

THESE
En vue de l'obtention de
DOCTORAT

Centre de Recherche : Laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et bioorganique
Discipline : Chimie des biomolécules
Spécialité : Chimie thérapeutique

Présentée et soutenue le 28/10/2017 à 10h30 par :

Abdellah MESSOUSSI

Le titre de la thèse :

La conception rationnelle, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de nouveaux inhibiteurs hétérocycliques des kinases JNKs : application thérapeutique à l'oncologie

JURY

Najia KOMIHA	PES, Faculté des Sciences de Rabat	Présidente/Rapporteuse
Aziz ABOULMOUHAJER	PES, Faculté des Sciences d'El Jadida	Rapporteur/examineur
Mohammed LAHCINI	PES, Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech	Rapporteur/examineur
Azeddine IBRAHIMI	PES, Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat	Examineur
Khalid BOUGRIN	PES, Faculté des Sciences de Rabat	Directeur de thèse
Abdelaziz YASRI	Directeur, de la Société Oribase Pharma à Montpellier, France	Invité

Année Universitaire : 2017/2018

باسم الله الرحمان الرحيم
و الصلاة والسلام على محمد سيد المرسلين

لسيدة حرية القدري الحسني, التي لطل ما دفعتني لتجاوز نفسي وفرحت لكل نجاح صادفني وشاركتني حماسي.

*Ma mère ; qui m'a poussé à me dépasser durant les moments difficiles et qui a partagé
mon enthousiasme et ma joie lors de mes réussites
Je te dédie ce travail.*

Remerciements

Ce projet de thèse est le fruit d'une collaboration entre le le **Pr. Khalid BOUGRIN** du laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et bioorganique de la faculté des sciences de Rabat et le **Dr. Abdellaziz YASRI**; président de la société OriBase pharma à Montpellier (France) pendant les travaux. Ce projet a également bénéficié de l'appui du programme PHC Toubkal de l'organisme campus France.

J'exprime en premier lieu toute ma reconnaissance au **Dr. Abdelaziz Yasri** qui a mis sur pied ce projet et qui a veillé à ce qu'il franchisse tous les obstacles. Merci de sa confiance, de m'avoir donné cette chance ; et pour m'avoir encouragé pour aller de l'avant tout au long de cette période. Merci pour toutes les heures passées sans compter, parfois jusqu'à 20h30, à m'enseigner la chémoinformatique, une toute nouvelle discipline pour moi. Et pardessus tout, merci de son amitié.

Merci au **Pr. Khalid BOUGRIN** d'avoir créé une réalité académique de ce projet et du rôle de directeur de thèse qu'il a tenu. Merci de la disponibilité et du dévouement dont il a fait preuve pour conduire à l'aboutissement de cette thèse.

Merci aux membres du jury, le **Pr. Najia KOMIHA** et le **Pr. Azedine IBRAHIMI** de s'être intéressés à mon travail et d'avoir pris le temps de lire avec attention mon manuscrit de thèse. Merci en particulier au **Pr. Aziz ABOULMOUHAJER** qui, malgré le long voyage a accepté de faire partie du jury, Je le remercie également de son accueil et du temps qu'il m'a consacré lors de ma visite. Tous mes remerciements et ma gratitude au **Pr. Mohammed LAHCINI** pour avoir fait partie de ce jury et pour sa disponibilité.

Un grand Merci à Younes.Z ; de son accueil sa disponibilité, et d'avoir répondu présent à chacune de mes sollicitations.

Evidemment, mes remerciements seraient incomplets sans ceux adressés à la grande Wiame.L. pour sa dévotion et sa générosité. Je suis ravi de connaître une personne d'une si rare qualité.

Mais rien n'aurait pu se faire sans ma famille qui, malgré la distance, m'a constamment soutenu pendant toute la durée de mes études à l'étranger. Conscient de la chance qui m'a été donnée de vous avoir pour proches, je vous exprime ici toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Résumé

De nombreuses études et expériences ont montré l'implication des protéines kinases dans plusieurs pathologies humaines notamment le cancer. Durant la dernière décennie, 24 inhibiteurs de kinases ont été mis sur le marché entant que médicaments prescrits pour des patients atteints de tumeurs solides ou liquides. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet de recherche de cette thèse de doctorat. En effet, notre recherche se penche sur l'inhibition des protéines C-Jun N-terminal kinases (JNKs) par des petites molécules à des fins thérapeutiques en oncologie. Pour ce faire une stratégie de conception de ces petites molécules a été mise en place, elle est basé sur deux axes de Drug Design rationnels, d'un côté nous avons fait appel à une approche de « Structure Based Drug Design » qui s'appuie sur divers outils de chimoinformatique guidés par la littérature, et de l'autre nous avons utilisé le criblage *In Vitro* de petites molécules issues de la chimiothèque de la société OriBase Pharma sur des souches cellulaires cancéreuses guidé au fur et à mesure par l'analyse des relations structure-activité. Après la synthèse multi-étapes de plusieurs lots successifs de molécules ainsi conçues, suivie de leur tests pharmacologiques sur les kinases JNKs nous ont permis l'obtention d'un « Hit » montrant une très bonne activité inhibitrice de la kinase JNK1 avec une IC50 de 328 nM.

Mots clés : inhibiteur de kinase, hétérocycles, synthèse multi-étapes, JNK, c-jun N-terminal kinase, docking, modélisation par homologie, SBDD, SAR.

Abstract

Several studies and experiments have shown the involvement of protein kinases in a number of human diseases including cancer. During the last decade, 24 kinase inhibitors were approved in the market as prescribed drugs for patients with solid or liquid tumours. It is in this context that fits the research focus of this doctoral thesis. Indeed, our research examines the JNK protein kinases as a therapeutic target in oncology. For a rational design of molecules capable of inhibiting these targets, a double strategy has been implemented. On one hand, we have used the approach of "Structure Based Drug Design" based on various chemoinformatics tools. On the other hand, we used the experimental screening and the analysis of structure-activity relationships of small molecules derived from of the OriBase Pharma company's database and literature. The multi-step synthesis of the newly designed molecules and the obtained results of pharmacological tests on JNK kinases guided the design of a novel chemical series who showed a very good inhibitory activity of the kinase JNK1 with IC50 328 nM.

Key-words : kinase inhibitors, heterocycles, multi-step synthesis, JNK, c-jun N-terminal kinase, docking, Homology modeling, SBDD, SAR.

Abréviations

μM : micro Molaire	DFG : séquence de toris acides aminés, Asp-Phe-Gly
3D : Tridimensionnel	DH : donneur d'hydrogène
6-OHDA : 6-hydroxydopamine	DIEA : N, N-diisopropyléthylamine
Å : Ångström	DMAB : 7,12-Diméthylbénzanthracène
AcOH : acide acétique	DMFanh : diméthylformamide anhydre
ACPE : adénocarcinome canalaire pancréatique exocrine	DORs : dérivés d'oxygène réactifs
ADN : Acide Désoxyribonucléique	EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Ag : Antigène	EGFR : Epidermal growth factor receptor, récepteur du facteur de croissance épidermique
AH : accépteur d'hydrogène	eq : équivalent
AP1 : Activator Protein 1	ERK : Extracellular signal-regulated kinases
APP : amyloid precursor protein	FRET : transfert d'énergie par résonance de Fröster
ARN : Acide RiboNucléique	HC : hépatocarcinome
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2, récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains
ATP : Adénosine triphosphate	HOBT : Hydroxybenzotriazole, See
A β : bêta-amyloïde, See	HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
BIRB796 : le Doramapimod ou B79	IC50 : concentration inhibitrice médiane
CCHP : cellules de cancer humain de la prostate	<i>in silico</i> : recherche ou essai effectuer à l'aide de calculs mathématiques complexes
CDSN : cellules dopaminergiques de leur système nigrostrié	<i>in vitro</i> : essai ou tester en tube
ChA : chaine A	<i>in vivo</i> : Recherche ou test effectué sur un organisme vivant
CHC : carcinome hépatocellulaire, : carcinome hépatocellulaire	JIP JNK Interacting Protein
CL : chaine laérale	JNK : C-jun N-terminal kinase, : C-jun N-terminal kinase
CO(OCCl ₃) ₂ : diphosgène	K ₂ CO ₃ : carbonate de potassium
CP : chaine principale de l'acide aminé	
CrkII : proteine adaptatrice	
CS : combinaison de substitution	
CSC : carcinome spinocellulaire, See	
DCM. : dichlorométhane	
DCX : Neuronal migration protein doublecortin	

kDa : kilo Dalton
LCMS : Liquid chromatography–mass spectrometry
LH : liaison hydrogène
MA : a. La maladie d'Alzheimer
mAb : Anticorps monoclonal
MAP2K : MKK ou MAPKKK, Mitogene Activated Protein kinase kinase
MAP3K : ou MAPKKK, Mitogene Activated Protein kinase kinase
MAPK : Mitogene Activated Protein kinase
MeOH : méthanol
MP : maladie de Parkinson
MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MTT : (3[4,5-diméthylthiazol-2yl]-bromure de diphenyltétrazolium)
NaBH₃CN : cyanoborohydrure de sodium
nM : nano Molaire, ou nano Mole par Litre
OMS : organisation mondiale de la santé
Pd(dppf)Cl₂ : [1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène]dichloropalladium(II)
PDB : protein data bank, base de données en ligne
PyV M T : Polyomavirus middle T, virus
RISC : RNA-induced silencing complex
RTK : Récepteur tyrosine kinase
SAPK : Stress-Activated Protein Kinase (une autre dénomination de JNK)
SAR : Structure activity relationship, Relation Structure Activité
SBDD : Structure Based Drug Design, conception de médicament base sur la structure, conception de médicament basée sur la structure
siRNA : small interfering RNA, petit ARN interférent
SN : Substrat Nucléaire
SNC : système nerveux central
SNN : substrat non-nucléaire
TA : température ambiante
TK : Tyrosine kinase
TPA : tétradécanoylphorbol acétate
UV : Ultraviolet

Liste des illustrations

Table des figures :

Figure 1 : schéma du cycle catalytique de la phosphorylation d'un substrat par une kinase	3
Figure 2 : Le Kinome humain ¹	5
Figure 3 : Nombre d'inhibiteurs de kinases approuvées par la FDA par indication thérapeutique ⁶	10
Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'une kinase	12
Figure 5 : Représentations tridimensionnelles de la forme active et la forme inactive de la kinase JNK2 (respectivement code PDB : 3E7O, 3NPC).....	14
Figure 6 : Isoformes de chaque protéine kinase JNK ¹⁶	19
Figure 7 : Cascade de signalisation des JNKs	20
Figure 8 : Schéma de la cancérogénèse de cancers solides.	25
Figure 9 : structure du SP600125.....	27
Figure 10 : Structure chimique du Semapimod	39
Figure 11 : Structure chimique et séquence du XG-102	40
Figure 12 : Modes de liaison entre les JNKs et les inhibiteurs de type I répertoriés à partir de structures cristallisées disponibles dans la PDB. <i>A : région de liaison de groupement triphosphate. B : région hydrophobe. C : région de liaison de l'adénine. D : région de liaison du ribose. E : région de liaison de groupements solubilisants.</i>	46
Figure 13 : les deux formes possibles du scaffold de la série 4.	48
Figure 14: Structure tridimensionnelle de JNK2 co-cristallisée avec le BIRB796 (code PDB : 3NPC).	49
Figure 15 : Processus de modélisation par homologie.	53
Figure 16 : A. Taxonomie des JNKs dans le protéome humain. B. Alignement des trois JNKs.	55
Figure 17 : Alignement des séquences des sites actifs DFG-out des JNKs sélectionnés à 4Å du BIRB796	57
Figure 18 : Alignement des séquences des sites actifs DFG-out des JNKs sélectionnés à 6Å du BIRB796.	57
Figure 19 : Distribution dans l'espace des résidus différents dans les séquences des sites actifs des trois JNKs.....	58
Figure 20 : Approche rationnelle mise en place pour la conception et le développement de nouveaux inhibiteurs de JNK.	62
Figure 21 : Les deux formes possibles du scaffold de la série 4	64
Figure 22: le scaffold-I inspiré du schéma du mode de liaison de la famille 4.	66
Figure 23 : Molécules de la série de départ.....	67
Figure 24 : Prise de vue du docking du JR032 (A, B et C) et JR028 (D, E et F) sur la structure 3NPC (ChA) de JNK2.....	68

Figure 25 : site actif de la structure 3NPC (ChA) de JNK2.	70
Figure 26 : Molécules issues des modulations 1	71
Figure 27 : Molécules issues des modulations 2	72
Figure 28 : Molécules issues des modulations 3	74
Figure 29 : Molécules issues des modulations 4	75
Figure 30 : Molécule issue des modulations 4	77
Figure 31: Inhibiteur dérivé de 7-azaindole cristallisé avec JNK1 (code PDB 4AWI).....	84
Figure 32 : Structure générale des dérivés de scaffold-II sélectionnés pour les tests sur JNK2.....	86
Figure 33 : molécules choisies pour la CS I	87
Figure 34 : A : Zoom sur les sites actifs après superposition des structure 4AWI (protéine en gris mode cartoon, ligand en vert en mode sticks) et 3NPC (protéine en jaune en mode surface). B : Structure générale des dérivés de scaffold-II sélectionnés pour la série 3 (L : Linker, Ar : Aromatique).	93
Figure 35 : structure des trois molécules testées	106
Figure 36 : kinases de la voie de signalisation MAPK inhibées par AD533 et par AD598. Les protéines sur lesquelles le composé est actif sont en couleur, les protéines sur lesquelles il n'est pas actif sont en gris.	109
Figure 37 : les diagrammes de Ramachandran des deux modèles de JNK1 et- JNK3 construit par homologie	120
Figure 38 : A. Les scores 3D-1D obtenus par Verify-3D pour les résidus du modèle de JNK1, B. Les scores 3D-1D obtenus par Verify-3D pour les résidus du modèle de JNK3	121
Figure 39 : position et dimensions de la Grille-Box (cube en rouge, vert et bleu) choisie par rapport à la structure de JNK2 chaîne A de code PDB : 3NPC	123
Figure 40 : Exemple de courbe des pourcentages inhibitions d'une kinase en fonction de la concentration de la molécule testée.	125
Figure 41 : Etapes de la technique Z'-LYTE®.	126
Figure 42: A. image des 4 membranes du test relatives aux trois composés testés et au témoin DMSO. B. liste des protéines de la famille des MAPK , de leur place sur la membrane nitrocellulose et des résidus phosphorylés analysés dans ce test.....	129
Figure 43 : les cascades de signalisation impliquant les 26 MAPK du test.....	130

Table des schémas :

Schéma 1: Voie de synthèse principale des dérivés du scaffold-I	78
Schéma 2: Obtention de l'acide boronique JR074 utilisé pour la dernière étape de synthèse de JR076.	79
Schéma 3 : Voie de synthèse de JR070	80
Schéma 4 : Voie de synthèse de JR031	80
Schéma 5 : Voies de synthèse mises en place pour JR062.....	82
Schéma 6 : Schéma des deux premières étapes communes à la synthèse des molécules de la série 4..	99

Schéma 7 : Suite de la voie de synthèse pour AD598 et AD597.....	100
Schéma 8 : Suite de la voie de synthèse pour AD533.....	101
Schéma 9 : Réduction du MTT en Formazan par les réductases mitochondriales des cellules vivantes.	127

Table des Tableaux :

Tableau 1 : Légende de la Figure 2.....	4
Tableau 2 : quelques ^{2,3} anticorps monoclonaux inhibiteurs d’RTK mis sur le marché.....	8
Tableau 3 : classification des inhibiteurs de kinases ⁷	16
Tableau 4 : récapitulatif des inhibiteurs de JNK actuellement en phase clinique.	42
Tableau 5 : Quelques petites molécules hétérocycliques inhibitrices des kinases JNKs arrêtés en études cliniques.	42
Tableau 6 : Pourcentages d’identité entre les séquences des JNKs.	55
Tableau 7 : Résultats des tests d’inhibition des molécules de la série de départ	69
Tableau 8 : Résultats des tests d’inhibition des molécules issues des modulations 1.....	71
Tableau 9 : Résultats des tests d’inhibition des molécules issues des modulations 2.....	73
Tableau 10 : Résultats des tests d’inhibition des molécules issues des modulations 3.....	74
Tableau 11 : Résultats des tests d’inhibition des molécules issues des modulations 4.....	76
Tableau 12 : résultats des tests d’inhibition de JR062	77
Tableau 13 : Composés intermédiaires synthétisés par ces deux étapes	78
Tableau 14 : Combinaisons de substitution sur le 7-Azaindole pour les tests de screening	85
Tableau 15 : Résultats des tests d’inhibition et structures des molécules de la série 1	88
Tableau 16 : Résultats des tests d’inhibition et structures des molécules de la Série 2	90
Tableau 17 : Les résultats des tests d’inhibition et les structure des molécules de la deuxième série de criblage pour la CSIII	92
Tableau 18 : Résultats des tests d’inhibition et structures des molécules de la série 3	94
Tableau 19 : Résultats des tests d’inhibition et structures des molécules de la série 4	96
Tableau 20 : Résultats du test de prolifération sur les 7 composés de l’approche II.....	104

Sommaire

DEDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
RESUME	III
ABSTRACT	IV
ABREVIATIONS	V
LISTE DES ILLUSTRATIONS	VII
<i>Table des figures</i> :.....	<i>VII</i>
<i>Table des schémas</i> :.....	<i>VIII</i>
<i>Table des Tableaux</i> :	<i>IX</i>
SOMMAIRE	X
INTRODUCTION	1
PARTIE I ETAT DE L'ART : DES PROTEINES KINASES JNKS A LA STRATEGIE THERAPEUTIQUE	2
CHAPITRE I PRÉSENTATION DES TYROSINES KINASES ET PREUVE DE CONCEPT THÉRAPEUTIQUE.....	3
I. <i>Rôle enzymatique et classification des protéines kinases</i>	3
II. <i>Preuve de concept et stratégies thérapeutiques</i>	6
1. Les anticorps monoclonaux (mAb).....	7
2. Les petits ARNs interférents (siRNA)	8
3. Les aptamères	9
4. Les petites molécules.....	10
III. <i>Généralité sur la structure tridimensionnelle d'une kinase et ses états d'activation</i>	11
1. Description structurale d'une kinase	11
2. Généralités sur les états d'activation d'une kinase	13
3. Les différents types d'inhibiteurs de kinase et l'intérêt de faire des inhibiteurs de type II	15
CHAPITRE II FOCUS SUR LA SOUS-FAMILLE DES JNKS	18
I. <i>Présentation de la sous-famille des protéines kinases JNKS</i>	18
II. <i>Implication biologique & rôle cellulaire des JNKS</i>	19
III. <i>Implication thérapeutique</i>	22
1. Implication des JNKS dans le cancer.....	22
a. Généralités	22
b. Facteurs cancérigènes.....	23
c. La cancérogénèse.....	23
d. Le cancer du foie	26
e. Le cancer du pancréas	27
f. Le cancer du sein.....	29
g. Le cancer du cerveau	30
h. Le cancer de la peau.....	31
i. Le cancer de la prostate :.....	32
2. Implication des JNKS dans des troubles neurologiques	33
a. La maladie de Parkinson	33

b.	La maladie d'Alzheimer (MA)	34
3.	Implication de JNK dans l'obésité, l'inflammation et diabète de type 2	35
4.	Conclusion	37
IV.	<i>Inhibiteurs de JNKs en phase clinique</i>	38
1.	Petite molécule inhibitrice de JNK en phase clinique.....	38
a.	Le Semapimod	38
b.	Le CC-90001.....	39
2.	Inhibiteurs peptidiques de JNK.....	39
a.	XG-102/AM-111	39
b.	XG-104	40
V.	<i>Conclusion</i>	41
PARTIE II ETUDE STRUCTURALE DES KINASES JNKs		43
CHAPITRE I ANALYSE DES STRUCTURE 3D DES JNKs		44
I.	<i>Analyse des modes de liaison des structures 3D des JNKs de conformation DFG-in avec des inhibiteurs de type I</i>	45
1.	Familles 1 et 2 impliquant une seule liaison hydrogène avec la charnière des JNKs	46
2.	Familles 3 et 4 impliquant plusieurs liaisons hydrogène avec la charnière des JNKs	47
II.	<i>Analyse du mode de liaison de la structure de JNK de conformation DFG-out avec le BIRB796</i>	49
CHAPITRE II CONSTRUCTION DES MODELES PAR HOMOLOGIE DE JNK1 & JNK3		52
I.	<i>Modélisation par homologie</i>	53
II.	<i>Construction des modèles DFG-out de JNK1 & JNK3</i>	54
III.	<i>Etude comparative des sites actifs des trois JNKs et mise en évidence de potentiels éléments de sélectivité entre isoformes JNK</i>	56
IV.	<i>Conclusion</i>	59
PARTIE III CONCEPTION PAR SBDD, SYNTHÈSE, ET EVALUATION BIOLOGIQUE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DES PROTEINES KINASES JNKs		61
CHAPITRE I STRATEGIE DE STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN MISE EN PLACE POUR LA CONCEPTION ET LE DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS JNK		62
CHAPITRE II APPROCHE I : CONCEPTION ET EXPLORATION DE SCAFFOLD INSPIRES DU MODE DE LIAISON DE LA FAMILLE 4		64
I.	<i>Design du scaffold-I</i>	65
II.	<i>Conception, modulation et évaluation des dérivés du scaffold-I</i>	66
1.	Série de départ	66
a.	Conception	66
b.	Résultats des tests d'inhibition et discussion	69
2.	Modulations 1 : exploration de l'Aryle1 avec un linker L1 = 2	69
a.	Conception	69
b.	Résultats des tests d'inhibition et discussion	71
3.	Modulations 2: combinaison du naphthyle et du linker méthylamine.....	72
a.	Conception	72
b.	Résultats des tests d'inhibition et discussion	73
4.	Modulations 3 : position du linker sur la pyridine.....	73
a.	Conception :	73
b.	Résultats des tests d'inhibition et discussion	74
5.	Modulations 4 : inversion du lien L ₁ et exploration de R	75
a.	Conception	75
b.	Résultats des tests d'inhibition et discussion	76

6.	Modulation 5 : Addition d'un Linker L ₂ et d'un Aryle ₂	76
a.	Conception	76
b.	Résultats des tests biologiques et discussion	77
III.	<i>Synthèse organique des molécules de l'approche I</i>	77
1.	La voie de synthèse	77
2.	Synthèse du JR070	79
3.	Synthèse du JR031	80
4.	Synthèse du JR062	81
IV.	<i>Conclusion et perspective</i>	83
CHAPITRE III APPROCHE II : DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MOLECULES A PARTIR D'UN SCAFFOLD D'ORIBASE		
PHARMA INSPIRE PAR LA LITTERATURE		84
I.	<i>Identification du scaffold-II</i>	84
II.	<i>Screening et SAR</i>	85
1.	Série 1 : exploration des trois CS sélectionnées	86
2.	Série 2 : sélection de la CS à exploiter.....	89
3.	Série 3 : exploration de molécules plus grandes de la CS II	93
4.	Série 4 : Conception et synthèse de nouveaux dérivés de la CS II.....	95
III.	<i>Synthèse organique des molécules de la série 4 de l'approche II</i>	98
1.	Synthèse de l'intermédiaire diphenyle :	98
2.	Synthèse de AD598 et AD597	99
3.	Synthèse du AD533	100
IV.	<i>Conclusion et Perspectives</i>	101
CHAPITRE IV : TESTS PHARMACOLOGIQUES IN CELLULO COMPLÉMENTAIRES		103
I.	<i>Tests de mesure de la viabilité et de la prolifération cellulaire : test colorimétrique MTT</i>	103
II.	<i>Human phospho-MAPK array</i>	105
III.	<i>Conclusion & perspective</i>	110
PARTIE IV CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		111
I.	<i>Conclusion et perspectives</i>	112
II.	<i>Communications</i>	113
III.	<i>Publications</i>	114
PARTIE V PARTIE EXPERIMENTALE		118
CHAPITRE I CHEMOINFORMATIQUE MATÉRIEL ET MÉTHODE		119
I.	<i>Modélisation par homologie</i>	119
II.	<i>Docking</i>	122
CHAPITRE II EVALUATION BIOLOGIQUE MATERIEL ET METHODE		125
I.	<i>Tests d'inhibition</i>	125
II.	<i>Tests de mesure de la viabilité et de la prolifération cellulaire : test colorimétrique MTT</i>	126
III.	<i>Human phospho-MAPK array</i> :.....	128
CHAPITRE III SYNTHÈSE ORGANIQUE.....		131
I.	<i>Conditions générales et appareillage</i>	131
1.	Source des composé utilisés et solvants	131
2.	Appareil à μ -onde.....	131
3.	Analyses physicochimiques	131
4.	Purification	132
II.	<i>Partie expérimentale des molécules de l'approche I</i>	133
1.	Procédure générale d'amination réductrice	133
2.	Couplage de Suzuku Miyaura	145

3.	Couplage peptidique pour obtenir l'intermédiaire JR074	164
4.	Formation de la fonction urée pour obtenir l'intermédiaire JR049	164
5.	Réduction du groupement Nitro du JR049	165
<i>III.</i>	<i>Partie expérimentale des molécules de l'approche II</i>	<i>166</i>
1.	Couplage de Suzuki Myaura	166
2.	Formation du dérivé ester de pinacol	167
3.	Détosylation et saponification du AD517 (AD593)	169
4.	Détosylation du AD518	171
5.	Réduction de la fonction nitro du AD528	172
6.	Couplage peptidique pour l'obtention des molécules finales	172
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		178

Introduction

Avant sa commercialisation, un médicament suit un long processus dit de « Drug Discovery ». Ce processus fait appel à plusieurs disciplines, la chimie médicinale et la pharmacologie dans un premier temps, suivies du développement clinique dans un second temps. Allant de pair, les deux premières disciplines, sont assez coûteuses. En effet, dès la découverte d'une touche également appelée « Hit » (c'est-à-dire une molécule qui présente une activité intéressante), celle-ci va subir des cycles itératifs entre la synthèse organique et l'évaluation biologique afin de devenir une tête de série, ou « Lead », dotée de tous les critères du candidat préclinique apte à entrer en développement clinique.

Le développement d'un médicament, coûteux en temps et en argent, représente le fléau de l'industrie pharmaceutique. Afin de le limiter, plusieurs techniques de recherche et de développement s'appuyant sur l'outil informatique ont vu le jour. La chimie médicinale est l'une des disciplines ayant profité de ces nouvelles techniques, en particulier de la chémoinformatique et du « Data-mining » connue également sous l'expression de « fouille ou l'exploration de données ». Ces techniques permettent au chimiste médicinal d'extraire de l'information d'intérêt à partir de grandes quantités de données et, en les utilisant, de concevoir de façon rationnelle des molécules potentiellement actives. Il peut alors prédire de façon empirique leur activité dans un laps de temps relativement très court, sans avoir à les synthétiser ou, encore moins, à les tester sur les cibles d'intérêt. Dans l'objectif d'une prise de décision la plus opportune quant aux molécules à synthétiser, cette démarche l'autorise à effectuer une sélection parmi ses inspirations.

Cette thèse de chimie médicinale a été conduite dans ce cadre. En effet, à l'aide de ces nouveaux outils, j'ai mené ce travail de manière rationnelle en partant d'une cible protéique impliquée dans plusieurs pathologies comme le cancer, pour arriver à la synthèse de molécules actives capables de stopper in vitro la prolifération de cellules cancéreuses humaines.

Partie I

Etat de l'art : Des protéines kinases JNKs à la stratégie thérapeutique

Chapitre I

Présentation des Tyrosines Kinases et preuve de concept thérapeutique

I. Rôle enzymatique et classification des protéines kinases

Les protéines kinases sont des enzymes de type transférase, leur activité consiste à transférer un groupement phosphate d'une molécule d'ATP à une autre entité protéique, lipidique ou glucidique appelée substrat. De façon générale, comme le démontre la **Figure 1**, la kinase va lier une molécule d'ATP puis le substrat, catalysera le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers le substrat. Ainsi, au final elle libère au final une molécule d'ADP et un substrat phosphorylé.

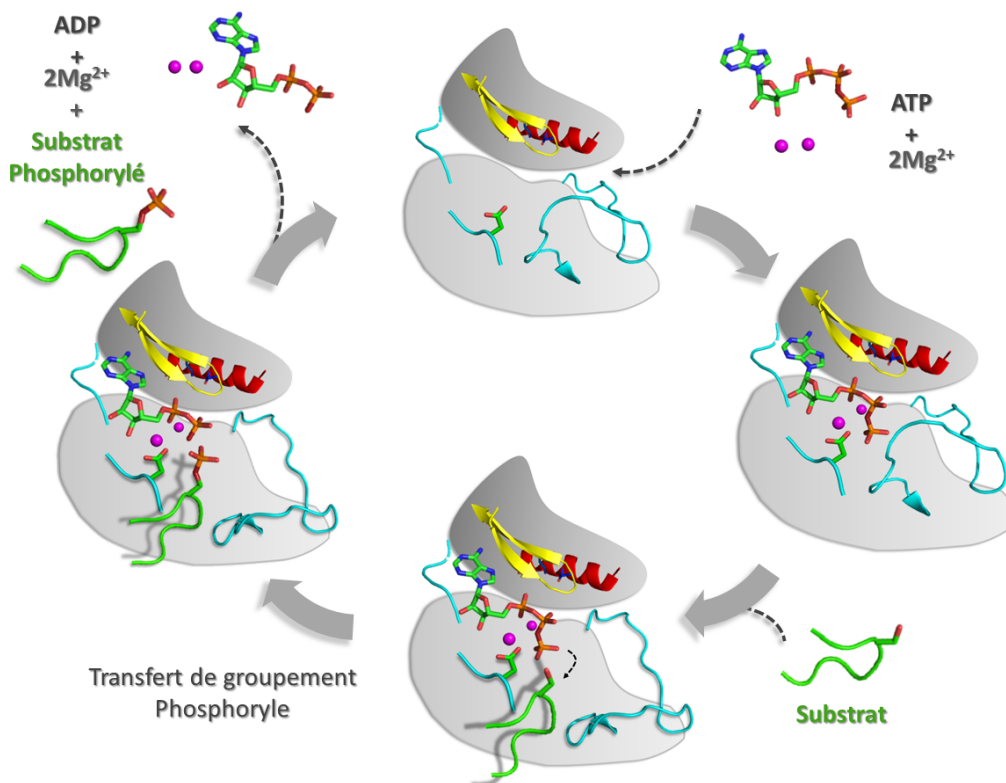


Figure 1 : schéma du cycle catalytique de la phosphorylation d'un substrat par une kinase

Les protéines kinases peuvent être catégorisées de plusieurs manières, par exemple selon le résidu du substrat qu'elles vont phosphoryler, ou encore selon leur localisation dans la cellule. Dans le cas où une kinase phosphoryle un résidu tyrosine de son substrat, elle est dite protéine tyrosine kinase (TK). S'il s'agit d'une sérine et/ou une thréonine qui est phosphorylée, elle est dite protéine sérine-thréonine kinase. Dans le cas où une protéine TK est transmembranaire, elle appartient à la famille des récepteurs tyrosines kinases (RTK). Si elle est localisée dans le cytoplasme ou le noyau cellulaire, il s'agit d'une protéine non-récepteur tyrosine kinase (NRTK).

A ce jour, 518 kinases humaines ont été découvertes et répertoriées. Le domaine catalytique de 478 d'entre elles présente des relations de séquences et elles ont ainsi pu être classées en groupes, en familles puis en sous-familles en fonction de leur identité de séquence selon le dendrogramme présenté dans la **Figure 2** (page suivante) (et sa légende **Tableau 1**) appelé également Kinome humain¹.

Tableau 1 : Légende de la Figure 2

Groupe	Description
AGC	Contient les familles de kinases: PKA (AMPc dépendantes), PKG (GMPc dépendantes et PKC (kinases activées par diacylglycérol (DAG))
CAMK	Protéines kinases calcium/calmoduline dépendantes
CK1	Caséine kinase 1
CMGC	Contient les familles de kinases: CDK, MAPK, GSK3, CLK
STE	Contient les 3 familles de kinases STE (Homologues des levures stériles): STE7, STE11 et STE20
TK	Tyrosine kinase
TKL	Tyrosine kinase-like

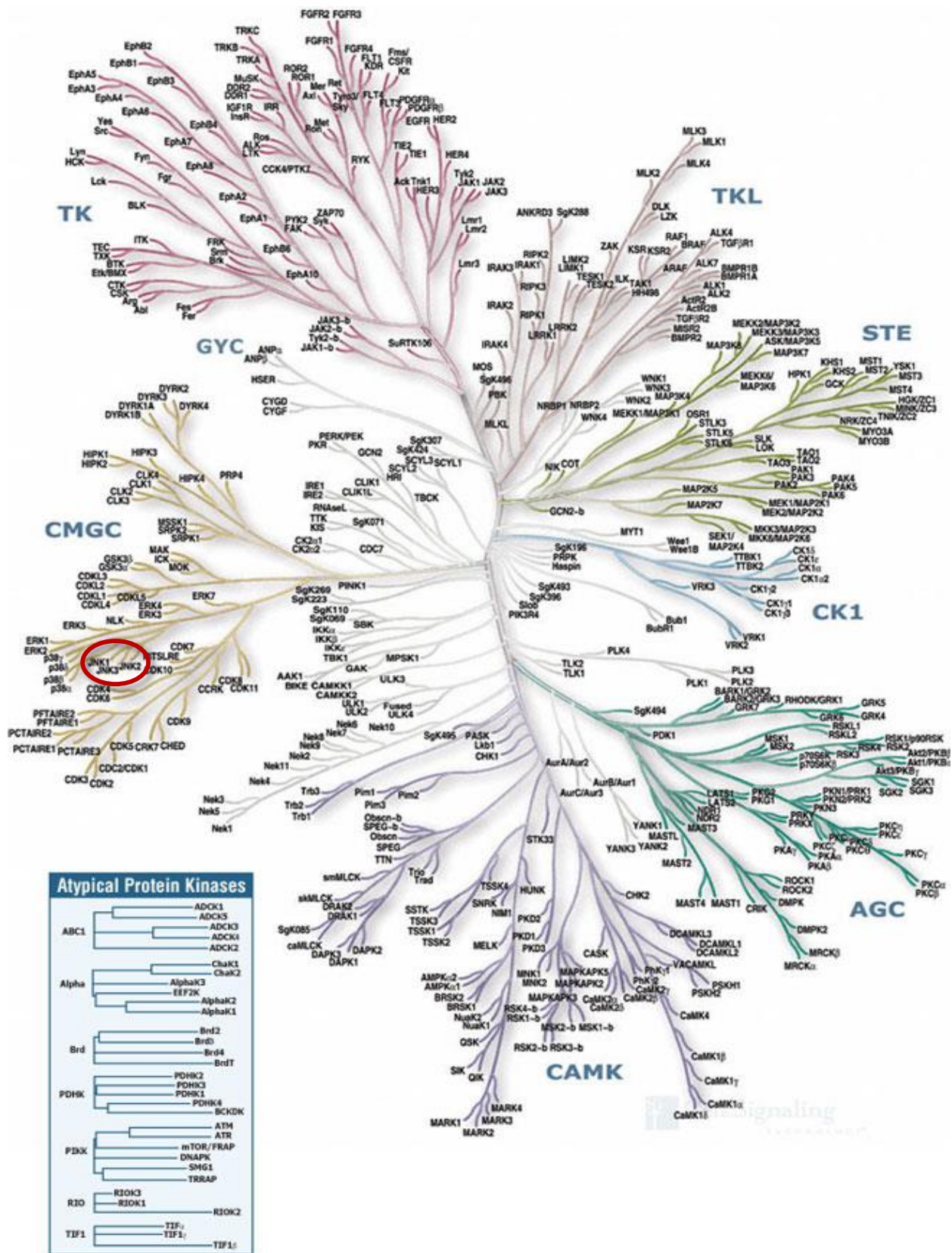


Figure 2 : Le Kinome humain ¹.

II. Preuve de concept et stratégies thérapeutiques

Durant le séquençage du génome humain au début des années 90, puis la caractérisation du kinome humain en 2002, les kinases ont suscité un grand intérêt et plusieurs équipes de scientifiques ont prouvé leur implication dans un grand nombre de pathologies.

L'aventure des kinases en tant que cible thérapeutique commence officiellement en mai 2001, quand la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé la firme pharmaceutique Novartis à mettre sur le marché une petite molécule pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC), sous la dénomination commune internationale : Imatinib®, et à le commercialiser sous le nom de marque : Gleevec® (en Amérique du nord, puis Glivec® en Europe), il est devenu depuis le standard thérapeutique de première intention en la matière. En effet, c'est à cette date et pour la première fois qu'on cible directement une kinase avec une petite molécule pour induire un résultat thérapeutique sur l'homme, car ce principe actif du Glivec d'une masse molaire 493 g/mol est capable de se fixer sur le site actif de la tyrosine kinase Abl ce qui induit l'inhibition de son activité, cela déclenche d'autres mécanismes responsables de la réémission des malades de la LMC. La preuve du concept est faite : on peut inhiber l'activité d'une Kinase avec une petite molécule pour induire un effet thérapeutique désiré.

Quand on parcourt la littérature sur les kinases, on remarque rapidement qu'elles sont impliquées dans un large éventail de pathologies. Depuis leur validation en tant que cibles thérapeutiques grâce au Glivec®, les kinases font l'objet d'un intérêt accru de la part des chercheurs dans le monde, surtout que celui-ci a démontré une grande efficacité contre la LMC qui se trouve être un cancer, il va de soit donc que cela a créé un grand engouement chez la communauté des chercheurs afin de trouver des solutions dans un domaine thérapeutique très préoccupant qui est l'oncologie. Ainsi, plusieurs équipes de recherches issues de disciplines différentes se sont penchées sur l'inhibition des kinases, leur diversité disciplinaire a permis l'exploration de 2 stratégies très variées, cela fut d'autant plus possible grâce à l'état avancé de la génomique

et de la protéomique actuelles, ainsi qu'au flux constant de structure 3D de kinases obtenue par cristallographie mises à disposition, ce dernier en particulier, sera très profitable pour notre projet.

Un état des lieux des quatre stratégies d'inhibition de l'activité des kinases mises au point est exposé dans les sections qui suivent en s'appuyant sur quelques exemples pertinents.

1. Les anticorps monoclonaux (mAb)

Les anticorps sont des macromolécules de nature protéique naturellement secrétés par des cellules du système immunitaire appelées les plasmocytes. Leur rôle principal consiste en la détection qui conduit à la neutralisation d'agents pathogènes dans l'organisme. La reconnaissance se fait par une liaison spécifique entre l'anticorps et une molécule généralement de nature protéique appartenant à l'agent pathogène, appelée antigène (Ag). Essentiellement grâce à cette spécificité, ils ont été utilisés en tant qu'inhibiteurs de kinases, de par leur capacité à se lier spécifiquement à la partie extracellulaire des RTKs pour de les bloquer et induire une action au sein de la cellule.

Actuellement plusieurs mAb inhibiteurs de kinases sont en études cliniques et quelques-uns de ceux qui ont été approuvés et mis sur le marché sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : quelques^{2,3} anticorps monoclonaux inhibiteurs d'RTK mis sur le marché.

DIC	Spécificité pharmaceutique	cible	indication	société	Date de MM /FDA
Trastuzumab	Herceptin®	HER2	Certains cancers du sein Certains cancers de l'estomac	Genentech	1998
Pertuzumab	Perjeta®, Omnitarg®	HER2	Certains cancers du sein	Genentech	2012
Panitumumab	Vectibix®	EGFR	Certains cancers du colon	Amgen	2006
Cetuximab	Erbix®	EGFR	Cancer colorectal métastatique cancer de la tête et du cou	Merck Serono	2004
Necitumumab	Portrazza®	EGFR	Cancer du poumon à cellules non petites et squameuses	Lilly oncology	2015

2. Les petits ARNs interférents (siRNA)

Les siRNA pour "small interfering RNA" sont des petits ARN non-codants double-brin d'environ 20 nucléotides pouvant être endogènes (cellulaires) ou exogènes (viraux).

Dans le cytoplasme, les siRNAs peuvent se lier à un complexe multienzymatique RISC (RNA-induced silencing complex). Grâce à la séquence du brin antisens de ce petit ARN, le complexe RISC-siRNA reconnaît les ARN messagers (ARNm) possédant la séquence complémentaire. Ce complexe peut alors inhiber la traduction de l'ARNm en question lorsque les deux séquences (siRNA et ARNm) sont partiellement complémentaires et, si elles sont totalement complémentaires, déclencher son hydrolyse. Ainsi, ces siRNAs permettent de réguler la traduction de la protéine relative à cet ARNm et sont également impliqués dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques dans la cellule.

De par ce mécanisme, les siRNA des différents isoformes de JNK inhibent son activité dans la cellule de façon indirecte. En effet il ne s'agit pas de l'inhibition des kinases JNKs activées dans

la cellule, mais bien de l'inhibition de l'activité des JNKs par l'arrêt ou la réduction de leur traduction au sein de la cellule.

Au cours de la dernière décennie, ces ARN ont été intensément étudiés. Bien que très convaincants in vitro et malgré un développement relativement moins onéreux que celui des petites molécules, jusqu'à ce jour les siRNA n'arrivent pas à émerger en tant que traitement thérapeutique et entraînent de nombreuses déceptions une fois en étude clinique. Pour preuve, aucun siRNA n'a encore été mis sur le marché ce qui pour autant ne remet pas en question ni leur potentiel ni leur avenir comme agents thérapeutiques.

Ils demeurent un moyen très efficace pour l'étude de l'implication des gènes et des protéines dans les processus cellulaires ou pathologiques.

3. Les aptamères

Les aptamères sont des oligomères synthétiques de nature peptidique ou nucléique (ADN ou ARN). Ils sont capables de se lier de façon très spécifique à leur cible qu'elle soit extracellulaire ou intracellulaire. Dans ce dernier cas, ils sont appelés intramères.

Pour engendrer une activité dans la cellule, les kinases sont capables de se lier à d'autres formes protéiques telles que leurs substrats ou encore les protéines d'échafaudage. C'est grâce à cette propriété des kinases, et en essayant de mimer les sections peptidiques de ces protéines qui viennent s'y lier que les aptamères peptidiques de kinases (ou inhibiteurs peptidiques de kinases) sont apparus : c'est le cas du D-JNK-I, exposé plus en détail dans le chapitre II de cette Partie au IV-a. L'avantage majeur de tels inhibiteurs est une toxicité relativement moindre grâce à une élimination aisée par les protéases naturellement présentes dans l'organisme. Toutefois, ce même avantage constitue un inconvénient en matière de durée de vie dans l'organisme. Un autre inconvénient qui leur est souvent attribué, leur manque de pénétration cellulaire. L'introduction de pseudo-peptides, par exemple en changeant la nature des liaisons peptidiques ou la configuration des aminoacides pour réduire leur protéolyse et augmenter leur demi-vie, ou encore en greffant de petites séquences peptidiques connues pour augmenter la perméabilité cellulaire et leur permettre de mieux atteindre leur cible, peuvent contourner ces inconvénients.

Les aptamères de nature nucléique qui ciblent les RTKs par exemple, empêchent la signalisation intracellulaire pouvant être induite par ces récepteurs. Récemment, la description d'un aptamère se liant aux récepteurs des facteurs de croissance (EGFR)⁴ a démontré que celui-ci a bloqué l'autophosphorylation du récepteur et empêché la prolifération de cellules tumorales. Jusqu'à présent, aucun intramère ciblant directement l'activité enzymatique des kinases n'a été décrit.

4. Les petites molécules

Les petites molécules représentent la classe d'inhibiteurs de kinase la plus développée présentant une efficacité avérée entant que traitements médicamenteux. Jusqu'en avril 2015 la FDA a approuvé la mise sur le marché de plus de 28 petites molécules inhibitrices de kinase^{5,6}. Le nombre de ces molécules est représenté par indication thérapeutique dans l'histogramme de la **Figure 3**, mettant en l'évidence que dans leur grande majorité elle sont destiné aux traitements de cancers.

Ces inhibiteurs de protéines kinases possèdent des structures très diverses, mais sont généralement de nature hétérocyclique, avec un poids moléculaire relativement faible par rapport aux anticorps monoclonaux et aux siRNA, entre 400 à 600 Da⁶, ce qui les rend relativement accessibles en matière de synthèse organique.

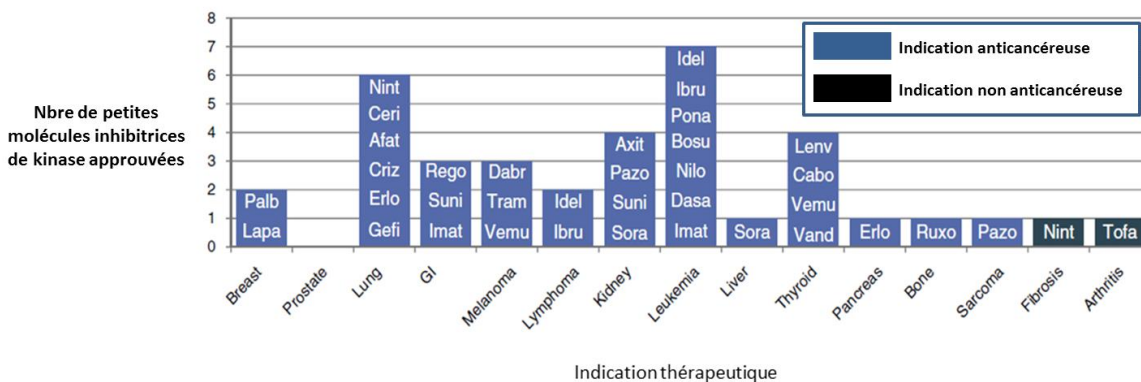


Figure 3 : Nombre d'inhibiteurs de kinases approuvés par la FDA par indication thérapeutique⁶.

Ces inhibiteurs se lient de façon non covalente ou covalente à la kinase, ce qui induit chez celle-ci une certaine conformation la bloquant sous cette forme. Cette immobilisation entravera son cycle catalytique habituel, paralysant ainsi son activité enzymatique.

Cette recherche s'intéresse particulièrement à ces inhibiteurs qui représentent le cœur du projet dont l'objectif vise le développement à visée thérapeutique de petites molécules hétérocycliques sélectives, inhibitrices des kinases JNKs.

III. Généralité sur la structure tridimensionnelle d'une kinase et ses états d'activation

Avant d'aborder la conception rationnelle et le développement de nouvelles petites molécules inhibitrices de JNK, il est nécessaire de comprendre le rapport entre la structure d'une kinase et ses états d'activation et d'identifier où et comment ces petites molécules interagissent avec ces protéines pour bloquer leur activité. En s'appuyant sur ces connaissances et à l'aide des outils de chimoinformatique, il sera possible par la suite, en fonction du matériel disponible concernant JNK, de mettre en place la stratégie de conception la plus pertinente.

1. Description structurale d'une kinase

De manière générale, une observation approfondie des structures tridimensionnelles de protéines kinases laisse apparaître leur grande similitude. En effet, d'une kinase à une autre, plusieurs éléments structuraux sont conservés.

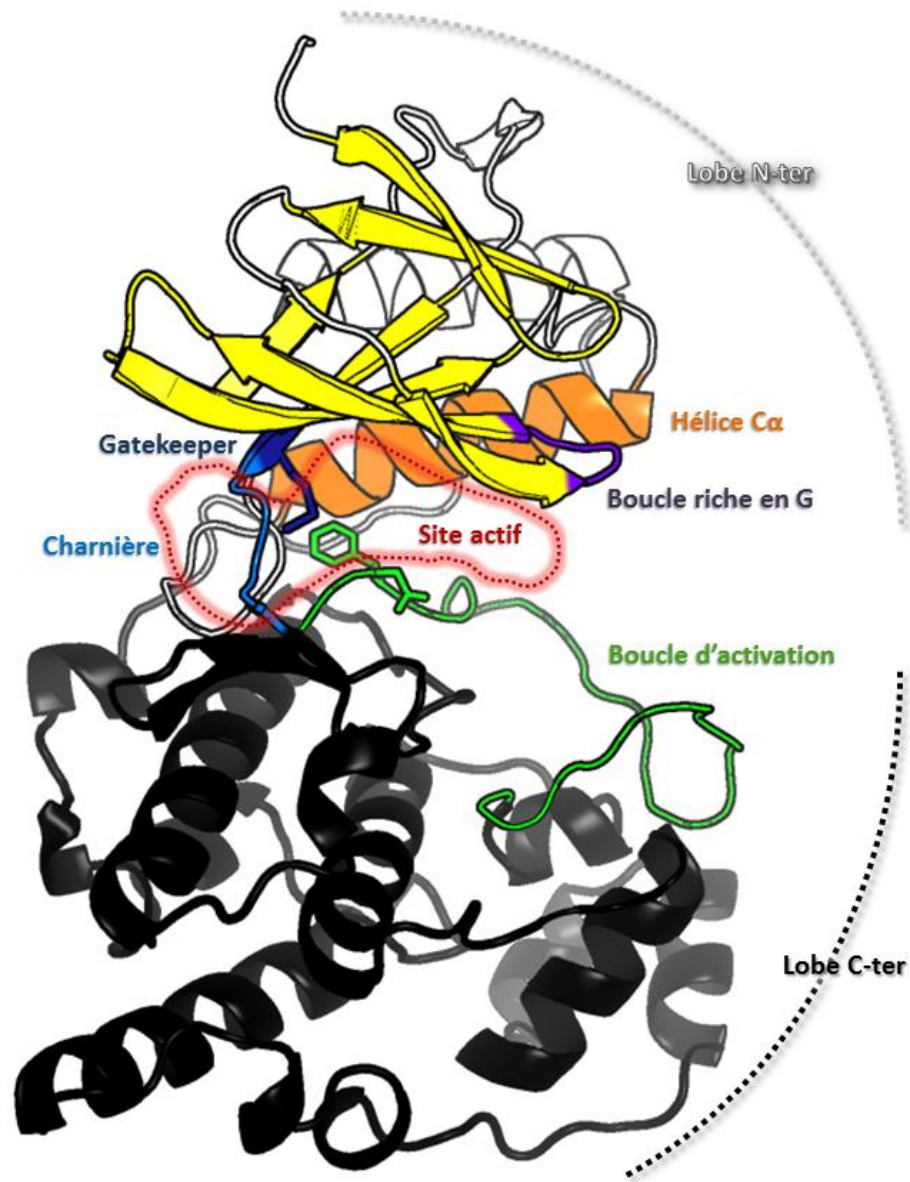


Figure 4 : Structure tridimensionnelle d'une kinase (provient du co-cristal de JNK3 de code PDB: 1JNK)

Comme le montre la **Figure 4**, les kinases sont constituées principalement de deux lobes, un lobe N-terminal (en haut dans la figure) riche en feuillets β (en jaune) et un lobe C-terminal (en noir, en bas) riche en hélices α . Dans ces lobes, certains éléments sont aussi redondants d'une kinase à une autre. Pour le lobe N-terminal, on retrouve par exemple l'hélice C α (en orange) ainsi que le feuillet β antiparallèle (en jaune) qui contient une boucle riche en glycine de séquence GXGXXG (avec X : un autre acide aminé) (en violet), appelé aussi la boucle-P car elle interagit avec les

phosphates β et γ de l'ATP pour aider à sa bonne orientation dans le site actif. Au niveau du lobe C-terminal, on trouve une boucle très labile dite boucle d'activation (en vert), elle est appelée ainsi car c'est par son mouvement que la kinase pourra adopter principalement ses conformations active ou inactive. Ces deux lobes sont reliés par une petite séquence composée généralement de trois acides aminés appelée la charnière (en bleu clair). L'espace confiné entre les deux lobes, et entre la charnière et la boucle d'activation de part et d'autre, constitue le site actif de la kinase (espace délimité par une ligne pointillée rouge). C'est dans une partie de cet espace que l'ATP vient se lier à la charnière afin de phosphoryler le substrat.

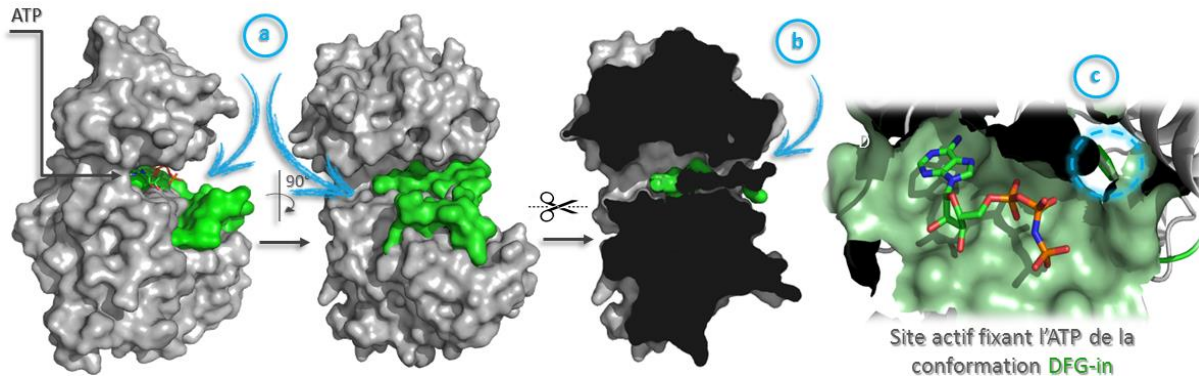
En effet, l'adénine de l'ATP vient interagir via des liaisons hydrogène (LHs) avec la charnière qui s'accompagne d'un acide aminé appelé le « gatekeeper » dont la chaîne latérale plonge vers l'intérieur du site actif (en bleu foncé).

2. Généralités sur les états d'activation d'une kinase

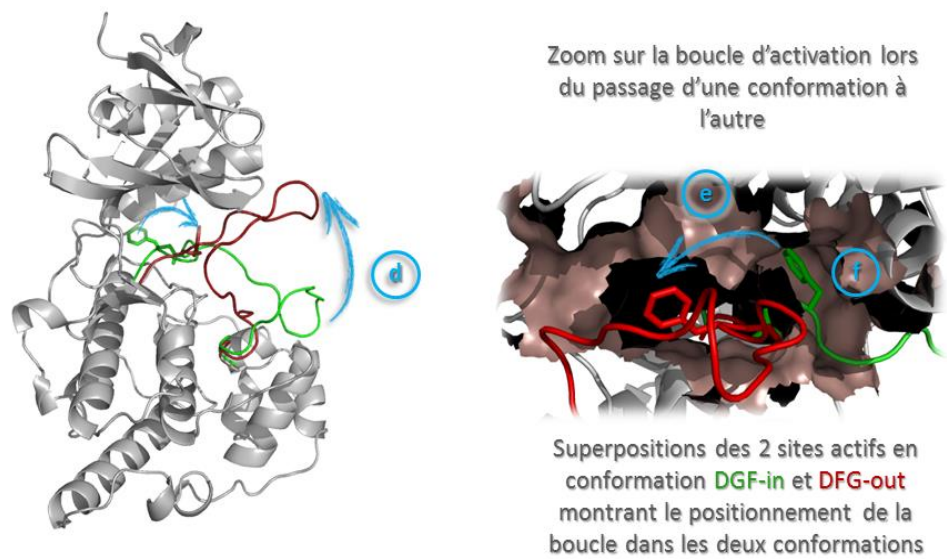
L'activation d'une kinase consiste en des changements conformationnels dans sa structure III^{aire} qui aboutissent au bon positionnement de l'ATP par rapport aux acides aminés du site actif afin de permettre l'accueil du substrat et sa phosphorylation.

Parmi ces conformations, deux sont particulièrement distinguées car elles sont directement associées aux états d'activation et d'inactivation de la kinase. Chez les MAPKs (Mitogene Activated Proteins kinases) par exemple dont JNK fait partie, lorsque la kinase est dans son état actif (**Figure 5.A**) elle présente un site actif en forme de fente complètement ouvert qui peut fixer l'ATP (**Figure 5 (a)**). Par un mouvement de bascule (**Figure 5.B (d)**), la boucle d'activation (appelée aussi boucle catalytique) libère des poches supplémentaires appelées poches de sélectivité (**Figure 5 (i)**), et vient cloisonner l'ouverture de cette fente, ce qui rend le site actif plus grand et lui donne, cette fois-ci, une forme de tunnel qui traverse la kinase d'un côté à l'autre (**Figure 5 (g)**, **(h)**). La kinase est alors dans son état inactif (**Figure 5.B**).

A: Forme active: conformation DFG-in de la boucle d'activation



B. Basculement de la boucle d'activation de la conformation DFG-in à la conformation DFG-out



C: Forme inactive: conformation DFG-out de la boucle d'activation

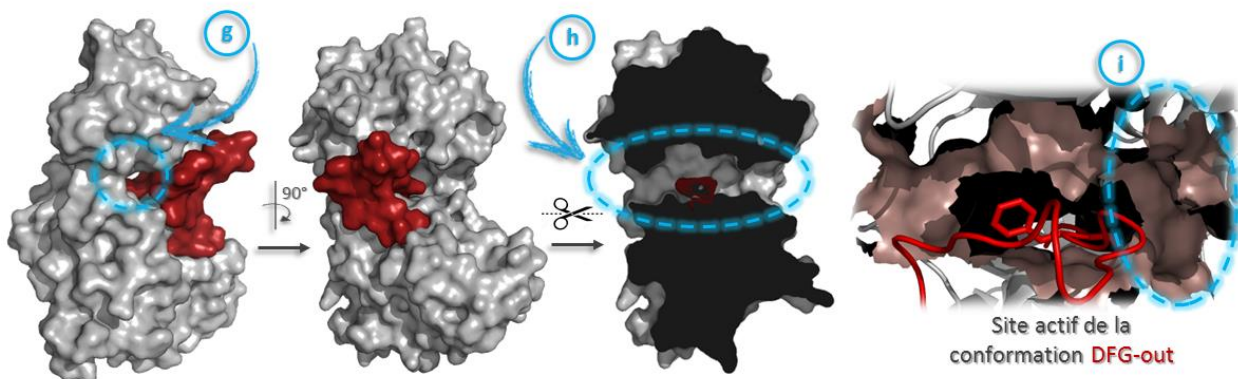


Figure 5 : Représentations tridimensionnelles de la forme active et la forme inactive de la kinase JNK2 (respectivement code PDB : 3E7O, 3NPC)

Parmi un grand nombre de kinases, la boucle d'activation (**Figure 5** : en rouge pour l'état inactif et en vert pour l'état actif de JNK2) comporte une séquence de trois résidus « DFG ». Cette petite séquence joue un rôle primordial dans la définition et le changement de la conformation de la kinase. En effet, lorsque cette dernière est dans son état actif, c'est principalement cette séquence qui obstrue les poches de sélectivité profondes du site actif (**Figure 5 (b), (c), (f)**), d'où la dénomination DFG-in de cette conformation. Lorsque la boucle d'activation bascule (**Figure 5 (e)**), cette même séquence sort du site actif et vient participer au cloisonnement de celui-ci (**Figure 5 (e)**), la conformation est alors dite DFG-out. Celle-ci reste la plus flagrante de toutes les autres modifications qui surviennent au sein de la structure de la kinase quand elle passe d'un état à l'autre. Il est important de préciser que l'existence de la conformation DFG-out n'a pas été démontrée pour toutes les protéines kinases.

3. Les différents types d'inhibiteurs de kinase et l'intérêt de faire des inhibiteurs de type II

La tâche commune aux kinases est la catalyse de la phosphorylation au sein de leur site actif. Cette région de liaison de l'ATP est visée par les inhibiteurs de kinases dits ATP compétitifs. C'est une des régions les plus conservées d'une kinase à l'autre, car elle contient un certain nombre de résidus primordiaux quant à la liaison de l'ATP et le transfert du groupement phosphate. C'est pour cette raison que le développement d'un inhibiteur ATP compétitif sélectif envers une kinase voire envers un seul de ses isoformes n'est pas une tâche des plus aisées.

Les deux types d'inhibiteurs ATP compétitifs de kinase les plus courants sont les inhibiteurs dits de type I, qui se lient à la conformation DFG-in, et de type II qui se lient à la conformation DFG-out. Ces deux types d'inhibiteurs de kinases ne sont pas isolés : d'autres existent et sont classés selon la région de la kinase où ils se lient, ou encore selon le type de liaison qu'ils forment avec celle-ci. Le **Tableau 3** résume l'ensemble de cette classification.

Tableau 3 : classification des inhibiteurs de kinases ⁷.

Type d'inhibiteur	Région de liaison dans la kinase	Forme de la kinase liée	Type de liaison
Type I	ATP-compétitif	Active	Non covalente
Type I _{1/2} (A,B)	ATP-compétitif	Inactive	Non covalente
Type II (A,B)	ATP-compétitif	Inactive	Non covalente
Type III	Allostérique dans les poches de sélectivité du site actif	Active/inactive	Non covalente
Type IV	Allostérique loin du site actif	Active/inactive	Non covalente
Type V	Deux régions de liaison différentes dans la kinase	Active/inactive	Non covalente
Type VI	Dans le site actif ou dans un site allostérique	Active/inactive	Covalente (généralement non réversible)

Dans le cadre de ce projet, les inhibiteurs de type II ont été sélectionnés pour être développés, choix motivé par trois raisons:

- Les inhibiteurs de type II, avec les inhibiteurs de type I et de type I_{1/2} constituent les types d'inhibiteurs de kinases ayant le plus fait leur preuve en tant qu'agents thérapeutiques⁷.
- Au sein d'OriBase Pharma, la technologie mise en place pour le développement d'inhibiteurs de kinases est basée sur le design d'un scaffold qui se lie à la charnière de la protéine kinase cible, avant d'être ensuite enrichie de fragments pour accroître l'activité voir la sélectivité envers cette cible. Les inhibiteurs ainsi développés sont par conséquent ATP compétitifs.
- Les inhibiteurs de type II présentent un avantage par rapport au inhibiteurs des types I et I_{1/2}, est qu'ils sont les seuls à être capables d'interagir en même temps avec la région de la charnière ainsi qu'avec plusieurs poches de sélectivités. Ces dernières sont beaucoup moins conservées entre kinases, donc ces inhibiteurs présentent un meilleur potentiel en matière de sélectivité et également en matière d'interaction grâce à la diversité de ces

zones atteintes et leur volume non négligeable. Les inhibiteurs de type II sont par conséquent censés être plus sélectifs et plus actifs, limitant ainsi les effets de cytotoxicité.

Chapitre II

Focus sur la sous-famille des JNKs

I. Présentation de la sous-famille des protéines kinases JNKs

Dans la branche des CMGC du kinome humain se trouve la famille des MAPKs ou MAP kinases pour Mitogen-activated proteins Kinases. Elle est constituée chez l'être humain de treize membres pouvant être classés en six sous-familles selon leur cascade de signalisation au sein de la cellule: les P38s, les ERK1/ERK2, la ERK5, les ERK3/ERK4, les ERK7/ERK8 et les JNKs ⁸.

La sous-famille des c-Jun N-terminal kinases (JNKs) (appelée aussi, Stress-Activated Protein Kinase (SAPK) ^{9,10}) prend sa dénomination de C-jun, qui fut le premier substrat étudié pour être phosphorylé par cette sous famille de kinases, et plus spécifiquement les deux résidus Ser63 et Ser73 de son domaine d'activation sur le lobe N-terminal ¹¹⁻¹⁴. C-jun est l'un des éléments qui entre dans la formation du facteur de transcription de l'ADN AP1 (Activator Protein 1), l'un des régulateurs de l'expression génétique. Cependant, des études plus récentes ont démontré que les JNKs peuvent phosphoryler plus de 50 substrats très variés ¹⁵.

Cette sous-famille est constituée de trois membres: JNK1, JNK2 et JNK3 (appelé aussi MAPK8, MAPK9 et MAPK10). Leurs trois gènes *jnk1*, *jnk2* et *jnk3* peuvent être transcrits en 10 isoformes lors de l'épissage au sein de la cellule. Ces derniers vont présenter une différence de 42 à 43 acides aminés soit 46 et 55 kDa en poids moléculaire (**Figure 6**).

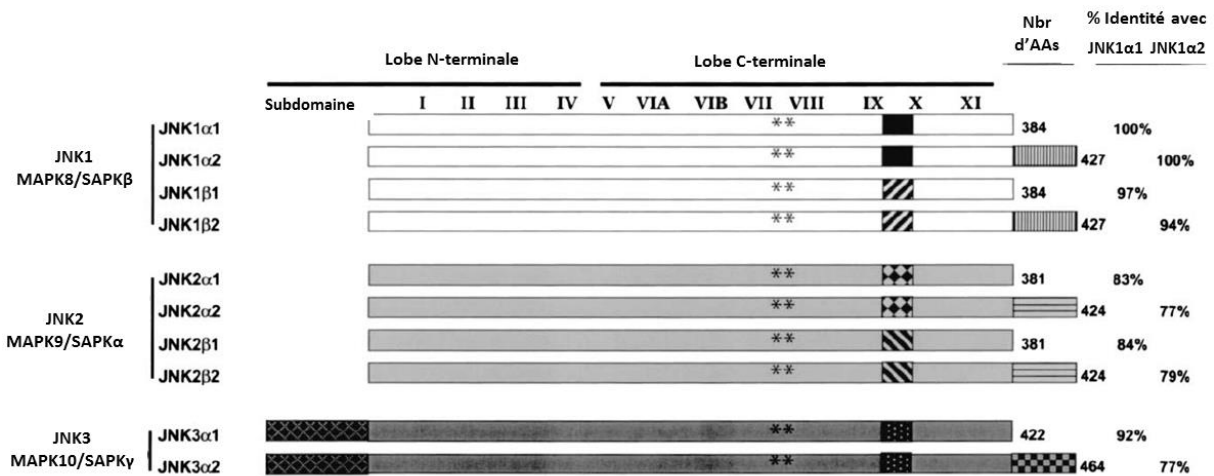


Figure 6 : Isoformes de chaque protéine kinase JNK ¹⁶

JNK1 et JNK2 sont exprimés de façon ubiquitaire dans les tissus et sont susceptibles de présenter des fonctions différentes ou similaires. Quant à JNK3, elle est principalement exprimée dans le cerveau (haut niveau d'expression), les testicules et le cœur (faibles niveaux d'expression) 17–20.

II. Implication biologique & rôle cellulaire des JNKs

Les protéines kinases sont des régulateurs clés des fonctions cellulaires. Elles interviennent dans la quasi-totalité des processus cellulaires en orchestrant l'activité et la localisation de nombreuses protéines au sein de la cellule. Par-ailleurs, le fait de retrouver une cinquantaine de familles de kinases distinctes chez différentes espèces, telles que l'Homme, les levures, certains invertébrés et d'autres mammifères, démontre bien que les kinases ont des fonctions essentielles pour la vie cellulaire.

Chez les mammifères, les réponses induites par l'activation des kinases peuvent se traduire par la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration, la réponse inflammatoire ou encore l'apoptose ^{21–23}. Par exemple, la famille des MAPKs est bien connue pour intégrer, relayer et

amplifier les signaux d'un large éventail de stimuli extracellulaires, à travers leur voie de signalisation appelée voie de signalisation MAPK, qui est l'une des voies qui contrôlent le comportement génomique et physiologique de la cellule. Dans cette voie de signalisation, chaque sous-famille des MAPKs, dont celle des JNKs, va intervenir selon sa propre cascade et lui son nom. Un des points commun entre ces cascades de signalisation, est qu'elles s'organisent généralement en trois niveaux d'activation successifs avant d'activer la MAPK en question (**Figure 7**) : au premier niveau a lieu l'activation d'une MAPK kinase (appelée aussi MAP3K ou MAPKKK) qui va activer à un second niveau une autre MAPK kinase (appelée aussi MAP2K ou MAPKK) qui activera à son tour et à un troisième niveau la MAPK concernée ²⁴.

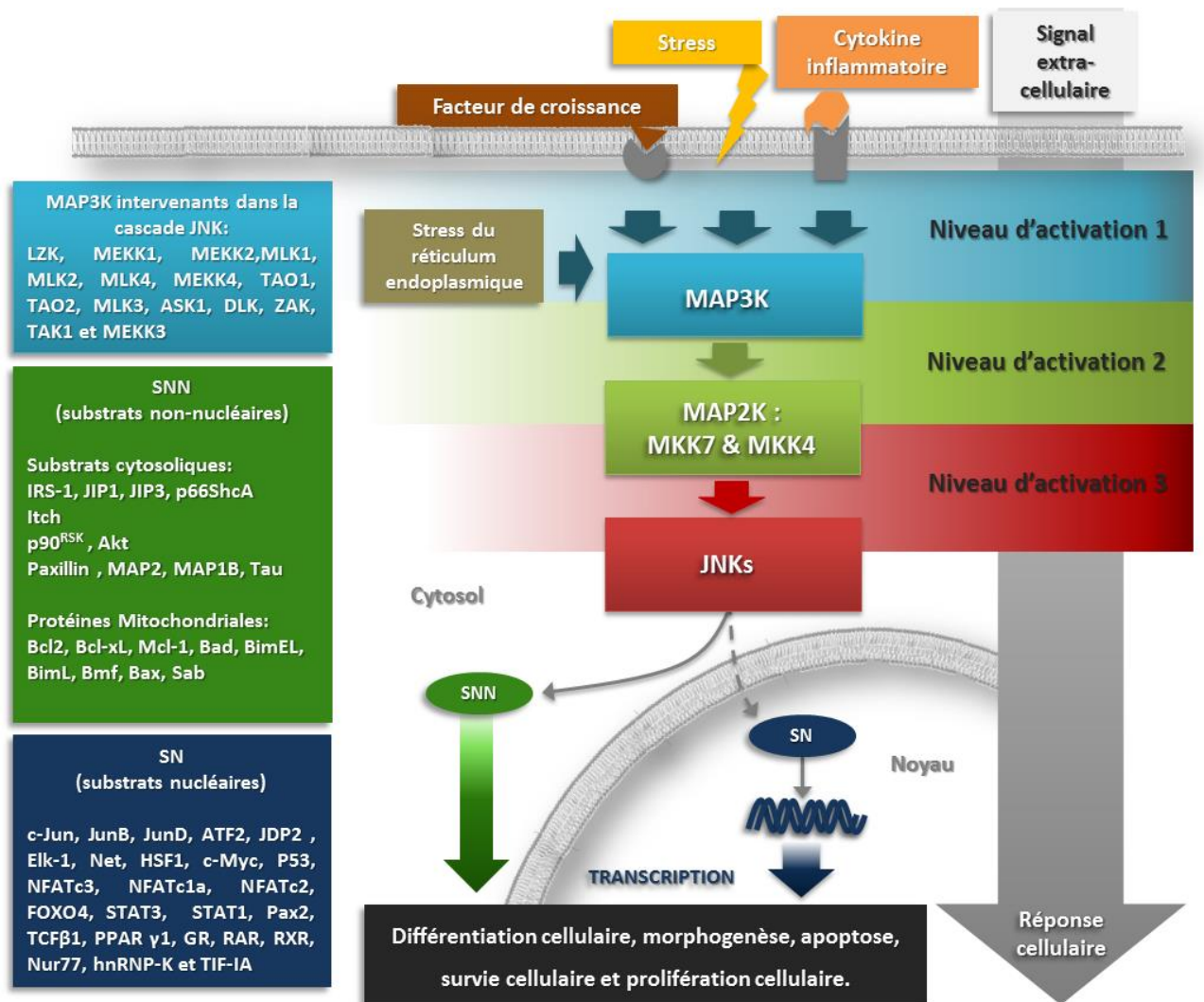


Figure 7 : Cascade de signalisation des JNKs

Dans le cas de la voie de signalisation des JNKs, l'activation en amont peut se faire par le biais de plusieurs stimulus extracellulaires et signaux intracellulaires, comme les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance ou encore les facteurs de stress (comme les rayonnements ionisants, les UV, les chocs thermiques, les chocs osmotiques, le stress oxydatif et les dommages de l'ADN ²⁵). Chacun de ces signaux induit sa propre cascade d'interactions avant d'activer une MAP3K particulière, qui elle-même active l'une des deux MAP2K: MKK4 ou MKK7 par une double phosphorylation, ce qui lui permet de catalyser à son tour une double phosphorylation de l'une des trois kinases JNK. Pour toutes les MAPKs, la double phosphorylation a lieu sur la séquence Thr-AA-Tyr de leur boucle d'activation. Pour les JNKs, ce motif est : Thr-Pro-Tyr ^{12,26}. Le plus souvent, les deux dernières activations ont lieu grâce à la formation d'un complexe de signalisation JNK. Ce dernier est constitué principalement d'une protéine d'échafaudage, comme JIP1²⁷, JIP2 , JIP3 , JIP4 (JNK Interacting Protein-1, 2 , 3 , 4), β -Arrestin-2, arrestine-3²⁸, Filamin ou CrkII ^{29,30} qui va lier la MAP3K initialement activée, la MAP2K et la JNK ainsi que d'autres protéines, rapprochant les trois kinases et permettant leurs interactions.

D'une manière plus générale, les JNKs interviennent sur un large éventail de substrats pouvant être nucléaires (SN) comme des facteurs de transcription, des récepteurs nucléaires d'hormones, et le facteur de transcription spécifique, ou bien non nucléaires (SNN), comme des substrats impliqués dans la dégradation des protéines, la transduction du signal, la mort apoptotique de la cellule, ou encore le mouvement ^{15 24}.

Il a été remarqué qu'entre les différentes isoformes des JNKs, en dépit de leur niveau élevé de similarité en matière de séquence ¹⁶ ; certains isoformes montraient des préférences pour certains substrats plus que d'autres. Par exemple, JNK2 interagirait préférentiellement avec la protéine substrat DCX ³¹ alors que JNK1 interagirait plus fréquemment avec la ligase Itch ³². A l'évidence, un certain nombre de mécanismes subtils coopèrent dans la cellule afin d'associer préférentiellement un isoforme de JNK à un substrat bien particulier ¹⁵.

III. Implication thérapeutique

Comme il a été démontré précédemment, la voie de signalisation des JNKs intervient dans bon nombre de processus cellulaires essentiels à l'activité cellulaire. De ce fait, toute anomalie ou dérégulation de cette voie peut entraîner des effets néfastes et donc participer au développement de différentes pathologies.

Ainsi l'expression aberrante et/ou la sur-activation des JNKs dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, aussi bien que dans des échantillons de patients atteints de cancer a été démontrée³³. De plus, des anomalies dans l'activité des JNKs ont également été identifiées dans des pathologies comme l'inflammation et le diabète de type 2 lié à l'obésité^{34,35} et les maladies neuro-dégénératives³⁶⁻³⁸. L'implication des JNKs dans ces différentes pathologies sera détaillée dans les paragraphes suivants.

1. Implication des JNKs dans le cancer

a. Généralités

Le cancer est un terme générique qui regroupe une grande famille de maladies qui se traduisent par la croissance inhabituelle de cellules anormales ayant capacité ou non d'envahir le tissu local et/ou de se propager à d'autres organes de l'organisme.

Le développement et l'évolution d'un cancer sont très divers d'un organe à un autre, d'un tissu du même organe à un autre, voir pour le même tissu d'un patient à un autre. Néanmoins, un processus global et multi-étapes commun à toutes ces maladies peut être désigné. Pour point de départ une ou plusieurs cellules normales qui subissent des modifications intrinsèques profondes et irréversibles. Celles-ci bouleversent leur mécanisme de prolifération, débrident la régulation de leur durée de vie, brouillent le contrôle de leurs relations avec les cellules voisines. Ces modifications leur attribuent une capacité à échapper au système immunitaire malgré leur défaillance, les conduisant à proliférer d'une façon rapide et anarchique.

b. Facteurs cancérigènes

Un ou plusieurs facteurs multiples et très divers entrent en jeu pour engendrer ces changements métaboliques et comportementaux de la cellule. Ils sont eux aussi multiples, très divers et peuvent être classés en trois types : les facteurs biologiques, chimiques et physiques.

Les facteurs biologiques : internes à l'organisme dit endogènes (comme un désordre dans le processus du cycle cellulaire d'origine génétique, désordre hormonal...) ou externes à l'organisme dit exogènes, comme certains Oncovirus (par exemple : les Hépatites B et C...) qui vont intégrer partiellement ou entièrement leur génome dans la cellule infectée afin de le transcrire, ou encore certaines bactéries (par exemple : la *Chlamedia pneumoniae* dont l'infection est associée au développement de cancer du poumon ^{39,40}) et certains parasites (par exemple les shistosomes ⁴¹).

Les facteurs chimiques : aliments ou substances chimiques (alcools, additifs alimentaires, tabac, médicaments, substances issues de pollution). Par exemple les dérivés réactifs de l'oxygène résultent de la combustion incomplète d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (combustion du tabac, d'hydrocarbures,...etc). Ce sont des radicaux oxygénés libres biologiquement actifs sous l'action de certaines enzymes cellulaires pouvant conduire à l'accumulation des métabolites d'une substance donnée de l'organisme. Ces métabolites peuvent se lier à des molécules biologiques fondamentales de la cellule telles que les protéines, l'ARN et l'ADN et provoquer des changements de phénotypes spécifiques ou des cancers.

Les facteurs physiques : la chaleur, la lumière ou les radiations ionisantes (comme les rayons X médicaux, les UVs,...). Ils peuvent induire aléatoirement la formation de radicaux libres dans la cellule à partir d'une particule cellulaire, ou encore dénaturer directement l'ADN, modifiant l'information génétique et altère donc le cycle cellulaire.

c. La cancérogénèse

La cancérogénèse est le processus conduisant à la formation de tumeurs malignes à partir d'une cellule normale. Ce processus est généralement divisé en trois grandes étapes pour les cancers dits solides qui sont l'initiation, la promotion et la propagation (**Figure 8**).

L'initiation (I) : elle apparaît lorsqu'une ou plusieurs cellules normales subissent une altération de leur génome pouvant être due à l'exposition à un seul ou à la combinaison de plusieurs facteurs cancérigènes (cf paragraphe précédent). Il faut savoir que l'initiation d'un cancer n'a pas lieu après chaque lésion du génome. Heureusement d'ailleurs, car en moyenne le génome humain subit plus de 10 000 dommages par cellules par jour sans pour autant développer une seule tumeur ⁴². Cela est possible car la cellule est dotée de voies de réparation d'ADN-endommagé. Quand ce dernier a subi un grand nombre de lésions et ne peut plus être réparé, la cellule peut entrer en senescence c'est à dire un état où la cellule arrête son cycle cellulaire de façon permanente ⁴³), empêchant d'enclencher son propre suicide appelé Apoptose. Dans certains cas, ces mutations atteignent des gènes impliqués dans les mécanismes de surveillance cellulaire, par conséquent la cellule se trouve démunie face à ses altérations génétiques et est dite dite initiée.

La promotion (II) : deux types de gènes cohabitent dans la cellule pour réguler sa mitose. D'un côté : les proto-oncogènes, qui s'activent en oncogènes pour promouvoir la mitose et de l'autre, les gènes suppresseurs de tumeur ou anti-oncogènes, qui régulent la mitose à la baisse. Un déséquilibre en faveur de l'activité des proto-oncogènes par rapport aux anti-oncogènes dans une cellule initiée conduit à sa multiplication anarchique, celle-ci peut être soutenue par l'immortalisation de ces cellules par perte de leur caractère homéostatique et devenir insensibles aux signaux qui régulent la prolifération cellulaire et l'apoptose.

La propagation (III) : non obligatoire cette étape se passe généralement après l'angiogenèse qui constitue en la formation par la tumeur de vaisseaux sanguins afin d'acheminer les nutriments à ses cellules. Une ou plusieurs cellules cancéreuses vont se détacher de la tumeur primaire et vont migrer en empruntant la circulation sanguine pour s'installer plus loin dans d'autres sites de l'organisme (un autre tissu voir d'autres organes), c'est le phénomène de métastase.

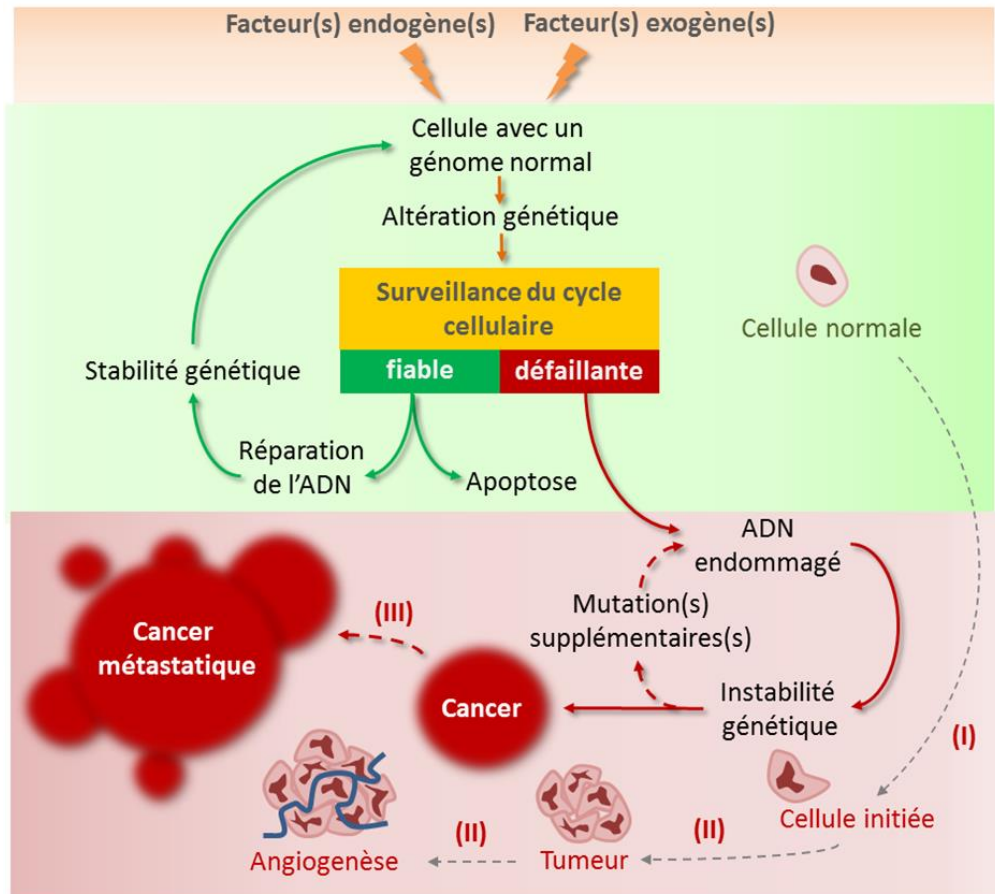


Figure 8 : Schéma de la cancérogénèse de cancers solides.

Les voies de signalisation intracellulaires impliquant les JNKs sont souvent dérégées et/ou suractivées dans divers cancers humains. Elles sont impliquées dans plusieurs processus cancéreux, comme la prolifération tumorale, l'angiogenèse, l'effet métastatique et la résistance aux médicaments^{33,44,45}. Alors que le rôle exact de chaque JNK dans les états pathologiques n'est pas encore bien compris, chaque isoforme de JNK semble jouer un rôle distinct dépendant de l'ensemble organe/tissus/tumeur et probablement aussi de la voie de signalisation activée en amont.

Plusieurs preuves de l'implication des protéines kinases JNKs dans divers cancers sont exposées dans les prochains paragraphes. Il s'agit d'expériences *in vitro* sur des cellules cancéreuses, des expériences *in vivo* sur des modèles animaux atteints de cancers, ainsi que des analyses de tissus humains atteints du cancer.

d. Le cancer du foie

Le type le plus répandu de cancer du foie est le **carcinome hépatocellulaire** (CHC), ou hépatocarcinome (HC). Ce cancer primaire du foie est classé 8^{ème} cancer dans le monde. Son, incidence mondiale oscille entre 500 à 750 mille nouveaux cas chaque année avec peu d'options de traitement efficaces ⁴⁶⁻⁴⁸. Le plus souvent, il a pour précurseur une infection virale comme certaines souches de virus d'hépatites B ou C ^{49,50} ou une maladie hépatique préexistante, comme une cirrhose du foie ou une fibrose sévère (accumulation élevée de constituants de la matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique) causées par une réponse inflammatoire, par des séries répétées de mort d'hépatocytes ou encore la régénération compensatoire du foie. Ces trois phénomènes impliquent une suractivation de la voie JNK dans les hépatocytes ^{44,51,52}.

Plusieurs études *in vivo* montrent l'implication de JNKs dans ce cancer, et les résultats prouvent qu'il y a une réelle relation entre l'activité des JNKs et l'initiation/progression de l'HC ⁵²⁻⁵⁷.

En effet, il a été démontré qu'un peptide inhibiteur du domaine substrat des JNKs (D-JNK11) était capable de supprimer l'activité de JNK et de réduire la croissance tumorale dans un modèle de souris « DEN-induced HCC » (CHC induit par traitement à la diéthylnitrosamine), ainsi que dans un modèle de xénogreffe de CHC humain chez des souris ⁵⁸. Dans un modèle de « DEN-induced HCC » chez le rat, l'administration de SP600125 (**Figure 9**), un inhibiteur de JNK a réduit le nombre des cellules et le volume tumoral des CHCs ⁵⁹. Cette même molécule en combinaison avec le TRAIL ((TNF)-related apoptosis-inducing ligand, médicament destiné à la chimiothérapie), a induit une augmentation considérable de l'apoptose dans les cultures de CHC humains ⁶⁰. De plus, un taux inhabituel de JNK1 activée a été dépisté dans des échantillons de tissus provenant de patients atteints de CHC ⁵⁸, et cette présence corrèle directement avec une mauvaise réponse thérapeutique au Sorafenib qui est un inhibiteur de kinases anticancéreux contre le CHC mis sur le marché par Bayer et par Onyx Pharmaceuticals sous le nom de *Nexavar* ⁶¹. Associés, les résultats décrits ci-dessus illustrent l'importance de JNK1 à promouvoir le CHC et le potentiel de JNK1 en tant que cible pour de nouveaux inhibiteurs, pouvant être utilisés seuls ou combinés à d'autres agents thérapeutiques dans le cadre de thérapies anti-CHC.

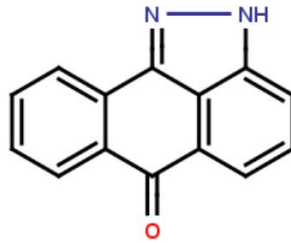


Figure 9 : structure du SP600125

À ce jour, aucun inhibiteur de JNK1 n'a été développé en vue de traitement des patients atteints de CHC. En dépit de toutes les expériences menées en ce sens, le mécanisme d'action exacte de JNK dans cette pathologie n'est pas entièrement élucidé.

e. Le cancer du pancréas

Les cancers du pancréas sont un groupe de maladies hétérogènes à la fois du pancréas exocrine et endocrine. L'adénocarcinome canalaire pancréatique exocrine (ACPE) est de loin le cancer du pancréas le plus répandu présentant plus de 90% des cas de tumeurs pancréatiques malignes. Pathologiquement et cliniquement, il se distingue bien des autres tumeurs endocrines du pancréas, telles que les tumeurs des îlots pancréatiques représentant 3-5% des tumeurs pancréatiques. Bien que l'ACPE soit un cancer relativement rare (2% de tous les cas de cancer), il est la quatrième cause de décès dû à un cancer en raison de son agressivité et du manque de traitement efficace. ^{62,63}.

Divers travaux scientifiques citent JNK comme un des acteurs majeurs dans le processus de croissance, d'angiogenèse et de déplacement de l'ACPE ⁶⁴. Différents symptômes physiologiques caractéristiques de l'APCE impliqueraient JNK, comme l'activation des cellules étoilées du pancréas qui permet la progression des cellules de l'APCE par la sécession de facteur de croissance et des cytokines, avec une sécrétion importante des protéines constitutives de la matrice extracellulaire. Celle-ci s'épaissira allant jusqu'à jouer un rôle de barrière aux agents chimiothérapeutiques ⁶⁵.

Lors d'un western blot de JNK dans des cellules du cancer de pancréas humain, des échantillons de cellules tumorales et des échantillons de cellules saines adjacentes ont été prélevés par biopsie sur 9 patients différents. L'analyse de ces tissus a dévoilé une sur-activation de JNK dans les 9 tissus cancéreux par comparaison, un à un, à avec leurs voisins sains ⁶⁶.

Une autre étude *in vivo* et *in cellulo* sur le cancer du pancréas ⁶⁷ démontre l'implication de JNK dans la prolifération cellulaire de lignées de cellules cancéreuses du pancréas ainsi que sur les phénomènes d'angiogénèse. Le traitement de trois lignées cellulaires du cancer du pancréas chez des souris par des petits ARNs interférents de JNK et un inhibiteur de JNK, le SP600125, supprime la prolifération cellulaire de ces cellules, réduit l'angiogénèse et prolonge significativement la vie des souris. Grâce à la coloration immunohistochimique, cette même étude prouve également que des niveaux élevés de JNK phosphorylée sont observés dans 85 sur 93 échantillons prélevés sur des patients atteints de cancer du pancréas, soit 91,4%. Et cela, sans qu'aucun des 18 échantillons témoins (échantillons de pancréas normaux) ne montre de coloration positive pour JNK phosphorylée. Cependant, ces taux de phosphorylation n'affichent pas de différence significative entre les stades pathologiques et le type histologique de ces échantillons. Toujours dans cette étude, la même analyse a été effectuée sur huit autres lignées cellulaires du cancer de pancréas humain dans lesquelles l'augmentation de cette phosphorylation a encore été observée, ce qui semble indiquer que la voie de JNK est activée dans la grande majorité des cas de cancer du pancréas humain.

La même équipe de chercheurs a alors examiné l'influence de JNK sur la croissance tumorale *in vitro*. En inhibant JNK-pan dans deux lignées cellulaires du cancer du pancréas (la lignée BxPC- 3 et la lignée KP-4 affichant un niveau élevé de JNK-pan) par de petits ARNs interférents (JNK1-siRNA et JNK2-siRNA), ou le SP600125, la prolifération cellulaire de ces deux lignées est significativement réduite.

Dans un contexte différent, selon les conclusions d'une autre équipe de chercheurs, JNK peut être potentiellement ciblée pour arrêter la migration et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques ⁶⁸.

Au regard des cancers étudiés précédemment, le mécanisme d'action de JNKs dans celui du pancréas est relativement mieux compris⁶⁷. Et pourtant, aucun inhibiteur de JNK n'a atteint la phase clinique ou encore, n'a été mis sur le marché pour le traitement du cancer du pancréas.

f. Le cancer du sein

Dans le cas du cancer du sein, l'intervention de la voie de signalisation JNK pour supprimer le développement des tumeurs a été démontrée. En effet, une étude sur des souris développant spontanément un cancer du sein du même type que le cancer Li-Fraumeni chez l'Homme⁶⁹, suggère que JNK1 et/ou JNK2 peuvent agir pour le réduire⁷⁰. Dans le même sens, des mutations inactivantes ont été identifiées dans le gène *MKK4* (activateur en amont de JNK) dans le cancer du sein humain^{71,72}. Un rôle de suppresseur de tumeur similaire des JNKs a également été observé dans les cellules épithéliales mammaires, chez des souris transgéniques qui expriment l'oncogène PyV M T (Polyomavirus middle T, virus)⁷³. Ce rôle des JNK est aussi corroboré par des études qui montrent que la déficience en JNK des cellules épithéliales mammaires promeut la formation de tumeur du cancer du sein dans un modèle de souris KRas/p53⁷⁰. Des souris transgéniques PyV M T développent des tumeurs mammaires de forme multifocales, qui métastasent souvent au poumon, imitant ainsi les deux stades précoces et tardifs du cancer du sein humain. Parmi ces souris, la délétion du gène *jnk2* a mis en évidence une réduction de latence et une augmentation du nombre de tumeurs, ainsi qu'une instabilité génomique plus importante. L'expression de JNK2 empêcherait donc le développement du cancer du sein en régulant la progression du cycle cellulaire et les mécanismes de réparation de l'ADN⁷⁴.

Sous un autre angle, la délétion de gène *MKK7* (activateur en amont de JNK) cette fois-ci dans les cellules épithéliales primaires murines faciliterait la transformation oncogénique dans les glandes mammaires⁷⁵.

L'ensemble de ces résultats valide bien l'implication de JNK1 et JNK2 dans la suppression, voire la promotion du carcinome mammaire. Il souligne également la possibilité d'une même direction des rôles des deux JNK.

g. Le cancer du cerveau

Les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte sont les glioblastomes, elles représentent environ 80% des tumeurs malignes du cerveau ⁷⁶. En s'appuyant sur différents critères histologiques, les différents sous-types de glioblastome sont classés par l'OMS (organisation mondiale de la santé) en quatre grades selon leur degré de malignité ⁷⁷. Le glioblastome de grade IV est le plus sévère et le plus agressif et représente environ la moitié de tous les glioblastomes⁷⁸.

Des études cellulaires et xénogreffes menées sur la souris ont révélé un rôle de JNK joué dans le développement et la progression des glioblastomes. Pour exemple, des niveaux élevés de l'activité de JNK ont été observés dans un panel de lignées cellulaires de glioblastome et dans des échantillons de tumeur de glioblastome humain⁷⁹.

Comparé à JNK1 et JNK3, JNK2 joue un rôle pro-tumorigène dominant dans le glioblastome. En effet, les deux isoformes de JNK2 de 55kDa constituent les principaux isoformes de JNK activés présents dans les noyaux cellulaires du glioblastome. Par ailleurs, les quatre isoformes de JNK2 font partie des cinq isoformes de JNK présentant un haut niveau basal d'activité envers leurs substrats en l'absence de la kinase activante en amont et possèdent donc une activité d'autophosphorylation ⁸⁰. Il a également été démontré que JNK2 favorise la tumorigenèse *in vivo* par l'activation de AKT (une kinase impliquée dans la voie JNK en amont) en régulant à la hausse l'expression de la traduction du facteur eucaryote d'initiation 4 ⁸¹, ce dernier étant fréquemment surexprimé dans de nombreux cancers humains ⁸². L'administration systémique de SP600125, un inhibiteur de JNK, laisse apparaître un effet anti-tumoral significatif contre les cellules « souches-like » de glioblastome implantées dans le cerveau de souris, sans causer des effets indésirables discernables ⁸³.

Globalement, ces résultats soulignent l'ampleur de l'implication de JNK dans les glioblastomes, en particulier JNK2. Cependant, les preuves du rôle de suppresseur de tumeurs du cerveau pour JNK3, dont l'expression est restreinte dans le cerveau, existent également : la perte d'expression du gène de JNK3 a été identifiée dans 10 lignées cellulaires de tumeurs humaines sur 19. De plus, sur les souris, la voie de signalisation de JNK3 est impliquée dans la médiation de l'apoptose dans les tissus du système nerveux central ⁸⁴.

h. Le cancer de la peau

Le cancer de la peau, l'un des cancers les plus répandus aux Etats-Unis avec plus d'un million de nouveaux cas annuels recensés, et est environ 10 à 20 fois plus fréquent que tous les autres cancers réunis⁸⁵. Plus de 90% des cas sont dus à l'exposition aux UVs solaires⁸⁶. Les types les plus communs du cancer de la peau sont le carcinome spinocellulaire (CSC), le carcinome basocellulaire et le mélanome⁸⁷.

L'implication de JNK dans le cancer de la peau a été prouvée par plusieurs études : les JNKs sont fortement activées dans plus de 75% d'échantillons de patients atteints de CSC⁸⁸. Une étude consistant à traiter des souris JNK2-déficientes et des souris de type sauvage par le DMAB (7,12-Diméthylbénzanthracène, un initiateur de tumeur), puis 2 semaines après par le TPA (tétradécanoylphorbol acétate, un promoteur de tumeurs) pendant 29 semaines, a révélé la moindre importance de la multiplication de papillomes chez les premières comparativement aux secondes⁸⁹. Des résultats confirmés par une seconde étude au cours de laquelle des souris n'exprimant pas MKK4 (une kinase directement activatrice des JNKs) spécifiquement dans leurs cellules épidermiques, font preuve d'une grande résistance à la formation de papillomes provoqués par DMAB/TPA- par rapport à des souris de type sauvage⁹⁰.

Encore plus inattendu, JNK1 exerce un rôle d'antagoniste à celui de JNK2. En effet, dans un premier temps, les souris JNK1-déficientes sont plus sensibles au développement de tumeurs de la peau DMAB/TPA-induites que les souris de types sauvage, ce qui, dans ce cas⁹¹ sous-entend que JNK1 aurait un rôle de suppresseur de tumeur contrairement à la description précédente de JNK2, hypothèse corroborée par une autre étude. Lorsque des cellules primaires épidermiques humaines exprimant des kinases JNK2 constitutivement actives ainsi que Ras (une GTPase proto-oncogènes) sont régénérées sur des souris immunodéficientes, elles sont transformées en cellules cancéreuses hyper-prolifératives possédant des caractéristiques de CSC⁹². Alors que, pour les mêmes types de cellules exprimant cette fois-ci des JNK1 constitutivement actives, elles se régénèrent sur des souris immunodéficientes en présentant des caractéristiques de peau humaine normale⁹². Ces deux dernières études révèlent bien les fonctions opposées dans la régulation de la carcinogenèse de la peau de JNK1 et JNK2 et le mécanisme d'action de chacune d'entre elles n'est toujours pas complètement élucidé⁸⁷. Néanmoins, cela suggère que la

découverte d'inhibiteurs spécifiques entre ces deux kinases pourrait s'avérer très pertinente dans le traitement de ce type de cancer.

i. Le cancer de la prostate :

Le cancer de la prostate est un cancer qui se forme dans les tissus de la prostate, glande du système reproducteur masculin située sous la vessie. Ce cancer, le plus répandu parmi les hommes, survient généralement chez ceux âgés de plus de 50 ans. En France, une estimation de plus de 71000 nouveaux cas en 2011 le place au premier rang des cancers.

Un grand nombre d'agents déclenche l'apoptose dans des cellules de cancer humain de la prostate (CCHP) par la voie de signalisation JNK : le gamma-tocotriénol ⁹³, dicoumarol ⁹⁴, des dérivés benzimidazole ⁹⁵, l'alpha chaconine, l'acide gallique ⁷² l'acide ursolique ⁹⁶, la mélatonine ⁹⁷, et des isothiocyanates^{98,99}.

Une autre étude *in vitro* et *in vivo* sur 10 lignées différentes de CCHP humain démontre la présence de JNK pour la croissance de ces cellules. Le traitement par deux oligonucléotides anti-sens *JNK1AS* et *JNK2AS* complémentaires à chacune des séquences des quatre isoformes de JNK1 pour le premier et de ceux de JNK2 pour le second, montre que la transfection de *JNK1AS* dans ces cellules cancéreuses (9 lignées) inhibe la croissance *in vitro* des tumeurs à 57% et pour *JNK2AS* à 80%. Les mêmes résultats ont été obtenus *in vivo* après le traitement systémique avec ces oligonucléotides de souris xénotreffées avec des cellules PC3 (une lignée de CCHP humain) ⁶⁴.

De même, dans ce cas de figure, JNK peut jouer un rôle pro-apoptotique. Des travaux ont mis en évidence la capacité de JNK à déclencher l'apoptose par la production de dérivés d'oxygène réactifs (DORs) dans les CCHP ^{100,101}. Dans l'autre sens, des DORs peuvent induire l'apoptose par l'intermédiaire de l'activation de JNK, ainsi que le cas a été constaté pour des CCHP dont l'apoptose fut induite par le traitement à la guggulstèrone ou la genipin^{102,103}.

Il est intéressant de noter que la privation androgénique, le traitement le plus couramment utilisé en tant que traitement pour le cancer de la prostate avancé, peut susciter l'apoptose par l'activation de JNK ¹⁰⁴.

En ce cas, selon une étude montre que JNK est impliqué tant qu'anti-apoptotique cette fois-ci, puisqu'elle est impliquée dans la protection de cellules cancéreuses du pancréas contre l'apoptose stress-induite ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

2. Implication des JNKs dans des troubles neurologiques

Plusieurs expériences prouvent que la voie des JNKs joue un rôle critique dans la pathogénèse de nombreuses maladies neurologiques, y compris dans les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, la maladie de Parkinson ainsi que la maladie d'Alzheimer. Quelques preuves de l'implication de JNKs dans les deux dernières pathologies sont détaillées ci-après.

a. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative chronique progressive caractérisée par des symptômes moteurs, tels que le tremblement, la rigidité, la lenteur des mouvements et difficultés de marche, problèmes souvent accompagnés de fatigue, de dépression, de douleur ou de soucis cognitifs. La cause physiologique de cette pathologie résulte de la mort des neurones dopaminergiques (cellules génératrices de dopamine, un neurotransmetteur du système nerveux central (SNC) dérivé de la tyrosine) situées dans la substance noire (ou substantia nigra) du mésencéphale, induisant des carences en dopamine. Les patients atteints de cette maladie sont traités par la L-DOPA (métabolisé en dopamine par l'organisme). A ce jour, aucune thérapie ne corrige ou stoppe cette dégénérescence ; les traitements actuellement disponibles sont uniquement destinés à ménager les patients et atténuer les symptômes. D'autre part, leur efficacité se perd au fil du temps et ils provoquent de lourds effets indésirables.

Dans plusieurs modèles cellulaires ou animaux de la MP, de fortes phosphorylations de JNK ont été mises en évidence et d'intenses colorations nucléaires du substrat c-Jun de JNK ont été observées dans la substantia nigra de patients parkinsoniens³⁶. Démonstration a été faite de l'implication de la voie de signalisation JNK dans la médiation de la mort neuronale par apoptose induite par la MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine). Cette molécule liposoluble, après avoir traversé la barrière hématoencéphalique, est métabolisée en MPP+, une neurotoxine

provoquant sur les neurones de la substantia nigra les mêmes effets que la MP chez l'humain, le singe et la souris ¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Une étude menée sur des souris traitées à la MPTP révèle une augmentation de la phosphorylation de JNK (2.5 fois) et la phosphorylation de MKK4 (5 fois), une des deux kinases qui activent JNK en amont. Cette augmentation corrèle avec les niveaux de ce dernier dans le SNC. Dans cette même étude, le traitement de ces souris par le CEP-1347 / KT-7515, un inhibiteur de l'activation de la voie JNK, réduit la dégénérescence MPTP-induite des cellules dopaminergiques de leur système nigrostrié (CDSN) ¹¹¹. Sur un modèle similaire de souris, un traitement avec l'inhibiteur de JNKs, le SP600125, réduit la phosphorylation de JNK, bloque la translocation de c-jun phosphorylé du cytoplasme vers le noyau dans les CDSNs, mitige la mort des souris et améliore leurs fonctions motrices^{112,113}. Le SR-3306, un autre inhibiteur de JNKs, est efficace à 30mg/Kg par voie orale de modèle CDSN de souris ¹¹⁴. Ce même inhibiteur a été utilisé sur un autre modèle de MP avec des rats traités avec la 6-OHDA (6-hydroxydopamine), une neurotoxine ayant les mêmes effets sur les CDSNs que le MPTP. L'administration de SR-3306 (à 10mg/kg/j, 14j) à ces rats protège leurs CDSNs et leur procure une amélioration comportementale¹¹⁵. Comme il a également été démontré, la délétion génétique de JNK2 et JNK3 chez la souris protège contre la neuro-dégénérescence induite par la MPTP³⁶.

Malgré toutes ces preuves expérimentales et bien d'autres sur des modèles cellulaires ou encore animaux, un essai clinique de l'inhibiteur de JNK, CEP-1347/ KT-7515 ¹¹⁶ sur des patients atteints de la MP (806 sujets) ne nécessitant pas encore de thérapie dopaminergique ne s'est pas avéré concluant¹¹⁷, et fut arrêté rapidement au bout de 21 mois. Environ 60% des patients de chaque groupe (un groupe sous placebo et 3 groupes sous traitement CP-1347/KT-7515 à trois doses différentes) ont requis un traitement dopaminergique montrant l'inefficacité de cet inhibiteur.

b. La maladie d'Alzheimer (MA)

La physiopathologie de la MA est liée à la lésion puis la mort des neurones, qui se déclenchent au niveau de la région de l'hippocampe du cerveau qui est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage. Elle est ensuite suivie d'une atrophie qui affecte l'ensemble du cerveau. Le bêta-amyloïde (A β) est un court peptide, un sous-produit protéolytique anormal de la protéine

transmembranaire APP (amyloid precursor protein) à la fonction incertaine, mais soupçonnée d'être impliquée dans le développement neuronal.

Les JNKs sont des effecteurs puissants de l'inflammation et de la mort neuronale ¹¹⁸, comme dans le cas de la MA où l'activation aberrante de JNK est observée. La voie de signalisation JNK est considérée comme un régulateur clé et une cible thérapeutique pertinente pour la MA ¹¹⁹⁻¹²². En effet, plusieurs preuves expérimentales illustrent l'intervention de la voie de signalisation JNK dans les trois symptômes principaux physiopathologiques de la MA, que sont le développement des plaques amyloïdes, le déploiement des enchevêtrements neuro-fibrillaires et l'atrophie du cerveau responsable de la perte de mémoire.

Parmi ces preuves, JNK est activée lors de mort neuronale A β -induite nécessite ¹²³⁻¹²⁵. Dans un modèle de cellules dégénératives (H4-APP^{sw}) de la MA, le traitement de ces cellules par un inhibiteur peptidique de JNK, le D-JNKI 1, a permis de limiter le métabolisme des APPs en A β en empêchant la phosphorylation du résidu Thr668. Cette inhibition de JNK constitue un « switch » dans le métabolisme des APPs, dans la mesure où elle favorise leur métabolisme non-amyloïdogène aux dépens du métabolisme amyloïdogène retrouvé dans les cellules dégénérées de la MP ¹²⁶.

Une autre étude *in cellulo* sur des neurones de rat et des fibroblastes humains et *in vivo* sur des souris TgCRND8 utilisant ce même inhibiteur peptidique de JNK, montre que l'inhibition de JNK par le peptide cellulo-perméable diminue la phosphorylation de Tau sur S202/T205 (*in cellulo* et *in vivo*) et sur Ser422 (uniquement *in cellulo*), deux sites de phosphorylation bien connus de JNK sur Tau¹²⁷. Par ailleurs, une expérience du labyrinthe de Morris, un test très répandu d'évaluation de la mémoire des rongeurs en neurosciences comportementales, a révélé l'implication de JNK dans la correction du déficit de la mémoire β A-induit chez des rats après traitement par injection intracérébroventriculaire au SP600125 (un inhibiteur de JNK) ¹²⁸.

3. Implication de JNK dans l'obésité, l'inflammation et diabète de type 2

De manière générale, l'inflammation est une réponse naturelle de l'organisme, relativement courte dans le temps, à une agression (blessure, infection, brûlure, allergie, etc.). Toutefois, lors

d'inflammation chronique, elle peut perdurer faiblement dans l'organisme sur un laps de temps prolongé. L'inflammation se développe suite à un excès dans le flux des nutriments et est désormais reconnue comme constituant un lien important entre l'obésité et la résistance à l'insuline, cause principale du diabète de type 2 ¹²⁹.

Physiologiquement, l'état d'inflammation chronique résulte de l'activation inappropriée du système immunitaire. Elle se traduit par la surproduction de cellules immunitaires activées surexprimant de nombreux gènes codant pour des molécules inflammatoires, tels les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les récepteurs de surface cellulaire, les molécules d'adhésion cellulaire et les enzymes. Cet amas de cellules actives et de petites molécules attaque et détruit les tissus sains, conduisant à divers désordres pathologiques selon l'organe et le tissu atteint.

Bien que les médicaments disponibles soulagent la plupart des symptômes inflammatoires, généralement ils ne ciblent pas les mécanismes sous-jacents et restent relativement non sélectifs avec des effets secondaires limitant la dose. La recherche d'agents ciblant les mécanismes pathogènes sous-jacents de ces maladies a été accélérée au cours de la dernière décennie, principalement en raison des connaissances accrues des voies moléculaires et génétiques régulant le système immunitaire.

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études in cellulo et in vivo ont fait la démonstration du rôle de JNK comme médiateur central entre l'inflammation induite par l'obésité et le diabète de Type 2 ¹³⁰. Parmi ces études, des analyses de tissus originaires de biopsies chez des patients obèses et obèses résistants à l'insuline, attestent d'une augmentation de l'activation de JNK par rapport aux individus témoins (maigres et sensibles à l'insuline) ¹³¹⁻¹³³. L'équipe de J. Hirosumi ³⁴ a observé des résultats similaires après comparaison de l'activité de JNK dans les tissus de différents modèles d'obésité et celle de modèles témoins. Une augmentation significative de l'activité totale de JNK dans tous les tissus testés sur les deux modèles d'obésité (alimentaires et génétiques) a été notée. Des biopsies de tissus adipeux sous-cutanés ont également indiqué une augmentation des niveaux de la forme phosphorylée active de JNK chez les personnes obèses par rapport à des individus sains ^{131,132}. De plus, la perte de poids de façon

concomitante (après chirurgie bypass gastrique de l'estomac) induit une meilleure sensibilité à l'insuline et entraîne une diminution des niveaux de phosphorylation de JNK dans des biopsies cutanées de tissu adipeux abdominal^{132,132}.

Par ailleurs, chez les rongeurs, il a été démontré que:

- l'absence de JNK1 chez des souris conduit à une protection partielle contre la résistance à l'insuline induite par l'obésité³⁴.
- l'administration d'un peptide inhibiteur de JNK améliore notablement la résistance à l'insuline avec une meilleure tolérance au glucose chez les souris diabétiques^{134,135}.
- l'administration d'un inhibiteur l'ATP compétitif de JNK chez des souris obèses augmente la sensibilité à l'insuline, diminue le taux du glucose et des triglycérides et mène à une perte de poids¹³⁶.

4. Conclusion

S'ajoutant à toutes les preuves avancées précédemment, de nouvelles études sont menées dans le but de révéler l'implication de JNK dans d'autres pathologies, d'affirmer son activité et/ou de mieux appréhender son mécanisme d'action. Preuve que le potentiel thérapeutique de la famille JNK continue à intéresser et qu'il reste à convaincre de ses atouts d'une cible thérapeutique pertinente.

Au regard du large éventail de maladies dans lesquelles elle est ou peut être impliquée, la découverte de nouveaux inhibiteurs spécifiques de JNK pourrait non seulement aider à une meilleure compréhension de son intervention dans la pathogenèse de diverses maladies, mais également offrir un nouveau traitement à celles (tels certains cancers ou la maladie de Parkinson) qui en sont toujours démunies, sans omettre l'intérêt économique que susciterait une telle découverte.

IV. Inhibiteurs de JNKs en phase clinique

Dans de nombreux états pathologiques, la voie de signalisation JNK est dérégulée faisant de l'inhibition de cette voie de signalisation une stratégie attractive pour le développement de nouvelles molécules capables d'intervenir dans plusieurs de ces maladies. Par conséquent, de considérables efforts ont été réalisés dans le but de découvrir des inhibiteurs de JNK cliniquement viables. Sans surprise, une collection très variée d'inhibiteurs de JNK a été générée, mais à ce jour, peu ont réussi à se démarquer lors des tests cliniques.

Malgré la démonstration d'une grande activité inhibitrice d'une molécule envers une ou plusieurs JNKs, prédire les effets indésirables potentiels qu'elle peut provoquer *in vivo* est difficile. Le passage par des études précliniques puis cliniques est indispensable. La mise sur le marché d'inhibiteurs de JNK reste le meilleur moyen de valider JNK comme cible thérapeutique. La molécule, quant à elle, ne sera viable que dans l'hypothèse où elle présentera un profil risque/bénéfice bien favorable.

Tous les inhibiteurs de JNK actuellement en phase clinique dont les informations sont accessibles sont décrits dans ce chapitre. Il s'agit de petites molécules de synthèse (Bentamapimod et Semapimond) ou de peptides (XG102 et XG104).

Au jour de cette rédaction, aucun médicament inhibiteur de JNK n'a été approuvé par une agence réglementaire du médicament ou mis sur le marché.

1. Petite molécule inhibitrice de JNK en phase clinique

a. Le Semapimod

Le Semapimod (**Figure 10**) est un inhibiteur de JNK administré par voie orale et développé par Cytokine PharmaSci. Depuis 2002, plusieurs études cliniques ciblant les patients atteints de la maladie de Crohn ont été menées sur cette molécule, mais les expériences sur maladie ont été arrêtées en phase II. Actuellement il est toujours en phase clinique I contre des maladies auto-immunes et l'inflammation.

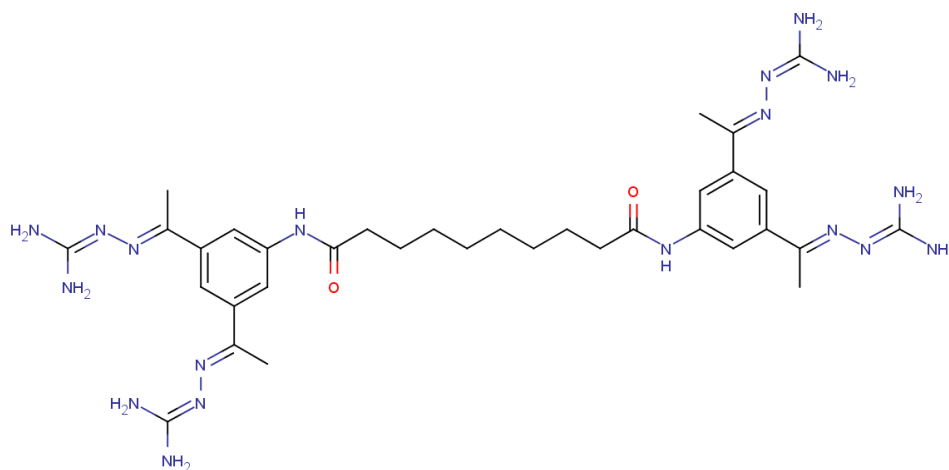


Figure 10 : Structure chimique du Semapimod

b. Le CC-90001

Le CC90001 est un inhibiteur de JNK développé par Celgene. En phase clinique Ib/IIa depuis 2015 pour la fibrose pulmonaire et la fibrose hépatique, cette étude a été mise en place afin d'évaluer l'innocuité, la tolérabilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de doses multiples de CC-90001, sur une durée de 3 mois chez les patients atteints de fibrose pulmonaire.

2. Inhibiteurs peptidiques de JNK

a. XG-102/AM-111

Xigen, une société de biotechnologie spécialisée dans le développement de peptides à visée thérapeutique, a mis au point le XG-102 (**Figure 11**), un peptide de 31 acides aminés de configuration D. Depuis 2008, la société a lancé plusieurs essais cliniques sur cette molécule, dont l'un est actuellement en cours de phase III. Celle-ci vise à évaluer l'efficacité et l'innocuité d'une injection sous-conjonctivale unique du XG-102 pour la réduction de l'inflammation intraoculaire après une chirurgie de la cataracte.

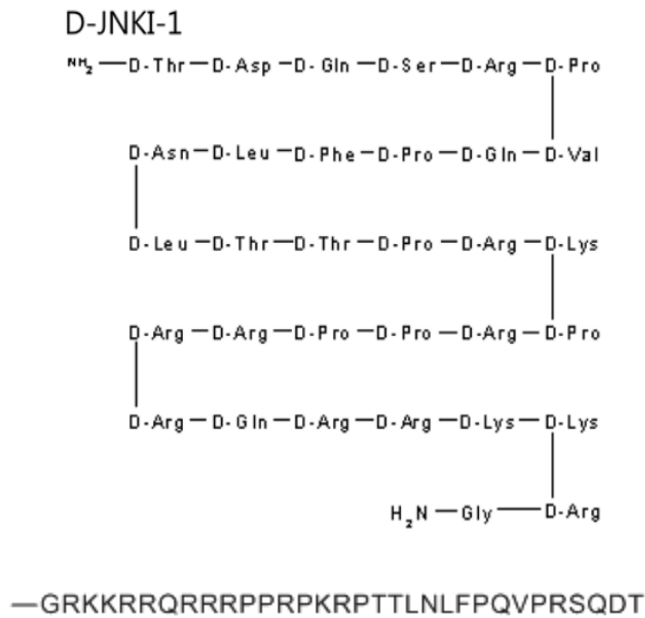


Figure 11 : Structure chimique et séquence du XG-102

En collaboration avec Auris médical, une autre société de biotechnologie a prouvé l'efficacité de cette molécule lors d'un essai clinique sur le traitement des traumatismes sonores aigus et la surdité soudaine. En effet les patients traités ont gagné environ 10 dB supplémentaires par rapport aux patients ayant reçu un placebo. En outre, au cours de ces tests la molécule a été bien tolérée durant ces tests, sans effets indésirables notables mis à part les effets mineurs transitoires liés à la procédure. Le XG-102 ayant reçu la désignation de médicament orphelin de la FDA (Food and Drug Administration) et de l'EMA (Agence Européenne du Médicament) dans le traitement de surdité, possède aujourd'hui le potentiel pour devenir le premier traitement pharmaceutique approuvé de cette pathologie.

b. XG-104

Le XG-104, deuxième peptide leader de la société Xigen, a spécifiquement été conçu afin de répondre au mieux aux besoins spécifiques liés aux thérapies à long terme. En 2014, cet inhibiteur de JNK a complété avec succès une étude clinique de phase I en France et, en 2015 aux États-Unis, une autre étude de phase II visant le traitement de la sécheresse des yeux.

V. Conclusion

Depuis la mise sur le marché du Gleevec® en 2001, un inhibiteur de type II de la kinase Abl utilisé en oncologie pour le traitement de certaines affections malignes, les kinases sont entrées dans l'industrie pharmaceutique par la grande porte. Depuis cette date, les protéines kinases ont été de plus en plus étudiées : plusieurs inhibiteurs de kinases sont apparus et, pour la plupart, ont été utilisés également en oncologie. Le domaine d'action des protéines kinases en tant que cible ne se restreint pas à l'oncologie, mais s'étend bien plus largement. Ainsi que décrit précédemment dans l'exemple des JNKs, de manière générale les protéines kinases sont sollicitées dans la plupart des processus cellulaires, les impliquant ainsi de façon directe dans de nombreuses pathologies autres que le cancer.

Dans le cas des JNKs, le nombre d'inhibiteurs en phase clinique (Tableau 4) valide en termes de cible thérapeutique cette sous famille de kinases. Le grand nombre d'expériences in cellulo et in vivo effectuées sur les JNKs exposées précédemment prouve que cette validation est un choix des plus pertinents pour le développement de potentiels médicaments. La mise en place du développement de telles molécules nécessite un cahier des charges bien rempli, la molécule à développer devant en effet répondre à un certain nombre de critères :

- Être brevetable : la société couvrant ce développement doit avoir l'exclusivité sur les retours sur investissements, au moins durant un certain temps.
- Être une preuve de concept : elle doit avoir bien évidemment une activité remarquable sur JNK en test in vitro et une activité tout aussi remarquable en test in cellulo.
- Être assez sélective à l'encontre de JNK, voire entre isoformes de JNKs afin de limiter son effet cytotoxique et avoir une action ciblée dans la cellule.
- Être facilement accessible en synthèse organique : afin d'avoir une synthèse transposable en production si la molécule est commercialisée.
- Avoir des effets cytotoxiques acceptables afin d'être admise en tests précliniques.

Toutes ces conditions ajoutées au nombre d'inhibiteurs de JNK stoppés en phase clinique (**Tableau 5**) montrent l'importance du défi relevé par ce projet. En ce sens, il devient inévitable de mettre en place une stratégie rationnelle au développement de telles molécules.

Tableau 4 : récapitulatif des inhibiteurs de JNK actuellement en phase clinique.

Molécule	classe	Indication	Phase clinique	Début de l'étude	Société
Semapimod	Petite molécule	maladies auto-immunes et l'inflammation	I	Juillet 2009	Cytokine PharmaSci & Ferring Pharmaceuticals
CC-90001	Petite molécule	Fibrose pulmonaire	Ib/IIa	2015	Celgen
XG-102	peptide	Perte auditive aiguë de l'oreille interne	III	2015	Xigen & Auris Medical
		Cataracte, douleur et inflammation intraoculaire post-chirurgicale	III	2016	Xigen
XG-104	peptide	Sècheresse des yeux	II	2014	Xigen

Tableau 5 : Quelques petites molécules hétérocycliques inhibitrices des kinases JNKs arrêtés en études cliniques.

Molécule	Arrêt	société	Pathologie	IC ₅₀ (nM)		
				JNK1	JNK2	JNK3
Tanzisertib CC-930	Phase clinique II	Celgene	Fibrose pulmonaire idiopathique	61	7	6
CC-401	Phase clinique II	Celgene	La leucémie myéloïde	500-1000	25	50
Bentamapimod PGL5001 AS602801 PGL5	Phase clinique II	PregLem	Endométriose inflammatoire	80	90	230

PARTIE II

ETUDE STRUCTURALE DES KINASES JNKS

Chapitre I

ANALYSE DES STRUCTURE 3D DES JNKS

Pour comprendre comment de petites molécules se lient à cette structure protéique et provoquent son inhibition, une étude des interactions entre les deux entités se révèle nécessaire.

En matière de structure tridimensionnelle, les JNKs ont été co-cristallisées avec plusieurs ligands, constituant une base de données précieuse et pertinente à la compréhension des interactions qui régissent la relation entre un inhibiteur et les kinases JNKs, puis pour rationaliser la conception de nouveaux inhibiteurs.

De ce fait, toutes les structures cristallisées des JNKs disponibles sur la base de données en ligne, the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (PDB, URL : www.rcsb.org) ont été collectées et examinées. Sur les 57 structures 3D de JNK humaines disponibles (25 septembre 2017), seule une structure 3D présente la conformation DFG-out : toutes les autres présentent une conformation DGF-in. Le but du projet étant de développer des inhibiteurs de JNKs de type II, la logique serait de se pencher attentivement sur les structures cristallisées de JNKs de conformation DFG-out. Malheureusement une seule structure est insuffisante pour apprécier la diversité des interactions possibles entre cette sous-famille de kinases et ses inhibiteurs de type II. Néanmoins, étant communément reconnu que les inhibiteurs de type II forment le même type d'interactions que les inhibiteurs de type I à la charnière, en ce cas l'exploitation des structures en conformation DFG-in constitue un atout pour comprendre ces interactions et reste tout à fait pertinente.

Ainsi, après avoir écarté les structures 3D cristallisées avec des inhibiteurs allostériques, des inhibiteurs de type VI ou encore les inhibiteurs ayant une IC50 (concentration inhibitrice médiane, concentration du composé qui inhibe 50% de l'activité de la kinase) de plus de 3 μ M, une analyse approfondie des 31 structures cristallographiques restantes a été réalisée en 2 temps :

- Au préalable une comparaison entre les entités responsables des modes de liaison (ou scaffolds) des inhibiteurs de type I et les structures III^{aires} des kinases JNKs des co-cristaux de conformation DFG-in. Ce qui a permis la définition d'un pharmacophore général interagissant au niveau de la région de liaison de l'ATP du site actif.
- Et une analyse détaillée des interactions entre JNK2 et le Doramapimod (dit encore BIRB796, ou B97) de la structure 3D de code PDB : 3NPC¹³⁷, qui constitue le seul co-cristal disponible à l'heure actuelle (01 juin 2017) présentant une conformation DFG-out de JNK.

I. Analyse des modes de liaison des structures 3D des JNKs de conformation DFG-in avec des inhibiteurs de type I

Les inhibiteurs des 31 structures isolées ont été classés en quatre familles selon le scaffold (l'entité chimique commune à ces inhibiteurs) qui forme la ou les liaisons hydrogènes avec la charnière de JNK et le nombre de celles-ci (une ou plusieurs), ainsi que démontré par la **Figure 12**.

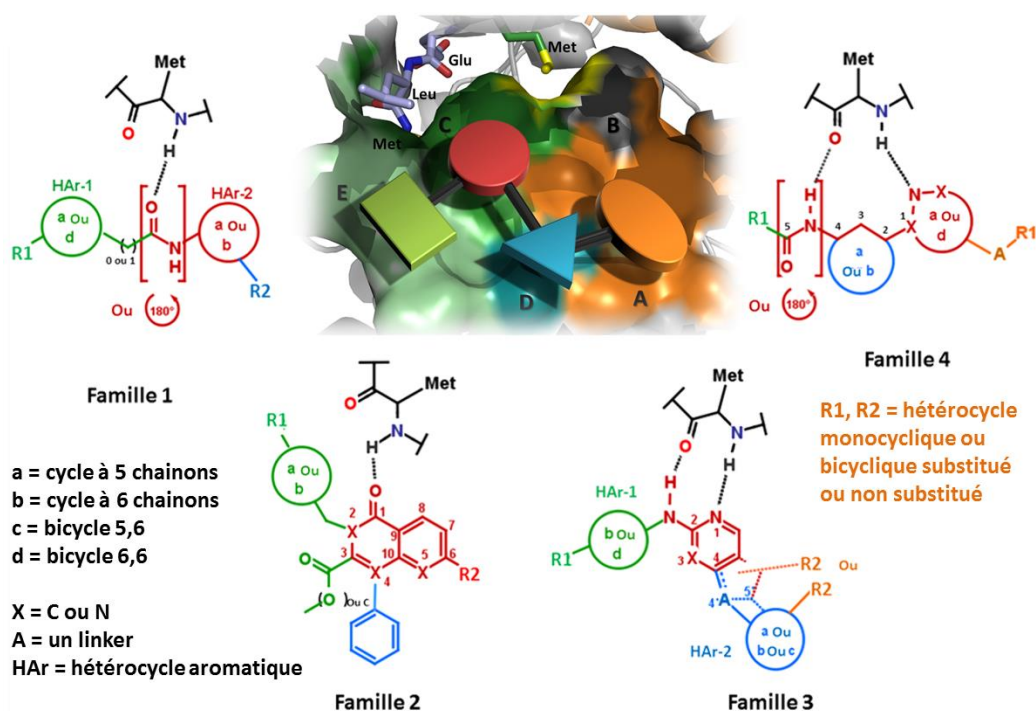


Figure 12 : Modes de liaison entre les JNKs et les inhibiteurs de type I répertoriés à partir de structures cristallisées disponibles dans la PDB. A : région de liaison de groupement triphosphate. B : région hydrophobe. C : région de liaison de l'adénine. D : région de liaison du ribose. E : région de liaison de groupements solubilisants.

En fonction du nombre de liaisons à la méthionine de la charnière, chaque famille va être présentée ci-après de façon plus détaillée ¹³⁸.

1. Familles 1 et 2 impliquant une seule liaison hydrogène avec la charnière des JNKs

Pour la **famille 1**, le mode de liaison implique une liaison hydrogène entre le carbonyle d'une fonction amide de l'inhibiteur et un NH de la chaîne principale (CP) de la charnière (**Figure 12**). Le résidu impliqué est une méthionine (respectivement Met 111/149 pour JNK1/JNK3). Le NH de la fonction amide de ce scaffold peut être orienté soit vers la lumière du site actif soit vers le côté solvant. A partir de cette fonction amide, en partant vers l'intérieur du site actif, il y a un hétérocycle aromatique substitué (HAr-2). De l'autre côté de cette même fonction, il peut y avoir des entités cycliques généralement hétéroaromatiques (HAr-1) décalées ou non par un groupe méthylène.

Le scaffold de la **famille 2** implique également une liaison hydrogène entre un de ses carbonyles et la méthionine de la charnière, comme dans le cas de la série 1. Cependant dans ce cas de figure, le carbonyle n'appartient pas à une fonction amide, mais à un bicyclic de type isoquinoline, azaquinolone ou encore 4-quinolone. Celles-ci sont généralement substituées en position 2 par un benzyle substitué à son tour en para par un groupement acide, amide ou sulfone. Ce bicyclic porte en position 3 une fonction carbonyle de type cétone ou ester. La position 4 est substituée par un cycle aromatique, alors que la position 6 porte ou non un halogène.

2. Familles 3 et 4 impliquant plusieurs liaisons hydrogène avec la charnière des JNKs

Les inhibiteurs de la **famille 3** interagissent avec la kinase selon un des modes de liaison les plus connus et répandus (**Figure 12**). Il se traduit par deux LHs entre un ou deux résidus de la charnière et une aminopyridine ou un de ses dérivés présents sur l'inhibiteur.

En premier lieu, le scaffold de cette famille 3 d'inhibiteurs implique un atome d'azote N_1 situé sur un hétérocycle à 6 chaînons pour interagir avec la méthionine (respectivement Met 111/149 pour JNK1/JNK3). En second lieu, il implique un substituant -NH- sur le carbone en position 2 par rapport à ce même atome d'azote N_1 pour interagir avec le carbonyle de la même méthionine. La nature du scaffold de ces inhibiteurs est très diverse, allant de la simple pyridine à la diaminopurine. De manière générale, ce scaffold est lié à des substituants aromatiques qui vont interagir avec la région de liaison au ribose et la région de liaison au triphosphate. Le groupement -NH- en position 2 est généralement substitué par un autre cycle qui va interagir avec les résidus situés coté solvant (HAr-1).

De la même manière que pour la famille 3, les inhibiteurs de la famille 4 interagissent avec la charnière en formant deux LHs avec la méthionine. La première implique un groupement NH amidique du scaffold jouant le rôle de donneur de LH (DH) avec le carbonyle de la CP de la méthionine. Pour la seconde LH, un atome d'azote sp^2 hétérocyclique du scaffold interférera en tant qu'accepteur de LH (AH) avec le groupement NH de la CP de la méthionine. Ainsi, dans cette famille, les DH et AH se liant à la méthionine de la charnière sont espacés de 4 à 5 chaînons au

lieu de 1 pour la famille 3, ce qui est assez atypique pour des inhibiteurs de kinases. Trois de ces chainons font partie d'un cycle aromatique interagissant avec la région de liaison au ribose.

Par ailleurs, quelques-uns des ligands de la famille 4 (code PDB : 2OK1, 3E7O) forment une troisième liaison hydrogène avec la charnière *via* un NH hétérocyclique en α de l'atome d'azote interagissant avec la méthionine (**Figure 13**), il joue ainsi le rôle de DH avec le carbonyle de la CP du résidu glutamate de cette charnière, respectivement Glu109/147 pour JNK2/JNK3. De l'autre côté, la fonction amide est généralement substituée aussi par un cycle aromatique ou hétéroaromatique.

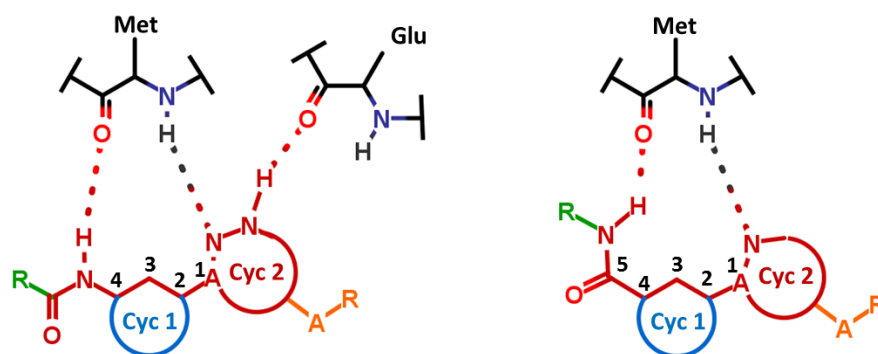


Figure 13 : les deux formes possibles du scaffold de la série 4.

Cette analyse et cette classification nous permettent de connaître la nature et la taille des entités chimiques capables de se lier à la charnière des JNKs. Trois liaisons hydrogènes semblent possibles : deux avec la CP du résidu Met et une avec le carbonyle de la CP du Glu en position n-2 par rapport à la Met, points essentiels pour le design de nouveaux inhibiteurs des JNKs, qu'ils soient de type I ou de type II.

II. Analyse du mode de liaison de la structure de JNK de conformation DFG-out avec le BIRB796

Comme mentionné précédemment, une seule structure de conformation DFG-out est disponible pour JNK : le co-cristal de JNK2 avec le BIRB796 (IC₅₀ JNK1 /JNK2 /JNK3, 30 000 /100 /1400 (nM)¹³⁹).

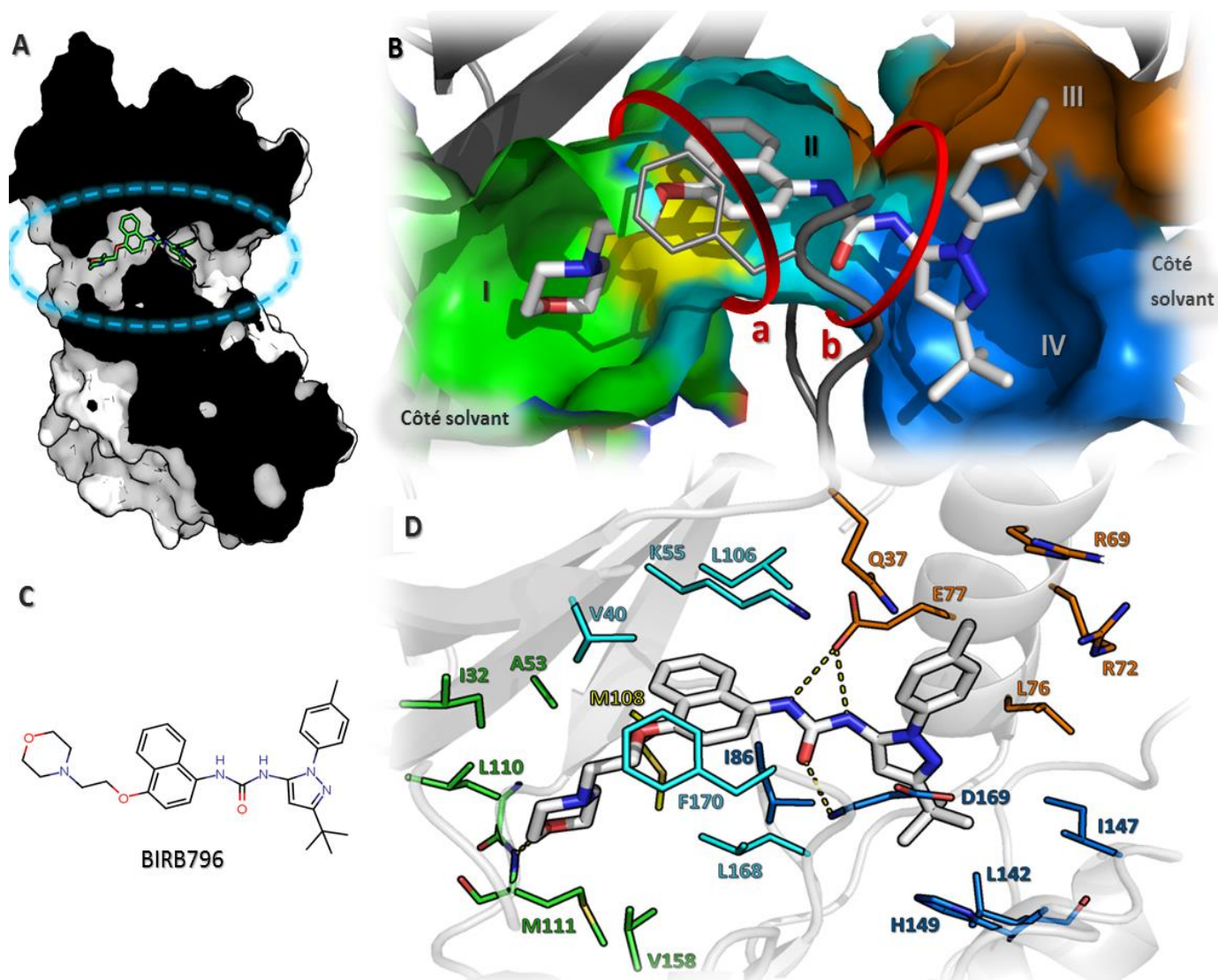


Figure 14: Structure tridimensionnelle de JNK2 co-cristallisée avec le BIRB796 (code PDB : 3NPC).
A : coupe verticale de la structure tridimensionnelle. **B :** Surface du site actif avec I : région de liaison à la charnière, II : première poche de sélectivité, III : deuxième poche de sélectivité, IV : troisième poche de sélectivité, a : premier étranglement et b : deuxième étranglement.
C : structure chimique du BIRB796. **D :** Mapping des résidus du site actif dans l'espace et liaisons hydrogènes (pointillés jaunes) entre le BIRB796 et les résidus de JNK2.

Dans cette structure, l'inhibiteur occupe presque la totalité du site actif de JNK2, traversant le tunnel de part en part (**Figure 14.A**) et interagissant au niveau de différentes régions bien définies (**Figure 14.B**). Initialement, on retrouve la région de liaison à la charnière (**Figure 14.B**, région I) équivalente à la région de liaison de l'adénine de l'ATP pour la conformation DFG-in où le BIRB796 forme une liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène de sa morpholine et le groupement NH de la CP de la Met111 (**Figure 14.D**). Cette même morpholine établie une interaction hydrophobe entre son cycle et les chaînes latérales (CLs) des résidus Ile32, Ala53 de la boucle-P (haut du site actif), Met108 du résidu gatekeeper, Leu110, Met111 de la charnière, et Val158. Cette région du site actif formant la première poche (**Figure 14.B**, poche I) est séparée du reste du site actif par un premier étranglement (**Figure 14.B**, étranglement a) dû en grande partie au résidu Met108 du gatekeeper. L'inhibiteur le contournera grâce à un linker à 3 chaînons, amenant ainsi le groupement naphthyle dans une seconde poche de sélectivité (**Figure 14.B**, région II). C'est une région hydrophobe constituée en haut par les CLs des résidus Val40, Lys55, Leu106, et Phe170 de la séquence DFG de la boucle d'activation et en bas par les CLs des résidus Met108, Ile86 et Leu168. Cette première poche est séparée à son tour de deux autres poches de sélectivité III et IV (**Figure 14.B**) par un deuxième étranglement (étranglement b), qui se trouve être riche en groupements DHs et AHs. A ce niveau, le BIRB796 interagit avec sa fonction urée en formant trois LHs, deux de ses NH avec la fonction acide de la CL du Glu73 (un résidu très conservé dans l'hélice C des kinases), et une troisième LH entre le carbonyle de cette urée et le NH de la CP de l'Asp169 de la séquence DFG (**Figure 14.D**). La fonction urée joue en même temps le rôle de linker entre le naphthyle et un 3-*t*butyl-5-pyrazole. Ce dernier hétérocycle interagit avec une poche hautement hydrophobe, la deuxième poche de sélectivité (**Figure 14.B**, III) constituée des CLs des résidus Ile86, Asp169, His149, Leu142 et Ile147. Ce pyrazole est ensuite substitué en position 1 par un groupe tolyle, qui interagissant à son tour avec la troisième poche de sélectivité (**Figure 14.B**, IV) relativement moins hydrophobe que la précédente, car elle est formée par les CLs des résidus Glu77, Gln37, Arg69, Arg72 et Leu76.

Outre les éléments d'interaction à la charnière tirés de l'analyse des données cristallographiques des JNKs en conformation DFG-in, l'analyse du BIRB796 cristallisée en conformation DFG-out permet d'accéder à des informations complémentaires comme :

- la taille des poches et des étranglements existants
- le degré d'hydrophobicité des différentes poches et leur accessibilité
- les résidus disponibles créer des liaisons hydrogènes ou du π -stacking, comme l'amine primaire de la CL de la Lys55 qui constitue un DH, et aussi la fonction acide de l'Asp169 qui constitue un AH.

La connaissance de tous les éléments répertoriés ci-dessus est très importante. Ils peuvent être intégrés dans la conception rationnelle d'inhibiteurs potentiels de JNKs de type II.

Chapitre II

CONSTRUCTION DES MODELES PAR HOMOLOGIE DE JNK1 & JNK3

Avant d'aborder la conception de novo, deux questions ont été soulevées ; Une fois que les dérivés d'un scaffold seront conçus, dans quelle JNK seront-ils amarrés virtuellement (dockés)? Et surtout dans quelle conformation de ces JNKs, DFG-in ou DFG-out ?

Dans le cadre de ce projet de développement d'inhibiteur de JNK, la première question amenait une réponse évidente. De par la présence de plusieurs isoformes de JNKs, il nous paraissait pertinent de docker (amarrer virtuellement) ces nouvelles molécules dans les trois JNKs afin d'explorer le caractère sélectif (ou « pan » JNK) des nouvelles molécules conçues. Par la suite, des tests biologiques sur les trois kinases valideront cette étape. En ce qui concerne le choix de la conformation, l'objectif de ce projet étant de développer des inhibiteurs de type II, il a été décidé de docker les nouvelles molécules dans les structures de conformations DFG-out. Pour des résultats plus profitables lors de leur analyse in silico, il paraît effectivement plus pertinent d'utiliser les espaces chimiques des sites actifs de conformation DFG-out afin de faire évoluer ces structures lors de leur pharmacomodulation.

Malheureusement, procéder à un tel amarrage moléculaire virtuel (docking) se heurte à un obstacle : l'indisponibilité des structures tridimensionnelles de JNK1 et JNK3 de conformation DFG-out. Faire appel à la modélisation par homologie nous a permis de contourner ce problème. Cette technique est capable de nous fournir des modèles virtuels de structures tridimensionnelles non élucidées de protéines en se basant sur une ou plusieurs protéines de séquences homologues dont les structures tridimensionnelles sont connues.

I. Modélisation par homologie

En l'absence de la structure 3D d'une protéine donnée, la modélisation par homologie représente actuellement la technique la plus fiable pour obtenir les informations structurales souhaitées sur cette protéine, grâce à la construction d'un modèle 3D virtuel sur la base de la structure 3D connue d'une protéine homologue appelée « Template ».

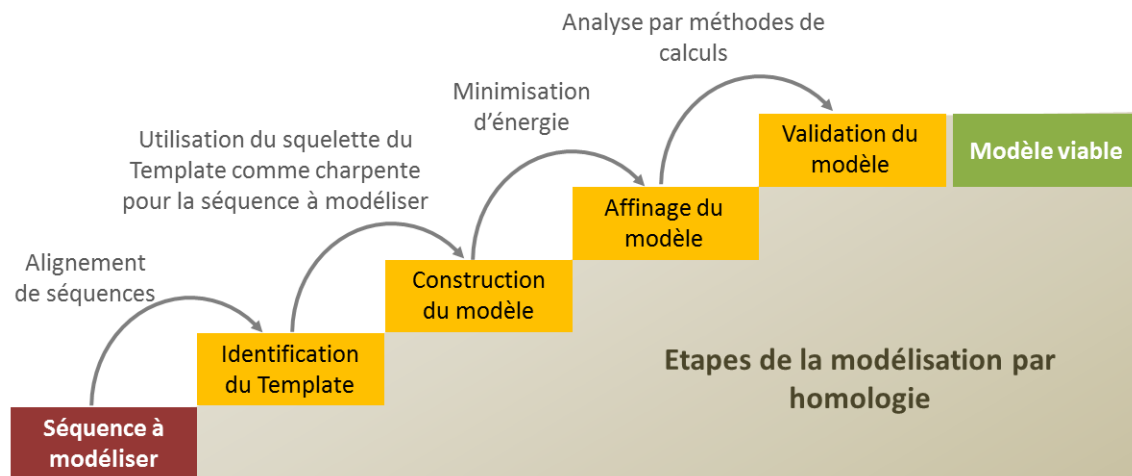


Figure 15 : Processus de modélisation par homologie.

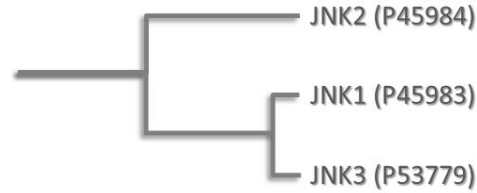
La modélisation par homologie est un processus multi-étapes (**Figure 15**) dont la première se caractérise par l'identification du Template et se base sur le fait que les structures 3D de deux protéines seront d'autant plus similaires que leurs séquences sont homologues. Le pourcentage d'identité entre ces deux séquences exerce une influence directe sur la qualité du modèle obtenu. Une identité de 50% est considérée comme suffisante pour l'obtention d'un modèle de qualité élevée. Une identité entre 25 et 50% peut engendrer un modèle relativement profitable, alors que celle entre 10 à 25% est considérée à peine considérable¹⁴⁰. Une fois que le Template est identifié, la seconde étape consiste à utiliser le squelette de la chaîne principale du Template (la structure 3D de celui-ci sans les chaînes latérales des acides aminés) comme charpente pour la séquence de la protéine à modéliser : c'est la construction du modèle. La troisième étape se

résume à affiner ce modèle de diverses façons afin qu'il soit aussi proche de la nature que possible. Enfin, la dernière étape permettra sa validation par des méthodes de calcul de justesse.

II. Construction des modèles DFG-out de JNK1 & JNK3

Dans notre cas, en littérature JNK1 et JNK3 ne possèdent pas de structure 3D de conformation DFG-out. Le Template logiquement sélectionné pour construire leurs modèles a été la structure JNK2 de conformation DFG-out (code PDB : 3NPC). En effet, les trois JNKs font partie de la même sous-famille dans l'arbre phylogénétique du protéome humain (**Figure 16.A**), et, plus deux protéines sont proches dans leur taxonomie, plus le pourcentage d'identité de leurs séquences est important. L'alignement des trois séquences a prouvé que JNK1 et JNK3 possèdent des séquences analogues à celle de JNK2 (résidus identiques en gris sombre, **Figure 16.B**) avec des pourcentages d'identité présentés (**Tableau 6**) supérieurs à 75%. Ces résultats très convaincants ont permis de valider l'utilisation de la structure 3NPC (chaîne A) de JNK2 comme Template pour la construction de ces modèles.

A



B

P45983	MK08_HUMAN	1	-----MSRSKRDNNFYSVEIGDSTFTV	22
P45984	MK09_HUMAN	1	-----MSDSKCDSQFYSVQVADSTFTV	22
P53779	MK10_HUMAN	1	MSLHFLYCYCEPTLDVKIAFCQGFDKQVDVSYIAKHYNMSKSKVDNQFYSVVEIGDSTFTV	60
			*** ** *.:****:..*****	
P45983	MK08_HUMAN	23	LKRYQNLKPIGSGAQQIVCAAYDAIERNVAIKKLSRPFQNTAKRAYRELVLMKCVNH	82
P45984	MK09_HUMAN	23	LKRYQQLKPIGSGAQQIVCAAFDTVLGINVAVKKLSRPFQNTAKRAYRELVLLKCVNH	82
P53779	MK10_HUMAN	61	LKRYQNLKPIGSGAQQIVCAAYDAVLDNRVAIKKLSRPFQNTAKRAYRELVLMKCVNH	120
			*****:*****:*****:*.:* **.:*****:*****:*****	
P45983	MK08_HUMAN	83	KNIIGLLVNFTPQKSLLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIQMELDHERMSYLLYQMLCGIKHL	142
P45984	MK09_HUMAN	83	KNIISSLNVFTPQKTLLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIHMELDHERMSYLLYQMLCGIKHL	142
P53779	MK10_HUMAN	121	KNIISSLNVFTPQKTLLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIQMELDHERMSYLLYQMLCGIKHL	180
			*****:*****:*****:*.:* **.:*****:*****:*****	
P45983	MK08_HUMAN	143	HSAGIIHRDLKPSNIIVKSDCTLKILDFLGARTAGTISFMMTPYVVTRYRAPEVILGMGY	202
P45984	MK09_HUMAN	143	HSAGIIHRDLKPSNIIVKSDCTLKILDFLGARTACTINFMMPYVVTRYRAPEVILGMGY	202
P53779	MK10_HUMAN	181	HSAGIIHRDLKPSNIIVKSDCTLKILDFLGARTAGTISFMMTPYVVTRYRAPEVILGMGY	240
			*****:*****:*****:*.:* **.:*****:*****:*****	
P45983	MK08_HUMAN	203	KENVDLWSVGCIMGEMVCHKILFPGRDYIDQWNKVIIEQLGTFCEPFMKKLQPTVRYVEN	262
P45984	MK09_HUMAN	203	KENVDIWSVGCIMGELVKGCVIFQGTDHIDQWNKVIIEQLGTFCEPFMKKLQPTVRYVEN	262
P53779	MK10_HUMAN	241	KENVDIWSVGCIMGEMVRHKILFPGRDYIDQWNKVIIEQLGTFCEPFMKKLQPTVRYVEN	300
			*****:*****:*****:*.:* **.:*****:*****:*****	
P45983	MK08_HUMAN	263	RPKYAGYSFEKLPFDVIFPADSEHNKLIKASQARDLLSKMLVIDASKRISVDEALQHPYIN	322
P45984	MK09_HUMAN	263	RPKYPGIKFEELFPDWIFPSESERDKIKTSQARDLLSKMLVIDDPKRISVDEALRHPYIT	322
P53779	MK10_HUMAN	301	RPKYAGLTFPKLPFDVIFPADSEHNKLIKASQARDLLSKMLVIDPAKRISVDDALQHPYIN	360
			*** * . * :**** :**:* **.:**:* **.:*****:*****:*****	
P45983	MK08_HUMAN	323	VWYDPAEAEAPPKIPDKQLDEREHTIEEWKELIYKEVMDLEERTKNGVIRGQPSPLGAA	382
P45984	MK09_HUMAN	323	VWYDPAEAEAPPQIYDAQLEEREHATIEEWKELIYKEVMDWEERSKNGVKDQPSDAA--	380
P53779	MK10_HUMAN	361	VWYDPAEVEAPPQIYDKQLDEREHTIEEWKELIYKEVMNSEEKTNGVVKGQPSPSGAA	420
			*****:*.*****:*. * **.:*****:*****:*****: **.:*****:..	
P45983	MK08_HUMAN	383	VINGSQHPSSSSSVNDVSSMSTDPFLASDTDSSEAAAGPLGCCR	427
P45984	MK09_HUMAN	381	-VSSNATPSQSSSINDISSMSTEQTLASDTDSSELDASTGPLEGCR	424
P53779	MK10_HUMAN	421	VNSSESL-PPSSSVNDISSMSTDPFLASDTDSSEASAGPLGCCR	464
			... *****:*****:*****:*.:* **.	

Figure 16 : A. Taxonomie des JNKs dans le protéome humain. B. Alignement des trois JNKs.
 (*) En gris sombre les résidus identiques ; (:) en gris clair les résidus homologues et en blanc résidus différents.

Tableau 6 : Pourcentages d'identité entre les séquences des JNKs.

Alignement	Pourcentage d'identité
JNK1/JNK2	80,5%
JNK3/JNK2	76,7%

Les deux modèles ont été construits par un logiciel dédié. Après leur affinage par minimisation d'énergie, deux nouveaux modèles 3D de JNK1 et JNK3 dans leurs conformations DFG-out ont été obtenus. Ainsi que nous l'avions anticipé, ceux-ci sont constitués de structures très proches de celle de JNK2 (3NPC, ChA). Les deux modèles ont été alors soumis à trois programmes statistiques et de calculs pour juger de leur qualité. Ils ont affiché des résultats très probants et de très bons scores lors de cette étape de validation (le détail de ce processus est présenté dans la partie expérimentale). Selon les trois logiciels, les deux modèles obtenus sont donc de haute qualité.

III. Etude comparative des sites actifs des trois JNKs et mise en évidence de potentiels éléments de sélectivité entre isoformes JNK

Après avoir affiné et validé les modèles, nous avons comparé les trois sites actifs des JNKs dans leur conformation DFG-out, dans le but de mettre en lumière les différences existantes entre ces sites et de comprendre leur influence sur la sélectivité.

Dans la structure 3NPC de JNK2, le BIRB796 occupant la totalité du site actif, la cartographie d'un tel site actif permettra l'obtention d'une séquence représentative de son ensemble. En utilisant l'outil de cartographique « around » du logiciel Pymol (The PyMol Molecular Graphics System, Version 0.99rc6 ; Schrodinger ; Delano Scientific LLC: San Carlos, CA, USA, 2002), nous avons sélectionné tous les résidus dans un rayon de 4 puis 6Å de chaque atome du BIRB796. Nous n'avons pas continué plus avant car, à cette distance, l'ensemble des résidus formant les parois du site actif sont sélectionnés, voire même des résidus profonds dans les lobes de la kinase. Nous avons considéré que l'ensemble d'acides aminés, ainsi sélectionnés participant à la formation des parois du site actif et dans cette distribution 3D, constitue le site actif de la conformation DFG-out de JNK2.

Les modèles par homologie de JNK1 et JNK3 ayant été obtenus à partir du Template 3NPC (ChA) de JNK2, nous avons utilisé l'alignement 3D de ces modèles avec la chaîne A de cette structure.

De cette façon, le BIRB796 s'est positionné dans les sites actifs des deux modèles, ce qui par la suite et de la même manière que pour JNK2, nous a permis de procéder à la cartographie des deux nouveaux sites actifs DFG-out de JNK1 et JNK3. Puis en tenant compte des écarts entre les résidus, nous avons effectué l'alignement des trois séquences ainsi obtenues. Les résultats ont conforté nos attentes : les trois séquences sont très similaires, avec un grand pourcentage d'identité de 85% à 4Å et 91% à 6Å (**Figure 17**, **Figure 18**).

Nbr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
JNK1	-	Q	V	A	K	R	R	E	-	M	I	I	M	E	L	M	L	H	L	D	F
JNK2	I	Q	V	A	K	R	R	E	L	L	I	L	M	E	L	M	L	H	L	D	F
JNK3	I	Q	V	A	K	R	R	E	L	M	I	L	M	E	L	M	L	H	L	D	F
	70	75	78	91	93	107	107	111	114	115	124	144	146	147	148	149	180	180	206	207	208

% d'identité: 85,714%

Figure 17 : Alignement des séquences des sites actifs DFG-out des JNKs sélectionnés à 4Å du BIRB796
En orange : les deux positions différentes entre les trois séquences

Nbr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
JNK1	I	Q	V	A	I	K	R	A	R	E	L	M	V	I	I	L	I	V	M	E	L	M	D	A	L	I	I	H	V	I	L	D	F	G	L	T
JNK2	I	Q	V	A	V	K	R	A	R	E	L	L	V	I	I	L	L	V	M	E	L	M	D	A	L	I	I	H	V	I	L	D	F	G	L	T
JNK3	I	Q	V	A	I	K	R	A	R	E	L	M	V	I	I	L	L	V	M	E	L	M	D	A	L	I	I	H	V	I	L	D	F	G	L	T
	70	75	78	91	92	93	107	107	111	114	115	115	124	124	124	144	144	144	146	147	148	149	180	180	180	180	180	180	206	207	208	208	208	208	208	208

% d'identité: 91,667%

Figure 18 : Alignement des séquences des sites actifs DFG-out des JNKs sélectionnés à 6Å du BIRB796.
En orange : positions différentes entre les trois séquences déjà observées à 4 Å ; En vert : position différente supplémentaire à 6Å ; En bleu : positions identiques à 6Å pour les 3 sites)

A regarder ces résultats plus attentivement, à 4Å uniquement deux positions de séquence sur les 21 sont différentes (**Figure 17**) : la Met77/115 dans JNK1/JNK3 correspondant à une Leu77 dans JNK2, et de l'Ile106 correspondant à une Leu106/144 dans JNK2/JNK3 (en couleur orange dans la **Figure 17**). La vérification de leur position dans l'espace (position I et position II de la **Figure 19**), souligne la participation à la formation des parois du site actif par la CL des résidus dans ces deux positions, donc susceptibles d'être des éléments structuraux influençant lors de l'interaction avec un inhibiteur et important pour la sélectivité entre les trois JNKs.

Dans les séquences sélectionnées à 6Å, on récupère seulement une position de séquence différente supplémentaire (colonne verte du **Figure 18**), dont les CLs des résidus en question

n'entrent pas dans la formation des parois du site actif, mais uniquement leurs CPs (Position III de la **Figure 19**). Il semble donc inutile de considérer les résidus de cette position comme potentiellement influents sur les interactions entre le site actif de JNK et des inhibiteurs ATP compétitifs.

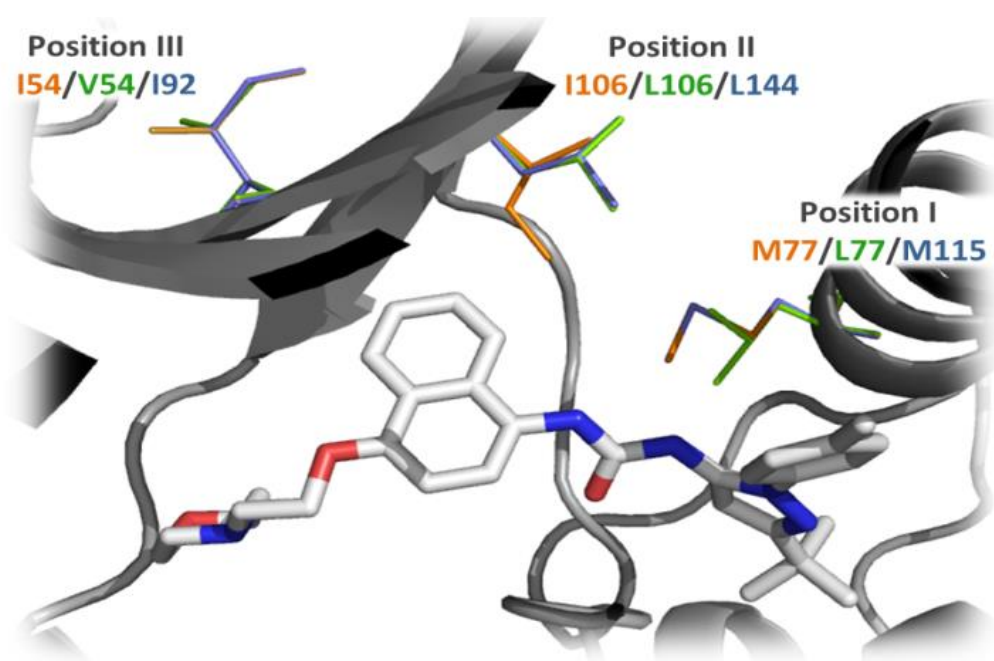


Figure 19 : Distribution dans l'espace des résidus différents dans les séquences des sites actifs des trois JNKs.

IV. Conclusion

Plusieurs éléments de relations structure-activité de l'inhibition des kinases JNKs ont été mis en évidence dans ce chapitre, en commençant par un pharmacophore global pour le site actif de conformation DFG-in des kinases JNKs (cf. **Figure 12, p56**). Il nous permettra, par la suite, de concevoir la partie se liant à la charnière de nos molécules.

Après avoir analysé le mode de liaison entre le BIRB796 et le site actif de conformation DFG-out de JNK2, nous avons pu explorer toutes les poches de sélectivité de cette kinase. Cette exploration nous a conduits à concevoir la seconde partie de nos inhibiteurs de type II, en l'occurrence celle qui interagit avec les poches de sélectivité et par conséquent, celle susceptible d'augmenter la sélectivité envers les kinases JNKs.

Finalement, la construction par modélisation par homologie des deux structures tridimensionnelles de conformation DFG-out de JNK1 et JNK3, nous a menés à comparer les trois sites actifs des JNKs dans cette conformation. Nous avons pu dégager deux acides aminés susceptibles d'influencer les interactions entre inhibiteurs et sites actifs des trois JNKs, et par conséquent influencer la sélectivité entre ces trois isoformes. De plus, ces modèles permettront également le docking des molécules conçues dans JNK1 et JNK3 en conformation DFG-out.

Soulignons que dans une conformation donnée, la structure d'une kinase dans le milieu biologique n'est pas figée et présente malgré tout une certaine flexibilité. Ainsi les structures 3D DFG-out de JNK2 de la littérature ainsi que les deux modèles qui en découlent représentent une des formes possibles de cette conformation DFG-out pour chaque JNK, vérification faite après comparaison des structures 3D de conformation DFG-in de JNK3 de la littérature, par exemple. Certes leurs sites actifs présentent une très grande similitude structurale, mais de légères différences de position pour certains résidus sont remarquées.

Toutes ces connaissances structurales sur les JNKs étant récoltées, nous pouvons enclencher l'étape de conception : elle peut être rationalisée grâce à toutes ces informations et aux outils de chemoinformatique mis à disposition dans la société OriBase Pharma.

PARTIE III

Conception par SBDD, synthèse, et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs des protéines kinases JNKs

Chapitre I

STRATEGIE DE STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN MISE EN PLACE POUR LA CONCEPTION ET LE DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS JNK

Tous les éclaircissements sur les kinases JNKs et les modes d'interaction avec leurs inhibiteurs ayant été apportés, une stratégie de « Drug Discovery » exploitant ces données a été mise en place afin de guider la conception de nouveaux inhibiteurs pour cette cible. Cette stratégie est basée sur deux approches initiales qui utiliseront par la suite un processus commun de *Structure Based Drug Design* (SBDD, conception de médicament basée sur la structure), ce processus d'exploration et de développement (**Figure 20**) permettra la génération d'un hit inhibiteur de JNK de façon rationnelle.

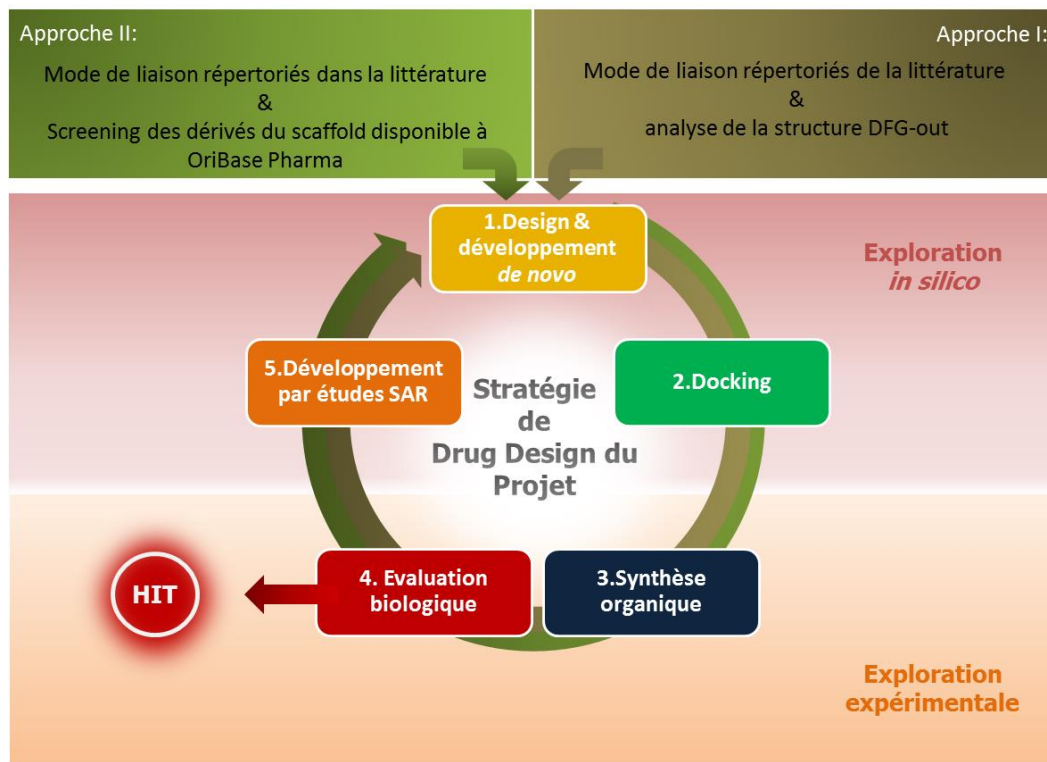


Figure 20 : Approche rationnelle mise en place pour la conception et le développement de nouveaux inhibiteurs de JNK.

Avant de déclencher le processus d'exploration et de développement, la génération de novo d'un squelette ou « scaffold » de départ a été envisagée selon deux approches dans le cadre de ce projet. L'approche I se base sur les modes de liaison entre JNK et ses inhibiteurs répertoriés dans la littérature. L'approche II s'appuie sur les résultats de screening de molécules issues des librairies d'OriBase Pharma possédant le même hétérocycle que celui porté par un inhibiteur de JNK décrit dans la littérature et interagissant avec la charnière.

Un scaffold une fois généré à partir de chacune des deux approches, l'objectif consiste à concevoir rationnellement ses dérivés qui seront analysés docking par la suite. Cette technique de modélisation moléculaire permet de prédire la position qu'occuperait préférentiellement une molécule dans un site précis d'une cible donnée. Les dérivés ayant rempli les conditions de docking au cours de cette étape seront synthétisés chimiquement avant d'être évalués par des tests biologiques. Obtenir plusieurs cycles de conception-synthèse-évaluation, un hit ayant démontré une activité satisfaisante sur la cible ($IC_{50} < 1\mu M$) représente l'objectif final.

Chapitre II

APPROCHE I : CONCEPTION ET EXPLORATION DE SCAFFOLD INSPIRES DU MODE DE LIAISON DE LA FAMILLE 4

A partir des modes de liaison répertoriés précédemment (cf **Figure 12**, p52), ceux de la famille 4 (**Figure 21**) ont été sélectionnés en vue du développement d'un nouveau scaffold selon les raisons suivantes:

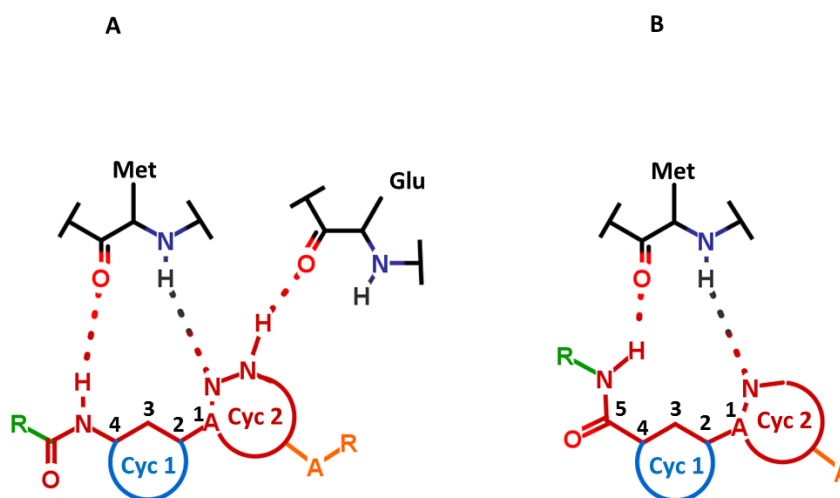


Figure 21 : Les deux formes possibles du scaffold de la série 4

- Tout d'abord dans la littérature, des molécules ayant ce mode de liaison (code PDB : 2B1P, 2OK1, 3E7O, 3FI2, 3FI3) font preuve d'une bonne activité ^{137,141,142}.

- Le scaffold impliqué dans ce mode de liaison forme deux liaisons hydrogène avec la charnière comme l'ATP, d'où une interaction plus forte avec la charnière par rapport au mode de liaison avec une seule liaison hydrogène.
- Les deux groupements responsables des liaisons hydrogènes dans ce scaffold sont bien distants (4 à 5 chaînons) par rapport au scaffold de la série 3 (1 seul chaînon). Ce nombre de chaînons entre ces groupements ouvrent la porte à une plus grande diversité structurale pour la conception de nouveaux scaffolds.
- Un scaffold brevetable sera plus accessible grâce à une telle diversité.
- Un tel nombre de chaînons facilitera une pharmaco-modulation du scaffold conçu, si nécessaire par la suite.

I. Design du scaffold-I

A partir du schéma de liaison de la famille 4, le scaffold-I présenté dans la **Figure 22** a été conçu. Il est constitué d'une pyridine dont l'atome d'azote pourra jouer le rôle de l'AH pour interagir avec le proton du NH du résidu Met de la charnière. Pour les 3 chaînons aromatiques 2, 3 et 4, ils ont été intégrés dans l'aromatique le plus simple, un phényle. Afin d'interagir avec le carbonyle de la Met en tant que DH, ce phényle a été substitué en méta par une fonction amine. Ainsi le scaffold-I conçu est une 3-anilino-2-pyridine. Pour la partie aniline de ce scaffold, la fonction amine sera un point de diversité permettant d'apporter des modulations et d'étudier leur impact sur l'activité prédite in silico. Pour la pyridine, il a été envisagé de la substituer par un lien L1 puis un aryle (Aryl1), le but étant d'observer si ces éléments pouvaient interagir avec les poches de sélectivité en conformation DFG-out.

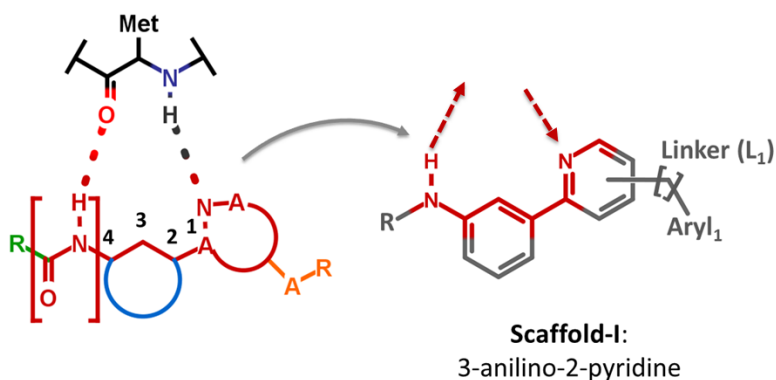


Figure 22: le scaffold-I inspiré du schéma du mode de liaison de la famille 4.

Mis à part le mode de liaison qu'il présente, l'intérêt de concevoir un scaffold d'une structure relativement simple engendrera des dérivés facilement accessibles par synthèse organique et si besoin est, d'être aisément modulables.

Plusieurs molécules ont été dérivées à partir de ce scaffold, les modifications visaient trois (caractéristiques) éléments de scaffold :

- 1- La nature du groupement R portée par l'aniline,
- 2- La position sur la pyridine du linker L_1 , sa nature et sa longueur,
- 3- La nature de l'aryle.

II. Conception, modulation et évaluation des dérivés du scaffold-I

1. Série de départ

a. Conception

Dans un premier temps, une première molécule a été conçue, **JR026 (Figure 23)** La plus simple possible, elle contient le scaffold avec :

- les deux groupements DH et AH de la 3-anilino-2-pyridine susceptible d'interagir avec la méthionine de la charnière selon le mode de liaison observé dans la littérature (famille 4).
- la 1,3-diméthylamine en tant que linker à trois chaînons ($L_1 = 3$), afin de lier le scaffold au groupement Aryle₁ et donner assez de flexibilité pour bien orienter ce dernier au niveau de la première poche de sélectivité.
- un phényle pour l'Aryle₁, l'aromatique hydrophobe le plus simple dans le but d'interagir avec la première poche hydrophobe.

Par ailleurs, selon nos observations, le groupement DH est toujours lié à un carbonyle pour la famille 4. C'est pourquoi, afin d'explorer son importance, une deuxième molécule **JR032** portant un groupement acétyle sur l'atome d'azote de l'aniline a été conçue. Puis, une troisième molécule **JR028** a été aussi conçue avec un $L^1 = 4$, la méthyl-éthyl-amine, pour explorer la longueur du linker.

Ainsi la série conçue de départ a été constituée de 3 molécules dont les structures sont présentées dans la **Figure 23**. Initialement elles ont été amarrées par docking dans la structure 3D de JNK2 afin de prédire si elles étaient capables de se lier à la charnière comme le mode de liaison décrit dans la littérature pour la famille 4.

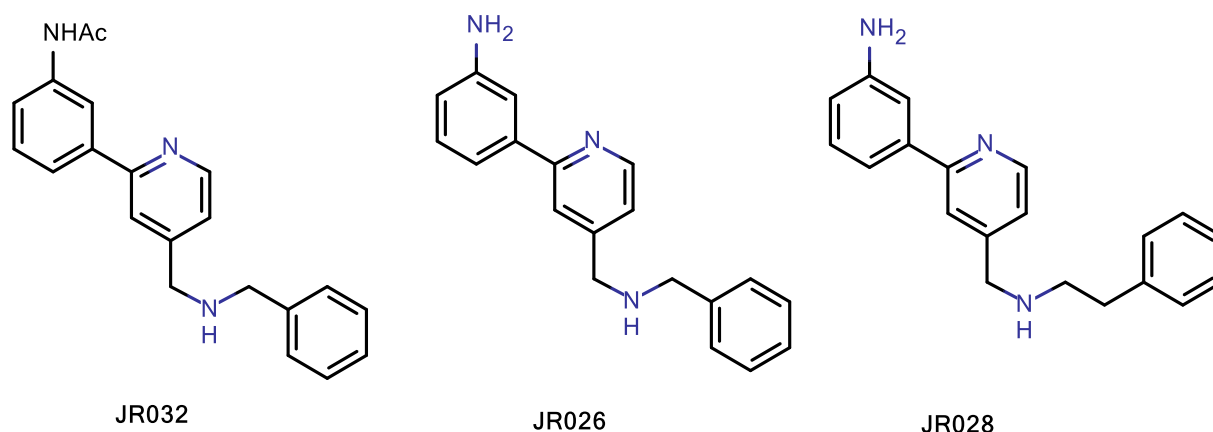


Figure 23 : Molécules de la série de départ

L'analyse par docking a démontré que le mode de liaison à la charnière pouvait s'effectuer comme prévu. En effet, l'AH des trois molécules se positionne bien en face du NH de la Met de cette charnière comme souhaité (LH prédite à 2,4-2,5 Å, **Figure 24**). Le DH de l'aniline, qu'il soit substitué ou non par un groupe acétyle, semble également se positionner à proximité du carbonyle de cette Met pour crée une LH à 3.5 Å (**Figure 24** B et E). Concernant le groupement acétyle de l'aniline, le carbonyle ne présente aucune interaction avec son entourage. Pour la fonction amine du linker L₁, l'orientation dans le premier étranglement est complètement inversée entre la méthyl-éthylamine et la diméthylamine, mais cela n'influence en rien celle du phényle au sein la première poche de sélectivité.

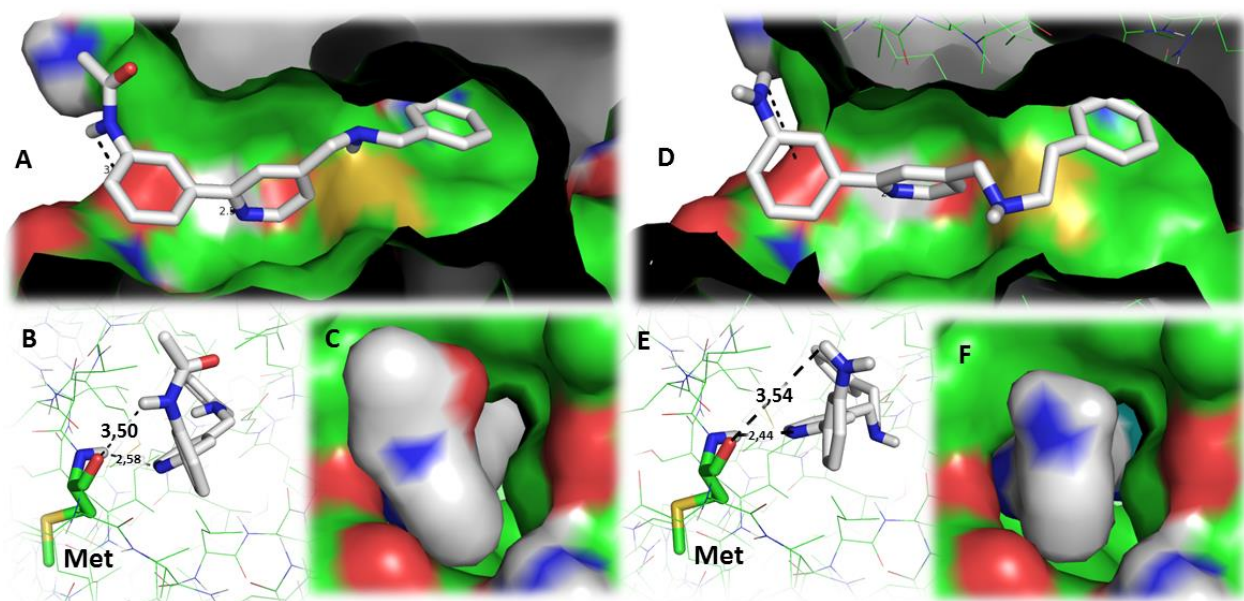


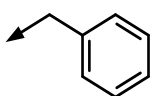
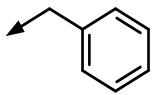
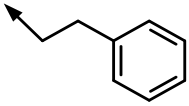
Figure 24 : Prise de vue du docking du JR032 (A, B et C) et JR028 (D, E et F) sur la structure 3NPC (ChA) de JNK2.

Ainsi, l'analyse du docking conduisant à une prédiction d'un mode de liaison/interaction correct au niveau du site actif, les 3 molécules de cette série ont donc été synthétisées (synthèse présentée en PARTIE III, Chapitre II, III) et évaluées *in vitro* sur les JNKs.

b. Résultats des tests d'inhibition et discussion

Les trois molécules de cette série ont été testées sur les trois JNKs afin d'évaluer si ces molécules étaient capables d'inhiber les 3 isoformes à une concentration de 10 μ M. Le **Tableau 7** ci-dessous présente les pourcentages d'inhibition obtenus à cette concentration.

Tableau 7 : Résultats des tests d'inhibition des molécules de la série de départ

Molécule	R	L ₁	Aryle ₁	% d'inhibition (10 μ M)		
				JNK1	JNK2	JNK3
JR026	H	-CH ₂ -NH-CH ₂ -		-5	3	1
JR032	Ac	-CH ₂ -NH-CH ₂ -		-6	0	9
JR028	H	-CH ₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -		-1	8	3

Les molécules de cette série n'ont montré aucune action sur les JNKs à 10 μ M. Aucune conclusion pouvant aider à notre design de novo n'a pu être tirée, sinon l'incapacité du scaffold-I ainsi substitué à se lier aux cibles.

2. Modulations 1 : exploration de l'Aryle₁ avec un linker L₁ = 2

a. Conception

Malgré l'absence d'activité in vitro de la première série, il a été décidé de poursuivre avec le même scaffold et de tenter d'augmenter les interactions avec la charnière et la poche de sélectivité en travaillant sur la partie Aryle et sur le linker.

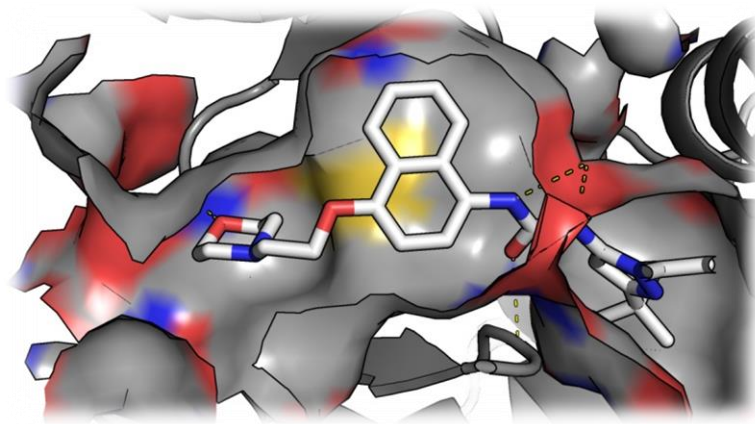


Figure 25 : site actif de la structure 3NPC (ChA) de JNK2.

Surface du site actif colorée par type d'atome : gris pour le carbone, bleu pour l'azote et rouge pour l'oxygène

Dans la structure 3NPC de JNK2 (**Figure 25**), la morpholine du BIRB796 se lie à la charnière par son atome d'azote. Ce mode de liaison n'est pas très commun dans ce genre de groupements, car les morpholines interagissent généralement avec les ouvertures des sites actifs (côté solvant) de par leur nature plus hydrophile. Nous posons l'hypothèse que la position du groupement naphthyle dans la poche de sélectivité induirait principalement l'orientation de la morpholine vers la méthionine. En effet le volume de ce groupement et son hydrophobicité permettraient de créer d'importantes interactions hydrophobes au niveau de la première poche de sélectivité avec les CLs des résidus de celle-ci. Ce fort ancrage orienterait alors le linker éthoxy (équivalent du $L_1 = 3$) dans la région de liaison de l'adénine et, de par sa bonne longueur, permettrait à la morpholine de se lier à la méthionine de cette charnière.

A partir de ce raisonnement, pour la première modification, un groupement naphthyle a remplacé l'Aryle1 du scaffold- I pour donner la molécule **JR036 (Figure 26)**. D'autre part, afin d'observer si le phényle était mieux orienté dans la poche de sélectivité (molécule **JR048, Figure 26**). le phényle a été conservé, mais le linker a été raccourci ($L_1 = 2$) dans la seconde modification. Ces deux nouvelles molécules ont ainsi été analysées par docking et leur synthèse réalisée en parallèle.

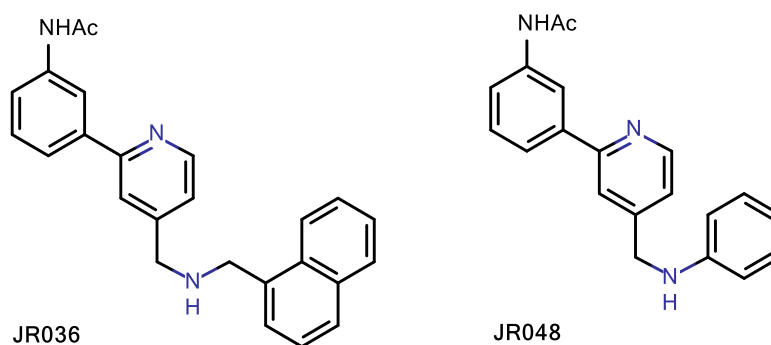


Figure 26 : Molécules issues des modulations 1

Après docking la contrainte remarquée pour la première série est toujours présente.

b. Résultats des tests d'inhibition et discussion

Les deux nouvelles molécules de la série 2, de même que pour la série de départ, ont également été testées à 10 μM sur les trois kinases et le **Tableau 8** ci-dessous présente les pourcentages d'inhibition. On observe une légère inhibition sur JNK2 pour les 2 composés ainsi que pour JNK1 pour JR048 uniquement. Cette activité reste très faible avec une inhibition entre 14 et 21% à 10 μM .

Tableau 8 : Résultats des tests d'inhibition des molécules issues des modulations 1

Molécule	R	L ₁	Aryle ₁	% d'inhibition (10 μM)		
				JNK1	JNK2	JNK3
JR036	Ac	-CH ₂ -NH-CH ₂ -		-9	20	5
JR048	Ac	-CH ₂ -NH-		14	21	-4

Globalement, les modulations de ce scaffold indiquent un léger effet sur les cibles. Un naphthyle comme aryle qui interagirait potentiellement avec la première poche de sélectivité induit une faible activité sélective pour JNK2, sans aucun effet observé sur JNK1 et JNK3. Pour la seconde modification, on remarque un effet de même amplitude lors du passage d'un $L_1 = 3$ à un $L_1 = 2$, avec une certaine sélectivité pour JNK1 et JNK2 par rapport à JNK3.

Peu encourageants, ces résultats démontrent néanmoins un certain potentiel de ce scaffold en cas d'application de la bonne modulation.

3. Modulations 2: combinaison du naphthyle et du linker méthylamine

a. Conception

Pour cette troisième série, il a été décidé de joindre les deux modifications apportées pour la série 2, afin d'observer l'effet de leur combinaison sur les JNKs. La molécule qui résulte de ce raisonnement est le composé JR054 (**Figure 27**). Dans l'objectif de compléter cette série dans laquelle la flexibilité du linker L1 est réduite et le degré de liberté du naphthyle limité, il a été conçu un analogue de position JR070 (**Figure 27**). Les deux molécules JR054 et JR070 diffèrent par la position du L1 sur leur naphthyle : en position 1 pour JR054 et en position 2 pour JR070, ce qui permettra d'explorer le comportement du naphthyle lorsqu'il est lié par toutes ses positions.

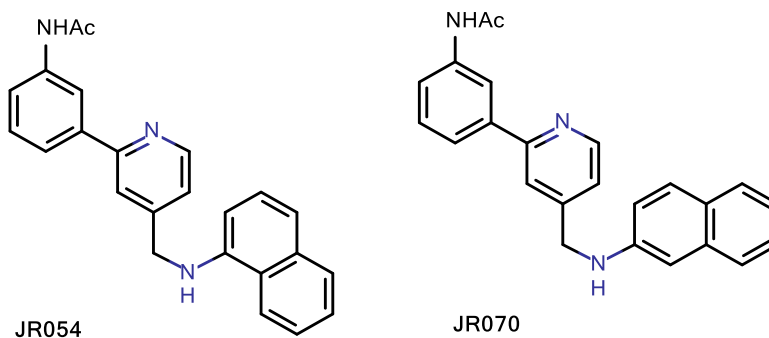


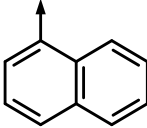
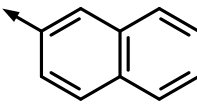
Figure 27 : Molécules issues des modulations 2

Ces deux molécules ont ainsi été évaluées en docking, synthétisées et évaluées *in vitro* sur les kinases.

b. Résultats des tests d'inhibition et discussion

Les résultats des tests d'inhibition effectués sur les deux molécules **JR054** et **JR070** à **10 μ M** sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Résultats des tests d'inhibition des molécules issues des modulations 2

Molécule	R	L ₁	Aryle ₁	% d'inhibition (10 μ M)		
				JNK1	JNK2	JNK3
JR054	Ac	-CH ₂ -NH-		3	-12	-3
JR070	Ac	-CH ₂ -NH-		11	-12	-11

La combinaison entre un L₁ = 2 et le naphyle comme Aryle₁ n'a pas mené aux résultats attendus ainsi que démontré dans le **Tableau 9**. Bien au contraire, on a perdu le peu d'activité observée pour JR036. Ce petit linker ne donne probablement pas assez de liberté à ces deux molécules pour diriger en même temps la 2-(3-anilino)pyridine devant la Met de la charnière et le naphyle dans la première poche de sélectivité.

4. Modulations 3 : position du linker sur la pyridine

a. Conception :

Afin d'explorer l'influence d'une autre liberté du naphyle comme Aryle₁ par rapport à la 2-(3-anilino)pyridine, la modification est cette fois-ci sur la position du linker L₁ sur la pyridine. En effet, la pyridine a été substituée en position 5 au lieu de la position 4 avec deux L₁ différents : la méthylamine (L₁ = 2) et la diméthylamine (L₁ = 3). Les deux molécules qui en résultent sont **JR064** et **JR047** (**Figure 28**), respectivement analogues de **JR054** et **JR036**.

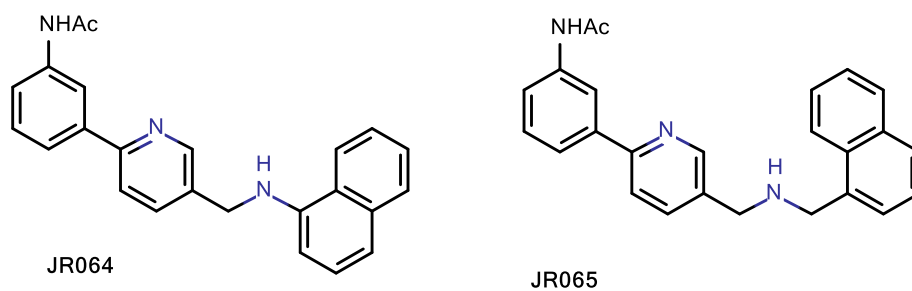
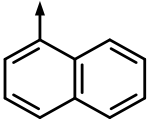
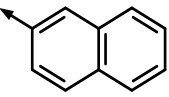


Figure 28 : Molécules issues des modulations 3

b. Résultats des tests d'inhibition et discussion

Le tableau ci-dessous présente les résultats des tests d'inhibition de **JR064** et **JR047** sur les trois JNKs .

Tableau 10 : Résultats des tests d'inhibition des molécules issues des modulations 3

Molécule	R1	L ₁	R2	% d'inhibition (10 μM)		
				JNK1	JNK2	JNK3
JR064	Ac	-CH ₂ -NH-		3	0	10
JR065	Bz	-CH ₂ -NH-CH ₂ -		-8	2	3

Quel que soit le linker L₁ = 2 ou L₁ = 3, , se lier à la position 5 sur la pyridine n'améliore en rien les activités et ces modulations ne permettent pas d'observer d'activité sur aucune des 3 JNKs..

5. Modulations 4 : inversion du lien L₁ et exploration de R

a. Conception

En raison du peu, voire même de l'absence d'activité observée lors des modulations précédentes, on a décidé d'inverser le linker L₁ = 2 qui avait donné un début d'activité lors des modulations 1. Donnant ainsi naissance à la molécule **JR031 (Figure 29)** analogue de **JR048**. Ensuite, on a opté pour une modification sur un autre élément du scaffold, le groupement R. Le groupement acétamide habituel a été remplacé par un groupement Ph-NHCO, donnant le **JR076 (Figure 29)**. Il devrait exposer à la charnière une fonction amide inversée à celle qui lui a été proposée jusqu'à maintenant, une application de la deuxième variante du scaffold de la famille 4 des modes de liaison (**Figure 13**). Par ailleurs, ce nouveau groupement devrait apporter un aromatique à l'entrée du site actif, inspiré également des quelques structures 3D de la famille 4 (code PDB : 2OK1 ; 3FI2/3E7O, molécules portant respectivement sur l'amide: un phényle ; un 1,2,3-trimethoxyphényle et un 2-furane).

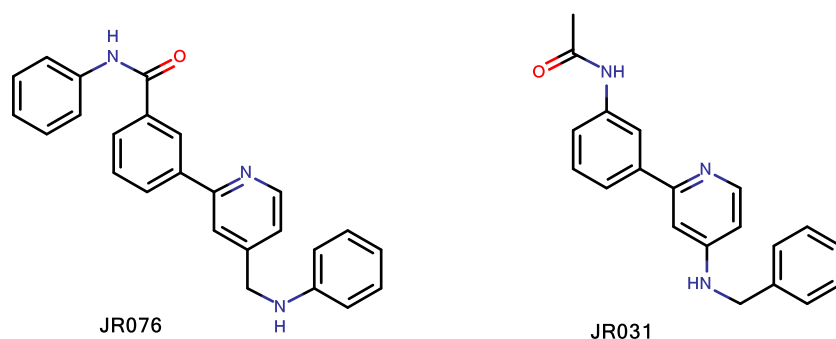
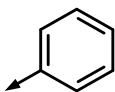
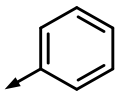


Figure 29 : Molécules issues des modulations 4

b. Résultats des tests d'inhibition et discussion

La lecture du **Tableau 11**, les pourcentages d'inhibition des molécules des modulations 4 restent très faibles à 10 μ M. Une légère inhibition de **JR031** sur JNK2 et JNK3 en comparaison avec JNK1 se remarque, alors qu'aucune activité pour **JR076** n'a été observée pour les trois JNKs.

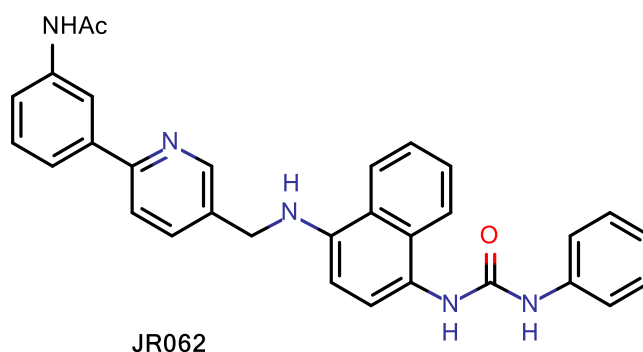
Tableau 11 : Résultats des tests d'inhibition des molécules issues des modulations 4

Molécule	R	L ₁	Aryle ₁	% d'inhibition (10 μ M)		
				JNK1	JNK2	JNK3
JR031	Ac	-NH-CH ₂ -		1	15	15
JR076	Ph-NHCO	-CH ₂ -NH-		3	-5	-3

6. Modulation 5 : Addition d'un Linker L₂ et d'un Aryle₂

a. Conception

A stade d'exploration, les résultats obtenus lors des tests d'inhibition avec l'ensemble des molécules synthétisées ne révèlent pas d'inhibition significative à 10 μ M sur les JNKs. Afin d'interagir avec la charnière et les deux poches de spécificité simultanément comme le fait le BIRB796 cristallisé dans JNK2, augmenter considérablement la taille de la structure a donc été envisagé. L'ajout d'un deuxième linker L₂ après l'Aryle₁, puis la substitution de ce linker par un Aryle₂ a été nécessaire à la réalisation de ce choix. Le Linker L₂ sélectionné n'est autre que le linker présent dans le BIRB796, c'est-à-dire une fonction urée. L'Aryle₂ choisi est un simple phényle afin de faciliter la synthèse. Ainsi la molécule **JR062 (Figure 30)**, dont la structure est présentée dans la Figure 32 et s'apparente à un inhibiteur de type II, a été synthétisée et testée *in vitro* sur les JNKs.



JR062

Figure 30 : Molécule issue des modulations 4

b. Résultats des tests biologiques et discussion

Les résultats des tests d'inhibition de **JR062** sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : résultats des tests d'inhibition de JR062

Molécule	R1	L ₁	Aryle ₁	L ₂	Aryle ₂	% d'inhibition (10 μM)		
						JNK1	JNK2	JNK3
JR062	Ac	- CH ₂ - NH-				17	-10	8

Avec cette molécule, une légère inhibition de JNK1 est observée (17% à 10 μM), alors qu'aucune inhibition n'est mesurée pour JNK2 et JNK3.

III. Synthèse organique des molécules de l'approche I

1. La voie de synthèse

La voie de synthèse principale mise en place pour l'obtention des molécules dérivées du scaffold-I se définit comme suit:

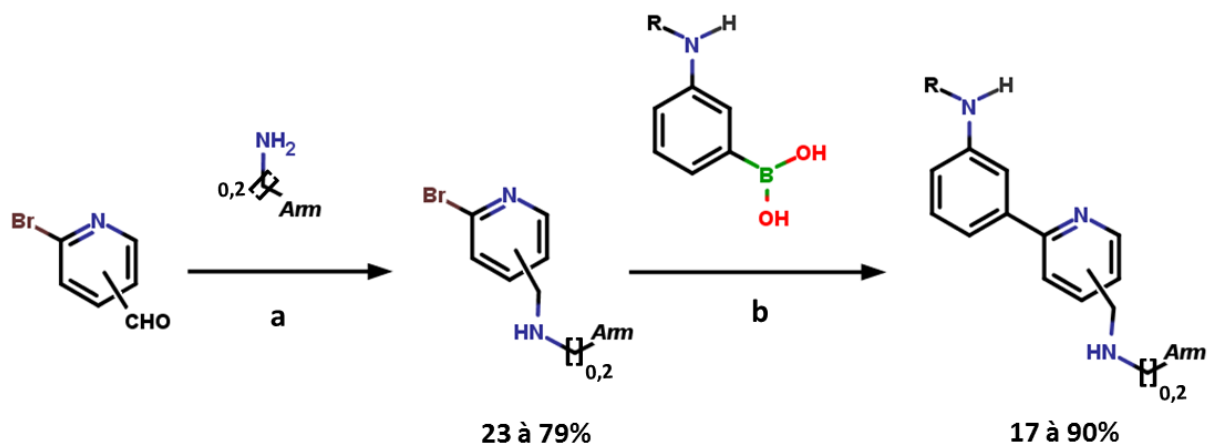


Schéma 1: Voie de synthèse principale des dérivés du scaffold-I

a) AcOH/MeOH, rt puis NaBH₃CN, TA ; b) Pd(dppf)Cl₂, K₂CO₃, 1,4-Dioxane/H₂O, μ-ondes 70°C à 120°C

La première étape (**Schéma 1 (a)**) de cette synthèse consiste en une amination réductrice entre le groupement aldéhyde du 2-bromopyridine-4-carbaldehyde ou 2-bromopyridine-5-carbaldehyde et l'amine qui va apporter à la structure le linker L₁ ainsi que l'aryle (Arm). Cette étape est suivie d'un couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura (**b**), afin d'introduire l'aniline potentiellement N-substituée.

Tableau 13 : Composés intermédiaires synthétisés par ces deux étapes

	Position du CHO sur la pyridine	R	Nbr (CH ₂)	Arm
JR026	4	H	1	Ph
JR032	4	Ac	1	Ph
JR028	4	H	2	Ph
JR036	4	Ac	1	1-Naphtyle
JR048	4	Ac	0	Ph
JR054	4	Ac	0	1-Naphtyle
JR070	4	Ac	0	2-Naphtyle
JR064	5	Ac	0	1-Naphtyle
JR065	5	Ac	1	1-Naphtyle
JR076	4	PhNHCO	0	Ph

Les acides boroniques utilisés pour l'étape **b** sont tous commerciaux mis à part celui utilisé pour la synthèse du **JR076**. Cet intermédiaire a été obtenu par le couplage de type peptidique entre l'acide carboxyphénylboronique et l'aniline comme décrit dans le **Schéma 2**.

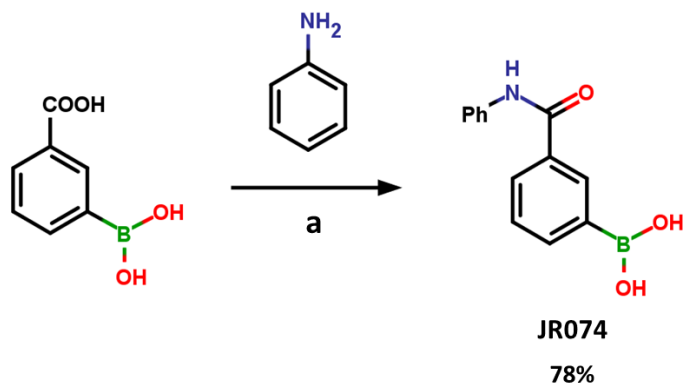


Schéma 2: Obtention de l'acide boronique JR074 utilisé pour la dernière étape de synthèse de JR076.
a) EDCI, HOBT, DIEA /DMFanh, TA.

Les intermédiaires issus de la réaction d'amination réductrice sont obtenus sans grande difficulté avec un rendement allant de 31 à 79%. La dernière étape a été réalisée sous irradiation micro-onde menant après purification à des rendements allant de 17 à 90% selon l'acide boronique utilisé.

2. Synthèse du JR070

La voie synthèse du JR070 est l'inverse de celle décrite précédemment (**Schéma 3**). Pour ce composé, la première étape est le couplage de Suzuki-Miyaura (**a**), il a permis l'obtention du JR063 avec un rendement de 39%. La deuxième étape est une amination réductrice qui conduit après purification au JR070 avec un rendement de 38% et une pureté en LCMS de 96%.

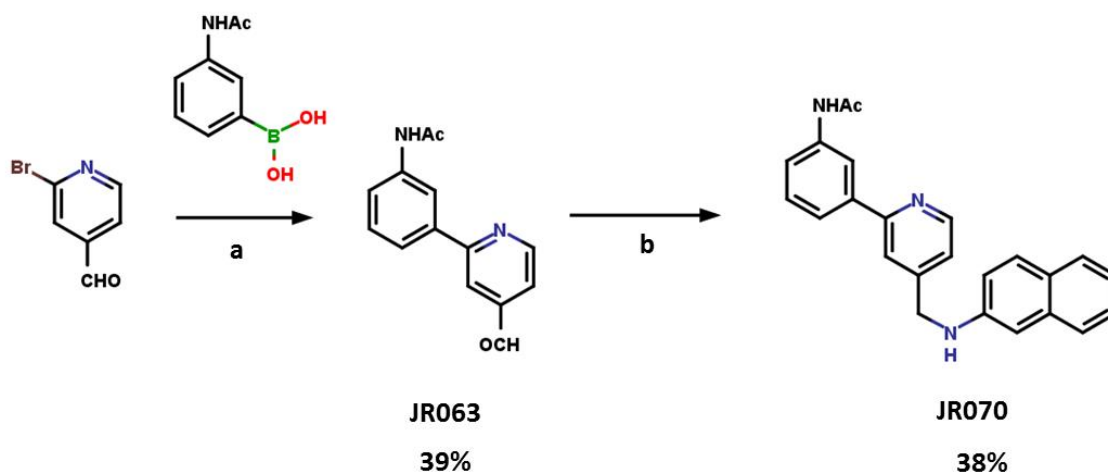


Schéma 3 : Voie de synthèse de JR070

a) $Pd(dppf)Cl_2$, K_2CO_3 , 1,4-Dioxane/ H_2O , μ -ondes $50^\circ C$; b) $AcOH/MeOH$, TA puis $NaBH_3CN$, TA

3. Synthèse du JR031

Pour ce composé, on souhaitait obtenir le linker méthylamine dans le sens inverse de ce qui est décrit au-dessus, c'est-à-dire l'atome d'azote branché directement en para de la pyridine. Pour cela on a gardé la même voie de synthèse que précédemment (**Schéma 4**), sauf que cette fois-ci, pour la première étape (**a**), il s'agit de la 2-bromo-pyridin-4-ylamine qui va réagir avec le benzaldéhyde. L'étape (**b**) reste la même à savoir une réaction de Suzuki-Miyaura par activation micro-ondes.

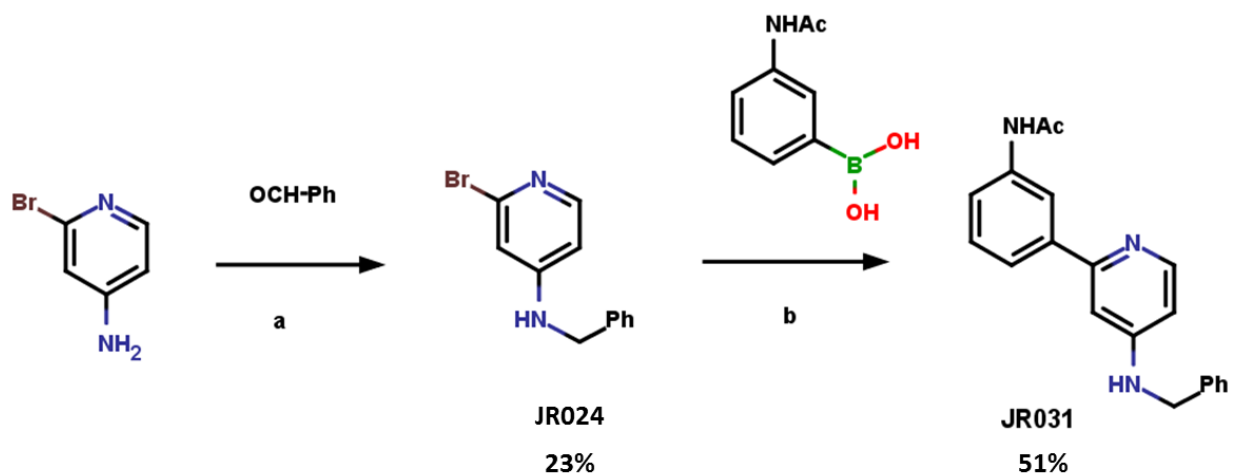


Schéma 4 : Voie de synthèse de JR031

a) $AcOH/MeOH$, rt puis $NaBH_3CN$, TA ; b) $Pd(dppf)Cl_2$, K_2CO_3 , 1,4-Dioxane/ H_2O , μ -onde $70^\circ C$

Lors de l'étape d'amination réductrice, le suivi de réaction avant l'ajout du cyanoborohydrure de sodium n'était pas possible car l'imine intermédiaire n'était visible ni en CCM ni en LCMS, on soupçonne qu'elle se dégrade sur silice. Le contrôle en LCMS après ajout du réducteur, montre une aire de pic de 36% du composé souhaité et 42% du benzaldéhyde, ce qui explique que la formation de l'imine n'était pas totale pour cette réaction, d'où le faible rendement de cette étape. Pour le couplage de Suzuki suivant, la réaction était complète après contrôle LCMS.

4. Synthèse du JR062

La synthèse du composé **JR062** a été envisagée selon deux voies de synthèse présentée dans le **Schéma 5** utilisant comme intermédiaire commun l'urée JR055, cette dernière a été synthétisée en deux étapes. Pour cela, la 1-amino-4-nitronaphtalène de l'étape **(a)** est mise en solution en premier avec le triphosgène, un des deux groupements trichlorométhoxy de celui-ci est donc substitué par cette amine conduisant ainsi à la formation *in situ* de l'isocyanate correspondant. Ce dernier se dégrade après ajout de l'aniline, pour conduire à l'urée asymétrique **JR049**. Après traitement, ce dernier a été réduit directement (étape **(b)**) pour obtenir son homologue amine, le **JR055**, avec un rendement de 20% sur les deux étapes.

A partir de cette urée, l'étape suivante envisagée dans un premier temps a été l'amination réductrice **(c)** avec le 2-bromopyridine-4-carbaldehyde. Cette réaction a permis d'obtenir l'intermédiaire **JR057** avec un rendement de 58%, ce dernier a ensuite été mis en jeu dans le couplage de Suzuki-Miyaura **(d)** avec l'acide 3-acétamidophénylboronique. Le **JR062** souhaité n'a pas été observé après la réaction ; cependant un produit de dégradation de **JR057** a été observé. Alors on a décidé d'inverser l'ordre des deux dernières étapes, afin d'éviter l'intermédiaire bromé **JR057** instable dans les conditions de réaction (b) et garder l'amination réductrice pour la fin, car c'est une réaction généralement robuste dans notre cas. Ainsi un nouvel intermédiaire **JR063** a été synthétisé par couplage de Suzuki **(e)** avec un rendement de 75%. Et comme attendu, l'amination réductrice **(f)** réalisée dans les conditions classiques nous a permis d'accéder avec un rendement de 19% au composé final **JR062**.

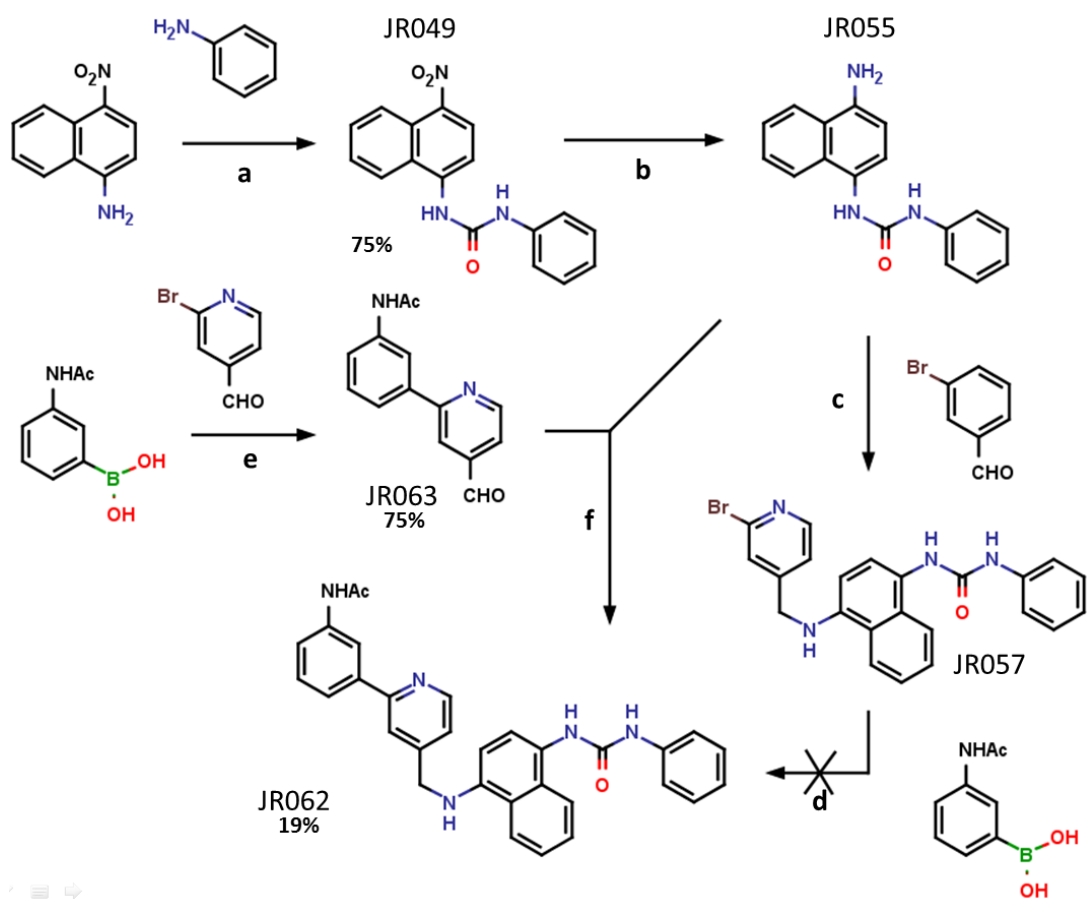


Schéma 5 : Voies de synthèse mises en place pour JR062.

a) $\text{CO}(\text{OCCl}_3)_2$, DCM_{anh} , TA ; b) H_2 / Pd/C(30bars), AcOEt, TA ; c) et f) AcOH/MeOH, puis NaBH_3CN , TA
 d) et e) Pd(dppf)Cl₂, K₂CO₃, 1,4-Dioxane/H₂O, μ -onde 50°C.

IV. Conclusion et perspective

Cette première approche a mené à la conception *de novo* et la synthèse de 12 molécules dérivées de 3-anilino-2-pyridine. Plusieurs pharmaco-modulations ont été réalisées autour de ce scaffold afin d'étudier l'influence des différents éléments structuraux composant cette série chimique sur l'interaction avec les cibles JNKs. Les analyses par amarrage dans JNK2 ont montré que cette série chimique pouvait s'amarrer dans le site actif, former des liaisons hydrogènes avec la charnière et occuper les poches de spécificité. Cependant l'évaluation biologique de l'activité *in vitro* a été insatisfaisante car aucune activité significative au alentour de 10 μM sur les JNKs n'a révélé pour ces molécules synthétisées. Le peu d'activité mesurée pour certaines molécules est de l'ordre de 15 à 20% d'inhibition. Cela reste loin des activités recherchées pour sélectionner un hit qui sont autour de 50% d'inhibition ou plus à 1 μM .

Dans ce cas-ci et avec ce scaffold, l'analyse *in silico* ne semble pas prédictive de l'activité observée. Cela n'empêche pas de poursuivre nos efforts sur cette série en testant d'autres modulations comme la synthèse d'homologue de **JR062** avec groupement phényle à la place du naphthyle, et celui avec une simple liaison amide à la place de la fonction urée entre le naphthyle et le dernier phényle. Il pourrait être intéressant de modifier le scaffold en rigidifiant le système AH/DH par le biais d'un système tricyclique.

Chapitre III

APPROCHE II : DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MOLECULES A PARTIR D'UN SCAFFOLD D'ORIBASE PHARMA INSPIRE PAR LA LITTERATURE

I. Identification du scaffold-II

Lors de la répartition en familles des structures 3D cristallisées des JNKs, un des ligands de la famille 3 a attiré notre attention. Il s'agit du ligand AQ2 cristallisé dans JNK1 de l'équipe de Liddle (Code PDB 4AWI, ¹⁴³). Le scaffold du ligand AQ2 (**Figure 31.B**) qui se lie à la charnière est une 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine communément appelé 7-azaindole (**Figure 31.A**). Il se trouve que ce même scaffold est développé par la société OriBase Pharma dans un autre projet. Comme le montre le zoom sur le site actif de cette structure (**Figure 31C**), le bicyclic 7-azaindole du ligand AQ2 vient interagir avec la Met111 de la charnière de JNK1 et forme avec celle-ci deux LHs selon le schéma des inhibiteurs de la famille 3.

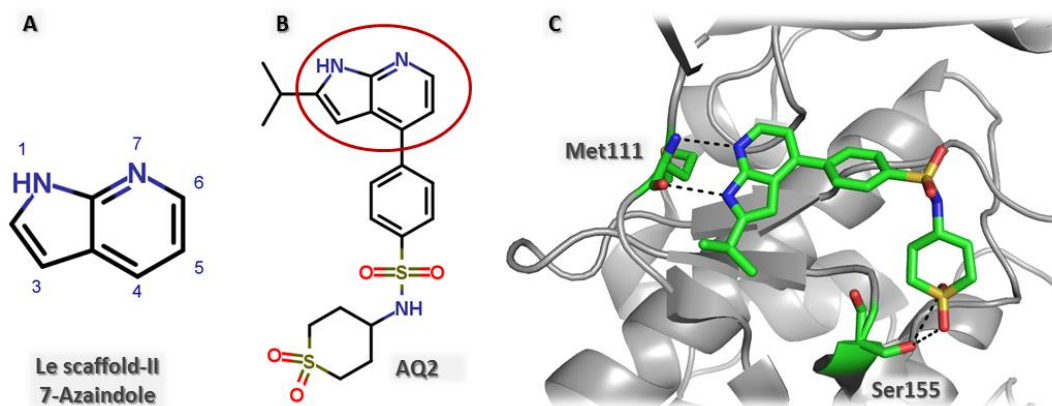


Figure 31: Inhibiteur dérivé de 7-azaindole cristallisé avec JNK1 (code PDB 4AWI).
A : bicyclic 7-Azaindole. B : inhibiteur AQ2. C : Zoom sur le site actif de la structure 4AWI.

Au départ J. Liddle et son équipe ont développé l'inhibiteur AQ2 et ses dérivés en tant qu'inhibiteurs des kinases IKK1/IKK2. Cependant, ils n'ont pu résoudre le co-cristal d'aucune de ces molécules avec ces kinases. Afin d'avoir malgré tout un aperçu de l'interaction de ces molécules avec le site actif d'une kinase, ils ont essayé de co-cristalliser ces molécules avec d'autres kinases proches des IKKs ; c'est ainsi que le co-cristal de ce dérivé de 7-azaindole avec JNK1 a pu être obtenu (pC₅₀ de 6 soit une IC₅₀ de 1 μM).

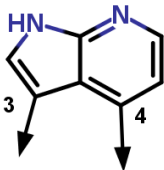
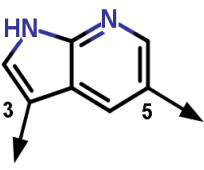
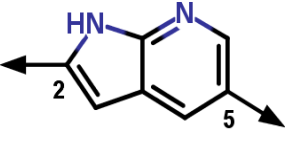
Grâce à cette structure 3D, on sait maintenant que les 7-azaindoles sont capables de se lier à la charnière de JNK1. Quand on connaît la similitude entre les sites actifs des trois JNKs, ce scaffold est très certainement capable de se lier aussi à la charnière de JNK2 et JNK3, à condition bien sûr d'avoir les bons substituants sur les bonnes positions.

Comme on dispose déjà de plusieurs séries moléculaires issues de ce scaffold au sein de la société, on a alors décidé de procéder à des petites séries de criblage afin de voir si l'on peut dégager une touche (Hit).

II. Screening et SAR

Le dérivé de 7-azaindole cristallisé avec JNK1 est substitué en position 2 et 4. A OriBase Pharma, les 7-Azaindoles disponibles sont substitués en plusieurs positions (**Tableau 14**), avec un large éventail de substituants, ce qui nous donne le choix entre plusieurs centaines de composés.

Tableau 14 : Combinaisons de substitution sur le 7-Azaindole pour les tests de screening

Combinaison de substitution (CS)		
CS I	CS II	CS III
		

Dans un premier temps, l'activité des molécules sélectionnées a été évaluée sur JNK2 uniquement à une concentration de 1 μM . Une première série de molécules a alors été choisie pour un premier criblage pharmacologique, puis les résultats de celle-ci ont guidé le choix des molécules pour la série suivante, et ainsi de suite jusqu'à l'identification d'un Hit. C'est à ce moment-là que les tests ont été étendus sur les trois isoformes de JNKs avec la réalisation des IC_{50} si nécessaire.

Dans cette étape d'exploration, les molécules ont été sélectionnées avec un poids moléculaire relativement moyen pour « des petites molécules » inhibitrice de kinase (300 à 400 Da), avec plusieurs différences structurales entre elles, car le but n'était pas encore le développement du scaffold mais de dégager quelle CS (combinaison de substitution) et quelle nature de substituants sur celle-ci nous seront les plus profitables par la suite. La **Figure 32** représente la structure générale des molécules qui ont été testées.

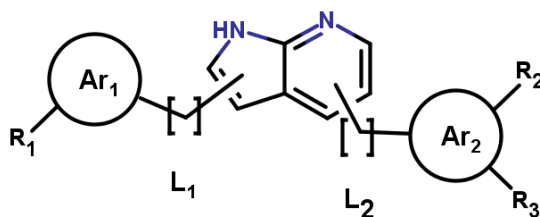


Figure 32 : Structure générale des dérivés de scaffold-II sélectionnés pour les tests sur JNK2
L : Linker, Ar : Aromatique, R : substituants de différentes natures

1. Série 1 : exploration des trois CS sélectionnées

Pour la première série, on a décidé de choisir quelques molécules de chaque CS selon les disponibilités. Ces molécules sont présentées dans la **Figure 33** et le **Tableau 15** ci-après.

Pour la CS I (substitutions en positions 3 et 4 sur le 7-azaindole), deux molécules ont été choisies (**OR0831** et **OR0829**), car elles représentent des similitudes structurales avec un ligand de la famille 3 (**Figure 33.A**) co-cristallisé avec JNK1 (code PDB 2NO3, IC_{50} de 9 nM). En effet, en plus d'avoir les éléments nécessaires pour mimer le mode de liaison de ce ligand, ces deux molécules comportent comme le ligand un $\text{L}_2 = \text{NH}$ sur la position 4 suivie d'un phényle comme Ar_2 (les

régions de similitude sont représentées en orange sur la **Figure 33**). Coté pyrrole, les deux molécules ne portent pas de groupe aromatique Ar₁ mais uniquement un ester méthylique.

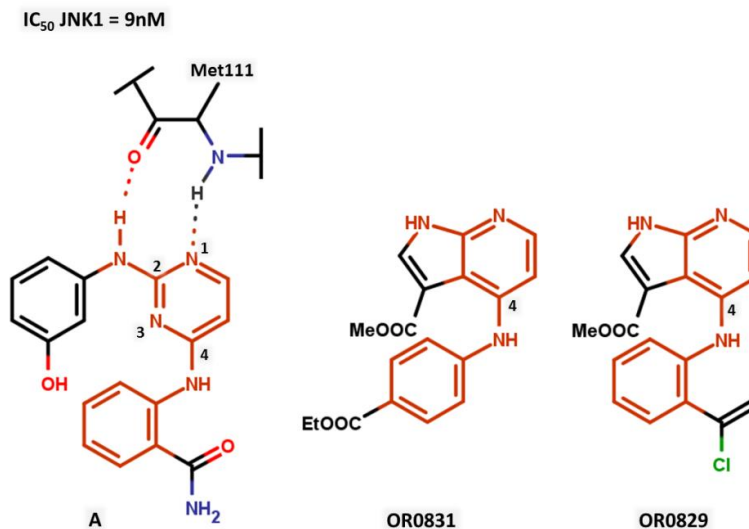


Figure 33 : molécules choisies pour la CS I

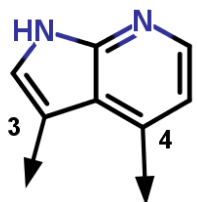
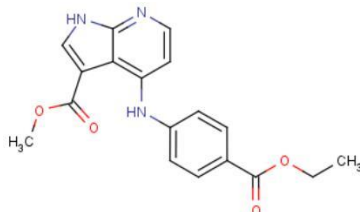
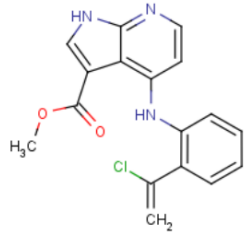
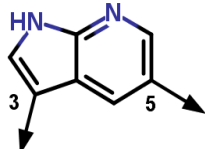
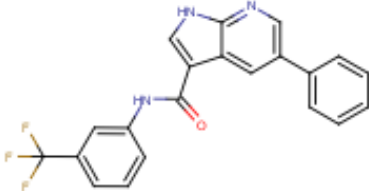
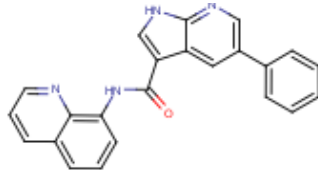
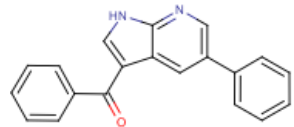
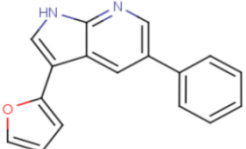
Pour la CSII (substitutions en position 3 et 5 sur le 7-azaindole), cinq composés ont été choisis portant tous un groupement phényle en position 5 sur le 7-azaindole.

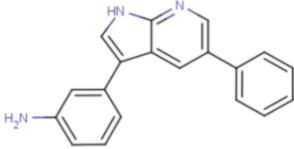
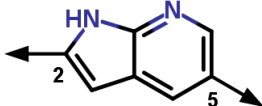
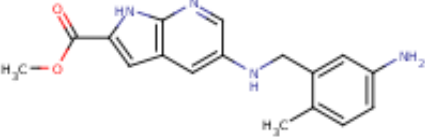
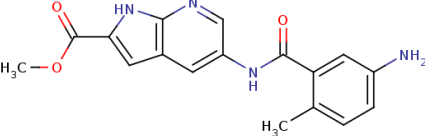
Les différences structurales résident au niveau des groupes L₁ et Ar₁ en position 3 sur l'azaindole. Les deux premières molécules de cette série, **OR0705** et **OR0743**, portent un lien amide C(O)NH en position 3 en tant que (L1) avec un groupe Ar₁ étant un trifluorométhylphényle ou une 4-quinoline, respectivement. La troisième molécule OR0774 est constituée d'un lien L₁ à un seul chaînon qui est le carbone d'une fonction carbonyle substituée par un groupe Ar₁ phényle. Et pour finir, deux molécules ont été choisies avec un linker L₁ = 0, donc sans chaînon entre la position 3 du 7-azaindole et le groupe Ar₁ qui est, soit un 2-furane soit une 2-aniline (composés **OR0823** et **OR0790** respectivement).

Pour la CSIII (substitutions en position 2 et 5 sur le 7-azaindole), deux molécules ont été choisies, **OR1241** et **OR1257**. Cette fois-ci l'objectif est d'explorer le côté pyridine du 7-azaindole, car c'est le linker L₂ qui diffère entre ces deux molécules. Il est représenté par un lien aminométhyle pour

OR1241, et par une fonction amide pour **OR1257**. Pour Ar₂, il s'agit d'une 3-(4-méthylaniline) pour les deux molécules, et côté pyrrole, les deux molécules portent un ester méthylique.

Tableau 15 : Résultats des tests d'inhibition et structures des molécules de la série 1

Combinaison de substitution	Nom de la molécule	Structure	% inhibition de JNK2 à 10 µM
CSI 	OR0831		9
	OR0829		9
CSII 	OR0713		7
	OR0743		31
	OR0774		11
	OR0790		12

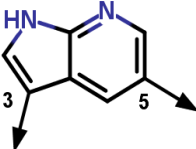
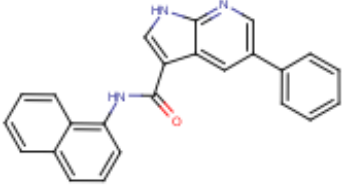
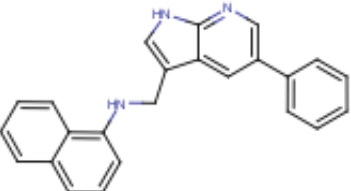
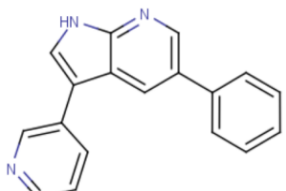
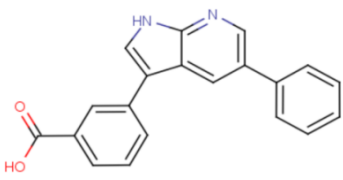
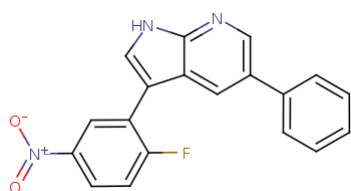
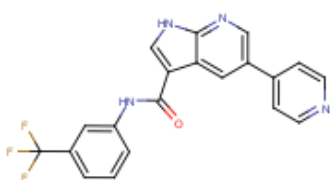
Combinaison de substitution	Nom de la molécule	Structure	% inhibition de JNK2 à 10 μ M
	OR0823		49
CSIII 	OR1241		28
	OR1257		25

Comme le montre le **Tableau 15**, quatre molécules se démarquent du reste. Deux molécules de la série CS II, **OR0743** et **OR0823**, présentent un pourcentage d'inhibition relativement élevé en particulier pour la deuxième 49% à 10 μ M. Les deux autres molécules sont celles de la CS III, **OR1241** et **OR1257**, qui ont un pourcentage de 28% et 25% respectivement, leur pourcentage d'inhibition n'est pas très élevé aussi, mais reste néanmoins intéressant comparé aux molécules de la série CS I et les trois molécules restantes de la série CS II qui ne montrent pas d'inhibition de JNK2 à 10 μ M.

2. Série 2 : sélection de la CS à exploiter

Vu les résultats obtenus avec les molécules des CS II et III de la série précédente (série 1), le criblage a été poursuivi sur une deuxième série, la série 2. Elle contient uniquement des molécules présentant ces deux CS. Le **Tableau 16** présente les structures des molécules de cette série et les résultats de leur screening sur JNK2.

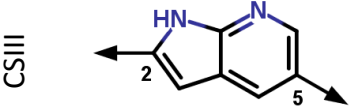
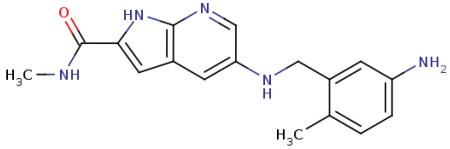
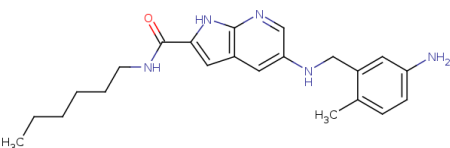
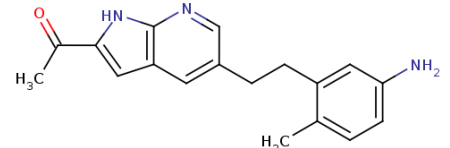
Tableau 16 : Résultats des tests d'inhibition et structures des molécules de la Série 2

Combinaison de substitution	Nom de la molécule	Structure	% inhibition de JNK2 à 10 μ M
CSII 	OR0742		1
	OR0756		10
	OR0803		72
	OR0819		84
	OR1265		-5
	OR0705		7

Pour la CS II, deux molécules **OR0742** et **OR0756**, analogues de **OR0743** de la série 1 (inhibition : 31% sur JNK2) ont été sélectionnées afin d'explorer l'importance de l'azote de la quinoline et l'importance du carbonyle du linker amide L₁. Comme le montre le **Tableau 16**, **OR0742** a un

pourcentage d'inhibition de 1% pour JNK2, l'atome d'azote de la quinoline de l'analogue **OR0743** de la série 1 doit jouer un rôle dans l'inhibition de JNK2. De même pour **OR0756** qui non plus ne contient pas cet azote, mais grâce à l'absence supplémentaire de l'oxygène du carbonyle du linker L₁, le pourcentage d'inhibition de celle-ci est légèrement plus élevé, de l'ordre de 10%. Toujours dans le cadre de la CS II, pour la molécule **OR0823** de la série 1 qui a montré le résultat le plus intéressant à 10 µM (49% d'inhibition), trois nouveaux analogues ont été choisis: **OR0803**, **OR0819** et **OR1265**. **OR0803** porte une pyridine en position 3. La présence de l'atome d'azote hétérocyclique remplaçant la fonction amine de l'aniline du **OR0823** a permis d'augmenter considérablement le pourcentage d'inhibition passant de 49% pour **OR0823** à 72% pour **OR0803**. Il serait donc plus favorable d'avoir sur l'aromatique Ar₁ un AH en position meta. Pour l'analogue **OR0819**, la fonction amine de l'aniline de **OR0823** est remplacée par une fonction acide permettant ainsi d'augmenter l'inhibition à 84%, ce qui soutient l'hypothèse précédente. Enfin, pour **OR1265**, bien que cette molécule possède un meilleur groupement AH que la molécule précédente, un groupement nitro à la place de la fonction acide sur le phényle en position 3, cela ne lui permet pas d'avoir une quelconque inhibition sur JNK2, ce qui est peut-être dû à la présence du substituant supplémentaire, un atome de fluor, en position 6 sur ce phényle.

Tableau 17 : Les résultats des tests d'inhibition et les structure des molécules de la deuxième série de criblage pour la CSIII

Combinaison de substitution	Nom de la molécule	Structure	% inhibition de JNK2 à 10 μ M
	OR1266		-3
	OR1260		27
	OR1259		18

Pour la CS III (Tableau 17), trois molécules analogues de **OR1241** de la série 1 (28% sur JNK2) ont été choisies. Les deux premières molécules, **OR1266** et **OR1260**, présentent une différence structurale au niveau de la position 2 du 7-azaindole avec respectivement un groupe Nméthylamide ou N-hexylamide au lieu de l'ester méthylique et des pourcentages d'inhibitions de -3% et 27% respectivement. Alors que le remplacement de l'ester méthylique par un groupe N-méthylamide induit une absence d'inhibition à 10 μ M, aucune différence n'est observée dans le pourcentage d'inhibition (27-28%) lors du remplacement de l'ester par la N-hexylamide. La troisième molécule analogue choisie est **OR1259**. Celle-ci comporte deux différences par rapport à **OR1241**, la première différence concerne toujours la position 2 du 7-azaindole qui porte cette fois-ci un acétyle au lieu de l'ester méthylique, et la deuxième différence réside au niveau du linker L₁ qui est toujours un linker à deux chainons, mais cette fois-ci, il ne contient pas d'hétéroatome. La combinaison de ces deux différences induit une légère baisse du pourcentage d'inhibition de 10% par rapport à **OR01241**.

3. Série 3 : exploration de molécules plus grandes de la CS II

A la vue des résultats obtenus lors des deux premières série de crible, la CSII ressort comme la combinaison de substitution la plus prometteuse avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50% à 10 μ M. Ainsi le criblage a été poursuivi sur une troisième série de molécules appartenant à la CSII.

Comme le montre la **Figure 34.A**, la superposition des structures 4AWI (dont le ligand a permis le rapprochement entre les molécules comportant un 7-azaidole et les JNKs) et la structure 3NPC de configuration DFG-out tend à montrer qu'il faille plutôt allonger nos molécules du côté AR₂ afin d'atteindre les poches de sélectivité du site actif, cela bien sûr en supposant que nos molécules se lient de la même façon à JNK que ce ligand. Pour vérifier cette hypothèse, quatre molécules comprenant un linker L₃ et un cycle Ar₃ supplémentaires sur l'AR₂ (schéma B de la **Figure 34**) ont été sélectionnées et testées. Les structures et les résultats sont présentés dans le **Tableau 18**.

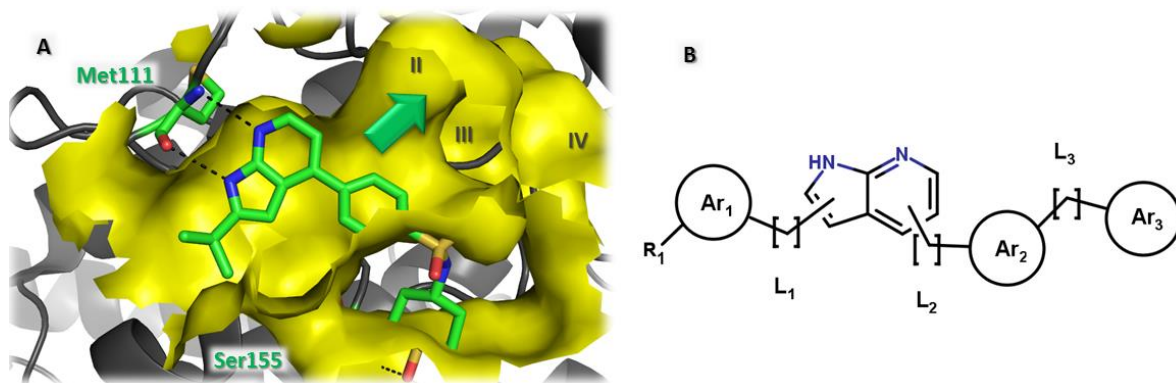


Figure 34 : A : Zoom sur les sites actifs après superposition des structure 4AWI (protéine en gris mode cartoon, ligand en vert en mode sticks) et 3NPC (protéine en jaune en mode surface). B : Structure générale des dérivés de scaffold-II sélectionnés pour la série 3 (L : Linker, Ar : Aromatique).

Ces quatre molécules présentent un fluorophényle et un imidazole en tant que groupe Ar₂ et Ar₃ respectivement. Les différences structurelles résident au niveau de la présence ou non d'un substituent 3-hydroxyméthyle sur Ar₁ et sur la taille/nature du linker L₃.

Tableau 18 : Résultats des tests d'inhibition et structures des molécules de la série 3

Structure	Nom de la molécule	C (μM)	% inhibition à 10 μM			IC ₅₀ (nM)		
			JNK1	JNK2	JNK3	JNK1	JNK2	JNK3
	AD429	10	46%	52%	67%	4350	8680	3340
	AD430	10	68%	59%	66%	3160	8550	1990
	AD438	10	90%	89%	89%	1350	1990	1290
	AD349	10	94%	83%	85%	2310	2270	930

Afin de comparer plus précisément l'activité de ces molécules qui ont montré des pourcentages d'inhibition élevés à 10 μM sur JNK2, les IC₅₀ (concentrations inhibant à 50% la kinase) ont également été déterminées pour les trois membres de la famille JNK (Tableau 18, les trois colonnes de droite).

Tout d'abord, quand on compare respectivement les IC₅₀ de **AD429** et **AD438** à celles de **AD430** et **AD349**, on remarque que la présence d'un linker L₃ à 4 chainons au lieu de 3 réduit de presque un tiers l'IC₅₀ pour JNK3. Ce linker à 4 chainons avec une telle orientation de l'imidazole semble

donc favorable à l'inhibition de JNK3. Cette modification de taille du lien ne semble pas avoir de grande influence sur l'activité de JNK2, alors que pour JNK1, le passage d'un lien à 4 chaînons au lieu de 3 fait augmenter ou diminuer légèrement l'IC₅₀ selon si l'aromatique Ar₁ est substitué ou non par un groupe 3-hydroxyméthyle, point qui peut être intéressant à exploiter pour apporter de la sélectivité par la suite.

Par ailleurs, la comparaison des IC₅₀ de **AD429** et **AD430** aux IC₅₀ de **AD438** et **AD349** respectivement nous montre bien que la présence d'un 3-hydroxyméthyle sur AR₁ a une influence majeure, puisque les valeurs d'IC₅₀ sont réduites de 1,5 à 4 fois pour toutes les JNKs quand ce groupement est présent. Si on considère que ces molécules se lient à la charnière de la même façon que AQ2, cela signifierait que ce groupement interagirait avec les résidus à l'entrée du site actif côté charnière. Afin de mieux comprendre le type d'interactions de ce groupe dans cette région du site, il serait intéressant d'explorer d'autres groupements et/ou d'autres positions de R₁ sur Ar₁.

Les résultats de cette série 3 ont permis d'obtenir deux molécules présentant des IC₅₀ de 1 à 2 µM sur les JNKs et d'entrevoir deux éléments structuraux permettant de moduler l'activité sur les JNKs. Le premier élément concerne le lien L₃ qui serait favorable à l'inhibition des JNKs lorsqu'il est constitué de 3 ou 4 chaînons et de type méthyléthylamine ou diméthylamine. Le deuxième élément concerne la présence d'un 3-hydroxyméthyle sur le phényle Ar₁, qui augmente considérablement l'activité de ces molécules.

4. Série 4 : Conception et synthèse de nouveaux dérivés de la CS II.

Suite aux résultats très probants de la série 3, il a été décidé d'explorer davantage la nature du lien L₃. Pour cela, trois molécules suivant le même schéma B de la **Figure 34** ont été synthétisées le **AD533**, le **AD598** et le **AD597**. Ces nouveaux composés ont été criblés sur les trois JNKs à une concentration de 1µM, avec détermination des IC₅₀ pour certaines d'entre elles. Les structures de ces trois nouvelles molécules et celles des deux meilleures de la série 3, ainsi que leurs résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 19 : Résultats des tests d'inhibition et structures des molécules de la série 4

Structure	Nom de la molécule	% inhibition à 1 μ M			IC ₅₀ (nM)		
		JNK1	JNK2	JNK3	JNK1	JNK2	JNK3
	AD438	46%	27%	36%	1350	1990	1290
	AD349	36%	22%	41%	2310	2270	930
	AD597	28%	25%	14%	>> 10000	>> 10000	>> 10000
	AD598	65%	60%	29%	935	1360	>> 10000
	AD533	65%	27%	50%	328	2670	877

Comme le montre le tableau ci-dessus, pour ces trois nouvelles molécules, le lien L₃ diméthylamine ou méthyléthylamine a été remplacé par des analogues en série amide.

Pour la molécule **AD597** dotée d'un linker amide à quatre chaînons lié par la fonction carbonyle sur Ar₁ et lié à la position 4 de l'imidazole, les pourcentages d'inhibition ne dépassent pas 28% sur les trois JNKs montrant ainsi une diminution des inhibitions de JNK1 et JNK3 par rapport **AD349** son analogue en série méthyléthylamine.

Tout comme **AD597**, **AD598** comporte un lien amide mais avec un chaînon en moins, et une liaison en position 2 sur l'imidazole, différences structurales induisant une augmentation des pourcentages d'inhibition d'un facteur 2 pour les 3 JNKs. Ainsi pour ce lien amide lié par la fonction carbonyle sur Ar₁, il semblerait plus favorable d'avoir un lien L₃ à 3 chaînons au lieu de 4 avec leurs positions respectives sur l'imidazole.

Par ailleurs, la comparaison des IC₅₀ de **AD438** (de la série 3) et **AD598** semble montrer qu'une fonction amide sur le linker L₃ liée par la fonction carbonyle sur Ar₁ est légèrement plus avantageuse pour inhiber JNK1 et JNK2 que la fonction amine correspondante. Cela se traduit par une légère augmentation des pourcentages d'inhibition et une légère diminution des IC₅₀ correspondantes.

Quand on compare les structures de **AD598** et **AD533**, les deux molécules possèdent un lien L₃ à 3 chaînons, mais diffèrent d'une part par l'orientation de la liaison amide (liée par la fonction carbonyle ou par l'azote à Ar₁) et d'autre part par la position de liaison de L₃ sur l'imidazole. Ces différences induisent pour **AD598** une diminution de l'IC₅₀ d'un facteur 3 pour JNK1 et une augmentation d'un facteur 2 pour JNK2. Les orientations/substitutions de l'amide et de l'imidazole de **AD598** favorisent ainsi une meilleure inhibition de JNK1 alors que celles de **AD598** favorisent une meilleure inhibition de JNK2. Ces éléments structuraux semblent intéressants à explorer pour amener de la sélectivité dans les profils d'inhibition des 3 JNKs.

En conclusion, nous avons pu découvrir de façon rationnelle au sein de notre chimiothèque une molécule avec une activité en dessous de la barre des 1µM, le **AD349**. A partir de cette dernière et de ces analogues, nous avons pu concevoir et synthétiser trois nouvelles molécules, qui ont

montré une activité encore meilleure, de l'ordre de 300nM envers JNK, grâce à ce nouvel linker amide, démontrant ainsi que notre stratégie de développement est sur la bonne voie pour nous mener vers de nouveaux inhibiteurs de JNKs performants.

III. Synthèse organique des molécules de la série 4 de l'approche II

1. Synthèse de l'intermédiaire diphényle :

Les deux premières étapes de synthèse sont communes aux trois molécules. La première étape est une réaction de Suzuki-Miyaura. Elle permet de substituer l'iode par le 3-méthylhydroxyphényle comme AR_1 en position 3 du 7-azaindole. Lors de cette étape le chauffage sous μ -ondes est relativement bas, il a été réglé à 50°C afin éviter que le brome entre aussi en réaction. Ensuite, une seconde réaction de Suzuki (Erreur ! Source du renvoi introuvable.(c)) va emplacer cette fois-ci le brome en position 5 par le groupement AR_2 souhaité. L'acide boronique utilisé dans cette réaction est sous sa forme ester de pinacol (Erreur ! Source du renvoi introuvable.(b)), car sous cette forme on remarque une meilleure stabilité dans les conditions de réaction que sous la forme acide boronique. Cette étape a permis l'obtention de deux intermédiaires **AD517** et **AD518**, dont le brut réactionnel de chacun a été utilisé directement dans l'étape suivante.

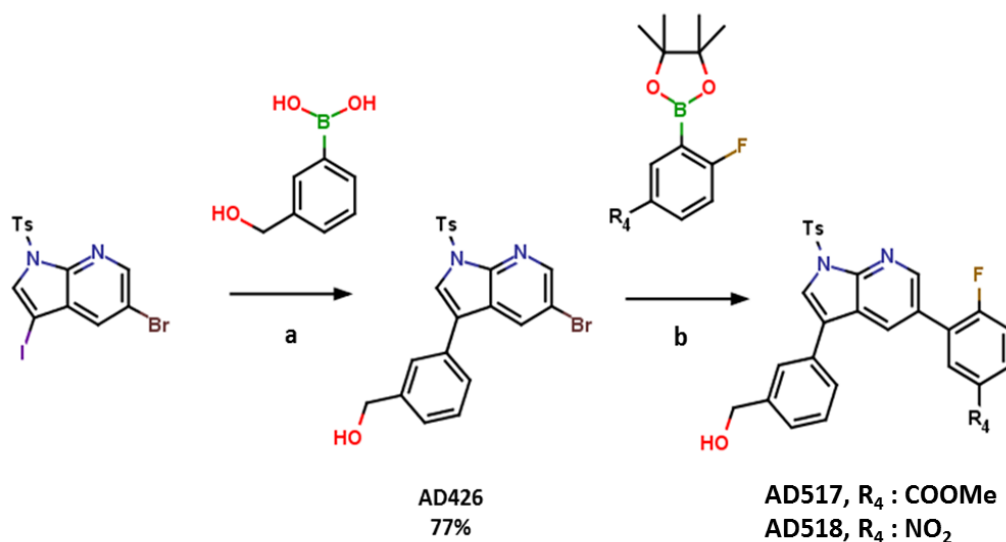


Schéma 6 : Schéma des deux premières étapes communes à la synthèse des molécules de la série 4.
 a) et b) $Pd(dppf)Cl_2$, K_2CO_3 , 1,4-Dioxane/ H_2O , μ -onde (50°C pour (a) et 70°C pour (b))

2. Synthèse de **AD598** et **AD597**

Pour obtenir **AD598** et **AD597**, l'intermédiaire **AD517** a subi une saponification (**Schéma 7.(a)**), celle-ci a permis non seulement de convertir la fonction ester du composé en fonction acide carboxylique, mais aussi d'éliminer le groupement tosyle sur l'azote 1, pour conduire à **AD593** avec un rendement de 69%. La fonction acide carboxylique ainsi libérée a été mis en jeu dans un couplage de type peptidique (**b**) avec l'amine adéquate pour d'introduire le linker L_3 et le Ar_3 souhaité. Pour **AD598**, l'amine mise en jeu lors de cette étape est la 1*H*-imidazol-2-yl)méthanamine. Après contrôle LCMS la réaction fut totale après 1 nuit à température ambiante. Lors de la purification, quelques difficultés de séparation ont été rencontrées ce qui a fait chuter le rendement à 25% mais le produit est isolé avec une pureté de 98% en LCMS. Concernant **AD597**, c'est l'histamine qui a été mise en jeu pour ce couplage dont la réaction fut totale après une nuit à température ambiante. Le brut réactionnel a dû être purifié pour obtenir le composé final avec une pureté LCMS de 94% et un rendement de 37%.

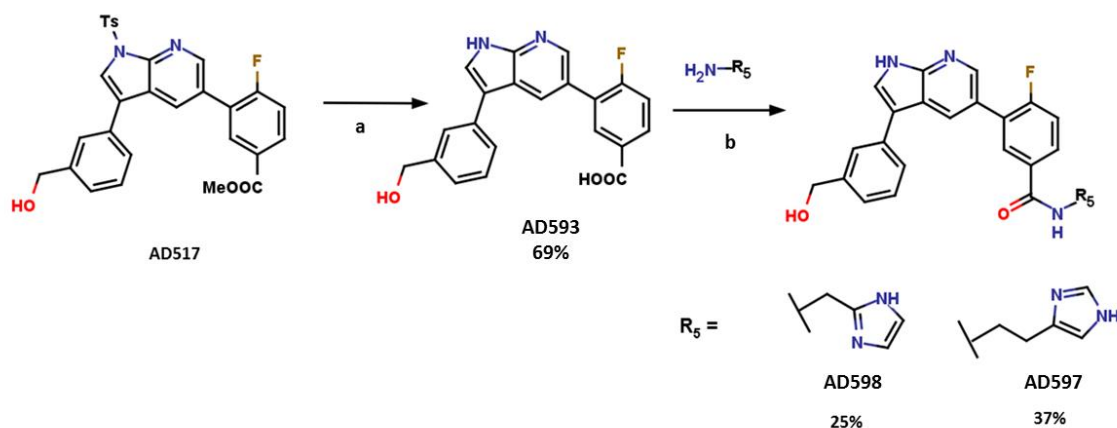


Schéma 7 : Suite de la voie de synthèse pour AD598 et AD597.

a) NaOH [1M], μ -onde 80°C ; b) HATU, DIEA, DMFanh, TA.

3. Synthèse du AD533

Pour **AD533**, le milieu réactionnel de l'intermédiaire **AD518** a été mis à réagir directement avec l'hydroxyde de sodium (**Schéma 8.(a)**) pour éliminer le groupement tosyle sur l'azote en position 1 sur le 7-azaindole. Lors de cette étape, le composé a pris en une émulsion très épaisse, l'extraction et la purification se sont montrées particulièrement difficiles. L'intermédiaire **AD528** obtenu a été utilisé tel quel dans l'étape de réduction (**b**), qui a permis de convertir le groupement nitro de l'Ar₂ en amine pour conduire au **AD530**. Le rendement sur ces deux étapes est de 11% après purification et l'intermédiaire est isolé avec une pureté LCMS de 93%. Maintenant que la fonction amine du Ar₂ est disponible pour un couplage peptidique, **AD530** est couplé avec le 2-(1H-imidazol-4-yl)acétique acide selon les conditions (**c**) pour donner le **AD533** avec un rendement de 58% et une pureté en LCMS de 98%.

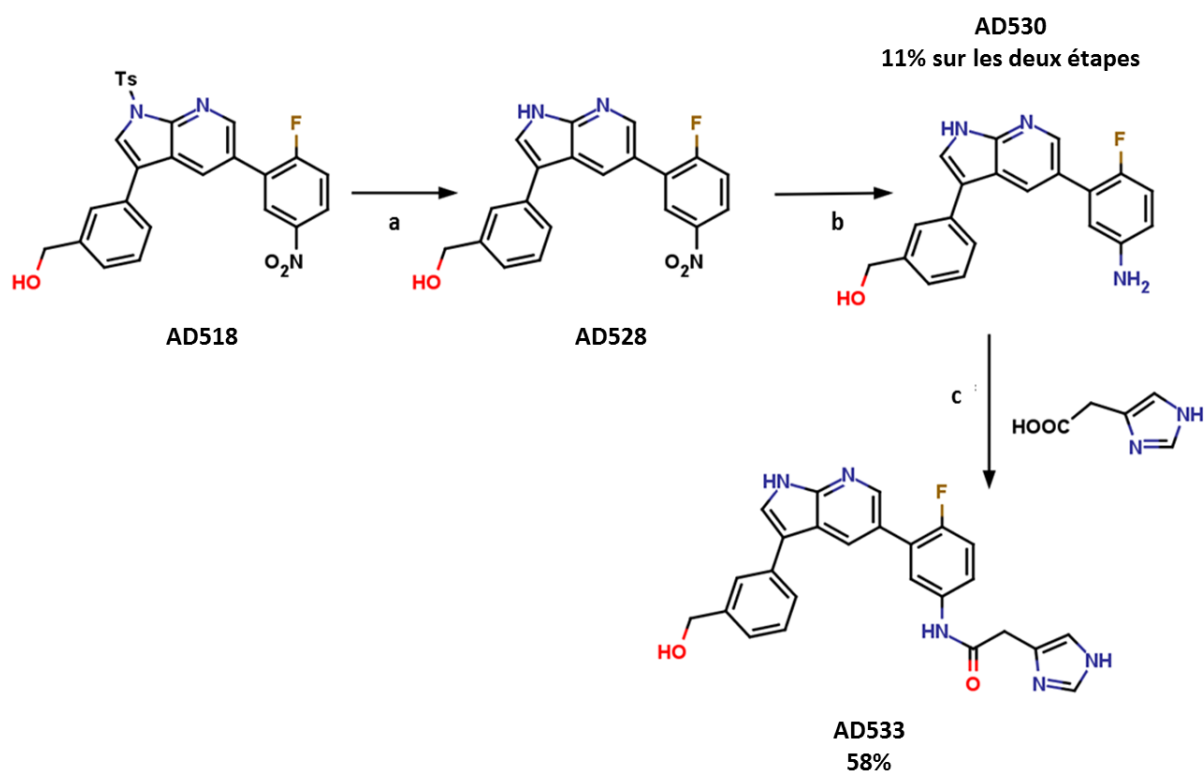


Schéma 8 : Suite de la voie de synthèse pour AD533

a) NaOH [1M] μ -onde 80°C ; b) NH_4HCO_3 , Pd/C, MeOH, μ -onde 70°C ; c) HATU, DIEA, DMFanh, TA.

IV. Conclusion et Perspectives

A partir du screening effectué pour cette approche, en faisant le rapprochement entre le ligand d'un co-cristal de JNK et un des scaffold élaboré à OriBase Pharma, nous avons réussi à obtenir un hit, le **AD349** avec une IC50 de 930 nM. Grâce à la pharmaco-modulation du linker L₃ de ce dernier, le faisant passer d'une méthyléthylamine à un acétamide, nous avons pu diviser par trois l'IC50 en passant à une IC50 de 328 nM pour le **AD598**.

Ces résultats très prometteurs ouvrent la porte au développement de nouveaux inhibiteurs de JNKs avec tout d'abord la recherche d'une tête de série ou Lead puis son optimisation en utilisant les outils de chemoinformatique et la chimie médicinale. Par exemple, dans un premier temps, il faudrait explorer d'autres linkers L₃ (comme la fonction urée) ainsi que divers Aromatiques Ar₃ (avec d'autres hétérocycles). Dans un deuxième temps, d'autres positions et d'autres natures de R₁ devraient être explorées, comme les groupements solubilisants de type morpholine ou

pipérazine. Et dans un troisième temps, il serait aussi intéressant d'explorer de nouvelles positions de l'atome de fluor sur l'aromatique Ar₂, voir de le remplacer par un autre substituant (Br, CH₃,...).

Chapitre IV : Tests pharmacologiques *in cellulo* **complémentaires**

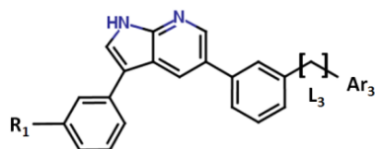
Pour apprécier l'effet direct de ces molécules sur des cellules cancéreuses, et aussi mieux comprendre leur action sur la voie de signalisation des MAPKs, les molécules les plus prometteuses ont été soumises à deux tests pharmacologiques. Ces deux tests ainsi que leurs résultats sont représentés ci-dessous.

I. Tests de mesure de la viabilité et de la prolifération cellulaire : test colorimétrique MTT

Pour ce test, les 7 derniers composés de l'approche II ont été incubés avec 6 lignées cellulaires cancéreuses différentes, les résultats de ce test sont présentés dans le **Tableau 20**:

Tableau 20 : Résultats du test de prolifération sur les 7 composés de l'approche II.
n : nombre d'expériences effectuées. *DS* : déviation standard. *EC*₅₀ (μM). (3<<10 : entre 3 μM et 10 μM)

		AD429	AD430	AD438	AD349	AD533	AD598	AD597
R1-		H-	H-	OH-CH ₂ -	OH-CH ₂ -	OH-CH ₂ -	OH-CH ₂ -	OH-CH ₂ -
-L ₃ -Ar ₃								
HUCTT-1 (cancer du pancréas)	n	2	1	1	2	2	2	1
	EC ₅₀	3<<10	0,88	3<<10	3<<10	>10	3<<10	>10
MDA-MB-231 (cancer du sein triple-négatif)	n	1	1	1	2	2	1	1
	EC ₅₀	3<<10	0,77	~10	3<<10	>10	3<<10	1,4
NCI-H1975 (cancer du poumon non à petites cellules)	n	2	1	4	4	4	1	1
	EC ₅₀	3<<10	0,8	3<<10	3<<10	>10	3<<10	>10
K562 (leucémie myéloïde chronique)	n	3	2	4	4	3	2	1
	DS	–	0,29	–	–	0,057	–	–
	EC ₅₀	3<<10	1,77	3<<10	>10	0,14	>10	>10
MV4-11 (leucémie myéloïde aiguë)	n	3	2	1	2	3	2	1
	DS	0,044	0,0015	–	0,38	0,10	0,050	–
	EC ₅₀	0,23	0,072	0,24	0,094	0,13	0,15	0,3<<1
THP1 (leucémie myéloïde aiguë)	n	2	2	3	3	2	3	1
	DS	–	0,37	–	–	–	–	–
	EC ₅₀	3<<10	1,43	3<<10	3<<10	>10	3<<10	>10



Comme le montre ce tableau, le composé **AD430** présente l'activité antiproliférative la plus élevée sur tous les types cellulaires testés ($0,072 \leq EC50 \leq 1,77$). Ce résultat est en adéquation avec l'effet escompté : l'inhibition de JNK conduirait à une mort cellulaire par apoptose. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que ce résultat pourrait également refléter l'activité du composé sur une ou plusieurs autres cibles ou une activité cytotoxique non ciblée. Pour confirmer ou infirmer une activité non spécifique du composé, un criblage de l'effet de cette molécule sur un large éventail de cibles (kinases et autres cibles pharmacologiques) devrait nous permettre de vérifier sa sélectivité envers les JNK. Par ailleurs, un test MTT sur des cellules primaires non cancéreuses comme des PBMC (Peripheral blood monocyctic cells) serait également très informatif pour vérifier si cette molécule est cytotoxique ou si son action antiproliférative est spécifique des cellules cancéreuses.

Deux autres composés se distinguent aussi, chacun sur un type cellulaire précis, il s'agit du **AD533** sur les K562 et du **AD597** sur les MDA-MB-231. Cette spécificité cellulaire pourrait être due à la surexpression ou à la suractivation de la cible inhibée (les JNKs entre autres) par chacun de ces deux composés dans le type cellulaire sensible. Cette sélectivité indique également que ces deux composés ne présentent probablement pas ou peu d'effet cytotoxique non spécifique, puisque 4 autres types cellulaires restent insensibles.

Pour les résultats sur les cellules MV4-11, il faut souligner que ce sont des cellules très sensibles à tout type de traitement pharmacologique avec des réponses jusqu'à 100 fois plus élevée que les autres types cellulaires. Ainsi, les EC50 obtenues sont beaucoup plus faibles en comparaison avec les autres types cellulaires. Dans ces cellules, **AD430** reste le composé le plus actif par rapport aux 4 autres composés. Par ailleurs, le composé **AD349** semble également avoir une activité d'intérêt.

II. Human phospho-MAPK array

Afin d'évaluer l'effet des composés sur les voies de signalisation intracellulaire, nous avons sélectionné le kit « Human Phospho-Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Antibody Array ». Ce kit permet de détecter simultanément l'état de phosphorylation de 24

protéines impliquées dans les voies de signalisation des MAPK après incubation des cellules en présence du composé.

Pour ce test, les cellules de la lignée cancéreuse K562 ont été sélectionnées pour trois raisons principales. Premièrement, de nombreuses publications indiquent une suractivation des voies MAPKs dans ce type cellulaire. Deuxièmement, ces cellules avaient démontré une sensibilité aux composés, observée en test MTT, laissant présager une action pharmacologique des composés sur leurs cibles dans ces cellules. Enfin, les cellules K562 avaient été utilisées pour des tests similaires en interne et avaient permis de mettre en évidence une suractivation de nombreuses voies de signalisation dans ces cellules.

Trois composés ont été testés le **AD533**, le **AD598** et le **JR062** (Figure 33). Les deux premiers composés ont été choisis à cause de leur activité sur les JNKs obtenue en test d'inhibition, le troisième a été choisi à cause de sa structure qui est proche du BIRB796 un inhibiteur connu de la kinase p38, membre de la famille des MAPK.

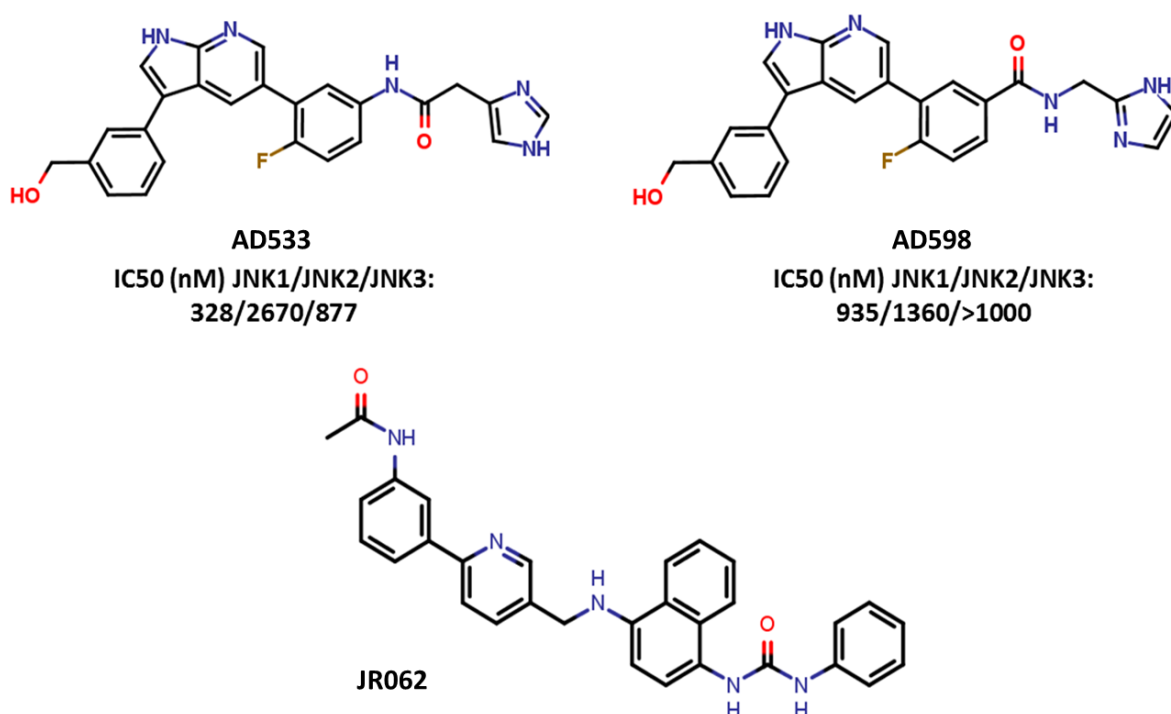
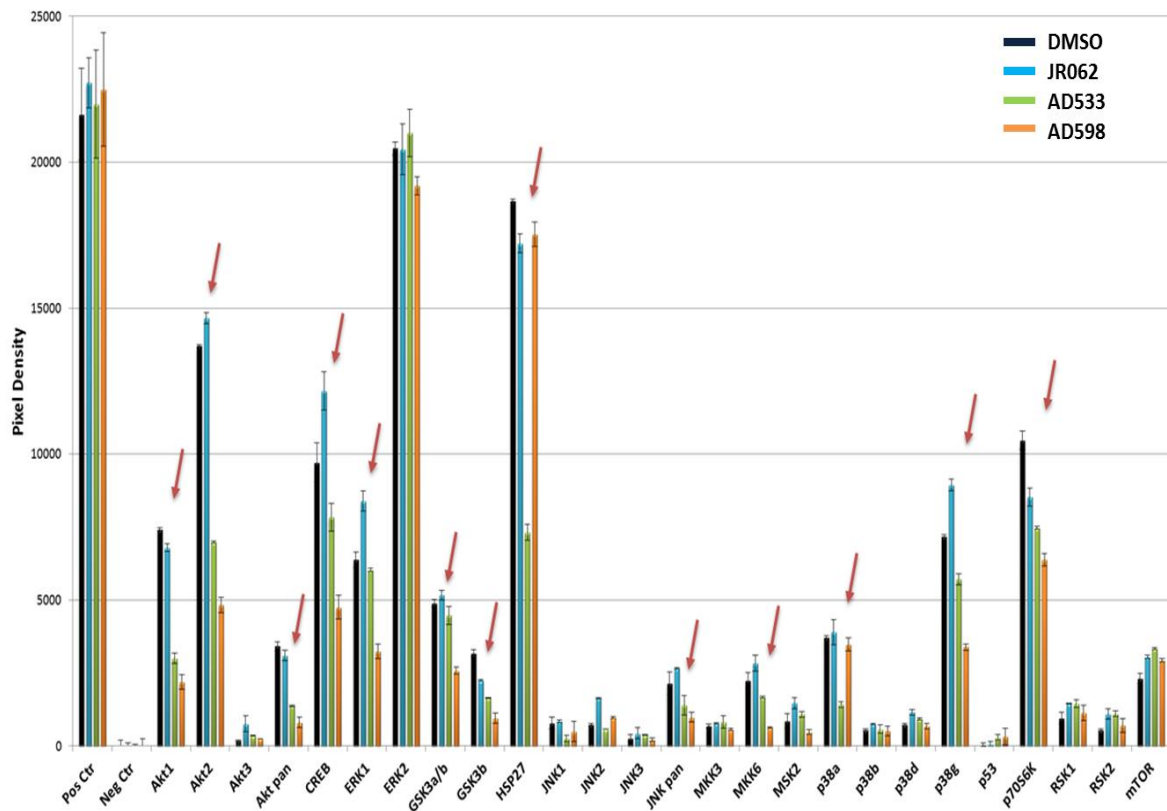


Figure 35 : structure des trois molécules testées

La densité en pixel de chaque spot a été analysée et la moyenne et écart type calculés pour chaque protéine évaluée. Les résultats sont présentés dans L'**Histogramme 1**.



Histogramme 1: Histogramme des valeurs des densités de pixel pour chaque protéine. En Bleu foncé : les valeurs obtenues sur la membrane témoin DMSO. En bleu clair : les valeurs obtenues sur la membrane du JR062. En vert : les valeurs obtenues sur la membrane de AD533. En orang : les valeurs obtenues sur la membrane du AD598 (les flèches rouge indiquent les protéines ou une activité est observée).

Le composé **AD533** inhibe la phosphorylation de plusieurs kinases et protéines de la voie de signalisation MAPK : AKT, CREB, GSK3, HSP27, JNK, p38 et S6K1, comme le montre l'histogramme en comparaison avec les cellules traitées uniquement avec le DMSO.

Le composé **AD598** inhibe la phosphorylation de plusieurs kinases et protéines de la voie de signalisation MAPK : AKT, CREB, ERK, GSK3, JNK, MKK6, p38 et S6K1.

Sur la voie des MAPK, en utilisant ce test « Human Phospho-Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Antibody Array », les résultats obtenus indiquent que :

- 1/ Le composé **JR062** n'induit pas de changement significatif de la phosphorylation de différentes protéines évaluées en comparaison avec les cellules traitées

uniquement avec le DMSO. Ceci pourrait être dû à une inactivité de ce composé sur les cibles d'intérêts ou à une non-pénétrabilité dans les cellules.

2/ Les deux composés **AD533** et **AD598** présentent des profils similaires (sauf dans le cas de HSP27) ; le composé **AD598** induisant une inhibition de la phosphorylation des protéines plus élevée que le composé **AD533**.

La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** résume les protéines de la voie de signalisation des APK qui ont été touchées lors du traitement des cellules K562 avec les composés **AD598** et **AD533**.

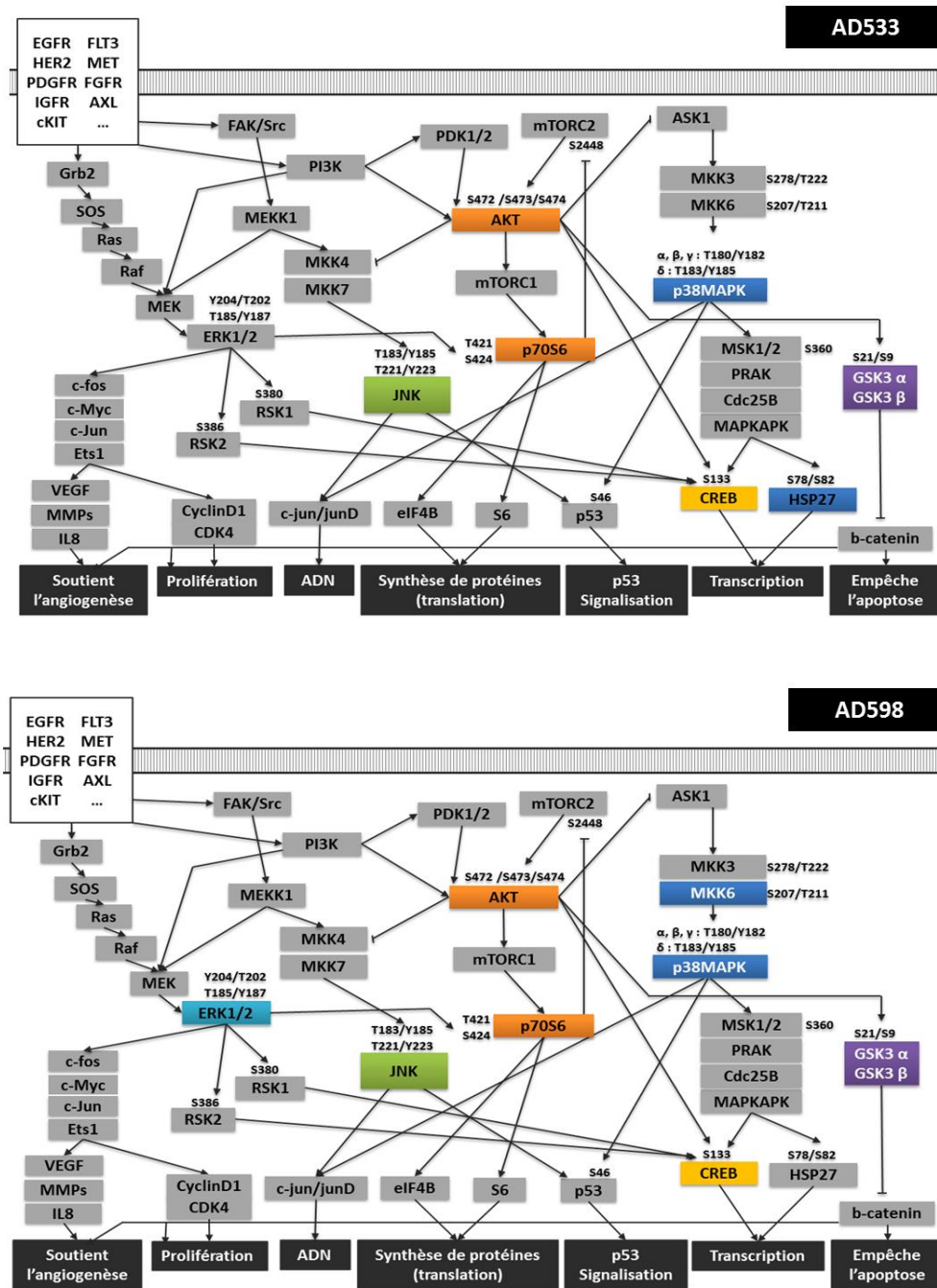


Figure 36 : kinases de la voie de signalisation MAPK inhibées par AD533 et par AD598. Les protéines sur lesquelles le composé est actif sont en couleur, les protéines sur lesquelles il n'est pas actif sont en gris.

De façon générale pour les cellules K562, nous remarquons que les valeurs des densités des spots des JNKs de la membrane témoin du DMSO sont faibles, indiquant que les JNKs ne sont pas ou très peu activées dans ces cellules ou qu'elles sont peu exprimées. Ainsi, il reste difficile de conclure sur l'activité de nos molécules sur les JNK dans ces cellules. Des expériences

supplémentaires devraient être effectuées sur un autre type cellulaire dans lequel les JNK sont fortement exprimées ou fortement activées.

III. Conclusion & perspective

Le test pharmacologique de prolifération des cellules tumorales nous a permis dans un premier temps d'explorer l'effet de nos composés directement sur des cellules cancéreuses. Nous avons pu ainsi mettre en évidence une activité cellulaire anti-cancéreuse pour trois composés issus de l'approche II. Dans un deuxième temps et grâce au test et Human phospho-MAPK array, l'effet de trois de nos composés sur la phosphorylation de 24 protéines appartenant à la voie de signalisation des MAPKs a pu être étudié.

Pour compléter ces résultats, d'autres techniques pourraient être utilisées pour mieux définir le mécanisme d'action des composés.

Par exemple, un test de compétition de l'ATP nous permettrait de confirmer que ces composés se lient au niveau du site actif des JNKs comme le composé AQ2 de la structure 4AWI. Une autre technique de choix serait la résolution d'un co-cristal d'un ou de plusieurs de ces composés avec les JNKs.

Des tests de stabilité et de solubilité de ces composés nous permettraient également d'évaluer des paramètres physico-chimiques indispensables pour conclure sur les résultats des tests biochimiques et cellulaires.

Enfin, un test de cytotoxicité sur des cellules primaires non cancéreuses nous permettrait de valider l'effet spécifique de nos composés.

Partie IV

Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion et perspectives

Dans la première partie de cette thèse, nous avons mis en évidence l'implication des protéines kinases JNKs dans divers cancers, ainsi que dans d'autres pathologies comme les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer) ou l'inflammation. La validation thérapeutique des protéines kinases JNKs en tant que cible thérapeutique a été aussi apportée dans cette partie. Bien qu'aucun inhibiteur de JNKs ne soit sur le marché, cinq inhibiteurs des JNKs sont actuellement en phase clinique ; ces études ciblant de nombreuses pathologies. Toutes ces preuves nous montrent à quel point les protéines kinases JNKs constituent une cible thérapeutique de choix.

Dans la seconde partie de cette thèse, une analyse complète des données structurales disponibles sur les JNKs a été réalisée. Conduisant à la compréhension des interactions entre inhibiteurs et kinase JNKs. Ensuite la construction des modèles par homologie des structure 3D de conformation DFG-out de JNK1 et JNK3 manquantes a permis la découverte de deux position de résidus de la séquence du site actifs des trois JNKs susceptibles d'influencer la sélectivité entre les trois isoformes, Met77/ Leu77/Met115 et l'Ile106/Leu106/Leu144 pour JNK1/JNK2/JNK3 respectivement.

Dans la troisième partie nous avons mis en place deux stratégies rationnelles pour appréhender le design de scaffold susceptible de se lier à la charnière des JNKs. La première est une stratégie basée sur le SBDD. Celle-ci nous a permis de développer un nouveau scaffold, la 3-anilino-2-pyridine. Les dérivés synthétisés de celui-ci, n'ont pas donné des résultats très probants, mais les faibles activités que nous avons obtenues nous montrent qu'il faut continuer dans cette voie. En effet, il reste plusieurs pistes à explorer pour le développement de ces structures afin de leur permettre d'avoir de meilleures activités sur JNKs.

La seconde stratégie mise en place est une stratégie classique de criblage pharmacologique. Celle-ci se distingue néanmoins par le choix du scaffold, le 7-azaindole. En effet, le choix de celui-ci a été fait de façon rationnelle en partant du co-cristal de code PDB : 4AWI qui montre un dérivé du noyau 7-azaindole, développé pour inhiber les protéines kinases IKKs, lié au site actif de JNK1. Ce scaffold étant aussi développé au sein d'OriBase Pharma, le screening de ses

dérivés sur JNK fut enclenché. L'étude SAR (structure activity relationship) des résultats de ce criblage nous ont permis de concevoir et synthétiser un hit, **AD533**, qui possède une IC₅₀ de 328 nM sur JNK1.

Lors du développement de ces molécules, il est vrai que dans certains cas les résultats des dockings n'ont pas été prédictifs ; cela pourra être amélioré par une optimisation supplémentaire des modèles construits, ou encore par la mise en place d'un docking flexible qui permettrait de prendre en considération les mouvements perpétuels des chaînes latérales du site actif de la cible, représentant ainsi de façon plus proche de la réalité ces kinases dans leur milieu naturel.

Pour apprécier l'effet direct de certaines de nos molécules sur des cellules cancéreuses, et aussi mieux comprendre leur action sur la voie de signalisation des MAPKs, deux tests pharmacologiques ont été effectués. Les résultats de ces tests sont très probants, puis ce que le même hit, le **AD533**, montre une EC₅₀ de 140 nM sur les K562, des cellules cancéreuses de la leucémie myéloïde chronique. Le deuxième test ne nous a pas permis de bien apprécier son activité sur les JNKs dans la voie de signalisation MAPK, probablement à cause d'un mauvais choix des cellules testées.

Comme tout projet de R&D, tous les résultats n'ont bien sûr pas toujours été au rendez-vous, du moins pas aussi rapidement que souhaité, mais aussi, plusieurs difficultés ont été rencontrées lors du déroulement de ce projet. Nous avons malgré tout réussi à obtenir des composés actifs sur JNK et actifs sur des cellules cancéreuses, ce qui se trouve être le but de notre projet depuis le départ. Vu ces résultats, et en plus du fait que nos molécules restent relativement facile d'accès en synthèse organique, nous pouvons dire aujourd'hui que ce projet est très prometteur pour la découverte d'un lead qui ciblerait les protéines kinases JNKs en tant qu'agent thérapeutique. Bien sûr beaucoup d'efforts supplémentaires en développement ainsi que d'autres tests sont à prévoir pour aboutir à une telle découverte.

II. Communications

Trois communications orales ont eu lieu durant des congrès internationaux :

- A la 3^{ème} édition des journées jeunes chercheurs de la SMCT, qui se sont déroulé à Rabat au Maroc le 26 Novembre 2014 sous le titre « Etude du site actif des kinases JNKs et mise en évidence des éléments responsables de la sélectivité au sein de cette famille de kinases »
- Aux journées scientifiques « JS-OIVSHPMA », qui se sont déroulé à Fès au Maroc le 03 juin 2015 sous le titre « Conception d'inhibiteurs hétérocycliques des kinases JNKs avec une approche de SBDD ».
- A la 4^{ème} édition des journées jeunes chercheuses de la SMCT, qui se sont déroulé à El Jadida au Maroc le 19 novembre 2015 sous le titre « Insight into Binding Mode and Selectivity of Heterocyclic Inhibitors of JNK Kinases using Structure Based Drug Design Approach”.

Une communication par affiche a eu lieu durant le congrès international des RICT à Avignon en France le 2 et 3 juillet 2015.

III. Publications

Ce travail a fait l'objet de trois publications dans des journaux internationaux :

- Une première revue a été acceptée le 15 septembre 2014 pour publication dans le journal *Chemistry and Biology journal* (2014 Impacte factor : 6.582):
“ Recent progress in the design, study and development of c-Jun N-terminal kinase inhibitors as anticancer agents ” A.MESSOUSSI et al. *Chemistry & Biology*, Volume 21, Issue 11, 1433 – 1443.
- Un article a été accepté le 29 septembre 2014 pour publication dans *Molecules Journal* (2014 Impacte factor : 2.45):
“ Structural Elucidation of the DFG-Asp in and DFG-Asp out States of TAM Kinases and Insight into the Selectivity of Their Inhibitors ”. A.MESSOUSSI. *Molecules*, Volume 19, Issue 10, 1420-3049.
- Un troisième Article a été accepté au journal *MedChemComm* le 06 janvier 2016 (2016 Impacte factor : 2,319):
“ Insight into the selective inhibition of JNK family members through structure-based drug design ”. A.MESSOUSSI et Al. *Med. Chem. Commun*, Volume 7, Issue 4, 686-692.

Les abstracts de ces publications sont présentés çï-après:

Recent progress in the design, study and development of c-Jun N-terminal kinase inhibitors as anticancer agents

Abdellah Messoussi^{1,2}, Clémence Fenevolles¹, Aurélie Bros¹, Arthur Deroide¹, Bénédicte Daydé-Cazals¹, Gwénaél Chev  ¹, Nathalie van Hijfte¹, Bénédicte Fauvel¹, Khalid Bougrin², and Aziz Yasri^{1*}

¹OriBase Pharma, Cap Gamma, Parc Eurom  decine, 34090 Montpellier, France.

²Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique, URAC23, Universit   Mohammed V-Agdal, Faculté des Sciences, B.P. 1014 Rabat, Maroc.

doi:10.1016/j.chembiol.2014.09.007

Abstract

The c-Jun N-terminal kinase (JNK) family, with its three members JNK1, JNK2, and JNK3, is a sub-family of mitogen activated protein kinases (MAPKs). Involved in many aspects of cellular processes, JNK has been also associated with pathological states such as neurodegenerative diseases, inflammation, and cancers. In oncology, each isoform plays a distinct role depending on the context of the targeted tissue/organ, the tumor stage and most likely the signaling pathway activated upstream. Consequently, the current challenge in finding new successful anti-JNK therapies is to design isoform-selective inhibitors of the JNKs. In this review, a particular focus is given to the JNK inhibitors that have been developed thus far when examining three-dimensional structures of various JNK-inhibitors complexes. Using current data regarding structure-activity relationships and medicinal chemistry approaches, our objective is to provide a better understanding of the design and development of selective JNK inhibitors in the present and future.

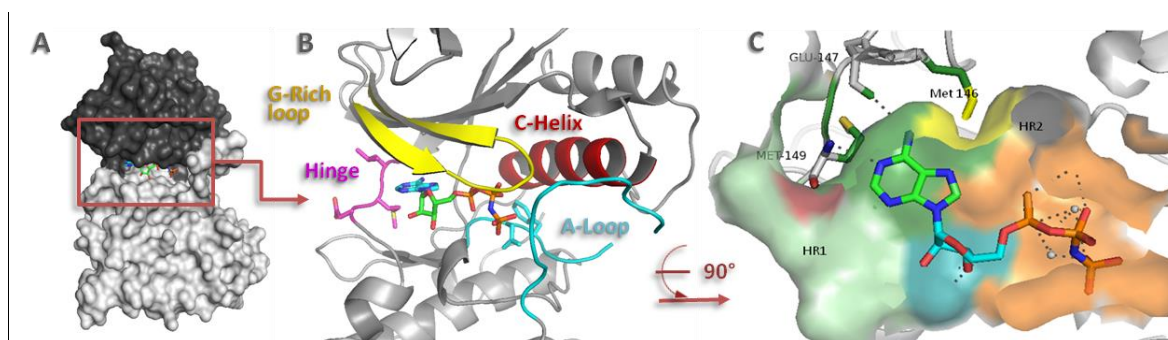


Figure 1. X-Ray-Resolved Structure of JNK3 in Complex with an ATP Analog, PDB ID: 1JNK

Article

Structural Elucidation of the DFG-Asp in and DFG-Asp out States of TAM Kinases, and Insight into the Selectivity of Their Inhibitors

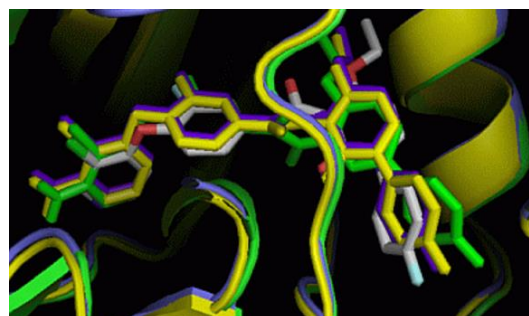
Abdellah Messoussi ^{1,2}, Lucile Peyronnet ¹, Clémence Feneyrolles ¹, Gwénaél Chevé ¹, Khalid Bougrin ² and Aziz Yasri ^{1*}

¹Affiliation: OriBase Pharma, Parc Euromedecine, Cap Gamma, 1682, rue de la Valsière, 34189 Montpellier, France. amessoussi@oribase-pharma.com; lpeyronnet@oribase-pharma.com; cfeneyrolles@oribase-pharma.com; gcheve@oribase-pharma.com; ayasri@oribase-pharma.com.

²Affiliation: Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique, URAC23, Université Mohammed V-Agdal, Faculté des Sciences B.P. 1014 Rabat, Morocco. khalid.bougrin@smct-ma.com

External Editor: Philippe Belmont

Abstract: Structural elucidation of the active (*DFG-Asp in*) and inactive (*DFG-Asp out*) states of the TAM family of receptor tyrosine kinases is required for future development of TAM inhibitors as drugs. Herein we report a computational study on each of the three TAM members: Tyro-3, Axl and Mer. DFG-Asp in and DFG-Asp out homology models of each one were built based on the X-ray structure of c-Met kinase, an enzyme with a closely related sequence. Structural validation and *in silico* screening enabled identification of critical amino acids for ligand binding within the active site of each DFG-Asp in and DFG-Asp out model. The position and nature of amino acids that differ among Tyro-3, Axl and Mer, and the potential role of these residues in the design of selective TAM ligands, are discussed.



Keywords: Tyrosine kinase ; TAM kinase family ; homology model ; kinase selectivity

RESEARCH ARTICLE



Cite this: DOI: 10.1039/c5md00562k

Insight into the selective inhibition of JNK family members through structure-based drug design†

A. Messoussi,^{ab} G. Chev e,^a K. Bougrin^{*b} and A. Yasri^{*a}*Med. Chem. Commun.*, 2016, 7, 686-692

DOI: 10.1039/C5MD00562K

Received 07 Dec 2015, Accepted 06 Jan 2016

First published online 08 Jan 2016

Abstract

The c-Jun N-terminal kinase (JNK) family, which comprises JNK1, JNK2 and JNK3, belongs to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily, whose members regulate myriad biological processes, including those implicated in tumorigenesis and neurodegenerative disorders. As with many other kinases, JNKs can adopt two main conformational changes: the DFG-in (active) conformation and the DFG-out (inactive) conformation; however, to date, the only resolved DFG-out conformation is that of JNK2. Structural elucidation of the remaining DFG-out conformations will be critical for structure-based drug design of novel type II inhibitors, which have been shown to offer greater therapeutic benefit than do type I inhibitors, as demonstrated by imatinib in chronic myeloid leukemia. Herein we report the use of a homology-modeling approach to build models of the DFG-out conformations of JNK1 and JNK3. After validating the model structures, we used structure-based drug design to elucidate the principal structural differences among the three JNK active sites and the binding of known JNK inhibitor, and to explain the selectivity of this compound for JNK2. Our findings provide structural guidelines for the design of novel and selective type II JNK inhibitors.

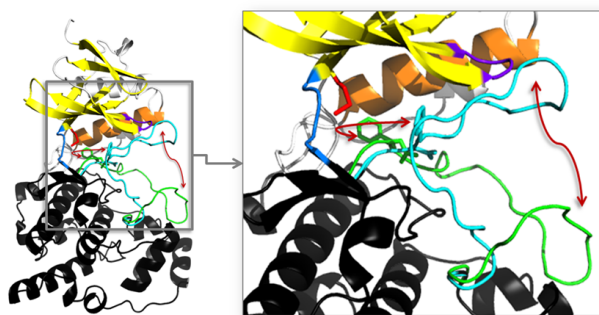


Fig. 1 Alignment of the JNK2 DFG-in (PDB ID: 3E7O) and DFG-out (PDB ID: 3NPC) conformations. N-terminal and C-terminal lobes in white and black respectively. In yellow the G-rich β -sheets and orange for the c-helix. Hinge in blue and gatekeeper in red. The activation loop in DFG-in conformation in cyan and the DFG-out conformation activation loop in green.

PARTIE V

Partie expérimentale

Chapitre I

chemoinformatique matériel et méthode

I. Modélisation par homologie

Les séquences des trois JNKs provenaient de la base de données Uniprot ¹⁴⁴. L'alignement de ces séquences a été réalisé avec le programme en ligne Clustal O¹⁴⁵ en utilisant les paramètres par défaut.

La construction des deux modèles a été réalisée avec le programme en ligne SWISS-MODEL ¹⁴⁶ selon ses paramètres par défaut. Ensuite ces deux modèles ont été affinés par minimisation d'énergie avec l'outil « Energy minimization » du logiciel Swiss-PdbViewer version 4.1.0 (selon ses paramètres par default : le champ de force GROMOS96 43b1 sans champ de réaction). Les valeurs d'énergie obtenues pour les modèles étaient de -21 206,189 kJ.mol⁻¹ pour JNK1 et -21 205,189 kJ.mol⁻¹ pour JNK3.

La validation des deux modèles a été effectuée avec les trois logiciels : **Prochek**, **ERRAT** et **Verify3D**.

Prochek ¹⁴⁷ nous a permis la génération des diagrammes de Ramachandran pour chaque modèle, Cela nous a permis de vérifier la distribution des angles dièdres ϕ et ψ pour chaque résidu. Pour le modèle de JNK1, 89% des résidus sont dans les régions énergétiquement très favorables, et 10% dans les régions autorisées, alors que seulement 0,6% (deux acides aminés) sont dans les régions non admises. Pour le modèle de JNK3, 90% des résidus sont dans les régions les plus favorables, 9,4% dans les régions autorisées et 0,6% (deux acides aminés) dans les régions non admises. Ces résultats prouvent que les deux modèles sont très plausibles: en effet, uniquement deux résidus par modèle présentent un angle dièdre de torsion exagérée. En plus, il est important de signaler que ces deux acides aminés sont situés dans la structure 3D en dehors du site actif. Par conséquent, ils ne devraient pas influencer notre analyse structurale.

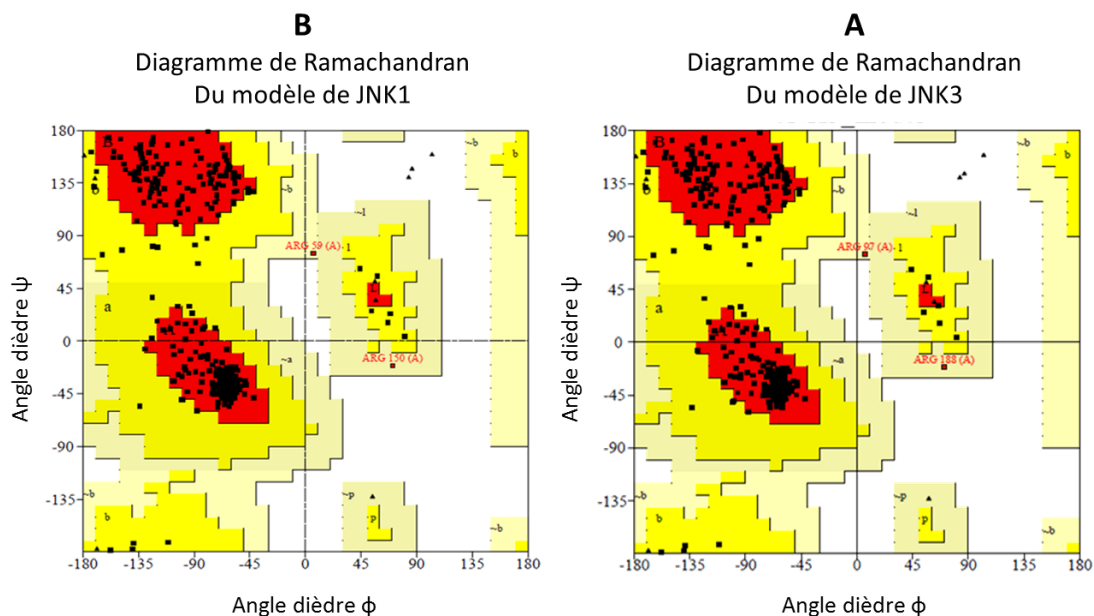


Figure 37 : les diagrammes de Ramachandran des deux modèles de JNK1 et- JNK3 construit par homologie

ERRAT¹⁴⁸ nous a permis d'analyser statistiquement les interactions non-liantes entre les atomes des modèles par rapport à ceux de structures hautement résolues prédéfinies dans une base de donnée du logiciel. Les facteurs globaux de qualité obtenus sont de 95% pour le modèle de JNK1 et 2% pour le modèle de JNK3, ce qui valide la qualité des deux modèles.

Verify3D¹⁴⁹ est un programme qui permet de vérifier la compatibilité de chaque modèle atomique 3D avec sa propre séquence d'acides aminés (1D). Chaque résidu du modèle 3D reçoit une classe structurale en fonction de sa position, son environnement et sa structure secondaire (hélice α , feuillet β , boucle, environnement polaire ou apolaire...etc), une base de données générée à partir de structures 3D expérimentalement bien établies est utilisée pour obtenir un score pour chacun des 20 acides aminés dans cette classe structurale. Ces nombres représentent la préférence statistique, appelé "3D-1Dscores" de chacun des 20 acides aminés pour un tel environnement). Le profil des scores (S) 3D pour la compatibilité avec la séquence modèle est la somme des scores de 3D-1D sur les positions de résidus de la séquence d'acides aminés de la protéine. Pour les deux modèles, le pourcentage de résidus avec un score moyen 3D-1D de plus de 0,2% a été 93% pour le modèle de JNK1 et 91% pour le modèle de JNK3. Ces scores démontrent que les modèles structurels 3D obtenues sont de haute qualité.

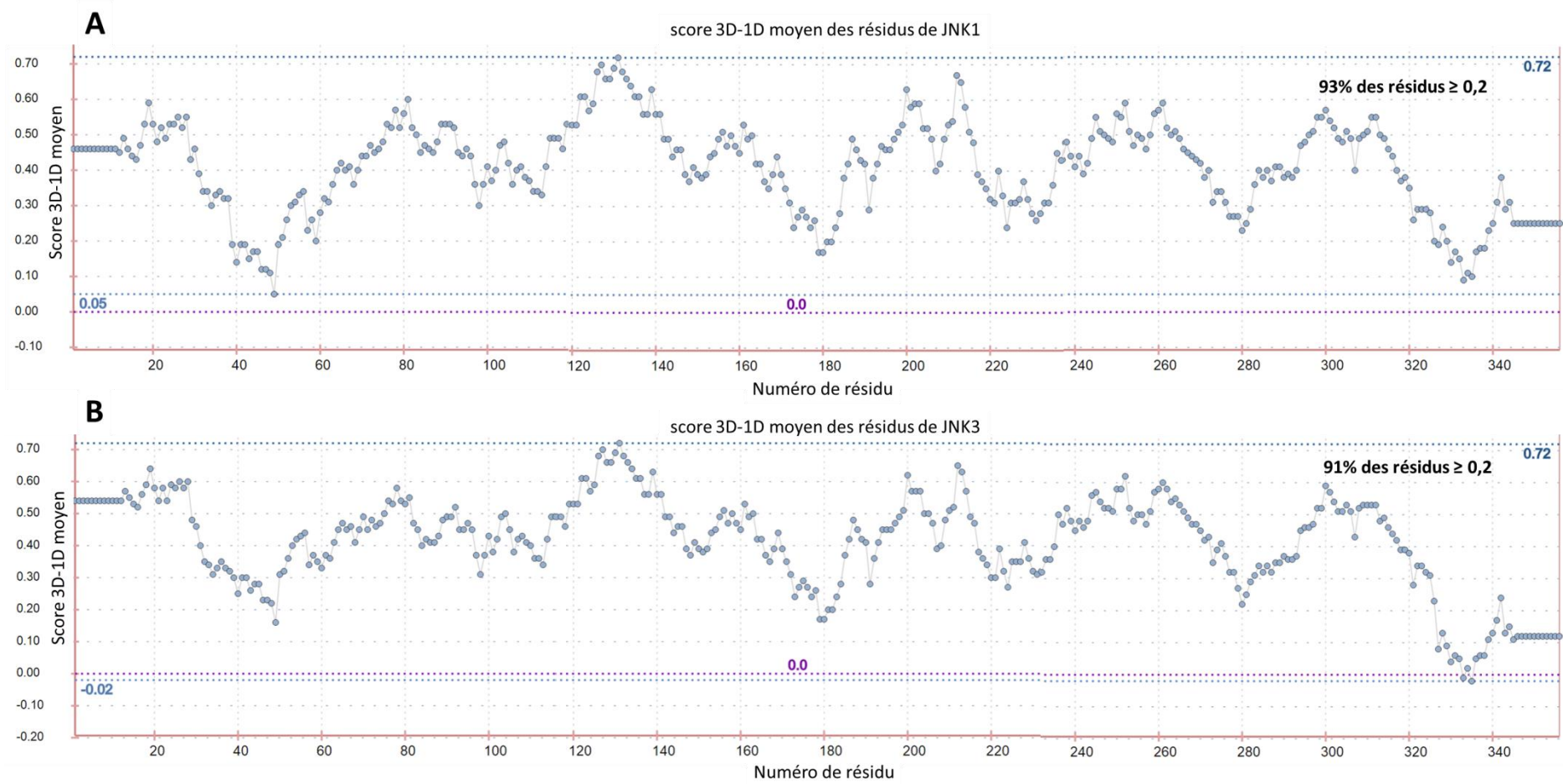


Figure 38 : A. Les scores 3D-1D obtenus par Verify-3D pour les résidus du modèle de JNK1, B. Les scores 3D-1D obtenus par Verify-3D pour les résidus du modèle de JNK3

II. Docking

Pour procéder au docking, dans notre projet, les fichiers des structures 3D des kinases et des molécules à docker (les ligands) ont été préparés avec le logiciel Autodock Vina¹⁵⁰, en utilisant l'outil Autodock (v1.5.6)¹⁵¹. Les paramètres suivants ont été ajustés dans cette étape de préparation:

- les charges Gastieger et atomes d'hydrogènes polaires ont été ajoutés
- le centre de la Gride-box a été placé au point ($x = 20$, $y = 9$, $z = 30$) pour les structures de conformation DFG-in, et au point ($x = 18$, $y = 14$, $z = 31$) après alignement des toutes les structures 3D utilisées à la structure 3NPC (chaîne A).
- les dimensions de la « Gride-box » ont été fixées à 20 Å (X), 20 Å (Y) et 16Å (z) pour les structures de conformation DFG-in, et à 18 Å (X), 32 Å (Y) et 14 Å (z) pour les structures de conformation DFG-out.
- La Gride-box est un cube virtuel qui va délimiter les acides aminés de la structure 3D de la kinase pour lesquelles les interactions avec les atomes du ligand seront calculées. Les deux derniers paramètres ont été donc fixés de façon à avoir le centre de ce cube au milieu du site actif, et que son volume recouvre tout l'espace de celui-ci ainsi qu'une bonne partie des surfaces extérieures des ouvertures de ce site exposées au solvant.

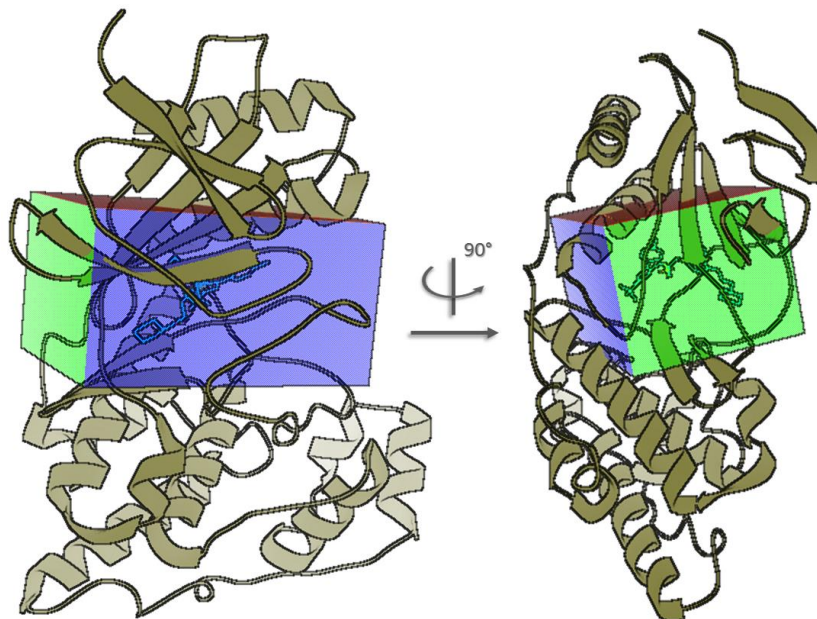


Figure 39 : position et dimensions de la Gride-Box (cube en rouge, vert et bleu) choisie par rapport à la structure de JNK2 chaîne A de code PDB : 3NPC

Pour l'étape de docking, nous avons utilisé les paramètres suivants d'Autodock Vina :

- Toutes les liaisons simples des ligands ont été autorisées à tourner librement, à l'exception des liaisons multiples et les liens dans des entités aromatiques.
- Les structures 3D des kinases ont été considérées comme rigides
- Dans la recherche des conformations possibles du ligand, le programme AutoDock Vina utilise l'algorithme génétique de Lamarck¹⁵² dont les paramètres ont été choisis par défaut.
- La différence d'énergie maximale entre les modes de liaison des poses admises a été fixée à 3 kcal / mol.
- La fonction de d'évaluation des poses (« scoring ») est une méthode d'optimisation globale stochastique inspirée principalement par X-score.
- 100 poses différentes sont évaluées par le programme pour chaque ligand amarré dans une kinase ; ce sont uniquement les 20 premières poses ayant obtenu les meilleurs scores qui sont maintenues pour l'inspection visuelle qui a été effectuée avec le programme PyMOL (The PyMol Molecular Graphics System, Version 0.99rc6 ; Schrodinger ; Delano Scientific LLC: San Carlos, CA, USA, 2002.).

Chapitre II

EVALUATION BIOLOGIQUE MATERIEL ET METHODE

I. Tests d'inhibition

Les tests d'inhibition ont été effectués par est le prestataire Invitrogen Life Technologies, qui utilise une technique appelée Z'LYTE® pour détecter et quantifier l'inhibition de kinases purifiées par nos molécules. Dans un premier temps ils effectuent des tests d'inhibition à une concentration de 10 μ M, si le pourcentage d'inhibition obtenu est assez élevé, la valeur d'IC₅₀ est demandée, elle représente la concentration de la molécule qui inhibe 50% de l'activité de la kinase (ou 50% de l'effet max) (**Figure 40**).

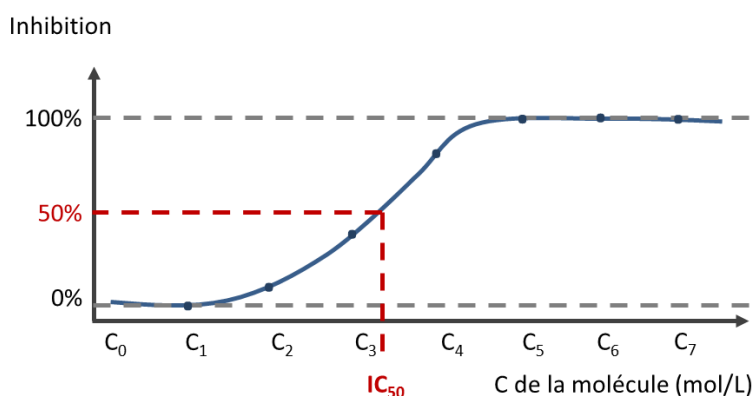


Figure 40 : Exemple de courbe des pourcentages inhibitions d'une kinase en fonction de la concentration de la molécule testée.

Le suivi de ces tests d'inhibition est basé sur la technologie de transfert d'énergie par résonance de Fröster, FRET. C'est un processus non radiatif par lequel l'énergie d'un fluorophore donneur à l'état excité est transmise à un fluorophore accepteur à proximité immédiate (distance < 10 nm), à condition que le spectre d'émission du fluorophore donneur et celui d'absorption de l'accepteur se chevauchent.

Le test effectué par la société consiste à incuber la kinase cible avec le peptide de son substrat où la phosphorylation a lieu, ce dernier est greffé par deux fluorophores. Il s'agit d'un fluorophore donneur, la coumarine, et d'un fluorophore accepteur, la fluorescéine. Les deux sont greffés à une distance qui permet le transfert d'énergie par FRET. Un agent développé par cette société va cliver uniquement les peptides non phosphorylés, la fluorescéine de ces derniers n'émet plus de fluorescence malgré l'excitation de la coumarine, car cette dernière ne lui est plus accessible. L'émission est ensuite quantifiée par un ratio entre l'émission de coumarine ($\lambda = 445\text{nm}$) et l'émission de fluorescéine (520nm) (**Figure 41**).

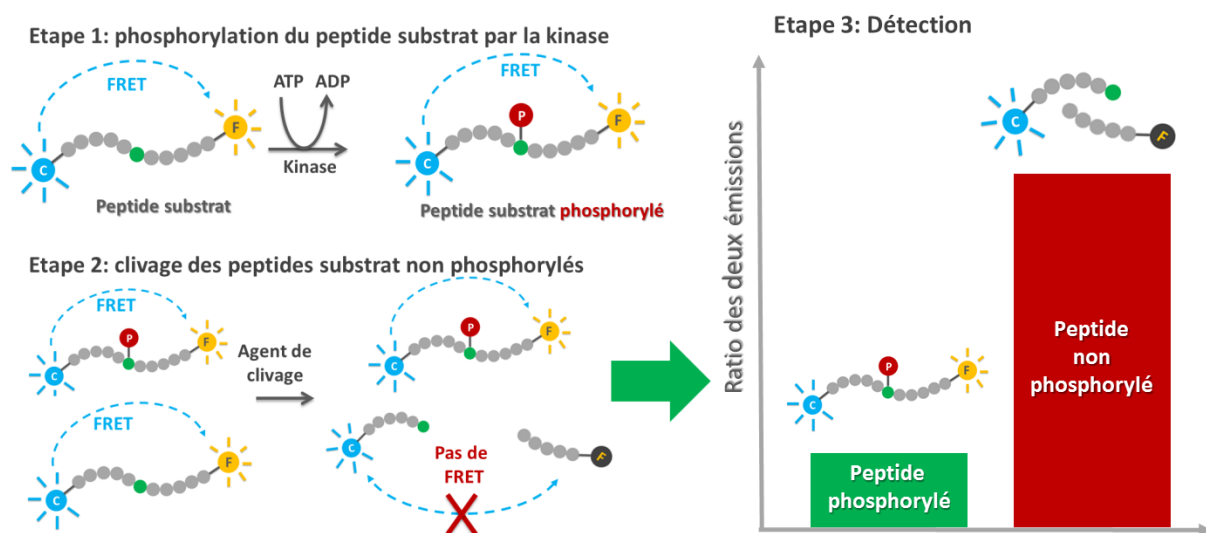


Figure 41 : Etapes de la technique Z'-LYTE®.

Plus une molécule est affine au site actif de la kinase, moins celle-ci pourra phosphoryler de peptides de substrat greffés, ce qui résulte par le clivage d'un plus grand nombre de ces derniers par l'agent clivant, induisant ainsi une diminution de l'émission de la fluorescéine dans le milieu après excitation de la coumarine, le résultat du ratio sera aussi élevé que cette molécule inhibera la kinase.

II. Tests de mesure de la viabilité et de la prolifération cellulaire : test colorimétrique MTT

Le test colorimétrique MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-bromure de diphenyltétrazolium)) est un test *in vitro* d'évaluation de la prolifération et de la viabilité cellulaire basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT. Il consiste à incuber dans une plaque de 96 puits des lignées cellulaires cancéreuses avec plusieurs concentrations du composé à tester. Après 72h d'incubation le MTT de couleur jaune est ajouté. Le MTT est réduit uniquement par les mitochondries des cellules vivantes en un métabolite de couleur violette, le Formazan (**Schéma 9**), cela rend l'intensité de la coloration violette dans les puits directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. A la fin de l'incubation, les cellules et les cristaux de formazan sont dissous grâce à l'ajout d'une solution contenant du SDS (sodium dodecyl sulfate) et de l'acide chlorhydrique. La mesure de l'intensité colorimétrique (absorbance) par un lecteur de plaques permet par la suite de calculer l'EC50 du composé, cette valeur correspond à la concentration du composé pour laquelle 50% des cellules cancéreuses ont été affectées.

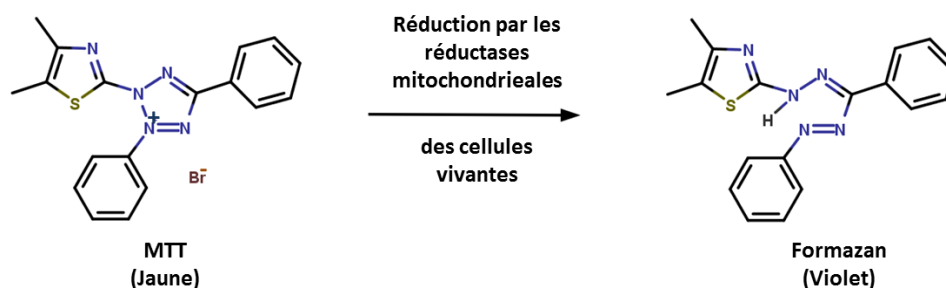


Schéma 9 : Réduction du MTT en Formazan par les réductases mitochondriales des cellules vivantes.

Par rapport au test d'inhibition biochimique, ce test nous permet d'apprécier trois caractéristiques supplémentaires du composé :

- le premier est la pénétrabilité (perméabilité) du composé à travers les membranes cellulaires. Les composés testés sont de petites molécules chimiques inhibitrices de kinases et doivent avoir la capacité de traverser les membranes afin d'aller inhiber des cibles kinases intracellulaires et agir sur la mort cellulaire.
- la deuxième caractéristique est la stabilité du composé dans le milieu de culture cellulaire. L'incubation du composé dans le milieu dure 72h, ce qui signifie que pour

provoquer la mort des cellules, le composé doit rester stable assez longtemps dans le milieu de culture jusqu'à ce qu'il interagisse avec sa cible.

- la troisième caractéristique est finalement l'effet pharmacologique du composé sur les cellules cancéreuses en évaluant son activité sur la viabilité ou sur la prolifération cellulaire.

III. Human phospho-MAPK array:

Les cellules en suspension sont incubées en présence de 10 μM de composé à tester ou 100% DMSO (contrôle) pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite stimulées à l'aide de 100 μM de pervanadate pendant 20 minutes. Le pervanadate est un inhibiteur de phosphatases bloquant la déphosphorylation des protéines et permettant de conserver un taux élevé des protéines ayant été phosphorylées dans les cellules. A la fin des temps d'incubation, les cellules sont lysées et les protéines totales dosées. 500 μg de protéines sont incubés pendant 1h sur la membrane en nitrocellulose contenant des paires de spots définis (schéma en haut de la **Figure 42.A**) pour chaque protéine à analyser. Chaque spot contient un anticorps spécifique qui va capturer la protéine à analyser. Dans ce test, la membrane contient 26 paires de spot concernant 24 protéines de la voie de signalisation MAPK (**Figure 42.B**), ainsi que 4 paires de spots témoins (3 paires de témoin positif et 1 pair de témoin négatif, qui servent de contrôles), soit 60 spots au total (**Figure 42.A**). Après lavage de la membrane pour éliminer tout le matériel non lié, un cocktail d'anticorps constitué d'anticorps dirigés contre les acides aminés phosphorylés (tyrosine, serine, thréonine) est utilisé pour détecter les protéines phosphorylées en fonction du signal émis par chimiluminescence. Les résultats obtenus avec les membranes ayant été incubées avec des cellules traitées avec le composé à évaluer (**Figure 42.A, membrane II, III et IV**), sont comparés aux résultats obtenus avec des cellules traitées avec le solvant DMSO (**Figure 42.A, membrane I**).

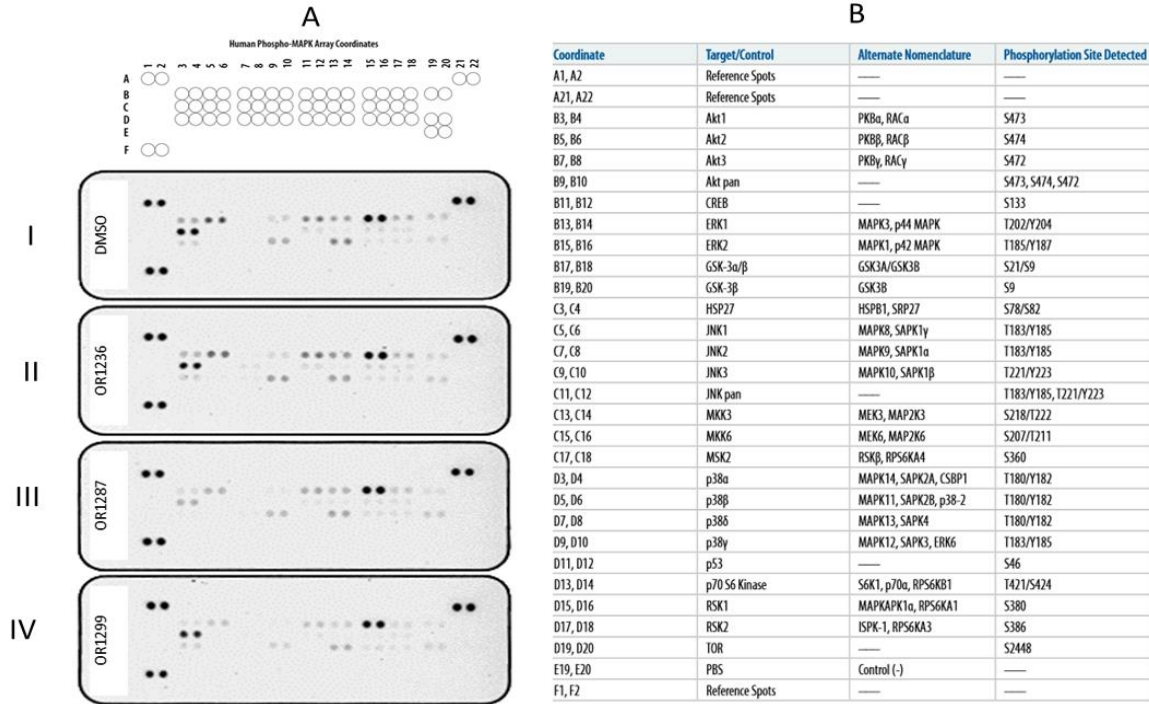


Figure 42: A. image des 4 membranes du test relatives aux trois composés testés et au témoin DMSO. B. liste des protéines de la famille des MAPK, de leur place sur la membrane nitrocellulose et des résidus phosphorylés analysés dans ce test.

Les cascades de signalisation impliquant les 24 protéines de la voie des MAPK sont représentées dans la figure suivante :

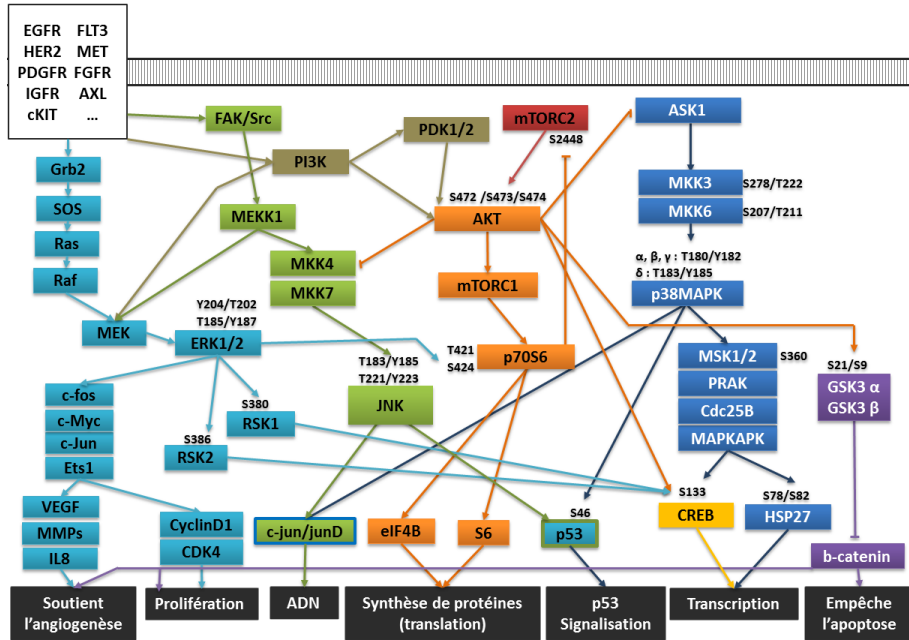


Figure 43 : les cascades de signalisation impliquant les 26 MAPK du test.

Chapitre III

SYNTHESE ORGANIQUE

I. Conditions générales et appareillage

1. Source des composé utilisés et solvants

Les produits commerciaux et les solvants utilisés ont été achetés chez les sociétés suivantes : Apollo Scientific, FluoroChem, Sigma-Aldrich, Acros Organics, Matrix Scientific, TCI et Alfa Aesar.

2. Appareil à μ -onde

L'appareil à μ -onde utilisée est un CEM Discover piloté sous ordinateur, la puissance est limitée à 100W. L'agitation est fixée à sa puissance maximale. La température et le temps d'irradiation sont fixés selon la réaction. Toutes les réactions ont lieu dans un réacteur fermé.

3. Analyses physicochimiques

RMN : Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés par un appareil Brücker 300 et 400 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par millions (ppm). Les constantes de couplage, notées J, sont exprimées en Herz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire les couplages observés : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, q pour quadruplet, quint pour quintuplet, sept pour septuplet et m pour multiplet.

LCMS : Les analyses LCMS ont été réalisées sur un Agilent Technology 1260 Infinity HPLC avec une colonne C18 (Zorbax SB-C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 μm) à une température de 30°C. Les solvants d'élution sont : eau contenant 0.1% d'acide formique et acétonitrile contenant 0.1% d'acide formique. Le détecteur est un détecteur à barrettes de diodes dont la longueur d'onde va de 190

à 400 nm. Les puretés HPLC sont données à 254nm. Les spectres de masses sont obtenus grâce au Quadripôle Agilent Technologies 6100 en mode ESI positif et négatif.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice de type 60 F₂₅₄ (Merck).

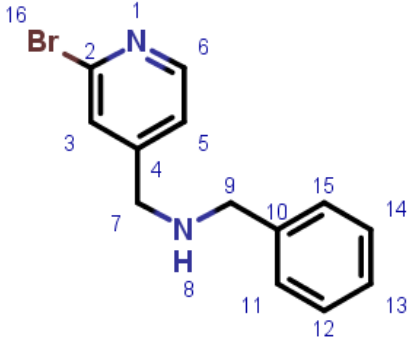
4. Purification

Les purifications ont été effectuées à l'aide d'un Puriflash 215 du constructeur Interchim. Les purifications sur phase normale ont été réalisées sur des colonnes de silice irrégulière (40-63 µm) préparées manuellement, alors que pour les phases inverses, des colonnes KP-C18-HS de Biotage ont été utilisées.

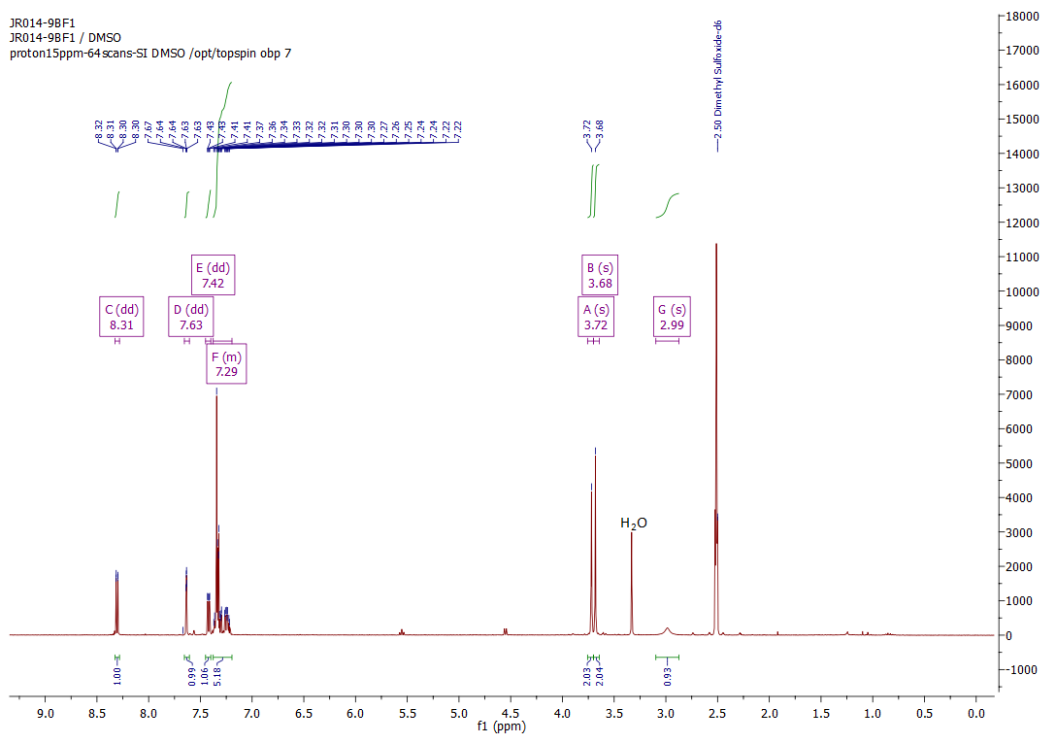
II. Partie expérimentale des molécules de l'approche I

1. Procédure générale d'amination réductrice

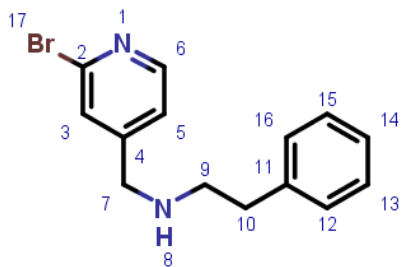
Mode opératoire : Dans un ballon, le dérivé aldéhyde (1 eq) et le dérivé amine (1,2 eq) sont dissous dans un mélange méthanol/acide acétique (9/1) [0,15 mol/L]. La solution est agitée 2 heures à TA puis le cyanoborohydrure de sodium (2 eq) est ajouté. Le milieu est ensuite agité à TA pour la nuit. Le solvant est évaporé, le résidu est repris avec de l'acétate d'éthyle, lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée sur coton et évaporée à sec, puis isolé par purification ou précipitation.

JR014	
	LC: 94% (double pic) à 254 nm
	MS: [M+H] ⁺ = 277/279 Da
	¹H RMN (300 MHz, DMSO) δ:
	8.31 (dd, J = 5.0, 0.5 Hz, 1H, H₆),
	7.63 (dd, J = 1.3, 0.7 Hz, 1H, H₃),
	7.42 (dd, J = 5.0, 1.3 Hz, 1H, H₅),
7.38 – 7.19 (m, 5H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅),	
3.72 (s, 2H, H₇),	
3.68 (s, 2H, H₉),	
2.99 (s, 1H, H₈).	
Purification : phase normale (EP/AcOEt)	
Rendement : 79%	

JR014-98F1
 JR014-98F1 / DMSO
 proton15ppm-64scans-SI DMSO /opt/topspin obp 7



JR021



LC: 88% à 254 nm

MS: $[M+H]^+ = 291/293$ Da

Purification : phase normale (EP/ACOEt)

Rendement : 31%

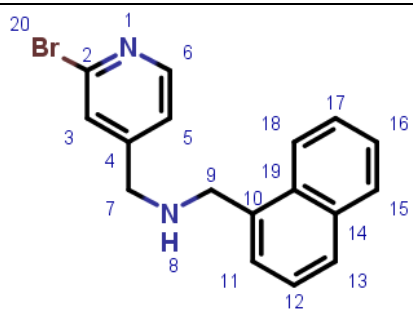
JR035

LC: 88% à 254 nm

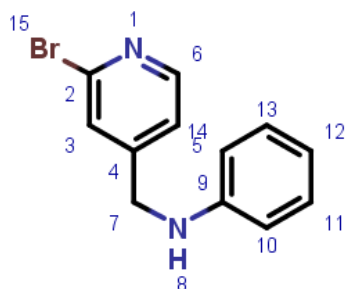
MS: $[M+H]^+ = 327/329$ Da

Purification : phase inverse (H₂O /ACN)

Rendement : 67%



JR027



LC: % à 254 nm

MS: $[M+H]^+ = 263/265$ Da

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ :

8.28 (dd, $J = 5.1, 0.6$ Hz, 1H, H_6),

7.56 (dd, $J = 1.4, 0.7$ Hz, 1H, H_3),

7.38 (dd, $J = 5.1, 1.4$ Hz, 1H, H_5),

7.11 – 6.98 (m, 2H, $\text{H}_{11}, \text{H}_{13}$),

6.58 – 6.48 (m, 3H, $\text{H}_{10}, \text{H}_{12}, \text{H}_{14}$),

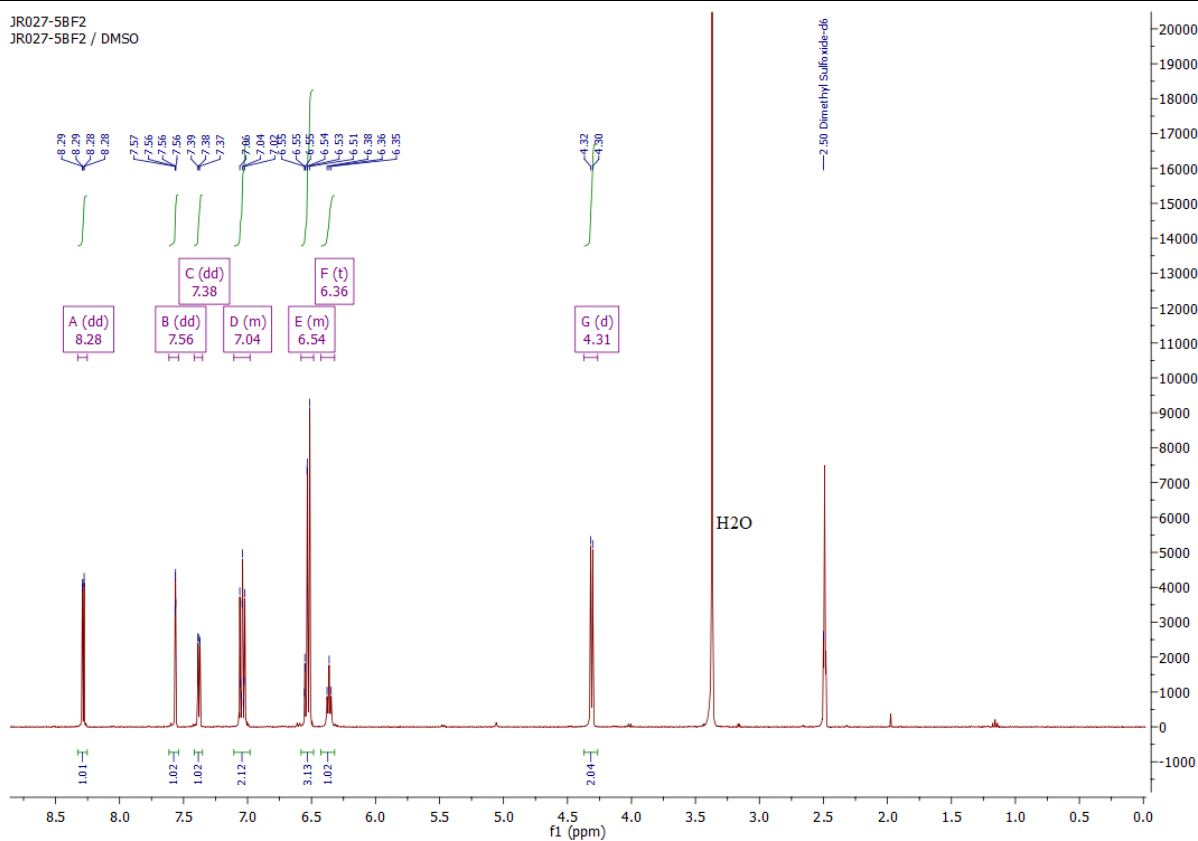
6.36 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H_8),

4.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, H_7).

Purification : phase inverse ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$)

Rendement : 66%

JR027-5BF2
JR027-5BF2 / DMSO

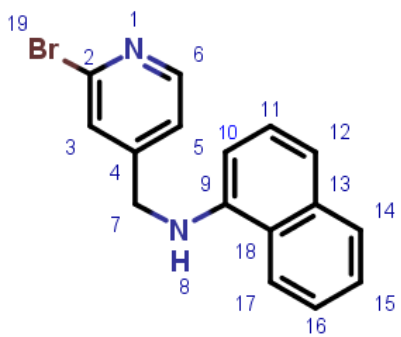


JR044

LC: 97% à 254 nm

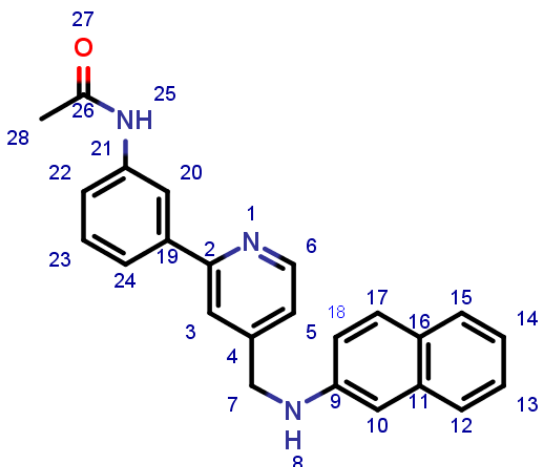
MS: $[M+H]^+ = 313/315$ Da

Purification : phase inverse ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$)



Rendement : 60%

JR070



LC: 96% à 254 nm

MS: $[M+H]^+ = 367$ Da

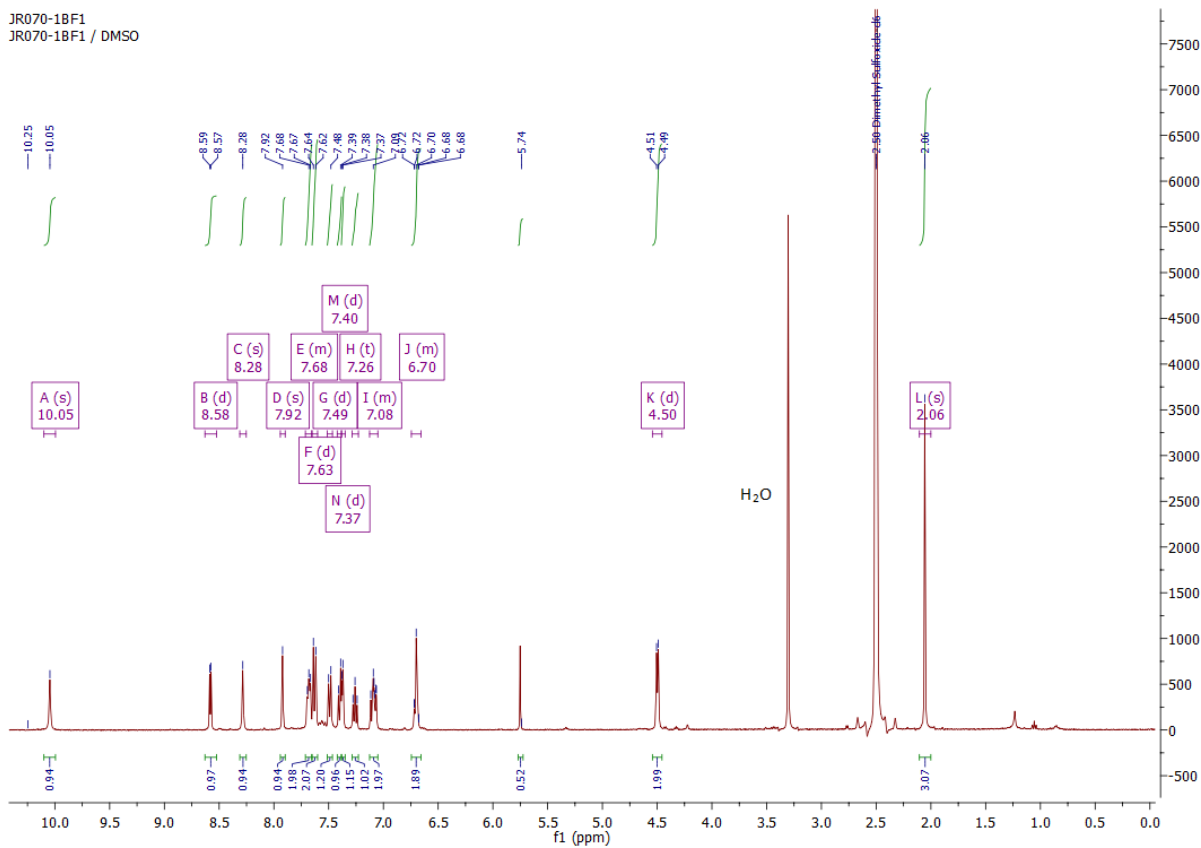
$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ :

10.05 (s, 1H, **H₈**),
 8.58 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, **H₂₀**),
 8.28 (s, 1H, **H₆**),
 7.92 (s, 1H, **H₃**),
 7.71 – 7.65 (m, 2H, **H₂₂**, **H₂₃**),
 7.62 (d, 1H, , **H₂₄**),
 7.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, **H₁₀**),
 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, **H₁₇**),
 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, **H₁₅**),
 7.37 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, , **H₁₂**),
 7.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, **H₁₃**),
 7.13 – 7.05 (m, 2H, **H₁₄**),
 6.74 – 6.66 (m, 2H, **H₅**),
 4.50 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, **H₇**),
 2.06 (s, 3H, **H₂₈**).

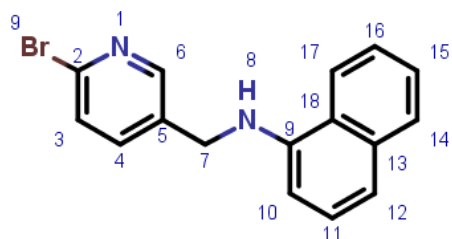
Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 38 %

JR070-18F1
 JR070-18F1 / DMSO



JR060



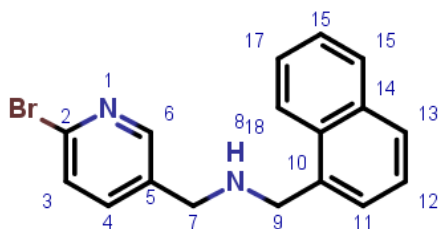
LC: 90 % à 254 nm

MS: $[M+H]^+ = 313/315$ Da

Précipitation : phase normale (EP/AcOEt, 9/1)

Rendement : 60 %

JR061



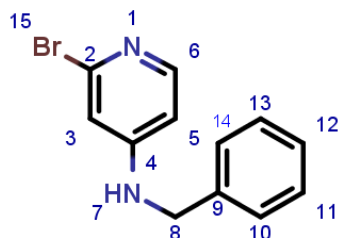
LC: 97% à 254 nm

MS: $[M+H]^+ = 327/329$ Da

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 80%

JR024



LC: 97% à 254 nm

MS: $[M+H]^+$ = 263/265 Da

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO) δ :

7.76 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, **H₆**),

7.50 – 7.20 (m, 6H, **H₁₀**, **H₁₁**, **H₁₂**, **H₁₃**, **H₁₄**),

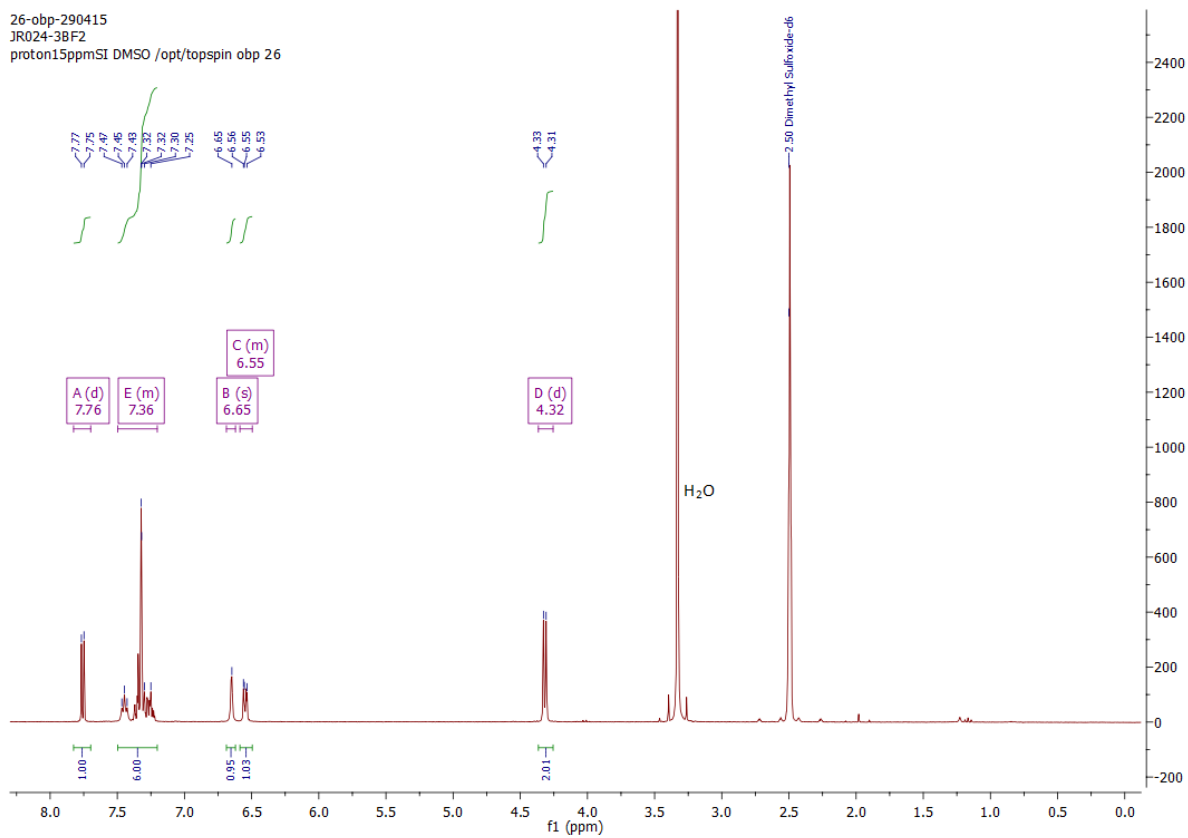
6.65 (s, 1H, **H₃**),

6.59 – 6.50 (m, 1H, **H₅**),

4.32 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, **H₈**).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 23%



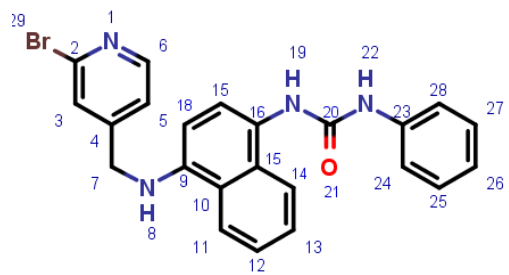
JR057

LC: 47% à 254 nm

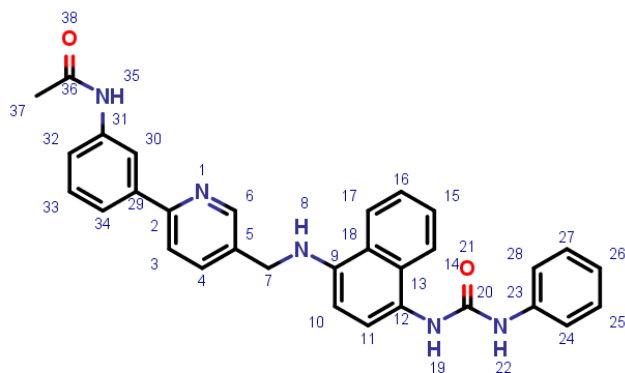
MS: $[M+H]^+$ = 447/449 Da

Précipitation : phase normale (EP/acétone)

Rendement : 58%



JR062



LC: 97% à 254 nm

MS: [M+H]⁺ = 501Da

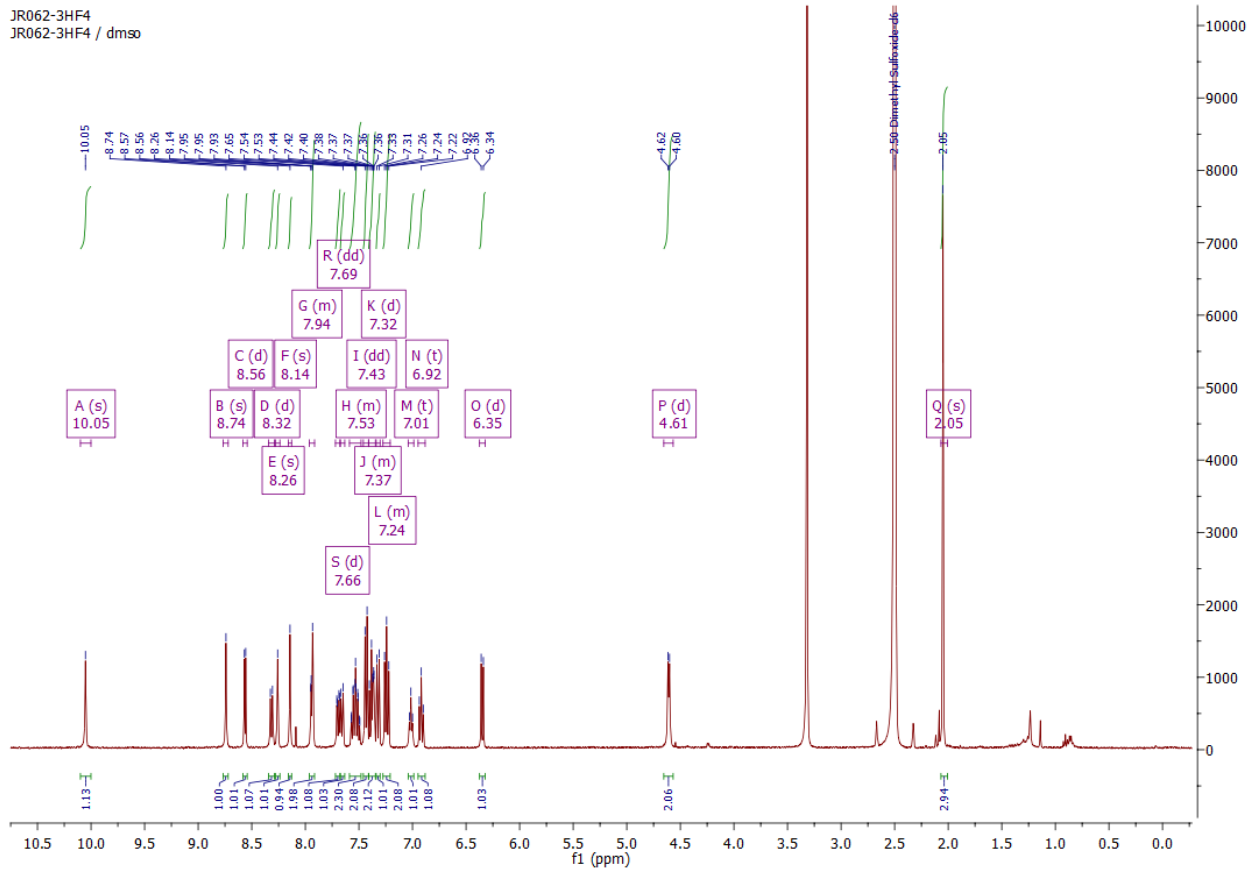
¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

10.05 (s, 1H, **H₈**),
 8.74 (s, 1H, **H₃₀**),
 8.56 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, **H₆**),
 8.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, **H₃**),
 8.26 (s, 1H, **H₃₄**),
 8.14 (s, 1H, **H₈**),
 7.96 – 7.91 (m, 2H, **H₁₄**, **H₁₇**),
 7.69 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, **H₃₃**),
 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H₃₂**),
 7.59 – 7.48 (m, 2H, **H₁₅**, **H₁₆**),
 7.43 (dd, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 2H, **H₂₄**, **H₂₈**),
 7.41 – 7.35 (m, 2H, **H₂₅**, **H₂₇**),
 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H₂₆**),
 7.28 – 7.21 (m, 2H, **H₁₁**),
 7.01 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, **H₃₅**),
 6.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, **H₁₀**),
 6.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, **H₄**),
 4.61 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, **H₇**),
 2.05 (s, 3H, **H₃₇**).

Purification : phase normale (DCM/acétone)

Rendement : 19%

JR062-3HF4
JR062-3HF4 / dms0

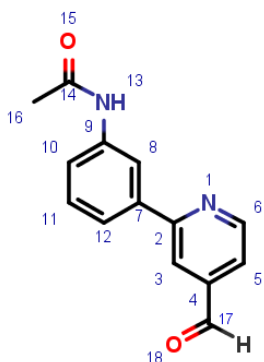


2. Couplage de Suzuki Miyaura

Mode opératoire : Dans un tube à micro-onde, le dérivé bromé (1 eq), l'acide boronique (1,2 eq) et le carbonate de potassium (3 eq) sont dissous dans une solution de dioxane/eau (3/1) ([dérivé bromé] = 0,15 mol/l). La solution est dégazée avec de l'argon durant 15 min avant d'ajouter le Pd(dppf)Cl₂ (0,1 eq) sous argon et d'exposer le tube au micro-ondes (70°C ; 20min ; 200W). La réaction est suivie par LCMS. Des ajouts d'acide boronique ou d'ester (de l'ordre de 0,5 eq) et de Pd(dppf)Cl₂ (de l'ordre de 0,025 eq) ont lieu jusqu'à ce que la réaction soit complète, accompagnée d'une augmentation de la température de réaction dans certain cas (de 70°C à 120°C).

Le milieu réactionnel est filtré sur célite puis séché sous vide, le résidu ainsi obtenu est alors dissout dans de l'acétate d'éthyle, lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtré sur coton et évaporé à sec.

JR063



Ajouts : 0 eq d'acide boronique ajouté

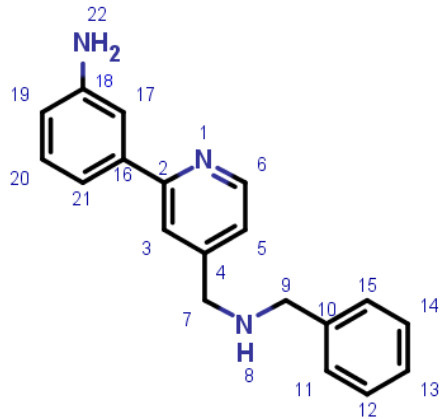
LC: % à 254 nm

MS: [M+H]⁺ = 241/259 (le +18) Da

Purification : Trituration, précipitation (DCM/ TBME)

Rendement : 39%

JR026



Ajouts : 0,5 eq d'acide boronique ajouté

LC: 91% à 254 nm

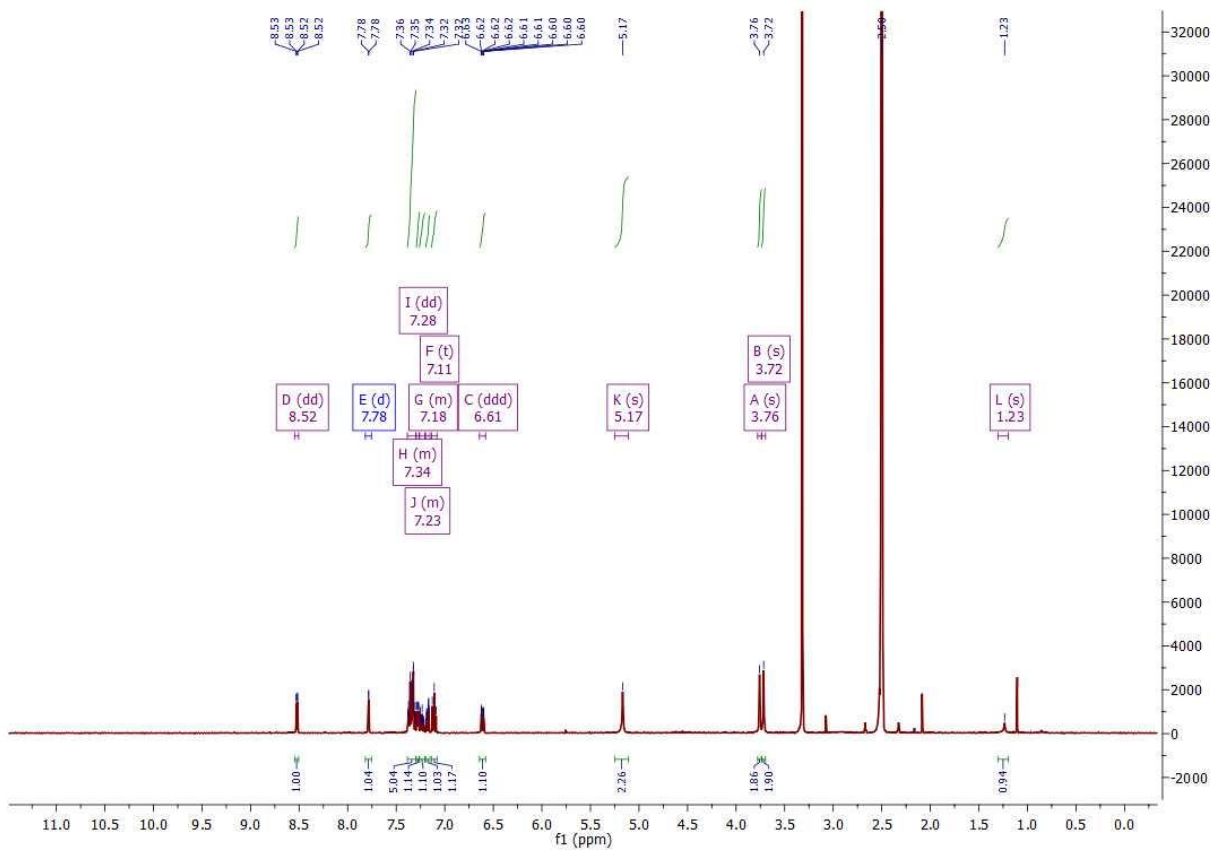
MS: [M+H]⁺ = 289,38 Da

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

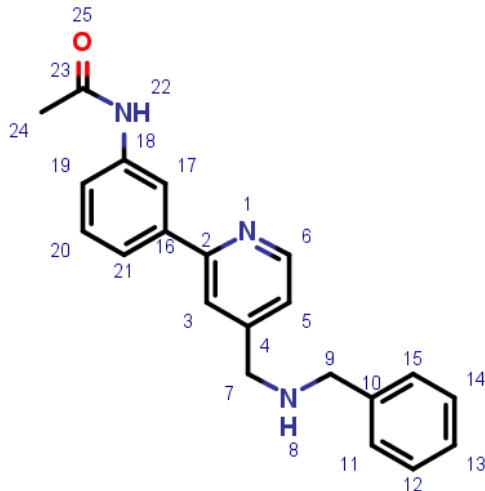
8.52 (dd, J = 5.0, 0.6 Hz, 1H, H₆),
 7.78 (d, J = 0.6 Hz, 1H, H₃),
 7.39 – 7.30 (m, 5H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅),
 7.28 (dd, J = 5.0, 1.4 Hz, 1H, H₂₁),
 7.26 – 7.21 (m, 1H, H₂₀),
 7.20 – 7.15 (m, 1H, H₁₇),
 7.11 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H₅),
 6.61 (ddd, J = 7.8, 2.3, 1.1 Hz, 1H, H₁₉),
 5.17 (s, H₂₂, 2H, H₂₂),
 3.76 (s, H₇, 2H, H₇),
 3.72 (s, H₉, 2H, H₉),
 1.23 (s, 1H, H₈).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 17%



JR032



Ajouts : 2x 0,3 eq d'acide boronique ajoutés

LC: 99% à 254 nm

MS: [M+H]⁺= 331,42 Da

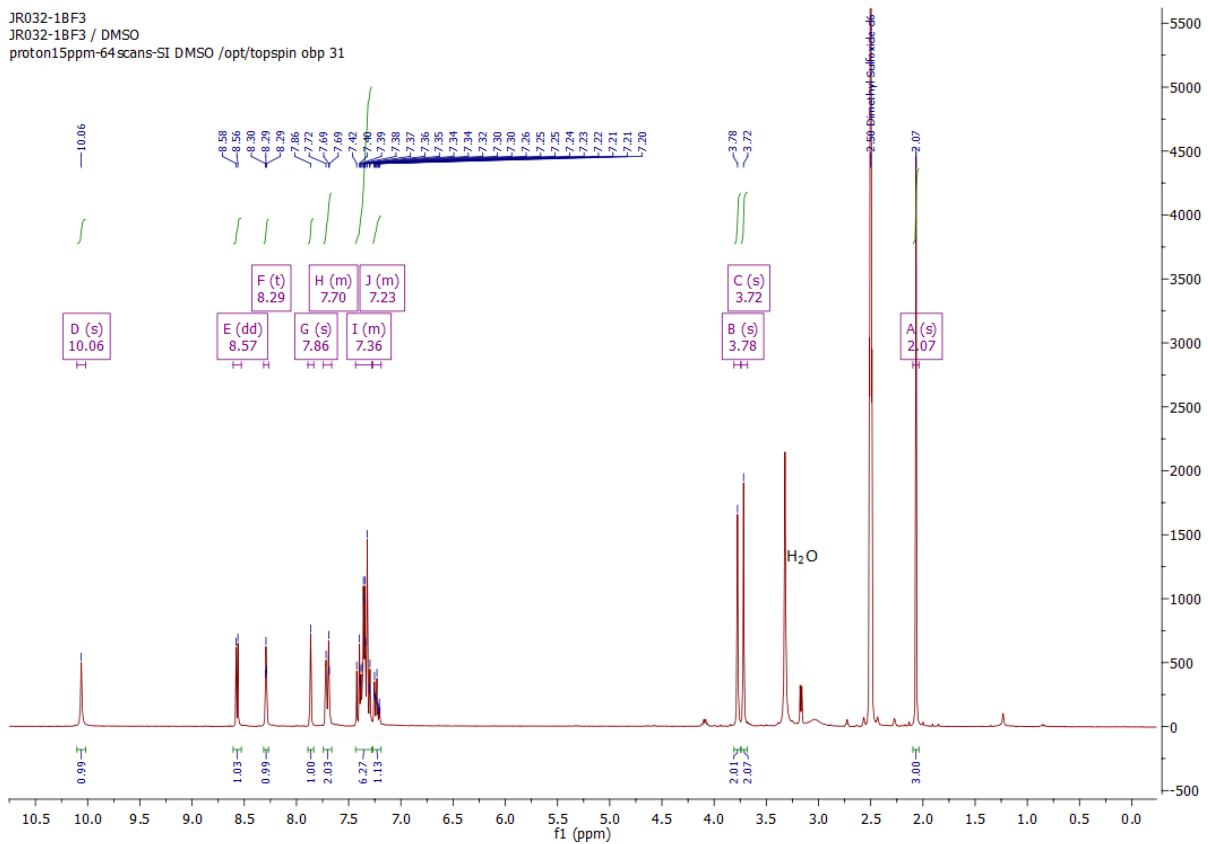
¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

10.06 (s, 1H, H₁₇),
 8.57 (dd, J = 5.0 Hz, 1H, H₆),
 8.29 (t, J = 1.7 Hz, 1H, H₃),
 7.86 (s, 1H, H₂₁),
 7.74 – 7.66 (m, 2H, H₁₉, H₂₀),
 7.43 – 7.28 (m, 6H, H₅, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅),
 7.27 – 7.19 (m, 1H, H₈),
 3.78 (s, H₇, 2H, H₇),
 3.72 (s, H₉, 2H, H₉),
 2.07 (s, H₂₄, 3H, H₂₄).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 39%

JR032-1BF3
 JR032-1BF3 / DMSO
 proton15ppm-64scans-SI DMSO /opt/topspin obp 31



JR028

Ajouts : 1 eq d'acide boronique ajouté

LC: 92% à 254 nm

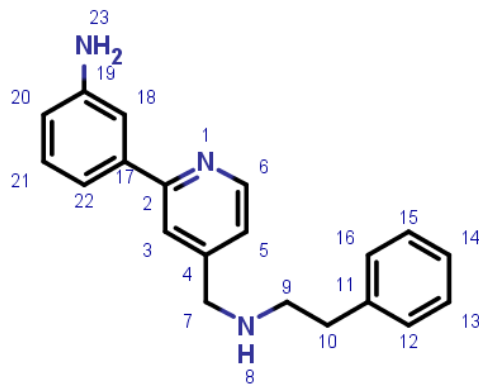
MS: $[M+H]^+ = 303,41$ Da

1H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

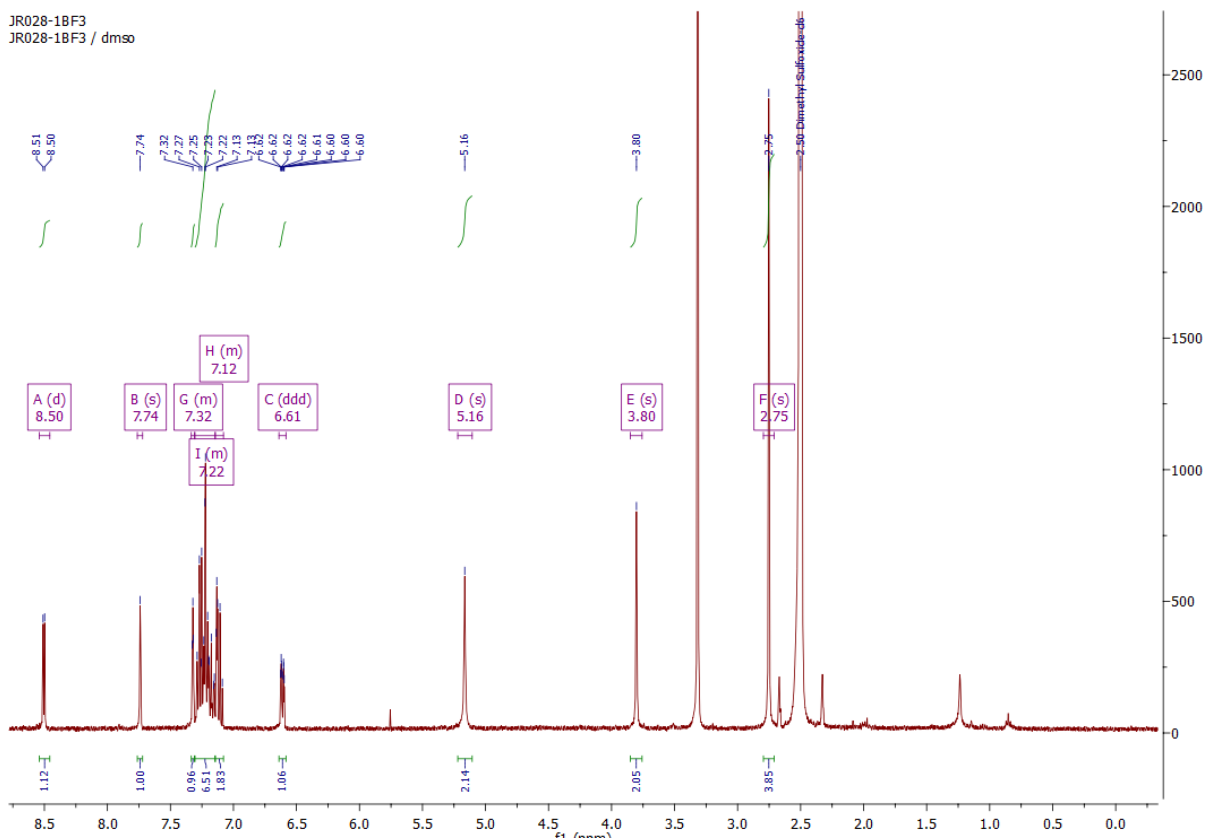
8.50 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, **H₆**),
 7.74 (s, 1H, **H₃**),
 7.33 – 7.31 (m, 1H, **H₂₂**),
 7.31 – 7.15 (m, 7H, **H₂₁**, **H₁₈**, **H₁₅**, **H₁₃**,
H₁₄, **H₁₆**, **H₁₀**),
 7.14 – 7.08 (m, 2H, **H₂₃**),
 6.61 (ddd, $J = 7.3, 2.2, 1.6$ Hz, 1H, **H₂₀**),
 5.16 (s, 2H, **H₃**),
 3.80 (s, 2H, **H₃**),
 2.75 (s, 4H, **H₇**, **H₉**).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

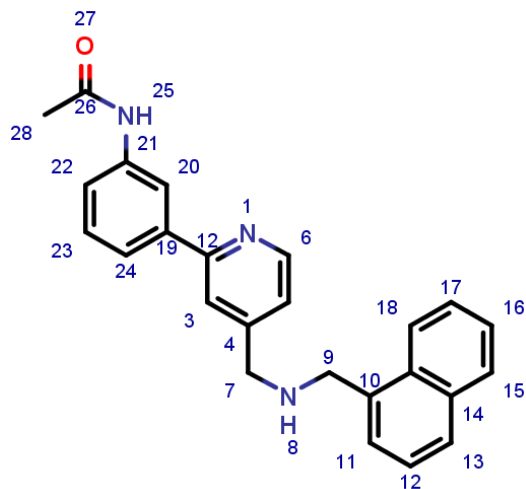
Rendement : 38%



JR028-1BF3
 JR028-1BF3 / dms0



JR036



Ajouts : 0,5 eq d'acide boronique et 0,01 eq de Pd(dppf)Cl₂ ajoutés

LC: 93% à 254 nm

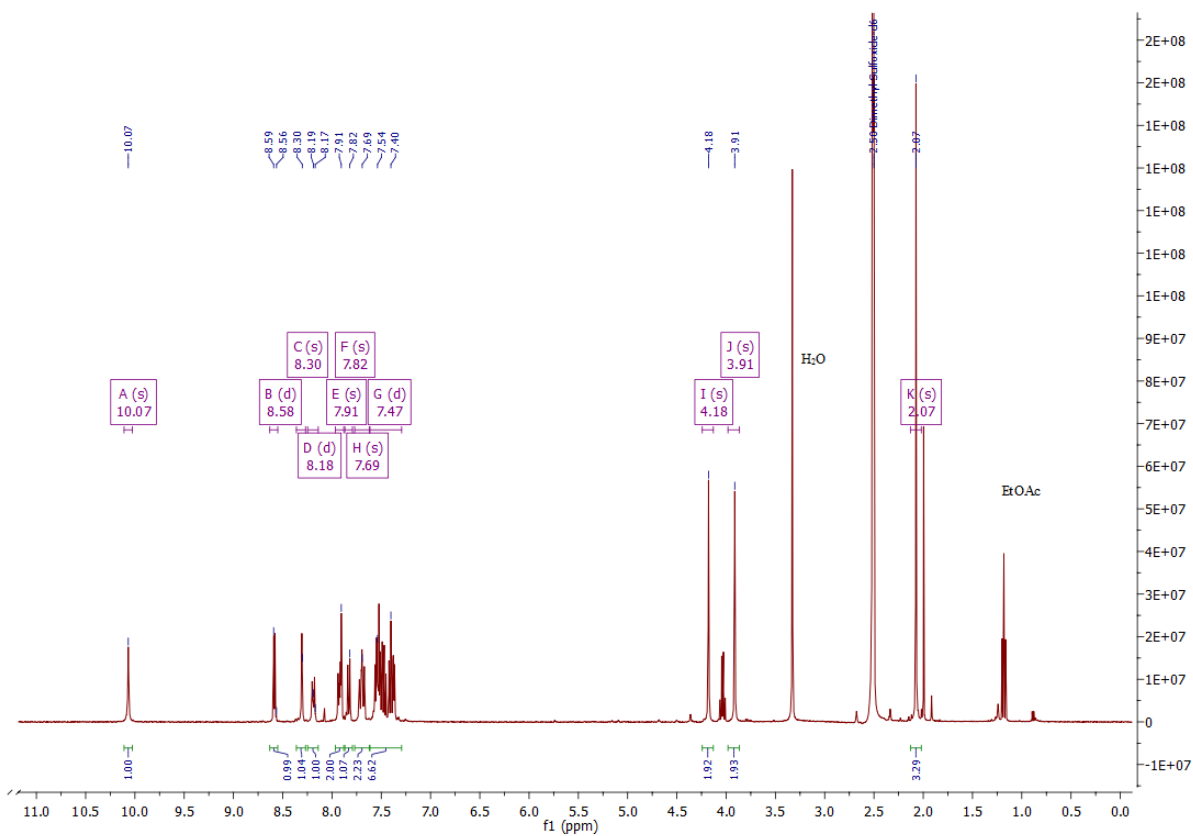
MS: [M+H]⁺ = 381Da

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

10.07 (s, 1H, **H₈**),
 8.58 (d, J = 11.7 Hz, 1H, **H₂₀**),
 8.30 (s, 1H, **H₆**),
 8.18 (d, J = 7.0 Hz, 1H, **H₁₈**),
 7.91 (s, 2H, **H₃**, **H₂₄**),
 7.82 (s, 1H, **H₁₅**),
 7.69 (s, 2H, **H₅**, **H₁₁**),
 7.47 (d, J = 54.4 Hz, 6H, **H₁₂**, **H₁₆**, **H₁₇**, **H₂₂**, **H₂₃**),
 4.18 (s, 2H, **H₉**),
 3.91 (s, 2H, **H₇**),
 2.07 (s, 3H, **H₂₈**).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 60%



JR048

Ajouts : 0,05 eq d'acide boronique ajouté

LC: % à 254 nm

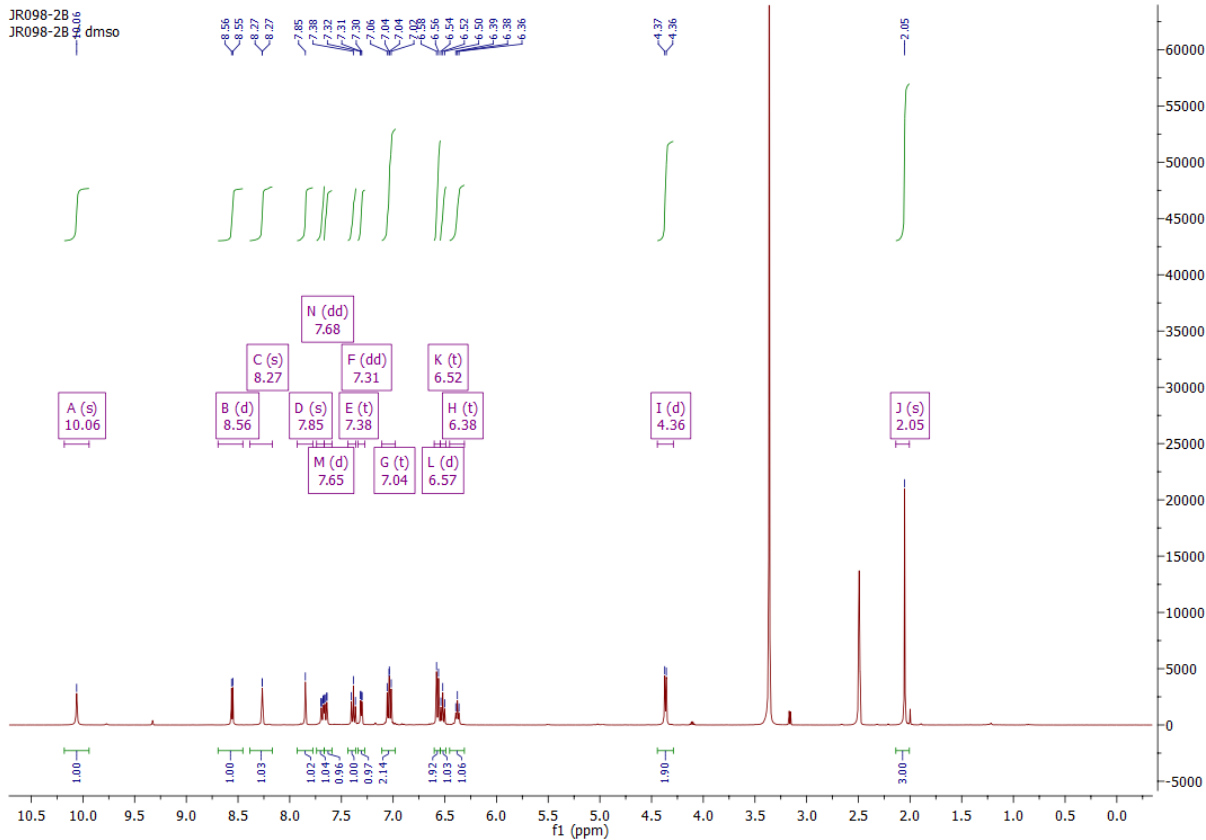
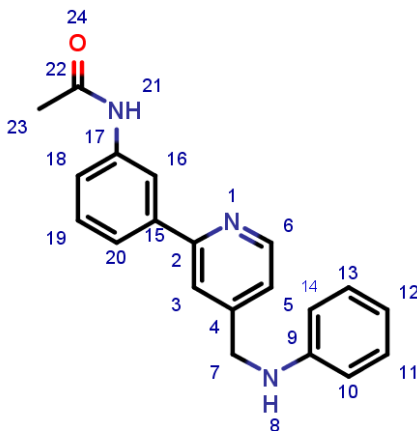
MS: [M+H]⁺= Da

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

- 10.06 (s, 1H, **H₈**),
- 8.56 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, **H₁₆**),
- 8.27 (s, 1H, **H₆**),
- 7.85 (s, 1H, **H₃**),
- 7.68 (dd, 1H, **H₂₀**),
- 7.65 (d, 1H, **H₁₈**),
- 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H₁₉**),
- 7.31 (dd, *J* = 4.9, 0.8 Hz, 1H, **H₂₁**),
- 7.04 (t, *J* = 8.4, 7.4 Hz, 2H, **H₁₁**, **H₁₃**),
- 6.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, **H₁₀**, **H₁₄**),
- 6.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, **H₅**),
- 6.38 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, **H₁₂**),
- 4.36 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, **H₇**),
- 2.05 (s, 3H, **H₂₃**).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 90%



JR054

Ajouts : 0 eq d'acide boronique ajouté

LC: 97% à 254 nm

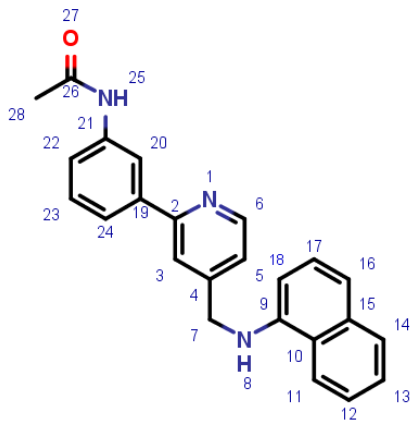
MS: [M+H]⁺= 367,39 Da

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

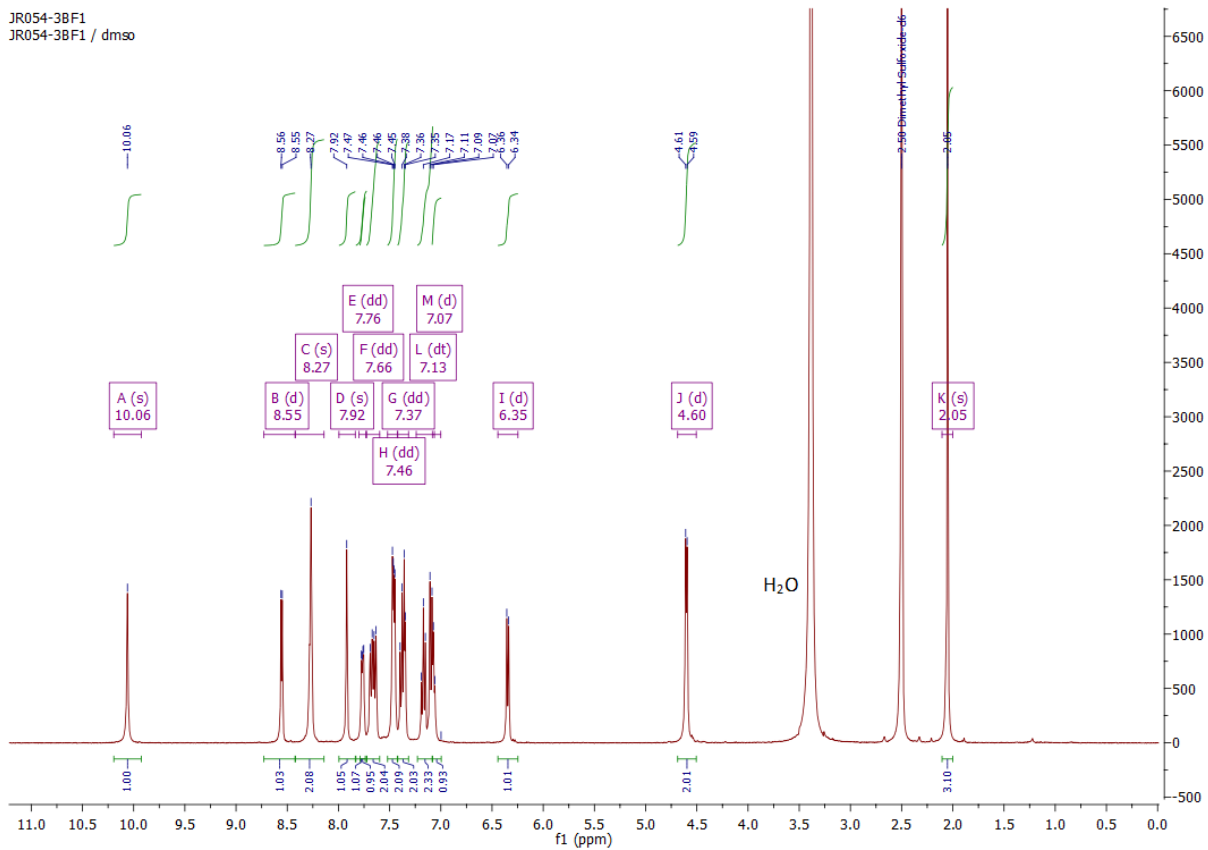
10.06 (s, 1H, **H₈**),
 8.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, **H₂₀**),
 8.27 (s, 2H, **H₂₃**, **H₂₂**),
 7.92 (s, 1H, **H₆**),
 7.76 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 1H, **H₂₅**),
 7.66 (dd, *J* = 15.3, 7.9 Hz, 2H, **H₃**, **H₂₄**),
 7.46 (dd, *J* = 6.3, 3.2 Hz, 2H, **H₁₁**, **H₁₄**),
 7.37 (dd, *J* = 14.2, 6.3 Hz, 2H, **H₁₂**, **H**),
 7.13 (dt, *J* = 31.5, 6.7 Hz, 3H, **H₁₆**, **H₁₂**, **H₁₃**),
 7.07 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, **H₅**),
 6.35 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, **H₁₈**),
 4.60 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, **H₇**),
 2.05 (s, 3H).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

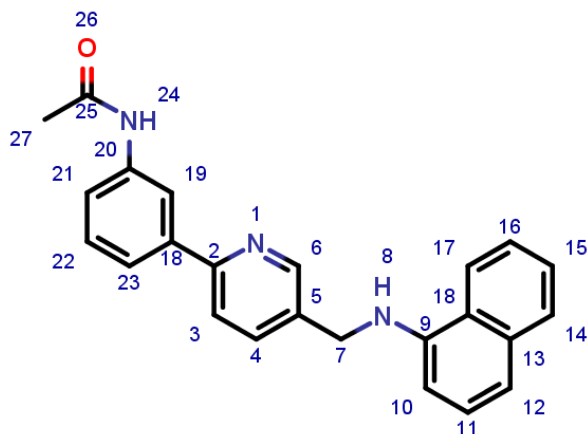
Rendement : 51%



JR054-3BF1
 JR054-3BF1 / dmsO



JR064



Ajouts : 0 eq d'acide boronique ajouté

LC: 97% à 254 nm

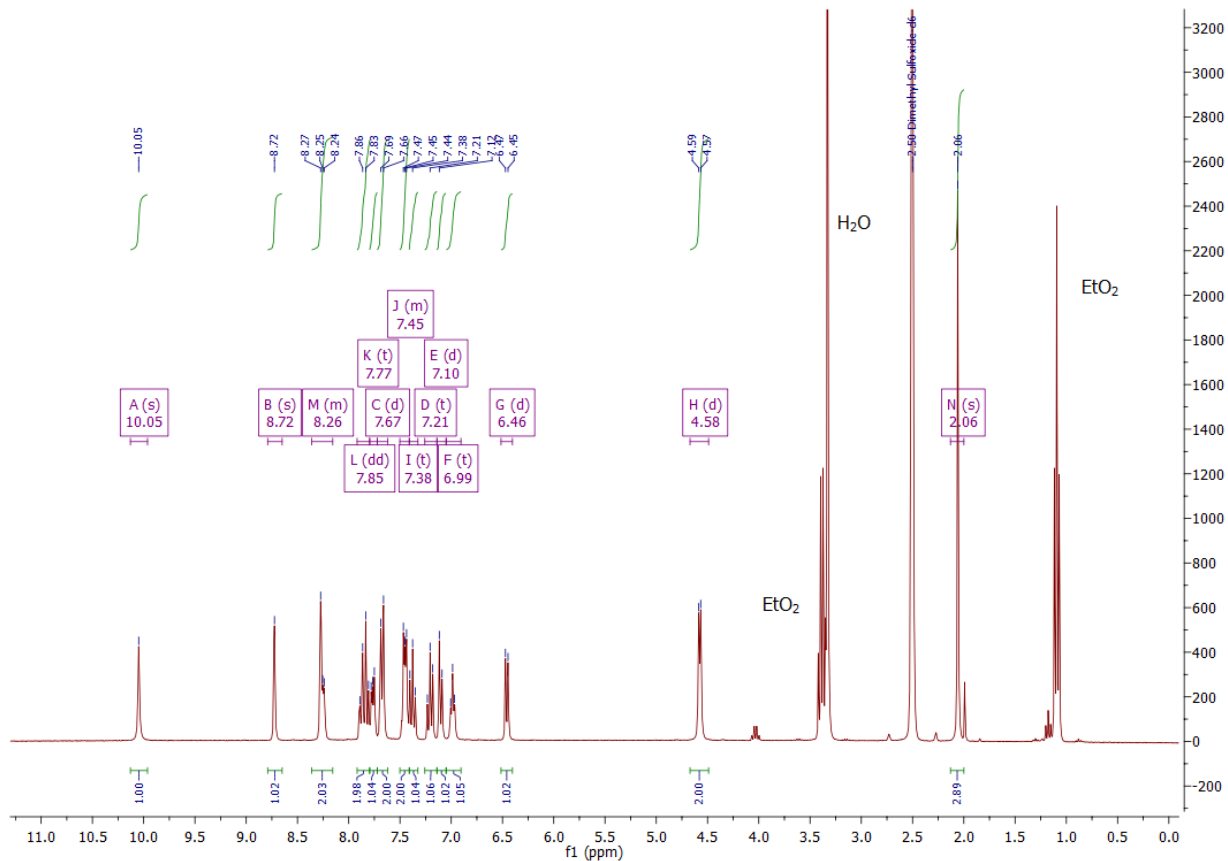
MS: $[M+H]^+ = 367,39$ Da

1H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

10.05 (s, 1H, **H₈**),
 8.72 (s, 1H, **H₁₉**),
 8.36 – 8.16 (m, 2H, **H₃**, **H₂₃**),
 7.85 (dd, $J = 17.0, 8.2$ Hz, 2H, **H₁₄**, **H₁₇**),
 7.77 (t, 1H, **H₄**),
 7.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, **H₂₁**, **H₂₂**),
 7.50 – 7.41 (m, 2H, **H₁₅**, **H₁₆**),
 7.38 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, **H₁₂**),
 7.21 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, **H₁₁**),
 7.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, **H₂₄**),
 6.99 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, **H₁₀**),
 6.46 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, **H₆**),
 4.58 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, **H₇**),
 2.06 (s, 3H **H₂₇**).

Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 30%



JR076

Ajouts : 0,1 eq d'acide boronique et 0,01 eq de Pd(dppf)Cl₂ ajoutés

LC: 95% à 254 nm

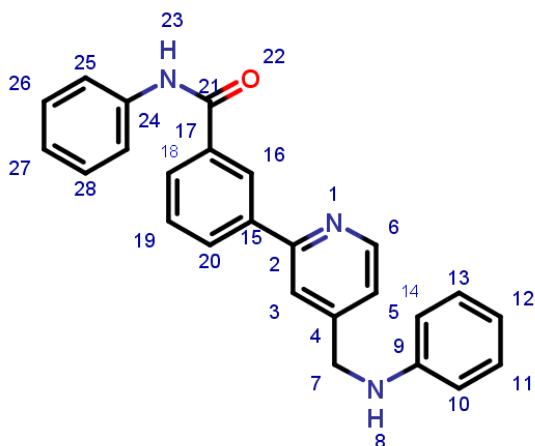
MS: [M+H]⁺ = 379 Da

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

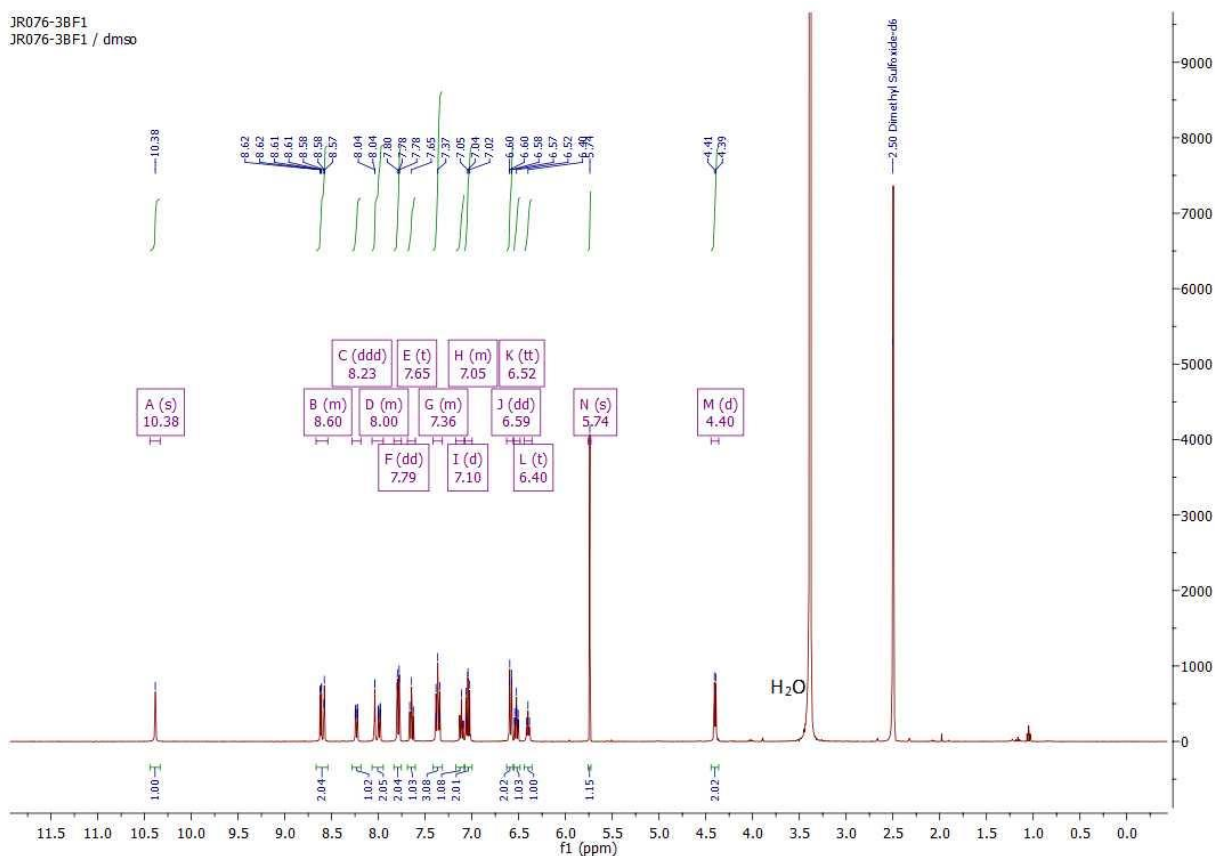
10.38 (s, 1H, **H₂₃**),
 8.67 – 8.54 (m, 2H, **H₆**, **H₂₀**),
 8.23 (ddd, *J* = 7.8, 1.7, 1.1 Hz, 1H, **H₁₆**),
 8.07 – 7.95 (m, 2H, **H₂₅**, **H₂₉**),
 7.79 (dd, *J* = 8.6, 1.1 Hz, 2H, **H₁₃**, **H₁₁**),
 7.65 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, **H₂₇**),
 7.42 – 7.32 (m, 3H, **H₁₄**, **H₁₀**, **H₁₂**),
 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, **H₃**),
 7.08 – 7.00 (m, 2H, **H₂₆**, **H₂₈**),
 6.59 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 2H, **H₂₀**, **H₁₉**),
 .52 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, **H₁₈**),
 6.40 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, **H₅**),
 5.74 (s, 1H, **H₈**),
 4.40 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, **H₇**).

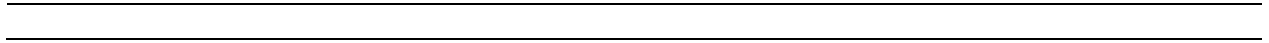
Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 27%

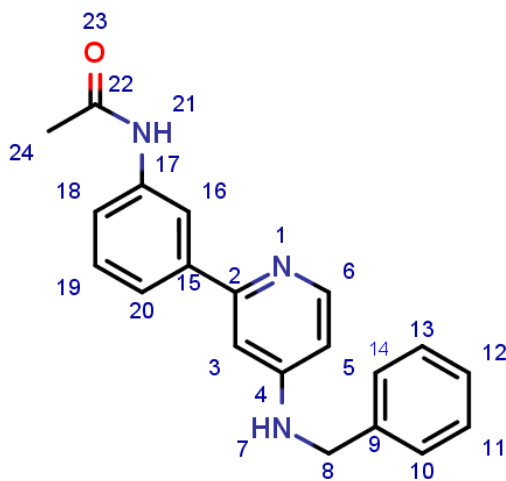


JR076-3BF1
 JR076-3BF1 / dmsO





JR031



Ajouts : 0 eq d'acide boronique ajouté

LC: 97% à 254 nm

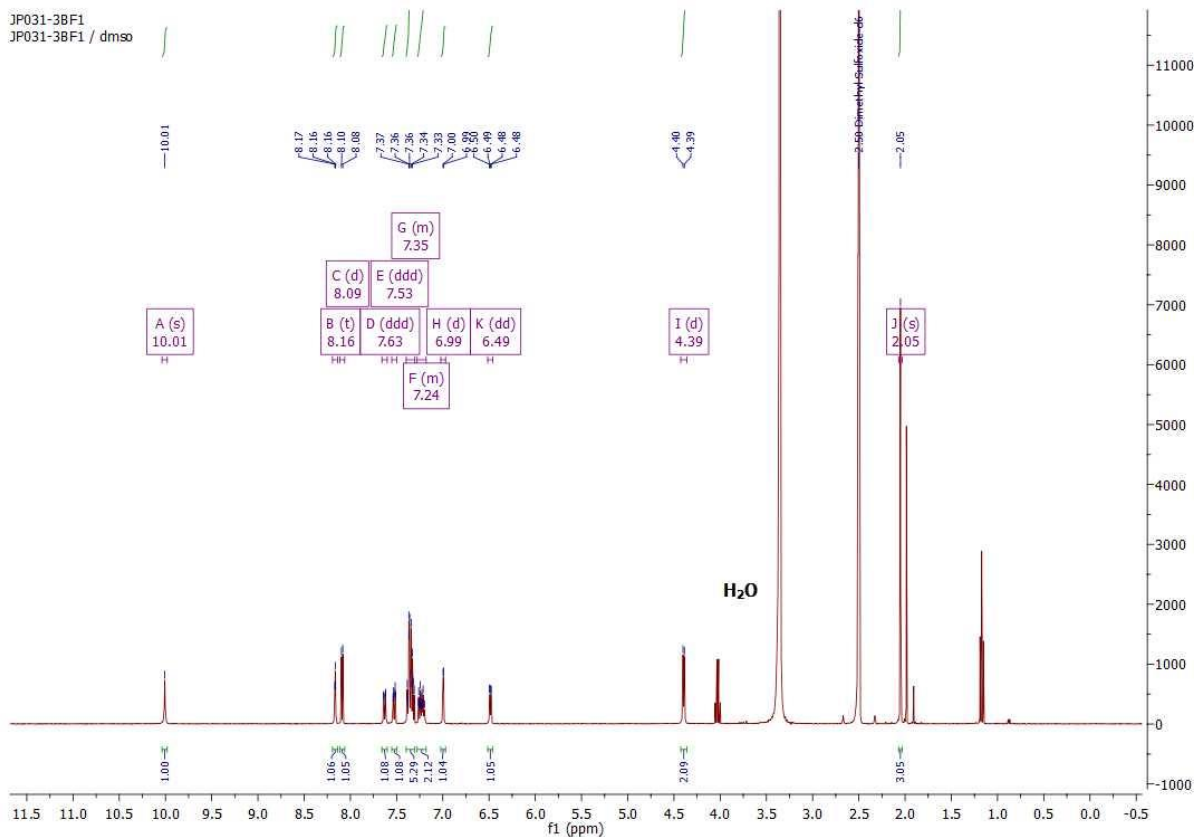
MS: [M+H]⁺= 367,39 Da

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

10.01 (s, 1H H₂₁),
 8.16 (t, J = 1.8 Hz, 1H H₁₆),
 8.09 (d, J = 5.7 Hz, 1H H₆),
 7.63 (ddd, 1H H₂₀),
 7.53 (ddd, 1H H₃),
 7.40 – 7.30 (m, 5H, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄),
 7.28 – 7.18 (m, 2H, H₁₈, H₁₉),
 6.99 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H₂₁),
 6.49 (dd, J = 5.7, 2.2 Hz, 1H, H₅),
 4.39 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H₈),
 2.05 (s, 3H H₂₄).

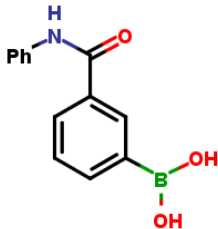
Purification : phase inverse (H₂O/ACN)

Rendement : 72%



3. Couplage peptidique pour obtenir l'intermédiaire JR074

Mode opératoire : Dans un ballon sec et sous argon, l'acide 3-(dihydroxyboranyl)benzoïque (300 mg ; 1,18 mmol), HOBT(H₂O) (1,2 eq ; 1,42 mmol), EDCI(HCl) (1,2 eq ; 1,42 mmol) et la DIEA (2,4 eq ; 2,84 mmol) sont dissous dans le DMF anhydre (3 mL). La solution est agitée à TA pendant 1h30 avant d'ajouter l'aniline (1,2 eq ; 1,42 mmol). Ensuite l'agitation est maintenue toujours à TA jusqu'à ce que la réaction soit complète (24h environ, suivi par LCMS). 10mL d'acétate d'éthyle est ajouté à la solution, la phase organique ainsi obtenue est lavé trois fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium puis séchée. Le précipité blanc légèrement jaunâtre récupéré est lavé sur verre fritté à l'eau (3x2 mL), puis séché pour donner l'intermédiaire souhaité.

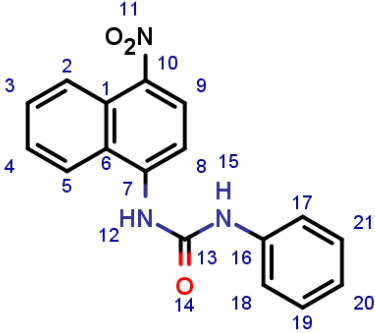
JR074	
	LC: 89% à 254 nm
	MS: [M+H] ⁺ = 241,05 Da
	¹ H RMN (400 MHz, DMSO) δ
	Rendement : 78%

4. Formation de la fonction urée pour obtenir l'intermédiaire JR049

Mode opératoire : Dans un ballon, le 1-amino-4-nitronaphtalène (300 mg ; 1,59 mmol ; 1 eq) est solubilisé dans 5 mL de DCM anhydre sous argon. Une solution de triphosgène (0,5 eq) dans 5 mL de DCM anhydre est ajoutée suivie de l'ajout d'une solution de triéthylamine (2 eq) dans 3 mL de DCM anhydre (toujours sous argon). Le mélange est mis sous agitation durant 30 min à TA.

Ensuite, le mélange est ajouté à une solution d'aniline (8 eq) dans 5 mL et porté à reflux sous agitation pendant 3h (control par LCMS). La réaction est quenchée par ajout d'une solution saturée en bicarbonate de sodium avant d'évaporer le solvant. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle, la phase organique est séchée sur du sulfate de sodium anhydre, puis filtrée sur coton avant l'évaporation du solvant sous-vide. Le résidu obtenu est repris dans un mélange éther de pétrole/acétone (8/2) puis passé aux ultrasons. Le précipité formé est filtré et rincé avec

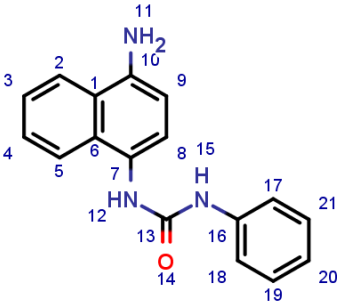
des petits volumes d'éther de pétrole. Cette opération est répétée deux fois. La troisième fois la solution est portée à reflux pendant 2h avant filtration et lavage du précipité.

JR049	
	LC: 91% à 254 nm
	MS: [M+H] ⁺ = 308 Da
	Précipitation : EP/acétone
	Rendement : 75%

5. Réduction du groupement Nitro du JR049

Mode opératoire : Dans un autoclave, le dérivé nitré (100 mg, 1 eq) est solubilisé dans 20 mL d'acétate d'éthyle, puis une suspension de palladium sur charbon 10% dans de l'acétate d'éthyle (0,1 eq en masse) est ajoutée sous argon. L'autoclave est ensuite fermé et purgé avec de l'argon avant d'ajouter l'hydrogène (30 bars). Le mélange est mis sous agitation à TA une nuit.

Le mélange est ensuite filtré sur célite, qui est lavée avec des petits volumes d'acétate d'éthyle. Le filtrat est évaporé sous-vide pour obtenir JR055.

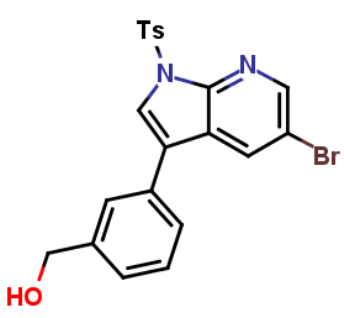
JR055	
	LC: 85% à 254 nm
	MS: [M+H] ⁺ = 278 Da

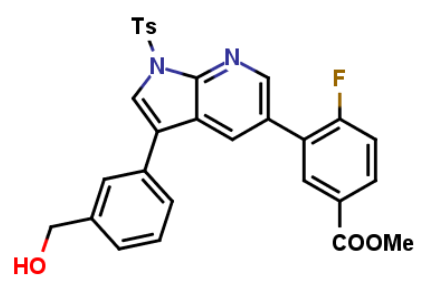
III. Partie expérimentale des molécules de l'approche II

1. Couplage de Suzuki Myaura

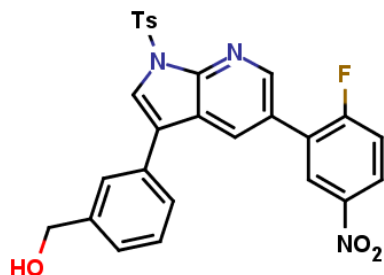
Mode opératoire : Les mêmes conditions de couplage de Suzuki utilisées pour la synthèse des molécules de l'approche I ont été utilisées pour le premier et le deuxième couplage (étapes **(a)** et **(c)** du **(Schéma 6)**. La seule différence réside dans la température d'irradiation. En effet, celle-ci est de 50°C pour le premier couplage afin d'éviter le double couplage, et de 70° à 100°C pour le deuxième couplage.

Toutes les molécules suivantes ont été ainsi obtenues :

AD426	
	LC : 97% à 254 nm
	ESI+ : [M+H] ⁺ = 457/459 Da
	Purification : en phase normale (EP/AcOEt)
	Rendement : 77%

AD517	
	Ajouts : 0,2 eq d'acide boronique + 0,025 de Pd(dppf)Cl ₂ ajoutés
	LC : 83% à 254 nm
	MS : [M+H] ⁺ = 531 Da

AD518



Ajouts : 0,8 eq d'acide boronique + 0,06 de Pd(dppf)Cl₂ ajoutés

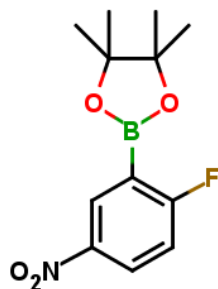
LC : 70% à 254 nm

MS : [M+H]⁺ = 518 Da

2. Formation du dérivé ester de pinacol

Dans un ballon muni d'un dispositif de Dean-Stark (condenseur rempli de toluène), l'acide boronique (1 eq) et le pinacol (1,5 eq) sont mélangés dans du toluène ([acide boronique] = 0,15 mol/L) sous argon. Le ballon est chauffé à 150°C durant 6h (control CCM). Le mélange est refroidi à TA, puis lavé avec de l'eau (3 x 20 mL). La phase organique est concentrée sous-vide et 30 mL de DCM sont ajoutés avant un second lavage à l'eau (3x20ml). La phase organique est enfin séchée sur de sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous-vide pour obtenir le dérivé souhaité.

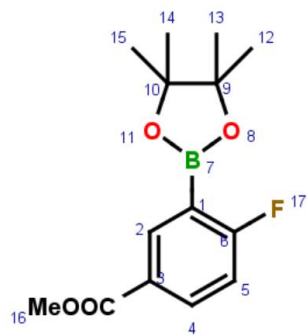
AD433



LCMS : la masse du composé attendu est non retrouvée, on soupçonne la coupure du pinacol dans la colonne de la LCMS

Rendement : 85%

AD556



LCMS: la masse du composé attendu est non retrouvée, on soupçonne la coupure du pinacol dans la colonne de la LCMS

¹H RMN (400 MHz, DMSO) : δ

8.25 (dd, $J = 5.7, 2.4$ Hz, 1H, **H₂**),

8.12 (ddd, $J = 8.6, 5.3, 2.4$ Hz, 1H, **H₄**),

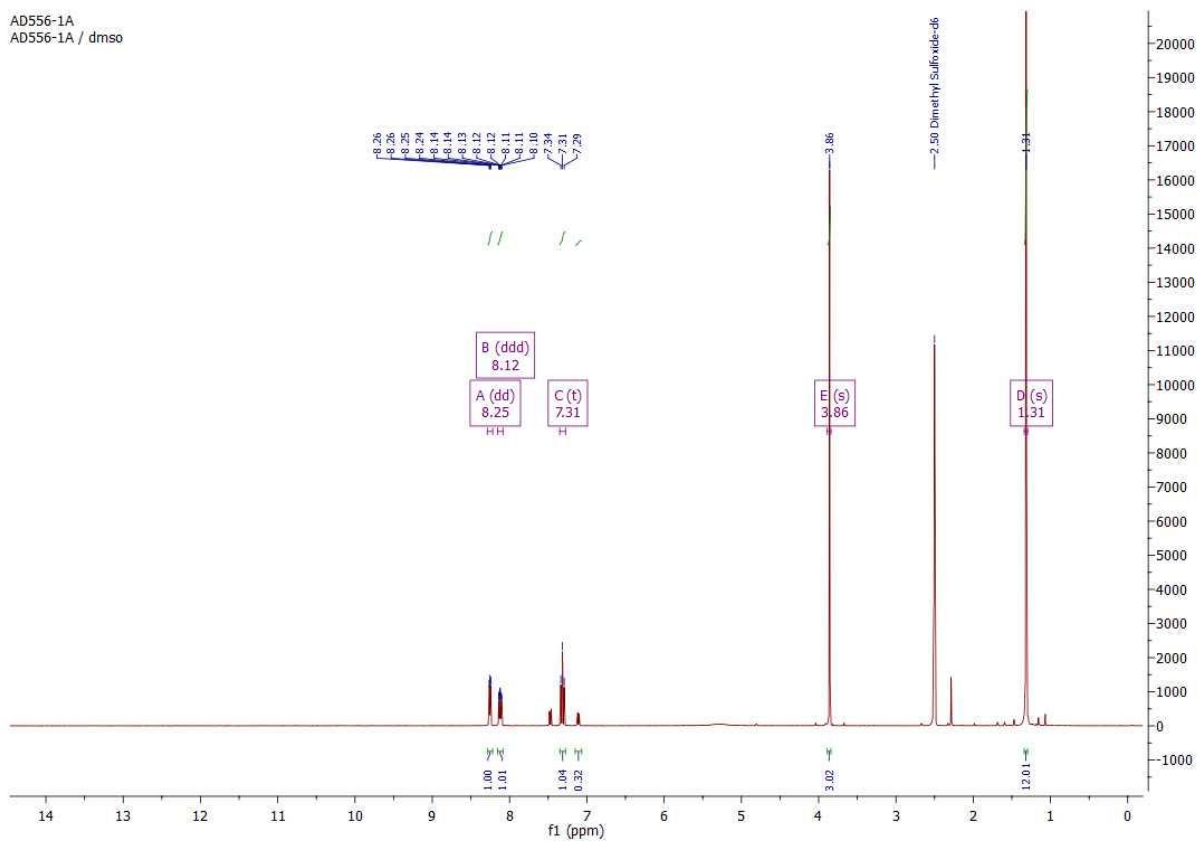
7.31 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H, **H₅**),

3.86 (s, 3H, **H₁₆**),

1.31 (s, 12H, **H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅**).

Rendement : 97%

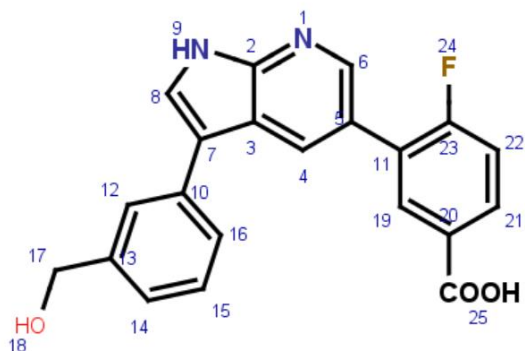
AD556-1A
AD556-1A / dms0



3. Détosylation et saponification du **AD517 (AD593)**

Dans un tube à micro-ondes le brut réactionnel AD517 est mélangé à du NaOH [1M] (3+2eq) Le tube est ensuite irradié à 100°C jusqu'à ce que la réaction soit complète (durant 2h10 min). Le milieu réactionnel est filtré sur célite et lavé avec un mélange acétate d'éthyle/eau (1/1). Le filtrat est ensuite concentré jusqu'à ce qu'il ne reste plus que de l'eau dans le milieu. De l'acétate d'éthyle est ajouté, puis la solution est ensuite extraite par une solution saturée en bicarbonate de sodium. La phase aqueuse est acidifiée avec précaution avec de l'acide chlorhydrique 37% (jusqu'à un pH = 1) et extraite avec de l'acétate d'éthyle (5 fois). La phase organique est enfin concentrée sous-vide pour obtenir le dérivé souhaité.

AD593



LC: 87% à 254 nm

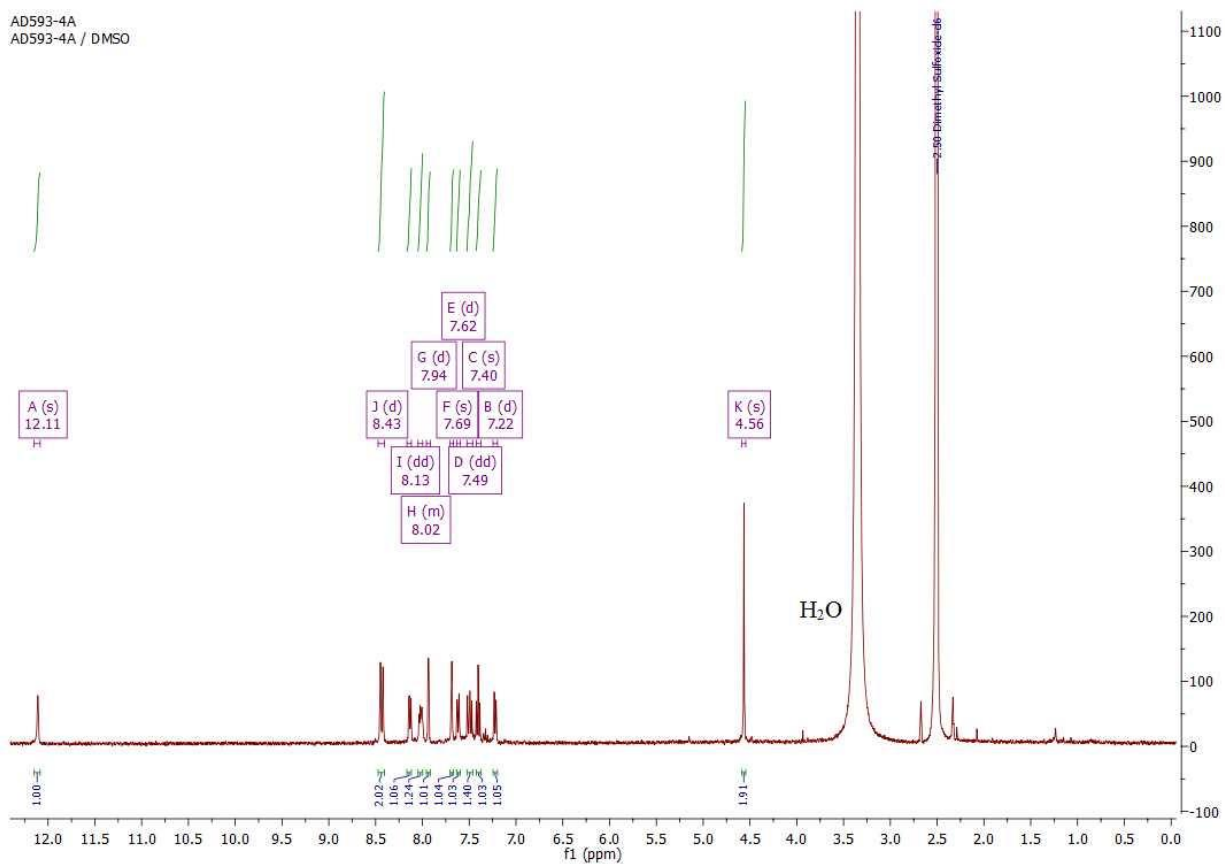
MS: $[M+H]^+ = 363$ Da

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) : δ

12.11 (s, 1H, **H**₁₈),
 8.43 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H, **H**₉, **H**₂₅),
 8.13 (dd, $J = 7.6, 2.2$ Hz, 1H, **H**₆),
 8.05 – 8.00 (m, 1H, **H**₁₉),
 7.94 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, **H**₂₁),
 7.69 (s, 1H, **H**₂₅),
 7.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, **H**₁₂),
 7.49 (dd, $J = 10.1, 8.7$ Hz, 1H, **H**₄),
 7.40 (s, 1H, **H**₁₆),
 7.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, **H**₁₅),
 4.56 (s, 2H, **H**₁₇).

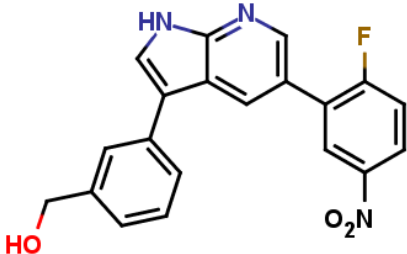
Rendement : 69%

AD593-4A
 AD593-4A / DMSO



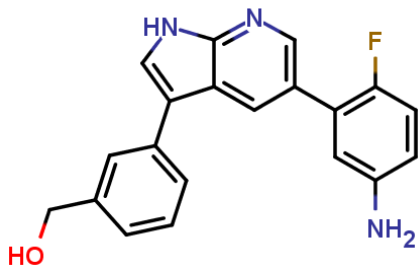
4. Détosylation du AD518

Dans un tube à micro-ondes, le brut réactionnel AD518 est mélangé à du NaOH [1M] (3+2eq). Le tube est ensuite irradié à 100°C jusqu'à ce que la réaction soit complète (durant 2h). La réaction est quenchée avec du chlorure d'ammonium. Le dioxane est ensuite concentré et la solution aqueuse obtenue est extraite avec de l'acétate d'éthyle puis lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase organique est concentrée sous-vide. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice phase normale (DCM/MeOH,NH₃) pour obtenir le composé d'intérêt.

AD528	
	LC: 85% et 79% à 254 nm MS: [M+H] ⁺ = 363 Da

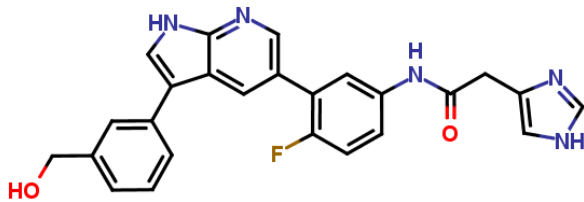
5. Réduction de la fonction nitro du AD528

Dans un tube à micro-ondes, AD528 est dissout dans du méthanol, puis du formiate d'ammonium (5 eq) et du palladium sur charbon (0,1 eq en masse) sont ajoutés sous argon. Le tube est ensuite irradié à 70°C pendant 10 min. Le milieu réactionnel est filtré sur célite et lavé au méthanol. Le filtrat est concentré et le milieu est repris dans du DCM puis extrait avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur du sulfate de sodium anhydre et filtrée sur coton avant d'être concentrée à sec sous-vide et purifiée pour obtenir AD530.

AD530	
	LC: 93% et 79% à 254 nm
	MS: [M+H] ⁺ = 334,7 Da
	Purification : en phase normale (DCM/AcOEt)
	Rendement : 11%

6. Couplage peptidique pour l'obtention des molécules finales

Le dérivé amine (1 eq) et le dérivé acide carboxylique (1 eq) sont solubilisés dans du DMF anhydre ([0.15 mol/L]), du HATU (1,1 eq) et de la DIEA (3eq) sont ajoutés, le mélange est agité à TA une nuit. Après contrôle LCMS, la réaction est complète. Le solvant est concentré, et après extraction le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (phase normale, DCM/méthanol+1%Et₃N).

AD533	
	La réaction n'étant pas complète du HATU (1eq) et de la DIEA (1eq) ont été ajoutés, le mélange a été agité à 60°C une nuit supplémentaire.
	LC: 98% à 254 nm
	MS: [M+H] ⁺ = 442,7 Da
	Rendement : 58%

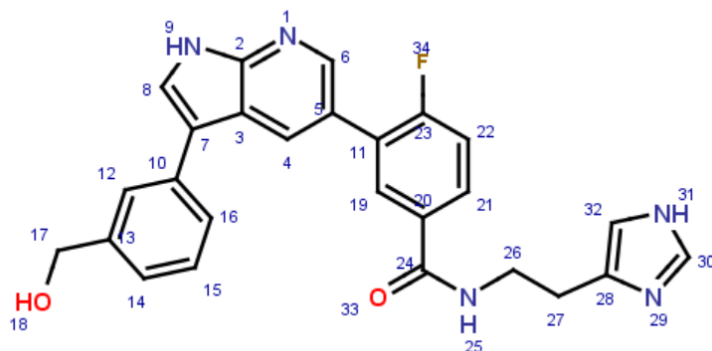
AD597

LC: 9% à 254 nm

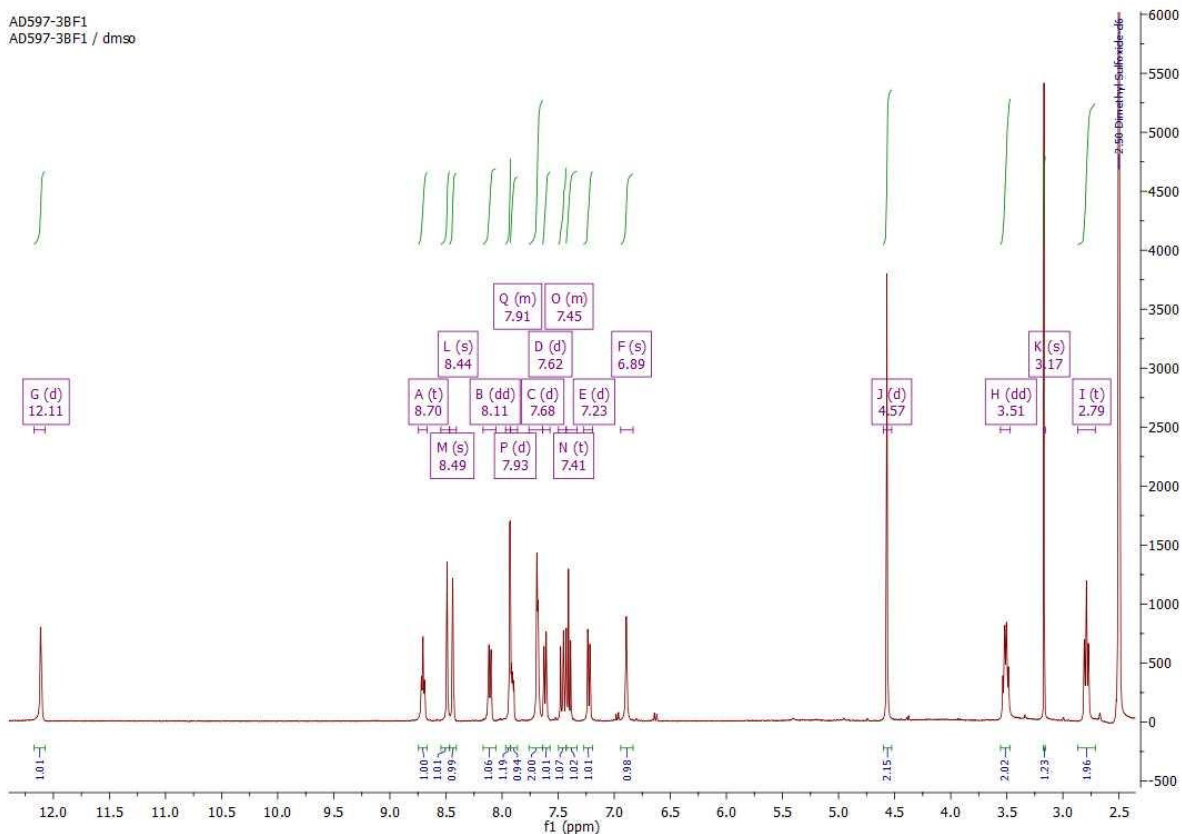
MS: [M+H]⁺= Da¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ

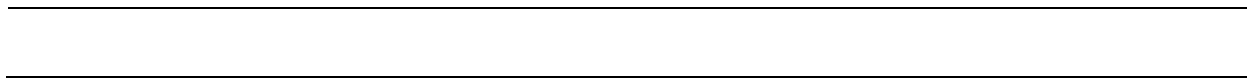
12.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₈),
 8.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₆),
 8.49 (s, 1H, H₁₉),
 8.44 (s, 1H, H₃₀),
 8.11 (dd, *J* = 7.6, 2.2 Hz, 1H, H₂₁),
 7.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₂₁),
 7.93 – 7.86 (m, 1H, H₂₂),
 7.68 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H₁₄, H₁₅),
 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₄),
 7.50 – 7.43 (m, 1H, H₁₂),
 7.41 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₂₅),
 7.23 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₁₈),
 6.89 (s, 1H, H₈),
 4.57 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, H₂₆, H₂₆),
 3.51 (dd, *J* = 13.1, 7.2 Hz, 2H, H₁₇, H₁₇),
 3.17 (s, 1H, H₁₈),
 2.79 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₂₇, H₂₇).

Rendement : 76%



AD597-38F1
 AD597-38F1 / dms0





AD598

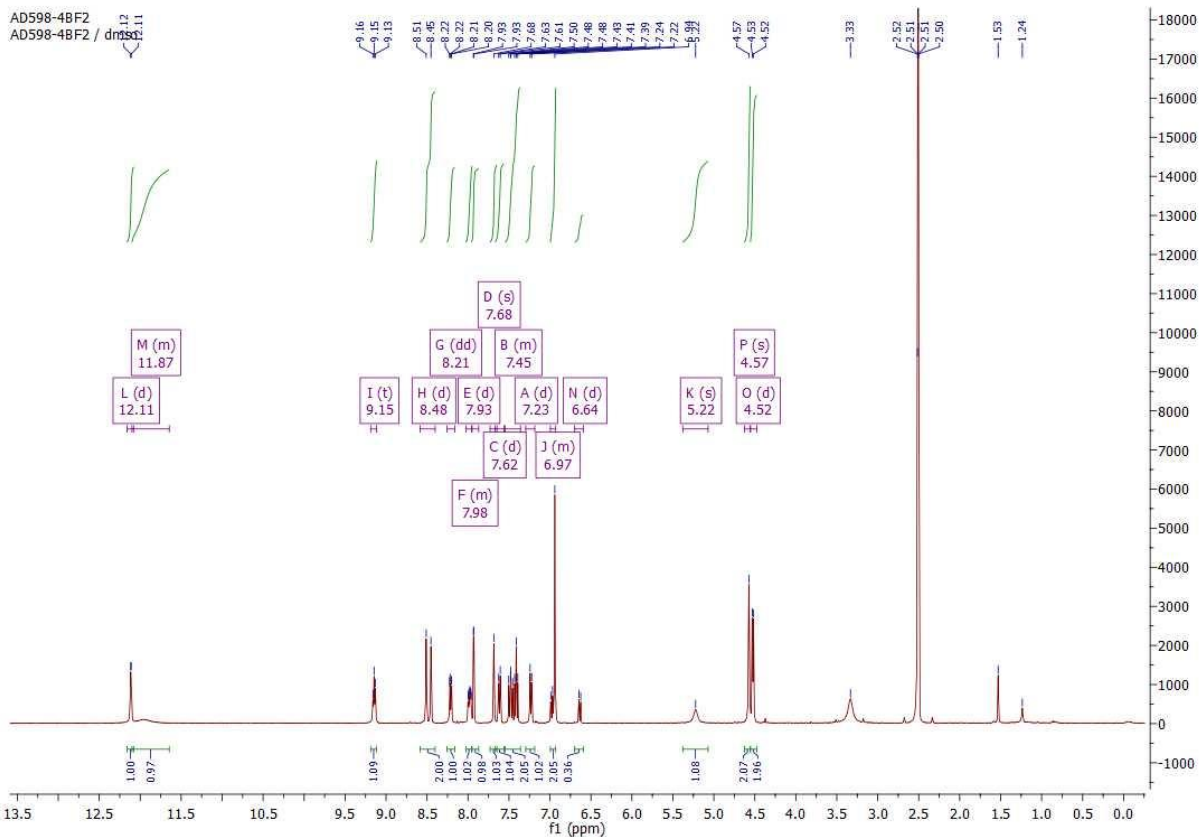
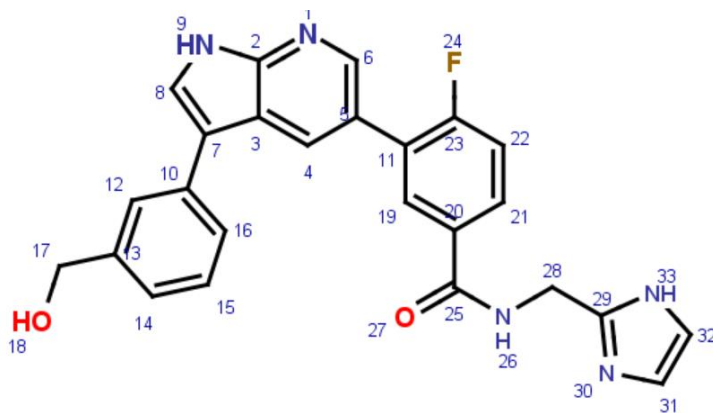
LC: 9% à 254 nm

MS: [M+H]⁺= Da

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ

12.11 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁₈, H₃₃),
 12.10 – 11.65 (m, 1H, H₂₃),
 9.15 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₉),
 8.48 (d, *J* = 23.2 Hz, 2H, H₂₁),
 8.21 (dd, *J* = 7.5, 2.2 Hz, 1H, H₁₉),
 8.03 – 7.95 (m, 1H, H₂₆),
 7.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₄),
 7.68 (s, 1H, H₁₂),
 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₂₂),
 7.55 – 7.36 (m, 2H, H₁₄, H₁₆),
 7.23 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₈),
 6.99 – 6.93 (m, 2H, H₃₁, H₃₂),
 6.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₁₅),
 5.22 (s, 1H, H₂₆),
 4.57 (s, 2H, H₁₇),
 4.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H₂₈).

Rendement: 21%



References bibliographiques

- 1 www.cellsignal.com, Human Kinome, Cell Signaling Technology, <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=kinases-human-protein#sthash.XyVsh2Gw.dpuf>), (accessed 19 April 2016).
- 2 B. FAUVEL and A. Yasri, *mAbs*, 2014, **6**, 838–851.
- 3 L. Fala, *Am. Health Drug Benefits*, 2016, **9**, 119–122.
- 4 N. Li, H. H. Nguyen, M. Byrom and A. D. Ellington, *PLoS ONE*, , DOI:10.1371/journal.pone.0020299.
- 5 P. Wu, T. E. Nielsen and M. H. Clausen, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2015, **36**, 422–439.
- 6 P. Wu, T. E. Nielsen and M. H. Clausen, *Drug Discov. Today*, 2016, **21**, 5–10.
- 7 R. Roskoski, *Pharmacol. Res.*, 2016, **103**, 26–48.
- 8 M. Li, J. Liu and C. Zhang, *PLoS One*, 2011, **6**, e26999–e26999.
- 9 M. Hibi, A. Lin, T. Smeal, A. Minden and M. Karin, *Genes Dev.*, 1993, **7**, 2135–2148.
- 10 J. M. Kyriakis and J. Avruch, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 17355–17363.
- 11 V. Adler, A. Polotskaya, F. Wagner and A. S. Kraft, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 17001–17005.
- 12 B. Dérijard, M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin and R. J. Davis, *Cell*, 1994, **76**, 1025–1037.
- 13 A. Minden, A. Lin, T. Smeal, B. Dérijard, M. Cobb, R. Davis and M. Karin, *Mol. Cell. Biol.*, 1994, **14**, 6683–6688.
- 14 B. J. Pulverer, J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki and J. R. Woodgett, *Nature*, 1991, **353**, 670–674.
- 15 M. A. Bogoyevitch and B. Kobe, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006, **70**, 1061–1095.
- 16 R. K. Barr and M. A. Bogoyevitch, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2001, **33**, 1047–1063.
- 17 A. M. Bode and Z. Dong, *Mol. Carcinog.*, 2007, **46**, 591–598.
- 18 J. Liu, Y. Minemoto and A. Lin, *Mol. Cell. Biol.*, 2004, **24**, 10844–10856.
- 19 J. H. Martin, A. A. Mohit and C. A. Miller, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1996, **35**, 47–57.
- 20 A. A. Mohit, J. H. Martin and C. A. Miller, *Neuron*, 1995, **14**, 67–78.
- 21 A. S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath and W. Kolch, *Oncogene*, 2007, **26**, 3279–3290.
- 22 E. K. Kim and E.-J. Choi, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, 2010, **1802**, 396–405.
- 23 O. Potapova, A. Haghighi, F. Bost, C. Liu, M. J. Birrer, R. Gjerset and D. Mercola, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 14041–14044.
- 24 D. K. Morrison, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012, **4**, a011254.
- 25 Y. T. Ip and R. J. Davis, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, **10**, 205–219.
- 26 R. J. Davis, *Cell*, 2000, **103**, 239–252.
- 27 M. Dickens, J. S. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J. R. Halpern, M. E. Greenberg, C. L. Sawyers and R. J. Davis, *Science*, 1997, **277**, 693–696.
- 28 X. Zhan, S. Kook, T. S. Kaoud, K. N. Dalby, E. V. Gurevich and V. V. Gurevich, in *Current Protocols in Pharmacology*, eds. S. J. Enna, M. Williams, R. Frechette, T. Kenakin, P. McGonigle and B. Ruggeri, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2015, p. 2.12.1-2.12.26.
- 29 D. N. Dhanasekaran, K. Kashef, C. M. Lee, H. Xu and E. P. Reddy, *Oncogene*, 2007, **26**, 3185–3202.

- 30 C. R. Weston and R. J. Davis, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, **12**, 14–21.
- 31 A. Gdalyahu, I. Ghosh, T. Levy, T. Sapir, S. Sapoznik, Y. Fishler, D. Azoulai and O. Reiner, *EMBO J.*, 2004, **23**, 823–832.
- 32 M. Gao, T. Labuda, Y. Xia, E. Gallagher, D. Fang, Y.-C. Liu and M. Karin, *Science*, 2004, **306**, 271–275.
- 33 E. F. Wagner and A. R. Nebreda, *Nat. Rev. Cancer*, 2009, **9**, 537–549.
- 34 J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Görgün, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin and G. S. Hotamisligil, *Nature*, 2002, **420**, 333–336.
- 35 P. K. Roy, *World J. Gastroenterol.*, 2008, **14**, 200.
- 36 S. Hunot, M. Vila, P. Teismann, R. J. Davis, E. C. Hirsch, S. Przedborski, P. Rakic and R. A. Flavell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 665–670.
- 37 R. Yarza, S. Vela, M. Solas and M. J. Ramirez, *Neuropharmacology*, 2015, **6**, 321.
- 38 V. Perrin, N. Dufour, C. Raoul, R. Hassig, E. Brouillet, P. Aebischer, R. Luthi-Carter and N. Déglon, *Exp. Neurol.*, 2009, **215**, 191–200.
- 39 A. J. Littman, L. A. Jackson and T. L. Vaughan, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, **14**, 773–778.
- 40 P. Zhan, L. Suo, Q. Qian, X. Shen, L.-X. Qiu, L. Yu and Y. Song, *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, 2011, **47**, 742–747.
- 41 M. H. Mostafa, S. A. Sheweita and P. J. O’Connor, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, **12**, 97–111.
- 42 C. Bernstein, A. R., V. Nfonsam and H. Bernstei, in *New Research Directions in DNA Repair*, ed. C. Chen, InTech, 2013.
- 43 J. Campisi and F. d’Adda di Fagagna, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, **8**, 729–740.
- 44 E. Seki, D. A. Brenner and M. Karin, *Gastroenterology*, 2012, **143**, 307–320.
- 45 L. D. Cripe, V. M. Gelfanov, E. A. Smith, D. R. Spigel, C. A. Phillips, T. G. Gabig, S.-H. Jung, J. Fyffe, A. D. Hartman, P. Kneebone, D. Mercola, G. S. Burgess and H. S. Boswell, *Leukemia*, 2002, **16**, 799–812.
- 46 H. B. El-Serag, *N. Engl. J. Med.*, 2011, **365**, 1118–1127.
- 47 J. M. Llovet, A. Burroughs and J. Bruix, *Lancet Lond. Engl.*, 2003, **362**, 1907–1917.
- 48 R. Siegel, E. Ward, O. Brawley and A. Jemal, *CA. Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 212–236.
- 49 S. Bruno, A. Crosignani, P. Maisonneuve, S. Rossi, E. Silini and M. U. Mondelli, *Hepatology*, 2007, **46**, 1350–1356.
- 50 H.-I. Yang, S.-H. Yeh, P.-J. Chen, U. H. Iloeje, C.-L. Jen, J. Su, L.-Y. Wang, S.-N. Lu, S.-L. You, D.-S. Chen, Y.-F. Liaw, C.-J. Chen and F. the R.-H. S. Group, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2008, **100**, 1134–1143.
- 51 P. A. Farazi and R. A. DePinho, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 674–687.
- 52 S. Papa, C. Bubici, F. Zazzeroni and G. Franzoso, *Biol. Chem.*, 2009, **390**, 965–976.
- 53 C. Bubici and S. Papa, *Br. J. Pharmacol.*, 2014, **171**, 24–37.
- 54 T. Luedde, N. Beraza, V. Kotsikoris, G. van Loo, A. Nenci, R. De Vos, T. Roskams, C. Trautwein and M. Pasparakis, *Cancer Cell*, 2007, **11**, 119–132.
- 55 S. Maeda, H. Kamata, J.-L. Luo, H. Leffert and M. Karin, *Cell*, 2005, **121**, 977–990.
- 56 W. Qiu, X. Wang, B. Leibowitz, W. Yang, L. Zhang and J. Yu, *Hepatology*, 2011, **54**, 1249–1258.
- 57 T. Sakurai, S. Maeda, L. Chang and M. Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 10544–10551.

- 58 L. Hui, K. Zatloukal, H. Scheuch, E. Stepniak and E. F. Wagner, *J. Clin. Invest.*, 2008, **118**, 3943–3953.
- 59 H. Nagata, E. Hatano, M. Tada, M. Murata, K. Kitamura, H. Asechi, M. Narita, A. Yanagida, N. Tamaki, S. Yagi, I. Ikai, K. Matsuzaki and S. Uemoto, *Hepatol. Baltim. Md*, 2009, **49**, 1944–1953.
- 60 S. R. Mucha, A. Rizzani, A. L. Gerbes, P. Camaj, W. E. Thasler, C. J. Bruns, S. T. Eichhorst, E. Gallmeier, F. T. Kolligs, B. Göke and E. N. De Toni, *Gut*, 2009, **58**, 688–698.
- 61 S. Hagiwara, M. Kudo, H. Chung, K. Ueshima, T. Inoue, S. Haji, T. Watanabe, A.-M. Park, H. Munakata and T. Sakurai, *Hepatol. Res.*, 2012, **42**, 394–400.
- 62 A. V. Biankin, N. Waddell, K. S. Kassahn, M.-C. Gingras, L. B. Muthuswamy, A. L. Johns, D. K. Miller, P. J. Wilson, A.-M. Patch, J. Wu, D. K. Chang, M. J. Cowley, B. B. Gardiner, S. Song, I. Harliwong, S. Idrisoglu, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Manning, S. Wani, M. Gongora, M. Pajic, C. J. Scarlett, A. J. Gill, A. V. Pinho, I. Rooman, M. Anderson, O. Holmes, C. Leonard, D. Taylor, S. Wood, Q. Xu, K. Nones, J. L. Fink, A. Christ, T. Bruxner, N. Cloonan, G. Kolle, F. Newell, M. Pinese, R. S. Mead, J. L. Humphris, W. Kaplan, M. D. Jones, E. K. Colvin, A. M. Nagrial, E. S. Humphrey, A. Chou, V. T. Chin, L. A. Chantrill, A. Mawson, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Lovell, R. J. Daly, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, N. Kakkar, F. Zhao, Y. Q. Wu, M. Wang, D. M. Muzny, W. E. Fisher, F. C. Brunicardi, S. E. Hodges, J. G. Reid, J. Drummond, K. Chang, Y. Han, L. R. Lewis, H. Dinh, C. J. Buhay, T. Beck, L. Timms, M. Sam, K. Begley, A. Brown, D. Pai, A. Panchal, N. Buchner, R. De Borja, R. E. Denroche, C. K. Yung, S. Serra, N. Onetto, D. Mukhopadhyay, M.-S. Tsao, P. A. Shaw, G. M. Petersen, S. Gallinger, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, R. D. Schlick, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, P. Capelli, V. Corbo, M. Scardoni, G. Tortora, M. A. Tempero, K. M. Mann, N. A. Jenkins, P. A. Perez-Mancera, D. J. Adams, D. A. Largaespada, L. F. A. Wessels, A. G. Rust, L. D. Stein, D. A. Tuveson, N. G. Copeland, E. A. Musgrove, A. Scarpa, J. R. Eshleman, T. J. Hudson, R. L. Sutherland, D. A. Wheeler, J. V. Pearson, J. D. McPherson, R. A. Gibbs and S. M. Grimmond, *Nature*, 2012, **491**, 399–405.
- 63 D. P. Ryan, T. S. Hong and N. Bardeesy, *N. Engl. J. Med.*, 2014, **371**, 1039–1049.
- 64 Y.-M. Yang, F. Bost, W. Charbono, N. Dean, R. McKay, J. S. Rhim, C. Depatie and D. Mercola, *Clin. Cancer Res.*, 2003, **9**, 391–401.
- 65 A. Masamune, K. Kikuta, N. Suzuki, M. Satoh, K. Satoh and T. Shimosegawa, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, **310**, 520–527.
- 66 T. Hirano, Y. Shino, T. Saito, F. Komoda, Y. Okutomi, A. Takeda, T. Ishihara, T. Yamaguchi, H. Saisho and H. Shirasawa, *Oncogene*, 2002, **21**, 5923–5928.
- 67 R. Takahashi, Y. Hirata, K. Sakitani, W. Nakata, H. Kinoshita, Y. Hayakawa, H. Nakagawa, K. Sakamoto, Y. Hikiba, H. Ijichi, H. L. Moses, S. Maeda and K. Koike, *Cancer Sci.*, 2013, **104**, 337–344.
- 68 G. Verma, H. Bhatia and M. Datta, *Cancer Lett.*, 2012, **320**, 86–95.
- 69 C. Kuperwasser, G. D. Hurlbut, F. S. Kittrell, E. S. Dickinson, R. Laucirica, D. Medina, S. P. Naber and D. J. Jerry, *Am. J. Pathol.*, 2000, **157**, 2151–2159.
- 70 C. Cellurale, N. Girnius, F. Jiang, J. Cavanagh-Kyros, S. Lu, D. S. Garlick, A. M. Mercurio and R. J. Davis, *Cancer Res.*, 2012, **72**, 472–481.
- 71 G. H. Su, J. J. Song, E. A. Repasky, M. Schutte and S. E. Kern, *Hum. Mutat.*, 2002, **19**, 81.

- 72 G. H. Su, W. Hilgers, M. C. Shekher, D. J. Tang, C. J. Yeo, R. H. Hruban and S. E. Kern, *Cancer Res.*, 1998, **58**, 2339–2342.
- 73 M. A. Webster, J. N. Hutchinson, M. J. Rauh, S. K. Muthuswamy, M. Anton, C. G. Tortorice, R. D. Cardiff, F. L. Graham, J. A. Hassell and W. J. Muller, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, **18**, 2344–2359.
- 74 P. Chen, J. F. O’Neal, N. D. Ebel, M. A. Cantrell, S. Mitra, A. Nasrazadani, T. L. Vandebroek, L. E. Heasley and C. L. Van Den Berg, *PLoS ONE*, 2010, **5**, e10443.
- 75 D. Schramek, A. Kotsinas, A. Meixner, T. Wada, U. Elling, J. A. Pospisilik, G. G. Neely, R.-H. Zwick, V. Sigl, G. Forni, M. Serrano, V. G. Gorgoulis and J. M. Penninger, *Nat. Genet.*, 2011, **43**, 212–219.
- 76 M. L. Goodenberger and R. B. Jenkins, *Cancer Genet.*, 2012, **205**, 613–621.
- 77 J. Y. Li, H. Wang, S. May, X. Song, J. Fueyo, G. N. Fuller and H. Wang, *J. Neurooncol.*, 2008, **88**, 11–17.
- 78 D. Ricard, A. Idbaih, F. Ducray, M. Lahutte, K. Hoang-Xuan and J.-Y. Delattre, *Lancet Lond. Engl.*, 2012, **379**, 1984–1996.
- 79 M. A. Antonyak, L. C. Kenyon, A. K. Godwin, D. C. James, D. R. Emlet, I. Okamoto, M. Tnani, M. Holgado-Madruga, D. K. Moscatello and A. J. Wong, *Oncogene*, 2002, **21**, 5038–5046.
- 80 H. Tsuiki, M. Tnani, I. Okamoto, L. C. Kenyon, D. R. Emlet, M. Holgado-Madruga, I. S. Lanham, C. J. Joynes, K. T. Vo and A. J. Wong, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 250–255.
- 81 J. Cui, S.-Y. Han, C. Wang, W. Su, L. Harshyne, M. Holgado-Madruga and A. J. Wong, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 10024–10031.
- 82 J. R. Graff, B. W. Konicek, J. H. Carter and E. G. Marcusson, *Cancer Res.*, 2008, **68**, 631–634.
- 83 K. Matsuda, A. Sato, M. Okada, K. Shibuya, S. Seino, K. Suzuki, E. Watanabe, Y. Narita, S. Shibui, T. Kayama and C. Kitanaka, *Sci. Rep.*, , DOI:10.1038/srep00516.
- 84 S. Yoshida, K. Fukino, H. Harada, H. Nagai, I. Imoto, J. Inazawa, H. Takahashi, A. Teramoto and M. Emi, *J. Hum. Genet.*, 2001, **46**, 182–187.
- 85 R. S. Stern, *Arch. Dermatol.*, 2010, **146**, 279–282.
- 86 R. P. Gallagher, T. K. Lee, C. D. Bajdik and M. Borugian, *Chronic Dis. Can.*, 2010, **29 Suppl 1**, 51–68.
- 87 J. Y. Zhang and M. A. Selim, *Am. J. Cancer Res.*, 2012, **2**, 691.
- 88 J. Y. Zhang, A. E. Adams, T. W. Ridky, S. Tao and P. A. Khavari, *Cancer Res.*, 2007, **67**, 3827–3834.
- 89 N. Chen, M. Nomura, Q.-B. She, W.-Y. Ma, A. M. Bode, L. Wang, R. A. Flavell and Z. Dong, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 3908–3912.
- 90 K. G. Finegan and C. Tournier, *Cancer Res.*, 2010, **70**, 5797–5806.
- 91 Q.-B. She, N. Chen, A. M. Bode, R. A. Flavell and Z. Dong, *Cancer Res.*, 2002, **62**, 1343–1348.
- 92 H. Ke, R. Harris, J. L. Coloff, J. Y. Jin, B. Leshin, P. M. de Marval, S. Tao, J. C. Rathmell, R. P. Hall and J. Y. Zhang, *Cancer Res.*, 2010, **70**, 3080–3088.
- 93 W. N. Yap, P. N. Chang, H. Y. Han, D. T. W. Lee, M. T. Ling, Y. C. Wong and Y. L. Yap, *Br. J. Cancer*, 2008, **99**, 1832–1841.
- 94 J. Watanabe, H. Nishiyama, Y. Matsui, M. Ito, H. Kawanishi, T. Kamoto and O. Ogawa, *Oncogene*, 2006, **25**, 2500–2508.
- 95 W.-L. Chang, C.-S. Chang, P.-C. Chiang, Y.-F. Ho, J.-F. Liu, K.-W. Chang and J.-H. Guh, *Br. J. Pharmacol.*, 2010, **160**, 1677–1689.
- 96 J.-J. Lee, J.-H. Lee, Y.-G. Ko, S. I. Hong and J.-S. Lee, *Oncogene*, 2010, **29**, 561–575.

- 97 S. S. Joo and Y.-M. Yoo, *J. Pineal Res.*, 2009, **47**, 8–14.
- 98 Y.-R. Chen, J. Han, R. Kori, A.-N. T. Kong and T.-H. Tan, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 39334–39342.
- 99 C. Xu, G. Shen, X. Yuan, J. Kim, A. Gopalkrishnan, Y.-S. Keum, S. Nair and A.-N. T. Kong, *Carcinogenesis*, 2006, **27**, 437–445.
- 100 J. Antosiewicz, W. Ziolkowski, J. J. Kaczor and A. Herman-Antosiewicz, *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, **43**, 265–270.
- 101 A. M. Sánchez, S. Malagarie-Cazenave, N. Olea, D. Vara, A. Chiloeches and I. Díaz-Laviada, *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, 2007, **12**, 2013–2024.
- 102 H.-Y. Hong and B.-C. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **362**, 307–312.
- 103 S. V. Singh, S. Choi, Y. Zeng, E.-R. Hahm and D. Xiao, *Cancer Res.*, 2007, **67**, 7439–7449.
- 104 P. I. Lorenzo and F. Saatcioglu, *Neoplasia N. Y. N.*, 2008, **10**, 418–428.
- 105 J. F. Curtin and T. G. Cotter, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 17090–17100.
- 106 S. Yang, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 4285–4290.
- 107 H. Yun, H.-S. Kim, S. Lee, I. Kang, S. S. Kim, W. Choe and J. Ha, *Carcinogenesis*, 2009, **30**, 529–537.
- 108 Y. Agid, *Lancet Lond. Engl.*, 1991, **337**, 1321–1324.
- 109 P. J. Blanchet, S. Konitsiotis, K. Hyland, L. A. Arnold, K. D. Pettigrew and T. N. Chase, *Exp. Neurol.*, 1998, **153**, 214–222.
- 110 J. W. Langston, *Neurology*, 1996, **47**, 153S–160S.
- 111 M. S. Saporito, E. M. Brown, M. S. Miller and S. Carswell, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, **288**, 421–427.
- 112 W. Wang, L. Shi, Y. Xie, C. Ma, W. Li, X. Su, S. Huang, R. Chen, Z. Zhu, Z. Mao, Y. Han and M. Li, *Neurosci. Res.*, 2004, **48**, 195–202.
- 113 Y. Wang, Y. Zhang, Z. Wei, H. Li, H. Zhou, Z. Zhang and Z. Zhang, *J. Neurol. Sci.*, 2009, **285**, 172–177.
- 114 J. W. Chambers, A. Pachori, S. Howard, M. Ganno, D. Hansen, T. Kamenecka, X. Song, D. Duckett, W. Chen, Y. Y. Ling, L. Cherry, M. D. Cameron, L. Lin, C. H. Ruiz and P. LoGrasso, *ACS Chem. Neurosci.*, 2011, **2**, 198–206.
- 115 C. E. Crocker, S. Khan, M. D. Cameron, H. A. Robertson, G. S. Robertson and P. LoGrasso, *ACS Chem. Neurosci.*, 2011, **2**, 207–212.
- 116 M. S. Saporito, R. L. Hudkins and A. C. Maroney, *Prog. Med. Chem.*, 2002, **40**, 23–62.
- 117 Parkinson Study Group PRECEPT Investigators, *Neurology*, 2007, **69**, 1480–1490.
- 118 S. Mehan, H. Meena, D. Sharma and R. Sankhla, *J. Mol. Neurosci. MN*, 2011, **43**, 376–390.
- 119 X. Antoniou, M. Falconi, D. Di Marino and T. Borsello, *J. Alzheimers Dis.*, 2011, **24**, 633–642.
- 120 M. Repici and T. Borsello, in *Hypoxia and Exercise*, Springer, 2007, pp. 145–155.
- 121 A. Scip, A. Tozzi, A. Abaza, D. Cardinetti, I. Colombo, P. Calabresi, M. Salmona, E. Welker and T. Borsello, *Cell Death Dis.*, 2014, **5**, e1019.
- 122 Tiziana Borsello and Gianluigi Forloni, *Curr. Pharm. Des.*, 2007, **13**, 1875–1886.
- 123 B. Puig, T. Gómez-Isla, E. Ribé, M. Cuadrado, B. Torrejón-Escribano, E. Dalfó and I. Ferrer, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2004, **30**, 491–502.
- 124 M. Shoji, N. Iwakami, S. Takeuchi, M. Waragai, M. Suzuki, I. Kanazawa, C. F. Lippa, S. Ono and H. Okazawa, *Mol. Brain Res.*, 2000, **85**, 221–233.
- 125 C. M. Troy, S. A. Rabacchi, Z. Xu, A. C. Maroney, T. J. Connors, M. L. Shelanski and L. A. Greene, *J. Neurochem.*, 2001, **77**, 157–164.

- 126A. Colombo, A. Bastone, C. Ploia, A. Scip, M. Salmona, G. Forloni and T. Borsello, *Neurobiol. Dis.*, 2009, **33**, 518–525.
- 127C. Ploia, X. Antoniou, A. Scip, V. Grande, D. Cardinetti, A. Colombo, N. Canu, L. Benussi, R. Ghidoni, G. Forloni and T. Borsello, *J. Alzheimers Dis. JAD*, 2011, **26**, 315–329.
- 128M. Ramin, P. Azizi, F. Motamedi, A. Haghparast and F. Khodagholi, *Behav. Brain Res.*, 2011, **217**, 424–431.
- 129J.-F. Tanti, F. Ceppo, J. Jager and F. Berthou, *Front. Endocrinol.*, , DOI:10.3389/fendo.2012.00181.
- 130M. Pal, M. A. Febbraio and G. I. Lancaster, *J. Physiol.*, 2016, **594**, 267–279.
- 131G. Boden, X. Duan, C. Homko, E. J. Molina, W. Song, O. Perez, P. Cheung and S. Merali, *Diabetes*, 2008, **57**, 2438–2444.
- 132B. M. Carvalho, A. G. Oliveira, M. Ueno, T. G. Araújo, D. Guadagnini, M. A. Carvalho-Filho, B. Geloneze, M. M. O. Lima, J. C. Pareja, J. B. C. Carvalheira and M. J. A. Saad, *Obes. Silver Spring Md*, 2013, **21**, 2452–2457.
- 133J. Chung, A.-K. Nguyen, D. C. Henstridge, A. G. Holmes, M. H. S. Chan, J. L. Mesa, G. I. Lancaster, R. J. Southgate, C. R. Bruce, S. J. Duffy, I. Horvath, R. Mestril, M. J. Watt, P. L. Hooper, B. A. Kingwell, L. Vigh, A. Hevener and M. A. Febbraio, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 1739–1744.
- 134H. Kaneto, Y. Nakatani, T. Miyatsuka, D. Kawamori, T. Matsuoka, M. Matsuhisa, Y. Kajimoto, H. Ichijo, Y. Yamasaki and M. Hori, *Nat. Med.*, 2004, **10**, 1128–1132.
- 135R. Yang and J. M. Trevillyan, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, **40**, 2702–2706.
- 136H. Cho, S. C. Black, D. Looper, M. Shi, D. Kelly-Sullivan, S. Timofeevski, K. Siegel, X.-H. Yu, S. R. McDonnell, P. Chen, J. Yie, K. M. Ogilvie, J. Fraser and C. P. Briscoe, *AJP Endocrinol. Metab.*, 2008, **295**, E1142–E1151.
- 137A. Kuglstatler, M. Ghate, S. Tsing, A. G. Villaseñor, D. Shaw, J. W. Barnett and M. F. Browner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 5217–5220.
- 138A. Messoussi, G. Chevé, K. Bougrin and A. Yasri, *MedChemComm*, , DOI:10.1039/C5MD00562K.
- 139K. Moffett, Z. Konteatis, D. Nguyen, R. Shetty, J. Ludington, T. Fujimoto, K.-J. Lee, X. Chai, H. Namboodiri, M. Karpusas, B. Dorsey, F. Guarnieri, M. Bukhtiyarova, E. Springman and E. Michelotti, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 7155–7165.
- 140V. K. Vyas, R. D. Ukawala, M. Ghate and C. Chintha, *Indian J. Pharm. Sci.*, 2012, **74**, 1–17.
- 141T. Kamenecka, J. Habel, D. Duckett, W. Chen, Y. Y. Ling, B. Frackowiak, R. Jiang, Y. Shin, X. Song and P. LoGrasso, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 12853–12861.
- 142D. Shaw, S. M. Wang, A. G. Villaseñor, S. Tsing, D. Walter, M. F. Browner, J. Barnett and A. Kuglstatler, *J. Mol. Biol.*, 2008, **383**, 885–893.
- 143J. Liddle, P. Bamborough, M. D. Barker, S. Campos, C.-W. Chung, R. P. C. Cousins, P. Faulder, M. L. Heathcote, H. Hobbs, D. S. Holmes, C. Ioannou, C. Ramirez-Molina, M. A. Morse, R. Osborn, J. J. Payne, J. M. Pritchard, W. L. Rumsey, D. T. Tape, G. Vicentini, C. Whitworth and R. A. Williamson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 5222–5226.
- 144R. Apweiler, A. Bairoch and C. H. Wu, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, **8**, 76–80.
- 145F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins, *Mol. Syst. Biol.*, 2014, **7**, 539–539.

- 146M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, W252-258.
- 147R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss and J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.*, 1993, **26**, 283–291.
- 148C. Colovos and T. O. Yeates, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, 1993, **2**, 1511–1519.
- 149R. Lüthy, J. U. Bowie and D. Eisenberg, *Nature*, 1992, **356**, 83–85.
- 150O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2009, NA-NA.
- 151D. S. Goodsell and A. J. Olson, *Proteins*, 1990, **8**, 195–202.
- 152R. Wang, L. Lai and S. Wang, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2002, **16**, 11–26.

Résumé

De nombreuses études et expériences ont montré l'implication des protéines kinases dans plusieurs pathologies humaines notamment le cancer. Durant la dernière décennie, 24 inhibiteurs de kinases ont été mis sur le marché entant que médicaments prescrits pour des patients atteints de tumeurs solides ou liquides. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet de recherche de cette thèse de doctorat. En effet, notre recherche se penche sur l'inhibition des protéines C-Jun N-terminal kinases (JNKs) par des petites molécules à des fins thérapeutiques en oncologie. Pour ce faire une stratégie de conception de ces petites molécules a été mise en place, elle est basé sur deux axes de Drug Design rationnels, d'un côté nous avons fait appel à une approche de « Structure Based Drug Design » qui s'appuie sur divers outils de chemoinformatique guidés par la littérature, et de l'autre nous avons utilisé le criblage *In Vitro* de petites molécules issues de la chimiothèque de la société OriBase Pharma sur des souches cellulaires cancéreuses guidé au fur et à mesure par l'analyse des relations structure-activité. Après la synthèse multi-étapes de plusieurs lots successifs de molécules ainsi conçues, suivie de leur tests pharmacologiques sur les kinases JNKs nous ont permis l'obtention d'un « Hit » montrant une très bonne activité inhibitrice de la kinase JNK1 avec une IC50 de 328 nM.

Mots-clefs : inhibiteur hétérocyclique de kinase, synthèse multi-étapes, c-jun N-terminal (JNK), modélisation, chemoinformatique.

Abstract

Several studies and experiments have shown the involvement of protein kinases in a number of human diseases including cancer. During the last decade, 24 kinase inhibitors were approved in the market as prescribed drugs for patients with solid or liquid tumours. It is in this context that fits the research focus of this doctoral thesis. Indeed, our research examines the JNK protein kinases as a therapeutic target in oncology. For a rational design of molecules capable of inhibiting these targets, a double strategy has been implemented. On one hand, we have used the approach of "Structure Based Drug Design" based on various chemoinformatics tools. On the other hand, we used the experimental screening and the analysis of structure-activity relationships of small molecules derived from of the OriBase Pharma company's database and literature. The multi-step synthesis of the newly designed molecules and the obtained results of pharmacological tests on JNK kinases guided the design of a novel chemical series who showed a very good inhibitory activity of the kinase JNK1 with IC50 328 nM.

Key Words : heterocyclics kinase inhibitors, multi-step synthesis, c-jun N-terminal kinase (JNK), Homology modeling, chemoinformatics.