

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue publiquement par

Mathieu LETEVE

Le 12 décembre 2016

SYNTHÈSES DE NOUVEAUX INHIBITEURS DES HISTONES DÉSACÉTYLASES ET LEUR INTÉRÊT DANS UN MODÈLE PRÉCLINIQUE D'ADDICTION À L'ALCOOL

Thèse dirigée par **Erika BOURGUET et Mickael NAASSILA**

JURY

M. Richard PLANTIER-ROYON,	, Professeur,	à l'Université de Reims Champagne-Ardenne,	, Président
Mme. Rebecca DEPREZ-POULAIN,	, Professeur,	à l'Université de Lille 2,	Rapporteur
M. Michel BOULOUARD,	, Professeur,	à l'Université de Caen,	, Rapporteur
Mme. Erika BOURGUET,	, Docteur,	à l'Université Reims Champagne-Ardenne,	, Examineur
M. Mickael NAASSILA,	, Professeur,	à l'Université de Picardie Jules Vernes,	, Examineur



Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse pour m'avoir donné la chance de réaliser ce projet. C'est un sujet d'intérêt en biologie, car les modifications épigénétiques pourraient être la clé pour comprendre certains problèmes de santé publique, mais aussi d'un point de vue chimique pour la synthèse de macrocycles, de pseudopeptides et de sulfonylhydrazides.

*Si je devais remercier une seule personne pour son aide durant cette thèse, ce serait le **Docteur Erika Bourguet**. Tu donnes tellement d'énergie au travail pour trouver des voies de synthèses, des techniques toujours plus efficaces, trouver des stagiaires, donner des cours. Je te remercie pour m'avoir encadré avec autant de disponibilité tout en me laissant tester les voies de synthèse qui me paraissaient les plus adéquates et ceci, sans jamais perdre de vue mes avancées, d'avoir laissé les résultats arriver sans me mettre la pression. Pour ton excellent travail de paillasse, car cela permet de garder à l'esprit qu'il n'y rien de plus frustrant que de donner son temps pour obtenir des résultats négatifs.*

*Je remercie le **Professeur Mickaël Naassila** de m'avoir accueilli au CHU sud de Amiens au sein du groupe de recherche sur l'alcool et les pharmacodépendances (GRAP) et bien sûr pour avoir accepté cette co-tutelle qui m'a permis de tester les inhibitions de nos molécules et leurs effets sur un modèle d'alcoolodépendance in vivo. Vous avez pu me consacrer un peu de votre temps, ce qui représente beaucoup pour moi.*

Dans un second temps :

*Je remercie le Directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire (ICMR), le **Professeur Xavier Coqueret**, pour avoir accepté ce projet de thèse.*

*Ma reconnaissance va également aux **Professeur Rebecca Deprez-Poulain** et **Professeur Michel Boulouard** qui ont acceptés de juger mon travail. Je suis honoré de leur présence dans ce jury.*

*Que le **Professeur Richard Plantier-Royon**, qui m'a fait l'honneur d'être le président de ce jury trouve ici le témoignage de toute ma gratitude.*

*Je remercie le **Professeur Janos Sapi** pour ses conseils qui ont éclairés ma vision de ce sujet.*

*Je remercie le **Docteur Jérôme JeanBlanc** pour son expertise et son intérêt pour nos molécules. J'ai pu l'observer travailler et c'était avec beaucoup d'intérêt que j'ai vu le travail chirurgical qu'il pratique sur chacun des rats étudiés.*

*Je remercie le **Docteur Rémi Legastelois** pour les premiers tests HDAC.*

*Je remercie le **Docteur Aurélie Trussardi-Régnier** pour m'avoir donné de son temps à m'enseigner les techniques en biologie et à tester les inhibiteurs d'HDAC. Cela m'a été très utile.*

*Je remercie le **Docteur Marwa Hentati** pour son aide durant les tests des inhibiteurs d'HDAC.*

*Je remercie le **Docteur Stéphanie Castex-Coantic** pour tout le temps qu'elle consacre à l'organisation du matériel du laboratoire, ainsi que pour son aide lors de l'installation et la mise en fonctionnement de la CLHP. Merci aussi pour tous les petits conseils techniques qui sont d'une importance cruciale quand on veut des produits de qualité.*

*Je remercie le **Docteur Gautier Moroy** pour les modélisations moléculaires des structures de nos molécules.*

*Je remercie le **Docteur Agathe Martinez** pour son travail d'analyses en RMN et son aide pour élucider les structures les plus complexes de cette thèse.*

*Je remercie le **Docteur Dominique Harakat** d'avoir réalisé toutes les HRMS de nos molécules quand c'était possible.*

*Je remercie le **Docteur Dominique Patigny** pour les premières purifications par CLHP.*

*Je remercie aussi les stagiaires. **Céline Gonzalez** pour son aide sur la technique de test des HDAC à Amiens. **Magdalena Szmigielska** pour avoir synthétisé certains blocs de type ZBG. **Monika Moczarska** et **Asma Gabtni** pour leur travail sur les sulfonylhydrazides. **Diana Sketriene** pour ses analyses en biologie. **Oumar Camara** pour ses tentatives de synthèse d'oxazole.*

*Je remercie **Arnaud de la Réberdière** pour son intérêt envers mon travail. Je remercie le **Docteur Benedetta Cornelio** pour ses capacités à toujours aller de l'avant. Je remercie le **Docteur Jouda Jakhlal** pour son amitié. Je remercie **Fabien Leff** pour son soutien moral depuis toujours.*

*Je remercie **Ghislaine et Thierry Margat** pour m'avoir hébergé durant ma période à Amiens.*

*Je remercie **Joël et Annie Létévé**, mes parents, sans qui je ne serais jamais allé aussi loin dans mes études.*

***Laure Martin**, ma compagne, je te remercie pour ton soutien au quotidien, ta présence me permet de voir plus clairement l'importance des choses.*

Table des matières

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	3
PARTIE THEORIQUE	6
1. LA PROBLEMATIQUE	6
1.1 Généralités sur la consommation d'alcool	6
1.1.1 Histoire	6
1.1.2 Problème de santé publique	6
1.1.3 Problème indirect	7
1.1.4 Le "binge drinking"	7
1.1.5 Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF)	8
1.2 L'alcoolodépendance et ses répercussions	8
1.2.1 La métabolisation de l'alcool	8
1.2.2 L'alcoolodépendance	9
1.2.3 La tolérance	10
1.2.4 La barrière hématoencéphalique (BHE)	11
1.2.5 Le syndrome de sevrage	12
1.2.6 Les effets de l'alcool sur les neurotransmetteurs	12
1.3 Le circuit de la récompense	14
1.4 L'adaptation de type «anti-récompense»	16
1.5 Les traitements de l'alcoolodépendance	17
1.5.1 Acamprosate (Aotal®)	18
1.5.2 Naltrexone (Revia®)	18
1.5.3 Nalméfène (Selincro®)	19
1.5.4 Disulfirame (Espéral®)	19
1.6 Les autres traitements et voies thérapeutiques à l'étude	20
1.6.1 Baclofène	20
1.6.2 GHB (Alcover®)	21
1.6.3 Les autres traitements à l'étude	21
2. L'EPIGENETIQUE	23
2.1 Généralités	23
2.2 L'ADN	24
2.3 Les chromosomes	24
2.4 La chromatine	24
2.5 L'expression des gènes	26
2.6 Les différentes modifications épigénétiques	27
2.6.1 La méthylation de l'ADN	27
2.6.2 Le code des histones	28
2.6.3 La méthylation des histones	29
2.6.4 La phosphorylation	30
2.6.5 L'ubiquitination	30
2.6.6 L'acétylation	30
2.6.7 Les HDAC	31
2.6.8 La structure des HDAC	32
2.6.9 Le mécanisme de la désacétylation des histones par les HDAC	33
3. L'EPIGENETIQUE ET L'ALCOOLODEPENDANCE	35
3.1 Les implications des HDAC dans la sensibilisation aux effets des drogues	35
3.2 Les effets des inhibiteurs HDAC sur la consommation d'alcool	37
3.3 Les effets du MS-275 sur la motivation à consommer de l'alcool	39

3.4	Les effets du MS-275 sur la rechute	40
3.5	Les effets des inhibiteurs HDAC sur l'anxiété durant le sevrage	40
4.	LES DIFFERENTS TYPES D'INHIBITEURS D'HDAC.....	42
4.1	Les inhibiteurs de type acide carboxylique.....	42
4.2	Les inhibiteurs de type acide hydroxamique	43
4.3	Modèle d'inhibiteur d'HDAC.....	45
4.4	Les inhibiteurs de type pont disulfure	46
4.5	Les inhibiteurs de type benzamide	46
4.6	Les inhibiteurs de type sulfonylhydrazide.....	47
4.7	Les inhibiteurs contenant un peptide cyclique	50
4.8	Le largazole, le FK228 et leurs pharmacomodulations	54
5.	OBJECTIF.....	56
PARTIE RESULTATS ET DISCUSSIONS		58
6.	CONCEPTION DE NOUVEAUX INHIBITEURS	58
6.1	Rétrosynthèse	58
6.2	Synthèse du dipeptide (A)	59
6.3	Synthèse de l'acide malique modifié (B).....	59
6.4	Synthèse de l'oxazole disubstitué (C)	62
6.5	Synthèse du thiazole disubstitué (C)	64
6.6	Synthèse de la pyridine disubstituée (C).....	64
6.7	Hydrolyse basique des hétérocycles	65
6.8	Synthèse des Blocs D (Z = Ms, Ts, n = 2, 3)	65
6.9	Couplage du dipeptide avec l'acide malique (Blocs A et B).....	67
6.10	Couplage du pseudopeptide avec l'hétérocycle (Blocs AB et C)	68
6.11	Macrolactamisation	68
6.12	Déprotection de l'ester exocyclique.....	70
6.13	Une nouvelle stratégie	72
6.14	Etude RMN	74
6.15	Modélisation moléculaire.....	76
7.	EVALUATION BIOLOGIQUE DE L'ACTIVITE DES COMPOSES.....	77
7.1	Test de l'inhibition d'extrait nucléaire HDAC.....	77
7.1.1	Principe	77
7.1.2	Résultats	77
7.2	Test de l'inhibition des HDAC1, 3 et 6	78
7.2.1	Principe	78
7.2.2	Résultats	79
7.3	Docking	81
8.	TEST SUR UN MODELE ANIMAL DE BINGE DRINKING.....	82
8.1	Principe	82
8.2	Effet du composé 82 sur la consommation des rats "gros buveurs"	83
8.3	Effet du composé 83 sur la consommation des rats "gros buveurs"	83
8.4	Effet du composé 83 sur la rechute.....	84
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		85
PARTIE EXPERIMENTALE		90
9.	CONDITIONS GENERALES.....	90
10.	MODES OPERATOIRES.....	91
11.	PROTOCOLE TEST HDAC	138
11.1	Réaction en deux étapes	138

11.2	<i>Préparation des réactifs</i>	138
11.3	<i>Déroulement du test</i>	138
11.4	<i>Réalisation de l'essai</i>	139
12.	TESTS <i>IN VIVO</i>	139
12.1	<i>Animaux</i>	139
12.2	<i>Produits & Réactifs</i>	140
12.3	<i>Consommation en libre choix à deux bouteilles en accès intermittent</i>	140
12.4	<i>Auto-administration en cage de conditionnement opérant</i>	140
12.5	<i>Chirurgie stéréotaxique</i>	141
12.6	<i>Ré-acquisition après abstinence</i>	141
12.7	<i>Microinjections du composé 82 ou 83</i>	142
12.8	<i>Vérification Histologique</i>	142
12.9	<i>Analyse Statistique</i>	142
TABLES		143
13.	LES FIGURES	143
14.	LES SCHEMAS	145
15.	LES TABLEAUX	146
BIBLIOGRAPHIE		148

Abréviations

aCSF	Liquide céphalorachidien artificiel
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AE	Acétate d'éthyle
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
API	Alcoolisations ponctuelles importantes
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hématoencéphalique
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
cL	Centilitre
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
DAST	Diéthyl(trifluorosulfido)amine
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DDC	DOPA-décarboxylase
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DNMT	Méthyltransférases de l'ADN
DSM 5	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5 ^{ème} édition
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
EP	Ether de pétrole
éq.	Equivalents
Et	Ethyle
FDA	"Food and drugs administration"
FT	Facteur de transcription
g	Gramme
GABA	Acide gamma-amino-butyrique
GHB	Gamma-hydroxybutyrate de sodium
GRAP	Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances
h	Heures
H2A	Histone H2A
H2B	Histone H2B
H3	Histone H3
H4	Histone H4
HAT	Histones acétyltransférases

HATU	"1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium-3-oxid hexafluorophosphate"
HBTU	" <i>N,N,N,N</i> -tétraméthyl-O-(1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-uronium hexafluorophosphate"
HDAC	Histones désacétylases
HDM	Histones déméthylases
HMT	Histone méthyltransférases
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
i.c.v.	Intra-cérébro-ventriculaire
IR	Infra-rouge
ISRS	Inhibiteurs de recapture de la sérotonine
M	Mole par litre
Me	Méthyle
NAc	Noyau accumbens
NaB	Butyrate de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
Nbr	Nombre
NES	Séquence d'exportation nucléaire
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
PCP	Phéncyclidine
PFA	Paraformaldéhyde
PRMT	Protéine arginine méthyltransférases
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RTU	Recommandation temporaire d'utilisation
SAHA	"Suberoylanilide hydroxamic acid" ou Vorinostat
SAHC	S-adénosyl-L-homocystéine
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SET	"Su (var) 3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax"
SIRT	Sirtuines
SLN	Signal de localisation nucléaire
SNC	Système nerveux central
SUMO	"Small ubiquitin-related modifier"
TBAF	Fluorure de tétra- <i>N</i> -butylammonium
tDCS	Stimulation transcrânienne par courant continu
TFA	Acide trifluoroacétique
TFFA	Anhydride trifluoroacétique
TH	Tyrosine hydroxylase
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétraméthylsilane
TMSE	2-(triméthylsilyl)éthyl
t _R	Temps de rétention
TSA	Trichostatine A
VPA	Acide valproïque
VTA	Aire tegmentale ventrale
ZBG	"Zinc binding group"

Introduction

La consommation excessive d'alcool et l'addiction sont un enjeu majeur de santé publique en France avec 49 000 morts/an et une soixantaine de pathologies liées à l'alcool.¹ C'est la première cause d'hospitalisation (580 000 hospitalisations en 2012).² Pourtant moins de 10% des personnes en difficulté avec l'alcool sont pris en charge spécifiquement pour ce problème.³ Il est urgent et important de rechercher de nouveaux traitements efficaces. Des recherches pour mieux comprendre les mécanismes de l'addiction pourraient conduire à un traitement qui permettrait aux personnes dépendantes d'être mieux prises en charge pour cette maladie invalidante, chronique et hautement récidivante.

Les neuroadaptations liées à la consommation chronique d'alcool sont relayées au moins en partie à des modifications durables d'expression génétique dont certaines sont régulées par des modifications de l'acétylation des histones.⁴ L'acétylation des histones est régulée par deux enzymes, les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC) (Schéma 1). Les HDAC chez l'homme comprennent 18 isoformes et sont réparties en quatre classes.

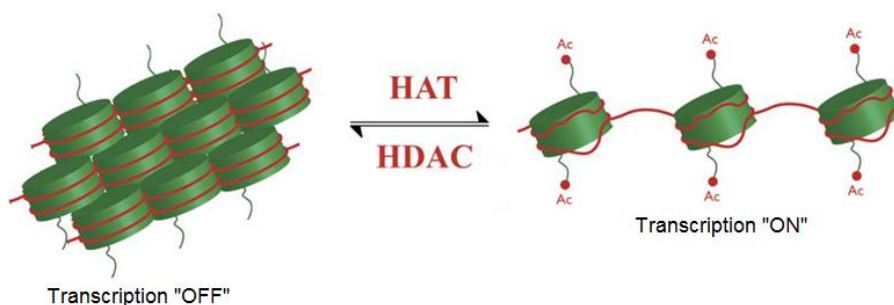


Schéma 1 : Equilibre HAT/HDAC

Ces régulations post-traductionnelles des histones semblent être une piste thérapeutique intéressante dans le champ des maladies psychiatriques et des addictions. Au laboratoire d'Amiens dans le groupe GRAP dirigé par Mickaël Naassila, des tests avec le butyrate de sodium (NaB), un inhibiteur non sélectif des HDAC a montré pour la première fois une diminution très efficace de la consommation d'alcool spécifiquement sur des rats alcoolodépendants (Figure 1).⁵

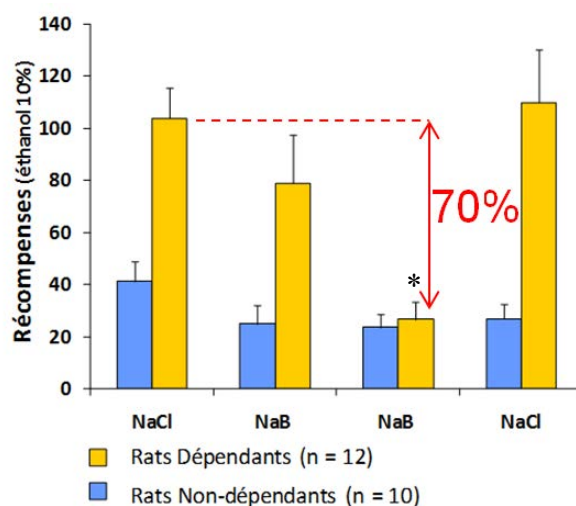


Figure 1 : Effet du butyrate de sodium sur la consommation d'alcool, *p<0.001⁵

Le butyrate de sodium a divers effets secondaires dûs au manque de sélectivité. Cette première étude a fourni la preuve de concept que l'inhibition des HDAC diminue la consommation d'alcool des rats dépendants.

Le MS-275 (Figure 2), un inhibiteur plus spécifique de la classe I, notamment de la HDAC1, mais également de la HDAC9 de la classe II, a montré une diminution de la consommation d'alcool sur des rats "gros buveurs" (et non alcoolo-dépendants).⁶

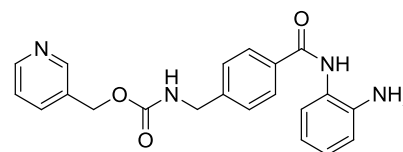


Figure 2 : MS-275

Plusieurs études permettent de penser que les HDAC de la classe I seraient impliquées dans cette diminution de la consommation.⁷ Les HDAC de la classe I sont Zn-dépendantes. Le largazole thiol⁸ et le RedFK228⁹ sont les inhibiteurs connus les plus sélectifs de la classe I. Le projet de cette thèse est de synthétiser des molécules cibles qui seraient analogues de ces deux cyclodepsipeptides en espérant obtenir un nouvel inhibiteur efficace et sélectif de la classe I. Ces analogues posséderont un groupement sulfonylhydrazide¹⁰ ayant une bonne affinité pour l'ion Zn^{2+} (ZBG) (Figure 3).

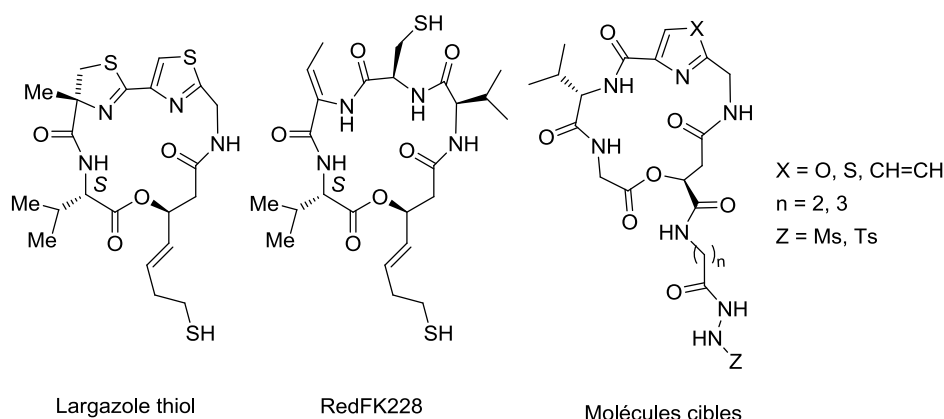


Figure 3 : Les molécules modèles et les molécules cibles

Les pharmacomodulations porteront sur la partie espaceur ($n = 2, 3$), l'hétérocycle (oxazole, thiazole et pyridine) ainsi que sur la partie ZBG ($R = Ms, Ts$). Suite à ces résultats très encourageants, une collaboration s'est mise en place entre le groupe GRAP et l'ICMR pour synthétiser et tester les molécules afin d'obtenir un inhibiteur sélectif de la classe I des HDAC et ainsi mieux comprendre le mécanisme par lequel les HDAC seraient impliquées dans la physiopathologie des addictions.

Partie théorique

Partie théorique

1. La Problématique

1.1 Généralités sur la consommation d'alcool

1.1.1 Histoire

9000 ans avant J.-C., les hommes consommaient de l'hydromel, la plus ancienne boisson alcoolisée, due exclusivement à la fermentation des levures naturelles présentes dans le miel. Les consommations excessives d'alcool sont des comportements anciens. Le savant Razi (865-925) cherchait à déterminer la matière qui donnait une odeur particulière à ses restes de repas en état de décomposition : c'était la fermentation. Il obtint un produit par distillation qui augmentait les forces, dissipait soucis et chagrins, inspirait de la joie et un nouveau courage. Il appela sa boisson Al Kool, c'est-à-dire le fin, le noble. De nombreux chimistes ont produit de l'alcool de qualité médicinale par distillation dès le X^e siècle à grande échelle. Plus cette découverte se répandait, plus ils voyaient combien ils s'étaient trompés, combien l'augmentation des forces passait rapidement à la faiblesse et à la somnolence, comment au sentiment du bonheur et de la délivrance des soucis succédaient le sentiment de misère avec un redoublement d'abattement.¹¹

1.1.2 Problème de santé publique

La consommation d'alcool en France a beaucoup diminué depuis 80 ans. Elle était de 6,5 verres par jour à la fin des années 1930, avant de baisser régulièrement depuis 1960. En 2009, elle était de 2,7 verres par adulte et par jour. Pour mémoire, un verre de bière (250-300 mL), un verre de vin (150 mL) et une mesure de spiritueux (30-50 mL) contiennent une quantité voisine d'alcool (environ 10 g d'éthanol).

Pourtant, la consommation d'alcool est responsable de 49000 décès par an en France, soit 18 % de la mortalité. C'est la seconde cause de mortalité évitable après le tabac.¹² La proportion des décès attribuables à l'alcool parmi les hommes en France (13 %), est ainsi bien supérieure à celle observée dans d'autres pays, telles que la Suisse (5 %) et l'Italie (3 %) (Figure 4).¹

Quelques 118 millions d'Européens ont une consommation massive au moins une fois par mois, ce qui représente un peu moins d'un adulte sur trois.

55 millions d'Européens adultes, soit 15 % de la population adulte ont une consommation d'alcool qui est au minimum dangereuse (consommation dite « à risque »). Pour une consommation sans risque pour la santé, plusieurs recommandations doivent être respectées : ne pas consommer plus de trois verres de boisson alcoolisée par jour pour un homme, deux verres pour une femme, réserver un jour par semaine sans alcool et ne jamais dépasser quatre verres lors d'une occasion.

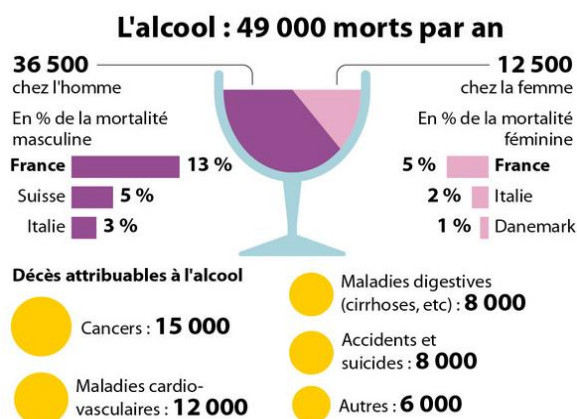


Figure 4 : Décès dus à l'alcool en France en 2009¹

Selon l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES), cinq millions de personnes en France auraient des difficultés médicales, psychologiques et sociales à cause de l'alcool. En Europe, 5 % des hommes adultes et 1 % des femmes adultes sont alcoolo-dépendants, soit 23 millions de personnes dépendantes à l'alcool chaque année.³ Un enjeu majeur est actuellement de repérer les consommateurs à risque et de réduire leur consommation. L'étude de facteurs de vulnérabilité est en cours pour améliorer ce repérage et la prise en charge de l'alcoolodépendance.

1.1.3 Problème indirect

L'alcool coûte chaque année 120 milliards d'euros à la société française. Pour parvenir à cette valeur, les éléments suivants ont été pris en compte : le nombre de vies perdues chaque année, le nombre de maladies liées à ces consommations, les dépenses engagées par l'Etat pour les soins, la prévention et la répression.¹³ La consommation excessive d'alcool est l'un des tous premiers motifs d'hospitalisation en France. En 2012, l'alcool a induit plus de 580 000 hospitalisations (+11,3 % par rapport à 2006).² La consommation d'alcool est responsable de plus de 200 maladies, notamment la cirrhose alcoolique ou certaines atteintes neurologiques, comme le syndrome de Korsakoff. Pour d'autres pathologies, l'alcool constitue un facteur de risques. C'est le cas de certains cancers (bouche, pharynx, larynx, œsophage, foie, sein, colon) et de maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, cardiopathie ischémique).¹⁴

1.1.4 Le "binge drinking"

Le mode de consommation a changé, car au lieu de consommer un peu, quotidiennement, les jeunes suivent la mode du "binge drinking" qui peut commencer dès le collège et le lycée. Cette pratique consiste à atteindre l'ivresse le plus rapidement possible. En France, la moitié des jeunes de 17 ans a pratiqué le "binge drinking" au cours des trente derniers jours et ce phénomène ne cesse d'augmenter.¹⁴ Il s'agit d'intoxication aiguë, correspondant à des alcoolisations ponctuelles et massives. Les sujets exposés précocement (entre 13 et 16 ans) ont deux fois plus de risques de devenir dépendants à l'alcool que ceux exposés plus tardivement (entre 17 et 21 ans).¹⁵ Une étude a montré sur des souris adolescentes que l'alcool diminuait la réparation et la protection des dommages oxydatifs de l'ADN. En revanche, pour les souris adultes, l'alcool activait des mécanismes de protection contre ces dommages oxydatifs. Le cerveau des adolescents est plus sensible à la toxicité de l'alcool.¹⁶ Le "binge drinking" peut se transformer progressivement en dépendance. Les week-ends deviennent des week-ends prolongés qui incluent finalement la semaine entière où la prise d'alcool commence de plus en plus tôt le soir. Avec la propagation de ces nouveaux modes de consommation, des conséquences majeures sur la santé sont attendues durant les prochaines décennies, notamment une augmentation du taux de mortalité évitable et une recrudescence du nombre d'individus alcoolo-dépendants.¹⁷

1.1.5 Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF)

L'exposition prénatale à l'alcool a des effets dramatiques et permanents. L'éthanol franchit facilement la barrière placentaire et les concentrations sanguines d'alcool chez le fœtus sont proches de celles de la mère, car le système d'élimination de l'alcool est peu développé chez le fœtus. Les perturbations peuvent aller des troubles comportementaux mineurs à des anomalies sévères du développement, se manifestant par un syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) : malformation du crâne et du visage, retard de croissance, handicaps comportementaux et cognitifs.¹⁴ Une consommation d'un seul verre par jour peut provoquer une réduction des scores obtenus par les enfants à divers tests cognitifs.¹⁸ Les études démontrent que l'alcoolisation massive concerne de plus en plus de femmes. Les garçons continuent à consommer davantage de boissons alcoolisées que les filles, mais celles-ci rattrapent leur « retard » à grande vitesse. De plus, les femmes métabolisent plus lentement l'alcool. Elles sont donc plus vulnérables aux effets toxiques de l'alcool.

1.2 **L'alcoolodépendance et ses répercussions**

1.2.1 La métabolisation de l'alcool

L'alcool consommé passe rapidement de la bouche à l'estomac et, de là, à l'intestin. Une partie est absorbée dans le système sanguin par la muqueuse buccale et l'œsophage, une autre partie passe à travers les parois de l'estomac. Le reste est absorbé par les intestins, principalement l'intestin grêle. Une fois passé dans le sang, l'alcool se répand dans toutes les parties de l'organisme et se diffuse dans tous les tissus contenant de l'eau. C'est ainsi que l'alcool parvient rapidement aux organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie. L'alcool agit directement sur le cerveau, avec des conséquences variables sur le comportement en fonction de la dose ingérée. Pour des alcoolémies inférieures ou égales à 0,50 g/L, l'éthanol a un effet stimulant qui s'accompagne d'une désinhibition : les tâches cognitives sont exécutées plus rapidement et avec une sensation subjective de facilité, mais avec un taux d'erreurs accru. Au-delà de 0,50 g/L, il a un effet sédatif qui perturbe les fonctions motrices (perte d'équilibre et de la coordination des mouvements). Ces effets dépendent également d'une sensibilité individuelle aux effets de l'alcool qui s'explique en partie par des facteurs génétiques.

Une partie de l'alcool (10 %) est éliminée telle quelle, soit sous une forme inchangée par l'urine et la sueur, mais aussi par l'air expiré. La majeure partie de l'alcool (90 %) est éliminée par le métabolisme. Bien que les reins et le système digestif participent à ce métabolisme, le foie est le principal responsable de la transformation de l'alcool absorbé. Dans un premier temps, l'enzyme « alcool déshydrogénase » transforme l'alcool en acétaldéhyde, une substance très toxique qui donne envie de vomir lors de consommation excessive. Ensuite, l'acétaldéhyde déshydrogénase transforme l'acétaldéhyde en une molécule moins réactive, l'acide acétique (Schéma 2).

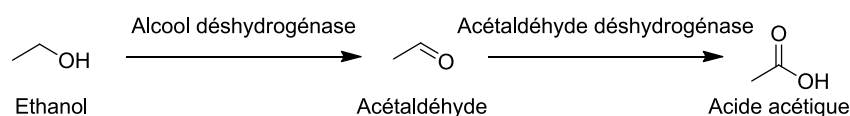


Schéma 2 : La métabolisation de l'alcool

1.2.2 L'alcoolodépendance

Les troubles liés à l'usage d'alcool se caractérisent par une série de symptômes aussi bien physiques que comportementaux. Parmi les signes physiques, on note l'apparition d'une tolérance, car le sujet doit augmenter les quantités consommées pour continuer à ressentir les effets de l'alcool et peut aussi présenter un syndrome de sevrage à l'arrêt de la consommation.¹⁹ Si cette consommation est occasionnelle, il s'agit de prise aiguë. Si elle est habituelle, c'est une prise chronique et dans ce cas pour obtenir les mêmes effets désirés, il doit augmenter toujours plus les doses ingérées. Cette recherche exerce un poids de plus en plus lourd, elle tend à devenir prévalente sur tout le reste. Quand une personne a perdu le contrôle de sa consommation, il s'agit d'alcoolodépendance ou de troubles de la consommation d'alcool ("alcohol use disorders" AUD). Elle continue sa consommation de façon compulsive en dépit de ses effets néfastes. Son intérêt est centré sur l'alcool au détriment des intérêts professionnels et relationnels.

En 1960, Jellinek²⁰ créa l'alcoolologie moderne en définissant l'alcoolodépendance comme une consommation de boisson alcoolique causant un dommage à l'individu et en décrivant avec précision les diverses catégories de buveurs excessifs, les dépendants et les non-dépendants. Cinq types d'alcoolisme ont été répertoriés :

- L'alcoolisme « alpha » : dépendance psychologique uniquement, l'alcool servant à soulager un malaise physique ou émotif.
- L'alcoolisme « bêta » : conduite alcoolique compliquée de symptômes somatiques sans syndrome de dépendance.
- L'alcoolisme « gamma » : perte de contrôle des quantités d'alcool consommées, consommation intermittente.
- L'alcoolisme « delta » : impossibilité de s'abstenir de boire, consommation quotidienne.
- L'alcoolisme « epsilon » : alcoolodépendance périodique de type dipsomaniaque (désir permanent d'absorber des boissons alcoolisées).

Les formes alpha, bêta et epsilon répondent aux critères de « l'abus d'alcool » du DSM 5 (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5^{ème} édition),²¹ les formes gamma et delta, aux critères de « dépendance ». Les types gamma, delta et epsilon sont ceux qui ont besoin d'aide et pour lesquels les traitements contemporains sont encore peu efficaces.

Actuellement, les impératifs de santé publique plaident en faveur d'outils internationaux validés pour faciliter la distinction entre l'abus et la dépendance. L'un des outils les plus utilisés en milieu clinique est le DSM 5. La dépendance se caractérise par un mode d'utilisation inadapté d'une substance conduisant à une altération du fonctionnement ou à une souffrance, cliniquement significative, caractérisé par la présence de deux (ou plus) des manifestations suivantes, à un moment quelconque d'une période continue d'un an :

- 1- La substance est souvent prise en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévue.
- 2- Il existe un désir persistant ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler l'utilisation de la substance.
- 3- Beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir la substance, à utiliser le produit ou à récupérer de ses effets.
- 4- "Craving" ou une envie intense de consommer de la substance.

- 5- L'utilisation répétée de la substance conduit à l'incapacité de remplir des obligations majeures, au travail, à l'école ou à la maison.
 - 6- L'utilisation de la substance malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets de la substance.
 - 7- Les activités sociales, professionnelles ou de loisirs importants sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance.
 - 8- L'utilisation répétée de la substance dans des situations où cela peut être physiquement dangereux.
 - 9- L'utilisation de la substance est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent, susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par la substance.
 - 10- Le développement d'une tolérance de plus en plus importante à la substance.
 - 11- Le sevrage caractérisé par le syndrome de sevrage (défini dans la partie 1.2.5) est soulagé par la consommation de la substance (ou une substance très proche).
- La sévérité des troubles est basée sur le nombre de critères rencontrés : 2-3 critères indiquent un trouble léger ; 4-5 critères, un trouble modéré, et 6 ou plus, un trouble sévère.

1.2.3 La tolérance

En 1955, une étude²² sur le développement de la tolérance a été réalisée sur une période de 13 semaines. Des personnes ont été invitées à consommer quotidiennement de l'alcool en quantité suffisante pour maintenir un état d'intoxication. Au début de l'expérience, tous les sujets augmentèrent leur consommation d'alcool. Après 15 à 20 jours de consommation d'alcool les taux sanguins d'alcool se mirent à chuter et les signes d'intoxication s'amenuisèrent également (Figure 5). Ces résultats sont vraisemblablement la conséquence de deux types de tolérance physique. La tolérance métabolique, c'est le nombre d'enzyme assurant la dégradation de l'alcool qui augmente dans le foie, le sang et le cerveau. L'alcool est métabolisé plus rapidement. La tolérance cellulaire est l'activité des cellules cérébrales qui s'adaptent de sorte à diminuer les signes comportementaux de l'intoxication.¹⁸

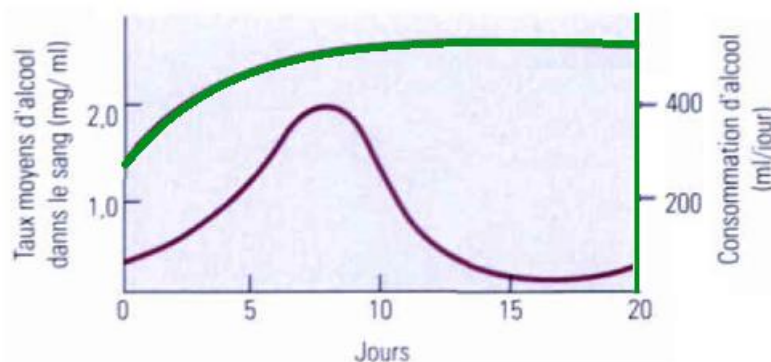


Figure 5 : Etude sur le développement de la tolérance²²

Trois formes de tolérance à l'alcool sont distinguées par Jellinek²⁰:

- La tolérance fonctionnelle aiguë (AFT) peut se développer lors d'une seule consommation d'alcool.
- La tolérance rapide à l'éthanol (RET), caractérisée par le développement de la tolérance, a lieu durant les 8-24 heures après l'exposition à l'éthanol.
- La tolérance chronique à l'éthanol (CET), observée après une exposition à long terme, est généralement développée comme une conséquence de RET.²³

L'alcool éthylique joue sur la membrane cellulaire un rôle majeur. Il peut désorganiser les protéines qui la composent ainsi que le passage des divers éléments qui doivent transiter. Néanmoins, l'organisme réagit, s'adapte et modifie la procédure de la traversée. Il le fait en augmentant le rapport cholestérol / acides gras des phospholipides qui conditionne la fluidité de la membrane. En cas d'absorption aiguë d'alcool éthylique, la membrane devient "hyper fluide", puis elle reprend son état normal lorsque l'alcool éthylique a été éliminé. Dans les cas d'absorption chronique, l'organisme enrichit la membrane en cholestérol et en acides gras, ceci fonctionne tant que les phospholipides de la membrane ne sont pas trop désorganisés. Il se produit alors un phénomène d'une extrême importance : la membrane devient "hyper rigide" et cela a pour effet de rendre plus difficile le passage de l'alcool éthylique. La membrane rigide conserve un fonctionnement relativement normal tant qu'elle se trouve imprégnée par l'alcool éthylique auquel elle s'est adaptée.²⁴ Cette théorie de la fluidité membranaire a été ensuite abandonnée pour laisser la place à des effets beaucoup plus spécifiques de l'alcool notamment au niveau des récepteurs, comme par exemple du récepteur NMDA du glutamate et GABA_A du GABA. En effet, des poches de liaison de l'alcool ont été mises en évidence au niveau de ces récepteurs et par exemple dès la consommation du premier verre et à une concentration aussi faible que 3 mM, un effet potentialisateur de l'alcool a été mis en évidence sur les récepteurs GABA_A.²⁵

1.2.4 La barrière hématoencéphalique (BHE)

Au niveau du cerveau, le passage des substances pharmacologiques à travers les capillaires est bien plus difficile du fait de l'existence d'une barrière hématoencéphalique (BHE). Le cerveau dispose d'un réseau de capillaires très fourni. Les capillaires du cerveau sont imperméables pour de nombreuses substances, une couche de cellules endothéliales accolées les unes aux autres, forment des jonctions serrées, l'espace qui les sépare étant extrêmement étroit, la plupart des substances ne peut pas traverser cet espace. L'oxygène ou le dioxyde de carbone ainsi que les substances liposolubles comme l'alcool peuvent traverser les parois de ces capillaires alors que d'autres comme les acides aminés, le glucose, les lipides doivent être transportés activement à travers ces parois.²⁶ Les grosses molécules ou celles chargées sont tout simplement incapables de traverser la BHE. Cette barrière a un rôle bénéfique, par exemple, l'activité électrique des neurones dépend de la concentration extracellulaire en ions, il est important que ceux-ci ne traversent pas la BHE et ne viennent ainsi bouleverser l'activité électrique du cerveau.¹⁸

En résumé, les substances pharmacologiques doivent être de petite taille, faiblement acides, solubles dans l'eau et dans les graisses et difficilement dégradables pour être potentiellement capables de traverser la BHE.

Un mg d'amphétamine induit un changement comportemental notoire après ingestion, les mêmes effets sont obtenus avec seulement 10 µg si l'amphétamine est injectée directement dans le liquide céphalorachidien. Grâce à la grande efficacité de la BHE, il est difficile de mettre au point de nouvelles substances pharmacologiques pour traiter les pathologies du cerveau. La consommation chronique d'alcool endommage la barrière hématoencéphalique, ce qui est considéré comme un facteur important pour l'amorce de maladies neurodégénératives.²⁷

1.2.5 Le syndrome de sevrage

Chez un sujet accoutumé, des troubles surviennent et peuvent revêtir une extrême gravité si l'alcool est brutalement supprimé. Il s'agit de delirium tremens, associé de sueurs et de tremblements, de déshydratation, de fièvre, de palpitations, d'hyperventilation, d'irritabilité, de troubles du sommeil, d'angoisse, d'anxiété et d'hallucinations. Quand une personne alcoolo-dépendante arrête brutalement sa consommation, ses membranes cellulaires s'avèrent immédiatement incapables de maintenir leurs fonctions physiologiques. En effet, elles sont habituées à se fluidifier en présence d'alcool. L'organisme est alors complètement désorganisé, ce qui est très dangereux. Certains désordres persistent durant une année au moins après l'arrêt de la prise d'alcool. Il s'agit de "mémoire biologique à l'alcool". Leur mémoire conserve les souvenirs agréables liés à la prise d'alcool et par association tous les détails de l'environnement qui leurs sont attachés. Ceux-ci, par la suite, peuvent réveiller l'envie et contribuer à faire rechuter le patient. D'où les grosses difficultés à arrêter pour ces personnes. Les médecins expliquent aux personnes alcoolo-dépendantes, devenues abstinences, que si elles boivent un verre, même après 10 ans d'abstinence, leur fonctionnement cérébral les conduira à reprendre leurs anciennes habitudes de consommation excessive d'alcool sans pouvoir contrôler leur soif inépuisable.

1.2.6 Les effets de l'alcool sur les neurotransmetteurs

Contrairement aux autres drogues, l'éthanol n'a pas de récepteurs spécifiques dans le cerveau, mais agit sur de nombreuses cibles dont il modifie l'activité. Des réactions chimiques ont lieu dans les neurones, particulièrement au niveau des synapses. La présence d'alcool perturbe la transmission de plusieurs signaux nerveux excitateurs et inhibiteurs.¹⁴ L'alcool interfère avec trois principaux récepteurs : les récepteurs GABAergiques, récepteurs NMDA du glutamate et récepteurs dopaminergiques.

1.2.6.1 Les récepteurs GABAergiques

L'alcool, les barbituriques et les benzodiazépines agissent sur une cible commune, les récepteurs GABAergiques. Il existe deux principaux types de récepteurs GABA (acide gamma-amino-butyrique).

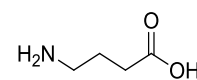


Figure 6 : GABA

Le GABA (Figure 6) a pour effet de diminuer l'activité neuronale en permettant aux ions chlorure de pénétrer à l'intérieur du neurone post-synaptique. Ceux-ci contribuent à rendre le neurone moins excitable. Cet effet physiologique sera amplifié par la fixation d'alcool sur le

récepteur, probablement en permettant au canal ionique de rester ouvert plus longtemps et de faire ainsi entrer plus d'ions chlorure dans la cellule (Figure 7). Puisque, le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur, une augmentation de son effet risque de causer une certaine altération des fonctions cérébrales, comme par exemple un temps réflexe augmenté et des facultés motrices et intellectuelles diminuées d'où l'effet sédatif de l'alcool, les pertes d'équilibre et la survenue d'un possible "coma" éthylique. Le récepteur GABA_A joue un rôle important dans le développement d'une tolérance physiologique à l'alcool. En effet, la consommation chronique de boissons alcoolisées peut amener un changement de conformation des sous-unités des récepteurs du GABA_A. Avec l'habitude, une certaine tolérance peut diminuer l'affinité du récepteur à l'éthanol, la même quantité d'éthanol causerait des effets moindres (Figure 7). Ainsi, par effet sur les récepteurs GABA_A, l'alcool peut amplifier (intoxication aiguë) ou diminuer (intoxication chronique) les effets inhibiteurs des produits sédatifs et hypnotiques au niveau de leurs sites d'action dans le cerveau.

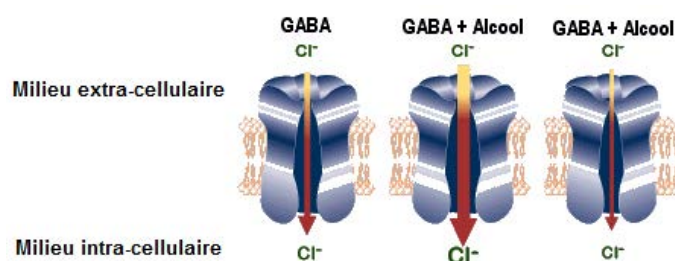


Figure 7 : Récepteurs GABAergiques normaux (gauche) avec intoxication aiguë (milieu) et chronique (droite)

1.2.6.2 Les récepteurs NMDA du glutamate.

Les synapses utilisant le glutamate (Figure 8) comme neurotransmetteur ont plusieurs sous-types de récepteurs. Le récepteur du glutamate spécifique du NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) (Figure 9) est couplé à un canal ionique perméable au calcium qu'il laisse entrer de façon privilégiée dans la cellule. La présence d'alcool réduit le pouvoir excitateur du glutamate sur le récepteur NMDA. Cependant, une consommation chronique d'alcool amène progressivement une "hypersensibilité" des récepteurs NMDA au glutamate.²⁸

Les neurones qui utilisent le GABA et le glutamate comme neurotransmetteurs sont utilisés par plus de 80 % des neurones du cerveau et sont respectivement les systèmes d'inhibition et d'excitation du SNC (Système nerveux central) les plus importants.

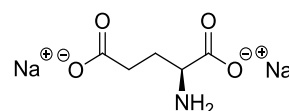


Figure 8 : Glutamate

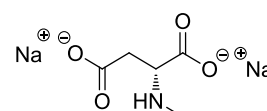


Figure 9 : NMDA

1.2.6.3 La dopamine

La dopamine (Figure 10) est impliquée dans le contrôle du mouvement et de la posture. Elle module aussi l'humeur et joue un rôle central dans le renforcement positif et la dépendance.

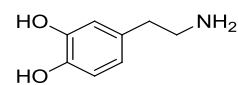


Figure 10 : Dopamine

La dopamine est synthétisée dans les neurones à partir de la tyrosine. La réaction est assurée par deux enzymes : la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme contrôlant la production de L-

DOPA, puis par la DOPA-décarboxylase (DDC) assurant la décarboxylation de cette dernière pour donner la dopamine (Schéma 3).

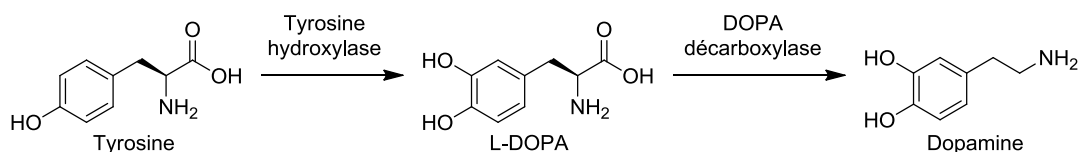


Schéma 3 : Synthèse de la dopamine

La dopamine est un neuromédiateur du plaisir et de la récompense, que le cerveau libère lors d'une expérience qu'il juge "agréable", très utile pour l'apprentissage de ce qui est bon ou mauvais pour l'organisme. La consommation d'alcool aiguë stimule la libération de dopamine dans le noyau accumbens tandis que la consommation chronique d'alcool maintient la concentration en dopamine à un niveau normal et le sevrage diminue le seuil des effets récompensants.²⁹ L'effondrement du système dopaminergique (diminution de la dopamine et de ses récepteurs) pendant l'abstinence est responsable du mal être associé au sevrage et est un facteur important de renforcement dit négatif, poussant le sujet non plus à consommer l'alcool pour ses effets plaisants (renforcement positif), mais pour se soulager de l'état dysphorique.

1.3 Le circuit de la récompense

En 1954, Olds et Milner pratiquent l'implantation d'une électrode de stimulation dans le cerveau d'un rongeur. Lorsque l'électrode est implantée dans le noyau accumbens, ils découvrent que le rongeur s'auto-administre de faibles décharges de courant électrique sans arrêt, sans que ce comportement ne soit lié à la présence de besoins physiologiques apparents (Schéma 4).

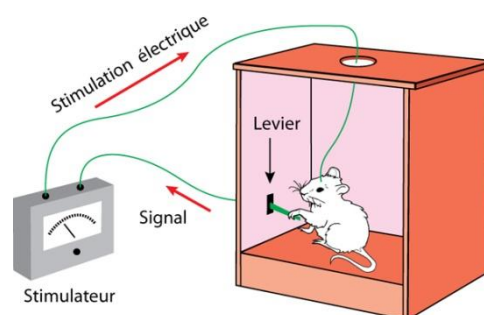


Schéma 4 : Expérience de Olds et Milner³⁰

Parfois, l'animal va préférer se stimuler et négliger de manger, de boire, même de dormir jusqu'à en mourir.³⁰ De nombreuses recherches ont montré l'implication de ces circuits dans les dépendances aux opiacés,³¹ à la cocaïne, aux amphétamines,³² à l'éthanol, à la nicotine, aux cannabinoïdes, à la phéncyclidine (PCP), aux hallucinogènes.^{33, 34, 35} Les substances ayant un pouvoir renforçant activent le circuit de la récompense, provoquant le "rush" recherché par le consommateur.³⁶

Le circuit de la récompense a trois grands rôles « désir – action – satisfaction » (Figure 11). Nos comportements sont influencés par des systèmes de notre cerveau pour nous permettre de répondre aux besoins vitaux de notre corps (manger, boire, se reproduire, se protéger). D'abord, en réponse à un stimulus, la libération de dopamine informe l'organisme de la présence possible d'une récompense et active le circuit de la récompense. Notre cerveau nous motive à l'action pour satisfaire un besoin. Par exemple, la faim nous pousse à nous faire à

manger quand le taux de glucose diminue dans notre sang. Ensuite, cette action sera récompensée par une sensation de plaisir. Il est important de noter que c'est l'action qui est surtout récompensée et pas seulement l'obtention de la récompense. Un sérum peut rétablir votre taux de glucose sanguin, mais il ne vous donnera jamais autant de plaisir qu'un bon repas partagé avec des amis. L'action, qui se traduit souvent par un rituel, est donc à la base même du plaisir ressenti. Enfin, un sentiment de satisfaction vient mettre un terme à l'action, jusqu'à ce qu'un nouveau stimulus vienne redéclencher le circuit.



Figure 11 : Circuit de la récompense

Le noyau accumbens joue certainement un rôle central dans le circuit de la récompense, mais ce sont les neurones de l'aire tegmentale ventrale qui synthétisent la dopamine (en bleu). Le noyau accumbens entretient d'étroites relations avec le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe (Schéma 5).³⁷ Tout d'abord le noyau accumbens juge la motivation de l'action et la valeur du plaisir que l'action peut apporter. Le cortex préfrontal estime les risques qui en découlent pour prendre une décision réfléchie. L'amygdale évalue le caractère sentimental de l'action. L'hippocampe, pilier de la mémoire, s'occupe de conserver les souvenirs agréables liés à la prise de drogue et, par association, tous les détails de l'environnement qui leurs sont attachés. Les autres zones influencent le noyau accumbens par émission de glutamate (en rouge). Si le noyau accumbens considère que l'action peut apporter du plaisir sans risque exagéré, il laissera l'aire tegmentale ventrale synthétiser la dopamine, mais dans le cas contraire, il libèrera du GABA (en vert) qui inhibera l'activité de l'aire tegmentale ventrale et évitera ainsi la libération de dopamine.

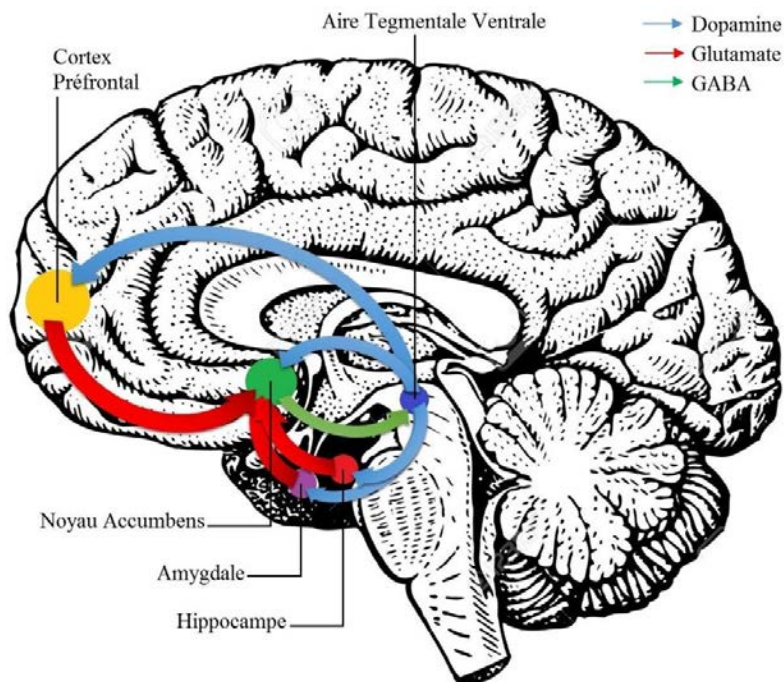


Schéma 5 : Zones du cerveau liées à l'addiction

La consommation chronique d'alcool entraîne une hypersensibilité des récepteurs du glutamate et une désensibilisation des récepteurs du GABA, provoquant une tolérance. Le développement de troubles de l'usage d'alcool dépend à la fois des facteurs génétiques et environnementaux, se produit au fil du temps et nécessite des adaptations neuronales. Dans le cerveau des patients alcoolo-dépendants, l'éthanol induit des changements épigénétiques dans plusieurs régions du circuit de la récompense tels que l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'amygdale.^{38, 39}

D'autres mécanismes sont impliqués dans le circuit de la récompense. Chez les personnes dépendantes à l'alcool, il existe un déséquilibre entre l'endorphine et de leur récepteur opioïde μ . La voie endorphine-récepteur μ est hypoactivée. L'endorphine libérée après la consommation d'alcool est impliquée dans le plaisir et les effets euphorisants. L'endorphine est un neuropeptide de la même famille chimique que celle de la dynorphine.

1.4 L'adaptation de type «anti-récompense»

Un effet important de l'alcool à prendre en compte dans l'alcoolodépendance est que l'éthanol est un anxiolytique. Chez les personnes dépendantes à l'alcool, la dynorphine est surexprimée lors de la consommation d'alcool (Schéma 6). La dynorphine est un peptide agissant comme un neurotransmetteur sur les récepteurs opiacés κ , sans toutefois être chimiquement apparentée aux composés de l'opium. Le renforcement de la voie dynorphine-récepteur κ est un mécanisme en opposition au circuit de la récompense, que le cerveau met en place pour lutter contre les effets de la consommation chronique d'alcool. La dynorphine inhibe la libération de dopamine et oblige une augmentation de la consommation, pour arriver à la même sensation de plaisir, ce qui explique les propriétés de renforcement de l'alcool. Ce renforcement contribue à l'état émotionnel négatif et à l'anxiété. Le patient ressent alors un mal-être en l'absence d'alcool.

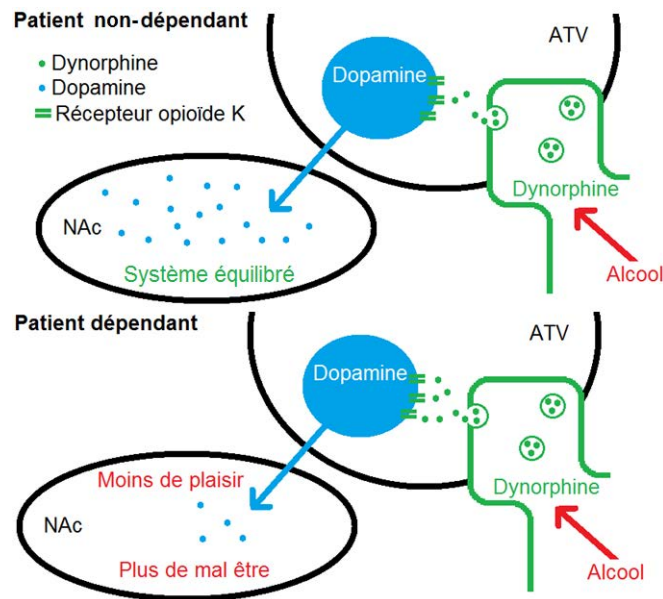


Schéma 6 : Mécanisme «anti-récompense»

Une étude sur des rats a démontré que l'anxiété est un facteur favorable au développement de l'addiction à l'alcool.⁴⁰ Pour réduire cette anxiété, les personnes dépendantes ont tendance à pratiquer "l'automédication".²³ Ils consomment de l'alcool pour se soulager de leur mal-être. En raison de ce déséquilibre, le patient n'arrive pas à retrouver un mieux-être permanent. Il est alors obligé de continuer à boire. Parallèlement, le cortex préfrontal perd son rôle de gendarme dans le circuit de la récompense, ce qui favorise ainsi la prise répétée d'alcool. La motivation à consommer l'emporte sur le contrôle de sa consommation.

Plusieurs études impliquent le facteur de transcription CREB (protéine liant l'AMPc) et l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) dans ces mécanismes neuronaux permettant d'expliquer les liens avec les mécanismes épigénétiques.^{41, 42}

1.5 Les traitements de l'alcoolodépendance

Malgré les « fardeaux » sanitaire et social que constituent les troubles liés à la consommation d'alcool, un faible nombre de patients est en recherche de traitement et moins de 10 % bénéficient de soins spécialisés. En effet, l'objectif du traitement a longtemps été d'atteindre l'abstinence définitive, décourageant un certain nombre de personnes à démarrer les soins. La réduction de la consommation d'alcool proposée depuis quelques années est plus facilement acceptable pour les consommateurs excessifs. La plupart des personnes dépendantes ne souhaitant pas devenir abstinentes dans un premier temps. Le but est alors de revenir à une consommation "contrôlée".¹⁴ Certains traitements sont proposés et décrits, par la suite.

1.5.1 Acamprosate (Aotal[®])

Le sel calcique d'acamprosate est utilisé en France et dans d'autres pays depuis 1989. Le médicament a été approuvé par la FDA en 2004. L'acamprosate (Figure 12) possède une ressemblance structurale avec le GABA. C'est un agoniste GABAergique se fixant aux récepteurs GABA qui faciliterait la récupération de la transmission GABAergique. Il diminue la transmission des récepteurs NMDA du glutamate et ainsi module l'hyperexcitabilité neuronale pendant le sevrage à l'alcool.⁴³ Il possède un groupement acétate permettant son passage à travers la barrière hématoencéphalique.

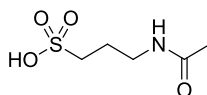


Figure 12 : Acamprosate

1.5.2 Naltrexone (Revia[®])

La naltrexone (Figure 13) est un inhibiteur des opiacés à longue durée d'action qui s'administre par voie orale. Celui-ci a été approuvé par la FDA en 1984 dans le traitement de l'alcoolisme chronique. Il diminue la fréquence et la sévérité des rechutes de la consommation d'alcool en diminuant le "craving". Il agit en réduisant la libération de dopamine dans les voies de la récompense dans l'aire tegmentale ventrale et le noyau accumbens. Une étude récente a rapporté des effets favorables de la naltrexone sur les gros buveurs. Dans la majorité des études, la naltrexone réduit de manière significative les taux de consommation chez les gros buveurs de 30-60 %. Il réduit de manière significative l'envie de boire, l'abstinence est maintenue dans 25-35 % des cas.⁴⁴

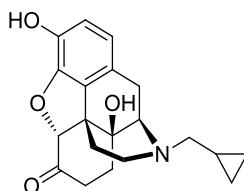


Figure 13 : Naltrexone

L'Inserm a mis en place une étude avec une équipe hollandaise, 108 patients alcoolo-dépendants ont été traités soit avec de l'acamprosate, soit de la naltrexone en fonction du polymorphisme (variations de séquences) de sept gènes candidats, codant pour des récepteurs de dopamine, d'opioïde, du glutamate ou de GABA. Les résultats montrent que l'efficacité de chaque traitement est effectivement dépendante d'une combinaison de polymorphismes génétiques.⁴⁵ La pharmacogénomique permettrait de connaître le traitement correspondant à chaque patient en raison de la variabilité individuelle aux réponses épigénétiques.⁴⁶ Les effets du naltrexone s'exercent grâce à des caractéristiques génétiques associées au système de renforcement positif (dopaminergique / opioïdergique) tandis que l'acamprosate fonctionne à travers le système de renforcement négatif (glutamatergique / GABAergique). Les patients caractérisés par des indicateurs de renforcement positif devraient bénéficier de la naltrexone, alors que les patients caractérisés par des indicateurs de renforcement négatif devraient

bénéficier d'acamprosate.⁴⁷ L'acamprosate et la naltrexone seraient des médicaments plus efficaces dans le traitement de l'alcoolodépendance, si l'information génétique était utilisée pour déterminer le traitement correspondant le mieux aux différents patients.⁴⁵

1.5.3 Nalméfène (Selincro®)

Le nalméfène développé dans les années 1970 (Figure 14) a obtenu son AMM en 2013 en France bien qu'ayant été approuvé par la FDA en 1995. C'est un dérivé opiacé similaire à la naltrexone par sa structure et son activité. Ses avantages par rapport à la naltrexone sont sa demi-vie plus longue et une plus grande biodisponibilité par voie orale.⁴⁸

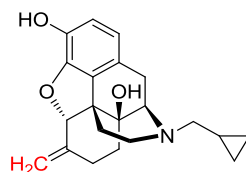


Figure 14 : Nalméfène

Le nalméfène est un modulateur du système opioïde, agoniste partiel des récepteurs opioïdes κ (Schéma 7). Son affinité pour ces récepteurs est plus importante que celle de la naltrexone. Le nalméfène est utilisé pour diminuer la consommation d'alcool des personnes dépendantes.

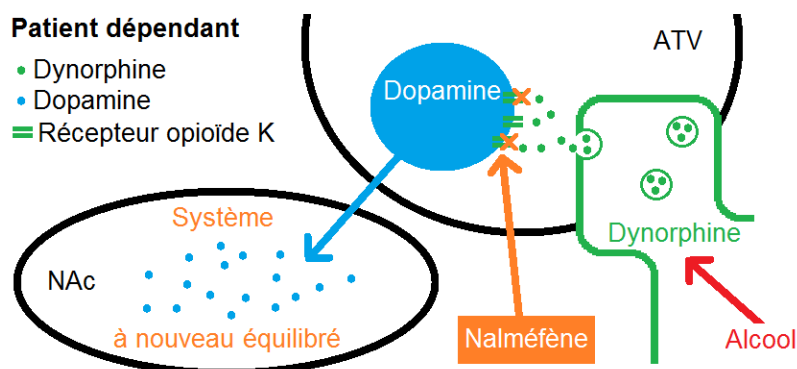


Schéma 7 : Les effets du nalméfène

1.5.4 Disulfirame (Esperal®)

Le disulfirame (Figure 15) a été approuvé par la FDA en 1951 comme une thérapie par l'aversion à l'alcool.

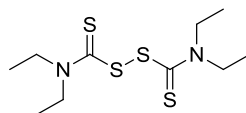


Figure 15 : Disulfirame

Le disulfirame a un effet antabuse, il permet d'associer une sensation de dégoût à l'absorption d'alcool. Il bloque l'action de l'acétaldéhyde déshydrogénase, empêchant le métabolisme rapide de l'acétaldéhyde par oxydation en acide acétique (Schéma 8). Ainsi,

quand un patient ingère du disulfirame et de l'alcool même en petites quantités, l'accumulation d'acétaldéhyde entraîne des nausées et des vomissements qui sont les conséquences de la "gueule de bois". Ces symptômes ont un effet dissuasif à l'ingestion d'alcool.

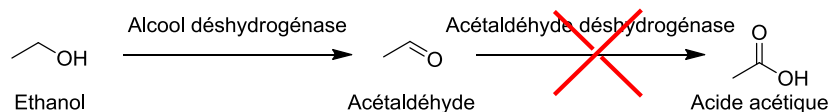


Schéma 8 : Blocage de l'oxydation de l'alcool au stade de l'acétaldéhyde

Le disulfirame est un médicament ancien, longtemps hors de la protection des brevets et pas cher. Celui-ci peut être facilement utilisé avec l'acamprosate et la naltrexone pour améliorer leurs efficacités. Pourtant, depuis l'émergence de la naltrexone et de l'acamprosate, il y a eu un déclin dans l'utilisation du disulfirame. De nombreux patients alcoolodépendants consomment de l'alcool même lorsqu'ils prennent du disulfirame ce qui cause des dommages allant jusqu'au décès. Par ailleurs, comme il contient du soufre, il donne mauvaise haleine.

L'acamprosate et la naltrexone refrènent l'envie de boire et sont une aide au maintien de l'abstinence. Le nalméfène est utilisé pour diminuer les excès de consommation. Enfin, le disulfirame agit sur le principe de dissuasion en provoquant des réactions désagréables lors de la consommation d'alcool.⁴⁴ De façon générale, l'addiction à l'alcool est une maladie chronique et hautement récidivante qui nécessite un suivi à vie par un addictologue ou un psychologue.¹⁴

1.6 Les autres traitements et voies thérapeutiques à l'étude

De nouvelles stratégies pour le traitement de la dépendance à l'alcool sont attendues de façon pressante. Face au problème grandissant de l'alcoolodépendance, trouver un nouveau traitement est un défi actuel.

1.6.1 Baclofène

Le baclofène (Figure 16), à l'origine commercialisé sous le nom de Lioréal[®], est un dérivé aromatique halogéné de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), connu depuis les années 1970 comme myorelaxant.

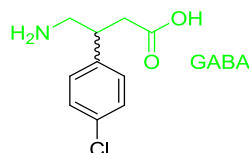


Figure 16 : Baclofène

C'est un agoniste du récepteur GABA_B, contrairement aux autres médicaments utilisés dans l'addiction qui agissent sur le récepteur GABA_A (Figure 17).⁴⁹ Bien qu'approuvé par la FDA en 1977 dans le traitement de l'alcoolodépendance, en France, le baclofène a reçu, en mars 2014, une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé).

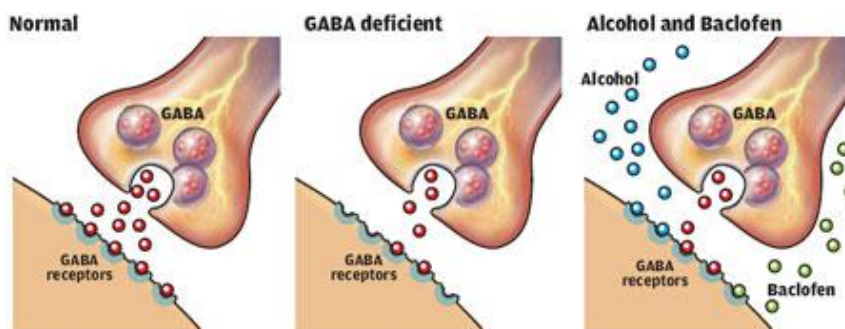


Figure 17 : Effet du baclofène sur les récepteurs GABA⁴⁹

Le baclofène supprimerait complètement chez la personne dépendante la montée du « craving », ce besoin irréprensible de boire. D'une intensité comparable à la sensation de soif ou de faim, cette pulsion est court-circuitée par la molécule dans le cerveau du malade qui devient alors indifférent à l'alcool. En supprimant ce besoin, la personne est alors libre de boire (comme une personne non-dépendante) ou de ne pas boire (par désintérêt total). Cette indifférence à l'alcool est une notion nouvelle et innovante dans le domaine. Pour faciliter le sevrage de l'alcool, de fortes doses doivent être administrées, laissant penser que le sujet devra ensuite se sevrer du baclofène.

1.6.2 GHB (Alcover®)

L'acide 4-hydroxybutanoïque ou gamma-hydroxybutyrate de sodium ou GHB (Figure 18) est un psychotrope dépressif, utilisé à des fins médicales. Découvert par les laboratoires Balmer & CO, il est produit physiologiquement dans le cerveau des mammifères et sa structure chimique est très proche de celle du neurotransmetteur GABA.

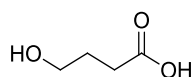


Figure 18 : GHB

Il a été utilisé dans les années 1960 comme anesthésique hypnotique. Agoniste du récepteur GABA_B, il inhibe temporairement la libération de dopamine. Le sodium oxybate, le sel de sodium du GHB a été approuvé par la FDA en 2002. Il est utilisé en Italie (depuis 1991) et en Autriche (depuis 1999) dans le traitement de l'alcoolodépendance pour la prévention du syndrome de sevrage et au maintien de l'abstinence chez le sujet alcoolodépendant sous le nom d'Alcover® avec de bons résultats. En France, il n'a pas encore d'AMM, mais fait l'objet d'études.⁵⁰ Après le sevrage de l'alcool, le sujet devra probablement se sevrer du GHB.

1.6.3 Les autres traitements à l'étude

Des inhibiteurs de recapture de la sérotonine, la sertraline et la fluoxétine (Figure 19), utilisés habituellement comme antidépresseurs, ont montré une réduction de la consommation d'alcool.⁵¹

Le récepteur de la dopamine D1 est impliqué dans les comportements addictifs. Un antagoniste de celui-ci, l'halopéridol (antipsychotique) (Figure 19), a réduit les effets stimulants et euphoriques de l'alcool chez les buveurs sociaux et diminué l'envie chez les alcooliques prétraités.⁵²

Un agoniste des récepteurs A2A, le CGS-21680 (Figure 19) a permis une réduction de 75 % de la consommation chez des rats alcooliques dans un modèle préclinique de dépendance à l'alcool. La voie adénosinergique est une cible potentielle pour traiter l'alcoolodépendance.⁵³

Le traitement de l'addiction à l'alcool par stimulation transcranienne par courant continu (tDCS) pourrait être une alternative intéressante à la pharmacothérapie.⁵⁴

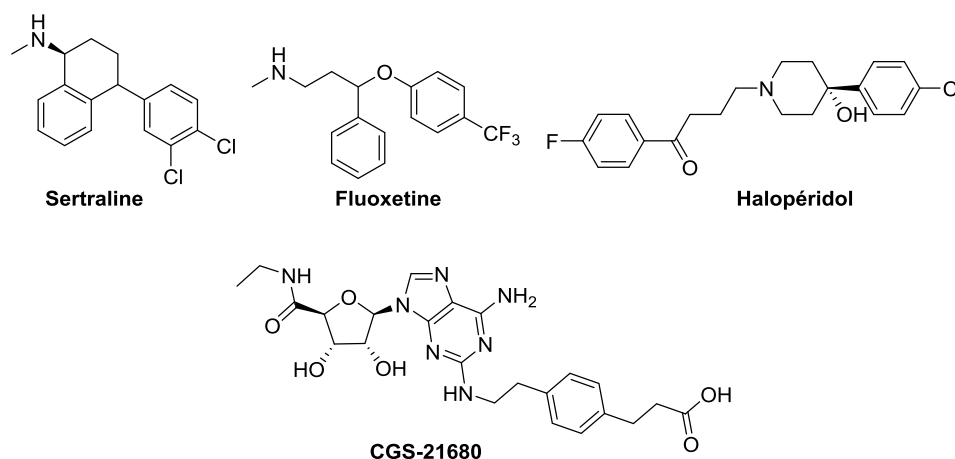


Figure 19 : Les molécules étudiées

Les médicaments sont peu nombreux et d'une efficacité indéniable, mais globalement modeste. Un an après avoir commencé le traitement, un tiers des patients restent abstinents et au bout de quatre ans seulement 10 % sont encore abstinents. Les médicaments agissent au niveau du cerveau en compensant certaines perturbations induites par l'alcool. Un traitement efficace contre la dépendance à l'alcool devrait rétablir les changements stables dans la plasticité neuronale et changer le comportement à long terme. Les mécanismes impliqués pourraient être des mécanismes épigénétiques. Les enzymes étudiées dans les mécanismes épigénétiques semblent avoir un grand potentiel pour bloquer le comportement addictif.

2. L'épigénétique

Un nouveau champ d'investigation est l'étude des modifications épigénétiques. Ces modifications interviennent sur l'expression des gènes.⁵⁵ L'épigénétique joue un rôle dans l'alcoolodépendance.⁴⁶ Le remodelage de la chromatine provoque des changements dans l'expression génique dans des régions cérébrales spécifiques qui contribuent à la tolérance et la dépendance créées par une consommation chronique d'alcool. Des recherches intensives visent à identifier les neuroadaptations à long terme telles que les modifications dans l'expression des gènes créées par l'abus des drogues.

2.1 Généralités

L'épigénétique est l'ensemble des mécanismes moléculaires ayant un lien avec le génome et la régulation de l'expression des gènes. Ces mécanismes peuvent être influencés par l'environnement et l'histoire individuelle. Ainsi, les modifications épigénétiques sont potentiellement transmissibles d'une génération à l'autre, sans altération des séquences primaires de l'ADN et ceci avec un caractère réversible. Ce terme est apparu en 1942 aux Etats-Unis par le biologiste Conrad Waddington (1905-1975) pour nommer : « La branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits. ». La question de savoir dans quelle mesure nous sommes préprogrammés ou façonnés par l'environnement continue de susciter des controverses, mais attire également de plus en plus de chercheurs pour qui l'ADN n'est plus le seul maître de l'hérédité.⁵⁵ Toutes les cellules d'un même organisme ont le même patrimoine génétique, pourtant l'expression des gènes de ces cellules peut être différente. De façon plus saisissante, la chenille et son papillon ont deux morphologies très distinctes, néanmoins, pendant la métamorphose, l'ADN de la chenille n'a pas changé.

Chez les humains, les vrais jumeaux n'ont pas les mêmes empreintes digitales bien que génétiquement identiques. Une étude a été menée sur des jumeaux génétiquement identiques ou monozygotes. Une fois adultes, leurs vies et leurs personnalités ont divergé : à la trentaine, après des épisodes d'hallucinations et d'illusions, l'un d'entre eux a été reconnu schizophrène. Bien que partageant le même patrimoine génétique, des jumeaux monozygotes peuvent présenter des différences notoires.⁵⁶

La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones de plusieurs jumeaux monozygotes ont été étudiés, il s'avère que les jumeaux sont indiscernables épigénétiquement pendant les premières années de leurs vies, mais âgés, ils présentent des différences notables dans la répartition de la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, affectant l'expression de leurs gènes.⁵⁷

En 1945, une étude a été menée à l'université de Colombia visant à analyser les effets de la famine aux Pays Bas sur les nouveaux nés conçus durant cette période. Les chercheurs ont constaté que les bébés avaient en grande majorité de faible poids à la naissance. Plus surprenant, les bébés de ces derniers avaient eux aussi un poids inférieur à la moyenne. En conclusion, les effets de la famine se seraient transmis aux petits enfants.⁵⁵

L'information environnementale peut être héritée de façon transgénérationnelle au niveau du comportement, neuroanatomique et épigénétique. Une étude récente a révélé que les souvenirs de peur peuvent être transmis à travers les générations.⁵⁸

2.2 L'ADN

La molécule d'ADN est bicaténaire, constituée par l'association de deux brins, unis l'un à l'autre par l'intermédiaire de liaisons hydrogène associant les bases puriques et pyrimidiques de chacune des deux chaînes. L'appariement des bases se fait de manière complémentaire : l'adénine est complémentaire à la thymine et la cytosine est complémentaire à la guanine (Figure 20). Ces brins d'ADN sont constitués de bases nucléiques liées les unes aux autres par des groupements phosphates, ainsi la surface extérieure du brin est chargée négativement.

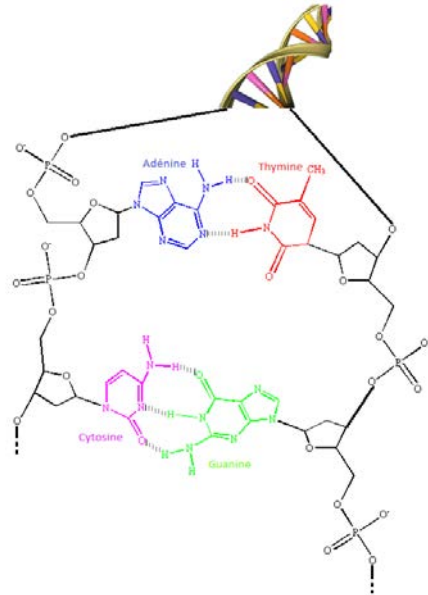


Figure 20 : Structure de l'ADN

2.3 Les chromosomes

Chaque cellule humaine possède 22 paires de chromosomes et une paire de chromosomes sexuels, soit un total de 23 paires. L'ADN compactée forme deux chromatides sœurs qui sont rattachées au niveau du centromère. Les extrémités du chromosome sont appelées télomères (Figure 21).

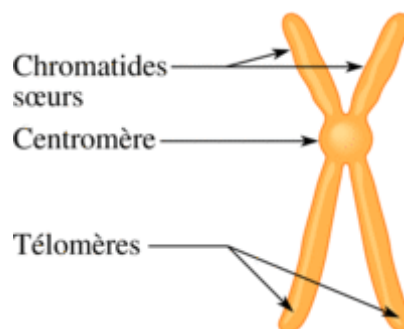
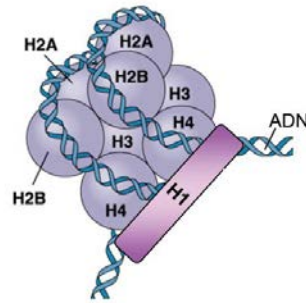


Figure 21 : Les différentes parties d'un chromosome

2.4 La chromatine

L'ADN n'est jamais nue, elle est toujours associée à des protéines appelées histones, l'ensemble constituant la chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome (Figure 22).⁵⁵ La double hélice d'ADN s'enroule 1,6 fois autour de cet octamère d'histones composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4.⁵⁵ La chromatine est organisée en une structure en collier de perles, appelée l'euchromatine.^{59, 60}

Figure 22 : Représentation d'un nucléosome⁵⁵

Il y a 4 à 5 niveaux superposés de condensation de la chromatine : l'euchromatine de 11 nm comporte une condensation de l'ADN d'environ sept fois. L'euchromatine de structure globalement décondensée contient l'ADN active ou transcriptible, susceptible d'être exprimée en protéines. Grâce au concours, d'une autre protéine, l'histone H1, et de modifications épigénétiques, des états chromatiniens encore plus condensés peuvent se former. Les nucléosomes s'agrègent ensuite en une fibre plus dense, l'hétérochromatine.⁶¹ La super structure de l'euchromatine par enroulement en solénoïde forme l'hétérochromatine : compaction supplémentaire d'au moins huit fois. L'hétérochromatine forme des boucles condensées en microconvules avec un facteur de condensation de 30 à 40 fois. A cela s'ajoute la disposition en spires serrées des microconvules, une condensation supplémentaire d'environ cinq fois pour obtenir la condensation normale des chromosomes (Schéma 9).⁶²

En définitive, la condensation de l'ADN dans le chromosome atteint la valeur d'environ 8 500 à 11 000 fois. Ainsi 2 m d'ADN peuvent être contenus dans les chromosomes dont l'ensemble, chez l'homme, mesure au maximum 10 μ m soit l'équivalent de 15 km de spaghettis dans un ballon de basket.

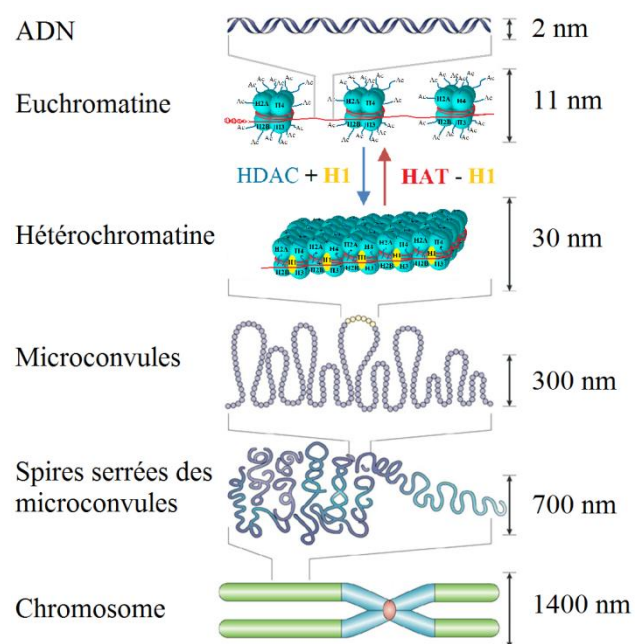


Schéma 9 : Les fibres chromatiniennes

L'hétérochromatine est composée de l'hétérochromatine constitutive et de l'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine constitutive renferme des séquences d'ADN non-codantes incluant les séquences satellites, répétées et parasites qui restent invariablement silencieuses. En revanche, l'hétérochromatine facultative est constituée de régions d'euchromatine qui ont été converties en hétérochromatine.⁵⁵

Le cycle cellulaire est composé de plusieurs phases de croissance dans lesquelles la structure de la chromatine est condensée ou libre (Figure 23). Pendant l'interphase, les phases G1, S et G2, la cellule grossit et l'ADN va être entièrement dupliqué, grâce à l'ADN polymérase. La chromatine est libre dans le noyau durant cette période, les modifications épigénétiques sont alors possibles. Au début de la mitose, la fibre de chromatine se condense en structures très ordonnées et individualisées pour former les chromosomes, les modifications épigénétiques ne sont plus possibles. Ainsi le matériel génétique est strictement séparé avec la transmission des mêmes modifications épigénétiques aux deux cellules filles. La structure compacte des chromosomes est alors libérée de ses contraintes pour que l'ADN puisse être à nouveau transcritible.

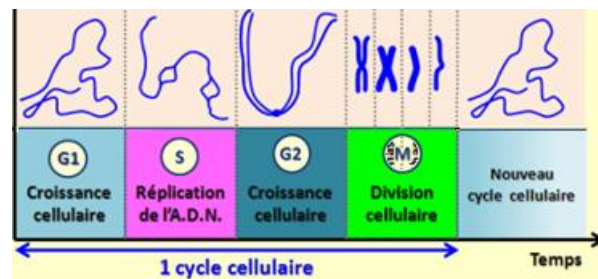


Figure 23 : Etat des chromosomes durant le cycle cellulaire

L'ensemble des modifications épigénétiques est gouverné par des enzymes spécifiques et affecte directement ou indirectement la compaction de l'ADN. L'expression des gènes pourrait être régulée en contrôlant l'état de la chromatine.⁵⁵

2.5 L'expression des gènes

Les gènes sont exprimés à la suite de différents mécanismes qui permettent la formation de protéine codée selon l'information génétique. La première étape dans le noyau cellulaire est la transcription. C'est le mécanisme qui permet de dupliquer l'ADN en ARN (acide ribonucléique) (Figure 24).

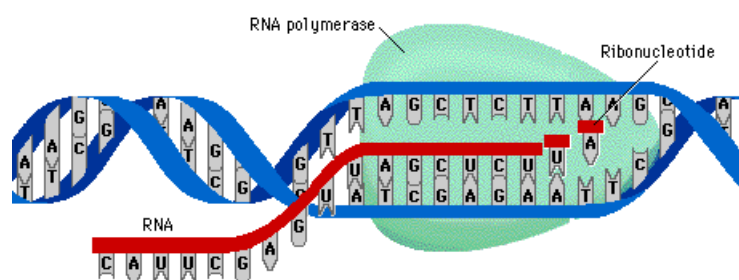


Figure 24 : Les fibres chromatinienne

Le processus de transcription se déroule en trois phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.⁵⁶

Initiation : L'ARN polymérase se fixe au promoteur du brin d'ADN, à l'aide des facteurs de transcription. Il existe deux types de facteurs de transcription : les activateurs augmentent l'expression génétique, les répresseurs, aussi appelés insulateurs, diminuent l'expression génétique.

Élongation : L'ARN polymérase va se déplacer jusqu'au lieu de la transcription et commencer l'addition séquentielle des ribonucléotides pour former l'ARN pré-messager.

Terminaison : L'ARN polymérase est libérée après avoir reconnu un signal spécifique dans le code ADN.

Après la transcription, se déroule la maturation de l'ARN. L'ARN pré-messager possède des séquences codantes (Exons) et des séquences non codantes (Introns) (Schéma 10). Seuls les exons participent à la biosynthèse des protéines. L'ARN pré-messager subit une opération d'épissage qui consiste en l'excision des introns par un complexe nucléoprotéique (le spliceosome), les exons quant à eux sont reliés par la suite pour former l'ARNm (messenger). Un ARN pré-messager peut subir deux épissages différents. Ce phénomène est appelé épissage alternatif et permet d'augmenter le nombre de possibilités d'ARNm, donc de protéines produites.

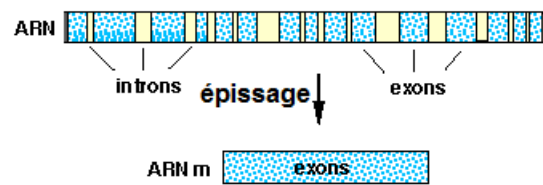


Schéma 10 : L'épissage

Ensuite, cet ARNm sera traduit à l'extérieur du noyau en protéines. Lors de la traduction, les ribosomes se chargent d'ajouter les acides aminés les uns après les autres à la protéine en cours de fabrication d'après le code lu sur les codons (séquences de trois bases nucléotides). Le gène s'exprime par l'intermédiaire de ceux-ci. Chaque codon peut coder soit pour l'un des 20 acides aminés, soit pour l'initiation, soit pour l'arrêt de la séquence codante.

2.6 Les différentes modifications épigénétiques

2.6.1 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le signal épigénétique le mieux connu en association à une répression transcriptionnelle. Toutes les bases de l'ADN peuvent être méthylées, mais la cytosine est la seule à être méthylée dans l'ADN humain. Les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) utilisent le *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) comme substrat pour catalyser le transfert d'un groupement méthyle sur la cytosine avec formation de la cinquième base nucléique, la 5-méthylcytosine et de la *S*-adénosyl-L-homocystéine (SAHC) (Schéma 11).⁶³

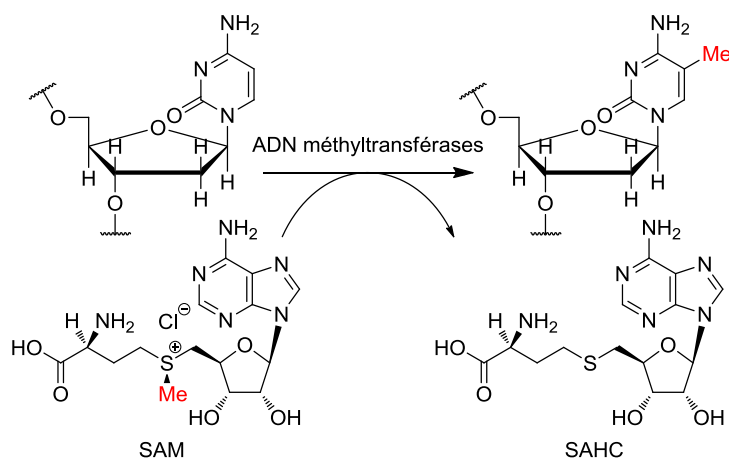


Schéma 11 : Méthylation de l'ADN par les DNMT

La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont deux mécanismes travaillant de concert pour remodeler la structure de la chromatine et réguler l'expression des gènes.⁶⁴

2.6.2 Le code des histones

Toutes les histones subissent des modifications post-traductionnelles, qui se produisent principalement au niveau des queues des histones.⁶⁵ Les principales sont représentées dans la figure 25 : les méthylations en rouge, les phosphorylations en jaune, les ubiquitinations en vert et les acétylations en bleu.⁶⁶ La numérotation en gris en dessous de chaque acide aminé donne sa position dans la séquence.

Figure 25 : Ensemble des modifications possibles sur les histones⁶⁵

Ces modifications s'influencent mutuellement en cis sur une même queue d'histone, mais aussi en trans entre différentes histones d'un même nucléosome ou de domaines nucléosomiques distincts,^{67, 68} constituant un code, le code des histones encore appelé "épigénome".^{69, 70} Selon l'hypothèse du code des histones, chaque combinaison de modifications conduirait à une réponse biologique spécifique, en créant par exemple un site

de liaison pour une autre protéine. La fixation de certaines protéines peut être empêchée ou même inversée par les modifications de résidus adjacents. Etant donné la grande diversité des modifications possibles, le nombre de combinaisons potentielles sur un nucléosome composé d'un octamère d'histones est extrêmement élevé. Les différentes modifications peuvent interagir entre elles et rendre ainsi plus complexe la lecture du code. Une modification sur un site peut influencer la capacité d'un autre site à être modifié, de manière synergique ou au contraire antagoniste.^{71, 72}

2.6.3 La méthylation des histones

La méthylation des histones s'effectue sur les résidus lysine ou arginine. Contrairement à d'autres modifications épigénétiques, elle peut être associée à l'activation ou à la répression de la transcription selon la position du résidu affecté et la nature de la modification.⁷³ En effet, il existe trois degrés différents de méthylation : la mono-, la di-, et la tri-méthylation.⁷⁴ Seules les lysines peuvent être triméthylées.

La réaction consiste en un transfert du groupement méthyle porté par la *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) sur la fonction amine de la lysine ou de l'arginine. La méthylation des histones est catalysée par trois familles d'histones méthyltransférases qui ne sont pas toutes spécifiques des histones : les protéines arginines méthyltransférases (PRMT) qui peuvent comme leur nom l'indique méthyler des arginines, les histones méthyltransférases (HMT) sont des enzymes qui catalysent la méthylation des lysines et les méthyltransférases associées aux membranes (Schéma 12).⁷⁵

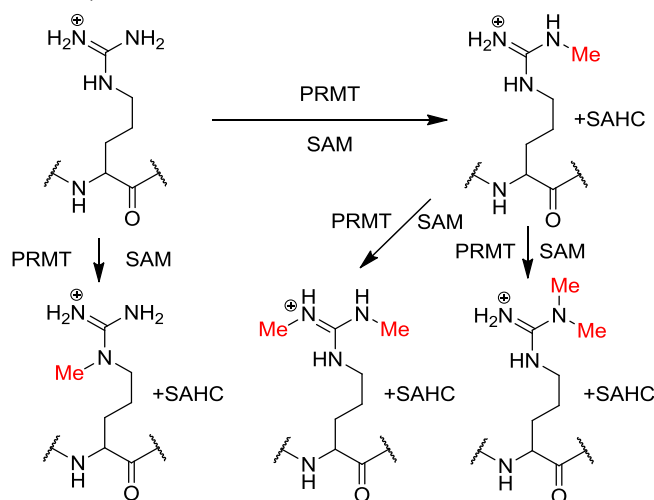


Schéma 12 : Méthylation d'un résidu arginine

La méthylation des résidus lysine joue souvent un rôle, mais non exclusivement, dans la formation de l'hétérochromatine alors que la méthylation des résidus arginine semble avoir un effet positif sur la transcription (Schéma 13).^{75, 76}

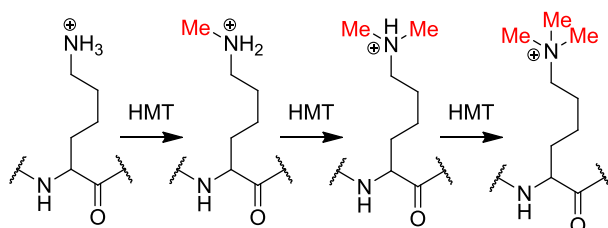


Schéma 13 : Méthylation d'un résidu lysine

Le nombre de groupements méthyles présents sur un même résidu lysine peut mener à différents types de réponses, augmentant ainsi la complexité du code des histones. Ces phénomènes de méthylation sont réversibles grâce aux histones déméthylases (HDM).⁷⁷

2.6.4 La phosphorylation

La phosphorylation des histones s'effectue par un transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur les résidus sérine ou thréonine avec l'aide de protéine kinase. Elle est impliquée dans l'activation de la transcription.

La phosphorylation de la sérine 10 de la queue *N*-terminale de l'histone H3 est cruciale pour la condensation des chromosomes et la progression du cycle cellulaire durant la mitose.⁷⁸

2.6.5 L'ubiquitination

L'ubiquitine, une protéine composée de 76 acides aminés portant dans sa partie terminale un résidu glycine, va se lier par covalence au résidu lysine de la partie *N*-terminale de l'histone. Cette modification est dynamique et réversible.⁷⁹ L'ajout de plusieurs copies d'ubiquitine est très souvent lié à la dégradation par le protéasome de la protéine modifiée. Dans le cas des histones, elle implique une simple mono-ubiquitination non dégradative. Elle aurait un rôle dans la spermatogenèse, la réponse au stress, ainsi que dans la formation de l'hétérochromatine et dans la régulation de la transcription.⁸⁰

2.6.6 L'acétylation

L'acétylation implique des enzymes telles que les histones acétyltransférases (HAT) qui transfèrent un groupement acétyle vers le groupement NH_3^+ d'un résidu lysine situé dans la partie *N*-terminale de l'histone (Schéma 14), ainsi la charge positive de la lysine est neutralisée et les contacts avec l'ADN chargée négativement diminuent.⁸¹

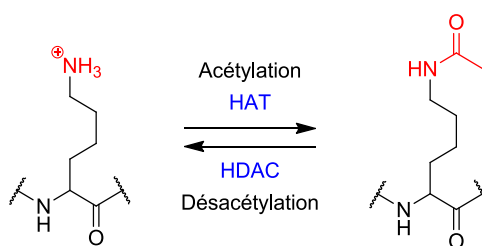


Schéma 14 : Acétylation d'un résidu lysine

Les HAT sont divisées en deux groupes : les HAT de type A sont nucléaires et responsables de l'acétylation des histones nucléosomales et les HAT de type B sont cytoplasmiques et responsables de l'acétylation des histones néosynthétisées avant le transport dans le noyau et l'incorporation dans la chromatine.⁸² Une hyperacétylation des histones par HAT permet la décondensation de l'hétérochromatine en euchromatine qui est la chromatine composée d'ADN accessible aux facteurs de transcription ou transcritible.

Les histones désacétylases (HDAC) désacétylent les résidus lysine, ainsi le groupement ammonium est reformé et permet la condensation de la chromatine, l'ADN n'est plus accessible aux facteurs de transcription. La transcription est désactivée. Les HDAC transforment l'euchromatine en hétérochromatine. L'hyperacétylation conduit à une augmentation de l'expression de gènes et à l'opposé l'hypoacétylation réprime cette expression (Schéma 15).⁶¹

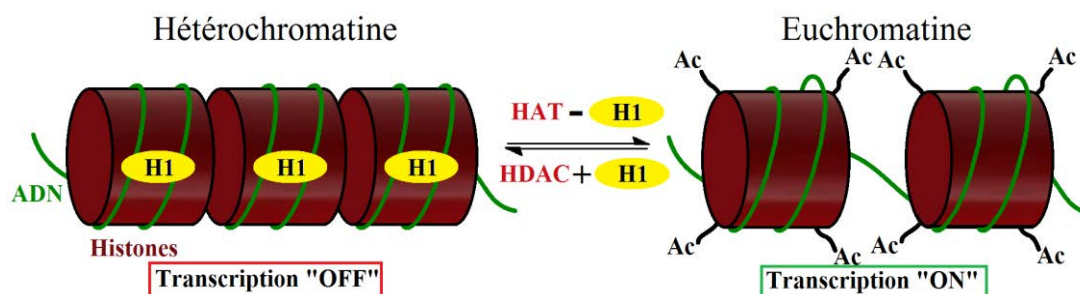


Schéma 15 : Équilibre chromatine condensée / décondensée

2.6.7 Les HDAC

Les protéines d'HDAC chez l'homme comprennent 18 isoformes qui sont répertoriées en quatre classes sur la base de leur taille, leur localisation cellulaire, le nombre de sites actifs catalytiques et leur homologie avec la levure Rpd3 pour la classe I et la levure Hda1 pour les classes II et IV. Onze HDAC « classiques », de la classe I, II et IV contiennent du zinc (Zn^{2+}) dans leur site catalytique,⁸³ tandis que les HDAC de la classe III sont nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+)-dépendantes, généralement appelées sirtuines (SIRT) en raison de leur homologie avec Sir2 chez la levure. Les sirtuines nécessitent la présence d'un cofacteur, NAD^+ .⁸⁴

Les enzymes de la classe I sont localisées principalement dans le noyau cellulaire et agissent majoritairement sur la transcription. Les HDAC1 et 2 sont présentes dans le noyau tandis que HDAC3 possède une séquence NES qui permet son exportation du noyau vers le cytoplasme. Les HDAC de classe I sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la survie.⁸⁵

La classe II est constituée de six protéines d'HDAC qui se subdivisent en deux sous-classes. La classe IIa comprend HDAC4, 5, 7 et 9, qui contient chacune un seul site catalytique actif. La classe IIb comprend HDAC6 et HDAC10, qui contiennent, deux sites catalytiques actifs seulement pour HDAC6 (Figure 26).⁸³ HDAC6 est principalement située dans le cytoplasme.

La HDAC11 serait étroitement liée aux HDAC3 et 8, suggérant qu'elle pourrait être plus proche des HDAC de la classe I que de celles de la classe II. Cependant, la classification de HDAC11, n'a pas encore été déterminée, puisque son homologie de séquence avec d'autres HDAC est limitée. C'est la seule à appartenir à la classe IV.

Le domaine catalytique de la classe I est en rose, celui de la classe IV en bleu, celui de la classe II en vert. Les séquences en noire permettent l'exportation du cytoplasme vers le noyau (SLN).^{83, 86}

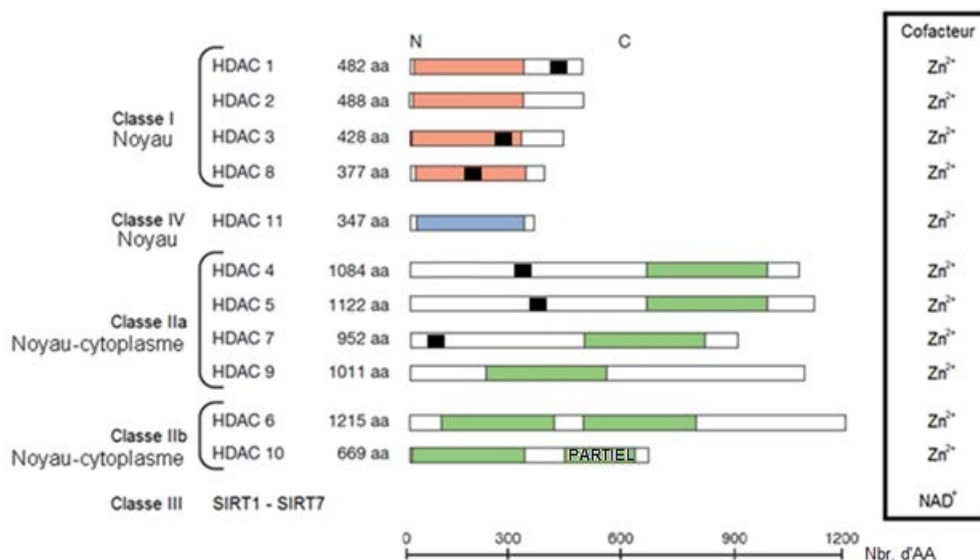


Figure 26 : Représentation schématique des différentes isoformes de HDAC⁸³

L'expression de ces HDAC est très variable selon le tissu considéré et ne sont pas réparties de la même manière dans tout le cerveau. Les HDAC9 et 10 sont peu présentes dans le cerveau, les HDAC1, 6, 7 et 8 ont une expression moyenne, tandis que les HDAC2, 3, 4, 5 et 11 sont fortement exprimées dans celui-ci. La HDAC11 est 22 fois plus exprimée dans le cerveau que HDAC10 (Figure 27).⁸⁷

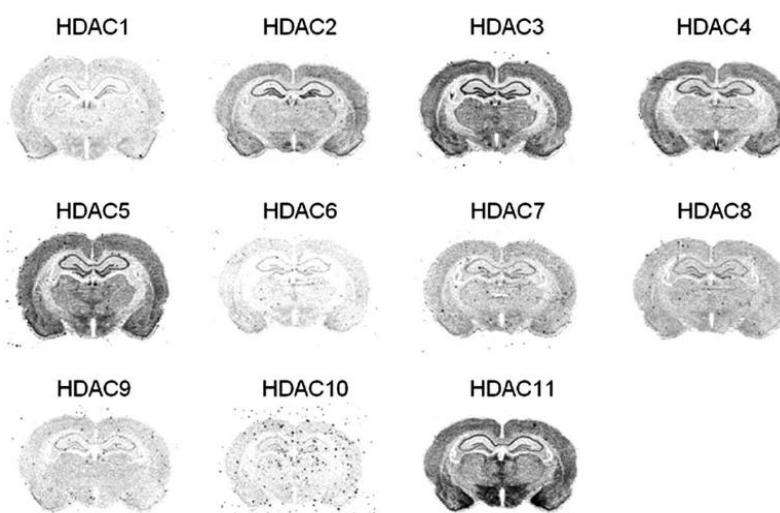


Figure 27 : Distribution des onze HDAC dans le cerveau de rat (Les zones sombres sont fortement concentrées en HDAC à l'inverse des zones claires).⁸⁷

2.6.8 La structure des HDAC

La première analyse aux rayons X de la structure du complexe HDAC avec son inhibiteur (TSA) a été réalisée avec l' "histone deacetylase-like protein" (HDLP) par Finnin *et al.* en 1999.⁸⁸ Ces analyses ont révélé que la HDLP avait un canal hydrophobe d'une longueur de 11 Å et une cavité de 14 Å adjacente à celui-ci (Figure 28). Le site catalytique est situé au fond du canal, qui reçoit la chaîne latérale de la lysine acétylée.^{89, 90}

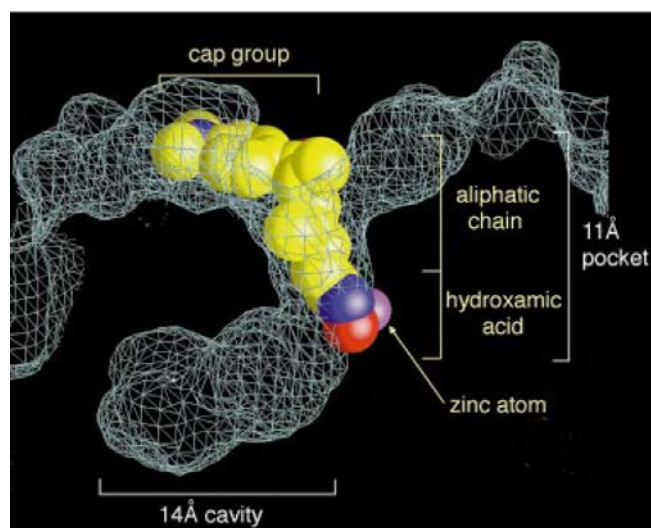


Figure 28 : Représentation de la surface de la HDLP⁸⁸

Les protéines de classe I et II présentent une similarité de séquence importante à l'intérieur du site catalytique. Deux unités de phénylalanine parallèles délimitent le canal. Le passage d'un groupe aromatique augmente l'affinité avec les cibles en comparaison à une chaîne carbonée linéaire, grâce à des interactions π - π favorables avec les deux chaînes latérales des résidus phénylalanine. La similarité de séquence élevée de HDAC1 avec HDLP, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 confirme que toutes les HDAC de la classe I présentent une cavité interne de 14 Å adjacente au canal hydrophobe. Des résidus encombrant la cavité interne de HDAC3 et HDAC8 empêchent la chélation de groupements ZBG volumineux.⁹¹ HDAC1 et HDAC2 ont des séquences identiques à 82%,⁹² mais un resserrement à l'accès au site catalytique de HDAC1 par rapport à HDAC2 et une cavité plus profonde de HDAC2 pourraient être exploitées pour les discriminer.⁹¹

Les résidus à l'entrée du canal dans HDAC4 sont chargés positivement, tandis que dans les autres HDAC, cette zone est neutre ou chargée négativement. HDAC6 est caractérisée par une entrée plus large.⁹¹

2.6.9 Le mécanisme de la désacétylation des histones par les HDAC

Le mécanisme de la désacétylation des histones a été publié par Finnin *et al.* en 1999⁸⁸ et confirmé par Chen *et al.* en 2014.⁹³ L'ion zinc est chélaté à l'enzyme au fond de la poche. Il est coordonné par deux molécules d'asparagine et une molécule d'histidine (Asp168, Asp258 et His170). La seconde sphère de coordination comprend deux histidines et une tyrosine (His131, His132 et Tyr297). La désacétylation est catalysée par un acide et une base. La première étape de la réaction est catalysée par l'histidine 131 qui est basique. Cette base attaque une molécule d'eau et permet l'attaque nucléophile du doublet non-liant de l'atome d'oxygène sur l'atome de carbone électrophile de l'amide. Un intermédiaire acyloxyanion est formé et se réarrange entraînant l'attaque de l'amine sur l'histidine 132 acide (Schéma 16).^{94, 95}

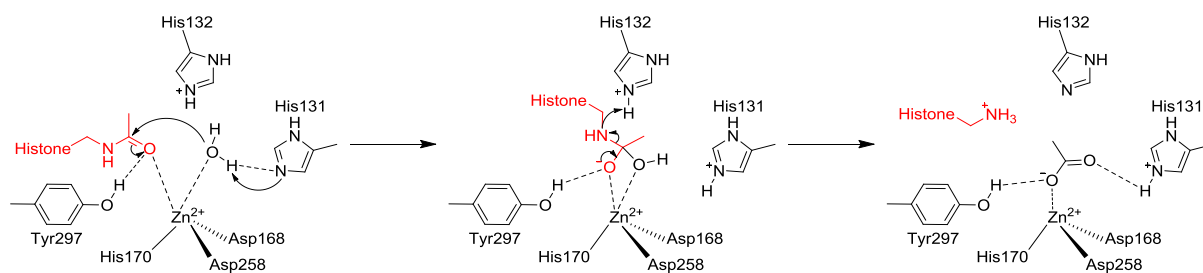
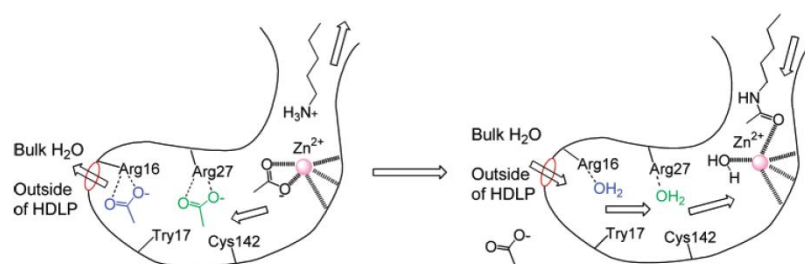


Schéma 16 : Mécanisme de la désacétylation des histones par les HDAC

Puis, le résidu lysine libre quitte le canal de 11 Å, l'histone est libérée sous la forme de sel d'ammonium, l'acétate est quant à lui éliminé en passant par la cavité de 14 Å. Une molécule d'eau peut entrer dans la cavité de 14 Å et réactive ainsi le site catalytique pour le prochain cycle d'hydrolyse de l'enzyme (Schéma 17).⁸⁹

Schéma 17 : Rôle de la cavité interne⁸⁹

Les altérations de l'équilibre HAT / HDAC ont été décrites dans de nombreux types de cancers,^{96, 97} dans les maladies neurodégénératives⁹⁸ et dans les addictions.⁹⁹ L'acétylation des histones est modifiée dans de nombreux modèles de l'addiction ou d'abus de la consommation pour différentes drogues^{100, 101, 102} ainsi que dans les troubles liés à l'usage d'alcool.¹⁰³

3. L'épigénétique et l'alcoolodépendance

3.1 Les implications des HDAC dans la sensibilisation aux effets des drogues

Les modifications covalentes des chaînes latérales des histones sont sous le contrôle de différentes voies enzymatiques, telles que l'acétylation / désacétylation, la méthylation / déméthylation et la phosphorylation / déphosphorylation. Ce sont des mécanismes de régulation essentiels, qui modifient la transcription dans le cerveau lors d'une exposition aiguë ou chronique à l'alcool. Ces changements contribuent aux neuroadaptations à long terme résultant de l'alcoolodépendance.¹⁰⁴ Les effets de l'alcool constatés sur différentes modifications épigénétiques autre que l'acétylation des HDAC sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Alcool et modifications épigénétiques

Modifications impliquées	Effets observés	Références
Méthylation de l'histone H3	La méthylation H3-K9 est impliquée dans les phénotypes d'abus l'alcool chez les souris	Pal-Bhadra <i>et al.</i> , 2007 ¹⁰⁵
Phosphorylation des histones	L'éthanol a montré une augmentation de la phosphorylation de l'histone H3 sur des rats	Lee <i>et al.</i> , 2007 ¹⁰⁶
Méthylation de l'ADN	L'inhibiteur de DNMT, la 5-azacitidine empêche la consommation excessive d'alcool chez les souris	Warnault <i>et al.</i> , 2013 ¹⁰⁷

Des preuves croissantes suggèrent que les modifications épigénétiques, en particulier, l'acétylation des histones, sont des mécanismes clés, pouvant produire des changements de longue durée sur l'expression génétique neuronale et expliquer la persistance des comportements addictifs.¹⁰⁴ Les effets des inhibiteurs de HDAC constatés sur les addictions aux amphétamines, à la cocaïne ou à la morphine sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Inhibiteurs d'HDAC et effets sur les dépendances

Inhibiteurs d'HDAC	Effets observés	Références
TSA	diminue la sensibilité à la cocaïne chez les souris	Kumar <i>et al.</i> , 2004 ¹⁰⁸
NaB et l'acide valproïque	modulent l'expression des effets induits par les amphétamines chez les souris	Kalda <i>et al.</i> , 2007 ³²
SAHA	diminue la sensibilité à la cocaïne chez les souris	Renthal <i>et al.</i> , 2007 ¹⁰⁹
TSA	réduit l'auto-administration de cocaïne chez les rats	Romieu <i>et al.</i> , 2008 ¹¹⁰
NaB	réduit l'auto-administration de cocaïne chez les rats	Sun <i>et al.</i> , 2008 ¹¹¹
NaB	diminue la sensibilité à la cocaïne sur des souris	Sanchis-Segura <i>et al.</i> , 2009 ³⁵
NaB	facilite l'extinction des comportements de recherche de cocaïne chez les souris	Malvaez <i>et al.</i> , 2010 ¹¹²
NaB	modifie le comportement d'abus de morphine sur des rats	Wang <i>et al.</i> , 2010 ¹¹³
NaB et l'acide valproïque	diminuent la sensibilité à la cocaïne sur des souris	Jing <i>et al.</i> , 2011 ³¹

Les inhibiteurs d'HDAC montrent des effets remarquables sur ces addictions, bien qu'ils ne soient pas spécifiques pour une classe d'HDAC. Des études ont montré l'implication de l'isoforme HDAC5 dans l'addiction à la cocaïne.¹⁰⁰ Les mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation de HDAC5 expliquent certains effets de la cocaïne. La prise de cocaïne augmente la phosphorylation de HDAC5, ce qui facilite son exportation dans le noyau, l'emprisonne à l'intérieur et facilite l'expression des gènes. Moins d'une heure après la prise de cocaïne, HDAC5 est déphosphorylée, l'expression des gènes est réprimée, ce qui provoque l'anxiété.¹⁰⁰ En parallèle de ces résultats, diverses études sur les effets des inhibiteurs de HDAC ont été réalisées pour mieux comprendre l'addiction à l'alcool. Ces études sont récapitulées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Inhibiteurs d'HDAC et effets sur l'alcool-dépendance

Inhibiteurs d'HDAC	Effets observés	Références
TSA	empêche le développement de l'anxiété liée au sevrage à l'alcool chez les rats	Pandey <i>et al.</i> , 2008 ¹⁰³
TSA	évite le développement d'anxiété sur les rats tolérant à l'éthanol rapide	Sakharkar <i>et al.</i> , 2012 ²³
5-azacitidine	empêche la consommation excessive d'alcool chez les souris	Warnault <i>et al.</i> , 2013 ¹⁰⁷
SAHA	inhibe la motivation des rats pour chercher de l'alcool	Warnault <i>et al.</i> , 2013 ¹⁰⁷
NaB et MS-275	diminuent fortement la consommation excessive d'alcool des rats dépendants à l'éthanol	Simon-O'Brien <i>et al.</i> , 2014 ¹¹⁴
TSA	Sur des rats alcool-dépendants, les comportements d'anxiété ont été atténués par le traitement	Pandey <i>et al.</i> , 2015 ¹¹⁵

Plusieurs études indiquent que la régulation de l'acétylation des histones par des inhibiteurs de HDAC permettrait de diminuer l'anxiété durant le sevrage. L'inhibition des HDAC maintient l'acétylation des histones et facilite la transcription (Schéma 18).

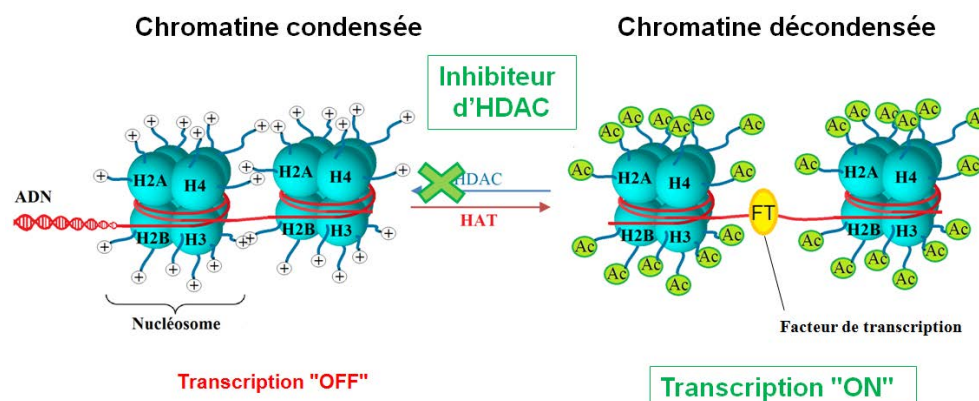


Schéma 18 : Inhibition des HDAC augmente la transcription

Des études ont montré que les HDAC sont inhibées par l'éthanol et permettent une augmentation de l'acétylation des histones dans l'amygdale des rats. A l'inverse, durant le

sevrage, les HDAC sont surexprimées provoquant une diminution de l'acétylation des histones. Les effets anxiolytiques de l'alcool seraient liés à cette inhibition des HDAC.¹⁰³

L'ensemble de ces études suggère que le remodelage de la chromatine par les HDAC dans l'amygdale, peut réguler le développement de comportements anxieux lors du sevrage de l'éthanol après une exposition chronique. Les inhibiteurs d'HDAC pourraient être des agents thérapeutiques d'intérêt dans le traitement des symptômes du sevrage. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives. Il reste maintenant à établir quelles sont les différentes isoformes des HDAC impliquées dans l'anxiété du sevrage, ainsi que dans d'autres caractéristiques de l'alcoolodépendance comme la tolérance et la sensibilisation.^{116, 117}

Les effets du stress oxydatif observés après un traitement avec alcool, pourraient être médiés par les HDAC de la classe I, spécifiquement HDAC2 et HDAC8, qui sont celles significativement surexprimées chez les utilisateurs d'alcool.¹¹⁸ Il a été constaté que les rats consommant beaucoup d'alcool, présentent naturellement une activité HDAC2 supérieure dans l'amygdale et sans changement de l'activité des HDAC1, 3, 4, 5, 6 par rapport aux rats consommant moins d'alcool. L'arrêt de prise d'éthanol a été associé à une augmentation des niveaux de HDAC2 dans l'aire tegmentale ventrale.¹¹⁷ HDAC2 serait impliquée dans les comportements de type anxieux.⁷ Les HDAC de la classe I sont particulièrement impliquées dans les effets négatifs des addictions.

3.2 Les effets des inhibiteurs HDAC sur la consommation d'alcool

Au laboratoire d'Amiens dans le groupe GRAP dirigé par Mickaël Naassila, des modèles animaux d'addiction à l'alcool ont été développés. Le butyrate de sodium (NaB) a une large gamme d'activité biologique dont l'inhibition des HDAC de la classe I et II.¹¹⁹ Pour tester les effets du butyrate de sodium sur la dépendance, deux groupes de rats ont été formés : un premier groupe non-dépendant qui consomme de l'alcool de façon modérée, un second groupe a été exposé à des vapeurs d'éthanol afin d'induire une dépendance. La concentration de vapeur d'éthanol a été progressivement augmentée pour atteindre des concentrations d'éthanol stables dans le sang (entre 1,5 et 2,5 g / L) pendant 14 heures par jour.

Les rats ont été placés dans des enceintes étanches contenant des vapeurs d'alcool (40 mg / L), 14 heures par jour pendant 10 semaines, pour induire une dépendance physique, identifiable par l'apparition de symptômes de sevrage somatiques. Dans un second temps, les deux groupes de rats sont placés dans des chambres de Skinner contenant un levier et ils sont habitués à presser le levier pour obtenir une récompense de 0,1 mL d'éthanol à 10 %. Il s'agit du test d'auto-administration opérante d'éthanol (Figure 29).

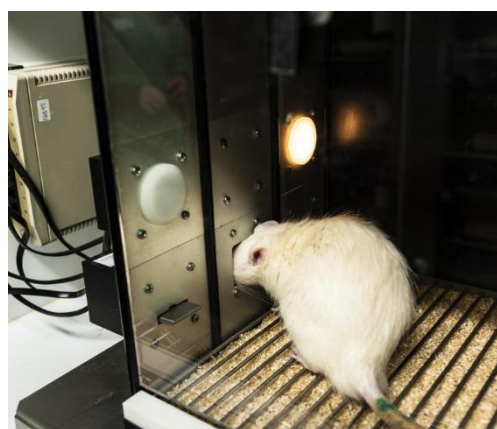


Figure 29 : Test d'auto-administration opérante d'éthanol

Les rats sont habitués à recevoir des injections de NaCl pour éviter qu'ils soient stressés, ainsi l'injection n'influence pas les résultats. Le premier jour, 30 minutes après l'injection de NaCl, les rats dépendants, consomment plus du double que les rats non-dépendants. Le deuxième jour, le butyrate de sodium est injecté aux deux groupes. Une diminution de la consommation des rats dépendants a été observée, mais l'effet n'est pas significatif.

Le troisième jour, une deuxième injection de butyrate de sodium est réalisée sur les deux groupes.

La consommation des rats dépendants est proche de celle des rats non-dépendants. Le butyrate de sodium a permis de bloquer la consommation excessive des rats alcoolo-dépendants et il n'a montré aucun effet chez les rats non-dépendants (Figure 30).⁵ Le butyrate de sodium a bloqué certaines neuroadaptations de longue durée à des administrations répétées d'éthanol.⁴ Le quatrième jour, sans injection de Butyrate de sodium, la consommation des rats dépendants est de nouveau excessive, le blocage est levé.

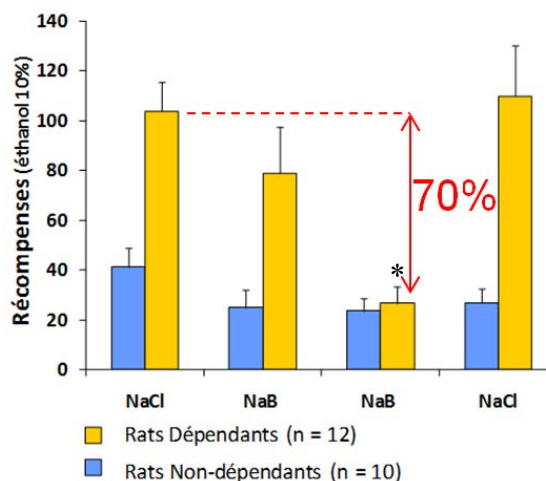


Figure 30 : Effet du butyrate de sodium sur des rats dépendants (jaune) et non-dépendants (bleu), * $p < 0.001$ ⁵

Un autre inhibiteur a été étudié : le MS-275, appartenant à la classe chimique des benzamides, inhibe plus particulièrement la classe I des HDAC.¹²⁰ Des rats conditionnés à l'auto-administration de niveaux élevés d'éthanol ont reçu des micro-injections intracérébroventriculaires de MS-275 (250 μ M et 500 μ M), 30 minutes avant les sessions d'auto-administration. Après deux injections quotidiennes consécutives de MS-275 à 500 μ M, les rats ont réduit leur consommation d'alcool de 60 % (Figure 31).⁶

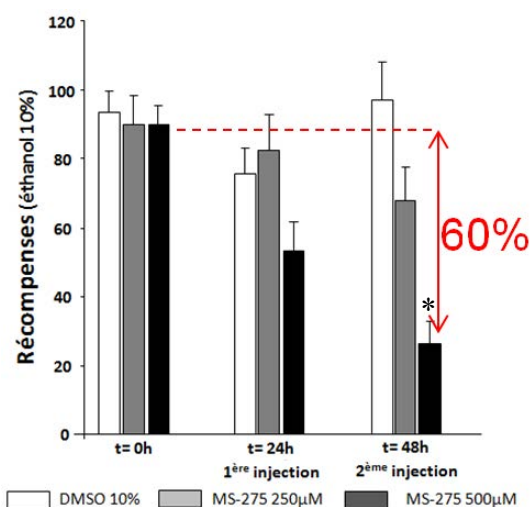


Figure 31 : Test du MS-275 sur des rats à différentes concentrations sur 48h, * $p < 0.001$ ⁶

Différentes doses de MS-275 ont été testées (Figure 32). La courbe dose-réponse indique que le MS-275 a un effet en forme de U lors de l'auto-administration d'éthanol : la dose de 500 μM est la plus efficace.⁶

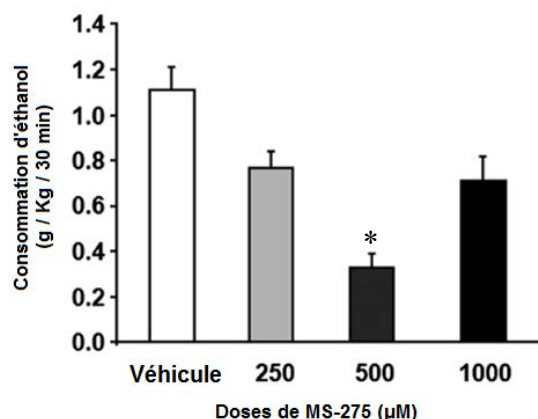


Figure 32 : Effet en U en fonction de la dose de MS-275, * $p < 0.001$ ⁶

Les composés butyrate de sodium et MS-275 ont fortement diminué la consommation excessive d'alcool des rats dépendants, durant les tests d'auto-administration opérante d'éthanol.^{5, 6}

3.3 Les effets du MS-275 sur la motivation à consommer de l'alcool

Pour évaluer la motivation à consommer de l'alcool, l'effort à fournir pour obtenir une récompense est augmenté progressivement. Au départ, ils doivent presser trois fois le levier pour obtenir une récompense de 0,1 mL d'éthanol à 20 %, puis quatre appuis sont nécessaires, puis cinq appuis et ainsi de suite en suivant l'incrémentations suivante : 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 28, 30, 33, 35 ...

Le point de rupture correspond à l'effort maximal que le rat est capable de fournir pour obtenir une seule dose d'alcool (Figure 33).

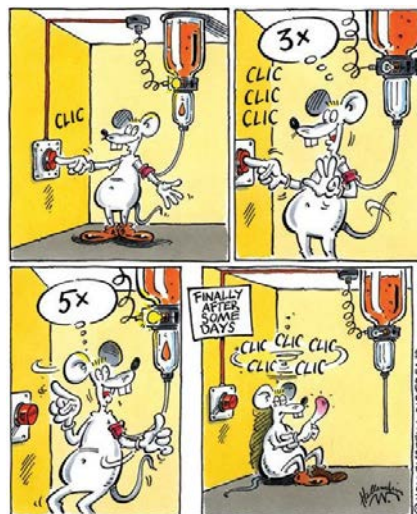


Figure 33 : Evaluation de la motivation à consommer de l'alcool¹²¹

Le MS-275 ne montre pas de réduction significative de la motivation à consommer de l'alcool (Figure 34).

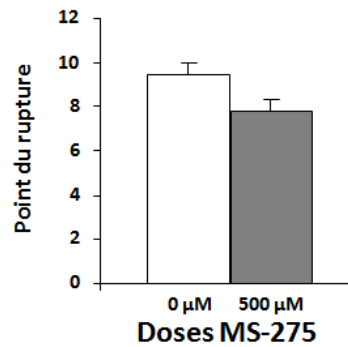


Figure 34 : Evaluation de la motivation à consommer de l'alcool après injection de MS-275

3.4 Les effets du MS-275 sur la rechute

Un test sur la rechute a été réalisé. Après une période de sevrage à l'alcool, les rats reçoivent une injection de MS-275, ou seulement de la solution "véhicule", avant d'être à nouveau testés à l'auto-administration opérante d'éthanol. La solution "véhicule" est la même solution utilisée pour dissoudre le MS-275, du liquide céphalorachidien artificiel. Le nombre d'appuis est comptabilisé pendant 30 minutes par bloc de 5 minutes (Figure 35). Les rats ayant reçu le MS-275, consomment beaucoup moins d'alcool que les autres. Le MS-275 a bloqué l'augmentation de la consommation d'éthanol, induite par une privation d'alcool, ce qui démontre un effet préventif sur la rechute.⁶

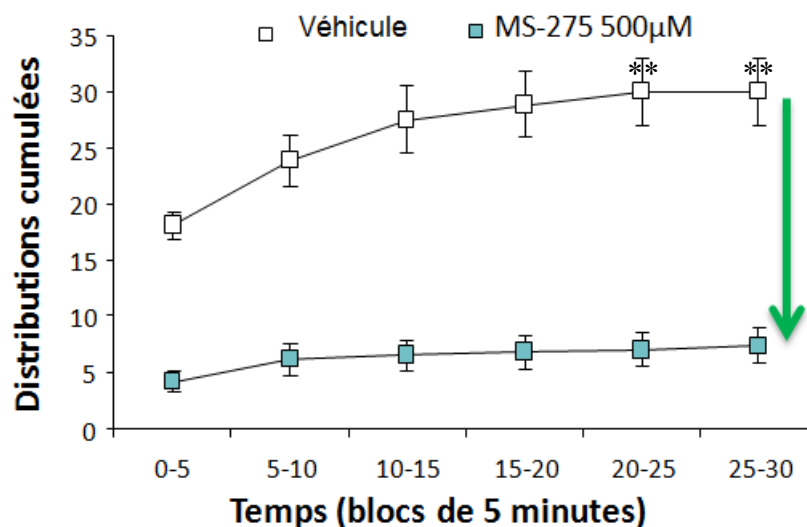


Figure 35 : Diminution de la rechute par traitement préventif au MS-275, **p<0.05

3.5 Les effets des inhibiteurs HDAC sur l'anxiété durant le sevrage

Une technique appelée test d'exploration "light/dark box (LDB)" est utilisée pour vérifier si les animaux développent de l'anxiété. L'appareil LDB comporte deux compartiments. Le compartiment lumineux est bien éclairé et ouvert. Le compartiment sombre est couvert et sombre. Une porte relie les deux compartiments. Les rongeurs passent généralement plus de temps dans le compartiment sombre que dans le compartiment lumineux. Si un anxiolytique est injecté aux rongeurs avant le test, le pourcentage de temps

passé dans le compartiment lumineux va augmenter. Lorsqu'un anxiogène est injecté, les rongeurs passent plus de temps dans le compartiment sombre.

En 2008, Pandey *et al.*¹⁰³ ont réalisé ce test sur deux groupes de rats. Le premier groupe de contrôle est alimenté normalement sans consommer d'alcool, ce premier groupe subit le test d'exploration LDB après injection d'une solution véhicule (en bleu) et une autre fois avec une solution de TSA (en rouge). Les rats passent environ 60 % du temps dans le compartiment sombre ce qui montre une légère anxiété, due au nouvel environnement, c'est une réaction tout à fait normale. La TSA n'a pas d'effet anxiolytique ou anxiogène sur les rats. Le deuxième groupe de rats est habitué à consommer de l'alcool depuis 15 jours, ce deuxième groupe subit le test d'exploration LDB après injection d'une solution véhicule (en vert) qui est utilisé comme référence. Ce deuxième groupe réagit de la même façon que le premier, car il est habitué aux effets de l'éthanol. Après 24 h de sevrage, le deuxième groupe est à nouveau testé. Le temps passé du côté sombre (en violet) est plus important, ce qui signifie que les rats sont anxieux. Le test est réalisé une dernière fois sur ce deuxième groupe, après injection d'un inhibiteur d'HDAC (TSA). Les rats passent 60 % de leurs temps dans le compartiment lumineux, la TSA a empêché le développement de l'anxiété liée au sevrage à l'alcool chez les rats (Figure 36).

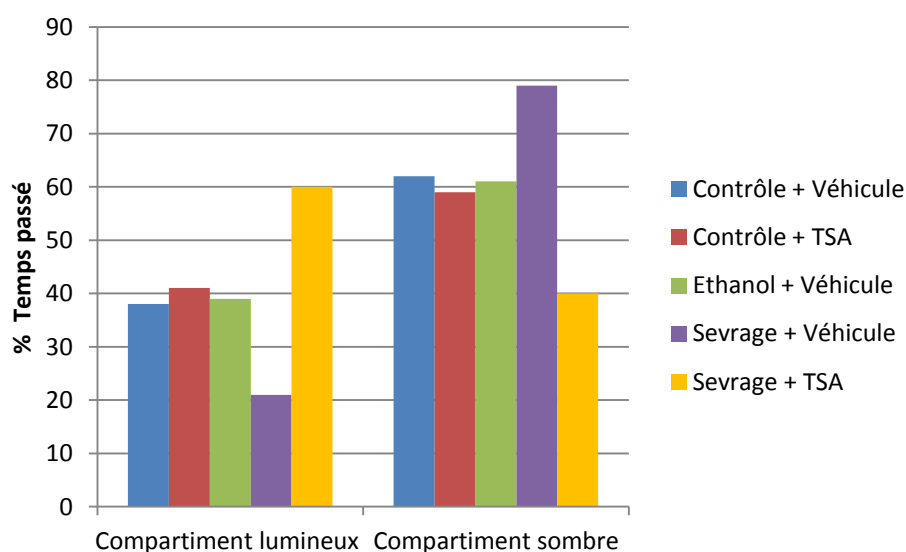


Figure 36 : Test d'exploration LDB

Ces résultats ont clairement démontré l'efficacité du MS-275 dans la consommation excessive d'alcool et confirment l'intérêt thérapeutique potentiel de cibler les mécanismes épigénétiques. Les inhibiteurs d'HDAC étudiés, pourtant non spécifiques, permettent d'observer des altérations de comportements addictifs. Ils soutiennent l'hypothèse que les inhibiteurs d'HDAC peuvent avoir une utilisation potentielle dans le traitement de la dépendance à l'alcool et renforce l'intérêt de se concentrer sur l'inhibition des isoformes spécifiques des histones désacétylases et notamment sur HDAC1 et 2.^{5,6}

4. Les différents types d'inhibiteurs d'HDAC

Le principal problème des inhibiteurs des HDAC en thérapie, est leur manque de sélectivité. En effet, ils ciblent aussi bien les HDAC de classe I que celles de classe II. Il existe une grande variété de molécules, de structures chimiques très diverses. Le développement d'inhibiteurs d'HDAC plus sélectifs d'une isoforme HDAC donnée, permettra sans doute de mieux élucider le rôle de cette dernière, dans un mécanisme donné. Un inhibiteur sélectif des HDAC de la classe I, inhiberait seulement les HDAC situées dans le noyau et aurait un effet prépondérant sur l'expression des gènes ; beaucoup d'effets secondaires seraient alors éliminés. Actuellement, de nombreux efforts sont déployés pour élargir nos connaissances des HDAC et pour développer des inhibiteurs d'HDAC puissants et sélectifs.^{83, 121} L'évolution des nombres de publications sur Scifinder pour l'épigénétique, les HDAC et leurs inhibiteurs est en pleine expansion (Figure 37).

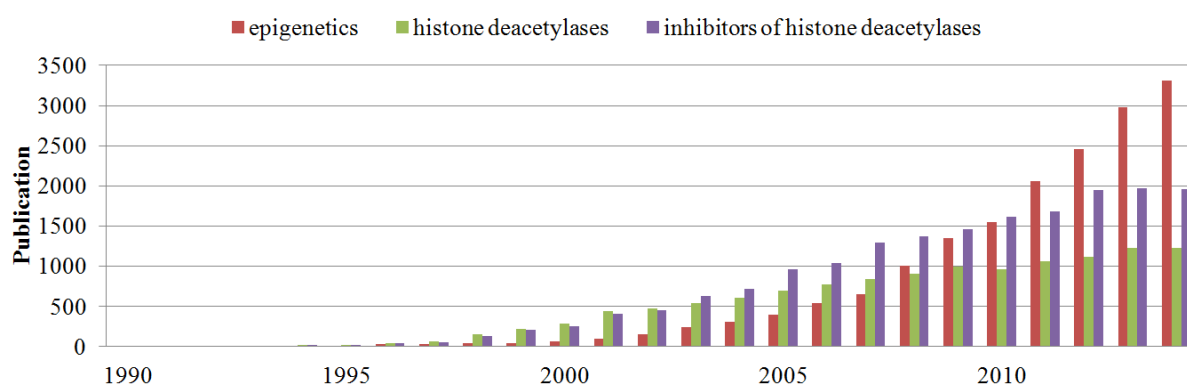


Figure 37 : Evolution du nombre de publication sur Scifinder de l'épigénétique, des HDAC et de leurs inhibiteurs.

La plupart des inhibiteurs d'HDAC chélatent l'ion zinc, ce qui cause un dysfonctionnement dans le système de transfert de charge et bloque l'accès au site actif de façon réversible. Ce mode d'action permet d'inhiber sélectivement les enzymes Zn-dépendantes. Ces inhibiteurs peuvent être classés en différentes familles par rapport à leur fonction qui complexe l'ion zinc, la fonction ZBG ("Zinc Binding Group"). L'IC₅₀ est la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques est occupée. Les IC₅₀ pour toutes les isoformes HDAC ne sont pas indiquées, car les tests sont extrêmement coûteux. En général, les HDAC1 et 6 sont testées, puis les HDAC2, 3 et 4 pour vérifier si les molécules sont sélectives d'une isoforme par rapport à une autre.¹²³

4.1 Les inhibiteurs de type acide carboxylique

Les inhibiteurs de type acide carboxylique sont peu puissants, mais ils peuvent facilement traverser la BHE en raison de leur faible poids moléculaire.¹²⁴ Le premier inhibiteur d'HDAC découvert, en 1978,¹²⁵ est le butyrate de sodium (NaB). Il peut entraîner une altération de l'expression des gènes et bloquer la prolifération cellulaire.^{125, 126} C'est un des premiers composés à montrer une diminution de l'addiction à l'alcool chez le rat.^{5, 115} Le butyrate de sodium est en phase II d'essais cliniques contre les troubles schizophréniques.¹²⁸ D'autres analogues du butyrate de sodium, tel que l'acide valproïque (VPA), possèdent un

groupement acide carboxylique qui interagit directement avec l'ion zinc du site catalytique de l'enzyme (Figure 38). La FDA a approuvé l'acide valproïque en 1978 contre l'épilepsie. Il a atteint les études cliniques de phase IV sur de multiples troubles cérébraux comme les troubles bipolaires ou la dépression.

Ces molécules ont une faible activité inhibitrice avec des IC_{50} sur HDAC1 supérieures à 100 μ M et inhibent les classes I et II des HDAC sans distinction (Tableau 4).¹²⁹

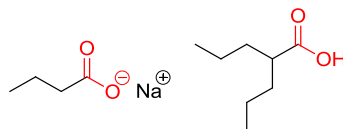


Figure 38 : Butyrate de sodium (gauche) et Acide valproïque (droite)

Tableau 4 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des inhibiteurs de type acide carboxylique (IC_{50} en mM)

Composés	Classe I				Classe II			Cytotoxicité CC_{50} μ M
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC7	HDAC9	HDAC6	
NaB	0,175							>10 000
VPA	1,5	3,0	3,0	7,6	>10	>10	>10	10 000

0,1nM  10 μ M

4.2 Les inhibiteurs de type acide hydroxamique

Les inhibiteurs de type acide hydroxamique sont la plus grande famille chimique d'inhibiteurs d'HDAC. Ils ont une bien meilleure activité inhibitrice, mais ils sont connus pour avoir une demi-vie relativement courte.¹²⁴

Certains inhibiteurs ont une activité inhibitrice très sélective d'une seule isoforme d'HDAC comme la tubacin avec HDAC6 (Figure 39).¹³⁰ La tubacin a une inhibition sur HDAC6 300 fois plus importante que sur toutes les autres isoformes d'HDAC. PCI-34051 est un inhibiteur de HDAC8 avec une sélectivité de 200 par rapport aux HDAC1 et 6 et de 1000 *versus* HDAC2, 3 et 10 (Tableau 5).^{130, 131}

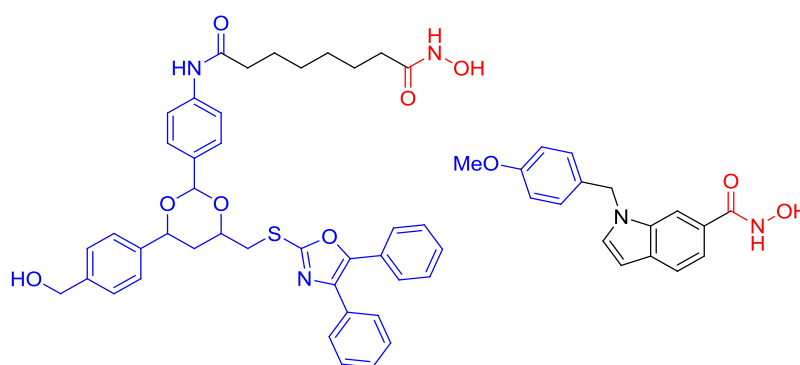


Figure 39 : Tubacin (gauche) et PCI-34051 (droite)

Les structures chimiques du belinostat et de l'oxamflatin (Figure 40) sont très proches, pourtant l'oxamflatin inhibe la classe I des HDAC avec une sélectivité intéressante (Tableau 5).^{129, 132} L' IC_{50} sur HDAC1 du belinostat est 4000 fois plus basse que celle du butyrate de sodium. Le belinostat est un inhibiteur non sélectif des enzymes des classes I et II des HDAC. Néanmoins, il a été approuvé par la FDA en 2014 contre le lymphome à cellules T.¹³³

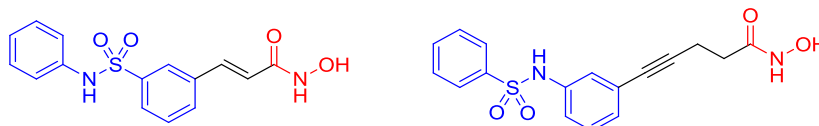


Figure 40 : Belinostat (gauche) et oxamflatin (droite)

Le panobinostat inhibe HDAC1 avec une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire, mais il inhibe aussi la classe II. La FDA a approuvé le panobinostat (Figure 41) en 2015 sous le nom de Farydak[®], comme anticancéreux, celui-ci est testé en essais cliniques de phase IV contre le syndrome myélodysplasique.¹³⁴ Le scriptaid (Figure 41) est le seul inhibiteur de cette famille à avoir une IC_{50} sur HDAC1 au dessous du nanomolaire, mais il inhibe aussi les HDAC2, 6 et 8 (Tableau 5).^{129, 132}

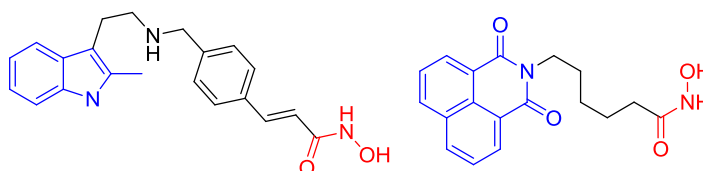


Figure 41 : Panobinostat (gauche) et scriptaid (droite)

Le vorinostat (SAHA) ($IC_{50 \text{ HDAC1}} = 68 \text{ nM}$) (Figure 42) a des activités inhibitrices plus faibles que celles de la TSA ($IC_{50 \text{ HDAC1}} = 2 \text{ nM}$), mais il continue d'être étudié, car il a une toxicité 100 fois plus faible.¹⁰⁷ La FDA a approuvé le vorinostat en 2006 pour le traitement de lymphome cutané à cellules T.

La trichostatine A (TSA) (Figure 42) est un antibiotique et antifongique isolé en 1990 à partir de *streptomyces hygroscopicus*.¹³⁵ La TSA est couramment utilisée en biologie comme inhibiteur d'HDAC. Son profil d'inhibition des HDAC est très proche de celui du Panobinostat. L'étude de la TSA a été arrêtée en raison de sa forte toxicité, mais elle reste un modèle pour la conception d'inhibiteur d'HDAC (Tableau 5).¹²⁹ Ces deux inhibiteurs ne différencient pas les classes I et II d'HDAC.

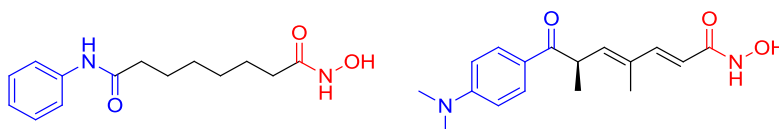


Figure 42 : SAHA (gauche) et TSA (droite)

Tableau 5 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des inhibiteurs de type acide hydroxamique (IC₅₀ en nM)

Composés	Classe I				Classe II				Cytotoxicité CC ₅₀ µM
	1	2	3	8	4	7	9	6	
Tubacin ¹³⁰	1400	6270	1270	1270	>10*10 ⁶	9700	4310	4	6
PCI-34051 ¹³¹	4000	>50*10 ⁶	>50*10 ⁶	10				2900	
Belinostat ¹³²	41	125	30	216	115	67	128	82	
Oxamflatin ¹²⁹	3,96	0,16	10,3	0,37	3800	840	>5*10 ⁶	390	
Panobinostat ¹³²	3	3	4	248	12	14	3	61	
Scriptaid ¹²⁹	0,64	1,4	607	14,5	14*10 ⁶	22*10 ⁶	>5*10 ⁶	34	6
SAHA ¹²⁹	68	164	48	1524	101	104	107	90	10
TSA ¹²⁹	2	3	4	456	6	5	6	3	0,1

0,1nM  10µM

Les inhibiteurs possédant une fonction acide hydroxamique sont de bons modèles pour créer de nouveaux inhibiteurs, mais ils présentent souvent une forte toxicité.¹³⁶

4.3 Modèle d'inhibiteur d'HDAC

L'étude structurale de ces inhibiteurs d'HDAC a permis de définir un pharmacophore modèle (Figure 43).¹³⁷ Celui-ci se composerait d'un domaine de reconnaissance formé généralement d'une région hydrophobe très souvent aromatique (**Tête**), d'un domaine de liaison soit linéaire, soit aromatique (**Espaceur**) et enfin, d'un site de liaison à l'ion zinc (**ZBG**).

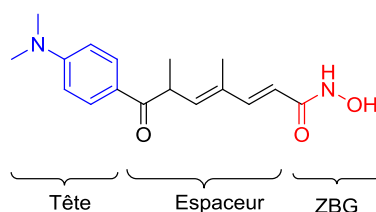


Figure 43 : Pharmacophore modèle exemple de la TSA

4.4 Les inhibiteurs de type pont disulfure

La psammapline A (Figure 44) a été isolée à partir d'une éponge marine : *Pseudoceratina purpurea* ($IC_{50}^{HDAC1} = 45 \text{ nM}$). Elle contient un pont disulfure au centre de sa structure, la molécule obtenue après réduction en thiol est plus active et plus sélective ($IC_{50}^{HDAC1} = 1 \text{ nM}$), c'est une pro-drogue.¹³⁸

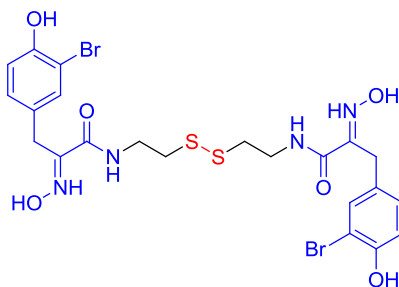


Figure 44 : Psammapline A

4.5 Les inhibiteurs de type benzamide

Les inhibiteurs de type benzamide ont une demi-vie relativement plus longue que ceux de type acide carboxylique.¹²⁴ La tacedinaline (CI-994) (Figure 45) est aujourd'hui annoncée comme sélective de HDAC1 et elle a une IC_{50} pour HDAC1 1,8 fois plus petite que pour HDAC2 (Tableau 6). La tacedinaline est en étude clinique de phase II sur le cancer du pancréas.¹³⁹ RGFP966 (Figure 45) est un des inhibiteurs les plus sélectifs de la HDAC3 ($IC_{50} = 0,08 \mu\text{M}$). Il n'a aucune activité inhibitrice sur les autres HDAC à $15 \mu\text{M}$.¹⁴⁰ L'effet du RGFP966 a été étudié chez des souris dépendantes à la cocaïne, les résultats ont démontré que l'inhibition de la HDAC3 a facilité l'extinction des comportements liés à la recherche de cocaïne.¹⁴⁰

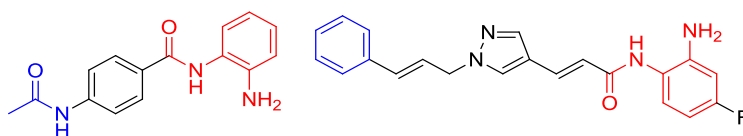


Figure 45 : CI-994 (gauche) et RGFP966 (droite)

La molécule la plus étudiée de cette classe est le MS-275 (Entinostat) (Figure 46). Il est en étude clinique de phase II sur le mélanome métastatique.¹⁴¹ Le MS-275 inhibe particulièrement les HDAC1 et 9 avec une IC_{50} pour HDAC1 2,7 fois plus petite que pour HDAC9. Compte tenu des résultats précédents sur l'alcoolodépendance et la sélectivité du MS-275, il semblerait que la HDAC1 soit impliquée dans l'addiction à l'alcool.⁶

Le mocetinostat (Figure 46) inhibe les HDAC1 et HDAC2 avec une IC_{50} de 34 nM , ce qui représente une activité inhibitrice 5 fois plus basse que pour le MS-275 ($IC_{50}^{HDAC1} = 181 \text{ nM}$). Il a une IC_{50} pour HDAC1 29 fois plus petite que pour HDAC3 et plus faible encore pour les HDAC de la classe II (Tableau 6). En 2015, des résultats favorables ont été annoncés pour le mocetinostat à partir de l'essai clinique de phase II pour le lymphome de Hodgkin.¹⁴²

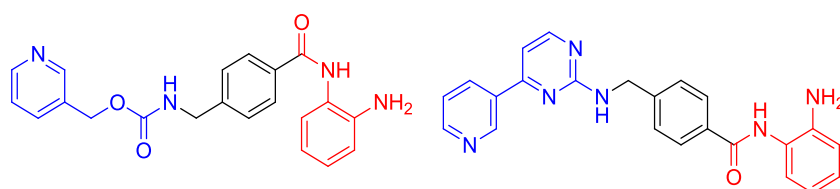


Figure 46 : MS-275 (gauche) et mocetinostat (droite)

Le pouvoir inhibiteur des benzamides sur les HDAC est moins puissant que celui des inhibiteurs de type acide hydroxamique, mais leur sélectivité pour la classe I est intéressante.

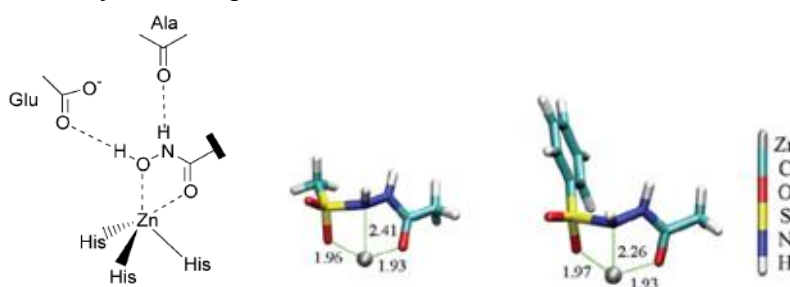
Tableau 6 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des inhibiteurs de type benzamide (IC₅₀ en nM)

Composés	Classe I				Classe II			
	1	2	3	8	4	7	9	6
CI-994 ¹⁴³	410	750	1200	>10 000				>10 000
RGFP966 ¹⁴⁰	15 000	15 000	80	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000
MS-275 ¹³²	181	1155	2311	>10*10 ⁶	>10 000	>10 000	505	>10 000
Mocetinostat ¹³²	34	34	998	>10 000	>10 000	>10 000		>10 000

0,1nM  10μM

4.6 Les inhibiteurs de type sulfonylhydrazide

L'équipe rémoise a acquis une certaine expérience dans la conception d'un nouveau type de ZBG : l'alkyl/arylsulfonylhydrazide. Les structures optimisées montrent que l'ion zinc serait coordonné par l'atome d'azote, l'atome d'oxygène du carbonyle et avec un des atomes d'oxygène du groupe SO₂, ce qui formerait un complexe tri-dentate plus stable qu'avec les inhibiteurs de type acide hydroxamique, bi-dentate (Figure 47). Au pH physiologique, l'atome d'azote du sulfonamide est déprotoné ce qui encourage cette complexation. Les dérivés alkyl/arylsulfonylhydrazides seraient moins toxiques, plus stables que ceux de type acide hydroxamique.^{144, 10}

Figure 47 : Mode de chélation de l'acide hydroxamique et des alkyl/arylsulfonylhydrazides^{144, 10}

Au laboratoire, une petite bibliothèque de molécules de type sulfonylhydrazide a été synthétisée à Reims et testée par le groupe GRAP à Amiens. Les cinq meilleures molécules inhibent HDAC1 avec 48 à 63 % à 30 mM (Figure 48). Ces mesures confirment que ces composés sont des inhibiteurs d'HDAC. Ces cinq composés ont tous une chaîne carbonée, entre la fonction carbamate et le sulfonylhydrazide, d'une longueur de deux atomes de carbone, soit $n = 2$. Les parties terminales des ZBG sont des groupements mésyle ou tosylé.

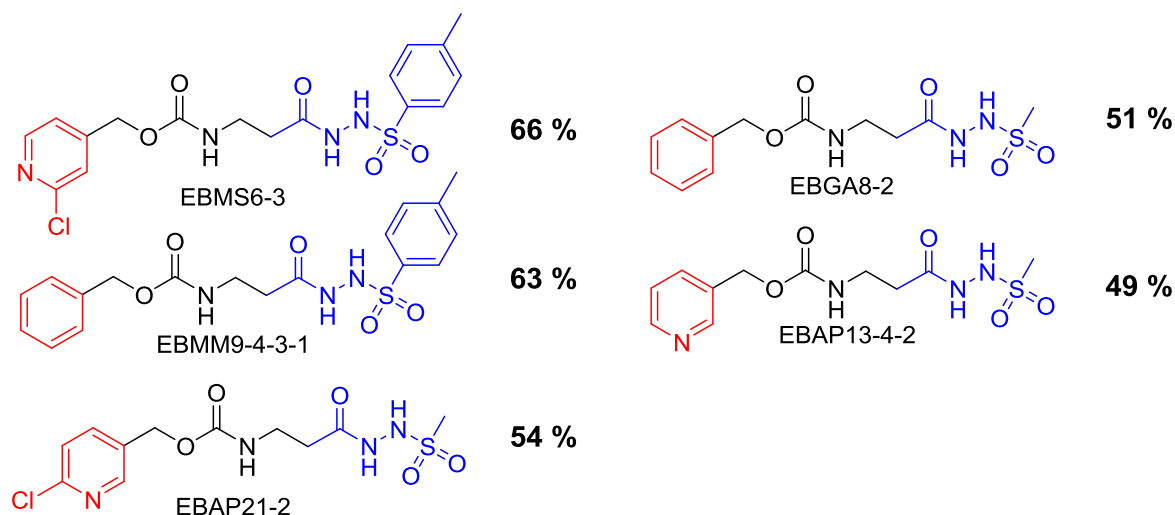


Figure 48 : Pourcentage d'inhibition de HDAC1 à 30 mM des analogues

Le docking de EBMS6-3 avec HDAC1 montre que cette molécule agit comme chélateur de l'ion zinc (Figure 49). Le groupe tosyl est inséré dans la cavité interne décrite précédemment dans la partie "2.6.8 La structure des HDAC". Une liaison hydrogène est formée entre un NH du groupement sulfonylehydrazide et le cycle imidazole de His 141. Le cycle imidazole de His 178 est impliqué dans une liaison hydrogène avec le groupe carbonyle de la fonction carbamate. Il semblerait également y avoir une interaction entre l'empilement Tyr 204 et le groupement chloropyridine. Les deux atomes d'oxygène du groupement sulfonyle sont chélatés à l'ion zinc formant un complexe bi-dentate. HDAC1 est représentée par les bandes blanches. L'EBMS6-3 et les résidus de HDAC1 impliqués dans les interactions sont représentés par des bâtons. Les atomes de carbone de EBMS6-3 sont colorés en magenta et ceux des HDAC1 sont en vert. L'atome de Zn est représenté par une sphère grise.

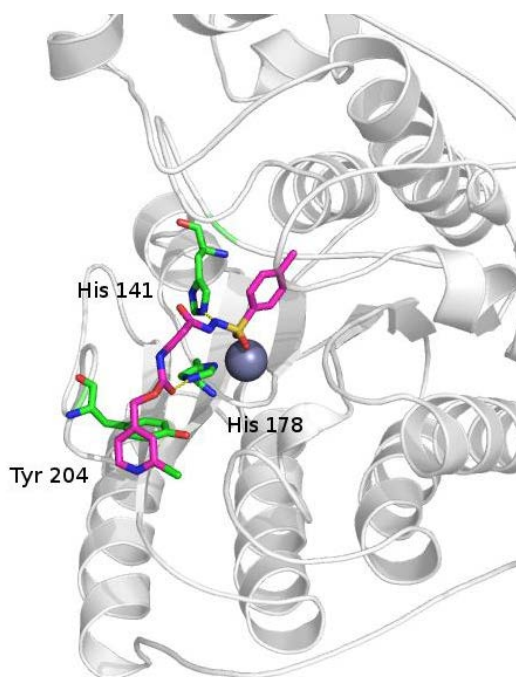


Figure 49 : Mode de liaison détaillée de EBMS6-3 avec HDAC1

Le composé EBGA8-2 a été testé sur la dépendance à l'alcool et a permis de diminuer de 50 % la consommation des rats alcoolo-dépendants. C'est la diminution de consommation la plus importante observée dans ce modèle après une seule injection à 500 μ M d'un inhibiteur d'HDAC (Figure 50). Le composé EBGA8-2 n'a pas diminué la motivation à consommer (Figure 51). Il est nécessaire que le sujet boive pour ensuite arrêter sa consommation. Ces récents résultats démontrent une efficacité importante de ces nouveaux inhibiteurs de type sulfonylhydrazide.

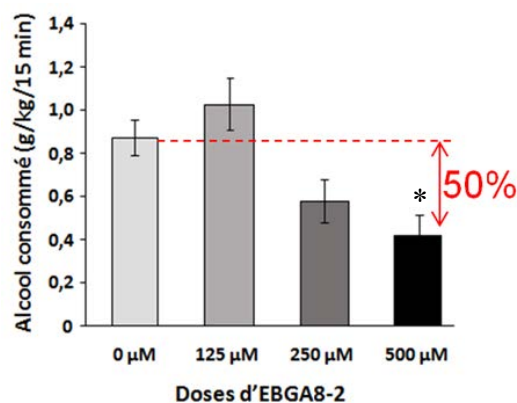


Figure 50 : Test d'auto-administration opérante d'éthanol après une injection de EBGA8-2, * $p < 0.001$

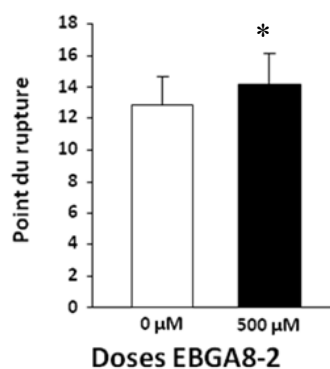


Figure 51 : Evaluation de la motivation à consommer de l'alcool après une injection de EBGA8-2, * $p < 0.05$

4.7 Les inhibiteurs contenant un peptide cyclique

Les peptides cycliques ont tendance à être extrêmement résistants à la digestion, ils ne sont pas dégradés dans le tube digestif. Cette caractéristique les rend attrayants en tant que médicaments délivrés par voie orale.¹⁴⁵ Un certain nombre de peptides cycliques ont été découverts dans la nature et une grande variété ont été synthétisés. Les peptides cycliques homodétiques, tels que la cyclosporine A (immunosuppresseur, FDA 1983), sont ceux composés exclusivement des liaisons amides alpha. Les peptides cycliques isopeptides contiennent au moins une liaison amide non-alpha, comme dans la bacitracine (traitement de la pneumonie, FDA 1948). Les cyclodepsipeptides, telle que l'auréobasidine A, ont au moins une fonction ester à la place de l'une des fonctions amide. Les peptides bicycliques telle que la triostine A contiennent un pont disulfure entre deux chaînes latérales (Figure 52).¹⁴⁶

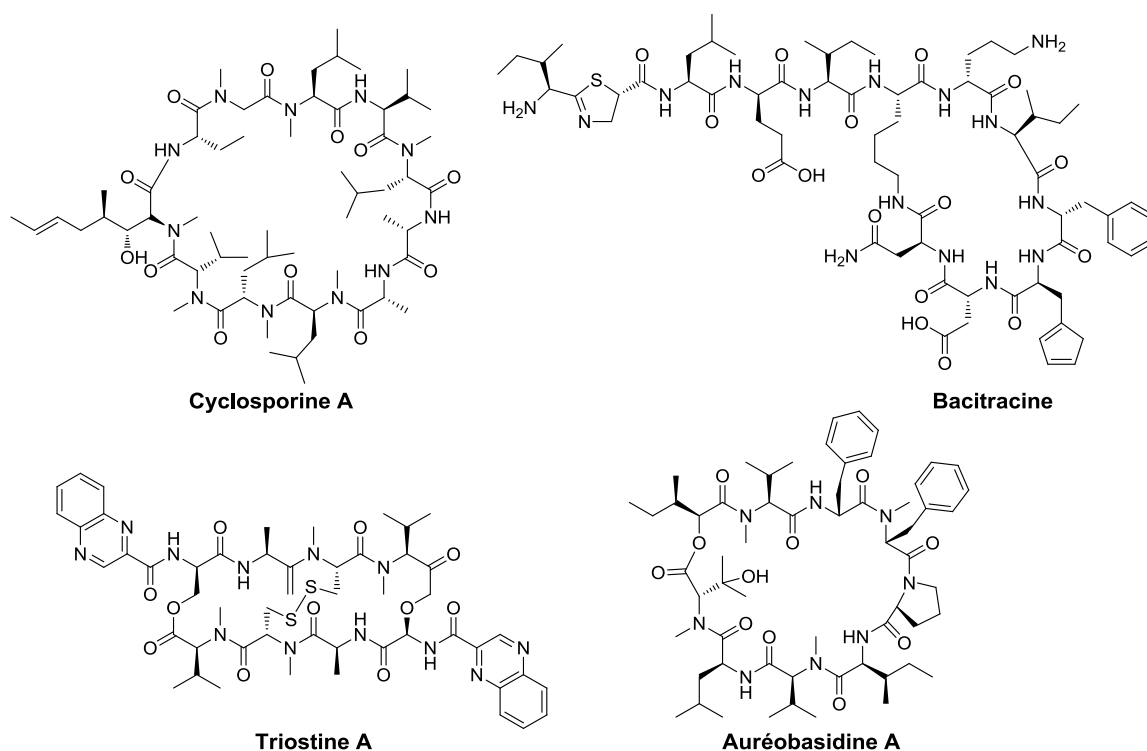


Figure 52 : Peptides cycliques homodétique, isopeptides, bicycliques et depsipeptides

Les inhibiteurs avec une tête de type peptide cyclique ont aussi une fonction ZBG qui leur donnent leurs propriétés inhibitrices. Une autre fonction ZBG a été utilisée pour la chlamydocin et la cyl-2 (Figure 53), une fonction époxycétone.

La chlamydocin inhibe 7 300 fois plus HDAC1 que HDAC6. La cyl-2 inhibe 57 000 fois plus HDAC1 que HDAC6 (Tableau 7).¹⁴⁷ L'azumamide E est un inhibiteur d'HDAC d'origine naturelle qui a été isolé de l'éponge marine *Mycale izuensis*. Les azumamides A, B et D ont une fonction carboxamide en guise de ZBG, tandis que les azumamides C et E portent une fonction acide carboxylique, leurs activités inhibitrices sont meilleures. Toutefois, la fonction acide carboxylique reste un mauvais ZBG, comme pour le butyrate de sodium. L'inhibition de HDAC1 par l'azumamide E est 1000 fois plus faible qu'avec la chlamydocin et la cyl-2, d'où l'importance de la partie ZBG.¹⁴⁸

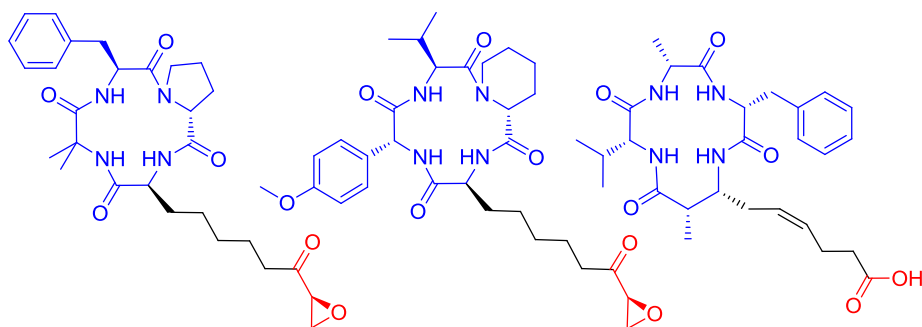


Figure 53 : Chlamydocin (gauche), cyl-2 (milieu) et azumamide E (droite).

La spiruchostatin (Figure 54) est un bon inhibiteur de HDAC1 avec une bonne sélectivité pour la classe I. Elle est isolée à partir de *Pseudimonas sponge*. Pourtant l'épi-spiruchostatin A de configuration absolue (*R*) est inactive à 10 mM (Tableau 7), la stéréochimie de la chaîne latérale doit être de configuration absolue (*S*) pour avoir une bonne affinité avec les HDAC.

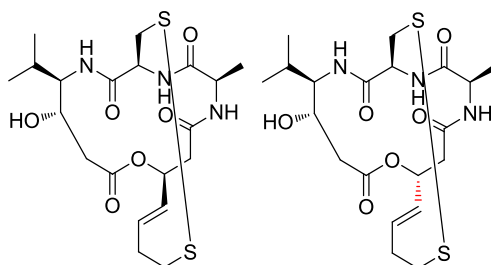


Figure 54 : Spiruchostatin A et l'épi-spiruchostatin A

La trapoxin A (TPX A) (Figure 55) est un inhibiteur des HDAC irréversible qui possède un groupement époxycétone chélatant l'ion zinc du site catalytique de l'enzyme.¹⁴⁹ Cette inhibition irréversible est sans doute provoquée par l'alkylation du composé à l'enzyme par son groupement époxyde, car le composé après réduction de l'époxyde a une activité beaucoup plus faible. La trapoxin B (TPX B) est sept fois plus efficace que la TPX A. La TPX B inhibe 3300 fois plus HDAC1 que HDAC6.¹⁴⁷ La différence entre les TPX B et A concerne l'hétérocycle qui compose le cyclopeptide, la pyrrolidine permet une meilleure inhibition que la pipéridine (Tableau 7).

L'apicidin est un inhibiteur des HDAC possédant un groupement alkylcétone comme ZBG, sa structure est proche de la TPX A et pourtant il inhibe fortement HDAC3 ainsi que les HDAC2 et HDAC8 sans inhiber HDAC1 (Tableau 7). Pour l'apicidin, toutes les isoformes des HDAC ont été testées et la classe II n'est pas inhibée, ce qui montre bien l'efficacité des peptides cycliques pour discriminer la classe II.

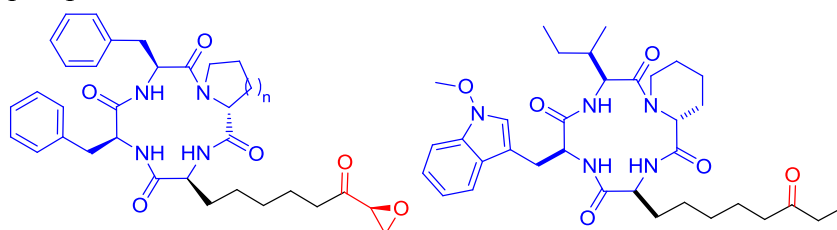


Figure 55 : Trapoxin B (n=1), A (n=2) (gauche) et apicidin (droite)

Le largazole¹⁵⁰ (Figure 56) est obtenu par extraction de la cyanobactérie marine *Symploca* découverte en Floride.⁸ Le largazole est une prodrogue qui après réduction du thioester en thiol donne le largazole thiol, un inhibiteur neuf fois plus puissant sur HDAC1 ($IC_{50} = 0,1 \text{ nM}$), cela s'explique par le groupement thiol qui est un excellent ZBG.¹⁵¹ Récemment, des études ont montré que le largazole serait sélectif des enzymes de la classe I. Le largazole thiol inhibe 400 fois plus HDAC1 que HDAC6 ou HDAC8 (Tableau 7).

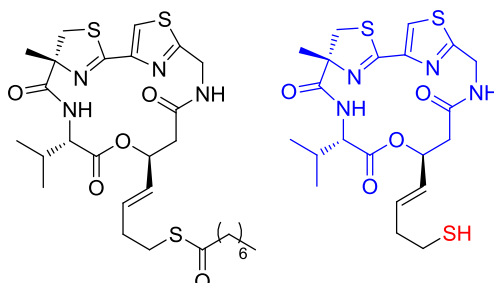


Figure 56 : Largazole (gauche) et largazole thiol (droite)

Des analogues du largazole comme le largazole thiazoline-pyridine et le largazole oxazoline-oxazole (Figure 57) inhibent fortement HDAC1 à des concentrations de l'ordre du nanomolaires ($IC_{50} = 0,32 \text{ nM}$ et $0,69 \text{ nM}$) (Tableau 7).¹⁴⁸ L'incorporation d'hétérocycles tels que l'oxazole, le thiazole ou la pyridine permet de garder une bonne activité inhibitrice sur HDAC1.

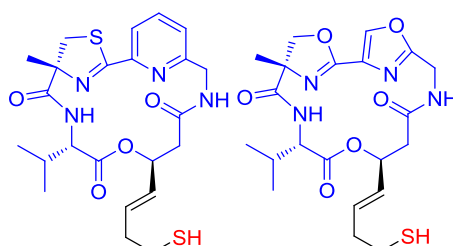


Figure 57 : Largazole thiazoline-pyridine (gauche) et largazole oxazoline-oxazole (droite)

Le FK228 (Romidepsin) commercialisé sous le nom d'Istodax[®], a été isolé pour la première fois de *Chromobacterium violaceum* présent naturellement dans l'eau et le sol des régions tropicales et subtropicales du globe (Figure 58). C'est une prodrogue, le FK228 est converti en sa forme active (redFK228) après sa pénétration dans les cellules par la réduction *in vivo* de la liaison disulfure par la glutathion réductase (GR).¹⁵² Le FK228 peut aussi être obtenu par voie de synthèse en 20 étapes¹⁴⁸ avec un rendement global de 1,7 %.¹⁵¹ RedFK228 inhibe fortement HDAC1 à de faibles concentrations nanomolaires ($IC_{50} = 0,397 \text{ nM}$). Il serait sélectif des enzymes de la classe I. Il inhibe 1900 fois plus HDAC1 que HDAC6 (Tableau 7).¹⁵³ La FDA a approuvé la Romidepsin en 2009 comme traitement du lymphome périphérique à cellules T et elle est actuellement en essais cliniques de phase II financée par le laboratoire CELGENE France.¹⁵⁴ Elle a une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) depuis 2011.

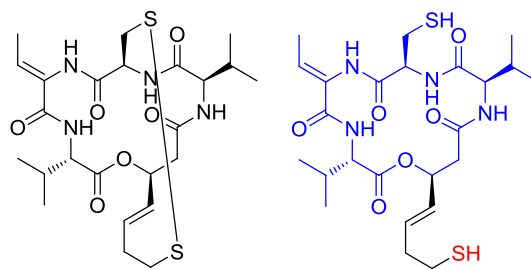


Figure 58 : FK228 (gauche) et redFK228 (droite)

Tableau 7 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des peptides cycliques (IC₅₀ en nM)

Composés	Classe I				Classe II			
	1	2	3	8	4	7	9	6
Chlamydocin ¹⁴⁸	0,15							1100
Cyl-2 ¹⁴⁸	0,7							40μM
(+)-Azumamide E ¹⁴⁸	1220				2280			>5 000
Spiruchostatin A ¹⁴⁸	0,62							360
Trapoxin B (TPX B) ¹⁴⁸	0,11				0,3			360
Trapoxin A (TPX A) ¹⁴⁸	0,82							524
Apicidin ¹²⁹	>10 000	120	43	575	>10 000	>10 000	>10 000	>10 000
Largazole ¹⁴⁸	0,9	4	4					1500
Largazole thiol ¹⁴⁸	0,1	0,8	1					40
Largazole thiazoline -pyridine ¹⁴⁸	0,32	0,86	1,1					29
Largazole oxazoline -oxazole ¹⁴⁸	0,69	1,7	1,5					45
FK228 ¹⁴⁸	30							14000
redFK228 ¹⁴⁸	0,397							787

0,1nM  10μM

Le FK228 et le largazole ont des structures proches avec une activité d'inhibitrice de l'ordre du nanomolaire et une excellente sélectivité pour la classe I. En utilisant ces peptides cycliques comme tête sur nos inhibiteurs, on devrait favoriser une sélectivité pour la classe I.

4.8 Le largazole, le FK228 et leurs pharmacomodulations

Après l'étude des inhibiteurs d'HDAC de familles chimiques et de structures différentes, il est incontestable que les meilleurs inhibiteurs sont ceux de type peptide cyclique. Ils ont une très bonne sélectivité pour la classe I des HDAC. Deux cyclodepsipeptides : le redFK228 et le largazole thiol sont les plus intéressants avec quelques similarités dans leurs structures.^{148, 9}

- Ce sont des cycles à 16 chaînons, de type cyclodepsipeptide (cycle peptidique ayant au moins une fonction ester).
- Les acides aminés composant le cycle sont des résidus glycine ou valine.
- La configuration absolue des atomes de carbone asymétrique de la Valine (série L) et de l'ester qui sont de stéréochimie *S*.
- Ils respectent le pharmacophore modèle **Tête-Espaceur-ZBG**.

Plusieurs études ont déjà été réalisées sur des analogues du largazole et du FK228. Des analogues du largazole ayant des espaceurs plus ou moins longs (Figure 59) ont été testés sur HDAC1, mais le largazole est toujours le meilleur inhibiteur (Tableau 8).¹⁵⁵ La longueur du bras espaceur est très importante pour relier le site catalytique et obtenir la meilleure inhibition de HDAC1.

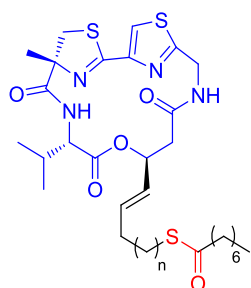


Figure 59 : Analogues du largazole

Tableau 8 : Inhibition de composés aux espaceurs de différentes longueurs (IC₅₀ en nM)

Composés	n	HDAC1
Largazole-1	0	>20 000
Largazole	1	7,6
Largazole+1	2	690
Largazole+2	3	1900

L'épi-largazole inhibe les HDAC avec un IC₅₀ 120 fois plus grand que le largazole (Tableau 9). Notons l'importance de la stéréochimie de la chaîne latérale (Figure 60).

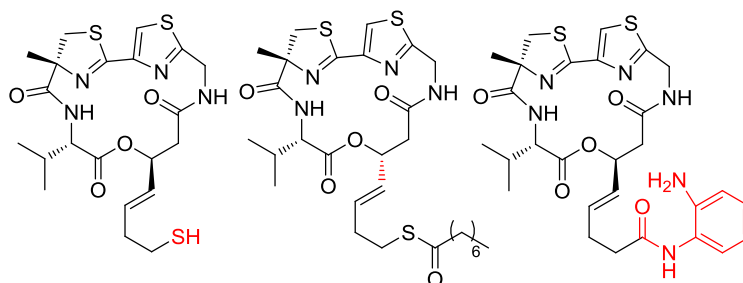


Figure 60 : Les structures du largazole thiol (gauche), de l'épi-largazole (milieu) et du largazole benzamide (droite).

Le largazole et les benzamides sont de bons inhibiteurs pris séparément. Un analogue du largazole avec une fonction benzamide, à la place de sa fonction thiol, a été étudié. Cet analogue a une inhibition sur HDAC1 30 fois plus faible que celle du largazole. Cependant, sa

sélectivité pour HDAC1 est remarquable.^{147, 155} Différentes structures du largazole ont déjà été étudiées et aucune n'a permis d'obtenir un inhibiteur plus actif voir plus sélectif.

Tableau 9 : Les inhibitions des analogues du largazole (IC₅₀ en nM)

Composés	HDAC globale	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6
Largazole thiol		0,77	3,4	3,4	570
Largazole	32	7,6			1800
Epi-largazole	3900				
Largazole benzamide		270	4100	4100	>30000

Le FK228 isostère, avec une fonction amide à la place de celle de l'ester, est 50 fois moins efficace comme inhibiteur de HDAC1 (Tableau 10). L'analogue avec deux résidus valine et deux résidus glycine est intéressant. La valine a été remplacé par une glycine, sans perte de la sélectivité pour HDAC1 (Figure 61).¹⁵⁷ Un autre analogue du FK228 avec une fonction thioester montre une inhibition de HDAC1 moins intéressante, mais il a gardé une bonne sélectivité pour la classe I.¹⁵⁸

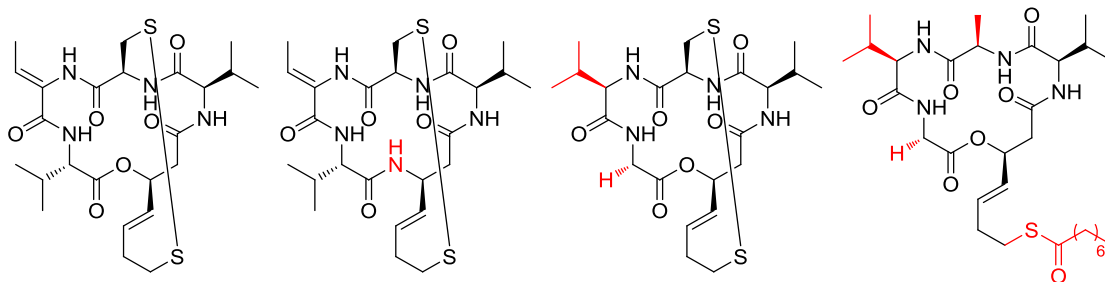


Figure 61 : FK228 (gauche), FK228 isostère (milieu gauche), FK228 valine (milieu droite) et FK228 thioester (droite).

Tableau 10 : Les inhibitions des analogues du FK228 (IC₅₀ en nM)

Composés	HDAC1	HDAC6
FK228	0.2	200
FK228 isostère	10	>3000
FK228 valine	1.6	897
FK228 thioester	1270	18300

5. Objectif

Les principales caractéristiques seront conservées dans nos molécules cibles (Figure 62) pour qu'elles gardent une bonne inhibition voire une bonne sélectivité.

Le largazole est constitué de deux hétérocycles, tandis que le FK228 n'a pas d'hétérocycle dans sa structure. Les molécules cibles seront composées d'un seul hétérocycle. La structure du largazole a déjà été modifiée par plusieurs hétérocycles pour remplacer le couple thiazoline-thiazole.¹⁴⁸ L'hétérocycle sera aromatique de type oxazole, thiazole ou pyridine. Le thiazole et l'oxazole sont des cycles à cinq chaînons. La pyridine est un cycle plus grand à six chaînons. L'atome d'azote possède un doublet électronique libre équatorial, qui est non délocalisé dans le système π aromatique. L'azote n'apporte donc pas de densité électronique supplémentaire. La taille de l'hétérocycle pourrait améliorer l'inhibition et la sélectivité pour HDAC1.

Le largazole et le FK228 ont un bras espaceur identique. La double liaison carbone-carbone de ce bras espaceur sera mimée par une fonction amide.¹⁵⁹ Le bras espaceur sera modulé à deux longueurs différentes. La longueur de l'espaceur ($n = 2$) pourrait ne pas être suffisamment longue pour complexer l'ion zinc dans le site catalytique des HDAC, avec le macrocycle et le ZBG que nous envisageons. C'est pourquoi, les analogues avec un espaceur d'une longueur $n = 3$, seront aussi synthétisés et testés.

Le largazole et le FK228 ont une fonction thiol comme ZBG. Un nouveau ZBG innovant de type alkyl/arylsulfonylhydrazide sera utilisé qui serait moins toxique et plus stable que la fonction acide hydroxamique. Ces sulfonylhydrazides peuvent être encombrés à leurs extrémités par les groupements mésyle ou tosyle. Les composés avec un groupement tosyle, devraient être plus sélectifs de HDAC1 voire HDAC2, car elles ont une cavité assez grande pour accueillir ce groupement encombrant.⁸⁹

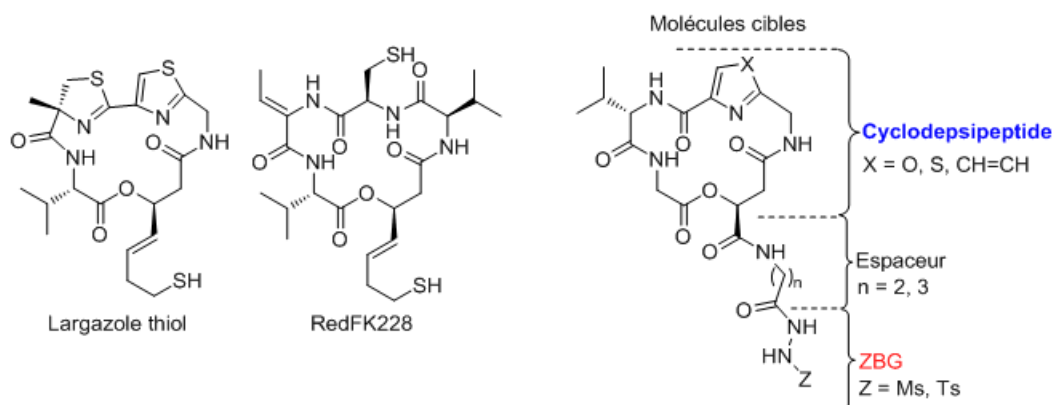


Figure 62 : Pharmacomodulations

Notre objectif est de synthétiser ces molécules cibles ayant différents hétérocycles, longueurs de bras espaceur et un nouveau ZBG. Leurs activités sur les HDAC seront évaluées dans le but de trouver une nouvelle molécule inhibant les HDAC de la classe I avec une bonne sélectivité.

Partie résultats et discussions

Partie résultats et discussions

6. Conception de nouveaux inhibiteurs

6.1 Rétrosynthèse

La synthèse convergente des analogues que nous nous proposons d'obtenir (Schéma 19),^{10, 144, 160} est basée sur quatre fragments :

- le dipeptide **A**,
- l'acide malique adéquatement protégé **B**,
- un hétérocycle **C**,
- le bras espaceur couplé à un groupement sulfonylhydrazide **D**.

Pour parvenir à la synthèse de ces molécules cibles, des couplages peptidiques sont envisagés pour relier les différents blocs. La macrolactamisation au niveau de la jonction entre l'hétérocycle **C** du côté *N*-terminal et l'acide malique **B** sera préférée pour une question de moindre encombrement stérique par rapport à une macrolactonisation entre le dipeptide **A** et le bloc **B**. Le bloc **B** sera synthétisé à partir d'acide malique qui aura ces deux fonctions acides protégées par des groupements protecteurs orthogonaux. Ainsi, il serait possible de former le macrocycle dans un premier temps et d'ensuite coupler le bloc **D** choisi.

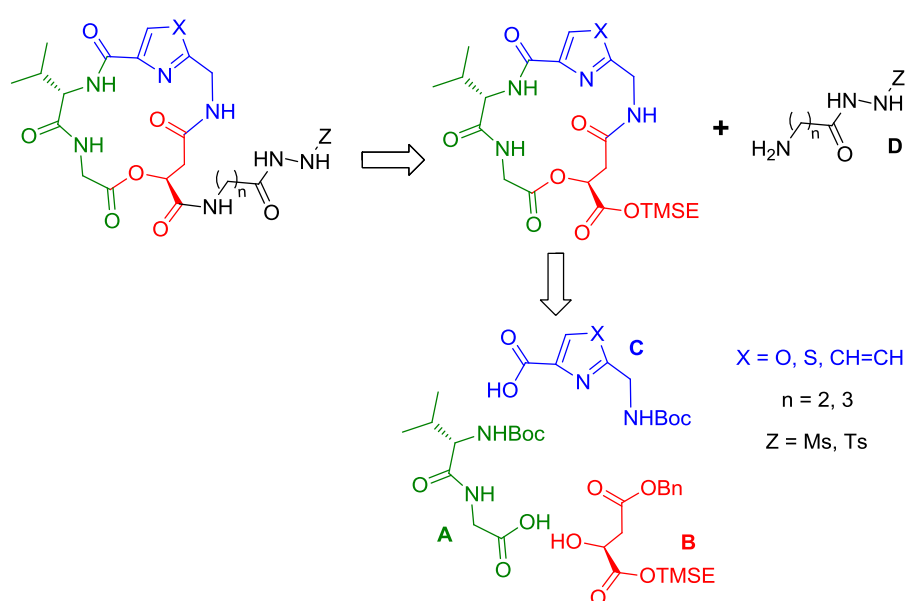
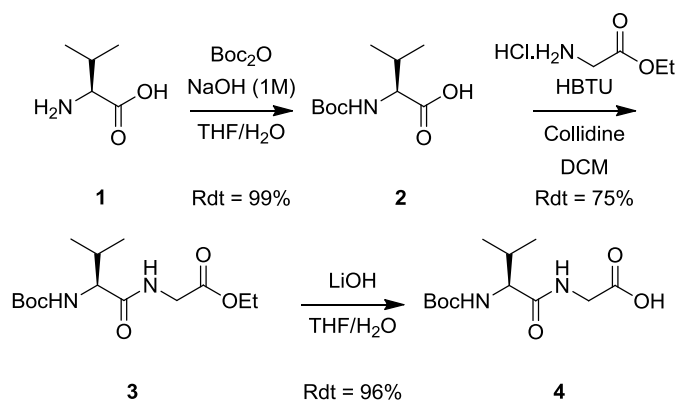


Schéma 19 : Rétrosynthèse

Trois cyclodepsipeptides seront synthétisés avec les trois hétérocycles envisagés. Les quatre blocs **D** avec deux longueurs (n) et deux groupements terminaux (Z) devraient être couplés avec les cyclodepsipeptides, ce qui permettrait d'obtenir une petite librairie d'analogues.

6.2 Synthèse du dipeptide (A)

La fonction amine de la valine **1** est protégée par un groupement carbamate Boc pour ensuite être couplée avec la glycine dont la fonction acide est protégée sous forme d'ester éthylique. Le couplage correspond à la formation d'une liaison amide entre une amine et un acide carboxylique. En présence d'une base, la 2,4,6-collidine, un agent de couplage, HBTU permet l'activation de la fonction acide rendant ainsi l'attaque nucléophile de l'amine possible sur l'atome de carbone de l'acide activé. Cet ester **3** est ensuite déprotégé par saponification pour être couplé avec le bloc **B** (Schéma 20).



Le bloc **A** peut-être obtenu en trois étapes avec un rendement global de 64 %.

6.3 Synthèse de l'acide malique modifié (B)

Avant de commencer ce projet, des essais avaient été réalisés avec un analogue du Bloc **B** (Figure 63), mais des difficultés avaient été rencontrées lors de la déprotection du groupement benzyle après la macrocyclisation. (Plus de détails dans la partie : 6.12 Déprotection de l'ester exocyclique)

Pour contourner ce problème, nous avons choisi de synthétiser un nouveau Bloc **B** (Figure 64) en permutant les fonctions ester. Ainsi, l'acide protégé par le groupement TMSE devrait pouvoir être déprotégé.

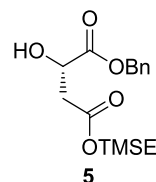


Figure 63 : Analogue du Bloc B

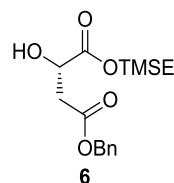
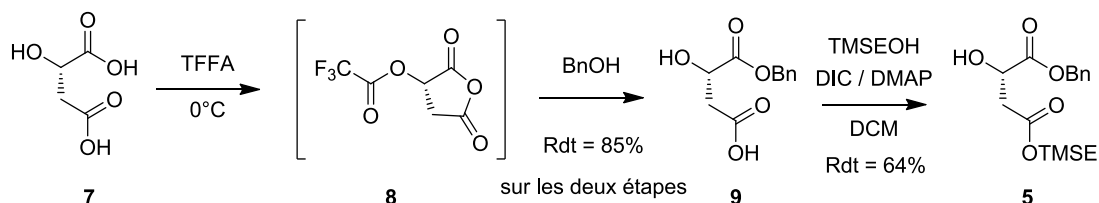


Figure 64 : Nouveau Bloc B

Pour former l'analogue du Bloc **B**, la voie décrite par Schobert *et al.*¹⁶¹ est envisagée. L'acide (L)-malique **7** est protégé sélectivement par un groupement trifluoroacétate en passant par la formation d'anhydride à l'aide de l'anhydride trifluoroacétique (TFFA). Le groupement trifluoroacétate qui est électroattracteur augmente l'électrophilie du carbonyle adjacent. L'alcool benzylique va attaquer le côté le plus électrophile, d'où l'ouverture du côté le plus encombré. Il faut ensuite protéger la seconde fonction acide par du triméthylsilyléthanol (Schéma 21).

Schéma 21 : Voie décrite par Schobert *et al.*

Pour former le nouveau bloc **B**, la même voie a été testée avec l'alcool (TMSE-OH). L'acide (L)-malique **7** réagit avec le TFFA, mais il est ensuite difficile d'obtenir le composé souhaité (Schéma 22). L'intermédiaire fluoré, avec des restes de TFFA, jouent le rôle des ions fluorure et déprotègent le groupement –OTMSE dans les conditions habituelles de déprotection de l'ester. Ce qui empêche sa formation.

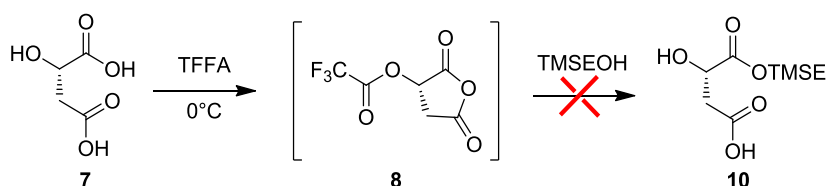


Schéma 22 : Interactions entre TMSEOH et les restes de TFFA

Nous avons changé d'approche en utilisant le chlorure d'acétyl, pour former l'anhydride qui est ensuite ouvert avec l'alcool (TMSEOH) avec un bon rendement (Schéma 23).^{162, 163}

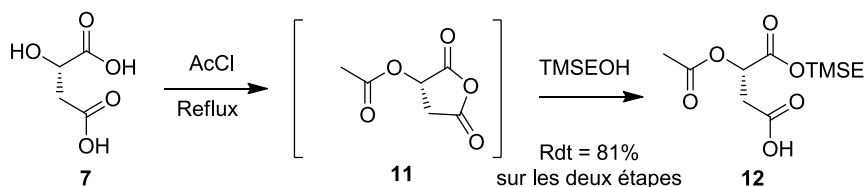


Schéma 23 : Synthèse du composé 12

La déprotection de l'acétate **12** est faite par hydrolyse basique avec le carbonate de potassium, mais le composé s'hydrolyse en acide malique (Schéma 24).

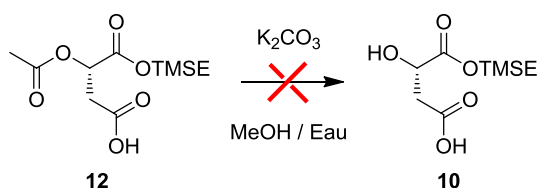


Schéma 24 : Difficultés lors de la déprotection du groupement acétate

Pour faciliter le suivi par CCM des transformations réalisées durant la réaction de déprotection, la seconde fonction acide du composé **12** a été protégée sous forme d'ester allylique (Schéma 25). Néanmoins, l'hydrolyse de la fonction acétate s'avère être plus lente que celles des autres esters du composé **13**. Après plusieurs essais, nous avons changé de stratégie pour obtenir le Bloc B.

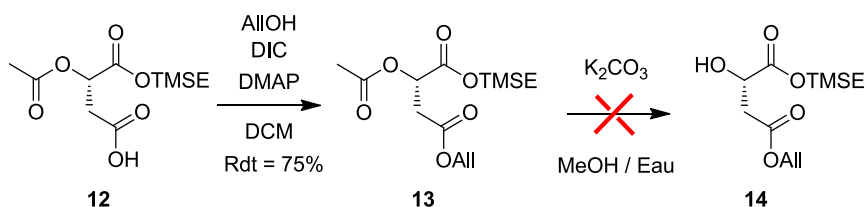


Schéma 25 : Groupement acétate difficile à éliminer

Le 2,2-diméthoxypropane **15** permet la formation de dioxolane qui est l'oxo-acétal cyclique entre les fonctions alcool et acide en α l'une de l'autre avec un rendement de 91 %. Cette réaction forme du méthanol qui a un point d'ébullition plus bas que celui du toluène. Ainsi, l'équilibre de la réaction est déplacé vers la formation de l'oxo-acétal, par élimination du méthanol. La fonction acide en position β est maintenant la seule fonction pouvant être protégée sous la forme d'ester benzylique avec un bon rendement (Schéma 26).^{164, 165}

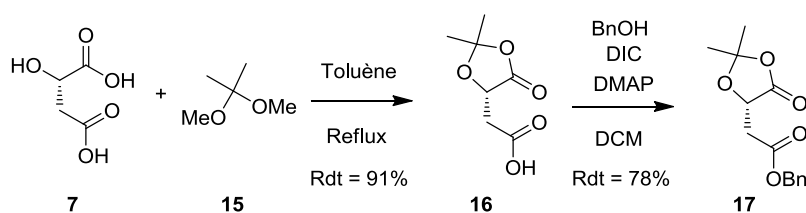


Schéma 26 : Nouvelle voie pour obtenir le Bloc B

Dans un premier temps, le composé **17** est déprotégé en présence de TFA dans de l'eau, sans déprotéger l'estér benzylique. La fonction acide libre est à nouveau protégée avec du triméthylsilyléthanol. Le composé **6** est obtenu avec un rendement de 13 % (Schéma 27).

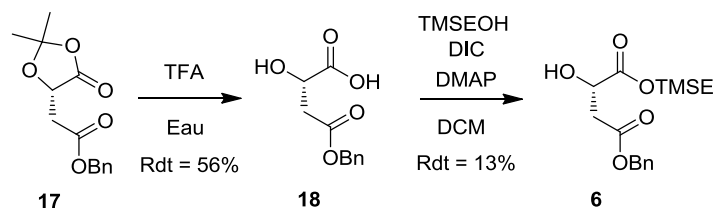


Schéma 27 : Synthèse du Bloc B

Afin d'améliorer le rendement, le composé **17** a été directement mis en réaction avec l'alcool TMSEOH, en présence d'acide APTS qui permet en une étape, la déprotection de l'oxo-acétal et la reprotction de la fonction acide en α avec le groupement TMSE. L'acide est ajouté en quantité catalytique pour éviter la déprotection des fonctions esters. L'alcool est ajouté petit à petit sur plusieurs jours en respectant les conditions anhydres. La réaction est lente, mais permet d'obtenir, dans ces conditions, le produit **6** avec un rendement de 72 % (Schéma 28).

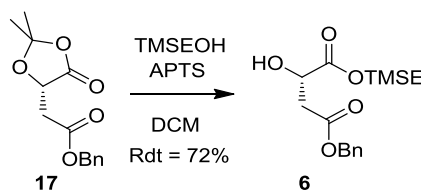


Schéma 28 : Optimisation de la synthèse du Bloc B

Le bloc **B** peut-être obtenu en trois étapes avec un rendement global de 51 %.

6.4 Synthèse de l'oxazole disubstitué (C)

La synthèse d'oxazoles fonctionnalisés repose sur une étape clé, à savoir l'enchaînement cyclisation/aromatisation du dipeptide (Gly-Ser). Pour obtenir ce dipeptide, La Boc-O-Benzyl-L-sérine **19** est engagée dans une réaction d'estérification avec un agent de couplage (DIC : *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide) et une base (DMAP : 4-Diméthylaminopyridine) dans le méthanol durant une nuit. L'acide aminé protégé **20** est obtenu avec un rendement de 80 %. La fonction amine de celui-ci est ensuite déprotégée par une hydrolyse acide avec un rendement de 95 % (Schéma 29).

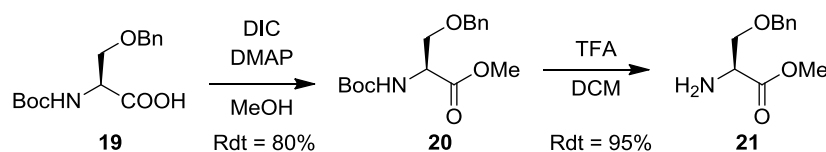


Schéma 29 : Préparation de la Sérine protégée

L'acide aminé déprotégé **21** est engagé dans une réaction de couplage peptidique avec la Boc-Gly-OH, en présence de HBTU et de 2,4,6-collidine dans le dichlorométhane anhydre. Le dipeptide **22** est obtenu avec un rendement de 92 % (Schéma 30). L'utilisation de collidine diminue les risques d'épimérisation du centre asymétrique.¹⁶⁶

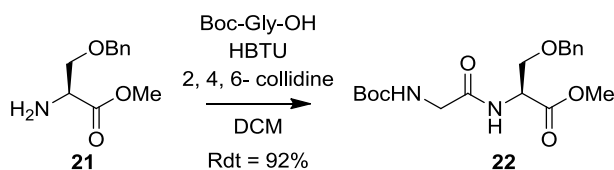


Schéma 30 : Couplage avec la glycine protégée

Une déprotection du groupement benzyle par une réaction d'hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon est réalisée avec difficulté. Le produit **23** est obtenu avec un rendement de 90 % après avoir relancé la réaction 5 à 6 fois (Schéma 31).

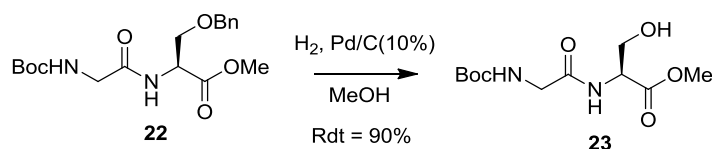


Schéma 31 : Hydrogénolyse

Le dipeptide subit une cyclisation avec le DAST à -80°C, pour conduire intermédiairement à l'oxazoline **24**.¹⁶⁷ Le DAST est un agent fluorant qui réagit avec le groupement hydroxyle qui sera, par la suite, éliminé lors de l'attaque de l'atome d'oxygène du carbonyle permettant la cyclisation. L'oxazoline étant instable, le brut réactionnel est rapidement lavé avec une solution basique froide et engagé directement dans la réaction d'aromatisation à 0°C. Le BrCCl₃ permet l'halogénéation en α de l'ester. Elle est suivie d'une déshydrohalogénéation qui oxyde l'oxazoline. L'oxazole **25** est obtenu avec un rendement de 52 % sur deux étapes (Schéma 32).¹⁶⁸

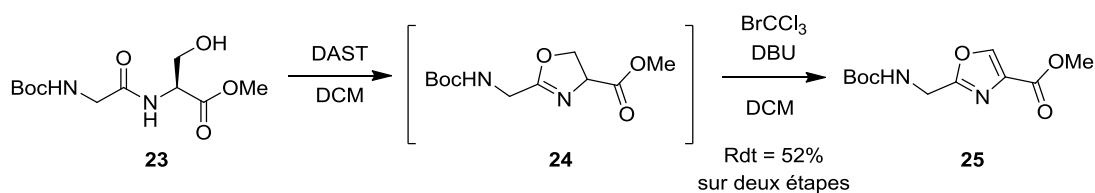


Schéma 32 : Synthèse de l'oxazole disubstitué

6.5 Synthèse du thiazole disubstitué (C)

Le mode opératoire utilisé pour la synthèse de ce thiazole est décrit dans la littérature.¹⁶⁹ Un couplage entre le chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-cystéine **26** et le Boc-amino-acétonitrile **27** en présence de triéthylamine dans du méthanol, conduit à la formation d'une thiazoline **28**. Celle-ci est aussi instable que l'oxazoline. La thiazoline est traitée rapidement à froid et oxydée par la même méthode en présence de BrCCl_3 et de DBU. Le cycle thiazole **29** est obtenu avec un rendement global de 46 % (Schéma 33).

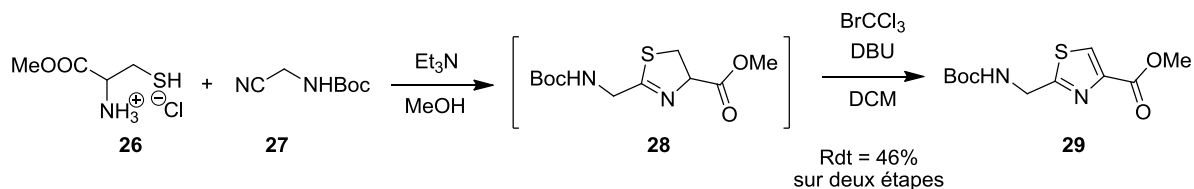


Schéma 33 : Synthèse du thiazole disubstitué

6.6 Synthèse de la pyridine disubstituée (C)

Ce bloc C a été synthétisé, en suivant les modes opératoires décrits dans la littérature.¹⁷⁰ Les fonctions acides de l'acide pyridine-2,6-dicarboxylique **30** sont protégées sous forme d'ester méthylique en passant par un chlorure d'acide avec le chlorure de thionyle. Une des deux fonctions esters est réduite en alcool en présence de NaBH_4 , avec un rendement de 76 % (Schéma 34). En utilisant des conditions douces, une réduction partielle permet d'obtenir le 6-(hydroxyméthyl)picolinate de méthyle **32**.

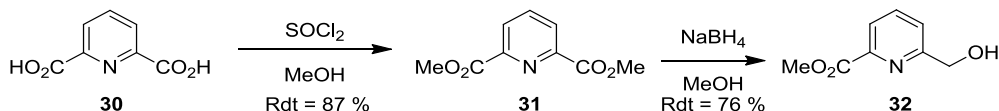


Schéma 34 : Synthèse du composé 32

Par une réaction d'Appel,¹⁷¹ le groupement hydroxyle est substitué par un atome de brome, le composé **33** est obtenu avec un rendement de 72 %. L'atome de brome est ensuite substitué par une amine, le composé **34** est obtenu avec un rendement de 76 % (Schéma 35). Les conditions opératoires d'alkylation permettront de s'arrêter à la monoalkylation.

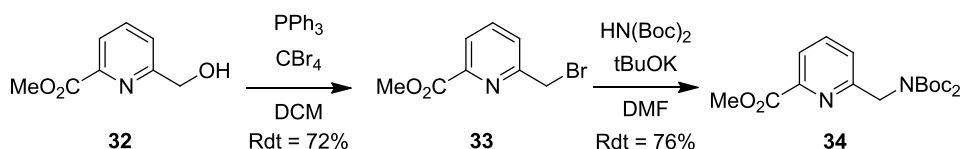


Schéma 35 : Synthèse de la pyridine disubstituée

6.7 Hydrolyse basique des hétérocycles

Pour préparer le composé au couplage peptidique, l'hétérocycle est engagé dans une réaction de saponification en présence d'hydroxyde de lithium monohydraté dans du THF et de l'eau (Schéma 36). Les rendements sont quasiment quantitatifs.

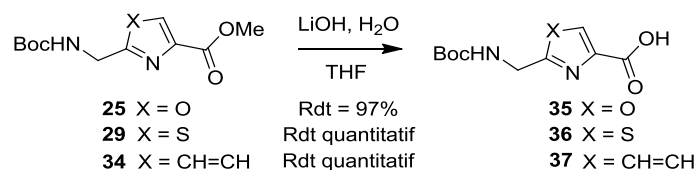


Schéma 36 : Saponification de l'ester des hétérocycles

Le bloc **C** de type oxazole est obtenu en sept étapes avec un rendement global de 36 %. Celui de type thiazole est synthétisé en trois étapes avec un rendement global de 46 %. Enfin, le bloc **C** de type pyridine est obtenu en quatre étapes avec un rendement global de 41 %.

6.8 Synthèse des Blocs D (Z = Ms, Ts, n = 2, 3)

Le composé **43** est obtenu à partir du carbazate de benzyle **40** et de Boc-β-alanine **42**. Le carbazate de *tert*-butyle est dissous dans du THF en présence de triéthylamine, du chloroformiate de benzyle est ajouté doucement. Durant la réaction, la triéthylamine permet la neutralisation de l'acide chlorhydrique formé. Après 2 h la réaction est terminée. Suite à plusieurs lavages et une purification par colonne de gel de silice, le composé **39** est ensuite déprotégé par hydrolyse acide avec du TFA pour obtenir le carbazate de benzyle **40** (Schéma 37).

La β-alanine **41** est dissoute dans du THF, une solution aqueuse de soude et le dicarbonate de di-*tert*-butyle sont ajoutés. Après 5 h d'agitation, le THF est évaporé, la soude est neutralisée et le composé protégé **42** est extrait avec de l'acétate d'éthyle.

Pour réaliser le couplage, le composé **42** est dissous dans du DCM en présence de DIPEA et d'un agent de couplage, HBTU, qui va activer la fonction acide. Après 30 minutes, le carbazate **40** est ajouté, 4 h plus tard la réaction est terminée. L'hydrazide **43** est obtenu avec un rendement de 72 %.

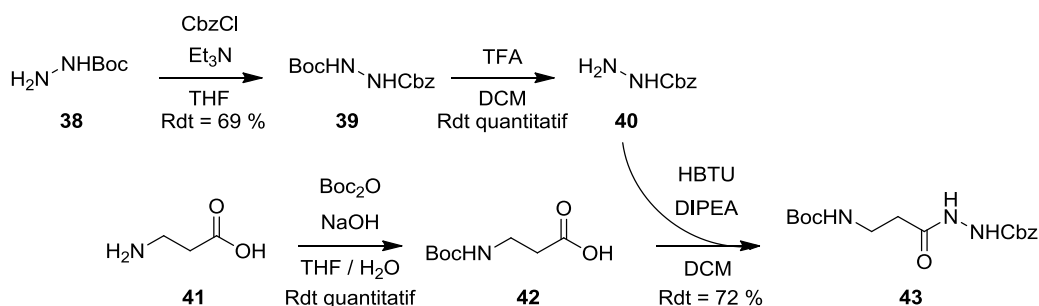


Schéma 37 : Synthèse du composé 43

Le composé **43** est déprotégé par hydrogénolyse avec un bon rendement. Ensuite, il réagit avec le chlorure de mésyle permettant d'obtenir le composé **45** (Schéma 38). Un premier bloc **D** est obtenu après déprotection en présence de TFA dans le dichlorométhane. Ce composé **46** correspond à l'espaceur $n = 2$ et le groupement chélatant l'ion zinc $Z = \text{Ms}$. Il faut sept étapes pour obtenir ce bloc **D** avec un rendement global de 26 %.

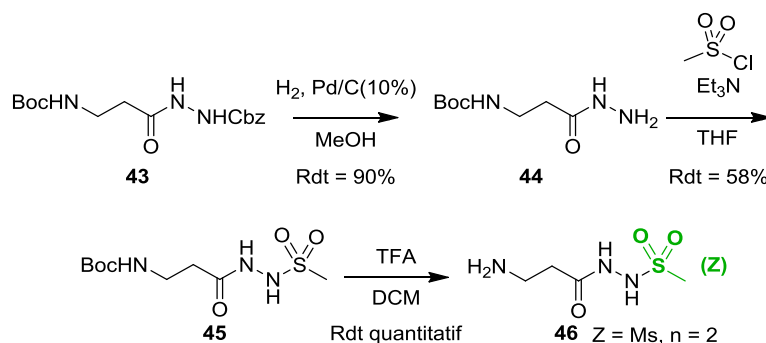
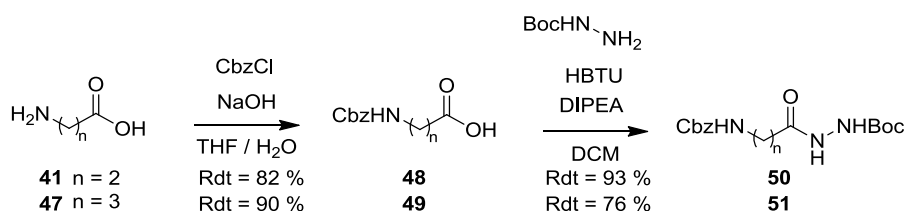


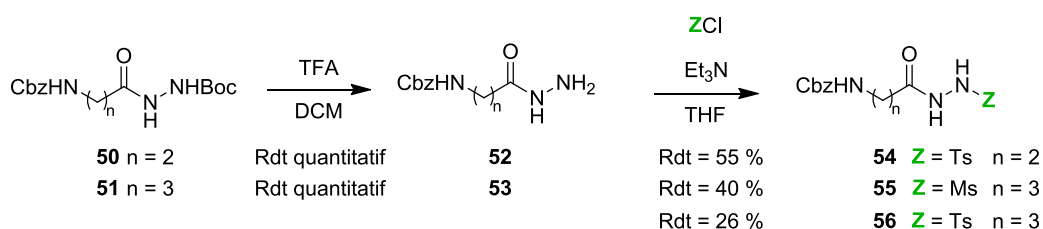
Schéma 38 : Synthèse du Boc D

Les autres blocs **D** ont été obtenus par une autre voie de synthèse plus rapide. La β -alanine **41** ($n = 2$) est protégée sous la forme de carbamate de benzyle avec un rendement de 82 % et le composé **48** est couplé avec le *tert*-butylcarbazate pour obtenir le composé **50** avec un rendement de 93 % (Schéma 39).

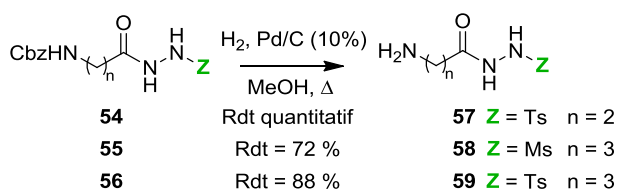
De la même façon, l'acide 4-aminobutanoïque **47** ($n = 3$) est protégé sous la forme de carbamate de benzyle et le composé **49** est couplé avec le *tert*-butylcarbazate pour obtenir le composé **51** avec un rendement de 76 %.

Schéma 39 : Synthèse des espaceurs $n = 2, 3$

Les composés **50** et **51** sont déprotégés en présence de TFA dans le dichlorométhane, et réagissent avec les chlorures de tosylo ou de mésyle en présence de triéthylamine dans le THF. Les composés **54**, **55** et **56** sont obtenus avec des rendements de 26 à 55 % (Schéma 40). Le même mode opératoire a été utilisé pour obtenir les différents analogues.

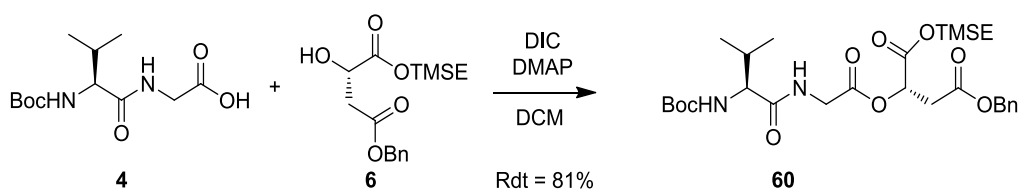
Schéma 40 : Synthèse des blocs **D** protégés

Les blocs **D** (**Z** = Ms, $n = 3$ et **Z** = Ts, $n = 2, 3$) sont obtenus après déprotection de l'amine par hydrogénolyse. Le composé protégé est mis en suspension dans le méthanol avec du palladium sur charbon à 10 %. Une circulation de dihydrogène est mise en place, plusieurs cycles vide-dihydrogène sont réalisés avec une rampe à vide pour purger l'air du montage. Pour la suite de la réaction une pression statique de dihydrogène est maintenue à l'aide d'une baudruche. Cette réaction est généralement réalisée à température ambiante, mais les composés de départ **54**, **55** et **56** sont peu solubles dans le méthanol. Pour faciliter la réaction et la solubilisation des composés, le milieu réactionnel est chauffé à reflux après une journée dans ces conditions, la réaction est terminée. Il reste à filtrer le milieu réactionnel sur celite à chaud pour récupérer le produit déprotégé. Il faut cinq étapes pour obtenir un bloc **D** avec un rendement global de 25 à 40 % (Schéma 41).

Schéma 41 : Déprotection des blocs **D**

6.9 Couplage du dipeptide avec l'acide malique (Blocs **A** et **B**)

Le dipeptide Boc-Val-Gly-OH **4** (Bloc **A**) est estérifié avec le composé **6** (Bloc **B**) par la méthode de Steglich¹⁷² à l'aide de DIC et de DMAP. L'acide **4** est dissous dans du dichlorométhane en présence de DMAP. Après avoir refroidi la solution à 0°C, la DIC est ajoutée et permet l'activation de l'acide. Ensuite, l'alcool **6** est ajouté goutte-à-goutte. Après une nuit d'agitation à température ambiante, l'ester **60** est obtenu après purification par colonne de gel de silice avec un rendement de 81 % (Schéma 42).

Schéma 42 : Couplage des blocs **A** et **B**

6.10 Couplage du pseudopeptide avec l'hétérocycle (Blocs AB et C)

Le groupement Boc du composé **60** est éliminé par hydrolyse acide pour obtenir le composé **61** avec un bon rendement. La fonction amine est libre pour le couplage peptidique suivant avec la fonction acide d'un des trois composés hétérocycliques (**C**) (Schéma 43). Les blocs **ABC** sont obtenus avec de bons rendements de 83 à 89 %.

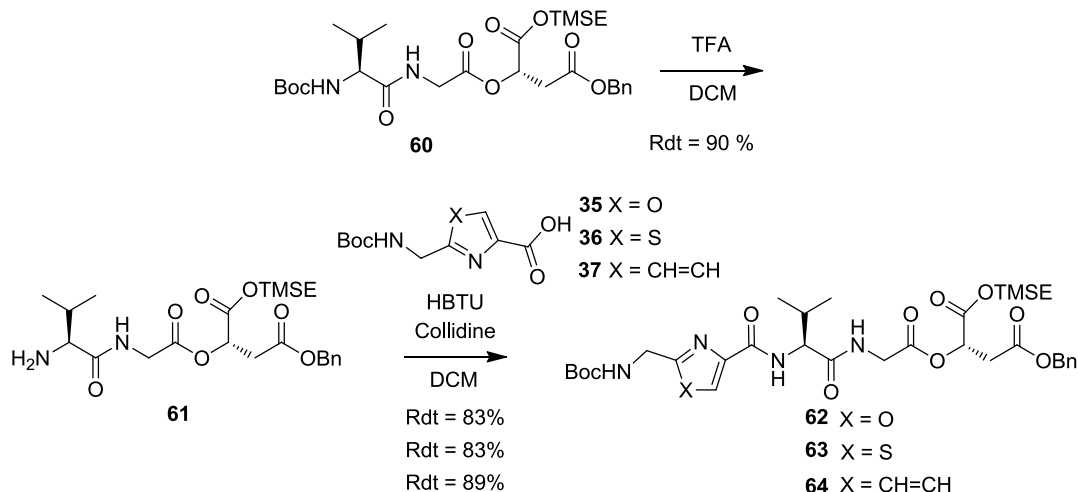


Schéma 43 : Couplage des Blocs AB et C

6.11 Macrolactamisation

Les fonctions carbamates des composés **62** et **64** sont déprotégées en présence de TFA qui est ajouté goutte-à-goutte à 0°C dans le dichlorométhane. Après une heure à 0°C et une autre à température ambiante, l'acide est neutralisé doucement avec une solution à 5 % de NaHCO₃, ainsi la fonction amine est active et non sous la forme de sel de TFA qui pourrait gêner la réaction de macrocyclisation. Suite à cette première déprotection, les composés **65** et **66** sont hydrogénés en moins de 2 h pour obtenir les fonctions acides (**Schéma 44**). Les déprotections de l'amine et de l'acide sont réalisées très rapidement pour enchaîner la réaction de macrocyclisation dans la même journée pour éviter toutes dégradations.

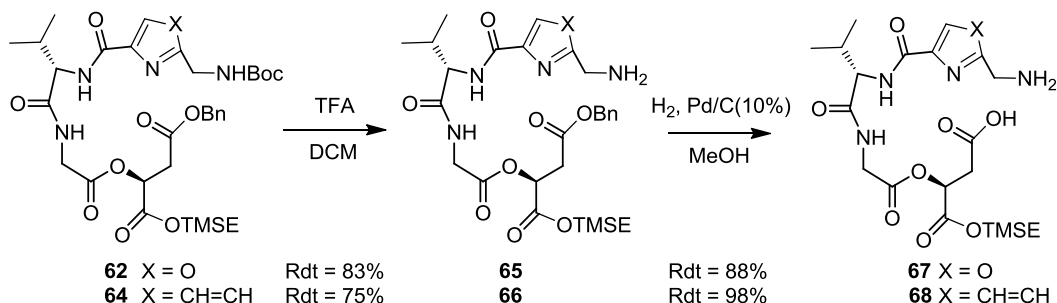


Schéma 44 : Déprotection de l'ester et du carbamate

Le composé contenant le cycle thiazole n'a pas été synthétisé. Nous avons rencontré des difficultés lors de l'hydrogénolyse. Nous pensons qu'il y a eu un empoisonnement du catalyseur qui pourrait être dû à l'atome de soufre du cycle thiazole.

Différentes conditions de macrolactamisation ont été essayées et sont réunies dans le tableau 11. Il est préférable de réaliser la déprotection de l'amine avant l'hydrogénolyse pour avoir un pseudopeptide déprotégé propre. L'HOAt accélère le processus de couplage et améliore le rendement de la réaction.¹⁷³

Tableau 11 : Récapitulatif des conditions de cyclisation

X	HATU (éq.)	DIEA (éq.)	HOAt (éq.)	Ajout lent	Ordre des déprotections	Produit
S	-	-	-	-	TFA puis H ₂	0 %
O	1,2	5	-	HATU (2,5 h)	H ₂ puis TFA	0 %
O	6	8	-	-	H ₂ puis TFA	mélange
O	1	2,5	2,5	-	TFA puis H ₂	0 %
O	1,2	5	1,2	HATU (5 h)	TFA puis H ₂	mélange
O	3	3	-	Pseudopeptide (2,5 h)	TFA puis H ₂	0 %
O	5	7	-	HATU (30 min)	TFA puis H ₂	mélange
O	6	8	-	HATU (10 min)	TFA puis H ₂	24 %
O	6	6	-	Pseudopeptide (2,5 h)	TFA puis H ₂	36 %
O	1,5	3	1,5	Pseudopeptide (2,5 h)	TFA puis H ₂	54 %
CH=CH	1,2	8	-	HATU (2 h)	TFA puis H ₂	0 %
CH=CH	1,5	3	1,5	Pseudopeptide (1 h)	TFA puis H ₂	6 %

Finalement, le composé déprotégé est dissous dans l'acétonitrile anhydre, à une concentration de l'ordre de 1 mmol/L en présence de HATU, de HOAt et de DIPEA. En diluant le pseudopeptide à de faible concentration, le couplage intramoléculaire est favorisé. Pour éviter la formation de dimère, il est préférable d'ajouter lentement les pseudopeptides **67** ou **68** sur une solution contenant l'agent de couplage au lieu d'ajouter l'agent de couplage sur une solution de pseudopeptide. L'utilisation de HOAt favorise la cyclisation. Les macrocycles contenant les cycles oxazole **69** et pyridine **70** ont pu être obtenus avec des rendements de 54 % et 6 %, respectivement (Schéma 45).^{174, 175, 176}

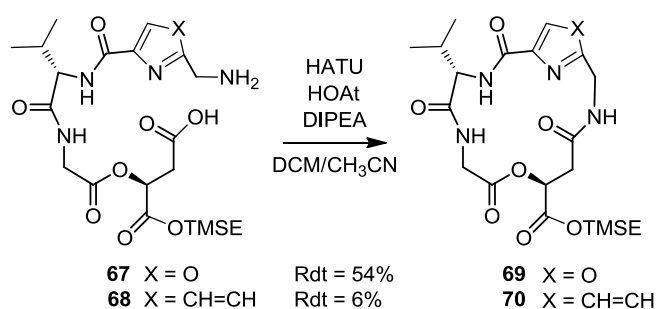


Schéma 45 : Macrolactamisation

6.12 Déprotection de l'ester exocyclique

L'ester-OTMSE exocyclique doit encore être déprotégé pour greffer le bloc **D**. Cette déprotection n'a jamais pu être réalisée et ceci aussi bien dans le THF que dans le DMF, à température ambiante ou après chauffage prolongé (Schéma 46).

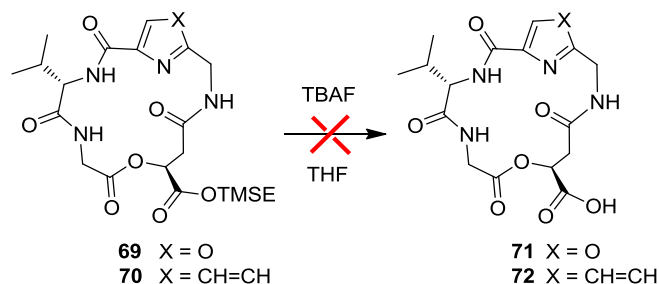


Schéma 46 : Déprotection de la fonction acide

Soit les conditions sont trop douces et le composé ne réagit pas, soit elles sont trop drastiques : la fonction acide est déprotégée, mais le macrocycle s'ouvre ou se décompose. Les différentes conditions de déprotection testées sont réunies dans le tableau 12.

Tableau 12 : Récapitulatif des conditions de déprotection

Composé	Réactif	Nbr d'éq.	Solvant	T(°C)	Durée (h)	Résultat
69	TBAF	2	THF	Ta	1	Produit de départ+ dégradation
69	TBAF	4	THF	Ta	1	Produit de départ+ dégradation
70	TBAF	4	THF	Ta	1	Produit de départ+ dégradation
69	TBAF	4	DCM	Ta	1	Produit de départ+ dégradation
69	TBAF	2	MeOH	Ta	48	Dégradation totale
69	NH ₄ F	15	THF	Ta	24	Produit de départ+ dégradation
69	NH ₄ F	33	THF	66	24	Produit de départ+ dégradation
69	HCl _(gaz)	-	DCM	Ta	24	Produit de départ+ dégradation
70	CeF	40	DMF	Ta	2	Produit de départ+ dégradation

Il est à noter que des difficultés lors de la déprotection d'un ester benzylique avaient déjà été constatées avec un autre macrocycle **73** comprenant un cycle thiazole synthétisé au préalable au laboratoire (Schéma 47).

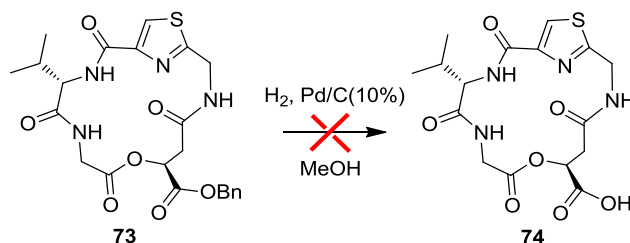


Schéma 47 : Déprotection de macrocycle analogue de type thiazole

Plusieurs conditions de déprotection avaient été testées et sont réunies dans le tableau 13. Lors de ces essais, soit il n'y avait pas de réaction et le réactif de départ était retrouvé inchangé, soit il y avait une décomposition du composé.

Tableau 13 : Récapitulatif des conditions de déprotection

Réactif	Catalyseur	Nbr d'éq.	Solvant	T(°C)	Durée (h)	Résultat
H ₂	Pd/C	-	MeOH	Ta	2	Produit de départ
H ₂	Pd/C	-	MeOH	Ta	24	Produit de départ
NH ₃ COOH	Pd/C	4	MeOH	Ta	2	Produit de départ
NH ₃ COOH	Pd/C	8	MeOH	Ta	2	Produit de départ + dégradation
NH ₃ COOH	Pd/C	4	MeOH	65	5	Produit de départ + dégradation
NH ₃ COOH	Pd/C	8	MeOH	65	5	Dégradation totale

Après avoir mis en évidence ces difficultés, l'hypothèse serait qu'une conformation particulière du macrocycle empêcherait la déprotection. La fonction ester se replierait à l'intérieur du cycle et deviendrait inaccessible. Il faudrait faire des études de dynamique moléculaire pour apporter la preuve de notre concept.

6.13 Une nouvelle stratégie

Une nouvelle stratégie de synthèse a été réalisée pour obtenir les composés cibles. Plutôt que de former le macrocycle **ABC** et de greffer la chaîne latérale **D** comprenant le ZBG par la suite, ce qui est difficile, nous venons de le montrer. L'ensemble du squelette de la molécule sera assemblé (bloc **ABCD**). Enfin, les étapes de déprotection et de cyclisation devraient permettre l'accès aux analogues attendus.

Le bloc **ABC** est déprotégé avec du TBAF dans du THF et rapidement mis en réaction pour être couplé avec un bloc **D** (Schéma 48). Le bloc **ABCD** a pu être obtenu avec une molécule linéaire plutôt que cyclique. Néanmoins, le couplage entre les blocs **ABC** et **D** est délicat de par la grande polarité de ceux-ci. Le bloc **D** est peu soluble dans l'acétonitrile qui est un solvant usuel de couplage. De ce fait, les réactions ont été effectuées dans le DMF.

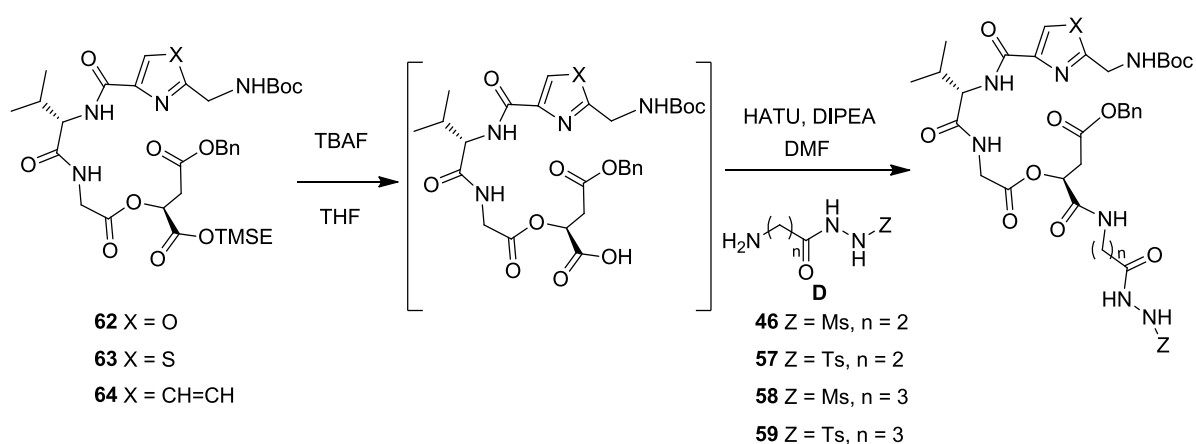


Schéma 48 : Couplage des Blocs ABC et D

Les produits obtenus sont fragiles et malgré des tentatives de purifications par colonne chromatographique sur silice ouverte ou par CLHP, les produits se dégradent. Seules des plaques préparatives ont permis d'isoler nos composés avec des rendements de 4 à 55 %, donnant accès à nos blocs **ABCD** (Tableau 14). Seul le composé **80** n'a pas pu être isolé.

Tableau 14 : Rendements sur deux étapes (déprotection et couplage)

Réactifs	X	n	Z	Produits	Rdt (%)
62	O	2	Ms	75	25
63	S	2	Ms	76	38
64	CH=CH	2	Ms	77	12
62	O	2	Ts	78	4
63	S	2	Ts	79	18
62	O	3	Ms	80	0
62	O	3	Ts	81	55

Enfin, les fonctions acide et amine sont déprotégées successivement par hydrogénolyse, puis hydrolyse acide. Le composé est cyclisé en présence de HATU, de HOAt et de DIPEA dans le DMF à haute dilution (Schéma 49). Ces dernières étapes sont délicates et deux éléments sont vraiment importants : le produit totalement déprotégé doit être extrêmement propre, les réactifs et solvant doivent être strictement anhydres.

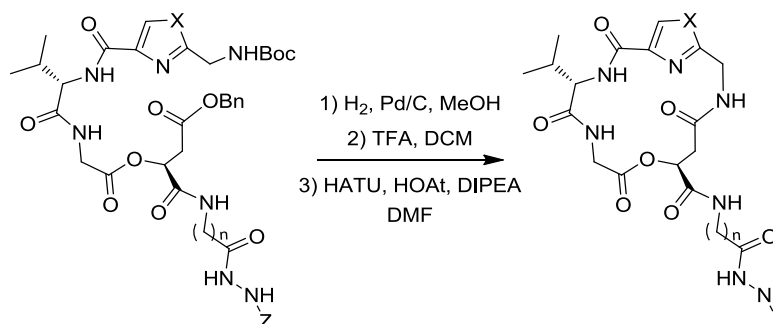


Schéma 49 : Macrocyclisation

Selon le composé utilisé, la réaction de cyclisation est plus ou moins propre. Les meilleurs rendements sont obtenus avec les macrocycles composés du cycle thiazole. Tous les composés finaux ont été purifiés par CLHP et obtenus en quantité suffisante avec des rendements de 12 à 42 % (Tableau 15).

Tableau 15 : Rendements des cyclisations sur trois étapes

Réactifs	X	n	Z	Produits	Rdt (%)
75	O	2	Ms	82	12
76	S	2	Ms	84	33
77	CH=CH	2	Ms	85	23
78	O	2	Ts	86	13
79	S	2	Ts	87	42
81	O	3	Ts	88	21

Durant la synthèse du composé **82**, un autre composé est formé ayant une structure très proche. Ce composé **83** a été purifié. La spectroscopie de masse révèle une masse supérieure de 32 g/mol comparé au composé **82**. Cette molécule rend la purification par colonne chromatographique sur gel de silice difficile.

6.14 Etude RMN

Le composé **82** a été synthétisé et purifié par CLHP. Néanmoins, les spectres de RMN¹H et ¹³C révèlent un mélange de deux composés avec un ratio de 50/50. La réaction a été réalisée plusieurs fois et le même mélange a toujours été obtenu. Les deux composés ne peuvent pas être séparés en CLHP malgré différentes conditions. Le mélange est composé de molécules de même masse moléculaire. Le même cas de figure a été rencontré avec le composé **88** (Figure 65).

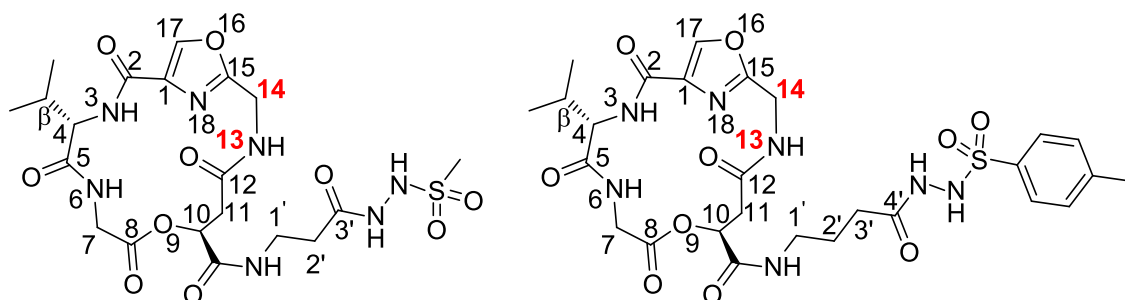


Figure 65 : Structure des composés **82** (gauche) et **88** (droite)

Nous notons que seuls les macrolides composés d'un cycle oxazole se retrouvent sous la forme d'un mélange de rotamères, bien que nous n'ayons pas rencontré ce "phénomène" pour le composé **86**.

Afin de mieux comprendre quelle était la nature de notre mélange, une étude de RMN¹H à différentes températures a été effectuée. Une variation de température de 25 à 45°C a été appliquée en RMN¹H au composé **88**. Deux signaux distincts ont pu être mis en évidence : les signaux correspondants à H_β de la valine et ceux correspondants à un méthylène de la chaîne latérale du bloc **D** (H_{3'}). Ceux-ci se rapprochent avec l'augmentation de la température pour ne former qu'un seul multiplet pour le signal H_β à 2,26 ppm et le signal correspondant à H_{3'} sous forme de massif à 1,92-2,02 ppm (Figure 66).

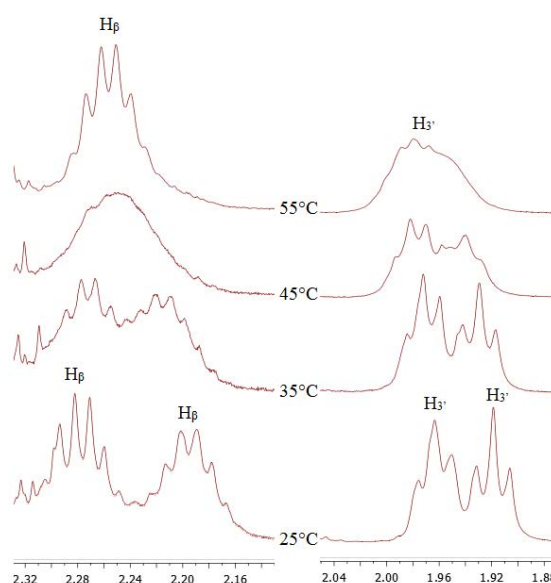


Figure 66 : Etude RMN du composé **88**

La coalescence observée pour ces deux signaux permet de conclure à un mélange de rotamères. Après retour à la température ambiante, le mélange s'est reformé.

Concernant le composé **82**, la coalescence n'a pas été observée à une température de 45°C (Figure 67). Néanmoins, les limites de la technique (microtube RMN en plastique, spineur spécifique) ne permettent pas de monter plus haut en température. Le composé **82** doit avoir une température de coalescence plus élevée, car il y a des rapprochements significatifs permettant de penser qu'il s'agit aussi d'un mélange de deux rotamères.

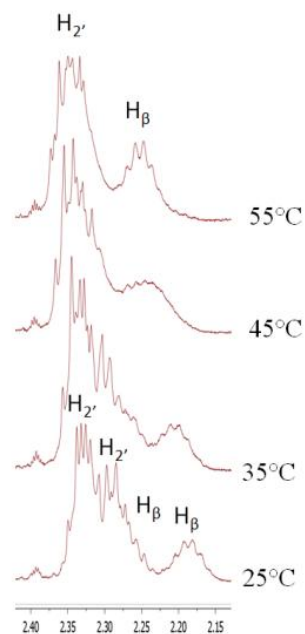


Figure 67 : Etude RMN du composé **82**

Les deux rotamères du composé **82** ont des spectres de RMN¹H et ¹³C différents, mais ces différences sont moins visibles sur la partie espaceur et quasi invisibles sur la partie du ZBG. Pour le rotamère A, les deux signaux des H₁₄ sont identiques, tandis que pour l'autre ils ne le sont pas. En effet, pour le rotamère A, les deux H₁₄ ont des environnements électroniques identiques, les deux angles dièdres H₁₃-N₁₃-C₁₄-H₁₄ sont égaux. La fonction amide O=C₁₂-N₁₃-H₁₃ et l'oxazole, forment un seul plan pour le rotamère A, alors que le rotamère B possède deux angles différents (Figure 68).

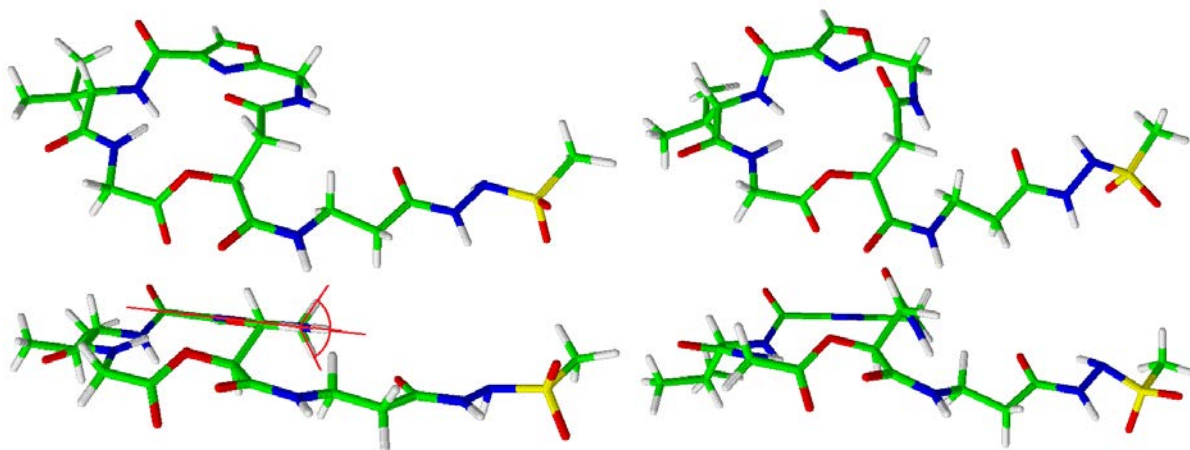


Figure 68 : Structure hypothétique du rotamère A (gauche) et du rotamère B (droite) du composé **82**

6.15 Modélisation moléculaire

Le Docteur Gautier Moroy qui travaille dans le groupe Molécules Thérapeutiques in silico (MTi) à l'Université de Paris Diderot a recherché la structure chimique optimisée du composé **82** à l'aide d'outils de mécanique moléculaire classique. La structure optimisée du composé **82** est schématisée sur la figure 69. Une seule structure a été trouvée qui serait celle du rotamère B.

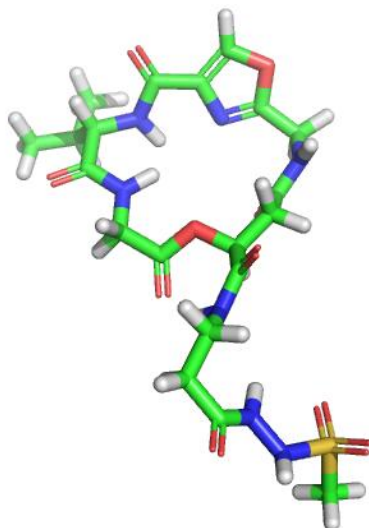


Figure 69 : Structure modélisée du composé **82-B**

La formation du deuxième rotamère pourrait s'expliquer par l'hypothèse suivante : une liaison hydrogène (double flèche en pointillé noire sur la figure 70) se formerait entre l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle en C₁₂ et l'atome d'hydrogène de la fonction amide en N₃. Les deux atomes H₁₄ ont des environnements électroniques similaires et les deux angles dièdres H₁₃-N₁₃-C₁₄-H₁₄ sont égaux, ce qui serait cohérent avec les analyses RMN et expliquerait la présence du rotamère A. La distance entre l'atome N₃ et l'atome O₁₂ est d'environ 3 Å, les liaisons N₃-H₃ et O₁₂=C₁₂ sont dans le même axe, mais l'angle entre N₃, H₃ et O₁₂ n'est pas idéal (115 °). Classiquement, un angle de 180 ± 30° serait acceptable. Une liaison hydrogène faible expliquerait l'équilibre entre les deux rotamères.

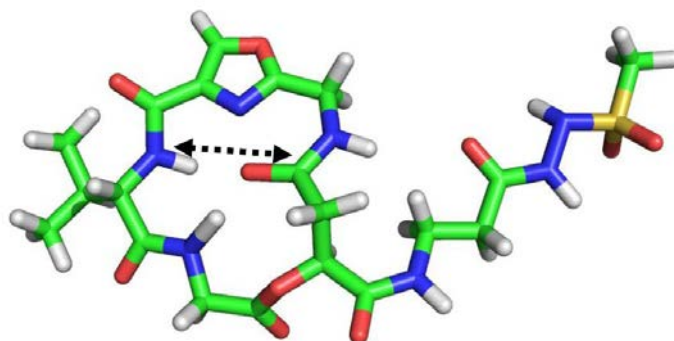


Figure 70 : Structure du composé **82-A** avec une liaison hydrogène intracyclique

7. Evaluation biologique de l'activité des composés

7.1 Test de l'inhibition d'extrait nucléaire HDAC

7.1.1 Principe

Pour tester l'inhibition de nos molécules *in vitro*, la réaction de désacétylation des résidus lysine est reproduite en utilisant un substrat acétylé (Boc-(Ac)-Lys-*p*Nitroaniline). Ce substrat est mis en présence d'enzyme HDAC, qui entraîne la désacétylation de ce substrat. Le substrat désacétylé (Boc-Lys-*p*Nitroaniline) peut être détecté par absorption à la longueur d'onde de 405 nm. L'absorbance est corrélée à l'activité de l'enzyme (Schéma 50). Si la molécule testée est un bon inhibiteur, une diminution de l'absorbance sera observée.

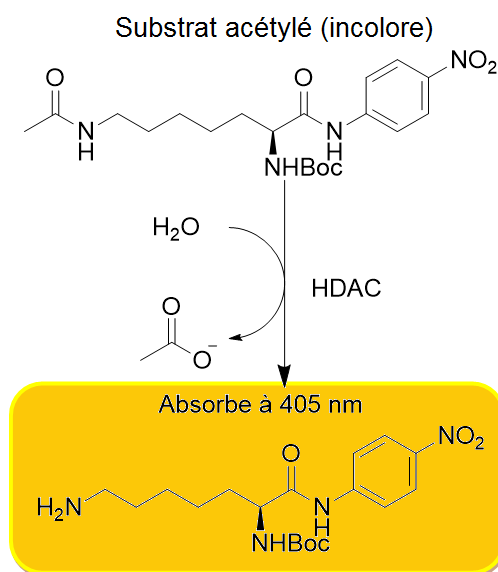


Schéma 50 : Réaction avec le kit HDAC

Ce premier test biologique permet de constater que ces analogues ont une activité inhibitrice des HDAC. Pour ce test d'inhibition, seulement deux de nos molécules cibles, **82** et **84** ont été testées.

7.1.2 Résultats

Les activités inhibitrices de ces deux composés ont été évaluées sur un extrait nucléaire de HDAC, contenant toutes les classes de HDAC (I, II et IV). Ces tests ont été effectués avec la collaboration du Docteur Aurélie Trussardi-Régnier du groupe MEDyC à Reims, dirigé par Professeur F. Antonicelli. Le composé **84** n'inhibe pas significativement les HDAC même à 5 mM tandis que le composé **82** a permis l'inhibition de plus de 50 % des HDAC à 5 mM. Son IC_{50} a été estimé à 2,6 mM (Tableau 16) en comparaison avec la TSA.¹³²

Tableau 16 : Inhibition sur un extrait nucléaire de HDAC

Composés	X	n	Z	IC_{50} (mM)
TSA	-	-	-	0,0002
82	O	2	Ms	2,6
84	S	2	Ms	>5

7.2 Test de l'inhibition des HDAC1, 3 et 6

7.2.1 Principe

Par ailleurs, tous les composés cibles ont été évalués *in vitro* avec une autre technique sur les HDAC1, 3 et 6. En testant l'inhibition de nos composés sur ces trois HDAC, le rapport entre l'inhibition de HDAC1 ou 3 et l'inhibition de HDAC6 permet d'analyser la sélectivité de ces molécules pour la classe I par rapport à la classe II. La HDAC6 est la HDAC la plus représentative de la classe II. Le rapport entre l'inhibition de HDAC1 et l'inhibition de HDAC3 permet d'analyser la sélectivité pour une isoforme de la classe I.

La réaction se déroule de la façon suivante : le substrat acétylé est mis en présence de l'enzyme HDAC, qui entraîne la désacétylation de ce substrat (Schéma 51). L'ajout de développeur et son interaction avec le substrat désacétylé, permet la formation d'un fluorophore. Une fois excité à 360 nm, le fluorophore émet une fluorescence à 460 nm, détectée dans un lecteur de plaques à fluorométrie (Tecan Infinite M200 PRO). La fluorescence émise par le substrat désacétylé est donc corrélée à l'efficacité de l'enzyme. La présence d'un inhibiteur HDAC entraîne une diminution de la fluorescence émise.

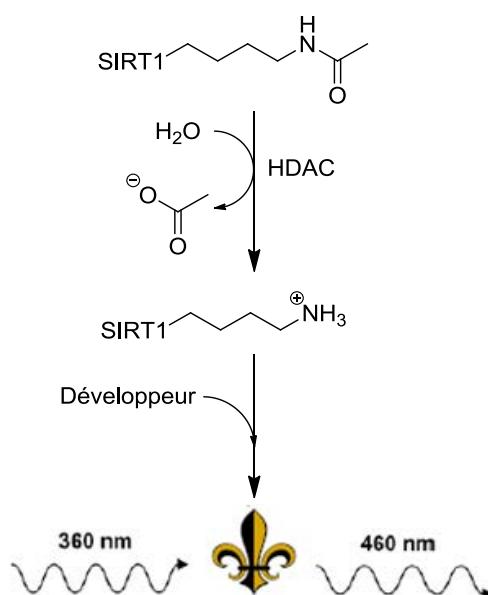


Schéma 51 : Réaction de désacétylation permettant la formation d'un fluorophore

Comme pour les tests précédents, des puits contrôles ont été définis (blancs, contrôles positifs, contrôles négatifs, contrôles de la gamme). La TSA est utilisée dans les puits contrôles positifs (Tableau 17).

Tableau 17 : Conditions standards de manipulation

Echantillon	HDAC Assay Buffer II	HDAC (diluée)	Inhibiteur	Substrat Fleur de Lys
Blanc (pas d'enzyme)	25 µL	0	0	25 µL
Contrôle négatif	10 µL	15 µL	0	25 µL
Contrôle positif	0	15 µL	10 µL	25 µL
Echantillon	0	15 µL	10 µL	25 µL

7.2.2 Résultats

Le composé **69** (Figure 71) est un cyclodepsipeptide avec une chaîne latérale sans ZBG, qui a été testé pour avoir une comparaison avec les autres molécules. Il n'a montré aucune inhibition sur HDAC1 même à 10 mM. Ce premier résultat montre l'importance du groupement ZBG à l'extrémité de la chaîne latérale.

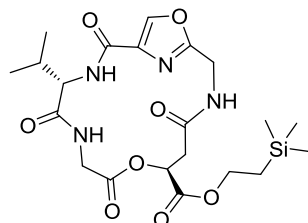


Figure 71 : Structure du composé **69**

Ensuite, les composés **82**, **84** et **85** (Figure 72) possèdent le même espaceur et le même type de ZBG ($n = 2$, $Z = \text{Ms}$). Ce sont des analogues qui se différencient seulement par leurs parties hétérocycliques.

Le composé **82**, avec un cycle oxazole, inhibe sélectivement HDAC3.

Le composé **83** montre une sélectivité pour HDAC1. Il reste néanmoins à finir de le caractériser pour valider sa structure.

Le composé **84**, avec un hétérocycle de type thiazole, inhibe les trois HDAC testées sans montrer une sélectivité significative (Tableau 18).

Le composé **85**, composé d'une pyridine, inhibe sélectivement les HDAC1 et HDAC3 de la classe I, par rapport à la HDAC6, qui est de la classe IIb.

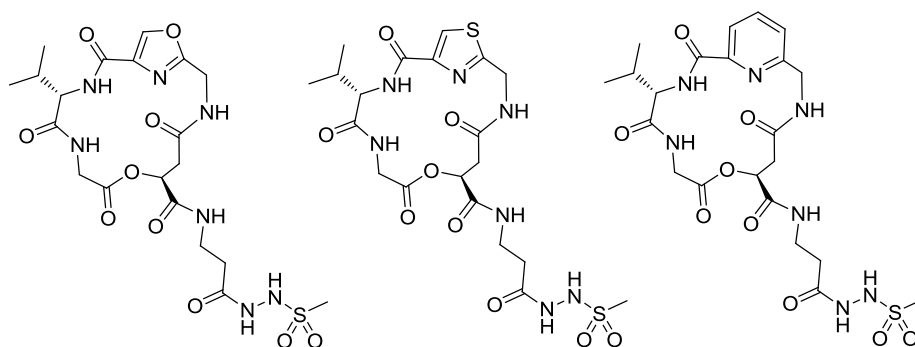


Figure 72 : Structures des composés **82** (gauche), **84** (milieu) et **85** (droite)

Le composé **86** (Figure 73) a un ZBG encombré par le groupement tosylé. Il inhibe les HDAC1 et HDAC3 avec une inhibition de HDAC3 2,7 fois plus importante que sur HDAC1. Ce composé **86** a une inhibition sur HDAC3 6 fois plus forte que celle du composé **82**, mais il est moins sélectif (Tableau 18).

Le composé **87** avec une partie ZBG encombrée, n'inhibe pas les HDAC, alors que son analogue non encombré, le composé **84** est bien un inhibiteur non-sélectif.

Le composé **88** a une longueur de chaîne plus longue que celle du composé **86**. Celle-ci lui permet d'améliorer légèrement son inhibition sur les HDAC1 et HDAC3, mais aussi d'inhiber HDAC6 et donc de perdre sa sélectivité sur la classe I. Une longueur d'espaceur de

$n = 2$ est une bonne alternative pour garder la sélectivité des HDAC de la classe I *versus* la classe II.

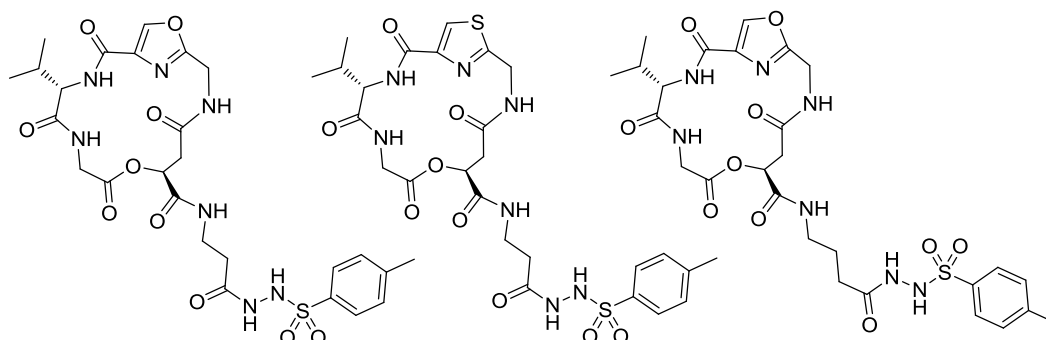


Figure 73 : Structures des composés 86 (gauche), 87 (milieu) et 88 (droite)

Tableau 18 : IC₅₀ sur les HDAC1, 3 et 6 (en mM)

Composés	X	n	Z	IC ₅₀ HDAC1	IC ₅₀ HDAC3	IC ₅₀ HDAC6
MS-275	-	-	-	0,008	0,05	1,3
69	O	2	-	>20	-	-
82	O	2	Ms	>20	6	>20
83	O	2	Ms	0,35	1,7	7
84	S	2	Ms	4	2	5
85	CH=CH	2	Ms	1	1,8	12
86	O	2	Ts	2,5	0,9	13
87	S	2	Ts	>20	-	-
88	O	3	Ts	2	0,7	1,8

Le composé **82** inhibe de façon très sélective HDAC3, puisqu'il ne montre pas d'inhibition sur HDAC1 et HDAC6 et le composé **83** est l'analogue testé ayant l'IC₅₀ le plus bas sur HDAC1 avec une sélectivité intéressante entre HDAC1 et HDAC3 de plus de 4 et une sélectivité entre HDAC1 et HDAC6 de 20. Ces composés pourraient être de bons outils pour l'étude des mécanismes impliqués dans le contrôle de la consommation abusive d'alcool.

7.3 Docking

La complexation du composé **82** avec HDAC3 a été modélisée par le Docteur Gautier Moroy pour mieux comprendre les interactions de cette molécule avec la HDAC3. Trois liaisons hydrogène stabilisant l'interaction sont observables en pointillés jaunes entre (Figure 74) :

- le NH de l'histidine 135 et la fonction carbonyle du ZBG,
- la fonction carbonyle de la glycine 143 et le premier NH du ZBG,
- le OH de la tyrosine 292 et le deuxième NH du ZBG.

Le macrocycle semble ne former que des liaisons de type van der Waals avec HDAC3. Les deux atomes d'oxygène du groupement sulfonyle sont chélatés à l'ion zinc. Le composé **82** et les résidus de HDAC3 impliqués dans les interactions sont représentés par des bâtons. Les atomes de carbone du composé **82** sont colorés en cyan et ceux des résidus de HDAC-3 sont en vert. L'ion Zn^{2+} est représenté par une sphère grise.

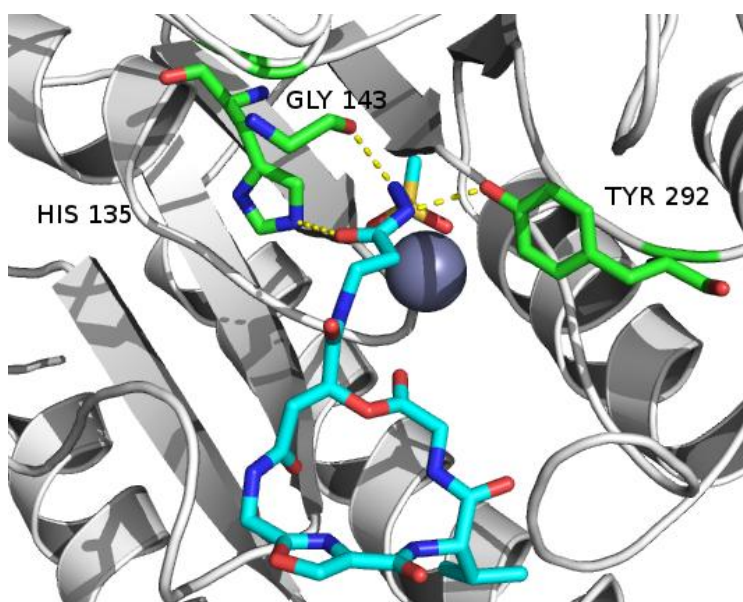


Figure 74 : Complexation du composé **82** avec HDAC3

Un modèle simplifié¹⁰ montrait que l'ion zinc serait coordonné par l'atome d'azote du sulfonylhydrazide, l'atome d'oxygène du carbonyle et avec l'un des atomes d'oxygène du groupe SO_2 . En prenant en compte la structure de l'enzyme, la modélisation montre que le groupement sulfonylhydrazide forme un complexe bi-dentate qui est du même type que celui trouvé avec le composé EBMS6-3.

8. Test sur un modèle animal de binge drinking

Parmi les sept composés, les composés **82** et **83** sont ceux qui ont les meilleures sélectivités pour HDAC3 et HDAC1. Le protocole d'auto-administration d'alcool qui a été mis en œuvre dans cette étude, développé par le Dr Jérôme Jeanblanc au sein du laboratoire GRAP – INSERM ERI 24, permet de modéliser une consommation d'alcool de type binge-drinking donc impliquant une forte consommation d'alcool durant une période de temps très brève.

8.1 Principe

Pour observer une consommation d'alcool relativement importante chez le rat, une procédure d'initiation est nécessaire. La plus efficace est l'accès intermittent à une solution contenant 20 % d'éthanol comme décrit dans les études de Wise en 1973¹⁷⁷ et remis au goût du jour par Simms *et al.* en 2008¹⁷⁸ suivi de nombreuses études dont celles de Carnicella *et al.* en 2009¹⁷⁹ et de Jeanblanc *et al.* en 2013.¹⁸⁰

Des rats mâles âgés de 8 semaines (jeunes adultes) ont accès de façon intermittente (un jour sur deux) à des solutions à 20 % d'éthanol (Figure 75),¹²¹ ce paradigme permet ensuite d'augmenter leur consommation d'éthanol dans le test d'auto-administration opérante et atteindre un niveau proche de 1 g / kg / 30 min (alcoolémie d'environ 1 g / L) soit environ cinq verres chez l'Homme. Ces rats sont considérés comme des "gros buveurs", ils ne sont pas dépendants, mais ils sont habitués à consommer de grandes quantités d'alcool en peu de temps. Dans le paradigme opérant, quand un rat presse le levier une fois, une récompense est délivrée : 0,1 mL d'éthanol à 20 %. Après deux mois d'entraînement, les rats ont atteint des niveaux stables d'auto-administration



Figure 75 : Accès de façon intermittente à l'alcool¹²¹

opérante d'éthanol. Ce protocole a également déjà été décrit dans les études menées par Jeanblanc, en 2006¹⁸¹, 2009¹⁸² et 2013¹⁸⁰ ainsi que par Alaux-Cantin en 2013.¹⁸³ Les rats sont alors opérés pour implanter une canule dans le cerveau, qui servira plus tard à injecter la solution d'inhibiteur d'HDAC. Après deux semaines de récupération, les rats sont divisés en deux groupes qui ont reçu, soit une solution physiologique contenant 10 % de DMSO, soit une solution d'inhibiteur d'HDAC, par voie intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.). Les solutions d'inhibiteur dans le liquide céphalorachidien artificiel (aCSF) sont préparées à partir d'une solution à 10 mM du composé dissous au préalable dans du DMSO à 10 %.

8.2 Effet du composé **82** sur la consommation des rats "gros buveurs"

Dans cet essai, les rats consommaient en moyenne plus de 0,6 g / kg / 15 minutes. Les tests ont été réalisés à deux concentrations avec le composé **82** ayant une spécificité pour HDAC3 (Figure 76). La dose de 500 μ M a été choisie sur la base des études précédentes qui ont déjà montré l'efficacité du MS-275 par exemple et permet de faire la comparaison avec les autres composés déjà testés. Pour favoriser les changements de consommation, une dose deux fois plus importante du composé **82** a aussi été testée. Les tests aux deux doses n'ont pas montré de changement significatif de la consommation d'alcool chez les rats "gros buveurs". Ces résultats permettent de penser que l'inhibition de HDAC3 n'est pas efficace dans ce modèle de consommation de type "binge drinking".

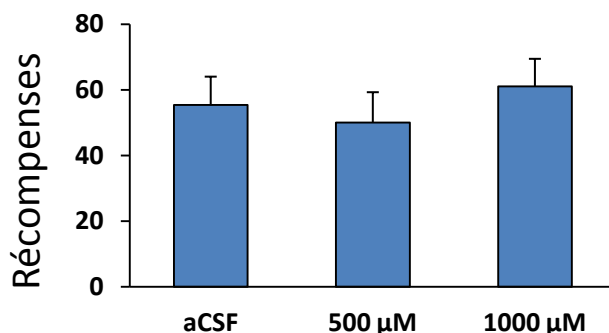


Figure 76 : Effet du composé **82** sur des rats "gros buveurs" à deux concentrations

8.3 Effet du composé **83** sur la consommation des rats "gros buveurs"

Le composé **83** montre une spécificité plus importante pour HDAC1 que pour HDAC3 et HDAC6. Deux doses du composé **83** ont été injectées, celle de 500 μ M n'a pas montré d'effet significatif, ce qui peut s'expliquer par l' IC_{50} élevée sur HDAC1 comparée à celle du MS-275. L'administration d'une dose de 1000 μ M du composé **83** (3 heures avant le début d'une session d'auto-administration d'alcool) a permis de diminuer la consommation d'alcool chez les rats "gros buveurs" de plus de 50 % suite à une injection unique (Figure 77). Le fait d'observer un effet, 3 heures après le traitement, suggère fortement une implication de modifications d'expression génique.

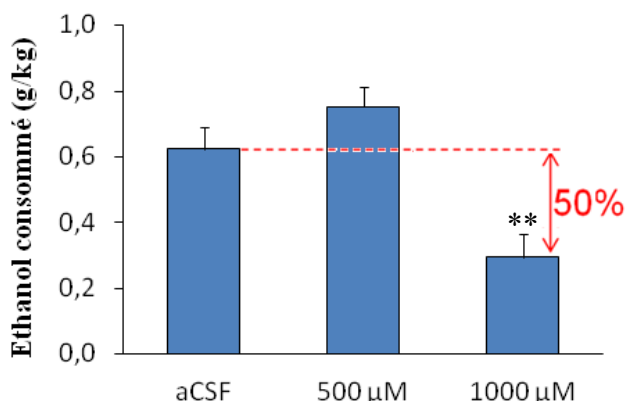


Figure 77 : Etude des effets du composé **83** sur les rats "gros buveurs", ** $p < 0.05$

8.4 Effet du composé **83** sur la rechute

La rechute est une composante importante à prendre en compte dans le traitement de la dépendance à l'alcool ; en effet, 70 % des patients alcoolodépendants rechutent un an après leur sevrage.

Après une période de sevrage à l'alcool, les rats reçoivent une dose de 1000 μ M du composé **83**, ou seulement de la solution aCSF, avant d'être à nouveau testés pour leur auto-administration opérante d'éthanol. Le nombre d'appuis est comptabilisé pendant 30 minutes (Figure 78). Les rats ayant reçu le composé **83**, consomment moins d'alcool que les rats ayant reçu la solution saline. Le composé **83** a diminué l'augmentation de la consommation d'éthanol, induite par une privation d'alcool, ce qui démontre un effet sur la rechute.

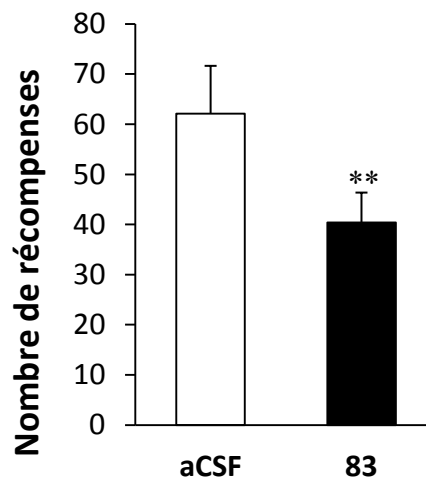


Figure 78 : Etude de la rechute des rats "gros buveurs" après injection du composé **83**, ** $p < 0.05$

Ces tests avec le composé **83** permettent de penser que HDAC1 serait un acteur important dans les mécanismes liés à l'addiction à l'alcool et particulièrement dans le mécanisme conduisant à la rechute.

Conclusions et perspectives

Un traitement efficace contre la dépendance à l'alcool devrait rétablir les changements stables dans la plasticité neuronale et changer le comportement à long terme. Les mécanismes impliqués pourraient être des mécanismes épigénétiques. L'épigénétique joue un rôle dans l'alcoolodépendance.⁴⁶ L'acétylation des histones est modifiée dans de nombreux modèles de l'addiction à différentes drogues^{100, 101, 102} ainsi que dans les troubles liés à l'usage d'alcool.¹⁰³

La consommation d'alcool augmente l'acétylation des histones et l'expression des gènes. Une personne consommant de l'alcool de façon chronique va développer une tolérance et des neuroadaptations typiques de l'addiction. A ce stade, l'acétylation des histones n'est plus perturbée par l'alcool, l'expression des gènes est revenue à la "normale". Une fois que la dépendance est avérée, les périodes de sevrage seront de plus en plus sévères avec une anxiété de plus en plus importante.

L'hypothèse serait que la surexpression des HDAC provoquerait cette anxiété et un état dépressif. En utilisant un inhibiteur d'HDAC, le taux d'acétylation des histones serait à nouveau équilibré et permettrait d'éviter le développement de l'anxiété durant les périodes de sevrage (Schéma 52).

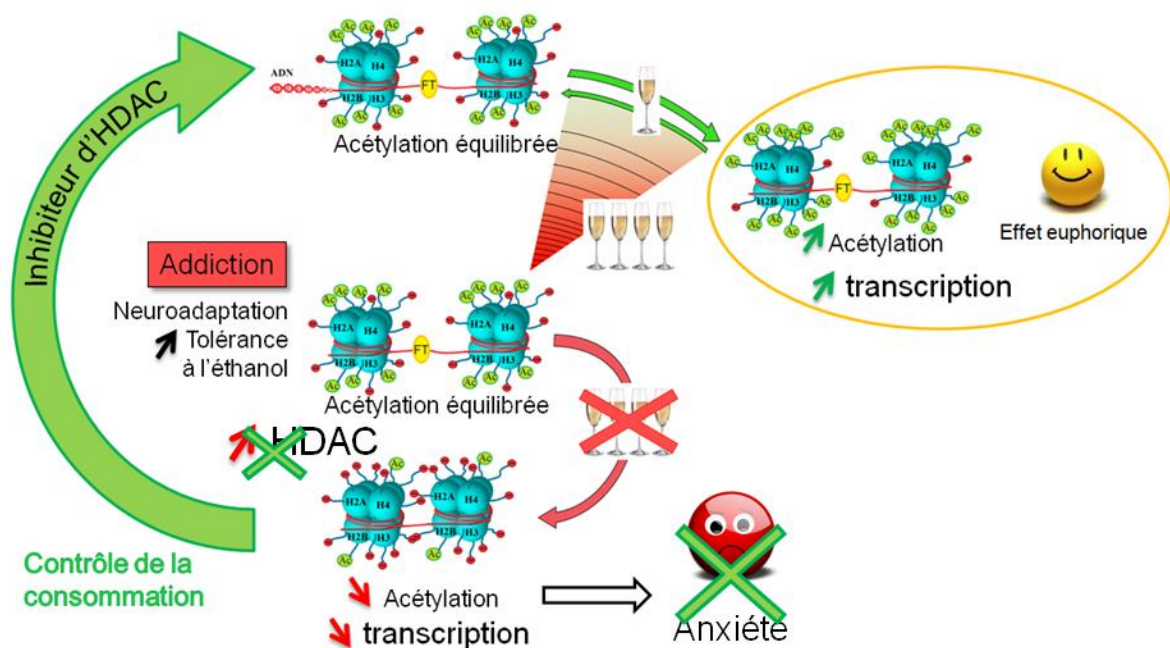


Schéma 52 : Les conséquences de l'alcool sur l'acétylation des histones

Cette nouvelle voie thérapeutique permettrait de diminuer la consommation excessive chez des personnes ayant des troubles de la consommation d'alcool, voire de contrôler leur consommation.

Pour valider notre hypothèse, nous avons synthétisé une série de composés de type cyclodepsipeptides connus pour être sélectifs de la classe I des HDAC. Les blocs **A** et **C** ont été obtenus en suivant les méthodes décrites dans la littérature. Un nouveau bloc **B** a été obtenu par une méthode originale. Notre première stratégie était de former le macrocycle et d'ensuite coupler le bloc **D** choisi. Une première série de cyclodepsipeptides a été synthétisée, bloc **ABC** (composés **69** et **70**), mais une conformation particulière du macrocycle empêcherait la déprotection.

Une nouvelle stratégie a été développée, à savoir de coupler le bloc **D** avec le bloc **ABC** et de terminer la synthèse par la macrocyclisation. Six cyclodepsipeptides cibles ont pu être obtenus avec une méthode efficace de synthèse avec des rendements globaux de 0,05 à 4 % sur 22 à 26 étapes.

L'effet inhibiteur de ces composés a été testé sur l'activité des HDAC1, HDAC3 et HDAC6. Cinq d'entre eux sont bien des inhibiteurs de HDAC. Le composé **82** a une spécificité pour HDAC3 et le composé **83** a une spécificité pour HDAC1. Les cyclodepsipeptides les plus intéressants sont ceux comprenant un cycle oxazole avec une longueur de chaîne $n = 2$. Il semble intéressant de continuer à synthétiser des analogues de ce type en priorité.

Le docking du composé **82** avec HDAC3 montre un nouveau type de chélation bidentate de notre groupement ZBG à l'intérieur du site catalytique et la formation de trois liaisons hydrogène et confirme les résultats *in vitro*.

Nous avons pu étudier les effets de l'inhibition de HDAC1 ou de HDAC3 sur des rats "gros buveurs". Ces rats ne sont pas encore réellement dépendants, mais ils sont habitués à consommer de grandes quantités d'alcool en peu de temps. Les résultats montrent que HDAC1 est impliquée dans ce modèle de consommation et non HDAC3. Ce qui nous permet de penser que HDAC1 est une cible thérapeutique intéressante dans ce modèle de consommation. L'inhibition de HDAC1 permet de réduire la consommation, mais aussi le phénomène de rechute. Les traitements actuels ont des effets sur le maintien de l'abstinence (acamprosate, naltrexone et disulfirame) ou sur la diminution de la consommation (nalméfène et baclofène). Nos composés (**83**, EBGA8-2) semblent faire les deux.

Les études avec le butyrate de sodium ou le MS-275 ont montré une efficacité après deux injections sur des rats dépendants et aucun effet sur des rats non-dépendants.^{5, 6} Nos inhibiteurs de type sulfonylhydrazide inhibent la consommation dès la première injection. Ceux-ci semblent donc plus efficaces. Cela sous-entend que chez les rats "gros buveurs", il y a des neuroadaptations ou un comportement spécifique, qui sont bloqués par nos composés, pourtant la motivation à consommer n'a pas changé, le blocage du craving pourrait être une explication. Il reste à déterminer si le composé **83** est aussi efficace chez des rats dépendants qui présentent des neuroadaptations. En effet, des neuroadaptations spécifiques induites par

l'induction de dépendances (physique et psychologique) pourraient se traduire aussi par une différence de sensibilité à notre composé.

Il sera également intéressant d'étudier les mécanismes impliqués dans l'efficacité de notre composé (modifications épigénétiques, gènes dont l'expression est modifiée et dans quelle structure cérébrale). Par exemple, une étude précédente⁶ a démontré que le traitement par le MS-275 modifie le nombre de neurones et l'intensité du marquage avec un anticorps anti Ac-H4K12 spécifiquement dans le striatum dorsolatéral et dans le noyau accumbens, deux structures jouant un rôle clé dans l'addiction. Le criblage de l'expression de gènes candidats sera réalisé grâce à des PCR arrays (80 gènes) en ciblant préférentiellement les enzymes impliquées dans les régulations épigénétiques et la neurotransmission.

Jusqu'à présent, nous avons aussi uniquement testé l'efficacité de nos composés dans le cadre d'un traitement aigu. Il sera donc aussi intéressant de regarder l'efficacité d'un traitement chronique notamment pendant une période d'abstinence prolongée avant d'induire la rechute.

L'ensemble de nos résultats comportementaux souligne l'intérêt de cibler la HDAC1 dans la consommation excessive d'alcool et la réduction de la rechute. Le laboratoire a pour objectif de démontrer définitivement l'implication de la HDAC1 avec l'utilisation soit de souris knockout, soit chez des rats qui seront transfectés avec des lentivirus pour induire un knockdown de l'expression de HDAC1 dans certaines structures cérébrales.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

9. Conditions Générales

Les solvants sont de qualité réactif et ils ont été achetés chez Carlo Erba Réactifs. Le THF anhydre, DMF anhydre et le DCM anhydre ont été déshydratés *via* une machine modèle PS – MD – 2 de chez Innovative Technology – Pure Solv utilisant une résine.

Tous les réactifs commerciaux ont été achetés chez Acros Organics[®], Sigma-Aldrich[®], Alfa-Aesar[®] et VWR[®] utilisés sans purification supplémentaire.

Les déroulements de la réaction et de la colonne ont été contrôlés par des chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) réalisées sur des plaques de silice MERCK 60F₂₅₄ (support aluminium). Les taches sont révélées lors de l'exposition en lumière UV (254 nm), mais également révélées avec une solution de vanilline (8,6 g de vanilline, 5 mL d'acide sulfurique concentré et 250 mL d'éthanol à 95°).

Les purifications chromatographiques ont été faites dans des colonnes de verre remplies de gel de silice (Silice 60 ACC, granulométrie 0,070-0,200 mm, Carlo Erba Réactifs). Le produit brut a été dissous dans un minimum de solvant avec un minimum de silice, puis évaporé et déposé sur la tête de colonne. L'élution a été effectuée avec l'éluant ou gradient d'élution à l'aide d'air comprimé avec une poire à double réservoir à filet. La composition de l'éluant a été spécifiée pour chaque composé.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés en solution à 300 MHz et 75 MHz ou à 600 MHz et 150 MHz, respectivement sur des appareils BRUKER à 298 K avec le tétraméthylsilane (TMS) comme étalon interne. Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm (δ). Les multiplicités sont abrégées comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), ls (large singulet), m (multiplet), dd (doublets de doublets). Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en unités Hertz (Hz).

Les spectres de masses ont été enregistrés sur un appareil MSQ (Mass Spectroscopy Quadrupolar) en ionisation par électrospray (ESI) Thermo Finnigan.

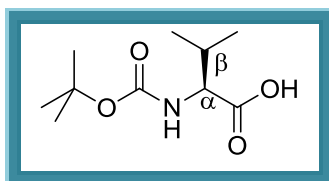
Les spectres IR ont été réalisés sur un spectromètre FT-IR Perkin Elmer Spectrum BX/RX. Les spectres ont été obtenus à partir de films minces sur des pastilles de KBr. Les principales bandes d'absorption sont données en cm⁻¹.

Les points de fusion (*T_{fusion}*) ont été mesurés en utilisant un appareil numérique SMP 3 Stuart scientifique et ne sont pas corrigés.

Les purifications par CLHP ont été réalisées sur une colonne semi-préparative Kinetex[®] 5 μ m C18(2) 100Å ; 150x10,0 mm à un débit de 4 mL/min et les analyses sur une colonne analytique Kinetex[®] 5 μ m C18(2) 100Å ; 150x4,6 mm à un débit de 1 mL/min. La méthode utilisée débute avec un mélange eau/acétonitrile (98/2), le pourcentage en acétonitrile augmente progressivement pendant 15 min jusqu'au mélange eau/acétonitrile (60/40). Les produits sont détectés par UV à 225 nm.

10. Modes opératoires

Acide (2S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-méthylbutanoïque
[13734-41-3] (2)



Dans un ballon de 50 mL sous agitation, 2 g (17,07 mmol) de valine sont dissous dans 23,6 mL de THF, 17 mL d'eau et 17 mL de NaOH (1 M) sont ajoutés goutte-à-goutte. Puis, 4,1 g (1,1 éq., 18,80 mmol) de dicarbonate de di-*tert*-butyle sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Le THF est évaporé et 20 mL d'AE sont ajoutés. 3,4 g d'acide citrique monohydrate sont additionnés pour obtenir un pH de 3-4. Des extractions sont alors réalisées avec trois fois 20 mL de DCM. La phase organique est filtrée, séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit sous forme d'une huile incolore est obtenu avec un rendement de 99 % (m = 3,66 g).

Formule Brute : C₁₀H₁₉NO₄

Masse molaire : 217,26 g/mol

CCM : R_f = 0,7 (AE/EP 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

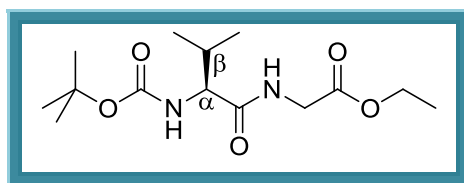
TOF-HRMS+ : *m/z* mesuré à 240,1206 pour [M+Na]⁺, calculé à 240,1212 pour C₁₀H₁₉NO₄Na.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3315($\bar{\nu}_{\text{N-H}}$); 2500-3500($\bar{\nu}_{\text{O-H}}$); 2966($\bar{\nu}_{\text{CH}_3}$); 1710($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1512($\delta_{\text{N-H}}$); 1405($\delta_{\text{O-H}}$); 1367(δ_{CH_3}); 1252($\bar{\nu}_{\text{C(CH}_3)_3}$); 1163($\bar{\nu}_{\text{CH(CH}_3)_2}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,94 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH₃); 1,01 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH₃); 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,16-2,25 (m, 1H, H_β); 4,26 (dd, 1H, *J* = 4,3 Hz, *J* = 8,7 Hz, H_α); 5,01 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, NH); 9,91 (sl, 1H, OH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 17,4 (CH₃); 19,0 (CH₃); 28,3 (C(CH₃)₃); 31,0 (C_α); 58,4 (C_β); 80,0 (C_q); 155,8 (CO); 177,2 (CO).

(2S)-2'-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-méthylbutanamido)acétate
d'éthyl [1010079-66-9] (3)



Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 1,71 g (7,89 mmol) de Boc-Val-OH sont dissous dans 50 mL de DCM anhydre. 2,3 mL (2,2 éq., 17,36 mmol) de 2,4,6-collidine et 3,29 g (1,1 éq.) de HBTU sont ajoutés au milieu réactionnel. 1,10 g (7,89 mmol) de H₂N-Gly-COOEt sont mis en suspension dans la solution de Boc-Val-OH.

Après 18h, le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 30 mL d'AE et purifié à la suite de plusieurs lavages : trois fois 40 mL d'HCl (5 %), 80 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %),

50 mL d'une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (9/1), puis (8/2). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 1,81$ g, soit un rendement de 75 %.

$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$

302,18 g/mol

$T_{\text{fusion}} = 98^\circ\text{C}$

CCM : $R_f = 0,7$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révéléateur : vanilline)

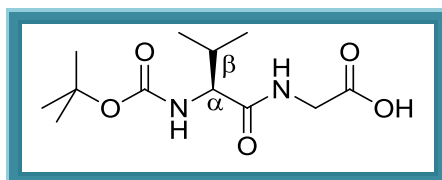
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 325,1741 pour $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculé à 325,1739 pour $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 3321($\bar{\nu}_{\text{N-H}}$); 2960($\bar{\nu}_{\text{CH}_3}$); 1746($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1686($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1657($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1524($\delta_{\text{N-H}}$); 1388(δ_{CH_3}); 1243($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_3\text{C}}$); 1210($\bar{\nu}_{\text{C-O}}$); 1169($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_2\text{CH}}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,93 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH_3 Val); 0,98 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH_3 Val); 1,26 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3); 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2,14-2,25 (m, 1H, H_β); 3,98-4,06 (m, 3H, H_α , CH_2 Gly); 4,21 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2); 5,04 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, NH Val); 6,49 (s, 1H, NH Gly).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 14,1 (CH_3 Val); 17,5 (CH_3); 19,2 (CH_3 Val); 28,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 30,8 (C_β); 41,2 (CH_2 Gly); 59,8 (C_α); 61,5 (CH_2); 169,6 (CO); 171,8 (CO).

Acide (2S)-2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-méthylbutanamido)acétique [45233-75-8] (4)



Dans un ballon de 250 mL, 839 mg (0,48 mmol) du composé **3** sont introduits dans 60 mL de THF et de 30 mL d'eau. 233 mg de LiOH monohydrate (2 équ., 5,55 mmol) sont ajoutés au milieu à température ambiante. La réaction est agitée pendant 30 min à 0°C . Le milieu réactionnel est acidifié jusqu'à pH 3-4 avec 10 mL de HCl à 1 M. Le THF est évaporé. Le produit est extrait avec du DCM. Ensuite, la phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le produit est obtenu sous forme de mousse blanche, avec une masse $m = 730$ mg, soit un rendement de 96 %.

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$

274,31 g/mol

CCM : $R_f = 0,05$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révéléateur : vanilline)

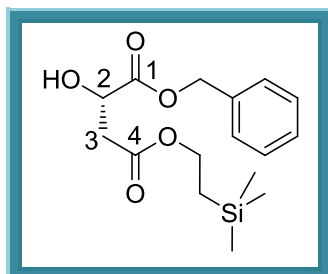
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 297,1429 pour $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculé à 297,1426 pour $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 3310($\bar{\nu}_{\text{N-H}}$); 2500-3500($\bar{\nu}_{\text{O-H}}$); 2966($\bar{\nu}_{\text{CH}_3}$); 1654($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1524($\delta_{\text{N-H}}$); 1391($\delta_{\text{O-H}}$); 1364(δ_{CH_3}); 1245($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_3\text{C}}$); 1166($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_2\text{CH}}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,85-1,00 (m, 6H, CH_3); 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2,02-2,25 (m, 1H, H_β); 3,98-4,06 (m, 3H, CH_2 Gly, H_α); 5,30 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, NH Val); 6,29 (s, 1H, NH Gly); 6,97 (s, 1H, OH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 17,9 (CH₃); 19,2 (CH₃); 28,3 (C(CH₃)₃); 31,3 (C _{β}); 41,3 (CH₂ Gly); 59,6 (C _{α}); 80,7 (C(CH₃)₃); 171,9 (CO); 172,1 (CO).

(2S)-1-benzyl 4-(2-(triméthylsilyl)éthyl) 2-hydroxysuccinate [868773-45-9]
(5)



Dans un ballon de 25 mL sous azote, 233 mg (1,04 mmol) de composé **9** sont additionnés dans du dichlorométhane (3 mL). 178 μ L (1,1 éq, 1,14 mmol) de DIC, 10 mg de DMAP (0,1 éq, 0,1 mmol) et 200 μ L de triméthylsilyléthanol sont ajoutés.

Le mélange est agité à température ambiante toute la nuit, puis évaporé.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide du produit avec comme mélange d'éluants : éther de pétrole/acétate d'éthyle (4/1). L'ester est obtenu, sous forme d'huile, avec une masse $m = 217$ mg, soit un rendement de 64 %.

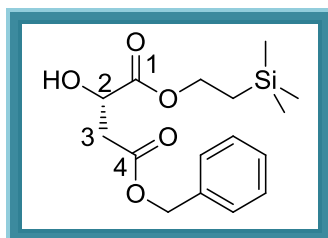
C₁₆H₂₄O₅Si

324,44 g/mol

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,03 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,92-0,98 (m, 2H, CH₂Si); 2,78 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz, $J = 18,0$ Hz, H₃); 2,85 (dd, 1H, $J = 4,5$ Hz, $J = 18,0$ Hz, H₃); 3,26 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz, OH); 4,12-4,18 (m, 2H, CH₂O); 4,52 (dd, 1H, $J = 4,8$ Hz, $J = 6,0$ Hz, H₂); 5,23 (s, 2H, CH₂Ph); 7,33-7,37 (m, 5H, Har).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,5 (Si(CH₃)₃); 17,2 (CH₂Si); 38,6 (C₃); 63,3 (CH₂O); 67,3 (C₂); 67,6 (CH₂Ph); 128,3 (CH_{ar}); 128,3 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 134,9 (C_q); 170,5 (CO); 173,2 (CO).

(2S)-4-benzyl-1-(2-(triméthylsilyl)éthyl)-2-hydroxysuccinate (6)



Dans un ballon de 50 mL, 1,00 g (3,86 mmol) du composé **17** est dissous dans 12 mL de DCM anhydre sous diazote. 105 mg (0,14 éq., 0,55 mmol) d'APTS anhydre et 2 mL (3,6 éq., 13,96 mmol) de 2-(Triméthylsilyl)éthanol sont ajoutés en quatre fois. Après six jours d'agitation, 20 mL d'eau sont ajoutés, le produit est extrait avec deux fois 10 mL de DCM. Ensuite, la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide avec comme mélange d'éluants :

EP/AE (95/5). Le produit est obtenu sous forme de solide brun avec une masse $m = 905$ mg, soit un rendement de 72 %.

$C_{16}H_{24}O_5Si$

324,44 g/mol

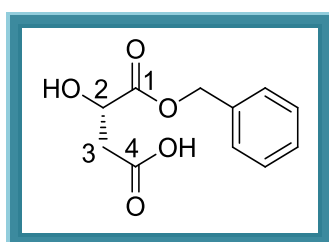
CCM : $R_f = 0,4$ (AE/EP 1/9 (v/v)) (révélateur : vanilline (faire migrer deux fois))

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 3436($\bar{\nu}_{O-H}$); 1731($\bar{\nu}_{C=O}$); 1640($\bar{\nu}_{C=C}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,03 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,96-1,02 (m, 2H, CH₂Si); 2,83 (dd, 1H, $J = 16,4$ Hz, $J = 5,9$ Hz, H₃); 2,92 (dd, 1H, $J = 16,4$ Hz, $J = 4,5$ Hz, H₃); 4,22-4,28 (m, 2H, CH₂O); 4,48 (t, 1H, $J = 5,2$ Hz, H₂); 5,15 (s, 2H, CH₂Ph); 7,36 (s, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,6 (Si(CH₃)₃); 17,3 (CH₂Si); 38,7 (C₃); 64,6 (CH₂O); 66,8 (CH₂Ph); 67,3 (C₂); 128,3 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 173,4 (CO).

Acide (3S)-4-(benzyloxy)-3-hydroxy-4-oxobutanoïque [66178-04-9] (9)



Dans un ballon de 25 mL, 1 g (7,45 mmol) de L-acide malique et 2,5 mL d'anhydride trifluoroacétique sont ajoutés. Le mélange est agité à 0°C pendant 1h. Après retour à la température ambiante, le mélange est évaporé avec un bain à une température inférieure à 30°C.

Au résidu blanc cristallin précédent, 1,5 mL d'alcool benzylique sont ajoutés, puis le mélange est agité pendant 18h à température ambiante. L'alcool est distillé sous vide. Le produit obtenu est une huile d'aspect jaunâtre. Une colonne chromatographique sur silice avec comme éluants cyclohexane/AcOEt (2/1) permet d'obtenir $m = 1,42$ g d'huile incolore, soit un rendement de 85 % sur deux étapes.

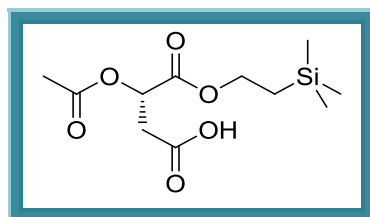
$C_{11}H_{12}O_5$

224,21 g/mol

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 2,89 (dd, 1H, $J = 6,1$ Hz, $J = 16,8$ Hz, H₃); 2,94 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 16,8$ Hz, H₃); 4,54 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz, $J = 6,1$ Hz, H₂); 5,21 (s, 2H, CH₂Ph); 7,32-7,38 (m, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 38,2 (C₃); 66,9 (C₂); 67,9 (CH₂Ph); 128,2 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 134,7 (Cq); 173,0 (CO); 176,0 (CO).

Acide (2S)-2-acétoxy-1-oxo-1-(2-(triméthylsilyl)éthoxy)butanoïque (12)



Dans un ballon de 50 mL, 1 g (7,45 mmol) de L-acide malique et 6 mL de chlorure d'acétyle sont ajoutés. Le mélange est agité au reflux pendant 2 h et ensuite évaporé.

Dans un ballon de 50 mL, le composé est dissous avec 1,08 mL de 2-(Triméthylsilyl)éthanol et de 3 mL de DCM, puis le mélange est agité pendant quatre jours à température ambiante sous atmosphère de diazote. L'alcool est distillé sous vide. Le produit obtenu est une huile d'aspect jaunâtre. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (9/1), (8/2), puis (7/3) permet d'obtenir $m = 1,66$ g d'huile incolore, soit un rendement de 81 % sur deux étapes.

$C_{11}H_{20}O_6Si$

276,36 g/mol

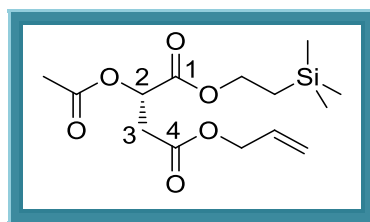
CCM : $R_f = 0,65$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 3049($\bar{\nu}_{O-H}$); 2953($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1749($\bar{\nu}_{C=O}$); 1419(δ_{O-H}); 1265($\bar{\nu}_{(CH_3)_3Si}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,05 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,99-1,05 (m, 2H, CH₂Si); 2,15 (s, 3H, CH₃); 2,95 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, CH₂); 4,23-4,29 (m, 2H, CH₂O); 5,45 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, CH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -2,0 (Si(CH₃)₃); 16,8 (CH₂Si); 20,1 (CH₃); 35,4 (CH₂); 64,1 (CH₂O); 67,85 (CH); 168,6 (CO); 169,8 (CO); 174,2 (CO).

(2S)-4-allyl 1-(2-(triméthylsilyl)éthyl) 2-acétoxysuccinate (13)



Dans un ballon de 25 mL sous diazote, 500 mg (1,81 mmol) de composé **12** sont additionnés dans 1 mL (8 équ., 14,63 mmol) d'alcool allylique distillé, 310 μ L (1,1 équ., 2,00 mmol) de DIC et 22 mg de DMAP (0,1équ., 0,18 mmol). La réaction est agitée 15 h à TA. L'alcool est distillé sous vide. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec comme mélange d'éluants : EP/AE (97/3), puis (95/5). L'ester est obtenu sous forme d'huile, avec une masse $m = 430$ mg, soit un rendement de 75 %.

$C_{14}H_{24}O_6Si$

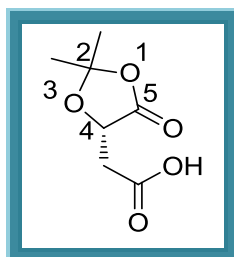
316,42 g/mol

CCM : $R_f = 0,6$ (AE/EP 2/8 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,04 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,98-1,05 (m, 2H, CH₂Si); 2,14 (s, 3H, CH₃); 2,91 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H₃); 4,21-4,29 (m, 2H, CH₂O); 4,63 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz, CH₂O); 5,24-5,31 (m, 2H, =CH₂); 5,45 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, H₂); 5,84-5,98 (m, 1H, CH=).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,6 (Si(CH₃)₃); 17,2 (CH₂Si); 20,6 (CH₃); 36,1 (C₃); 64,3 (CH₂O); 65,7 (CH₂O); 68,4 (C₂); 118,6 (=CH₂); 131,6 (CH=); 168,8 (CO); 168,9 (CO); 169,9 (CO).

Acide (4S)-2-(2,2-diméthyl-5-oxo-1,3-dioxolan-4-yl)acétique [73991-95-4]
(16)



Dans un ballon de 100 mL, 2 g (14,92 mmol) de L-acide malique sont mis en suspension dans 30 mL de toluène avec 4,4 mL (2,4 éq, 35,49 mmol) de 2,2-diméthoxypropane. La solution est chauffée au reflux pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé. Le produit est purifié par une colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (9/1), (8/2) et (7/3) pour obtenir sous forme de solide blanc, une masse de $m = 2,38$ g du produit, soit un rendement de 91 %.

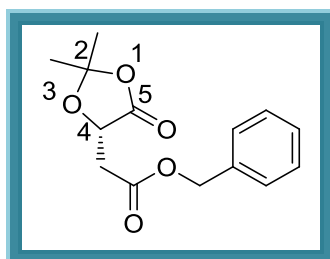
$C_7H_{10}O_5$

174,15 g/mol

CCM : $R_f = 0,5$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H ($CDCl_3$, 300MHz) δ (ppm) : 1,58 (s, 3H, CH_3); 1,63 (s, 3H, CH_3); 2,86 (dd, 1H, $J = 17,2$ Hz, $J = 6,6$ Hz, CH_2); 3,01 (dd, 1H, $J = 17,2$ Hz, $J = 3,8$ Hz, CH_2); 4,72 (dd, 1H, $J = 6,5$ Hz, $J = 3,9$ Hz, H_4).

(4S)-2-(2,2-diméthyl-5-oxo-1,3-dioxolan-4-yl)acétate de benzyle
[242810-01-1] (17)



Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 793 mg (4,55 mmol) de composé **16** sont dissous dans 6 mL de DCM anhydre. La solution est refroidie à 0°C et maintenue sous atmosphère de diazote. 55 mg (0,1 éq., 0,45 mmol) de DMAP et 780 μ L (1,1 éq., 5,00 mmol) de DIC et 0,7 mL (1,5 éq., 6,83 mmol) d'alcool benzylique sont ajoutés. Après 10 min, la solution est laissée à température ambiante. Après 15 h, le DCM est évaporé et l'alcool est distillé sous vide. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide avec comme mélange d'éluants : EP, puis EP/AE (95/5). L'ester est obtenu sous forme d'un solide brun, avec une masse $m = 938$ mg, soit un rendement de 78 %.

$C_{14}H_{16}O_5$

264,27 g/mol

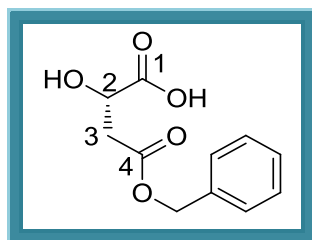
$T_{\text{fusion}} = 54^\circ\text{C}$

CCM : $R_f = 0,7$ (AE/EP 2/8 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,56 (s, 3H, CH₃); 1,58 (s, 3H, CH₃); 2,85 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz, $J = 6,4$ Hz, CH₂); 2,99 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz, $J = 3,9$ Hz, CH₂); 4,74 (dd, 1H, $J = 6,4$ Hz, $J = 3,9$ Hz, H₄); 5,18 (s, 2H, CH₂Ph); 7,36 (s, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 25,8 (CH₃); 26,6 (CH₃); 36,1 (CH₂); 66,9 (CH₂Ph); 70,6 (C₄); 111,1 (C₂); 128,3 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 135,2 (C_q); 169,0 (CO); 172,0 (CO).

Acide (2S)-4-(benzyloxy)-2-hydroxy-4-oxobutanoïque [66178-06-1] (18)



Dans un ballon de 5 mL, 22 mg (0,08 mmol) du composé **17** sont dissous dans 0,5 mL d'eau. 40 μ L de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 16 h d'agitation à température ambiante la solution est reprise avec 4 mL de méthanol et évaporée. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide du produit avec comme mélange d'éluants : EP/AE (7/3). Le produit est obtenu avec une masse $m = 10$ mg, soit un rendement de 56 %.

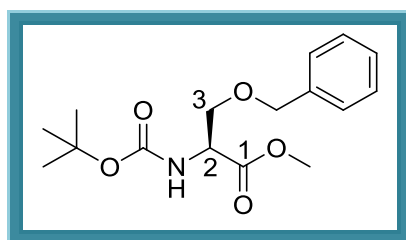
C₁₁H₁₂O₅

224,21 g/mol

CCM : R_f = 0,05 (AE/EP 3/7 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 2,79 (dd, 1H, $J = 16,8$ Hz, $J = 6,6$ Hz, H₃); 2,92 (dd, 1H, $J = 16,8$ Hz, $J = 4,4$ Hz, H₃); 4,51 (m, 1H, H₂); 5,14 (s, 2H, CH₂Ph); 7,31-7,36 (m, 5H, H_{ar}).

(2S)-méthyl 3-(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate [80963-10-6] (20)



Dans un ballon de 100 mL, 2,01 g (6,81 mmol) d'acide (S)-3-(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoïque sont dissous sous diazote dans 50 mL de méthanol. 84,8 mg (0,1 éq., 0,69 mmol) de DMAP et 1,2 mL (1,1 éq., 7,75 mmol) de DIC sont ajoutés. La réaction est agitée sous diazote pendant 72 h. Le milieu réactionnel est évaporé. Le résidu est purifié par colonne de silice avec comme gradient d'éluants : EP/AE (9/1), puis (8/2). L'ester est obtenu sous forme d'huile jaune, avec une masse $m = 1,68$ g, soit un rendement de 80 %.

C₁₆H₂₃NO₅

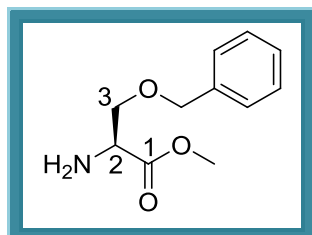
309,36 g/mol

CCM : $R_f = 0,9$ (EP/AE 8/2 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,68 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J = 3,2$ Hz, H₃); 3,73 (s, 3H, CH₃); 3,86 (dd, 1H, $J = 9,4$ Hz, $J = 3,3$ Hz, H₃); 4,42-4,56 (m, 3H, H₂, CH₂Ph); 5,43 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, NH); 7,24-7,36 (m, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃); 52,4 (CH₃); 53,9 (C₂); 69,9 (C₃); 73,2 (CH₂Ph); 79,9 (Cq); 127,5 (CH_{ar}); 127,8 (CH_{ar}); 128,3 (CH_{ar}); 137,5 (Cq); 155,4 (CO); 171,1 (CO).

(2S)-2-amino-3-(benzyloxy)propanoate de méthyl [46460-82-6] (21)



Dans un ballon de 100 mL, 3,54 g (11,46 mmol) du composé **20** sont dissous dans 4 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C, 10 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 30 min. Une solution de NaHCO₃ à 5 % (200 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte. Le produit est extrait du milieu avec du DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. L'amine est obtenue sous forme d'huile brune, avec une masse de $m = 2,28$ g, soit un rendement de 95 %.

C₁₁H₁₅NO₃

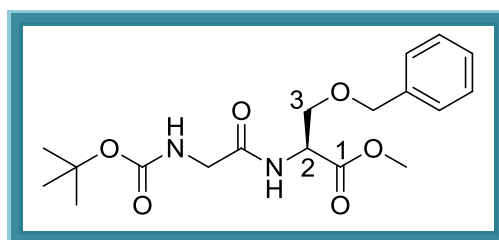
209,24 g/mol

CCM : $R_f = 0,0$ (EP/AE 8/2 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 3,76 (s, 3H, OCH₃); 3,83 (ddd, 2H, $J = 18,8$ Hz, $J = 10,6$ Hz, $J = 3,7$ Hz, H₃); 4,41 (t, 1H, $J = 3,6$ Hz, H₂); 4,51 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, CH₂Ph); 4,59 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, CH₂Ph); 7,30-7,39 (m, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 52,1 (CH₃); 54,8 (C₂); 71,8 (C₃); 73,2 (CH₂Ph); 127,6 (CH_{ar}); 127,7 (CH_{ar}); 128,3 (CH_{ar}); 137,7 (Cq); 174,1 (CO).

(2S)-méthyl-3-(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acétamido)propanoate [67864-85-1] (22)



Solution A : dans un ballon de 100 mL, sous diazote 1,92 g (10,94 mmol) de Boc-Gly-OH sont dissous dans 50 mL de DCM anhydre, 1,6 mL (1,1 éq., 12,03 mmol) de 2,4,6-collidine et 4,56 g (1,1 éq., 12,03 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 min.

Solution B : dans un ballon de 100 mL, 2,88 g (10,94 mmol) du produit **21** sont dissous dans 16 mL de DCM anhydre. Le mélange est introduit goutte-à-goutte dans le milieu réactionnel A et la solution est laissée toute la nuit sous agitation à température ambiante. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 13 mL d'AE et lavé trois fois par 12 mL d'une solution d'HCl (5 %), puis par une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (9/1) ; (8/2), puis (7/3). Le produit est obtenu sous forme d'huile jaune avec une masse de $m = 3,69$ g avec un rendement de 92 %.

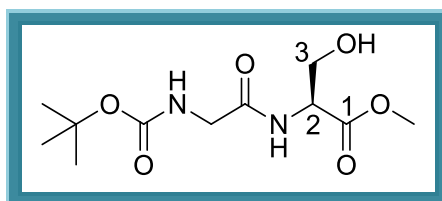
C₁₈H₂₆N₂O₆

366,41 g/mol

CCM : R_f = 0,4 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,68 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J = 3,2$ Hz, H₃); 3,73 (s, 3H, CH₃); 3,83-3,87 (m, 2H, CH₂); 3,89 (dd, 1H, $J = 9,6$ Hz, $J = 3,1$ Hz, H₃); 4,51 (dd, 2H, $J = 12,2$ Hz, CH₂Ph); 4,74 (dt, 1H, $J = 3,1$ Hz, $J = 8,0$ Hz, H₂); 5,09 (s, 1H, NH Gly); 6,81 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, NH Ser); 7,24-7,37 (m, 5H, H_{ar}).

(2S)-méthyl 2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)acétamido)-3-hydroxypropanoate [83661-73-8] (**23)**



Dans un ballon de 50 mL, 2,11 g (5,76 mmol) de composé **22** sont dissous dans 50 mL de méthanol. 216 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min, le ballon est maintenu sous pression de dihydrogène. Après 4 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec un rendement de 90 % ($m = 1,43$ g).

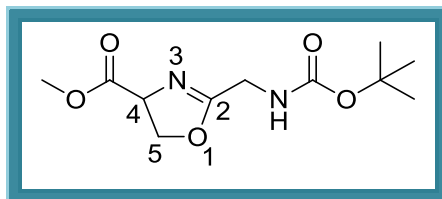
C₁₁H₂₀N₂O₆

276,29 g/mol

CCM : R_f = 0,05 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,79 (s, 3H, CH₃); 3,84 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz, CH₂); 3,97 (d, 2H, $J = 3,3$ Hz, H₃); 4,66 (dt, 1H, $J = 3,3$ Hz, $J = 7,0$ Hz, H₂); 5,23 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, NH Gly); 7,04 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, NH Ser).

2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carboxylate de méthyle [871715-69-4] (24)



Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 700 mg (2,53 mmol) du composé **23** sont dissous dans 15 mL de DCM anhydre. La température du milieu réactionnel est maintenue en dessous de -80°C. 0,5 mL de DAST (1,5 éq., 3,80 mmol) sont ajoutés goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h 30, ensuite la température du milieu réactionnel remonte doucement jusqu'à 0°C. 20 mL d'une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium à 0°C sont ajoutés au goutte-à-goutte. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée sans chauffer. L'oxazoline est fragile et donc utilisée directement dans l'étape suivante sans plus de purification.

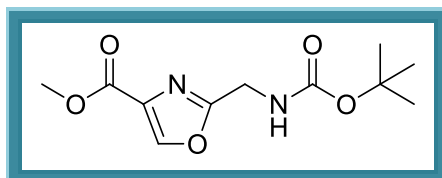
C₁₁H₁₈N₂O₅

258,27 g/mol

CCM : R_f = 0,25 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) **δ** (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,78 (s, 3H, CH₃); 4,00-4,02 (m, 2H, CH₂); 4,49-4,60 (m, 2H, H₅); 4,74-4,77 (m, 1H, H₄); 5,13 (s, 1H, NH).

2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)oxazole-4-carboxylate de méthyle [182120-89-4] (25)



Le brut réactionnel du composé **24** est dissous dans 17,5 mL de DCM sous diazote à 0°C, 0,75 mL de DBU (2 éq., 5,02 mmol) sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 10 min, 280 µL (1,1 éq., 2,82 mmol) de bromotrichlorométhane sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h. La solution est lavée avec 20 mL d'une solution de KHSO₄ (1 M) et 20 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE: (9/1), puis (8/2) et (7/3). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse m = 340 mg, soit un rendement de 52 % sur deux étapes.

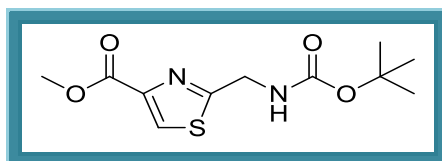
C₁₁H₁₆N₂O₅

256,26 g/mol

CCM : R_f = 0,50 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) **δ** (ppm) : 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,91 (s, 3H, CH₃); 4,50 (d, 2H, J = 5,9 Hz, CH₂); 5,36 (s, 1H, NH); 8,20 (s, 1H, CH=).

2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)thiazole-4-carboxylate de méthyle
[297165-32-3] (29)



Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 1,00 g (6,40 mmol) de *N*-Boc-aminoacétonitrile et 1,20 g (1,1 éq., 6,99 mmol) d'hydrochlorure de l'ester méthylique de la cystéine, 10 mL de méthanol et 1,2 mL (1,4 éq., 8,89 mmol) de triéthylamine sont mélangés. Le tout est mis à reflux à 65°C pendant 4 h 30. Puis, le mélange est refroidi à température ambiante. 20 mL de toluène sont ajoutés. La phase organique est lavée avec deux fois 20 mL d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée sans chauffer. La thiazoline est fragile et utilisée directement dans l'étape suivante sans plus de purification.

CCM : R_f = 0,30 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

Le brut réactionnel est dissous dans 4 mL de DCM sous diazote à 0°C, 0,48 mL de DBU (1 éq., 3,20 mmol) sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 10 min, 320 µL (1 éq., 3,20 mmol) de bromotrichlorométhane sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à 0°C. La solution est lavée avec 4 mL d'une solution de KHSO₄ à 1 M, 4 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (8/2), puis (7/3). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse *m* = 818 mg, soit un rendement de 46 %.

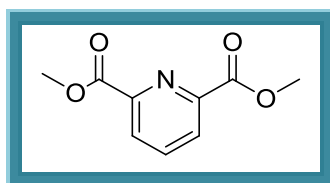
C₁₁H₁₆N₂O₄S

272,32 g/mol

CCM : R_f = 0,40 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,95 (s, 3H, CH₃); 4,65 (d, 2H, *J* = 6,1 Hz, CH₂); 5,27 (s, 1H, NH); 8,15 (s, 1H, CH=).

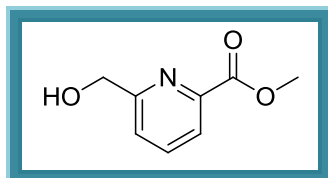
Diméthyl pyridine-2,6-dicarboxylate [5453-67-8] (31)



Dans un ballon de 50 mL, 1,0 g (5,98 mmol) d'acide pyridine-2,6-dicarboxylique est dissous dans 25 mL de méthanol. La solution est refroidie à 0°C et 1,82 mL (4,2 éq., 25,10 mmol) de chlorure de thionyle sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 30 min à température ambiante le milieu est chauffé au reflux pendant 3 h. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans l'AE et lavé par plusieurs solutions : deux fois 10 mL d'une solution saturée de NaHCO₃ et 10 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse *m* = 1,02 g, soit un rendement de 87 %.

C₉H₉NO₄

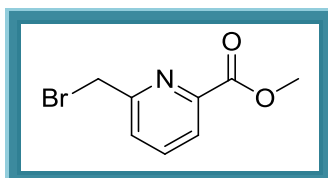
195,17 g/mol

CCM : $R_f = 0,28$ (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)**RMN¹H** (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 4,04 (s, 6H, OCH₃); 8,05 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, CH); 8,34 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, CH).**6-(hydroxyméthyl)picolinate de méthyle [39977-44-1] (32)**

Dans un ballon de 100 mL, 805 mg (4,12 mmol) de composé **31** sont dissous dans 40 mL de méthanol. La solution est refroidie à 0°C et 249 mg (1,6 éq., 6,59 mmol) de borohydrure de sodium sont ajoutés par portion. Après 1 h à température ambiante, le milieu est acidifié avec une solution de HCl (1 M) jusqu'au pH de 3-4. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans l'eau et neutralisé par une solution saturée de NaHCO₃. Le produit est extrait avec trois fois 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 524$ mg, soit un rendement de 76 %.

C₈H₉NO₃

167,16 g/mol

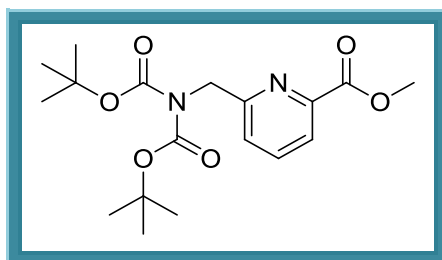
CCM : $R_f = 0,14$ (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)**RMN¹H** (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 4,01 (s, 3H, OCH₃); 4,87 (s, 2H, CH₂); 7,53 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, CH); 7,86 (dd, 1H, $J = 9,0$ Hz, $J = 6,0$ Hz, CH); 8,05 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, CH).**6-(bromométhyl)picolinate de méthyle [146462-25-1] (33)**

Dans un ballon de 50 mL, 524 mg (3,10 mmol) de composé **32** sont dissous dans 6,5 mL de DCM et 6,5 mL d'éther diéthylique. 904 mg (1,1 éq., 3,44 mmol) de triphénylphosphine et 1,14 g (1,1 éq., 3,44 mmol) de tétrabromure de carbone sont ajoutés. Après 30 min à température ambiante, les solvants sont évaporés. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide avec comme mélange d'éluant : EP/AE (75/25). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 511$ mg, soit un rendement de 72 %.

C₈H₈NO₂Br

230,06 g/mol

CCM : $R_f = 0,52$ (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)**RMN¹H** (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 4,02 (s, 3H, OCH₃); 4,65 (s, 2H, CH₂); 7,70 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, CH); 7,88 (dd, 1H, $J = 9,0$ Hz, $J = 6,0$ Hz, CH); 8,07 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, CH).

6-((di(*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)picolinate de méthyle (34)

Dans un ballon de 50 mL, 608 mg (1,15 éq., 2,79 mmol) de di-*tert*-butyl iminodicarboxylate sont dissous dans 2,86 mL de DMF anhydre. 320 mg (1,17 éq., 2,84 mmol) de *tert*-butanolate de potassium sont ajoutés. Après 30 min à température ambiante, 2,29 mL d'une solution de 560 mg (1 éq., 2,43 mmol) du composé **33** dans du DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 2 h à 50°C, le DMF est évaporé. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide avec comme mélange d'éluants : EP/AE (95/5). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 677$ mg, soit un rendement de 76 %.

$C_{18}H_{26}N_2O_6$

366,41 g/mol

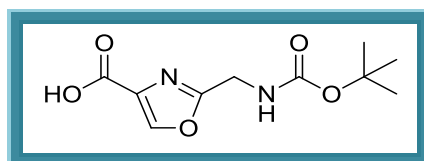
$T_{\text{fusion}} = 71^\circ\text{C}$

CCM : $R_f = 0,42$ (EP/AE 7/3 (v/v)) (révélateur : vanilline)

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 389,1700 pour $[M+Na]^+$, calculé à 389,1689 pour $C_{18}H_{26}N_2O_6Na$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 2976($\bar{\nu}_{\text{CH}_3}$); 1746 et 1723($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1366($\bar{\nu}_{\text{C-O}}$); 1517($\delta_{\text{N-H}}$); 1226($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_3\text{C}}$); 1142($\bar{\nu}_{\text{C-O}}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,44 (s, 18H, C(CH₃)₃); 4,00 (s, 3H, OCH₃); 5,03 (s, 2H, CH₂); 7,37 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, CH); 7,82 (dd, 1H, $J = 9,0$ Hz, $J = 6,0$ Hz, CH); 8,02 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, CH).

Acide 2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)oxazole-4-carboxylique [182120-90-7] (35)

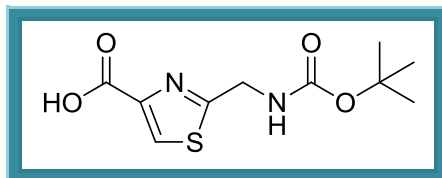
Dans un ballon de 100 mL, 335 g (1,31 mmol) du composé **25** sont dissous dans 32 mL de THF et 16 mL d'eau. La solution est refroidie à 0°C et 110 mg (2 éq., 2,62 mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté sont ajoutés. Après 30 min, le milieu est acidifié avec une solution de HCl à 1 M jusqu'au pH de 3-4. Le produit est extrait à l'aide de DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 308$ mg, soit un rendement de 97 %.

$C_{10}H_{14}N_2O_5$

242,23 g/mol

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 4,52 (d, 2H, J = 6,1 Hz, CH₂); 5,43 (s, 1H, NH); 8,27 (s, 1H, CH=).

Acide 2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)thiazole-4-carboxylique
[71904-80-8] (36)



Dans un ballon de 100 mL, 123 mg (0,45 mmol) du composé **29** sont dissous dans 12 mL de THF et 6 mL d'eau. La solution est refroidie à 0°C et 38 mg (2 équ., 0,89 mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté sont ajoutés. Après 30 min, le milieu est acidifié avec une solution de HCl (1 M) jusqu'au pH de 3-4. Le produit est extrait à l'aide de DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse m = 116 mg, soit un rendement quantitatif.

C₁₀H₁₄N₂O₄S

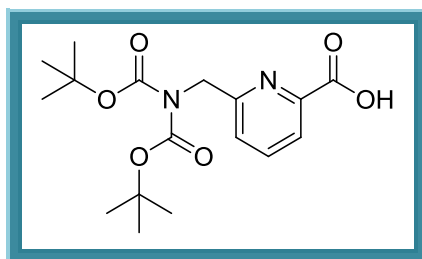
258,29 g/mol

CCM : R_f = 0,0 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CD₃OD, 300MHz) δ (ppm) : 1,47 (s, 9H, CH₃); 4,51 (s, 2H, CH₂); 4,92 (s, 1H, NH); 8,30 (s, 1H, CH=).

RMN¹³C (CD₃OD, 75MHz) δ (ppm) : 28,7 (C(CH₃)₃); 43,0 (CH₂); 80,9 (C_q); 129,2 (C₅); 148,2 (CO); 158,2 (C₄); 163,9 (C₂); 173,9 (CO).

Acide-6-((di(*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)picolinique [874619-36-0]
(37)



Dans un ballon de 100 mL, 110 mg (0,30 mmol) du composé **34** sont dissous dans 10 mL de THF et 5 mL d'eau. La solution est refroidie à 0°C et 37 mg (2 équ., 0,88 mmol) d'hydroxyde de lithium monohydraté sont ajoutés. Après 30 min, le milieu est acidifié avec 4 mL d'une solution de HCl (1 M). Le produit est extrait à l'aide de DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu avec une masse m = 106 mg, soit un rendement quantitatif.

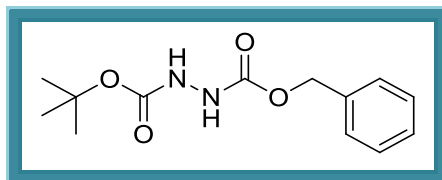
C₁₂H₁₆N₂O₄

252,27 g/mol

CCM : R_f = 0,0 (MeOH/DCM 1/9 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,47 (s, 18H, C(CH₃)₃); 4,99 (s, 2H, CH₂); 7,49 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, CH); 7,94 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 5,8$ Hz, CH); 8,13 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, CH).
RMN¹³C (CD₃OD, 75MHz) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃); 51,7 (CH₂); 84,3 (Cq); 124,3 (CH); 124,6 (CH); 139,7 (CH); 148,6 (Cq); 153,8 (CO); 159,9 (Cq); 167,5 (CO).

**hydraxine 1,2-diester 1-(1,1-diméthyléthyl) 2-(phénylméthyl) [57699-88-4]
(39)**



Dans un ballon de 250 mL sous diazote, 4,00 g (30,3 mmol) du *tert*-butylcarbazate sont dissous dans 100 mL de THF, sous diazote. A 0°C, 4,65 mL (1,1 éq., 33,3 mmol) de triéthylamine sont ajoutés à la solution et ensuite 11,25 mL (1,1 éq., 33,3 mmol) d'une solution à 50% de chloroformiate de benzyle dans du toluène sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 10 min. Après 2 h à température ambiante, la solution est évaporée. Le résidu est repris dans de l'AE et lavé par plusieurs solutions : 20 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (95/5), (9/1), puis (8/2). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 5,61$ g, soit un rendement de 69 %.

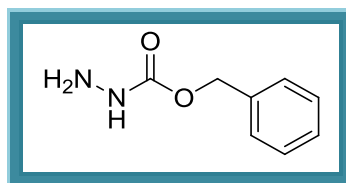
C₁₃H₁₈N₂O₄

266,29 g/mol

CCM : R_f = 0,85 (AE/EP 3/7 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃); 5,18 (s, 2H, CH₂Ph); 6,31 (s, 1H, NH); 6,51 (s, 1H, NH); 7,36 (s, 5H, H_{ar}).

Carbazate de benzyl [5331-43-1] (40)



Dans un ballon de 50 mL, 5,61 g (21,1 mmol) du composé **39** sont dissous dans 20 mL de DCM, sous diazote. La solution est refroidie à 0°C. 10 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 2 h 30. Le DCM est évaporé, le résidu est repris dans du méthanol et évaporé. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 3,5$ g, soit un rendement quantitatif.

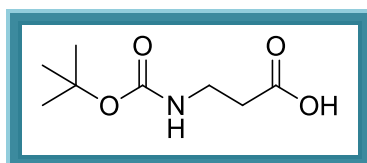
C₈H₁₀N₂O₂

166,18 g/mol

CCM : $R_f = 0,12$ (AE/EP 3/7 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 2,82 (s, 3H, NH, NH₂); 5,16 (s, 2H, CH₂Ph); 7,36 (s, 5H, H_{ar}).

Acide-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoïque [3303-84-2] (42)



Dans un ballon de 100 mL, 2,00 g (22,5 mmol) de β -alanine sont mis en suspension dans 50 mL de THF. 25 mL d'une solution de NaOH (1 M) sont ajoutés au goutte-à-goutte. 5,38 g (1,1 éq., 24,7 mmol) de dicarbonate de di-*tert*-butyle sont ajoutés. Le milieu réactionnel au départ trouble est agité pendant 5 h jusqu'à devenir limpide. Le THF est évaporé. Le résidu est repris avec de l'acétate d'éthyle, 5 g d'acide citrique monohydrate sont ajoutés. La solution est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. L'amine est obtenue sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 4,25$ g, soit un rendement quantitatif.

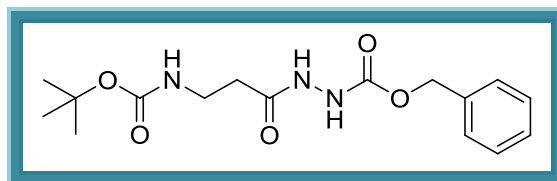
C₈H₁₅NO₄

189,21 g/mol

CCM : $R_f = 0,0$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,59 (ls, 2H, CH₂); 3,40 (ls, 2H, CH₂N); 5,05 (s, 1H, NH).

2-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)hydrazinecarboxylate de benzyle (43)



Dans un ballon de 250 mL sous diazote, 1,50 g (7,93 mmol) du composé **42** sont mis en suspension dans 75 mL de DCM anhydre. 1,48 mL (1,1 éq., 8,72 mmol) de DIPEA. 3,3 g (1,1 éq., 8,72 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 1 h, une solution de 1,32 g (7,93 mmol) du composé **40** dissous dans 100 mL de DCM sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après 3 h, le milieu réactionnel est lavé par plusieurs solutions : trois fois 50 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 50 mL d'une solution d'NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (7/3), puis (5/5). Le produit est obtenu sous forme de solide beige, avec une masse $m = 1,93$ g, soit un rendement de 72 %.

C₁₆H₂₃N₃O₅

375,37 g/mol

$T_{\text{fusion}} = 111^{\circ}\text{C}$

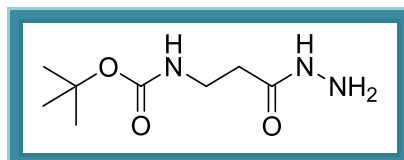
CCM : $R_f = 0,43$ (AE/EP 3/7 (v/v)) (révélateur : vanilline)

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 360,1533 pour $[M+Na]^+$, calculé à 360,1535 pour $C_{16}H_{23}N_3O_5Na$.

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,44 (t, 2H, J = 5,0 Hz, CH₂); 3,37-3,46 (m, 2H, CH₂N); 5,16 (s, 2H, CH₂Ph); 5,23 (s, 1H, NH_{carbamate}); 6,91 (s, 1H, NH); 7,35 (s, 5H, H_{ar}); 7,92 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃); 34,0 (CH₂); 36,2 (CH₂N); 67,7 (CH₂Ph); 128,0 (CH_{ar}); 128,2 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}).

(3-hydrazinyl-3-oxopropyl)carbamate de *tert*-butyle [42116-56-3] (44)



Dans un ballon de 100 mL, 1,93 g (5,73 mmol) du composé **43** sont dissous dans 50 mL de méthanol. 190 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 1 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse m = 1,06 g, soit un rendement de 90 %.

$C_8H_{17}N_3O_3$

203,23 g/mol

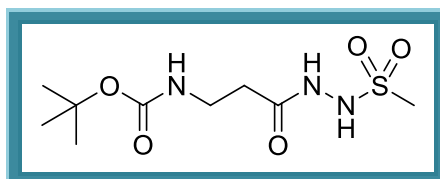
$T_{\text{fusion}} = 76^\circ\text{C}$

CCM : $R_f = 0,0$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,39 (t, 2H, J = 5,8 Hz, CH₂); 3,40-3,46 (m, 2H, CH₂N); 5,09 (s, 1H, NH_{carbamate}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 28,3 (C(CH₃)₃); 34,3 (CH₂); 36,6 (CH₂); 79,5 (Cq); 156,1 (CO_{carbamate}); 172,2 (CO).

(3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)carbamate de *tert*-butyle (45)



Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 808 mg (1 éq., 3,98 mmol) du composé **44** sont dissous dans 40 mL de THF. A 0°C, 0,59 mL (1,1 éq., 4,37 mmol) de triéthylamine sont ajoutés à la solution et ensuite 0,34 mL (1,1 éq., 4,37 mmol) de chlorure de mésyle sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 h. Après 1 h à température ambiante, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans de l'AE et lavé par plusieurs solutions : trois fois 20 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (98/2), puis (96/4). Le produit est obtenu sous forme de cristaux blanc, avec une masse $m = 651$ g, soit un rendement de 58 %.

$C_9H_{19}N_3O_5S$

281,33 g/mol

CCM : $R_f = 0,28$ (MeOH/DCM 5/95 (v/v)) (révélateur : vanilline)

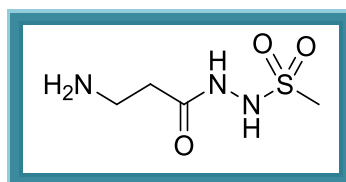
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 304,0934 pour $[M+Na]^+$, calculé à 304,0943 pour $C_9H_{19}N_3O_5NaS$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 3357 et 3318 ($\bar{\nu}_{N-H}$); 2920 ($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1681 ($\bar{\nu}_{C=O}$); 1505 (δ_{N-H}); 1366 ($\bar{\nu}_{SO_2}$); 1248 ($\bar{\nu}_{(CH_3)_3C}$); 1162 ($\bar{\nu}_{C-Ocarbamate}$).

RMN¹H (DMSO- d_6 , 300MHz) δ (ppm) : 1,39 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 2,29 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2); 2,92 (s, 3H, CH_3); 3,10-3,20 (m, 2H, CH_2N); 6,86 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, $NH_{carbamate}$); 9,39 (s, 1H, NH); 10,14 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 28,1 ($C(CH_3)_3$); 33,8 (CH_2); 36,2 (CH_2N); 38,9 (CH_3); 79,7 (Cq); 156,4 ($CO_{carbamate}$); 171,4 (CO).

N-(3-aminopropanoyl)méthanesulfonylhydrazide (46)



Dans un ballon de 10 mL, 120 mg (0,43 mmol) du composé **45** sont dissous dans 1,5 mL de DCM, sous diazote. La solution est refroidie à 0°C. 0,5 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 2 h 30. Le DCM est évaporé, le résidu est repris dans du méthanol et évaporé. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 77$ mg, soit un rendement quantitatif.

$C_4H_{11}N_3O_3S$

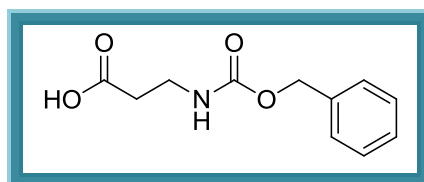
181,21 g/mol

CCM : $R_f = 0,0$ (DCM/MeOH 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO- d_6 , 300MHz) δ (ppm) : 2,53 (s, 2H, CH_2); 2,98 (s, 3H, CH_3); 3,04 (s, 2H, CH_2N); 7,76 (s, 2H, NH_2); 9,48 (s, 1H, NH); 10,32 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO- d_6 , 75MHz) δ (ppm) : 30,5 (CH_2); 34,9 (CH_2N); 40,3 (CH_3); 169,2 (CO).

Acide 3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)propanoïque [2304-94-1] (48)



Dans un ballon de 100 mL, 4,00 g (44,9 mmol) de β -alanine sont mis en suspension dans 184 mL de THF et 92 mL d'une solution de NaOH (1 M). 16,7 mL (1,1 éq., 49,4 mmol) d'une solution à 50% de chloroformiate de benzyle dans du toluène sont ajoutés au goutte-à-

goutte. Le milieu réactionnel au départ trouble est agité pendant 2 h jusqu'à devenir limpide. Le THF est évaporé. La solution est acidifiée avec 200 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). Le produit est extrait avec trois fois 80 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées. Le composé est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 8,2$ g, soit un rendement 82 %.

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$

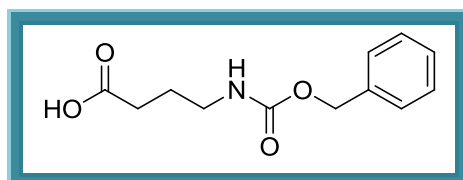
223,23 g/mol

CCM : $R_f = 0,65$ (DCM) (révélateur : vanilline)

RMN^1H (DMSO- d_6 , 300MHz) δ (ppm) : 2,41 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz, CH_2); 3,19-3,26 (m, 2H, CH_2N); 5,02 (s, 3H, CH_2Ph , NH); 7,36 (s, 5H, H_{ar}); 12,23 (s, 1H, COOH).

RMN^{13}C (DMSO- d_6 , 75MHz) δ (ppm) : 34,4 (CH_2); 36,8 (CH_2N); 65,4 (CH_2Ph); 128,8 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 137,4 (Cq); 156,2 ($\text{CO}_{\text{carbamate}}$); 173,0 (COOH).

Acide 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butanoïque [5105-78-2] (49)



Dans un ballon de 100 mL, 2,00 g (19,4 mmol) d'acide 4-aminobutanoïque sont mis en suspension dans 80 mL de THF et 40 mL d'une solution de NaOH (1 M). 7,2 mL (1,1 éq., 21,3 mmol) d'une solution à 50% de chloroformiate de benzyle dans du toluène sont ajoutés au goutte-à-goutte. La solution est agitée pendant 3 h jusqu'à devenir blanche. Le THF est évaporé. La solution est acidifiée avec 60 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). Le produit est extrait avec trois fois 50 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées. Le composé est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 4,2$ g, soit un rendement 90 %.

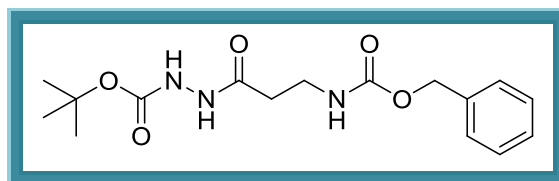
$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$

237,25 g/mol

CCM : $R_f = 0,75$ (DCM/méthanol 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) : 1,82-1,87 (m, 2H, CH_2); 2,40 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 3,17-3,32 (m, 2H, CH_2N); 4,93 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{carbamate}}$); 5,10 (s, 2H, CH_2Ph); 7,35 (s, 5H, H_{ar}).

2-(3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)propanoyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyl [110503-79-2] (50)

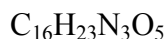


Dans un ballon de 500 mL sous diazote, 4,00 g (17,9 mmol) du composé **48** sont mis en suspension dans 200 mL de DCM anhydre. 3,44 mL (1,1 éq., 19,7 mmol) de DIPEA. 7,47 g (1,1 éq., 19,7 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à

température ambiante. Après 1 h, 2,60 g (1,1 éq., 19,7 mmol) de *tert*-butylcarbazate sont additionnés au milieu.

Après 18 h, le milieu réactionnel est lavé par plusieurs solutions : trois fois 50 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 50 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %) et 50 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluateurs EP/AE : (7/3), (5/5), puis AE seulement. Le produit est obtenu sous forme de solide beige, avec une masse $m = 5,61$ g, soit un rendement de 93 %.



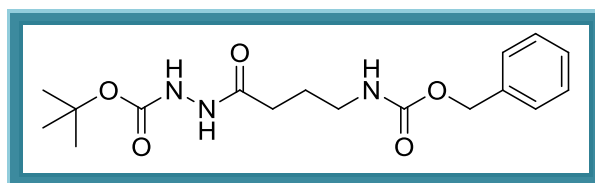
337,37 g/mol

CCM : $R_f = 0,24$ (AE/EP 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃+CD₃OD, 300MHz) δ (ppm) : 1,37 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,33 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz, CH₂); 3,33-3,37 (m, 2H, CH₂N); 4,97 (s, 2H, CH₂Ph); 7,23 (s, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃+CD₃OD, 75MHz) δ (ppm) : 27,3 (C(CH₃)₃); 33,2 (CH₂); 36,3 (CH₂N); 66,0 (CH₂Ph); 80,7 (Cq); 127,2 (CH_{ar}); 127,4 (CH_{ar}); 127,8 (CH_{ar}); 136,0 (Cq); 155,7 (CO_{carbamate}); 156,7 (CO_{carbamate}); 165,5 (CO).

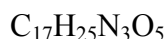
2-(3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butanoyl)hydrazinecarboxylate de *tert*-butyl (51)



Dans un ballon de 500 mL sous diazote, 2,00 g (8,4 mmol) du composé **49** sont mis en suspension dans 140 mL de DCM anhydre. 1,58 mL (1,1 éq., 9,3 mmol) de DIPEA. 3,52 g (1,1 éq., 9,3 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 1 h, 1,11 g (1 éq., 8,4 mmol) de *tert*-butylcarbazate sont additionnés au milieu.

Après 24 h, le milieu réactionnel est lavé par plusieurs solutions : trois fois 100 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 100 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %) et 100 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice éluée avec du DCM et ensuite DCM/méthanol (98/2). Le produit est obtenu sous forme d'huile brune, avec une masse $m = 2,25$ g, soit un rendement de 76 %.



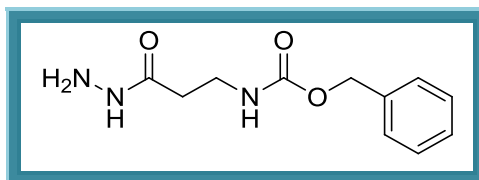
351,40 g/mol

CCM : $R_f = 0,75$ (DCM/méthanol 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,83-1,87 (m, 2H, CH₂); 2,26 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH₂); 3,22-3,32 (m, 2H, CH₂N); 5,09 (s, 2H, CH₂Ph); 5,30 (s, 1H, NH_{carbamate}); 6,68 (s, 1H, NH); 7,34 (s, 5H, H_{ar}); 8,27 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 25,8 (CH₂); 27,9 (C(CH₃)₃); 30,8 (CH₂); 39,7 (CH₂N); 66,6 (CH₂Ph); 81,5 (Cq); 127,9 (CH_{ar}); 128,3 (CH_{ar}); 136,2 (Cq); 155,4 (CO); 156,9 (CO); 172,3 (CO).

(3-hydrazinyl-3-oxopropyl)carbamate de benzyl [21855-66-3] (52)



Dans un ballon de 10 mL, 2 g (5,93 mmol) du composé **50** sont dissous dans 12 mL de DCM, sous diazote. La solution est refroidie à 0°C. 6 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 30 min. Le DCM est évaporé, le résidu est repris dans du méthanol et évaporé. Le produit est obtenu sous forme de huile brune, avec une masse $m = 2,08$ g, soit un rendement quantitatif.

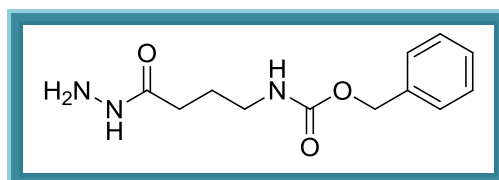
C₁₁H₁₅N₃O₃

237,26 g/mol

CCM : R_f = 0,0 (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 2,44 (t, 2H, $J = 9,0$ Hz, CH₂); 3,24-3,29 (m, 2H, CH₂N); 5,03 (s, 3H, CH₂Ph, NH_{carbamate}); 7,36 (s, 5H, H_{ar}); 10,05 (s, 1H, NH); 10,97 (s, 2H, NH₂).

(3-hydrazinyl-3-oxobutyl)carbamate de benzyl (53)



Dans un ballon de 10 mL, 800 mg (2,28 mmol) du composé **51** sont dissous dans 10 mL de DCM, sous diazote. La solution est refroidie à 0°C. 2,5 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 3 h. Le DCM est évaporé, le résidu est repris dans du méthanol et évaporé. Le produit est obtenu sous forme de huile brune, avec une masse $m = 573$ mg, soit un rendement quantitatif.

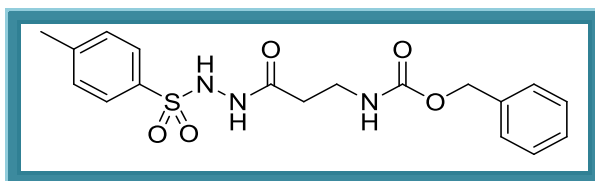
C₁₂H₁₇N₃O₃

251,28 g/mol

CCM : R_f = 0,32 (DCM/méthanol 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 1,62-1,71 (m, 2H, CH₂); 2,21 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂); 2,98-3,04 (m, 2H, CH₂N); 5,01 (s, 2H, CH₂Ph); 7,28-7,39 (m, 5H, H_{ar}); 10,71 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ (ppm) : 25,1 (CH₂); 30,2 (CH₂); 39,7 (CH₂N); 65,3 (CH₂Ph); 127,8 (CH_{ar}); 127,8 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 137,2 (Cq); 156,2 (CO_{carbamate}); 171,5 (CO).

(3-oxo-3-(2-tosylhydrazinyl)propyl)carbamate de benzyl (54)

Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 2,08 g (1 éq., 5,92 mmol) du composé **52** sont dissous dans 43 mL de THF. A 0°C, 2,05 mL (2,5 éq., 14,8 mmol) de triéthylamine sont ajoutés à la solution et ensuite 1,69 g (1,1 éq., 8,88 mmol) de chlorure de tosylo sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 h. Après 1 h à température ambiante, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans de l'AE et lavé par plusieurs solutions : deux fois 20 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (98/2), puis (96/4). Le produit est obtenu sous forme de solide beige, avec une masse m = 1,28 g, soit un rendement de 55 %.

C₁₈H₂₁N₃O₅S

391,44 g/mol

T_{fusion} = 158°C

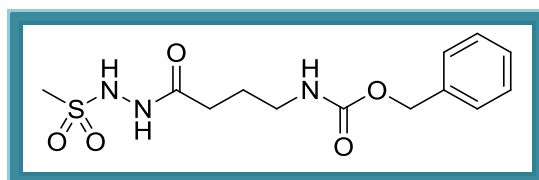
CCM : R_f = 0,28 (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 414,1108 pour [M+Na]⁺, calculé à 414,1100 pour C₁₈H₂₁N₃O₅NaS.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3363 et 3323 ($\bar{\nu}_{\text{N-H}}$); 1695 et 1670 ($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1536 ($\delta_{\text{N-H}}$); 1156 ($\bar{\nu}_{\text{C-O}}$).

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 2,19 (t, 2H, J = 6,0 Hz, CH₂); 2,36 (s, 3H, CH₃); 3,03-3,08 (m, 2H, CH₂N); 5,01 (s, 2H, CH₂Ph); 7,31-7,43 (m, 8H, H_{ar}, NH); 7,68 (d, 2H, J = 9,0 Hz, H_{ar}); 9,66 (s, 1H, NH); 10,07 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ (ppm) : 21,4 (CH₃); 33,8 (CH₂); 39,1 (CH₂N); 65,9 (CH₂Ph); 128,3 (CH_{ar}); 128,9 (CH_{ar}); 129,8 (CH_{ar}); 136,4 (Cq); 137,6 (Cq); 143,9 (Cq); 156,5 (CO_{carbamate}); 169,5 (CO).

(4-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-4-oxobutyl)carbamate de benzyl (55)

Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 573 mg (1 éq., 3,98 mmol) du composé **53** sont dissous dans 20 mL de THF. A 0°C, 0,77 mL (2,5 éq., 5,70 mmol) de triéthylamine sont ajoutés à la solution et ensuite 195 μ L (1,1 éq., 2,51 mmol) de chlorure de mésyle sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 h. Après 1 h à température ambiante, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans de l'AE et lavé par plusieurs solutions : trois fois 20 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (98/2), puis (96/4). Le produit est obtenu sous forme de cristaux blanc, avec une masse $m = 307$ mg, soit un rendement de 40 %.

$C_{13}H_{19}N_3O_5S$

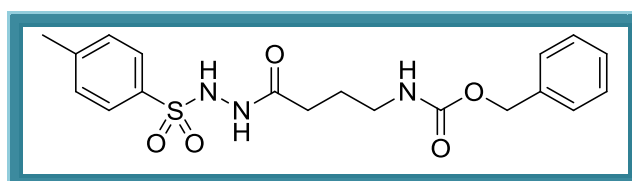
329,37 g/mol

CCM : $R_f = 0,58$ (DCM/EPméthanol 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-D₆, 300MHz) δ (ppm) : 1,60-1,71 (m, 2H, CH₂); 2,14 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂); 2,90 (s, 3H, SCH₃); 2,97-3,03 (m, 2H, CH₂N); 5,00 (s, 2H, CH₂Ph); 7,27-7,39 (m, 6H, H_{ar}, NH_{carbamate}); 9,37 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, NH); 10,07 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-D₆, 75MHz) δ (ppm) : 25,4 (CH₂); 30,4 (CH₂); 40,3 (CH₂N, SCH₃); 65,3 (CH₂Ph); 127,8 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 137,2 (Cq); 156,2 (CO_{carbamate}); 171,6 (CO).

(4-oxo-4-(2-tosylhydrazinyl)butyl)carbamate de benzyle (56)



Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 672 mg (1 éq., 2,68 mmol) du composé **53** sont dissous dans 19 mL de THF. A 0°C, 0,9 mL (2,5 éq., 6,7 mmol) de triéthylamine sont ajoutés à la solution et ensuite 562 mg (1,1 éq., 2,95 mmol) de chlorure de tosyloxy sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 1 h. Après 1 h à température ambiante, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans de l'AE et lavé par plusieurs solutions : deux fois 20 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec du DCM comme éluant au départ et ensuite un gradient d'éluants DCM/méthanol : (98/2). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 288$ mg, soit un rendement de 26 %.

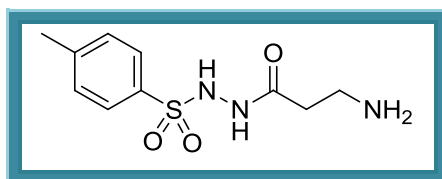
$C_{19}H_{23}N_3O_5S$

405,47 g/mol

CCM : $R_f = 0,53$ (DCM/méthanol 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 1,43-1,47 (m, 2H, CH₂); 1,96 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH₂); 2,36 (s, 3H, CH₃); 2,82-2,89 (m, 2H, CH₂N); 5,00 (s, 2H, CH₂Ph); 7,22 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, NH_{carbamate}); 7,29-7,39 (m, 7H, H_{ar}); 7,66 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H_{ar}); 9,69 (sl, 1H, NH); 9,96 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ (ppm) : 21,1 (CH₂); 25,3 (CH₂); 30,4 (CH₂); 65,2 (CH₂Ph); 127,7 (CH_{ar}); 127,8 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 136,0 (Cq); 137,2 (Cq); 143,2 (Cq); 156,1 (CO_{carbamate}); 170,5 (CO).

N-(3-aminopropanoyl)-4-méthylbenzènesulfonylhydrazide (57)

Dans un ballon de 50 mL, 166 mg (0,426 mmol) du composé **54** sont mis en suspension dans 20 mL de méthanol. 50 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min, le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après une nuit au reflux, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 109$ mg, soit un rendement quantitatif.

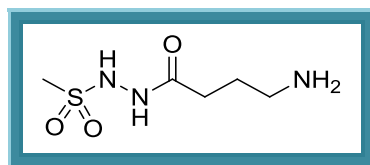
$C_{10}H_{15}N_3O_3S$

257,31 g/mol

CCM : $R_f = 0,0$ (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révéléateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 2,07 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH₂); 2,39 (s, 3H, CH₃); 2,59 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH₂); 7,35 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 21,3 (CH₃); 37,0 (CH₂); 38,2 (CH₂N); 127,9 (CH_{ar}); 127,9 (CH_{ar}); 129,4 (CH_{ar}); 129,4 (CH_{ar}); 136,4 (Cq); 143,3 (Cq); 170,1 (CO).

N-(4-aminobutanoyl)méthanesulfonylhydrazide (58)

Dans un ballon de 50 mL, 140 mg (0,426 mmol) du composé **55** sont mis en suspension dans 20 mL de méthanol. 50 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min, le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après une nuit au reflux, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 60$ mg, soit un rendement de 72 %.

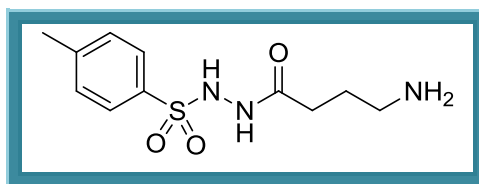
$C_5H_{13}N_3O_3S$

195,24 g/mol

CCM : $R_f = 0,0$ (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révéléateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 1,67 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH₂); 2,24 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH₂); 2,99 (s, 3H, CH₃); 3,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, CH₂).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ (ppm) : 20,9 (CH₂); 24,6 (CH₂); 29,7 (CH₂); 37,5 (CH₃); 169,7 (CO).

N-(4-aminobutanoyl)-4-méthylbenzènesulfonylhydrazide (59)

Dans un ballon de 50 mL, 200 mg (0,426 mmol) du composé **56** sont mis en suspension dans 20 mL de méthanol. 100 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min, le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après une nuit au reflux, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 116$ mg, soit un rendement de 88 %.

$C_{11}H_{17}N_3O_3S$

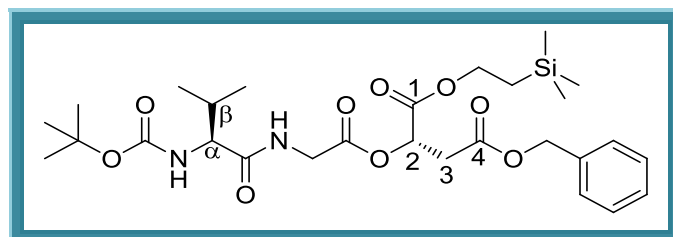
271,34 g/mol

CCM : $R_f = 0,0$ (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 1,73-1,77 (m, 2H, CH₂); 2,49-2,51 (m, 2H, CH₂); 2,73 (s, 3H, CH₃); 3,60 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, CH₂); 7,95 (s, 4H, H_{ar}).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ (ppm) : 21,1 (CH₂), 21,1 (CH₃); 25,4 (CH₂); 30,4 (CH₂); 127,8 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 136,0 (Cq); 143,2 (Cq); 170,5 (CO).

(S)-4-benzyl-1-(2-(triméthylsilyl)éthyl) 2-(2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-méthylbutanamido)acétoxy)succinate (60)



Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 702 mg (2,56 mmol) de composé **4** sont dissous dans 15 mL de DCM anhydre, 31 mg de DMAP (0,1 éq., 0,26 mmol) et ensuite 480 μ L (1,1 éq., 2,81 mmol) de DIC sont ajoutés à 0°C. 830 mg (2,56 mmol) de composé **6** dissous dans 10 mL de DCM sont additionnés au goutte-à-goutte à 0°C. Après deux jours d'agitation à température ambiante, les solvants sont évaporés. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice par un dépôt solide avec comme mélange d'éluants : EP/AE (8/2), puis (7/3). L'ester est obtenu sous forme d'huile, avec une masse $m = 1,21$ g, soit un rendement de 81 %.

$C_{28}H_{44}N_2O_9Si$

580,74 g/mol

CCM : $R_f = 0,30$ (EP/AE 7/3 (v/v)) (révélateur : vanilline)

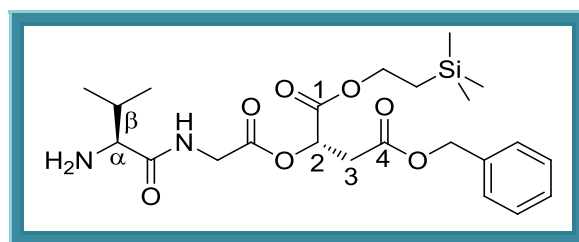
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 603,2709 pour $[M+Na]^+$, calculé à 603,2714 pour $C_{28}H_{44}N_2O_9NaSi$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3318($\bar{\nu}_{N-H}$); 2959($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1745($\bar{\nu}_{C=O}$); 1667($\bar{\nu}_{C=O}$); 1517(δ_{N-H}); 1248($\bar{\nu}_{(CH_3)_3C}$); 1167($\bar{\nu}_{(CH_3)_2CH}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,03 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,83-1,01 (m, 8H, CH₂Si, CH₃ Val); 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,14-2,22 (m, 1H, H _{β} Val); 2,94 (d, 2H, J = 6,0 Hz, H₃); 4,01 (dd, 1H, J = 8,7 Hz, J = 5,7 Hz, H _{α} Val); 4,09 (t, 2H, J = 5,0 Hz, CH₂ Gly); 4,17-4,25 (m, 2H, CH₂O); 5,03 (d, 1H, J = 8,7 Hz, NH Val); 5,18 (s, 2H, CH₂Ph); 5,53 (t, 1H, J = 6,1 Hz, H₂); 6,41 (t, 1H, J = 5,3 Hz, NH Gly); 7,33-7,34 (m, 5H, H_{ar}).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,5 (Si(CH₃)₃); 17,2 (CH₂Si); 17,4 (CH₃); 19,2 (CH₃); 28,3 (C(CH₃)₃); 30,7 (C _{β} Val); 35,9 (C₃); 40,9 (CH₂ Gly); 59,7 (C _{α} Val); 64,6 (CH₂O); 67,0 (CH₂Ph); 69,1 (C₂); 80,0 (Cq); 128,4 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 135,3 (Cq); 155,8 (CO_{carbamate}); 168,3 (CO); 168,7 (CO); 168,8 (CO); 171,7 (CO).

(S)-4-benzyl-1-(2-(triméthylsilyl)éthyl)-2-((S)-2-amino-3-méthylbutanamido)acétoxy)succinate (61)



Dans un ballon de 25 mL, 356 mg (0,61 mmol) du composé **60** sont dissous dans 4 mL de DCM. La solution est refroidie. 2 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 30 min. Une solution de NaHCO₃ (5 %) est ajoutée au goutte-à-goutte jusqu'à pH 9-10. Le produit est extrait du milieu avec du DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. L'amine est obtenue sous forme d'huile brune, avec une masse m = 265 mg, soit un rendement de 90 %.

C₂₃H₃₆N₂O₇Si

480,63 g/mol

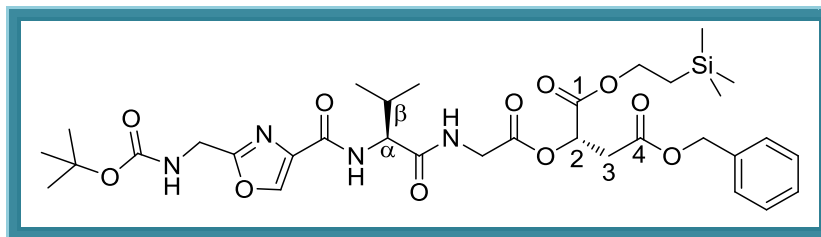
CCM : R_f = 0,00 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3480($\bar{\nu}_{N-H}$); 2948($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1729($\bar{\nu}_{C=O}$); 1662($\bar{\nu}_{C=O}$); 1452(δ_{CH_3}); 1517(δ_{N-H}); 1248($\bar{\nu}_{(CH_3)_3Si}$); 1164($\bar{\nu}_{(CH_3)_2CH}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,03 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,84 (d, 3H, J = 6,9 Hz, CH₃ Val); 0,98-1,01 (m, 5H, CH₂Si, CH₃ Val); 2,28-2,34 (m, 1H, H _{β} Val); 2,96 (d, 2H, J = 6,1 Hz, H₃); 3,28 (d, 1H, J = 3,6 Hz, H _{α} Val); 4,11 (d, 2H, J = 5,6 Hz, CH₂ Gly); 4,17-4,26 (m, 2H, CH₂O); 5,16 (s, 2H, CH₂Ph); 5,53 (t, 1H, J = 6,0 Hz, H₂); 7,36 (s, 5H, H_{ar}); 7,75 (t, 1H, J = 5,0 Hz, NH Gly).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,8 (Si(CH₃)₃); 15,8 (CH₃ Val); 17,0 (CH₂Si); 19,4 (CH₃ Val); 30,6 (C _{β} Val); 35,8 (C₃); 40,4 (CH₂ Gly); 59,8 (C _{α} Val); 64,3 (CH₂O); 66,8 (CH₂Ph); 68,8 (C₂); 128,2 (CH_{ar}); 135,1 (Cq); 168,2 (CO); 168,5 (CO); 168,9 (CO); 174,5 (CO).

(S)-4-benzyl-1-(2-(triméthylsilyl)éthyl)-2-(2-((S)-2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)oxazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)succinate (62)



Dans un ballon de 25 mL sous diazote, 126 mg (0,52 mmol) du composé **35** sont dissous dans 4 mL de DCM anhydre. 79 μ L (1,13 éq., 0,59 mmol) de 2,4,6-collidine (incolore) sont ajoutés à la solution incolore qui devient jaune. 223 mg (1,13 éq., 0,59 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, 4 mL d'une solution de 265 mg (0,55 mmol) du composé **61** dissous dans du DCM sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après trois jours, le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 10 mL d'AE et lavé par plusieurs solutions : trois fois 10 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (7/3), puis (5/5). Le produit est obtenu sous forme de solide beige, avec une masse $m = 304$ mg, soit un rendement de 83 %.

C₃₃H₄₈N₄O₁₁Si

704,84 g/mol

T_{fusion} = 92°C

CCM : R_f = 0,3 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

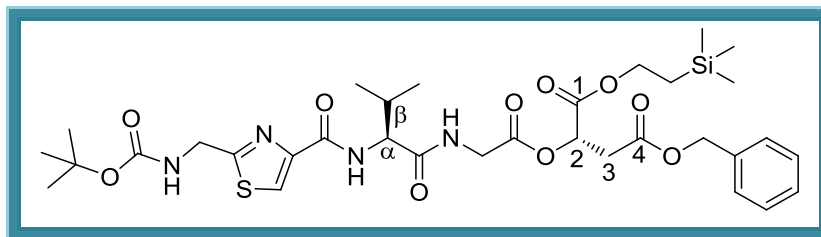
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 727,2982 pour [M+Na]⁺, calculé à 727,2987 pour C₃₃H₄₈N₄O₁₁NaSi.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3317($\bar{\nu}_{N-H}$); 2959($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1743($\bar{\nu}_{C=O}$); 1659($\bar{\nu}_{C=O}$); 1597($\bar{\nu}_{C=C}$); 1513(δ_{N-H}); 1248($\bar{\nu}_{(CH_3)_3C}$); 1170($\bar{\nu}_{(CH_3)_2CH}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,02 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,94-1,04 (m, 8H, CH₂Si, CH₃ Val); 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,23-2,30 (m, 1H, H _{β} Val); 2,93 (d, 2H, $J = 6,1$ Hz, H₃); 4,04-4,24 (m, 4H, CH₂ Gly, CH₂O); 4,42-4,46 (m, 3H, CH₂N, H _{α} Val); 5,15 (s, 1H, NH_{carbamate}); 5,16 (d, 2H, $J = 3,4$ Hz, CH₂Ph); 5,52 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, H₂); 6,45 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz, NH Gly); 7,34-7,36 (m, 6H, NH Val, H_{ar}); 8,14 (s, 1H, CH=).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,4 (Si(CH₃)₃); 17,4 (CH₂Si); 18,2 (CH₃ Val); 19,4 (CH₃ Val); 28,4 (C(CH₃)₃); 31,0 (C _{β} Val); 36,1 (C₃); 38,0 (CH₂); 41,0 (CH₂ Gly); 58,1 (C _{α} Val); 64,7 (CH₂O); 67,1 (CH₂Ph); 69,2 (C₂); 80,6 (C_q); 128,5 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 128,7 (CH_{ar}); 135,4 (C_q); 135,8 (C_q_{oxazole}); 141,8 (CH=); 160,6 (CO_{oxazole}); 161,3 (CN); 168,4 (C₄); 168,8 (C₁); 168,8 (CO Gly); 168,8 (CO_{carbamate}); 171,0 (CO Val).

(2S)-4-benzyl-1-(2-(triméthylsilyl)éthyl)-2-(2-((S)-2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)thiazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)succinate (63)



Dans un ballon de 25 mL sous diazote, 135 mg (1,08 éq., 0,52 mmol) du composé **36** sont dissous dans 8 mL de DCM anhydre. 120 μ L (1,85 éq., 0,90 mmol) de 2,4,6-collidine (incolore) sont ajoutés à la solution incolore qui devient jaune. 220 mg (1,2 éq., 0,58 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, 4 mL d'une solution de 233 mg (0,49 mmol) du composé **61** dissous dans du DCM sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après quatre jours, le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 10 mL d'AE et lavé par plusieurs solutions : trois fois 10 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluant EP/AE : (7/3), puis (5/5). Le produit est obtenu sous forme d'huile jaune, avec une masse $m = 293$ mg, soit un rendement de 83 %.

C₃₃H₄₈N₄O₁₀SSi

720,91 g/mol

CCM : R_f = 0,3 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

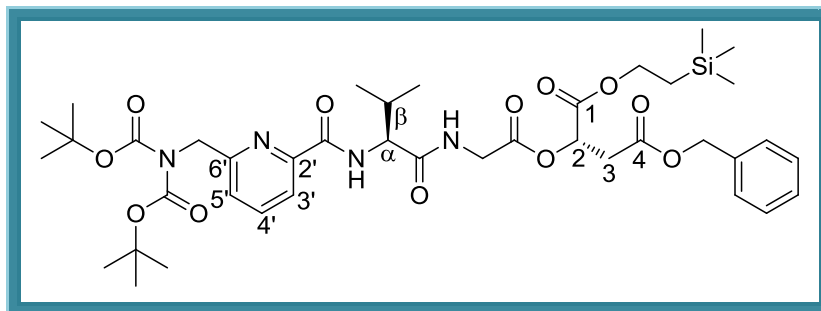
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 743,2750 pour [M+Na]⁺, calculé à 743,2758 pour C₃₃H₄₈N₄O₁₀NaSiS.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3312($\bar{\nu}_{N-H}$); 2959($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1743($\bar{\nu}_{C=O}$); 1648($\bar{\nu}_{C=O}$); 1536($\bar{\nu}_{C=C}$); 1248($\bar{\nu}_{(CH_3)_3C}$); 1167($\bar{\nu}_{(CH_3)_2CH}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,02 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,85-0,99 (m, 2H, CH₂Si); 1,00-1,05 (m, 6H, CH₃ Val); 1,48 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,28-2,34 (m, 1H, H _{β} Val); 2,93 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H₃); 4,04-4,24 (m, 4H, CH₂ Gly, CH₂O); 4,44 (dd, 1H, $J = 9,0$ Hz, $J = 6,6$ Hz, H _{α} Val); 4,55-4,62 (m, 2H, CH₂N); 5,16 (d, 2H, $J = 3,4$ Hz, CH₂Ph); 5,24 (s, 1H, NH_{carbamate}); 5,53 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, H₂); 6,45 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz, NH Gly); 7,36 (s, 5H, H_{ar}); 7,74 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, NH Val); 8,04 (s, 1H, CH=).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,6 (Si(CH₃)₃); 17,2 (CH₂Si); 18,1 (CH₃ Val); 19,3 (CH₃ Val); 28,3 (C(CH₃)₃); 31,0 (C _{β} Val); 36,0 (C₃); 40,9 (CH₂ Gly); 42,2 (CH₂N); 58,4 (C _{α} Val); 64,6 (CH₂O); 67,0 (CH₂Ph); 69,0 (C₂); 80,4 (C_q); 124,2 (CH=); 128,4 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 135,3 (C_q); 149,0 (C_q_{thiazole}); 155,6 (CO_{carbamate}); 161,1 (CO_{thiazole}); 168,2 (C₁); 168,6 (C₄); 168,6 (CO Gly); 169,4 (CN); 171,2 (CO Val).

(S)-4-benzyl 1-(2-(triméthylsilyl)éthyl) 2-(2-((S)-2-(6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)picolinamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)succinate (64)



Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 319 mg (1,53 éq., 0,91 mmol) du composé **37** sont dissous dans 13 mL de DCM anhydre. 240 μ L (3 éq., 1,78 mmol) de 2,4,6-collidine (incolore) sont ajoutés à la solution incolore qui devient jaune. 675 mg (3 éq., 1,78 mmol) de HBTU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, 13 mL d'une solution de 285 mg (1 éq., 0,59 mmol) du composé **61** dissous dans du DCM sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après cinq jours, le milieu réactionnel est lavé par plusieurs solutions : 10 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 10 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (8/2), puis (7/3). Le produit est obtenu sous forme d'huile jaune, avec une masse $m = 432$ mg, soit un rendement de 89 %.

C₄₀H₅₈N₄O₁₂Si

814,99 g/mol

CCM : R_f = 0,5 (EP/AE 1/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

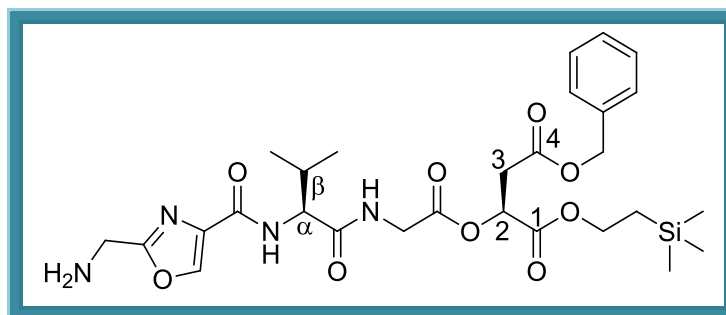
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 837,3713 pour [M+Na]⁺, calculé à 837,3718 pour C₄₀H₅₈N₄O₁₂Na.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3374($\bar{\nu}_{N-H}$); 2959($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1746($\bar{\nu}_{C=O}$); 1680 et 1662($\bar{\nu}_{C=O\text{carbamate}}$); 1519($\bar{\nu}_{C=C}$); 1366(δ_{N-H}); 1248 et 1226($\bar{\nu}_{(CH_3)_3C}$); 1167($\bar{\nu}_{(CH_3)_2CH}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,02 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,93-0,99 (m, 2H, CH₂Si); 1,03 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 1,05 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 1,43 (s, 18H, C(CH₃)₃); 2,35-2,42 (m, 1H, H _{β} Val); 2,94 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H₃); 3,98-4,23 (m, 4H, CH₂ Gly, CH₂O); 4,42 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 6,7$ Hz, H _{α} Val); 4,97 (s, 2H, CH₂N); 5,16 (d, 2H, $J = 3,4$ Hz, CH₂Ph); 5,52 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, H₂); 6,51 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz, NH Gly); 7,34 (m, 6H, H_{5'}, H_{ar}); 7,83 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 5,8$ Hz, H_{4'}); 8,06 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, H_{3'}); 8,44 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, NH Val).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,6 (Si(CH₃)₃); 17,3 (CH₂Si); 18,0 (CH₃ Val); 19,5 (CH₃ Val); 28,0 (C(CH₃)₃); 29,7 (CH₂N); 30,4 (C _{β} Val); 36,0 (C₃); 40,9 (CH₂ Gly); 58,9 (C _{α} Val); 64,6 (CH₂O); 67,0 (CH₂Ph); 69,1 (C₂); 82,9 (C_q); 120,7 (C_{3'}); 123,0 (C_{5'}); 128,5 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 135,3 (C_q); 138,0 (C_{4'}); 148,4 (C_{2'}); 152,4 (CO_{carbamate}); 157,3 (C₆); 164,6 (CO_{pyridine}); 168,3 (C₁); 168,7 (CO Gly); 168,7 (C₄); 171,0 (CO Val).

(S)-4-benzyl 1-(2-(triméthylsilyl)éthyl) 2-(2-((S)-2-(2-(aminométhyl)oxazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)succinate (65)



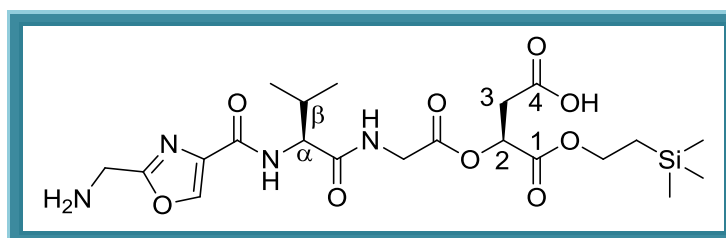
Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 435 mg (0,62 mmol) du composé **62** sont dissous dans 8 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 1,6 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 1 h 30. Une solution de NaHCO₃ (5 %) est ajoutée au goutte-à-goutte jusqu'à pH 9-10. Le produit est extrait du milieu avec du DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. L'amine est obtenue sous forme d'huile brune, avec une masse $m = 312$ mg, soit un rendement de 83 %.

C₂₈H₄₀N₄O₉Si

604,72 g/mol

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,03 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,94-1,04 (m, 8H, CH₂Si, CH₃ Val); 2,25-2,35 (m, 1H, H _{β} Val); 2,94 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H₃); 3,92-4,02 (m, 2H, CH₂N); 4,06-4,24 (m, 4H, CH₂ Gly, CH₂O); 4,42 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 6,7$ Hz, H _{α} Val); 5,16 (d, 2H, $J = 3,4$ Hz, CH₂Ph); 5,53 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, H₂); 6,39 (t, 1H, $J = 3,0$ Hz, NH Gly); 7,25-7,42 (m, 6H, NH Val, H_{ar}); 8,14 (s, 1H, CH=).

Acide (S)-3-(2-((S)-2-(2-(aminométhyl)oxazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-oxo-4-(2-(triméthylsilyl)éthoxy)butanoïque (67)



Dans un ballon de 50 mL, 312 mg (0,52 mmol) de composé **65** sont dissous dans 28 mL de méthanol. 66 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 2 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 236$ mg, soit un rendement de 88 %.

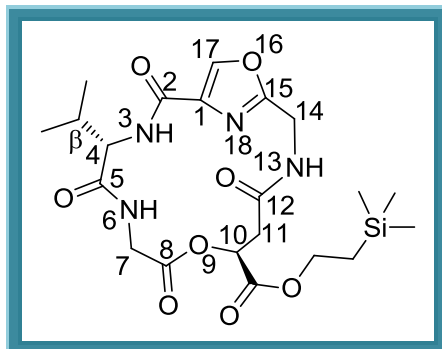
C₂₁H₃₄N₄O₉Si

514,21 g/mol

RMN¹H (CD₃OD, 300MHz) δ (ppm) : 0,04 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,97-1,04 (m, 8H, CH₂Si, CH₃ Val); 2,15-2,22 (m, 1H, H _{β} Val); 2,65 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, H₃); 3,97-4,22 (m, 6H, CH₂

Gly, CH₂O, CH₂N); 4,46 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, H_α Val); 5,32-5,39 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 4,3$ Hz, H₂); 8,37 (s, 1H, CH=).

(4S,10S)-4-isopropyl-2,5,8,12-tétraoxo-9,16-dioxa-3,6,13,18-tétrazabicyclo[13.2.1]octadéca-1(17),15(18)-diène-10-carboxylate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (69)



Dans un ballon de 500 mL, 94 mg (1,5 éq., 0,69 mmol) de HOAt et 262 mg (1,5 éq., 0,69 mmol) de HATU sont dissous sous diazote dans 375 mL d'acétonitrile distillé deux fois sur P₂O₅. 100 mL d'une solution de 236 mg (0,46 mmol) du composé **67** et 230 µL (3 éq., 1,38 mmol) de DIPEA dans l'acétonitrile distillé deux fois sur P₂O₅ et DMF anhydre (9/1, v/v) sont ajoutés au goutte-à-goutte (40 mL/h). Après sept jours, l'acétonitrile est évaporé, le résidu est repris avec 10 mL de toluène et évaporé (trois fois). Le solide est dissous dans 30 mL d'AE et lavé par plusieurs solutions : deux fois 30 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 30 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %) et 30 mL d'une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluateurs EP/AE : (1/1), puis seulement acétate d'éthyle. Le produit est obtenu sous forme d'huile, avec une masse $m = 124$ mg, soit un rendement de 54 %.

C₂₁H₃₂N₄O₈Si

496,59 g/mol

$T_{\text{fusion}} = 109^{\circ}\text{C}$

CCM : R_f = 0,5 (AE) (révélateur : vanilline (tache orange difficile à voir))

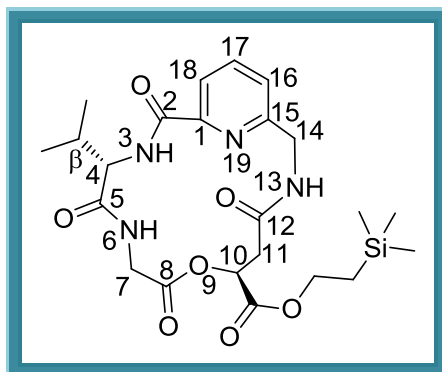
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 519,1878 pour [M+Na]⁺, calculé à 519,1887 pour C₂₁H₃₂N₄O₈NaSi.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3323($\bar{\nu}_{\text{N-H}}$); 2953($\bar{\nu}_{\text{CH}_3}$); 1746($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$); 1665($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$ et $\bar{\nu}_{\text{C=N}}$); 1595($\bar{\nu}_{\text{C=C}}$); 1519($\delta_{\text{N-H}}$); 1248($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_3\text{C}}$); 1206($\bar{\nu}_{(\text{CH}_3)_2\text{CH}}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,06 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,91 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃); 1,01-1,09 (m, 5H, CH₃, CH₂Si); 2,65-2,76 (m, 1H, H_β Val); 2,88 (dd, 1H, $J = 17,2$ Hz, $J = 3,8$ Hz, H₁₁); 3,41 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz, $J = 3,8$ Hz, H₁₁); 3,95 (dd, 1H, $J = 18,5$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H₇); 4,18-4,37 (m, 3H, H₁₄, CH₂O); 4,68-4,86 (m, 3H, H_α Val, H₇, H₁₄); 5,51 (t, 1H, $J = 3,7$ Hz, H₁₀); 6,62 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz, H₁₃); 7,11 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H₆); 7,38 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H₃); 8,19 (s, 1H, H₁₇).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,6 (Si(CH₃)₃); 16,4 (CH₃); 17,1 (CH₂Si); 19,5 (CH₃); 29,6 (C _{β} Val); 36,1 (C₁₁); 37,4 (C₁₄); 42,1 (C₇); 57,1 (C _{α} Val); 64,5 (CH₂O); 68,7 (C₁₀); 135,3 (C₁); 141,1 (C₁₇); 160,0 (C₂); 161,1 (C₁₅); 167,1 (C₈); 168,1 (CO); 169,0 (C₁₂); 170,4 (C₅).

(4S,10S)-4-isopropyl-2,5,8,12-tétraoxo-9-oxa-3,6,13,19-tétraazabicyclo[13.3.1]octadéca-1(18),16(17),15(19)-triène-10-carboxylate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (70)



Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 129 mg (0,16 mmol) du composé **64** sont dissous dans 2,5 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 0,5 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 1 h 30. Une solution de NaHCO₃ (5 %) est ajoutée au goutte-à-goutte jusqu'à pH 9-10. Le produit est extrait du milieu avec du DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. L'amine **66** est obtenue sous forme d'huile brune, avec une masse $m = 73$ mg, soit un rendement de 75 %.

Dans un ballon de 10 mL, 73 mg du composé précédent sont dissous dans 2,5 mL de méthanol. 15 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 2 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé **68** est obtenu avec une masse $m = 61$ mg, soit un rendement de 98 %.

Dans un ballon de 250 mL, 24 mg (1,5 éq., 0,17 mmol) de HOAt et 66 mg (1,5 éq., 0,17 mmol) de HATU sont dissous sous diazote dans 95 mL d'acétonitrile anhydre. 27,5 mL d'une solution de 61 mg (0,12 mmol) du composé précédent dissous au préalable dans 2,5 mL de DMF anhydre avec 59 μ L (3 éq., 0,35 mmol) de DIPEA dans l'acétonitrile anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après cinq jours, l'acétonitrile est évaporé, le résidu est repris avec 10 mL de toluène et évaporé (trois fois). Le solide est dissous dans 10 mL de DCM et lavé par plusieurs solutions : deux fois 10 mL d'une solution d'HCl (0,5 M), 20 mL d'une solution de NaHCO₃ (5 %) et 10 mL d'une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants EP/AE : (1/1), puis seulement acétate d'éthyle. Le produit est obtenu sous forme d'huile, avec une masse $m = 4$ mg, soit un rendement de 6 %.

C₂₃H₃₄N₄O₇Si

506,62 g/mol

CCM : R_f = 0,55 (AE) (révélateur : vanilline (tache orange difficile à voir))

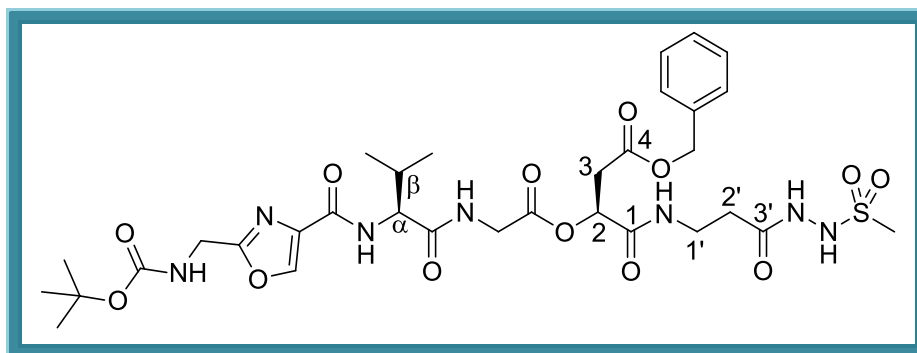
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 529,2101 pour $[M+Na]^+$, calculé à 529,2094 pour $C_{23}H_{34}N_4O_7NaSi$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) : 3340($\bar{\nu}_{N-H}$); 2920($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1740($\bar{\nu}_{C=O}$); 1656($\bar{\nu}_{C=O}$); 1656($\bar{\nu}_{C=N}$); 1528(δ_{N-H}); 1248($\bar{\nu}_{(CH_3)_3C}$).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz) δ (ppm) : 0,01 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,87-0,99 (m, 8H, CH₃ Val, CH₂Si); 2,69-2,76 (m, 2H, H _{β} Val, H₁₁); 3,23 (dd, 1H, $J = 16,4$ Hz, $J = 4,4$ Hz, H₁₁); 3,76 (dd, 1H, $J = 17,8$ Hz, $J = 3,0$ Hz, H₇); 4,18-4,24 (m, 2H, CH₂O); 4,48 (dd, 1H, $J = 16,8$ Hz, $J = 5,8$ Hz, H₁₄); 4,66-4,82 (m, 3H, H _{α} Val, H₇, H₁₄); 5,33 (t, 1H, $J = 4,0$ Hz, H₁₀); 6,32 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, H₁₃); 6,96-6,99 (m, 1H, H₆); 7,36 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_{ar}); 7,85 (dd, 1H, $J = 7,7$ Hz, $J = 7,7$ Hz, H₁₇); 8,05 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H_{ar}); 8,50 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H₃).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : -1,8 (Si(CH₃)₃); 16,3 (CH₃); 16,9 (CH₂Si); 19,3 (CH₃); 31,2 (C _{β} Val); 36,7 (C₇); 41,3 (C₁₁); 43,6 (C₁₄); 57,0 (C _{α} Val); 64,2 (CH₂O); 68,7 (C₁₀); 120,7 (CH_{ar}); 124,2 (CH_{ar}); 138,3 (CH_{ar}); 148,0 (C_q); 155,2 (C_q); 163,9 (CO); 167,4 (CO); 167,6 (CO); 168,1 (CO); 170,5 (CO).

(S)-3-(2-((S)-2-(2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)oxazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-((3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)amino)-4-oxobutanoate de benzyle (75)



Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 150 mg (1 éq., 0,21 mmol) du composé **62** sont dissous dans 1 mL de THF. 213 μ L (1 éq., 0,21 mmol) d'une solution de TBAF dans du THF à 1 M sont ajoutés à la solution au goutte-à-goutte. Après 30 min, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans 5 mL d'AE et lavé avec 5 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporé. Le produit est obtenu avec une masse $m = 128$ mg, soit un rendement quantitatif.

Le composé est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 128 mg (0,21 mmol) du composé précédent sont dissous dans 1 mL de DMF anhydre. 35 μ L (1 éq., 0,21 mmol) de DIPEA et 119 mg (1,5 éq., 0,31 mmol) de HATU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, une solution de 77 mg (2 éq., 0,42 mmol) du composé **46** et 70 μ L (2 éq., 0,42 mmol) de DIPEA dans 1 mL de DMF anhydre sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après 24 h, le solvant est évaporé. Le produit est purifié en deux fois par des plaques préparatives de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (9/1), puis (95/5). Le

produit est obtenu sous forme de solide marron, avec une masse $m = 41$ mg, soit un rendement de 25 %.

$C_{32}H_{45}N_7O_{13}S$

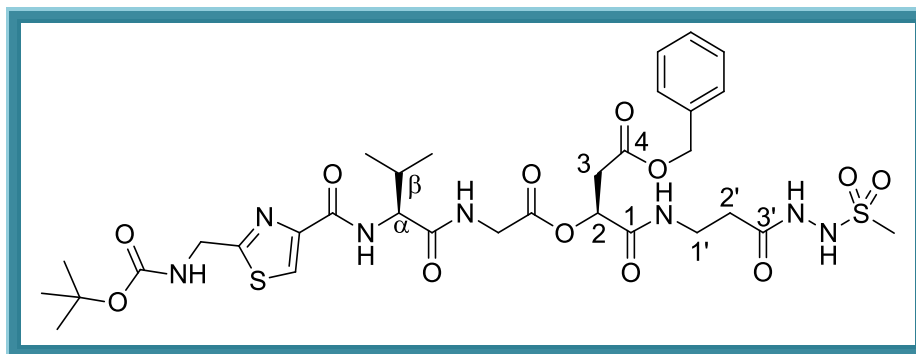
767,80 g/mol

CCM : $R_f = 0,66$ (DCM/MeOH 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 0,91 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,00-2,09 (m, 1H, H _{β} Val); 2,26-2,33 (m, 2H, H_{2'}); 2,71-2,94 (m, 2H, H₃); 2,90 (s, 3H, SCH₃); 3,25-3,29 (m, 2H, H_{1'}); 3,95 (dd, 1H, $J = 5,4$ Hz, $J = 3,5$ Hz, CH₂ Gly); 4,27 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, CH₂N); 4,40 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J = 7,1$ Hz, H _{α} Val); 5,11 (s, 2H, CH₂Ph); 5,28 (dd, 1H, $J = 9,1$ Hz, $J = 4,2$ Hz, H₂); 7,30-7,41 (m, 6H, NH, H_{ar}); 7,57 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, NH_{carbamate}); 7,64 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, NH Val); 8,24 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 8,60 (s, 1H, CH=); 8,71 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz, NH Gly); 9,38 (ls, 1H, NH), 10,14 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 18,3 (CH₃ Val); 19,2 (CH₃ Val); 28,3 (C(CH₃)₃); 30,7 (C _{β} Val); 33,7 (C_{2'}); 35,5 (C_{1'}); 36,2 (C₃); 37,7 (CH₂N); 39,2 (SCH₃); 41,7 (CH₂ Gly); 58,6 (C _{α} Val); 66,8 (CH₂Ph); 70,5 (C₂); 80,3 (Cq); 128,2 (CH_{ar}); 128,3 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 135,3 (Cq); 142,2 (CH=); 155,8 (CO_{carbamate}); 161,3 (CO_{oxazole}); 161,8 (Cq); 161,8 (CN); 168,7 (CO Gly); 169,5 (C₁); 169,5 (C₄); 171,8 (C_{3'}); 172,9 (CO Val).

(S)-benzyl 3-(2-((S)-2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)thiazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-((3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)amino)-4-oxobutanoate (76)



Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 56 mg (1 éq., 0,08 mmol) du composé **63** sont dissous dans 1 mL de THF. 8 μ L (1 éq., 0,08 mmol) d'une solution de TBAF dans du THF à 1 M sont ajoutés à la solution au goutte-à-goutte. Après 30 min, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans 5 mL d'AE et lavé avec 5 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu avec une masse $m = 41$ mg, soit un rendement 85 %.

Le produit est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 41 mg (1 éq., 0,07 mmol) du composé précédent sont dissous dans 0,5 mL de DMF anhydre. 11 μ L (1 éq., 0,07 mmol) de DIPEA et 37 mg (1,5 éq., 0,10 mmol) de HATU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, une solution de 28 mg (2,3 éq., 0,154 mmol) du

composé **46** et 22 μL (2 eq. , 0,13 mmol) de DIPEA dans 0,5 mL de DMF anhydre sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après 24 h, le solvant est évaporé. Le produit est purifié en deux fois par des plaques préparatives de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (9/1), puis (95/5). Le produit est obtenu sous forme de huile, avec une masse $m = 20 \text{ mg}$, soit un rendement de 38 %.

$\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{S}_2$

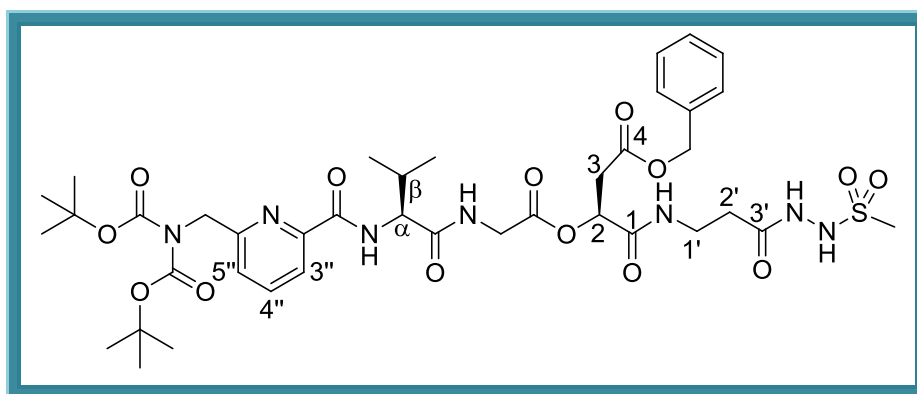
783,87 g/mol

CCM : $R_f = 0,68$ (DCM/MeOH 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm) : 1,02 (d, 3H, $J = 6,5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3 \text{ Val}$); 1,02 (d, 3H, $J = 6,5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3 \text{ Val}$); 1,47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2,24-2,30 (m, 1H, $\text{H}_\beta \text{ Val}$); 2,49 (t, 2H, $J = 6,0 \text{ Hz}$, H_2); 2,85-3,03 (m, 2H, H_3); 3,01 (s, 3H, SCH_3); 3,51-3,60 (m, 2H, $\text{H}_{1'}$); 3,90 (t, 2H, $J = 6,0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2 \text{ Gly}$); 4,41 (t, 1H, $J = 8,3 \text{ Hz}$, $\text{H}_\alpha \text{ Val}$); 4,52 (d, 2H, $J = 6,3 \text{ Hz}$, CH_2N); 5,06 (d, 2H, $J = 4,0 \text{ Hz}$, CH_2Ph); 5,46-5,55 (m, 1H, H_2); 5,68 (t, 1H, $J = 6,4 \text{ Hz}$, $\text{NH}_{\text{carbamate}}$); 7,27-7,36 (m, 6H, NH , H_{ar}); 7,56 (s, 1H, NH Gly); 7,87 (d, 1H, $J = 8,3 \text{ Hz}$, NH Val); 7,93 (s, 1H, NH); 8,13 (s, 1H, CH=); 9,47 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm) : 18,4 ($\text{CH}_3 \text{ Val}$); 19,4 ($\text{CH}_3 \text{ Val}$); 28,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 30,5 ($\text{C}_\beta \text{ Val}$); 33,9 (C_2); 35,6 ($\text{C}_{1'}$); 36,3 (C_3); 39,4 (SCH_3); 41,7 ($\text{CH}_2 \text{ Gly}$); 42,2 (CH_2N); 59,2 ($\text{C}_\alpha \text{ Val}$); 66,8 (CH_2Ph); 70,5 (C_2); 80,6 (C_q); 124,7 (CH=); 128,3 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 128,6 (CH_{ar}); 135,3 (C_q); 148,5 (C_q); 155,9 ($\text{CO}_{\text{carbamate}}$); 161,6 ($\text{CO}_{\text{thiazole}}$); 168,5 (CO Gly); 169,6 (C_1); 169,6 (C_4); 170,5 (CN); 171,6 (C_3); 173,1 (CO Val).

(S)-benzyl 3-(2-((S)-2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)thiazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-((3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)amino)-4-oxobutanoate (77)



Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 37 mg (1 eq. , 0,045 mmol) du composé **64** sont dissous dans 0,5 mL de THF. 45 μL (1 eq. , 0,045 mmol) d'une solution de TBAF dans du THF à 1 M sont ajoutés à la solution au goutte-à-goutte. Après 30 min, le THF est évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 32 mg (1 eq. , 0,045 mmol) du composé précédent sont dissous dans 0,5 mL de DMF anhydre. 26 mg (1,5 eq. , 0,068 mmol) de HATU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, une

solution de 26 mg (3,15 éq., 0,142 mmol) du composé **46** et 23 μL (3 éq., 0,135 mmol) de DIPEA dans 0,5 mL de DMF anhydre sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après 24 h, le solvant est évaporé. Le produit est purifié en deux fois par des plaques préparatives de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (9/1), puis (95/5). Le produit est obtenu sous forme de huile, avec une masse $m = 4,5$ mg, soit un rendement de 12 %.

$\text{C}_{39}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{S}$

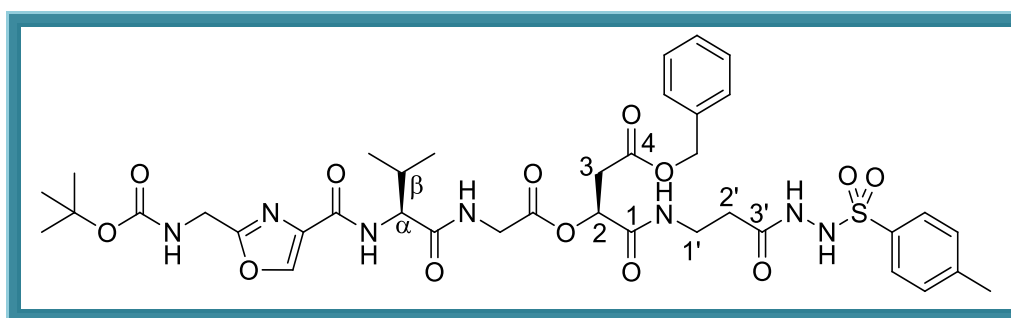
877,96 g/mol

CCM : $R_f = 0,25$ (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

RMN¹H (DMSO-d₆, 600MHz) δ (ppm) : 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 0,94 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 1,36 (s, 18H, C(CH₃)₃); 2,09-2,14 (m, 1H, H _{β} Val); 2,31 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H_{2'}); 2,76 (dd, 1H, $J = 16,5$ Hz, $J = 8,9$ Hz, H₃); 2,88-2,92 (m, 4H, SCH₃, H₃); 3,26-3,31 (m, 2H, H_{1'}); 3,95 (t, 2H, $J = 5,5$ Hz, CH₂ Gly); 4,48 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 6,2$ Hz, H _{α} Val); 4,86 (d, 1H, $J = 16,9$ Hz, CH₂N); 4,92 (d, 1H, $J = 16,9$ Hz, CH₂N); 5,11 (s, 2H, CH₂Ph); 5,30 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 4,2$ Hz, H₂); 7,35-7,38 (m, 5H, H_{ar}); 7,47 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_{3''}); 7,94 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_{5''}); 8,01 (dd, 1H, $J = 7,7$ Hz, $J = 7,7$ Hz, H_{4''}); 8,24 (t, 1H, $J = 5,7$ Hz, NH); 8,29 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz, NH Val); 8,68 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz, NH Gly); 9,36 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, NH); 10,13 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 150MHz) δ (ppm) : 18,2 (CH₃ Val); 19,6 (CH₃ Val); 28,0 (C(CH₃)₃); 31,7 (C _{β} Val); 33,3 (C_{2'}); 35,5 (C_{1'}); 36,8 (C₃); 40,4 (SCH₃); 40,8 (CH₂ Gly); 50,5 (CH₂N); 57,5 (C _{α} Val); 66,4 (CH₂Ph); 70,5 (C₂); 82,5 (C_q); 120,7 (C_{5''}); 124,0 (C_{3''}); 128,4 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 128,8 (CH_{ar}); 136,3 (C_q); 139,1 (C_{4''}); 151,6 (C_{6''}); 155,1 (CO_{carbamate}); 160,1 (C_{2''}); 166,4 (CO_{pyridine}); 171,0 (C₁); 172,3 (CO Gly); 172,3 (C₄); 173,1 (C_{3'}); 174,2 (CO Val).

(S)-3-(2-((S)-2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)oxazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-oxo-4-((3-oxo-3-(2-tosylhydrazinyl)propyl)amino)butanoate de benzyle (78)



En parallèle, dans un ballon de 10 mL sous diazote, 512 mg (1 éq., 0,73 mmol) du composé **62** sont dissous dans 1 mL de THF. 730 μL (1 éq., 0,73 mmol) d'une solution de TBAF dans du THF à 1 M sont ajoutés à la solution au goutte-à-goutte. Après 30 min, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans 5 mL d'AE et lavé avec 5 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu avec une masse $m = 439$ mg, soit un rendement quantitatif.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 439 mg (0,73 mmol) du produit sont dissous dans 2,5 mL de DMF anhydre. 185 μL (1,5 éq., 1,09 mmol) de DIPEA et 415 mg (1,5 éq., 1,09

mmol) de HATU sont ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, une solution de 187 mg (1 éq., 0,73 mmol) du produit **57** dissous dans 2,5 mL de DMF anhydre sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après six jours, le solvant est évaporé. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (98/2), puis (95/5). Le produit est ensuite purifié par plaque préparative de silice avec un mélange d'éluants DCM/méthanol : (98/2). Le produit est obtenu avec une masse $m = 26$ mg, soit un rendement de 4 %.

$C_{38}H_{49}N_7O_{13}S$

843,90 g/mol

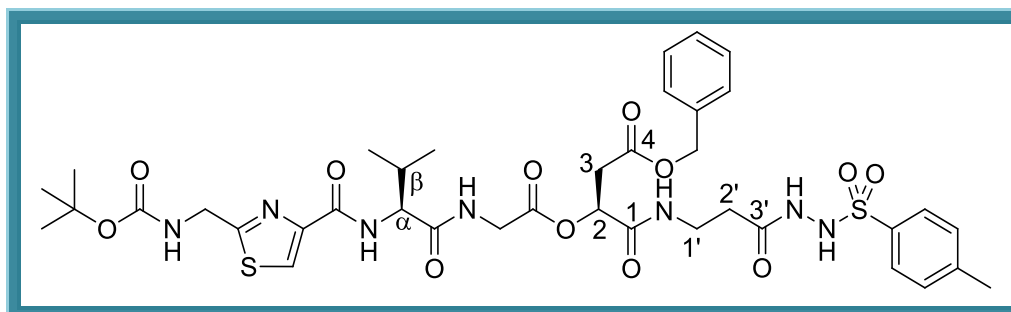
CCM : $R_f = 0,66$ (DCM/MeOH 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 866,2999 pour $[M+Na]^+$, calculé à 866,3007 pour $C_{38}H_{49}N_7O_{13}NaS$.

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 0,85-0,88 (m, 3H, CH₃ Val); 0,90-0,92 (m, 3H, CH₃ Val); 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,04-2,09 (m, 1H, H _{β} Val); 2,29 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H₂); 2,37 (s, 3H, CH₃); 2,73 (dd, 1H, $J = 16,3$ Hz, $J = 8,6$ Hz, H₃); 2,88 (dd, 1H, $J = 16,7$ Hz, $J = 3,8$ Hz, H₃); 3,06-3,10 (m, 2H, H₁); 3,91-4,00 (m, 2H, CH₂ Gly); 4,28 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz, CH₂N); 4,40-4,42 (m, 1H, H _{α} Val); 5,11 (s, 2H, CH₂Ph); 5,26 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 4,2$ Hz, H₂); 7,33-7,39 (m, 7H, H_{ar}); 7,57 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH_{carbamate}); 7,60-7,68 (m, 3H, NH Val, H_{ar}); 8,11 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 8,60 (s, 1H, CH=); 8,67-8,73 (m, 1H, NH Gly); 9,69 (s, 1H, NH), 10,03 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 17,9 (CH₃ Val); 19,1 (CH₃ Val); 21,1 (CH₃); 28,1 (C(CH₃)₃); 31,2 (C _{β} Val); 32,8 (C_{2'}); 35,0 (C_{1'}); 36,4 (C₃); 37,3 (CH₂N); 40,4 (CH₂ Gly); 56,9 (C _{α} Val); 65,9 (CH₂Ph); 70,0 (C₂); 78,6 (C_q); 127,6 (CH_{ar}); 127,6 (CH_{ar}); 128,1 (CH_{ar}); 128,1 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 128,4 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 129,4 (C_q); 135,8 (C_q); 143,2 (C_q); 143,2 (CH=); 155,6 (CO_{carbamate}); 162,0 (CO_{oxazole}); 162,0 (CN); 162,0 (C_q); 167,6 (C₁); 168,8 (CO Gly); 168,8 (C₄); 168,8 (C_{3'}); 171,1 (CO Val).

(S)-3-(2-((S)-2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)thiazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-oxo-4-((3-oxo-3-(2-tosylhydrazinyl)propyl)amino)butanoate de benzyle (79)



Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 308 mg (1 éq., 0,43 mmol) du composé **63** sont dissous dans 2 mL de THF. 427 μ L (1 éq., 0,43 mmol) d'une solution de TBAF dans du THF à 1 M sont ajoutés à la solution au goutte-à-goutte. Après 30 min, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans 5 mL d'AE et lavé avec 5 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). La phase

organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le produit est obtenu avec une masse $m = 251$ mg, soit un rendement de 94%.

Le composé est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 251 mg (0,40 mmol) du composé précédent sont dissous dans 1 mL de DMF anhydre. 230 mg (1,5 éq., 0,61 mmol) de HATU et 70 μL (1 éq., 0,40 mmol) de DIPEA sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, la solution préparée est ajoutée goutte-à-goutte à une solution de 131 mg (1,26 éq., 0,51 mmol) du composé **57** dissous dans 1 mL de DMF anhydre.

Après dix jours, le solvant est évaporé. Le produit est purifié sur colonne chromatographique de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (98/2), puis (95/5). Le produit est ensuite purifié par plaque préparative de silice avec un mélange d'éluants DCM/méthanol : (98/2). Le produit est obtenu avec une masse $m = 64$ mg, soit un rendement de 18 %.

$\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{S}_2$

859,97 g/mol

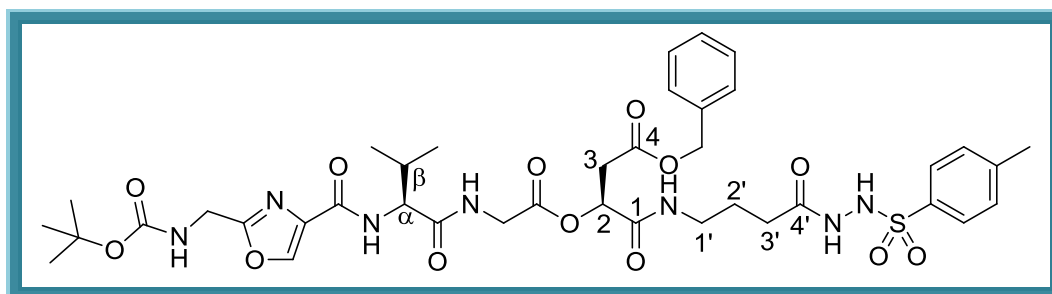
CCM : $R_f = 0,39$ (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 882,2770 pour $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculé à 882,2778 pour $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{NaS}_2$.

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 0,87 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3 Val); 0,92 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3 Val); 1,41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2,02-2,10 (m, 1H, H_β Val); 2,15 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H_2); 2,36 (s, 3H, CH_3); 2,68-2,77 (m, 1H, H_3); 2,88 (dd, 1H, $J = 16,5$ Hz, $J = 4,1$ Hz, H_3); 3,03-3,10 (m, 2H, H_1); 3,95 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz, CH_2 Gly); 4,40-4,46 (m, 3H, CH_2N , H_α Val); 5,10 (s, 2H, CH_2Ph); 5,25 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 4,1$ Hz, H_2); 7,31-7,39 (m, 7H, H_{ar}); 7,66 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, H_{ar}); 7,84-7,89 (m, 2H, NH Val, $\text{NH}_{\text{carbamate}}$); 8,12 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH); 8,20 (s, 1H, $\text{CH}=\text{}$); 8,73 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz, NH Gly); 9,70 (s, 1H, NH), 10,04 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm) : 18,1 (CH_3 Val); 19,2 (CH_3 Val); 21,1 (CH_3); 28,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 31,4 (C_β Val); 32,8 (C_2); 35,1 (C_1); 36,4 (C_3); 40,5 (CH_2 Gly); 42,0 (CH_2N); 57,2 (C_α Val); 66,0 (CH_2Ph); 70,1 (C_2); 78,8 (Cq); 124,4 ($\text{CH}=\text{}$); 127,7 (CH_{ar}); 127,7 (CH_{ar}); 128,0 (CH_{ar}); 128,0 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 135,9 (Cq); 136,0 (Cq); 143,3 (Cq); 148,8 (Cq); 155,8 ($\text{CO}_{\text{carbamate}}$); 159,9 ($\text{CO}_{\text{thiazole}}$); 167,6 (C_1); 168,8 (CO Gly); 168,9 (C_3); 169,1 (C_4); 171,2 (CO Val); 172,1 (CN).

(S)-3-(2-((S)-2-(2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)oxazole-4-carboxamido)-3-méthylbutanamido)acétoxy)-4-oxo-4-((4-oxo-4-(2-tosylhydrazinyl)butyl)amino)butanoate de benzyle (81)



Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 273 mg (1 éq., 0,39 mmol) du composé **62** sont dissous dans 2 mL de THF. 680 μ L (1,76 éq., 0,68 mmol) d'une solution de TBAF dans du THF à 1 M sont ajoutés à la solution au goutte-à-goutte. Après 30 min, le THF est évaporé. Le résidu est repris dans 5 mL d'AE et lavé avec 5 mL d'une solution d'HCl (0,5 M). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le produit est obtenu avec une masse $m = 234$ mg, soit un rendement quantitatif.

Le composé est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 234 mg (0,39 mmol) du composé précédent sont dissous dans 1 mL de DMF anhydre. 221 mg (1,5 éq., 0,58 mmol) de HATU et. 66 μ L (1 éq., 0,39 mmol) de DIPEA sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 min, une solution de 193 mg (1,8 éq., 0,71 mmol) du composé **59** dissous dans 1,5 mL de DMF anhydre sont additionnés goutte-à-goutte au milieu.

Après trois jours, le solvant est évaporé. Le produit est purifié en deux fois par des plaques préparatives de silice avec un gradient d'éluants DCM/méthanol : (9/1), puis (95/5). Le produit est obtenu sous forme de solide marron, avec une masse $m = 185$ mg, soit un rendement de 55 %.

$\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}$

857,93 g/mol

CCM : $R_f = 0,17$ (DCM/MeOH 95/5 (v/v)) (révélateur : vanilline)

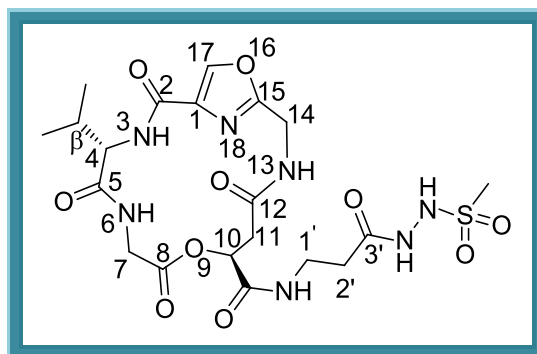
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 880,3170 pour $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculé à 880,3163 pour $\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{NaS}$.

RMN¹H (DMSO- d_6 , 300MHz) δ (ppm) : 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3 Val); 0,91 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3 Val); 1,38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,47-1,43 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$); 1,95 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{H}_{3'}$); 2,03-2,09 (m, 1H, H_β Val); 2,35 (s, 3H, CH_3); 2,71-2,80 (m, 1H, H_3); 2,88-2,95 (m, 3H, H_3 , $\text{H}_{1'}$); 3,95 (d, 2H, $J = 6,5$ Hz, CH_2 Gly); 4,27 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz, CH_2N); 4,40 (dd, 1H, $J = 9,1$ Hz, $J = 6,8$ Hz, H_α Val); 5,11 (s, 2H, CH_2Ph); 5,27 (dd, 1H, $J = 8,9$ Hz, $J = 4,2$ Hz, H_2); 7,31-7,41 (m, 7H, H_{ar}); 7,57 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, $\text{NH}_{\text{carbamate}}$); 7,62-7,67 (m, 3H, H_{ar} , NH Val); 8,06 (t, 1H, $J = 5,7$ Hz, NH); 8,60 (s, 1H, $\text{CH}=\text{}$); 8,72 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH Gly); 9,68 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, NH); 9,96 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO- d_6 , 75MHz) δ (ppm) : 18,1 (CH_3 Val); 19,1 (CH_3 Val); 21,1 (CH_3); 24,8 ($\text{C}_{2'}$); 28,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 30,4 ($\text{C}_{3'}$); 31,2 (C_β Val); 36,5 (C_3); 37,4 (CH_2N); 38,1 ($\text{C}_{1'}$); 40,5 (CH_2

Gly); 56,8 (C_{α} Val); 66,0 (CH_2Ph); 70,2 (C_2); 78,6 (Cq); 127,7 (CH_{ar}); 127,7 (CH_{ar}); 128,0 (CH_{ar}); 128,0 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 128,5 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 129,3 (CH_{ar}); 135,3 (Cq); 135,9 (Cq); 142,1 ($CH=$); 143,2 (Cq); 155,7 ($CO_{carbamate}$); 159,4 ($CO_{oxazole}$); 162,1 (Cq); 162,1 (CN); 167,5 (C_1); 168,9 (CO Gly); 169,1 (C_4); 170,5 (C_4'); 171,3 (CO Val).

(4S,10S)-4-isopropyl-N-(3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)-2,5,8,12-tétraoxo-9,16-dioxa-3,6,13,18-tétraazabicyclo[13.2.1]octadéca-1(17),15(18)-diène-10-carboxamide (82)



Dans un ballon de 10 mL, 70 mg (0,091 mmol) du composé **75** sont dissous dans 1 mL de méthanol. 40 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 20 min, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 54$ mg, soit un rendement de 87 %.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 54 mg (0,080 mmol) du composé précédent sont dissous dans 3 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 1 mL de TFA est ajouté au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 1 h 30. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 46 mg (1 éq., 0,080 mmol) du composé précédent sont dissous dans 80 mL de DMF anhydre. 55 μ L (4 éq., 0,320 mmol) de DIPEA et 17 mg (1,5 éq., 0,120 mmol) de HOAt sont additionnés. Une solution de 46 mg (1,5 éq., 0,120 mmol) de HATU dans 20 mL de DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 10 jours, le DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme d'huile, avec une masse $m = 5,6$ mg, soit un rendement de 12 %.

$C_{20}H_{29}N_7O_{10}S$

559,55 g/mol

CLHP : $t_R = 8$ min 33 s

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 582,1604 pour $[M+Na]^+$, calculé à 582,1594 pour $C_{20}H_{29}N_7O_{10}Na$.

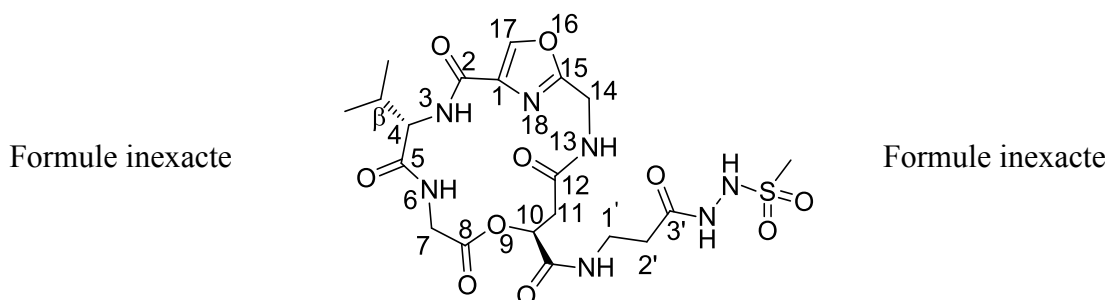
IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 2920($\bar{\nu}_{CH_3}$); 1198($\bar{\nu}_{(CH_3)_2CH}$).

RMN¹H (DMSO- d_6 , 600MHz) δ (ppm) : (mélange de deux rotamères) 0,83-0,92 (m, 6H, CH_3 Val); 2,16-2,21 (m, 0,5H, H_{β} Val); 2,25-2,35 (m, 2,5H, H_2 , H_{β} Val); 2,52-2,62 (m, 0,5H, H_{11}); 2,70 (dd, 0,5H, $J = 14,7$ Hz, $J = 11,0$ Hz, H_{11}); 2,79 (dd, 0,5H, $J = 17,1$ Hz, $J = 3,0$ Hz, H_{11}); 2,89 (s, 1,5H, SCH_3); 2,92 (s, 1,5H, SCH_3); 3,01 (dd, 0,5H, $J = 16,7$ Hz, $J = 6,5$ Hz,

H_{11}); 3,21-3,29 (m, 0,5H, $H_{1'}$); 3,30-3,36 (m, 0,5H, $H_{1'}$); 3,75-3,78 (m, 0,5H, H_7); 3,89 (dd, 0,5H, $J = 17,4$ Hz, $J = 5,1$ Hz, H_7); 4,10-4,14 (m, 1H, H_α Val, H_7); 4,24-4,30 (m, 1H, H_7 , H_{14}); 4,33-4,35 (m, 1H, H_{14}); 4,65 (dd, 0,5H, $J = 17,2$ Hz, $J = 6,9$ Hz, H_{14}); 4,89 (dd, 0,5H, $J = 10,2$ Hz, $J = 6,7$ Hz, H_α Val); 5,11 (dd, 0,5H, $J = 11,0$ Hz, $J = 2,4$ Hz, H_{10}); 5,22-5,23 (m, 0,5H, H_{10}); 7,68 (d, 0,5H, $J = 10,3$ Hz, H_3); 7,86 (d, 0,5H, $J = 9,8$ Hz, H_3); 7,92 (t, 0,5H, $J = 5,8$ Hz, NH); 8,01 (t, 0,5H, $J = 5,4$ Hz, H_6); 8,24-8,28 (m, 1H, H_6 , NH); 8,51 (t, 0,5H, $J = 5,7$ Hz, H_{13}); 8,56 (s, 1H, H_{17}); 8,79 (t, 0,5H, $J = 5,8$ Hz, H_{13}); 9,32 (d, 0,5H, $J = 2,9$ Hz, NH); 9,36 (d, 0,5H, $J = 2,8$ Hz, NH); 10,08 (d, 0,5H, $J = 2,5$ Hz, NH); 10,14 (d, 0,5H, $J = 2,9$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 150MHz) δ (ppm) : (mélange de 2 rotamères) 17,6 (CH_3 Val); 19,2 (CH_3 Val); 19,8 (CH_3 Val); 19,9 (CH_3 Val); 29,4 (C_β Val); 30,4 (C_β Val); 33,2 ($C_{2'}$); 35,4 ($C_{1'}$); 36,4 (C_{11}); 36,5 (C_{14}); 36,8 (C_{14}); 38,0 (C_{11}); 40,3 (SCH_3); 42,1 (C_7); 43,0 (C_7); 60,5 (C_α Val); 61,1 (C_α Val); 71,3 (C_{10}); 72,0 (C_{10}); 135,8 (C_1); 136,8 (C_1); 141,5 (C_{17}); 145,2 (C_{17}); 160,3 (C_2); 161,8 (C_{15}); 162,5 (C_{15}); 162,9 (C_2); 168,6 (C_8); 168,9 (CO); 168,9 (C_{12}); 169,2 (CO); 169,2 (C_8); 169,5 (C_{12}); 170,3 ($C_{3'}$); 170,5 ($C_{3'}$); 170,9 (C_5); 171,4 (C_5).

Composé indéterminé (83)



Dans un ballon de 10 mL, 70 mg (0,091 mmol) du composé **75** sont dissous dans 1 mL de méthanol. 40 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 20 min, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 54$ mg, soit un rendement de 87 %.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 54 mg (0,080 mmol) du composé précédent sont dissous dans 3 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 1 mL de TFA est ajouté au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 1 h 30. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 46 mg (1 éq., 0,080 mmol) du composé précédent sont dissous dans 80 mL de DMF anhydre. 55 μ L (4 éq., 0,320 mmol) de DIPEA et 17 mg (1,5 éq., 0,120 mmol) de HOAt sont additionnés. Une solution de 46 mg (1,5 éq., 0,120 mmol) de HATU dans 20 mL de DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après 10 jours, le DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme d'huile, avec une masse $m = 2,3$ mg, soit un rendement de 5 %.

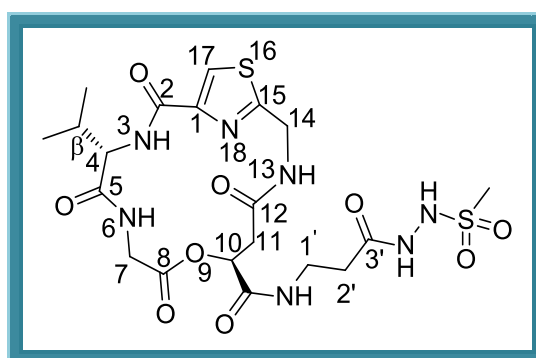
CLHP : $t_R = 8$ min 40 s

TOF-MS-ES⁺ : m/z mesuré à 614,1

RMN¹H (DMSO-D₆, 600MHz) δ (ppm) : 0,87 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 2,04-2,10 (m, 1H, H _{β} Val); 2,29-2,35 (m, 3H, H_{2'}, H₁₁); 2,55 (dd, 1H, $J = 3,1$ Hz, $J = 14,9$ Hz, H₁₁); 2,92 (s, 3H, SCH₃); 3,30-3,34 (m, 2H, H_{1'}); 3,84 (dd, 1H, $J = 2,8$ Hz, $J = 16,4$ Hz, H₇); 3,93 (dd, 1H, $J = 5,9$ Hz, $J = 17,4$ Hz, H₇); 4,25 (dd, 1H, $J = 5,9$ Hz, $J = 17,4$ Hz, H₁₀); 4,40 (dd, 1H, $J = 3,2$ Hz, $J = 9,4$ Hz, H₄); 4,44 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz, H₁₄); 7,65 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, N₃H); 7,87 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 8,60-8,62 (m, 2H, H₁₇, N₁₃H); 8,68 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, N₆H); 9,38 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, NH); 10,14 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-D₆, 150MHz) δ (ppm) : 18,5 (CH₃ Val); 19,5 (CH₃ Val); 31,7 (C _{β} Val); 33,5 (C_{2'}); 35,1 (C_{1'}); 36,3 (C₁₄); 40,4 (SCH₃); 41,0 (C₁₁); 41,0 (C₇); 57,4 (C₄); 68,7 (C₁₀); 135,8 (C₁); 142,6 (C₁₇); 159,8 (C₂); 161,9 (C₁₅); 170,5 (C₈); 170,7 (C₃); 170,8 (C₁₂); 171,5 (C₅); 173,6 (CO).

(4S,10S)-4-isopropyl-N-(3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)-2,5,8,12-tétraoxo-9-oxa-16-thia-3,6,13,18-tétraazabicyclo[13.2.1]octadéca-1(17),15(18)-diène-10-carboxamide (84)



Dans un ballon de 10 mL, 43 mg (0,055 mmol) du composé **76** sont dissous dans 1 mL de méthanol. 41 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 4 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 38$ mg, soit un rendement quantitatif.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 38 mg (0,055 mmol) du composé précédent sont dissous dans 1 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 0,5 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 30 min. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 250 mL sous diazote, 12 mg (1,5 éq., 0,086 mmol) de HOAt et 33 mg (1,5 éq., 0,086 mmol) de HATU sont dissous dans 70 mL de DMF anhydre. Une solution de 34 mg (1 éq., 0,055 mmol) du composé précédent dans 2 mL de DMF anhydre sont ajoutés. Une solution de 39 μ L (4 éq., 0,228 mmol) de DIPEA dans 2 mL de DMF anhydre sont additionnés au goutte-à-goutte. Après trois jours, le DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 11$ mg, soit un rendement de 33 %.

C₂₀H₂₉N₇O₉S₂

575,62 g/mol

CCM : $R_f = 0,77$ (DCM/MeOH 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

CLHP : $t_R = 9$ min 34 s

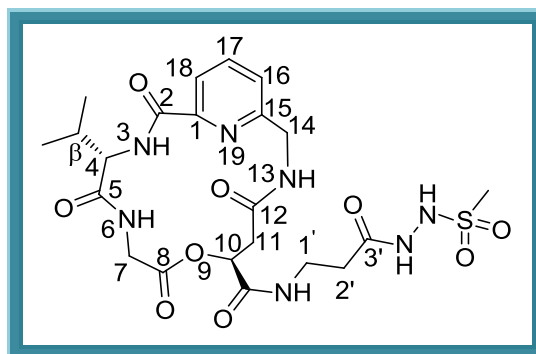
TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 598,1368 pour $[M+Na]^+$, calculé à 598,1366 pour $C_{20}H_{29}N_7O_9NaS_2$.

IR (NaCl) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) : 3289 ($\bar{\nu}_{N-H}$); 1746 ($\bar{\nu}_{C=O}$); 1662 ($\bar{\nu}_{C=O}$); 1536 (δ_{N-H}); 1201 ($\bar{\nu}_{SO_2}$); 1148 ($\bar{\nu}_{C-O}$).

RMN¹H (DMSO-d₆, 300MHz) δ (ppm) : 0,86 (d, 3H, $J = 3,7$ Hz, CH₃ Val); 0,88 (d, 3H, $J = 3,7$ Hz, CH₃ Val); 2,20-2,31 (m, 3H, H _{β} Val, H_{2'}); 2,68 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz, $J = 16,8$ Hz, H₁₁); 2,83-2,94 (m, 4H, SCH₃, H₁₁); 3,13-3,31 (m, 2H, H_{1'}); 3,77 (dd, 1H, $J = 16,0$ Hz, $J = 3,5$ Hz, H₇); 4,09-4,21 (m, 2H, H _{α} Val, H₇); 4,53 (dd, 1H, $J = 16,7$ Hz, $J = 4,8$ Hz, H₁₄); 4,66 (dd, 1H, $J = 16,8$ Hz, $J = 6,7$ Hz, H₁₄); 5,20 (dd, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H₁₀); 7,93-8,03 (m, 2H, NH, H₃); 8,19 (s, 1H, H₁₇); 8,37-8,47 (m, 2H, H₆, H₁₃); 9,33 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, NH); 10,09 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ (ppm) : 18,5 (CH₃ Val); 19,2 (CH₃ Val); 30,3 (C _{β} Val); 32,8 (C_{2'}); 34,9 (C_{1'}); 36,3 (C₁₁); 39,8 (SCH₃); 39,8 (C₁₄); 42,4 (C₇); 59,7 (C _{α} Val); 71,0 (C₁₀); 123,4 (C₁₇); 148,2 (C₁); 160,2 (C₂); 167,7 (C₁₅); 168,3 (C₁₂); 168,8 (C₈); 168,9 (CO); 170,0 (C_{3'}); 170,2 (C₅).

(4S,10S)-4-isopropyl-N-(3-(2-(méthylsulfonyl)hydrazinyl)-3-oxopropyl)-2,5,8,12-tétraoxo-9-oxa-16-thia-3,6,13,18-tétraazabicyclo[13.3.1]octadéca-1(18),16(17),15(19)-triène-10-carboxamide (85)



Dans un ballon de 10 mL, 12 mg (0,014 mmol) du composé **77** sont dissous dans 1 mL de méthanol. 10 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 2 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 6$ mg, soit un rendement de 56 %.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 6 mg (0,008 mmol) du composé précédent sont dissous dans 1 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 0,5 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min et ensuite à température ambiante pendant 1 h 30. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 4,5 mg (1 éq., 0,008 mmol) du composé précédent sont dissous dans 5 mL de DMF anhydre. 6 μ L (4 éq., 0,030 mmol) de DIPEA et 2 mg (1,5 éq., 0,011 mmol) de HOAt sont additionnés. Une solution de 5 mg (1,5 éq., 0,011 mmol) de HATU dans 5 mL de DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après trois jours, le

DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme de solide blanc, avec une masse $m = 1$ mg, soit un rendement de 23 %.

$C_{22}H_{30}N_6O_{10}S$

570,57 g/mol

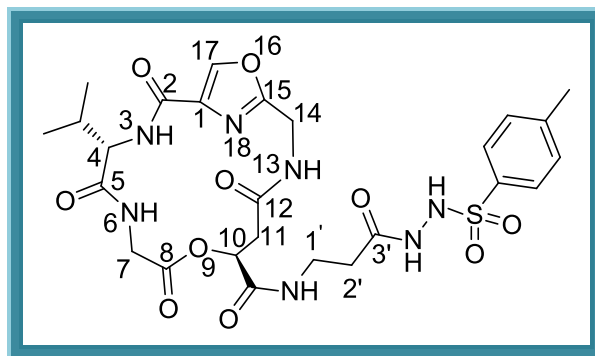
CCM : $R_f = 0,30$ (DCM/MeOH 9/1 (v/v)) (révélateur : vanilline)

CLHP : $t_R = 10$ min 8s

RMN¹H (DMSO-d₆, 600MHz) δ (ppm) : 0,90 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 0,95 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 2,08-2,15 (m, 1H, H _{β} Val); 2,31-2,40 (m, 3H, H_{2'}, H₁₁); 2,61 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J = 3,5$ Hz, H₁₁); 2,91 (s, 3H, SCH₃); 3,32 (dd, 2H, $J = 13,2$ Hz, $J = 6,7$ Hz, H_{1'}); 3,85 (dd, 1H, $J = 17,4$ Hz, $J = 5,8$ Hz, H₇); 3,93 (dd, 1H, $J = 17,4$ Hz, $J = 5,8$ Hz, H₇); 4,29 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 3,5$ Hz, H₁₀); 4,43-4,49 (m, 3H, H _{α} Val, H₁₄); 7,55 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H₁₈); 7,87-7,93 (m, 2H, NH, H₁₆); 7,96 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H₁₇); 8,48 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz, H₃); 8,60 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H₁₃); 8,72 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, H₆); 9,38 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, NH); 10,14 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 150MHz) δ (ppm) : 18,5 (CH₃ Val); 19,6 (CH₃ Val); 31,9 (C _{β} Val); 33,5 (C_{2'}); 35,1 (C_{1'}); 40,5 (SCH₃); 41,0 (C₇); 41,3 (C₁₁); 44,5 (C₁₄); 57,7 (C _{α} Val); 69,0 (C₁₀); 120,6 (C₁₈); 124,4 (C₁₆); 138,9 (C₁₇); 148,8 (C₁); 158,6 (C₁₅); 163,6 (C₂); 170,7 (C_{3'}); 170,7 (C₁₂); 170,7 (C₈); 171,6 (C₅); 173,7 (CO).

(4S,10S)-4-isopropyl-2,5,8,12-tétraoxo-N-(3-oxo-3-(2-tosylhydrazinyl)propyl)-9,16-dioxa-3,6,13,18-tétraazabicyclo[13.2.1]octadéca-1(17),15(18)-diène-10-carboxamide (86)



Dans un ballon de 10 mL, 20 mg (0,024 mmol) du composé **78** sont dissous dans 2 mL de méthanol. 10 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 20 min, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 18$ mg, soit un rendement quantitatif.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 18 mg (0,024 mmol) du composé précédent sont dissous dans 1 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 0,25 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 1 h. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 16 mg (1 éq., 0,024 mmol) du composé précédent sont dissous dans 20 mL de DMF anhydre. 5 mg (1,5 éq., 0,036 mmol) de HOAt et 16 μ L (4 éq., 0,096 mmol) de DIPEA sont additionnés. Une solution de 14 mg (1,5 éq., 0,036 mmol) de

HATU dans 5 mL de DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après trois jours, le DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme de solide, avec une masse $m = 2$ mg, soit un rendement de 13 %.

$C_{26}H_{33}N_7O_{10}S$

635,65 g/mol

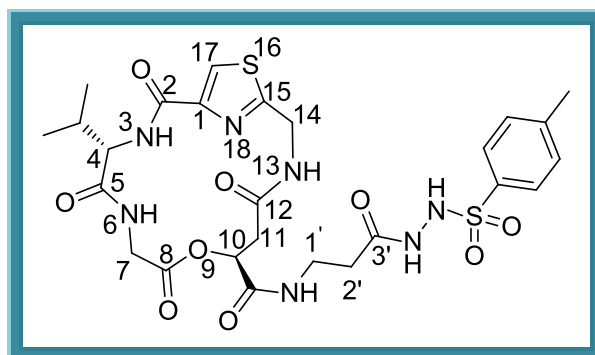
CLHP : $t_R = 11$ min 51 s

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 658,1903 pour $[M+Na]^+$, calculé à 658,1907 pour $C_{26}H_{33}N_7O_{10}NaS$.

RMN¹H (DMSO-d₆, 600MHz) δ (ppm) : 0,86 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 0,91 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 2,03-2,09 (m, 1H, H _{β} Val); 2,17 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H_{2'}); 2,29 (dd, 1H, $J = 14,8$ Hz, $J = 9,4$ Hz, H₁₁); 2,38 (s, 3H, CH₃); 2,52-2,55 (m, 1H, H₁₁); 3,11 (dt, 2H, $J = 7,1$ Hz, $J = 6,5$ Hz, H_{1'}); 3,76 (dd, 1H, $J = 17,4$ Hz, $J = 5,9$ Hz, H₇); 3,83 (dd, 1H, $J = 17,5$ Hz, $J = 5,9$ Hz, H₇); 4,22 (dd, 1H, $J = 9,4$ Hz, $J = 3,2$ Hz, H₁₀); 4,41 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J = 6,7$ Hz, H _{α} Val); 4,44 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz, H₁₄); 7,36 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, H_{ar}); 7,66 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz, H₃); 7,68 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, H_{ar}); 7,71 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz, NH); 8,57 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, H₆); 8,61-8,62 (m, 2H, H₁₃, H₁₇); 9,71 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, NH); 10,04 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 150MHz) δ (ppm) : 18,5 (CH₃ Val); 19,6 (CH₃ Val); 21,5 (CH₃); 31,8 (C _{β} Val); 33,4 (C_{2'}); 35,1 (C_{1'}); 36,3 (C₁₄); 41,0 (C₁₁); 41,0 (C₇); 57,3 (C _{α} Val); 68,7 (C₁₀); 128,1 (CH_{ar}); 128,1 (CH_{ar}); 129,8 (CH_{ar}); 129,8 (CH_{ar}); 135,9 (C₁); 136,5 (C_q); 142,5 (C₁₇); 143,7 (C_q); 159,7 (C₂); 161,9 (C₁₅); 169,7 (C_{3'}); 170,8 (C₁₂); 171,3 (C₅); 171,4 (C₈); 173,5 (CO).

(4S,10S)-4-isopropyl-2,5,8,12-tétraoxo-N-(3-oxo-3-(2-tosylhydrazinyl)propyl)-9-oxa-16-thia-3,6,13,18-tétraazabicyclo[13.2.1]octadéca-1(17),15(18)-diène-10-carboxamide (87)



Dans un ballon de 10 mL, 46 mg (0,053 mmol) du composé **79** sont dissous dans 2 mL de méthanol. 46 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 2 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 39$ mg, soit un rendement de 95%.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 39 mg (0,051 mmol) du composé **77** sont dissous dans 1 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 0,5 mL de TFA sont ajoutés au goutte-à-

goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 1 h. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 100 mL sous diazote, 10 mg (1,5 éq., 0,071 mmol) de HOAt, 27 mg (1,5 éq., 0,071 mmol) de HATU et 16 µL (2 éq., 0,096 mmol) de DIPEA sont dissous dans 37 mL de DMF anhydre. Une solution de 31 mg (1 éq., 0,047 mmol) du composé précédent et 16 µL (2 éq., 0,096 mmol) de DIPEA dans 10 mL de DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après trois jours, le DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme de solide jaune, avec une masse $m = 13$ mg, soit un rendement de 42 %.

$C_{26}H_{33}N_7O_9S_2$

651,71 g/mol

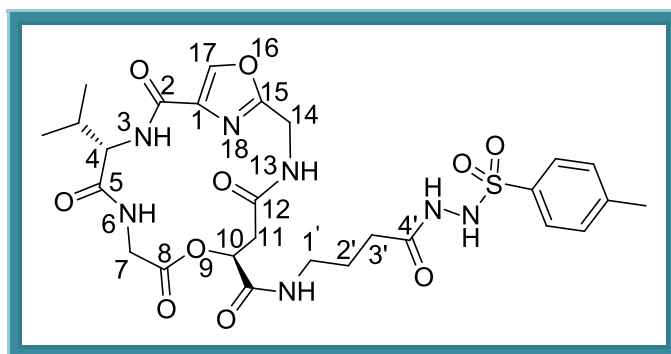
CLHP : $t_R = 13$ min 52 s

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 674,1671 pour $[M+Na]^+$, calculé à 674,1679 pour $C_{26}H_{33}N_7O_9NaS_2$.

RMN¹H (DMSO-d₆, 600MHz) δ (ppm) : 0,87 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 0,89 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 2,07-2,15 (m, 2H, H_{2'}); 2,18-2,24 (m, 1H, H _{β} Val); 2,38 (s, 3H, CH₃); 2,67 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H₁₁); 2,87-2,91 (m, 1H, H₁₁); 2,99-3,03 (m, 2H, H_{1'}); 3,77 (dd, 1H, $J = 16,0$ Hz, $J = 3,7$ Hz, H₇); 4,13-4,17 (m, 2H, H₇, H _{α} Val); 4,55 (dd, 1H, $J = 16,7$ Hz, $J = 5,3$ Hz, H₁₄); 4,63 (dd, 1H, $J = 16,8$ Hz, $J = 6,8$ Hz, H₁₄); 5,18 (dd, 1H, $J = 6,7$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H₁₀); 7,35 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_{ar}); 7,66 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, H_{ar}); 7,87 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 7,97 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, H₃); 8,20 (s, 1H, H₁₇); 8,38 (dd, 1H, $J = 6,2$ Hz, $J = 3,9$ Hz, H₆); 8,43 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, H₁₃); 9,67 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, NH); 10,02 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆, 150MHz) δ (ppm) : 18,9 (CH₃ Val); 19,7 (CH₃ Val); 21,5 (CH₃); 30,7 (C _{β} Val); 33,3 (C_{2'}); 35,4 (C_{1'}); 36,7 (C₁₁); 40,2 (C₁₄); 42,8 (C₇); 60,1 (C _{α} Val); 71,3 (C₁₀); 123,9 (C₁₇); 128,1 (CH_{ar}); 128,1 (CH_{ar}); 129,7 (CH_{ar}); 129,7 (CH_{ar}); 136,4 (C_q); 143,7 (C_q); 148,6 (C₁); 160,6 (C₂); 168,2 (C₁₅); 168,8 (C₁₂); 169,2 (CO); 169,2 (C₈); 169,3 (C_{3'}); 170,7 (C₅).

(4S,10S)-4-isopropyl-2,5,8,12-tétraoxo-N-(4-oxo-4-(2-tosylhydrazinyl)butyl)-9,16-dioxa-3,6,13,18-tétraazabicyclo[13.2.1]octadéca-1(17),15(18)-diène-10-carboxamide (88)



Dans un ballon de 10 mL, 146 mg (0,170 mmol) du composé **81** sont dissous dans 4 mL de méthanol. 100 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés. Un flux de dihydrogène

permet de purger l'atmosphère du milieu réactionnel. Après 10 min, le ballon est maintenu sous atmosphère de dihydrogène. Après 2 h, la solution est filtrée sur célite et évaporée. Le produit déprotégé est obtenu avec une masse $m = 107$ mg, soit un rendement de 82 %.

Dans un ballon de 10 mL sous diazote, 107 mg (0,139 mmol) du composé précédent sont dissous dans 2 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C. 1 mL de TFA est ajouté au goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 30 min. Le DCM est évaporé, du méthanol est ajouté et évaporé. Le résidu est utilisé directement dans la réaction suivante.

Dans un ballon de 50 mL sous diazote, 28 mg (1,5 éq., 0,209 mmol) de HOAt, 80 mg (1,5 éq., 0,209 mmol) de HATU et 47 μ L (2 éq., 0,278 mmol) de DIPEA sont dissous dans 120 mL de DMF anhydre. Une solution de 93 mg (1 éq., 0,139 mmol) du composé précédent et 47 μ L (2 éq., 0,278 mmol) de DIPEA dans 20 mL de DMF anhydre sont ajoutés au goutte-à-goutte. Après deux jours, le DMF est évaporé. Le produit est purifié par CLHP (acétonitrile/eau). Le produit est obtenu sous forme de solide, avec une masse $m = 19$ mg, soit un rendement de 21 %.

$C_{27}H_{35}N_7O_{10}S$

649,67 g/mol

CLHP : $t_R = 13$ min 57 s

TOF-HRMS⁺ : m/z mesuré à 672,2054 pour $[M+Na]^+$, calculé à 672,2064 pour $C_{27}H_{35}N_7O_{10}NaS$.

RMN¹H (DMSO- d_6 , 600MHz) δ (ppm) : (mélange de deux rotamères) 0,83 (d, 1,5H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 0,85 (d, 1,5H, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Val); 0,88 (d, 1,5H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 0,90 (d, 1,5H, $J = 6,7$ Hz, CH₃ Val); 1,40-1,44 (m, 1H, H_{2'}); 1,45-1,50 (m, 1H, H_{2'}); 1,92 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, H_{3'}); 1,96 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, H_{3'}); 2,17-2,21 (m, 0,5H, H _{β} Val); 2,26-2,29 (m, 0,5H, H _{β} Val); 2,37 (s, 1,5H, CH₃); 2,38 (s, 1,5H, CH₃); 2,58 (dd, 0,5H, $J = 14,4$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H₁₁); 2,73 (dd, 0,5H, $J = 14,6$ Hz, $J = 11,0$ Hz, H₁₁); 2,79 (dd, 0,5H, $J = 17,2$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H₁₁); 2,87-2,91 (m, 1H, H_{1'}); 2,92-2,95 (m, 1H, H_{1'}); 3,01 (dd, 0,5H, $J = 17,2$ Hz, $J = 5,2$ Hz, H₁₁); 3,77 (dd, 0,5H, $J = 16,3$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H₇); 3,89 (dd, 0,5H, $J = 17,5$ Hz, $J = 5,1$ Hz, H₇); 4,08-4,13 (m, 1H, H₇, H _{α} Val); 4,26-4,30 (m, 1H, H₁₄, H₇); 4,34 (t, 1H, $J = 6,9$ Hz, H₁₄); 4,64 (dd, 0,5H, $J = 17,3$ Hz, $J = 6,8$ Hz, H₁₄); 4,89 (dd, 0,5H, $J = 17,5$ Hz, $J = 5,9$ Hz, H _{α} Val); 5,10 (dd, 0,5H, $J = 10,6$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H₁₀); 5,20-5,21 (m, 0,5H, H₁₀); 7,32-7,35 (m, 2H, H_{ar}); 7,65-7,69 (m, 2,5H, H_{ar}, H₃); 7,78 (t, 0,5H, $J = 5,4$ Hz, NH); 7,85 (d, 0,5H, $J = 10,0$ Hz, H₃); 8,04 (t, 0,5H, $J = 5,3$ Hz, H₆); 8,11 (t, 0,5H, $J = 5,5$ Hz, NH); 8,23-8,24 (m, 0,5H, H₆); 8,51 (t, 0,5H, $J = 5,9$ Hz, H₁₃); 8,56 (s, 0,5H, H₁₇); 8,57 (s, 0,5H, H₁₇); 8,80 (t, 0,5H, $J = 5,5$ Hz, H₁₃); 9,64 (d, 0,5H, $J = 3,0$ Hz, NH); 9,67 (d, 0,5H, $J = 3,1$ Hz, NH); 9,90 (d, 0,5H, $J = 3,0$ Hz, NH); 9,95 (d, 0,5H, $J = 2,7$ Hz, NH).

RMN¹³C (DMSO- d_6 , 150MHz) δ (ppm) : (mélange de deux rotamères) 17,5 (CH₃ Val); 19,1 (CH₃ Val); 19,8 (CH₃ Val); 19,9 (CH₃ Val); 21,5 (CH₃); 21,5 (CH₃); 25,3 (C_{2'}); 25,4 (C_{2'}); 29,3 (C _{β} Val); 30,4 (C _{β} Val); 30,9 (C_{3'}); 31,0 (C_{3'}); 36,4 (C₁₄); 36,5 (C₁₁); 36,8 (C₁₄); 38,1 (C₁₁); 38,4 (C_{1'}); 38,5 (C_{1'}); 42,1 (C₇); 43,0 (C₇); 60,5 (C _{α} Val); 61,1 (C _{α} Val); 71,4 (C₁₀); 72,0 (C₁₀); 128,1 (CH_{ar}); 128,1 (CH_{ar}); 129,7 (CH_{ar}); 129,7 (CH_{ar}); 135,7 (C₁); 136,4 (Cq); 136,4 (Cq); 136,8 (C₁); 141,5 (C₁₇); 143,6 (Cq); 143,6 (Cq); 145,2 (C₁₇); 160,3 (C₂); 161,7 (C₁₅); 162,5 (C₁₅); 162,9 (C₂); 168,6 (C₈); 168,7 (CO); 168,9 (CO); 169,0 (C₁₂); 169,2 (C₈); 169,5 (C₁₂); 170,8 (C₅); 170,9 (C_{4'}); 171,0 (C_{4'}); 171,5 (C₅).

11. Protocole test HDAC

11.1 Réaction en deux étapes

- Incubation de Fleur de Lys (comportant une lysine acétylée) avec une HDAC.
- La désacétylation du substrat Fleur de Lys permet l'émission d'un fluorophore par interaction du substrat désacétylé avec le Fleur de Lys Developer II.

11.2 Préparation des réactifs

1. Décongélation et conservation des composés dans la glace jusqu'à utilisation. La HDAC1 est stabilisée dans la glace 30 à 60 minutes.
2. Dilution de l'enzyme HDAC dans le Buffer II. 50 µg de HDAC1 dans 2,5 mL de Buffer II. 67 µL de HDAC3 dans 3,01 mL de Buffer II. 50 µg de HDAC6 dans 1,87 mL de Buffer II.
3. Dilution de TSA ou autres inhibiteurs dans le Buffer II. 10 µL de TSA concentré (200 µM) dans 190 µL de Buffer II pour obtenir 200 µL final de TSA à 10 µM.
4. Dilution du substrat Fleur de Lys-SIRT1 dans Buffer II.
Pour les HDAC1 et HDAC6, 10 µL de substrat concentré (5 mM) dans 5 mL Buffer II pour obtenir 5 mL de substrat à 10 µM. Pour la HDAC3, 6 µL de substrat concentré (5 mM) dans 5 mL de Buffer II pour obtenir 5 mL de substrat à 3 µM.
5. Préparation d'une quantité suffisante de Fleur de Lys Developer moins de 30 minutes avant utilisation. Diluer 1,25 mL de Fleur de Lys Developer II dans 5 mL de Buffer I froid et ajouter 50 µL de TSA à 200 µM pour une concentration de TSA à 2 µM. L'ajout de trichostatine A au Developer II garantit l'arrêt de l'activité HDAC au moment de l'ajout de Developer II. Garder le Developer II dans la glace jusqu'à utilisation.

11.3 Déroulement du test

Le test se déroule dans des plaques 96 puits, des références de contrôles ont été définies (blancs, contrôles positifs, contrôles négatifs, contrôles de la gamme). La TSA est utilisée dans les puits contrôles positifs ; les puits contrôles négatifs ne contiennent pas d'inhibiteur, mais contiennent des HDAC et du substrat et absorbe au maximum. Les blancs ne contiennent qu'une solution tampon avec le substrat et absorbe au minimum. Une gamme de contrôle avec un inhibiteur connu permet de vérifier si le test s'est déroulé normalement. Avant d'ajouter l'enzyme et le substrat, les molécules à tester, le MS-275 et la TSA sont ajoutés dans les puits.

La distribution des puits se fait comme suit (Figure 79) :

- 2 puits blancs
- 2 puits contrôles négatifs (sans inhibiteur)
- 2 puits contrôles positifs (avec TSA)
- MS-275 contrôle de la gamme avec cinq concentrations différentes testées deux fois (10 puits)
- 8 molécules à tester avec cinq concentrations différentes testées deux fois (10 puits / molécules à tester)

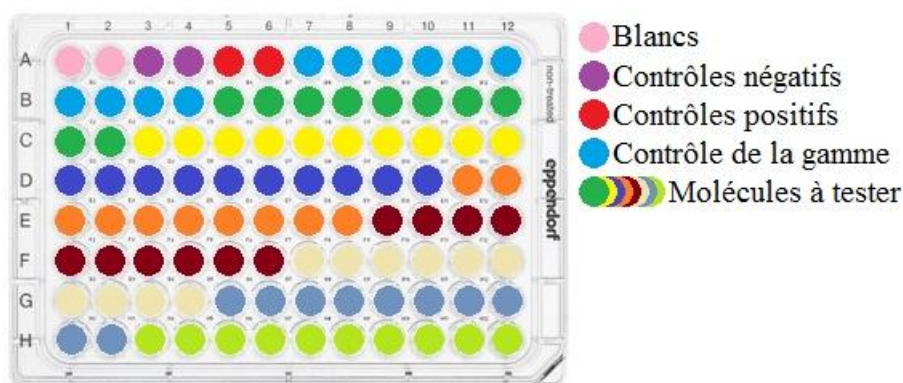


Figure 79 : Distribution des puits

La quantité de réactif mise dans chaque puits est fixe. La réaction se déroule dans un volume fixe de 50 μL . Finalement, 50 μL de développeur sont ajoutés, pour un volume final dans chaque puits de 100 μL (Tableau 19).

Tableau 19 : Conditions standards de manipulation

Echantillon	HDAC Assay Buffer II	HDAC (diluée)	Inhibiteur	Substrat Fleur de Lys
Blanc (pas d'enzyme)	40 μL	0	0	10 μL
Contrôle négatif	10 μL	30 μL	0	10 μL
Contrôle positif	0	30 μL	10 μL	10 μL
Echantillon	0	30 μL	10 μL	10 μL

11.4 Réalisation de l'essai

1. Ajout de Buffer II, de TSA diluée ou d'inhibiteur test selon les puits.
2. Réchauffer le substrat (10 μM) et le Buffer II pour diluer l'enzyme. Ajouter la HDAC froide et non diluée au Buffer II réchauffé.
3. Ajouter la HDAC diluée dans tous les puits sauf dans les blancs.
4. Débuter la réaction de désacétylation en ajoutant 25 μL de substrat dilué dans chaque puits et homogénéiser (microplate mixer).
5. Laisser la réaction se dérouler pendant 60 minutes, puis l'arrêter par ajout de 50 μL de Developer II préparé auparavant. Laisser la plaque à température ambiante pendant au moins 45 minutes.
6. Emission du signal fluorescent à 360 nm et détection à 460 nm. (Application : Tecan i-control, Target Temperature : 24 $^{\circ}\text{C}$, Excitation Bandwidth = 9 nm, Emission Bandwidth = 20 nm, Gain = 50 Manual, Number of Flashes = 5, Integration Time = 20 μs , Lag Time = 0 μs , Settle Time = 0 ms, Z-Position (Manual) = 20000 μm).

12. Tests *in vivo*

12.1 Animaux

Des rats mâles Long Evans ont été utilisés (200-250 g à leur arrivée) en provenance de Charles River (L'arbresle, France). Ces rats ont été placés dans une animalerie où la température était maintenue à $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et où le pourcentage d'humidité était d'environ $55 \pm 10\%$. Les animaux placés dans des cages individuelles avaient un accès libre à l'eau et à

la nourriture. Les cycles dans lesquels les animaux évoluaient étaient de 12 h de lumière suivies de 12 h d'obscurité (la lumière était allumée de 7 h à 19 h). L'ensemble des expériences a été mené dans le respect de la réglementation en vigueur soumise à la directive européenne N°86/609 relative à l'utilisation des animaux dans la recherche et a été déclaré à la DDPP et au Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Picardie (N° : 260912-10).

12.2 Produits & Réactifs

L'éthanol (96 % vol.) provient de VWR (Fontenay-sous-Bois, France) et est dilué (20 % V/V) dans de l'eau courante du robinet. L'inhibiteur des histones déacétylases, le composé **82** ou **83** a été dilué dans du DMSO, puis cette solution a été diluée dans du liquide céphalorachidien artificiel (CMA Microdialysis, Solna, Suède) pour atteindre une concentration finale de 500 ou 1000 μ M du composé **82** ou **83** dans du DMSO à 10 %.

12.3 Consommation en libre choix à deux bouteilles en accès intermittent

Les animaux avaient accès pendant 24 h à deux bouteilles ; l'une contenant la solution composée d'éthanol à 20 % et l'autre contenant uniquement de l'eau. Les sessions débutaient à 14 h les lundis, mercredis et vendredis et étaient entrecoupées de périodes de 24 h (en semaine) ou de 48 h (le weekend) durant lesquelles les rats n'avaient plus accès à l'alcool, mais uniquement à de l'eau. Nous avons pris le soin d'alterner la position des bouteilles (gauche ou droite) à chaque session pour éviter que l'animal associe un placement à une des deux bouteilles ou qu'une préférence s'installe. A la fin de chaque session, les deux bouteilles étaient pesées.

12.4 Auto-administration en cage de conditionnement opérant

De façon brève, l'auto-administration se déroulait dans des chambres (Figure 80) qui comprennent deux leviers : un levier actif sur lequel les appuis conduisent à l'obtention d'une récompense de 0,1 mL de solution d'éthanol à 20 % et un levier inactif, où les appuis étaient comptés, mais ne donnaient accès à aucune récompense. L'apprentissage des rats commence en les plaçant dans les cages d'auto-administration pendant cinq séances de nuit. Ces séances consistaient à laisser les rats dans les cages durant une nuit (16 h) pendant laquelle ils vont acquérir la tâche d'appuyer sur le levier et apprendre à discriminer le levier actif du levier inactif. Durant ces cinq sessions de nuit, l'accès à une récompense était permis par un unique appui ; protocole FR1 (Fixed Ratio 1 : une récompense pour un appui). A la suite de ces cinq sessions d'apprentissage, les rats ont été entraînés pendant des séances de 30 minutes, cinq jours par semaine, selon un protocole FR3 (une récompense pour trois appuis consécutifs). Durant ces séances d'auto-administration, plusieurs paramètres étaient relevés (le nombre d'appuis sur les différents leviers, le nombre de récompenses délivrées) grâce au logiciel Packwin (Bioseb, Vitrolles, France).



Figure 80 : Chambre d'auto-administration

12.5 Chirurgie stéréotaxique

Après acquisition de la tâche d'auto-administration, nous avons procédé à la mise en place de guides de canule d'injection (26 GA, 12 mm, Phymep) au sein du ventricule latéral droit des rats. L'anesthésie a été faite grâce à de l'isoflurane en continu lors de la chirurgie. Afin d'implanter avec précision les guides de canules (tube en acier inoxydable de diamètre 0,404 mm et de 8 mm de long), nous avons placé les animaux dans un cadre stéréotaxique (Figure 81). Nous avons percé quatre trous pour la mise en place de vis d'ancrage, un trou pour l'implantation du guide de canule (longueur : 12 mm) dans le ventricule latéral droit (Coordonnées : antéropostérieure : -0,8 mm par rapport au bregma (Figure 82); latérale : +1,4 mm par rapport au bregma ; dorso-ventrale : -3 mm par rapport à la surface de l'os). Les guides de canules ont été fixés à la surface de l'os grâce à du ciment dentaire. A la fin de l'opération, la plaie a été nettoyée à la bétadine, puis suturée avec de la colle cyanoacrylate. Nous avons placé des stylets de protection dans les guides de canules afin d'éviter d'éventuelles fuites de LCS ou d'éventuelles pénétrations d'éléments exogènes. Après la chirurgie, nous avons pesé nos rats chaque jour pendant une semaine afin de nous assurer de leur bonne convalescence. Durant 48 h post-opératoire, la solution d'eau a été complétée avec du Doliprane pour enfant. Une semaine après l'opération, les animaux ont repris l'entraînement d'auto-administration.



Figure 81 : Cadre stéréotaxique

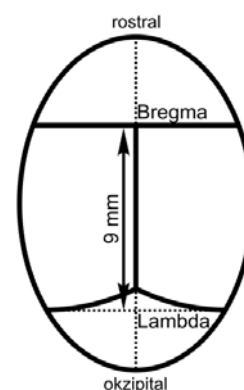


Figure 82 : Situation du bregma sur le crâne

12.6 Ré-acquisition après abstinence

Une fois le test sur la motivation effectué, les animaux ont été gardés dans leur cage de stabulation pendant une période de 15 jours sans aucun accès à l'alcool, ni en cage de stabulation ni en cage opérante. Nous avons utilisé un modèle de rechute appelé

“ré-acquisition” qui consiste en la ré-introduction d'une récompense d'alcool après trois appuis sur le levier actif. Au début de la séance d'auto-administration, une première récompense d'alcool (0,1 mL d'éthanol à 20 %) était distribuée sans que le rat ait à appuyer. Ensuite, les récompenses d'éthanol furent rendues disponibles à la suite de trois appuis consécutifs comme pendant les sessions d'auto-administration FR3 habituelles.

12.7 Microinjections du composé **82** ou **83**

Trois heures avant chaque test (consommation d'alcool, motivation et rechute après abstinence), les rats ont reçu une micro-injection soit de liquide céphalorachidien artificiel (aCSF) contenant 5 % de DMSO, soit le composé **82** ou **83** dilué dans du aCSF avec 5 % de DMSO. Ces micro-injections ont été réalisées de la manière suivante. L'animal a été habitué à être maintenu dans les mains et nous avons inséré un micro-injecteur (tube en acier inoxydable de diamètre 0,160 mm et long de 9 mm). Ce micro-injecteur est relié à une seringue Hamilton (1702N, 25 μ L) par un tube. La seringue est placée sur un pousse seringue pour permettre l'injection à très basse vitesse. Nous avons micro-injecté au total un volume de 2 μ L par animal à une vitesse de 1 μ L/min. Le système a été laissé en place une minute supplémentaire pour permettre à la solution de diffuser correctement dans le ventricule latéral.

12.8 Vérification Histologique

Les rats canulés sont perfusés par voie transcardiaque avec une solution fixatrice (PFA 4 %) et les cerveaux prélevés. Puis, nous procédons à des coupes coronales de 75 μ m d'épaisseur sur les cerveaux afin d'examiner les sites d'implantations des guides de canules après coloration à la thionine. Après ce contrôle, nous excluons les rats dont les guides n'ont pas été implantés dans la zone du cerveau désirée.

12.9 Analyse Statistique

L'analyse des données portant sur le nombre d'appuis sur le levier actif par une analyse de la variance à 1 voie (ANOVA) indique un effet significatif du traitement : $p < 0,001$. L'analyse *post hoc* (test de Tukey) révèle, lui, une différence significative entre les groupes aCSF et 1000 μ M ($p = 0,005$) et entre les groupes 500 et 1000 μ M ($p < 0,001$). Le calcul de la quantité d'éthanol pur total consommé a été réalisé grâce à la formule suivante : ((nombre de récompenses obtenues x pourcentage d'éthanol dans la solution (20 %) x volume reçu par récompense (0,1 mL) x densité de l'éthanol (0,79))/ poids de l'animal) x 1000 pour exprimer le tout en g/kg. Les données obtenues ont elles aussi été analysées par une ANOVA à une voie qui indique un effet significatif du traitement sur la quantité d'alcool consommé : $p < 0,001$. Le test de Tukey montre une différence significative entre les groupes aCSF et 1000 μ M ($p = 0,004$) et entre les groupes 500 et 1000 μ M ($p < 0,001$). Le seuil de significativité pour tous les tests a été fixé à $p < 0,05$.

Tables

13. Les Figures

Figure 1 : Effet du butyrate de sodium sur la consommation d'alcool, * $p < 0.001$ ⁵	3
Figure 2 : MS-275	4
Figure 3 : Les molécules modèles et les molécules cibles	4
Figure 4 : Décès dus à l'alcool en France en 2009 ¹	6
Figure 5 : Etude sur le développement de la tolérance ²²	10
Figure 6 : GABA	12
Figure 7 : Récepteurs GABAergiques normaux (gauche) avec intoxication aigüe (milieu) et chronique (droite)	13
Figure 8 : Glutamate	13
Figure 9 : NMDA	13
Figure 10 : Dopamine	13
Figure 11 : Circuit de la récompense	15
Figure 12 : Acamprosate	18
Figure 13 : Naltrexone	18
Figure 14 : Nalméfène	19
Figure 15 : Disulfirame	19
Figure 16 : Baclofène	20
Figure 17 : Effet du baclofène sur les récepteurs GABA ⁴⁹	21
Figure 18 : GHB	21
Figure 19 : Les molécules étudiées	22
Figure 20 : Structure de l'ADN	24
Figure 21 : Les différentes parties d'un chromosome	24
Figure 22 : Représentation d'un nucléosome ⁵⁵	25
Figure 23 : Etat des chromosomes durant le cycle cellulaire	26
Figure 24 : Les fibres chromatiniennes	26
Figure 25 : Ensemble des modifications possibles sur les histones ⁶⁵	28
Figure 26 : Représentation schématique des différentes isoformes de HDAC ⁸³	32
Figure 27 : Distribution des onze HDAC dans le cerveau de rat (Les zones sombres sont fortement concentrées en HDAC à l'inverse des zones claires). ⁸⁷	32
Figure 28 : Représentation de la surface de la HDLP ⁸⁸	33
Figure 29 : Test d'auto-administration opérante d'éthanol	37
Figure 30 : Effet du butyrate de sodium sur des rats dépendants (jaune) et non-dépendants (bleu), * $p < 0.001$ ⁵	38
Figure 31 : Test du MS-275 sur des rats à différentes concentrations sur 48h, * $p < 0.001$ ⁶	38
Figure 32 : Effet en U en fonction de la dose de MS-275, * $p < 0.001$ ⁶	39
Figure 33 : Evaluation de la motivation à consommer de l'alcool ¹²¹	39
Figure 34 : Evaluation de la motivation à consommer de l'alcool après injection de MS-275	40
Figure 35 : Diminution de la rechute par traitement préventif au MS-275, ** $p < 0.05$	40
Figure 36 : Test d'exploration LDB	41

Figure 37 : Evolution du nombre de publication sur Scifinder de l'épigénétique, des HDAC et de leurs inhibiteurs.	42
Figure 38 : Butyrate de sodium (gauche) et Acide valproïque (droite)	43
Figure 39 : Tubacin (gauche) et PCI-34051 (droite).....	43
Figure 40 : Belinostat (gauche) et oxamflatin (droite).....	44
Figure 41 : Panobinostat (gauche) et scriptaid (droite).....	44
Figure 42 : SAHA (gauche) et TSA (droite).....	44
Figure 43 : Pharmacophore modèle exemple de la TSA.....	45
Figure 44 : Psammapline A.....	46
Figure 45 : CI-994 (gauche) et RGFP966 (droite)	46
Figure 46 : MS-275 (gauche) et mocetinostat (droite).....	47
Figure 47 : Mode de chélation de l'acide hydroxamique et des alkyl/arylsulfonylhydrazides ¹⁴⁴ , 10	47
Figure 48 : Pourcentage d'inhibition de HDAC1 à 30 mM des analogues	48
Figure 49 : Mode de liaison détaillée de EBMS6-3 avec HDAC1	48
Figure 50 : Test d'auto-administration opérante d'éthanol après une injection de EBGA8-2, *p<0.001.....	49
Figure 51 : Evaluation de la motivation à consommer de l'alcool après une injection de EBGA8-2, *p<0.05	49
Figure 52 : Peptides cycliques homodétique, isopeptides, bicycliques et depsipeptides	50
Figure 53 : Chlamydocin (gauche), cyl-2 (milieu) et azumamide E (droite).	51
Figure 54 : Spiruchostatin A et l'épi-spiruchostatin A	51
Figure 55 : Trapoxin B (n=1), A (n=2) (gauche) et apicidin (droite).....	51
Figure 56 : Largazole (gauche) et largazole thiol (droite)	52
Figure 57 : Largazole thiazoline-pyridine (gauche) et largazole oxazoline-oxazole (droite) ..	52
Figure 58 : FK228 (gauche) et redFK228 (droite)	53
Figure 59 : Analogues du largazole.....	54
Figure 60 : Les structures du largazole thiol (gauche), de l'épi-largazole (milieu) et du largazole benzamide (droite).	54
Figure 61 : FK228 (gauche), FK228 isostère (milieu gauche), FK228 valine (milieu droite) et FK228 thioester (droite).	55
Figure 62 : Pharmacomodulations.....	56
Figure 63 : Analogue du Bloc B.....	59
Figure 64 : Nouveau Bloc B.....	59
Figure 65 : Structure des composés 82 (gauche) et 88 (droite).....	74
Figure 66 : Etude RMN du composé 88.....	74
Figure 67 : Etude RMN du composé 82.....	75
Figure 68 : Structure hypothétique du rotamère A (gauche) et du rotamère B (droite) du composé 82.....	75
Figure 69 : Structure modélisée du composé 82-B	76
Figure 70 : Structure du composé 82-A avec une liaison hydrogène intracyclique.....	76
Figure 71 : Structure du composé 69	79
Figure 72 : Structures des composés 82 (gauche), 84 (milieu) et 85 (droite)	79

Figure 73 : Structures des composés 86 (gauche), 87 (milieu) et 88 (droite)	80
Figure 74 : Complexation du composé 82 avec HDAC3	81
Figure 75 : Accès de façon intermittente à l'alcool ¹²¹	82
Figure 76 : Effet du composé 82 sur des rats "gros buveurs" à deux concentrations	83
Figure 77 : Etude des effets du composé 83 sur les rats "gros buveurs", **p<0.05	83
Figure 78 : Etude de la rechute des rats "gros buveurs" après injection du composé 83, **p<0.05.....	84
Figure 79 : Distribution des puits	139
Figure 80 : Chambre d'auto-administration.....	141
Figure 81 : Cadre stéréotaxique	141
Figure 82 : Situation du bregma sur le crâne	141

14. Les schémas

Schéma 1 : Equilibre HAT/HDAC.....	3
Schéma 2 : La métabolisation de l'alcool	8
Schéma 3 : Synthèse de la dopamine	14
Schéma 4 : Expérience de Olds et Milner ³⁰	14
Schéma 5 : Zones du cerveau liées à l'addiction	16
Schéma 6 : Mécanisme «anti-récompense»	17
Schéma 7 : Les effets du nalméfène.....	19
Schéma 8 : Blocage de l'oxydation de l'alcool au stade de l'acétaldéhyde.....	20
Schéma 9 : Les fibres chromatiniques.....	25
Schéma 10 : L'épissage	27
Schéma 11 : Méthylation de l'ADN par les DNMT	28
Schéma 12 : Méthylation d'un résidu arginine	29
Schéma 13 : Méthylation d'un résidu lysine.....	29
Schéma 14 : Acétylation d'un résidu lysine.....	30
Schéma 15 : Équilibre chromatine condensée / décondensée	31
Schéma 16 : Mécanisme de la désacétylation des histones par les HDAC.....	34
Schéma 17 : Rôle de la cavité interne ⁸⁹	34
Schéma 18 : Inhibition des HDAC augmente la transcription	36
Schéma 19 : Rétrosynthèse	58
Schéma 20 : Synthèse du Bloc A	59
Schéma 21 : Voie décrite par Schobert <i>et al.</i>	60
Schéma 22 : Interactions entre TMSEOH et les restes de TFFA.....	60
Schéma 23 : Synthèse du composé 12	60
Schéma 24 : Difficultés lors de la déprotection du groupement acétate	61
Schéma 25 : Groupement acétate difficile à éliminer	61
Schéma 26 : Nouvelle voie pour obtenir le Bloc B.....	61
Schéma 27 : Synthèse du Bloc B	62
Schéma 28 : Optimisation de la synthèse du Bloc B.....	62
Schéma 29 : Préparation de la Sérine protégée	62
Schéma 30 : Couplage avec la glycine protégée	63

Schéma 31 : Hydrogénolyse.....	63
Schéma 32 : Synthèse de l'oxazole disubstitué.....	63
Schéma 33 : Synthèse du thiazole disubstitué.....	64
Schéma 34 : Synthèse du composé 32	64
Schéma 35 : Synthèse de la pyridine disubstituée.....	64
Schéma 36 : Saponification de l'ester des hétérocycles	65
Schéma 37 : Synthèse du composé 43	65
Schéma 38 : Synthèse du Boc D	66
Schéma 39 : Synthèse des espaceurs n = 2, 3.....	66
Schéma 40 : Synthèse des blocs D protégés	66
Schéma 41 : Déprotection des blocs D.....	67
Schéma 42 : Couplage des blocs A et B.....	67
Schéma 43 : Couplage des Blocs AB et C	68
Schéma 44 : Déprotection de l'ester et du carbamate	68
Schéma 45 : Macrolactamisation	69
Schéma 46 : Déprotection de la fonction acide.....	70
Schéma 47 : Déprotection de macrocycle analogue de type thiazole	70
Schéma 48 : Couplage des Blocs ABC et D	72
Schéma 49 : Macrocyclisation	73
Schéma 50 : Réaction avec le kit HDAC	77
Schéma 51 : Réaction de désacétylation permettant la formation d'un fluorophore	78
Schéma 52 : Les conséquences de l'alcool sur l'acétylation des histones.....	85

15. Les tableaux

Tableau 1 : Alcool et modifications épigénétiques	35
Tableau 2 : Inhibiteurs d'HDAC et effets sur les dépendances	35
Tableau 3 : Inhibiteurs d'HDAC et effets sur l'alcool-dépendance	36
Tableau 4 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des inhibiteurs de type acide carboxylique (IC ₅₀ en mM).....	43
Tableau 5 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des inhibiteurs de type acide hydroxamique (IC ₅₀ en nM).....	45
Tableau 6 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des inhibiteurs de type benzamide (IC ₅₀ en nM)	47
Tableau 7 : Récapitulatif des inhibitions des différentes HDAC par des peptides cycliques (IC ₅₀ en nM).....	53
Tableau 8 : Inhibition de composés aux espaceurs de différentes longueurs (IC ₅₀ en nM)	54
Tableau 9 : Les inhibitions des analogues du largazole (IC ₅₀ en nM).....	55
Tableau 10 : Les inhibitions des analogues du FK228 (IC ₅₀ en nM)	55
Tableau 11 : Récapitulatif des conditions de cyclisation	69
Tableau 12 : Récapitulatif des conditions de déprotection.....	70
Tableau 13 : Récapitulatif des conditions de déprotection.....	71
Tableau 14 : Rendements sur deux étapes (déprotection et couplage).....	72
Tableau 15 : Rendements des cyclisations sur trois étapes	73
Tableau 16 : Inhibition sur un extrait nucléaire de HDAC.....	77
Tableau 17 : Conditions standards de manipulation.....	78

Tableau 18 : IC ₅₀ sur les HDAC1, 3 et 6 (en mM).....	80
Tableau 19 : Conditions standards de manipulation.....	139

Bibliographie

- (1) Guérin, S.; Laplanche, A.; Dunant, A.; Hill, C. Alcohol-Attributable Mortality in France. *Eur. J. Public Health* **2013**, 588–593.
- (2) Paille, F.; Reynaud, M. L'alcool, Une Des Toutes Premières Causes D'hospitalisation En France. *Behav. Brain Res.* **2015**, 440–449.
- (3) Anderson, P.; Gual, A.; Colom, J. *Alcool et Médecine Générale - Recommandations Cliniques Pour Le Repérage Précoce et Les Interventions*; Boulogne-Billancourt : Institut national du cancer (INCa)PHEPA, 2008; p 141.
- (4) Legastelois, R.; Botia, B.; Naassila, M. Blockade of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization by Sodium Butyrate: Descriptive Analysis of Gene Regulations in the Striatum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2013**, 37 (7), 1143–1153.
- (5) Simon-O'Brien, E.; Alaux-Cantin, S.; Warnault, V.; Buttolo, R.; Naassila, M.; Vilpoux, C. The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Decreases Excessive Ethanol Intake in Dependent Animals. *Addict. Biol.* **2015**, 20 (4), 676–689.
- (6) Jeanblanc, J.; Lemoine, S.; Jeanblanc, V.; Alaux-Cantin, S.; Naassila, M. The Class I-Specific HDAC Inhibitor MS-275 Decreases Motivation to Consume Alcohol and Relapse in Heavy Drinking Rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2015**, 18 (9), pyv029.
- (7) Moonat, S.; Sakharkar, A. J.; Zhang, H.; Tang, L.; Pandey, S. C. Aberrant Histone deacetylase2-Mediated Histone Modifications and Synaptic Plasticity in the Amygdala Predisposes to Anxiety and Alcoholism. *Biol. Psychiatry* **2013**, 763–773.
- (8) Taori, K.; Paul, V. J.; Luesch, H. Structure and Activity of Largazole, a Potent Antiproliferative Agent from the Floridian Marine Cyanobacterium *Symploca* Sp. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (6), 1806–1807.
- (9) Ueda, H.; Nakajima, H.; Hori, Y.; Fujita, T.; Nishimura, M.; Goto, T.; Okuhara, M. FR901228, a Novel Antitumor Bicyclic Depsipeptide Produced by *Chromobacterium Violaceum* No. 968. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-Chemical and Biological Properties, and Antitumor Activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1994**, 47 (3), 301–310.
- (10) Rouffet, M.; Denhez, C.; Bourguet, E.; Bohr, F.; Guillaume, D. In Silico Study of MMP Inhibition. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (18), 3817–3825.
- (11) Ajram, K. *The Miracle of Islamic Science*; Knowledge House Publishers: Seattle, 1992.
- (12) Moller, L. L'alcool, Toujours Un Facteur de Risque Majeur Pour La Santé En France. *Bull. Épidémiologique Hebd.* **2013**, No. 16-17–18, 161–203.
- (13) Kopp, P. Le Coût Social Des Drogues En France. *Obs. Fr. Drogue Toxicom.* **2015**, 10.
- (14) Alcool et santé : bilan et perspectives <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/alcool-et-sante-bilan-et-perspectives> (accessed Mar 29, 2016).
- (15) Hygiene, G. M. &. Le binge drinking des rats adolescents conduit à l'alcoolisme des adultes <http://www.planetesante.ch/Magazine/Addictions/Binge-drinking/Le-binge-drinking-des-rats-adolescents-conduit-a-l-alcoolisme-des-adultes> (accessed Aug 6, 2016).
- (16) Lacaille, H.; Duterte-Boucher, D.; Liot, D.; Vaudry, H.; Naassila, M.; Vaudry, D. Comparison of the Deleterious Effects of Binge Drinking-like Alcohol Exposure in Adolescent and Adult Mice. *J. Neurochem.* **2015**, 132 (6), 629–641.
- (17) Kyzar, E. J.; Floreani, C.; Teppen, T. L.; Pandey, S. C. Adolescent Alcohol Exposure: Burden of Epigenetic Reprogramming, Synaptic Remodeling, and Adult Psychopathology. *Syst. Biol.* **2016**, 222.

- (18) Kolb, B.; Whishaw, I. Q. *Cerveau & comportement*; De Boeck: Paris, 2002.
- (19) Legastelois, R.; Botia, B.; Coune, F.; Jeanblanc, J.; Naassila, M. Deciphering the Relationship between Vulnerability to Ethanol-Induced Behavioral Sensitization and Ethanol Consumption in Outbred Mice. *Addict. Biol.* **2014**, *19* (2), 210–224.
- (20) Jellinek, E. M. *The Disease Concept of Alcoholism*; Hillhouse Press: New Haven, 1960.
- (21) Crocq, M.-A.; Guelfi, J.-D.; Boyer, P.; Pull, C.-B.; Pull, M.-C. *DSM-5 Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5 ème édition*; Elsevier Masson, 2013.
- (22) Isbell, H.; Fraser, H. F.; Wikler, A.; Belleville, R. E.; Eisenman, A. J. An Experimental Study of the Etiology of Rum Fits and Delirium Tremens. *Q. J. Stud. Alcohol* **1955**, *16* (1), 1–33.
- (23) Sakharkar, A. J.; Zhang, H.; Tang, L.; Shi, G.; Pandey, S. C. Histone Deacetylases (HDAC)-Induced Histone Modifications in the Amygdala: A Role in Rapid Tolerance to the Anxiolytic Effects of Ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2012**, *36* (1), 61–71.
- (24) Rainaut, J.; Morenon, J. *L'ALCOOL : ALIBIS ET SOLITUDES. Cours D'alcoologie*; Seli Arslan, 1997.
- (25) Wallner, M.; Hancher, H. J.; Olsen, R. W. Low Dose Acute Alcohol Effects on GABA A Receptor Subtypes. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112* (2), 513–528.
- (26) Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Oldendorf, W. H.; Hill, M. A. Comparison of Lipid-Mediated Blood-Brain-Barrier Penetrability in Neonates and Adults. *Am. J. Physiol.* **1982**, *243* (3), C161-168.
- (27) Haorah, J.; Knipe, B.; Gorantla, S.; Zheng, J.; Persidsky, Y. Alcohol-Induced Blood-Brain Barrier Dysfunction Is Mediated via Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor (IP3R)-Gated Intracellular Calcium Release. *J. Neurochem.* **2007**, *100* (2), 324–336.
- (28) Kauer, J. A.; Malenka, R. C.; Nicoll, R. A. A Persistent Postsynaptic Modification Mediates Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Neuron* **1988**, *1* (10), 911–917.
- (29) Di Chiara, G.; Imperato, A. Ethanol Preferentially Stimulates Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Freely Moving Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *115* (1), 131–132.
- (30) Olds, J.; Milner, P. Positive Reinforcement Produced by Electrical Stimulation of Septal Area and Other Regions of Rat Brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1954**, *47* (6), 419–427.
- (31) Jing, L.; Luo, J.; Zhang, M.; Qin, W.-J.; Li, Y.-L.; Liu, Q.; Wang, Y.-T.; Lawrence, A. J.; Liang, J.-H. Effect of the Histone Deacetylase Inhibitors on Behavioural Sensitization to a Single Morphine Exposure in Mice. *Neurosci. Lett.* **2011**, *494* (2), 169–173.
- (32) Kalda, A.; Heidmets, L.-T.; Shen, H.-Y.; Zharkovsky, A.; Chen, J.-F. Histone Deacetylase Inhibitors Modulates the Induction and Expression of Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization Partially through an Associated Learning of the Environment in Mice. *Behav. Brain Res.* **2007**, *181* (1), 76–84.
- (33) Nestler, E. J. Historical Review: Molecular and Cellular Mechanisms of Opiate and Cocaine Addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25* (4), 210–218.
- (34) Nestler, E. J. Molecular Basis of Long-Term Plasticity Underlying Addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2* (2), 119–128.
- (35) Sanchis-Segura, C.; Lopez-Atalaya, J. P.; Barco, A. Selective Boosting of Transcriptional and Behavioral Responses to Drugs of Abuse by Histone Deacetylase Inhibition. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2009**, *34* (13), 2642–2654.

- (36) Killam, E. K.; Killam, K. F.; Shaw, T. The Effects of Psychotherapeutic Compounds on Central Afferent and Limbic Pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1957**, 66 (3), 784–805.
- (37) Vilpoux, C.; Warnault, V.; Pierrefiche, O.; Daoust, M.; Naassila, M. Ethanol-Sensitive Brain Regions in Rat and Mouse: A Cartographic Review, Using Immediate Early Gene Expression. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2009**, 33 (6), 945–969.
- (38) Taqi, M. M.; Bazov, I.; Watanabe, H.; Sheedy, D.; Harper, C.; Alkass, K.; Druid, H.; Wentzel, P.; Nyberg, F.; Yakovleva, T.; Bakalkin, G. Prodynorphin CpG-SNPs Associated with Alcohol Dependence: Elevated Methylation in the Brain of Human Alcoholics. *Addict. Biol.* **2011**, 16 (3), 499–509.
- (39) Zhou, Z.; Yuan, Q.; Mash, D. C.; Goldman, D. Substance-Specific and Shared Transcription and Epigenetic Changes in the Human Hippocampus Chronically Exposed to Cocaine and Alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108 (16), 6626–6631.
- (40) Botia, B.; Legastelois, R.; Houchi, H.; Naassila, M. Basal Anxiety Negatively Correlates with Vulnerability to Ethanol-Induced Behavioral Sensitization in DBA/2J Mice: Modulation by Diazepam. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2015**, 39 (1), 45–54.
- (41) Nestler, E. J. Molecular Mechanisms of Drug Addiction. *Neuropharmacology* **2004**, 47 Suppl 1, 24–32.
- (42) Pandey, S. C.; Zhang, H.; Roy, A.; Xu, T. Deficits in Amygdaloid cAMP-Responsive Element-Binding Protein Signaling Play a Role in Genetic Predisposition to Anxiety and Alcoholism. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115 (10), 2762–2773.
- (43) Pierrefiche, O.; Daoust, M.; Naassila, M. Biphasic Effect of Acamprosate on NMDA but Not on GABAA Receptors in Spontaneous Rhythmic Activity from the Isolated Neonatal Rat Respiratory Network. *Neuropharmacology* **2004**, 47 (1), 35–45.
- (44) De Sousa, A. The Pharmacotherapy of Alcohol Dependence: A State of the Art Review. *Mens Sana Monogr.* **2010**, 8 (1), 69–82.
- (45) Ooteman, W.; Naassila, M.; Koeter, M. W. J.; Verheul, R.; Schippers, G. M.; Houchi, H.; Daoust, M.; van den Brink, W. Predicting the Effect of Naltrexone and Acamprosate in Alcohol-Dependent Patients Using Genetic Indicators. *Addict. Biol.* **2009**, 14 (3), 328–337.
- (46) Botia, B.; Legastelois, R.; Alaux-Cantin, S.; Naassila, M. Expression of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization Is Associated with Alteration of Chromatin Remodeling in Mice. *PloS One* **2012**, 7 (10), e47527.
- (47) Verheul, R.; van den Brink, W.; Geerlings, P. A Three-Pathway Psychobiological Model of Craving for Alcohol. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* **1999**, 34 (2), 197–222.
- (48) Mason BJ; Salvato FR; Williams LD; Ritvo EC; Cutler RB. A Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Oral Nalmefene for Alcohol Dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* **1999**, 56 (8), 719–724.
- (49) Brown, K. M.; Roy, K. K.; Hockerman, G. H.; Doerksen, R. J.; Colby, D. A. Activation of the γ -Aminobutyric Acid Type B (GABA(B)) Receptor by Agonists and Positive Allosteric Modulators. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (16), 6336–6347.
- (50) Paille, F. Oxybate de Sodium(acide Gamma-Hydroxybutyrique Ou GHB) et Alcool. *Société Française d'Alcoologie*. February 10, 2012, p 21.
- (51) Simon O'Brien, E.; Legastelois, R.; Houchi, H.; Vilpoux, C.; Alaux-Cantin, S.; Pierrefiche, O.; André, E.; Naassila, M. Fluoxetine, Desipramine, and the Dual Antidepressant Milnacipran Reduce Alcohol Self-Administration And/Or Relapse in Dependent Rats. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2011**, 36 (7), 1518–1530.
- (52) Batel, P.; Houchi, H.; Daoust, M.; Ramoz, N.; Naassila, M.; Gorwood, P. A Haplotype of the DRD1 Gene Is Associated with Alcohol Dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2008**, 32 (4), 567–572.

- (53) Houchi, H.; Persyn, W.; Legastelois, R.; Naassila, M. The Adenosine A2A Receptor Agonist CGS 21680 Decreases Ethanol Self-Administration in Both Non-Dependent and Dependent Animals. *Addict. Biol.* **2013**, *18* (5), 812–825.
- (54) Coune, F. Traitement de L'addiction À L'alcool Par La Stimulation Transcrânienne Par Courant Continu (tDCS) : Une Alternative Intéressante À La Pharmacothérapie ?, 2015.
- (55) Brenner, C. Le Rôle Des Méthyltransférases de l'ADN Dans La Régulation Transcriptionnelle, Université libre de Bruxelles, 2005.
- (56) Aimi, D. Les événements épigénétiques dans le mélanome malin, existe-t-il de nouvelles cibles thérapeutiques ? Thèse d'exercice, Université de Reims Champagne-Ardenne: France, 2008.
- (57) Fraga, M. F.; Ballestar, E.; Paz, M. F.; Ropero, S.; Setien, F.; Ballestar, M. L.; Heine-Suñer, D.; Cigudosa, J. C.; Urioste, M.; Benitez, J.; Boix-Chornet, M.; Sanchez-Aguilera, A.; Ling, C.; Carlsson, E.; Poulsen, P.; Vaag, A.; Stephan, Z.; Spector, T. D.; Wu, Y.-Z.; Plass, C.; Esteller, M. Epigenetic Differences Arise during the Lifetime of Monozygotic Twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (30), 10604–10609.
- (58) Dias, B. G.; Ressler, K. J. Parental Olfactory Experience Influences Behavior and Neural Structure in Subsequent Generations. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17* (1), 89–96.
- (59) Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature* **1997**, *389* (6648), 251–260.
- (60) Smith, M. M. Histone Structure and Function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**, *3* (3), 429–437.
- (61) Mottet, D.; Castronovo, V. Les Histones Désacétylases: Nouvelles Cibles Pour Les Thérapies Anti-Cancéreuses. *médecine/sciences* **2008**, *24* (8–9), 742–746.
- (62) Schlissel, M. S. Regulating Antigen-Receptor Gene Assembly. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (11), 890–899.
- (63) Herman, J. G.; Baylin, S. B. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (21), 2042–2054.
- (64) Hsieh, J.; Gage, F. H. Chromatin Remodeling in Neural Development and Plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17* (6), 664–671.
- (65) Fischle, W.; Wang, Y.; Allis, C. D. Histone and Chromatin Cross-Talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15* (2), 172–183.
- (66) Portela, A.; Esteller, M. Epigenetic Modifications and Human Disease. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (10), 1057–1068.
- (67) El Khoury, V.; Dufer, J. Etude de modifications épigénétiques corrélées à l'expression du gène MDR1 et à la texture nucléaire dans des cellules de carcinome pulmonaire H69 sensibles et résistantes à la chimiothérapie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2006.
- (68) Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **2007**, *128* (4), 693–705.
- (69) Lacoste, N.; Côté, J. The epigenetic code of histones. *Médecine Sci. MS* **2003**, *19* (10), 955–959.
- (70) Jenuwein, T.; Allis, C. D. Translating the Histone Code. *Science* **2001**, *293* (5532), 1074–1080.
- (71) Latham, J. A.; Dent, S. Y. R. Cross-Regulation of Histone Modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14* (11), 1017–1024.
- (72) Berger, S. L. Histone Modifications in Transcriptional Regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12* (2), 142–148.
- (73) Kouzarides, T. Histone Methylation in Transcriptional Control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12* (2), 198–209.

- (74) Akbarian, S.; Huang, H.-S. Epigenetic Regulation in Human Brain-Focus on Histone Lysine Methylation. *Biol. Psychiatry* **2009**, *65* (3), 198–203.
- (75) Zhang, Y.; Reinberg, D. Transcription Regulation by Histone Methylation: Interplay between Different Covalent Modifications of the Core Histone Tails. *Genes Dev.* **2001**, *15* (18), 2343–2360.
- (76) Lachner, M.; O’Sullivan, R. J.; Jenuwein, T. An Epigenetic Road Map for Histone Lysine Methylation. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (Pt 11), 2117–2124.
- (77) Ng, S. S.; Yue, W. W.; Oppermann, U.; Klose, R. J. Dynamic Protein Methylation in Chromatin Biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2009**, *66* (3), 407–422.
- (78) Nowak, S. J.; Corces, V. G. Phosphorylation of Histone H3: A Balancing Act between Chromosome Condensation and Transcriptional Activation. *Trends Genet. TIG* **2004**, *20* (4), 214–220.
- (79) Kao, C.-F.; Osley, M. A. In Vivo Assays to Study Histone Ubiquitylation. *Methods San Diego Calif* **2003**, *31* (1), 59–66.
- (80) Zhang, Y. Transcriptional Regulation by Histone Ubiquitination and Deubiquitination. *Genes Dev.* **2003**, *17* (22), 2733–2740.
- (81) Yang, X.-J.; Seto, E. HATs and HDACs: From Structure, Function and Regulation to Novel Strategies for Therapy and Prevention. *Oncogene* **2007**, *26* (37), 5310–5318.
- (82) Ruiz-Carrillo, A.; Wagh, L. J.; Allfrey, V. G. Processing of Newly Synthesized Histone Molecules. *Science* **1975**, *190* (4210), 117–128.
- (83) de Ruijter, A. J. M.; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A. B. P. Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family. *Biochem. J.* **2003**, *370* (Pt 3), 737–749.
- (84) Haigis, M. C.; Guarente, L. P. Mammalian Sirtuins—emerging Roles in Physiology, Aging, and Calorie Restriction. *Genes Dev.* **2006**, *20* (21), 2913–2921.
- (85) Delcuve, G. P.; Khan, D. H.; Davie, J. R. Roles of Histone Deacetylases in Epigenetic Regulation: Emerging Paradigms from Studies with Inhibitors. *Clin. Epigenetics* **2012**, *4* (1), 5.
- (86) Gregoret, I.; Lee, Y.-M.; Goodson, H. V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338* (1), 17–31.
- (87) Broide, R. S.; Redwine, J. M.; Aftahi, N.; Young, W.; Bloom, F. E.; Winrow, C. J. Distribution of Histone Deacetylases 1-11 in the Rat Brain. *J. Mol. Neurosci. MN* **2007**, *31* (1), 47–58.
- (88) Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. Structures of a Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors. *Nature* **1999**, *401* (6749), 188–193.
- (89) Wang, D.-F.; Wiest, O.; Helquist, P.; Lan-Hargest, H.-Y.; Wiech, N. L. On the Function of the 14 Å Long Internal Cavity of Histone Deacetylase-Like Protein: Implications for the Design of Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (13), 3409–3417.
- (90) Wang, D. Computational Studies on the Histone Deacetylases and the Design of Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9* (3), 241–256.
- (91) Di Micco, S.; Chini, M. G.; Terracciano, S.; Bruno, I.; Riccio, R.; Bifulco, G. Structural Basis for the Design and Synthesis of Selective HDAC Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (13), 3795–3807.
- (92) Bertrand, P. Inside HDAC with HDAC Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (6), 2095–2116.
- (93) Chen, K.; Zhang, X.; Wu, Y.-D.; Wiest, O. Inhibition and Mechanism of HDAC8 Revisited. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (33), 11636–11643.

- (94) Wu, R.; Wang, S.; Zhou, N.; Cao, Z.; Zhang, Y. A Proton-Shuttle Reaction Mechanism for Histone Deacetylase 8 and the Catalytic Role of Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (27), 9471–9479.
- (95) Corminboeuf, C.; Hu, P.; Tuckerman, M. E.; Zhang, Y. Unexpected Deacetylation Mechanism Suggested by a Density Functional Theory QM/MM Study of Histone-Deacetylase-like Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (14), 4530–4531.
- (96) Wang, G. G.; Allis, C. D.; Chi, P. Chromatin Remodeling and Cancer, Part I: Covalent Histone Modifications. *Trends Mol. Med.* **2007**, *13* (9), 363–372.
- (97) Rothhammer, T.; Bosserhoff, A.-K. Epigenetic Events in Malignant Melanoma. *Pigment Cell Res.* **2007**, *20* (2), 92–111.
- (98) Saha, R. N.; Pahan, K. HATs and HDACs in Neurodegeneration: A Tale of Disconcerted Acetylation Homeostasis. *Cell Death Differ.* **2006**, *13* (4), 539–550.
- (99) Renthal, W.; Nestler, E. J. Histone Acetylation in Drug Addiction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, *20* (4), 387–394.
- (100) Rogge, G. A.; Wood, M. A. The Role of Histone Acetylation in Cocaine-Induced Neural Plasticity and Behavior. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2013**, *38* (1), 94–110.
- (101) McQuown, S. C.; Wood, M. A. Epigenetic Regulation in Substance Use Disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* **2010**, *12* (2), 145–153.
- (102) Robison, A. J.; Nestler, E. J. Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12* (11), 623–637.
- (103) Pandey, S. C.; Ugale, R.; Zhang, H.; Tang, L.; Prakash, A. Brain Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Alcoholism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2008**, *28* (14), 3729–3737.
- (104) Krishnan, H. R.; Sakharkar, A. J.; Teppen, T. L.; Berkel, T. D. M.; Pandey, S. C. The Epigenetic Landscape of Alcoholism. *Int. Rev. Neurobiol.* **2014**, *115*, 75–116.
- (105) Pal-Bhadra, M.; Bhadra, U.; Jackson, D. E.; Mamatha, L.; Park, P.-H.; Shukla, S. D. Distinct Methylation Patterns in Histone H3 at Lys-4 and Lys-9 Correlate with up- & down-Regulation of Genes by Ethanol in Hepatocytes. *Life Sci.* **2007**, *81* (12), 979–987.
- (106) Lee, Y. J.; Shukla, S. D. Histone H3 Phosphorylation at Serine 10 and Serine 28 Is Mediated by p38 MAPK in Rat Hepatocytes Exposed to Ethanol and Acetaldehyde. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *573* (1–3), 29–38.
- (107) Warnault, V.; Darcq, E.; Levine, A.; Barak, S.; Ron, D. Chromatin Remodeling--a Novel Strategy to Control Excessive Alcohol Drinking. *Transl. Psychiatry* **2013**, *3*, e231.
- (108) Kumar, A.; Choi, K.-H.; Renthal, W.; Tsankova, N. M.; Theobald, D. E. H.; Truong, H.-T.; Russo, S. J.; Laplant, Q.; Sasaki, T. S.; Whistler, K. N.; Neve, R. L.; Self, D. W.; Nestler, E. J. Chromatin Remodeling Is a Key Mechanism Underlying Cocaine-Induced Plasticity in Striatum. *Neuron* **2005**, *48* (2), 303–314.
- (109) Renthal, W.; Maze, I.; Krishnan, V.; Covington, H. E.; Xiao, G.; Kumar, A.; Russo, S. J.; Graham, A.; Tsankova, N.; Kippin, T. E.; Kerstetter, K. A.; Neve, R. L.; Haggarty, S. J.; McKinsey, T. A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E. N.; Nestler, E. J. Histone Deacetylase 5 Epigenetically Controls Behavioral Adaptations to Chronic Emotional Stimuli. *Neuron* **2007**, *56* (3), 517–529.
- (110) Romieu, P.; Host, L.; Gobaille, S.; Sandner, G.; Aunis, D.; Zwiller, J. Histone Deacetylase Inhibitors Decrease Cocaine But Not Sucrose Self-Administration in Rats. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (38), 9342–9348.
- (111) Sun, J.; Wang, L.; Jiang, B.; Hui, B.; Lv, Z.; Ma, L. The Effects of Sodium Butyrate, an Inhibitor of Histone Deacetylase, on the Cocaine- and Sucrose-Maintained Self-Administration in Rats. *Neurosci. Lett.* **2008**, *441* (1), 72–76.

- (112) Malvaez, M.; Sanchis-Segura, C.; Vo, D.; Lattal, K. M.; Wood, M. A. Modulation of Chromatin Modification Facilitates Extinction of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference. *Biol. Psychiatry* **2010**, *67* (1), 36–43.
- (113) Wang, R.; Zhang, Y.; Qing, H.; Liu, M.; Yang, P. The Extinction of Morphine-Induced Conditioned Place Preference by Histone Deacetylase Inhibition. *Neurosci. Lett.* **2010**, *483* (2), 137–142.
- (114) Simon-O'Brien, E.; Alaux-Cantin, S.; Warnault, V.; Buttolo, R.; Naassila, M.; Vilpoux, C. The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Decreases Excessive Ethanol Intake in Dependent Animals. *Addict. Biol.* **2014**.
- (115) Pandey, S. C.; Sakharkar, A. J.; Tang, L.; Zhang, H. Potential Role of Adolescent Alcohol Exposure-Induced Amygdaloid Histone Modifications in Anxiety and Alcohol Intake during Adulthood. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *82*, 607–619.
- (116) SFA - Société Française d'Alcoologie
<http://www.sfalcoologie.asso.fr/page.php?choix=abstract&menu=archive&action=detail&id=68> (accessed Jun 16, 2016).
- (117) Arora, D. S.; Nimitvilai, S.; Teppen, T. L.; McElvain, M. A.; Sakharkar, A. J.; You, C.; Pandey, S. C.; Brodie, M. S. Hyposensitivity to Gamma-Aminobutyric Acid in the Ventral Tegmental Area during Alcohol Withdrawal: Reversal by Histone Deacetylase Inhibitors. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2013**, *38* (9), 1674–1684.
- (118) Agudelo, M.; Figueroa, G.; Parira, T.; Yndart, A.; Muñoz, K.; Atluri, V.; Samikkannu, T.; Nair, M. P. Profile of Class I Histone Deacetylases (HDAC) by Human Dendritic Cells after Alcohol Consumption and In Vitro Alcohol Treatment and Their Implication in Oxidative Stress: Role of HDAC Inhibitors Trichostatin A and Mocetinostat. *PloS One* **2016**, *11* (6), e0156421.
- (119) Kruh, J. Effects of Sodium Butyrate, a New Pharmacological Agent, on Cells in Culture. *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *42* (2), 65–82.
- (120) Harrison, I. F.; Dexter, D. T. Epigenetic Targeting of Histone Deacetylase: Therapeutic Potential in Parkinson's Disease? *Pharmacol. Ther.* **2013**, *140* (1), 34–52.
- (121) Sanchis-Segura, C.; Spanagel, R. Behavioural Assessment of Drug Reinforcement and Addictive Features in Rodents: An Overview. *Addict. Biol.* **2006**, *11* (1), 2–38.
- (122) Gryder, B. E.; Sodji, Q. H.; Oyeler, A. K. Targeted Cancer Therapy: Giving Histone Deacetylase Inhibitors All They Need to Succeed. *Future Med. Chem.* **2012**, *4* (4), 505–524.
- (123) Bieliauskas, A. V.; Pflum, M. K. H. Isoform-Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (7), 1402–1413.
- (124) Sharma, S.; Taliyan, R. Transcriptional Dysregulation in Huntington's Disease: The Role of Histone Deacetylases. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 157–169.
- (125) Candido, E. P.; Reeves, R.; Davie, J. R. Sodium Butyrate Inhibits Histone Deacetylation in Cultured Cells. *Cell* **1978**, *14* (1), 105–113.
- (126) Davie, J. R. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *J. Nutr.* **2003**, *133* (7), 2485S–2493S.
- (127) Boffa, L. C.; Vidali, G.; Mann, R. S.; Allfrey, V. G. Suppression of Histone Deacetylation in Vivo and in Vitro by Sodium Butyrate. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253* (10), 3364–3366.
- (128) Sodium Butyrate For Improving Cognitive Function In Schizophrenia - Full Text View
- ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02654405?term=%22sodium+Butyrate%22&hase=0123&rank=1> (accessed Jul 6, 2016).
- (129) Huber, K.; Doyon, G.; Plaks, J.; Fyne, E.; Mellors, J. W.; Sluis-Cremer, N. Inhibitors of Histone Deacetylases: Correlation between Isoform Specificity and Reactivation of

- HIV Type 1 (HIV-1) from Latently Infected Cells. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (25), 22211–22218.
- (130) Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P. Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (31), 10842–10846.
- (131) Balasubramanian, S.; Ramos, J.; Luo, W.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Buggy, J. J. A Novel Histone Deacetylase 8 (HDAC8)-Specific Inhibitor PCI-34051 Induces Apoptosis in T-Cell Lymphomas. *Leukemia* **2008**, 22 (5), 1026–1034.
- (132) Khan, N.; Jeffers, M.; Kumar, S.; Hackett, C.; Boldog, F.; Khramtsov, N.; Qian, X.; Mills, E.; Berghs, S. C.; Carey, N.; Finn, P. W.; Collins, L. S.; Tumber, A.; Ritchie, J. W.; Jensen, P. B.; Lichenstein, H. S.; Sehested, M. Determination of the Class and Isoform Selectivity of Small-Molecule Histone Deacetylase Inhibitors. *Biochem. J.* **2008**, 409 (2), 581.
- (133) Belinostat in Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00865969?term=Belinostat&phase=1&rank=2>
 (accessed Jul 6, 2016).
- (134) LBH589 Alone or in Combination With Erythropoietin Stimulating Agents (ESA) in Patients With Low or Int-1 Risk MDS - Full Text View - ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01034657?term=Panobinostat&phase=3&rank=1>
 (accessed Jul 6, 2016).
- (135) Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both in Vivo and in Vitro by Trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265 (28), 17174–17179.
- (136) Shen, S.; Kozikowski, A. P. Why Hydroxamates May Not Be the Best Histone Deacetylase Inhibitors-What Some May Have Forgotten or Would Rather Forget? *Chem Med Chem* **2016**, 11 (1), 15–21.
- (137) Marks, P. A.; Miller, T.; Richon, V. M. Histone Deacetylases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, 3 (4), 344–351.
- (138) Baud, M. G. J.; Leiser, T.; Petrucci, V.; Gunaratnam, M.; Neidle, S.; Meyer-Almes, F.-J.; Fuchter, M. J. Thioester Derivatives of the Natural Product Psammaphin A as Potent Histone Deacetylase Inhibitors. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 81–88.
- (139) Gemcitabine With or Without CI-994 in Treating Patients With Advanced Pancreatic Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00004861?term=Tacedinaline&rank=3>
 (accessed Jul 6, 2016).
- (140) Malvaez, M.; McQuown, S. C.; Rogge, G. A.; Astarabadi, M.; Jacques, V.; Carreiro, S.; Rusche, J. R.; Wood, M. A. HDAC3-Selective Inhibitor Enhances Extinction of Cocaine-Seeking Behavior in a Persistent Manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110 (7), 2647–2652.
- (141) Safety and Efficacy Study of a New Chemotherapy Agent to Treat Metastatic Melanoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00185302?term=MS-275&phase=1&rank=8>
 (accessed Jul 6, 2016).
- (142) Study of MGCD0103 (MG-0103) in Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00358982?term=Mocetinostat&cond=%22Hodgkin+Lymphoma%22&rank=2>
 (accessed Jul 6, 2016).
- (143) Beckers, T.; Burkhardt, C.; Wieland, H.; Gimmnich, P.; Ciossek, T.; Maier, T.; Sanders, K. Distinct Pharmacological Properties of Second Generation HDAC Inhibitors with the Benzamide or Hydroxamate Head Group. *Int. J. Cancer* **2007**, 121 (5), 1138–1148.

- (144) Augé, F.; Hornebeck, W.; Decarme, M.; Laronze, J.-Y. Improved Gelatinase a Selectivity by Novel Zinc Binding Groups Containing Galardin Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (10), 1783–1786.
- (145) Craik, D. J. Seamless Proteins Tie Up Their Loose Ends. *Science* **2006**, *311* (5767), 1563–1564.
- (146) Vickers, C. J.; Olsen, C. A.; Leman, L. J.; Ghadiri, M. R. Discovery of HDAC Inhibitors That Lack an Active Site Zn²⁺-Binding Functional Group. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (6), 505–508.
- (147) Furumai, R.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. Potent Histone Deacetylase Inhibitors Built from Trichostatin A and Cyclic Tetrapeptide Antibiotics Including Trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (1), 87–92.
- (148) Newkirk, T. L.; Bowers, A. A.; Williams, R. M. Discovery, Biological Activity, Synthesis and Potential Therapeutic Utility of Naturally Occurring Histone Deacetylase Inhibitors. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26* (10), 1293–1320.
- (149) Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugita, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T. Trapoxin, an Antitumor Cyclic Tetrapeptide, Is an Irreversible Inhibitor of Mammalian Histone Deacetylase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (30), 22429–22435.
- (150) Williams, R. M.; Bradner, J. E.; Bowers, A.; Newkirk, T.; Wiest, O. G. Method for Preparing Largazole Analogs and Uses Thereof. US2009050878.
- (151) Ganesan, A.; Packham, G. K.; Yurek-George, A.; Cecil, A. R. L. FK 228 Derivates as HDAC Inhibitors. US20090131390.
- (152) Yao, Y.; Tu, Z.; Liao, C.; Wang, Z.; Li, S.; Yao, H.; Li, Z.; Jiang, S. Discovery of Novel Class I Histone Deacetylase Inhibitors with Promising in Vitro and in Vivo Antitumor Activities. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (19), 7672–7680.
- (153) Furumai, R.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K.-H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; Tanaka, A.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. FK228 (Depsipeptide) as a Natural Prodrug That Inhibits Class I Histone Deacetylases. *Cancer Res.* **2002**, *62* (17), 4916–4921.
- (154) A Trial of Romidepsin for Progressive or Relapsed Peripheral T-cell Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00426764?term=FK228&phase=1&rank=12>
(accessed Jul 6, 2016).
- (155) Ying, Y.; Liu, Y.; Byeon, S. R.; Kim, H.; Luesch, H.; Hong, J. Synthesis and Activity of Largazole Analogues with Linker and Macrocyclic Modification. *Org. Lett.* **2008**, *10* (18), 4021–4024.
- (156) Bowers, A. A.; West, N.; Newkirk, T. L.; Troutman-Youngman, A. E.; Schreiber, S. L.; Wiest, O.; Bradner, J. E.; Williams, R. M. Synthesis and Histone Deacetylase Inhibitory Activity of Largazole Analogs: Alteration of the Zinc-Binding Domain and Macrocyclic Scaffold. *Org. Lett.* **2009**, *11* (6), 1301–1304.
- (157) Yurek-George, A.; Cecil, A. R. L.; Mo, A. H. K.; Wen, S.; Rogers, H.; Habens, F.; Maeda, S.; Yoshida, M.; Packham, G.; Ganesan, A. The First Biologically Active Synthetic Analogues of FK228, the Depsipeptide Histone Deacetylase Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (23), 5720–5726.
- (158) Ni, M.; Esposito, E.; Raj, V. P.; Muzi, L.; Zunino, F.; Zuco, V.; Cominetti, D.; Penco, S.; Dal Pozzo, A. New Macrocyclic Analogs of the Natural Histone Deacetylase Inhibitor FK228; Design, Synthesis and Preliminary Biological Evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (21), 6785–6793.
- (159) Bowers, A. A.; Greshock, T. J.; West, N.; Estiu, G.; Schreiber, S. L.; Wiest, O.; Williams, R. M.; Bradner, J. E. Synthesis and Conformation–Activity Relationships of the Peptide Isosteres of FK228 and Largazole. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (8), 2900–2905.

- (160) Ledour, G.; Moroy, G.; Rouffet, M.; Bourguet, E.; Guillaume, D.; Decarme, M.; Elmourabit, H.; Augé, F.; Alix, A. J. P.; Laronze, J.-Y.; Bellon, G.; Hornebeck, W.; Sapi, J. Introduction of the 4-(4-Bromophenyl)benzenesulfonyl Group to Hydrazide Analogs of Ilomastat Leads to Potent Gelatinase B (MMP-9) Inhibitors with Improved Selectivity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (18), 8745–8759.
- (161) Schobert, R.; Jagusch, C. An Efficient Synthesis of Carlosic Acid and Other 5-Carboxymethyltetronates from Malates. *Synthesis* **2005**, No. 14, 2421–2425.
- (162) Zhang, D.-W.; Luo, Z.; Liu, G.-J.; Weng, L.-H. α N–O Turn Induced by Fluorinated α -Aminoxy Diamide: Synthesis and Conformational Studies. *Tetrahedron* **2009**, *65* (48), 9997–10001.
- (163) Arencibia-Mohar, A.; Ariosa-Alvarez, A.; Madrazo-Alonso, O.; González Abreu, E.; García-Imia, L.; Sierra-González, G.; Verež-Bencomo, V. Synthesis of Terminal Disaccharide Elements Corresponding to the Ogawa and Inaba Antigenic Determinant from *Vibrio Cholerae* O1. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306* (1–2), 163–170.
- (164) Huang, Y.; Zhang, Y.-B.; Chen, Z.-C.; Xu, P.-F. A Concise Synthesis of (R)- and (S)- α -Alkyl Isoserines from D- and L-Malic Acids. *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, *17* (22), 3152–3157.
- (165) Burova, S. A.; McDonald, F. E. Total Synthesis of the Polyene-Polyol Macrolide RK-397, Featuring Cross-Couplings of Alkynylepoxy Modules. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (8), 2495–2500.
- (166) Gennari, C.; Mielgo, A.; Potenza, D.; Scolastico, C.; Piarulli, U.; Manzoni, L. Solid-Phase Synthesis of Peptides Containing Reverse-Turn Mimetic Bicyclic Lactams. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *1999* (2), 379–388.
- (167) Cadran, N. Fluoration Nucléophile D'alcools et de Composés Carbonylés. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 2006.
- (168) Williams, D. R.; Lowder, P. D.; Gu, Y.-G.; Brooks, D. A. Studies of Mild Dehydrogenations in Heterocyclic Systems. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (3), 331–334.
- (169) Seiser, T.; Kamena, F.; Cramer, N. Synthesis and Biological Activity of Largazole and Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (34), 6483–6485.
- (170) Hui, R. A.; Sigler, G. F.; Root, R. T.; Yuan, W. Saquinavir Derivatives Useful in Immunoassay. US6992177 B1.
- (171) Appel, R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P–N Linkage. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14* (12), 801–811.
- (172) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17* (7), 522–524.
- (173) Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (10), 4397–4398.
- (174) White, C. J.; Yudin, A. K. A Versatile Scaffold for Site-Specific Modification of Cyclic Tetrapeptides. *Org. Lett.* **2012**, *14* (11), 2898–2901.
- (175) Malešević, M.; Strijowski, U.; Bächle, D.; Sewald, N. An Improved Method for the Solution Cyclization of Peptides under Pseudo-High Dilution Conditions. *J. Biotechnol.* **2004**, *112* (1–2), 73–77.
- (176) Villadsen, J. S.; Stephansen, H. M.; Maolanon, A. R.; Harris, P.; Olsen, C. A. Total Synthesis and Full Histone Deacetylase Inhibitory Profiling of Azumamides A–E as Well as β 2-Epi-Azumamide E and β 3-Epi-Azumamide E. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (16), 6512–6520.
- (177) Wise, R. A. Voluntary Ethanol Intake in Rats Following Exposure to Ethanol on Various Schedules. *Psychopharmacologia* **1973**, *29* (3), 203–210.
- (178) Simms, J. A.; Steensland, P.; Medina, B.; Abernathy, K. E.; Chandler, L. J.; Wise, R.; Bartlett, S. E. Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long–Evans and Wistar Rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2008**, *32* (10), 1816–1823.

- (179) Carnicella, S.; Amamoto, R.; Ron, D. Excessive Alcohol Consumption Is Blocked by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Alcohol Fayettev. N* **2009**, *43* (1), 35–43.
- (180) Jeanblanc, J.; Logrip, M. L.; Janak, P. H.; Ron, D. BDNF-Mediated Regulation of Ethanol Consumption Requires the Activation of the MAP Kinase Pathway and Protein Synthesis. *Eur. J. Neurosci.* **2013**, *37* (4), 607–612.
- (181) Jeanblanc, J.; He, D.-Y.; McGough, N. N. H.; Logrip, M. L.; Phamluong, K.; Janak, P. H.; Ron, D. The Dopamine D3 Receptor Is Part of a Homeostatic Pathway Regulating Ethanol Consumption. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2006**, *26* (5), 1457–1464.
- (182) Jeanblanc, J.; He, D.-Y.; Carnicella, S.; Kharazia, V.; Janak, P. H.; Ron, D. Endogenous BDNF in the Dorsolateral Striatum Gates Alcohol Drinking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2009**, *29* (43), 13494–13502.
- (183) Alaux-Cantin, S.; Warnault, V.; Legastelois, R.; Botia, B.; Pierrefiche, O.; Vilpoux, C.; Naassila, M. Alcohol Intoxications during Adolescence Increase Motivation for Alcohol in Adult Rats and Induce Neuroadaptations in the Nucleus Accumbens. *Neuropharmacology* **2013**, *67*, 521–531.

SYNTHÈSES DE NOUVEAUX INHIBITEURS DES HISTONES DÉACÉTYLASES ET LEUR INTÉRÊT DANS UN MODÈLE PRÉCLINIQUE D'ADDICTION À L'ALCOOL

Le déséquilibre HAT/HDAC aurait une influence sur le développement de certains cancers ainsi que dans l'addiction à l'alcool ou à la cocaïne. En inhibant les histones désacétylases, le taux d'acétylation de la chromatine augmente ce qui permet l'accès aux facteurs de transcription et l'expression des gènes. Aujourd'hui, il existe de nombreux inhibiteurs d'HDAC de structures diverses, mais ils ne sont pas spécifiques et présentent des effets secondaires importants. Les inhibiteurs d'HDAC comme le butyrate de sodium ou le MS-275 ont montré une modification de la dépendance à l'alcool chez le rat. MS-275 inhibe principalement la classe I de HDAC et conformément à ces observations nous nous intéressons aux inhibiteurs les plus sélectifs de la classe I tels que le largazole thiol et le RedFK228. Notre but est de synthétiser de nouveaux cyclodepsipeptides analogues afin d'obtenir un inhibiteur sélectif de la classe I. Les HDAC de la classe I sont Zn-dépendants, ces analogues auront un groupement sulfonylhydrazide ayant une bonne affinité pour l'ion Zn^{2+} (ZBG). Il sera relié au cyclodepsipeptide par un bras espaceur dont la longueur sera adaptée ($n = 2, 3$). Une autre pharmacomodulation concerne l'incorporation d'hétérocycles différents (oxazole, thiazole et pyridine). Les inhibitions de ces composés ont pu être testées sur HDAC1, HDAC3 et HDAC6. Un composé a une spécificité pour HDAC3 tandis que l'autre a une spécificité pour HDAC1. Les tests sur des rats "gros buveurs" permettent de penser que HDAC1 est impliquée dans ce modèle de consommation et non HDAC3.

Inhibiteur, HDAC, addiction, alcool, cyclodepsipeptide, sulfonylhydrazide.

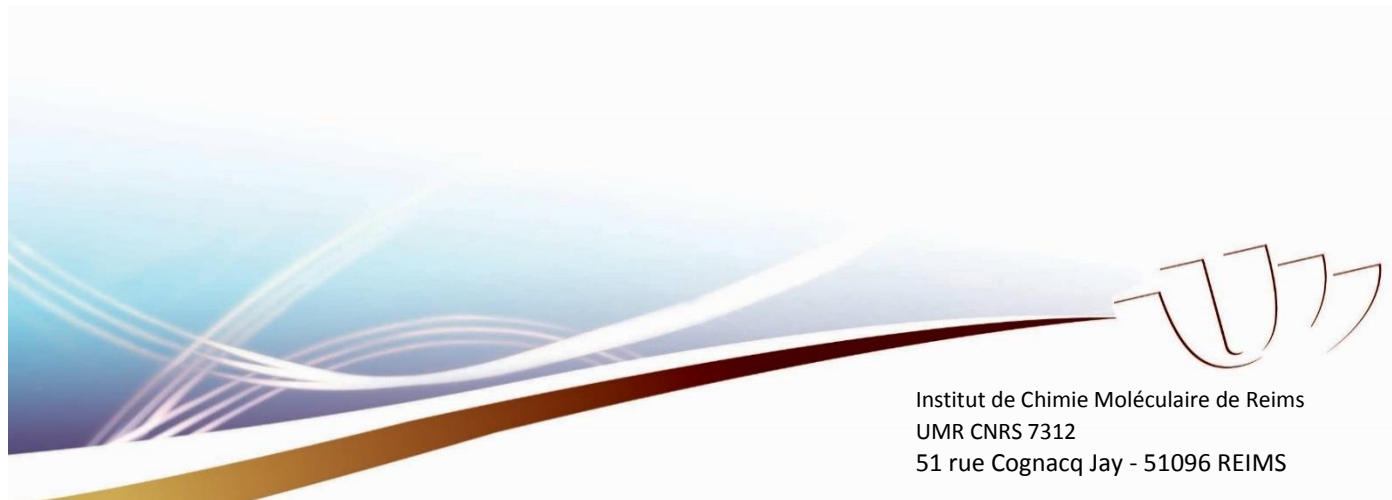
SYNTHESIS OF THE NEW INTEREST HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS IN A PRECLINICAL MODEL OF ADDICTION TO ALCOHOL

The imbalance HAT/HDAC would influence the development of cancers and alcohol or cocaine addiction. HDAC inhibition allows increase of both acetylation rate and gene expression. Today, there are many structurally diverse potent, but non-specific HDAC inhibitors displaying important side-effects. HDAC inhibitors such as sodium butyrate or MS-275 have been shown to alter the alcohol dependence in the rat. MS-275 inhibits mainly class I of HDAC and in line with these observations we are interested in more selective class I inhibitors such as largazole thiol and RedFK228. Our purpose is to synthesize new cyclodepsipeptides analogues in order to obtain selective class I inhibitor. HDAC class I is a Zn-dependent enzyme and our target molecules have sulfonylhydrazide function as efficient Zinc binding group (ZBG). Additional pharmacomodulations concern the incorporation of different heterocycles (oxazole, thiazole, pyridine) and varying linker lengths ($n = 2, 3$). Inhibitions of these compounds have been tested on HDAC1, HDAC3 and HDAC6. A compound has specificity for HDAC3 and another has specificity for HDAC1. Tests on rats "binger" suggest that HDAC1 is involved in this model of consumption and not HDAC3.

Inhibitor, HDAC, addiction, alcohol, cyclodepsipeptide, sulfonylhydrazide.

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Sciences du médicament



Institut de Chimie Moléculaire de Reims
UMR CNRS 7312
51 rue Cognacq Jay - 51096 REIMS