préparative : 5 mg.

Formule moléculaire : C₂₉H₃₃N₅O₅.

Formule moléculaire (+2 CF₃COOH): C₃₃H₃₅N₅O₉F₆.

MM = 531 g/mol.

MM (+2 CF₃COOH) = 759 g/mol.

HPLC analytique : pic à 41,03 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

SM (FAB) : (M + H)⁺ = 532 ; M⁺ = 531.

5. Préparation des peptides 90 à 97

La synthèse des peptides 90 à 97 est détaillée dans le troisième partie, paragraphe III. 5.

5.1 Trifluoroacétate de Ala—Phe—Arg—Arg : 90

Purification par HPLC préparative

Quantité déposée : $m = 300$ mg

Conditions : Gel nucléosil 100 Å 5 µ C₁₈.

Phase mobile : eau, acétonitrile, acide trifluoroacétique.

Solvant A : eau-acide trifluoroacétique (99,95-0,05 v/v).

Solvant B : acétonitrile-eau-acide trifluoroacétique (49,97-49,97-0,06 v/v).

Gradient de solvant :

5 minutes d'isocratique en A, 80 minutes de gradient linéaire de A (100 %) vers B (40 %), 10 minutes d'isocratique à 40 % de B.

Débit : 2,5 ml / minute.

Longueur d'onde : 235 nM

Sensibilité 2,56.

Masse obtenue après purification par HPLC préparative : 50 mg.

Contrôle HPLC analytique

- phase stationnaire : Nucléosil 100 Å 5 µ C₁₈.

- phase mobile : eau, acétonitrile, acide trifluoroacétique.

Solvant A : eau-acide trifluoroacétique (99,95-0,05 v/v).

Solvant B : acétonitrile-eau-acide trifluoroacétique (49,97-49,97-0,06 v/v).

Gradient de solvant :

5 minutes d'isocratique en A, 30 minutes de gradient linéaire de A (100 %) vers B (100 %), 5 minutes d'isocratique en solvant B.

Débit : 0,5 ml / minute.

Longueur d'onde : 215 nM

Sensibilité 0,64.

Contrôle d'identité : Analyse d'acides aminés (HAT)

L'identité du peptide a été confirmée par une analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale. Dans un tube à hydrolyse on ajoute :

- 0,5 mg de peptide
- 0,5 ml d'eau ultra-pure
- 0,5 ml d'HCl 12 N
- et quelques gouttes de phénol qui évite l'oxydation des acides aminés.

Le mélange mis sous vide est porté à 110°C pendant 24 heures.

Peptide 90	Quantité théorique	Quantité trouvée
Ala	1	0,87
Phe	1	0,95
Arg	2	2

MM = 548 g/mol.

MM (+ 3 CF₃COOH) = 890 g/mol.

HPLC analytique : pic à 29,48 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 549.

5.2. Trifluoroacétate de Ser—Phe—Arg—Arg : 91

Peptide 91	Quantité théorique	Quantité trouvée
Ser	1	0,75
Phe	1	0,95
Arg	2	2

MM = 564 g/mol.

MM (+ 3 CF₃COOH) = 906 g/mol.

HPLC analytique : pic à 27,5 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 565.

5.3. Trifluoroacétate de Arg—Asn—Ala—Phe—Arg—Arg : 92

Peptide 92	Quantité théorique	Quantité trouvée
Ala	1	0,94
Phe	1	1,04
Arg	3	3
Asn	1	0,9

MM = 818 g/mol.

MM (+ 4 CF₃COOH) = 1274 g/mol.

HPLC analytique : pic à 28,3 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 819.

5.4. Trifluoroacétate de Arg—Asn—Ser—Phe—Arg—Arg : 93

Peptide 93	Quantité théorique	Quantité trouvée
Ser	1	0,92
Phe	1	0,97
Arg	3	3
Asn	1	1,01

MM = 834 g/mol.

MM (+ 4 CF₃COOH) = 1290 g/mol.

HPLC analytique : pic à 27,41 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 835,2.

5.5. Trifluoroacétate de N α -(3-(-7-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)heptylamino)-4-oxobutanoyl)—Ala—Phe—Arg—Arg : 94

HPLC analytique : pic à 41,9 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

MM = 970 g/mol.

MM (+ 3 CF₃COOH) = 1312 g/mol.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 971.

5.6. Trifluoroacétate de N α -(3-(-7-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)heptylamino)-4-oxobutanoyl)—Ser—Phe—Arg—Arg : 95

HPLC analytique : pic à 41,8 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

MM = 986 g/mol.

MM (+ 3 CF₃COOH) = 1328 g/mol.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 987,5.

5.7. Trifluoroacétate de N α -(3-(-7-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)heptylamino)-4-oxobutanoyl)—Arg—Asn—Ala—Phe—Arg—Arg : 96

HPLC analytique : pic à 39,2 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

MM = 1240 g/mol.

MM (+ 4 CF₃COOH) = 1696 g/mol.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 1241.

5.8. Trifluoroacétate de N α -(3-(-7-(4-(1H-indol-3-yl)2,5-dione pyrrol-3-ylamino)heptylamino)-4-oxobutanoyl)—Arg—Asn—Ser—Phe—Arg—Arg : 97

HPLC analytique : pic à 39,3 mn (système TFA) ; pureté 100 %.

MM = 1256 g/mol.

MM (+ 4 CF₃COOH) = 1713 g/mol.

SM (TOF) : (M + H)⁺ = 1257.

Tests d'inhibition de la PKA et de la PKC

I. Méthodes générales d'étude enzymatique

Les enzymes sont les catalyseurs biologiques qui permettent aux réactions chimiques nécessaires à la vie et à la multiplication cellulaire de s'effectuer à vitesse élevée et avec une spécificité qui élimine la formation de sous-produits.

1. Propriétés des enzymes

- Elles abaissent considérablement l'énergie d'activation des réactions chimiques.
- Elles se retrouvent intactes à la fin de la réaction.
- Les enzymes sont toutes de nature protéique, ce qui leur confère une très haute spécificité.
- Contrairement aux catalyseurs chimiques, leur activité est limitée à une zone de température et de pH souvent étroite et elles exigent la présence de cofacteurs ou d'activateurs spécifiques.

2. Cinétique des réactions enzymatiques

2.1. influence de la concentration en substrat sur la cinétique

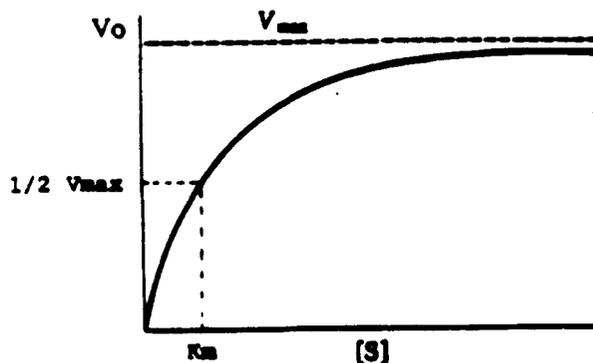
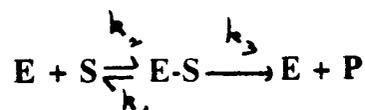


Figure 69 : variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

Pour une concentration donnée en enzyme, la vitesse de réaction tracée en fonction de la concentration en substrat fournit une hyperbole équilatère. Cette observation a conduit deux auteurs : Michaelis et Menten à suggérer que la réaction enzymatique se déroulait en plusieurs étapes :



- combinaison rapide et réversible de l'enzyme [E] avec le substrat [S] pour fournir le complexe enzyme-substrat [E-S].

- transformation lente et réversible du complexe enzyme-substrat pour fournir l'enzyme et le produit de la réaction [P].

Puisque la deuxième étape est limitante, la vitesse de réaction doit être proportionnelle à la concentration du complexe enzyme-substrat :

$$v = k [E-S]$$

$$v_{\max} = k [E_T] \text{ (pour } v_{\max}, [E-S] = [E_T])$$

$$v / v_{\max} = [E-S] / [E_T]$$

La constante d'équilibre ou constante de Michaelis (K_m) pour la dissociation du complexe [E-S] est :

$$K_m = k_2 / k_1 = ([E] * [S]) / [E-S]$$

$$(K_m + [S]) / [S] = [E_T] / [E-S]$$

$$v / v_{\max} = [S] / (K_m + [S])$$

$$\text{pour } v = v_{\max} / 2, \text{ on a : } K_m = [S]$$

D'après cette relation, on en déduit que K_m correspond à la concentration en substrat pour laquelle une enzyme donnée produit la moitié de la vitesse maximale. K_m est exprimé en unité de concentration (g/l ou molarité). Chaque enzyme possède un K_m caractéristique pour un substrat donné, dans des conditions définies de température et de pH. Il est d'autant plus faible que l'affinité pour l'enzyme est grande.

La valeur de cette constante peut être obtenue d'après la courbe précédente, cependant la vitesse maximale (v_{\max}) ne peut être déterminée avec précision. Une mesure plus précise de K_m et de v_{\max} peut être obtenue en effectuant une représentation des mêmes données sous une autre forme appelée "représentation en double inverse" de Lineweaver et Burk (figure 70) qui utilise la transformation algébrique de l'équation de Michaelis et Menten :

$$v = (v_{\max} * [S]) / (K_m + [S])$$

$$1 / v = (K_m / v_{\max} * 1 / [S]) + 1 / v_{\max}.$$

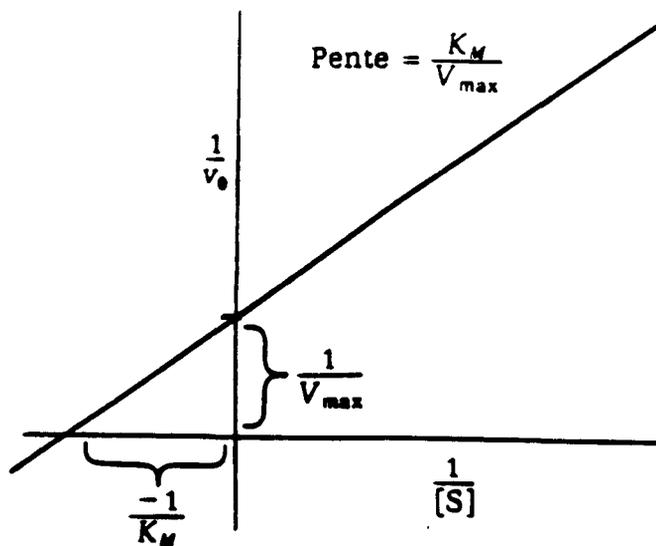


Figure 70 : variation de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat : "représentation en double inverse".

On obtient une droite qui coupe l'axe des ordonnées en $1 / v_{\max}$, et l'axe des abscisses en un point correspondant à la valeur $- 1 / K_m$. Cette représentation graphique est plus commode pour déterminer la constante de Michaelis et la vitesse maximale de la réaction pour une concentration en enzyme donnée.

2.2. Influence de la température et du pH

2.2.1. influence de la température

En général, on constate que la vitesse de la réaction augmente quand la température augmente, ceci s'explique par une augmentation de la concentration du complexe activé [E-S] lorsqu'on fournit plus d'énergie sous forme thermique. Puis, au delà d'une certaine température qui varie selon les enzymes (45°C environ), on assiste à une dénaturation de la protéine. La température optimale pour la PKC et pour la PKA est de 30°C.

2.2.2. influence du pH

Les variations de pH peuvent avoir un effet :

- au niveau de l'enzyme, en provoquant des modifications du degré d'ionisation de certains groupements fonctionnels dont la charge positive ou négative est nécessaire :
 - soit à la formation du complexe enzyme-substrat.
 - soit au maintien de la conformation tridimensionnelle native de l'enzyme .
- au niveau du substrat, en changeant son degré d'ionisation, ce qui peut permettre ou au contraire empêcher la formation du complexe enzyme-substrat.

On peut donc définir un pH optimum pour la transformation enzymatique d'un substrat dans un milieu de composition donnée.

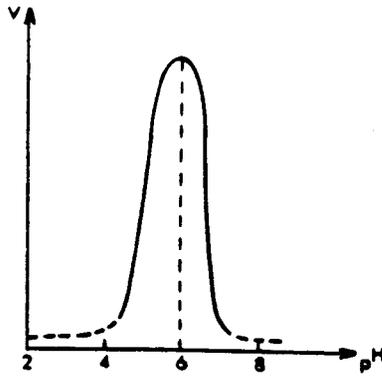


Figure 71 : variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH

Comme le montre la figure 71, de part et d'autre du pH optimum, la vitesse de la réaction décroît rapidement. Le pH optimum varie beaucoup selon les enzymes. Le pH optimum pour la PKC et pour la PKA est de 7,5 et de 7 respectivement.

2.3. Les inhibiteurs

Les enzymes peuvent être inhibées par de nombreuses molécules qui sont regroupées selon leur mode d'action : irréversible ou réversible.

2.3.1. inhibiteur irréversible

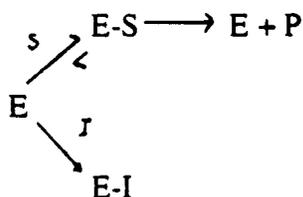
Les inhibiteurs irréversibles détruisent ou se combinent à un groupement fonctionnel indispensable à l'activité enzymatique. Ce type d'inhibiteur fournit des informations sur la structure du site actif et le mécanisme d'action de l'enzyme.

2.3.2. inhibiteur réversible

Parmi ces inhibiteurs, on distingue en général, ceux dont l'action est compétitive et ceux qui agissent de façon non-compétitive.

2.3.2.1. inhibiteur compétitif

Les inhibiteurs compétitifs présentent une analogie structurale avec le substrat de l'enzyme, ils peuvent ainsi entrer en compétition avec lui pour se fixer sur le site actif de l'enzyme. L'enzyme peut donc se combiner soit au substrat, soit à l'inhibiteur. On peut donc avoir les équilibres suivants :



Il est clair que l'enzyme engagée dans le complexe [E-I] ne peut pas fonctionner comme catalyseur, seul le complexe [E-S] pourra permettre la formation de produits de la

réaction. Cette inhibition est caractérisée par le fait qu'elle peut être levée par de fortes concentrations en substrats. Un inhibiteur compétitif ne modifie pas v_{max} de l'enzyme, en revanche il augmente la valeur du K_M apparent.

2.3.2.2. inhibiteur non-compétitif

En général, ils se fixent :

- soit sur l'enzyme mais en un site différent du site actif, de sorte qu'il n'y a pas de compétition avec le substrat pour ce site.
- soit sur le complexe [E-S] pour former un complexe [ESI].

De façon générale, ils n'ont pas d'analogie structurale avec ce dernier. Un inhibiteur non-compétitif diminue la valeur de v_{max} car quelle que soit la concentration en substrat il reste toujours une fraction de l'enzyme sous forme inactive ; en revanche la capacité de fixation du substrat sur le site actif reste la même et la valeur du K_M n'est pas modifiée.

2.3.3. Détermination du mécanisme d'inhibition et de la constante d'inhibition

Le mécanisme d'inhibition peut être obtenu d'après la représentation des valeurs d'inhibition selon la méthode de DIXON : $1 / V = f ([I])$. Pour cela il est nécessaire d'étudier la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en inhibiteur pour différentes concentrations en substrats (figure 72). De même qu'un substrat est caractérisé par son K_M , un inhibiteur est caractérisé par son K_i qui correspond à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur : $K_i = [E] * [I] / [EI]$

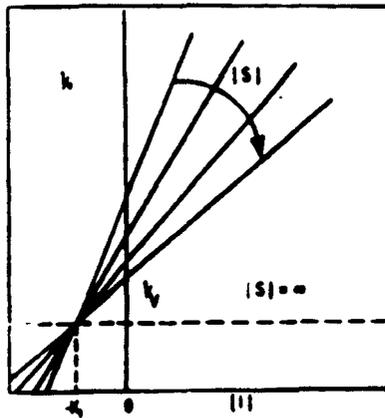


Figure 72 : Inhibition compétitive

Dans le cas d'une inhibition de type compétitif, les droites obtenues se coupent en un point d'abscisse - K_i .

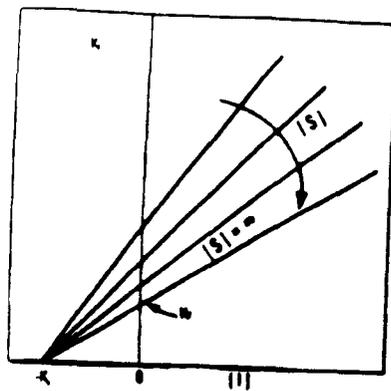


Figure 73 : Inhibition non compétitive

Dans le cas d'une inhibition de type non compétitif, les droites obtenues se coupent sur l'axe des abscisses en $-K_i$.

La concentration inhibitrice 50 ou IC_{50} est une autre constante couramment utilisée pour exprimer le pouvoir inhibiteur quel que soit le type de l'inhibition étudiée. Elle correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour réduire de 50 % l'activité enzymatique. Cette valeur est dépendante des conditions utilisées : concentrations en enzyme, en substrat et en effecteur. Elle permet cependant de faire une comparaison d'inhibiteurs dans un système donné.

II. TESTS DE PHOSPHORYLATION *IN VITRO*

La phosphorylation *in vitro* des différents composés synthétisés est quantifiée grâce à l'emploi de phosphate radio marqué amené sous forme d'[γ 32 P] ATP.

La réaction enzymatique est effectuée soit avec la PKC purifiée en présence d'activateurs (calcium, phospholipides), soit avec la sous-unité catalytique de la PKA (PKA de coeur de boeuf) qui ne nécessite pas la présence d'AMPc dans le milieu.

La protéine kinase C nous fut gracieusement offerte par le Docteur H. COSTE des laboratoires Glaxo (les ULLIS). La PKC de cerveau de Boeuf, après purification sur une DEAE cellulose et sur une phényl sépharose, renferme essentiellement l'isoforme β .

Tous les réactifs autres que les enzymes sont dissous dans un tampon Tris 50 mM (pH = 7,5 pour la PKC et pH = 7 pour la PKA).

Les inhibiteurs à tester sont mis en solution à la concentration de 10^{-3} M. Les inhibiteurs, insolubles dans l'eau sont préalablement dissous dans le DMSO dont la concentration finale est de 5 % à 15 % (v/v) à la concentration en inhibiteur 10^{-3} M.

Les phospholipides dissous dans le chloroforme sont séchés sous courant d'azote et mis en suspension (micelles) dans le tampon tris/HCl.

1. Méthodes

L'activité de la PKC est testée en mesurant l'incorporation du 32 P, provenant de [γ 32 P] ATP, dans l'histones III S qui est le substrat de l'enzyme.

Le milieu réactionnel (80 μ l) est composé comme suit :

La protéine kinase C

MgCl ₂	5 mM.
CaCl ₂	0,5 mM.
ATP	10 μ l.
[γ 32 P] ATP	1 million de cpm.
Phosphatidylsérine	50 μ g/ml.
Diacylglycérol	5 μ g/ml.
PKC	60 μ g/ml.

substrats protéiques : Histones III S 60 µg/ml.

Inhibiteurs en concentration variable

La protéine kinase A

L'inhibition de la PKA est testée selon un protocole voisin du précédent. Le substrat utilisé est l'histone II A.

Le milieu réactionnel (80 µM) comprend :

MgCl ₂	5 mM.
ATP	10 µl.
[γ ³² P] ATP	1 million de cpm.
PKA (unité catalytique)	1 µg/ml.
substrats protéiques : Histones II A	60 µg/ml.

Inhibiteurs en concentration variable.

Le temps d'incubation est choisi dans la zone où la vitesse de réaction est égale à la vitesse initiale, c'est à dire que le taux de réaction est directement proportionnel au temps. Le temps choisi pour tous les tests de phosphorylation *in vitro* est de 8 minutes. Après incubation, la réaction est stoppée par acidification du milieu et le substrat phosphorylé doit être séparé de l'ATP radiomarqué afin d'évaluer la quantité de la radioactivité incorporée.

La séparation du substrat phosphorylé et de l'ATP radio marqué est effectuée par la méthode de séparation à l'acide trichloroacétique (TCA). La précipitation au TCA est réservée à la séparation des protéines, elle est favorisée par la présence d'une seconde protéine précipitable comme la sérum albumine bovine (BSA). La réaction est réalisée dans des tubes de polypropylène directement utilisables pour le comptage de la radioactivité. Après incubation, l'isolement de la protéine phosphorylée se déroule selon les étapes suivantes :

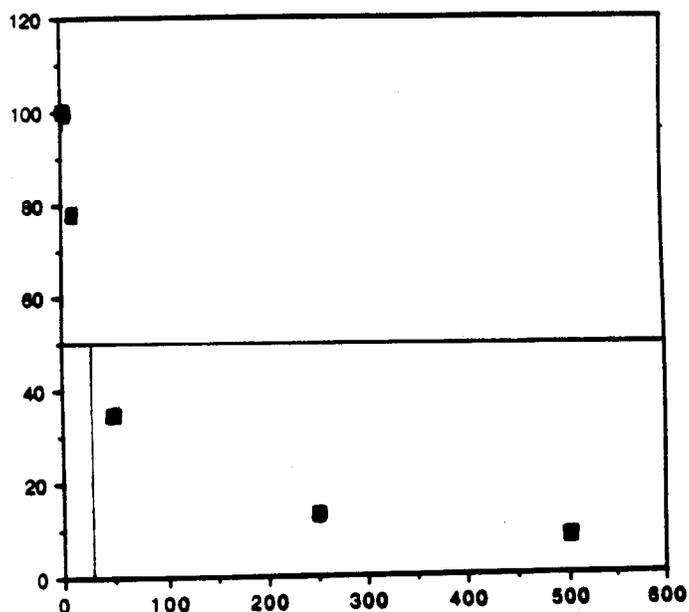
- Précipitation par addition de 30 µl de BSA à 30 mg/ml, puis de 1 ml de TCA à 12 %.
- Centrifugation 10 minutes à 2000 rpm.
- Élimination du surnageant.
- Solubilisation du culot par 100 µl de soude 1M.
- Agitation 1 minute.

- Précipitation par 1 ml de TCA à 12 %.
- Centrifugation 15 minutes à 2000 rpm.
- Élimination du surnageant.
- Solubilisation du culot par 100 μ l de soude 1M.
- Agitation 1 minute.
- Addition d'1 ml d'aqualyte.
- Comptage de la radioactivité.

Les IC₅₀ sont déterminées en établissant le graphe du pourcentage d'inhibition enzymatique en fonction de la concentration en inhibiteur. Pour chaque concentration, la moyenne de trois mesures est prise en compte. Les dérivés de type isoquinoléine sulfonamide comme H-7 ou le composé 4 sont utilisés comme référence.

Dans le graphe ci-dessous, on montre un exemple de détermination expérimentale de l'IC₅₀, qui est de 30 μ M.

% d'inhibition enzymatique



Concentration en inhibiteur (μ M)

Annexes

Annexe 1 : les nomenclatures

14	◇ anhydride 2,3-dibromomaléique ◇ 3,4-dibromo-2,5-furandione
15	◇ 2,3-dibromomaléimide ◇ 3,4-dibromo pyrrole-2,5-dione
16	◇ 2,3-dibromo-N-méthylmaléimide ◇ 3,4-dibromo-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
17	◇ 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
18	◇ 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
19	◇ 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
20	◇ 2-[4-aminoxylène]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-[4-aminoxylèneamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
21	◇ 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
22	◇ 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
23	◇ 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide ◇ 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione
24	◇ 2-[hexadécyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide ◇ 3-[hexadécylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione

25	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione</p>
26	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[4-aminoxylène]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[4-aminoxylèneamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione</p>
27	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione</p>
28	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[3-N', N' diméthylaminopropylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione</p>
29	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthyl maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione</p>
30	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[hexadécyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]-N-méthylmaléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[hexadécylamino]-4-[1H-indol-3-yl]-1-méthyl pyrrole-2,5-dione</p>
31	<p>◇ 2,3-dibromo-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3,4-dibromo-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
32	<p>◇ 2,3-dibromo-N-4-méthoxytritylmaléimide</p> <p>◇ 3,4-dibromo-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione</p>
33	<p>◇ 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-N-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
34	<p>◇ 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
35	<p>◇ 2-[2-bis N'-2-aminoéthyl]aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[2-bis N'-2-aminoéthyl]aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>

36	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
37	<p>◇ 2-bromo-3-[1H-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide</p> <p>◇ 3-bromo-4-[1H-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione</p>
38	<p>◇ 2-bromo-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide</p> <p>◇ 3-bromo-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione</p>
39	<p>◇ 2-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-4-méthoxytritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[2-bis (N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-[4-méthoxytrityl] pyrrole-2,5-dione</p>
40	<p>◇ 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
41	<p>◇ 2-[3-N', N' diméthylaminopropyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[3-N', N' diméthylaminopropylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
42	<p>◇ 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-trityl maléimide</p> <p>◇ 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
43	<p>◇ 2-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
44	<p>◇ 2-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
45	<p>◇ 2-[5-aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
46	<p>◇ 2-[6-aminohexyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[6-aminohexylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>

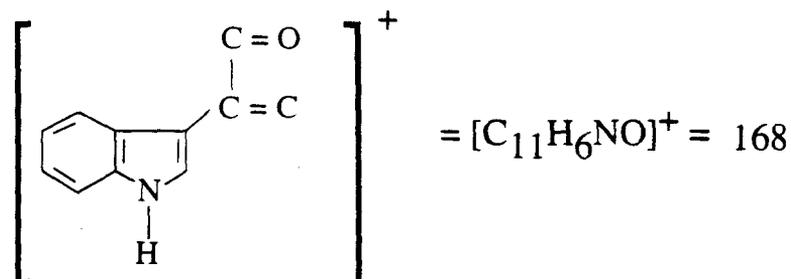
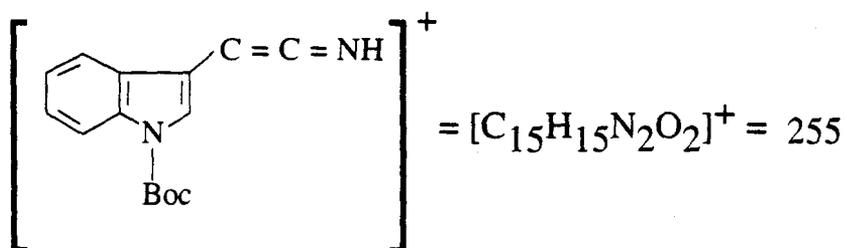
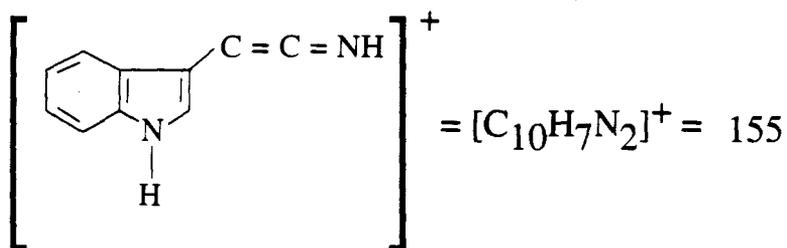
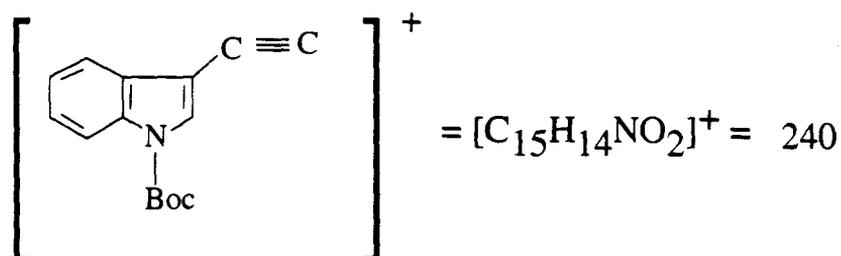
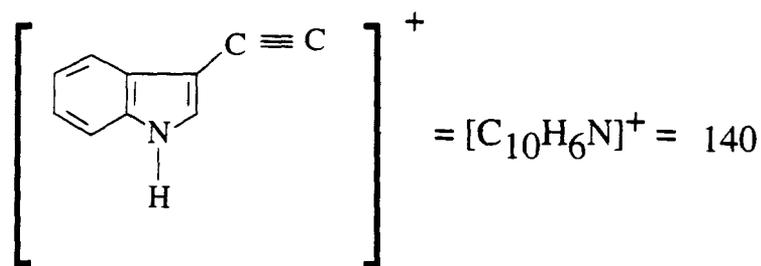
47	<p>◇ 2-[7-aminoheptyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[7-aminoheptylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
48	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
49	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[3-N', N'diméthylaminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[3-N', N' diméthylaminopropylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
50	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-indol-3-yl-éthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-indol-3-yl-éthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
51	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-(N'-2-aminoéthyl)aminoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
52	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[3-(N'-3-aminopropyl)aminopropylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
53	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-aminopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
54	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[6-aminohexyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[6-aminohexylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
55	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[7-aminoheptyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[7-aminoheptylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
57	<p>◇ 2-[2-NαFmoc NePmc-arginylamidoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[2-(NαFmoc NePmc-arginylamido)éthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
58	<p>◇ 2-[2-NePmc-arginylamidoéthyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[2-(NePmc-arginylamido)éthylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>

59	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[2-arginylamidoéthyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[2-arginylamidoéthylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
60	<p>◇ 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-trityl maléimide</p> <p>◇ 3-[5-guanidinopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
61	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-guanidinopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-guanidinopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
62	<p>◇ 2-[5-(NαFmoc NϵPmc-arginylamidopentyl)]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(NαFmoc NϵPmc-arginylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
63	<p>◇ 2-[5-(NαFmoc γBu-glutamylamidopentyl)]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(NαFmoc γBu-glutamylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
64	<p>◇ 2-[5-(NαBoc-phénylalaninylamidopentyl)]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(NαBoc-phénylalaninylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
65	<p>◇ 2-[5-NϵPmc-arginylamidopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(NϵPmc-arginylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
66	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-arginylamidopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-arginylamidopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
67	<p>◇ 2-[5-γBu-glutamylamidopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(γBu-glutamylamido)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
68	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-glutamylamidopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl] maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-glutamylamidopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>

69	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-phénylalaninylamidopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl] maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-phénylalaninylamidopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
70	<p>◇ 2-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
71	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-(N'-2-aminoéthyl)aminopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
72	<p>◇ 2-[5-(N-2-NαFmoc NePmc-arginylamidoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(2-(NαFmoc NePmc-arginylamidoéthyl)aminopentylamino)-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
73	<p>◇ 2-[5-(N-2-NαBoc-phénylalaninylamidoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(2-(NαBoc-phénylalaninylamidoéthyl)aminopentylamino)-4-[1-tert.butylloxycarbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
74	<p>◇ 2-[5-(2-NePmc-arginylamidoéthylamino)pentyl]amino-3-[1-tert.butylloxy carbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(2-NePmc-arginylamidoéthylamino)pentylamino]-4-[1-tert.butylloxy carbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>
75	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-(N-2-arginylamidoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-(N-2-arginylamidoéthyl)aminopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
76	<p>◇ trifluoroacétate de 2-[5-(2-phénylalaninylamidoéthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide</p> <p>◇ trifluoroacétate de 3-[5-(2-phénylalaninylamidoéthyl)aminopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione</p>
77	<p>◇ 2-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentyl]amino-3-[1-tert.butylloxy carbonyl-indol-3-yl]-N-tritylmaléimide</p> <p>◇ 3-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentylamino]-4-[1-tert.butylloxy carbonyl-indol-3-yl]-1-trityl pyrrole-2,5-dione</p>

78	◇ trifluoroacétate de 2-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentyl]amino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide ◇ trifluoroacétate de 3-[5-(2-éthoxycarbonyl-2-éthyl)aminopentylamino]-4-[1H-indol-3-yl] pyrrole-2,5-dione
-----------	---

Annexe 2 : Fragments observés en spectrométrie de masse (IE) pour les composés 19 à 30



BIBLIOGRAPHIE

AMIARD G., GOFFINET B.

Sur les N-trityl α amino-acide et leurs applications en synthèse peptidique. IV.
Dérivés de la lysine.

Mémoires présentés à la société chimique (J. Org. Chem., 1133-1136 (1957)).

ASAOKA Y., NAKAMURA S., YOSHIDA K., NISHIZUKA Y.

Protein Kinase C, calcium and phospholipid degradation.

TIBS., vol 17., 414-417 (1992).

AZZI A., BOSCOBOINIK D., HENSEY C.

The protein kinase C family.

Eur. J. Biochem., vol 208., 547-557 (1992).

BASKAKOV Y.A., MEL'NIKOV N.

Preparation of the cyclic hydrazole of maleic acid and some derivatives.

Zhur. Obschei Khim., vol 24., 1216-1221 (1954).

BELL R.M.

Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers.

Cell., vol 45., 631-632 (1986).

BERGMAN J., PELCMAN B.

Coupling of indoleacetic acid trianion or methyl indole acetic acid dianion. A
biometric approach to indolocarbazole alkaloids.

Tetrahedron letters., vol 28., N°28., 4441-4444 (1987).

BIT R.A., DAVIS P.D., ELLIOT L.H., HARRIS W., HILL C.H., KEECH E.,
KUMAR H., LAWTON G., MAW A., NIXON J.S., VESEY D.R., WADSWORTH
J., WILKINSON S.E.

Inhibitors of protein kinase C. 3. Potent and highly selective bisindolylmaleimides
by conformational restriction.

J. Med. Chem., vol 36., 21-29 (1993).

BOUTIN J.A., ERNOULD A. P., GENTON A., CUDENNEC C.A.

Partial purification and characterization of a new p36/40 tyrosine protein kinase from HL-60.

Biochem. Biophys. Res. Commun., vol 160., 1203-1211 (1989).

BRAMSON H.N., THOMAS N., MATSUEDA R., NELSON N.C., TAYLOR S.S., KAISER E.T.

Modification of the catalytic subunit of bovine Heart c AMP dependent protein kinase with affinity labels related to peptide substrates.

J. Biol. Chem., vol 257., 10575-10581 (1982).

BRENNER M., REXHAUSEN H., STEFFAN B., STEGLICH W.

Synthesis of arcyriarubin B and related Bis indolylmaleimides¹.

Tetrahedron., vol 44., N°10., 2887-2892 (1988).

BROWN J.P.

α , β -dibromomaleic anhydrides.

Brit 1, 026, 442 (1966).

BRYANT T.N., WATSON H.C., WENDELL P.L.

Structure of yeast phosphoglycerate kinase.

Nature., vol 247., 14-17 (1974).

CHEN S.J., KLANN E., GOWER M.C., POWELL C.M., SESSOMS J.S., SWEAT J.D.

Studies with synthetic peptide substrates derived from the neuronal protein neurogranin reveal structural determinants of potency and selectivity for protein kinase C.

Biochemistry., vol 32., 1032-1039 (1993).

CIAMICIAN G.L., SIEBER P.

Ueber einiger Derivative des Succinimids.

Ber., vol 43., 553-559 (1884).

CONOLLY E.A.

The synthesis of oligonucleotides containing a primary amino group at the 5'-terminus.

Nucleic Acids Research., vol 15., N°7., 3131-3139 (1987).

COTTON J.

Synthèse et purification de fragments peptidiques d'une protéine myrolaxante d'origine animale. Utilisation pour la détermination d'épitopes T.

Diplome d'ingénieur C.N.A.M. en Biochimie Industrielle et Agroalimentaire.

COUSSENS L., PARKER P.J., RHEE L., YANG-FENG T.L., CHEN E., WATERFIELD M.D., FRANCKE U., ULLRICH A.

Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways.

Science., vol 233., 859-866 (1986).

DAVIS P.D., HILL H., KEECH E., LAWTON G., NIXON J., SEDGWICK A., WADSWORTH J., WESTMACOTT D., WILKINSON S.

Potent selective inhibitors of protein kinase C.

FEB., vol 259., N°1., 61-63 (1989).

DAVIS P.D., HILL H., LAWTON G., NIXON J.S., WILKINSON S.E., HURST S.A., KEECH E., TURNER S.E.

Inhibitors of protein kinase C. 1.¹ 2,3-bisarylmaleimides.

J. Med. Chem., vol 35., 177-184 (1992).

DAVIS P.D., ELLIOTT L.H., HARRIS W., HILL C.H., HURST S.A., KEECH E., KUMAR H., LAWTON G., NIXON J.S., WILKINSON S.E.

Inhibitors of protein kinase C. 2.substituted.Bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity.

J. Med. Chem., vol 35., 994-1001 (1992).

DAVIS P.D., RINO A.

A mild conversion of maleic anhydrides into maleimides.

Tetrahedron Letters., vol 31., N°36., 5201-5204 (1990).

DAVIS P.D., RINO A., HURST A.

A convenient synthesis of bisindolyl and indolylarylmaleic anhydrides

Tetrahedron letters., vol 31., N°16., 2353-2356 (1990).

DIELS O., REINBECK M.

Über dibrom-maleinsäurosanhydrid.

Ber., vol 43., 1271-1279 (1910).

EDELMAN A.M., BLUMENTAL D.K., KREBS E.G.

Protein serine/threonine kinases.

Ann. Rev. Biochem. vol 56., 567-613 (1987).

ELVIDGE J.A., GOLDEN J.H., LINSTED R.P.

Conjugated Macrocycles. Tribenzotetraza porphin Metal Derivatives and Dibromotribenzotetra porphin.

J. Chem. Soc., vol 51., 2466-2472 (1957).

EXTON J.H.

Signaling-through phosphatidylcholine breakdown

J. Biol. Chem., vol 5., 1-4 (1990).

FABRE S., PRUDHOMME M.

Preparation of synthons for the synthesis of protein kinase C inhibitors from Rebeccamycin.

Biorganic and Medicinal Chemistry Letters., vol 2., N°5., 449-452 (1992).

FERRARI S., MARCHIORI F., BORIN G., PINNA L.A.

Distinct structural requirements of Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) and cAMP-dependent protein kinase as evidenced by synthetic substrates.

Febs letters., vol 184., N°1., 72-77 (1985).

FERRARI S., MARCHIORI F., MARIN O., PINNA L.A.

Ca^{2+} phospholipid-dependent and independent phosphorylation of synthetic peptide substrates by protein kinase C.

Eur. J. Biochem., vol 163., 481-487 (1987).

FIELDS G.B., NOBLE R.L.

Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonylaminoacids.

Int. J. Peptide. Protein. Res., vol 35., 161-214 (1990).

GALLANT M., LINK J.T., DANISHEFSKY S.J.

A stereoselective synthesis of indolo β , N-glycosides an application to the synthesis of rebeccamycin.

J. Org. Chem., vol 58., 343-349 (1993).

GLASS D.B., CHENG H.G., MUELLER L.M., REED J., WALSH D.A.

Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-stable inhibitor protein.

J. Biol. Chem., vol 264., N°15., 8802-8810 (1989).

GREHN L., RAGNARSSON U.

A convenient method for the preparation of 1-(ter-butyloxycarbonyl)pyrroles.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol 23., N°4., 296-297 (1984).

GROSS E., MEIENHOFER J.

Special methods in peptides.

The peptides : analysis, synthesis, biology., vol 5., 127-132.

GROSS E., MEIENHOFER J.

Protection of functional groups in peptide synthesis.

The peptides : analysis, synthesis, biology., vol 3., 277-278.

HANKS S.K., QUINN A.M., HUNTER T.

The protein kinase family : conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.

Science., vol 241., 42-52 (1988).

HIDAKA H., INAGAKI M., KAWAMOTO S., SASAKI Y.

Isoquinoline sulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C.

Biochemistry., vol 23., 5036-5041 (1984).

HIDAKA U., HAGIWARA M.

Pharmacology of the isoquinoline sulfonamide protein kinase C inhibitors.

TIPS., vol 8., 162-164 (1987).

HÖFLE G., STEGLICH W., VORBRÜGGEN H.

4-Dialkylaminopyridines as highly active acylation catalysts.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol 17., 569-583 (1978).

HOUSE C., KEMP B.E.

Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain.
Science., vol 338., 1726-1728 (1987).

HOUSE C., WETTENHALL R.E.H., KEMP B.E.

The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C.
J. Biol. Chem., vol 262., N°2., 772-777 (1987).

HUANG K.P.

The mechanism of protein kinase C activation.
TIPS., vol 12., N°12., 425-432 (1989).

HUGUES I., NOLAN W.P., RAPHAEL R.A.

Synthesis of the Indolo[2,3-a]carbazole Natural products Staurosporinone and arcyriaflavin B.
J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1, vol 1., 2475-2480 (1990).

HUNTER T., COOPER J.A.

Annu. Rev. Biochem., vol 54., 897-930 (1985).

JOYCE R.P., GAINOR J.A., WEINREB S.M.

Synthesis of the aromatic and monosaccharide Moieties of Staurosporine^{1,2}.
J. Org. Chem., vol 52., N°7., 1177-1185 (1987).

KAISER E., COLESCOTT R.L., BOSSINGER C.D., COOK P.I.

Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides.
Analytical Biochemistry., vol 34., N°2., 595-598 (1970).

KANEKO T., WONG H.

Two synthetic approaches to Rebeccamycin.
Tetrahedron letters., vol 26., N°34., 4015-4018 (1985).

KASE H., IWAHASHI K., NAKANISHI S., MATSUDA Y., YAMADA K., TAKAMASHI M., MURAKATA C., SATO A., KANEKO M.

K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide dependent protein kinases.

Biochem. Biophys. Research. Commun., vol 142., N°2., 436-444 (1987).

KEMP B.E., GRAVES D.J., BENJAMINI E., KREBS E.G.

Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase.

J. Biol. Chem., vol 252., N° 14., 4888-4894 (1977).

KIKKAWA U., KISHIMOTO A., NISHIZUKA Y.

The protein kinase C family : heterogeneity and its implications.

Annu. Rev. Biochem., vol 58., 31-44 (1989).

KIKKAWA U., OGITA K., ONO Y., ASAOKA Y., SHEARMAN M.S., FUJII T., ASE K., SEKIGUCHI K., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.

The common structure and activities of four subspecies of rat brain protein kinase C family.

FEB., vol 223., N°2., 212-216 (1987).

KNIGHTON D.R., ZHENG J., EYCK L.F.T., ASHFORD V.A., XUONG N.H., TAYLOR S.S., SOWADSKI J.M.

Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase.

Science., vol 253., 407-414 (1991).

KNIGHTON R.R., ZHENG J., TENNEYCK L.T., XUONG N.H., TAYLOR S.S., SOWADSKI J.M.

Structure of peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase.

Science., vol 253., 414-416 (1991).

KOESCH C.F., ALBERSON N.F.

Synthesis of N-methylmorphinone.

J. Am. Chem. Soc., vol 75., N°9., 2095-2097 (1953).

KROLL M.H., SCHAFER A.J.

Biochemical mechanisms of platelet activation.

Blood., vol 74., 1181-1195 (1989).

LE PECK J. B.

Nouvelles substances antitumorales

Les nouveaux moyens de la médecine ; bibliothèque pour la science 108-117.

LU G.S., MOJSOV S., TAM J.P., MERRIFIELD R.D.

Improved synthesis of 4-alkoxybenzylalcohol Resin.

J. Org. Chem., vol 46., 3433-3436 (1981).

MERRIFIELD R.

Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide.

J. Am. Chem. Soc., vol 85., 2149-2154 (1963).

MEYER R.T., REGENASS U., FABBRO D., ALTERI E., RÖSEL J., MÜLLER M., CARAVATTI G., MATTER A.

A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity.

Int. J. Cancer., vol 43., 851-856 (1989).

MÖLLER U., CECH D., SCHUBERT F.

P(III)-acidinderivate als synthese bausteine für die festphasensynthesenichtradioaktiv markierter Oligonucleotide.

LIEBIGS Ann. Chem., 1221-1225 (1990).

MORIKAWA A., SONE T., ASANO T.

5-Isoquinoline sulfamide derivatives. Synthesis and vasodilatory Activity of N-(2-aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide derivatives.

J. Med. Chem., vol 32., 46-50 (1989).

NAKANISKI S., MATSUDA Y., IWAHASHI K., KASE H.

K-252b, c and d, potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin.

J. Antibiotics., vol 39., 1066-1071 (1986).

NELSESTUEN G.L., BAZZI M.D.

Activation and regulation of protein kinase C enzymes.

Journal of bioenergetics and biomembranes., vol 23., N°1., 44-61 (1991).

NISHIZUKA Y.

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.

Nature., vol 308., 693-698 (1984).

NIHIZUKA Y.

Studies and perspectives of protein kinase C.

Sciences., vol 233., 305-312 (1986).

NISHIZUKA Y.

The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.

Nature., vol 334., 661-665 (1988).

NISHIZUKA Y.

The family of protein kinase C for signal transduction.

JAMA., vol 262., 1826-1833 (1989).

NISHIZUKA Y., TAKAI Y., KISHIMOTO A., HASHIMOTO E., INOUE M., YAMAMOTO M., CRISS W.E., KURODA Y.

A role of calcium in the activation of a new protein kinase system.

Advances in cyclic nucleotide Research., vol 9., 209-220 (1978).

NIXON J.S., BISHOP J., BRADSHAW D., DAVIS P.D., HILL C.H., ELLIOT L.H., KUMAR H., LAWTON G., LEWIS E.J., MULQUEEN M., SEDGWICK A.D., WESTMACOTT D., WADSWORTH J., WILKINSON S.E.

Novel, potent and selective inhibitors of protein kinase C show oral anti-inflammatory activity.

DRUGS EXPTL. CLIN. RES., XVII (8), 389-393 (1991).

NIXON J.S., BISHOP J., BRADSHAW D., DAVIS P.D., HILL C.H, ELLIOT L.H., KUMAR H., LAWTON G., LEWIS E.J., MULQUEEN M., WESTMACOTT D., WADSWORTH J., WILKINSON S.E.

The design and biological properties of potent and selective inhibitors of protein kinase C.

Biochemical society transactions., vol 20., 419-425 (1992).

OMURA S., IWAI Y., HIRANO A., NAKAGAWA A., AWAYA J., TSUCHIYA H., TAKAHASHI Y., MASUMA R.

A new alkaloid AM-2282 of streptomyces origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization.

J. Antibiot. , vol 30., 275-281 (1977).

ONO Y., FUJII T., OGITA K., KIKKAWA U., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.

Identification of three additional members of rat protein kinase C family : δ , ϵ , ζ subspecies.

FEB., vol 226., N°1., 125-128 (1987).

ONO Y., FUJII T., OGITA K., KIKKAWA U., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.

The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family.

J. Biol. Chem., vol 263., N°14., 6927-6932 (1988).

PARKER P.J., COUSSENS L., TOTTY N., RHEE L., YOUNG S., CHEN E., STABEL S., WATERFIELD M.D., ULLRICH A.

The complete primary structure of protein kinase C- the major phorbol ester receptor.

Science., vol 233., 853-859 (1986).

PELECH S.L., VANCE D.E.

Signal transduction via phosphatidylcholine cycles.

Trends. Biochem. S.C., vol 14., 28-30 (1989).

PFITZNER K.E., MOFFATT J.G.

The synthesis and hydrolysis of 2',3'-dideoxyuridine.

J. Org. Chem., 1508-1510 (1964).

POWIS G.

Signalling targets for anticancer drug development.

TIPS., vol 12., 188-194 (1991).

RANDELL

Evidence for phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C in rat platelets.

Biochim. Biophys. Acta 1124., 273-278 (1992).

RAWAL V.H., CAVA M.P.

Thermolytic removal of t-butyloxycarbonyl (BOC) protecting group of indoles and pyrroles.

Tetrahedron Letters., vol 26., N°50., 6141-6142 (1985).

RICOUART A.

Conception et synthèse de structures peptidiques appliquées à la caractérisation et l'inhibition de la protéine kinase C.

Thèse de doctorat d'Université en Chimie Organique et Macromoléculaire (1989).

RICOUART A., TARTAR A., SERGHERAERT C.

Evidence for negative control in protein kinase C substrate specificity.

International Journal of Peptide and Protein Research (1989), 33, 304-307.

RICOUART A., GESQUIERE J.C., TARTAR A., SERGHERAERT C.

Design of potent protein kinase inhibitors using the bisubstrate approach.

J. Med. Chem., vol 34., 73-78 (1991).

RINIKER B., HARTMANN A.

Deprotection of peptides containing Arg(Pmc) and tryptophan or tyrosine :
Elucidation of byproducts.

A. peptides (chemistry, structure and biology ; Riviers, J.E., Marschall, G.R.,
Eds., Escom Press : 1990, 1-1113.

ROEDIG A., ZIEGLER H.

Investigation of 1,2-dihalocyclopentene-3-5-diones. Condensation with aldehydes,
coupling, halogenation and halogen-exchange reactions.

Chem. Ber., vol 94., 1800-1813 (1961).

SCHARF H.D, KORTE F., SEIDLER H., DITTMAR R.

Preparative photochemical C4-ring synthesis.

Chem. Ber., vol 98., N°3., 764-780 (1965).

SHOJY.S., ERISSON L.H., WALSH K.A., FISCHER E.H., TITANI K.

Aminoacid sequence of the catalytic subunit of bovine type II adenosine cyclic 3', 5'-phosphate dependent protein kinase.

Biochemistry., vol 22., 3702-3709 (1983).

SIEBER P., RINIKER B.

Protection of carboxamide functions by the trityl residue application to peptide synthesis.

Tetrahedron Letters., vol 32., N°6., 739-742 (1991).

STABEL S., PARKER P.J.

Protein kinase C.

Pharmac. Ther., vol 51., 71-95 (1991).

STEWART J.M., YOUNG J.D.

Solid Phase Peptide Synthesis.

TAKAI Y., KISHIMOTO A., INOUE M., NISHIZUKA Y.

Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues.

J. Biol. Chem., vol 252., N°21., 7603-7609 (1977).

TAKAI Y., KISHIMOTO A., IWASA Y., KAWAHARA Y., MORI T., NISHIZUKA Y.

Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids.

J. Biol. Chem., vol 254., 3692-3695 (1979).

TAMAKI T., NOMOTO H., TAKAHASHI I., YATO Y., MORIMOTO M., TOMITA F.

Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca²⁺ dependent protein kinase.

Biochemical and Biophysical Research Communications., vol 135., N°2., 397-402 (1986).

TAMAOKI T.

Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and Calphostin C as Protein Kinase Inhibitors.

Protein phosphorylation., vol 201., 340-347 (1991).

TAYLOR S. S., ADAMS J.A.

Protein kinases : coming of age.

Current Opinion in structural Biology., vol 2., 743-748 (1992).

TAYLOR S. S., KNIGHTON D.R., ZHENG J., SOWADSKI J.M., GIBBS C.S., ZOLLER M.J.

A template for the protein kinase family.

TIBS 18 , 84-89 (1993).

TOULLEC D., PIANETTI P., COSTE H., BELLEGERGUE P., GRAND-PERRET T., AJAKANE M., BAUDET V., BOISSIN P., BOURSIER E., LORIOLE F., DUHAMEL L., CHARON D., KIRILOVSKI J.

The bisindolylmaleimide GF 109203 X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C.

J. Biol. Chem., vol 266., N°24., 15771-15781 (1991).

TURNER R.S., KEMP B.E., HUAI-DE SU., KUO J.F.

Substrate specificity of phospholipid/Ca²⁺-dependent protein kinase as probed with synthetic peptide fragments of the bovine myelin basic protein.

J. Biol. Chem., vol 260., N°21., 11503-11507 (1985).

WANG S.S.

P-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments.

J. Am. Chem. Soc., vol 95., 1328-1333 (1973).

WANG S.S., KULESHA I.D.

Preparation of protected peptide intermediates for a synthesis of the ovine pituitary growth hormone séquence 96-135.

J. Org. Chem., vol 40., N° 9., 1227-1234 (1975).

WARD N.E., O'BRIAN C.A.

Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine : Evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates.

Molecular Pharmacology., vol 41., 387-392 (1991).

WOODGETT J.R., GOULD K.L., HUNTER T.

Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements.

Eur. J. Biochem., vol 161., 177-184 (1986).

ZUCKERMANN R.N., KERR J.M., KENT S.B.H., MOOS W.H.

Efficient method for preparation of peptoids [Oligo (N-substituted glycines)] by submonomer Solid-Phase Synthesis.

J. Am. Chem. Soc., vol 114., 10646-10647 (1992).



CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'INHIBITEURS BISUBSTRAT DE LA PROTÉINE KINASE C

Résumé

Le but de ce travail est l'obtention d'inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC), enzyme impliquée dans la transduction du signal cellulaire.

La plupart des inhibiteurs déjà répertoriés agissent en se fixant directement sur un site de reconnaissance de la PKC et très peu d'entre eux présentent une spécificité satisfaisante. Afin d'obtenir des inhibiteurs plus spécifiques et plus actifs, nous nous sommes proposés de concevoir des inhibiteurs bisubstrat susceptibles de se fixer simultanément sur deux sites de reconnaissance de la PKC.

La première partie du travail est consacrée à la conception et à la synthèse d'inhibiteurs bis-ATP. Comme monomère susceptible de reconnaître chacun des deux sites accepteurs potentiels de l'ATP, nous avons choisi un dérivé de l'isoquinoléine sulfonamide. La distance séparant ces deux sites n'étant pas connue, les deux mimes ATP ont donc été condensés par des bras espaceurs de longueur variable. L'association de ces deux mimes nous a fourni de bons inhibiteurs de la PKC, néanmoins les valeurs des constantes d'inhibition observées (1 μM) ne font pas penser à une interaction simultanée avec les deux sites de reconnaissance.

Dans la deuxième partie, des inhibiteurs susceptibles d'interagir simultanément au niveau des sites de liaison du substrat et de l'ATP ont été préparés. La distance séparant les deux sites a été évaluée par des techniques de modélisation moléculaire à partir de la structure cristallographique du domaine catalytique de la protéine kinase A (40 % d'homologie avec celui de la PKC). La conception d'un mime ATP spécifique PKC (2-alkylamino-3-[1H-indol-3-yl]maléimide) puis sa fixation en N-term d'une séquence peptidique ont conduit à des inhibiteurs d'activité intéressante.

mots-clés

protéine kinase, concept bisubstrat, inhibiteurs bisubstrat, inhibiteurs bis-ATP, inhibiteurs de protéines kinases