

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ANNEE : 2019**

**THESE 2019/TOU3/2092**

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Kévin ANTRAYGUES**  
**Né le 13 décembre 1995 à Draguignan**

**Synthèse et évaluation d'antagonistes de XIAP vers de nouveaux  
traitements du cancer de l'ovaire chimiorésistant.**

Soutenu le 13 Décembre 2019

Directeur de thèse : Madame le Docteur KIEFFER Charline

**JURY**

Président : Monsieur le Professeur Pierre VERHAEGHE  
1er assesseur : Madame le Professeur Elisa BOUTET  
2ème assesseur : Madame le Docteur Charline KIEFFER

## PERSONNEL ENSEIGNANT

de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier au 1<sup>er</sup>  
janvier 2019

### Professeurs Emérites

|                  |                       |
|------------------|-----------------------|
| M. BENOIST H.    | Immunologie           |
| M. BERNADOU J.   | Chimie Thérapeutique  |
| M. CAMPISTRON G. | Physiologie Mycologie |
| M. CHAVANT L.    | Pharmacognosie        |
| M. MOULIS C.     | Biologie Cellulaire   |
| M. ROUGE P.      | Toxicologie           |
| M. SALLES B.     | Hématologie           |
| M. SIE P.        |                       |

### Professeurs des Universités

#### Hospitolo-Universitaires

|                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| Mme AYYOUB M.          | Immunologie               |
| M. CHATELUT E.         | Pharmacologie             |
| Mme DE MAS MANSAT V.   | Hématologie               |
| M. FAVRE G.            | Biochimie                 |
| Mme GANDIA P.          | Pharmacologie             |
| M. PARINI A.           | Physiologie               |
| M. PASQUIER C. (Doyen) | Bactériologie - Virologie |
| Mme ROQUES C.          | Bactériologie - Virologie |
| Mme SALLERIN B.        | Pharmacologie Pharmacie   |
| M. VALENTIN A.         | Clinique Parasitologie    |

#### Universitaires

|                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| Mme BARRE A.              | Biologie                 |
| Mme BAZIARD G.            | Chimie pharmaceutique    |
| Mme BERNARDES-GÉNISSON V. | Chimie thérapeutique     |
| Mme BOUTET E.             | Toxicologie - Sémiologie |
| Mme COUDERC B.            | Biochimie                |
| M. CUSSAC D. (Vice-Doyen) | Physiologie              |
| M. FABRE N.               | Pharmacognosie           |
| M. GAIRIN J-E.            | Pharmacologie            |
| Mme GIROD-FULLANA S.      | Pharmacie Galénique      |
| Mme MULLER-STAU MONT C.   | Toxicologie - Sémiologie |
| Mme NEPVEU F.             | Chimie analytique        |
| M. SEGUI B.               | Biologie Cellulaire      |
| Mme SIXOU S.              | Biochimie                |
| M. SOUCHARD J-P.          | Chimie analytique        |
| Mme TABOULET F.           | Droit Pharmaceutique     |
| M. VERHAEGHE P.           | Chimie Thérapeutique     |

## Maîtres de Conférences des Universités

| Hospitolo-Universitaires |                      | Universitaires              |                           |
|--------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| M. CESTAC P. (*)         | Pharmacie Clinique   | Mme ARELLANO C. (*)         | Chimie Thérapeutique      |
| Mme JUILLARD-CONDAT B.   | Droit Pharmaceutique | Mme AUTHIER H.              | Parasitologie             |
| M. PUISSET F.            | Pharmacie Clinique   | M. BERGE M. (*)             | Bactériologie - Virologie |
| Mme ROUZAUD-LABORDE C.   | Pharmacie Clinique   | Mme BON C.                  | Biophysique               |
| Mme SERONIE-VIVIEN S (*) | Biochimie            | M. BOUJILA J. (*)           | Chimie analytique         |
| Mme THOMAS F. (*)        | Pharmacologie        | M. BROUILLET F.             | Pharmacie Galénique       |
|                          |                      | Mme CABOU C.                | Physiologie               |
|                          |                      | Mme CAZALBOU S. (*)         | Pharmacie Galénique       |
|                          |                      | Mme CHAPUY-REGAUD S.        | Bactériologie - Virologie |
|                          |                      | Mme COLACIOS C.             | Immunologie               |
|                          |                      | Mme COSTE A. (*)            | Parasitologie             |
|                          |                      | M. DELCOURT N.              | Biochimie                 |
|                          |                      | Mme DERAEEVE C.             | Chimie Thérapeutique      |
|                          |                      | Mme ECHINARD-DOUIN V.       | Physiologie               |
|                          |                      | Mme EL GARAH F.             | Chimie Pharmaceutique     |
|                          |                      | Mme EL HAGE S.              | Chimie Pharmaceutique     |
|                          |                      | Mme FALLONE F.              | Toxicologie               |
|                          |                      | Mme FERNANDEZ-VIDAL A.      | Toxicologie               |
|                          |                      | Mme HALOVA-LAJOIE B.        | Chimie Pharmaceutique     |
|                          |                      | Mme JOUANJUS E.             | Pharmacologie             |
|                          |                      | Mme LAJOIE-MAZENC I.        | Biochimie                 |
|                          |                      | Mme LEFEVRE L.              | Physiologie               |
|                          |                      | Mme LE LAMER A-C.           | Pharmacognosie            |
|                          |                      | M. LEMARIE A.               | Biochimie                 |
|                          |                      | M. MARTI G.                 | Pharmacognosie            |
|                          |                      | Mme MIREY G. (*)            | Toxicologie               |
|                          |                      | Mme MONFERRAN S.            | Biochimie                 |
|                          |                      | M. Olichon A.               | Biochimie                 |
|                          |                      | Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*) | Chimie Analytique         |
|                          |                      | M. SAINTE-MARIE Y.          | Physiologie               |
|                          |                      | M. STIGLIANI J-L.           | Chimie Pharmaceutique     |
|                          |                      | M. SUDOR J. (*)             | Chimie Analytique         |
|                          |                      | Mme TERRISSE A-D.           | Hématologie               |
|                          |                      | Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*) | Pharmacie Galénique       |
|                          |                      | Mme VANSTEELANDT M.         | Pharmacognosie            |
|                          |                      | Mme WHITE-KONING M. (*)     | Mathématiques             |

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

| Assistants Hospitolo-Universitaires |                      | Assistant Associé des Universités |             |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------|
| Mme LARGEAUD L.                     | Immunologie          | Mme MARTINI H.                    | Physiologie |
| M. MOUMENI A.                       | Biochimie            |                                   |             |
| M. METSU D.                         | Pharmacologie        |                                   |             |
| Mme PALUDETTO M.N.                  | Chimie thérapeutique |                                   |             |
| M.PAGES A.                          | Pharmacie Clinique   |                                   |             |
| Mme SALABE                          | Biophysique          |                                   |             |

***À Monsieur Pierre Verhaeghe,***

Professeur à l'Université de Toulouse

***À Madame Elisa Boutet,***

Professeur à l'Université de Toulouse

***À Madame Charline Kieffer,***

Maître de conférences à l'Université de Caen Normandie

*Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,*

*Et de juger mon travail,*

*En témoignage de ma profonde reconnaissance.*

# Remerciements

Je remercie tout d'abord Patrick Dallemagne, directeur du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage d'application de 5<sup>ème</sup> année de Pharmacie et mon stage de Master 2.

Je remercie également Anne-Sophie Voisin Chiret pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, ainsi que pour m'avoir permis de réaliser un poster lors du congrès du Cancéropôle Nord-Ouest.

Un immense merci à Charline pour m'avoir encadré tout au long de ces deux stages. De par ta bienveillance et le fait que tu aies toujours été là pour répondre à mes questions, travailler avec toi a été un réel plaisir. Je suis heureux d'avoir fait ta connaissance.

Merci à Jana pour son aide en modélisation moléculaire sur le projet.

Je remercie bien sûr toute l'équipe du CM042 :

Merci à Marie pour ta gentillesse et pour avoir effectué les tests de FPA

Un grand merci à Damien pour tes précieux conseils en chimie

Merci à toi Camille, pour la bonne humeur que tu apportais dans le labo et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir.

Johanna (haan), merci pour toutes les bonnes rigolades qu'on a eu dans le labo. On n'a pas beaucoup travaillé ensemble, mais ces deux mois ont été géniaux !

Merci à toi Martin, cher collègue de M2. J'ai beaucoup apprécié avoir travaillé avec toi sur le projet, on a formé une bonne équipe ! (même si personne n'est venu voir notre poster au congrès...)

Merci également à Peggy, pour sa patience avec les fiches de la chimiothèque.

Je tiens également à remercier les gens sûrs, Clément et Caroline, pour tous les bons moments qu'on a passés !

Spéciale dédicace à Victor, mon encadrant hors labo !

Enfin un très grand merci à tous les membres du CERMN pour leur accueil, j'ai passé une année merveilleuse.

Un grand merci à mes amis du M2, Quentin, Camille et Martin pour les bons moments qu'on a partagés, en particulier le rallye pharma !

Merci beaucoup à Pierre Verhaeghe, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui.

Je remercie enfin de tout cœur toute ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu dans cette longue aventure. Un merci tout particulier à papa, maman, Cédric et Elodie, c'est grâce à vous si j'ai pu aller aussi loin (et c'est pas fini !)

Et pour terminer, merci à toi cher lecteur, qui à défaut de ne peut-être pas lire la suite de ce manuscrit, auras au moins lu ces remerciements !

# Sommaire

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tables des illustrations .....</b>                      | <b>17</b> |
| <b>Table des figures .....</b>                             | <b>17</b> |
| <b>Table des schémas.....</b>                              | <b>19</b> |
| <b>Table des tableaux .....</b>                            | <b>21</b> |
| <b>Abréviations et acronymes .....</b>                     | <b>23</b> |
| <b>Avant-propos .....</b>                                  | <b>27</b> |
| <b>Introduction .....</b>                                  | <b>29</b> |
| <b>1- Epidémiologie.....</b>                               | <b>29</b> |
| <b>2- Physiopathologie des cancers .....</b>               | <b>30</b> |
| 2-1- Le processus de cancérisation .....                   | 30        |
| 2-2- Classification des cancers .....                      | 31        |
| <b>3- Stratégies thérapeutiques .....</b>                  | <b>32</b> |
| 3-1- La chimiothérapie cytotoxique .....                   | 32        |
| 3-1-1- Les antimétabolites .....                           | 33        |
| 3-1-2- Les alkylants de l'ADN et apparentés .....          | 35        |
| 3-1-3- Les intercalants de l'ADN .....                     | 36        |
| 3-1-4- Les poisons du fuseau mitotique.....                | 37        |
| 3-2- L'hormonothérapie .....                               | 38        |
| 3-2-1- Les anti-œstrogènes .....                           | 39        |
| 3-2-2- Les anti-aromatase .....                            | 39        |
| 3-2-3- Les anti-androgènes .....                           | 40        |
| 3-2-4- Les agonistes de la LH-RH .....                     | 41        |
| 3-3- Les thérapies ciblées .....                           | 43        |
| 3-3-1- Les inhibiteurs de tyrosine kinase .....            | 45        |
| 3-3-1-1 Les inhibiteurs d'ErbB.....                        | 45        |
| 3-3-1-2- Les inhibiteurs de l'angiogenèse.....             | 46        |
| 3-3-1-3- Les autres inhibiteurs de tyrosine kinase .....   | 47        |
| 3-3-2- Les inhibiteurs de sérine/thréonine kinase .....    | 48        |
| 3-3-3- Inhibiteur de l'antigène de surface CD20 .....      | 49        |
| 3-3-4- Les immunomodulateurs .....                         | 49        |
| 3-4- Récapitulatif des traitements de chimiothérapie ..... | 50        |
| <b>4- Mécanismes de chimiorésistance.....</b>              | <b>52</b> |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4-1- Influx et efflux des médicaments.....                                                               | 53        |
| 4-2- Inactivation du principe actif .....                                                                | 53        |
| 4-3- Modifications de la cible.....                                                                      | 54        |
| 4-4- Réparation de l'ADN.....                                                                            | 55        |
| 4-5- Echappement à l'apoptose .....                                                                      | 55        |
| <b>5- XIAP, une protéine inhibitrice de l'apoptose.....</b>                                              | <b>56</b> |
| 5-1- L'apoptose.....                                                                                     | 56        |
| 5-2- La famille des IAPs.....                                                                            | 59        |
| 5-3- Intérêt de cibler XIAP.....                                                                         | 61        |
| 5-4- Les inhibiteurs de XIAP .....                                                                       | 63        |
| <b>6- Etat des lieux des inhibiteurs de XIAP .....</b>                                                   | <b>63</b> |
| 6-1 Inhibiteurs d'IAP en phase d'essais cliniques.....                                                   | 64        |
| 6-2 Inhibiteurs abiotiques de XIAP en développement .....                                                | 68        |
| 6-2-1- Inhibiteurs de XIAP-BIR3 .....                                                                    | 68        |
| 6-2-2- Inhibiteurs de XIAP-BIR2 .....                                                                    | 71        |
| <b>7- Démarche mise en œuvre pour la conception de nouveaux inhibiteurs de XIAP au laboratoire .....</b> | <b>73</b> |
| <b>Travaux personnels.....</b>                                                                           | <b>77</b> |
| <b>1- Synthèse des molécules de première génération.....</b>                                             | <b>77</b> |
| 1-1- Synthèse de la molécule de référence .....                                                          | 77        |
| 1-2- Synthèse des molécules présentant une fonction amine primaire .....                                 | 79        |
| 1-2-1- Synthèse des molécules possédant une fonction amine portée par un cycle pipéridine .....          | 79        |
| 1-2-2- Synthèse des molécules possédant une fonction amine portée par un cycle pyrazole.....             | 80        |
| 1-2-3- Ajout d'une unité de carbone supplémentaire entre la fonction amine et le cycle pyrazole .....    | 82        |
| 1-3- Synthèse des molécules présentant une fonction amine hétérocyclique .....                           | 85        |
| 1-3-1- Synthèse de la molécule 28 présentant un cycle pyrazole.....                                      | 85        |
| 1-3-2- Synthèse des molécules présentant un cycle pyrrole .....                                          | 86        |
| 1-4- Synthèse des molécules présentant un groupement acétamide .....                                     | 88        |
| <b>2- Criblage des molécules de première génération .....</b>                                            | <b>90</b> |
| <b>3- Etude de l'influence du groupement nitro sur l'affinité de ces molécules .....</b>                 | <b>91</b> |
| 3-1- Remplacement du groupement nitro .....                                                              | 93        |
| 3-2- Modulations du noyau pyridine.....                                                                  | 96        |

|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3-3- Modulations du noyau pyrazole .....                                                           | 98         |
| <b>4- Modulations du hit MR34659 pour l'obtention de molécules de deuxième génération</b><br>..... | <b>100</b> |
| 4-1- Allongement de la chaîne linker .....                                                         | 100        |
| 4-2- Ajout de groupements donneurs de liaison hydrogène sur le noyau pyridine .....                | 102        |
| <b>5- Deuxième campagne de criblage des composés</b> .....                                         | <b>103</b> |
| 5-1- Criblage sur le domaine XIAP-BIR3.....                                                        | 103        |
| 5-2- Criblage sur le domaine XIAP-BIR2.....                                                        | 105        |
| <b>Conclusion et perspectives</b> .....                                                            | <b>109</b> |
| <b>Experimental section</b> .....                                                                  | <b>111</b> |

# Tables des illustrations

## Table des figures

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Incidence et mortalité des cancers en 2018, chez l'homme et la femme. <sup>1,2</sup> .....                                                                | 29 |
| <b>Figure 2.</b> Représentation des différentes étapes de cancérisation. ....                                                                                              | 30 |
| <b>Figure 3.</b> Schéma des cibles des agents de chimiothérapie cytotoxique.....                                                                                           | 33 |
| <b>Figure 4.</b> Structure de l'uracile, de la thymine et du 5-Fu. ....                                                                                                    | 33 |
| <b>Figure 5.</b> Schéma récapitulatif des mécanismes d'action du 5-Fu.....                                                                                                 | 34 |
| <b>Figure 6.</b> Structures de l'adénine et de la fludarabine. ....                                                                                                        | 34 |
| <b>Figure 7.</b> Structures chimiques de l'acide folique et du méthotrexate. ....                                                                                          | 35 |
| <b>Figure 8.</b> Mécanisme d'action du méthotrexate .....                                                                                                                  | 35 |
| <b>Figure 9.</b> Mécanisme d'action du cisplatine, d'après Nuhric, A. <sup>9</sup> .....                                                                                   | 36 |
| <b>Figure 10. (A)</b> Structure chimique de la doxorubicine. <b>(B)</b> Mécanisme d'action de la doxorubicine, d'après Mobaraki <i>et al.</i> <sup>10</sup> .....          | 37 |
| <b>Figure 11.</b> Structure chimique de l'étoposide. ....                                                                                                                  | 37 |
| <b>Figure 12.</b> Structures chimiques de la vincristine et du paclitaxel. ....                                                                                            | 38 |
| <b>Figure 14.</b> Structures de l'estradiol, du tamoxifène et de du fulvestrant. ....                                                                                      | 39 |
| <b>Figure 15.</b> Action de l'aromatase sur la synthèse des hormones stéroïdiennes. ....                                                                                   | 40 |
| <b>Figure 16.</b> Structure chimique du formestane et de l'anastrozole. ....                                                                                               | 40 |
| <b>Figure 17.</b> Structures chimiques du nilutamide, de la cyprotérone et de l'abiratéron. ....                                                                           | 41 |
| <b>Figure 18.</b> Inhibition de la synthèse de la testostérone (croix rouge) par l'abiratéron. ....                                                                        | 41 |
| <b>Figure 19.</b> Structure chimique de la gosérelène. ....                                                                                                                | 42 |
| <b>Figure 20.</b> Rétrocontrôle négatif de l'hypophyse par la testostérone et les œstrogènes. ....                                                                         | 42 |
| <b>Figure 21.</b> Mécanisme d'action des agents de thérapie ciblée. ....                                                                                                   | 44 |
| <b>Figure 22.</b> Structures chimiques de l'ATP et de l'imatinib. Le cycle pyrimidine commun est représenté en rouge. ....                                                 | 44 |
| <b>Figure 23.</b> Structures chimiques de l'erlotinib et du lapatinib. ....                                                                                                | 45 |
| <b>Figure 24.</b> Mécanisme de l'inhibition irréversible de l'EGFR par l'afatinib. ....                                                                                    | 46 |
| <b>Figure 25.</b> Structure chimique du sunitinib. ....                                                                                                                    | 47 |
| <b>Figure 26.</b> Structures chimiques du crizotinib et de l'ibrutinib. ....                                                                                               | 47 |
| <b>Figure 27.</b> Structure chimique du vemurafenib.....                                                                                                                   | 48 |
| <b>Figure 28.</b> Structure chimique de l'everolimus.....                                                                                                                  | 48 |
| <b>Figure 29.</b> Immunomodulation du LT par les CPA et les cellules tumorales, d'après Aref <i>et al.</i> .....                                                           | 50 |
| <b>Figure 30.</b> Mécanismes de chimiorésistances, symbolisés par des flèches rouges.....                                                                                  | 52 |
| <b>Figure 31.</b> Structure du glutathion (à gauche) et d'un complexe cisplatine-glutathion (à droite) proposé dans la littérature. ....                                   | 54 |
| <b>Figure 32.</b> Modèle de liaison de l'imatinib (STI-571) avec la kinase Bcr-abl sauvage (à gauche) et mutée (à droite), d'après Gorre <i>et al.</i> <sup>51</sup> ..... | 55 |
| <b>Figure 33.</b> Mécanisme cellulaire de l'apoptose, d'après Abou-Ghali et Stiban. <sup>57</sup> .....                                                                    | 57 |
| <b>Figure 34.</b> Voie extrinsèque de l'apoptose, passant par TNFR1. ....                                                                                                  | 58 |

|                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 35.</b> Cascade d'activation des caspases dépendante de la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose, d'après Röckmann <i>et al.</i> <sup>62</sup> .....                                                   | 59  |
| <b>Figure 36.</b> Représentation de la famille des IAP, avec leurs domaines protéiques, d'après Ribe <i>et al.</i> .....                                                                                                 | 60  |
| <b>Figure 37.</b> Complexe SMAC et XIAP-BIR3 (code PDB : 1G73) et détail des interactions avec le peptide AVPI (en jaune), les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés bleus. <sup>76</sup> ....             | 62  |
| <b>Figure 38.</b> Structures chimiques d'AVPI, de GDC-0152 (première génération), du debio 1143 (seconde génération), du birinapant (troisième génération) et d'ASTX660 (quatrième génération).....                      | 64  |
| <b>Figure 39.</b> Optimisations du hit A ayant permis l'obtention du lead B puis du candidat-médicament ASTX660.....                                                                                                     | 67  |
| <b>Figure 40.</b> Structure des molécules <b>C</b> et <b>D</b> , et leur affinité pour le domaine XIAP-BIR3. ....                                                                                                        | 69  |
| <b>Figure 41.</b> Structure chimique de <b>E</b> et son affinité pour le domaine XIAP-BIR3. ....                                                                                                                         | 70  |
| <b>Figure 42.</b> Docking de <b>E</b> dans XIAP-BIR3 en se basant sur des données de RMN-2D, d'après Park <i>et al.</i> <sup>93</sup> .....                                                                              | 70  |
| <b>Figure 43.</b> Structure des molécules <b>F</b> à <b>H</b> et leur affinité pour le domaine XIAP-BIR3. ....                                                                                                           | 71  |
| <b>Figure 44.</b> Optimisations du hit <b>I</b> ayant conduites aux composés <b>J</b> puis <b>K</b> .....                                                                                                                | 72  |
| <b>Figure 45.</b> Exemple d'inhibiteurs de XIAP-BIR3 de structure abiotique décrits dans la littérature, présentant le motif « amine-linker-hétérocycle aromatique ». ....                                               | 73  |
| <b>Figure 46. (A)</b> Structure d'un des composés issus des travaux de modélisation moléculaire. <b>(B)</b> Docking de ce composé dans domaine XIAP-BIR3. ....                                                           | 74  |
| <b>Figure 47.</b> Résumé des différentes étapes du travail effectué.....                                                                                                                                                 | 75  |
| <b>Figure 48.</b> Complexe SMAC et XIAP-BIR3 (code PDB : 1G73) et visualisation des poches P1 (A1), P2 (V2), P3 (P3) et P4 (I4), d'après Cong <i>et al.</i> <sup>76</sup> .....                                          | 77  |
| <b>Figure 49.</b> Molécules envisagées possédant une unité de carbone entre le groupement amine et le noyau pyrazole.....                                                                                                | 82  |
| <b>Figure 50.</b> Substitution de la fonction amine primaire par un groupement acétamide.....                                                                                                                            | 88  |
| <b>Figure 51.</b> Structure et affinité des hits identifiés par FPA sur XIAP-BIR3. ....                                                                                                                                  | 91  |
| <b>Figure 52.</b> Représentation schématique de la pose de la molécule <b>MR34658</b> dans le domaine XIAP –BIR3. Le groupement nitro est soit situé dans la poche P1 (à gauche), soit dans la poche P4 (à droite). .... | 92  |
| <b>Figure 53.</b> Modulation envisagées .....                                                                                                                                                                            | 92  |
| <b>Figure 54.</b> Docking du hit <b>MR34658</b> dans le domaine XIAP-BIR3. Le groupement nitro n'interagit avec aucun acide aminé de la protéine. ....                                                                   | 98  |
| <b>Figure 55.</b> Tautomérie possible, au niveau du noyau pyrazole, des composés <b>MR34657</b> et <b>MR34658</b> .....                                                                                                  | 99  |
| <b>Figure 56.</b> Co-cristallisation de la molécule <b>MR3458</b> avec une molécule d'isopropanol. ....                                                                                                                  | 99  |
| <b>Figure 57.</b> Modulations envisagées du hit <b>MR34659</b> . ....                                                                                                                                                    | 100 |
| <b>Figure 58.</b> Docking du hit <b>MR34659</b> et d'une molécule de seconde génération dans le domaine XIAP-BIR3.....                                                                                                   | 101 |
| <b>Figure 59.</b> Structure des molécules <b>48</b> et <b>49</b> , ainsi que des composés <b>MR34657</b> et <b>MR34658</b> . ....                                                                                        | 103 |
| <b>Figure 60.</b> Images de dynamique moléculaire du hit <b>MR34658</b> en début de simulation (molécule en bleu) et en fin de simulation (molécule en violet). ....                                                     | 104 |

|                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 61.</b> Principe de l'Alphascreen®, appliqué à l'étude d'interaction protéine-protéine sur le domaine XIAP-BIR2, d'après Martin Giret.....                                     | 106 |
| <b>Figure 62. (A)</b> Structure des composés <b>MR34657</b> , <b>MR34659</b> , <b>MR34676</b> . <b>(B)</b> Signal de luminescence en fonction de la concentration en composé testé. .... | 107 |

## Table des schémas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Schéma 1.</b> Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention de la 2-(pipérazin-1-yl)-1-(pipéridin-1-yl)éthanone <b>1</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 78 |
| <b>Schéma 2.</b> Synthèse du 2-(pipérazin-1-yl)-1-(pipéridin-1-yl)éthanone <b>1</b> . Réactifs et conditions : (i) pipéridine 1,0 éq., triéthylamine 1,0 éq., DCM, 0 °C -> 22 °C, 30 min -> 16 h ; (ii) pipérazine 1,0 éq., K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,5 éq., DMF, 60 °C, 96 h. ....                                                                                                                                                                                                                                            | 78 |
| <b>Schéma 3.</b> Synthèse du ditrifluoroacétate de 1-(2-oxo-2-(pipéridin-1-yl)éthyl)pipérazine-1,4-diium <b>1e</b> . Réactifs et conditions : (i) pipéridine 1,0 éq., triéthylamine 1,0 éq., DCM, 0 °C -> 22 °C, 30 min -> 12 h ; (ii) Boc <sub>2</sub> O 0,5 éq., DCM, 0 °C -> 22 °C, 15 min -> 1 h ; (iii) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,5 éq., DMF, 60 °C, 96 h ; (iv) TFA 10,0 éq., DCM, 22 °C, 30 min. ....                                                                                                                   | 79 |
| <b>Schéma 4.</b> Synthèse des composés <b>2</b> à <b>9</b> possédant un cycle saturé. Réactifs et conditions : (i) 4-( <i>N</i> -Boc-amino)piperidine 2,0 éq., HATU 2,5 éq., DIPEA 4,0 éq., DMF, 22 °C, 16 h ; (ii) 3-( <i>N</i> -Boc-amino)pyrrolidine 2,0 éq., HATU 2,0 éq., DIPEA 4,0 éq., DMF, 22 °C, 16 h ; (iii) acide trifluoroacétique 10,0 éq., DCM, 22 °C, 30 min. ....                                                                                                                                                     | 80 |
| <b>Schéma 5.</b> Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention des composés <b>12</b> et <b>13</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 80 |
| <b>Schéma 6.</b> Synthèse des composés <b>11</b> et <b>13</b> . Réactifs et conditions : (i) 3-Aminopyridine 1,6 éq., EDC-HCl 1,6 éq., HOBt 1,6 éq., Et <sub>3</sub> N 3,0 éq., DMF, 22 °C, 48 h ; (ii) 10% Pd/C 0,10 éq., 1:1 AcOEt/EtOH, H <sub>2</sub> , 22 °C, 16 h. ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 81 |
| <b>Schéma 7.</b> Synthèse des composés <b>11</b> et <b>13</b> . Réactifs et conditions : (i) acide 5-nitro-1 <i>H</i> -pyrazole-3-carboxylique 0,9 éq., EDC-HCl 1,1 éq., HOBt 1,1 éq., DMF, 25 °C, 16 h ; (ii) acide 5-nitro-1 <i>H</i> -pyrazole-3-carboxylique 0,5 éq., HATU 1,2 éq., DIPEA 2,0 éq., pyridine, 60 °C, 96 h ; (iii) 10% Pd/C 0,10 éq., 1:1 AcOEt/EtOH, H <sub>2</sub> , 22 °C, 16 h. ....                                                                                                                            | 82 |
| <b>Schéma 8.</b> Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention des molécules à une unité de carbone supplémentaire. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 82 |
| <b>Schéma 9.</b> Synthèse des molécules <b>14</b> à <b>21</b> . Réactifs et conditions : (i) DMF 1,1 éq., POCl <sub>3</sub> 1,1 éq., solution d'acétate de sodium, DCM, 0 °C → 22 °C → 0 °C → reflux → 0 °C, 3 min → 5 min → 30 min ; (ii) hydroxylamine 1,5 éq., K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,6 éq., eau, 65 °C, 5 min ; (iii) 10% Pd/C 0,2 éq., Boc <sub>2</sub> O 1,1 éq., AcOEt, H <sub>2</sub> , 22 °C, 16 h ; (iv) LiOH 10,0 éq., THF/eau/MeOH 3/1/1, 50 °C, 20 h ; (v) LiOH 10,0 éq., THF/eau/MeOH 3/1/1, 50 °C, 5 h. .... | 83 |
| <b>Schéma 10.</b> Synthèse des molécules <b>22</b> et <b>23</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 84 |
| <b>Schéma 11.</b> Echec de la réaction entre <b>20</b> et la 2-aminopyridine en présence d'HATU. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 84 |
| <b>Schéma 12.</b> Formation de l'ester activé à partir de <b>20</b> et de la 2-aminopyridine en présence de BOP. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 85 |
| <b>Schéma 13.</b> Synthèse des molécules <b>24</b> à <b>27</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 85 |
| <b>Schéma 14.</b> Synthèse du composé <b>28</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 85 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Schéma 15.</b> Synthèse du <i>N</i> -(pyridin-2-yl)-1 <i>H</i> -pyrazole-3-carboxamide et dégradation supposée, en milieu acide, en dipyrazolo[1,5- <i>a</i> :1',5'- <i>d</i> ]pyrazine-4,9-dione. ....                                                                                                                                                                                          | 86  |
| <b>Schéma 16.</b> Mécanisme proposé pour la dégradation du <i>N</i> -(pyridin-2-yl)-1 <i>H</i> -pyrazole-3-carboxamide en dipyrazolo[1,5- <i>a</i> :1',5'- <i>d</i> ]pyrazine-4,9-dione en milieu acide. ....                                                                                                                                                                                       | 86  |
| <b>Schéma 17.</b> Couplage entre l'acide pyrrole-2-carboxylique et l'aminopyridine (2-aminopyridine et 3-aminopyridine) correspondante, conduisant au 1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]-1-yl-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxyate. ....                                                                                                                                                                     | 87  |
| <b>Schéma 18.</b> Synthèse des composés comportant un cycle pyrrole. Réactifs et conditions : (i) chlorure d'oxalyle 5,0 éq., 22 °C, 2 h ; (ii) 2-aminopyridine ou 3-aminopyridine 1,1 éq., triéthylamine 3,0 éq., DCM, 22 °C, 48 h. ....                                                                                                                                                           | 87  |
| <b>Schéma 19.</b> Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention des molécules <b>32</b> et <b>34</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 88  |
| <b>Schéma 20.</b> Synthèse de la molécule <b>32</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 88  |
| <b>Schéma 21.</b> Echec de l'acétylation de <b>13</b> par l'anhydride acétique. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 88  |
| <b>Schéma 22.</b> Mécanisme proposé conduisant à l'intermédiaire acylé et stabilisation intramoléculaire de celui-ci. ....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 89  |
| <b>Schéma 23.</b> Voie rétrosynthétique alternative pour l'obtention de la molécule <b>39</b> (GP = groupement protecteur). ....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 90  |
| <b>Schéma 24.</b> Synthèse des molécules <b>33</b> à <b>35</b> . Réactifs et conditions : (i) Boc <sub>2</sub> O 2,0 éq., Et <sub>3</sub> N 3,0 éq., AcOEt, 50 °C, 24 h ; (ii) Ac <sub>2</sub> O 2,0 éq., DMAP 0,1 éq., Et <sub>3</sub> N 2,0 éq., dioxane, 50 °C, 16 h ; (iii) AcCl 2,0 éq., DMAP 0,1 éq., Et <sub>3</sub> N 2,0 éq., dioxane, 50 °C, 3 h ; (iv) TFA 10 éq., DCM, 22 °C, 1 h. .... | 90  |
| <b>Schéma 25.</b> Synthèse de la molécule <b>36</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 93  |
| <b>Schéma 26.</b> Synthèse de la molécule <b>37</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 94  |
| <b>Schéma 27.</b> Synthèse des molécules <b>38</b> et <b>39</b> présentant un groupement trifluorométhyle. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 94  |
| <b>Schéma 28.</b> Synthèse de la molécule <b>40</b> présentant un groupement carboxyle. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 94  |
| <b>Schéma 29.</b> Synthèse des molécules <b>41</b> et <b>42</b> présentant un groupement cyano, avec formation du sous-produit <b>43</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                     | 95  |
| <b>Schéma 30.</b> Equilibre tautomérique "amine"- "imine" de la molécule <b>41</b> et mécanisme réactionnel proposé permettant l'obtention du composé <b>43</b> . ....                                                                                                                                                                                                                              | 96  |
| <b>Schéma 31.</b> Voies rétrosynthétiques proposées permettant d'obtenir les composés nitrés possédant un hétérocycle saturé azoté (GP = groupement protecteur). ....                                                                                                                                                                                                                               | 96  |
| <b>Schéma 32.</b> Synthèse de la molécule <b>44</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 97  |
| <b>Schéma 33.</b> Synthèse des molécules <b>45</b> à <b>50</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 97  |
| <b>Schéma 34.</b> Synthèse des molécules <b>51</b> à <b>54</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 98  |
| <b>Schéma 35.</b> Synthèse des molécules <b>55</b> et <b>56</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 100 |
| <b>Schéma 36.</b> Voies rétrosynthétiques envisagées pour l'allongement de la chaîne linker en rouge (X = Cl, Br, I) (GP = groupement protecteur). ....                                                                                                                                                                                                                                             | 101 |
| <b>Schéma 37.</b> Synthèse des molécules <b>57</b> et <b>58</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 101 |
| <b>Schéma 38.</b> Synthèse permettant de former le produit désiré. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 102 |
| <b>Schéma 39.</b> Voie rétrosynthétique envisagée pour l'introduction d'un groupement amine sur le noyau pyridine (X = Cl, Br, I) (GP = groupement protecteur). ....                                                                                                                                                                                                                                | 102 |
| <b>Schéma 40.</b> Synthèse des molécules <b>59</b> à <b>60</b> . (i) pipéridin-4-ylcarbamate de tert-butyle 1,6 éq., EDC-HCl 1,6 éq., HOBt 1,6 éq., Et <sub>3</sub> N 3,0 éq., DMF, 22 °C, 16 h ; (ii) carbamate de tert-                                                                                                                                                                           |     |

butyle 4,0 éq., Pd<sub>2</sub>(dba<sub>3</sub>) 0,1 éq., xantphos 0,2 éq., Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,0 éq., THF, 70 °C, 24 h ; (iii) TFA 100 éq., DCM, 22 °C, 7 h. ....103

## Table des tableaux

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1.</b> Récapitulatif des traitements de chimiothérapie anticancéreuse .....                                                                                                                                     | 51 |
| <b>Tableau 2.</b> Liste des candidat-médicaments et leur génération, ayant été évalués en phase d'essai clinique. En vert, actuellement en essai clinique, en rouge, ensemble des essais cliniques terminés/complétés..... | 64 |
| <b>Tableau 3.</b> Squelettes établis par analyse de ligands et modélisation moléculaire, susceptibles d'interagir avec XIAP-BIR3. ....                                                                                     | 74 |
| <b>Tableau 4.</b> Étude de la réduction de <b>10</b> en <b>12</b> . ....                                                                                                                                                   | 81 |
| <b>Tableau 5.</b> Etude de la réaction d'acétylation de la molécule <b>13</b> .....                                                                                                                                        | 89 |

# Abréviations et acronymes

- 5-Fu : 5-Fluorouracile
- 5-Fu-UTP : 5-fluorouridine 5'-triphosphate
- AcCl : chlorure d'acide acétique
- AcOEt : acétate d'éthyle
- AcOH : acide acétique
- ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- Alk : Anaplastic lymphoma kinase
- Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1
- ARN : Acide RiboNucléique
- ATP : Adénosine-Triphosphate
- Bcr-Abl : Breakpoint cluster region-Abelson
- BIR : Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
- Boc : *tert*-butoxycarbonyl
- Boc<sub>2</sub>O : dicarbonate de di-*tert*-butyle
- CARD (Caspase Recruitment Domain)
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- CD : cluster de différenciation
- CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity
- CDCl<sub>3</sub> : chloroforme deutéré
- CERMN : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie
- Cl<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice 50
- ciAP : cytosolic Inhibitor of Apoptosis Protein
- CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
- CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
- CyHex : cyclohexane
- CYP3A4 : cytochrome P450 3A4
- D<sub>2</sub>O : eau deutérée
- DCM : dichlorométhane
- DHFR : Dihydrofolate Réductase
- DIPEA : *N, N*-diisopropyléthylamine
- DISC : Death-Inducing Signaling Complex
- DMAP : *N, N*-diméthylpyridin-4-amine
- DMF : diméthylformamide
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- dUMP : 5-Fluorodésoxyuracile monophosphate
- EC : essai Clinique
- EDC-HCl : *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride
- EGF : Epidermal Growth Factor
- EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

- EML4 : Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4
- ErbB : avian erythroblastosis oncogene B
- ET<sub>3</sub>N : triéthylamine
- EtOH : éthanol
- FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
- FasR : Fas Receptor
- FBDD : Fragment-Based Drug Discovery
- FPA : Fluorescence Polarization Assay
- FSH : Follicle-Stimulating Hormone
- HATU : (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
- HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
- HOBt : hydroxybenzotriazole
- IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
- ITK : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase
- K<sub>d</sub> : Constante de dissociation
- LC-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry
- LH-RH : Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
- LiOH : hydroxide de lithium
- LNH : Lymphome Non Hodgkinien
- LT : Lymphocyte T
- Luteinizing Hormone
- MeCN : acétonitrile
- MeOD : méthanol deutéré
- MeOH : méthanol
- MgSO<sub>4</sub> : sulfate de magnésium
- mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
- NaCl : chlorure de sodium
- NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium
- NER : Nucleotide Excision Repair
- NF-κB (Nuclear Factor-kappa B)
- Pd/C : palladium sur charbon
- PD1 : Programmed Death 1
- Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> : Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)
- PDB : Protein Data Bank
- PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
- Pgp : Permeability-GlycoProtein
- POCl<sub>3</sub> : trichlorure de phosphore
- RE : Récepteur aux œstrogènes
- RFC : Reduced Folate Carrier
- RING (Really Interesting New Gene)
- RIP : Related receptor Interacting Protein
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

- RSA : Relation Structure activité/affinité
- SERD : Selective Estrogen Receptor Modulators
- SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
- SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
- SOCl<sub>2</sub> : chlorure de thionyle
- TFA : trifluoroacetic acid
- THF : tétrahydrofurane
- TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1
- TNM : Tumor Nide Metastasis
- TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
- VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
- XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

# Avant-propos

Mes travaux de thèse ont été réalisés au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), sous la direction du Docteur Charline Kieffer. Ceux-ci regroupent les travaux de mon stage d'application de 5<sup>ème</sup> année de Pharmacie, ainsi que les travaux de mon stage de Master 2, effectué en équivalence de ma 6<sup>ème</sup> année de Pharmacie.

Le CERMN, rattaché à l'Université de Caen-Normandie et dirigé par le Pr. Patrick Dallemagne, est une unité de recherche orientée vers le *drug design*. Elle est constituée de quatre plateformes : chimie organique et médicinale, chémoinformatique, chimiothèque et enfin screening et duggabilité. Les axes de recherche actuellement développés sont la cancérologie et les neurosciences avec comme programmes scientifiques prioritaires la polypharmacologie, les interactions protéine-protéine et les outils chimiques pour le diagnostic et l'imagerie.

Mon projet de recherche s'insère dans l'axe cancérologie et plus précisément dans le programme dédié aux interactions protéine-protéine.

Les travaux de mes deux stages effectués au CERMN ont consisté à synthétiser des molécules potentiellement inhibitrices de la protéine anti-apoptotique XIAP. Cette protéine est surexprimée dans un certain nombre de cancers, conduisant au développement de chimiorésistance.

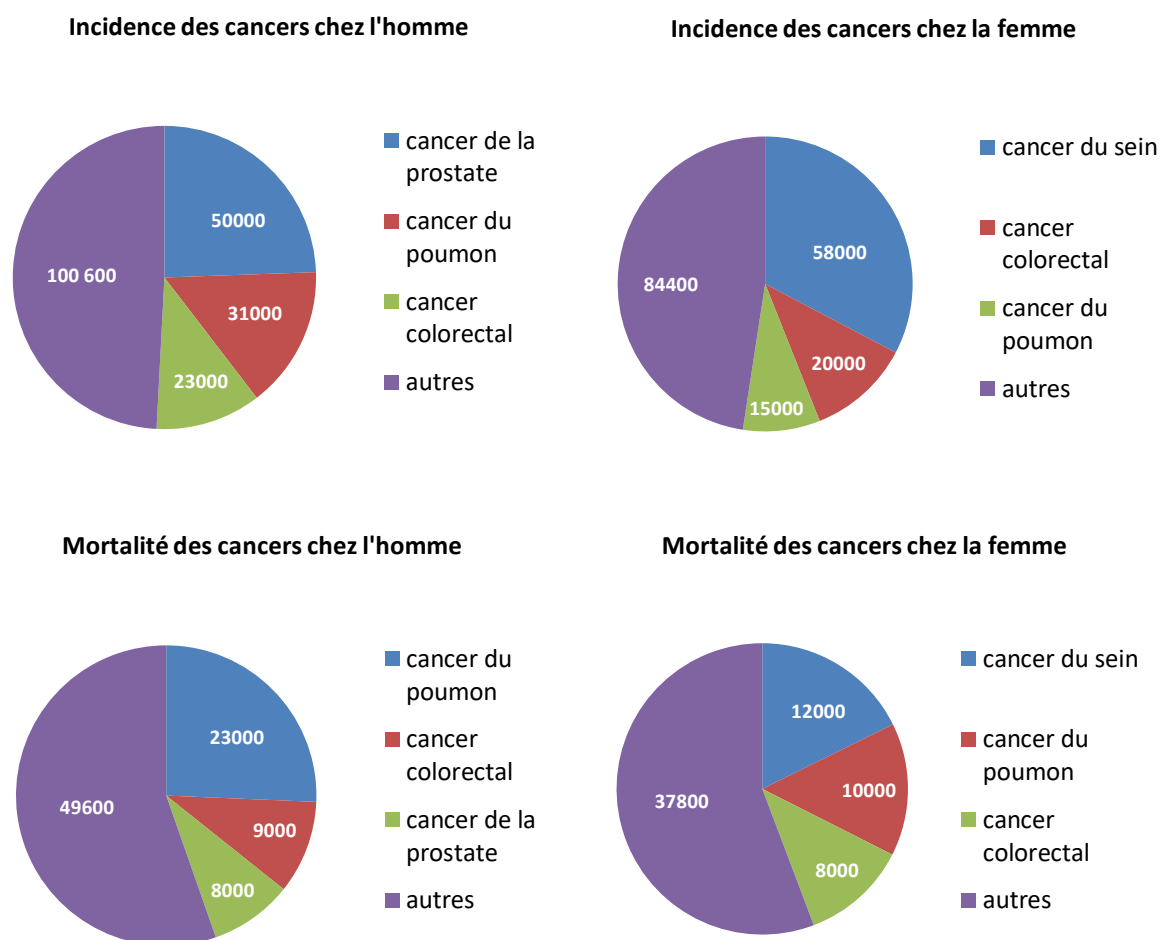
Dans ce manuscrit seront reprises tout d'abord des généralités sur le cancer et les stratégies thérapeutiques employées pour lutter contre cette pathologie. La protéine XIAP sera ensuite présentée puis un état de lieux des inhibiteurs de XIAP existants sera effectué. Il sera enfin présenté le projet de recherche ainsi que mes travaux personnels conduits durant ces onze mois passés au CERMN.

Ces travaux de recherche ont fait l'objet d'une communication par affiche lors d'un congrès de cancérologie : K. Antraygues, M. Giret, C. Kieffer, H. Paysant, L. Weiswald, J. Sopkova-de Oliveira Santos, L. Poulain, A. S. Voisin-Chiret. **Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de XIAP pour rétablir l'apoptose.** 12<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 15-17 mai 2019, Deauville.

# Introduction

## 1- Epidémiologie

Le cancer était en 2018 à l'origine de plus de 157 000 décès en France, se classant comme la première cause de décès chez l'homme et la seconde chez la femme.<sup>1</sup> Les cancers du poumon, colorectal et de la prostate comptent environ pour moitié dans l'incidence et la mortalité des cancers chez l'homme. Il en est de même chez la femme avec les cancers du sein, du poumon et colorectal (Figure 1).<sup>1,2</sup> La mortalité est néanmoins en baisse, ceci pouvant notamment être expliqué par une amélioration de la prise en charge de ces pathologies.



**Figure 1.** Incidence et mortalité des cancers en 2018, chez l'homme et la femme.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Santé publique France. (Page consultée le 16 juillet 2019). Cancers, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers>.

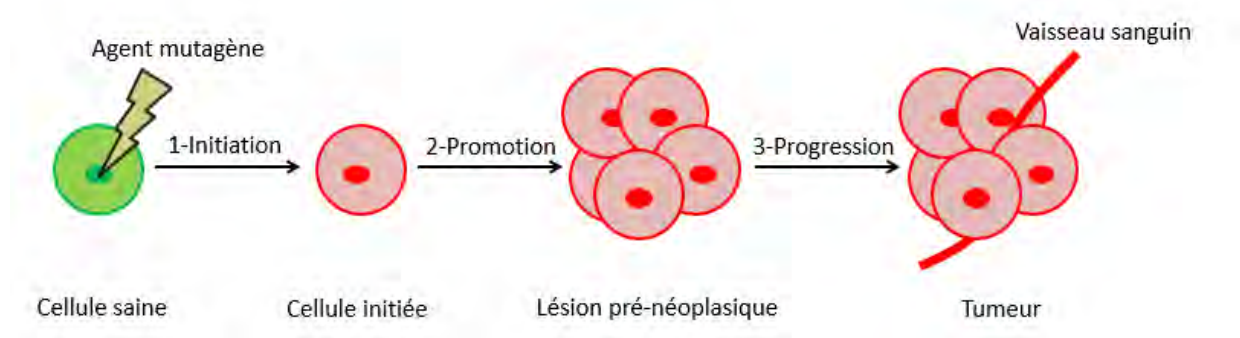
<sup>2</sup> Institut National du Cancer. (Page consultée le 16 juillet 2019). Cancers : les chiffres clés, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>.

## 2- Physiopathologie des cancers

### 2-1- Le processus de cancérisation

Le cancer est une maladie décrite depuis l'Antiquité. Ce n'est qu'avec les récents progrès de la biologie et de la médecine que cette pathologie a pu en partie être comprise.

À l'état physiologique, il existe une balance entre la division cellulaire et différents facteurs, comme l'apoptose, qui la freinent. La rupture de cette homéostasie, traduite par une division cellulaire trop importante, correspond à la définition du cancer. Trois étapes vont aboutir au phénomène de cancérisation :<sup>3</sup> l'initiation, la promotion et la progression (Figure 2).



**Figure 2.** Représentation des différentes étapes de cancérisation.

L'initiation correspond à l'acquisition par la cellule d'un phénotype de cellule maligne. Celui-ci s'acquiert par des mutations sur le génome. De nombreuses mutations seront toutefois nécessaires pour aboutir à une cellule cancéreuse.<sup>4</sup> Ainsi auront lieu entre autre :

- une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (dont le rôle est de contrôler la prolifération cellulaire).
- une inactivation de l'apoptose, empêchant la mort programmée de la cellule.
- une activation des télomérases, rendant la cellule immortelle.

Si les mutations ne sont pas corrigées et que la cellule survit, celle-ci va pouvoir proliférer.

L'étape suivante de la cancérisation se nomme la promotion. Des promoteurs, comme par exemple des facteurs de croissance, vont pouvoir induire la division cellulaire, dont celle de la cellule transformée. Cette dernière va continuer à proliférer, aboutissant à un nombre croissant de clones formant une lésion pré-néoplasique. Au fil des divisions, la promotion va

<sup>3</sup> Tubiana, M. Généralités sur la cancérogenèse. *C. R. Biol.* **2008**, 331, 114–125.

<sup>4</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **2011**, 144, 646–674.

se pérenniser, permettant aux cellules de croître indépendamment des facteurs de croissance extérieurs.

La dernière étape de progression correspond à l'acquisition par les cellules de capacités de vascularisation (angiogenèse) et de prolifération, formant une néoplasie ou tumeur. Celle-ci conduit ainsi à une invasion tissulaire locale. Le cancer peut ensuite évoluer vers la formation de métastases, c'est-à-dire la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme.

Le terme de cancer apparaît donc comme générique, il serait plus adéquat de parler de cancers au pluriel. En effet, ceux-ci vont pouvoir différer en fonction de la lignée cellulaire impliquée dans le phénomène de cancérisation, mais aussi par des mutations qui ne seront pas forcément identiques entre deux cancers d'une même lignée : il y a presque autant de cancers que de patients.

## **2-2- Classification des cancers**

Les cancers sont tout d'abord classifiés histologiquement en fonction du tissu à partir duquel la tumeur s'est formée.<sup>3</sup> Ainsi sont distingués :

- les carcinomes, se développant à partir d'un tissu épithélial. Ce dernier peut-être externe, comme l'épiderme, ou bien interne (tissu de revêtement d'un organe).
- les sarcomes, dérivant d'un tissu musculaire ou conjonctif (os, cartilages, tissu conjonctif proprement dit).<sup>5</sup>
- les cancers hématopoïétiques, dits liquides, formés à partir de cellules du système sanguin ou lymphatique.

Le grade de la tumeur s'intéresse quant à lui à l'agressivité de la tumeur. Plus celui-ci est élevé, plus le cancer est agressif. La détermination du grade se fait par un examen anatomopathologique en prenant en compte l'apparence des cellules cancéreuses, la forme du noyau et le nombre de cellules en mitose.<sup>6</sup>

---

<sup>5</sup> Watkins, J.; Mathieson, I. CHAPTER 4 - Connective Tissues. In *The Pocket Podiatry Guide: Functional Anatomy*; Watkins, J., Mathieson, I., Eds.; Churchill Livingstone: Edinburgh, 2009; pp 107–156.

<sup>6</sup> Vivre avec un cancer métastatique. (Page consultée le 17 juillet 2019). Stades et types de cancers du sein, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.vivreavec.eu/cancer-du-sein-metastatique/comprendre-la-maladie/stades-et-types-de-cancer-du-sein.html>.

Concernant le stade du cancer, celui-ci est déterminé grâce à la classification TNM :<sup>7</sup>

- T pour tumeur, décrit la taille de la tumeur.
- N pour ganglions (*nodes* en anglais), indique la propagation du cancer au niveau des ganglions lymphatiques environnants.
- M pour métastase, indique si le cancer s'est propagé dans l'organisme.

Le grade et le stade vont ainsi être pris en compte pour établir un pronostic vis-à-vis du cancer. D'autres caractéristiques, telles que l'hormonodépendance de la tumeur ou bien la présence de mutations spécifiques, permettent également de classifier les cancers.

### **3- Stratégies thérapeutiques**

Une fois le patient diagnostiqué, en utilisant notamment l'imagerie médicale et/ou la biopsie, une ou plusieurs stratégies thérapeutiques vont pouvoir être mises en place pour lutter contre le cancer. Trois stratégies existent :<sup>8</sup>

- la chirurgie, consistant à l'exérèse de la tumeur.
- la radiothérapie, visant à délivrer localement une quantité de rayonnements ionisants détruisant les cellules cancéreuses.
- la chimiothérapie, employant des antinéoplasiques pour lutter contre les cellules tumorales.

Deux stratégies peuvent être combinées dans un même protocole de soin. La chimiothérapie néo-adjuvante consiste par exemple en l'emploi d'un traitement médicamenteux pour diminuer la taille d'une tumeur trop volumineuse pour être retirée chirurgicalement d'emblée.

La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements loco-régionaux. Si un cancer est métastasé, seule la chimiothérapie pourra lutter contre celui-ci.

#### **3-1- La chimiothérapie cytotoxique**

Les molécules utilisées pour réaliser une chimiothérapie cytotoxique ciblent l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou la mitose des cellules. Les cellules cancéreuses, se divisant plus

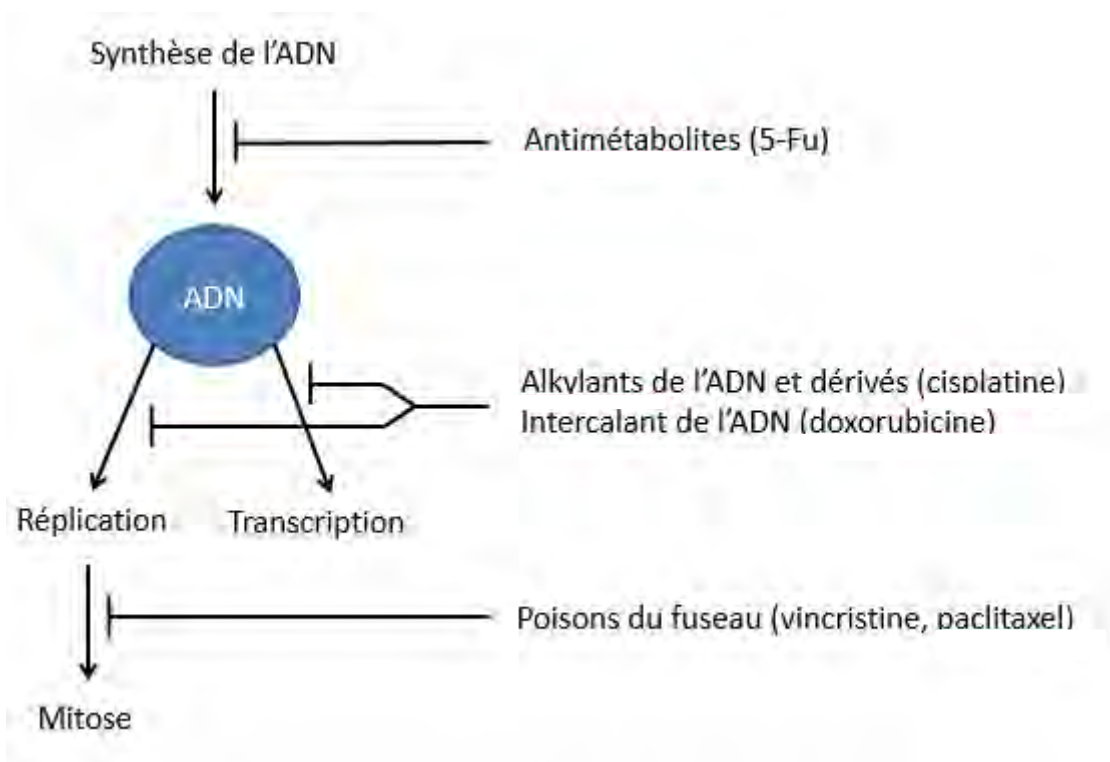
---

<sup>7</sup> Institut National du Cancer. (Page consultée le 17 juillet 2019). Classification TNM, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/C/classification-TNM>.

<sup>8</sup> Curtit, E. (2010). Stratégies thérapeutiques en cancérologie : Maladies curables maladies non curables, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.oncolie.fr/wp-content/uploads/2010/02/E.-CURTIT-28-01-10.pdf>.

rapidement, seront ainsi d'avantage touchées que les cellules saines. Cependant, les cellules saines avec une division rapide, comme les cellules hématologiques et digestives, seront également atteintes, expliquant les effets indésirables communs retrouvés pour ces médicaments. On notera ainsi des toxicités hématologiques (anémie, neutropénie, thrombopénie) et digestives (nausées et vomissements, mucite).

Les cytotoxiques, dont les cibles sont résumées sur la figure 3, vont être vus plus en détail ci-dessous.

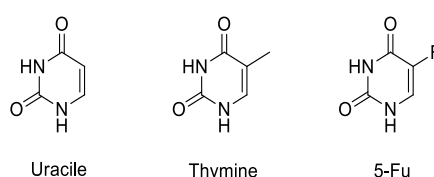


**Figure 3.** Schéma des cibles des agents de chimiothérapie cytotoxique.

### 3-1-1- Les antimétabolites

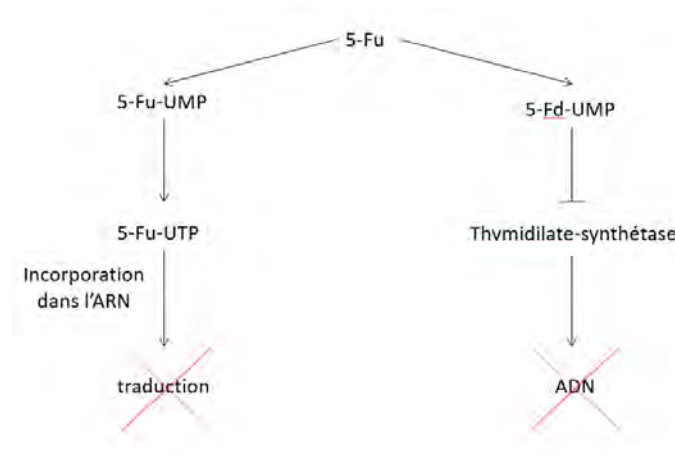
Les antimétabolites sont une famille de molécules analogues des bases puriques et pyrimidiques. Ils vont avoir comme mécanisme d'action une inhibition de la synthèse des bases nucléotidiques.

Le chef de file des analogues des bases pyrimidiques est le 5-Fluorouracile (5-Fu) ([Figure 4](#)).



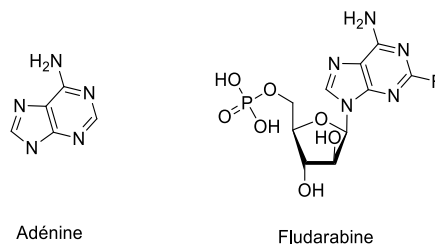
**Figure 4.** Structure de l'uracile, de la thymine et du 5-Fu.

L'uracile, tout d'abord transformée en nucléotide désoxyuridine monophosphate (dUMP) subit une méthylation en position 5 du cycle pyrimidine pour donner la thymidine. Cette réaction est médiée par l'enzyme thymidilate-synthétase. Le 5-Fu, analogue de l'uracile, va bloquer cette enzyme, empêcher la synthèse de bases thymine et freiner la prolifération cellulaire. L'uracile est de plus une base nucléique de l'ARN (acide ribonucléique). Le 5-Fu, sous forme de 5-fluorouridine 5'-triphosphate (5-Fu-UTP), va pouvoir être incorporé dans l'ARN, entraînant des erreurs lors de la traduction (Figure 5).



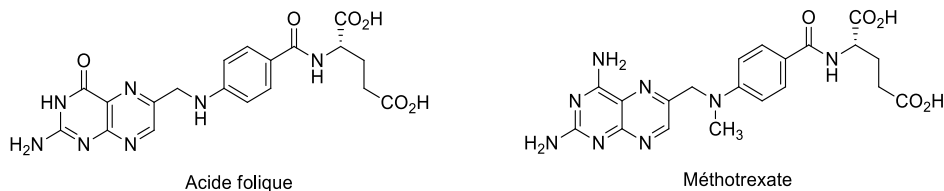
**Figure 5.** Schéma récapitulatif des mécanismes d'action du 5-Fu.

Les analogues de la purine sont incorporés à l'ADN lors de sa synthèse, causant par la suite des erreurs lors de la réplication et de la transcription. La fludarabine est par exemple un analogue de l'adénine (Figure 6).



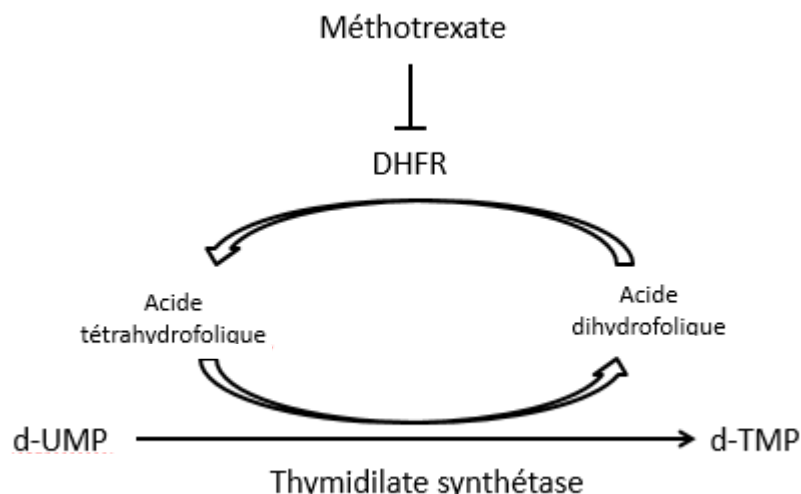
**Figure 6.** Structures de l'adénine et de la fludarabine.

Les derniers membres de la famille des antimétabolites sont les antifolates, avec pour chef de file le méthotrexate. Ce dernier est un analogue méthylé de l'acide folique (Figure 7).



**Figure 7.** Structures chimiques de l'acide folique et du méthotrexate.

Lors de la méthylation de la base uracile, la thymidilate-synthétase nécessite une co-enzyme : l'acide tétrahydrofolique. Ce dernier est régénéré à partir de l'acide dihydrofolique grâce à l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR). Le méthotrexate inhibe cette enzyme, empêchant la synthèse de la thymine, nécessaire pour la synthèse de l'ADN (Figure 8).



**Figure 8.** Mécanisme d'action du méthotrexate

### 3-1-2- Les alkylants de l'ADN et apparentés

Cette famille de composés crée des liaisons covalentes intra- et inter-brins, bloquant la réplication de l'ADN. Le médicament emblématique de cette famille est le cisplatine.

Le cisplatine présente une certaine stabilité dans le milieu extracellulaire due aux fortes concentrations en ions chlorure ( $\approx 100$  mM). En milieu intracellulaire, où ces concentrations sont beaucoup plus faibles ( $\approx 4$  mM), le processus d'aquation est favorisé, conduisant à la formation d'aquacomplexes électrophiles. Ces espèces vont pouvoir réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN, notamment l'atome d'azote situé en position 7 de la guanine. Ceci va

conduire à la formation d'un premier adduit, puis d'un second intra- ou inter-brin (Figure 9).<sup>9</sup> Ces adduits vont bloquer les ADN polymérases, empêchant la réplication et la transcription de l'ADN. Ceci conduit au final à la mort de la cellule par apoptose.

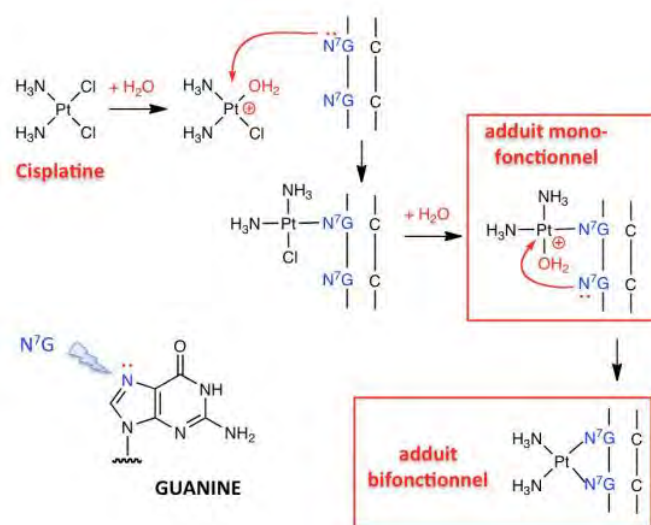


Figure 9. Mécanisme d'action du cisplatine, d'après Nuhrich, A.<sup>9</sup>

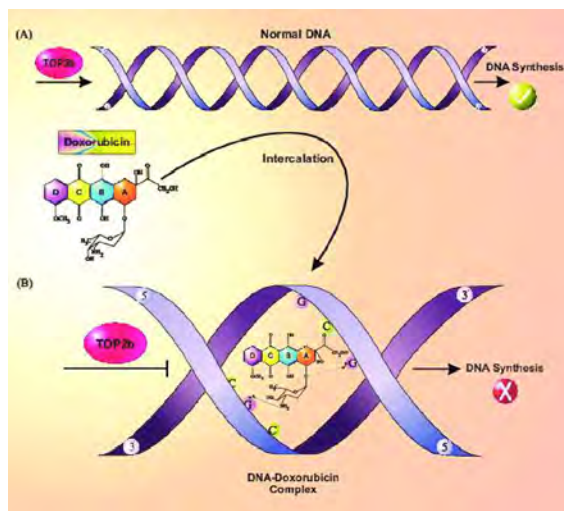
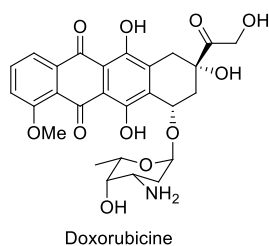
### 3-1-3- Les intercalants de l'ADN

Les intercalants de l'ADN s'insèrent dans la double hélice de l'ADN, modifiant sa structure tertiaire. C'est le cas de la doxorubicine, qui de par son cycle anthracyle, possède une géométrie relativement plane (Figure 10A) qui lui confère sa propriété d'intercalant de l'ADN. Lorsque cette molécule s'est insérée entre deux bases adjacentes, la topoisomérase II est bloquée. Cette enzyme est responsable de la coupure de brins d'ADN, permettant de supprimer les superenroulements acquis. La déformation entraînée par la doxorubicine va bloquer l'action de la topoisomérase II et donc inhiber la synthèse mais aussi la transcription de l'ADN (Figure 10B).<sup>10</sup> Ce mécanisme peut même conduire à des cassures double brins.<sup>11</sup>

<sup>9</sup> Nurich, A. (2015). (Page consultée le 18 juillet 2018). Médicaments antitumoraux dérivés du Platine, [en ligne]. Adresse URL : [http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2015\\_Bordeaux\\_Nuhrich\\_Platine/res/Platines\\_A\\_Nuhrich\\_2015.pdf](http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2015_Bordeaux_Nuhrich_Platine/res/Platines_A_Nuhrich_2015.pdf).

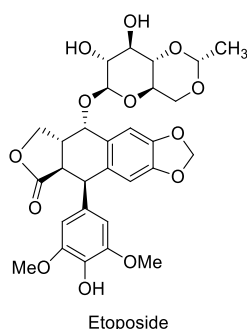
<sup>10</sup> Mobaraki, M.; Faraji, A.; Zare, M.; R Dehghan Manshadi, H. Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on Major Side-Effect of Doxorubicin. *Indian J. Pharm. Sci.* **2017**, 79.

<sup>11</sup> Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. Intercalation of Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue by DNA Duplex: Structural Features and Biological Implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 66, 144–150



**Figure 10. (A)** Structure chimique de la doxorubicine. **(B)** Mécanisme d'action de la doxorubicine, d'après Mobaraki *et al.*<sup>10</sup>

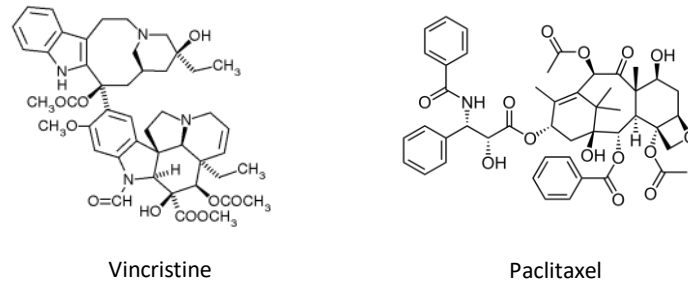
Les inhibiteurs de la topoisomérase II non intercalants, comme l'étoposide (Figure 11), conduisent également à une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN.



**Figure 11.** Structure chimique de l'étoposide.

### 3-1-4- Les poisons du fuseau mitotique

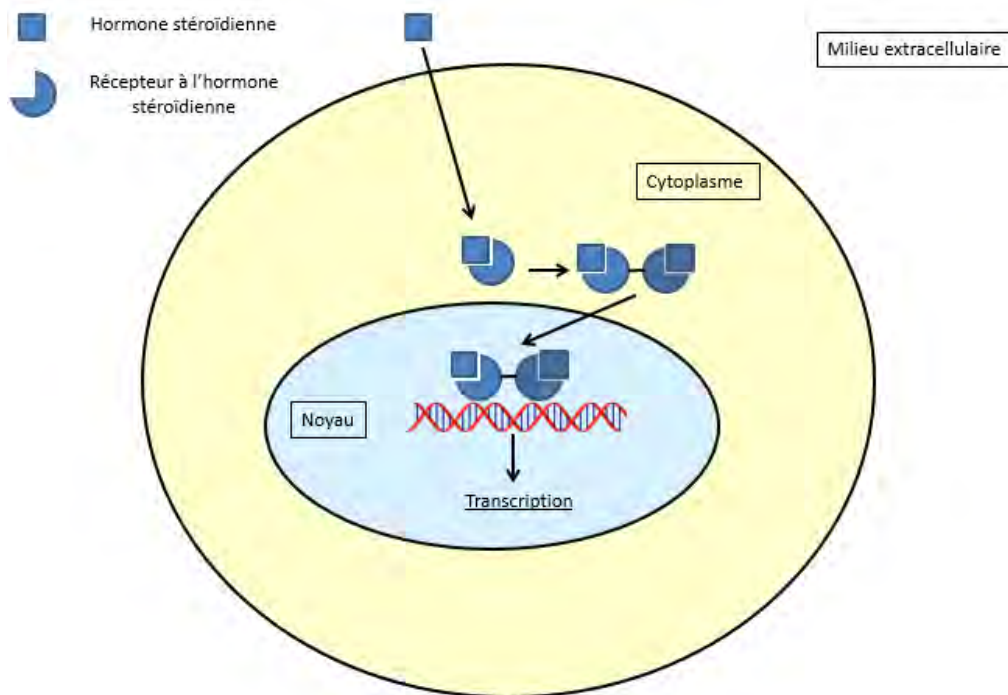
Les microtubules sont des polymères de tubuline. Ils jouent un rôle essentiel tout au long du cycle cellulaire et sont notamment impliqués lors de la mitose, pendant l'anaphase. Le fuseau mitotique, responsable de la ségrégation des chromatides sœurs, est en effet composé de microtubules. Deux classes d'anticancéreux ciblent ce fuseau mitotique. D'une part les inhibiteurs du fuseau, tels que la vincristine (Figure 12), qui empêche la polymérisation de la tubuline. D'autre part les stabilisants du fuseau, comme le paclitaxel (Figure 12), qui stabilisent les microtubules en empêchant la dépolymérisation de la tubuline. Le fuseau mitotique étant un élément dynamique, les mécanismes d'actions présentés conduisent tous deux à une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs et donc à l'obtention de cellules filles non-viables.



**Figure 12.** Structures chimiques de la vincristine et du paclitaxel.

### 3-2- L'hormonothérapie

Une hormone stéroïdienne est capable de traverser la membrane plasmique pour se lier avec son récepteur dans le cytoplasme. Le complexe hormone-récepteur, qui se dimérise généralement avec un autre complexe, va pouvoir traverser la membrane nucléaire pour ensuite réguler la transcription de gènes, codant par exemple pour la prolifération cellulaire ([Figure 13](#)). La dérégulation de ce phénomène est à l'origine des cancers hormonodépendants.<sup>12</sup> On retrouve parmi ceux-ci les cancers gynécologiques (ovaire, endomètre, col de l'utérus), du sein et de la prostate.



**Figure 13.** Transcription de l'ADN induite par une hormone stéroïdienne.

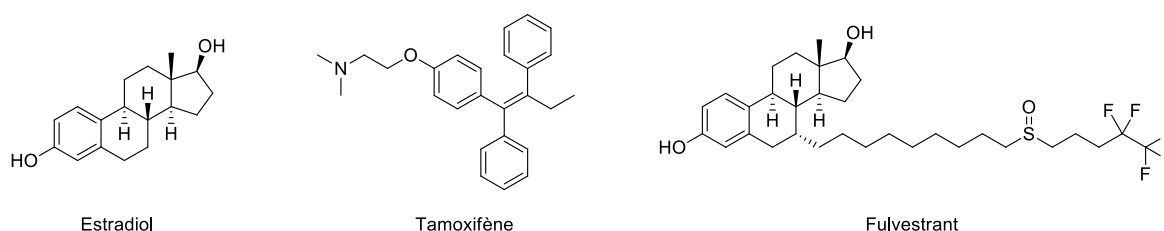
<sup>12</sup> Sever, R.; Glass, C. K. Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, 5.

Les médicaments utilisés en hormonothérapie vont soit entrer en compétition avec l'hormone naturelle au niveau de son récepteur, soit diminuer la production de cette hormone.

### 3-2-1- Les anti-œstrogènes

La première famille d'anti-œstrogènes apparus est constituée des modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes (SERM), dont le chef de file est le tamoxifène. Ces molécules, de structure non stéroïdienne (Figure 14), se lient au récepteur aux œstrogènes (RE), déplaçant ainsi l'hormone naturelle (principalement l'estradiol). Le changement conformationnel du récepteur ainsi induit empêche l'expression génique au niveau du noyau. Si ces composés sont décrits comme des antagonistes, ils présentent également une activité œstrogénique. Cette composante agoniste pourrait être à l'origine de résistances de la tumeur au traitement.<sup>13</sup>

Les régulateurs négatifs sélectifs du récepteur des œstrogènes (SERD), aussi appelés anti-œstrogènes purs, sont une famille d'anti-œstrogènes qui ne présentent pas d'activité agoniste. Le fulvestrant, de structure stéroïdienne, possède ainsi des avantages par rapport au tamoxifène : une affinité pour les RE cent fois plus élevée et la capacité de bloquer complètement l'activité stimulatrice des œstrogènes.<sup>14</sup> De plus, le fulvestrant induit une dégradation du RE, empêchant ainsi sa liaison avec des œstrogènes après que le complexe fulvestrant-RE ne se soit dissocié.<sup>15</sup>



**Figure 14.** Structures de l'estradiol, du tamoxifène et de du fulvestrant.

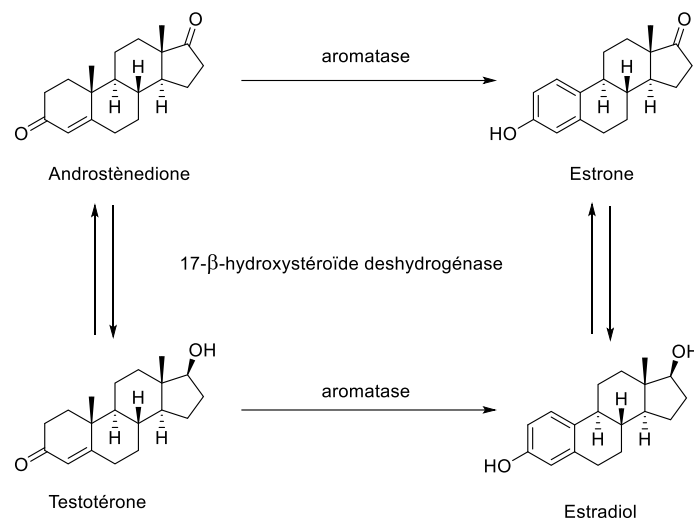
### 3-2-2- Les anti-aromatase

L'aromatase est une enzyme impliquée dans la biosynthèse des œstrogènes. Elle permet la transformation de l'androstènedione et de la testostérone en respectivement l'estrone et l'estradiol (Figure 15).

<sup>13</sup> Ring, A.; Dowsett, M. Mechanisms of Tamoxifen Resistance. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 643–658.

<sup>14</sup> Howell, S.; Johnston, S.; Howell, A. The Use of Selective Estrogen Receptor Modulators and Selective Estrogen Receptor Down-Regulators in Breast Cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *18*, 47–66

<sup>15</sup> Yeh, W.; Shioda, K.; Coser, K.; Rivizzigno, D.; McSweeney, K.; Shioda, T. Fulvestrant-Induced Cell Death and Proteasomal Degradation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Protein in MCF-7 Cells Require the CSK c-Src Tyrosine Kinase. *PLoS ONE*, **2013**, *8*.



**Figure 15.** Action de l'aromatase sur la synthèse des hormones stéroïdiennes.

Il existe deux classes d'anti-aromatase, utilisées dans le cancer du sein :<sup>16</sup>

- les anti-aromatase de type 1, de structure stéroïde, se liant de manière covalente au site actif de l'enzyme, tel le formestane (Figure 16).
- les anti-aromatase de type 2, de nature non-stéroïde comme l'anastrozole (Figure 16), qui entrent en compétition avec le substrat naturel au niveau de l'enzyme.



**Figure 16.** Structure chimique du formestane et de l'anastrozole.

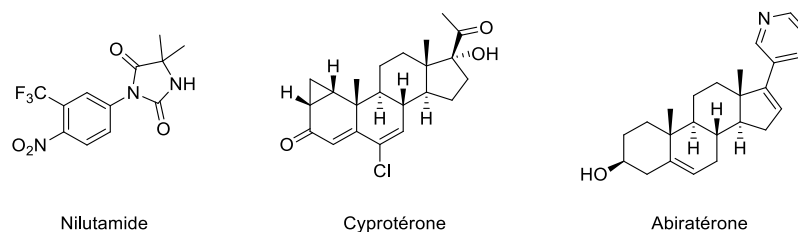
### 3-2-3- Les anti-androgènes

Il existe là aussi deux classes d'anti-androgènes, principalement employés dans le cancer de la prostate :<sup>17</sup>

- les anti-androgènes non stéroïdiens, tel que le nilutamide (Figure 17), qui entrent en compétition avec la testostérone et la dihydrotestostérone au niveau de son récepteur nucléaire.
- la cyprotérone (Figure 17), de nature stéroïdienne, qui présente le même mécanisme d'action.

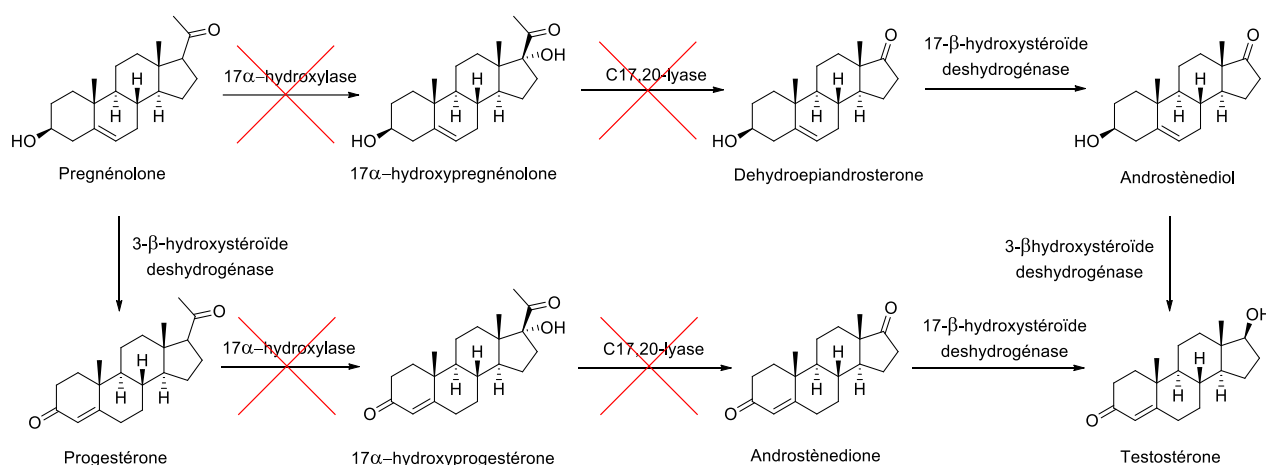
<sup>16</sup> Carpenter, R.; Miller, W. R. Role of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **2005**, 93 (Suppl 1), S1–S5.

<sup>17</sup> Hellerstedt, B.; Pienta, K. The Current State of Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **2002**, 52 (3), 154–179.



**Figure 17.** Structures chimiques du nilutamide, de la cyprotérone et de l'abiratéron.

L'abiratéron (Figure 117), plus récent, inhibe la synthèse des androgènes en bloquant le complexe 17α-hydroxylase/C17,20-lyase (Figure 18).



**Figure 18.** Inhibition de la synthèse de la testostérone (croix rouge) par l'abiratéron.

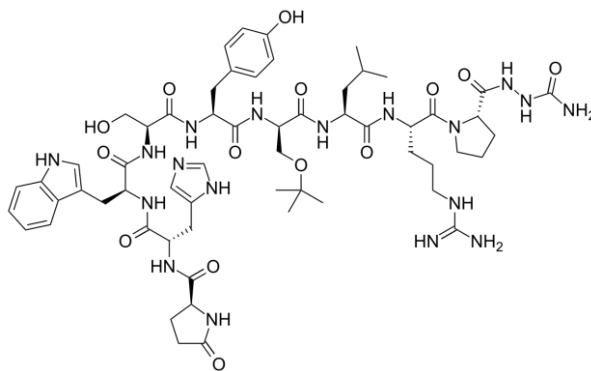
### 3-2-4- Les agonistes de la LH-RH

Les agonistes de la LH-RH (luteinizing hormone releasing hormone) sont indiqués en France, dans les cancers de la prostate et du sein principalement.

La LH-RH, sécrétée par l'hypothalamus, agit au niveau de l'hypophyse, qui va en réaction sécréter de la FSH (hormone folliculostimulante) et de la LH (hormone lutéinisante ou lutéinostimuline). Après passage au niveau sanguin, cette dernière va stimuler la production de testostérone par les testicules (cellules de Leydig) chez l'Homme. Chez la femme, la FSH et la LH permettent la sécrétion d'œstrogènes par les ovaires.

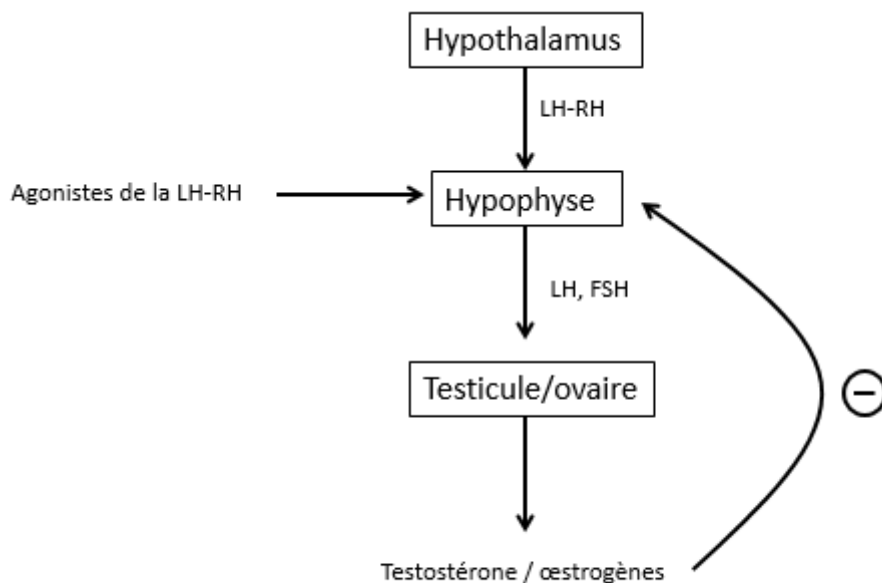
Les agonistes de la LH-RH, comme la gosérelène (Figure 19) présentent une structure peptidique. Ils ont la capacité de stimuler l'hypophyse afin d'augmenter les sécrétions de LH et FSH qui vont elles-mêmes augmenter la production de la testostérone chez l'homme et des œstrogènes chez la femme. Ces hormones vont ensuite exercer un rétrocontrôle négatif sur

l'hypophyse (Figure 20). Ceci va aboutir à une diminution durable des taux de FSH et de LH et donc des taux de testostérone/œstrogènes.



**Figure 19.** Structure chimique de la goséréline.

A l'instauration du traitement par un agoniste de la LH-RH, les taux en hormones stéroïdiennes augmentent. Cette augmentation, appelée effet "flush" stimulerait les cellules du cancer hormonodépendant.<sup>18</sup> C'est pourquoi il est administré au début de la prise d'agoniste de la LH-RH un anti-androgène ou anti-œstrogène, afin de contrer cet effet "flush".



**Figure 20.** Rétrocontrôle négatif de l'hypophyse par la testostérone et les œstrogènes.

<sup>18</sup> Thompson, I. M. Flare Associated with LHRH-Agonist Therapy. *Rev. Urol.* **2001**, 3 (Suppl 3), S10–S14.

### 3-3- Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées visent à cibler des anomalies moléculaires propres à la cellule cancéreuse. Elles se différencient ainsi de la chimiothérapie "non ciblée", agissant principalement sur l'ADN, qui vise toute cellule à prolifération rapide, tumorale ou non. Les thérapies ciblées présentent donc certains avantages comme une moindre toxicité vis-à-vis des cellules saines et donc moins d'effets indésirables pour les patients comme (alopécie par exemple). Ceci contribue ainsi à une meilleure qualité de vie.

La majorité des agents de thérapie ciblée est constituée d'inhibiteurs de tyrosine kinases. Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs transmembranaires : quand un ligand se fixe sur la partie extracellulaire, la dimérisation (qui a lieu pour la majorité des récepteurs) et la transphosphorylation du récepteur au niveau intracellulaire sont induites.<sup>19</sup> Cette phosphorylation va pouvoir activer une voie de signalisation, par une cascade de phosphorylation, aboutissant à la translocation d'un facteur de transcription dans le noyau. L'agent thérapeutique peut également cibler une tyrosine kinase cytosolique.

L'imatinib par exemple, ciblant la tyrosine kinase de Bcr-Abl (Breakpoint Cluster Region-Abelson), a été l'un des premiers médicaments de thérapie ciblée commercialisé. Cette molécule issue de la chimie de synthèse a révolutionné la prise en charge la leucémie myéloïde chronique. Ainsi, la rémission cytogénétique complète est passée de 10% à 76%<sup>20,21</sup> et le taux de survie à 10 ans est aujourd'hui de 83%.<sup>22</sup>

La plupart des médicaments de thérapies ciblées appartiennent à la classe des inhibiteurs de tyrosine kinase. Parmi ces médicaments sont retrouvés les molécules de synthèse, qui seront abrégées en ITK par la suite (segment-clé en -tinib), et les anticorps monoclonaux (segment-clé en -mab) ([Figure 21](#)).

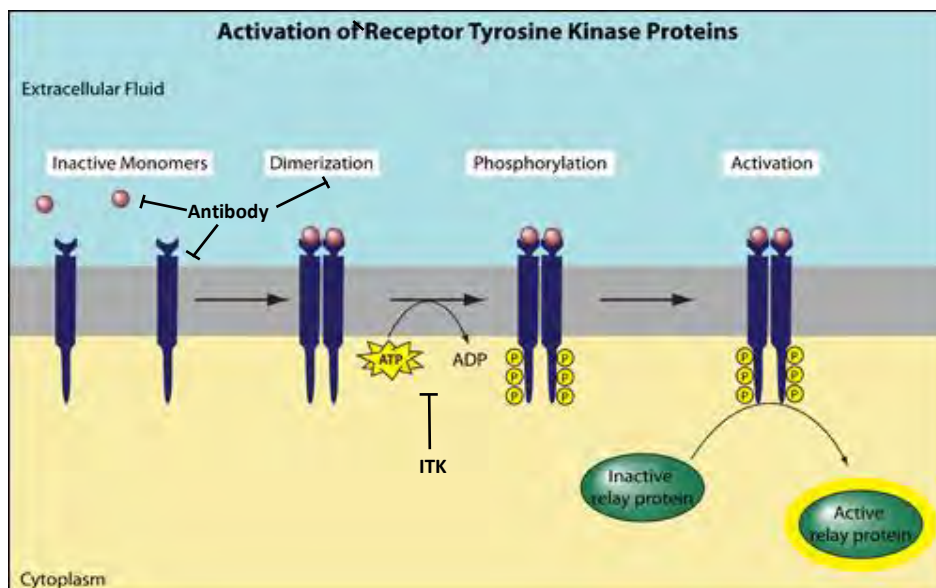
---

<sup>19</sup> Ségalliny, A.; Gabriel, M.; Heymann, M.; Heymann, D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J. Bone. Oncol.* **2015**, *4*, 1-12.

<sup>20</sup> Druker, B.; Sawyers, C.; Kantarjian, H.; Resta, D.; Reese, S.; Ford, J.; Capdeville, R.; Talpaz, M. Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1038-1044.

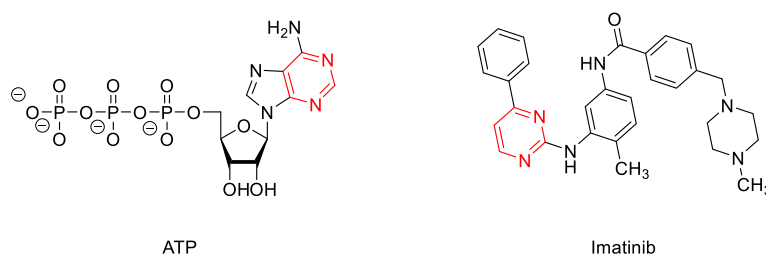
<sup>21</sup> O'Brien, S.; Guilhot, F.; Larson, R. A.; Gathmann, I.; Baccarani, M.; Cervantes, F.; Cornelissen, J.; Fischer, T.; Hochhaus, A.; Hughes, T.; Lechner, K.; Nielsen, J. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 944-1004.

<sup>22</sup> Hochhaus, A.; Larson, R.; Guilhot, F.; Radich, J.; Branford, S.; Hughes, T.; Baccarani, M.; Deininger, M.; Cervantes, F.; Fujihara, S.; Ortmann, C.; Mendenhall, H. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 917-927.



**Figure 21.** Mécanisme d'action des agents de thérapie ciblée.<sup>23</sup>

Les ITK, de par leur faible poids moléculaire, sont capables de traverser la membrane cellulaire. Ils ont aussi l'avantage de pouvoir être administrés *per os*. Ils présentent pour la plupart dans leur structure chimique un cycle pyrimidine, que l'on retrouve dans l'ATP (adénosine-triphosphate) (Figure 22). Ainsi le mécanisme d'action des ITK consiste à entrer en compétition avec l'ATP au niveau du site catalytique de la tyrosine kinase. Ceci va empêcher la phosphorylation induite par l'ATP et donc toute la cascade de signalisation en aval. Les cellules cancéreuses peuvent toutefois développer des résistances, *via* des mutations dans la séquence peptidique du site catalytique de la kinase : l'ITK devient alors inefficace.



**Figure 22.** Structures chimiques de l'ATP et de l'imatinib. Le cycle pyrimidine commun est représenté en rouge.

Les anticorps monoclonaux ciblent quant à eux le domaine extracellulaire des récepteurs aux tyrosines kinases. Ceux-ci empêchent la reconnaissance du ligand par le récepteur, mais peuvent aussi bloquer la dimérisation du récepteur. Les anticorps induisent aussi une cytotoxicité, médiée soit par des cellules (ADCC) ou par le complément (CDC). Enfin, certains anticorps reconnaissent cette-fois-ci le ligand, empêchant ainsi sa fixation sur son récepteur.

<sup>23</sup> Hartnell College Biology Tutorials. (Page consultée le 22 juillet 2019). Signal Transduction Tutorial, [en ligne]. Adresse URL : <https://dev-www.hartnell.edu/tutorials/signaltransduction.php>.

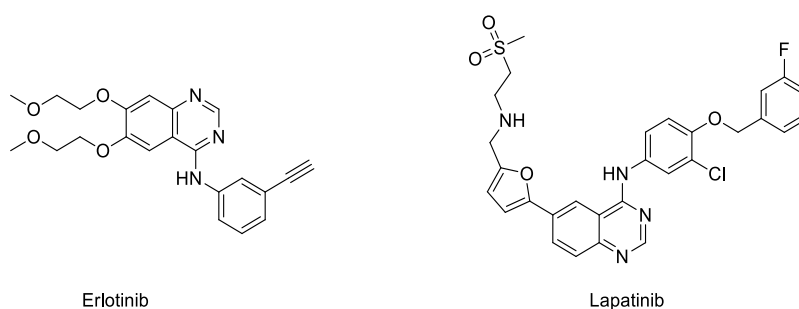
### 3-3-1- Les inhibiteurs de tyrosine kinase

#### 3-3-1-1 Les inhibiteurs d'ErbB

La famille des ErbB (avian erythroblastosis oncogene B) contient quatre récepteurs à activité tyrosine kinase dont deux sont principalement la cible de médicaments : ErbB-1, aussi appelé EGFR (epidermal growth factor receptor) et ErbB-2, nommé également HER2 (human epidermal growth factor receptor 2).

Un certain nombre de ligand se lie à l'EGFR dont l'EGF (epidermal growth factor). Ceci permet l'activation de diverses voies de signalisation comme celle de Ras/Raf ou de la phospholipase Cy.<sup>24</sup> L'erlotinib ([Figure 23](#)), indiqué dans le cancer pulmonaire non à petite cellule et le cetuximab, utilisé dans le cancer colorectal métastatique, ciblent l'EGFR.

HER-2 n'a pas de ligand direct.<sup>25</sup> HER-2 doit donc se dimériser avec un autre membre de la famille des ERbB. Cet hétérodimère va pouvoir reconnaître un facteur de croissance pour ensuite exercer son activité catalytique de phosphorylation. Le lapatinib ([Figure 23](#)) et le trastuzumab sont indiqués dans le cancer du sein, où la surexpression de HER2 est retrouvée dans environ 25% des cas.<sup>26</sup>



**Figure 23.** Structures chimiques de l'erlotinib et du lapatinib.

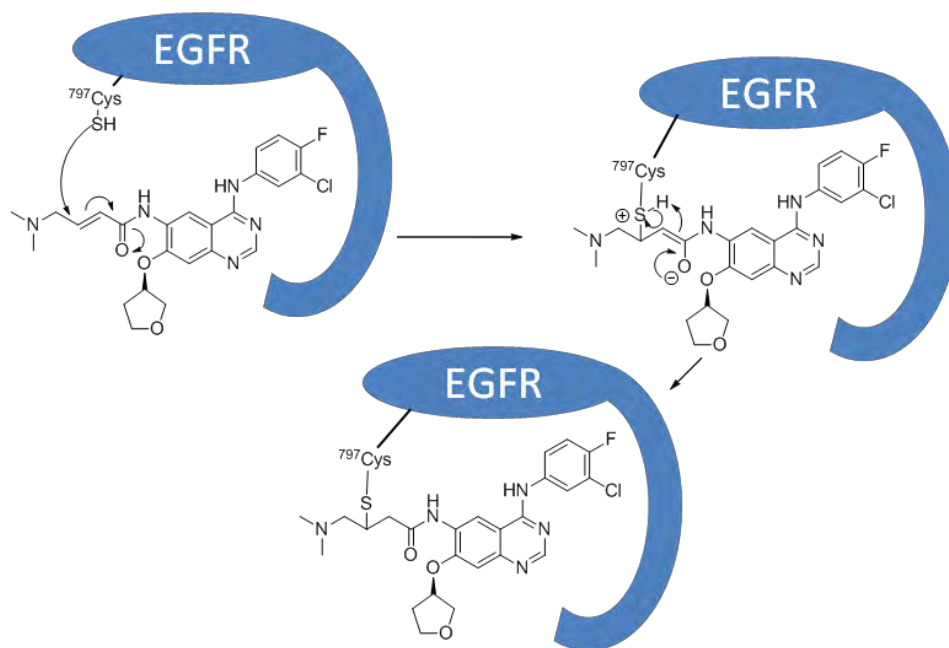
L'afatinib cible quant à lui plusieurs récepteurs de la famille ErbB. Il présente dans sa structure chimique un motif acrylamide, qui est un accepteur de Michael. Une addition 1-4 de la cystéine 797 du site catalytique sur l'ITK va ainsi avoir lieu, formant une liaison covalente :

<sup>24</sup> Scaltriti, M.; Baselga, J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 5268-5272.

<sup>25</sup> Roskoski, R. The ErbB/HER Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 1-11.

<sup>26</sup> Ménard, S.; Tagliabue, E.; Campiglio, M.; Pupa, S. Role of HER2 Gene Overexpression in Breast Carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *182*, 150-162.

l'afatinib est donc un inhibiteur irréversible des ErbB (Figure 24). Ceci permettrait une activité plus prolongée de l'afatinib par rapport aux autres ITK.<sup>27</sup>



**Figure 24.** Mécanisme de l'inhibition irréversible de l'EGFR par l'afatinib.

### 3-3-1-2- Les inhibiteurs de l'angiogénèse

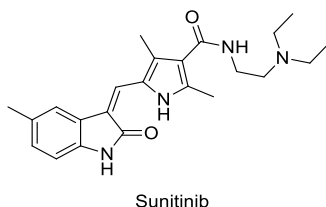
La néo-angiogénèse est nécessaire à la tumeur pour se développer en permettant l'apport d'oxygène et de nutriments ainsi que l'élimination de métabolites.<sup>28</sup> Parmi les facteurs de l'angiogénèse sécrétés par les cellules tumorales, est retrouvé le VEGF (vascular endothelial growth factor), ligand du VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor).

Les antiangiogéniques vont ainsi réduire la vascularisation des tumeurs et donc ralentir leur croissance. Ceci explique pourquoi ils doivent être utilisés en association avec d'autres traitements.

Le sunitinib (Figure 25) est par exemple un anti-VEGFR, utilisé dans le cancer du rein. Le bevacizumab, utilisé dans la même indication, est quant à lui dirigé vers le VEGF, empêchant sa fixation sur son récepteur.

<sup>27</sup> Wislez, M.; Malka, D.; Bannoun, J.; Mortier, L.; Bensadoun, R.; Sicard, J.; Dielenseger, P.; Rey, J.; Moro-Sibilot, D.; Scotté, F. Nouvelle Perspective de Traitement Dans Le Cancer Bronchique Non à Petites Cellules (CBNPC). Place de l'afatinib : Un Inhibiteur Oral et Irréversible de La Famille ErbB. *Bull. Cancer (Paris)* **2014**, *101*, 647–652.

<sup>28</sup> Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186.



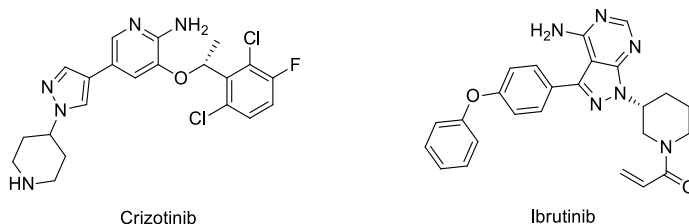
**Figure 25.** Structure chimique du sunitinib.

### 3-3-1-3- Les autres inhibiteurs de tyrosine kinase

Alk (anaplastic lymphoma kinase) est un récepteur aux tyrosines kinases. Le gène codant pour ce récepteur peut subir une translocation avec le gène EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4), aboutissant à la production d'une protéine de fusion EML4-Alk induisant la prolifération et la survie cellulaire.<sup>29</sup> Cette anomalie moléculaire est retrouvée dans 5% des cancers du poumon non à petites cellules.<sup>30</sup> Le crizotinib (Figure 26), utilisé dans cette indication et où la mutation Alk est retrouvée, cible le domaine kinase de la protéine fusionnée.

Des ITK visent également des tyrosines kinases cytosoliques :

- l'imatinib, cité précédemment, qui cible la protéine de fusion Bcr-abl. Cette kinase, constitutivement active, est une des causes de la leucémie myéloïde chronique.<sup>31</sup>
- l'ibrutinib (Figure 26), dont la cible est la kinase de Bruton. Cette protéine est importante dans le développement, la signalisation et la différenciation des lymphocytes B.<sup>32</sup> L'indication de l'ibrutinib est donc la leucémie lymphoïde chronique. Il présente de plus dans sa structure un motif acrylamide, comme l'afatinib, induisant donc une inhibition irréversible de la kinase ciblée.



**Figure 26.** Structures chimiques du crizotinib et de l'ibrutinib.

<sup>29</sup> Sabir, S.; Yeoh, S.; Jackson, G.; Bayliss, R. EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients. *Cancers*. **2017**, *9* (9).

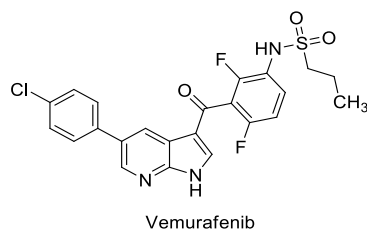
<sup>30</sup> Shaw, A.; Kim, D.; Nakagawa, K.; Seto, T.; Crinó, L.; Ahn, M.-J.; De Pas, T.; Besse, B.; Solomon, B.; Blackhall, F.; Wu, Y.; Thomas, M. Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 2385–2394.

<sup>31</sup> Druker, B.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J.; Lydon, N.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers, C. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1031–1037.

<sup>32</sup> Mohamed, A.; Yu, L.; Bäckesjö, C.; Vargas, L.; Faryal, R.; Aints, A.; Christensson, B.; Berglöf, A.; Vihinen, M.; Nore, B.; Smith, C. Bruton's Tyrosine Kinase (Btk): Function, Regulation, and Transformation with Special Emphasis on the PH Domain. *Immunol. Rev.* **2009**, *228*, 58–73.

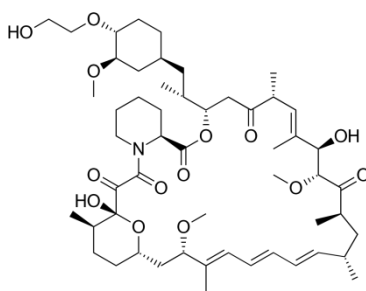
### 3-3-2- Les inhibiteurs de sérine/thréonine kinase

La protéine B-Raf est une sérine/thréonine kinase cytosolique. Son fonctionnement est semblable aux tyrosines kinase. C'est dans ce cas-ci un résidu sérine ou thréonine qui va être responsable de la phosphorylation d'autres protéines. Des mutations activatrices dans la séquence de la protéine peuvent être à l'origine de cancers. Ainsi, 50 % des mélanomes possèdent une telle anomalie moléculaire.<sup>33</sup> Des inhibiteurs de kinases ont donc été conçus, comme le vemurafenib (Figure 27).



**Figure 27.** Structure chimique du vemurafenib

La protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) est une autre sérine/thréonine kinase impliquée dans un grand nombre de voies de signalisation induisant entre autres la transcription, la prolifération et la survie cellulaire.<sup>34</sup> La rapamycine est un macrocycle d'origine bactérienne qui a la capacité de se lier et d'inhiber mTOR. Des dérivés hémisynthétiques, comme l'everolimus (Figure 28), étaient initialement indiqués en tant qu'immunosuppresseurs dans la prévention du rejet de greffe. Celui-ci est aujourd'hui utilisé en oncologie, comme par exemple dans le cancer du sein.<sup>35</sup>



**Figure 28.** Structure chimique de l'everolimus.

<sup>33</sup> Ascierto, P.; Kirkwood, J.; Grob, J.; Simeone, E.; Grimaldi, A.; Maio, M.; Palmieri, G.; Testori, A.; Marincola, F. M.; Mozzillo, N. The Role of BRAF V600 Mutation in Melanoma. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 85.

<sup>34</sup> Watanabe, R.; Wei, L.; Huang, J. mTOR Signaling, Function, Novel Inhibitors, and Therapeutic Targets. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 497–500.

<sup>35</sup> Haute autorité de santé. (Page consultée le 24 juillet 2019). AFINITOR (évérolimus), inhibiteur de tyrosine kinases, [en ligne]. Adresse URL : [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_1528334/fr/afinitor-everolimus-inhibiteur-de-tyrosine-kinase](https://www.has-sante.fr/jcms/c_1528334/fr/afinitor-everolimus-inhibiteur-de-tyrosine-kinase).

### 3-3-3- Inhibiteur de l'antigène de surface CD20

Les lymphocytes B présentent au niveau membranaire un antigène de surface nommé CD20 (cluster de différenciation 20). Cette protéine est la signature moléculaire des lymphocytes B. Le lymphome non hodgkinien (LNH) est un cancer possédant un groupe hétérogène de cellules malignes. Cependant, 90% des LNH présentent des cellules ayant un phénotype de cellule B. Pratiquement toutes ces cellules expriment le CD20 à leur surface.<sup>36</sup>

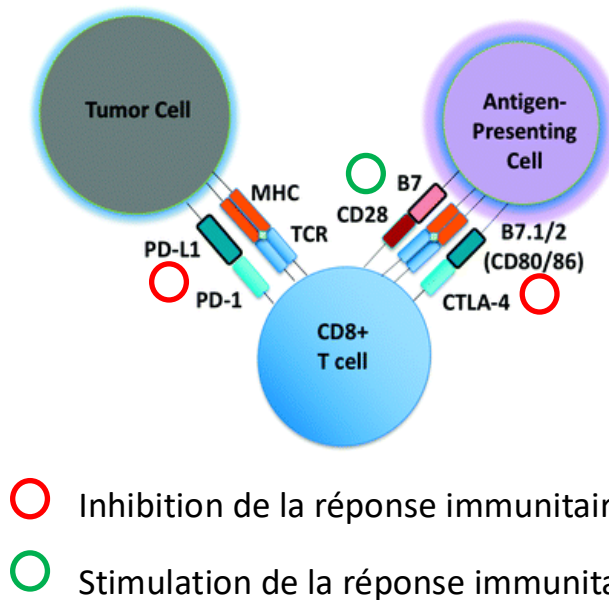
Le rituximab est un anticorps dirigé contre le CD20. Une fois fixé, celui-ci va pouvoir induire la mort de la cellule visé par ADCC ou CDC.

### 3-3-4- Les immunomodulateurs

Les cellules de l'immunité, dont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes T (LT), sont capables de reconnaître les cellules cancéreuses. Il se met alors en place une réponse immunitaire, aboutissant à la mort de la cellule tumorale. Cette dernière peut cependant exprimer à sa surface des protéines, qui en interagissant avec d'autres protéines présentes à la surface des cellules de l'immunité, inhibent la réponse immunitaire. C'est le cas du couple PD-1/PD-L1 (Programmed death 1/ Programmed death-ligand 1). Le principe est le même entre B7 exprimée par la cellule dendritique et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) présente sur le lymphocyte T ([Figure 29](#)). Sur cette figure, on peut observer que le LT reconnaît la CPA et la tumeur grâce à l'interaction entre le TCR (T cell receptor du lymphocyte T) et le complexe CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)-peptide. De plus, l'interaction B7/CD28 entre la CPA et le LT costimule ce dernier.

---

<sup>36</sup>Zhao, L.; Xie, F.; Tong, X.; Li, H.; Chen, Y.; Qian, W.; Duan, S.; Zheng, J.; Zhao, Z.; Li, B.; et al. Combating Non-Hodgkin Lymphoma by Targeting Both CD20 and HLA-DR through CD20–243 CrossMab. *mAbs*. **2014**, 6, 739–747.



**Figure 29.** Immunomodulation du LT par les CPA et les cellules tumorales, d'après Aref *et al.*<sup>37</sup>

Plusieurs anticorps ciblent ces protéines que l'on nomme "checkpoints immunologiques" :

- l'ipilimumab, ciblant CTLA-4, indiqué dans le mélanome avancé.
- le nivolumab, visant PD-1, utilisé dans le cancer pulmonaire non à petites cellules et le mélanome.
- l'atezolizumab, qui cible PD-L1, indiqué dans le mélanome.

Ces traitements permettent une amélioration de la survie des patients atteints de mélanome : l'ipilimumab permet par exemple une augmentation de la survie de trois mois par rapport à une chimiothérapie classique.<sup>38</sup>

### 3-4- Récapitulatif des traitements de chimiothérapie

Un récapitulatif des traitements de chimiothérapie se trouve dans le tableau 1 ci-après, reprenant la classe thérapeutique ainsi qu'un exemple de médicament appartenant à la classe de l'agent anticancéreux utilisé.

<sup>37</sup> R. Aref, A.; Campisi, M.; Ivanova, E.; Portell, A.; Larios, D.; P. Piel, B.; Mathur, N.; Zhou, C.; Vlahos Coakley, R.; Bartels, A.; Bowden, M.; Herbert, Z.; Hill, S.; Gilhooly, S.; Carter, J.; Cañadas, I.; Thai, T.; Kitajima, S.; Chiono, V.; Paweletz, C.; Barbie, D.; Kamm, R.; Jenkins, R. 3D Microfluidic Ex Vivo Culture of Organotypic Tumor Spheroids to Model Immune Checkpoint Blockade. *Lab. Chip.* **2018**, *18*, 3129–3143.

<sup>38</sup> Marconcini, R.; Spagnolo, F.; Stucci, L.; Ribero, S.; Marra, E.; Rosa, F.; Picasso, V.; Di Guardo, L.; Cimminiello, C.; Cavalieri, S.; Orgiano, L.; Tanda, E.; Spano, L.; Falcone, A.; Queirolo, P. Current Status and Perspectives in Immunotherapy for Metastatic Melanoma. *Oncotarget.* **2018**, *9*, 12452–12470.

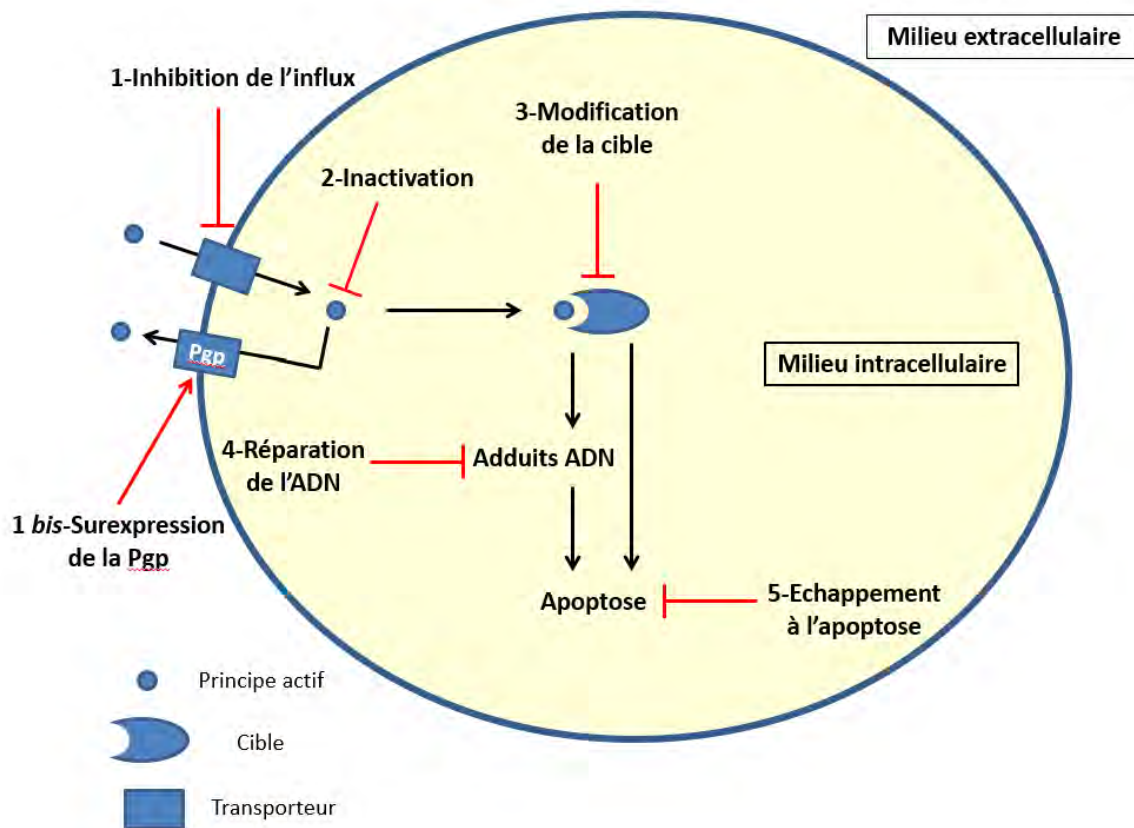
| Stratégie                  | Classe d'anticancéreux                 | Exemple de médicament |
|----------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| Chimiothérapie cytotoxique | Antimétabolites                        | 5-Fu                  |
|                            | Alkylants de l'ADN                     | Cisplatine            |
|                            | Intercalants de l'ADN                  | Doxorubicine          |
|                            | Poisons du fuseau mitotique            | Paclitaxel            |
| Hormonothérapie            | Anti-œstrogènes                        | Tamoxifène            |
|                            | Anti-aromatase                         | Anastrozole           |
|                            | Anti-androgènes                        | Cyprotérone           |
|                            | Analogues de la LH-RH                  | Goséréline            |
| Thérapie ciblée            | Inhibiteurs d'ErbB                     | Erlotinib             |
|                            | Inhibiteurs de l'angiogénèse           | Sunitinib             |
|                            | Autres ITK                             | Imatinib              |
|                            | Inhibiteurs de sérine/thréonine kinase | Vemurafenib           |
|                            | Inhibiteur du CD20                     | Rituximab             |
|                            | Immunomodulateurs                      | Nivolumab             |

**Tableau 1.** Récapitulatif des traitements de chimiothérapie anticancéreuse

## 4- Mécanismes de chimiorésistance

Les cellules cancéreuses peuvent développer différents mécanismes de chimiorésistance, aboutissant à une inefficacité des traitements utilisés. Ainsi, 90% des causes d'échec au traitement, chez des patients atteints de cancer métastatique, est due à une résistance à la chimiothérapie.<sup>39</sup> Il est donc important de comprendre ces mécanismes, afin de pouvoir lutter contre ceux-ci et donc d'améliorer la survie des patients.

Les différents mécanismes de chimiorésistance, qui vont être abordés par la suite, sont résumés dans la figure 30.



**Figure 30.** Mécanismes de chimiorésistances, symbolisés par des flèches rouges.

<sup>39</sup> Longley, D.; Johnston, P. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* **2005**, *205*, 275-292.

## 4-1- Influx et efflux des médicaments

Certains médicaments utilisent un transporteur au niveau membranaire pour entrer dans la cellule tumorale. Ainsi une diminution de l'expression de ce transporteur s'accompagne d'une moindre concentration intracellulaire en agent thérapeutique. C'est le cas pour le méthotrexate qui utilise principalement le transporteur du folate réduit (RFC) pour entrer dans la cellule cancéreuse. Une diminution de l'expression de RFC ou une mutation inactivatrice sont des mécanismes de résistance du cancer au méthotrexate.<sup>40,41</sup>

Inversement, les protéines d'efflux sont capables de rejeter le médicament en dehors de la cellule. Parmi elles est retrouvée la glycoprotéine P (Pgp), dont la surexpression dans le cancer du sein<sup>42</sup> conduit à une chimiorésistance.<sup>43</sup> Les substrats de la Pgp sont principalement des molécules hydrophobes comme les taxanes (paclitaxel) ou les anthracyclines (doxorubicine).<sup>44</sup>

## 4-2- Inactivation du principe actif

Ce phénomène diminue la quantité de molécule, sous forme active, dans la cellule tumorale. Cette inactivation a lieu principalement par métabolisation.

Le 5-Fu est métabolisé par la dihydropyrimidine déshydrogénase. Une surexpression de cette enzyme se traduit, *in vitro*, par une chimiorésistance des cellules cancéreuses au 5-Fu.<sup>45</sup>

Le glutathion est quant à lui capable de former un complexe (Figure 31) avec les sels de platine.<sup>46</sup> Cette liaison covalente rend le cytotoxique inefficace. De plus ce complexe va être reconnu par la Pgp et être excrété hors de la cellule.<sup>47</sup>

---

<sup>40</sup> Gorlick, R.; Bertino, J. Clinical pharmacology and resistance to dihydrofolate reductase inhibitors. In *Antifolate Drugs in Cancer Therapy*, AL Jackman (ed). Humana Press: Totowa, NJ, 1999.

<sup>41</sup> Guo, W.; Healey, J.; Meyers, P.; Ladanyi, M.; Huvos, A.; Bertino, J.; Gorlick, R. Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* **1999**, *5*, 621–627.

<sup>42</sup> Kuo, M. T. *Roles of Multidrug Resistance Genes in Breast Cancer Chemoresistance*; Landes Bioscience, 2013.

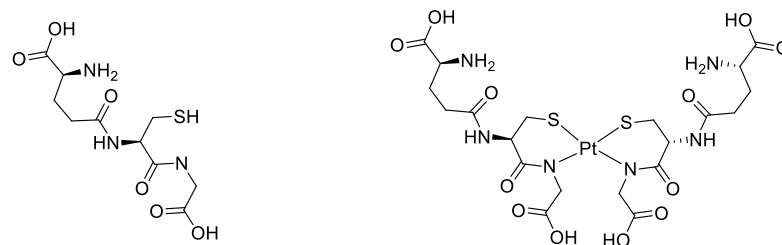
<sup>43</sup> Verrelle, P.; Meissonnier, F.; Fonck, Y.; Feillel, V.; Dionet, C.; Kwiatkowski, F.; Plagne, R.; Chassagne, J. Clinical Relevance of Immunohistochemical Detection of Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 111–116.

<sup>44</sup> Fardel, O.; Lecreur, V.; Guillouzo, A. The P-Glycoprotein Multidrug Transporter. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1996**, *27*, 1283–1291.

<sup>45</sup> Takebe, N.; Zhao, S.; Ural, A.; Johnson, M.; Banerjee, D.; Diasio, R.; Bertino, J. Retroviral Transduction of Human Dihydropyrimidine Dehydrogenase cDNA Confers Resistance to 5-Fluorouracil in Murine Hematopoietic Progenitor Cells and Human CD34+ -Enriched Peripheral Blood Progenitor Cells. *Cancer Gene Ther.* **2001**, *8*, 966–973.

<sup>46</sup> Meijer, C.; Mulder, N.; Timmer-Bosscha, H.; Sluiter, W.; Meersma, G.; de Vries, E. Relationship of Cellular Glutathione to the Cytotoxicity and Resistance of Seven Platinum Compounds. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6885–6889.

<sup>47</sup> Ishikawa, T.; Ali-Osman, F. Glutathione-Associated Cis-Diamminedichloroplatinum(II) Metabolism and ATP-Dependent Efflux from Leukemia Cells. Molecular Characterization of Glutathione-Platinum Complex and Its Biological Significance. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20116–20125.



**Figure 31.** Structure du glutathion (à gauche) et d'un complexe cisplatine-glutathion (à droite) proposé dans la littérature.<sup>48</sup>

### 4-3- Modifications de la cible

La cible du médicament peut subir des modifications, de manière quantitative ou qualitative. Premièrement, si la cible est surexprimée, l'agent thérapeutique ne sera pas en quantité suffisante pour agir sur cette cible. Une étude s'est intéressée à la réponse de patients traités par 5-Fu en fonction du polymorphisme de leur gène codant pour la thymidilate-synthétase. Les patients avec des allèles induisant une plus grande production de l'enzyme présentaient une moindre réponse, par rapport aux individus avec des taux plus faibles en thymidilate-synthétase.<sup>49</sup>

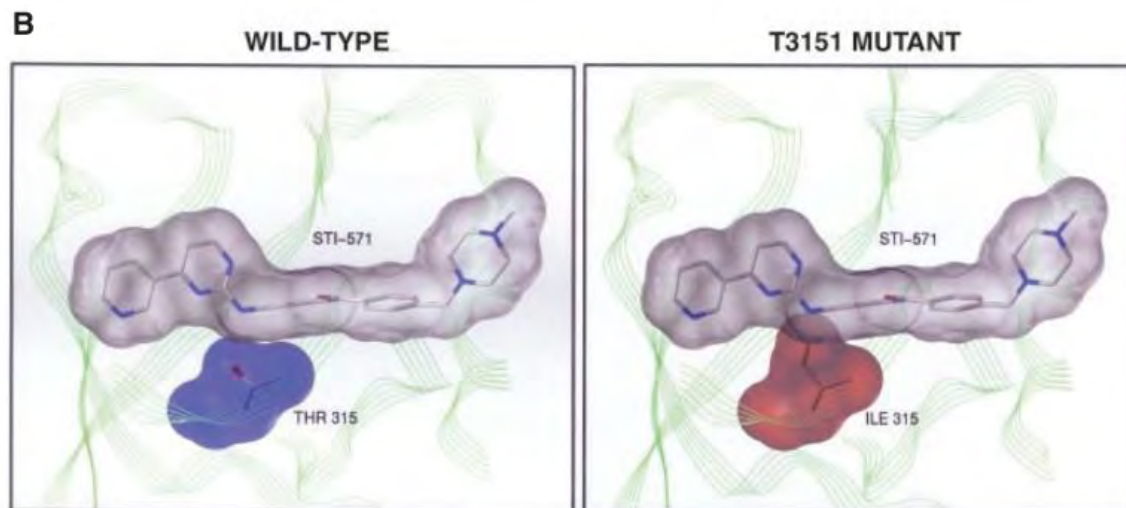
Concernant les modifications qualitatives de la cible, une seule mutation dans le domaine de fixation de la molécule peut par exemple conduire à son inefficacité. C'est le cas de l'imatinib, qui interagit avec Bcr-abl, *via* notamment une liaison hydrogène avec la thréonine 315. La mutation T315I, correspondant au remplacement de cette thréonine 315 par une isoleucine, rend les cellules tumorales résistantes à l'imatinib.<sup>50</sup> La perte de la liaison hydrogène entraîne en effet une diminution de l'affinité du composé pour sa cible. De plus, la chaîne hydrophobe de l'isoleucine entraînerait une gêne stérique avec l'imatinib (Figure 32).<sup>51</sup>

<sup>48</sup> Gibson, D. The Mechanism of Action of Platinum Anticancer Agents—What Do We Really Know about It? *Dalton Trans.* **2009**, 10681–10689.

<sup>49</sup> Marsh, S.; McLeod, H. Thymidylate Synthase Pharmacogenetics in Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer.* **2001**, *1*, 175–178.

<sup>50</sup> O'Hare, T.; Eide, C.; Deininger, M. Bcr-Abl Kinase Domain Mutations, Drug Resistance, and the Road to a Cure for Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2007**, *110*, 2242–2249.

<sup>51</sup> Gorre, M.; Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Rao, P.; Sawyers, C. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science.* **2001**, *293*, 876–880.



**Figure 32.** Modèle de liaison de l'imatinib (STI-571) avec la kinase Bcr-abl sauvage (à gauche) et mutée (à droite), d'après Gorre *et al.*<sup>51</sup>

#### 4-4- Réparation de l'ADN

Dans la famille des cytotoxiques, les alkylants de l'ADN conduisent à des adduits sur l'ADN. Ces dommages peuvent être pris en charge par divers mécanismes, dont la réparation par excision de nucléotides (NER). Ce système a pour objectif la réparation d'adduits intra-brin, causés par exemple par les sels de platine.<sup>52</sup> La protéine ERCC-1 (excision repair cross-complementing-1) est l'une des composantes du système NER. Ainsi, il a été montré qu'il existait une corrélation entre des taux élevés d'ERCC-1 et une faible réponse au cisplatine ou carboplatine, dans des cellules du cancer de l'ovaire.<sup>53</sup>

#### 4-5- Echappement à l'apoptose

Des signaux de mort, causés par le traitement de chimiothérapie, conduisent au déclenchement de l'apoptose de la cellule tumorale, et donc à sa mort. La cellule cancéreuse peut mettre en place des mécanismes afin d'échapper à cette apoptose. Cette partie va être traitée plus en détail par la suite, en se concentrant sur le rôle de la protéine antiapoptotique XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein).

<sup>52</sup> Mouw, K.; D'Andrea, A.; Konstantinopoulos, P. Nucleotide Excision Repair (NER) Alterations as Evolving Biomarkers and Therapeutic Targets in Epithelial Cancers. *Oncoscience*. **2015**, 2, 942–943.

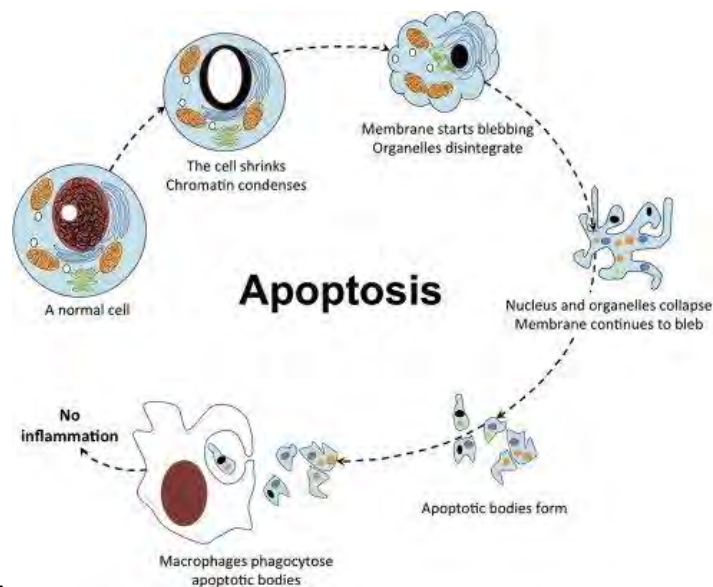
<sup>53</sup> Dabholkar, M.; Vionnet, J.; Bostick-Bruton, F.; Yu, J.; Reed, E. Messenger RNA Levels of XPAC and ERCC1 in Ovarian Cancer Tissue Correlate with Response to Platinum-Based Chemotherapy. *J. Clin. Invest.* **1994**, 94, 703–708.

## 5- XIAP, une protéine inhibitrice de l'apoptose

### 5-1- L'apoptose

L'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée, est un processus physiologique aboutissant à la destruction de la cellule suite à un signal donné. Ce terme a pour la première fois été utilisé par Kerr et *al.* pour décrire un processus de mort cellulaire différent de la nécrose.<sup>54</sup> L'apoptose joue en effet un rôle important dans l'homéostasie tissulaire en détruisant les cellules altérées, dont l'ADN a par exemple été endommagé.<sup>55</sup> Contrairement à la nécrose, l'apoptose est une mort cellulaire "propre", évitant ainsi des dommages aux tissus environnants.<sup>56</sup>

Le processus cellulaire est le suivant : suite à un signal de mort, la chromatine du noyau se condense et l'enveloppe nucléaire se désagrège conduisant à l'hydrolyse de l'ADN par les DNases. La membrane plasmique forme ensuite des proéminences (*blebs* en anglais) et les organites sont détruits. La cellule se divise au final en petites vésicules, appelées corps apoptotiques, qui vont par la suite être phagocytés par les macrophages (*Figure 33*).<sup>57</sup> Le contenu cellulaire n'est ainsi pas rejeté dans le milieu environnant, ne déclenchant donc pas une réponse inflammatoire



<sup>54</sup> Kerr, J.; Wyllie, A.; Currie, A. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer.* **1972**, *26*, 239–257.

<sup>55</sup> Lopez, J.; Tait, S. W. G. Mitochondrial Apoptosis: Killing Cancer Using the Enemy Within. *Br. J. Cancer.* **2015**, *112*, 957–962.

<sup>56</sup> Dorn, G. W. Mechanisms of Non-Apoptotic Programmed Cell Death in Diabetes and Heart Failure. *Cell Cycle.* **2010**, *9*, 3442–3448.

<sup>57</sup> Abou-Ghali, M.; Stiban, J. Regulation of Ceramide Channel Formation and Disassembly: Insights on the Initiation of Apoptosis. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *274*, 760–772.

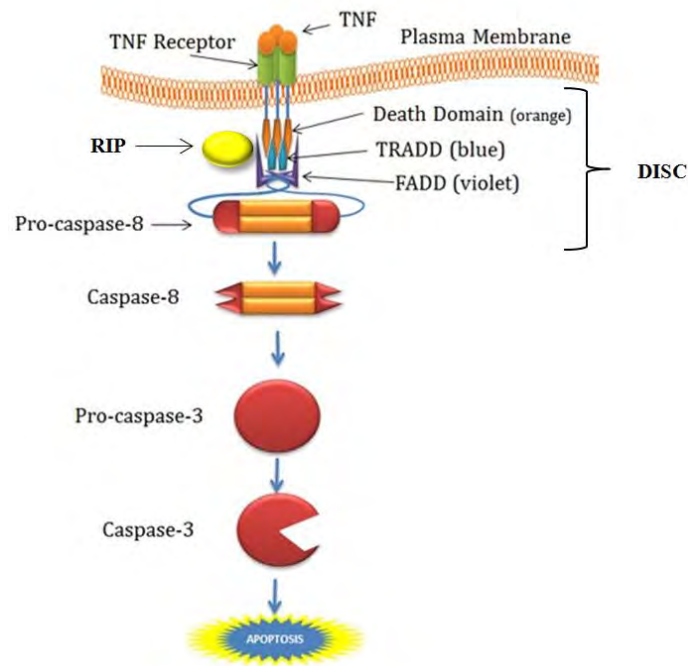
Suivant la provenance du signal de mort, le processus d'apoptose peut être déclenché par deux voies de signalisation : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.<sup>58</sup>

Pour la voie extrinsèque, le signal de mort vient de l'extérieur de la cellule. Cette voie passe par les "récepteurs de mort" comme FasR (récepteur Fas) ou TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1), présents au niveau de la membrane plasmique. La fixation de leur ligand (respectivement Fas et le TNF) sur le domaine extracellulaire du récepteur va entraîner la liaison de protéines adaptatrices au niveau de leur domaine intracellulaire (appelé aussi domaine de mort) : FADD (Fas-associated protein with death domain) pour FasR et TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death domain) pour le TNFR1. La liaison TNFR1-TRADD permet également le recrutement des protéines adaptatrices FADD et RIP (related receptor interacting protein). L'association de la procaspase 8 à FADD forme le DISC (death-inducing signaling complex), qui correspond au trimère « domaine de mort-protéine adaptatrice-procaspase 8 ». Ce complexe a la capacité d'activer la caspase 8 par clivage de la procaspase 8. La caspase 8 va par la suite elle-même pouvoir activer la caspase 3, qui va au final déclencher l'apoptose (Figure 34).<sup>59</sup>

---

<sup>58</sup> Riedl, S.; Salvesen, G. The Apoptosome: Signalling Platform of Cell Death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 405–413.

<sup>59</sup> Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516.



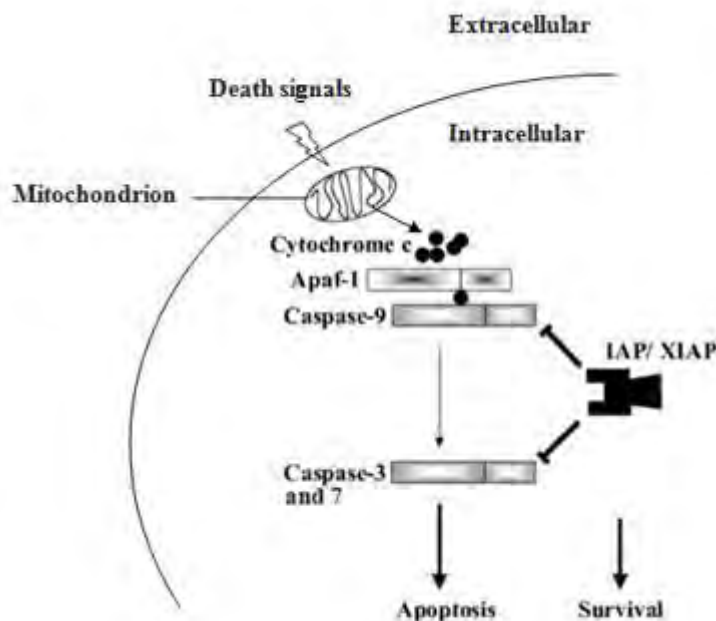
**Figure 34.** Voie extrinsèque de l'apoptose, passant par TNFR1.<sup>60</sup>

La voie intrinsèque est déclenchée par des signaux de mort intracellulaires comme des dommages à l'ADN ou du stress oxydatif.<sup>61</sup> Suite à ce signal de mort, la mitochondrie relargue diverses protéines dans le cytosol, dont le cytochrome c. Celui-ci va se fixer à la protéine adaptatrice Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1). Le dimère formé va ensuite se lier à la procaspase-9 pour ainsi former le trimère cytochrome c/Apaf-1/procaspase-9, également appelé apoptosome. Ce complexe va pouvoir activer la caspase 9, par protéolyse de la procaspase-9. Cette caspase initiateur va ensuite activer les caspases effectrices 3 et 7, qui vont elles-mêmes entraîner l'apoptose (Figure 35).<sup>62</sup>

<sup>60</sup> EASY BIOLOGY CLASS. (Page consultée le 25 juillet 2019). Extrinsic Pathway of Apoptosis (Apoptosis Molecular Mechanism Part 2), [en ligne]. Adresse URL : <https://www.easybiologyclass.com/extrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-2/>.

<sup>61</sup> Loreto, C.; La Rocca, G.; Anzalone, R.; Caltabiano, R.; Vespasiani, G.; Castorina, S.; J Ralph, D.; Cellek, S.; Musumeci, G.; Giunta, S.; Djinoic, R.; Basic, D.; Sansalone, S. The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease. *BioMed Res. Int.* **2014**, 616149.

<sup>62</sup> Röckmann, H.; Schadendorf, D. Drug Resistance in Human Melanoma: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Oncol. Res. Treat.* **2013**, 26, 581-587.



**Figure 35.** Cascade d'activation des caspases dépendante de la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose, d'après Röckmann *et al.*<sup>62</sup>

## 5-2- La famille des IAPs

Comme nous pouvons l'observer sur la figure 35, les "protéines inhibitrices de l'apoptose", ou IAPs, sont capables d'inhiber les caspases et jouent ainsi un rôle clé dans la régulation de l'apoptose.<sup>63</sup>

La famille des IAP comporte 8 protéines parmi lesquelles cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2 (cellular IAP2) et XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (Figure 36).

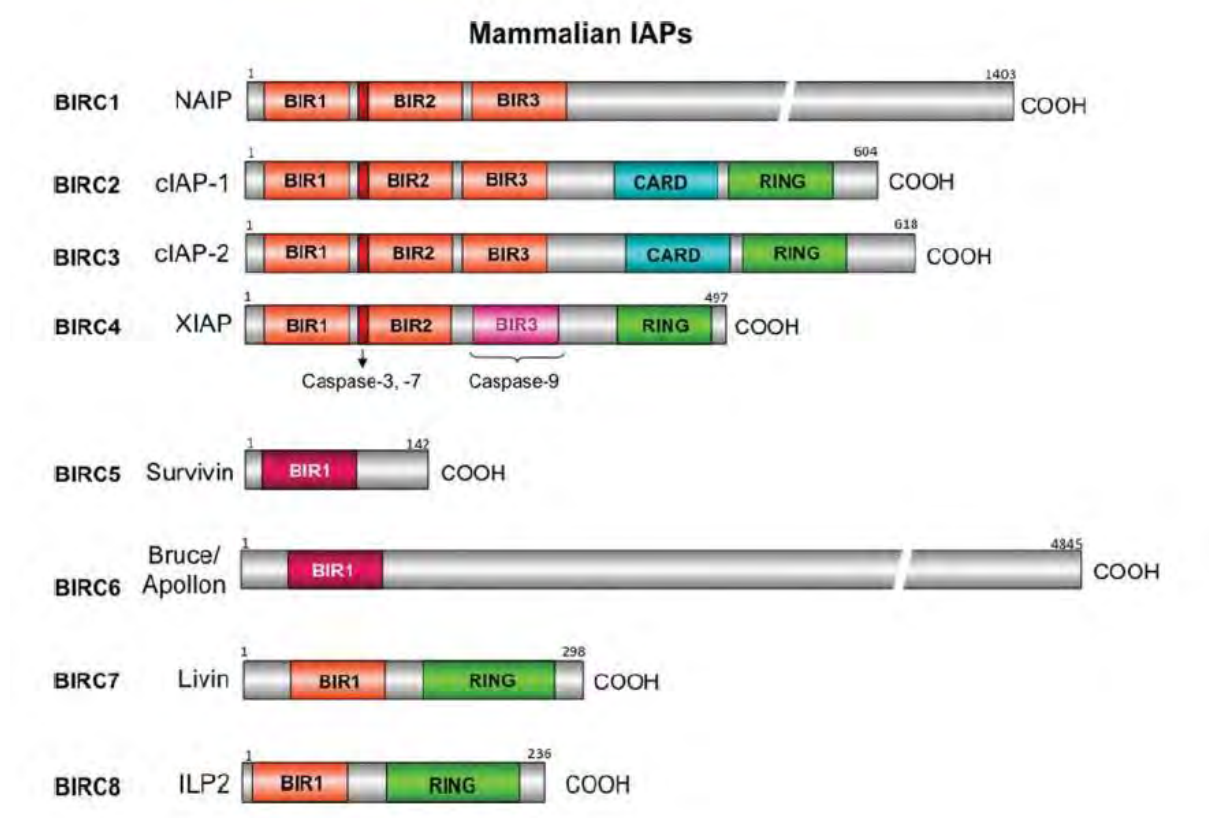
Les IAP, notamment cIAP1, cIAP2 et XIAP possèdent de fortes similitudes structurales. Ainsi, les domaines BIR3 de XIAP et cIAP1 présentent par exemple 48% d'homologie de séquence.<sup>64</sup> Ceci permet à ces trois protéines de se lier aux caspases. Cependant, de légères différences dans la séquence empêchent l'inhibition des caspases par les cIAP1 et cIAP2 : ainsi la protéine XIAP a un rôle prépondérant, puisque c'est la seule à pouvoir inhiber directement les caspases cytosoliques.<sup>65</sup>

<sup>63</sup> Salvesen, G.; Duckett, C. Apoptosis: IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 401-410.

<sup>64</sup> Kulathila, R.; Vash, B.; Sage, D.; Cornell-Kennon, S.; Wright, K.; Koehn, J.; Stams, T.; Clark, K.; Price, A. The Structure of the BIR3 Domain of cIAP1 in Complex with the N-Terminal Peptides of SMAC and Caspase-9. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **2009**, *65*, 58-66.

<sup>65</sup> Eckelman, B.; Salvesen, G. The Human Anti-apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but Do Not Inhibit Caspases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3254-3260.

L'inhibition des caspases par la protéine XIAP empêche donc le déclenchement de l'apoptose.<sup>66</sup>



**Figure 36.** Représentation de la famille des IAP, avec leurs domaines protéiques, d'après Ribe et al.<sup>67</sup>

L'interaction IAP-caspases se fait *via* des domaines protéiques appelés « domaines BIR » (pour Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat) :

- le rôle du domaine BIR1 n'est à ce jour pas clairement défini.<sup>68</sup>
- le domaine BIR2 est capable d'interagir et ainsi de séquestrer les caspases 3 et 7, bloquant leur activité. La région de jonction entre BIR1 et BIR2 joue également un rôle dans l'inhibition des caspases 3 et 7.<sup>68</sup>
- le domaine de liaison BIR 3 se lie quant à lui à la caspase 9.<sup>68</sup>

<sup>66</sup> Tamm, I.; Kornblau, S.; Segall, H.; Krajewski, S.; Welsh, K.; Kitada, S.; Scudiero, D.; Tudor, G.; Qui, Y.; Monks, A.; Andreeff, M.; Reed, J. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin. Cancer. Res.* **2000**, *6*, 1796-1803.

<sup>67</sup> Ribe, E. M.; Serrano-Saiz, E.; Akpan, N.; Troy, C. Mechanisms of Neuronal Death in Disease: Defining the Models and the Players. *Biochem. J.* **2008**, *415*, 165-182.

<sup>68</sup> Holcik, M.; Korneluk, R. XIAP, the guardian angel. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2001**, *2*, 550-556.

Les domaines CARD (caspase recruitment domain) et RING (really interesting new gene) confèrent quant à eux une activité E3-ubiquitine liagase aux IAP.<sup>69,70</sup> Les cIAP en particulier jouent un rôle important dans la régulation de voies impliquées dans l'inflammation, comme par exemple la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B).<sup>71</sup>

### 5-3- Intérêt de cibler XIAP

Il a été montré que certaines cellules cancéreuses, dont les cellules cancéreuses ovariennes, surexpriment XIAP, empêchant ainsi l'apoptose. Cette surexpression est de plus nécessaire à la survie de la cellule cancéreuse.<sup>72</sup> Dans ces cellules, il semble donc intéressant de cibler XIAP, pour l'inhiber, afin de rétablir l'apoptose.

Il existe, dans une cellule saine, des inhibiteurs naturels de XIAP. Ainsi la protéine SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase, aussi parfois appelée DIABLO pour direct IAP binding protein with Low isoelectric point) interagit avec les domaines BIR2 et BIR3 de XIAP pour l'inhiber.<sup>73,74,75</sup> Un précurseur de SMAC initialement constitué de 239 acides aminés et située dans la mitochondrie, va subir un clivage suite à des stimuli pro-apoptotiques. Les acides aminés 1-55 constituent la séquence d'adressage mitochondrial. Le clivage de cette séquence peptidique va donc aboutir à la libération dans le cytosol de la protéine SMAC activée, exposant son "motif de liaison pour XIAP". Ce dernier est constitué d'un térapeptide Alanine-Valine-Proline-Isoleucine (AVPI), situé sur la partie N-terminale de la protéine. L'interaction entre XIAP et AVPI empêche la liaison de XIAP aux caspases, permettant de rétablir l'activité protéolytique de ces enzymes, et ainsi l'apoptose.

La co-cristallisation de XIAP-BIR3 avec AVPI permet de visualiser les interactions entre les deux partenaires ([Figure 37](#)).<sup>76</sup>

---

<sup>69</sup> Broemer, M. ; Tenev, T. ; Rigbolt, K. ; Hempel, S. ; Blagoev, B. ; Silke, J. ; Ditzel, M. ; Meier, P. Systematic *in vivo* RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases. *Mol Cell*. **2010**, *40*, 810–822.

<sup>70</sup> Lopez, J. ; John, S. ; Tenev, T. ; Rautureau, G. ; Hinds, M. ; Francalanci, F. ; Wilson, R. ; Broemer, M. ; Santoro, M. ; Day, C. ; Meier, P. CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol Cell*. **2011**, *142*, 569–583.

<sup>71</sup> Varfolomeev, E., Blankenship, J., Wayson, S., Fedorova, A., Kayagaki, N.; Garg, P.; Zobel, K.; Dynek, J.; Elliott L.; Wallweber, H.; Flygare, J.; Fairbrother, W.; Deshayes, K.; Dixit, V.; Vucic, D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B activation, and TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell*. 2007, *131*, 669-681.

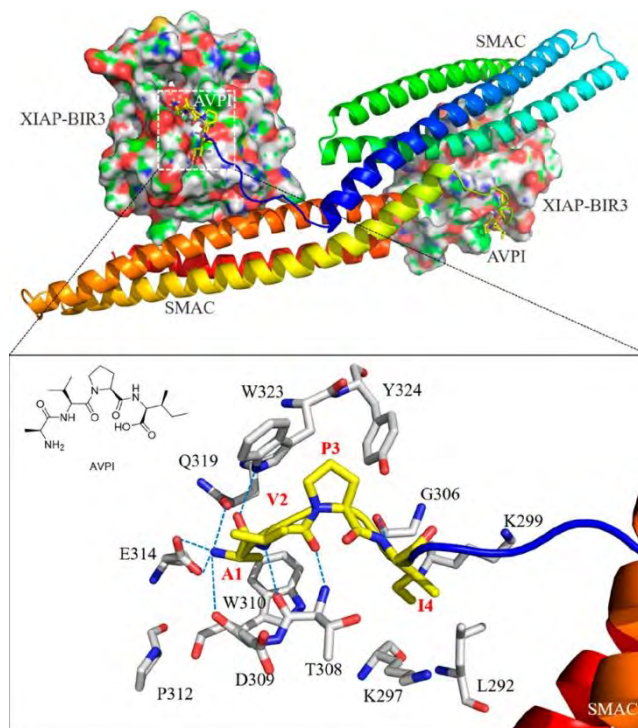
<sup>72</sup> Chen, W.; Huang, L.; Hao, C.; Zeng, W.; Luo, X.; Li, X.; Zhou, L.; Jiang, S.; Chen, Z.; HE, Y. MicroRNA-155 promotes apoptosis in SKOV3, A2780, and primary cultured ovarian cancer cells. *Tumor Biol*. **2016**, *37*, 9289–9299.

<sup>73</sup> Wu, G.; Chai, J.; Suber, T.; Wu, J.; Du, C.; Wang, X.; Shi, Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, **2000**, *408*, 1008-1012.

<sup>74</sup> Elsayed, N.; Abou El Ella, D.; Serya, R.; Abouzid, Khaled. Targeting apoptotic machinery as approach for anticancer therapy: Smac mimetics as anticancer agents. *J. Pharm. Chem*. **2016**, *12*, 3250–3260.

<sup>75</sup> Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.; Qian, D.; Lu, J.; Qiu, S.; Bai, L.; Peng, Y.; Cai, Q.; Wang, S. Design of small-molecule peptidic and nonpeptidic Smac mimetics. *Acc. Chem. Res*. **2008**, *41*, 1264-1277.

<sup>76</sup> Cong, H.; Xu, L.; Wu, Y.; Qu, Z.; Bian, T.; Zhang, W.; Xing, C.; Zhuang, C. Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Antagonists in Anticancer Agent Discovery: Current Status and Perspectives. *J. Med. Chem*. **2019**, *62*, 5750-5772.



**Figure 37.** Complexe SMAC et XIAP-BIR3 (code PDB : 1G73) et détail des interactions avec le peptide AVPI (en jaune), les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés bleus.<sup>76</sup>

4 poches peuvent être distinguées au niveau de XIAP-BIR3, qui correspondent aux sites de liaison des 4 acides aminés d'AVPI dans la protéine : la poche A1, dans laquelle se loge l'alanine terminale de SMAC, puis la poche V2 pour la valine, la poche P3 pour la proline et enfin la poche I4 pour l'isoleucine.

L'analyse cristallographique du complexe XIAP-BIR3/AVPI montre que les interactions nécessaires sont les suivantes :

- une liaison ionique entre la fonction amine terminale libre (protonée à pH physiologique) d'AVPI et l'acide glutamique 314. Des liaisons hydrogène sont également présentes entre cette fonction amine d'une part et l'acide aspartique 309 et la glutamine 319 d'autre part (poche A1).
- la formation de liaisons hydrogène au niveau de la poche V2, avec la chaîne principale de XIAP-BIR3 entre le Tryptophane 310 et la Glycine 306, pour former un feuillet bêta.

- une interaction hydrophobe au niveau de la poche P3, rendue possible par la présence du Tryptophane 323 et de la Tyrosine 324.

Dans la suite du manuscrit, les poches A1, V2, P3 et I4 seront respectivement nommées P1, P2, P3 et P4.

#### **5-4- Les inhibiteurs de XIAP**

Il a été montré que l'inhibition de XIAP par de petites molécules antagonistes était capable de restaurer l'activité pro-apoptotique des caspases.<sup>77</sup> Wu et *al.* ont de plus montré que le tétrapeptide AVPI constituait la séquence minimale de SMAC pour inhiber XIAP.<sup>73</sup> La structure de ce tétrapeptide a ainsi directement inspiré le design d'inhibiteurs de XIAP.

### **6- Etat des lieux des inhibiteurs de XIAP**

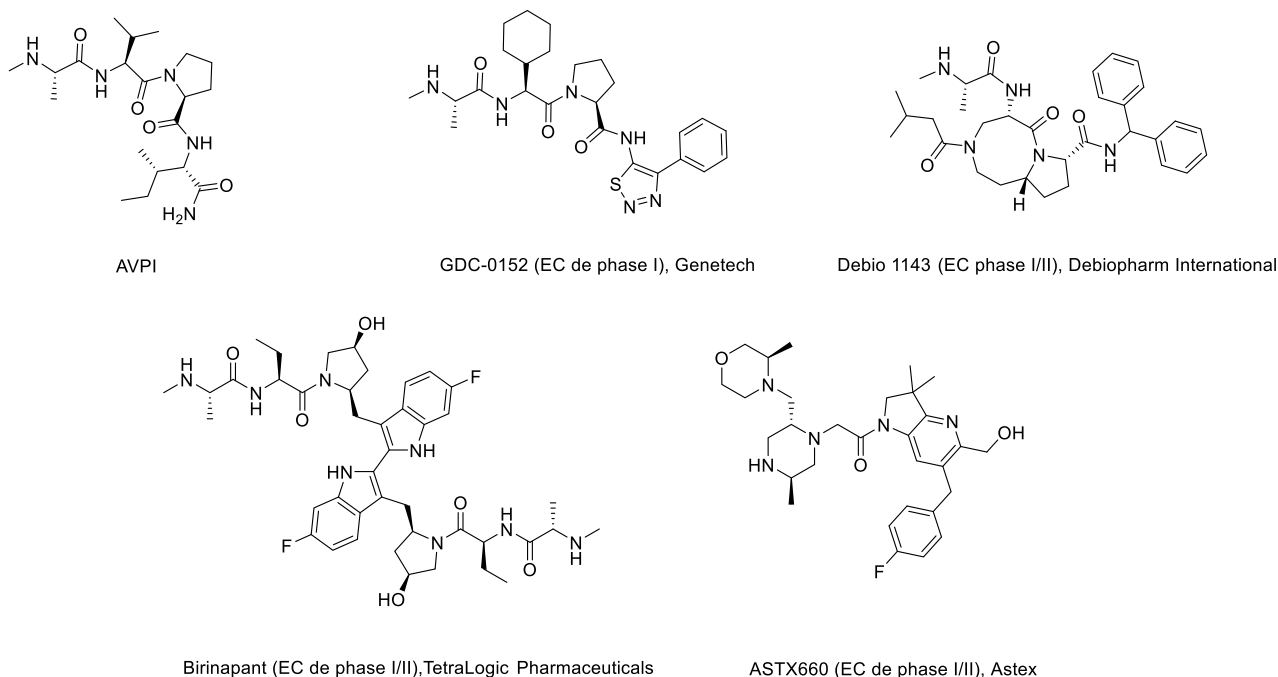
La grande majorité des inhibiteurs de XIAP inhibe également d'autres membres de la famille IAP, on parle alors de « pan inhibitors » en anglais. Ceux-ci peuvent être classés en quatre catégories, en se basant sur leur structure chimique :<sup>78</sup>

- les inhibiteurs de première génération, dont la structure peptidique dérive directement du tétrapeptide AVPI.
- les inhibiteurs de seconde génération, mimes contraints d'AVPI, dont la rigidification a permis une meilleure stabilité métabolique des composés, ainsi qu'une amélioration de la biodisponibilité.
- les inhibiteurs de troisième génération, qui sont des dimères d'inhibiteurs de première ou deuxième génération, dans le but d'inhiber simultanément les domaines BIR2 et BIR3.
- les inhibiteurs de quatrième génération enfin, de structure abiotique.

Un exemple d'une molécule chef de file de chaque génération est présenté dans la figure 38.

<sup>77</sup> Wang, Z.; Cuddy, M.; Samuel, T.; Welsh, K.; Schimmer, A.; Hanai, F.; Houghten, R.; Pinilla, C.; Reed, J. Cellular, Biochemical, and Genetic Analysis of Mechanism of Small Molecule IAP Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 48168-48176.

<sup>78</sup> Cong, H.; Xu, L.; Wu, Y.; Qu, Z.; Bian, T.; Zhang, W.; Xing, C.; Zhuang, C. Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Antagonists in Anticancer Agent Discovery: Current Status and Perspectives. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 5750–5772.



**Figure 38.** Structures chimiques d'AVPI, de GDC-0152 (première génération), du debio 1143 (seconde génération), du birinapant (troisième génération) et d'ASTX660 (quatrième génération).

## 6-1 Inhibiteurs d'IAP en phase d'essais cliniques

Aucun inhibiteur d'IAP ne possède actuellement d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Cependant, au moins huit inhibiteurs d'IAP ont été évalués en phase d'essais cliniques (EC) ou sont en cours d'évaluation (Tableau 2).<sup>78,79</sup>

| Candidat-médicament | Génération       |
|---------------------|------------------|
| GDC-0152            | 1 <sup>ère</sup> |
| GDC-0917            |                  |
| LCL161              |                  |
| Debio 1143          | 2 <sup>ème</sup> |
| AEG40826            | 3 <sup>ème</sup> |
| Birinapant          |                  |
| APG-1387            |                  |
| ASTX660             | 4 <sup>ème</sup> |

**Tableau 2.** Liste des candidat-médicaments et leur génération, ayant été évalués en phase d'essai clinique. En vert, actuellement en essai clinique, en rouge, ensemble des essais cliniques terminés/complétés.

<sup>79</sup> U.S. National Library of Medicine. [Page consultée le 25/07/2019]. Adresse URL [en ligne] : <https://clinicaltrials.gov/ct2.home>.

Parmi ces huit inhibiteurs d'IAP, trois ne sont plus à ce jour en EC :

- GDC-0152, en phase I, dans les cancers solides avancés ou métastasés (NCT00977067). Cet essai a été terminé prématurément en 2009 suite à une étude démontrant une toxicité du composé sur l'animal. Le candidat-médicament était en effet à l'origine d'un syndrome de relargage des cytokines chez le rat et le chien.<sup>80</sup> Cet effet indésirable peut être expliqué par la forte inhibition des cIAP. Bien que le syndrome de relargage n'ait pas été observé au cours de l'essai clinique, ce dernier n'a pas été terminé par mesure de sûreté.
- GDC-0917/CUDC-427 (Genetech/Curis), qui était également en phase I d'essai clinique dans les cancers solides et les lymphomes jusqu'en 2012 (NCT01226277, essai complété). Une patiente est décédée suite à une insuffisance hépatique développée un mois après la fin de l'essai.<sup>81</sup> Ceci peut expliquer pourquoi GDC-0917 n'est pas entré en phase II.
- AEG40826/ HGS1029 (Aegera Therapeutics/Human Genome Sciences), dont l'essai de phase I a été complété en 2011, dans l'indication de lymphomes (NCT01013818). Les résultats de l'étude ont montré que le candidat-médicament était toléré mais aucun EC n'a été reporté depuis.<sup>82</sup>

Cinq autres inhibiteurs d'IAP sont quant à eux actuellement en cours d'évaluation. Certains ont déjà été évalués auparavant dans d'autres essais cliniques :

- LCL161 (Novartis) a complété plusieurs essais de phase II, en association avec d'autres anti-cancéreux comme le paclitaxel (NCT01617668, cancer du sein). Le composé est à ce jour en phase I ou II dans trois essais en oncologie (NCT02649673 dans le cancer du poumon et du sein, NCT03111992 dans le myélome, NCT02890069 dans divers cancers solides).
- le debio 1143 est en phase I/II, en association avec le cisplatine, dans le carcinome de cellules squameuses de la tête et cou (NCT02022098). Il est également en phase I dans divers cancers solides (NCT03871959, NCT03270176). Il est aussi à noter l'essai NCT01930292, complété en 2016, avec pour indication les cancers solides avancés dont celui de l'ovaire. Cet essai a été réalisé en France dans divers centres hospitaliers.

---

<sup>80</sup> Erickson, R.; Tarrant, J.; Cain, G.; Lewin-Koh, S.; Dybdal, N.; Wong, H.; Blackwood, E.; West, K.; Steigerwalt, R.; Mamounas, M.; Flygare, J.; Anemiy, K.; Dambach, D.; Fairbrother, W.; Diaz, D. Toxicity Profile of Small-Molecule IAP Antagonist GDC-0152 Is Linked to TNF- $\alpha$  Pharmacology. *Toxicol. Sci.* **2013**, *131*, 247–258.

<sup>81</sup> Curis. (Page consultée le 07 août 2019). Curis Reports Third Quarter 2013 Financial Results and Provides CUDC-427 Development Update, [en ligne]. Adresse URL : <http://investors.curis.com/Curis-Reports-Third-Quarter-2013-Financial-Results-and-Provides-CUDC-427-Development-Update>.

<sup>82</sup> Sikic, B.; Eckhardt, S.; Gallant, G.; Burris, H.; Camidge, D.; Colevas, A.; Jones, S.; Messersmith, W.; Wakelee, H.; Li, H.; Kaminker, P.; Morris, S.; Infante, J. Safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of HGS1029, an inhibitor of apoptosis protein (IAP) inhibitor, in patients (Pts) with advanced solid tumor: Results of a phase I study. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 3008–3008.

- le birinapant est lui aussi en phase d'essai I/II dans la leucémie myéloïde aiguë (NCT01486784) et en phase I, en chimiothérapie adjuvante de la radiothérapie, dans le carcinome de cellules squameuses de la tête et cou (NCT03803774). Il se trouve également en association avec le pembrolizumab dans un essai de phase I (NCT02587962).
- APG-1387 (Ascentage Pharm) est actuellement en phase I/II dans les différents cancers solides et hématologiques.
- ASTX660 est lui aussi en phase I/II, dans divers cancers solides et lymphomes.

Nous pouvons observer qu'aucun inhibiteur n'a pour l'instant atteint la phase III d'essais cliniques. De plus ces composés ne montrent qu'une efficacité faible à modérée en monothérapie.<sup>78</sup> Il est cependant important de rappeler que la polychimiothérapie est la norme dans la majorité des traitements des cancers. Celle-ci présente en effet des avantages par rapport à la monothérapie : un effet additif voire synergique des substances ainsi qu'une meilleure tolérance, de part un profil de toxicité des médicaments employés différent. Il a par exemple été montré récemment *in vivo* que les inhibiteurs d'IAP présentaient un effet synergique avec les inhibiteurs des checkpoints immunologiques.<sup>83</sup> Les inhibiteurs d'IAP sont donc réévalués en EC, en association avec d'autres anti-cancéreux.

Les molécules peptidomimétiques, mimes d'AVPI, sont des pan-inhibiteurs : ils ciblent en effet l'ensemble des membres de la famille des IAP.<sup>84</sup> Ces mimes inhibent ainsi cIAP1 et 2, qui ont un rôle dans la régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Ils inhibent également XIAP, qui bloque la voie intrinsèque. Les pan-inhibiteurs présentent donc un effet synergique en inhibant les deux voies de l'apoptose.<sup>85</sup> La déplétion en IAP peut cependant conduire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, aboutissant à la production de TNF $\alpha$ .<sup>86</sup> Son augmentation de la concentration plasmatique, ainsi que celle d'autres cytokines pro-inflammatoires est à

---

<sup>83</sup> Beug, S.; Beauregard, C.; Healy, C.; Sanda, T.; St-Jean, M.; Chabot, J.; Walker, E.; Mohan, A.; Earl, N.; Lun, X.; Senger, D.; Robbins, S.; Staeheli, P.; Forsyth, P.; Alain, T.; LaCasse, E.; Korneluk, R. Smac mimetics synergize with immune checkpoint inhibitors to promote tumour immunity against glioblastoma. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14728-14742.

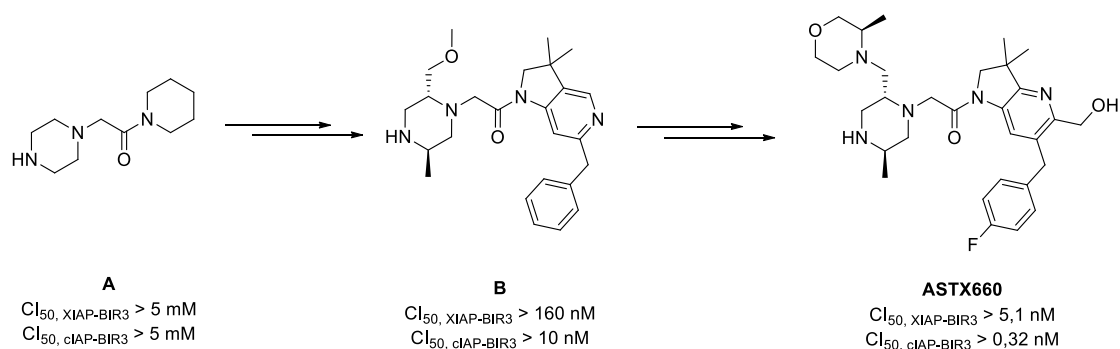
<sup>84</sup> Cossu, F.; Milani, M.; Mastrangelo, E.; Lecis, D. Targeting the BIR Domains of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins in Cancer Treatment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 142–150.

<sup>85</sup> Derakhshan, A.; Chen, Z.; Waes, C. Therapeutic small-molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clin. Cancer. Res.* **2017**, *23*, 1379-1387.

<sup>86</sup> Vince, J.; Wong, W.; Khan, N.; Feltham, R.; Chau, D.; Ahmed, A.; Benetatos, C.; Chunduru, S.; Condon, S.; McKinlay, M.; Brink, R.; Leverkus, M.; Tergaonkar, V.; Schneider, P.; Callus, B.; Koentgen, F.; Vaux, D.; Silke, J. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell*. **2007**, *131*, 682-693.

l'origine d'un grave effet indésirable : le syndrome de relargage des cytokines.<sup>87</sup> Ainsi dans l'essai de phase I NCT00993239 évaluant le birinapant, un tel effet indésirable a été suspecté.<sup>88</sup>

Sur les huit inhibiteurs d'IAP évalués, seul le composé ASTX660 présente une structure abiotique (Figure 39). Il n'est en effet pas un mime d'AVPI, mais a été obtenu en employant une stratégie de *drug design* basée sur une approche par fragment (fragment-based drug discovery, FBDD). Un hit **A** a premièrement été identifié, par polarisation de fluorescence (FPA) et résonance magnétique nucléaire (RMN), pour présenter une affinité avec les domaines BIR3 de XIAP et cIAP1 (IAP cytosolique 1). Une optimisation de ce fragment a été réalisée, assistée par des données de cristallographie et de modélisation moléculaire, permettant d'obtenir le lead **B**. D'autres modulations ont enfin permis de donner le composé ASTX660 (Figure 39).<sup>89,90</sup>



**Figure 39.** Optimisations du hit A ayant permis l'obtention du lead B puis du candidat-médicament ASTX660.

<sup>87</sup> Chesi, M.; Mirza, N.; Garbitt, V.; Sharik, M.; Dueck, A.; Asmann, Y.; Akhmetzyanova, I.; Kosiorek, H.; Calcinotto, A.; Riggs, D.; Keane, N.; Ahmann, G.; Morrison, K.; Fonseca, R.; Lacy, M.; Dingli, D.; Kumar, S.; Ailawadhi, S.; Dispenzieri, A.; Buadi, F.; Gertz, M.; Reeder, C.; Lin, Y.; Chanan-Khan, A.; Stewart, A.; Fooksman, D.; Bergsagel, P. IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1411-1420.

<sup>88</sup> Amaravadi, R.; Schilder, R.; Martin, L.; Levin, M.; Graham, M.; Weng, D.; Adjei, A. A Phase I Study of the SMAC-Mimetic Birinapant in Adults with Refractory Solid Tumors or Lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 2569-2575

<sup>89</sup> Chessari, G.; Buck, I.; Day, J.; Day, P.; Iqbal, A.; Johnson, C.; Lewis, E.; Martins, V.; Miller, D.; Reader, M.; Rees, C.; Rich, S.; Tamanini, E.; Vitorino, M.; Ward, G.; Williams, P.; Williams, G.; Wilsher, N.; Woolford, A. Fragment-Based Drug Discovery Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins: Discovery of a Non-Alanine Lead Series with Dual Activity Against cIAP1 and XIAP. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6574-6588.

<sup>90</sup> Tamanini, E.; Buck, I. M.; Chessari, G.; Chiarparin, E.; Day, J.; Frederickson, M.; Griffiths-Jones, C. M.; Hearn, K.; Heightman, T.; Iqbal, A.; Johnson, C.; Lewis, E.; Martins, V.; Peakman, T.; Reader, M.; Rich, S.; Ward, G.; Williams, P.; Wilsher, N. Discovery of a Potent Nonpeptidomimetic, Small-Molecule Antagonist of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (cIAP1) and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4611-4625.

Les molécules abiotiques comme ASTX660 possèdent des avantages par rapport aux molécules peptidomimétiques :

- Leur synthèse nécessite moins d'étapes, ce qui s'inscrit dans l'un des principes de la chimie verte. 5 étapes sont par exemple nécessaires pour synthétiser ASTX660 contre 13 pour le debio 1143.<sup>89,91,92</sup>
- Elles présentent une meilleure biodisponibilité, ce qui autorise leur administration par voie orale contrairement aux dimères peptidomimétiques dont le poids moléculaire est trop élevé pour une absorption intestinale.
- Elles sont de plus résistantes aux peptidases.

## **6-2 Inhibiteurs abiotiques de XIAP en développement**

Développer des inhibiteurs abiotiques spécifiques de XIAP apporterait des avantages par rapport aux molécules peptidomimétiques citées plus haut :

- de par leur structure abiotique, une synthèse plus rapide et un meilleur profil pharmacocinétique des molécules.
- en ciblant XIAP, moins d'effets indésirables sont attendus, notamment la déplétion en IAP pouvant entraîner le syndrome de relargage des cytokines.

### **6-2-1- Inhibiteurs de XIAP-BIR3**

Les molécules ciblant XIAP-BIR3 possèdent également une affinité pour les domaines BIR3 d'autres cIAP (1 et 2). Ceci s'explique par la forte homologie structurale entre les domaines BIR3 de XIAP et des cIAP.<sup>64</sup> A notre connaissance, aucune molécule sélective de XIAP-BIR3 n'a été développée.

---

<sup>91</sup> Cai, Q.; Sun, H.; Peng, Y.; Lu, J.; Nikolovska-Coleska, Z.; McEachern, D.; Liu, L.; Qiu, S.; Yang, C.; Miller, R.; Yi, H.; Zhang, T.; Sun, D.; Kang, S.; Guo, M.; Leopold, L.; Yang, D.; Wang, S. A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2714–2726.

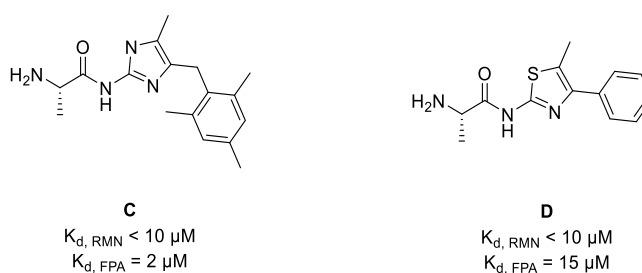
<sup>92</sup> Peng, Y.; Sun, H.; Wang, S. Design and synthesis of a 1,5-diazabicyclo[6,3,0] dodecane amino acid derivative as a novel dipeptide reverse-turn mimetic. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4769–4770.

Les premiers inhibiteurs abiotiques de XIAP-BIR3 ont été décrits par Park *et al.* en 2005.<sup>93</sup> Les auteurs se sont basés sur des données de RSA d'analogues d'AVPI dans le domaine XIAP-BIR3.<sup>94</sup>

Deux éléments ont retenu leur attention :

- la fonction positivement ionisable de l'alanine terminale d'AVPI.
- la valine, interagissant grâce à sa fonction amide *via* deux liaisons hydrogène avec la chaîne principale de XIAP.

Les auteurs se sont donc basés sur ces éléments pour créer une librairie de molécules en reliant l'alanine à des fragments susceptibles de former des liaisons hydrogène avec la protéine. Les composés ont ensuite été évalués, en mesurant leur affinité par RMN. Les résultats positifs ont été confirmés par FPA (polarisation de fluorescence). Les molécules **C** et **D** ont présenté les meilleurs résultats, avec un  $K_d$  (constante de dissociation) par FPA de respectivement 2 et 15  $\mu\text{M}$  (Figure 40).



**Figure 40.** Structure des molécules **C** et **D**, et leur affinité pour le domaine XIAP-BIR3.

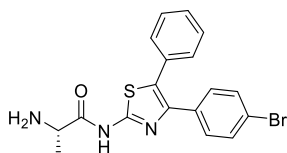
La fonction positivement ionisable est toujours présente avec l'alanine. Le cycle azoté imidazole ou thiazole mimerait quant à lui la fonction amide de la valine.<sup>95</sup>

La proline du térapeptide AVPI occupe une poche hydrophobe. Les auteurs ont donc par la suite pharmacomodulé la molécule **D** en substituant le cycle thiazole avec des chaînes alkyles ou des cycles insaturés benzène ou naphthalène. La meilleure affinité a été trouvée pour la molécule **E**, présentant un  $K_d$  de 0,74  $\mu\text{M}$  (Figure 41).

<sup>93</sup> Park, C.; Sun, C.; Olejniczak, E.; Wilson, A.; Meadows, R.; Betz, S.; Elmore, S.; Fesik, S. Non-peptidic small molecule inhibitors of XIAP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 771-775.

<sup>94</sup> Oost, T.; Sun, C.; Armstrong, R.; Al-Assaad, A.; Betz, S.; Deckwerth, T.; Ding, H.; Elmore, S.; Meadows, R.; Olejniczak, E.; Oleksijew, A.; Oltersdorf, T.; Rosenberg, S.; Shoemaker, A.; Tomaselli, K.; Hua, Z.; Fesik, S. Discovery of Potent Antagonists of the Antiapoptotic Protein XIAP for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4417-4426.

<sup>95</sup> Fincham, C.; Higginbottom, M.; Hill, D.; Horwell, D.; O'Toole, J.; Ratcliffe, G.; Rees, D.; Roberts, E. Amide Bond Replacements Incorporated into CCK-B Selective "Dipeptoids." *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1472-1484.



**E**  
 $K_d, \text{RMN} < 10 \mu\text{M}$   
 $K_d, \text{FPA} = 0,74 \mu\text{M}$

**Figure 41.** Structure chimique de **E** et son affinité pour le domaine XIAP-BIR3.

Des données de RMN-2D ont permis vérifier le positionnement de **E** dans XIAP-BIR3 afin de valider les hypothèses de liaison de la molécule à la protéine :

- la fonction amine terminale, protonée à pH physiologique, peut interagir avec l'acide glutamique 314.
- le cycle thiazole est susceptible d'interagir avec le groupement carbonyle de la thréonine 308.
- les cycles aromatiques semblent bien occuper la poche hydrophobe de XIAP-BIR3.

Le docking de **E** dans XIAP-BIR3 en se basant sur les données de RMN-2D est représenté dans la figure 42.

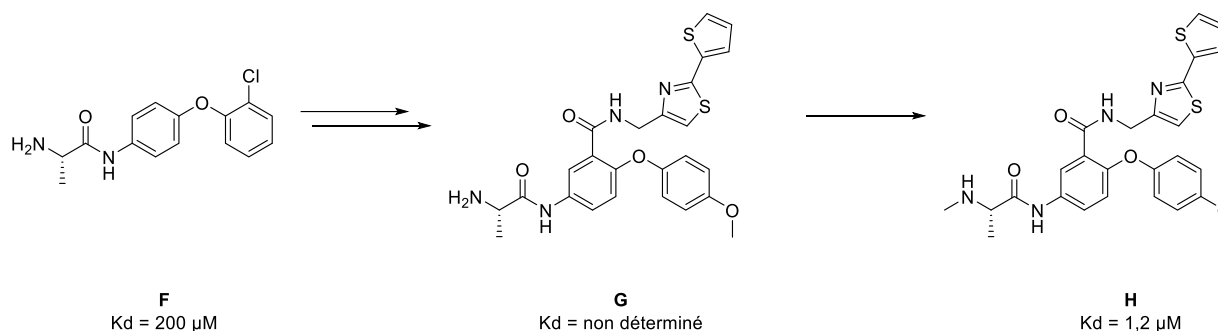


**Figure 42.** Docking de **E** dans XIAP-BIR3 en se basant sur des données de RMN-2D, d'après Park *et al.*<sup>93</sup>

Huang *et al.* ont également développés un inhibiteur abiotique de XIAP-BIR3.<sup>96</sup> Toujours en se basant sur la fonction positivement ionisable cruciale de l'alanine, les auteurs ont procédé au criblage virtuel par docking de centaines de molécules, en couplant la fonction acide carboxylique de l'alanine avec des amines commerciales de bas poids moléculaire. 15

<sup>96</sup> Huang, J.; Zhang, Z.; Wu, B.; Celliti, J.; Zhang, X.; Dahl, R.; Shiao, C.; Welsh, K.; Emdadi, A.; Stebbins, J.; Reed, J.; Pellecchia, M. Fragment-Based Design of Small Molecule X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7111-7118.

composés ont par la suite été sélectionnés, synthétisés et criblés par RMN. La molécule **F** est ressortie du test de criblage avec la meilleure affinité ( $K_d$  d'environ 200  $\mu\text{M}$ ). Le criblage virtuel d'une seconde génération de molécules, dérivées de **F**, puis leur synthèse et mesure de l'affinité a permis d'identifier le composé **G**. La méthylation de la fonction amine terminale, dans le but d'augmenter la pharmacopotentialité de la molécule, a finalement permis d'obtenir la molécule **H**, possédant un  $K_d$  de 1,2  $\mu\text{M}$  (Figure 43). Cette dernière possède une activité pro-apoptotique sur une lignée de cellules de cancer du sein, avec une  $\text{CI}_{50}$  de 16,4  $\mu\text{M}$  (mesure de la viabilité cellulaire).



**Figure 43.** Structure des molécules **F** à **H** et leur affinité pour le domaine XIAP-BIR3.

Il est aussi important de citer la molécule ASTX600, évoqué dans le paragraphe 6-1 et actuellement en phase d'essais cliniques. Contrairement aux autres molécules citées, ASTX660 ne possède pas de motif alanine.

### 6-2-2- Inhibiteurs de XIAP-BIR2

Des dérivés de benzoxazépinones et benzodiazépinones possèdent des profils intéressants : certains de ces composés se présentent en effet comme des antagonistes sélectifs du domaine XIAP-BIR2.<sup>97,98</sup> Cette caractéristique n'est décrite nulle part ailleurs dans la littérature.

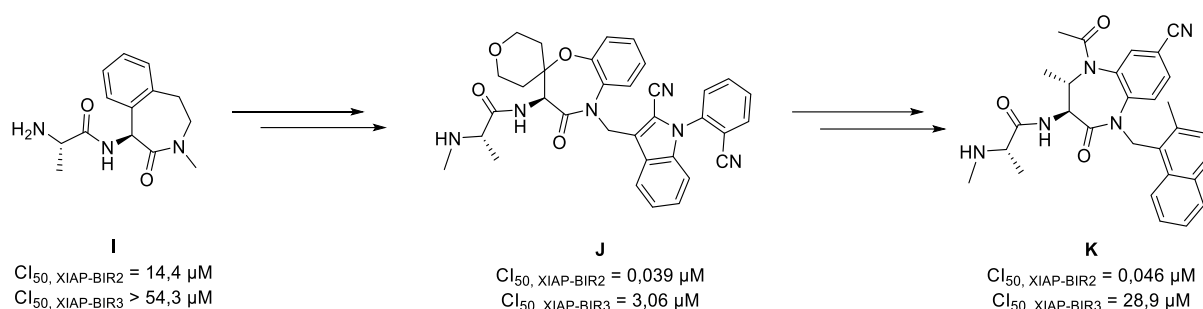
Un criblage à haut débit à tout d'abord permis d'identifier un hit comportant un squelette benzazépinone : le composé **I**. Ce dernier a été pharmacomodulé, en s'appuyant sur des données de RSA (relation structure-activité, ou plus précisément relation structure-affinité

<sup>97</sup> Donnell, A.; Michoud, C.; Rupert, K.; Han, X.; Aguilar, D.; Frank, K.; Fretland, A.; Gao, L.; Goggin, B.; Hogg, J.; Hong, K.; Janson, C.; Kester, R.; Kong, N.; Le, K.; Li, S.; Liang, W.; Lombardo, L.; Lou, Y.; Lukacs, C.; Mischke, S.; Moliterni, J.; Polonskaia, A.; Schutt, A.; Solis, D.; Specian, A.; Taylor, R.; Weisel, M.; Remiszewski, S. Benzazepinones and Benzoxazepinones as Antagonists of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) Selective for the Second Baculovirus IAP Repeat (BIR2) Domain. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7772-7787.

<sup>98</sup> Kester, B.; Donnell, A.; Lou, Y.; Remiszewski, S.; Lombardo, L.; Chen, S.; Le, N.; Lo, J.; Moliterni, J.; Han, X.; Hogg, J.; Liang, W.; Michoud, C.; Rupert, K.; Mischke, S.; Le, K.; Weisel, M.; Janson, C.; Lukacs, C.; Fretland, A.; Hong, K.; Polonskaia, A.; Gao, L.; Li, S.; Solis, D.; Aguilar, D.; Tardell, C.; Dvorozniak, M.; Tannu, S.; Lee, E.; Schutt, A.; Goggin, B. Optimization of Benzodiazepinones as Selective Inhibitors of the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Second Baculovirus IAP Repeat (BIR2) Domain. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7788-7803.

dans ce cas-ci) et de cristallographie. La molécule **J** (possédant un motif benzoxazépinone) a ainsi pu être obtenue, présentant une affinité pour XIAP-BIR2 78 fois supérieure par rapport à XIAP-BIR3 ( $Cl_{50, \text{XIAP-BIR2}} = 39 \text{ nM}$  contre  $Cl_{50, \text{XIAP-BIR3}} = 3,06 \mu\text{M}$ ,  $Cl$  = concentration inhibitrice) (Figure 44). Cependant cette molécule possédait des propriétés limitant son utilisation en clinique : le composé **J** est à la fois un inhibiteur et un inducteur du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). Cette molécule est de plus un inhibiteur du CYP3A4 temps-dépendant, ce qui signifie que l'inhibition du système protéique augmente à mesure du temps écoulé en contact avec **J**. Si un médicament possédait de telles propriétés, il ne serait pas possible de prédire la concentration plasmatique du principe actif d'une part, mais aussi celle des médicaments utilisés en association, qui seraient métabolisés par le CYP3A4.

D'autres optimisations ont donc été conduites, pour conserver une sélectivité vis-à-vis de XIAP-BIR2, tout en s'affranchissant des inconvénients cités précédemment. En s'appuyant encore une fois sur une approche basée sur des données de RSA et cristallographie, les auteurs ont finalement pu obtenir la molécule **K** comportant un noyau benzodiazépinone. Ce composé est près de 700 fois plus afin pour XIAP-BIR2 que pour XIAP-BIR3 ( $Cl_{50, \text{XIAP-BIR2}} = 45 \text{ nM}$  contre  $Cl_{50, \text{XIAP-BIR3}} = 30,8 \mu\text{M}$ ) (Figure 44). Le profil d'inhibiteur du CYP3A4 et d'inhibiteur temps-dépendant est de plus diminué. Enfin, **K** n'est plus un inducteur enzymatique du cytochrome.



**Figure 44.** Optimisations du hit **I** ayant conduit aux composés **J** puis **K**.

La molécule **K** a été testée *in vitro* sur des lignées de cellules du cancer du côlon. Si le composé ne possède pas d'activité seul, celui-ci sensibilise les cellules au conatumumab, un anticorps capable d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose.<sup>98</sup> La molécule **K** (sous la dénomination de RO-BIR2) a plus récemment montré une synergie d'action, en association avec notamment la cytarabine, sur des lignées cellulaires de leucémie myéloïde aiguë.<sup>99</sup>

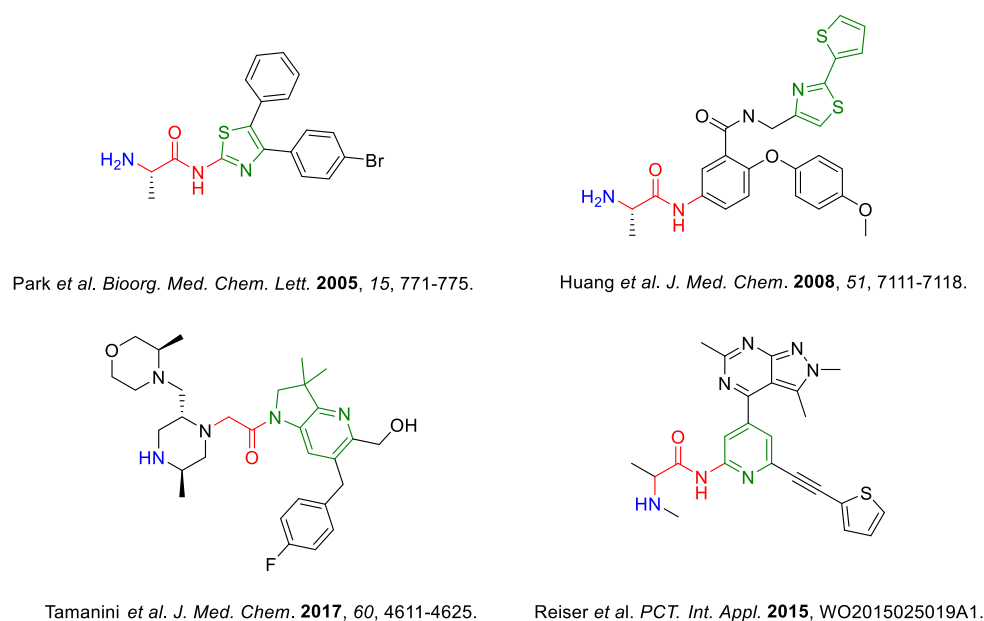
<sup>99</sup> Zhou, J.; Lu, X.; Tan, T.; Chng, W. X-linked inhibitor of apoptosis inhibition sensitizes acute myeloid leukemia cell response to TRAIL and chemotherapy through potentiated induction of proapoptotic machinery. *Mol. Oncol.* **2018**, *12*, 33-47.

Cibler XIAP-BIR2 semblent donc une approche intéressante pour concevoir des molécules sélectives de ce domaine et donc par extension de la protéine XIAP.

## 7- Démarche mise en œuvre pour la conception de nouveaux inhibiteurs de XIAP au laboratoire

Nous nous sommes inspirés des démarches ayant permises l'obtention des molécules **E**, **H** et ASTX660 pour développer de nouveaux inhibiteurs abiotiques de XIAP-BIR3.

Une analyse des ligands abiotiques de XIAP-BIR3 issus de la littérature<sup>93,96,100</sup> a montré que la plupart des composés décrits comportaient un motif « amine-linker-hétérocycle aromatique » (Figure 45).

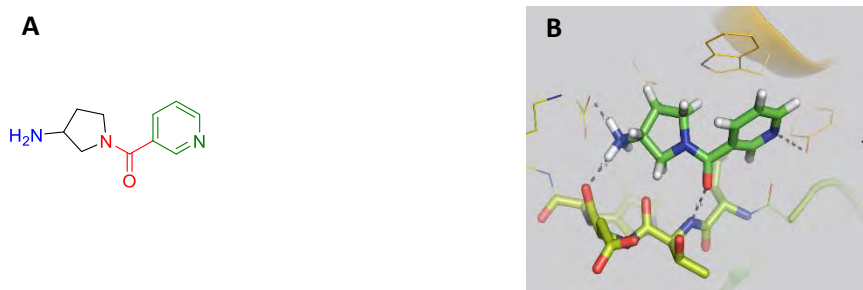


**Figure 45.** Exemple d'inhibiteurs de XIAP-BIR3 de structure abiotique décrits dans la littérature, présentant le motif « amine-linker-hétérocycle aromatique ».

Dans une démarche rationnelle de *drug design*, ces données, couplées à des travaux de modélisation moléculaire effectués au laboratoire par le Pr. Jana Sopková- De Oliveira Santos à partir de structures cristallographiques disponibles dans la PDB (Protein Data Bank) (co-cristaux ligands-protéine), ont permis d'établir les premiers squelettes à synthétiser (Figure 46A). Ces motifs permettraient d'établir des liaisons hydrogène avec des acides aminés de la XIAP. Ainsi, comme illustré par exemple dans la figure 45B, l'acide aspartique 309 de la

<sup>100</sup> Reiser, U.; Madden, J. New 6-alkynyl pyridine. *PCT. Int. Appl.* **2015**, WO2015025019A1.

protéine XIAP, est capable d'engager une liaison hydrogène avec une fonction amine située sur le ligand. Le groupement carbonyle de la fonction amide et l'atome d'azote du cycle pyridine sont également impliqués dans des interactions de type liaison hydrogène avec XIAP-BIR3.



**Figure 46. (A)** Structure d'un des composés issus des travaux de modélisation moléculaire. **(B)** Docking de ce composé dans domaine XIAP-BIR3.

A la suite des travaux de modélisation moléculaire, une librairie de 15 squelettes a été conçue (Tableau 3) pour répondre à ces prérequis.

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**Tableau 3.** Squelettes établis par analyse de ligands et modélisation moléculaire, susceptibles d'interagir avec XIAP-BIR3.

Par la suite vont être présentés l'ensemble des travaux effectués lors de mes deux stages d'application de 5<sup>ème</sup> année de Pharmacie et de Master 2, pour une durée totale de 11 mois.

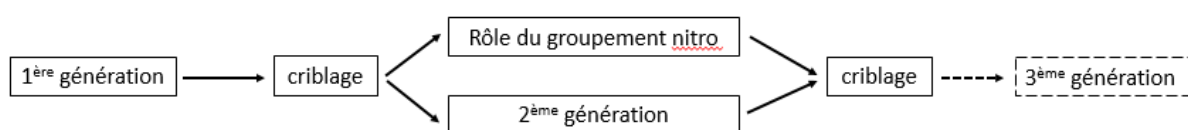
Une molécule de référence a tout d'abord été synthétisée. Celle-ci, décrite comme présentant une affinité pour le domaine XIAP-BIR3, devait servir comme son nom l'indique de référence

dans notre test de criblage. A partir de la librairie montrée dans le Tableau 3, les molécules de première génération ont par la suite été synthétisées.

Ces composés ont ensuite été criblés par FPA. Suite aux résultats obtenus, des pharmacomodulations ont été effectuées pour obtenir des molécules plus affines pour XIAP.

Les molécules obtenues ont ensuite fait l'objet d'une deuxième campagne de criblage.

J'ai été en charge de la synthèse de l'ensemble des molécules présentées. Les tests de criblage ont quant à eux été effectués par le Dr. Marie Jouanne et Martin Giret, dans le cadre de ses stages de Master 1 et Master 2.



**Figure 47.** Résumé des différentes étapes du travail effectué.

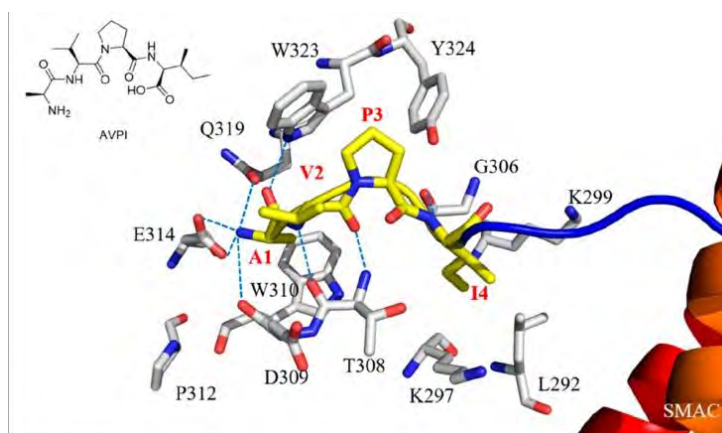


# Travaux personnels

## 1- Synthèse des molécules de première génération

En se basant sur le motif "amine-linker-hétérocycle aromatique", nous cherchons à établir les interactions suivantes entre nos molécules et les poches du domaine XIAP-BIR3 (Figure 48) :

- au niveau de la poche P1, établir une liaison ionique et/ou des liaisons hydrogène entre la fonction amine de nos composés et l'acide glutamique 314 et l'acide aspartique 309.
- concernant la poche P2, la fonction amide des squelettes doit interagir avec les fonctions amides d'acides aminés de la chaîne principale de XIAP-BIR3, *via* des liaisons hydrogènes ; ceci dans le but de former un feuillet  $\beta$ .



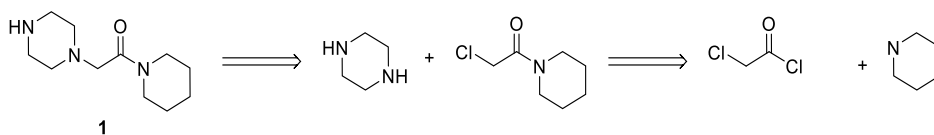
**Figure 48.** Complexe SMAC et XIAP-BIR3 (code PDB : 1G73) et visualisation des poches P1 (A1), P2 (V2), P3 (P3) et P4 (I4), d'après Cong *et al.*<sup>76</sup>

### 1-1- Synthèse de la molécule de référence

Dans un premier temps il m'a été demandé de synthétiser la 2-(pipérazin-1-yl)-1-(pipéridin-1-yl)éthanone **1**. En effet, ce composé ayant déjà été décrit et évalué par Chessari *et al.* pour son activité antagoniste de XIAP-BIR3, les données d'affinité mesurée par FPA sont disponibles.<sup>89</sup> Le composé servira donc de molécule de référence pour les tests effectués au laboratoire.

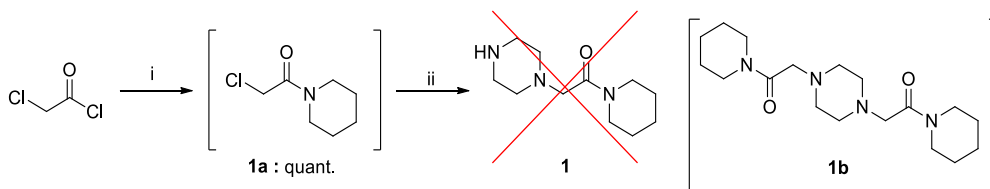
L'analyse rétrosynthétique effectuée permet d'obtenir le composé désiré en deux étapes. La première étape consiste en l'addition-élimination de la pipéridine sur la fonction chlorure

d'acide du chlorure de chloroacétyle, suivie d'une réaction de Substitution Nucléophile d'ordre 2 ( $S_N2$ ) (Schéma 1).



**Schéma 1.** Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention de la 2-(pipérazin-1-yl)-1-(pipéridin-1-yl)éthanone **1**.

L'addition-élimination de la pipéridine sur le chlorure de chloroacétyle a conduit à l'obtention du composé **1a** en appliquant un protocole décrit par Durgapal *et al.*<sup>101</sup> Ce composé a ensuite été engagé directement sans être isolé dans une réaction de  $S_N2$  en présence d'1,1 équivalents de pipérazine. Cette réaction n'a pas permis d'obtention du composé **1** attendu mais du produit di-substitué **1b** (Schéma 2), non isolé mais observé par RMN.

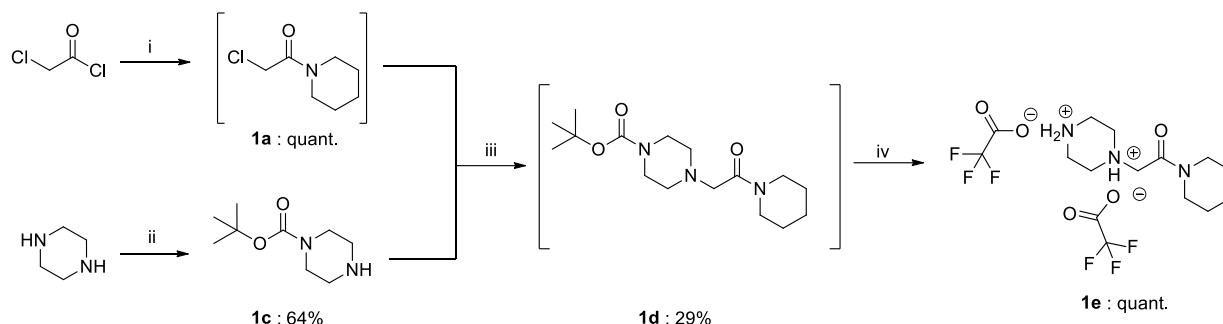


**Schéma 2.** Synthèse du 2-(pipérazin-1-yl)-1-(pipéridin-1-yl)éthanone **1**. Réactifs et conditions : (i) pipéridine 1,0 éq., triéthylamine 1,0 éq., DCM, 0 °C -> 22 °C, 30 min -> 16 h ; (ii) pipérazine 1,0 éq.,  $K_2CO_3$  1,5 éq., DMF, 60 °C, 96 h.

Devant ce résultat, il a été choisi de protéger l'une des fonctions amine de la pipérazine avec un groupement protecteur Boc (*tert*-butoxycarbonyle). Ceci a été réalisé à l'aide de dicarbonate de di-*tert*-butyle ( $Boc_2O$ ). Le composé **1c** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 47%, selon le protocole décrit par Sengmain *et al.*<sup>102</sup> Ce composé a ensuite été engagé dans une réaction de  $S_N2$  en présence de **1a**, ce qui permet d'obtenir la molécule **1d** avec un rendement de 29%. La déprotection de la fonction amine est ensuite effectuée grâce à l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le DCM (dichlorométhane), permettant d'obtenir le composé désiré **1e** sous forme de sel de TFA avec un rendement quantitatif (Schéma 3).

<sup>101</sup> Durgapal, S.; Soni, R.; Umar, S.; Suresh, B.; Soman, S. Anticancer Activity and DNA Binding Studies of Novel 3,7-Disubstituted Benzopyrones. *ChemistrySelect*. **2017**, 2, 147-153.

<sup>102</sup> Sengmany, S.; Le Gall, E.; Le Jean, C.; Troupel, M.; Nédélec, J. Straightforward three-component synthesis of diarylmethylpiperazines and 1,2-diarylethylpiperazines. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 3672-3681.



**Schéma 3.** Synthèse du ditrifluoroacétate de 1-(2-oxo-2-(pipéridin-1-yl)éthyl)pipérazine-1,4-diium **1e**. Réactifs et conditions : (i) pipéridine 1,0 éq., triéthylamine 1,0 éq., DCM, 0 °C -> 22 °C, 30 min -> 12 h ; (ii) Boc<sub>2</sub>O 0,5 éq., DCM, 0 °C -> 22°C, 15 min -> 1 h ; (iii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,5 éq., DMF, 60 °C, 96 h ; (iv) TFA 10.0 éq., DCM, 22 °C, 30 min.

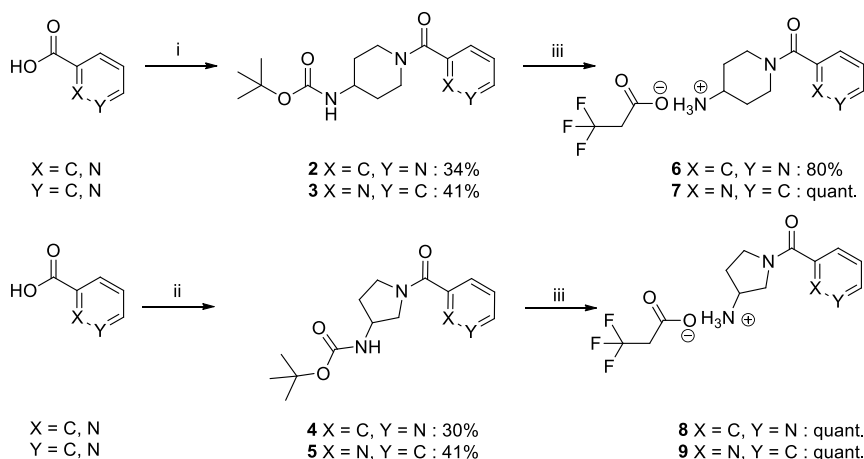
## 1-2- Synthèse des molécules présentant une fonction amine primaire

### 1-2-1- Synthèse des molécules possédant une fonction amine portée par un cycle pipéridine

Dans le cadre d'un stage d'initiation à la recherche effectué par Alice Wang, il a été déterminé les conditions adéquates pour procéder à la réaction d'amidification permettant d'obtenir les molécules **2** à **5**. La réaction fait intervenir un agent utilisé classiquement en synthèse peptidique pour l'obtention de liaisons amides : l'HATU (hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yloxy)méthaniminium). La DIPEA (*N,N*-diisopropyléthylamine) est également utilisée pour rendre la fonction amine plus nucléophile.<sup>103</sup> Ainsi les composés **2** à **5** ont pu être obtenus en faisant réagir le dérivé d'acide carboxylique considéré (acide nicotinique ou picolinique) avec le composé aminé adapté (4-(*N*-Boc-amino)piperidine ou 3-(*N*-Boc-amino)pyrrolidine) en présence d'HATU et de DIPEA, avec des rendements compris entre 30% et 41%.

L'étape de déprotection est ensuite réalisée à l'aide d'acide trifluoroacétique dans le DCM, permettant d'obtenir les molécules **6** à **9** sous forme de sels de TFA, avec des rendements compris entre 80% et 100% (Schéma 4).

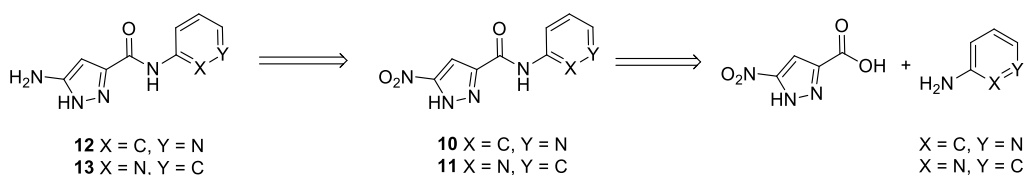
<sup>103</sup> Raeppel, S.; Raeppel, F.; Claridge, S.; Zhan, L.; Gaudette, F.; Mannion, M.; Sato, N.; Yuki, Y.; Kishida, M.; Vaisburg, A. Inhibitors of protein tyrosine kinase activity. *PCT. Int. Appl.* **2011**, WO2011127567A1.



**Schéma 4.** Synthèse des composés **2** à **9** possédant un cycle saturé. Réactifs et conditions : (i) 4-(*N*-Boc-amino)piperidine 2,0 éq., HATU 2,5 éq., DIPEA 4,0 éq., DMF, 22 °C, 16 h ; (ii) 3-(*N*-Boc-amino)pyrrolidine 2,0 éq., HATU 2,0 éq., DIPEA 4,0 éq., DMF, 22 °C, 16 h ; (iii) acide trifluoroacétique 10,0 éq., DCM, 22 °C, 30 min.

### 1-2-2- Synthèse des molécules possédant une fonction amine portée par un cycle pyrazole

Pour obtenir les molécules **12** et **13**, nous avons envisagé la voie rétrosynthétique suivante (Schéma 5) :



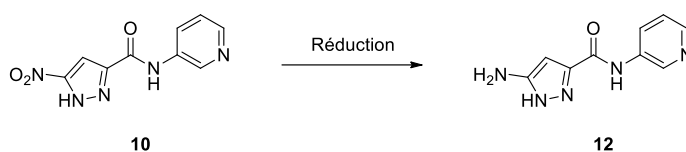
**Schéma 5.** Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention des composés **12** et **13**.

La première étape consiste à coupler l'aminopyridine considérée avec l'acide 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylique commercial. La deuxième étape consiste ensuite à réduire le groupement nitro de ces deux composés pour obtenir respectivement **12** et **13**.

Le composé **10** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 42%, en faisant réagir l'acide 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylique et la 3-aminopyridine en présence d'HOBt (hydroxybenzotriazole) et d'EDC-HCl (chlorure de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide), selon un protocole décrit par Wyatt *et al.*<sup>104</sup> Diverses conditions de réduction ont ensuite été testées pour conduire au composé **12**.

<sup>104</sup> Wyatt, P.; Woodhead, A.; Berdini, V.; Boulstridge, J.; Carr, M.; Cross, D.; Davis, D.; Devine, L.; Early, T.; Feltell, R.; Lewis, E.; McMennamin, R.; Navarro, E.; O'Brien, M.; O'Reilly, M.; Reule, M.; Saxty, G.; Seavers, L.; Smith, D.; Squires, M.; Trewartha, G.; Walker, M.; Woolford, A. Identification of *N*-(4-Piperidiny)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a Novel Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Using Fragment-Based X-Ray Crystallography and Structure Based Drug Design. *J. Med. Chem.* 2008, *56*, 4986-4999.

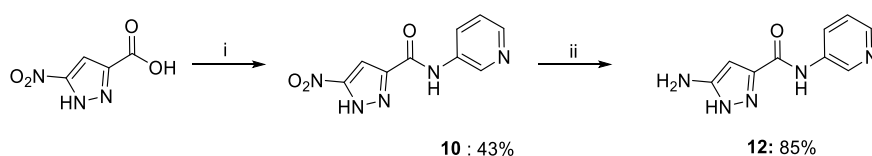
**Tableau 4.** Étude de la réduction de **10** en **12**.



| Entrée | Température (°C) | Agent réducteur       | Solvant    | Temps (h) |
|--------|------------------|-----------------------|------------|-----------|
| 1      | 50               | SnCl <sub>2</sub>     | AcOEt      | 2         |
| 2      | Reflux           | Poudre de fer         | AcOH       | 2         |
| 3      | 25 °C            | H <sub>2</sub> , Pd/C | AcOEt/EtOH | 16        |

La réaction de réduction en présence de chlorure d'étain (tableau 4, entrée 1) a été réalisée et suivie par CCM (Chromatographie sur Couche Mince). Au bout de 2 h, il n'y avait pas plus de produit de départ visible. Cependant, il n'a pas été possible d'isoler le composé **12** sans impuretés minérales. Le même problème a été rencontré avec l'utilisation de poudre de fer (tableau 4, entrée 2).

Il a donc été choisi une méthode de réduction plus propre. La réduction du groupement nitro, réalisée par une réaction d'hydrogénation catalytique (tableau 4, entrée 3), à l'aide de palladium sur charbon activé, a ainsi conduit au composé **12** avec un rendement de 85% (Schéma 6).

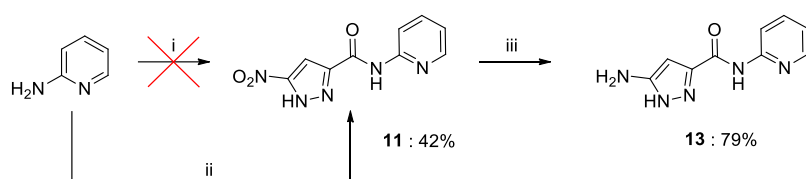


**Schéma 6.** Synthèse des composés **11** et **13**. Réactifs et conditions : (i) 3-Aminopyridine 1,6 éq., EDC-HCl 1,6 éq., HOBt 1,6 éq., Et<sub>3</sub>N 3,0 éq., DMF, 22 °C, 48 h ; (ii) 10% Pd/C 0,10 éq., 1:1 AcOEt/EtOH, H<sub>2</sub>, 22 °C, 16 h.

Le composé **13**, avec les mêmes conditions que pour **10**, a pu être obtenu avec un taux de conversion de seulement 15%. Une optimisation a donc été réalisée, en faisant intervenir l'HATU au lieu du couple HOBt/EDC-HCl, et en remplaçant le DCM par la pyridine. La réaction a de plus nécessité un chauffage à 60 °C.<sup>105</sup> L'application de ces conditions a permis d'obtenir

<sup>105</sup> Miwatashi, S.; Kaieda, A.; Takahashi, M. Preparation of fused imidazole compounds as mitogen activating protein kinase (MAPK) inhibitors and/or and TNF-α production inhibitors. *PCT. Int. Appl.* **2008**, WO2008133192.

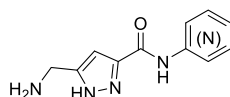
le produit **11** avec un rendement de 35%. Le groupement nitro de ce composé a ensuite été réduit comme précédemment, pour conduire à **13** avec un rendement de 79% (Schéma 7).



**Schéma 7.** Synthèse des composés **11** et **13**. Réactifs et conditions : (i) acide 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylique 0,9 éq., EDC-HCl 1,1 éq., HOBt 1,1 éq., DMF, 25 °C, 16 h ; (ii) acide 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylique 0,5 éq., HATU 1,2 éq., DIPEA 2,0 éq., pyridine, 60 °C, 96 h ; (iii) 10% Pd/C 0,10 éq., 1:1 AcOEt/EtOH, H<sub>2</sub>, 22 °C, 16 h.

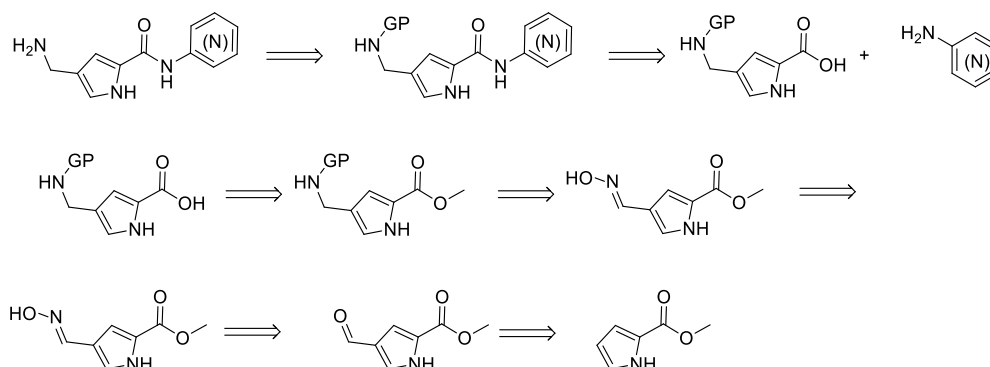
### 1-2-3- Ajout d'une unité de carbone supplémentaire entre la fonction amine et le cycle pyrazole

Il a par la suite été envisagé d'ajouter une unité de carbone entre la fonction amine terminale et le noyau pyrazole (Figure 49). Cette flexibilité pourrait apporter une meilleure interaction entre la fonction amine et l'acide glutamique 314 de la poche P1 de XIAP-BIR3.



**Figure 49.** Molécules envisagées possédant une unité de carbone entre le groupement amine et le noyau pyrazole.

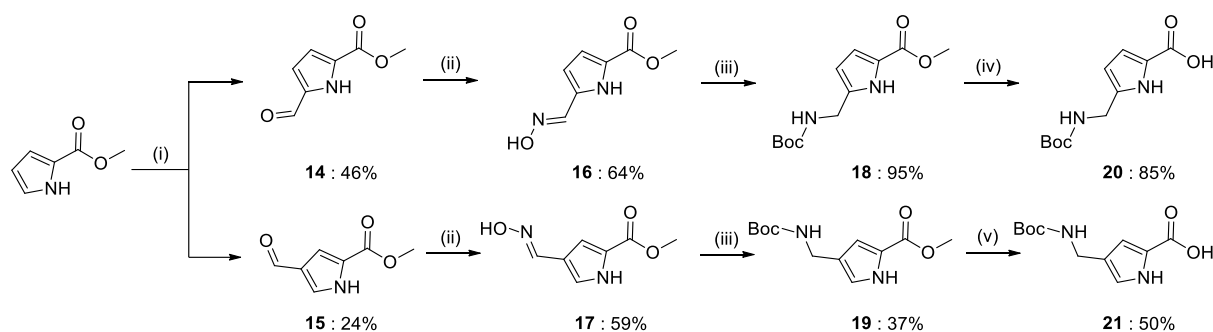
Introduire une chaîne carbonée sur un noyau pyrazole s'avère délicat car non décrit dans la littérature. Cela se révèle plus aisé en travaillant sur un cycle pyrrole. Ainsi, d'après une synthèse décrite par *Hawker et al.*,<sup>106</sup> la rétrosynthèse suivante permet d'obtenir les composés désirés en 7 étapes à partir du substrat commercial 1*H*-pyrrole-2-carboxylate de méthyle (Schéma 8).



**Schéma 8.** Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention des molécules à une unité de carbone supplémentaire.

<sup>106</sup> Hawker, D.; Silverman, R. Synthesis and evaluation of novel heteroaromatic substrates of GABA aminotransferase. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5763-5773.

Le protocole décrit par *Hawker et al.*<sup>106</sup> a été suivi jusqu'à l'obtention des dérivés d'acides carboxyliques **20** et **21** (Schéma 9).

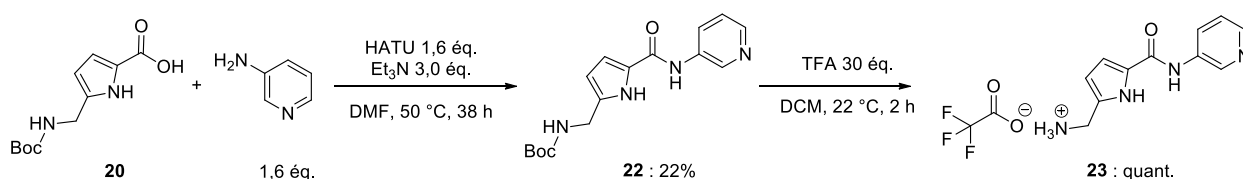


**Schéma 9.** Synthèse des molécules **14** à **21**. Réactifs et conditions : (i) DMF 1,1 éq., POCl<sub>3</sub> 1,1 éq., solution d'acétate de sodium, DCM, 0 °C → 22 °C → 0 °C → reflux → 0 °C, 3 min → 5 min → 30 min ; (ii) hydroxylamine 1,5 éq., K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,6 éq., eau, 65 °C, 5 min ; (iii) 10% Pd/C 0,2 éq., Boc<sub>2</sub>O 1,1 éq., AcOEt, H<sub>2</sub>, 22 °C, 16 h ; (iv) LiOH 10,0 éq., THF/eau/MeOH 3/1/1, 50 °C, 20 h ; (v) LiOH 10,0 éq., THF/eau/MeOH 3/1/1, 50 °C, 5 h.

La première étape consiste en une réaction de formylation de Vilsmeier-Haack. Le réactif de Vilsmeier-Haack, formé à partir du DMF et du POCl<sub>3</sub> (trichlorure de phosphore), a pu réagir avec le substrat 1H-pyrrole-2-carboxylate de méthyle pour donner l'intermédiaire iminium. Ce dernier a été hydrolysé par une solution aqueuse d'acétate de sodium afin d'obtenir l'aldéhyde désiré. Deux isomères ont été obtenus, les composés **14** et **15** portant respectivement la fonction aldéhyde en position 5 ou 4 du noyau pyrrole et présentant des rendements de 46 et 24%. Les deux molécules ont ensuite réagi avec de l'hydroxylamine en présence de carbonate de potassium afin d'obtenir les oximes **16** et **17** avec 64% et 59% de rendement. Une synthèse one-pot, consistant en la réduction, par hydrogénation catalytique, du groupement oxime, suivie de la protection de la fonction amine obtenue par le Boc<sub>2</sub>O, a abouti aux molécules **18** et **19** avec des rendements de 95% et 37%. Le plus faible rendement obtenu pour le composé **19** est expliqué par des problèmes rencontrés sur l'installation permettant de réaliser l'hydrogénation catalytique, empêchant la réaction d'être totale. Enfin la dernière étape de saponification fait intervenir l'hydroxyde de lithium. Le protocole proposé par *Hawker et al.*<sup>106</sup> ne permettant pas la solubilisation des réactifs, un autre protocole a donc été appliqué. En suivant celui de Zhang *et al.*,<sup>107</sup> les intermédiaires-clés **20** et **21** ont ainsi été obtenus avec respectivement 85 et 50% de rendement.

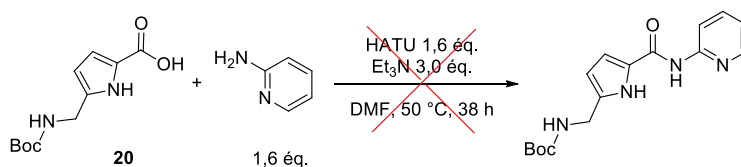
<sup>107</sup> Zhang, Y.; Yin, Z.; Li, Z.; He, J.; Cheng, J. Synthesis and anion recognition properties of pyrrole-bearing acyclic receptors. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 7560-7564.

La molécule **22** a ensuite été synthétisée, en engageant le composé **20** dans une réaction de couplage peptidique avec la 3-aminopyridine en présence d'HATU. Le composé **22** n'a ainsi pu être obtenu qu'avec un rendement de 22%. Ceci peut s'expliquer par des problèmes de réactivité des deux partenaires : la fonction amine aromatique, portée par le noyau pyridine est d'une part peu nucléophile, de surcroît avec l'effet attracteur de l'atome d'azote du cycle. Le groupement carboxylique est d'autre part porté par un noyau pyrrole, riche en électrons, rendant ainsi le carboxyle de l'intermédiaire ester activé moins électrophile. Enfin, l'étape de déprotection du groupement Boc par le TFA a permis l'obtention de la molécule **23** avec un rendement quantitatif (Schéma 10).



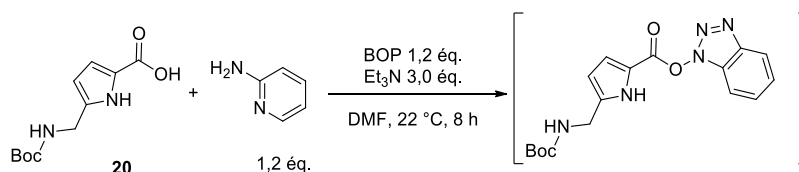
**Schéma 10.** Synthèse des molécules **22** et **23**.

L'application de cette même séquence réactionnelle avec la 2-aminopyridine ne permet pas d'obtenir le composé désiré (Schéma 11).



**Schéma 11.** Echec de la réaction entre **20** et la 2-aminopyridine en présence d'HATU.

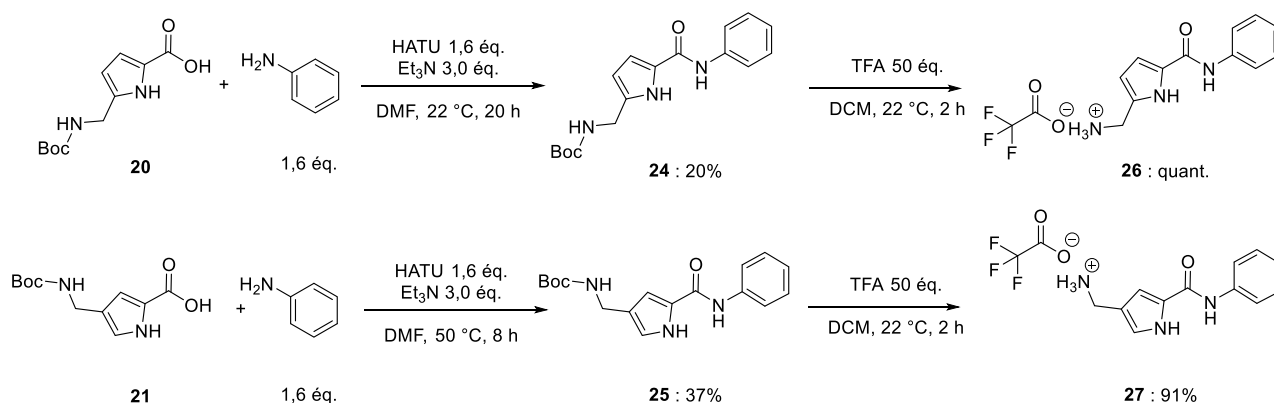
En effet, la 2-aminopyridine est moins nucléophile que la 3-aminopyridine. Pour augmenter, la réactivité, l'HATU a été remplacé par le BOP ((benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate), décrit comme plus réactif.<sup>108</sup> Un suivi LC-MS a montré uniquement l'obtention de l'ester activé (Schéma 12).



<sup>108</sup> Sigma-Aldrich. (Page consultée le 19/06/2019). Peptide Coupling Reagents Selection Guide, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/chemistry/peptide-coupling-reagents-selection-guide.html>.

**Schéma 12.** Formation de l'ester activé à partir de **20** et de la 2-aminopyridine en présence de BOP.

La même réaction conduite en remplaçant l'aminopyridine par l'aniline, plus nucléophile, permet d'obtenir les composés **24** et **25** avec des rendements de 20% et 37% (Schéma 13). Ceci confirme que les problèmes de réactivités proviennent bien de l'aminopyridine. Enfin, la dernière étape de déprotection par le TFA a permis d'obtenir les molécules **26** et **27** avec un rendement quantitatif pour la première et de 91% pour la seconde.

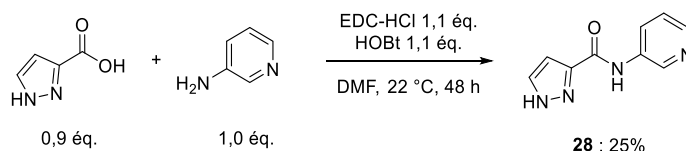


**Schéma 13.** Synthèse des molécules **24** à **27**.

### 1-3- Synthèse des molécules présentant une fonction amine hétérocyclique

#### 1-3-1- Synthèse de la molécule **28** présentant un cycle pyrazole

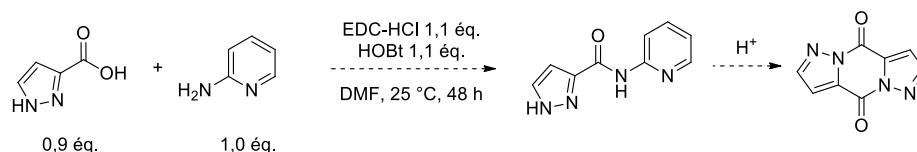
Le composé **28** a été synthétisé avec un rendement de 25% à l'aide d'HOBt (1-Hydroxybenzotriazole hydrate) et d'EDC-Cl (chlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) (Schéma 14).



**Schéma 14.** Synthèse du composé **28**.

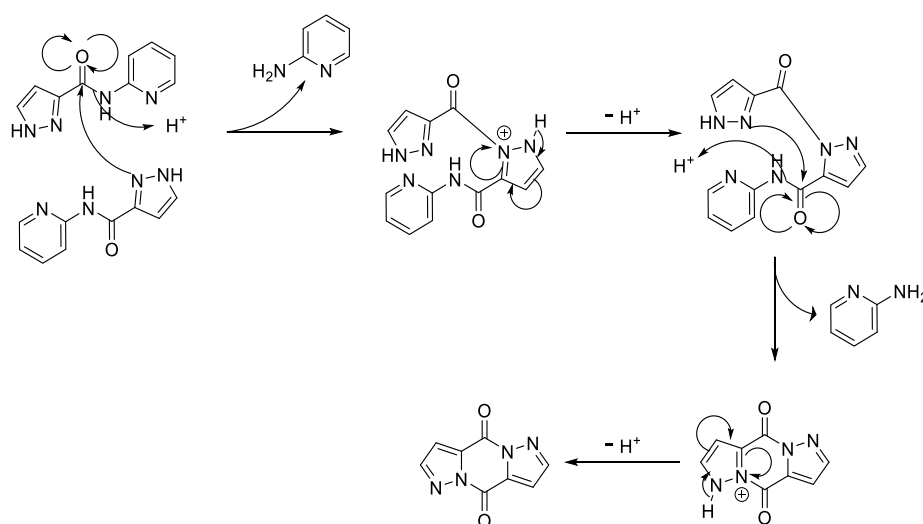
L'application de ces conditions réactionnelles a échoué à obtenir le *N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide. L'analyse par LC/MS (Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse) du composé obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice nous indique un composé possédant une masse molaire de 188 g.mol<sup>-1</sup>. Ces données

couplées à une analyse de la littérature,<sup>109</sup> nous montrent qu'il pourrait s'agir de la dipyrazolo[1,5-a:1',5'-d]pyrazine-4,9-dione (Schéma 15).



**Schéma 15.** Synthèse du *N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide et dégradation supposée, en milieu acide, en dipyrazolo[1,5-a:1',5'-d]pyrazine-4,9-dione.

Il a ainsi été émis l'hypothèse qu'en milieu acide, comme par exemple dans le gel de silice d'une chromatographie sur colonne, le *N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide se dégrade en dipyrazolo[1,5-a:1',5'-d]pyrazine-4,9-dione (Schéma 16). Afin de valider cette hypothèse, il aurait fallu isoler et caractériser ce composé.



**Schéma 16.** Mécanisme proposé pour la dégradation du *N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide en dipyrazolo[1,5-a:1',5'-d]pyrazine-4,9-dione en milieu acide.

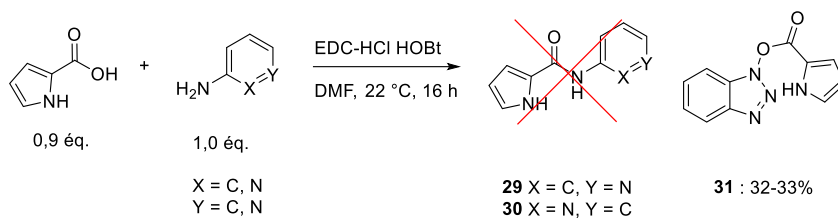
Pour pallier ce problème lors de la purification, nous envisageons de remplacer la phase stationnaire de la colonne par de l'alumine, qui présente un caractère légèrement basique, ou bien de réaliser une chromatographie en phase inverse en utilisant une silice greffée C18.

### 1-3-2- Synthèse des molécules présentant un cycle pyrrole

La synthèse des composés **29** et **30** a été envisagée en faisant appel à l'acide pyrrole-2-carboxylique et aux aminopyridines adaptées, en présence d'EDC-HCl et d'HOBT. Dans les deux

<sup>109</sup> Pelcman, B.; Sanin, A.; Nilsson, P.; No, K.; Schaal, W.; Öhrman, S.; Krog-Jensen, C.; Forsell, P.; Hallberg, A.; Larhed, Mats.; Boesen, T.; Kromann, H.; Byskov Vogensen, S.; Groth T.; Claesson, H. 3-Substituted pyrazoles and 4-substituted triazoles as inhibitors of human 15-lipoxygenase-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 3024-3029.

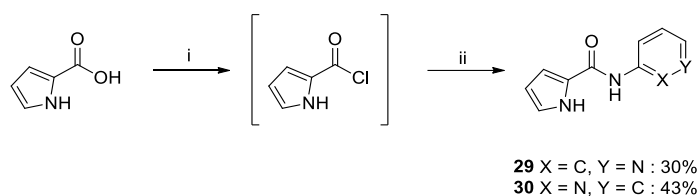
cas, le même produit **31** a été obtenu (Schéma 17) avec des rendements respectifs de 33 et 32%. Après avoir été isolé et caractérisé par RMN et LC-MS, le composé **31** s'avère ainsi être le 1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 1*H*-pyrrole-2-carboxylate, c'est à dire l'ester activé formé à partir de l'acide carboxylique utilisé et d'HOBt.



**Schéma 17.** Couplage entre l'acide pyrrole-2-carboxylique et l'aminopyridine (2-aminopyridine et 3-aminopyridine) correspondante, conduisant au 1*H*-benzo[d]-1-yl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate.

L'échec de la réaction peut être expliqué par une grande stabilité de l'ester activé et/ou par un manque de nucléophile de l'aminopyridine. Diverses conditions ont donc été testées pour permettre l'attaque de l'aminopyridine sur ce produit, soit en ajoutant de la DIPEA pour rendre l'amine plus nucléophile, soit en chauffant, mais aucun essai n'a abouti. Devant ces résultats, une autre voie de synthèse a été envisagée, en passant par un chlorure d'acyle et en réalisant donc une réaction de substitution nucléophile (passant par un mécanisme d'addition-élimination).

Pour cela, le chlorure d'acide a été préparé à partir l'acide pyrrole-2-carboxylique mis en présence de chlorure d'oxalyle.<sup>110</sup> Cet intermédiaire a ensuite été directement engagé dans une réaction d'addition-élimination pour obtenir les composés désirés **29** et **30** avec des rendements respectifs de 30 et 43% (Schéma 18).



**Schéma 18.** Synthèse des composés comportant un cycle pyrrole. Réactifs et conditions : (i) chlorure d'oxalyle 5,0 éq., 22 °C, 2 h ; (ii) 2-aminopyridine ou 3-aminopyridine 1,1 éq., triéthylamine 3,0 éq., DCM, 22 °C, 48 h.

<sup>110</sup> Yusun, C.; Taehoon, K.; Soonmin, J.; Jongmin, K. The contribution of polar C–H hydrogen bonds to anion binding. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 794-802.

## 1-4- Synthèse des molécules présentant un groupement acétamide

Afin d'étudier l'influence de la substitution de la fonction amine terminale, cette dernière a été substituée par un groupement acétamide, à la fois donneur et accepteur de liaison hydrogène (Figure 50).

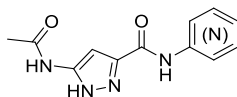


Figure 50. Substitution de la fonction amine primaire par un groupement acétamide.

L'approche rétrosynthétique pour l'obtention des molécules avec un groupement acétamide est la suivante :

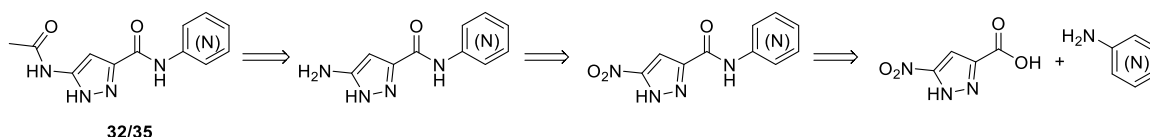


Schéma 19. Voie rétrosynthétique proposée pour l'obtention des molécules 32 et 35.

L'acétylation de 12 par l'anhydride acétique a permis d'obtenir le composé 32 avec un rendement de 61% (Schéma 20).

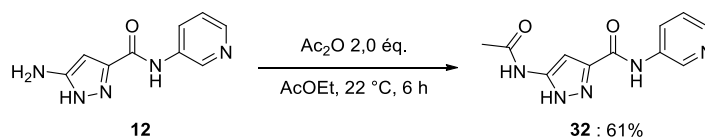


Schéma 20. Synthèse de la molécule 32.

L'application des mêmes conditions d'acétylation sur la molécule 13 n'a pas permis d'obtenir la molécule attendue. (Schéma 21).

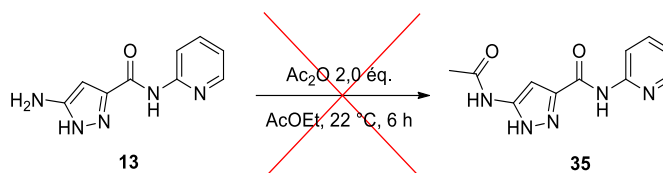
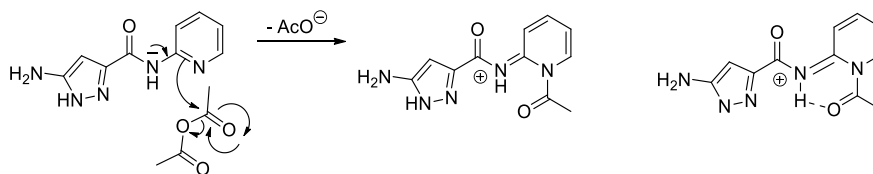


Schéma 21. Echec de l'acétylation de 13 par l'anhydride acétique.

Afin d'expliquer ce résultat, nous avons émis l'hypothèse suivante : le motif 2-aminopyridine pourrait agir en tant que catalyseur d'acylation avec l'anhydride acétique (Schéma 22). La formation d'une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène de la fonction amide et l'atome

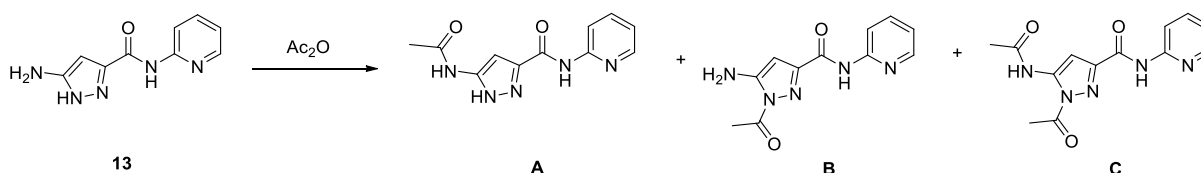
d'oxygène du groupement carbonyle conduirait ainsi à une stabilisation intramoléculaire de l'intermédiaire. Ce dernier ne serait alors pas assez réactif pour réagir avec la fonction amine aromatique de la molécule, afin de donner le composé **35** désiré.



**Schéma 22.** Mécanisme proposé conduisant à l'intermédiaire acylé et stabilisation intramoléculaire de celui-ci.

Diverses conditions ont donc été testées afin d'optimiser la réaction d'acétylation de la molécule **35** (Tableau 5).

**Tableau 5.** Etude de la réaction d'acétylation de la molécule **13**.

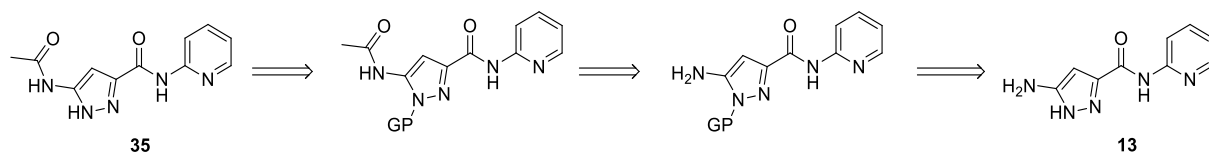


| Entrée | Température (°C) | Ac <sub>2</sub> O (éq.) | Solvant | Temps (h) | Base (Et <sub>3</sub> N, éq.) | Catalyseur (DMAP) | Résultats                                        |
|--------|------------------|-------------------------|---------|-----------|-------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
| 1      | 22               | 2,0                     | AcOEt   | 2         |                               |                   | Pas de produit formé                             |
| 2      | 50               | 2,0                     | AcOEt   | 2         |                               |                   | Pas de produit formé                             |
| 3      | 50               | 2,0                     | AcOEt   | 2         | 2,0 éq.                       |                   | <b>Produit B majoritaire<sup>a</sup></b>         |
| 4      | 22               | 2,0                     | dioxane | 2         |                               |                   | Pas de produit formé                             |
| 5      | 22               | 2,0                     | dioxane | 0,5       | 2,0 éq.                       |                   | Pas de produit formé                             |
| 6      | 50               | 2,0                     | dioxane | 16        | 2,0 éq.                       |                   | Produit A : traces <sup>a</sup>                  |
| 7      | 22               | 1,1                     | dioxane | 2         |                               | 0,1 éq.           | <b>B : 33%<sup>b</sup> ; C : 66%<sup>b</sup></b> |

<sup>a</sup> estimation par RMN ; <sup>b</sup> isolé après purification

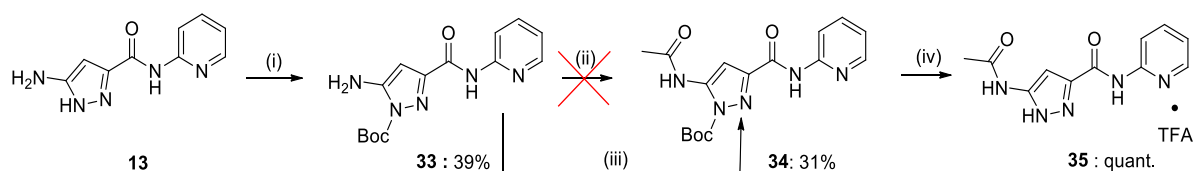
Selon les conditions de l'entrée 3, l'acétylation est sélective du cycle pyrazole. Les conditions de l'entrée 7 ont été les seules testées permettant une acétylation de la fonction amine aromatique (en plus du noyau pyrazole).

En se basant sur ces deux résultats, une nouvelle voie rétrosynthétique a été imaginée (Schéma 23) pour obtenir la molécule désirée, en passant par la protection du noyau pyrazole.



**Schéma 23.** Voie rétrosynthétique alternative pour l'obtention de la molécule 39 (GP = groupement protecteur).

Ainsi en reprenant les conditions de l'entrée 3 du tableau, le composé **33** a tout d'abord pu être obtenu en faisant réagir la molécule **13** avec le  $\text{Boc}_2\text{O}$  en présence de triéthylamine (Schéma 24). Le taux de conversion (mesuré par RMN) produit attendu/substrat de départ était de 4/1 à 24h. Le rendement de seulement 39% peut être expliqué par le clivage, en partie, du groupement protecteur lors de la purification.



**Schéma 24.** Synthèse des molécules **33** à **35**. Réactifs et conditions : (i)  $\text{Boc}_2\text{O}$  2,0 éq.,  $\text{Et}_3\text{N}$  3,0 éq.,  $\text{AcOEt}$ , 50 °C, 24 h ; (ii)  $\text{Ac}_2\text{O}$  2,0 éq., DMAP 0,1 éq.,  $\text{Et}_3\text{N}$  2,0 éq., dioxane, 50 °C, 16 h ; (iii)  $\text{AcCl}$  2,0 éq., DMAP 0,1 éq.,  $\text{Et}_3\text{N}$  2,0 éq., dioxane, 50 °C, 3 h ; (iv) TFA 10 éq., DCM, 22 °C, 1 h.

En appliquant les conditions d'acétylation décrites à l'entrée 7, aucun produit attendu n'a été obtenu au bout de 16 h. Il en a été de même en augmentant la température de chauffage jusqu'à 50°C et en ajoutant de la triéthylamine comme base. Ceci peut être expliqué par le fait que le groupement Boc oppose une gêne stérique empêchant l'attaque de la fonction amine sur l'anhydride acétique. L'utilisation du chlorure d'acétyle à la place de l'anhydride acétique a permis d'obtenir le composé **34** avec rendement de 31 %. La déprotection de la molécule **34** par le TFA a finalement permis d'obtenir le composé **35** attendu sous forme de sel de trifluoroacétate, avec un rendement quantitatif.

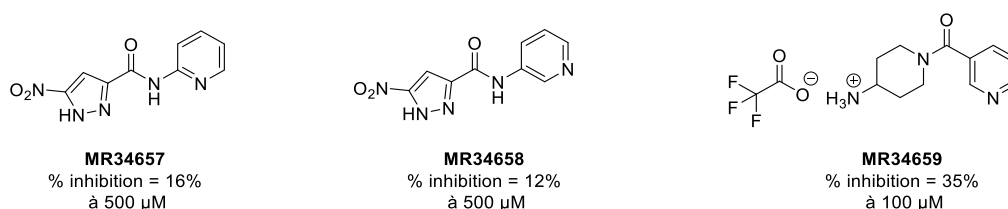
## 2- Criblage des molécules de première génération

L'ensemble des molécules de première génération synthétisées ont été criblées par FPA sur XIAP-BIR3, afin de mesurer leur affinité pour le domaine.

Tout d'abord, la molécule de référence **1e** ne présente pas une affinité pour XIAP-BIR3 aux concentrations utilisées. Le composé présentant un pourcentage d'inhibition décrit de 38% à 5 mM,<sup>89</sup> celui-ci ne semble pas présenter une affinité pour le domaine dans la gamme de concentrations testées, dont la valeur maximale est de 0,5 mM.

Concernant les molécules conçues par modélisation moléculaire, trois hits ont pu être identifiés (Figure 51):

- les molécules nitrées **MR34657 (11)** et **MR34658 (10)**, présentant un pourcentage d'inhibition à 500  $\mu$ M de respectivement 16 et 12%.
- le composé aminé **MR34659 (3)**, possédant un pourcentage d'inhibition de 35% à 100  $\mu$ M, correspondant à une  $CI_{50}$  relative de 72  $\mu$ M.



**Figure 51.** Structure et affinité des hits identifiés par FPA sur XIAP-BIR3.

Les molécules nitrées **MR34657** et **MR34658** étaient des intermédiaires de synthèse et n'avaient pas été conçues initialement pour être affines du domaine XIAP-BIR3. Nous avons donc procédé à des modulations afin d'étudier l'influence du groupement nitro sur l'affinité de ces molécules.

Concernant le hit **MR34659**, des pharmacomodulations ont été conduites en vue de l'obtention de molécules de seconde génération, présentant une augmentation de l'affinité pour XIAP-BIR3.

### 3- Etude de l'influence du groupement nitro sur l'affinité de ces molécules

A l'issu du criblage, deux molécules nitrées **MR34657** et **MR34658** présentent une affinité pour XIAP-BIR3.

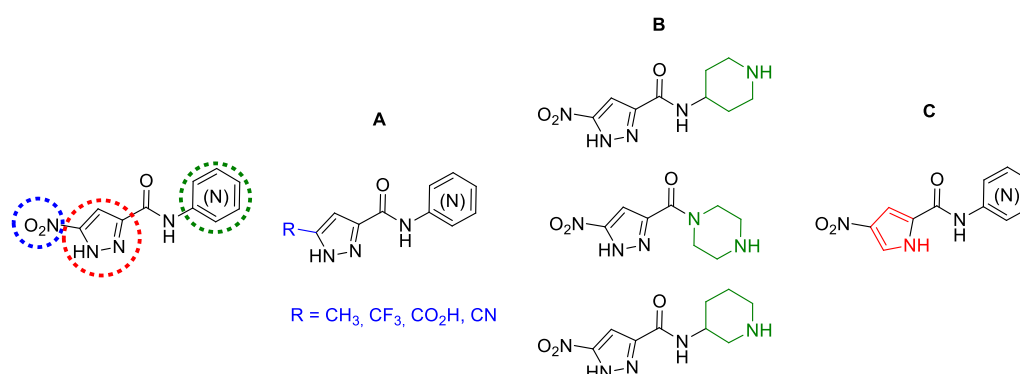
D'après des données de docking, les composés **MR34657** et **MR34658** peuvent adopter deux poses différentes dans le domaine protéique considéré (Figure 52). Le groupement nitro peut

en effet se placer soit au niveau de la poche P1 (hypothèse 1), soit au niveau de la poche P4 (hypothèse 2).



**Figure 52.** Représentation schématique de la pose de la molécule **MR34658** dans le domaine XIAP –BIR3. Le groupement nitro est soit situé dans la poche P1 (à gauche), soit dans la poche P4 (à droite).

Dans la première hypothèse, le groupement nitro est situé dans la poche P1. Afin d'étudier le rôle du groupement nitro dans l'interaction, nous avons décidé de le remplacer par d'autres groupements présentant des effets électroniques similaires ou différents. Nous avons choisi d'introduire des groupements carboxyle, cyano, méthyle et trifluorométhyle ([Figure 53A](#)).



**Figure 53.** Modulation envisagée

Dans la seconde hypothèse, c'est cette fois-ci le cycle pyridine qui est situé dans la poche P1. Pour augmenter cette interaction, la pyridine a été remplacée par une fonction amine présentant un atome d'azote plus basique (noyau pipéridine ou pipérazine) ([Figure 53B](#)). La fonction amine, alors engagée dans des interactions avec l'acide glutamique 314, favoriserait ainsi cette orientation, permettant de vérifier si cette pose permet de conserver l'affinité pour le domaine XIAP étudié.

D'autre part, la place de l'atome d'hydrogène sur le noyau pyrazole semble également importante pour l'interaction avec XIAP-BIR3. Sur ce noyau, un équilibre tautomérique existe ; l'atome d'hydrogène est ainsi porté par l'un ou l'autre des atomes d'azote du cycle.

Nous avons donc étudié cette tautomérie sur nos composés, puis pour s'affranchir de cette tautomérie, le noyau pyrazole a été remplacé par un cycle pyrrole (Figure 53C).

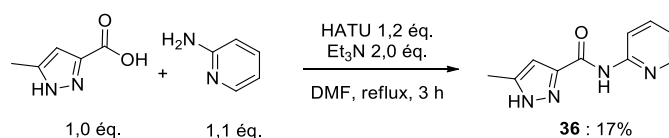
### 3-1- Remplacement du groupement nitro

Dans l'hypothèse 1 où le groupement nitro est orienté vers la poche P1, il a d'abord été décidé de remplacer celui-ci, présentant un caractère mésomère attracteur, par des groupements avec des effets électroniques différents. Le groupement méthyle possède un effet inductif donneur et le groupement trifluorométhyle un effet inductif attracteur.

Il a également été introduit un groupement carboxyle, qui comme le groupement nitro possède un effet mésomère attracteur. Ceci permettrait de savoir si le groupement nitro est en lui-même nécessaire pour avoir une affinité avec la protéine ou si un groupement avec des effets électroniques similaires est suffisant.

Les composés **36** à **40** ont été synthétisés en faisant réagir l'acide carboxylique concerné avec la 2-aminopyridine et la 3-aminopyridine en présence de divers agents de couplage peptidique.

Concernant les molécules méthylées, le composé **36** a été obtenu en adaptant un protocole décrit par Doma *et al.*<sup>111</sup> L'acide 5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylique a été mis à réagir avec la 2-aminopyridine, en remplaçant l'agent de couplage TBTU (2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate), non disponible au laboratoire, par l'HATU (Schéma 25). Le faible rendement de 17% peut être expliqué par des problèmes d'extraction rencontrés lors du traitement de la manipulation : une partie de la molécule, hydrophile, est perdue dans la phase aqueuse.

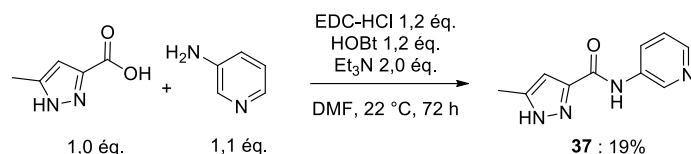


**Schéma 25.** Synthèse de la molécule **36**.

Avec la 3-aminopyridine, l'application des mêmes conditions ne permet pas d'obtenir le composé **37**. En effet, il n'a pas été possible de séparer le produit attendu de la

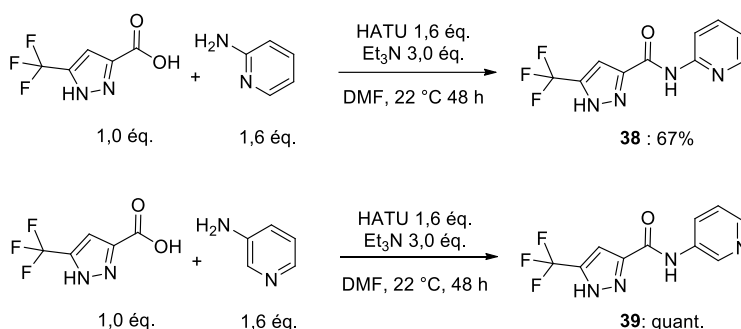
<sup>111</sup> Doma, A.; Kulkarni, R.; Palakodety, R.; Sastry, G.; Sridhara, J.; Garlapati, A. Pyrazole derivatives as potent inhibitors of c-Jun N-terminal kinase: Synthesis and SAR studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 6209-6219.

tétraméthylurée (sous-produit formé lors du couplage peptidique en utilisant l'HATU). Nous avons donc décidé d'utiliser le couple EDC-HCl/HOBt sans chauffage (Schéma 26). La molécule **37** a ainsi pu être isolée avec un rendement de 19 %, s'expliquant par des problèmes rencontrés lors de l'étape d'extraction.



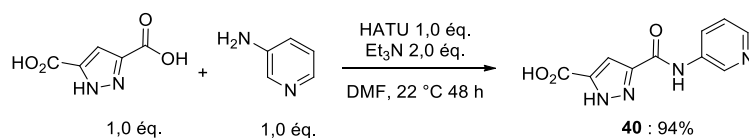
**Schéma 26.** Synthèse de la molécule **37**.

Pour les molécules possédant un groupement trifluorométhyle (Schéma 27), il a été décidé de ne pas procéder à l'étape d'extraction au vu des faibles rendements des composés **36** et **37**. Ainsi le couplage de l'acide 5-(trifluorométhyl)-1H-pyrazole-3-carboxylique avec la 2-et 3-aminopyridine par l'HATU a permis d'obtenir les composés désirés **38** et **39** avec des rendements respectifs de 67% et 100%.



**Schéma 27.** Synthèse des molécules **38** et **39** présentant un groupement trifluorométhyle.

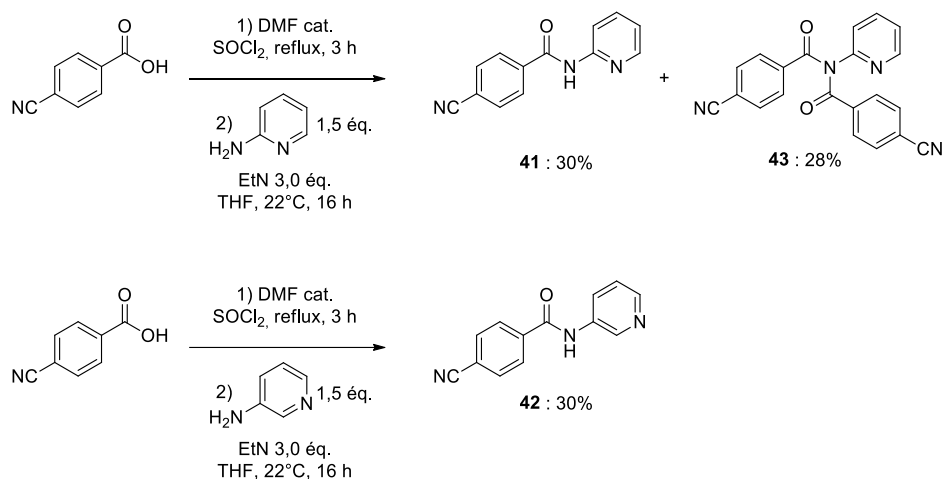
L'application du même protocole permet d'obtenir la molécule **40** avec un rendement de 94% (Schéma 28).



**Schéma 28.** Synthèse de la molécule **40** présentant un groupement carboxyle.

En se plaçant dans les mêmes conditions avec la 2-aminopyridine, la réaction n'est pas complète. Il en est de même en chauffant à 50°C. Il n'a pas été possible de séparer le produit désiré de l'amine de départ. Une solution envisagée consisterait à placer l'aminopyridine en défaut, afin que celle-ci soit entièrement consommée lors de la réaction.

Enfin le groupement cyano est décrit dans la littérature comme un groupement bioisostère du groupement nitro.<sup>112</sup> Cependant, l'acide 5-cyano-1*H*-pyrazole-3-carboxylique, nécessaire à la synthèse des composés cyanés désirés, aurait été difficilement synthétisable. Du point de vue commercial, il n'est pas abordable économiquement. Il a ainsi été décidé de remplacer le noyau pyrazole par un noyau phényle. Le chlorure d'acide correspondant a donc été préparé à partir de l'acide 4-cyanobenzoïque en suivant un protocole décrit par Černovská *et al.*<sup>113</sup> (Schéma 29). Celui-ci a directement été engagé avec la 2- ou 3-aminopyridine, en adaptant un protocole décrit par Stansfield *et al.*,<sup>114</sup> afin d'obtenir les composés **41** et **42** avec un rendement de 30%. Le faible rendement obtenu avec le composé **41** est expliqué par la formation du sous-produit di-acylé **43**, isolé avec un rendement de 28%. Concernant la molécule **41**, des problèmes de purification ont été rencontrés.



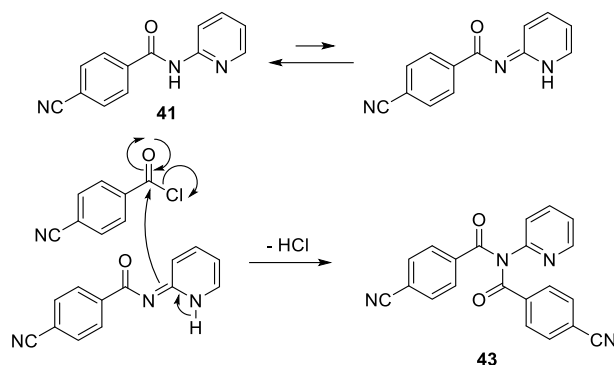
**Schéma 29.** Synthèse des molécules **41** et **42** présentant un groupement cyano, avec formation du sous-produit **43**.

Pour expliquer la formation du composé **43**, il faut considérer que la molécule **41** existe en équilibre tautomérique. Il est donc proposé comme hypothèse que sous sa forme "imine", la molécule est capable de réagir avec un second équivalent de chlorure d'acide afin de donner le produit di-acylé (Schéma 30).

<sup>112</sup> Cambridge MedChem Consulting. (Page consultée le 20/06/2019). Bioisosteric Remplacements, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/bioisoteres/>.

<sup>113</sup> Černovská, K.; Kemter, M.; Gallmeier, H.; Rzepecki, P.; Schrader, T.; König, B. PEG-supported synthesis of pyrazole oligoamides with peptide  $\beta$ -sheet affinity. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1603-1611.

<sup>114</sup> Stansfield, I.; Querolle, O.; Ligny, Y.; Gross, G.; Jacoby, E.; Meerpoel, L.; Green, S.; Hynd, G.; Kulagowski, J.; Macleod, C.; Mann, S. Heteroaromatic derivatives as nik inhibitors. *Int. Appl.* **2017**, WO2018002217A1.

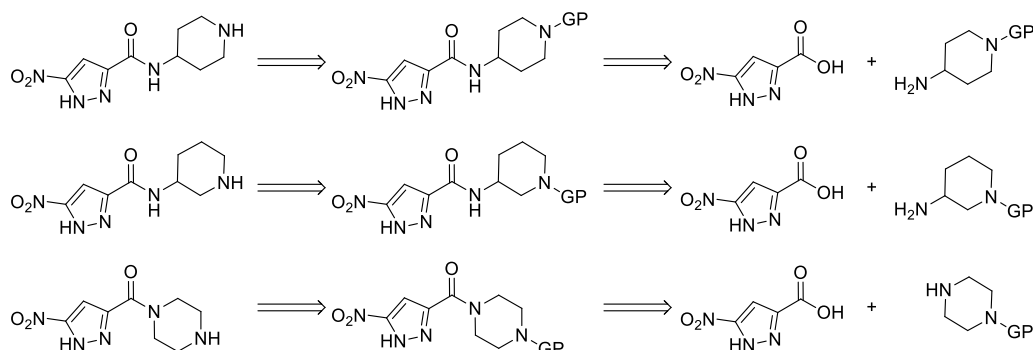


**Schéma 30.** Equilibre tautomérique "amine"- "imine" de la molécule **41** et mécanisme réactionnel proposé permettant l'obtention du composé **43**.

### 3-2- Modulations du noyau pyridine

Dans l'hypothèse 2 où le groupement nitro serait orienté vers la poche P4, il a été décidé de remplacer le noyau pyridine par un cycle pipéridine ou pipérazine afin d'augmenter l'affinité des molécules pour le domaine XIAP-BIR3.

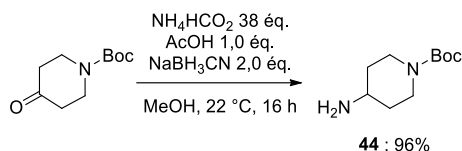
L'analyse rétrosynthétique permet d'obtenir les composés désirés en deux ou trois étapes (Schéma 31).



**Schéma 31.** Voies rétrosynthétiques proposées permettant d'obtenir les composés nitrés possédant un hétérocycle saturé azoté (GP = groupement protecteur).

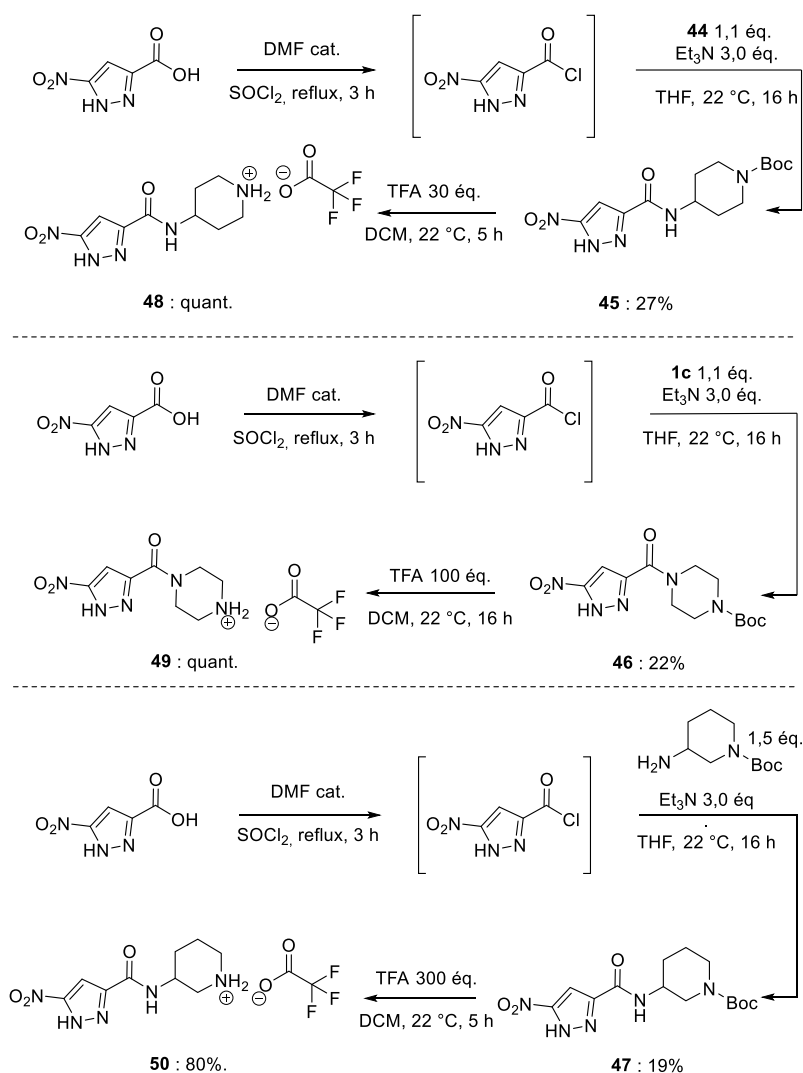
La synthèse du composé **44** 4-aminopipéridine-1-carboxylate de *tert*-butyle a été effectuée par amination réductrice. En adaptant le protocole décrit par Mitchell *et al.*,<sup>115</sup> le substrat 4-oxopipéridine-1-carboxylate de *tert*-butyle a réagi avec le formiate d'ammonium et le cyanoborohydrure de sodium pour donner le composé attendu avec un rendement de 96% (Schéma 32).

<sup>115</sup> Mitchell, L.; Bell, A.; Chesworth, R.; Foley, M.; Kuntz, K.; Mills, J.; Munchhof, M. Substituted piperidine compounds. *PCT. Int. Appl.* **2016**, WO2016040515A1.



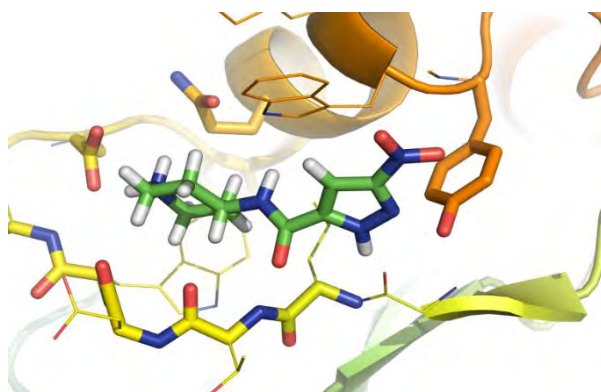
**Schéma 32.** Synthèse de la molécule **44**.

Les deux composés **44** et **1c** (*N*-Boc-pipérazine), ainsi que la 4-(5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxamido)pipéridine-1-carboxylate de *tert*-butyle commerciale ont été mis à réagir, en adaptant le protocole décrit par Stansfield *et al.*,<sup>114</sup> avec le chlorure d'acide adapté. Ce dernier a été préparé à partir de l'acide 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylique suivant le protocole décrit par Černovská *et al.*<sup>113</sup> Les molécules **45** à **47** ont ainsi pu être obtenues avec des rendements compris entre 19 et 27%. Ces faibles rendements peuvent être expliqués par une mauvaise solubilité des réactifs dans le THF, le milieu réactionnel étant en effet une suspension. Ces composés ont par la suite subi l'étape de déprotection dans le TFA afin de donner les molécules finales **48** à **50** avec des rendements allant de 80% à quantitatif (Schéma 33).



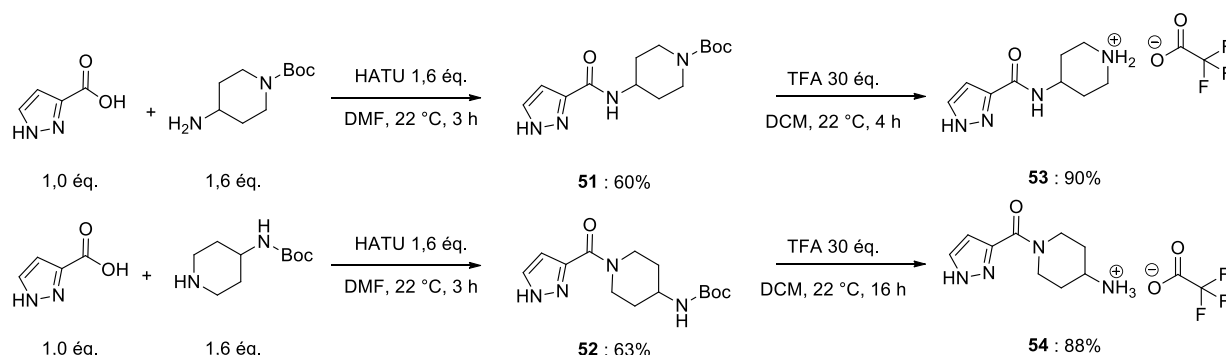
**Schéma 33.** Synthèse des molécules **45** à **50**.

Des travaux de modélisations moléculaires complémentaires ont par la suite montré que dans la pose où le groupement nitro était orienté vers la poche P4 (hypothèse 2), celui-ci n'établissait pas d'interactions avec les acides aminés du domaine protéique XIAP-BIR3 ([Figure 54](#)). Deux nouvelles molécules ont donc été synthétisées, sans groupement nitro, afin de vérifier si ce dernier était nécessaire pour conserver une affinité.



**Figure 54.** Docking du hit **MR34658** dans le domaine XIAP-BIR3. Le groupement nitro n'interagit avec aucun acide aminé de la protéine.

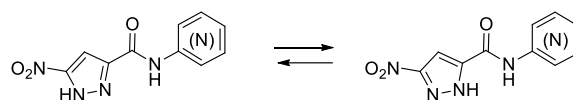
Les composés **51** et **52** ont été synthétisés en utilisant l'agent de couplage peptique HATU ([Schéma 34](#)). Les composés sont ainsi obtenus avec des rendements compris entre 60 et 63%. Une dernière étape de déprotection a permis d'obtenir les molécules **53** et **54** avec 90 et 88% de rendement.



**Schéma 34.** Synthèse des molécules **51** à **54**.

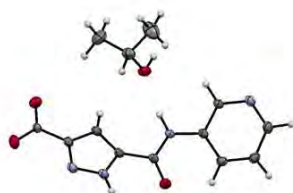
### 3-3- Modulations du noyau pyrazole

Le cycle pyrazole présente une tautomérie au niveau du proton porté par un de ses deux atomes d'azote. Nous nous sommes questionnés sur l'équilibre tautomérique des composés **MR34657** et **MR34658** ([Figure 55](#)).



**Figure 55.** Tautométrie possible, au niveau du noyau pyrazole, des composés **MR34657** et **MR34658**.

Pour répondre à cette problématique, des données de cristallographie des rayons x ont montré, concernant la molécule **MR34658**, une protonation de l'atome d'azote situé en  $\gamma$  du groupement nitro ([Figure 56](#)).



**Figure 56.** Co-cristallisation de la molécule **MR3458** avec une molécule d'isopropanol.

Il serait intéressant de confirmer ce résultat en solution. Des expériences RMN ont donc été réalisées, notamment des expériences hétéronucléaires  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , mais celles-ci ne permettent pas d'obtenir de données en solution pour le moment : des expériences complémentaires sont en cours.

Il a ensuite été décidé de remplacer le noyau pyrazole par un cycle pyrrole afin de s'affranchir de la tautométrie. La molécule **55** a été synthétisée en adaptant le protocole décrit par Wyatt *et al.*<sup>104</sup> en mettant à réagir l'acide 4-nitro-1H-pyrrole-2-carboxylique avec la 3-aminopyridine en présence du couple EDC-HCl/HOBt ([Schéma 35](#)). Bien que la réaction ne soit pas totale, le composé **55** a été isolé avec un rendement de 34%.

Concernant la molécule **56**, le protocole proposé par Bürli *et al.*<sup>116</sup> a été suivi, toujours avec le même acide carboxylique et en utilisant la 2-aminopyridine. L'HBTU, non disponible, a été remplacé par l'HATU, mais comme précédemment, la réaction n'était pas totale au bout de 48h. Le composé **56** a tout de même pu être obtenu avec 47% de rendement.

<sup>116</sup> Bürli, R.; Jones, P.; McMin, D.; Le, Q.; Duan, J.; Kaizerman, J.; Difuntorum, S.; Moser, H. DNA binding ligands targeting drug-resistant Gram-positive bacteria. Part 2: C-terminal benzimidazoles and derivatives. *Bioorg. med. chem. lett.* 2004, 14, 1259-1263.

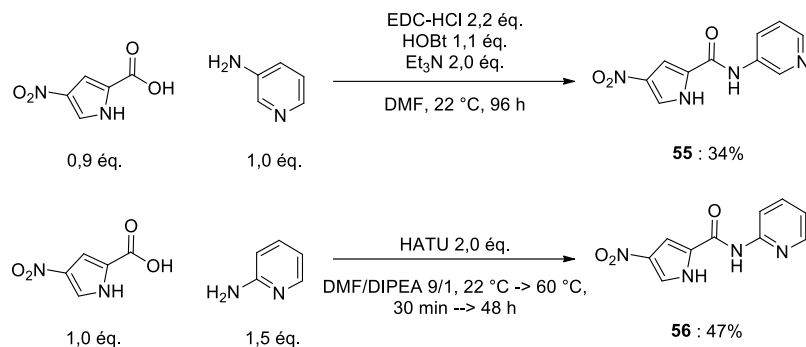


Schéma 35. Synthèse des molécules 55 et 56.

## 4- Modulations du hit MR34659 pour l'obtention de molécules de deuxième génération

En se basant sur des travaux de modélisation moléculaire, plusieurs modulations du hit **MR34659** ont été envisagées ([Figure 57](#)) :

- en bleu, la substitution de cycle pipéridine par un groupement méthoxy, capable d'interagir avec l'acide glutamique 319 et le tryptophane 323, en s'inspirant d'un ligand décrit dans la littérature<sup>89</sup>
- en rouge, l'allongement de la chaîne linker
- en vert, l'ajout d'un groupement donneur de liaison hydrogène sur le noyau pyridine

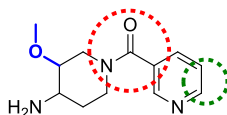


Figure 57. Modulations envisagées du hit **MR34659**.

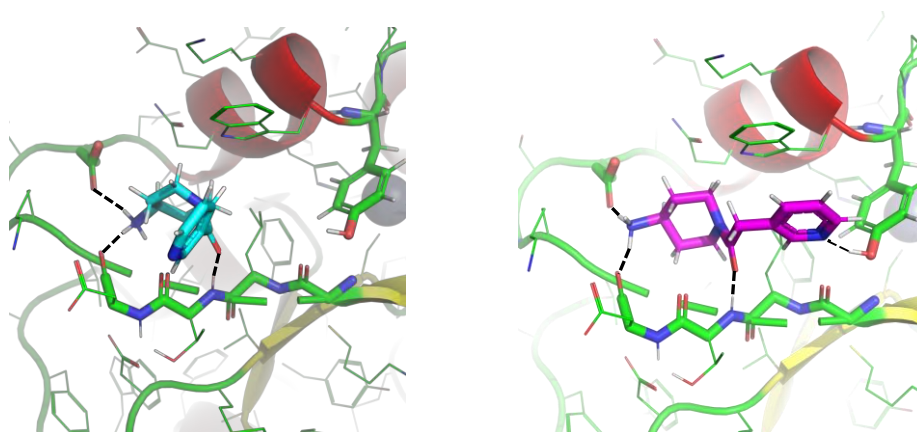
Ces modulations visent à augmenter les interactions entre la molécule et le domaine XIAP-BIR3 et donc d'augmenter l'affinité.

L'ajout du groupement méthoxy sur le noyau pipéridine est complexe, nécessitant de nombreuses étapes de synthèse. Nous nous sommes donc concentrés sur les autres modulations envisagées.

### 4-1- Allongement de la chaîne linker

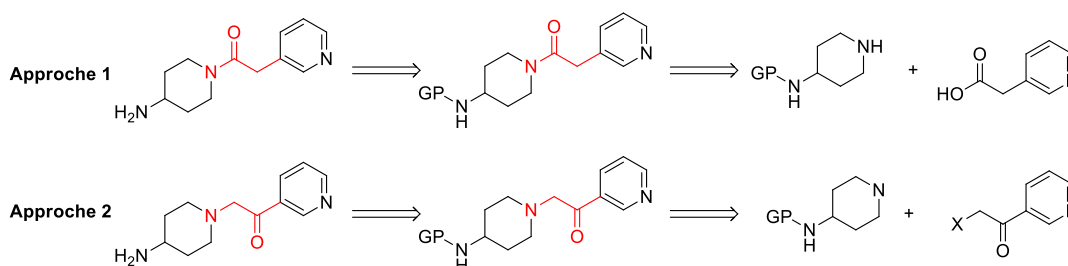
L'allongement de la chaîne linker doit permettre d'orienter le cycle pyridine de manière optimale, en vue d'établir de nouvelles interactions avec la protéine ([Figure 58](#)). Comme nous pouvons l'observer sur les images de docking ci-dessous, le noyau pyridine du hit **MR34659**

n'est pas engagé dans des interactions avec le domaine protéique. En revanche, la molécule de seconde génération voit son cycle pyridine orienté vers le résidu Tyrosine 324.



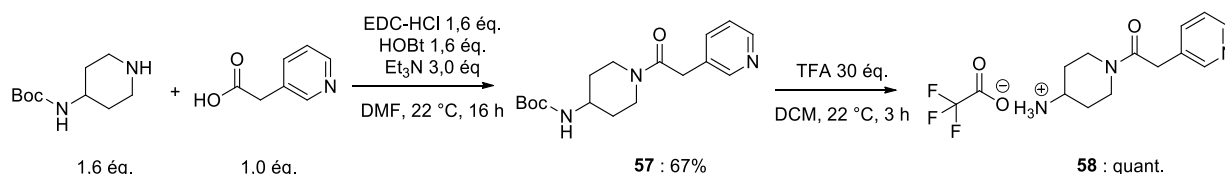
**Figure 58.** Docking du hit **MR34659** et d'une molécule de seconde génération dans le domaine XIAP-BIR3.

L'allongement de la chaîne linker par un atome de carbone supplémentaire peut être effectué soit entre la fonction amide et le noyau pyridine, soit entre l'atome d'azote du cycle pipéridine et le groupement carbonyle de la fonction amide. La voie rétrosynthétique envisagée est alors différente (Schéma 36).



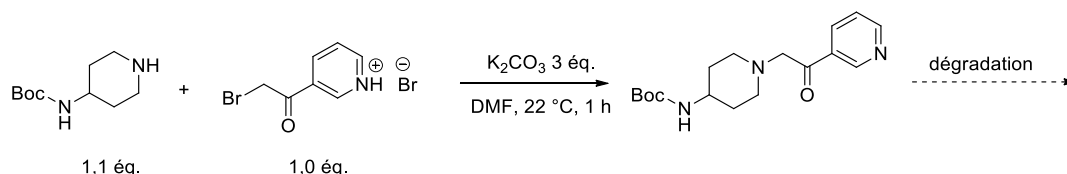
**Schéma 36.** Voies rétrosynthétiques envisagées pour l'allongement de la chaîne linker en rouge (X = Cl, Br, I) (GP = groupement protecteur).

Concernant l'approche 1, la molécule a été synthétisée par couplage peptidique grâce au couple EDC-HCl/HOBt. Ainsi, l'acide 2-(pyridin-3-yl)acétique a pu réagir avec l'amine pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle afin de donner la molécule **57** avec 67% de rendement. L'étape de déprotection dans le TFA a permis d'obtenir le composé final **58** avec un rendement quantitatif (Schéma 37).



**Schéma 37.** Synthèse des molécules **57** et **58**.

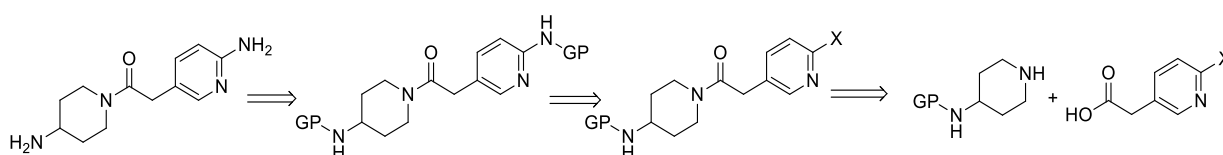
La deuxième molécule présente un motif  $\alpha$ -amino cétone. Elle peut être obtenue par une réaction de  $S_N2$  de la pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle sur le bromure de 3-(2-bromoacetyl)pyridin-1-ium (Schéma 38). La réaction est complète en 1 h, cependant le produit se dégrade, notamment sous l'influence de la température du bain de l'évaporateur rotatif. Celui-ci n'a ainsi pas pu être obtenu avec un taux de pureté satisfaisant. Le but de ce projet étant d'identifier des composés pouvant, à terme, aboutir à des molécules à visée thérapeutique, le développement de produits thermolabiles semble à écarter. Nous n'avons donc pas poursuivi le développement de cette molécule.



**Schéma 38.** Synthèse permettant de former le produit désiré.

## 4-2- Ajout de groupements donneurs de liaison hydrogène sur le noyau pyridine

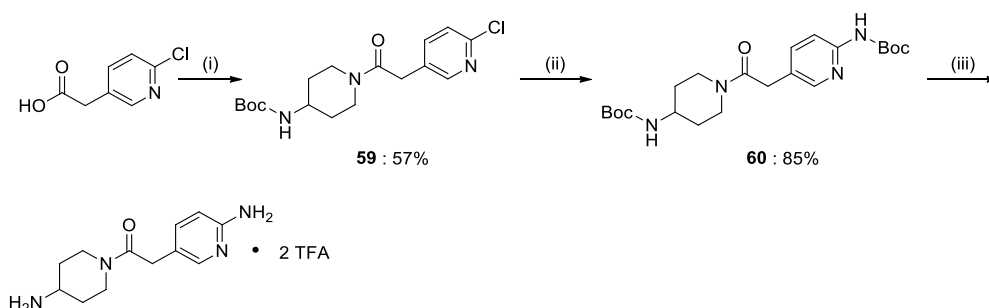
Comme décrit précédemment, l'allongement de la chaîne linker permet le placement du noyau pyridine dans une orientation optimale. Des groupements donneur de liaisons hydrogènes, substitués sur ce cycle, peuvent alors établir de nouvelles interactions avec les acides aminés de la protéine. Le groupement amine notamment, pourrait ainsi interagir avec la Tyrosine <sup>324</sup>Tyr. L'analyse rétrosynthétique permet d'obtenir la molécule désirée en trois étapes (Schéma 39).



**Schéma 39.** Voie rétrosynthétique envisagée pour l'introduction d'un groupement amine sur le noyau pyridine (X = Cl, Br, I) (GP = groupement protecteur).

La première étape consiste en un couplage peptidique, dans ce cas entre l'acide 2-(6-chloropyridin-3-yl)acétique et le pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle en présence d'HATU (Schéma 40). Les réactifs ont été placés en mélange équimolaire, afin d'éviter une éventuelle  $S_NAr$  (substitution nucléophile aromatique) de l'amine sur le noyau chloropyridine. La

molécule **59** a ainsi été obtenue avec un rendement de 72%. L'étape suivante a consisté au couplage de Buchwald-Hartwig de ce composé avec le carbamate de *tert*-butyle en adaptant le protocole décrit par Fader *et al.*<sup>117</sup>. Il fait intervenir le Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> comme catalyseur, le xantphos comme ligand et le carbonate de césium comme base. Le composé **60** a ainsi pu être obtenu avec 85% de rendement. La dernière étape, consistant en une double déprotection de groupements Boc par le TFA, a permis de donner la molécule finale attendue sous forme de sel de TFA (avec cependant plus de deux molécules de TFA pour une molécule désirée).

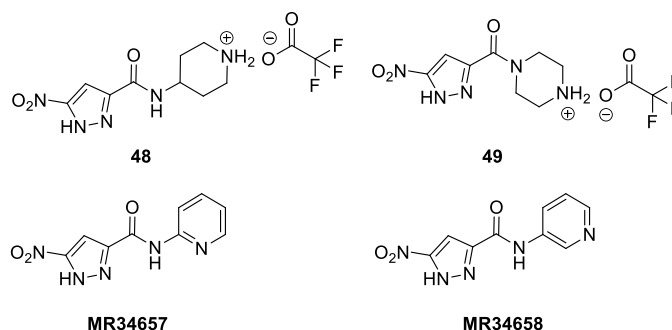


**Schéma 40.** Synthèse des molécules **59** à **60**. (i) pipéridin-4-ylcarbamate de *tert*-butyle 1,6 éq., EDC-HCl 1,6 éq., HOBT 1,6 éq., Et<sub>3</sub>N 3,0 éq., DMF, 22 °C, 16 h ; (ii) carbamate de *tert*-butyle 4,0 éq., Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 0,1 éq., xantphos 0,2 éq., Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,0 éq., THF, 70° C, 24 h ; (iii) TFA 100 éq., DCM, 22 °C, 7 h.

## 5- Deuxième campagne de criblage des composés

### 5-1- Criblage sur le domaine XIAP-BIR3

L'ensemble des 28 molécules, synthétisées et placées en chimiothèque à l'issu du premier criblage, a été criblé par FPA sur XIAP-BIR3. Deux d'entre elles ont présenté une affinité pour le domaine XIAP-BIR3 : les composés **48** et **49** (Figure 59) avec un pourcentage d'inhibition de 20% à 0,5 mM.



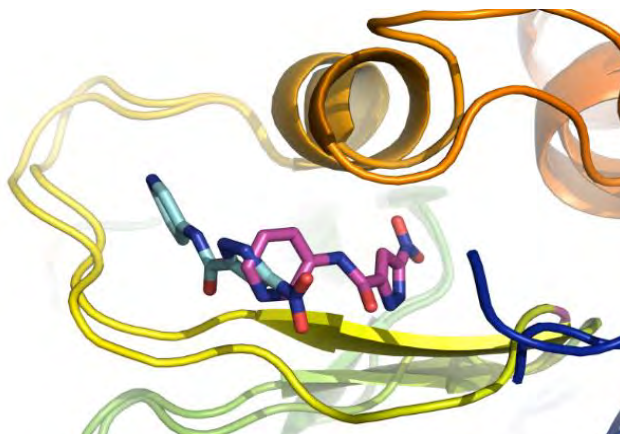
**Figure 59.** Structure des molécules **48** et **49**, ainsi que des composés **MR34657** et **MR34658**.

<sup>117</sup> Fader, L.; Parisien, M.; Thibeault, C.; Morency, L.; Duplessis, M.; James, C.; Morin, S.; Gillard, J. Inhibiteurs de cytomégalo virus. *Int. Appl.* **2013**, WO2014070979A1.

La modulation de ces molécules consistait, dans le cadre de l'hypothèse 2, au remplacement du noyau pyridine du hit **MR34658** afin d'augmenter l'affinité des molécules pour le domaine XIAP-BIR3. Ceci, favoriserait l'orientation du groupement nitro vers la poche P4, reproduisant ainsi l'hypothèse où le hit **MR34658** adopte cette pose. L'affinité des molécules **48** et **49** pour le domaine XIAP-BIR3 étant conservée, les résultats corroborent ainsi l'hypothèse : les composés nitrés **MR34657** et **MR34658** semblent donc se placer dans le domaine XIAP-BIR3 en orientant le groupement nitro vers la poche P4.

Les données de modélisation moléculaire montraient que le groupement nitro n'établissait pas d'interactions dans cette pose. Cependant, aucune des deux molécules **53** et **54** synthétisées sans ce groupement ne présente d'affinité pour XIAP-BIR3. Ainsi, le groupement nitro semble essentiel pour conserver une affinité.

Toutefois, de récentes expériences de dynamique moléculaire (durée de la simulation : 50 ns) indiqueraient que, pour le hit **MR34658**, le groupement nitro prendrait en fait une troisième pose. En déformant le domaine XIAP-BIR3, le composé se placerait en effet perpendiculairement à la pose imaginée ([Figure 60](#)).



**Figure 60.** Images de dynamique moléculaire du hit **MR34658** en début de simulation (molécule en bleu) et en fin de simulation (molécule en violet).

Concernant la deuxième génération de molécules, le composé **58** ne répond pas en FPA. Si l'allongement de la chaîne linker oriente le noyau pyridine dans une configuration optimale, c'est avec des substituant donneurs de liaison hydrogène que la molécule sera susceptible d'interagir avec de nouveaux acides aminés du domaine protéique, dont par exemple la tyrosine 324. Des groupements hydrophobes permettraient quant à eux une interaction avec les résidus de la poche P4.

## 5-2- Criblage sur le domaine XIAP-BIR2

Bien que les molécules synthétisées durant mes deux stages aient été conçues pour être des inhibiteurs du domaine XIAP-BIR3, nous nous sommes intéressés à leur affinité pour XIAP-BIR2. Ce domaine est pour rappel capable de se lier et ainsi d'inhiber les caspases activatrices 3 et 7. Un inhibiteur de XIAP-BIR2 serait donc capable de restaurer l'activité apoptotique de ces caspases. De plus, très peu de ligands spécifiques de XIAP-BIR2 sont décrits dans la littérature.

La FPA étant une méthode maîtrisée par le laboratoire concernant le domaine XIAP-BIR3, il a été décidé de développer ce test sur XIAP-BIR2. Seules trois publications discutent de l'application de la FPA sur ce domaine.<sup>118,119,120</sup> Malheureusement, en reproduisant ou adaptant les protocoles, il n'a pas été possible de mesurer une affinité.

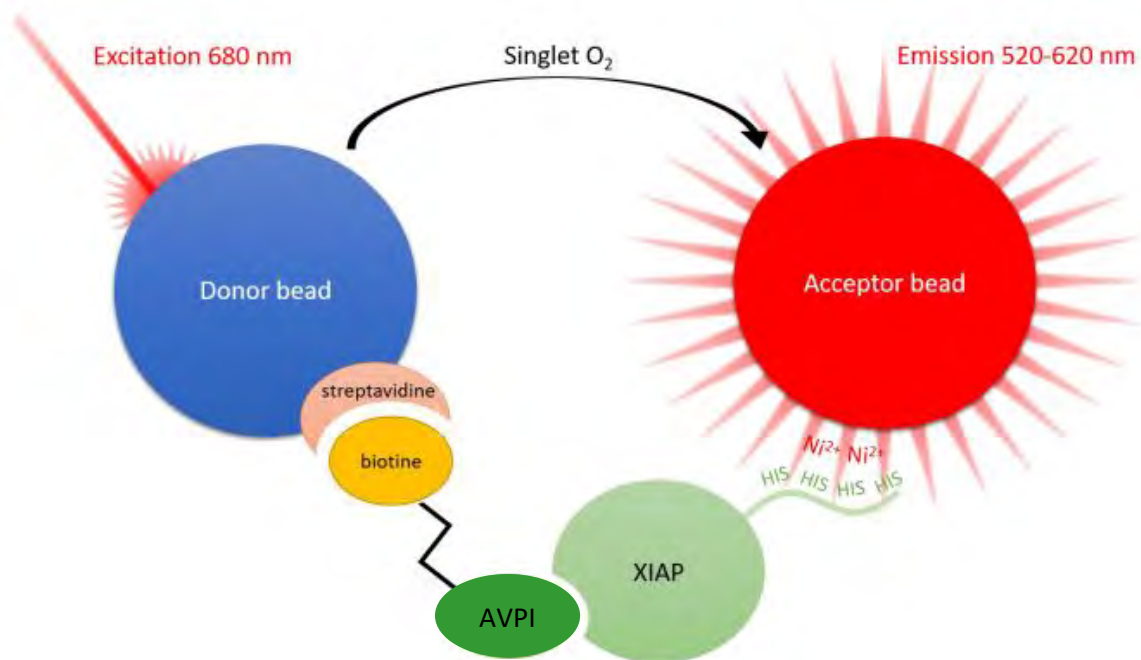
Il a donc été décidé de s'orienter vers une méthode de criblage alternative: l'Alphascreen® (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay), technologie développée par PerkinElmer et basée sur la luminescence. Adaptée à notre projet, en voici le principe : d'une part, une bille donneuse (BD) couplée à la streptavidine est capable de se lier au tétrapeptide AVPI biotinylé. D'autre part, une bille acceptrice (BA) possédant des ions nickel à sa surface interagit avec le domaine XIAP-BIR2 présentant un tag histidine. Ainsi, si AVPI et XIAP-BIR2 interagissent, les BD et BA sont à proximité. L'excitation de la BD à une longueur d'onde de 680 nm libère alors un oxygène singulet. Celui-ci va exciter la BA, qui va émettre un signal entre 520 et 620 nm (Figure 61). Il est à noter que cette excitation ne peut avoir lieu que si les BD et BA sont situées à une distance assez courte (< 200 nm).

---

<sup>118</sup> González-López, M.; Welsh, K.; Finlay, D.; Ardecky, R.; Ganji, S.; Su, Y.; Yuan, H.; Teriete, P.; Mace, P.; Riedl, S.; Vuori, K.; Reed, J.; Cosford, N. Design, Synthesis and Evaluation of Monovalent Smac Mimetics That Bind to the BIR2 Domain of the Anti-Apoptotic Protein XIAP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (14), 4332–4336.

<sup>119</sup> Hennessy, E.; Adam, A.; Aquila, B.; Castriotta, L.; Cook, D.; Hattersley, M.; Hird, A.; Huntington, C.; Kamhi, V.; Laing, N.; Li, D.; MacIntyre, T.; Omer, C.; Oza, V.; Patterson, T.; Repik, G.; Rooney, M.; Saeh, J.; Sha, L.; Vasbinder, M.; Wang, H.; Whitston, D. Discovery of a Novel Class of Dimeric Smac Mimetics as Potent IAP Antagonists Resulting in a Clinical Candidate for the Treatment of Cancer (AZD5582). *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (24), 9897–9919.

<sup>120</sup> Flygare J.; Beresini, M.; Budha, N.; Chan, H.; Chan, I.; Cheeti, S.; Cohen, F.; Deshayes, K.; Doerner, K.; Eckhardt, S.; Elliott, L.; Feng, B.; Franklin, M.; Reisner, S.; Gazzard, L.; Halladay, J.; Hymowitz, S.; La, H.; LoRusso, P.; Maurer, B.; Murray, L.; Plise, E.; Quan, C.; Stephan, J.; Young, S.; Tom, J.; Tsui, V.; Um, J.; Varfolomeev, E.; Vucic, D.; Wagner, A.; Wallweber, H.; Wang, L.; Ware, J.; Wen, Z.; Wong, H.; Wong, J.; Wong, M.; Wong, S.; Yu, R.; Zobel, K.; Fairbrother, W. Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 4101-4113.



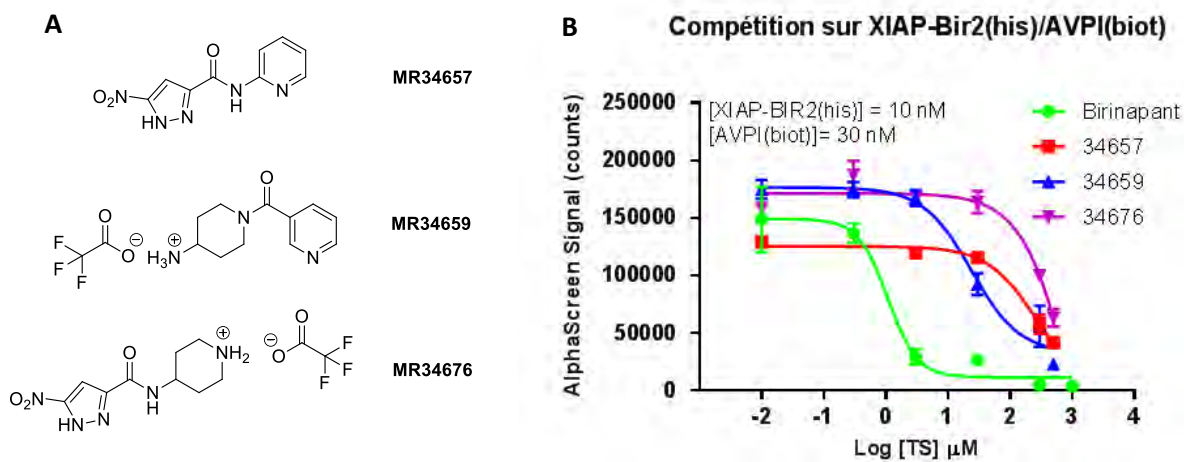
**Figure 61.** Principe de l'AlphaScreen®, appliqué à l'étude d'interaction protéine-protéine sur le domaine XIAP-BIR2, d'après Martin Giret.

Cette méthode peut être appliquée au criblage de nos composés : si une molécule présente une affinité pour le domaine XIAP-BIR2, il va y avoir compétition avec AVPI. Si le térapeptide est déplacé, les BD et BA ne seront plus à proximité, empêchant l'excitation de la BA par l'oxygène singulet. Aucun signal ne sera donc détecté : une diminution de la luminescence est alors observée. Cette méthode présente de plus plusieurs avantages :

- facilité à mettre en place et à miniaturiser.
- relativement peu coûteuse.
- plus sensible que la FPA.
- ne nécessitant pas de grande quantité de protéine.

Le test de criblage a été mis en place par Martin Giret et le Dr. Marie Jouanne. Des résultats préliminaires ont ainsi pu être obtenus pour 12 molécules. Il est important de préciser que l'expérience n'a été conduite qu'une seule fois. Le birinapant, utilisé en tant que contrôle positif, présente une  $CI_{50}$  de l'ordre du micromolaire. Cette valeur concorde avec la  $CI_{50}$  de 45 nM, décrite dans la littérature pour la protéine XIAP (il n'existe pas de  $CI_{50}$  du birinapant pour le domaine XIAP-BIR2 spécifiquement). Il est intéressant de constater que les molécules possédant une affinité pour le domaine XIAP-BIR3 sont également affines de XIAP-BIR2 ([Figure 62](#)) :

- **MR34659 (3)**, qui présente la meilleure affinité pour XIAP-BIR2, avec une  $CI_{50}$  de l'ordre de la dizaine de micromolaire.
- **MR34657 (11)**, dont la  $CI_{50}$  est de l'ordre de la centaine de micromolaire.
- **MR34676 (52)** enfin, avec une  $CI_{50}$  de l'ordre du millimolaire.



**Figure 62. (A)** Structure des composés **MR34657**, **MR34659**, **MR34676**. **(B)** Signal de luminescence en fonction de la concentration en composé testé.

L'approche de *drug design* employée dans le projet consiste en la synthèse et au criblage de molécules de bas poids moléculaire afin de déterminer dans un premier temps un *lead*. Or, les grandes similitudes structurales entre XIAP-BIR2 et XIAP-BIR3 expliquent pourquoi les hits, de petites tailles, ne sont pas sélectifs et présentent une affinité pour les deux domaines.

Des modulations des hits permettront de gagner en sélectivité, en cherchant à cibler soit le domaine XIAP-BIR2 soit le domaine XIAP-BIR3.

# Conclusion et perspectives

Un total de 60 molécules a été synthétisé au cours de ces stages effectué au CERMN et 45 d'entre elles ont pu être évaluées par FPA sur le domaine XIAP-BIR3. 3 hits ont été identifiés : **MR34657**, **MR34658** et **MR34659**.

Des modulations des composés nitrés **MR34657** et **MR34658** ont été effectuées. Ces modulations consistaient au remplacement du noyau pyridine par un cycle pipéridine ou pipérazine. Elles visaient ainsi à augmenter l'affinité des molécules pour le domaine XIAP-BIR3, dans l'hypothèse où les composés **MR34657** et **MR34658** adoptent une pose orientant le groupement nitro vers la poche P4. Les pourcentages d'inhibition en FPA de 20% à 0,5 mM obtenus pour les composés **48** et **49** issus de ces modulations, semblent corroborer cette hypothèse.

Concernant les molécules de seconde génération, la poursuite des travaux est nécessaire. Afin de concevoir des molécules sélectives de XIAP-BIR3, il s'agira dans un premier temps d'augmenter le nombre d'interactions avec les acides aminés constituant le feuillet  $\beta$  au niveau du site de liaison, pour améliorer l'affinité des molécules vis-à-vis du domaine protéique. Il sera ensuite envisagé de cibler des acides aminés spécifiques du domaine XIAP-BIR3 pour obtenir des composés sélectifs. La tyrosine 324 est par exemple spécifique de la protéine XIAP. Chez les autres membres de la famille des IAP, cet acide aminé est remplacé par une phénylalanine. Ainsi, en ciblant cette tyrosine, on augmenterait la sélectivité des composés pour XIAP.

Les molécules **MR34657**, **MR34659** et **MR34676**, affines pour le domaine XIAP-BIR3, présentent également une affinité pour XIAP-BIR2 avec une  $CI_{50}$  allant de la dizaine de micromolaire au millimolaire. Il existe des différences significatives entre le domaine XIAP-BIR2 et les autres domaines des IAPs.<sup>97,98</sup> Ces hits pourront ainsi être pharmacomodulés spécifiquement pour augmenter l'affinité pour ce domaine, afin de développer des inhibiteurs sélectivité vis-à-vis de XIAP-BIR2.

Afin de vérifier la sélectivité de nos composés, ceux-ci seront également testés par FPA, afin de mesurer leur affinité pour cIAP1 et cIAP2.

## Experimental section

Commercial reagents were used as received without additional purification. Melting points were determined by Stuart SMP50. IR spectra were recorded on a PerkinElmer BX FT-IR spectrophotometer. The band positions are given in reciprocal centimeters ( $\text{cm}^{-1}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spectra were recorded on a Bruker AVANCE III 400 Mhz spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million downfield from tetramethylsilane as an internal standard and coupling constants in hertz (Hz). Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to the solvent resonance. Multiplicities are given in following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, dd = doublet of doublets, ddd = doublets of doublets of doublets, dt = doublet of triplets, brs = broad range single. Low resolution mass spectrometry was performed by using a spectrometer LC-MS Waters alliance 2695 (ESI+). Chromatography was carried out on a column using silica gel Kieselgel Merck 60 (0.063-0.200 mm) as the stationary phase. Flash chromatography were performed using a Biotage Isolera One flash chromatography. The eluting solvent indicated for each purification was determined by thin layer chromatography (TLC) performed on 0.2 mm precoated plates of silica gel 60F-264 (Merck) and spots were visualized using an ultraviolet-light lamp.

**General procedure A for amidification using acid chloride:** To a mixture of the appropriated carboxylic acid in thionyl chloride (10 mL) were added five drops of DMF. The mixture was refluxed 3 h and concentrated under *vacuo*. The residue was washed with 5 mL of DCM and evaporated three times to give a yellow solid. The yellow solid was dissolved in dry THF (5 mL). A solution of the appropriated amine and triethylamine (3.0 eq.) in THF (5 mL) was added dropwise and the mixture was stirred 16 h at 22°C. The crude mixture was concentrated *in vacuo*, 40 mL of acid water (pH = 4) was added and the aqueous layer was extracted with 3x40 mL of AcOEt. The organic layer was washed with 40 mL of a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ , dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under *vacuo*.

**General procedure B for amidification:** To a stirred suspension of the corresponding carboxylic acid (200 mg, 1.62 mmol, 1.0 eq.) and *N*-*boc*-amine (3.24 mmol, 2.0 eq.) in DMF (10 mL) were added sequentially HATU (1.54 g, 4.06 mmol, 2.5 eq.) and DIPEA (1.14 mL, 6.48 mmol, 4.0 eq.) at 22°C. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with 25 mL of water and 25 mL of DCM, extracted with 2x25 mL of

DCM, then washed with 4x100 mL of water and 100 mL of 1M NaOH. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under *vacuo*.

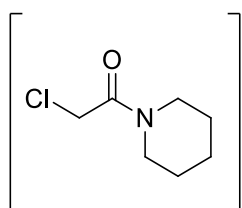
**General procedure C for amidification using coupling agents:** To a stirred solution of the corresponding carboxylic acid (1.0 eq.) in DMF (10 mL) was added sequentially HATU (1.6 eq.), the appropriated amine (1.6 eq.), triethylamine (3.0 eq.). The resulting solution was stirred at at the desired temperature until the reaction complete. The mixture was concentrated under *vacuo* and purified by silica gel chromatography column.

**General procedure D for *N*-boc amine deprotection:** To a stirred suspension of the corresponding amine (1.0 eq.) in DCM (1 mL) was added dropwise TFA (10 eq.) at 22°C. The resulting mixture was stirred 30 minutes at 22°C. The obtained solution was concentrated to dryness, washed with 3x2 mL of DCM and concentrated *in vacuo* to give the corresponding salt.

**General procedure E for *N*-boc amine deprotection:** To a stirred suspension of the corresponding amine (1.0 eq.) in DCM (10 mL) was added dropwise TFA at 22°C. The resulting mixture was stirred at 22°C until reaction complete. The obtained solution was concentrated to dryness, washed with 3x10 mL of DCM and concentrated *in vacuo* to give the corresponding salt.

## 2-(Piperazin-1-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (**1e**) was obtained in 4 steps:

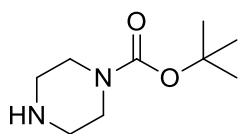
- Synthesis of 2-chloro-1-(piperidin-1-yl)ethanone (**1a**).<sup>101</sup>



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>ClNO  
Molecular Weight: 161.63 g.mol<sup>-1</sup>

According to a protocol described by Durgapal *and al.*<sup>101</sup> to a stirred solution of piperidine (0.19 mL, 2.00 mmol, 1.00 eq.) in DCM (25 mL) cooled at 0°C were added dropwise triethylamine (0.28 mL, 2.02 mmol, 1.01 eq.) and chloroacetyl chloride (0.16 mL, 2.00 mmol, 1.00 eq.). The mixture was stirred 30 minutes at 0°C and then overnight at 22°C. The reaction was quenched with 30 mL of water, extracted with 2x30 mL of DCM and washed with 15 mL of HCl (0.5 M). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a colorless oil (407 mg, quant.). The compound was immediately engaged in the next step reaction without further purification.

- Synthesis of *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate (**1c**).<sup>102</sup>

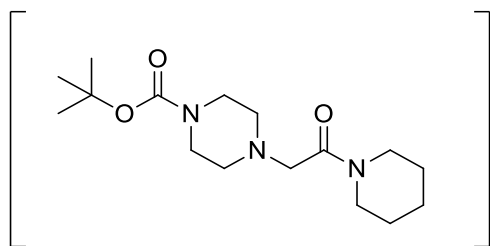


Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 186.25 g.mol<sup>-1</sup>

According to a protocol described by Sengmany *and al.*,<sup>102</sup> to a stirred solution of piperazine (1.00 g, 11.60 mmol, 1.0 eq.) in DCM (25 mL) cooled at 0°C was added dropwise over 15 minutes di-*tert*-butyl dicarbonate (1.27 g, 5.80 mmol, 0.5 eq.). The mixture was then stirred 1h at 22°C. The mixture was filtered, evaporated, solubilized with 15 mL of water and filtrated another time. The filtrate was saturated with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and then extracted with 3x10 mL of Et<sub>2</sub>O. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under *vacuo* to give a colorless solid (685 mg, 64%). No further purification was necessary. **M.P.:** 70°C (lit.:<sup>121</sup> 70°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.32 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 2.74 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 1.40 (s, 9H), one non-visible protons in these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 155.0, 79.7, 46.0 (4C), 28.6 (3C).

<sup>121</sup> Tahtaoui, C., Parrot, I.; Klotz, P.; Guillier, F.; Galzi, J.; Hibert, M.; Ilien, B. Fluorescent Pirenzepine Derivatives as Potential Bitopic Ligands of the Human M1 Muscarinic Receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4300-4315.

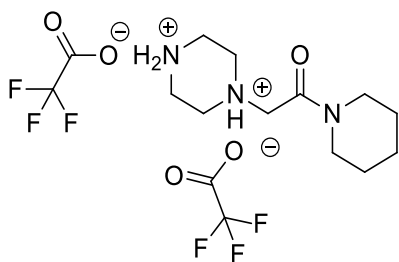
- Synthesis of *tert*-butyl 4-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethyl)piperazine-1-carboxylate (**1d**):



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 311.42 g.mol<sup>-1</sup>

Adapting from a protocol described by John *and al.*<sup>122</sup>, to a solution of 2-chloro-1-(piperidin-1-yl)ethanone **1a** (322 mg, 2.00 mmol, 1.00 eq.) in DMF (10 mL) were added *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate **1d** (407 mg, 2.20 mmol, 1.10 eq.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (412 mg, 3.00 mmol, 1.50 eq.). The mixture was stirred 96h at 60°C. The reaction was quenched with 20 mL of water and 20 mL of DCM and then extracted with 2x20 mL of DCM. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a yellow oil. To the crude residue was added 20 mL of cyclohexane and the obtained suspension was filtered to give **1d** as a yellow solid (180 mg, 29%).

- Synthesis of 2-(piperazin-1-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (**1e**):

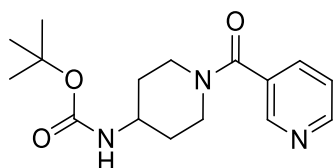


Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>F<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (base: C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O)  
Molecular Weight: 441,37 (base: 211.30) g.mol<sup>-1</sup>

**2-(Piperazin-1-yl)-1-(piperidin-1-yl)ethanone (1-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethyl)piperazine-1,4-diium ditrifluoroacetate) (1e):** Following the general **procedure D** using *tert*-butyl 4-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethyl)piperazine-1-carboxylate **1d** (180 mg, 0.58 mmol), **1e** was obtained as an orange oil (270 mg, quant.). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 4.39 (s, 2H), 3.75-3.63 (m, 7H), 3.53-3.46 (m, 2H), 3.34-3.28 (m, 2H), 1.67-1.50 (m, 7H), three non-visible labile protons under these conditions; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 162.9 (q, *J* = 35.4 Hz, 2C), 161.4, 116.2 (q, *J* =

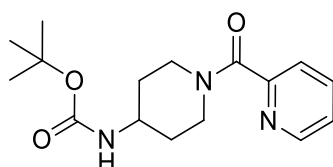
<sup>122</sup> John, J.; Loorthuraja, R.; Antoniuk, E.; Bergens, S. Catalytic hydrogenation of functionalized amides under basic and neutral conditions. *Catal. Sci. Technol.* 2014, 5, 1181-1186.

289.8 Hz, 2C), 56.8, 53.8, 49.5, 45.9, 43.5, 40.3, 30.1, 25.5, 24.8, 23.3. **IR (KBr):**  $\nu$  max 3440, 2952, 2866, 1674, 1448, 1203, 1126, 1020, 989, 839, 800, 724, 707  $\text{cm}^{-1}$ .



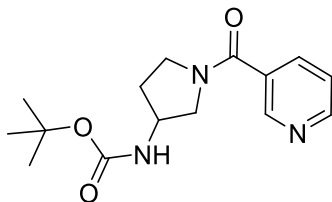
Chemical Formula:  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$   
Molecular Weight: 305.37  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**tert-Butyl (1-nicotinoylpiperidin-4-yl)carbamate (2, MR34648):** Following the general **procedure B**, using nicotinic acid and 4-(*N*-Boc-amino)piperidine (650 mg), **2** was isolated after silica gel column chromatography (DCM/MeOH gradient of 100:0 to 98:2) as an orange solid (169 mg, 34%). **M.P.:** 218°C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.65 (dd,  $J$  = 1.6 Hz, 4.9 Hz, 1H), 8.63 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 7.72 (dt,  $J$  = 2.0 Hz, 7.8 Hz, 1H), 7.35 (ddd,  $J$  = 0.7 Hz, 4.9 Hz, 7.8 Hz, 1H), 4.73-4.39 (m, 2H), 3.84-3.54 (m, 2H), 3.24-2.85 (m, 2H), 2.13-1.87 (m, 2H), 1.43(s, 9H), 1.35-1.26 (m, 2H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  167.8, 155.0, 150.8, 147.8, 134.9, 131.7, 123.5, 79.7 47.8, 46.7, 41.3, 33.2, 32.1, 28.4 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3255, 2971, 2930, 1706, 1632, 1323, 1244, 1168, 1042, 744  $\text{cm}^{-1}$ .



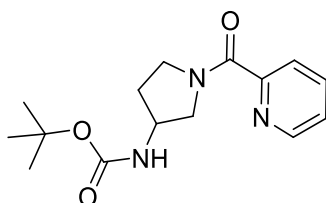
Chemical Formula:  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$   
Molecular Weight: 305.37  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**tert-Butyl (1-picolinoylpiperidin-4-yl)carbamate (3, MR34650):** Following the general **procedure B**, using picolinic acid and 4-(*N*-Boc-amino)piperidine (650 mg), **3** was isolated after silica gel column chromatography (94/5/1 AcOEt/MeCN/ $\text{NH}_3$ ) as a colorless solid (221 mg, 41%). **M.P.:** 245.3 °C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.57 (dd,  $J$  = 0.7 Hz, 4.8 Hz, 1H), 7.81-7.75 (m, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.36-7.30 (m, 1H), 4.61 (d,  $J$  = 13.3 Hz, 1H), 4.57-4.45 (m, 1H), 3.89 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H), 3.78-3.65 (m, 1H), 3.19-3.09 (m, 1H), 3.02-2.91 (m, 1H), 2.05 (d,  $J$  = 13.4 Hz, 1H), 1.93 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 1.52-1.37 (m, 2H), 1.43 (s, 9H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  167.6, 163.0 (q,  $J$  = 34.4 Hz) 155.1, 154.2, 148.4, 137.1, 124.5, 123.6, 116.3 (q,  $J$  = 287.0 Hz), 79.6, 47.9, 46.1, 41.4, 33.0, 32.2, 28.4 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3325, 2977, 2932, 1629, 1523, 1321, 1169, 1046, 1025, 750  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 291.35 g.mol<sup>-1</sup>

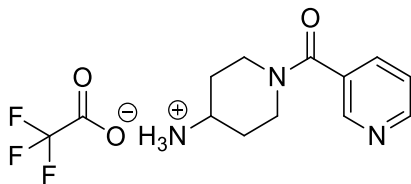
**tert-Butyl (1-(nicotinoyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (4, MR34661):**<sup>123</sup> Following the general **procedure B**, using nicotinic acid and 3-(*N*-Boc-amino)pyrrolidine (602 mg), **4** was isolated after silica gel column chromatography (AcOEt) as a brown oil (143 mg, 30%). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):** (mixture of rotamers 1 and 2)  $\delta$  8.62 (dd,  $J$  = 1.4 Hz, 8.7 Hz, 1H), 8.54 (dd,  $J$  = 1.6 Hz, 5.0 Hz, 1H), 7.93-7.87 (m, 1H), 7.43 (dd,  $J$  = 5.0 Hz, 7.9 Hz, 1H), 4.16-4.08 (m, 0.4H), 4.01-3.94 (m, 0.6H, rotamer 1), 3.72 (dd,  $J$  = 6.4 Hz, 12.7 Hz, 0.4H, rotamer 2), 3.68-3.42 (m, 2.6H, rotamer 1 for 0.6H), 3.39 (dd,  $J$  = 3.9 Hz, 12.3 Hz, 0.6H, rotamer 1), 3.25 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 0.4H, rotamer 2), 2.17-2.00 (m, 1H), 1.91-1.75 (m, 1H), 1.36 (s, 4H), 1.30 (s, 5H), one non-visible labile proton under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  167.3, 156.5, 153.7, 148.1, 137.3, 125.0, 123.1, 79.7, 54.0, 44.5, 31.6, 29.6, 27.3 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3454, 3304, 2977, 1693, 1620, 1533, 1444, 1669, 739, 713 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 291.35 g.mol<sup>-1</sup>

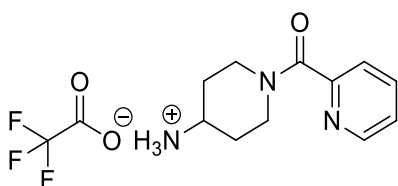
**tert-Butyl (1-(picolinoyl)pyrrolidin-3-yl)carbamate (5, MR34662):** Following the general **procedure B**, using picolinic acid and 3-(*N*-Boc-amino)pyrrolidine (602 mg), **5** was isolated after silica gel column chromatography (AcOEt) as a colorless solid (193 mg, 41%). **M.P.:** 273.2 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):** (mixture of rotamers 1 and 2)  $\delta$  8.64 (d,  $J$  = 18.7 Hz, 1H), 7.97 (tt,  $J$  = 2.4 Hz, 7.8 Hz, 1H), 7.79-7.74 (m, 1H), 7.55-7.49 (m, 1H), 4.25-4.17 (m, 0.4H, rotamer 1), 4.15-4.07 (m, 0.6H, rotamer 2), 3.93-3.82 (m, 1H), 3.82-3.66 (m, 2H), 3.53 (dd,  $J$  = 4.4 Hz, 12.4 Hz, 1H), 2.26-2.12 (m, 1H), 2.00-1.87 (m, 1H), 1.48 (s, 4H, rotamer 1), 1.43 (s, 5H, rotamer 2), one non-visible labile proton under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  167.3, 156.5, 153.7, 148.1, 137.3, 125.0, 123.1, 79.7, 54.0, 44.5, 31.6, 29.6, 27.3 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3292, 2982, 1708, 1616, 1536, 1447, 1416, 1279, 1248, 1174, 1092, 748, 697 cm<sup>-1</sup>.

<sup>123</sup> Brochu, C.; Grand-Maître, C.; Joly, M.; Kuhn, C.; Bertrand-Laperle, M.; Pesant, M. Hepatitis C inhibitor compounds. *PCT. Int. Appl.* **2013**, WO2013026162A1.



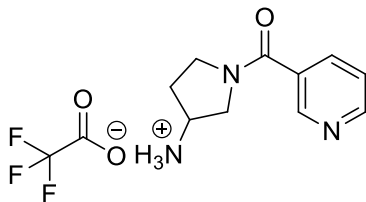
Chemical Formula:  $C_{13}H_{16}F_3N_3O_3$  (base:  $C_{11}H_{15}N_3O$ )  
Molecular Weight: 319.28 (base: 205.26)  $g \cdot mol^{-1}$

**(4-Aminopiperidin-1-yl)(pyridin-3-yl)methanone trifluoroacetate) (6, MR34659):** Following the general **procedure D** using *tert*-butyl (1-nicotinoylpiperidin-4-yl)carbamate **2** (100 mg, 0.32 mmol), **6** was obtained as a brown oil (84 mg, 80%).  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):**  $\delta$  8.98 (s, 1H), 8.92 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 8.69 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 8.19 (dd,  $J$  = 6.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 4.68-4.57 (m, 1H), 3.80-3.67 (m, 1H), 3.62-3.48 (m, 1H), 3.43-3.29 (m, 1H), 3.12-2.99 (m, 1H), 2.26-2.16 (m, 1H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.78-1.59 (m, 2H), three non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ ):**  $\delta$  165.2, 144.7, 143.0, 140.4, 134.1, 127.7, 47.6, 45.9, 40.9, 29.4, 28.7, two non-visible carbons under these experimental conditions (trifluoroacetate salt); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3419, 2152, 1683, 1461, 1297, 1203, 1134, 838, 801, 723  $cm^{-1}$ .



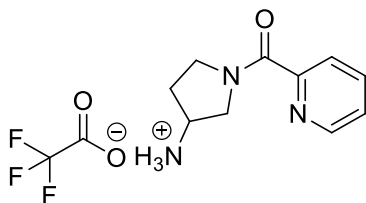
Chemical Formula:  $C_{13}H_{16}F_3N_3O_3$  ( $C_{11}H_{15}N_3O$ )  
Molecular Weight: 319.28 (205.26)  $g \cdot mol^{-1}$

**(4-Aminopiperidin-1-yl)(pyridin-2-yl)methanone trifluoroacetate) (7, MR34660):** Following the general **procedure D** using *tert*-butyl (1-picolinoylpiperidin-4-yl)carbamate **3** (70 mg, 0.23 mmol), **7** was obtained as a brown oil (87 mg, quant.).  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):**  $\delta$  8.54 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H), 8.04 (dt,  $J$  = 1.6 Hz, 7.8 Hz, 1H), 7.60 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J$  = 1.2 Hz, 7.8 Hz, 1H), 4.56-4.47 (m, 1H), 3.67-3.56 (m, 1H), 3.51-3.37 (m, 1H), 3.22-3.10 (m, 1H), 3.01-2.90 (m, 1H), 2.16-2.07 (m, 1H), 1.95-1.85 (m, 1H), 1.68-1.46 (m, 2H), three non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ ):**  $\delta$  167.7, 150.1, 147.6, 140.5, 126.3, 123.3, 47.7, 45.5, 40.7, 29.5, 28.8; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3436, 2099, 1683, 1456, 1431, 1288, 1205, 1139, 810, 803, 724  $cm^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{12}H_{14}F_3N_3O_3$  ( $C_{10}H_{13}N_3O$ )  
Molecular Weight: 305.26 (191.23) g.mol<sup>-1</sup>

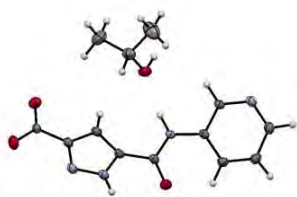
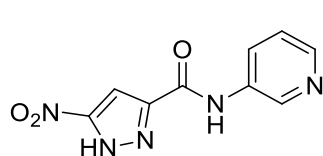
**(4-Aminopyrrolidin-1-yl)(pyridin-3-yl)methanone trifluoroacetate) (8, MR34666):** Following the general **procedure D** using *tert*-butyl (1-nicotinoylpyrrolidin-3-yl)carbamate **4** (70 mg, 0.24 mmol), **8** was obtained as a brown oil (72 mg, quant.). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** (mixture of rotamers 1 and 2)  $\delta$  8.93 (s, 1H), 8.83 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 8.68-8.62 (m, 1H), 8.08 (dd,  $J$  = 6.0 Hz, 7.2 Hz; 1H), 4.08-4.00 (m, 0.6H, rotamer 1), 3.99-3.84 (m, 1.4H, rotamer 2 for 0.4H), 3.81-3.51 (m, 3H), 2.47-2.29 (m, 1H), 2.19-2.02 (m, 1H), three non-visible labile protons under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):** (mixture of rotamers 1 and 2)  $\delta$  164.8, 144.9 (rotamer 1), 144.7 (rotamer 2), 143.5 (rotamer 2), 143.3 (rotamer 1), 144.7 (rotamer 1), 144.6 (rotamer 2), 134.32 (rotamer 1), 134.26 (rotamer 2), 127.7, 116.3 (q,  $J$  = 290.3 Hz), 51.9 (rotamer 2), 50.2 (rotamer 2), 49.8 (rotamer 1), 48.8 (rotamer 1), 50.0 (rotamer 1), 44.6 (rotamer 2), 29.5 (rotamer 1), 27.7 (rotamer 2), one non-visible carbon under these experimental conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3480, 2155, 1683, 1452, 1203, 1137, 839, 801, 724 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula:  $C_{12}H_{14}F_3N_3O_3$  ( $C_{10}H_{13}N_3O$ )  
Molecular Weight: 305.26 (191.23) g.mol<sup>-1</sup>

**(4-Aminopyrrolidin-1-yl)(pyridin-2-yl)methanone trifluoroacetate) (9, MR34665):** Following the general **procedure D** using *tert*-butyl (1-picolinoylpyrrolidin-3-yl)carbamate **5** (100 mg, 0.34 mmol), **9** was obtained as a brown oil (102 mg, quant.). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** (mixture of rotamers 1 and 2)  $\delta$  8.87-8.78 (m, 1H), 8.59-8.46 (m, 1H), 8.14 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 23.7 Hz, 1H), 8.08-8.78 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 0.6H, rotamer 1), 4.09-4.01 (m, 1.4H, rotamer 2 for 0.4H), 3.93-3.72 (m, 3H), 2.54-2.40 (m, 1H), 2.26-2.13 (m, 1H), two non-visible labile protons under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** (mixture of rotamers 1 and 2)  $\delta$  168.3 (rotamer 2), 168.0 (rotamer 1), 160.9 (q,  $J$  = 58.8 Hz), 156.0, 105.7, 140.1, 128.0, 127.0 (rotamer 1), 126.0 (rotamer 2), 118.6 (q,  $J$  = 243.0 Hz), 54.7 (rotamer 1), 52.9 (rotamer 1), 52.8 (rotamer 2), 50.7 (rotamer 2), 48.9 (rotamer 2), 47.1

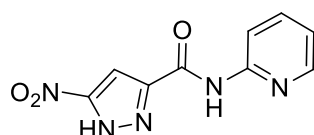
(rotamer 1), 32.9 (rotamer 2), 30.1 (rotamer 1); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3501, 2127, 1682, 1451, 1205, 1139, 839, 801, 723  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_5\text{O}$

Molecular Weight: 233.18  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**5-Nitro-*N*-(pyridin-3-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (10, MR34658):** To a stirred suspension of 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (300 mg, 1.90 mmol, 1.0 eq.) and 3-aminopyridine (268 mg, 2.90 mmol, 1.6 eq.) in DMF (10 mL) was added sequentially EDC-HCl (456mg, 2.90 mmol, 1.6 eq.), HOBT monohydrate (458 mg, 2.90 mmol, 1.6 eq.) and triethylamine (801  $\mu\text{L}$ , 5.70 mmol, 3.0 eq.). The reaction was stirred 48h at 22°C. The mixture was then concentrated *in vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (AcOEt) as a colorless solid (190 mg, 43%). **M.P.:** > 300 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 2.19 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 233.92;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  15.08 (brs, 1H), 10.68 (brs, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.16 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.45 (s, 1H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  156.4, 155.8, 145.4, 141.9, 139.1, 134.8, 127.6, 123.9, 102.5; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3582, 3505, 3402, 2921, 1706, 1678, 1634, 1542, 1466, 1334, 800  $\text{cm}^{-1}$ .

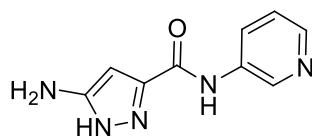


Chemical Formula:  $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_3$

Molecular Weight: 233.19  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

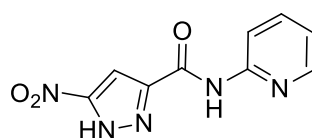
**5-Nitro-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-2-carboxamide (11, MR34657):** Following the general **procedure C** 16h at 50°C, using 5-nitro-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (300 mg, 1.91 mmol), 2-aminopyridine (287 mg, 3.05 mmol), HATU (1.16 g mg, 3.05 mmol) and triethylamine (804  $\mu\text{L}$ , 5.73 mmol), **11** was isolated after silica gel column chromatography (gradient of DCM/AcOH 99/1 to DCM/AcOEt/AcOH 79/20/1) and then a filtration with DCM as a colorless solid (187 mg, 42%). **M.P.:** > 300 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 2.19 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 233.92;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  15.01 (brs, 1H), 11.22 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.22 (s, 1H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  156.8, 156.3, 151.7, 148.6, 139.2,

139.0, 121.0, 115.4, 103.3. **IR (KBr):**  $\nu$  max 3433, 3328, 3138, 1686, 1579, 1540, 1437, 1301, 1007, 781  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$   
Molecular Weight: 203.20  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

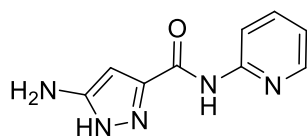
**5-Amino-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (12, MR34664):** To a stirred suspension of 5-Nitro-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide **10** (190 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) in 1:1 AcOEt/EtOH (50 mL) was added 10% Pd/C (57 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq.). After flushing with nitrogen, the reaction was stirred overnight under  $\text{H}_2$  atmosphere at 22°C. The mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was concentrated to dryness to give a grey solid (141 mg, 85%). **M.P.:** 205 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 0.98 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 204.06$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  12.13 (brs, 1H), 10.01 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.19 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H), 8.13 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J$  = 4.6 Hz, 8.2 Hz, 1H), 5.70 (brs, 1H), 5.14 (brs, 2H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  144.5, 142.3, 136.1, 127.3, 123.8, 88.8 (determined by HSQC), 3 carbons non-visible in these conditions ; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3397, 3329, 2851, 1667, 1536, 1434, 1304, 1225, 1151, 779  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_3$   
Molecular Weight: 233.19  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

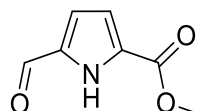
**5-Nitro-N-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (11, MR34657):** To a stirred suspension of 5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (300 mg, 1.90 mmol, 1.0 eq.) and 2-aminopyridine (352 mg, 3.80 mmol, 2.0 eq.) in pyridine (10 mL) was added sequentially HATU (1.83 g, 4.80 mmol, 2.5 eq.) and DIPEA (1.32 mL, 7.60 mmol, 4.0 eq.) at 22°C. The resulting mixture was stirred 96h at 80°C. The obtained solution was diluted with 10 mL of water, extracted with 3x40 mL of AcOEt and then washed with 3x50 mL of water. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo*. To the crude residue was added 50 mL of  $\text{Et}_2\text{O}$ . The suspension was filtered to give a brown solid (155 mg, 35 %). **M.P.:** > 300 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 2.19 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 233.92$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  15.01 (brs, 1H), 11.22 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.22 (s, 1H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100**

**MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  156.8, 156.3, 151.7, 148.6, 139.2, 139.0, 121.0, 115.4, 103.3. **IR (KBr):**  $\nu$  max 3433, 3328, 3138, 1686, 1579, 1540, 1437, 1301, 1007, 781 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O  
Molecular Weight: 203.20 g.mol<sup>-1</sup>

**5-Amino-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (13, MR34663):** To a stirred suspension of 5-nitro-N-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide **11** (128 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) in 1:1 AcOEt/EtOH (50 mL) was added 10% Pd/C (57 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq.). After flushing with nitrogen, the reaction was stirred overnight under H<sub>2</sub> atmosphere at 22°C. The mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was concentrated to dryness to give a brown solid (109 mg, quant.). **M.P.:** 218 °C. **LC/MS (ESI+):** tr = 1.84 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 204.06; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  12.27 (brs, 1H), 9.41 (brs, 1H), 8.39 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.92-7.86 (m, 1H), 7.22-7.16 (m, 1H), 5.86 (brs, 1H), 5.34 (brs, 2H, NH<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  151.7, 148.6, 138.7, 120.0, 113.6, 88.0 (determined by HSQC), 3 carbons non-visible in these conditions ; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3355, 3128, 2963, 1677, 1605, 1545, 1489, 1261, 1015, 804, 701 cm<sup>-1</sup>.

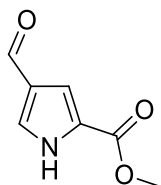


Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 153.14 g.mol<sup>-1</sup>

**Methyl 5-formyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (14):**<sup>106</sup> According to a protocol described by Schmuck *and al.*,<sup>124</sup> to DMF (680  $\mu$ L, 8.70 mmol, 1.1 eq.) cooled at 0°C was added dropwise POCl<sub>3</sub> (1.34 g, 8.70 mmol, 1.1 eq.) over 3 minutes. The mixture was then diluted with 5 mL of DCM at 22°C then cooled again at 0°C. Methyl 1H-pyrrole-2-carboxylate (1.00 g, 8.00 mmol, 1.0 eq.) in 5 mL of DCM was added dropwise over 5 minutes at 0°C then the mixture was refluxed over 30 minutes. The solution was cooled at 0°C and the the iminium intermediate was hydrolyzed by a sodium acetate solution (3.60 g in 10 mL of water). The organic layer was kept and the aqueous layer was extracted with 3x30 mL of Et<sub>2</sub>O. The four organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a crude residue

<sup>124</sup> Schmuck, C. Self-assembly of 2-(guanidiniocarbonyl)-pyrrole-4-carboxylate in dimethyl sulfoxide: an entropy driven oligomerization. *Tetrahedron*. **2001**, 57, 3063-3067.

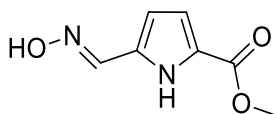
purified by flash chromatography (CyHex/AcOEt gradient of 7/3 to 6/4) as a yellow solid (565 mg, 46%). **M.P.:** 98°C (lit.: 98-99°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.82 (brs, 1H), 9.65 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 180.4, 160.8, 134.4, 128.1, 119.8, 115.4, 52.3.



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>

Molecular Weight: 153.14 g.mol<sup>-1</sup>

**Methyl 4-formyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (15):**<sup>106</sup> According to a protocol described by Schmuck *and al.*,<sup>124</sup> to DMF (680 μL, 8.70 mmol, 1.1 eq.) cooled at 0°C was added dropwise POCl<sub>3</sub> (1.34 g, 8.70 mmol, 1.1 eq.) over 3 minutes. The mixture was then diluted with 5 mL of DCM at 22°C then cooled again at 0°C. Methyl 1H-pyrrole-2-carboxylate (1.00 g, 8.00 mmol, 1.0 eq.) in 5 mL of DCM was added dropwise over 5 minutes at 0°C then the mixture was refluxed over 30 minutes. The solution was cooled at 0°C and the the iminium intermediate was hydrolyzed by a sodium acetate solution (3.60 g in 10 mL of water). The organic layer was kept and the aqueous layer was extracted with 3x30 mL of Et<sub>2</sub>O. The four organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a crude residue purified by flash chromatography (CyHex/AcOEt gradient of 7/3 to 6/4) as an orange solid (299 mg, 24%). **M.P.:** 122 °C (lit.: 104°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.85 (s, 1H), 9.58 (brs, 1H), 7.57 (dd, *J* = 3.3 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 2.4 z, 1.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 185.7, 161.3, 128.4, 127.8, 124.9, 114.3, 52.2.

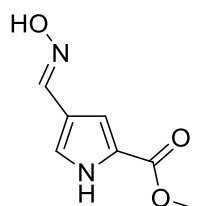


Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molecular Weight: 168.15 g.mol<sup>-1</sup>

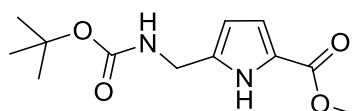
**Methyl 5-((hydroxyimino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate (16):**<sup>106</sup> According to a protocol described by Hawker *and al.*,<sup>106</sup> to methyl 5-formyl-1H-pyrrole-2-carboxylate **14** (600 mg, 3.92 mmol, 1.0 eq.) in water at 65°C was added hydroxylamine hydrochloride ( 427 mg, 6.41 mmol, 1.5 eq.) and potassium carbonate (347 mg, 2.5 mmol, 0.6 eq.) in 20 ml of water. The mixture was stirred 5 minutes at 65°C, cooled at 0°C and the filtered. A yellow solid (388 mg, 59%) was obtained in a 5/6 mixture of the two diastereoisomers, no further purification was necessary.

**M.P.:** 143°C (lit.:<sup>125</sup> 123°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  10.61/10.26 (brs, 1H), 9.09 (brs, 1H), 8.07 (brs, 1H), 6.93/6.90 (dd,  $J$  = 3.9 Hz, 2.5 Hz, 1H), 6.50/6.42 (dd,  $J$  = 3.9 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.90/3.89 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  162.9/162.8, 145.4/142.1, 129.0/125.1, 124.8/123.6, 120.0/117.8, 118.2/113.6, 51.9.



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 168.15 g.mol<sup>-1</sup>

**Methyl 4-((hydroxyimino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate (17):**<sup>106</sup> According to a protocol described by Hawker *and al.*,<sup>106</sup> to methyl 4-formyl-1H-pyrrole-2-carboxylate **15** (1.88 g, 12.3 mmol, 1.0 eq.) in water at 65°C was added hydroxylamine hydrochloride ( 1.28 g, 18.4 mmol, 1.5 eq.) and potassium carbonate (1.04 g, 7.52 mmol, 0.6 eq.) in 20 ml of water. The mixture was stirred 5 minutes at 65°C, cooled at 0°C and the filtered. A colorless solid (1.32 g, 64%) was obtained in a 1/10 mixture of the two diastereoisomers, no further purification was necessary. **M.P.:** 197 °C (lit.:<sup>125</sup> 204°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  8.00/7.26 (s, 1H), 7.67/7.07 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 7.21/7.20 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 3.84/3.83 (s, 3H), one labile non-visible proton in these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  162.5, 142.2, 129.5, 124.5, 116.6, 114.5, 52.2.

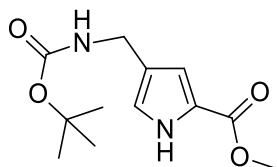


Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 254.28 g.mol<sup>-1</sup>

**Methyl 5-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate (18):**<sup>106</sup> According to a protocol described by Hawker *and al.*,<sup>106</sup> to a solution of methyl 5-((hydroxyimino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate **16** (1.32 g, 7.85 mmol, 1.0 eq.) in AcOEt (80mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (1.88 g, 8.61 mmol, 1.1 eq.) and 10% Pd/C (132 mg, 1.24 mmol, 0.2 eq.). After flushing with nitrogen, the reaction was stirred overnight under H<sub>2</sub> atmosphere at 22°C. The mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was concentrated to dryness to give a crude residue purified by silica gel column chromatography

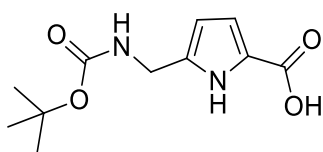
<sup>125</sup> Anderson, H.; Lee, S. The preparation and some reactions of brominated pyrrole derivatives. Can. J. Chem. 1965, 43, 409-414.

(CyHex/AcOEt gradient of 8/2 to 7/3) as a colorless solid (1.39 g, 70%). **M.P.:** 129 °C (lit.:<sup>126</sup> 115-116°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.81 (brs, 1H), 6.79 (dd,  $J$  = 3.6 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.06 (t,  $J$  = 3.2 Hz, 1H), 5.10 (brs, 1H), 4.25 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.45 (s, 9H; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  161.6, 156.6, 135.4, 122.4, 115.4, 108.7, 80.2, 51.5, 37.5, 28.4 (3C).



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 254.28 g.mol<sup>-1</sup>

**Methyl 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate (19):**<sup>106</sup> According to a protocol described by Hawker *and al.*,<sup>106</sup> to a solution of methyl 4-((hydroxyimino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate **17** (360 mg, 2.14 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (40mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (512 mg, 2.35 mmol, 1.1 eq.) and 10% Pd/C (36 mg, 0.19 mmol, 0.2 eq.). After flushing with nitrogen, the reaction was stirred overnight under H<sub>2</sub> atmosphere at 22°C. The mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was concentrated to dryness to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (DCM/AcOEt gradient of 9/1 to 1/1) as a yellow solid (168 mg, 37%). **M.P.:** 124 °C (lit.:<sup>126</sup> 107-108°C). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  6.88 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 6.79 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), two non-visible labile protons under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  163.1, 158.5, 124.8.4, 123.3, 123.0, 115.8, 80.0, 51.7, 37.9, 28.8 (3C).

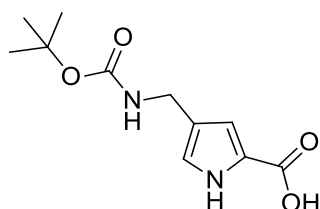


Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 240.26 g.mol<sup>-1</sup>

**5-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (20):**<sup>106</sup> Adapting from a protocol described by Zhang *and al.*,<sup>107</sup> to a solution of methyl 5-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate **18** (1.20 g, 4.68 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL of THF/MeOH/water (3/1/1) was added LiOH (1.36 g, 46.8 mmol, 10.0 eq.). The reaction was stirred 20h at 50°C. To the mixture concentrated *in vacuo* was added 30 mL of

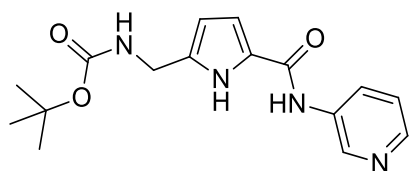
<sup>126</sup> Coquin, L.; Jourdan, F.; Pierrat, O.; Lowe, D.; Maxwell, A.; Picket, C.; Wall, M. Microcin b17 analogs and methods for their preparation and use. *PCT. Int. Appl.* **2005**, WO2006054102A1.

water, then the pH was adjusted to 1 with HCl 1N. The white suspension was extracted with 3x100 mL of AcOEt then the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, AcOH 975/20/5) as an orange oil (1.07 g, 95%). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  6.77 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 6.05 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 4.19 (s, 2H), 1.45 (s, 9H), three non-visible labile protons under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  164.4, 158.9, 137.1, 123.4, 117.0, 109.1, 80.4, 38.1, 28.7 (3C).



Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 240.26 g.mol<sup>-1</sup>

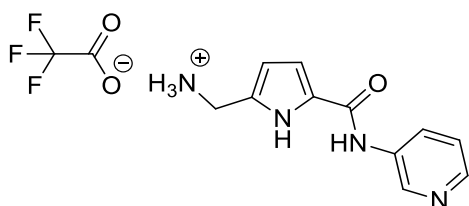
**4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (21):**<sup>106</sup> Adapting from a protocol described by Zhang *and al.*,<sup>107</sup> to a solution of methyl 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate **19** (100 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL of THF/MeOH/water (3/1/1) was added LiOH (93 mg, 3.90 mmol, 10.0 eq.) The reaction was stirred 5h at 50°C. To the mixture concentrated *in vacuo* was added 20 mL of water, then the pH was adjusted to 1 with HCl 1N. The yellow suspension was extracted with 3x40 mL of AcOEt then the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (CyHex/AcOEt, AcOH 75/20/5) as colorless solid (47 mg, 50%). **M.P.:** 154 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  6.83 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 6.75 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 4.07 (s, 2H), 1.44 (s, 9H), three non-visible labile protons under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  165.5, 158.4, 125.3, 124.3, 122.1, 115.2, 80.0, 30.0, 28.8 (3C).



Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 316.35 g.mol<sup>-1</sup>

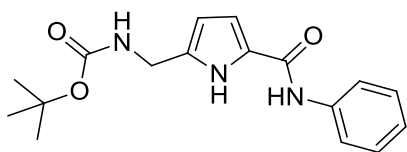
**tert-Butyl ((5-(pyridin-3-ylcarbamoyl)-1H-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate (22, MR34685):** Following the general **procedure C** 38h at 50°C, using 5-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-

1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid **20** (200 mg, 0.83 mmol), 3-aminopyridine (125 mg, 1.33 mmol), HATU (506 mg, 1.33 mmol) and triethylamine (350  $\mu$ L, 2.49 mmol), **22** was isolated after flash chromatography (AcOEt) as a colorless solid (59 mg, 22%). **M.P.**: 190 °C. **LC/MS (ESI+)**:  $t_r$  = 3.60 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 316.95;  **$^1H$  NMR (400 MHz, MeOD)**:  $\delta$  8.86 (brs, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 8.20 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.5 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.40 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.8 Hz, 1H), 6.97 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1H), 6.11 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 1.46 (s, 9H), three non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD)**:  $\delta$  161.8, 158.6, 144.6, 144.3, 137.9, 136.9, 129.4, 126.2, 125.2, 113.4, 109.1, 80.4, 38.1, 28.7 (3C); **IR (KBr)**:  $\nu$  max 3384, 3322, 2681, 1692, 1648, 1531, 1417, 1280, 1170, 1055, 864  $cm^{-1}$ .



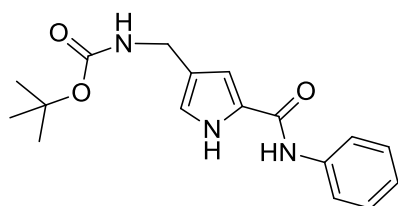
Chemical Formula:  $C_{13}H_{13}F_3N_4O_3$  (base:  $C_{11}H_{12}N_4O$ )  
Molecular Weight: 330.26 (base: 216.24)  $g \cdot mol^{-1}$

**(5-(Pyridin-3-ylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-3-yl)methanaminium 2,2,2-trifluoroacetate (23) (MR34686)**: Following the general **procedure E** for 2h, using *tert*-Butyl ((5-(pyridin-3-ylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate **22** (46 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.) and TFA (348  $\mu$ L, 4.50 mmol, 30 eq.), **23** was obtained as an orange oil (55 mg, quant.). **LC/MS (ESI+)**:  $t_r$  = 1.07 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 216.99 (base);  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )**:  $\delta$  9.32 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.59 (ddd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.4 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.51 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 8.02 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 5.9 Hz, 1H), 7.09 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 1H), 6.44 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 1H), 4.25 (s, 2H), five non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ )**:  $\delta$  162.9 (q,  $J$  = 35.3 Hz), 160.7, 138.3, 136.6, 135.9, 132.6, 129.4, 127.4, 125.1, 116.3 (q,  $J$  = 291.3 Hz), 114.2, 111.2, 35.4; **IR (KBr)**:  $\nu$  max 3445, 3262, 3052, 1674, 1553, 1266, 1206, 1129, 804, 740  $cm^{-1}$ .



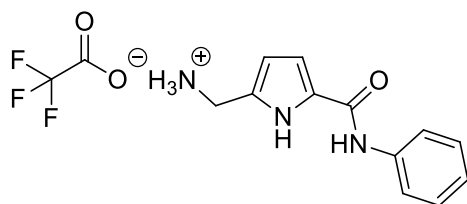
Chemical Formula:  $C_{17}H_{21}N_3O_3$   
Molecular Weight: 315.37  $g \cdot mol^{-1}$

***tert*-Butyl ((5-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate (24):** Following the general **procedure C** 20h at 22°C, using 5-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid **20** (100 mg, 0.42 mmol), aniline (61  $\mu$ L, 0.67 mmol), HATU (255 mg, 0.67 mmol) and triethylamine (177  $\mu$ L, 1.26 mmol), **24** was isolated after flash chromatography (CyHex/AcOEt 8/2) as a colorless solid (26 mg, 20%). **M.P.:** 202 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 4.98 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 315.96;  **$^1H$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  7.64-7.61 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 2H), 7.11-7.06 (m, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 6.09 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 1.46 (s, 9H), three non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  161.8, 158.6, 140.0, 136.3, 129.7 (2C), 126.7, 124.9, 121.9 (2C), 112.9, 109.0, 80.4, 38.1, 28.7 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3398, 2927, 2472, 2434, 1682, 1619, 1490, 1412, 1162, 1046, 746  $cm^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{17}H_{21}N_3O_3$   
Molecular Weight: 315.37  $g \cdot mol^{-1}$

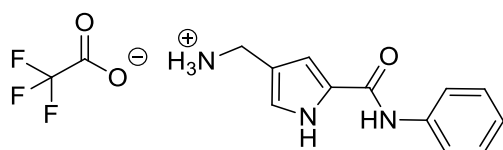
***tert*-Butyl ((4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate (25):** Following the general **procedure C** 8h at 50°C, using *tert*-Butyl ((4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate **21** (45 mg, 0.19 mmol), aniline (27  $\mu$ L, 0.30 mmol), HATU (114 mg, 0.30 mmol) and triethylamine (81  $\mu$ L, 10.57 mmol), **25** was isolated by flash chromatography (CyHex/AcOEt 8/2) as a colorless solid (22 mg, 37%). **M.P.:** 193°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 4.94 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 315.96;  **$^1H$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  7.65-7.60 (m, 2H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.11-7.06 (m, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 1.46 (s, 9H), three non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  161.8, 158.4, 139.9, 129.7 (2C), 127.2, 125.0, 124.4, 122.0, 121.9 (2C), 111.9, 80.0, 38.1, 28.8 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3431, 3362, 2972, 2928, 2428, 1701, 1656, 1541, 1493, 1250, 757, 692  $cm^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{14}H_{14}F_3N_4O_3$  (base:  $C_{12}H_{13}N_4O$ )  
Molecular Weight: 329.27 (base: 215.25)  $g \cdot mol^{-1}$

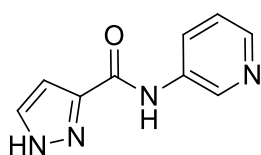
**(5-(Phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methanaminium 2,2,2-trifluoroacetate (26, MR34690):** Following the general **procedure E** 2h30 using *tert*-Butyl ((5-(phenylcarbamoyl)-

1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate **24** (21 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) and TFA (270  $\mu$ L, 0.35 mmol, 50 eq.), **26** was obtained as an orange solid (23 mg, quant.). **M.P.**: 96°C. **LC/MS (ESI+)**:  $t_r$  = 3.26 min,  $m/z$   $[M+H-NH_3]^+$  = 199.00;  **$^1H$  NMR (400 MHz, MeOD)**:  $\delta$  7.64 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.11 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 7.03 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1H), 6.37 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), five non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD)**:  $\delta$  161.3, 139.7, 129.8 (2C), 128.9, 128.6, 125.2, 122.0 (2C), 112.8, 111.7, 36.8, two carbons of the TFA non-visible under these conditions; **IR (KBr)**:  $\nu$  max 3431, 2910, 1678, 1634, 1539, 1205, 1133, 797, 749, 723  $cm^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{14}H_{14}F_3N_4O_3$  (base:  $C_{12}H_{13}N_4O$ )  
Molecular Weight: 329.27 (base: 215.25)  $g \cdot mol^{-1}$

**(4-(Phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methanaminium 2,2,2-trifluoroacetate (27, MR34691)**: Following the general **procedure E** 3h using *tert*-Butyl ((4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)methyl)carbamate **25** (21 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) and TFA (270  $\mu$ L, 0.35 mmol, 50 eq.), **27** was obtained as an orange solid (21 mg, 91%). **M.P.**: 167°C **LC/MS (ESI+)**:  $t_r$  = 3.07 min,  $m/z$   $[M+H-NH_3]^+$  = 199.00;  **$^1H$  NMR (400 MHz, MeOD)**:  $\delta$  7.63 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1.1 Hz; 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 7.14-7.09 (m, 1H), 7.12 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 7.05 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 4.04 (s, 2H), five non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD)**:  $\delta$  161.2, 139.7, 129.8 (2C), 128.3, 125.2, 123.7, 121.9 (2C), 111.7, 112.5, 36.8, two carbons of the TFA non-visible under these conditions; **IR (KBr)**:  $\nu$  max 3420, 2963, 2919, 1638, 1609, 1546, 1439, 1175, 801, 760  $cm^{-1}$ .

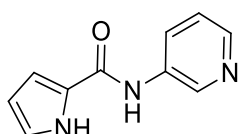


Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O

Molecular Weight: 188.19 g.mol<sup>-1</sup>

**N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (28, MR34655):**<sup>127</sup> To a stirred suspension of 1H-pyrazole-3-carboxylic acid (500 mg, 4.46 mmol, 0.90 eq.) and 3-aminopyridine (466 mg, 4.96 mmol, 1.00 eq.) in DMF (10 mL) was added sequentially EDC-HCl (1.05 g, 5.45 mmol, 1.10 eq.) and HOBt hydrate (745 mg, 4.86 mmol, 0.98 eq.) at 25°C. The resulting mixture was stirred 96h at 25°C. The obtained reaction was quenched with 10 mL of water, extracted with 3x40 mL of AcOEt and 3x40 mL of DCM and then washed with 3x100 mL of water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (AcOEt/NH<sub>3</sub> gradient of 100:0 to 99:1). **28** was isolated as a colorless solid (212 mg, 25%). **M.P.:** 291.3 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 8.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.30-8.24 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.43 (ddd, *J* = 0.7 Hz, 4.9 Hz, 8.4 Hz 1H), 6.89 (s, 1H), two non-visible labile protons under these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 143.8, 141.0, 135.8, 129.9, 128.2, 123.9, 105.5, two non-visible carbons under these experimental conditions; **IR (KBr):** *ν* max 3446, 3069, 1628, 1586, 1434, 1400, 890, 729, 699 cm<sup>-1</sup>.

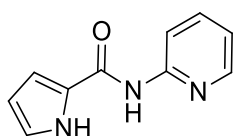
<sup>127</sup> Dragovich, P.; Zhao, G.; Baumeister, T.; Bravo, B.; Giannetti, A.; Ho, Y.; Hua, R.; Li, G.; Liang, X.; Ma, X.; O'Brien, T.; Oh, A.; Skelton, N.; Wang, C.; Wang, W.; Wang, Y.; Xiao, Y.; Yuen, P.; Zak, M.; Zhao, Q.; Zheng, X. Fragment-based design of 3-aminopyridine-derived amides as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 954-962.



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O  
Molecular Weight: 187.20 g.mol<sup>-1</sup>

**N-(Pyridin-3-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (29, MR34653):**<sup>128</sup> To pyrrole-2-carboxylic acid (300 mg, 2.70 mmol, 1.0 eq.) was added oxalyl chloride (1.15 mL, 13.5 mmol, 5.0 eq.). The mixture was stirred 2 h at 22°C and concentrated under vacuo. The residue was washed with 2 mL of DCM and evaporated to give a black solid. 300 mg (2.32 mmol, 1.0 eq.) of this black solid was dissolved in DCM (15 mL). 3-Aminopyridine (240 mg, 2.55 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (0.94 mL, 6.96 mmol, 3.0 eq.) were added and the mixture was stirred 48 h at 22°C. The crude mixture was concentrated in vacuo, 40 mL of water was added and the aqueous layer was extracted with 3x40 mL of AcOEt. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to give a yellow crude residue purified by silica gel column chromatography (AcOEt) as a colorless solid (130 mg, 30%). **M.P.:** > 300 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 11.74 (brs, 1H, NH), 9.94 (s, 1H, NH), 8.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 1.3 Hz, 4.6 Hz, 1H), 8.14 (ddd, *J* = 1.5 Hz, 2.4 Hz, 8.3 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 4.7 Hz, 8.3 Hz, 1H), 7.10-7.06 (m, 1H), 7.00-6.97 (m, 1H), 6.20-6.16 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 159.9, 144.3, 142.0, 136.5, 127.2, 126.0, 124.0, 123.5, 112.3, 109.5. **IR (KBr):** *ν* max 3295, 2913, 1641, 1553, 1538, 1425, 1334, 1129, 1041, 771 cm<sup>-1</sup>.

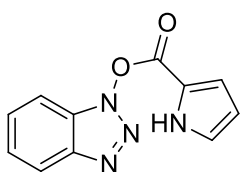
<sup>128</sup> Sörgel, S.; Defieber, C.; Ronan Le, V.; Gross, S.; Körber, K.; Culbertson, D.; Anspaugh, D. Pyridine compounds for controlling invertebrate pests. *PCT. Int. Appl.* **2012**, WO2012034961A1.



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O

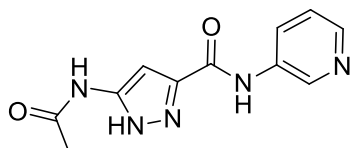
Molecular Weight: 187.20 g.mol<sup>-1</sup>

**N-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (30, MR34656):** To pyrrole-2-carboxylic acid (300 mg, 2.70 mmol, 1.0 eq.) was added oxalyl chloride (1.15 mmol, 13.5 mmol, 5.0 eq.). The mixture was stirred 2h at 22°C then evaporated. The solid was rinsed with 2 mL of DCM then evaporated again to give a black solid. To 2-aminopyridine (240 mg, 2.55 mmol, 1.1 eq.) in DCM (15 mL) was added triethylamine (0.94 mL, 6.96 mmol, 3.0 eq.) then dropwise the black solid (300 mg, 2.32 mmol, 1.0 eq.) in DCM (20 mL). The mixture was stirred 48h at 22°C. The obtained solution was concentrated *in vacuo* then solubilised with 40 mL of water, extracted with 3x40 mL of AcOEt. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to give a yellow crude residue purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH gradient of 100:0 to 99:1) as a colorless solid (186 mg, 43%). **M.P.:** > 300 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 11.79 (brs, 1H, NH), 10.39 (s, 1H, NH), 8.40 (ddd, *J* = 0.8 Hz, 1.9 Hz, 4.8 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.88-7.82 (m, 1H), 7.34-7.31 (m, 1H), 7.16 (ddd, *J* = 1.0 Hz, 4.9 Hz, 7.3 Hz, 1H), 7.07-7.04 (m, 1H), 6.24-6.19 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 159.7, 152.9, 148.3, 138.5, 126.0, 123.7, 120.0, 114.6, 113.3, 109.7; **IR (KBr):** *ν* max 3305, 3121, 3077, 2961, 1638, 1579, 1532, 1434, 1333, 1143, 779, 753 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula:  $C_{11}H_8N_4O_2$   
Molecular Weight: 228,21 g.mol<sup>-1</sup>

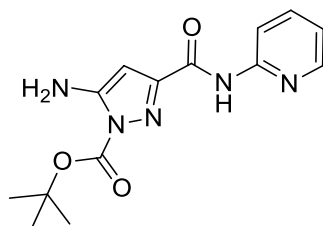
**1H-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 1H-pyrrole-2-carboxylate (31, MR34649)** : To a stirred suspension of pyrrole-2-carboxylic acid (495 mg, 4.46 mmol, 0.90 eq.) and 2-aminopyridine/3-aminopyrrole (466 mg, 4.96 mmol, 1.00 eq.) in DMF (10 mL) was added sequentially EDC-HCl (1.05 g, 5.45 mmol, 1.10 eq.) and HOBt hydrate (861 mg, 5.45 mmol, 1.10 eq.) at 22°C. The resulting mixture was stirred 24 h at 80°C. The obtained solution was quenched with 25 mL of water, extracted with 3x25 mL of AcOEt, 3x25 mL of DCM and then washed with 5x100 mL of water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH gradient of 100:0 to 99:1) as a colorless solid (337/320 mg, 33/32%). **M.P.:** 205.4 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.56 (brs, 1H, NH), 8.08 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.57-7.51 (m, 1H), 7.48 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.46-7.41 (m, 1H), 7.40-7.37 (m, 1H), 7.23-7.21 (m, 1H), 6.47-6.44 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  156.8, 143.5, 129.0, 128.7, 127.0, 124.9, 120.5, 119.9, 116.5, 112.0, 108.5; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3140, 3129, 3078, 2978, 1761, 1401, 1374, 1318, 1096, 1023, 904, 742 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula:  $C_{11}H_{11}N_5O_2$   
Molecular Weight: 245.24 g.mol<sup>-1</sup>

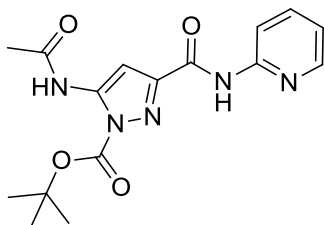
**5-Acetamido-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (32, MR34683)**: To a suspension of 5-amino-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide **12** (80 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.) in AcOEt (50 mL) was added dropwise acetic anhydride (76  $\mu$ L, 0.78 mmol, 2.0 eq.). The mixture

was stirred 6h at 22°C. The solvent was removed under *vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (gradient of AcOEt to AcOEt/MeOH 9/1) as a colorless solid (58 mg, 61%). **M.P.:** 289°C. **LC/MS (ESI+):** tr = 3.04 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 245.96; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 13.31 (brs, 1H,), 10.62 (brs, 1H,), 10.44 (brs, 1H), 8.95 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 4.7 Hz, 1.4 Hz, 1H), 8.18 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 8.3 Hz, 4.6 Hz, 2H), 2.05 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 167.7, 158.4, 148.1, 144.7, 141.9, 136.6, 135.4, 127.3, 123.6, 97.4, 23.1. **IR (KBr):** *ν* max 3328, 3211, 3105, 1686, 1610, 1290, 996, 809, 707 cm<sup>-1</sup>.



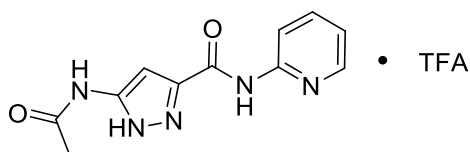
Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 303.32 g.mol<sup>-1</sup>

**tert-Butyl 5-amino-3-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate (33):** To a solution of 5-amino-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide **13** (80 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.) in AcOEt (50mL) at 50°C was added triethylamine (161 μL, 1.17 mmol, 3.0 eq) and di-*tert*-butyl dicarbonate (188 mg, 0.86 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred 24h at 50°C. The solvent was removed under *vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (CyHex/AcOEt gradient of 7/3 to 8/2) as a colorless solid (46 mg, 39%). **M.P.:** 138°C. **LC/MS (ESI+):** tr = 4.40 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 303.96; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 9.44 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.3 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.18 (ddd, *J* = 7.3 Hz, 4.8 Hz, 0.9 Hz, 1H), 6.59 (s, 2H), 5.79 (s, 1H), 1.61 (s, 9H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 161.8, 154.3, 152.4, 151.3, 149.8, 149.2, 139.8, 123.3, 115.5, 88.3, 87.4, 28.2 (3C). **IR (KBr):** *ν* max 3459, 3376, 2982, 2930, 1740, 1618, 1531, 1484, 1301, 1142, 1000, 777 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula:  $C_{16}H_{19}N_5O_3$   
Molecular Weight: 345.35 g.mol<sup>-1</sup>

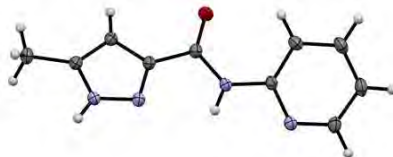
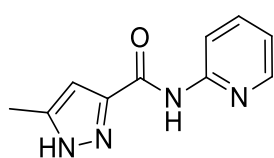
**tert-Butyl 5-acetamido-3-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate (34):** To a solution of *tert*-butyl 5-acetamido-3-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate **33** (50 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.) in dioxane (20 mL) at 50°C was added acetyl chloride (36  $\mu$ L, 0.51 mmol, 3.0 eq.). The mixture was stirred 3h at 50°C. The solvent was removed under *vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (CyHex/AcOEt 1/1) as a colorless solid (18 mg, 31%). **M.P.:** 62°C. **LC/MS (ESI+):** tr = 4.69 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 345.92; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  11.97 (s, 1H); 10.17 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.39 (ddd, *J* = 4.9 Hz, 1.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.21 (ddd, *J* = 7.3 Hz, 4.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.64 (s, 9H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  169.6, 160.8, 152.2, 150.8, 149.3, 149.1, 149.0, 143.4, 139.9, 121.4, 115.5, 98.6, 89.1, 28.1 (3C), 23.8. **IR (KBr):**  $\nu$  max 3366, 2978, 2929, 1739, 1521, 1438, 1302, 1122, 998, 779 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula:  $C_{13}H_{12}F_3N_5O_4$  (base:  $C_{11}H_{11}N_5O_2$ )  
Molecular Weight: 352.26 (base: 245.24) g.mol<sup>-1</sup>

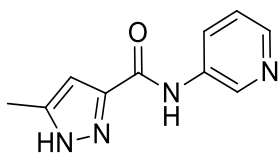
**5-Acetamido-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide, trifluoroacetate salt (1:1) (35, MR34692):** Following the general **procedure E** 1h using *tert*-butyl 5-acetamido-3-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate **34** (18 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) and TFA (40  $\mu$ L, 0.52 mmol, 10 eq.), **35** was obtained as a colorless solid (18 mg, quant.). **M.P.:** 240°C. **LC/MS (ESI+):** tr = 2.98 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 245.96; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  10.72 (brs, 1H), 10.60 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.25-7.1 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), two non-visible protons in these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  167.7,

158.6, 158.3 (q,  $J = 36.9$  Hz), 151.0, 147.0, 146.8, 139.3, 120.0, 115.9 (q,  $J = 291.1$  Hz) (determined by 600 MHz NMR), 114.8, 96.8, 23.0, one non-visible carbon in these conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3432, 2556, 2923, 2399, 1659, 1614, 1435, 1303, 1151, 769  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$   
Molecular Weight: 202.21  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**5-Methyl-N-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (36, MR34675):** To a stirred solution of 5-methyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (118 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq.) in DMF (10 mL) was added HATU (425 mg, 1.12 mmol, 1.2 eq.), 2-aminopyridine (97 mg, 1.03 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (261  $\mu\text{L}$ , 1.88 mmol, 2.0 eq.). The mixture was refluxed 3h. The reaction was quenched with 40 mL of water at pH 5, extracted with 3x40 mL of AcOEt and washed with 40 mL of a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  and 40 mL of a saturated solution of NaCl. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under *vacuo* to give a crude residue purified by reversed-phase flash chromatography (water/MeCN gradient of 8/2 to 1/1) as a colorless solid (32 mg, 17%). **M.P.:** 192  $^{\circ}\text{C}$ . **LC/MS (ESI+):**  $t_r = 2.29$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 202.99$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  8.20 (dd,  $J = 4.9$  Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.16 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.73 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 7.4 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J = 7.3$  Hz, 4.9 Hz, 0.9 Hz 1H), 6.50 (s, 1H), 2.25 (s, 3H), two labile non-visible protons in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  162.8, 152.6, 149.0, 147.6, 142.6, 139.9, 121.0, 115.3, 105.7, 10.5; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3408, 3341, 2925, 1686, 1575, 1436, 1301, 1169, 1059, 773  $\text{cm}^{-1}$ .

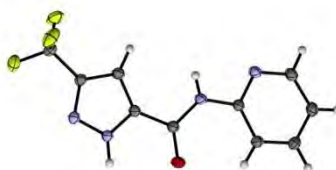
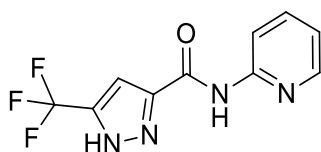


Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O

Molecular Weight: 202.21 g.mol<sup>-1</sup>

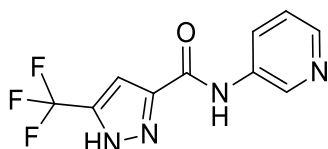
**5-Methyl-N-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (37, MR34679):**<sup>129</sup> To a stirred solution of 5-methyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (118 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq.) in DMF (10 mL) was added HOBt monohydrate (171 mg, 1.12 mmol, 1.2 eq.), EDC-HCl (215 mg, 1.12 mmol, 1.2 eq.), 3-aminopyridine (97 mg, 1.03 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (261 µL, 1.88 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred 72h at 22°C. The reaction was quenched with 40 mL of a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, extracted with 3x40 mL of AcOEt and washed with 40 mL of a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and 40 mL of saturated solution of NaCl. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under *vacuo* to give a crude residue purified by reversed-phase flash chromatography (water/MeCN/TFA gradient of 999/0/1 to 499/500/1) as a colorless solid (35 mg, 19%). **M.P.:** >300 °C. **LC/MS (ESI+):** t<sub>r</sub> = 1.29 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 202.99; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 13.23 (brs, 1H), 10.32 (s, 1H), 9.15 (brs, 1H), 8.34 (brs, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 7.9 Hz, 4.4 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 2.34 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 163.4, 146.8, 143.0, 140.3, 140.2, 137.2, 137.0, 127.4, 106.0, 10.6.

<sup>129</sup> Persson, T.; Yde, C.; Rasmussen, J.; Rasmussen, T.; Guerra, B.; Issinger, O.; Nielsen, J. Pyrazole carboxamides and carboxylic acids as protein kinase inhibitors in aberrant eukaryotic signal transduction: induction of growth arrest in MCF-7 cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3963-3970.



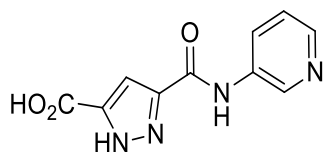
Chemical Formula:  $C_{10}H_7F_3N_4O$   
Molecular Weight: 256.18 g.mol<sup>-1</sup>

**N-(pyridin-2-yl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (38, MR34684):** Following the general **procedure C** during 48h at 22°C, using 5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (50 mg, 0.28 mmol), 2-aminopyridine (42 mg, 0.45 mmol), HATU (170 mg, 0.45 mmol) and triethylamine (117  $\mu$ L, 0.84 mmol), **38** was isolated after silica gel column chromatography (DCM/AcOEt 8/2) as a colorless solid (48 mg, 67%). **M.P.:** 229 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 3.78 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 256.96; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  8.35 (ddd,  $J$  = 4.9 Hz, 1.8 Hz, 0.8 Hz, 1H), 8.20 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 7.4 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.17 (ddd,  $J$  = 7.4 Hz, 4.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), two labile non-visible protons in these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  151.2, 147.9, 138.3, 120.1, 114.8, 104.2, four non-visible carbons in these conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3318, 3135, 3044, 2919, 1662, 1441, 1179, 1128, 973, 779 cm<sup>-1</sup>.



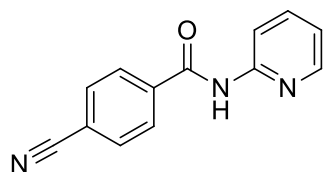
Chemical Formula:  $C_{10}H_7F_3N_4O$   
Molecular Weight: 256.18 g.mol<sup>-1</sup>

**N-(pyridin-2-yl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (39, MR34680):** Following the general **procedure C** during 48h at 22°C, using 5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (50 mg, 0.28 mmol), 3-aminopyridine (42 mg, 0.45 mmol), HATU (170 mg, 0.45 mmol) and triethylamine (117  $\mu$ L, 0.84 mmol), **39** was isolated after silica gel column chromatography (AcOEt) as a colorless solid (70 mg, quant.). **M.P.:** 201 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 2.58 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 256.91; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  14.73 (s, 1H), 10.58 (s, 1H), 8.90 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.37 (dd,  $J$  = 4.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 8.15 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.3 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.6 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  157.2, 145.7, 142.3, 139.0, 135.3, 127.9, 124.2, 105.0, two non-visible carbons in these conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3424, 3133, 2918, 2852, 1661, 1550, 1421, 1258, 1149, 971, 833, 559 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula:  $C_{10}H_8N_4O_3$   
Molecular Weight:  $232.20 \text{ g.mol}^{-1}$

**3-(Pyridin-3-ylcarbamoyl)-1H-pyrazole-5-carboxylic acid (40, MR3478):** A solution of 1H-pyrazole-3,5-dicarboxylic acid (300 mg, 1.92 mmol, 1.0 eq.) and HATU (729 mg, 1.92 mmol, 1.0 eq.) in DMF (5 mL) was stirred 10 min at 22°C. 3-Aminopyridine (180 mg, 1.92 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (540  $\mu\text{L}$ , 3.84 mmol, 2.0 eq.) were then added and the mixture was stirred 48h at 22°C. The solvent was removed under *vacuo* and the residue was washed with 200 mL of DCM to give a crude residue purified by reversed-phase flash chromatography (water/MeCN/ $\text{NH}_3$  gradient of 99/0/1 to 49/50/1) as a colorless solid (420 mg, 94%). **M.P.:** >300 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r = 1.02 \text{ min}$ ,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 232.97$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):**  $\delta$  10.27 (s, 1H), 8.98 (d,  $J = 2.4 \text{ Hz}$ , 1H), 8.25 (dd,  $J = 4.7 \text{ Hz}$ , 1.4 Hz, 1H), 8.22 (ddd,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 2.5 Hz, 1.5 Hz 1H), 7.34 (dd,  $J = 8.3 \text{ Hz}$ , 4.7 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), two labile non-visible protons in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):**  $\delta$  162.4, 161.5, 146.1, 145.0, 144.6, 142.4, 136.1, 127.5, 123.8, 106.7; **IR (KBr):**  $\nu_{\text{max}}$  3426, 3306, 3140, 1682, 1538, 1427, 1352, 994, 815  $\text{cm}^{-1}$ .

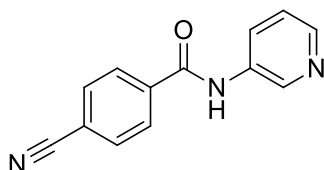


Chemical Formula:  $C_{13}H_9N_3O$   
Molecular Weight:  $223.23 \text{ g.mol}^{-1}$

**4-Cyano-N-(pyridin-2-yl)benzamide (41, MR34668):**<sup>130</sup> Following the general **procedure A**, using 4-cyanobenzoic acid (250 mg, 1.70 mmol, 1.0 eq.), 2-aminopyridine (213 mg, 2.27 mmol, 1.5 eq.) and triethylamine (520  $\mu\text{L}$ , 3.75 mmol), **41** was isolated after silica gel column chromatography (DCM/AcOEt/ $\text{NH}_3$  gradient of 94/5/1 to 89/10/1) as a colorless solid (102 mg, 30%). **M.P.:** 207°C (litt.:<sup>130</sup> 202-204°C). **LC/MS (ESI+):**  $t_r = 3.27 \text{ min}$ ,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 223.95$ ;

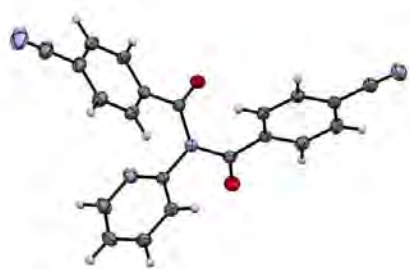
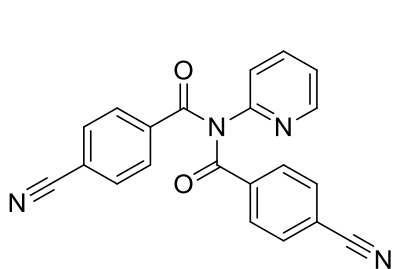
<sup>130</sup> Liu, Y.; Sun, H.; Huang, Z.; Ma, C.; Lin, A.; Yao, H.; Xu, J.; Xu, S. Metal-Free Synthesis of N-(Pyridine-2-yl)amides from Ketones via Selective Oxidative Cleavage of C(O)-C(Alkyl) Bond in Water. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 14307-14313.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  9.07 (brs, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.18 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.81-7.75 (m, 3H), 7.12 (ddd,  $J$  = 3.7 Hz, 2.5 Hz, 0.5 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  164.1, 151.1, 147.9, 138.8, 138.2, 132.7 (2C), 128.0 (2C), 120.5, 117.8, 115.8, 114.5.



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O  
Molecular Weight: 223.23 g.mol<sup>-1</sup>

**4-Cyano-N-(pyridin-3-yl)benzamide (42, MR34669):**<sup>131</sup> Following the general **procedure A**, using 4-cyanobenzoic acid (250 mg, 1.70 mmol, 1.0 eq.), 3-aminopyridine (213 mg, 2.27 mmol, 1.5 eq.) and triethylamine (520  $\mu$ L, 3.75 mmol), **42** was isolated after silica gel column chromatography DCM/MeOH gradient of 95/5 to 90/10) as a colorless solid (100 mg, 30%). **M.P.:** 163.7°C (lit.:<sup>131</sup> 105.2-106.2). **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 2.43 min,  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 223.95; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.69 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 8.44 (dd,  $J$  = 4.7 Hz, 1.4 Hz, 1H), 8.28 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1.4 Hz, 1H), 8.00 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.88 (brs, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.7 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  164.6, 145.9, 141.7, 138.1, 134.6, 132.6 (2C), 128.1, 128.0 (2C), 124.0, 117.8, 115.7. **IR (KBr):**  $\nu$  max 3353, 3046, 2223, 1675, 1542, 1480, 1294, 1018, 1146, 810 cm<sup>-1</sup>.

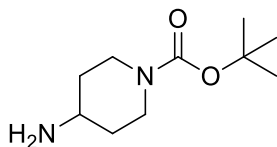


Chemical Formula: C<sub>21</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 352.35 g.mol<sup>-1</sup>

**4-cyano-(4-cyanophenyl)-N-(pyridin-2-yl)benzamide (43, MR34670):** Following the general **procedure A**, using 4-cyanobenzoic acid (250 mg, 1.70 mmol, 1.0 eq.), 2-Aminopyridine (213 mg, 2.27 mmol, 1.5 eq.) and triethylamine (520  $\mu$ L, 3.75 mmol), **43** was isolated after silica gel column chromatography (DCM/AcOEt/NH<sub>3</sub> gradient of 94/5/1 to 89/10/1) as a colorless solid (100 mg, 30%). **M.P.:** 195°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 4.39 min,  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> = 352.85; **<sup>1</sup>H NMR (400**

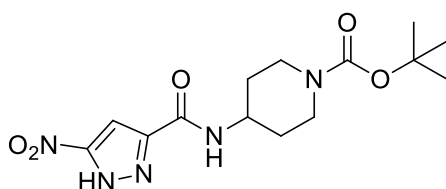
<sup>131</sup> Yun, F.; Cheng, C.; Zhang, J.; Li, J.; Liu, X.; Xie, R.; Tang, P.; Yuan, Q. Boric Acid Catalyzed Direct Amidation between Amino-Azaarenes and Carboxylic Acids. *Synthesis*. **2017**, 49, 1583-1596.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.30 (ddd,  $J$  = 4.9 Hz, 1.9 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.75 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 4H), 7.72 (dd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.61 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 4H), 7.23 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.17 (ddd,  $J$  = 7.5 Hz, 4.9 Hz, 0.9 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  171.1 (2C), 152.3, 149.6, 138.8, 138.0 (2C), 132.7 (4C), 129.1 (4C), 123.2, 121.9, 117.6 (2C), 116.1 (2C). **IR (KBr):**  $\nu$  max 3424, 3067, 2231, 1697, 1266, 1134, 875, 767 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 200.28 g.mol<sup>-1</sup>

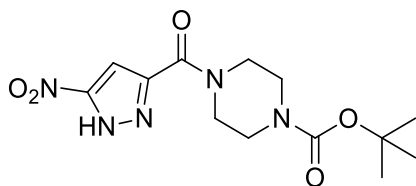
**tert-Butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate (44):**<sup>115</sup> Adapting from a protocol described by Mitchell *and al.*,<sup>115</sup> to a stirred solution of *tert*-butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (300 mg, 1.51 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL of methanol was added sequentially ammonium formate (3.58 g, 56.7 mmol, 38 eq.), acetic acid (895  $\mu$ L, 1.56 mmol, 1.0 eq.) and sodium cyanoborohydride (188 mg, 2.99 mmol, 2.0 eq.). The resulting mixture was stirred 16h at 22°C. The obtained solution was diluted with 100 mL of basic water (pH = 10) and then extracted with 3x100 mL of ethyle acetate. The organic layer was washed with 50 mL of water saturated with NaCl, then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under *vacuo* to give a beige oil (290 mg, 96 %). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  4.05 (brs, 2H), 3.08-2.70 (m, 3H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.55 (brs, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.32-1.17 (m, 2H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  154.8, 79.4, 48.8, 42.2 (brs, 2C), 35.5 (2C), 28.4 (3C).



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>  
Molecular Weight: 339.35 g.mol<sup>-1</sup>

**tert-Butyl 4-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (45, MR34672):** Following the general **procedure A**, using 5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (200, 1.27 mmol, 1.0 eq.), *tert*-butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate **44** (275 mg, 1.38 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (520  $\mu$ L, 3.75 mmol), **45** was isolated after silica gel column chromatography (DCM/MeOH gradient of 8/2 to 1/1) as a colorless solid (116 mg, 27%). **M.P.:** 187°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 3.94 min,  $m/z$  [M+H-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup> = 283.94; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  7.45 (s, 1H), 4.13-3.98 (m, 3H), 2.90 (brs, 2H), 1.97-1.88 (m, 2H), 1.54-1.42 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), two labile non-visible protons in these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  158.8, 157.5, 156.4,

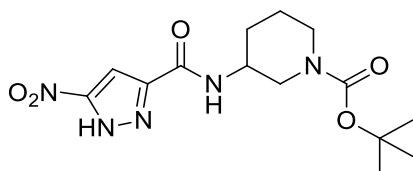
140.6, 101.9, 81.2, 48.4, 43.9 (brs, 2C), 32.4, 28.6 (3C), one non-visible carbon in these conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3436, 3142, 2977, 2886, 1647, 1333, 1275, 1146, 991, 824, 755  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_5$   
Molecular Weight: 325.32  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**tert-Butyl 4-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carbonyl)piperazine-1-carboxylate (46, MR34673):**

Following the general **procedure A**, using 5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (200, 1.27 mmol, 1.0 eq.), *tert*-butyl piperazine-1-carboxylate **1c** (275 mg, 1.38 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (520  $\mu\text{L}$ , 3.75 mmol), **46** was isolated after reversed-phase flash chromatography (water/MeCN gradient of 8:2 to 1:1) as a colorless solid (90 mg, 22%). **M.P.:** 135°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 4.05 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$  = 269.94;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  6.98 (s, 1H), 3.75 (brs, 4H), 3.50 (brs, 4H), 1.41 (s, 9H), one labile non-visible proton in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  158.9, 156.1, 154.4, 137.0, 102.5, 80.9, 47.0 (2C), 42.9 (2C), 28.0 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3422, 2978, 2920, 1700, 1638, 1392, 1240, 1166, 995, 825, 753  $\text{cm}^{-1}$ .

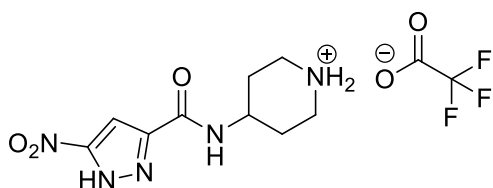


Chemical Formula:  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$   
Molecular Weight: 339.35  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**tert-Butyl 3-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (47, MR34681):**

Following the general **procedure A**, using 5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (200, 1.27 mmol, 1.0 eq.), *tert*-butyl 4-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (382 mg, 1.90 mmol, 1.5 eq.) and triethylamine (520  $\mu\text{L}$ , 3.75 mmol), **47** was isolated after silica gel column chromatography (DCM/AcOEt gradient of 7/3 to 1/1) as a colorless solid (80 mg, 19%). **M.P.:** 217°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 4.00 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$  = 283.94;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):**  $\delta$  14.82 (s, 1H), 8.55 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 4.05-3.56 (m, 3H), 3.06-2.76 (m, 2H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.79-1.69 (m, 1H), 1.58-1.47 (m, 1H), 1.36 (s, 10H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):**  $\delta$  156.9, 155.7, 153.9, 139.1, 101.7, 78.7, 47.9, 45.8, 43.0, 29.6, 28.0

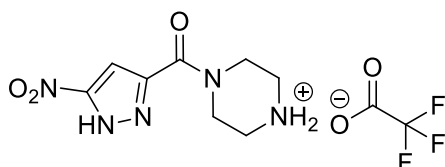
(3C), 23.5; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3435, 3137, 2973, 2928, 2869, 2382, 1696, 1635, 1385, 1152, 850  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5$  (base :  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$ )  
Molecular Weight: 353.25 (base : 239.23)  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**4-(5-Nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate (48, MR34676):**

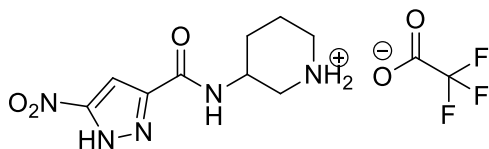
Following the general **procedure E** during 5h using *tert*-butyl 4-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate **45** (60 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.) and TFA (450  $\mu\text{L}$ , 5.40 mmol, 30 eq.), **48** was obtained as a grey solid (62 mg, quant.). **M.P.:** 221°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 1.21 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 239.99 (base);  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  7.44 (s, 1H), 4.13-4.06 (m, 1H), 3.44 (d,  $J$  = 14.2 Hz, 2H), 3.11 (t,  $J$  = 11.6 Hz, 2H), 2.16 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 2H), 1.91-1.76 (m, 2H), four labile non-visible protons in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  157.8, 156.1, 139.0, 100.8, 44.6, 48.8 (2C), 28.0 (brs, 2C), two non-visible carbons (trifluoroacetate salt) in these conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3419, 2925, 2218, 1662, 1539, 1334, 1180, 798  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5$  (base :  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3$ )  
Molecular Weight: 339.23 (base : 225.20)  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

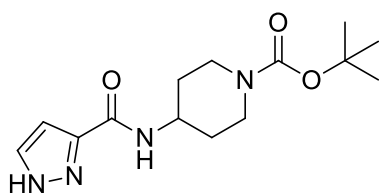
**4-(5-Nitro-1H-pyrazole-3-carbonyl)piperazin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate (49, MR34677):**

Following the general **procedure E** during 16 h using *tert*-butyl 4-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carbonyl)piperazine-1-carboxylate **46** (60 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.) and TFA (450  $\mu\text{L}$ , 10.8 mmol, 100 eq.), **49** was obtained as a brown solid (62 mg, quant.). **M.P.:** 56°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 1.21 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 225.98 (base);  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  7.25 (s, 1H), 3.99-3.83 (m, 4H), 3.28 (brs, 4H), three labile non-visible protons in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  162.9 (q,  $J$  = 37.7 Hz), 159.38, 155.2, 136.8, 116.6 (q,  $J$  = 278.6 Hz), 103.4, 43.7, 42.8, 42.7, 39.2; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3430, 1681, 1630, 1442, 1300, 1206, 1132, 803, 725  $\text{cm}^{-1}$ .



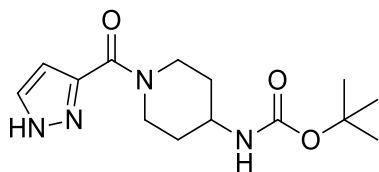
Chemical Formula:  $C_{11}H_{14}F_3N_5O_5$  (base:  $C_9H_{13}N_5O_3$ )  
Molecular Weight: 353.25 (base: 239.23)  $g \cdot mol^{-1}$

**3-(5-Nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate (50, MR34682):** Following the general **procedure E** during 5h using *tert*-butyl 3-(5-nitro-1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate **47** (60 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.) and TFA (4.1 mL, 54 mmol, 300 eq.), **50** was obtained after a filtration in DCM as a grey solid (50 mg, 80%). **M.P.:** 218°C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 1.44 min,  $m/z$   $[M+H]^+$  = 239.99 (base);  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):**  $\delta$  7.43 (s, 1H), 4.30-4.21 (m, 1H), 3.54 (dd,  $J$  = 12.8 Hz, 3.9 Hz, 1H), 3.38 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 1H), 3.07-2.95 (m, 2H), 2.16-2.02 (m, 2H), 1.92-1.66 (m, 2H), four labile non-visible protons in these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  159.0, 155.4, 138.7, 116.3, (q,  $J$  = 290.0 Hz), 101.9, 45.9, 44.0, 43.5, 27.1, 20.4, one non-visible carbons in these conditions (trifluoroacetate salt carbonyl); **IR (KBr):**  $\nu$  3435, 3266, 3144, 3057, 2939, 2845, 1789, 1664, 1551, 1336, 1208, 998  $cm^{-1}$ .



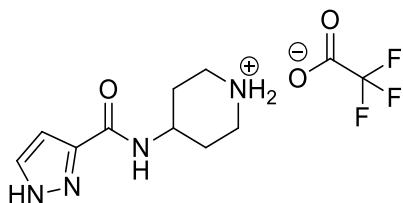
Chemical Formula:  $C_{14}H_{22}N_4O_3$   
Molecular Weight: 294.35  $g \cdot mol^{-1}$

***tert*-Butyl 4-(1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (51, MR34689):** Following the general **procedure C** during 4h at 22°C, using 1H-pyrazole-3-carboxylic acid (100 mg, 0.89 mmol), *tert*-butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate (280 mg, 1.40 mmol), HATU (533 mg, 1.40 mmol) and triethylamine (375  $\mu$ L, 2.67 mmol), **51** was isolated after flash chromatography (AcOEt) as a colorless solid after precipitation in CyHex (156 mg, 60%). **M.P.:** 161 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 4.11 min,  $m/z$   $[M+H-C_4H_8]^+$  = 238.99;  **$^1H$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  7.69 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 6.75 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 4.14-4.00 (m, 3H), 2.93 (brs, 2H), 1.92 (dd,  $J$  = 12.5 Hz, 2.6 Hz, 2H), 1.57-1.48 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), two non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD)**  $\delta$  164.2, 156.4, 147.7, 130.9, 106.3, 81.1, 48.0, 43.9 (brs, 2C), 32.6 (2C), 28.7 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3417, 3291, 2975, 2926, 2863, 2446, 1697, 1637, 1428, 1169, 1141, 850, 761  $cm^{-1}$ .



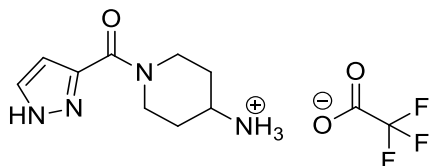
Chemical Formula:  $C_{14}H_{22}N_4O_3$   
Molecular Weight:  $294.35 \text{ g.mol}^{-1}$

**tert-Butyl (1-(1H-pyrazole-3-carbonyl)piperidin-4-yl)carbamate (52, MR34687):** Following the general **procedure C** during 3h at 22°C, using 1H-pyrazole-3-carboxylic acid (100 mg, 0.89 mmol), *tert*-butyl piperidin-4-ylcarbamate (280 mg, 1.40 mmol), HATU (533 mg, 1.40 mmol) and triethylamine (375  $\mu\text{L}$ , 2.67 mmol), **52** was isolated after flash chromatography (DCM/AcOEt gradient of 1/1 to 0/1) as a colorless solid (165 mg, 63%). **M.P.:** 179 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r = 4.02 \text{ min}$ ,  $m/z [M+H]^+ = 294.99$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  7.74 (d,  $J = 2.2 \text{ Hz}$ , 1H), 6.59 (d,  $J = 2.4 \text{ Hz}$ , 1H), 4.55-4.41 (m, 2H), 3.69-3.59 (m, 1H), 3.29-3.24 (m, 1H), 3.06-2.96 (m, 1H), 1.92 (dd,  $J = 30.4 \text{ Hz}$ , 11.6 Hz, 2H), 1.49-1.30 (m, 11H), two non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD)**  $\delta$  164.6, 157.7, 147.5, 130.2, 107.5, 80.0, 49.0 (determined by HSQC), 47.1, 42.6, 33.8, 32.9, 28.7 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3376, 3142, 2945, 1685, 1588, 1524, 1323, 1104, 845, 762  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{11}H_{15}F_3N_4O_3$  (base:  $C_9H_{14}N_4O$ )  
Molecular Weight: 308.26 (base: 194.23)  $\text{g.mol}^{-1}$

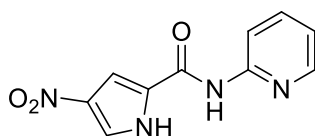
**4-(1H-Pyrazole-3-carboxamido)piperidin-1-ium 2,2,2-trifluoroacetate (53, MR34694):** Following the general **procedure E** during 4h using *tert*-butyl 4-(1H-pyrazole-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate **51** (80 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) and TFA (619  $\mu\text{L}$ , 8.10 mmol, 30 eq.), **53** was obtained as colorless oil (75 mg, 90%). **LC/MS (ESI+):**  $t_r = 0.80 \text{ min}$ ,  $m/z [M+H]^+ = 195.04$  (base);  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  7.75 (d,  $J = 2.5 \text{ Hz}$ , 1H), 6.77 (d,  $J = 2.5 \text{ Hz}$ , 1H), 4.19-4.09 (m, 1H), 3.49 (d,  $J = 13.4 \text{ Hz}$ , 2H), 3.14 (dt,  $J = 12.8 \text{ Hz}$ , 2.2 Hz, 2H), 2.20 (dd,  $J = 14.2 \text{ Hz}$ , 3.0 Hz, 2H), 1.89-1.77 (m, 2H), four labile non-visible protons in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  163.1, 162.6 (q,  $J = 35.7 \text{ Hz}$ ), 144.3, 131.7, 116.1 (q,  $J = 292.1 \text{ Hz}$ ), 105.6, 44.3, 42.8 (2C), 27.6 (2C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 2437, 1635, 1263, 1202, 1140, 739  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula: C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (base: C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O)  
Molecular Weight: 308.26 (base: 194.23) g.mol<sup>-1</sup>

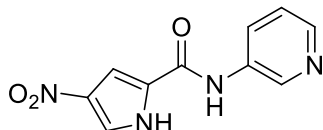
**1-(1H-pyrazole-3-carbonyl)piperidin-4-aminium 2,2,2-trifluoroacetate (54, MR34688):**

Following the general **procedure E** 16h using *tert*-butyl (1-(1H-pyrazole-3-carbonyl)piperidin-4-yl)carbamate **52** (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq.) and TFA (783 µL, 10.2 mmol, 30 eq.) afforded **54** as colorless oil (92 mg, 88%). **LC/MS (ESI+)**: t<sub>r</sub> = 1.10 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 195.04 (base); **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)**: δ 7.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 4.20 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.53-3.41 (m, 1H), 3.26-3.16 (m, 1H), 2.98-2.88 (m, 1H), 2.13 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 2.00 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 1.66-1.51 (m, 2H), four labile non-visible protons in these conditions; **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)**: δ 165.1, 162.8 (q, *J* = 35.9 Hz), 143.9, 140.0, 116.2 (q, *J* = 290.2 Hz), 106.1, 47.9, 45.6, 40.8, 29.8, 29.0; **IR (KBr)**: ν max 3424, 2952, 1679, 1610, 1502, 1293, 1203, 1136, 765 cm<sup>-1</sup>.



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 232.20 g.mol<sup>-1</sup>

**4-Nitro-N-(pyridin-2-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide (55, MR34671):** Adapting from a protocol described by Bürli *and al.*,<sup>116</sup> to a solution of 4-nitro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (100 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL of DMF/DIPEA (9/1), HATU was added (486 mg, 1.28 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred 30 minutes at 25°C and then 16h at 60°C after the addition of 2-aminopyridine (90 mg, 0.96 mmol, 1.5 eq.). The reaction was quenched with 40 mL of water and the aqueous layer was extracted with 3x40 mL of AcOEt. The organic layer was washed with 40 mL of a water at pH = 3, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to give a residue purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH gradient of 9/1 to 8/2) as a purple solid (70 mg, 47%). **M.P.**: 273°C. **LC/MS (ESI+)**: t<sub>r</sub> = 2.74 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 232.97; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ 12.97 (brs, 1H), 10.88 (s, 1H), 8.39 (ddd, *J* = 4.9 Hz, 1.9 Hz, 0.8 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.3 Hz, 4.9 Hz, 0.9 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ 158.8, 152.3, 148.3, 138.7, 137.1, 126.6, 124.3, 120.3, 115.0, 118.0. **IR (KBr)**: ν max 3434, 3353, 3151, 3109, 2928, 1661, 1439, 1324, 1149, 752, 609 cm<sup>-1</sup>.



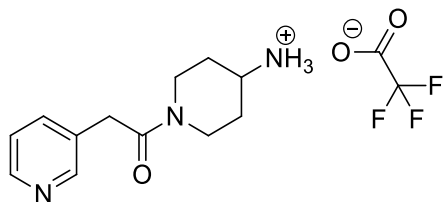
Chemical Formula:  $C_{10}H_8N_4O_3$

Molecular Weight:  $232.20 \text{ g.mol}^{-1}$

**4-Nitro-*N*-(pyridin-3-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (56, MR34674):** Adapting from a protocol by Wyatt and *al.*,<sup>104</sup> to a stirred suspension of pyrrole-2-carboxylic acid (200 mg, 1.27 mmol, 0.90 eq.) in DMF (10mL) was added sequentially EDC-HCl (596 mg, 3.00 mmol, 2.2 eq.), HOBt hydrate (776 mg, 3.00 mmol, 2.2 eq.), 3-aminopyridine (133 mg, 1.40 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (394  $\mu\text{L}$ , 2.80 mmol, 2.0 eq.) The resulting mixture was stirred 48 h at 25°C. The obtained solution was quenched with 40 mL of water at pH= 3 and extracted with 3x40 mL of AcOEt. The organic layer was washed with 40 mL of a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  and 40 mL of a saturated solution of NaCl, then, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under *vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (AcOEt) as an orange solid (102mg, 34%). **M.P.:** >300 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r$  = 2.18 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 232.97$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  13.03 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.91 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.32 (dd,  $J$  = 4.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 8.14 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.4 Hz, 1.3 Hz, 1H), 8.07-8.04 (m, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.41 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.6 Hz, 1H);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  158.7, 145.1, 142.1, 136.9, 135.8, 127.5, 126.7, 124.1, 107.3, one non-visible carbon in these conditions; **IR (KBr):**  $\nu$  max 3140, 3129, 3078, 2978, 1761, 1401, 1374, 1318, 1096, 1023, 904, 742  $\text{cm}^{-1}$ .



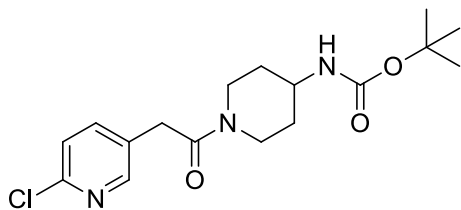
**tert-Butyl (1-(2-(pyridin-3-yl)acetyl)piperidin-4-yl)carbamate (57, MR34693):** To a stirred suspension of 2-(pyridin-3-yl)acetic acid (100 mg, 0.73 mmol, 1.0 eq.) in DMF (10mL) was added *tert*-butyl piperidin-4-ylcarbamate (235 mg, 1.17 mmol, 1.6 eq.), EDC-HCl (224 mg, 1.17 mmol, 1.6 eq.), HOBT monohydrate (179 mg, 1.17 mmol, 1.6 eq.) and triethylamine (308  $\mu$ L, 2.19 mmol, 3.0 eq.). The mixture was stirred 16h at 22°C. The reaction was then quenched with 40 mL of water, extracted with 3x40 mL of AcOEt and washed with 40 mL of a saturated solution of NaCl. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and concentrated under *vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (AcOEt) as an orange solid (155 mg, 67%). **M.P.:** 135 °C. **LC/MS (ESI+):** *tr* = 3.09 min, *m/z*  $[M+H]^+ = 320.02$ ;  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  8.50 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.47 (brs, 1H), 7.61(d, *J* = 7.9Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 7.8 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.54-4.43 (m, 2H), 3.82 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.63 (brs, 1H), 3.16-3.07 (m, 1H), 2.81-2.71 (m, 1H), 1.94 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.32-1.19 (m, 1H), 1.18-1.05 (m, 1H);  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  168.3, 155.0, 150.0, 148.3, 136.5, 130.8, 123.5, 79.4, 47.7, 44.9, 41.0, 37.8, 32.9, 32.0, 28.4 (3C); **IR (KBr):**  $\nu$  max 3301, 2979, 2934, 2849, 1704, 1615, 1530, 1470, 1317, 1174, 1024, 712  $cm^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{14}H_{18}F_3N_3O_3$  (base:  $C_{12}H_{17}N_3O$ )  
 Molecular Weight: 333.31 (base: 219.28)  $g \cdot mol^{-1}$

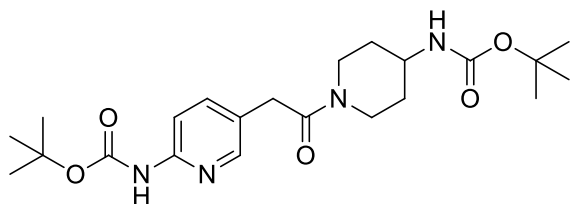
**1-(2-(Pyridin-3-yl)acetyl)piperidin-4-aminium 2,2,2-trifluoroacetate (58, MR34695):**

Following the general **procedure E** during 3h using *tert*-butyl (1-(2-(pyridin-3-yl)acetyl)piperidin-4-yl)carbamate **57** (100 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) and TFA (711  $\mu$ L, 9.3 mmol, 30 eq.), **58** was obtained as an orange oil (103 mg, quant.). **LC/MS (ESI+)**:  $t_r$  = 0.97 min,  $m/z$   $[M+H]^+ = 220, 12$ ;  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )**:  $\delta$  8.67 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.41 (dt,  $J$  = 8.2 Hz, 1.6 Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J$  = 8.1 Hz, 5.8 Hz, 1H), 4.49-4.41 (m, 1H), 4.16-4.05 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.53-3.41 (m, 1H), 3.32-3.23 (m, 1H), 2.84-2.74 (m, 1H), 2.18-2.02 (m, 2H), 1.70-1.58 (m, 1H), 1.56-1.44 (m, 1H), three non-visible labile protons under these conditions;  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ )**:  $\delta$  169.3, 162.8 (q,  $J$  = 35.4 Hz), 148.4, 141.5, 139.5, 135.9, 123.9, 116.1 (q,  $J$  = 290.2 Hz), 47.8, 43.8, 40.6, 35.9, 29.5, 28.9; **IR (KBr)**:  $\nu$  3446, 2139, 1682, 1634, 1464, 1429, 1203, 1135, 839, 802, 724  $cm^{-1}$ .



Chemical Formula:  $C_{17}H_{24}ClN_3O_3$   
Molecular Weight:  $353.84 \text{ g.mol}^{-1}$

**tert-Butyl (1-(2-(6-chloropyridin-3-yl)acetyl)piperidin-4-yl)carbamate (59):** A stirred solution of 2-(6-chloropyridin-3-yl)acetic acid (200 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq.) and HATU (441 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq.) in DMF (10 mL) was stirred 10 min at 22°C. *tert*-butyl piperidin-4-ylcarbamate (232 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (326  $\mu\text{L}$ , 2.32 mmol, 2.0 eq.) were then added and the mixture was stirred 2h at 22°C. The reaction was then quenched with 40 mL of water, extracted with 3x40 mL of AcOEt and washed with 40 mL of a saturated solution of NaCl. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under *vacuo* to give a crude residue purified by silica gel column chromatography (gradient of DCM/AcOEt 8/2 to AcOEt) and a filtration with  $\text{Et}_2\text{O}$ . 59 was obtained as a colorless solid (235 mg, 57%). **M.P.:** 142 °C. **LC/MS (ESI+):**  $t_r = 4.90 \text{ min}$ ,  $m/z [\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+ = 298.02$  (100%),  $m/z [\text{M}+2+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+ = 300.00$  (33%);  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  8.23 (d,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ , 1H), 7.70 (dd,  $J = 8.3 \text{ Hz}$ , 2.5 Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 8.3 \text{ Hz}$ , 0.3 Hz, 1H), 4.41-4.33 (m, 1H), 4.03-3.96 (m, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.63-3.54 (m, 1H), 3.28-3.19 (m, 1H), 2.90-2.82 (m, 1H), 1.96-1.82 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40-1.26 (m, 2H), one labile non-visible proton in these conditions;  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  170.4, 157.7, 151.2, 150.6, 142.0, 132.5, 125.3, 80.1, 48.9 (determined by HSQC), 45.9, 42.2, 36.9, 33.5, 32.7, 28.7 (3C); **IR (KBr):**  $\nu_{\text{max}}$  3347, 3002, 2949, 1676, 1630, 1540, 1463, 1321, 1101, 645  $\text{cm}^{-1}$ .



Chemical Formula: C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>  
Molecular Weight: 434.53 g.mol<sup>-1</sup>

**tert-Butyl (1-(2-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)acetyl)piperidin-4-yl)carbamate (60):** Adapting from a protocol described by Fader *and al.*,<sup>117</sup> in a dried sealed tube were introduced *tert*-butyl (1-(2-(6-chloropyridin-3-yl)acetyl)piperidin-4-yl)carbamate **59** (50 mg, 0.14 mmol, 1.3 eq.), *tert*-butyl carbamate (52 mg, 0.44 mmol, 4.0 eq.), cesium carbonate (78 mg, 0.22 mmol, 2.0 eq.), xantphos (17 mg, 0.03 mmol, 0.2 eq.) and Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (14 mg, 0.015 mmol, 0.1 eq.). The atmosphere was flushed under nitrogen and then dry THF (0.5 mL) was added. The mixture was stirred 24h at 70°C. The reaction was quenched with 40 mL of a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and the aqueous layer was extracted with 2x40 mL of AcOEt. The organic layer was washed with 40 mL of a water and 40 mL of a saturated solution of NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to give a residue purified by flash chromatography (DCM/AcOEt 8/2 to DCM/MeOH 9/1). **60** was obtained as an orange oil (52 mg, 85%). **LC/MS (ESI+):** tr = 4.55 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 435.05; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.03 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.48 (brs, 1H), 4.44 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 4.35 (brs, 1H), 3.73 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.61-3.52 (m, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.08-2.99 (m, 1H), 2.74-2.64 (m, 1H), 1.86 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.36 (s, 9H), 1.23-1.12 (m, 1H), 1.07-0.94 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 168.6, 155.0, 152.4, 150.9, 147.6, 138.6, 125.3, 112.1, 81.1, 79.6, 47.7, 44.9, 40.9, 37.3, 33.0, 32.0, 28.4 (3C), 28.3 (3C); **IR (KBr):** ν 3438, 3340, 2977, 2930, 1710, 1634, 1512, 1160, 1025, 738 max cm<sup>-1</sup>.

---

**Titre et résumé en Anglais : Synthesis and evaluation of XIAP anatgonists to new chemoresistant cancer treatments**

Chemoresistance may include the XIAP protein overexpression in cancer cells. XIAP is able to interact with the caspases thanks to its BIR2 and BIR3 domains to stop apoptosis triggering. In order to restore aptosis, design of specific inhibitors of XIAP can be achieved in targeting the XIAP-BIR3 domain. A first generation molecules, based on an "amine-linker-heterocycle" scaffold, were first synthesized. The screening of these compounds by FPA allowed to identify three hits: two nitro compounds (**MR34657** and **MR34658**) as well as an amino molecule (**MR34659**). **MR34657** and **MR34658** were modulated in order to understand the role of the nitro group on the affinity toward the XIAP protein. Second generation molecules were also obtained by pharmacomodulating the hit **MR34659** with the aim of increasing its XIAP-BIR3 affinity.

---

---

**NOM de l'auteur :** Kévin ANTRAYGUES

---

**TITRE :** Synthèse et évaluation d'antagonistes de XIAP vers de nouveaux traitements du cancer de l'ovaire chimiorésistant.

---

**DIRECTEUR DE THESE:** Madame le Docteur Charline KIEFFER

---

**LIEU ET DATE DE LA SOUTENANCE :** Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, le 13 Décembre 2019

---

### **RESUME en français**

La chimiorésistance peut passer par la surexpression de la protéine XIAP dans les cellules cancéreuses. Cette dernière est capable, *via* ses domaines BIR2 et BIR3, d'interagir avec les caspases et d'empêcher le déclenchement de l'apoptose. Pour tenter de rétablir l'apoptose dans ces cellules, concevoir des composés inhibiteurs spécifiques de XIAP peut ainsi être envisagé en ciblant le domaine XIAP-BIR3. Une première génération de molécules, basées sur un motif "amine-linker-hétérocycle", a d'abord été synthétisée. Le criblage de ces composés par FPA a permis d'identifier trois hits : deux composés nitrés **MR34657** et **MR34658**, ainsi qu'une molécule aminée **MR34659**. **MR34657** et **MR34658** ont par la suite été modulés afin de comprendre le rôle du groupement nitro dans l'affinité de ces deux composés pour la protéine XIAP. Des molécules de deuxième génération ont également été obtenues en pharmacomodulant la structure du hit **MR34659** dans le but d'augmenter son affinité pour XIAP-BIR3.

---

**DISCIPLINE administrative :** Sciences pharmaceutiques

---

**MOTS-CLES :** Cancer, chimiorésistance, apoptose, XIAP, *drug design*, chimie médicinale

---

### **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

Laboratoire d'accueil : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, UNICAEN EA 4258FR, CNRS 3038, INC3MSF 4206 ICORE Boulevard Becquerel, 14032 Caen Cedex, France