



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS SETIF 1

FACULTE DE TECHNOLOGIE

Département de Génie des Procédés

THÈSE

Présentée par **Amel DJEHAL**

Pour l'obtention du grade de

Docteur en sciences

Option: GENIE DES PROCEDES PHARMACEUTIQUES

THEME

Synthèse de ligands promélanogéniques des prohibitines

Soutenue le, 03 Mars 2019 devant le jury:

| | | | |
|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| BAITICHE Milad | Professeur | Univ.Setif 1 | Présidente |
| BENTOUHAMI Embarek | Professeur | Univ.Setif 1 | Directeur de thèse |
| DESAUBRY Laurent | Dir. Recherche CNRS | Univ.Strasbourg | Co-Directeur |
| BELHAMEL Kamel | Professeur | Univ.Bedjaia | Examineur |
| SOBHI Widad | MCA | Univ.Setif 1 | Examinatrice |
| BENMEKHBI Lotfi | MCA | Univ.Constantine 3 | Examineur |
| GALONS Hervé | Professeur | Univ.Paris Descartes | Membre invité |

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents pour leur amour inconditionnel, leur confiance, leur soutien, leurs encouragements pendant ces longues années d'études. Grace à leur présence, leur grande patience, leur compréhension, leur générosité, j'ai pu aller au bout de mes rêves.

Il me sera impossible de rendre tout ce qu'ils m'ont offert. Rien n'aurait été possible sans eux. Cette réussite est donc la leur avant qu'elle soit la mienne.

Aucun remerciement ne pourrait être suffisant.

A mes nièces, Emilie et Elena. Que ce modeste travail soit l'expression des vœux que vous n'aviez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous protège et préserve santé et longue vie.

A mes sœurs Nardjes, Lilia et Amira pour l'amour, l'aide et le soutien qu'elles m'ont toujours apporté aussi bien dans les moments difficiles que radieux.

Je vous aime.

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Chimie - Ingénierie des Matériaux et Nanostructures de la faculté de génie des procédés de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1 sous la direction du Professeur Embarek BENTOUHAMI et du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg sous la direction du Docteur Laurent DESAUBRY.

Mes remerciements s'adressent au Professeur Embarek BENTOUHAMI, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré, dirigé, orienté durant toutes ces années où j'ai travaillé avec lui. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet d'intérêt majeur pour le laboratoire, et d'avoir été un deuxième père pour moi. Merci pour son aide précieuse, son soutien, sa disponibilité et ses encouragements qui m'ont fait apprécier le monde de la recherche.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance envers le Docteur Laurent DESAUBRY, Directeur de recherches au CNRS Strasbourg et chef d'équipe au Laboratoire d'Innovation Thérapeutique à la Faculté de pharmacie de d'Illkirch. Merci de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant ces années, de m'avoir fait confiance, et de m'avoir encadré. Je le remercie également pour ses connaissances, ses conseils, sa grande disponibilité, pour tous les moments passés à discuter du projet et pour la valorisation de mon travail. Merci aussi pour la sympathie qu'il m'a témoignée au cours de toutes ces années de thèse.

Mes remerciements s'adressent également au professeur Milad BAITICHE, du département de Génie des procédés de la faculté de technologie de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté de présider ce jury. Qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance.

Merci au Professeur Widad SOBHI de la faculté de Biologie de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1 et au Professeur Kamel BELHAMEL de l'Université Abderahmane Mira de Bedjaia d'avoir bien voulu évaluer ce manuscrit de thèse et l'enrichir par leurs recommandations pertinentes.

Toute ma gratitude au Professeur Hervé GALONS, de l'Université Paris Descartes d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche et d'apporter les corrections nécessaires.

Je voudrais enfin exprimer ma reconnaissance au Docteur Lotfi BELMOKHBI, du Département de génie des procédés de l'Université Constantine 3 pour avoir eu l'amabilité de consacrer son temps à l'examen de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier mes amies et collègues au laboratoire, le Docteur Qian ZAHO, Christine BASMADJIAN pour l'aide qu'elles m'ont apporté, pour leur motivation, leur disponibilité, leurs encouragements. Merci aussi pour leur bonne humeur de tous ces bons moments et pour le temps passé à mener à bien mes travaux. Ce fut un plaisir de travailler à leur côté.

Je remercie chaleureusement les thésards, les stagiaires et post-doc côtoyés pendant ces années, compagnons de fortune mais aussi d'infortune dans notre quotidien de « chercheur » : Sabira, Redouane, Hussein, Laura, Fabrice, Hassan, Jordan, Fun. Merci pour votre compagnie au laboratoire. Merci pour toutes ces discussions, plus ou moins chimiques selon les intervenants et les circonstances...

Merci aussi à tous les thésards et membres des autres laboratoires que j'ai eu l'occasion de rencontrer et avec qui j'ai eu le plaisir de passer ces années.

J'adresse mes sincères remerciements au Service Commun d'Analyse de la Faculté de Pharmacie d'Illkirch.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes amis : Jean Luc, Barbara, Akiko pour leur soutien permanent.

Je tiens à remercier le Professeur Eric RAYMOND (Chef de service en Oncologie Médicale chez Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Paris), le Professeur Ghanem Elias GHANEM (Directeur du Laboratoire d'Oncologie et de Chirurgie Expérimentale du centre oncologique Jules Bordet et Professeur de Radiopharmacologie et de Médecine Nucléaire au Centre Hospitalier Universitaire de Bruxelles), le docteur Mohammad KRAYEM de l'équipe du professeur Ghanem GHANEM d'avoir testé mes produits.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au professeur Thierry CRISTEIL (IPST, Faculté de pharmacie, Université Paris Sud), le docteur Canan G.NEBIGIL (UMR7242, CNRS/Université de Strasbourg, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, laboratoire de Biomolécules, Université de Sorbonne, Paris), le professeur Dong WANG et le professeur Peng YU (Sino-French Joint Lab of Food Nutrition /Safety and medicinal Chemistry. College de Biotechnologie, Université de science et de technologie de Tianjin, Chine).

Finalement, je remercie mon ancien directeur le Professeur BOUSSEBOUA, mon nouveau directeur le Professeur KHLIFI (Directeur de L'ENSB Constantine), Monsieur Reda BENMOURALLAH (Directeur du CACQE de Constantine), et tous mes anciens collègues du CACQE, pour leur sympathie et leurs encouragements.

Liste des abbreviations

| | | | |
|---------|-------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------|
| Å | Angström | eq. | équivalent |
| Ac | Acétyle | ESIPT | Transfert de proton à l'état excité |
| AcOEt | Acétate d'éthyle | | |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique | ESI-TOF | Electron spray ionisation-time of flight |
| ARN | Acide Ribonucléique | Et | éthyle |
| AIF | Apoptosis Inducing Factor | EtOM | éthoxyméthyle |
| Ar | Aryle | FL | Flavagline |
| DIPEA | <i>N,N</i> -diisopropyl éthylamine | FT-IR | Infrarouge à transformée de Fourier |
| Bn | Benzyle | | |
| n-BuLi | n-butyllithium | HOBt | Hydroxybenzotriazole |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-ène | HMPA | Hexaméthylphosphoramide |
| DCC | <i>N,N'</i> -dicyclohexyl carbodiimide | HRMS | Spectre de masse haute-résolution |
| DDQ | 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone | Hsp | Heat shock protein |
| DIAD | Diisopropyl azodicarboxylate | | |
| DIBAL-H | Hydruce de diisobutylaluminium | Im | Imidazole |
| DMDO | diméthylidioxirane | i.p. | Intrapéritonéale |
| DME | 1,2-diméthoxyéthane | IR | Infrarouge |
| EDCI | 1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl) carbodiimide | i.v. | Intraveineuse |
| EDTA | Ethylène diamine tétra acétate | LDA | Diisopropylamidure de lithium |
| eIF4 | Eukaryotic initiation factors | mCPBA | Acide 3-chloropéroxybenzoïque |
| | | Me | Méthyle |
| | | NBS | <i>N</i> -bromosuccinimide |
| | | NI | pas d'inhibition à la concentration maximale testée |

| | | | |
|-------|-----------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------|
| NMO | <i>N</i> -oxyde de <i>N</i> -méthylmorpholine | TBAF | Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium |
| NMP | <i>N</i> -méthylpyrrolidone | TBS | <i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle |
| Pd/C | Palladium sur charbon | TBSOTf | Tributylsilyle trifluoro méthanesulfonate |
| Ph | Phényle | Tf | Trifluorométhanesulfonyle |
| PhMe | Toluène | TFA | Acide trifluoroacétique |
| PMBCl | Chlorure de para-méthoxybenzyle | TFE | Trifluoroéthanol |
| Piv | Pivaloyle | THF | Tétrahydrofurane |
| Rdt | Rendement | TMS | Triméthylsilyle |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire | TMSNCO | Isocyanate de triméthylsilyle |
| ROS | Espèces oxygénées réactives | Ts | Tosyle |
| SIRNA | Petit ARN d'interférence | <i>p</i> -TsOH | Acide para-toluène sulfonique |
| TA | Température ambiante | | |

Liste des tableaux

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1. Directives recommandées pour les propriétés des sondes chimiques..... | 5 |
| Tableau 2. Cytotoxicité dans les cellules HCT15 (IC ₅₀ , nM)..... | 7 |
| Tableau 3. Relation structure-activité de la mélanogénine et de ses analogues..... | 8 |
| Tableau 4. Essais d'oxydation du composé 9..... | 35 |
| Tableau 5. Les analogues 16a synthétisés..... | 39 |
| Tableau 6. Les analogues 16b synthétisés..... | 40 |
| Tableau 7. Les analogues 16c synthétisés..... | 41 |
| Tableau 8. Les analogues 16d synthétisés..... | 42 |
| Tableau 9. Les analogues 16e synthétisés..... | 44 |
| Tableau10. Pourcentage d'induction de la mélanogénèse dans la lignée de cellules de mélanome humain HBL..... | 47 |
| Tableau 11. Pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire par la mélanogénine à 10 ⁻⁵ et 10 ⁻⁶ M sur différentes lignées cellulaires cancéreuses dans le DMSO, mesuré après 72h d'exposition..... | 62 |
| Tableau 12. Inhibition de de la croissance cellulaire par la mélanogénine, le Mel9, le Mel41 rapport aux cellules sur les cellules KB et HL60, mesuré après 72h d'exposition..... | 63 |

Liste des Figures

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Signalisations des PHB..... | 3 |
| Figure 2. Fonction de la PHB1 et de la PHB2 dans les mitochondries..... | 4 |
| Figure 3. Exemples représentatifs de flavaglines naturelles (rocaglamide et silvestrol) et synthétiques (FL3)..... | 6 |
| Figure 4. Requis structuraux des flavaglines pour la cytotoxicité dans les cellules cancéreuses (FL3: $R^1=R^2=OMe$, $R^3=OH$, $R^4=R^5=R^6=R^7=R^9=H$, $R^8=Br$)..... | 7 |
| Figure 5. Taux de survie des souris traitées avec la doxorubicine(31%) ou doxorubicine + 5 injections de FL3 (0,1 mg / kg i.p.)..... | 8 |
| Figure 6. Mécanisme cardioprotecteur de FL3 proposé par le Dr Désaubry et <i>al.</i> | 9 |
| Figure 7. Exigences structurelles pour la radioprotection et la cytotoxicité des cellules cancéreuses..... | 9 |
| Figure 8. Structure et neurotoxicité de l'Aftine-4..... | 10 |
| Figure 9. Structure de la fluorizoline..... | 10 |
| Figure 10. La mélanogénèse ou la synthèse de la mélanine est impliquée dans des voies réactionnelles enzymatiques et biochimiques complexes appelées voie de Raper-Mason..... | 11 |
| Figure 11. Principales voies régulatrices de la mélanogénèse, cette figure a été adaptée de Pillaiyar et al et légèrement modifiée..... | 13 |
| Figure 12. Mode d'action de LC3 lié à la PHB2 lors de la mitophagie..... | 16 |
| Figure 13. Structure de la mélanogénine..... | 17 |
| Figure 14. Mécanisme proposé de l'action de la mélanogénine..... | 17 |
| Figure 15. Découverte de la mélanogénine..... | 19 |
| Figure 16. Identification d'un agent améliorant la pigmentation qui se lie à la prohibitine..... | 20 |
| Figure 17. Les analogues 16a..... | 39 |
| Figure 18. Les analogues 16b | 39 |
| Figure 19. Les analogues 16c..... | 42 |
| Figure 20. Les analogues 16d..... | 43 |
| Figure 21. Les analogues 16 e..... | 44 |
| Figure 22. Effet sur la pigmentation cellulaire des analogues de la mélanogénine..... | 53 |
| Figure 23. Effet de Mel9 et Mel 41 sur la pigmentation cellulaire dans les lignées cellulaires MM162 et MM043..... | 54 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 24: Mel55 interagit avec PHB1..... | 55 |
| Figure 25. Activation de MITF via l'activation de LC3-II par les ligands PHB le Mel9 et leMel41.. | 57 |
| Figure 26. Inhibition et amélioration de l'activité promélanogénique du Mel9 respectivement par l'inhibiteur (PIK-III), l'activateur de l'autophagie(HD1) et l'activation de LC3. | 58 |
| Figure 27. Les ligands de PHB régulent à la baisse le niveau de protéine des PHB et la phosphorylation d'Akt pour induire l'apoptose dans les cellules du mélanome | 60 |
| Figure 28. Le ligand de PHB Mel9 régule à la baisse le niveau de protéine des PHB et la phosphorylation de Akt dans les cellules de mélanome MM043 et MM162..... | 61 |
| Figure 29. . Induction de la dégradation de PHB1 et l'activation de la signalisation de MITF dans les cellules de mélanome HBL par le MEL9, le MEL41 et la mélanogénine..... | 62 |
| Figure 30. Dégradation induite de la PHB1 et inhibition de signalisation AKT dans les cellules HL60 par le Mel9 et Mel41..... | 63 |
| Figure 31. Modèle proposé d'induction de la mélanogénèse par les dérivés de la mélanogénine | 65 |

Liste des schémas

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Schéma 1. Voie de synthèse générale des triamino-triazines..... | 30 |
| Schéma 2. Synthèse supportée des triazines fonctionnalisées développée par Chang <i>et al</i> | 31 |
| Schéma 3. Synthèse des triazines fonctionnalisées développée par Masquelin <i>et al</i> | 32 |
| Schéma 4. Condensation du pentafluorophénol 4 sur la dichlorotriazine 3 | 33 |
| Schéma 5. Double substitution nucléophile d'une benzylthiol sur la trichlorotriazine selon les travaux de T. Masquelin <i>et al.</i> | 34 |
| Schéma 6. Essai de développement d'une méthode de synthèse de triazines substituées par un groupement pentafluorophenoxy faisant appel à des intermédiaires thioéthers et sulfoxydes..... | 34 |
| Schéma 7. Troisième approche pour la mise au point de méthode de synthèse de la mélanogénine et de ses analogues..... | 36 |
| Schéma 8. Travaux de Katharina Reichenbacher <i>et al</i> | 36 |
| Schéma 9. Approche finale permettant d'accéder à la mélanogénine et à ses dérivés..... | 37 |
| Schéma 10. Synthèse des amines Y et Z non-commerciales..... | 38 |
| Schéma 11. Synthèse de la mélanogénine..... | 45 |
| Schéma 12. Synthèse de l'analogue de la mélanogénine couplé au groupement espaceur et à l'affigel10..... | 46 |

Sommaire

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Introduction | 1 |
| 1.1 | Les prohibitines | 1 |
| 1.1.1 | Signalisation et rôles physiologiques | 1 |
| 1.1.2 | Importance actuelle des sondes chimiques en biologie cellulaire | 4 |
| 1.1.3 | Ligands des prohibitines | 6 |
| 1.1.3.1 | Les flavaglines | 6 |
| 1.1.3.2 | L'Aftine-4 | 10 |
| 1.1.3.3 | La fluorizoline | 10 |
| 1.2 | Découverte et propriétés de la mélanogénine | 11 |
| 1.2.1 | Mélanine et mélanogénèse | 11 |
| 1.2.2 | Protéines régulant la mélanogénèse : | 14 |
| 1.2.2.1 | MITF : Microphthalmia-associated transcription factor | 14 |
| 1.2.2.2 | ERK : Généralités et relations avec le MITF et la mélanogénèse | 15 |
| 1.2.2.3 | LC3 : Généralités et relations avec la mélanogénèse, la PHB2 et ERK | 15 |
| 1.2.3 | Découverte et effets pharmacologiques | 17 |
| 1.2.4 | Relations structure-activité..... | 19 |
| 1.3 | Chimie des triazines..... | 29 |
| 2 | Objectifs..... | 32 |
| 3 | Synthèses | 33 |

| | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1 | Mise au point d'une synthèse sélective d'analogues de la mélanogénine | 33 |
| 3.2 | Synthèse de la mélanogénine | 45 |
| 3.3 | Synthèse du linker | 46 |
| 4 | <i>Résultats biologiques</i> | 47 |
| 4.1 | Stimulation de la pigmentation cellulaire | 47 |
| 4.2 | Mel55 interagit avec PHB1 | 55 |
| 4.3 | Mel9 et le Mel41 régulent à la hausse le MITF et la tyrosinase grâce à l'activation de LC3 | 55 |
| 4.4 | Mel9 et le Mel41 régulent à la baisse les PHB et AKT pour induire l'apoptose dans les cellules de mélanome HBL | 59 |
| 4.5 | Effet de la mélanogénine dans les cellules de mélanome HBL..... | 61 |
| 4.6 | Effet sur la croissance des cellules cancéreuses | 62 |
| 4.7 | Discussion | 64 |
| 5 | <i>Conclusion générale</i> | 68 |
| 6 | <i>Partie expérimentale</i> :..... | 70 |
| 7 | <i>Annexes</i> | 118 |

1. INTRODUCTION

1 Introduction

1.1 Les prohibitines

La Prohibitine-1 (PHB1) et son homologue PHB2 sont des protéines d'échafaudage agissant comme un hub pour de nombreuses voies de signalisation activées par des facteurs de croissance, de réponse immunitaire et d'hormones stéroïdes, pour réguler le métabolisme, la dynamique et la fonction mitochondriale, la prolifération cellulaire et la survie.¹ En raison de leur effet régulateur sur diverses voies de signalisation cellulaire, les PHB sont impliquées dans l'étiologie des cancers, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives, du diabète, de l'obésité et dans la réponse immunitaire.^{2,3} De nombreuses modifications post-traductionnelles des PHB modulent leur activité et également leur distribution intracellulaire, dans les mitochondries, le noyau, le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Les fonctions spécifiques de chacune de ces différentes formes de PHB ne peuvent pas être examinées par l'utilisation de méthodes de délétion de gènes, car elles induisent l'apoptose, en raison de leur rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité mitochondriale. Par conséquent, l'utilisation d'agents ciblant les PHB peut être très utile pour déchiffrer leurs rôles dans divers contextes cellulaires.

1.1.1 Signalisation et rôles physiologiques

Les PHBs sont régulées par plusieurs phosphorylations de la tyrosine et de la sérine, des modifications de O-GlcNAc, des palmitoylations, des transamidations, des nitrosylations de la tyrosine, ... A titre d'exemple, la phosphorylation d'Akt, de PHB1 à Thr258, qui bloque son interaction avec Shp1 / 2 et facilite la signalisation d'Akt (Figure 1). La PHB1 est également phosphorylée par PKC- δ , pour bloquer l'apoptose. L'activité de PHB2 est régulée par la phosphorylation de la sérine et de la thréonine, en particulier à Ser91 et Tyr248. La protéine kinase IV dépendant du calcium / calmoduline (CaMKIV) phosphoryle la PHB2 chez Ser91, ce qui

Introduction

nuit à son aptitude à réprimer l'activité transcriptionnelle du facteur d'amplification des myocytes.

Dans la membrane interne mitochondriale, la PHB1 et la PHB2 interagissent ensemble pour former des oligodimères qui sont organisés dans des structures de type anneau avec un diamètre de 20-25nm (Figure 2). Ces supers complexes maintiennent la structure des mitochondries et régulent leurs fonctions.² Ils agissent aussi dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la transcription génique

Dans le noyau, les PHB régulent l'activité de nombreux facteurs de transcription, co-activateurs de transcription et co-répresseurs, tels que le p53, le récepteur d'œstrogène, E2Fs, STAT3, PGC. De plus, PHB1 contrôle l'activité des protéines MCM pour réguler la synthèse de l'ADN, Elles protègent les protéines nouvellement importées de la dégradation, par la protéase m-AAA, favorisent la synthèse des protéines mitochondriales, maintiennent l'organisation, copient le nombre d'ADN mitochondrial et agissent comme chaperons pour les protéines nouvellement synthétisées, protéines du complexe mitochondrial I et de l'atrophie optique GTPase 1 (Opa1) lors de la fission mitochondriale et de la morphogénèse.

Introduction

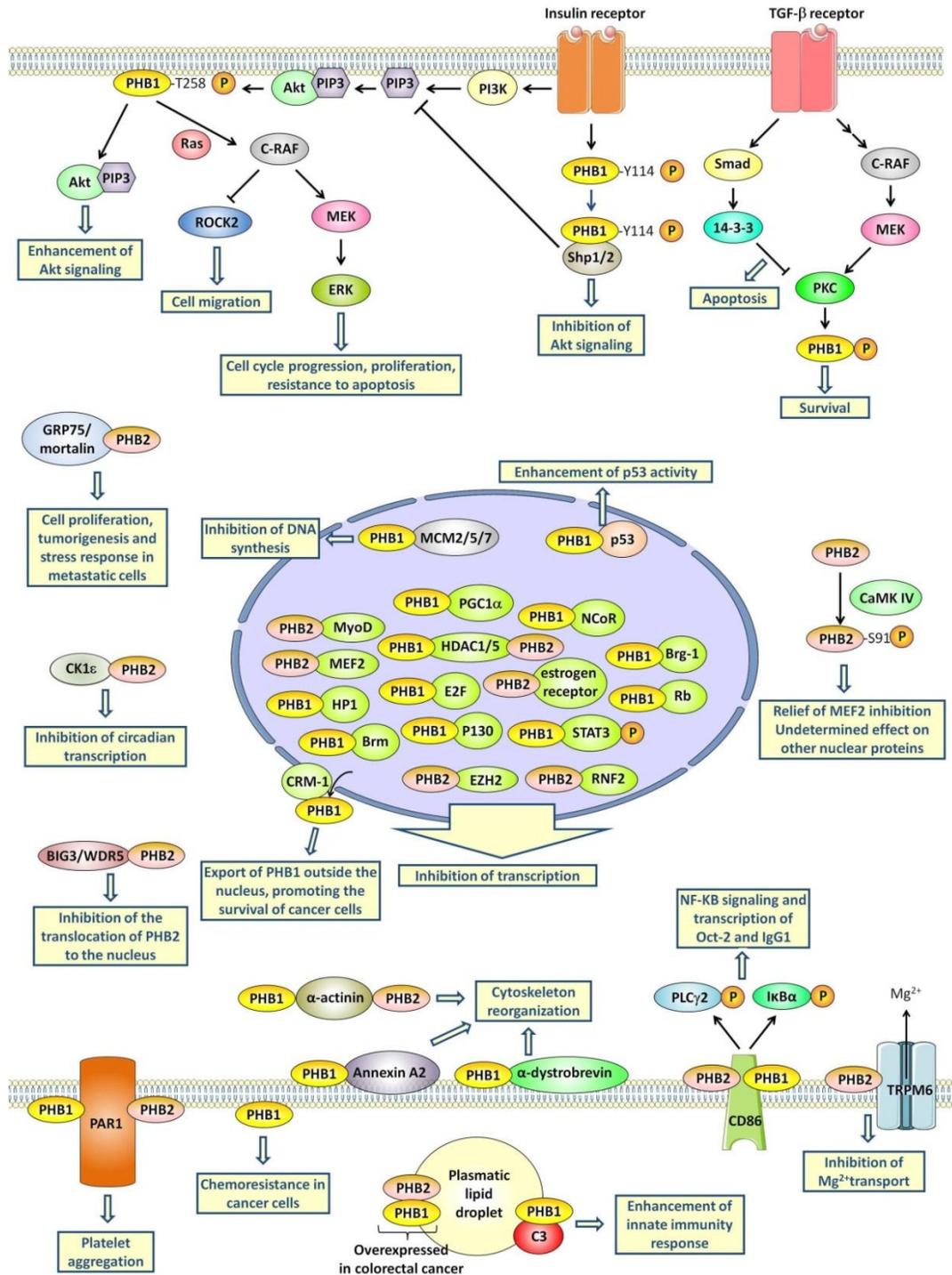


Figure 1. Signalisations des PHB¹

(Copiée de la référence Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Nebigil, C. G.; Desaubry, L., Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chemistry & biology* **2013**, *20* (3), 316-31).

Introduction

Les PHBs régulent de nombreuses voies de signalisation (P. Ex., Akt, C-RAF-MEK-ERK, CaMK et PKC) pour orchestrer divers aspects de la physiologie cellulaire, y compris le métabolisme, la transcription, l'apoptose, la survie, la réorganisation du cytosquelette et la différenciation.

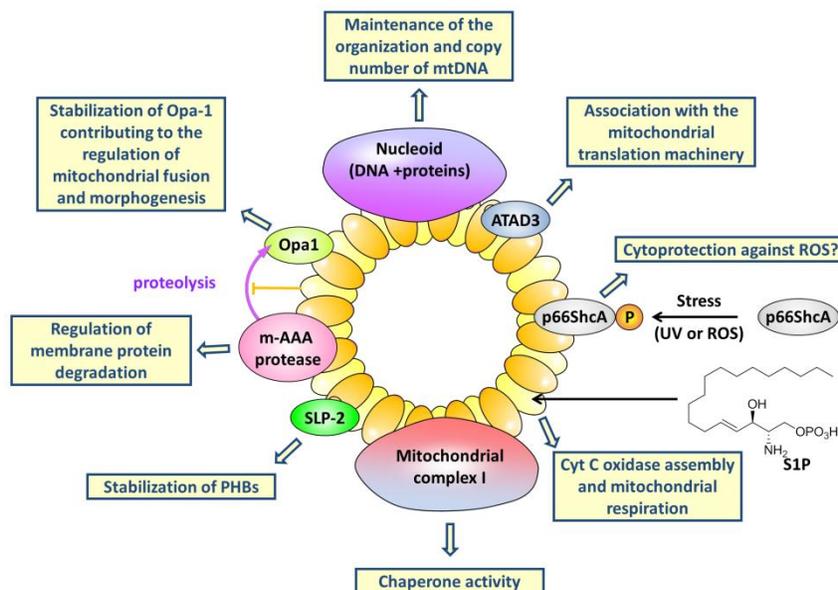


Figure 2. Fonction de la PHB1 et de la PHB2 dans les mitochondries.¹

(Copiée de la référence Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Nebigil, C. G.; Desaubry, L., Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chemistry & biology* **2013**, *20* (3), 316-31).

1.1.2 Importance actuelle des sondes chimiques en biologie cellulaire

Le séquençage du génome humain en 2001 a contribué à l'émergence de la génétique chimique qui vise à identifier des sondes chimiques pour les produits de chaque gène humain.⁴ En effet, les petites molécules peuvent servir de sonde pour explorer divers processus biologiques.

Les sondes chimiques sont des acteurs majeurs pour valider de nouvelles cibles moléculaires. En biologie cellulaire, elles sont très complémentaires à l'utilisation de l'interférence ARN (ARNi), notamment en étant capables d'inhiber une fonction spécifique de la protéine cible plutôt que d'éliminer la protéine entière, évitant ainsi des problèmes de fonction

Introduction

multiples ou d'échafaudage. Cette approche permet aussi de contrôler l'étendue et la cinétique de l'inhibition.⁵

Pour être utiles, les sondes chimiques doivent satisfaire à certains critères, tels que la perméabilité (se rendre au site d'action dans la cellule), la puissance et la sélectivité. Paul Workman et Ian Collins ont proposé quelques critères pour évaluer la qualité des sondes chimiques (Tableau 1).³

En ce qui concerne leur puissance, elle devrait être submicromolaire pour les études biochimiques et dans la gamme micromolaire pour les études cellulaires. Pour les études in vivo, elle doit présenter des propriétés pharmacocinétiques acceptables. Fait important, les effets biochimiques et cellulaires doivent être corrélés dans une série d'analogues.

Tableau 1. Directives recommandées pour les propriétés des sondes chimiques .³

| | |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Perméabilité membranaire | >0.05 mg/ml en basse % DMSO en solutions aqueuses |
| Perméabilité membranaire | Perméabilité essentielle; Efflux médié par PGP minimal dans les lignées cellulaires intéressantes. |
| Groupes chimiquement réactifs | Aucun présent sauf si bien caractérisé et sélectif. |
| Masse moléculaire (Da) | préférentiellement d'être < 450 |
| Lipophilie (LogP) | préférentiellement d'être < 5 |
| H-liaison donneurs (O-H, N-H) | préférentiellement d'être < 3 |
| H-liaison accepteurs (N, O) | préférentiellement d'être < 11 |
| Rotatable bonds | préférentiellement d'être < 10 |
| Puissance cible (IC ₅₀ or K _i) | <100 nM |
| Sélectivité ciblée | Sélectivité bien définie; >10–100- Contre des cibles étroitement liées; Polypharmacologie indésirable |
| Mécanisme d'action | Une relation quantitative bien définie entre les effets biochimiques et cellulaires compatible avec l'action dépendante de la cible |
| Pharmacocinétique | Bonne pharmacocinétique non essentielle pour l'utilisation in vitro et cellulaire, mais nécessaire pour le travail in vivo des animaux |

1.1.3 Ligands des prohibitines

Les activités des PHB sont affectées par les produits naturels appelés «flavaglines» et de petites molécules entièrement synthétiques telles que l'Aftine-4 ou la mélanogénine.¹

1.1.3.1 Les flavaglines

Jusqu'à présent, les ligands de PHB les plus étudiés étaient des flavaglines (Figure 3). Ces composés représentent une famille de plus de 100 cyclopenta [b] benzofuranes trouvés dans l'arbre Chu-lan (Mǐ Zǎi Lán, 米仔兰) utilisés dans la MTC. Les flavaglines présentent de puissantes activités insecticides, antifongiques, anti-inflammatoires, neuroprotectrices, cardioprotectrices et surtout anticancéreuses.^{6,7}

La caractéristique la plus intéressante est la sélectivité de leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses par rapport aux saines. En effet, il a été observé que lors des cultures in-vitro, toutes les lignées cellulaires cancéreuses et celles transformées sont sensibles à cette cytotoxicité, alors que les cellules non cancéreuses n'ont pas affectées.

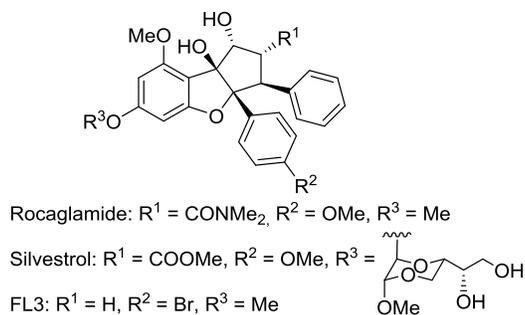


Figure 3. Exemples représentatifs de flavaglines naturelles (rocaglamide et silvestrol) et synthétiques (FL3).

Introduction

Le rocaglamide (Figure 3) a été la première flavagline à être identifiée.⁸

L'équipe du Dr Désaubry a rapporté la découverte d'analogues, tels que le FL3, qui empêchent les PHB d'interagir avec la kinase C-RAF et inhibent par conséquent la signalisation Ras-C-RAF-MEK-Erk, qui est essentielle à la survie de nombreux types de cellules cancéreuses.⁹

Activités anticancéreuses

De nombreux dérivés de flavaglines ont été synthétisés pour déterminer les exigences structurales de leur cytotoxicité dans les cellules cancéreuses (Figure 4).^{1,10}

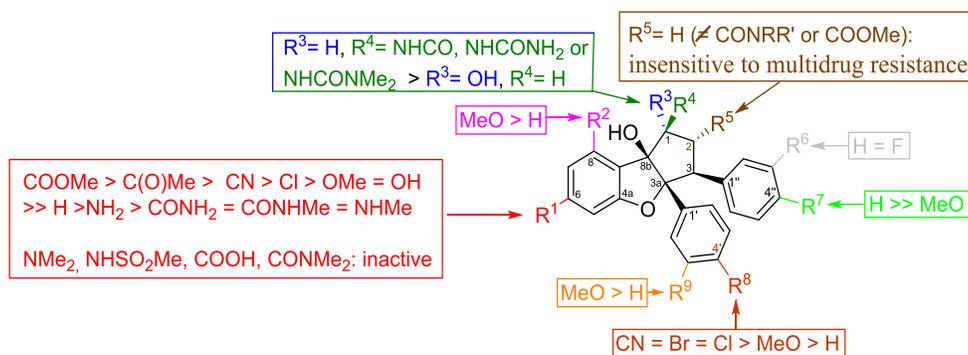


Figure 4. Requis structuraux des flavaglines pour la cytotoxicité dans les cellules cancéreuses (FL3: R¹=R²=OMe, R³=OH, R⁴=R⁵=R⁶=R⁷=R⁹=H, R⁸=Br).

Tableau 2. Cytotoxicité dans les cellules HCT15 (IC₅₀, nM).

| Anticancer agents | IC ₅₀ (nM) |
|-------------------|-----------------------|
| FL3 | 2 |
| Doxorubicine | 81 |
| Docetaxel | 13 |
| Cisplatine | 2900 |
| Camptothécine | 3 |
| Vinblastine | 10 |

Introduction

Cela a mené à la découverte du FL3, la première flavagline qui présente une cytotoxicité supérieure à celle des flavaglines naturelles (Figure 4, Tableau 2).⁶ Une flavagline a été conjuguée à un lien est utilisé pour identifier les prohibitines qui sont leur cible et ce par chromatographie d'affinité.⁹

En 2005, les chercheurs de Bayer Healthcare ont rapporté que les flavaglines présentaient des activités anti-inflammatoires et neuroprotectrices puissantes dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson.¹¹

Sur la base de cette observation, il a été démontré que ces composés protègent les neurones et les cardiomyocytes contre l'apoptose induite par les médicaments anticancéreux (cisplatine et doxorubicine), et qu'en particulier le FL3 protège les souris in vivo de la toxicité induite par la doxorubicine. Ces données indiquent également que le FL3 présente une biodisponibilité appropriée. Aucun signe de toxicité ou de perte de poids chez des souris traitées uniquement avec FL3 n'a été détecté (Figure 5).

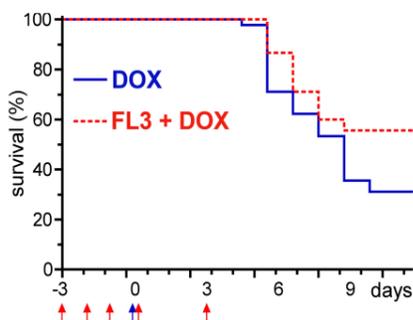


Figure 5. Taux de survie des souris traitées avec la doxorubicine(31%) ou doxorubicine + 5 injections de FL3 (0,1 mg / kg i.p.).¹²

Il a été également montré que le FL3 induit des propriétés cardioprotectrices via la signalisation par la PHB1 (Figure 6).¹³ En effet, la doxorubicine induit la translocation de PHB1 et de STAT3 phosphorylée dans le noyau des cardiomyocytes pour réaliser l'apoptose. Au contraire, FL3 induit la translocation de ces protéines de signalisation dans les mitochondries pour protéger la cellule contre les effets indésirables de la doxorubicine.

Introduction

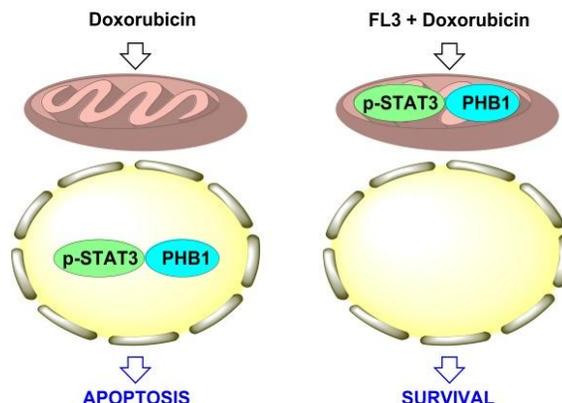


Figure 6. Mécanisme cardioprotecteur de FL3 proposé par le Dr Désaubry et *al.*

Cette activation du complexe STAT3 / PHB1 mitochondrial par des ligands de PHB représente une nouvelle stratégie pour protéger l'organisme contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine et éventuellement d'autres problèmes cardiaques.

Les relations structure-activité de la cardioprotection sont identiques à celles de la neuroprotection et similaires pour la cytotoxicité dans les cellules cancéreuses (Figure 7).¹⁴

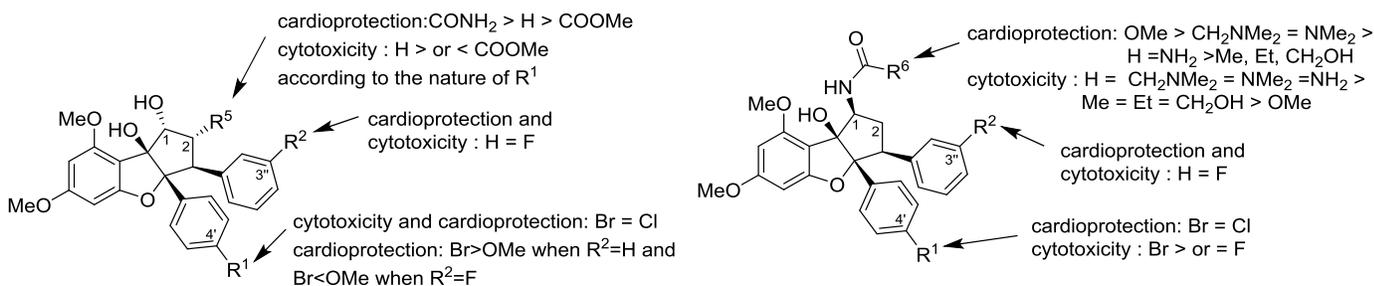


Figure 7. Exigences structurales pour la cardioprotection et la cytotoxicité des cellules cancéreuses.

En plus des flavaglines, plusieurs ligands PHB ont été identifiés, tels que la mélanogénine, l'Aftine-4, l'aurilide, l'adipotide, la Fluorizoline et les sulfonamidines.

1.1.3.2 L'Aftine-4

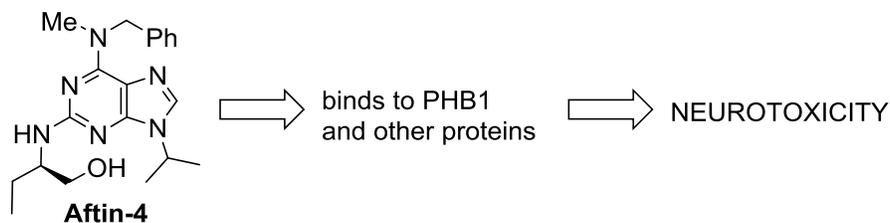


Figure 8. Structure et neurotoxicité de l'Aftine-4

Lors de l'étude qui déterminait comment le peptide amyloïde-b42 (Ab42) toxique est produit dans la maladie d'Alzheimer, le Professeur Hervé Galons, a observé que le dérivé d'adénine Aftine-4 interagit avec trois protéines: la PHB1, le canal VDAC1 et la mitofiline.¹⁵ Au niveau cellulaire, il favorise la production de neurotosines dans les neurones.

1.1.3.3 La fluorizoline

La fluorizoline est un nouvel agent anticancéreux qui cible les PHBs.¹⁶ Les requis structuraux de ce composé pour son activité cytotoxique demeurent peu décrits.¹⁷

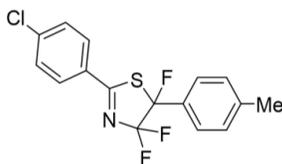


Figure 9. Structure de la fluorizoline.

1.2 Découverte et propriétés de la mélanogénine

1.2.1 Mélanine et mélanogénèse

La mélanine est le pigment noir qui protège la peau des radiations ultraviolettes, fournit les différentes décorations de la peau, des yeux et des fourrures d'animaux.

La couleur de la peau, des yeux et des cheveux sont en grande partie le résultat de la synthèse de la mélanine par les mélanocytes dans une organelle spécialisée appelée le mélanosome.¹⁸ Les mélanocytes responsables de la pigmentation protègent des dommages induits par les UV sur la peau.¹⁹ Un grand nombre de maladies de la peau, qui comprennent l'hyperpigmentation acquise, tels que le melasma, la mélanodermie postinflammatoire et lentigos solaires, sont dûs à l'augmentation de la production et de l'accumulation de la mélanine.²⁰ A l'inverse, l'albinisme ou le vitiligo résultent d'un défaut de pigmentation.

Les agents éclaircissant sont devenus de plus en plus importants dans le domaine cosmétique. Plus de 100 gènes sont impliqués dans le processus de la mélanogénèse.²¹ Les altérations dans la transcription, la traduction, le traitement ou le trafic intracellulaire d'une de ces protéines peut affecter la synthèse de la mélanine. Les mélanocytes répondent aussi à divers facteurs produits par leur environnement ou par les cellules voisines de la peau.^{22,23}

Le transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes et leur répartition dans les kératinocytes sont également des procédés qui jouent des rôles importants dans la régulation de la pigmentation de la peau et des cheveux.^{24,25}

Introduction

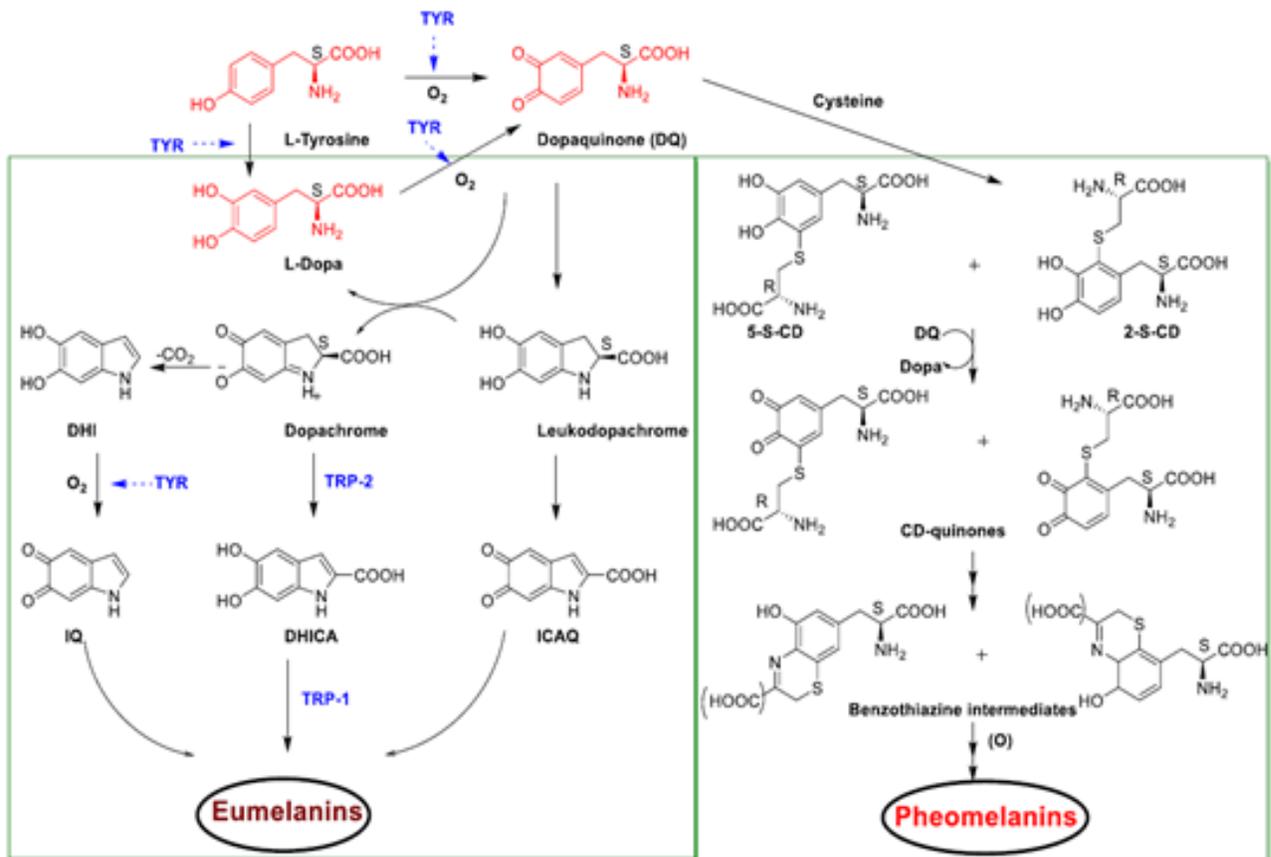


Figure 10. La mélanogénèse ou la synthèse de la mélanine est impliquée dans des voies réactionnelles enzymatiques et biochimiques complexes appelées voie de Raper-Mason^{5,27}

Cette figure a été adaptée d'un article de T.Pillaiyar et *al* légèrement modifié. (Tyr, tyrosinase, DQ, dopaquinone, L-Dopa, L-3,4-dihydroxyphénylalanine, DHICA, acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique; DHI, 5,6-dihydroxyindole; ICAQ, acide indole-2-carboxylique-5,6-quinone; IQ, indole-5,6-quinone; HBTA, 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine).²⁶

Introduction

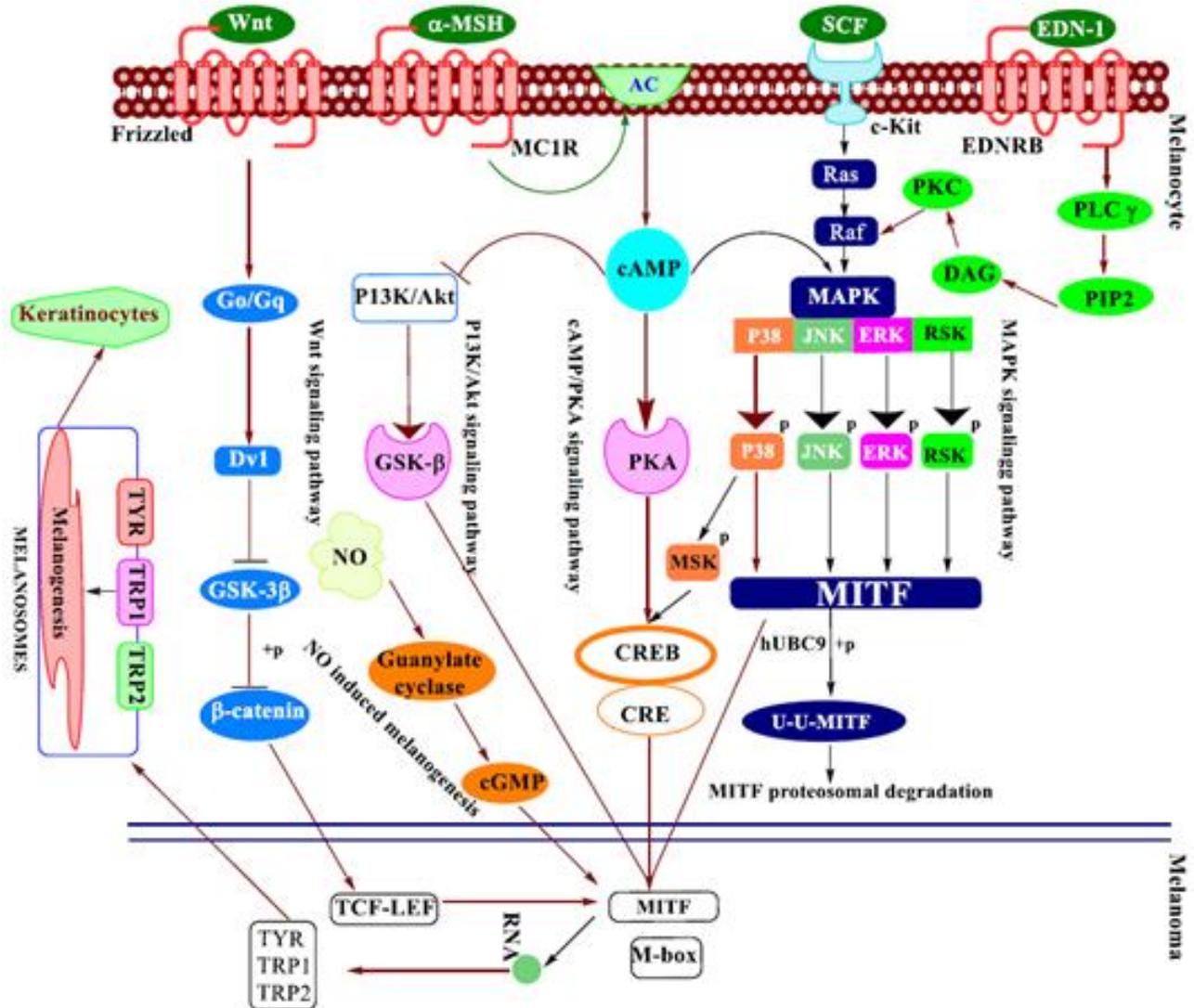


Figure 11. Principales voies régulatrices de la mélanogénèse, cette figure a été adaptée de Pillaiyar et al et légèrement modifiée.²⁶

La régulation de la mélanogénèse dans les mélanocytes est un phénomène complexe régulé par de nombreuses voies de signalisation, notamment celles de l'AMP cyclique, du GMP cyclique de la β-caténine et des MAPS kinases. Ces voies convergent vers l'activation du MITF (microphthalmia-associated transcription factor) qui active la transcription d'enzymes-clés de la mélanogénèse, et en particulier la tyrosinase.²⁶

1.2.2 Les protéines régulant la mélanogénèse :

Parmi les différentes protéines régulant la mélanogénèse, nous allons présenter en particulier celles qui sont affectées par les composés que nous avons synthétisés : le MITF, pERK et LC3.

1.2.2.1 MITF : *Microphthalmia-associated transcription factor*

Le MITF est un facteur de transcription qui contrôle la mélanogénèse. Cette protéine joue un rôle dans le développement, la survie et la fonction de certains types de cellules.^{27, 28}

Le MITF contrôle le développement et la fonction des mélanocytes. Au sein de ces cellules, cette protéine contrôle la production du pigment mélanine. Les mélanocytes sont également présents dans l'oreille interne et jouent un rôle important dans l'audition. De plus, le MITF régule le développement des cellules épithéliales du pigment rétinien. Ces cellules nourrissent la rétine.

Le MITF régule également le développement des cellules qui décomposent et éliminent les os (ostéoclastes) et les cellules qui jouent un rôle dans les réactions allergiques (mastocytes).²⁹

Le MITF régule l'expression du récepteur de Kit²⁹ ainsi que celle des enzymes telle que la tyrosinase et la protéine 1 liée à la tyrosinase (TRP1),³⁰ qui sont essentiels pour la production de la mélanine. La tyrosinase est l'enzyme limitante de la biosynthèse de la mélanine, catalysant la conversion de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) et ensuite en DOPA quinone.³¹

La TRP1 catalyse la conversion de l'acide 5,6-quinonecarboxyindole-2-carboxylique (DHICA) en l'acide indole-5,6-quinonecarboxylique.³²

1.2.2.2 ERK : généralités et relations avec le MITF et la mélanogenèse

Les **protéines ERK-1 et ERK-2** signifiant *Extracellular signal-regulated kinases* sont des kinases activées par des phosphorylations au niveau d'une tyrosine et d'une thréonine.

ERK1 et ERK2 phosphorylent aussi des protéines sur des résidus tyrosine, thréonine ou sérine pour activer à leur tour d'autres protéines. ERK1/2 font partie de la famille des MAP kinases, *mitogen-activated protein kinases*.³³

L'extracellulaire signal-regulated kinase (ERK) est une clé médiatrice de signalisation de la prolifération et de la différenciation cellulaire,^{34,35} et l'inhibition de la voie ERK induit une hyperpigmentation, suggérant ainsi que ERK est également impliqué dans la mélanogenèse.³⁶

En outre, l'activation d'ERK conduit à la phosphorylation de MITF à la serine 73, qui sera suivie par l'ubiquitination de MITF et sa dégradation.³⁷ L'activation d'ERK par le sphingosine-1-phosphate ou la céramide régule la mélanogenèse.³⁸

L'activation de ERK a également un effet inhibiteur sur l'activité de la tyrosinase et la transcription.^{39,40}

1.2.2.3 LC3 : généralités et relations avec la mélanogenèse, la PHB2 et ER

La chaîne légère 3 β associée aux microtubules (ci-après dénommées LC3) est une protéine qui chez les humains est codée par le gène *MAP1LC3B*.

LC3 est une protéine centrale dans la voie d'autophagie où elle fonctionne dans la sélection de substrat d'autophagie et la biogenèse d'autophagosomes. LC3 est le marqueur des autophagosomes le plus largement utilisé.²⁴

La LC3 a été identifiée à l'origine comme une protéine associée aux microtubules dans le cerveau du rat.⁴¹

Cependant, il a été constaté plus tard que la fonction primaire de LC3 est dans l'autophagie, un processus qui implique la dégradation en bloc des composants cytoplasmiques.

Introduction

Le LC3 contribue à la mélanogénèse en augmentant l'expression de MITF dépendant d'ERK,⁴² Beth Levine et *al* ont récemment montré que la PHB2 interagit physiquement avec la chaîne légère 3 β (LC3) de la protéine 1 associée aux microtubules pour promouvoir la mitophagie en réponse au dysfonctionnement mitochondrial des cellules HeLa, et que pendant la mitophagie, la protéine associée à l'autophagosome LC3-II se lie directement à la protéine mitochondriale interne PHB2 et se lie indirectement à l'hétérodimère PHB2 et son partenaire de liaison PHB.⁴³

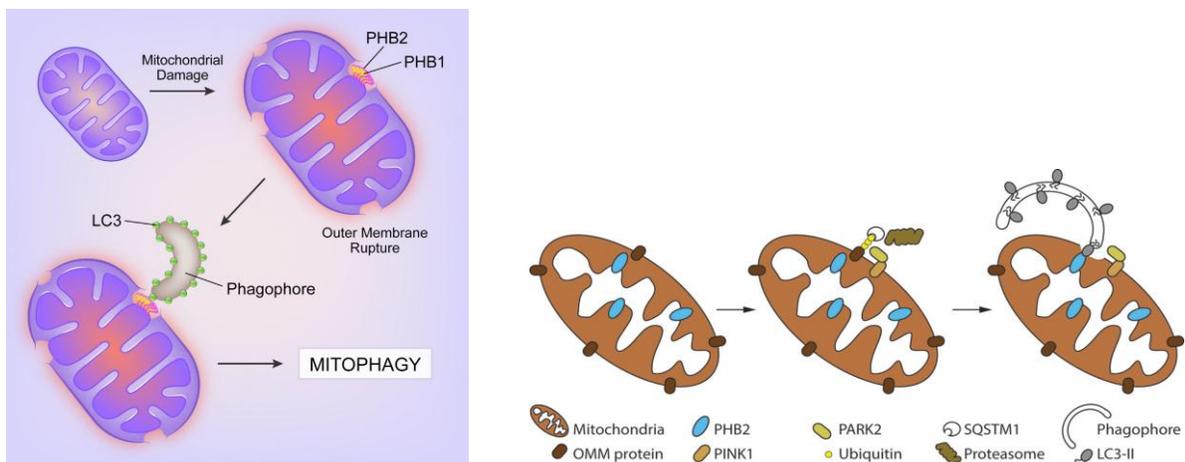


Figure 12. Mode d'action de LC3 lié à la PHB2 lors de la mitophagie.^{43,44}

L'interaction entre PHB2 et LC3 nécessite une rupture de la membrane mitochondriale externe. PHB2 est requis pour la mitophagie à médiation par Parkin.⁴⁴ Figure copiée de Wei, Y.; Chiang, W.-C.; Sumpter, R.; Mishra, P.; Levine, B., Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. *Cell* **2017**, *168* (1), 224-238. e10. Et de Bang, S.; Won, K. H.; Moon, H. R.; Yoo, H.; Hong, A.; Song, Y.; Chang, S. E., Novel regulation of melanogenesis by adiponectin via the AMPK/CRTC pathway. *Pigment cell & melanoma research* **2017**, *30* (6), 553-557.

Les mitochondries dépolarisées expriment PINK1 sur la membrane externe, entraînant le recrutement de PARK2 et l'ubiquitination et la dégradation subséquente des protéines de la membrane externe mitochondriale. La rupture de la membrane externe qui en résulte permet à LC3-II sur un phagophore de se lier à la protéine membranaire interne mitochondriale PHB2, conduisant à la mitophagie.⁴³

1.2.3 Découverte et effets pharmacologiques de la mélanogénine

Orlow et *al.* ont décrit en 2005 une petite molécule, la mélanogénine (Figure 13), qui induit la formation de mélanine en inhibant la translocation de la prohibitine-1 (PHB1) des mitochondries vers le noyau des mélanocytes.¹⁴ Il a été proposé que la PHB1 bloque la transcription d'un facteur contrôlant la transcription de la tyrosinase. L'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la mélanogénèse est que la mélanogénine en se liant à la PHB1 lèverait cette inhibition (Figure 14).

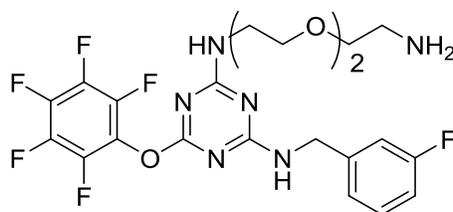


Figure 13. Structure de la mélanogénine.

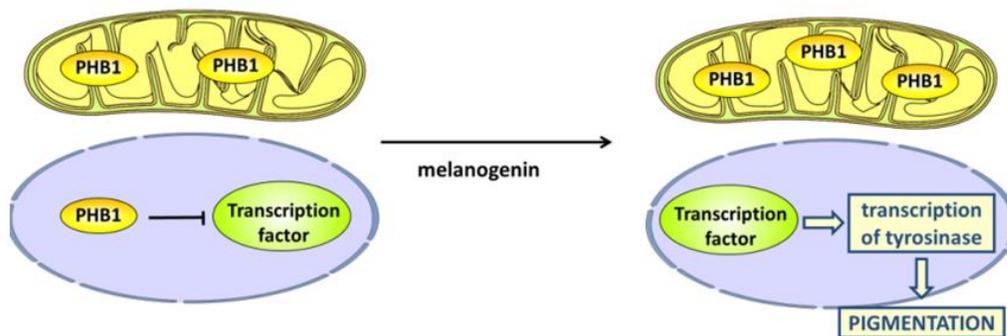


Figure 14. Mécanisme proposé de l'action de la mélanogénine.¹

Pour identifier des composés qui modulent la pigmentation de la peau, Snyder et *al.* ont criblé une chimiotèque constituée de 1170 triazines sur des mélanocytes non pigmentés.¹⁴ Ils ont identifié la mélanogénine comme inducteur de pigmentation avec une EC50 de 2,5 mM. Ce composé augmente la tyrosinase, l'enzyme limitant la vitesse dans la biosynthèse de la mélanine. Ces auteurs ont conjugué la mélanogénine à un support d'agarose, ce qui leur a

Introduction

permis d'identifier la PHB1 comme cible moléculaire par chromatographie d'affinité. D'autres recherches biologiques ont confirmé que la PHB1 est responsable de l'induction de la pigmentation. Les études de microscopie ont montré que la PHB1 était localisée uniquement dans les mitochondries, ce qui a conduit ces auteurs à suggérer que la liaison de la mélanogénine au PHB1 pourrait perturber l'interaction entre PHB1 et un facteur de transcription, provoquant ainsi sa translocation dans le noyau et l'induction de l'expression de la tyrosinase, l'enzyme limitant le taux de mélanogénèse. Cette étude a été la première à démêler l'implication de la PHB1 dans la régulation de la pigmentation des mammifères.

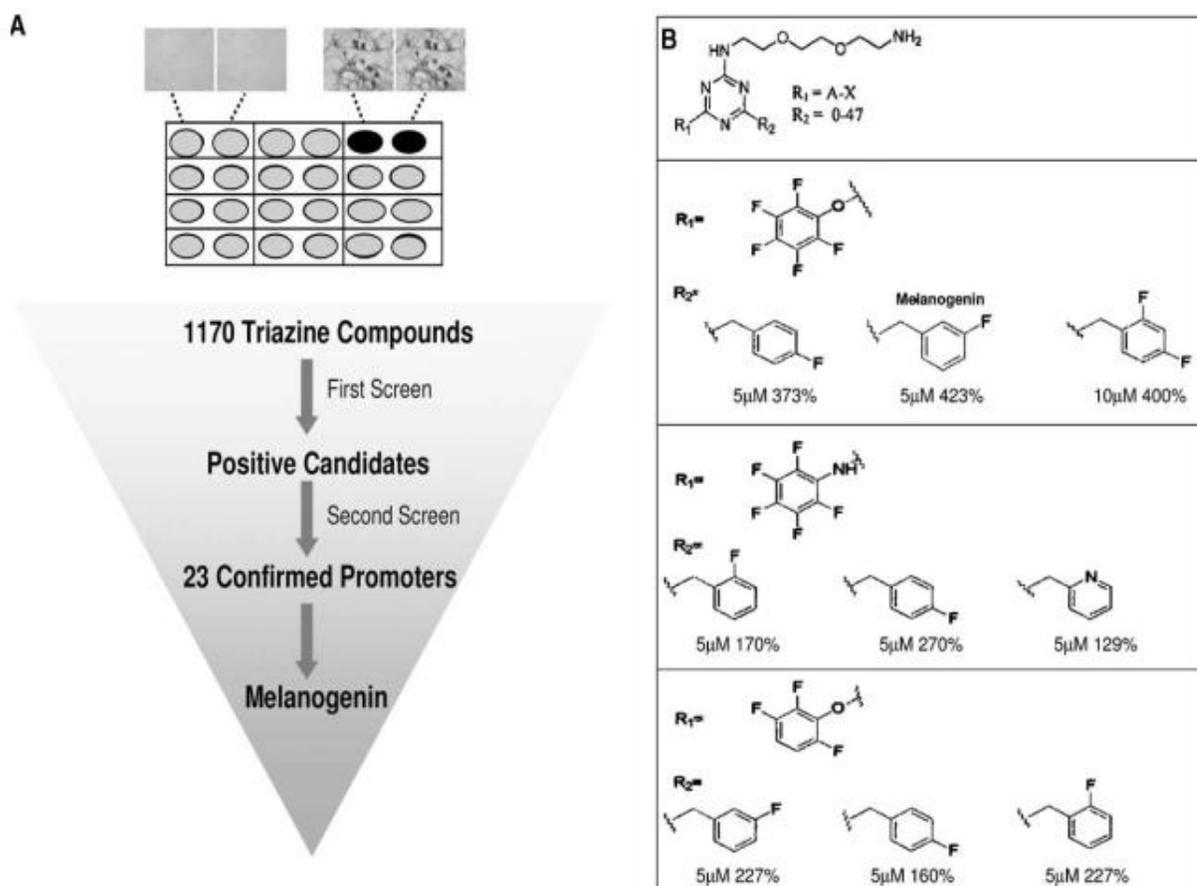


Figure 15. Découverte de la mélanogénine.¹⁴

Introduction

(A) Criblage in vitro d'une banque de triazines trisubstituées de 1170 membres dans des cultures wild-type mélanocytes murins.

(B) Analyse de la relation structure-activité des membres de la bibliothèque des triazines. Les variations structurales ont été produites en modifiant la structure chimique de la triazine aux positions R1 et R2. L'activité chimique est exprimée par le pourcentage d'augmentation de la pigmentation au-dessus des mélanocytes non traités.¹⁴

1.2.4 Relations structure-activité

Identification de la Prohibitine comme Protéine cible de la Mélanogénine

Pour déterminer si la prohibitine a un rôle fonctionnel dans l'induction de pigmentation, la technologie ARNi a été utilisée pour réduire l'expression de la prohibitine de manière sélective (Figure 9c). Ils ont démontré une atténuation significative de la réponse cellulaire à la mélanogénine suivant l'inactivation du gène de la prohibitine spécifique (Figure 16e).

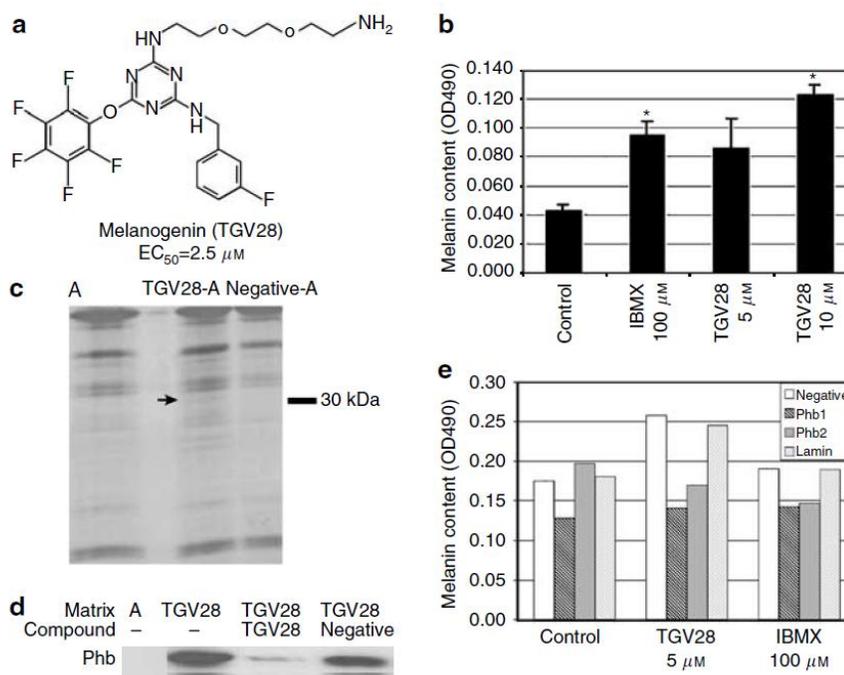


Figure 16. Identification d'un agent améliorant la pigmentation qui se lie à la prohibitine.⁴⁵ (Copiée de Ni-Komatsu, L.; Orlow, S. J., Identification of novel pigmentation modulators by chemical genetic screening. *The Journal of investigative dermatology* **2007**, 127 (7), 1585-92).

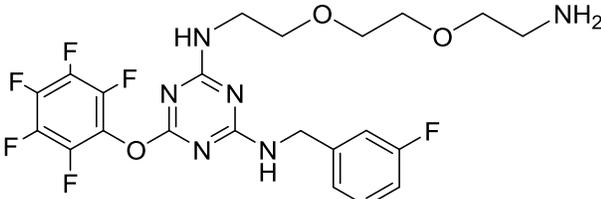
Introduction

- a) La structure chimique et la EC50 de la mélanogénine (TGV28).
- b) La mélanogénine induit la synthèse de la mélanine de manière dépendante de la dose dans les mélanocytes murins immortalisés (mélan-a cells). La teneur en mélanine est normalisée par rapport à la quantité totale de protéines dans les lysats cellulaires.
- c) La mélanogénine se lie spécifiquement à la prohibitine. Le gel SDS-PAGE coloré à l'argent à une concentration de 5-15% illustre la spécificité de la liaison mélanogénine-protéine. A est la matrice de billes d'agarose non conjuguée, TGV28-A est la matrice d'affinité de la mélanogénine, et négatif-A est la matrice d'affinité conjuguée à témoin négatif. La flèche indique la bande protéique qui se lie spécifiquement à la matrice conjuguée à la mélanogénine.
- d) Le Western blot du lysat de mélanocyte incubé avec des billes d'agarose conjuguées à la mélanogénine (TGV28) ou des billes d'agarose seules utilisant un anticorps contre la PHB (A). La liaison mélanogénine-prohibitine a été supprimée lors de la pré-incubation du lysat cellulaire avec la mélanogénine libre mais pas avec le composé témoin inactif (négatif).
- e) L'inhibition du gène de la prohibitine atténue efficacement la réponse cellulaire à la mélanogénine. Dosage de la mélanine des cellules de mélanome B16-F10 transfecté avec deux séquences d'siRNA interdites distinctes (PHB1 et PHB2), siRNA contrôle négatif, ou siRNA Lamin A / C non pertinent suivi par aucun traitement (témoin), mélanogénine 5 mM, ou 100 mM traitement à l'isobutylméthylxanthine.⁴⁵

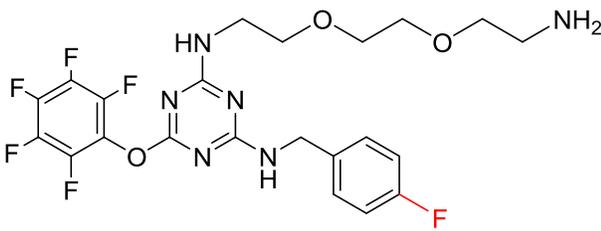
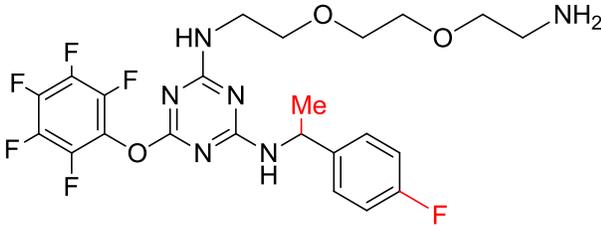
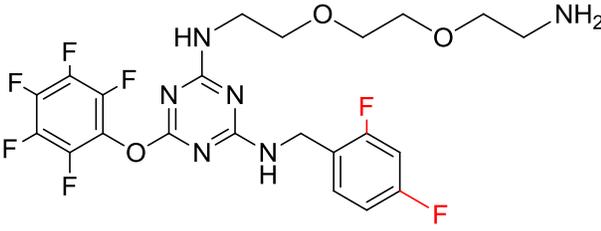
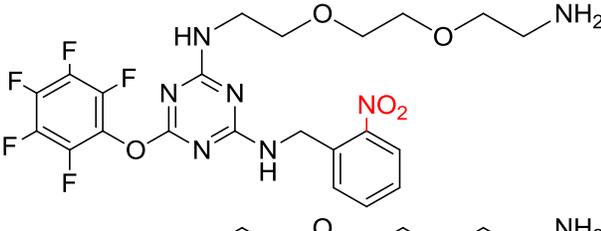
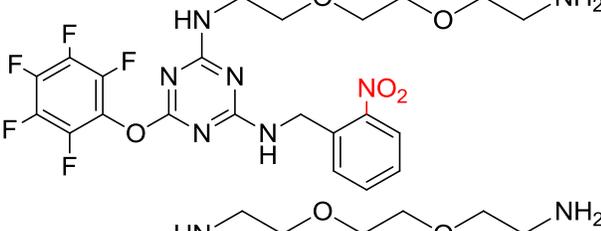
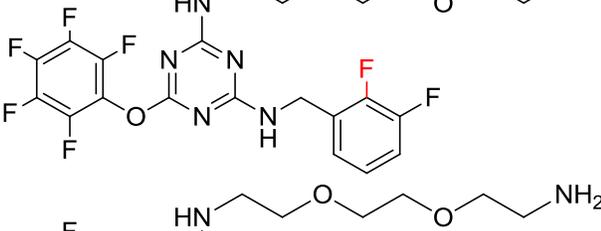
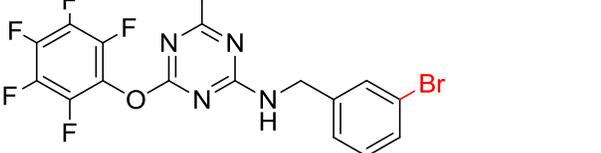
Relation structure-activité de la mélanogénine et de ses analogues

Orlow et *al.* ont déposé un brevet couvrant la structure de plusieurs dizaines de triazines. Ces données nous fournissent des premières informations sur le développement de nouveaux analogues de la mélanogénine.⁴⁶

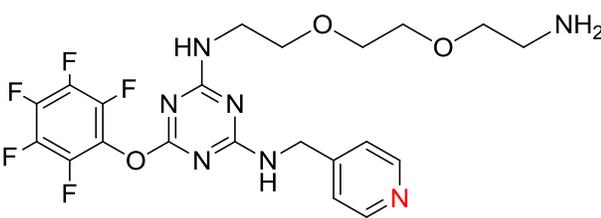
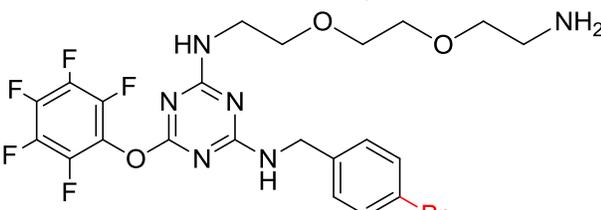
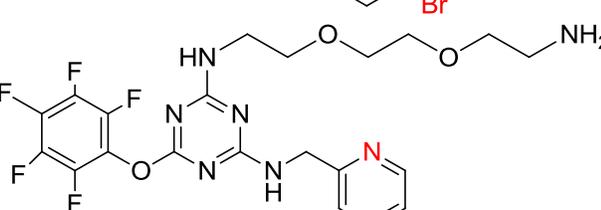
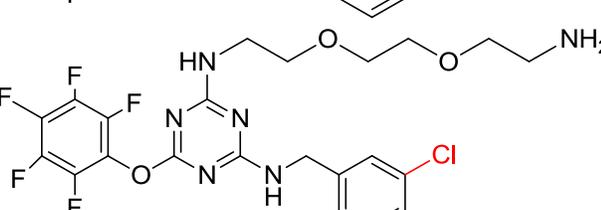
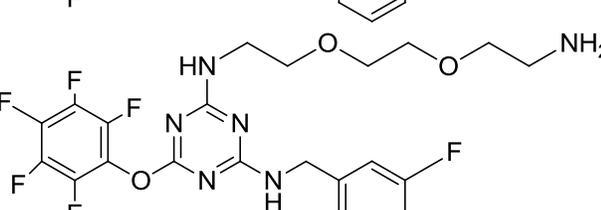
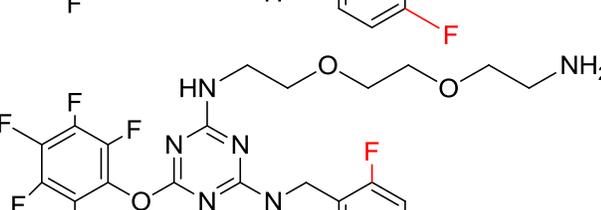
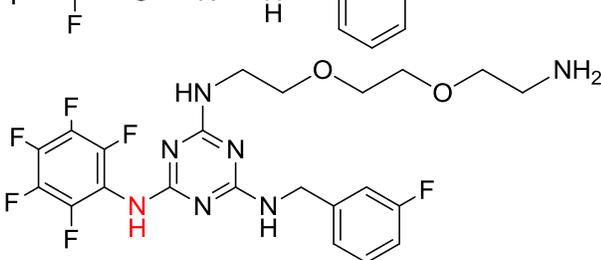
Tableau 3. Relation structure-activité de la mélanogénine et de ses analogues

| Entrées | Structures des analogues de la mélanogénine | Concentrations (µM) | % d'induction de la pigmentation comparé aux cellules non traitées |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1 |  | 5 | 423 |

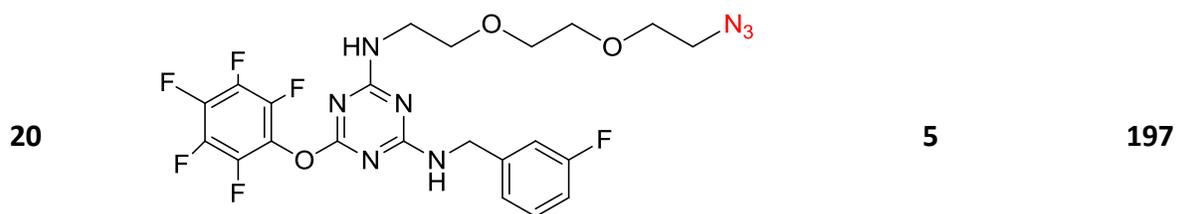
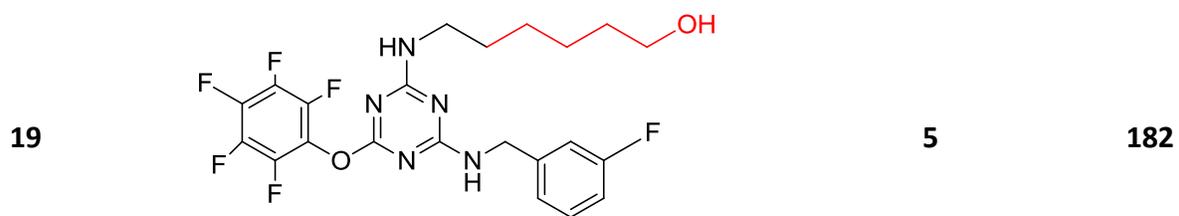
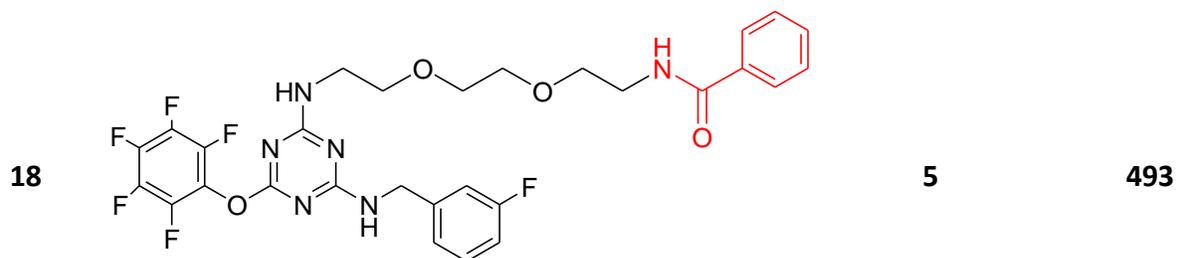
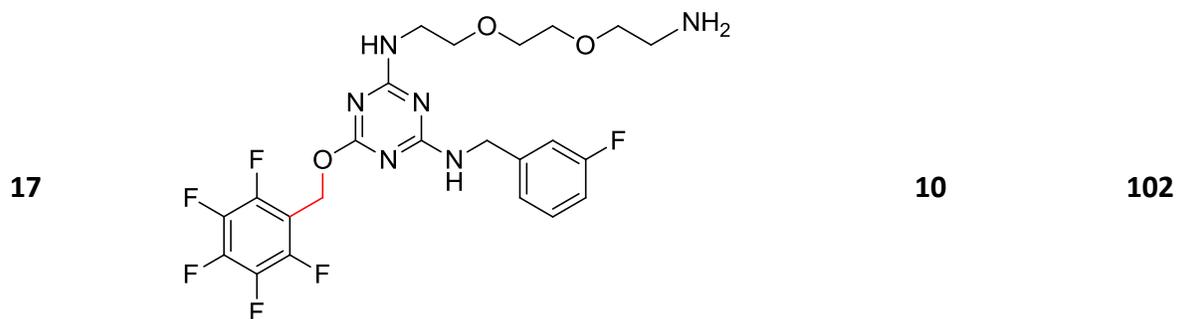
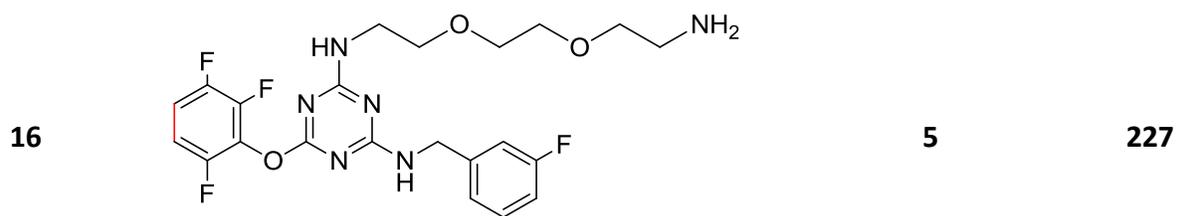
Introduction

| | | | |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|
| 2 |  | 5 | 373 |
| 3 |  | 5 | 537 |
| 4 |  | 10 | 400 |
| 5 |  | 10 3 | 360 |
| 6 |  | 10 | 360 |
| 7 |  | 10 | 353 |
| 8 |  | 5 | 270 |

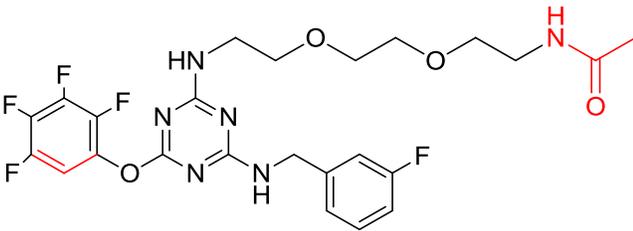
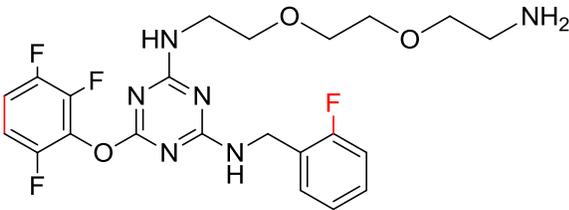
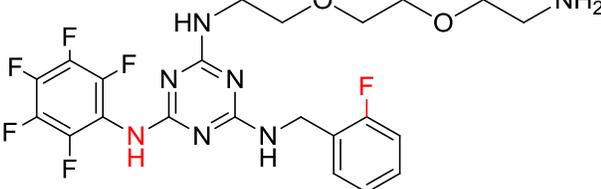
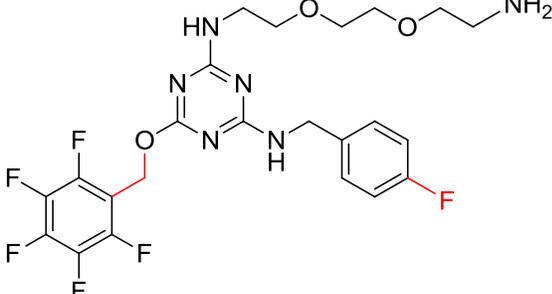
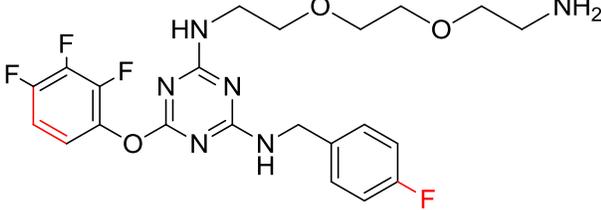
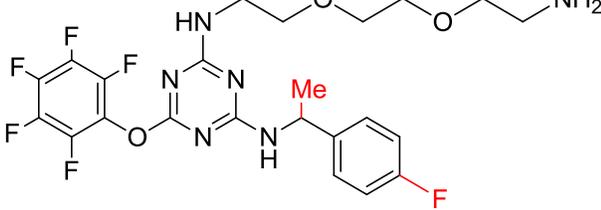
Introduction

| | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|
| 9 |  | 5 | 227 |
| 10 |  | 1 | 167 |
| 11 |  | 5 | 72 |
| 12 |  | 5 | 109 |
| 13 |  | 5 | 103 |
| 14 |  | 5 | 340 |
| 15 |  | 5 | 270 |

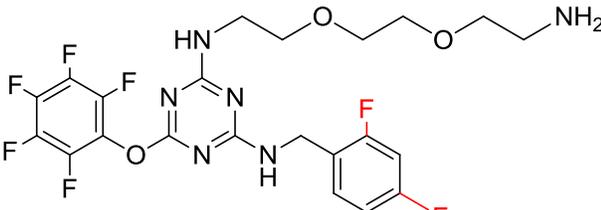
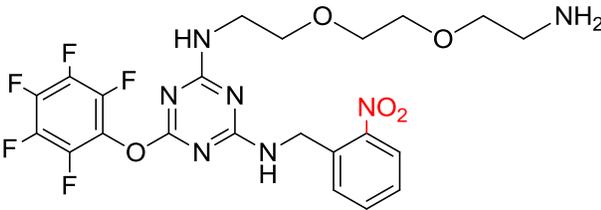
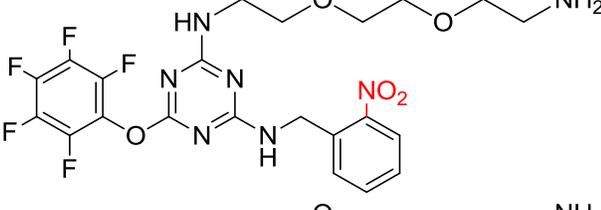
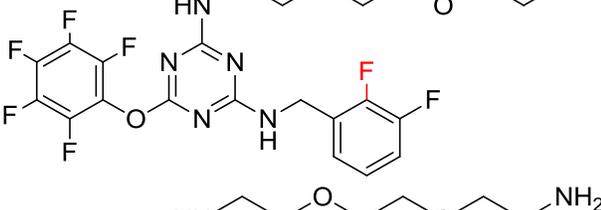
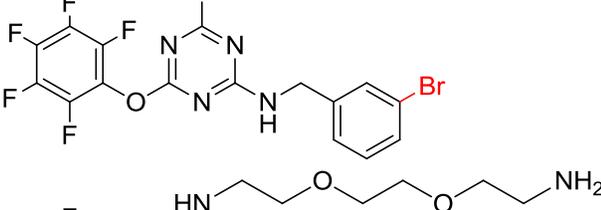
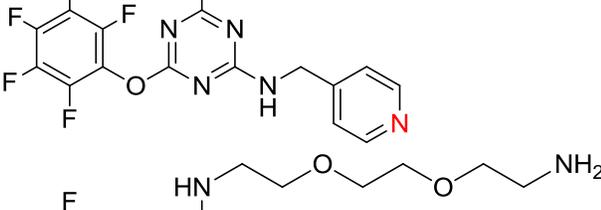
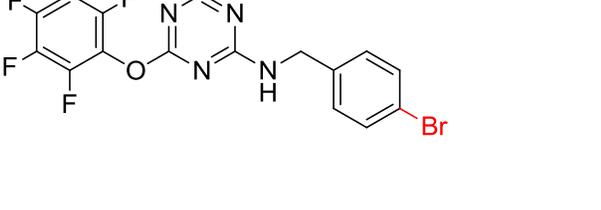
Introduction



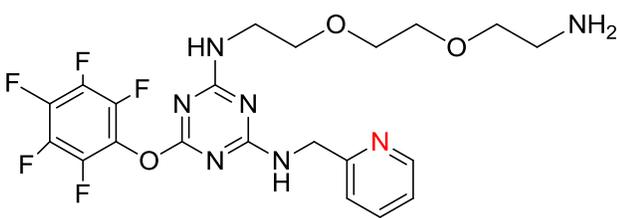
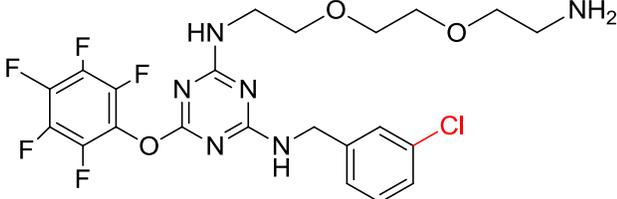
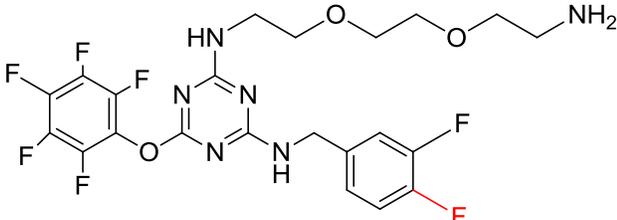
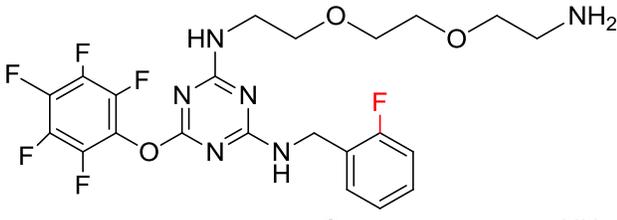
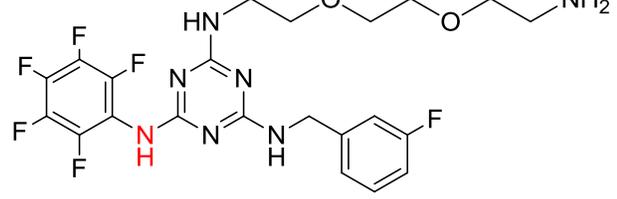
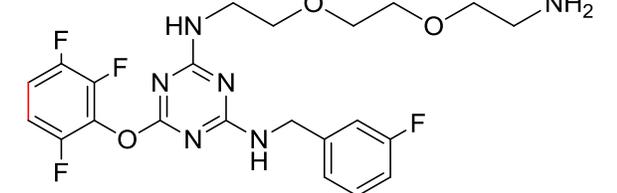
Introduction

| | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|-----|
| 21 |  | 5 | 537 |
| 22 |  | 5 | 277 |
| 23 |  | 5 | 170 |
| 24 |  | 10 | 87 |
| 25 |  | 5 | 160 |
| 26 |  | 5 | 537 |

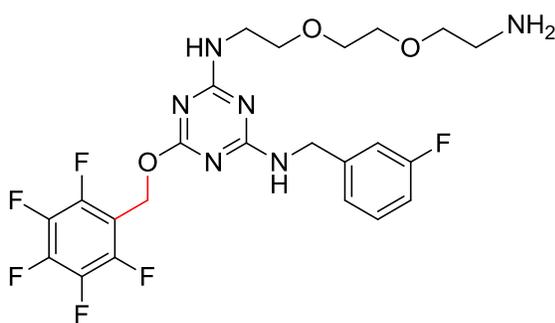
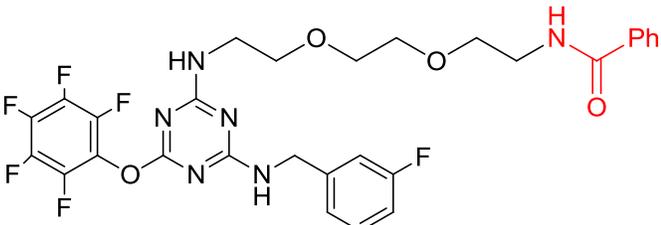
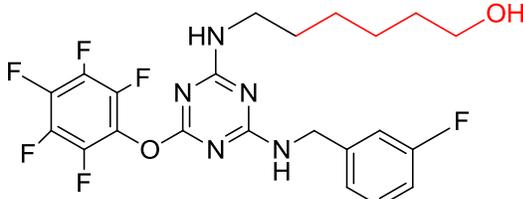
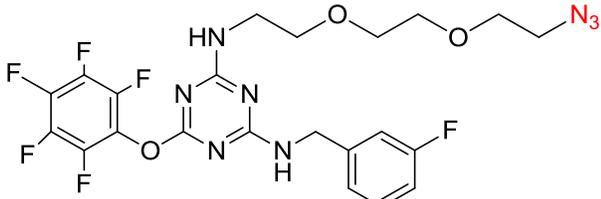
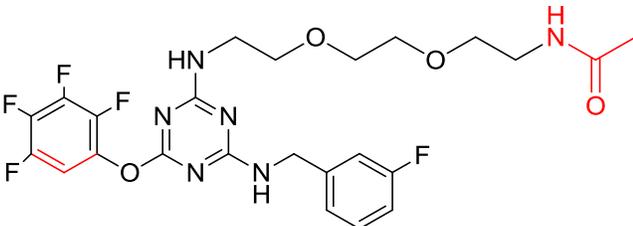
Introduction

| | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|
| 27 |  | 10 | 400 |
| 28 |  | 10 3 | 360 |
| 29 |  | 10 | 360 |
| 30 |  | 10 | 353 |
| 31 |  | 5 | 270 |
| 32 |  | 5 | 227 |
| 33 |  | 1 | 167 |

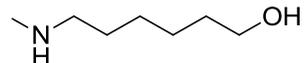
Introduction

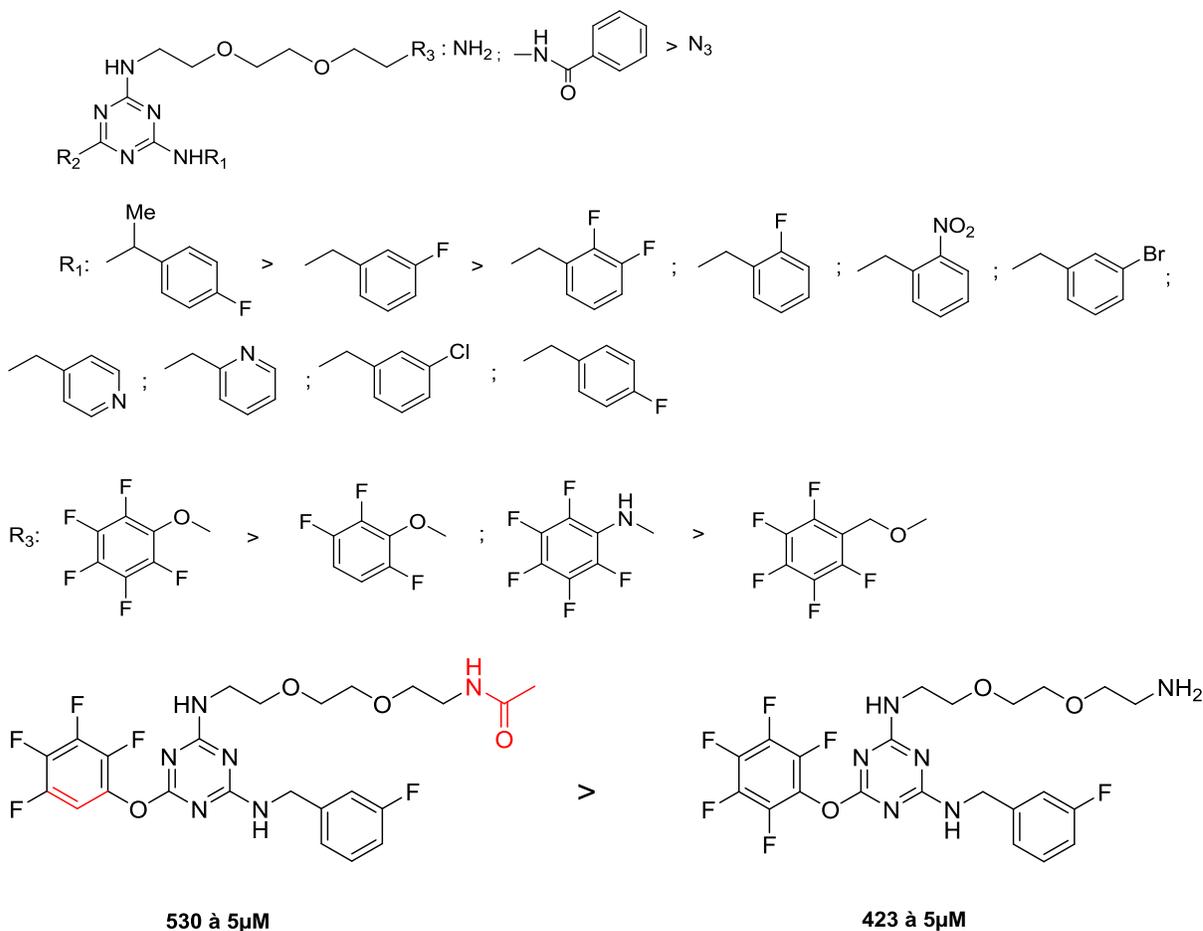
| | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|
| 34 |  | 5 | 72 |
| 35 |  | 5 | 109 |
| 36 |  | 5 | 103 |
| 37 |  | 5 | 340 |
| 38 |  | 5 | 270 |
| 39 |  | 5 | 227 |

Introduction

| | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----|-----|
| 40 |  | 10 | 102 |
| 41 |  | 5 | 493 |
| 42 |  | 5 | 182 |
| 43 |  | 5 | 197 |
| 44 |  | 5 | 537 |

Introduction

Remplacement de la chaîne par  : perte d'activité



Le remplacement du bout de la chaîne dans la mélanogénine par d'autres substituants augmente considérablement leurs activités.

Pour le R1 : les composés fluorés sont ceux qui augmentent l'activité des analogues.

Pour le R2 : le pentafluorophénoxy est celui qui apporte la meilleure activité. On remarque que plus il y a du fluor plus c'est actif, et que l'oxygène est plus actif que l'azote et doit être directement lié au cycle aromatique fluoré.

1.3 Chimie des triazines

La synthèse de triamino-triazines la plus fréquemment utilisée repose sur une tri-substitution séquentielle de la trichlorotriazine **1** (Schéma 1).⁴⁷ La première substitution se produit à basse température alors que les deuxième et troisième réactions nécessitent des températures plus élevées.

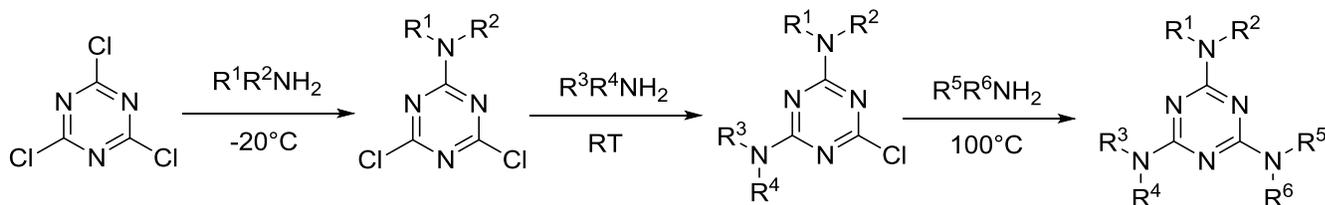


Schéma 1. Voie de synthèse générale des triamino-triazines.⁴⁷

La mélanogénine a été préparée par Y-T. Chang *et al.* selon l'approche ci-dessus.¹⁴ Les détails de cette synthèse ne figurent ni dans l'article décrivant ce composé, ni dans le brevet correspondant.⁴⁶ En effet, les triazines décrites dans cette étude ont été préparées par une synthèse sur surface solide où le groupement espaceur est conjugué par amination réductrice à des résines fonctionnalisées par du di-méthoxybenzaldéhyde (Schéma 2).

Introduction

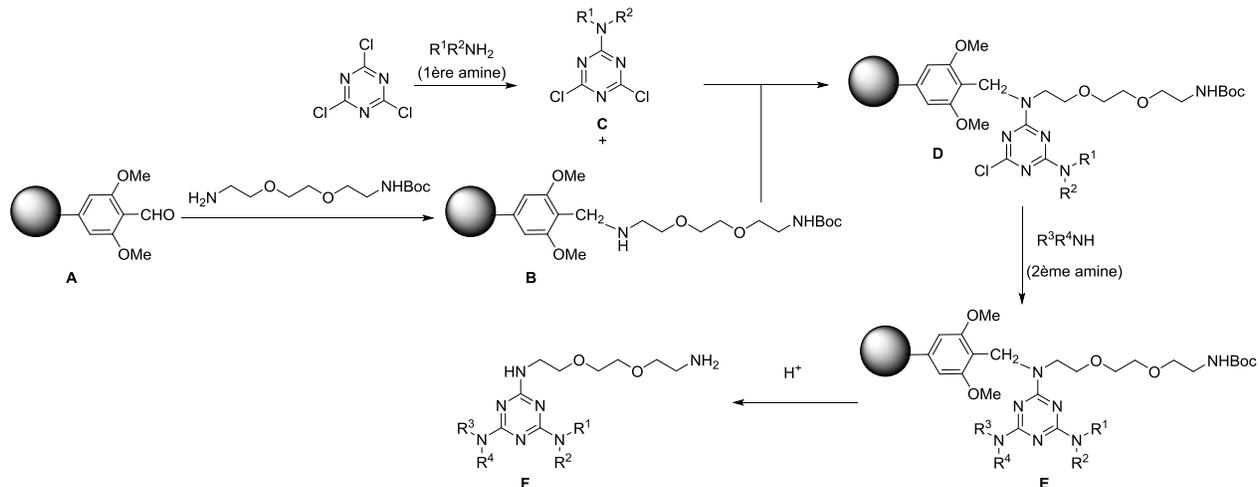


Schéma 2. Synthèse supportée des triazines fonctionnalisées développée par Chang *et al.*⁴⁶

Une première amine est condensée à la trichlorotriazine pour former un premier intermédiaire **C**, qui est ensuite combiné à la résine **B** pour produire la triazine trisubstituée **D**. Cette approche a permis de préparer des chimiothèques comportant des milliers de triazines substituées par deux amines différentes et par un groupement espaceur avec des quantités d'environ 1 à 2 mg. C'est par cette approche décrite par Chang *et al.* qu'a été synthétisé la chimiothèque incluant la mélanogénine, cependant ni les conditions expérimentales, ni les rendements des différentes étapes, n'ont été décrites dans le cas spécifique de la mélanogénine. Cette méthode a montré son efficacité pour préparer des triaminotriazines. En revanche, elle ne peut pas être efficacement appliquée à la synthèse de diaminotriazines substituées par un groupement pentafluorophénoxy. En effet la pentafluorophénol n'est pas suffisamment nucléophile pour réagir avec les triazines immobilisées **D** ou **E**.⁴⁶

T. Masquelin *et al.* ainsi que J. T. Brock *et al* en s'associant avec Y-T. Chang ont également développé une synthèse de triazines sur surface solide qui présente comme particularité de faire appel à une amino-chlorotriazine reliée à une résine par un thioéther comme intermédiaire clé (Schéma 3). Après une première addition d'amine, le thioéther est

Introduction

oxydé en sulfoxyde ou sulfone, ce qui le rend plus réactif que la chlorotriazine correspondante et permet d'introduire la pyrrolidine tout en induisant un clivage avec la résine.^{48,49}

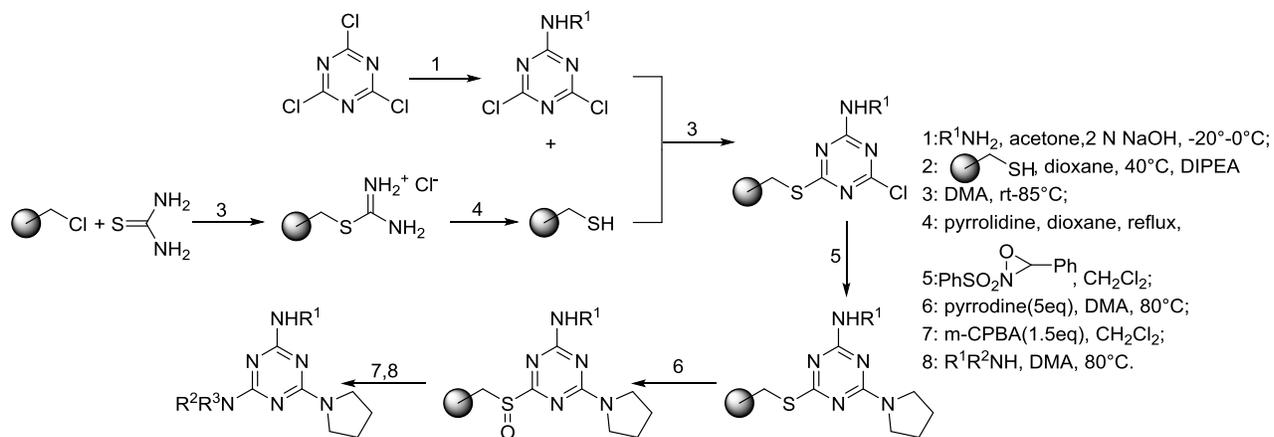


Schéma 3. Synthèse des triazines fonctionnalisées développée par Masquelin *et al.*⁴⁸

2. OBJECTIFS

2 Objectifs

Notre objectif principal était de développer une voie de synthèse simple et efficace pour préparer des analogues de la mélanogénine qui sont des composés originaux ayant potentiellement de meilleures activités biologiques, puis d'examiner les requis structuraux pour leurs activités promélanogéniques.

3. SYNTHÈSE

3 Synthèses

3.1 Mise au point d'une synthèse sélective d'analogues de la mélanogénine

La première tâche de mon projet fût de mettre au point une synthèse pratique et efficace de la mélanogénine et de ses analogues. Une première condensation à -20°C de la benzylamine **2** sur la trichlorotriazine **1** a donné le monoadduit **3** avec un rendement de 75 %. La condensation ultérieure avec le pentafluorophénol **4** à 0°C conduit à un mélange de rendement global de 72% dont les produits finaux sont le monoadduit **5** et le diadduit **6** dans un rapport respectif de 74 :26. Cette réaction n'étant pas sélective, nous avons cherché à examiner une autre stratégie (Schéma 4).

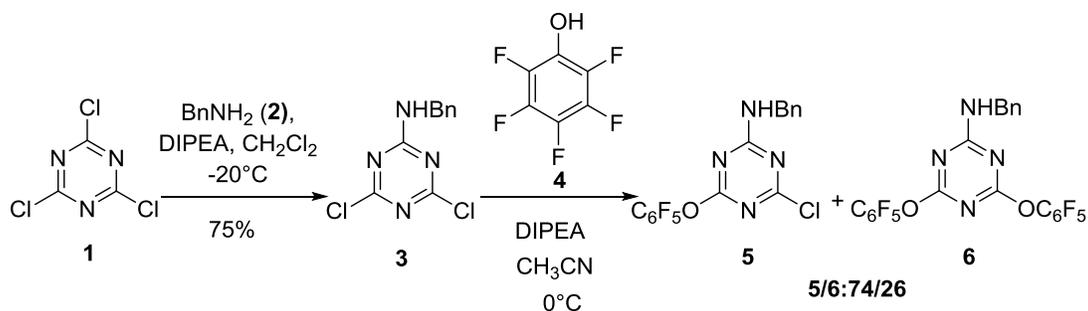


Schéma 4. Condensation du pentafluorophénol **4** sur la dichlorotriazine **3**.

Notre deuxième démarche a été inspirée des travaux de T. Masquelin *et al.*,⁴⁸ où la trichlorotriazine **1** est mise en réaction avec du benzylthiol **7** en présence de DIPEA pour donner un mélange de rendement 64% composé de monoadduit **8** et de di-adduit **9** dans un rapport 87:13 (Schéma 5).

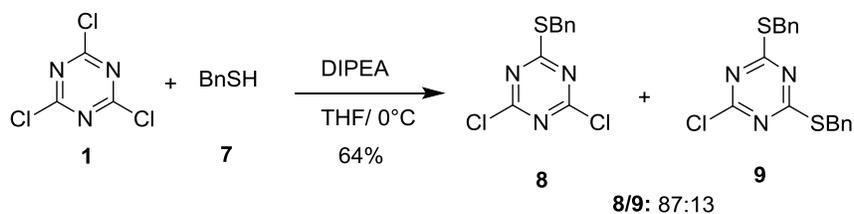


Schéma 5. Double substitution nucléophile d'une benzylthiol sur la trichlorotriazine
Selon les travaux de T. Masquelin *et al.*

Synthèse

L'approche suivante repose sur une double substitution nucléophile d'une benzylthiol sur la trichlorotriazine, suivie d'une 3^{ème} substitution par du pentafluorophénol et d'une oxydation des thioéthers en sulfones ou sulfoxydes pour faciliter leurs déplacements décrite par A. Vallribera *et al.* J'ai essayé deux oxydants (oxone et mCPBA) dans de multiples conditions (Schéma 6, Tableau 4).

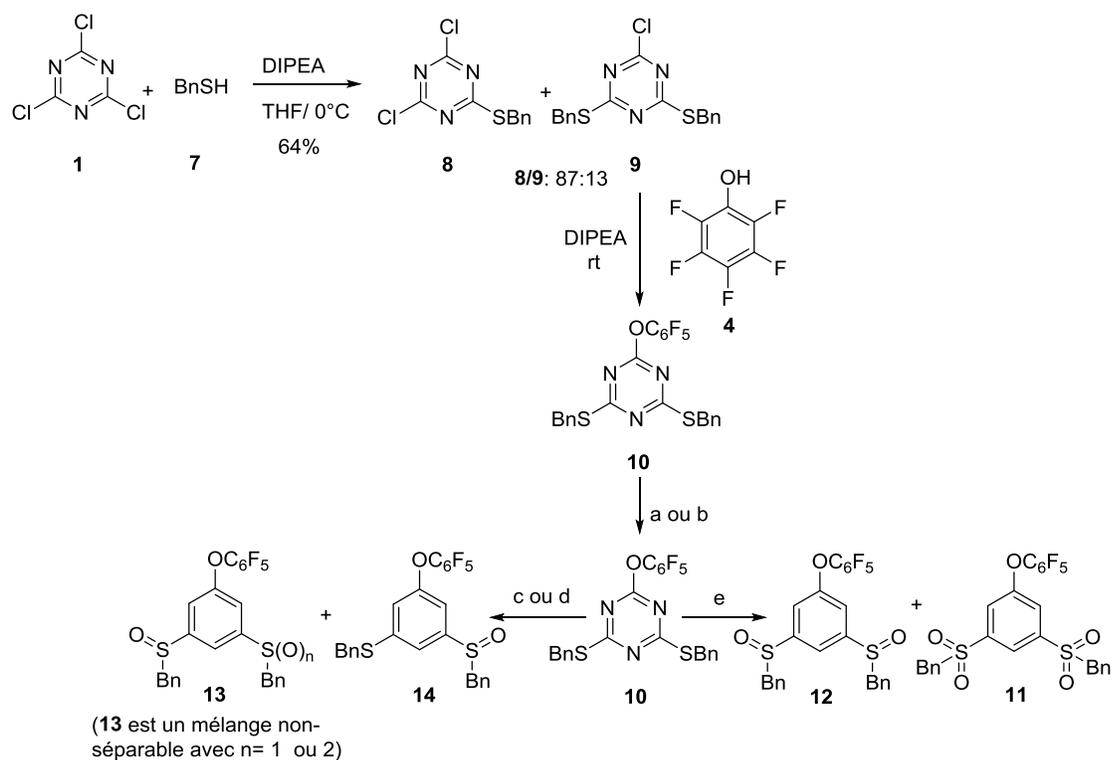


Schéma 6. Essai de développement d'une méthode de synthèse de triazines substituées par un groupement pentafluorophénoxy faisant appel à des intermédiaires thioéthers et sulfoxydes.

Synthèse

Tableau 4. Essais d'oxydation du composé 9

| | Conditions | Résultats |
|---|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| a | Oxone(5 éq)/THF/H ₂ O ; 0°C→RT | Principalement produit de départ. |
| b | Oxone (5 éq)/THF/H ₂ O (quantité de solvant doublée) ; 0°C→RT | Principalement produit de départ |
| c | Oxone (5 éq)/Acétone/H ₂ O: 4/1; RT | Mélange non séparable 13 (n=1 ou 2) + monosulfoxyde 14 dans un ratio 80%/20%. |
| d | Oxone (6 éq)/DMF, 0°C →RT | Mélange de disulfoxyde/sulfone, sulfoxyde dans un ratio de 95%/5%. |
| e | mCPBA (2.1 éq)/CH ₂ Cl ₂ ;0°C→RT | Mélange de disulfoxyde/disulfoxyde.dans un ratio de : 75%/25% |

Le traitement des produits issus des conditions **c** et **d** par des amines a donné des mélanges, ce qui nous a incité à mettre en place une nouvelle approche. Lors de nos expériences nous avons constaté que le groupement pentafluorophénoxy se déplace aussi facilement que les groupements sulfones ou sulfoxydes.

Synthèse

Une nouvelle approche s'est imposée où nous avons examiné la condensation du pentafluorophénol **4** sur la triazine **1**.

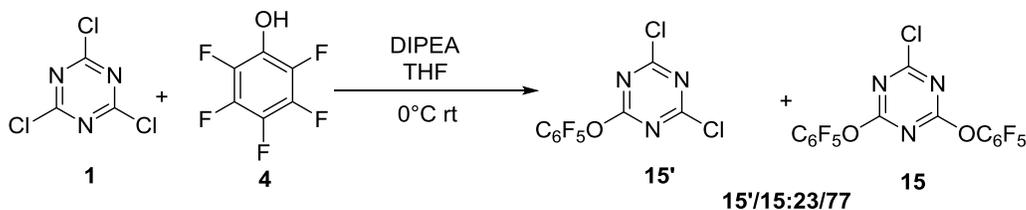


Schéma 7. Troisième approche pour la mise au point de méthode de synthèse de la mélanogénine et de ses analogues

Contrairement à la substitution par la plupart des nucléophiles, le remplacement d'un chlorure par un groupement pentafluorophénoxy ne perturbe guère le caractère électrophile des triazines, ce qui fait que les SNAr faisant intervenir le pentafluorophénol conduisent à un mélange de mono- et di-adduits. Nous avons donc cherché à développer une méthode pour nous affranchir de ce manque de sélectivité.

Notre nouvelle stratégie s'est basée sur les travaux de Katharina Reichenbacher *et al.* qui a décrit une triple addition du pentafluorophénol sur la trichlorotriazine.⁵⁰

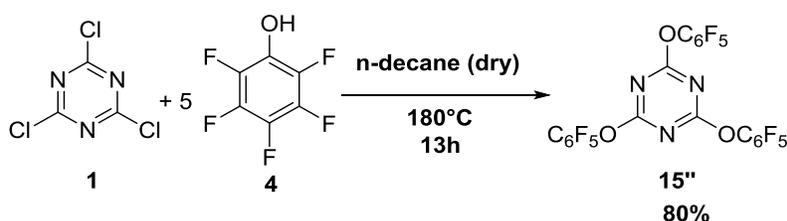


Schéma 8. Travaux de Katharina Reichenbacher *et al.*⁵⁰

Nous nous sommes inspirés de ces travaux et avons effectué dans un premier temps une di substitution nucléophile de la trichlorotriazine avec le pentafluorophénol avec 90% de rendement.

Synthèse

Dans un deuxième temps, une substitution par une première amine à une température comprise en 0 et 25°C a permis d'obtenir les intermédiaires **16a-e**. Une dernière SNar effectuée à température ambiante ou à reflux dans le dichlorométhane selon la réactivité de l'amine, permet d'obtenir les produits finaux désirés. La structure des composés synthétisés avec les rendements de la dernière étape sont indiqués dans les tableaux 5-9.

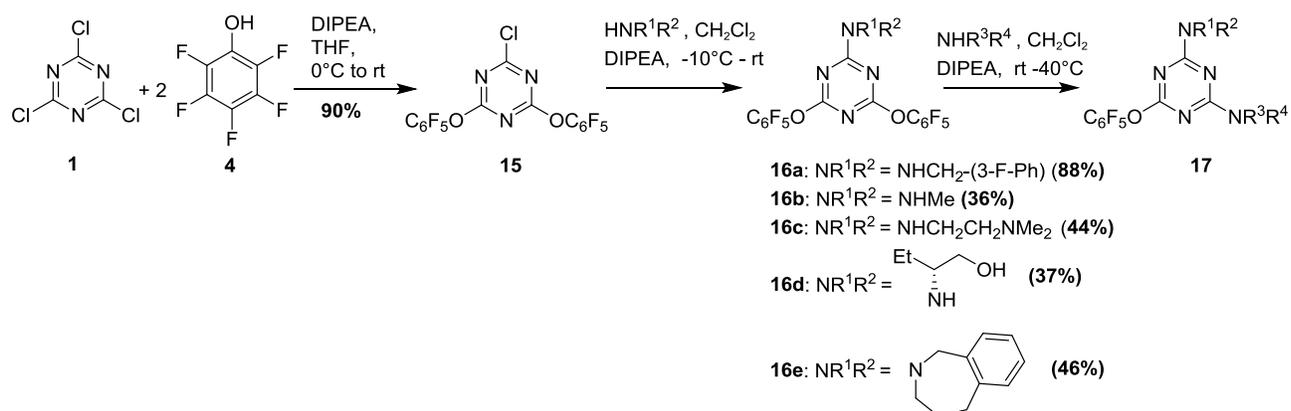


Schéma 9. Approche finale permettant d'accéder à la mélanogénine et à ses dérivés.

Certaines amines utilisées dans la 3^{ème} étape du schéma 17 n'étaient pas disponibles, ce qui nous a ramené à les synthétiser. Ainsi l'amine **Y** a été préparée par la méthode de Ghosh *et al.* par amination réductrice de la cétone **X** en utilisant du cyanoborohydrure de sodium.⁵¹ L'amine **Z** a quant à elle été préparée par hydrogénation de l'oxime correspondante.

Synthèse

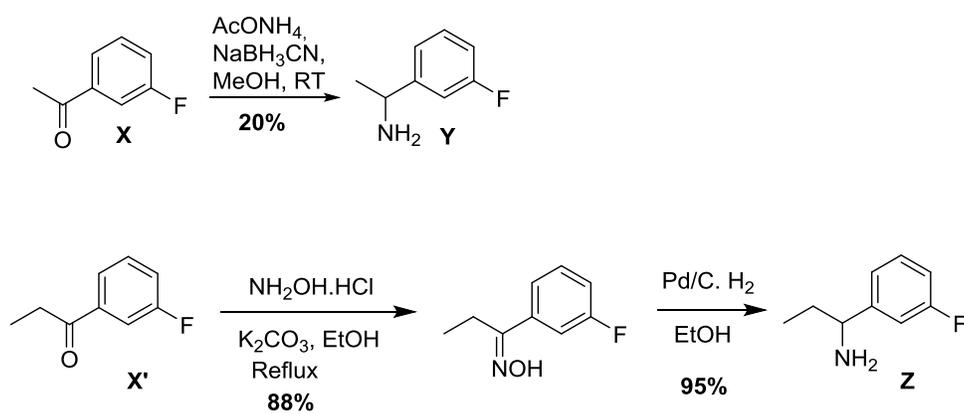


Schéma 10. Synthèse des amines Y et Z non-commerciales.

Synthèse

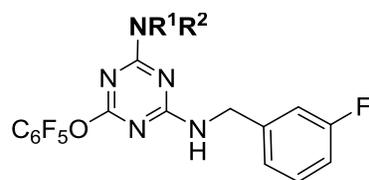
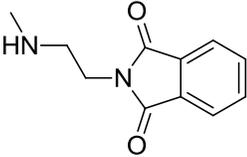
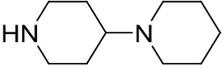
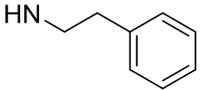
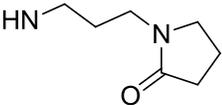
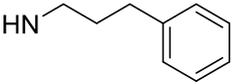
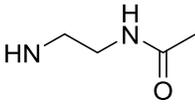
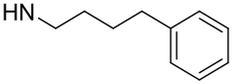
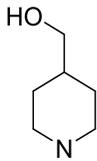
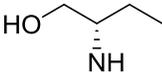
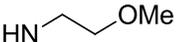
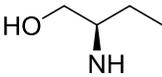


Figure 17. Les analogues 16a

Tableau 5. Les analogues 16a synthétisés

| | NR ¹ R ² | Rdt | | NR ¹ R ² | Rdt |
|-------|--------------------------------|-----|--------|--------------------------------|-----|
| Mel 1 | NH ₂ | 57% | Mel 14 | | 81% |
| Mel 2 | NHMe | 52% | Mel 15 | | 60% |
| Mel 3 | NMe ₂ | 99% | Mel 16 | | 57% |
| Mel 4 | | 32% | Mel 17 | | 99% |
| Mel 5 | | 82% | Mel 18 | | 88% |
| Mel 6 | | 99% | Mel 19 | | 27% |
| Mel 7 | | 94% | Mel 20 | | 82% |

Synthèse

| | | | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Mel 8 |  | 5% | Mel 21 |  | 99% |
| Mel 9 |  | 65% | Mel 22 |  | 89% |
| Mel 10 |  | 41% | Mel 23 |  | 99% |
| Mel11 |  | 62% | Mel 24 |  | 94% |
| Mel 12 |  | 96% | Mel 25 |  | 94% |
| Mel 13 |  | 55% | Mel26 |  | 95% |

Synthèse

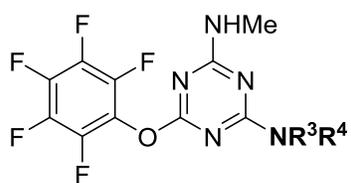


Figure 18. Les analogues 16b.

Tableau 6. Les analogues 16b synthétisés.

| | NR ³ R ⁴ | Rdt | | NR ³ R ⁴ | Rdt |
|--------|--------------------------------|-----|--------|--------------------------------|-----|
| Mel27 | | 81% | Mel33 | | 91% |
| Mel 28 | | 84% | Mel 34 | | 98% |
| Mel 29 | | 81% | MEL 49 | | 80% |
| Mel 30 | | 34% | Mel 50 | | 99% |
| Mel 31 | | 99% | Mel 51 | | 81% |
| Mel 32 | | 83% | | | |

Synthèse

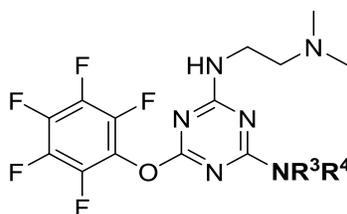


Figure 19. Les analogues 16c.

Tableau 7. Les analogues 16c synthétisés.

| | NR ³ R ⁴ | Rdt | | NR ³ R ⁴ | Rdt |
|-------|--------------------------------|-----|-------|--------------------------------|-----|
| Mel35 | | 99% | Mel42 | | 47% |
| Mel37 | | 91% | Mel43 | | 83% |
| Mel38 | | 95% | Mel52 | | 98% |
| Mel39 | | 13% | Mel53 | | 90% |
| Mel40 | | 65% | Mel54 | | 97% |
| Mel41 | | 86% | | | |

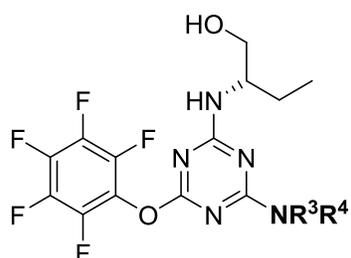


Figure 20. Les analogues 16d

Tableau 8. Les analogues 16d synthétisés.

| | NR ³ R ⁴ | Rdt | | NR ³ R ⁴ | Rdt |
|--------|--------------------------------|-----|--------|--------------------------------|-----|
| Mel 36 | | 90% | Mel 46 | | 50% |
| Mel 44 | | 92% | Mel 47 | | 92% |
| Mel 45 | | 89% | Mel 48 | | 83% |

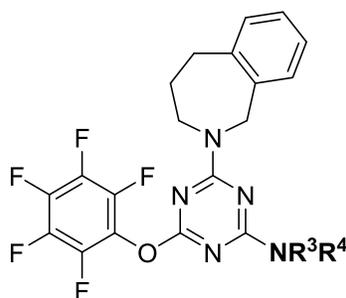


Figure 21. Les analogues 16e.

Tableau 9. Les analogues 16e synthétisés.

| | NR ³ R ⁴ | Rdt | NR ³ R ⁴ | Rdt | NR ³ R ⁴ | Rdt | | |
|-------|--------------------------------|-----|--------------------------------|-----|--------------------------------|-------|--|-----|
| Mel55 | | 77% | Mel56 | | 71% | Mel57 | | 79% |

3.2 Synthèse de la mélanogénine

Pour la synthèse de la mélanogénine, j'ai suivi la même procédure que précédemment, en utilisant la diamine monoprotégée **A** pour obtenir l'adduit **A'** qui a été déprotégé ensuite par hydrogénation. Il s'agit là de la première synthèse efficace de la mélanogénine.

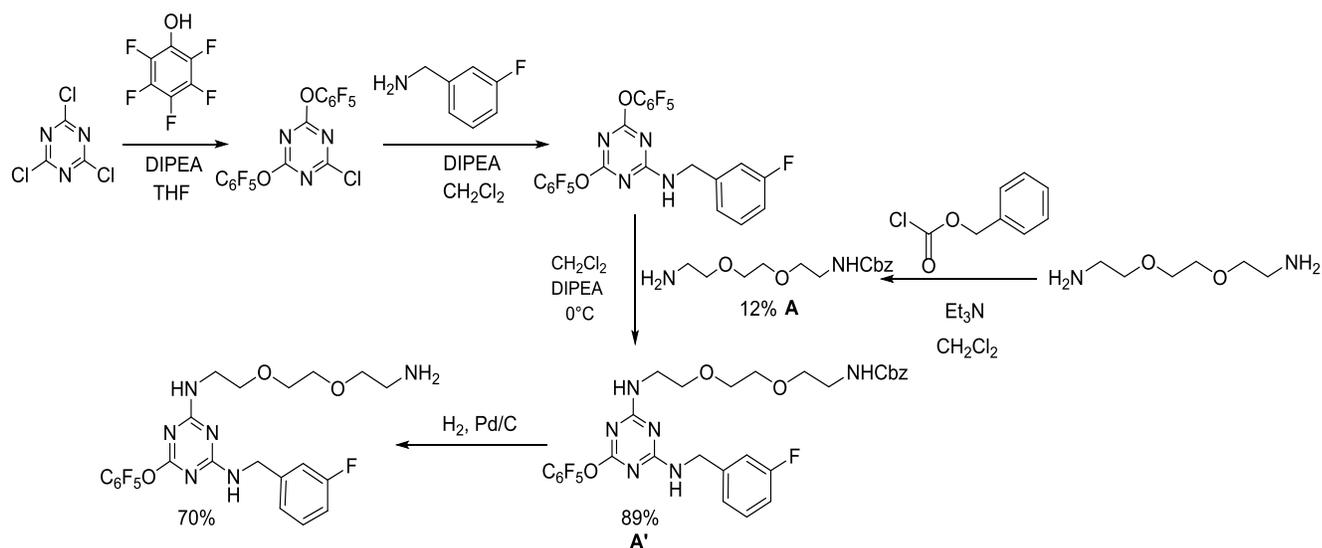


Schéma 11. Synthèse de la mélanogénine.

3.3 Synthèse du linker

Pour les tests biologiques notamment celles du pull down, (visant à prouver que les analogues de la mélanogénine synthétisés se lient aux prohibitines), nous avons dû conjuguer le Mel 41 à un groupement espaceur (linker) susceptible d'être immobilisé sur l'affigel10 (agarose activée).

La synthèse de ce bras espaceur s'est faite à partir d'une animation réductrice, en faisant réagir l'anime **A** et la *N*-Boc-piperidin-4-one **B** en utilisant le triacétoxyborohydride de sodium comme agent réducteur à 0°C avec un rendement de 82%, suivi d'une déprotection du groupement Boc par l'acide trifluoroacétique pour le coupler avec l'analogue **16e** obtenu avec un rendement de 88%, puis le déprotéger du groupement Cbz par hydrogénation suivie d'un couplage avec l'Affigel10.

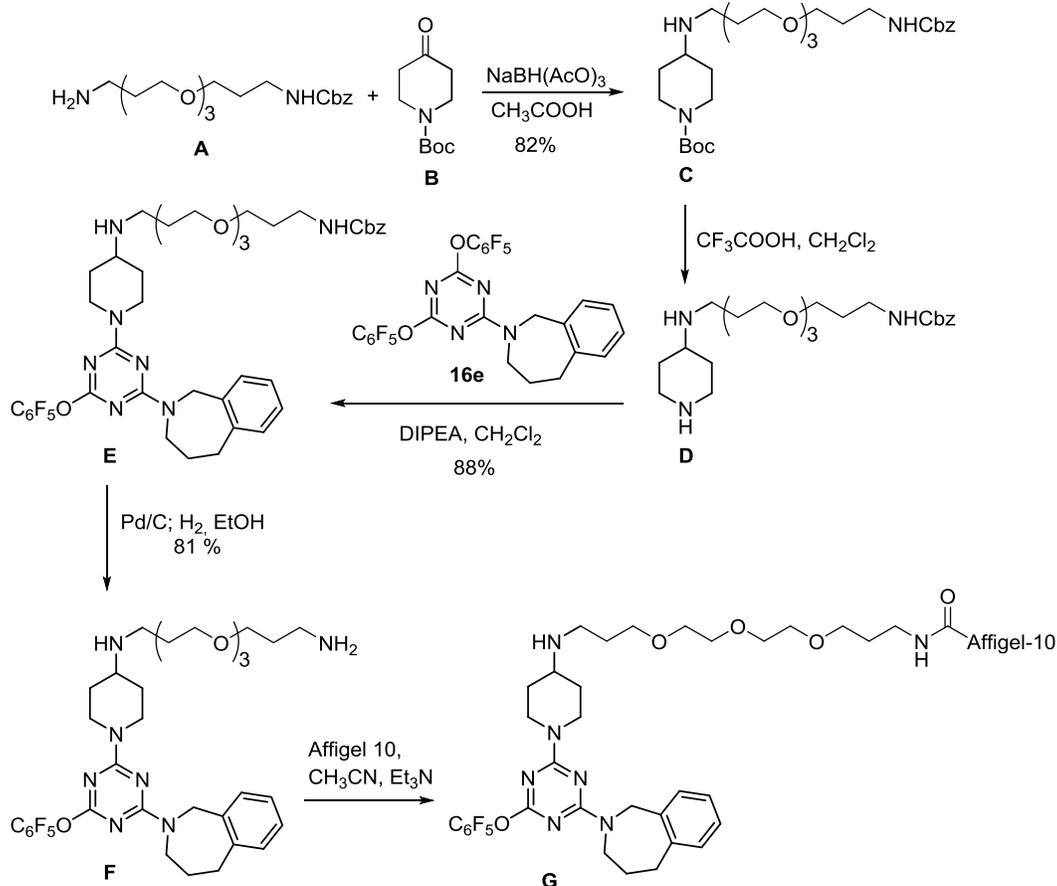


Schéma 12. Synthèse de l'analogue de la mélanogénine couplé au groupement espaceur et à l'affigel10.

4. RESULTATS BIOLOGIQUES

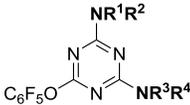
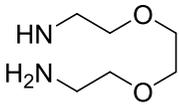
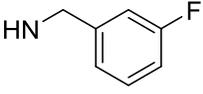
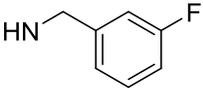
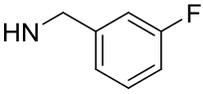
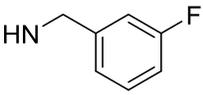
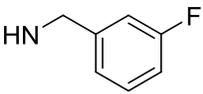
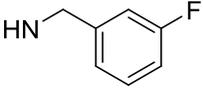
Résultats biologiques

4 Résultats biologiques

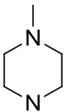
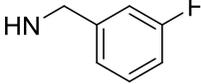
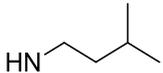
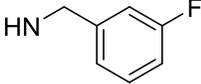
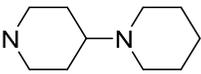
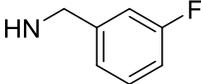
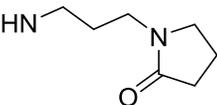
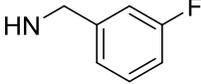
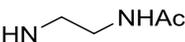
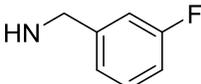
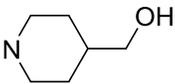
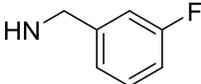
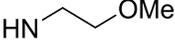
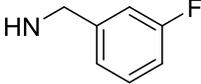
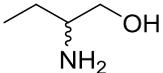
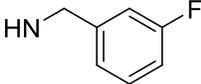
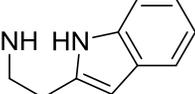
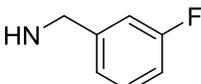
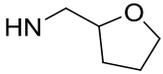
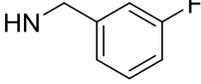
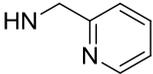
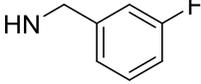
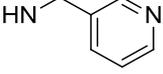
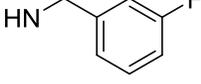
4.1 Stimulation de la pigmentation cellulaire

L'équipe du professeur Ghanem à l'institut Jules Bordet (Bruxelles) a examiné si ou non nos nouveaux analogues de la mélanogénine favorisent la mélanogénèse dans les cellules de mélanome HBL en mesurant l'ampleur de la formation du pigment (Figure 22, Tableau 10).⁵²

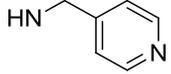
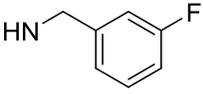
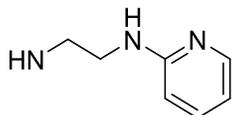
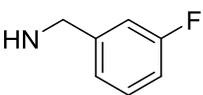
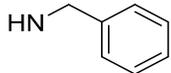
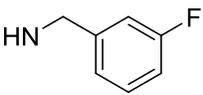
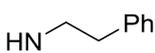
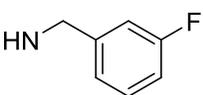
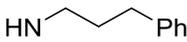
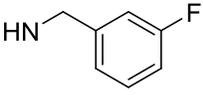
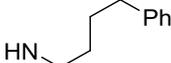
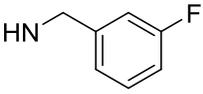
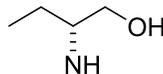
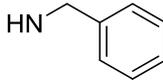
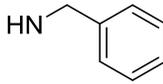
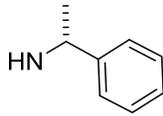
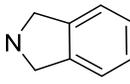
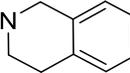
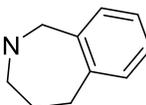
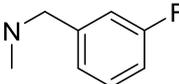
Tableau10. Pourcentage d'induction de la mélanogénèse dans la lignée de cellules de mélanome humain HBL.

|  | NR ¹ R ² | NR ³ R ⁴ | Induction de la mélanogénèse ^a | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------|
| | | | 1 μM | 10 μM |
| | Vehicule | | 1.00 | 1.00 |
| | Fluorizoline | | 1.51 | 1.37 |
| Mélano-génine |  |  | 1.05 | 1.25 |
| Mel 1 | NH ₂ |  | 0.92 | 0.91 |
| Mel 2 | NHMe |  | 0.89 | 0.84 |
| Mel 3 | NMe ₂ |  | 1.04 | 1.05 |
| Mel 4 |  |  | 0.99 | 1.08 |
| Mel 5 |  |  | 0.85 | 0.93 |

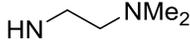
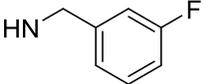
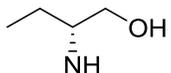
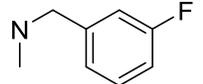
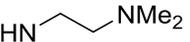
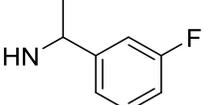
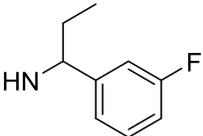
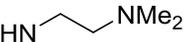
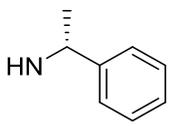
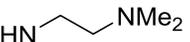
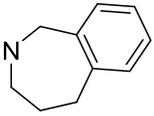
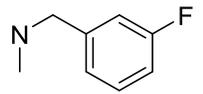
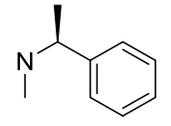
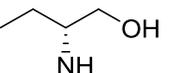
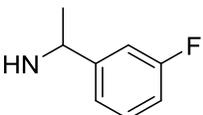
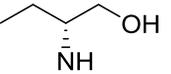
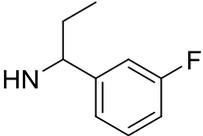
Résultats biologiques

| | | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Mel 6 |  |  | 0.78 | 0.65 |
| Mel 7 |  |  | 0.70 | 0.89 |
| Mel 9 |  |  | 1.15 | 2.01 |
| Mel 10 |  |  | 0.99 | 1.04 |
| Mel 11 |  |  | 0.91 | 1.00 |
| Mel 12 |  |  | 0.89 | 0.84 |
| Mel 13 |  |  | 0.80 | 0.76 |
| Mel 14 |  |  | 1.06 | 1.39 |
| Me l15 |  |  | 1.09 | 1.25 |
| Mel 16 |  |  | 1.07 | 0.95 |
| Mel 17 |  |  | 1.02 | 1.01 |
| Mel18 |  |  | 0.92 | 0.94 |

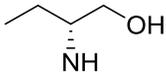
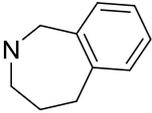
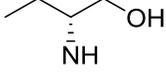
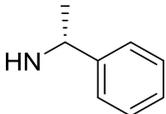
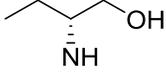
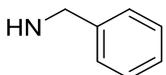
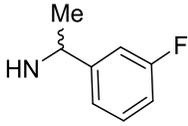
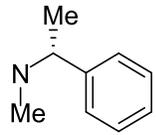
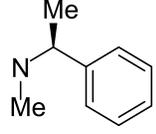
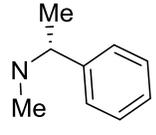
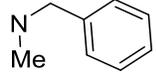
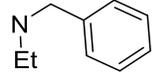
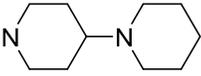
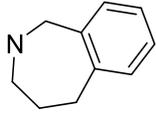
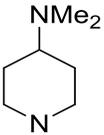
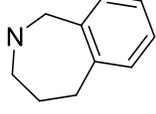
Résultats biologiques

| | | | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Mel19 |  |  | 0.77 | 0.76 |
| Mel 20 |  |  | 0.97 | 1.09 |
| Mel 21 |  |  | 0.89 | 1.10 |
| Mel 22 |  |  | 0.90 | 1.11 |
| Mel 23 |  |  | 1.07 | 1.07 |
| Mel 24 |  |  | 0.90 | 1.00 |
| Mel 26 |  |  | 0.80 | 0.61 |
| Mel 27 | NHMe |  | 0.90 | 0.69 |
| Mel 28 | NHMe |  | 1.16 | 0.89 |
| Mel 31 | NHMe |  | 0.93 | 0.98 |
| Mel 32 | NHMe |  | 0.84 | 0.87 |
| Mel 33 | NHMe |  | 0.80 | 0.86 |
| Mel 34 | NHMe |  | 0.84 | 0.78 |

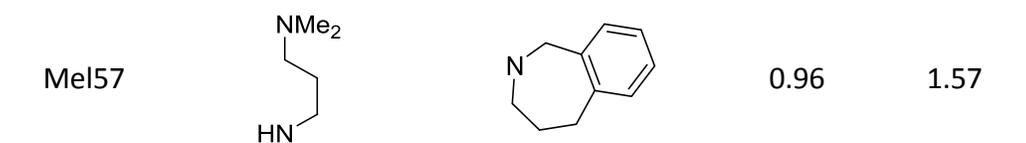
Résultats biologiques

| | | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Mel 35 |  |  | 0.98 | 0.59 |
| Mel 36 |  |  | 0.77 | 0.81 |
| Mel 38 |  |  | 0.77 | 0.43 |
| Mel 39 |  |  | 0.86 | 0.55 |
| Mel 40 |  |  | 0.78 | 0.61 |
| Mel 41 |  |  | 0.89 | 2.23 |
| Mel 42 |  |  | 1.15 | 1.97 |
| Mel 43 |  |  | 0.94 | 0.71 |
| Mel 44 |  |  | 0.78 | 0.68 |
| Mel 45 |  |  | 0.95 | 0.74 |

Résultats biologiques

| | | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Mel 46 |  |  | 0.85 | 0.74 |
| Mel47 |  |  | 0.94 | 0.83 |
| Mel48 |  |  | 0.96 | 0.89 |
| Mel49 | NHMe |  | 1.01 | 0.84 |
| Mel50 | NHMe |  | 0.88 | 0.94 |
| Mel51 | NHMe |  | 1.01 | 0.86 |
| Mel52 | HNCH ₂ CH ₂ NMe ₂ |  | 1.25 | 1.53 |
| Mel53 | HNCH ₂ CH ₂ NMe ₂ |  | 0.98 | 0.99 |
| Mel54 | HNCH ₂ CH ₂ NMe ₂ |  | 1.11 | 1.43 |
| Mel55 |  |  | 0.87 | 1.79 |
| Mel56 |  |  | 0.83 | 1.51 |

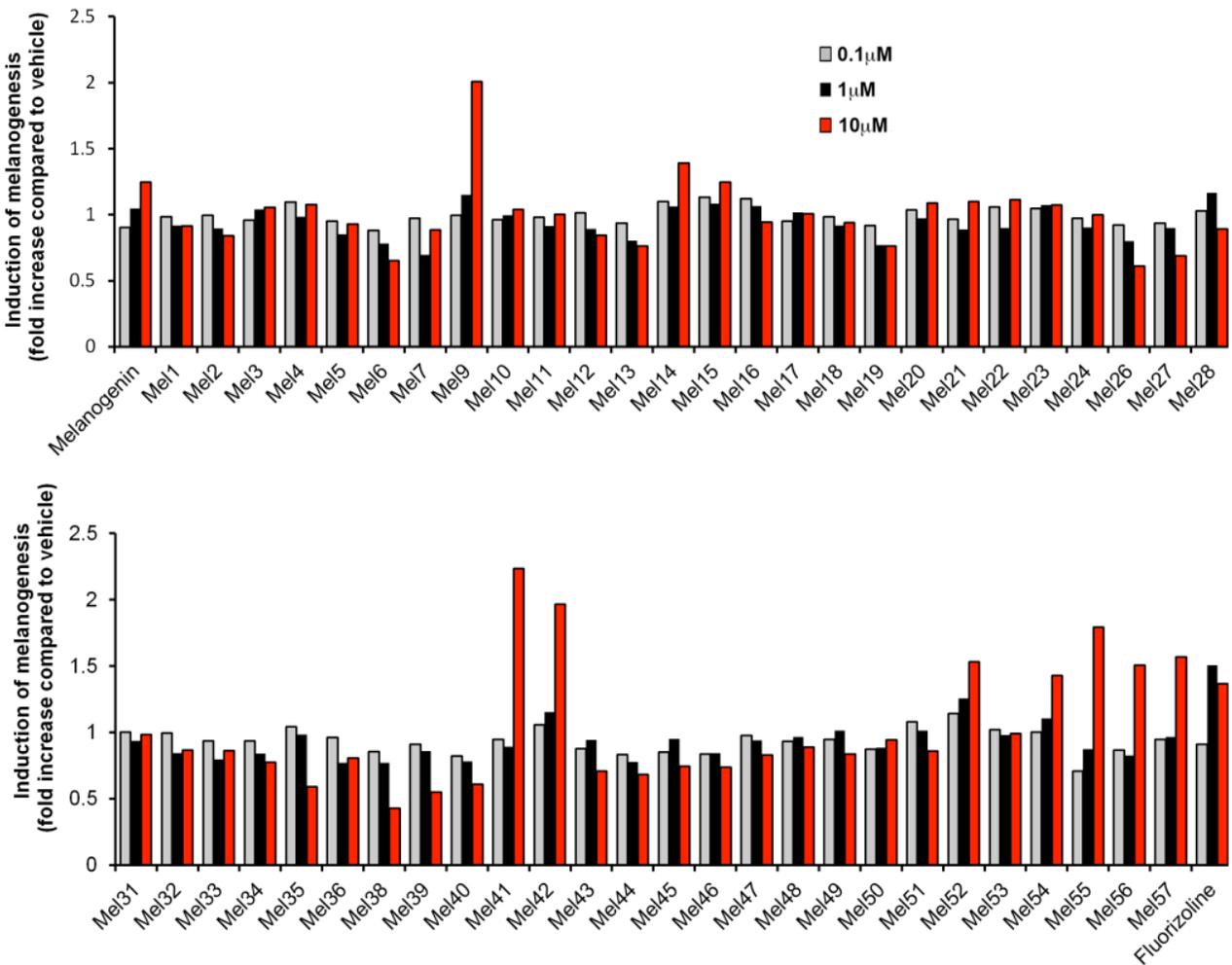
Résultats biologiques



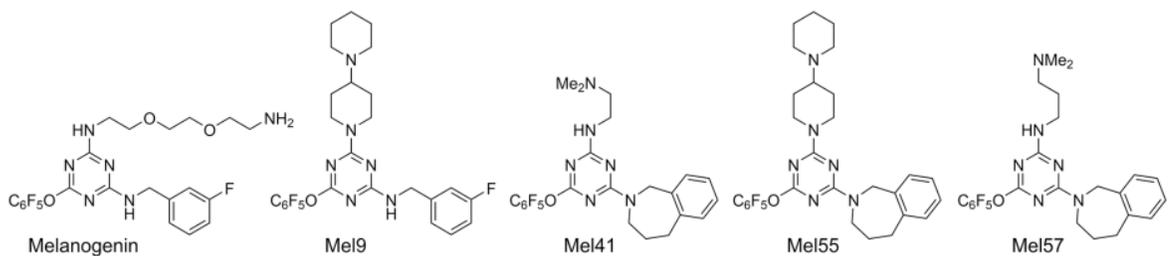
Contrairement aux cellules (mom) utilisées à l'origine pour découvrir la mélanogénine, les cellules HBL sont moins sensibles aux signaux d'induction de la mélanogénèse, ce qui permet de distinguer les composés puissants des composés peu actifs et d'éviter les faux positifs. Dans les cellules HBL, la mélanogénine a stimulé la formation de pigment 1,25 fois par rapport au véhicule, alors que la plupart des composés criblés n'ont pas activé la mélanogénèse. Les agents les plus actifs comprenaient une fraction N,N-diméthyl-éthylènediamine, avec une forte préférence pour une tétrahydrobenzazépine (Mel41). Ce composé ayant augmenté de 2,23 fois la pigmentation (Figure 22A).

Résultats biologiques

A



B



C

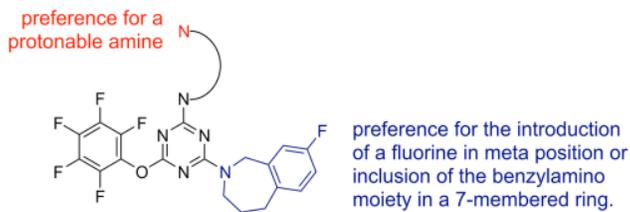


Figure 22. Effet sur la pigmentation cellulaire des analogues de la mélanogénine.

Résultats biologiques

Des cellules de mélanome humain HBL ont été traitées pendant dix jours avec de la mélanogénine, ses analogues et le ligand PHB fluorizoline (0,1 ; 1 et 10 μM). Toutes les expériences ont été réalisées indépendamment en duplicat.

A) Teneur en mélanine exprimée est relativement importante par rapport à celles des cellules HBL traitées avec le véhicule.

B) Structures des composés actifs représentatifs.

C) Résumé des requis structuraux pour l'activité promélanogénique.

Fait intéressant, un autre ligand du PHB, la fluorizoline,^{53,54} favorise significativement la mélanogénèse dans les cellules HBL, confirmant que cette induction de la pigmentation est en effet médiée par une action sur les PHB. Tous les composés actifs ont été substitués par un substituant diaminé, avec une légère préférence pour la *N,N*-diméthyl-éthylènediamine sur la pipéridinopipéridine (Mel55), la 4-diméthylaminopipéridine (Mel56) ou la *N,N*-diméthylpropylènediamine (Mel57). L'induction de la mélanogénèse a également été favorisée par la *N*-méthylation, la *N*-éthylation et la *C*-méthylation en position benzylique avec une configuration *R*, ou par l'introduction d'un fluor en méta sur le phényle.

Pour examiner si les effets promélanogéniques sont spécifiques à ce type cellulaire, l'activité de Mel9 et Mel41 dans deux autres lignées cellulaires a été testée. Le Mel9 et le Mel41 induisaient significativement la mélanogénèse également dans les cellules de mélanome MM043 et MM162 ce qui est en accord avec les résultats précédents (Figure 23).

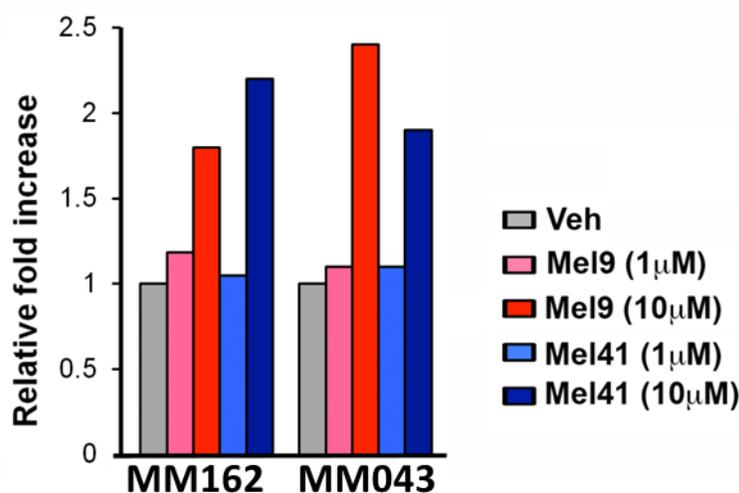


Figure 23. Effet de Mel9 et Mel 41 sur la pigmentation cellulaire dans les lignées cellulaires MM162 et MM043.

Résultats biologiques

Les cellules de mélanome humain MM043 et MM162 ont été traitées pendant dix jours avec le Mel9 et le Mel 41 (1 et 10 μM). La teneur en mélanine exprimée est relativement importante par rapport aux cellules traitées avec le véhicule.

4.2 Le Mel55 interagit avec PHB1

Pour vérifier que les nouveaux dérivés de la mélanogénine se lient bien à la PHB1, le Mel55 a été conjugué à des billes d'Affigel-10 à travers un bras espaceur et un pull-down a été effectué en utilisant des lysats de cellules entières issus des cellules de mélanome HBL (Figure 24). Le Mel55 a été choisi parce qu'il combine les caractéristiques structurales de Mel9 et Mel41 et est par conséquent un représentant typique de cette classe de composés. L'Affigel-10 conjugué à Mel55 a pu se lier à la PHB1, ce que le témoin Affigel-10 n'a pas pu faire.

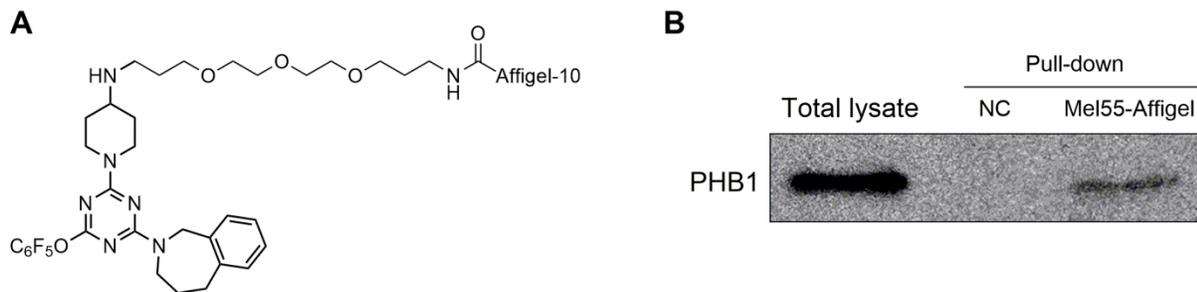


Figure 24: Mel55 interagit avec PHB1.

A) Structure de l'Affigel-10 conjugué à Mel55 ou au linker uniquement (témoin négatif, NC).

B) Analyse par transfert de Western de protéines arrachées à partir des billes Affigel-10 couplées au Mel55 ou au négatif, en utilisant un lysat de cellules de mélanome HBL.

4.3 Le Mel9 et le Mel41 régulent à la hausse le MITF et la tyrosinase grâce à l'activation de LC3

Ayant identifié des sondes avec des activités promélanogéniques améliorées, les effets de Mel9 et Mel41 ont été ensuite examinés sur les protéines clés de signalisation qui régulent la mélanogénèse dans les cellules du mélanome HBL (Figure 25). Le facteur de transcription

Résultats biologiques

associé à la microphthalmie (MITF) est un facteur de transcription restreint qui est essentiel au développement, à la survie et au fonctionnement des mélanocytes et à la mélanogénèse.⁵⁵ En particulier, MITF augmente la transcription de la tyrosinase, l'enzyme limitant la vitesse dans la biosynthèse de la mélanine. Ainsi, nous avons examiné le Mel9 et le Mel41 pour la régulation du MITF et l'expression de la tyrosinase. Conformément à la stimulation de la mélanogénèse, l'expression du MITF et de la tyrosinase a augmenté considérablement lors du traitement avec le Mel9 et le Mel41. L'augmentation de l'expression de MITF était plus faible à 24h qu'à 48h, mais l'expression de la tyrosinase était légèrement plus élevée après 24 heures de traitement.

La chaîne légère 3 β de la protéine 1 associée aux microtubules (LC3) est impliquée à la fois dans la régulation du MITF et dans la mitophagie.^{42,43} En effet, lors de l'induction de la mélanogénèse, la forme cytosolique de LC3 (LC3-I) est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine pour former le conjugué LC3-phosphatidyléthanolamine (LC3-II), ce qui favorise l'expression du MITF.⁴² De plus, PHB2 interagit avec LC3-II pour induire la dégradation des mitochondries endommagées.⁴³ Ainsi, nous avons supposé que le Mel9 et le Mel41 pourraient induire une mélanogénèse par activation de LC3 ce qui est effectivement le cas. En conséquence, le Mel9 et le Mel41 ont induit une accumulation de LC3-II d'une manière dépendante de la dose, indiquant que le Mel9 et le Mel41 agissent sur les PHB pour promouvoir la mélanogénèse par la voie LC3-II-MITF. Cet effet était moins prononcé après 48h qu'après 24h.

Résultats biologiques

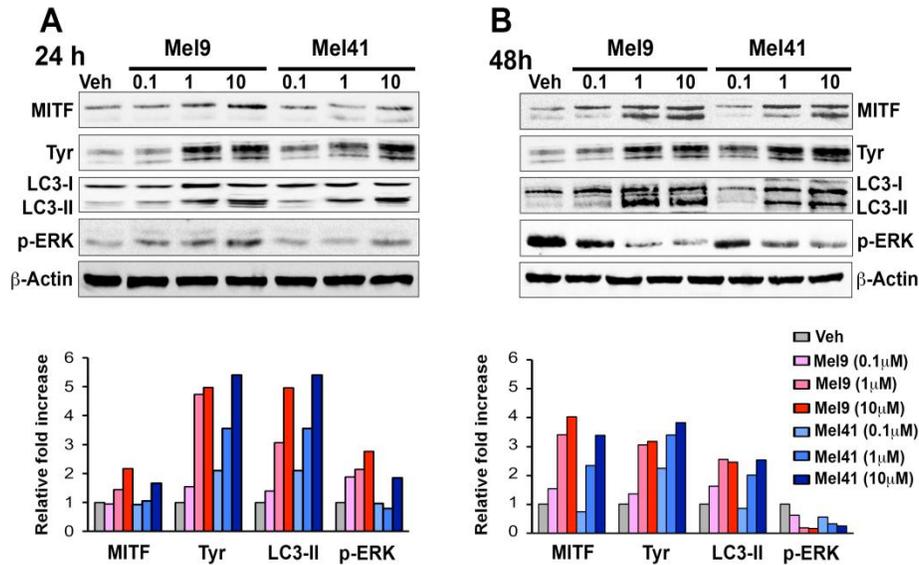


Figure 25. Activation de MITF via l'activation de LC3-II par les ligands PHB le Mel9 et le Mel41.

A) Les Western Blots représentatifs illustrant l'effet du Mel9 et du Mel41 (0, 0,1, 1, 10 μ M) pendant 24 et 48 heures dans des cellules HBL. Des quantités égales de protéines extraites (35 μ g) ont été analysées par la méthode de transfert de Western avec des anticorps contre le MITF, la tyrosinase, le LC3 et le phospho-ERK.

B) Les analyses densitométriques des bandes immunoréactives. Les niveaux de phosphorylation de ERK ont été corrigés avec l'expression de la protéine totale ERK, les taux d'expression de MITF, de tyrosinase et de LC3 ont été corrigés avec l'expression de la β -actine. Les résultats représentent le moyen de deux expériences indépendantes.

Pour corroborer l'effet de nos ligands PHB sur l'activation de LC3, nous avons examiné si l'activité promélanogénique peut être modulée par un inhibiteur (PIK-III) ou un activateur (HD1) de l'autophagie et l'activation de LC3. Comme prévu, le PIK-III a effectivement inhibé l'activité promélanogénique du Mel9, tandis que HD1 a amélioré cette activité (Figure 26A). En conséquence, PIK-III a réprimé l'expression de la conversion MITF et LC3 induite par Mel9, tandis que HD1 a favorisé ces deux événements (Figures 26B et 26C).

Résultats biologiques

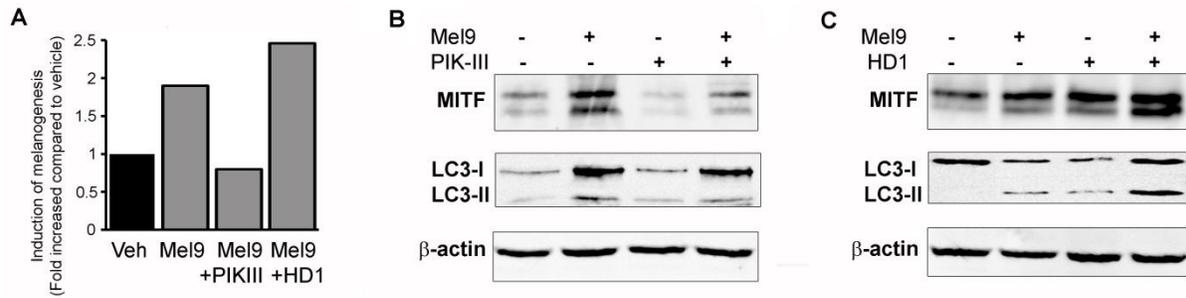


Figure 26. Inhibition et amélioration de l'activité promélanogénique du Mel9 respectivement par l'inhibiteur (PIK-III), l'activateur de l'autophagie (HD1) et l'activation de LC3.

A) Modulation de l'activité promélanogénique du Mel9 par PIK-III et HD1. Les cellules HBL ont été traitées par du Mel9 (10 μ M) pendant dix jours avec et sans le PIK-III (10 μ M) et le HD1 (10 μ M), la teneur en mélanine exprimée par ces cellules est relativement supérieure à celle à celle traitées avec le véhicule.

B) Modulation de l'expression MITF induite par du Mel9 et l'activation du LC3 par le PIK-III et le HD1. Les cellules HBL ont été traitées par du Mel9 (10 μ M) pendant 24 heures avec et sans le PIK-III (10 μ M) et le HD1 (10 μ M). Des quantités égales de protéines extraites (35 μ g) ont été analysées par Western blot avec des anticorps contre le MITF, le LC3 et la β -actine. Le PIK-III bloque l'activation de LC3 et l'autophagie en inhibant l'activité enzymatique de VPS34. L'HD1 a l'effet opposé en activant l'AMPK.

En plus du LC3-II, le MITF est également régulée par d'autres facteurs, y compris la kinase ERK. Plus spécifiquement, le ERK phosphoryle le MITF pour favoriser simultanément son activité transcriptionnelle et sa dégradation dépendante de l'ubiquitine comme mécanisme de rétroaction.⁵⁶ Nous avons observé un effet biphasique: après un traitement de 24h, le Mel9 et le Mel41 ont induit une phosphorylation de l'ERK, ce qui est en accord avec l'induction de l'expression et de l'activité du MITF, conduisant à la mélanogénèse. Après un traitement de 48h, le Mel9 et le Mel41 inhibaient la phosphorylation d'ERK, suggérant l'existence d'un mécanisme de rétroaction retardée.

Ces données mettent en évidence le lien entre l'autophagie et la mélanogénèse, ainsi que la régulation de ces événements par les PHB. Ainsi, il est probable que les analogues de la mélanogénine se lient aux PHB pour réguler l'activité du LC3 et du MITF.

4.4 Le Mel9 et le Mel41 régulent à la baisse les PHB et le AKT pour induire l'apoptose dans les cellules de mélanome HBL

De manière intéressante, le Mel9 et en particulier le Mel41 régulent à la baisse les niveaux de protéines PHB (Figure 27) après 24 et 48 h dans les cellules de mélanome HBL. Considérant qu'une régulation négative des PHB est connue pour promouvoir l'apoptose,¹ nous avons examiné si le Mel9, le Mel41 et leurs analogues le Mel42, le Mel55, le Mel56 et le Mel57 induisent l'apoptose dans trois cellules de mélanome différentes (Figure 27C). Ces composés, en particulier le Mel9 et le Mel 56, ont significativement induit l'apoptose après un traitement de 48h dans les cellules HBL et MM043, et également, dans une moindre mesure, dans les cellules MM162.

Nous avons également observé que le Mel9 et le Mel41 inhibaient la phosphorylation de le AKT. En effet, l'activation de le AKT favorise non seulement la survie cellulaire, mais empêche également la mélanogénèse.⁵⁷

Résultats biologiques

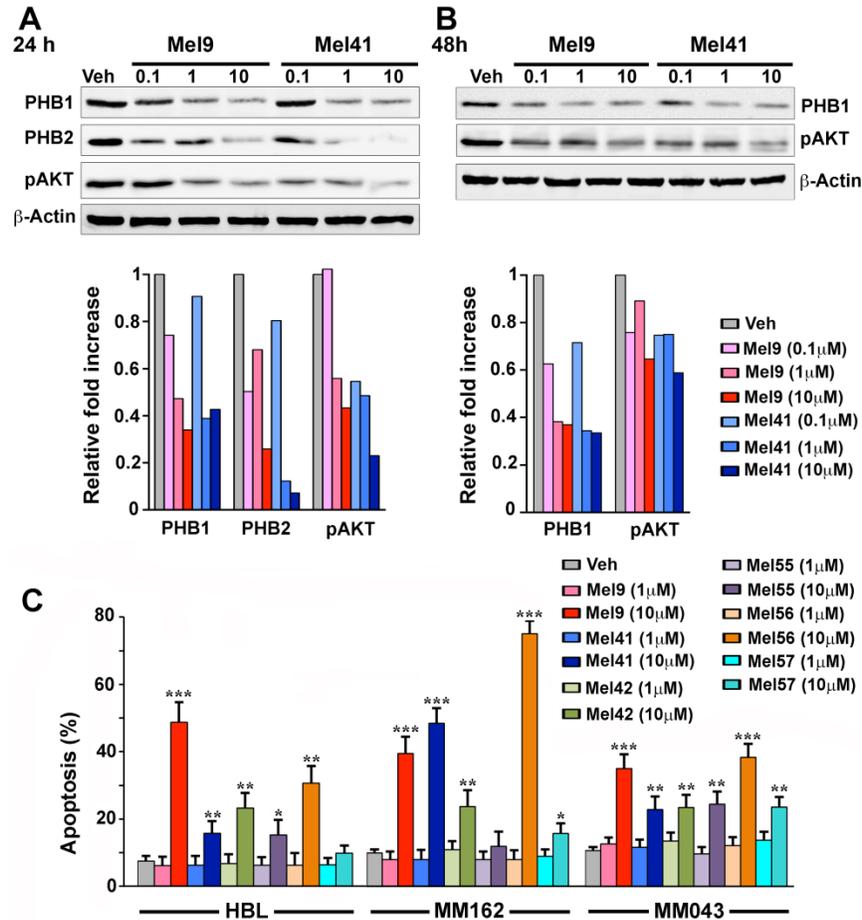


Figure 27. Ligands de PHB régulent à la baisse le niveau de protéine des PHB et la phosphorylation d'Akt pour induire l'apoptose dans les cellules du mélanome

En A et B), les cellules HBL ont été traitées par le Mel9 et le Mel41 (0 ; 0,1 ; 1 et 10 μ M) pendant 24 et 48 heures. Des quantités égales de protéines extraites (35 μ g) ont été analysées par Western blot avec des anticorps dirigés contre le PHB1, le PHB2 et le phospho-AKT. Pour garantir un chargement égal, les transferts ont été évalués avec un anticorps contre la β -actine (rangée du bas). Les graphiques représentent la moyenne des 2 expériences indépendantes de l'intensité des bandes dans les mêmes conditions de traitement comparées au véhicule.

En C) Les cellules HBL, MM043 et MM162 ont été traitées par le Mel9, le Mel41, le Mel42, le Mel55, le Mel56 et le Mel57 (0, 1 ou 10 μ M) pendant 48 heures et le pourcentage des cellules apoptotiques a été déterminé par coloration à l'annexine V (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,01$).

Résultats biologiques

De plus, l'équipe du professeur Ghanem a vérifié que le Mel9 régule à la baisse les PHB et inhibe la phosphorylation de l'AKT dans deux autres lignées cellulaires de mélanome humain (MM043 et MM162, Figure 28). Ainsi, l'inhibition de l'activité de l'AKT par Mel9 et Mel41 peut contribuer à la fois aux effets inducteurs promélanogéniques et à l'apoptose.

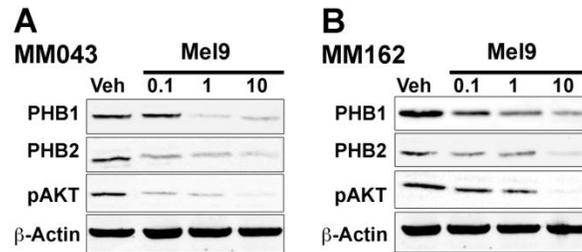


Figure 28. Mel9 régule à la baisse le niveau de protéine des PHB et la phosphorylation d'Akt dans les cellules de mélanome MM043 et MM162.

En A et B), les cellules HBL ont été traitées par le Mel9 (0 ; 0,1 ; 1 et 10 μ M) pendant 24 heures. Des quantités égales de protéines extraites (35 μ g) ont été analysées par analyse Western blot avec des anticorps dirigés contre le PHB1, le PHB2 et le phospho-AKT. Pour garantir un chargement égal, les transferts ont été évalués avec un anticorps contre la β -actine (rangée du bas).

4.5 Effet de la mélanogénine dans les cellules de mélanome HBL

Une comparaison des effets de la mélanogénine sur les voies de signalisation dans les cellules HBL, avec ceux des Mel9 et Mel41 a été effectuée. Il a été ainsi observé que la mélanogénine modulait la même signalisation que le Mel9 et le Mel41, mais à une concentration plus élevée et avec une intensité plus faible, ce qui confirme l'activité accrue de ces derniers (Figure 29).

Résultats biologiques

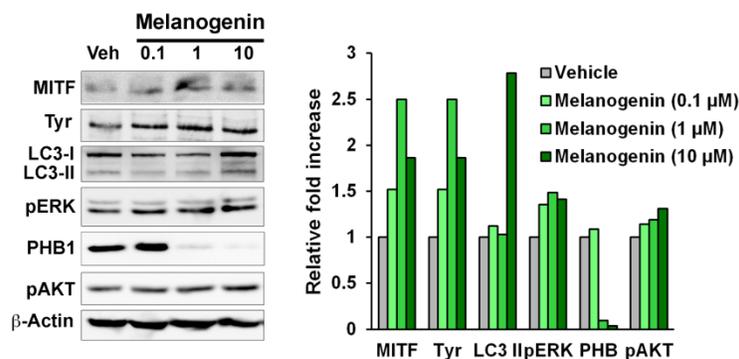


Figure 29. Induction de la dégradation de PHB1 et l'activation de la signalisation de MITF dans les cellules de mélanome HBL par le MEL9, le MEL41 et la mélanogénine. Des cellules de mélanome humain HBL ont été traitées avec de la mélanogénine (0 ; 0,1 ; 1 et 10 μM) pendant 24 heures. Des quantités égales de protéines extraites (35 μg) ont été analysées par Western blot avec des anticorps contre le MITF, la tyrosinase, le LC3, le phospho-ERK, le PHB1 et le phospho-AKT. Les graphes représentent la moyenne des 2 expériences indépendantes de l'intensité des bandes dans les mêmes conditions de traitement comprises au véhicule.

4.6 Effet sur la croissance des cellules cancéreuses

Puisque les PHB sont des cibles émergentes en oncologie,^{1,58,59} l'équipe du professeur Thierry Cristeil à la Faculté de Pharmacie de Paris Sud à Chatenay-Malabry a examiné si la mélanogénine est cytotoxique sur diverses lignées de cellules cancéreuses humaines par le dosage MTS. Comme le montre le tableau 12, la mélanogénine réduit significativement la prolifération cellulaire et la viabilité à 10 μM . La cytotoxicité de ce composé n'a pas été précédemment rapportée. Ils ont également trouvé que le Mel9, et en particulier le Mel41, sont plus cytotoxiques que la mélanogénine dans les cellules KB et HL60 (Tableau 11).

Tableau 11. Pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire par la mélanogénine à 10^{-5} et 10^{-6}M sur différentes lignées cellulaires cancéreuses dans le DMSO, mesuré après 72h d'exposition.

| Cell line | 1 μM | 10 μM |
|-----------|-----------------|------------------|
| PC3 | 15 \pm 5 | 52 \pm 5 |
| LNCaP | 11 \pm 3 | 32 \pm 1 |
| EPC | 27 \pm 6 | 58 \pm 2 |
| HT29 | 12 \pm 7 | 20 \pm 10 |
| HCT116 | 10 \pm 1 | 36 \pm 7 |
| MCF7 | 11 \pm 9 | 27 \pm 5 |
| MRC5 | 12 \pm 9 | 61 \pm 2 |
| HBL | 9 \pm 3 | 18 \pm 5 |

Résultats biologiques

Tableau 12. Inhibition de de la croissance cellulaire par la mélanogénine, le Mel9, le Mel41 rapport aux cellules sur les cellules KB et HL60, mesuré après 72h d'exposition.

| | KB | HL60 |
|-------------|------|------|
| Vehicle | 0 | 0 |
| Melanogenin | 33±4 | 15±6 |
| Mel9 | 46±8 | 25±1 |
| Mel41 | 63±3 | 95±2 |

Pour identifier la voie de signalisation apoptotique de Mel9 et Mel41 dans les cellules HL60, les niveaux de PHB, l'activation de LC3, et la phosphorylation du ERK et du AKT ont été examinés pendant 24h (Figure 30). Nous avons observé que les deux composés réduisaient considérablement le niveau des protéines PHB1 et PHB2, ce qui pourrait expliquer la cytotoxicité observée dans ces cellules leucémiques. En effet, les PHB sont nécessaires pour maintenir la structure des mitochondries, et une déplétion des PHB est connue pour déclencher une fragmentation des mitochondries conduisant à l'apoptose.^{58,60}

Il a été de même avec ce qui a été observé dans les cellules HBL, le Mel9 et le Mel41 ont activé LC3-II. Curieusement, seule une concentration faible (0,1 µM) du Mel9 et du Mel41 a inhibé l'activation de ERK, indiquant que la nature des voies de signalisation contrôlées par ces ligands du PHB change en fonction de leur concentration. Enfin, nous avons trouvé que le Mel9 et le Mel41 inhibent la phosphorylation de l'AKT de manière dose-dépendante dans les cellules HL60, ce qui est en ligne avec la cytotoxicité observée dans cette lignée cellulaire.

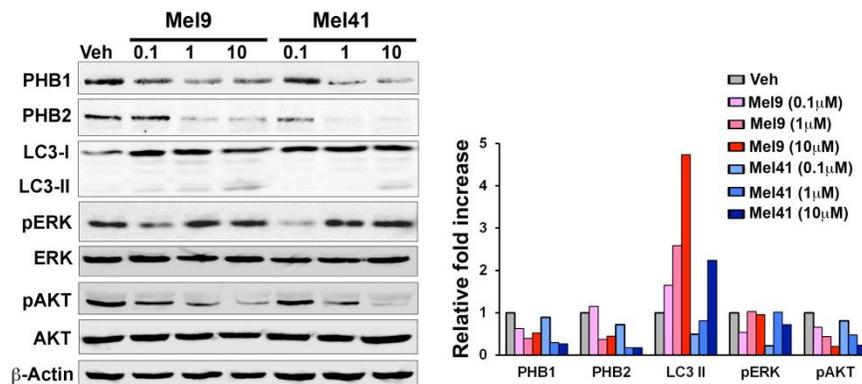


Figure 30. Dégradation induite de la PHB1 et inhibition de signalisation AKT dans les cellules HL60 par le Mel9 et le Mel41.

Résultats biologiques

Les cellules HL60 ont été traitées par le Mel9 et le Mel41 (0 ; 0,1 ; 1 et 10 μ M) pendant 24 heures. Des quantités égales de protéines extraites (35 ug) ont été analysées par le transfert de Western avec des anticorps dirigés contre la PHB1, la PHB2, le LC3, le phospho-ERK, le ERK, le phospho-AKT et le AKT. Pour assurer une charge égale, les transferts ont été évalués avec un anticorps contre la β -actine. Les graphiques représentent la moyenne des 2 expériences indépendantes de l'intensité des bandes dans les mêmes conditions de traitement comparé au véhicule.

4.7 Discussion

La complexité de la signalisation des PHB ne peut pas être explorée par une invalidation de leur gène, qui induit la mort cellulaire en raison de leurs fonctions essentielles dans les mitochondries.^{1,60} Par conséquent, les petites molécules qui se lient aux PHB et modulent leurs fonctions sont essentielles pour étudier les rôles des PHB dans des conditions normales et pathologiques.¹ A cet égard, la découverte de la mélanogénine a dévoilé pour la première fois l'implication des PHB1 dans la mélanogénèse.¹⁴ Depuis, la mélanogénine n'a pas été réutilisée pour explorer la signalisation des PHB, et ce pour deux raisons: la mélanogénine présente de médiocres propriétés drug-like et n'est pas facilement disponible. Elle n'est pas commerciale et nous n'avons pas pu la synthétiser suivant la stratégie générale proposée pour ce type de molécules. Nous avons identifié des analogues (parmi les dérivés synthétisés), tels que le MEL9 et le Mel41, qui présentaient une activité promélanogénique accrue. Nous avons constaté qu'un autre ligand de PHB, avec une architecture structurale et un profil pharmacologique différent, la fluorizoline, qui favorise également la mélanogénèse, ce qui renforce l'idée que la PHB1 régule la mélanogénèse.

Depuis la découverte de la mélanogénine en 2005, aucun progrès n'a été réalisé pour la compréhension du rôle des PHB dans le contrôle de la mélanogénèse. Avec le développement du Mel9 et Mel41 qui affichent des activités promélanogéniques améliorées, nous pourrions rassembler quelques récentes avancées concernant la mélanogénèse et aussi la fonction des PHB et éclaircir le mécanisme d'action des PHB dans la mélanogénèse (Figure 31). IL a été montré que le LC3-II interagit avec la PHB2 pendant la mitophagie⁴³ et il est aussi impliqué dans la mélanogénèse.⁴² Nous fournissons ici la première preuve que la régulation de la mélanogénèse par le LC3-II est également médiée par les PHB. Le LC3-II est connu pour activer

Résultats biologiques

le ERK, qui à son tour phosphoryle le MITF, favorisant ainsi l'activité transcriptionnelle du MITF et en même temps déclenchant sa dégradation dépendante de l'ubiquitine comme un mécanisme de rétroaction.⁵⁶ Nous avons trouvé que le Mel9 et le Mel41 induisaient la phosphorylation de ERK après 24h pour favoriser la transcription du MITF et inhiber la phosphorylation de ERK après 48 h pour empêcher la dégradation du MITF. Ces deux événements contribuent à la promotion de la mélanogénèse. Ces observations suggèrent fortement que les PHB peuvent empêcher l'ubiquitination du MITF pour favoriser davantage la mélanogénèse.

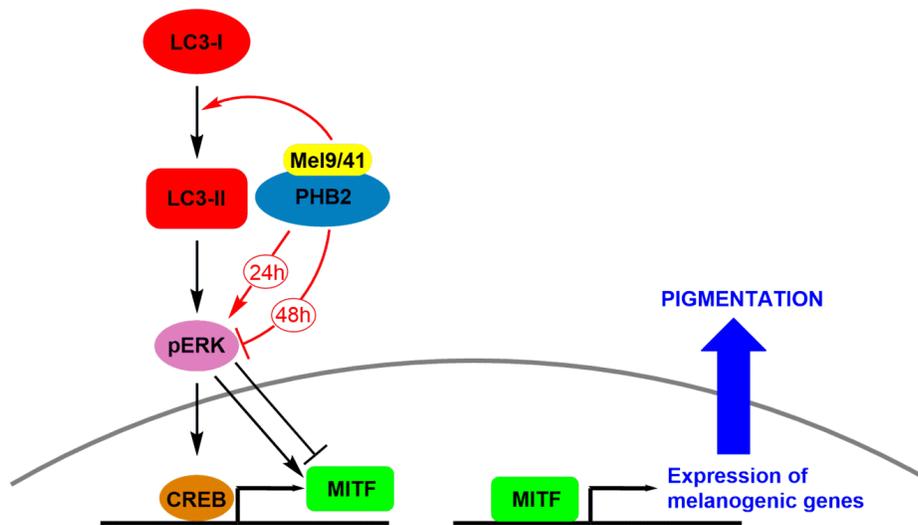


Figure 31. Modèle proposé d'induction de la mélanogénèse par les dérivés de la mélanogénine.

La liaison de ces composés à PHB2 favorise la conversion de LC3-I en LC3-II, conduisant à l'activation de ERK, à la phosphorylation de CREB et à celle du MITF pour favoriser la mélanogénèse et également la dégradation du MITF après 24 h. Mais après 48h, l'inhibition de la phosphorylation de ERK par Mel9 / 41 empêche cette dégradation du MITF, contribuant encore à la promotion de la mélanogénèse.

Tous les composés actifs ont été substitués par des groupements diamminés, avec une légère préférence, la *N,N*-diméthyl-éthylènediamine sur la pipéridinopipéridine (Mel55), la 4-diméthylaminopipéridine (Mel56) ou la *N,N*-diméthylpropylènediamine (Mel57). L'induction de la mélanogénèse a également été favorisée par la *N*-méthylation, la *N*-éthylation, la *C*-

Résultats biologiques

méthylation en position benzylique avec une configuration *R*, ou l'introduction d'un fluor sur le phényle en position méta.

Nous avons également découvert pour la première fois que la mélanogénine, et ses analogues plus actifs, tels que le Mel41, sont également toxiques pour les cellules cancéreuses.

Auparavant, deux autres classes de ligands PHB ont également montré des propriétés cytotoxiques sur les cellules cancéreuses des composés naturels appelés flavaglines, et une molécule synthétique appelée la fluorizoline.^{61,62,63} Ces deux types de ligands des PHB empêchent l'interaction des PHB avec la kinase C-RAF (RAF1) pour empêcher son activation par RAS.^{9,64} De surcroît, les flavaglines, mais pas la fluorizoline, bloquent l'activation de KRAS (échange échange GDP-GTP).

Des travaux préliminaires effectués dans le laboratoire du Professeur Rajalingam à Mayence en Allemagne ont montré que de manière similaire que le Mel41 (10 μ M) inhibe partiellement l'activation de KRAS.

Le rôle des PHB1 dans le cancer est complexe. La surexpression de PHB1 est corrélée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers^{64,65} et présente des rôles anti- ou pro-tumorigènes selon le type de tumeur.¹ En effet, dans le noyau, la PHB1 supprime la transcription médiée par E2F pour la progression du cycle cellulaire, inhibant ainsi la croissance cellulaire maligne.^{66,67} Cependant, au niveau de la membrane plasmique, les PHB sont indispensables pour l'activation de la voie C-Raf-MEK-ERK par l'oncogène Ras, qui favorise la progression du cancer.^{64,68,69} Curieusement, le Mel9 et le Mel41 étaient capables de bloquer l'activation de ERK seulement à faible concentration (10 μ M), suggérant que lorsque la quantité de PHB liée aux ligands augmente, une interaction supplémentaire avec d'autres protéines partenaires peut se produire, menant à l'activation de ERK.

Les petites molécules, telles que le Mel41, peuvent être des outils chimiques inestimables pour étudier la fonction et la régulation des PHB. Ainsi, dans de futures études, nos collaborateurs détermineront si le Mel41 module l'interaction des PHB avec de nombreuses protéines impliquées dans la tumorigenèse et la progression du cancer, comme les facteurs de

Résultats biologiques

transcription p53, E2F, les suppresseurs de tumeurs Rb ou les kinases C-RAF ou KRAS. Ils détermineront également si ce composé modifie la localisation intracellulaire des PHB.

D'autres ligands PHB ont déjà été utilisés pour examiner le rôle des PHB dans d'autres contextes cellulaires non liés aux cancers, comme l'infection par le virus chikungunya,⁷⁰ l'inflammation,⁷¹ la cardioprotection,¹³ la régulation du canal TRPM6 dans les cellules rénales,⁷² ou la différenciation des ostéoblastes.^{73,74} Le Mel9 et le Mel 41 rejoindront probablement les ligands de PHB disponibles pour explorer les rôles des PHB dans la signalisation cellulaire. Il est important de noter que toutes ces différentes classes d'effecteurs présentent des profils différents, probablement parce qu'elles ciblent certaines formes de PHB qui présentent des modifications post-traductionnelles spécifiques. Ainsi, le Mel41 devrait être complémentaire aux autres ligands PHB précédemment développés. Il pourrait également être à la base du développement de la liste des médicaments candidats pour traiter les cancers.

5. CONCLUSION GENERALE

5 Conclusion générale

Le principal objectif de cette thèse était de synthétiser des analogues de la mélanogénine afin de déterminer les requis structuraux pour leurs activités pharmacologiques et évaluer leur potentiel thérapeutique. Plusieurs méthodes ont été examinées pour accéder à des perfluorophénoxytriazines substituées par des amines avant de mettre au point la première méthode efficace pour accéder à ce type de composés.

Une soixantaine de composés originaux ont ainsi été synthétisés et ont été testés pour leurs activités cytotoxiques sur les cellules cancéreuses, ainsi pour leurs activités d'induction de la mélanogénèse dans le laboratoire du Pr Ghanem à l'institut Jules Borbet de Bruxelles.

Les agents les plus actifs sont substitués par un substituant diaminé, avec une légère préférence pour la *N,N*-diméthyl-éthylènediamine sur la pipéridinopipéridine (Mel55), la 4-diméthylaminopipéridine (Mel56) ou la *N,N*-diméthylpropylènediamine (Mel57).

L'induction de la mélanogénèse a également été favorisée par la *N*-méthylation, la *N*-éthylation, la *C*-méthylation en position benzylique avec une configuration *R*, ou l'introduction d'un fluor en méta sur le phényle.

Nous avons aussi vérifié que nos nouveaux dérivés de la mélanogénine se lient à la PHB1, en conjuguant un des composés les plus actifs à des billes d'Affigel-10 au travers d'un bras espaceur.

Ayant identifié des sondes avec des activités promélanogéniques améliorées, le laboratoire du Pr Ghanem a examiné les effets des deux composés particulièrement actifs, le Mel9 et le Mel41, sur des protéines de signalisation clés qui régulent la mélanogénèse, en particulier les protéines LC3, ERK, et le facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF). Plus précisément ces travaux ont montré que la liaison du Mel9 et du Mel41 à la PBH2 favorise la conversion de LC3-I en LC3-II, conduisant à l'activation de ERK, à la phosphorylation de CREB et au MITF pour favoriser la mélanogénèse et également la dégradation de MITF après 24 h. Mais

Conclusion générale

après 48h, l'inhibition de la phosphorylation de ERK par le Mel9 et le Mel41 empêche cette dégradation du MITF, contribuant encore à la promotion de la mélanogénèse.

Nous avons ainsi identifié des analogues qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses et la synthèse de mélanine dans les mélanocytes de manière plus efficace que la mélanogénine. De tels composés sont plus « drug-like » que la mélanogénine, c'est-à-dire qu'ils présentent des attributs physico-chimiques qui sont plus compatibles à un développement pharmacologique.

6. PARTIE EXPERIMENTALE

6 Partie expérimentale :

General experimental details

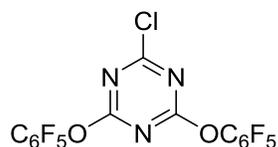
All commercial reagents were used without purification. All the anhydrous solvents used are commercial or are conserved on molecular sieves. All reactions sensitive to moisture or oxygen were carried out under argon atmosphere and in flasks dried at 110 °C. Reactions were stirred with a magnetic stirrer. Temperatures for the reactions refer to bath temperatures.

Reactions were monitored by TLC (0.2 mm, Merck DC Platten Kieselgel 60 F₂₅₄) with detection by UV light ($\lambda = 254$ nm) and treatment with anisaldehyde and potassium permanganate-stain.

NMR spectra were acquired on a Bruker DRX-400 spectrometer in CDCl₃ (referenced to 7.26 ppm for ¹H and 77.0 ppm for ¹³C), (CD₃)₂SO (referenced to 2.50 ppm for ¹H and 39.5 ppm for ¹³C) or CD₃OD (referenced to 3.31 ppm for ¹H and 49 ppm for ¹³C) as solvents. Coupling constants (J) are in Hz. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm). The multiplicities of the signals are described using the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

High resolution mass spectra were recorded on a Bruker MicroTOF-Q (ESI Q-TOF) spectrometer.

(2-Chloro-4,6-bis(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine) (3):



A solution of DIPEA (5.8 g, 45 mmol, 2.25 eq) in THF (25 ml) was added dropwise over 10 min to solution of trichlotriazine (3.7 g, 20 mmol) in THF (50 ml) at 0°C. The resulting mixture was stirred at 0°C for 15 min, pentafluorophenol (8.3 g, 45 mmol, 2.25 eq) was then added in 4 portions over 1 h at 0°C. The reaction medium was allowed to warm to room temperature for 3h, concentrated, washed with H₂O and NaHCO₃, extracted with ether, and finally washed with

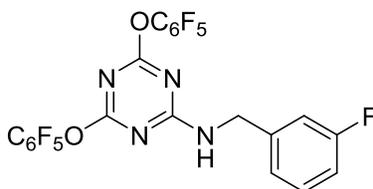
Partie expérimentale

brine. The yellow precipitate was filtered off, the filtrate was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum to afford 6.56 g (71%) of the title compound (**3**) as a yellow powder.

^{19}F NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -151.8 (4F, m), -155.7 (2F, m), -161(4F, m).

LC-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_{10}\text{Cl}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 479,9519; found: 479.98.

N-(3-Fluorobenzyl)-4,6-bis(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine (**4a**):

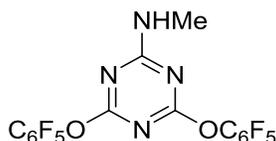


DIPEA (1.43 g, 11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of chlorotriazine **3** (4.8 g, 10 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) cooled in an ice water-NaCl bath (-10°C). After 5 min, a solution of 3-fluorobenzylamine (1.26 g, 10 mmol in CH_2Cl_2 (5 ml) was added dropwise for 30 min at 0°C . The mixture was then stirred for 1 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2) to afford 5 g (88%) of aminotriazine **4a**.

^1H NMR: (400 MHz, CDCl_3) δ 7.44-7.28 (1H, m, CH_{ar}), 7.25-6.86 (2H, m, CH_{ar}), 6.69 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$, CH_{ar}), 6.07 (1H, s, NH), 4.49 (2H, d, $J=6.1\text{Hz}$, CH_2).

LC-MS: m/z calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_7\text{F}_{11}\text{N}_4\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 569,0393; found: 569.0474.

N-methyl-4,6-bis(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine (**4b**):



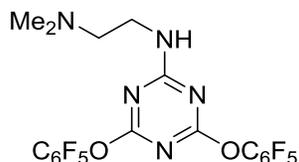
Partie expérimentale

DIPEA (0.9 g, 6.93 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of chlorotriazine **3** (3 g, 6.3 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) cooled in an ice water-NaCl bath (-10°C). After 5 min, an aqueous solution (30 %) of methylamine (1.86g, 20.8 mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) was added dropwise for 30 min at 0°C. The mixture was then stirred for 48 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/Pentane: 50/50) to afford 1.075 g (36 %) of aminotriazine **4b**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 5.85 (1H, s, NH), 2.96 (3H, d, *J*=5 Hz, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₆H₄F₁₀N₄O₂ (M+H)⁺: 475,0175; found: 475.02.

N-(2-(dimethylamino)ethyl)-4,6-bis(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine (**4c**):



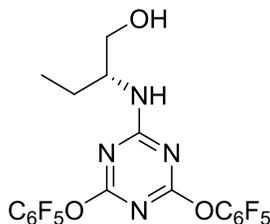
DIPEA (0.9 g, 6.93 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of chlorotriazine **3** (3 g, 6.3 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) cooled in an ice water-NaCl bath (-10°C). After 5 min, a solution of N1,N1-ethylenediamine (0.611 g, 6.93mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) was added dropwise for 30 min at 0°C. The mixture was then stirred for 48 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/Pentane: 80/20) to afford 1.32 g (44%) of aminotriazine **4c**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.01 (1H, br s, NH), 3.34 (2H, m, CH₂), 2.61 (2H, m, CH₂), 2.26 (6H, s, CH₃.N-CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₉H₁₁F₁₀N₅O₂ (M+H)⁺: 532,0753; found: 532.0836.

(R)-2-(4,6-Bis(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-ylamino)butan-1-ol (**4d**):

Partie expérimentale

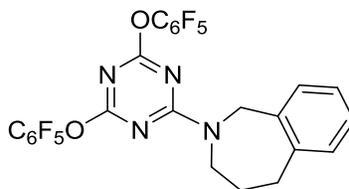


DIPEA (0.9 g, 6.93 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of chlorotriazine **3** (3 g, 6.3 mmol) in CH₂Cl₂ (40mL) cooled in an ice water-NaCl bath (-10°C). After 5 min, a solution of (*R*)-2-aminobutan-1-ol (0.731g, 8.2mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) was added dropwise for 30 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 1.25g, (37%) of aminotriazine **4d**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 5.86 (1H, d, *J*=8.5, CH), 3.86 (1H, br s, NH), 3.77-3.62 (2H, m, CH₂), 1.72 (1H, s, OH), 1.67-1.53 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, *J*=7.4 Hz, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₉H₁₀F₁₀N₄O₃ (M+H)⁺: 533,0593; found: 533.0677.

4,6-Bis(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzo[*c*]azepine (**4e**)



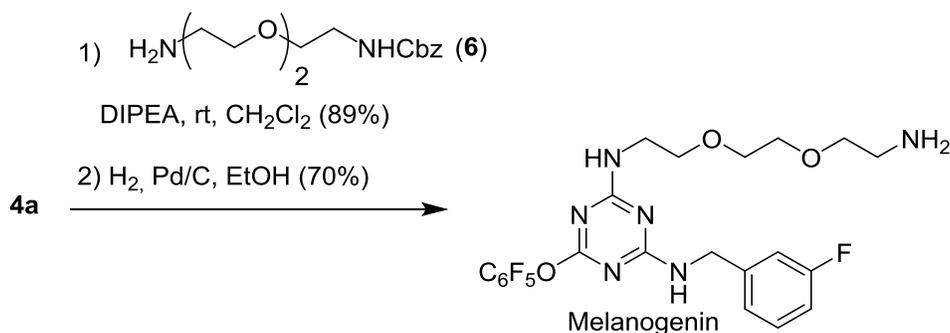
DIPEA (48 mg, 0.37 mmol, 1.1 eq)) was added to a solution of chlorotriazine **3** (163 mg, 0.34 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) cooled in an ice water-NaCl bath (-10°C). After 5 min, a solution of hexahydrobenzo[*d*]azepine (55 mg, 0.37 mmol) in CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise for 30 min at 0°C. The mixture was then stirred for 12 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/Pentane: 20/80) to afford 91 mg (46%) of aminotriazine **4e**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.22-7.12 (3H, m, CH_{ar}), 6.62 (1H, d, *J*=7.5 Hz, CH_{ar}), 4.55 (2H, s, CH₂), 3.99 (2H, s, CH₂), 3.04-2.92 (2H, m, CH₂), 1.86-1.76 (2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₅H₁₂F₁₀N₄O₂ (M+H)⁺: 591,0801; found: 591.09.

Synthesis of melanogenin



Benzyl 2-(2-(2-(4-(3-fluorobenzylamino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethoxy)ethoxy)ethylcarbamate (Melanogenin-Cbz)

DIPEA (1.26 g, 1.96 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (1g, 1.78 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (30 mL) at 0°C. After 5 min, a solution of monoprotected amine **6** (665 mg, 2.32 mmol, 1.3 eq) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/pentane: 60/40) to afford 1.05 g (89%) of the title compound.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.28 (4H, m, CH_{ar}), 7.21-7.00 (1H, m, CH_{ar}), 7.00-6.76 (3H, m, CH_{ar}), 6.70-6.55 (1H, m, CH_{ar}), 6.05 (1H, m, NH), 5.60 (1H, br s, NH), 5.06 (2H, d, *J*= 7.9 Hz, O-CH₂-Ph), 4.54(1H_a, dd, *J*=20, 5.9 Hz, CH₂), 4.36 (1H_b, dd, *J*=25.6, 6 Hz, CH₂), 3.84 (1H, d, *J*=6 Hz, NH), 3.78-3.59 (6H, m, CH₂-CH₂, CH₂), 3.56-3.51(4H, m, CH₂, CH₂), 3.47-3.35 (2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₃₀H₂₈F₆N₆O₅(M+H)⁺: 667,2025; found: 667.2116.

Partie expérimentale

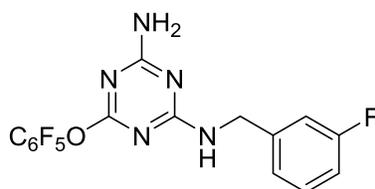
Melanogenin

A solution of melanogenin-Cbz (0.49 g, 7.37 mmol) in EtOH (50 mL) was hydrogenated over Pd/C (50 mg) at 40 psi in a Parr apparatus for 48 h. The catalyst was removed by filtration and EtOH evaporated to afford melanogenin (275 mg, 70%) as a white solid.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (1H, br s, CH_{ar}), 7.26-6.73 (3H, m, CH_{ar}), 6.21 (1H, br s, NH), 5.63 (1H, br s, NH), 4.68-4.25 (2H, m, CH₂), 3.67-3.64 (4H, m, CH₂-O), 3.52-3.46 (4H, m, CH₂), 2.82 (2H, br s, NH₂), 2.05 (4H, m, CH₂-CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₂F₆N₆O₃ (M+H)⁺: 533,1658; found: 533.1613.

Mel1: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



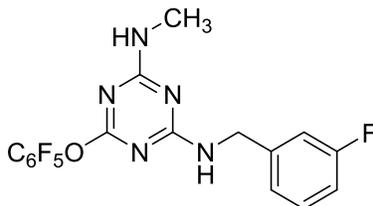
DIPEA (90 mg, 0.6 mmol, 3 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, ammonia (0.06 mL, 1.2 mmol, 6 eq) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for one week at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography silica gel (CH₂Cl₂), to afford 46 mg (58 %) of **Mel1**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (1H, br s, CH_{ar}), 7.17-6.92 (3H, m, CH_{ar}), 5.55 (1H, br s, NH), 5.12 (2H, br s, NH₂), 4.57 (1H_a, d, *J*=6 Hz, CH₂), 4.32 (1H_b, d, *J*=6 Hz, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₆H₉F₆N₅O (M+H)⁺: 402,0711; found: 402.0785

Partie expérimentale

Mel2: N2-(3-fluorobenzyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

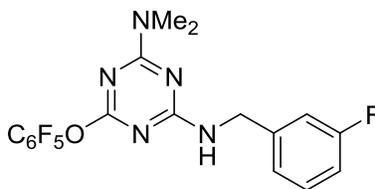


DIPEA (80 mg, 0.6 mmol, 3 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a 30% aqueous solution of methylamine (53.9 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 144 mg (52%) of **Mel2**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (1H, s, CH_{ar}), 7.13-6.83 (3H, m, CH_{ar}), 5.64 (1H, brs, NH-CH₃), 5.19 (1H, br s, NH), 4.67-4.40 (2H, m, CH₂), 3.01-2.8 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₇H₁₁F₆N₅O (M+H)⁺: 416,0868; found: 416,0952.

Mel3: N2-(3-fluorobenzyl)-N4,N4-dimethyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



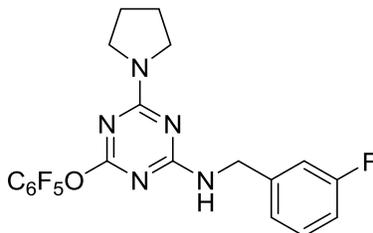
DIPEA (30mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.6 8mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of dimethylamine (12 mg, 0.26 mmol, 1.3 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 85 mg (98%) of **Mel3**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (1H, br s, CH_{ar}), 7.15-6.80 (3H, m, CH_{ar}), 5.46 (1H, br s, NH), 4.60 (1H_a, d, *J*=6 Hz, CH₂), 4.43 (1H_b, d, *J*=6 Hz, CH₂), 3.11 (3H,s, CH₃), 3.02 (3H, s, CH₃).

Partie expérimentale

LC-MS: m/z calcd. for $C_{18}H_{13}F_6N_5O$ ($M+H$)⁺ : 430,1024; found: 430,1112.

Mel4: *N*-(3-fluorobenzyl)-4-(perfluorophenoxy)-6-(pyrrolidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amine

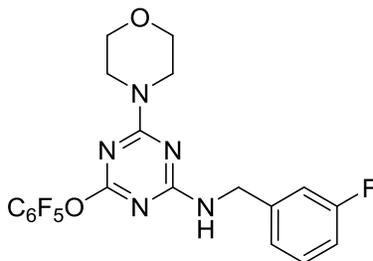


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of pyrrolidine (15.6 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH_2Cl_2 (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 18 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 /ether: 90/10) to afford 30 mg (32 %) of **Mel 4**.

¹H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.32 (1H, br s, CH_{ar}), 7.11-6.84 (3H, m, CH_{ar}), 5.41 (1H, br s, NH), 4.59 (1H_a, d, $J=5.9$ Hz, CH_2), 4.41(1H_b, d, $J= 5.9$ Hz, CH_2), 3.59-3.37 (4H, m, CH_2 -N- CH_2), 1.92 (4H, s, CH_2 - CH_2).

LC-MS: m/z calcd. for $C_{20}H_{15}F_6N_5O$ ($M+H$)⁺: 456.1191; found: 456.1264.

Mel5: *N*-(3-fluorobenzyl)-4-morpholino-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine



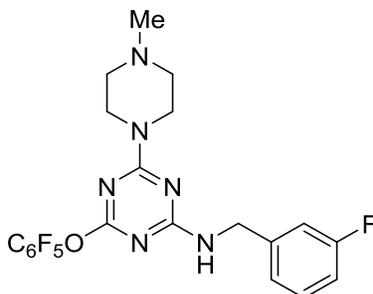
Partie expérimentale

DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of morpholine (19.8 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 78 mg (82 %) of **Mel 5**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (1H, br s, CH_{ar}), 7.17-6.82 (3H, m, CH_{ar}), 5.48 (1H, br s, NH), 4.57 (1H_a, d, *J*=6 Hz, CH₂), 4.42 (1H_b, d, *J*=6 Hz, CH₂), 3.78 (4H, br s, CH₂-N-CH₂), 3.68 (4H, s, CH₂-O-CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀ H₁₅ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 471.1137; found: 472.1209 .

Mel6: N-(3-fluorobenzyl)-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine



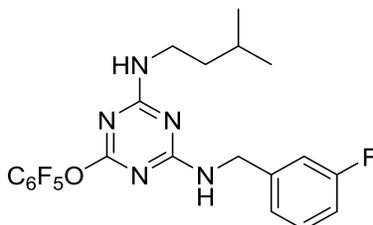
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-methylpiperazine (22.3 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOH: 95/5), to afford 95 mg (98 %) of **Mel6**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.36 (1H, br s, CH_{ar}), 7.09-6.92 (3H, m, CH_{ar}), 6.79 (1H, br s, NH), 4.35 (2H, s, CH₂), 3.15 (4H, br s, CH₂-N-CH₂), 2.36 (4H, s, CH₂-N-CH₂), 2.21(3H, s, CH₃).

Partie expérimentale

LC-MS: m/z calcd. for $C_{21}H_{18}F_6N_6O$ ($M+H$)⁺ : 485,1446; found: 485,1529.

Mel7: N2-(3-fluorobenzyl)-N4-isopentyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

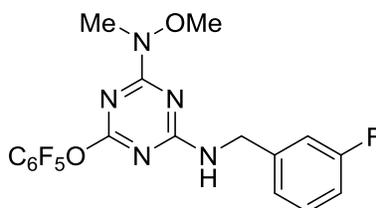


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 3-methylbutylamine (19.2 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH_2Cl_2 (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2), to afford 89 mg (94 %) of **Mel7**.

¹H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.31 (1H, br s, CH_{ar}), 7.13-6.61 (3H, m, CH_{ar}), 5.67 (1H, br s, NH), 5.19 (1H, br s, NH), 4.64-4.38 (2H, m, CH_2), 3.38 (1H_a, qd, $J=6.7$ Hz, CH_2), 3.28 (1H_b, qd, $J=6.7$ Hz, CH_2), 1.58 (1H, s, CH), 1.47-1.35 (2H, m, CH_2), 0.96-0.81(3H, m, CH_3).

LC-MS: m/z calcd. for $C_{21}H_{19}F_6N_5O$ ($M+H$)⁺: 472,1494; found: 472,1581.

Mel8: N-(3-fluorobenzyl)-4-(methoxy(methyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine



DIPEA (60 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of

N-

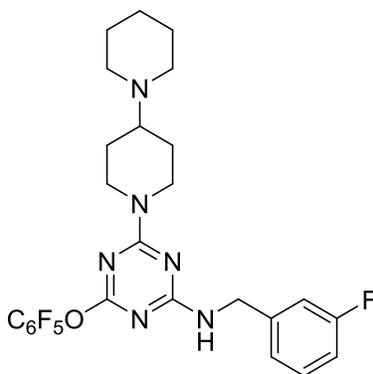
Partie expérimentale

methoxymethylamine (50 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂), to afford 6 mg (7 %) of **Mel8**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (1H, br s, CH_{ar}), 7.03-6.83 (3H, m, CH_{ar}), 5.96 (1H, br s, NH), 4.49 (2H, d, J=6.1 Hz, CH₂), 1.54 (6H, s, CH₃-N-O-CH₃).

LC-MS: m/z calcd. for C₁₈ H₁₃ F₆ N₅ O₂(M+H)⁺: 446.0981; found: 446,1054.

Mel9: 4-([1,4'-bipiperidin]-1'-yl)-N-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine



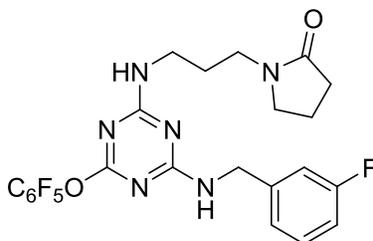
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-(1-methylpiperidin-4-yl) piperidine (37.03mg, 0.22mmol, 1.1eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 85/15), to afford 72 mg (65 %) of **Mel9**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (1H, brs, CH_{ar}), 7.14-6.78 (3H,m, CH_{ar}), 5.42 (1H,brs, NH), 4.76 (1H_a, brs, CH₂), 4.57 (2H, d, J=6 HZ, CH₂), 4.41 (H_b, d, J=6.5, CH₂), 2.77 (2H, qd, J=10.9.Hz, -N-CH₂), 2.49 (4H,brs,CH₂-N-CH₂). 1.63 (2H, d, J=12.7Hz, CH₂-CH₂-CH₂), 1.67-1.36 (8H, m, CH₂-CH₂-N-CH₂-CH₂), 1.26 (1H, m, CH).

Partie expérimentale

LC-MS: m/z calcd. for $C_{26}H_{26}F_6N_6O(M+H)^+$:553.2070; found: 553.2143.

Mel10: 1-(3-((4-((3-fluorobenzyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)propyl)pyrrolidin-2-one

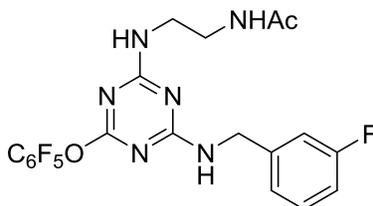


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 3-(2-methylenepyrrolidin-1-yl)propan-1-amine (31.8 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH_2Cl_2 (1 ml) was added dropwise for 5 min at $0^\circ C$. The mixture was then stirred for 4 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2/AcOEt$: 40/60) to afford 43 mg (41 %) of **Mel10**.

1H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.292 (1H, brs, CH_{ar}), 7.16-6.77 (3H, m, CH_{ar}), 6.09 (1H, brs, NH), 5.66 (1H, brs, NH), 4.58 (1H_a, dd, $J=12.3, 6$ Hz, CH_2), 3.28 (1H_b, m, CH_2), 3.48-3.18 (6H, m, $3CH_2cyc$), 2.37 (2H, qt, $J=7.3$ Hz, $CH_2-CH_2-CH_2$), 2.08-1.94 (2H, m, CH_2-N), 1.74-1.63 (2H, m, CH_2-CH_2-N).

LC-MS: m/z calcd. for $C_{23}H_{20}F_6N_6O_2(M+H)^+$: 527.1560; found: 527.1633.

Mel11: N-(2-((4-((3-fluorobenzyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)ethyl)acetamide



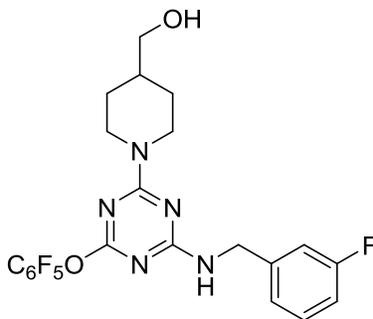
Partie expérimentale

DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of *N*-(2-aminoethyl) acetamide (23 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 7 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 60/40) to afford 60 mg (62 %) of **Mel11**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (1H, br s, CH_{ar}), 7.14-6.78 (3H, m, CH_{ar}), 6.03(1H,brs, NH), 5.72 (1H, br s, NH), 5.52 (1H, br s, NH), 4.63-4.57 (1H_a, m, CH₂), 4.40-4.33 (1H_b, m, CH₂), 3.36-3.25 (4H, m, N-CH₂-CH₂-N), 1.97 (2H, d, *J*= 4.4 Hz,CH₃), 1.91 (1H, s, CH₃).

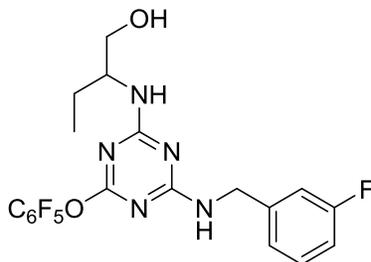
LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀ H₁₆ F₆ N₆ O₂ (M+H)⁺: 487.1251; found: 487.1323.

Mel12: (1-(4-((3-fluorobenzyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)piperidin-4-yl)MeOH



DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (piperidin-4-yl)methanol (25.5 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 48 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 96 mg (96 %) of **Mel12**.

Partie expérimentale

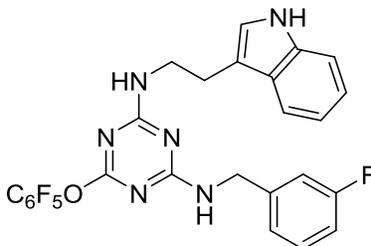


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 2-aminobutan-1-ol (20 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 80/20), to afford 77 mg (81 %) of **Mel14**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.31 (1H, br s, CH_{ar}), 7.16-6.76 (3H, m, CH_{ar}), 5.75 (1H, br s, NH), 5.39 (1H, br s, NH), 4.63-4.37 (2H, m, CH₂), 3.90 (1H, br s, CH-), 3.77-3.54 (2H, m, -HO-CH₂), 2.28 (1H, br s, OH), 1.58 (2H, br s, CH₂), 1.00-0.89 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀ H₁₇ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 474.1285; found: 474.1358.

Mel15: N2-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N4-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 2-(1H-indol-3-yl) ethylamine (35.3 mg, 0.22 mmol, 1.1eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced

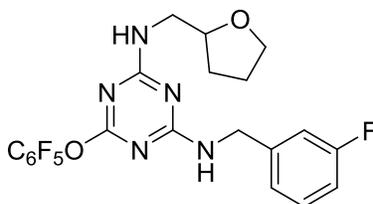
Partie expérimentale

pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 65 mg (60 %) of **Mel15**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (1H, br s, CH_{ar}), 7.60 (1H, m, CH_{ar}), 7.36 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, CH_{ar}), 7.29 (1H, br s, CH_{ar}), 7.20 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, CH_{ar}), 7.16-7.06 (2H, m, CH_{ar}), 7.05-6.96 (2H, m, CH_{ar}), 6.92 (1H, br s, NH), 6.85 (1H, br s, NH), 4.66-4.39 (2H, m, CH₂-NH), 3.96-3.55 (2H, m, CH₂), 3.17-2.93 (2H, m, CH₂), 2.02 (1H, br s, NH), 1.30 (1H, br s, CH).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₆ H₁₈ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 545.1458; found: 545.1530.

Mel16: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



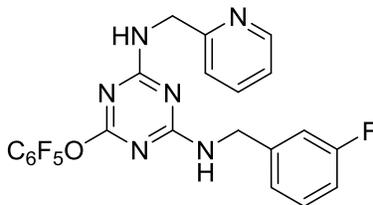
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of ((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)amine (23 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 7 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 70/30), to afford 55 mg (56 %) of **Mel16**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.65 (1H, br s, CH_{ar}), 7.15-6.75 (3H, m, CH_{ar}), 5.90-3.6 (1H, br s, NH), 4.57 (1H_a, dd, *J* = 16.9, 5.3 Hz, CH₂), 4.41 (1H_b, dd, *J* = 16.6, 5 Hz, CH₂), 4.08-3.49 (4H, m, CH₂-CH₂), 3.47-3.15 (1H, m, CH), 1.97 (1H, br s, NH), 1.89-1.76 (2H, m, CH₂-NH), 1.74-0.59 (2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₁₇ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 486.1281; found: 486.1353.

Partie expérimentale

Mel17: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(pyridin-2-ylmethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

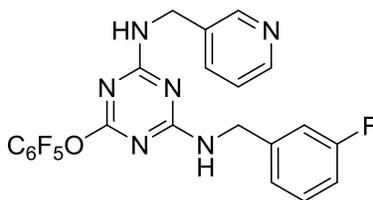


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (pyridin-2-yl)methylamine (24 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 97 mg (98 %) of **Mel17**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 8.42 (1H, br s, CH_{ar}), 7.63 (1H, br s, CH_{ar}), 7.23-6.62 (6H, m, CH_{ar}), 6.41 (1H, br s, NH), 5.57 (1H, br s, NH), 4.69-4.66 (1H_a, m, CH₂), 4.61-4.58 (1H_b, m, CH₂), 4.58-4.43 (2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂H₁₄F₆N₆O (M+H)⁺ : 493,1133; found: 486.1353.

Mel18: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(pyridin-3-ylmethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (pyridin-3-yl)methylamine (24 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at

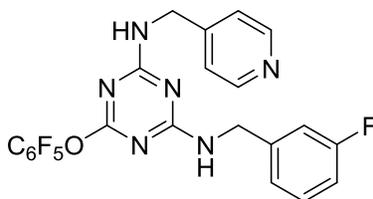
Partie expérimentale

0°C. The mixture was then stirred for 4 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 87 mg (88 %) of **Mel18**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (1H, br s, CH_{ar}), 7.58 (1H, br s, CH_{ar}), 7.25-6.75 (6H, m, CH_{ar}), 6.60 (1H, brs, NH), 5.43 (1H, brs, NH), 4.67-4.39 (4H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₁₄ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 493,1133; found: 493.1222.

Mel19: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(pyridin-4-ylmethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



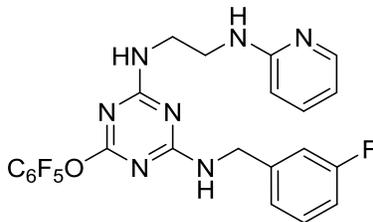
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (pyridin-4-yl)methylamine (24 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 7 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 60/40), to afford 26 mg yield 27 % of **Mel19**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (2H, br s, CH_{ar}), 7.24-6.77 (6H, m, CH_{ar}), 6.69 (1H, br s, NH), 5.57 (1H, br s, NH), 4.65-4.36 (4H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₁₄ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 493,1133; found: 493.1222.

Mel20: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(2-(pyridin-2-ylamino)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Partie expérimentale

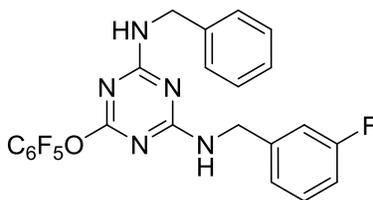


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of *N*-(2-aminoethyl)pyridin-2-amine (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 60/40), to afford 86 mg (82 %) of **Mel20**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (1H, br s, CH_{ar}), 7.42-7.26 (2H, m, CH_{ar}), 7.12-6.78 (3H, m, CH_{ar}), 6.57 (1H, q, *J*=5.5 Hz, CH_{ar}), 6.34 (1H, br s, CH_{ar}), 6.08 (1H, br s, NH), 5.56 (1H, br s, NH), 4.78 (1H, br s, NH), 4.56 (1H_a, m, CH₂), 4.42 (1H_b, m, CH₂), 3.67-3.34 (4H, m, CH₂-CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₃ H₁₇ F₆ N₇ O (M+H)⁺: 522.1405; found: 522.1478.

Mel21: N2-benzyl-N4-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine:



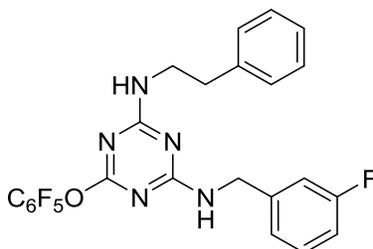
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of phenylmethanamine (25 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂), to afford 86 mg (99 %) of **Mel21**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.26 (5H, m, CH_{ar}), 7.23-6.82 (4H, m, CH_{ar}), 5.70 (1H, br s, NH), 5.56 (1H, br s, NH), 4.61-4.41 (4H, m, CH₂, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₃ H₁₅ F₆ N₅ O (M+H)⁺: 492.1194; found: 492.1267.

Mel22: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-phenethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine

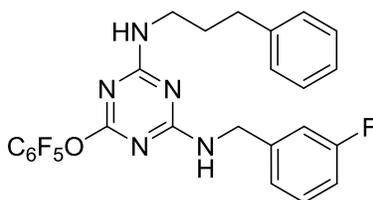


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 2-phenylethylamine (27 mg, 0.22 mmol, 1.1eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 91 mg (89 %) of **Mel22**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.27 (5H, m, CH_{ar}), 7.23-6.83 (4H, m, CH_{ar}), 5.50 (1H, br s, NH), 5.20 (1H, br s, NH), 4.67-4.37 (2H, m, CH₂), 3.69-3.48 (2H, m, CH₂), 2.95-2.69 (2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₄ H₁₇ F₆ N₅ O (M+H)⁺: 506.1343; found: 5061416.

Mel23: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(3-phenylpropyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



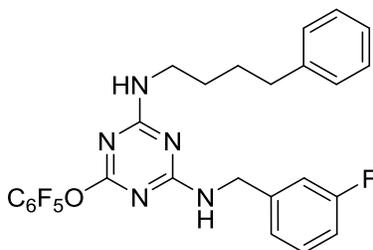
Partie expérimentale

DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 3-phenylpropan-1-amine (30.2 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 102 mg (99 %) of **Mel23**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70-6.73 (9H, m, CH_{ar}), 5.65(1H, br s, NH), 5.28 (1H, br s, NH), 4.55-4.28 (2H, m, CH₂, CH₂), 3.41-3.14 (2H, m, CH₂), 2.66-2.45 (2H, m, CH₂), 1.79 (2H, sep, *J*=6.5 Hz, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₅ H₁₉ F₆ N₅ O (M+H)⁺: 520.1505; found: 520.1578.

Mel24: N2-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(4-phenylbutyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



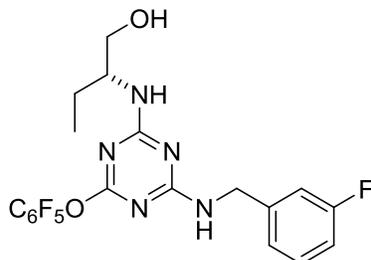
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 4-phenylbutan-1-amine (33mg, 0.22mmol, 1.1eq) in CH₂Cl₂ (1ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 100 mg (94%) of **Mel24**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (1H, s, CH_{ar}), 7.26-7.11 (5H, m, CH_{ar}), 7.10-6.81 (3H, m, CH_{ar}), 5.48(1H, br s, NH), 5.15(1H, br s, NH), 5.06 (1H_a, dd, *J* =15.2, 6Hz, CH₂), 4.43 (1H_b, m, CH₂), 3.35 (2H, qt, *J*=6. Hz, CH₂), 2.61 (2H, qt, *J*=6.5 Hz, CH₂), 1.74-1.56 (4H, m, -CH₂-CH₂-).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₆ H₂₁ F₆ N₅ O (M+H)⁺:534.1651; found: 534.17.

Partie expérimentale

Mel25: (R)-2-((4-((3-fluorobenzyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol

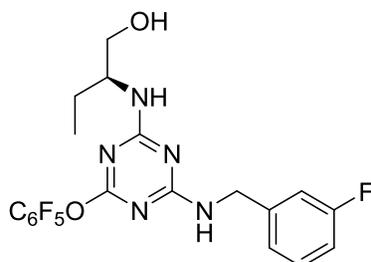


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (R)-2-aminobutan-1-ol (20 mg, 0.22mmol, 1.1eq) was dissolved in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 80/20), to afford 89 mg (94 %) of **Mel25**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (1H, br s, CH_{ar}), 7.22-6.79 (3H, m, CH_{ar}), 6.23 (1H, br s, NH), 5.31 (1H, br s, NH), 4.66-4.36 (2H, m, CH₂), 4.33-3.90 (1H, m, CH), 3.87-3.51 (2H, m, CH₂), 1.92-1.47 (2H, m, CH₂), 1.47-1.09 (1H, m, OH), 1.09-0.78 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀ H₁₇ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 474.1293; found: 474.1365.

Mel26: (S)-2-((4-((3-fluorobenzyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol



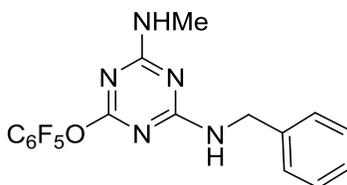
Partie expérimentale

DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4a** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (S)-2-aminobutan-1-ol (20 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 80/20) to afford 90 mg (95 %) of **Mel26**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (1H, br s, CH_{ar}), 7.14-6.79 (3H, m, CH_{ar}), 5.49 (1H, br s, NH), 4.66-4.38 (2H, m, CH₂), 4.38-4.08 (1H, m, NH), 4.08-3.84 (1H, m, CH), 3.84-3.52 (2H, m, CH₂), 1.78-1.43 (2H, m, CH₂), 1.43-1.07 (1H, br s, OH), 1.07-0.85 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀ H₁₇ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 474.1293; found: 474.1365.

Mel27: N2-benzyl-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



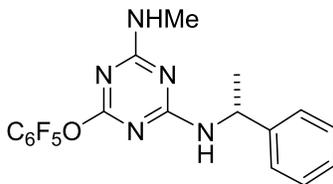
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of benzylamine (37.5 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, CH₂Cl₂/AcOEt: 60/40) to afford 57 mg (81 %) of **Mel27**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.26 (4H, m, CH_{ar}), 7.17 (1H, br s, CH_{ar}), 5.74(1H, br s, NH), 5.35(1H, br s, NH), 4.69-4.50 (1H_a, m, CH₂), 4.52-4.32 (1H_b, m, CH₂), 3.00-2.84 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₇ H₁₂ F₅ N₅ O (M+H)⁺ : 398.0968; found: 398.1041.

Partie expérimentale

Mel28: (R)-N2-(1-(3-fluorophenyl)ethyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

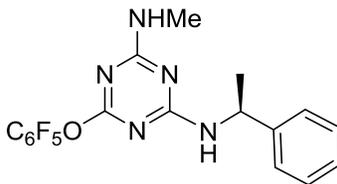


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (R)-1-phenylethylamine (26.75 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 70/30), to afford 69 mg (84 %) of **Mel28**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.26 (3H, m, CH_{ar}), 7.25-7.02 (2H, m, CH_{ar}), 5.80-5.58 (1H, m, CH), 5.41(1H, br s, NH), 4.99 (1H, br s, NH), 3.99-2.80 (3H, m, CH₃), 1.60-1.37 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₈ H₁₄ F₅ N₅ O (M+H)⁺: 412.1126; found: 412.1199 .

Mel29: (S)-N2-methyl-6-(perfluorophenoxy)-N4-(1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



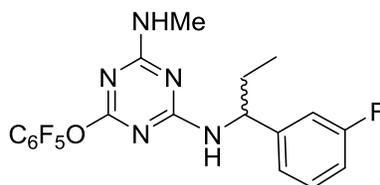
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (S)-1-phenylethylamine (26.75 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 7 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 80/20), to afford 67mg (81 %) of **Mel29**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.26 (3H, m, CH_{ar}), 7.25-6.97 (2H, m, CH_{ar}), 5.61-5.32 (1H, m, CH), 5.20 (1H, br s, NH), 4.92 (1H, br s, NH), 2.91 (3H, q, *J*=5Hz, CH₃), 1.57-1.36 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₈H₁₄F₅N₅O (M+H)⁺: 412.1126; found: 412.1199.

Mel30: N2-(1-(3-Fluorophenyl)propyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



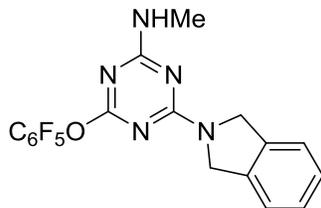
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-(3-fluorophenyl)propan-1-amine (34 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 8 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 40/60), to afford 30 mg (34 %) of **Mel30**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (1H, br s, CH_{ar}), 7.04-6.62 (3H, m, CH_{ar}), 5.55-5.26 (1H, m, CH), 5.02 (1H, br s, NH), 4.68 (1H, br s, NH), 2.95-2.70 (3H, m, CH₃), 1.66-1.61 (2H, m, CH₂), 0.89 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₉H₁₅F₆N₅O (M+H)⁺: 444,1181; found: 444.1268.

Mel31: 4-(Isoindolin-2-yl)-N-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine

Partie expérimentale

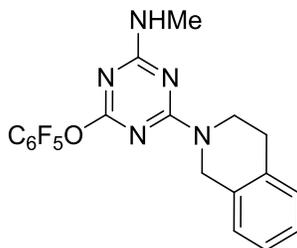


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of isoindoline (28 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 72 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to afford 81mg (99 %) of **Mel31**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (4H, br s, CH_{ar}), 5.14(1H, br s, NH), 4.99-4.69(4H, m, CH₂-N - CH₂), 3.00-2.83 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₈ H₁₂ F₅ N₅ O (M+H)⁺: 410.0967; found: 410.1040 .

Mel32: 4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-N-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-amine



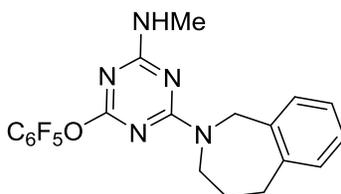
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (31mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 48 h at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 77 mg (91 %) of **Mel32**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.22-7.10 (4H, m, CH_{ar}), 5.07(1H, br s, NH), 4.97-4.75(2H, m, CH₂), 4.13-4.85 (2H, m, CH₂), 2.99 (3H, t, *J*=5.8 Hz, CH₃), 2.94-2.81(2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₉ H₁₄ F₅ N₅ O (M+H)⁺: 424.1118; found: 424.1190.

Mel33: N-methyl-4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[c]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-amine



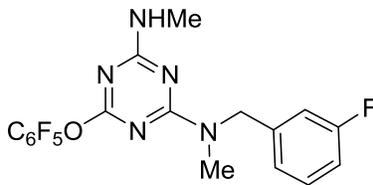
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of hexahydrobenzo[c]azepine (32.8 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 7 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 73 mg (83 %) of **Mel33**

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (1H, br s, CH_{ar}), 7.22-6.98 (3H, m, CH_{ar}), 5.02(1H, br s, NH), 4.86-4.39(2H, m, CH₂), 4.17-3.80 (2H, m, CH₂), 3.06-2.94 (3H, m, CH₃), 2.94-2.83 (2H, m, CH₂), 1.92-1.65(2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀H₁₆F₅N₅O (M+H)⁺ : 438,1275; found: 438,1357.

Mel34: N2-(3-fluorobenzyl)-N2,N4-dimethyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Partie expérimentale

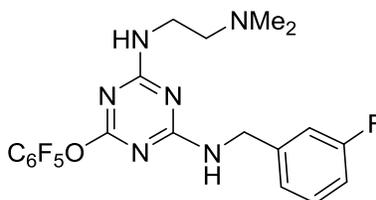


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (3-fluorophenyl)-N-methylmethanamine (30.6 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred for 5 days at room temperature, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂) to afford 85 mg (99 %) of **Mel34**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (1H, br s, CH_{ar}), 7.06-6.69 (3H, m, CH_{ar}), 5.22 (1H, br s, NH), 4.92-5.47 (2H, m, CH₂), 3.20-2.85 (6H, m, CH₃, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₈ H₁₃ F₆ N₅ O (M+H)⁺ : 430.1021; found: 430.1094 .

Mel35: N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-N4-(3-fluorobenzyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



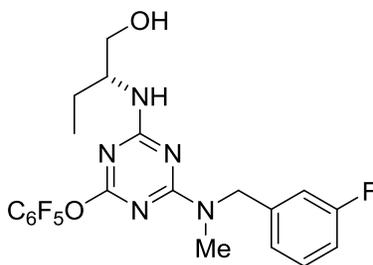
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 3-fluorobenzylamine (20 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, CH₂Cl₂/EtOH: 80/20), to afford 94mg (99 %) of **Mel35**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (1H, br s, CH_{ar}), 7.08-6.97 (3H, m, CH_{ar}), 6.97(1H, br s, NH), 4.35(2H, br s, CH₂), 3.46(1H, br s, NH), 3.34(2H, m, CH₂), 2.61(2H, m, CH₂), 2.26 (6H, s, CH₃-N-CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₀ H₁₈ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 473.1445; found: 473.1518.

Mel36: (R)-2-((4-((3-fluorobenzyl)(methyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol



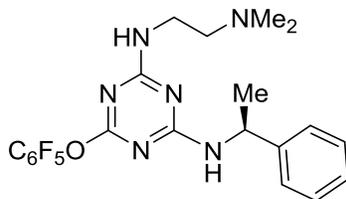
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4d** (106.22 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (3-fluorophenyl)-*N*-methylmethylamine (30.6 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 60/40), to afford 96 mg (90 %) of **Mel36**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (1H, br s, CH_{ar}), 7.05-6.73 (3H, m, CH_{ar}), 5.38-5.07 (1H, m, CH), 4.87-4.49 (2H, m, CH₂), 3.96 (1H, br s, NH), 3.83-2.92 (2H, m, CH₂), 3.13-2.92(3H, m, CH₃), 2.24 (1H, br s, OH), 1.66 (1H_a, br s, CH₂), 1.49 (1H_a, br s, CH₂), 1.11-0.76 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₁₉ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 473.1445; found: 473.1518.

Mel37: (S)-N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Partie expérimentale

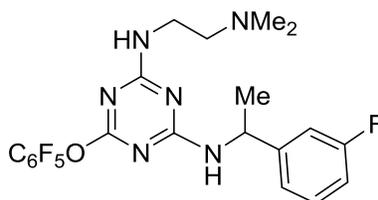


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (*S*)-1-phenylethylamine (26.7 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 86 mg (92 %) of **Mel37**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.26 (4H, m, CH_{ar}), 7.10 (1H, br s, CH_{ar}), 6.12 (1H, br s, NH), 5.65-5.06 (4H, m, CH₂-CH₂), 3.44 (1H, br s, NH), 2.66-2.07 (6H, m, CH₃-N-CH₃), 1.57-1.51 (1H, m, CH), 1.50-1.41 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₂₁ F₅ N₆ O (M+H)⁺ :469.17048; found: 469.1777.

Mel38: N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-N4-(1-(3-fluorophenyl)ethyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-(3-fluorophenyl)-ethylamine (31.2 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure

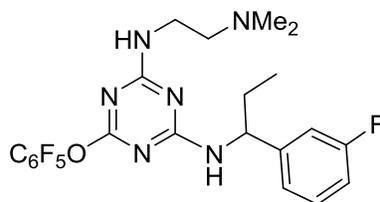
Partie expérimentale

and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 92 mg (95 %) of **Mel38**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (1H, br s, CH_{ar}), 7.24-6.97 (3H, m, CH_{ar}), 6.96-6.71 (2H, m CH₂), 6.11(1H, br s, NH), 5.67-4.64 (2H, m, CH₂), 3.48 (1H, br s, NH), 2.70-2.26 (6H, m, CH₂- N-CH₂), 1.54-1.47 (1H, m, CH), 1.46-1.38 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₂₀ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 487.1613; found: 487.1688.

Mel39: N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-N4-(1-(3-fluorophenyl)propyl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



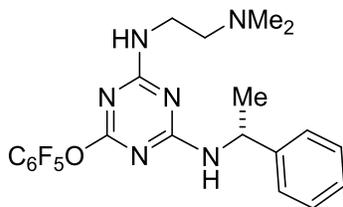
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-(3-fluorophenyl)propan-1-amine (66 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH: 90/10), to afford 13 mg (13 %) of **Mel39**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.52(1H, br s, CH_{ar}), 7.25-6.69 (3H, m, CH_{ar}), 5.90-5.25 (2H, m CH₂), 4.75 (1H, br s, NH), 4.19 (1H, br s, NH), 3.51-3.22 (2H, m, CH₂), 2.52-2.35(2H, m, CH₂), 2.22 (6H, d, *J*=18.6 Hz, CH₃- N-CH₃), 1.94-1.62(3H, m, CH₃), 1.45-1.33 (1H, m, CH).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₂₂ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 501.1764; found: 501.1837.

Partie expérimentale

Mel40: (R)-N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-6-(perfluorophenoxy)-N4-(1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

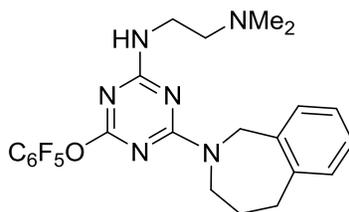


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (*R*)-1-phenylethylamine (26.7 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 61 mg (65 %) of **Mel40**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.27 (3H, m, CH_{ar}), 7.25-7.20 (2H, m, CH_{ar}), 6.15 (1H, br s NH), 5.60 (1H, br s, NH), 3.51-3.33 (2H, m, CH₂), 2.55(1H_{a,t}, *J*=6.1Hz,CH₂), 2.44 (1H_{b,t}, *J*=6.1Hz,CH₂), 2.34-2.18 (6H, m, CH₃-N -CH₃), 1.52 (1H, d, *J*=6.8Hz,CH), 1.50-1.41 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₂₁ F₅ N₆ O (M+H)⁺: 469.1695; found: 469.1768.

Mel41 : N1,N1-dimethyl-N2-(4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[c]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)ethane-1,2-diamine



DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of hexahydrobenzo[c]azepine (32.4 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise

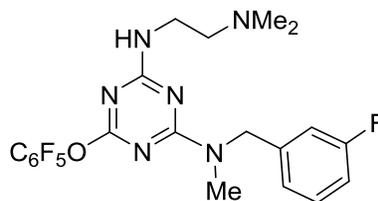
Partie expérimentale

for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 85 mg (86 %) of **Mel41**

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-6.45 (4H, m, CH_{ar}), 6.09 (1H, br s NH), 4.79-4.39 (2H, m, CH₂), 4.13-4.17 (2H, m, CH₂), 3.74-3.54 (2H, m, CH₂), 3.02-2.90 (2H, m, CH₂), 2.89-2.66 (2H, m, CH₂), 2.63-2.35 (6H, m, CH₃-N -CH₃), 1.88-1.65 (2H, m, CH₂).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₃ H₂₃ F₅ N₆ O (M+H)⁺: 495.1856; found: 495.1929.

Mel42: N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-N4-(3-fluorobenzyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



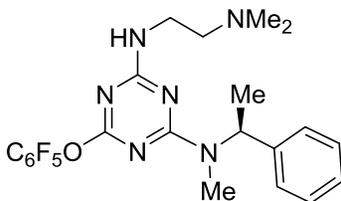
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (3-fluorophenyl)-*N*-methylmethylamine (30.6 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 47mg (48 %) of **Mel42**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (1H, br s, CH_{ar}), 7.06 -6.68 (3H, m, CH_{ar}), 6.08 (1H, br s, NH), 4.87-4.47 (2H, m, CH₂), 3.64-3.36 (2H, m, CH₂), 3.17-2.83 (3H, m, CH₃), 2.74-2.49 (2H, m, CH₂), 2.45-2.22 (6H, m, CH₃-N- CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₂₀ F₆ N₆ O (M+H)⁺: 487.1611; found: 487.1784.

Partie expérimentale

Mel43: (S)-N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-N4-(1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

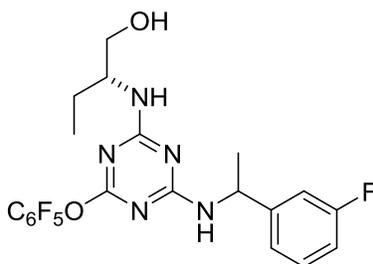


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (113.68mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (S)-N-methyl-1-phenylethylamine (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 72 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/EtOH: 95/5), to afford 80 mg (83 %) of **Mel43**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.27 (4H, m, CH_{ar}), 7.23-7.10 (1H, br s, CH_{ar}), 6.02 (1H, br s, NH), 5.82-5.62 (1H, m, CH), 3.58-3.37 (2H, m, CH₂), 2.90-2.63 (3H, m, CH₃), 2.61-2.47 (2H, m, CH₂), 2.40-2.21 (6H, m, CH₃-N-CH₃), 1.61-1.44 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₂₃ F₅ N₆ O (M+H)⁺: 483.1836; found: 483.1935.

Mel44: (2R)-2-((4-((1-(3-fluorophenyl)ethyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol



DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4d** (106.45 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-(3-

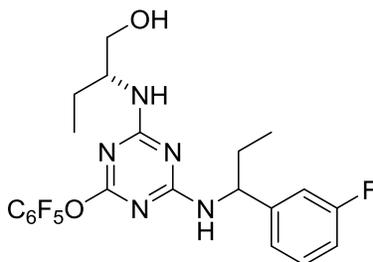
Partie expérimentale

fluorophenyl)ethylamine (31 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 7 days, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 70/30), to afford 90 mg (92 %) of **Mel44**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43(1H, br s, CH_{ar}), 7.13-6.74 (3H, m, CH_{ar}), 5.46 (1H, br s, NH), 5.00 (1H, br s, NH), 4.46-3.87 (1 H, m, CH), 3.77 (b ds, 1H, CH), 3.71-3.28 (2H,m, CH₂), 1.80-1.55 (2H, m, CH₂), 1.55-1.42 (3H, m, CH₃), 1.42-1.06 (1H, br s, OH), 1.06-0.72(3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₁₉ F₆ N₅ O₂ (M+H)⁺: 488.1452; found: 488.1525.

Mel45: (2R)-2-((4-((1-(3-fluorophenyl)propyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol



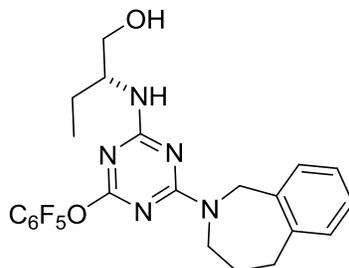
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4d** (106.45 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1-(3-fluorophenyl)propan-1-amine (33 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 7 days, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 80/20), to afford 89mg (89 %) of **Mel45**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15(1H, br s, NH), 7.36(1H, br s, CH_{ar}), 7.13-6.97(3H, m, CH_{ar}), 6.79 (1H, br s, NH), 4.49(1H, br s, OH), 3.81(1H, m, CH), 3.21(2H, m, CH₂), 2.53(1H,m, CH), 1.85 (2H,m, CH₂), 1.59 (2H, m, CH₂), 0.94-0.87(6H, m, CH₃, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₁F₆N₅O₂ (M+H)⁺: 502,1599; found: 502.17 (M+H)⁺.

Partie expérimentale

Mel46: (R)-2-((4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[c]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol

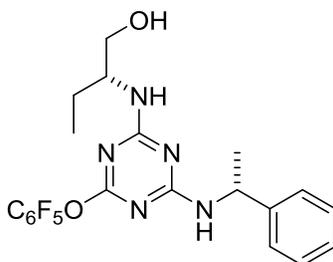


DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4d** (106.45 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of hexahydrobenzo[c]azepine (33 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 48 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 90/10) to afford 49mg (50 %) of **Mel46**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31-6.69 (4H, m, CH_{ar}), 6.22 (1H, br s NH), 5.37-5.11 (1H, m, CH), 4.78-4.30 (2H, m, CH₂), 4.12-3.85 (2H, m, CH₂), 3.83-3.69 (1H, m, OH), 3.69-3.47 (2H, m, CH₂), 2.97-2.78 (2H, m, CH₂), 1.83-1.64 (2H, m, CH₂), 1.63-1.39 (2H, m, CH₂), 0.96-0.88 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₃ H₂₂ F₅ N₅ O₂ (M+H)⁺: 496.1700; found: 496.1773.

Mel47: (R)-2-((4-(perfluorophenoxy)-6-(((R)-1-phenylethyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol



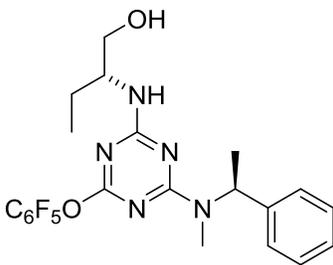
Partie expérimentale

DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4d** (106.45 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (R)-1-phenylethylamine (26.7 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 90/10), to afford 86 mg (92 %) of **Mel47**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.26. (3H, m, CH_{ar}), 7.24-7.03 (2H, m, CH_{ar}), 5.57 (1H, br s, NH), 5.33 (1H, br s, NH), 5.23-4.73 (1H, m, CH), 4.01-3.69 (2H, m, CH₂), 3.67-3.48 (1H, m, OH), 1.70-1.35 (6H, m, CH₃, CH₃), 1.03-0.88(2H, m, CH₂), 0.81 (1H, t, J=7.4 Hz, CH).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁ H₂₀ F₅ N₅ O₂ (M+H)⁺: 469.1534; found: 469.1607.

Mel48: (R)-2-((4-(methyl((S)-1-phenylethyl)amino)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol



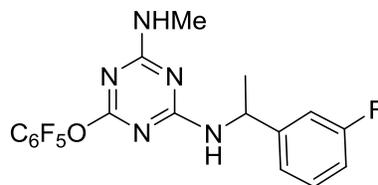
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4d** (106.45 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (R)-1-phenylethylamine (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/AcOEt: 80/20), to afford 86 mg (89 %) of **Mel48**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.26 (4H, m, CH_{ar}), 7.20 (1H, br s, CH_{ar}), 5.99 (1H, br s, NH), 5.34-5.06 (1H, m, CH), 4.05-3.82 (1H, m, CH), 3.82-3.54 (2H, m, CH₂), 2.90-2.59 (3H, m, CH₃), 2.34 (H, br s, OH), 1.69-1.56 (2H, m, CH₂), 1.56-1.41 (3H, m, CH₃), 1.04-0.91 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₂₂ F₅ N₅ O₂ (M+H)⁺: 484.1705; found: 484.1777.

Mel49: N2-(1-(3-fluorophenyl)ethyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



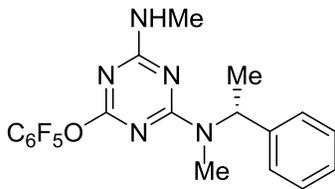
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (*S*)-1-phenylethylamine (62 mg, 0.44 mmol, 2.2 eq) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/Pentane: 80/20), to afford 39 mg (41 %) of **Mel49**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26-6.72 (4H, m, CH_{ar}), 5.35 (1H, br s, NH), 4.95 (1H, br s, NH), 2.92 (3H, m, CH₃), 1.56-1.43 (3H, m, CH₃), 1.25 (1H, br s, CH).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₈ H₁₃ F₆ N₅ O (M+H)⁺: 430.1021; found: 430.1094.

Mel50: (R)-N2,N4-dimethyl-6-(perfluorophenoxy)-N2-(1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Partie expérimentale

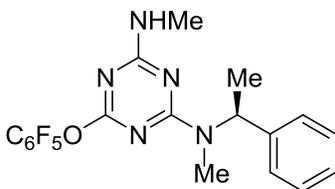


DIPEA (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (47 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (*R*)-*N*-methyl-1-phenylethylamine (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/Pentane: 80/20) to afford 42 mg (99 %) of **Mel50**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56-7.26 (4H, m, CH_{ar}), 7.19 (1H, br s, CH_{ar}), 6.03 (1H, br s, NH), 4.66 (1H, br s, CH), 3.07-2.56 (6H, m, CH₃ N-CH₃), 1.62-1.44 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₉ H₁₆ F₅ N₅ O (M+H)⁺: 426.1267; found: 426.1340.

Mel51: (*S*)-*N*,*N*-dimethyl-6-(perfluorophenoxy)-*N*-(1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



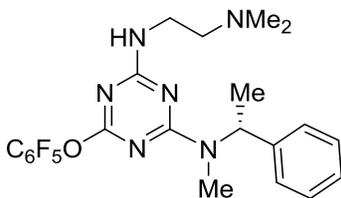
DIPEA (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4b** (94 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (*S*)-*N*-methyl-1-phenylethylamine (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/Pentane: 80/20) to afford 68mg (81 %) of **Mel51**.

Partie expérimentale

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.27(3H, m, CH_{ar}), 7.25-7.12 (2H, m, CH_{ar}), 6.06 (1H, br s, NH), 5.14 (1H, m, CH), 3.06-2.50 (6H, m, CH₃, CH₃), 1.62-1.43 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₁₉ H₁₆ F₅ N₅ O (M+H)⁺: 426.1267; found: 426.1340.

Mel 52: *N2-(2-(dimethylamino)ethyl)-N4-methyl-6-(perfluorophenoxy)-N4-((R)-1-phenylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine*



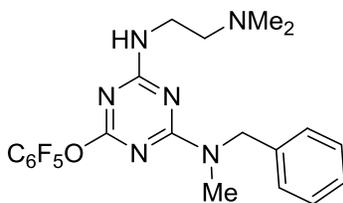
DIPEA (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (53 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of (*R*)-*N*-methyl-1-phenylethylamine (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 48 mg (99%) of **Mel52**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76-6.67(5H, m, CH_{ar}), 6.24(1H, br s, NH), 5.84(1H, m, CH), 3.72-3.28 (2 H, m, CH₂), 2.99-2.70 (2H, m, CH₂), 2.70-2.50 (3H, m, CH₃), 2.50-2.09 (6H, m, CH₃-CH₃), 1.70-1.33 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₂₃ F₅ N₆ O (M+H)⁺: 483.1849; found: 483.1922.

Mel 53: *N2-benzyl-N4-(2-(dimethylamino)ethyl)-N2-methyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine*

Partie expérimentale

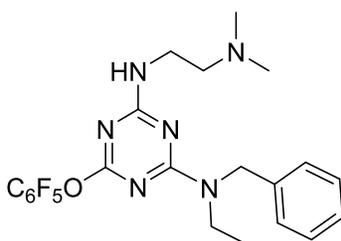


DIPEA (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (53 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of *N*-methyl-benzylamine (26 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5), to afford 40 mg (85 %) of **Mel53**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56-7.27(4H, m, CH_{ar}), 7.25-6.95 (1H, m, CH_{ar}), 6.15 (1H, br s, NH), 4.80 (1H_a, m, CH₂), 4.54 (1H_b, m, CH₂), 3.68(1H_a, q, *J*=5.6Hz, CH₂), 3.6(1H_b, q, *J*=5.9 Hz, CH₂), 3.12-3.01 (2H, m, CH₂), 2.97-2.61 (3H, m, CH₃), 3.61-2.31 (6H,m, CH₃-CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₁F₅N₆O (M+H)⁺ : 469,1697; found: 469.18.

Mel 54: N2-benzyl-N4-(2-(dimethylamino)ethyl)-N2-ethyl-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazine-2,4-diamine



DIPEA (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4c** (53 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of *N*-benzylethylamine (26 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (1 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was

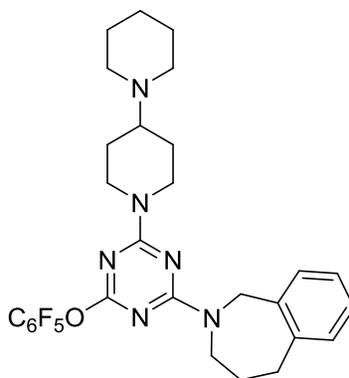
Partie expérimentale

then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂), to afford 47 mg (97%) of **MeI54**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.25 (5H, m, CH_{ar}), 7.01 (1H, br s, NH), 4.71 (2H, s, CH₂), 3.34 (2H, m, CH₂), 3.17 (2H, m, CH₂), 2.61 (2H, m, CH₂), 2.26 (6H, m, CH₃-N-CH₃), 1.10 (3H, m, CH₃).

LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₂ H₂₃ F₅ N₆ O (M+H)⁺: 483.1837; found: 483.1910.

MeI 55: 2-(4-([1,4'-bipiperidin]-1'-yl)-6-(perfluorophenoxy)-1,3,5-triazin-2-yl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzo[*c*]azepine.



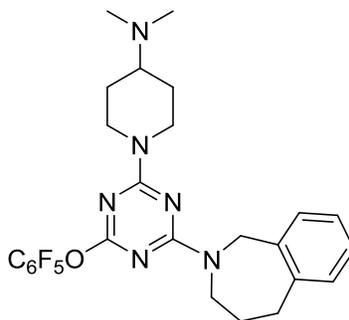
DIPEA (96 mg, 0.74 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4e** (400 mg, 0.67 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (10 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of 1,4'-bipiperidine (125.4 mg, 0.74 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 90/10), to afford 300 mg (77%) of **MeI55**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35-6.48 (4H, m, CH_{ar}), 4.77 (1H_a, d, *J*=13.2 Hz, CH₂), 4.68 (1H_b, d, *J*=13.7 Hz, CH₂), 4.60-4.32 (2H, m, CH₂), 4.13-3.78 (2H, m, CH₂), 2.97 (2H, qt, *J*=4.8 Hz, CH₂), 2.86 (1H, m, CH), 2.79-2.64 (2H, m, CH₂), 2.51 (4H, s, 2CH₂), 1.88-1.70 (4H, m, 2CH₂), 1.59 (4H, s, 2CH₂) 1.44 (4H, s, 2CH₂).

Partie expérimentale

LC-MS: LC-MS: m/z calcd. for $C_{29}H_{31}F_5N_6O$ (M+H)⁺: 575.2480; found: 575.163.

Mel 56: *N,N*-dimethyl-1-(4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[*c*]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)piperidin-4-amine



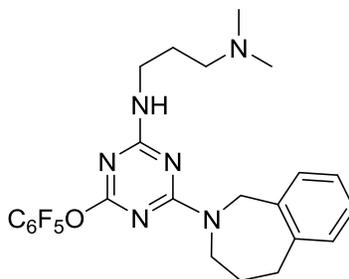
DIPEA (84 mg, 0.65 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4e** (350 mg, 0.59 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (10 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of *N,N*-dimethylpiperidin-4-amine (84 mg, 0.65 mmol, 1.1 eq) in CH_2Cl_2 (3 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH_2Cl_2 /MeOH: 90/10), to afford 225 mg (71%) of **Mel56**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35-7.07 (3H, m, CH_{ar}), 7.06-6.49 (1H, m, CH_{ar}), 4.98-4.70 (2H, m, CH_2), 4.68-4.37 (2H, m, CH_2), 4.13-3.77 (2H, m, CH_2), 3.02-2.93 (2H, m, CH_2), 2.93-2.69 (2H, m, CH_2), 2.51-2.38 (1H, m, CH), 2.29 (6H, d, $J=4.1Hz$, 2 CH_3) 1.98-1.70 (4H, m, 2 CH_2), 1.50-1.29 2H, m, CH_2).

LC-MS: LC-MS: m/z calcd. for $C_{26}H_{27}F_5N_6O$ (M+H)⁺: 535.2167; found: 535.1681.

Mel 57: *N1,N1*-dimethyl-*N3*-(4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[*c*]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)propane-1,3-diamine

Partie expérimentale



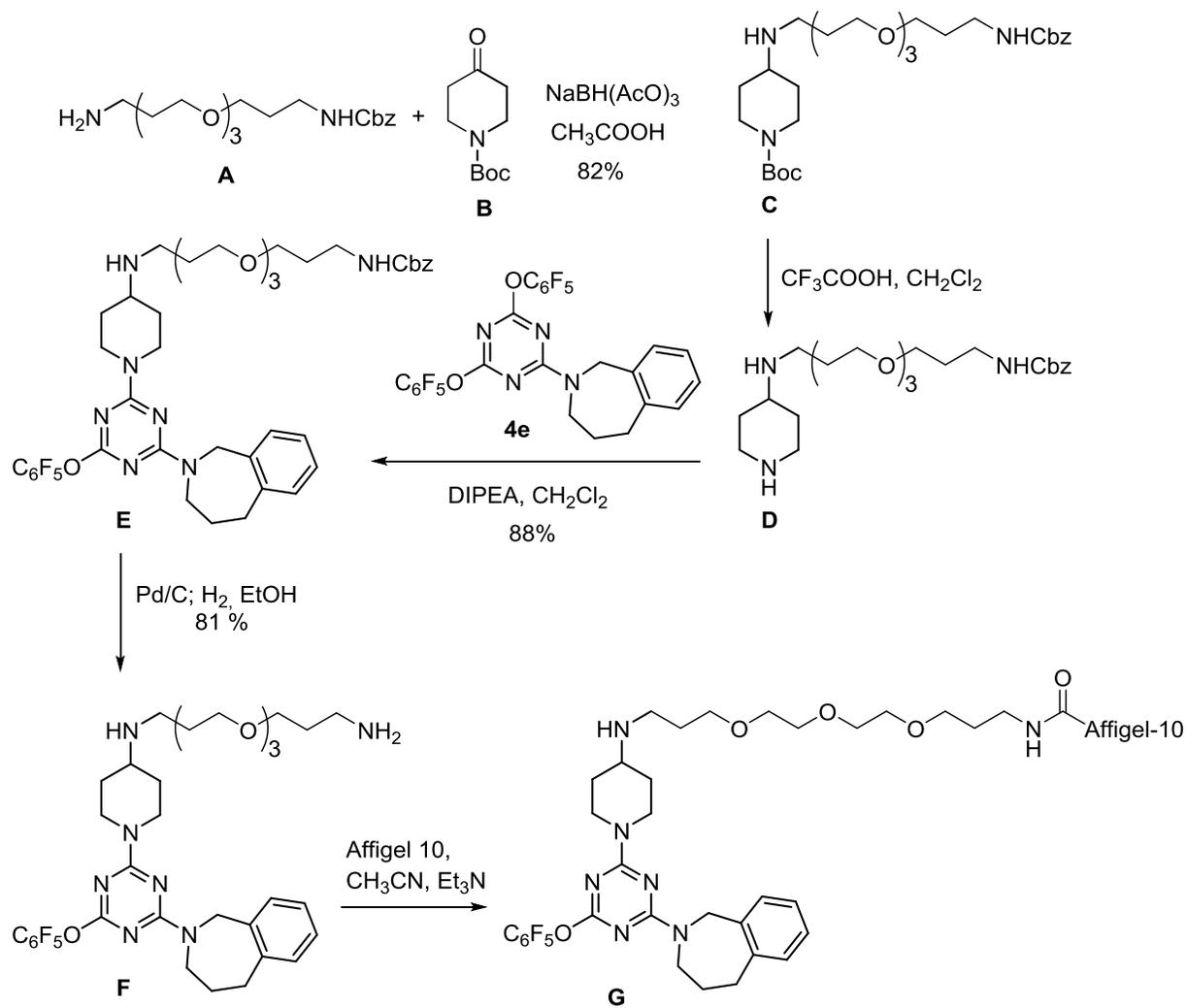
DIPEA (72 mg, 0.55 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4e** (300 mg, 0.50 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (10 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of N1,N1-dimethylpropane-1,3-diamine (57 mg, 0.55 mmol, 1.1 eq) in CH₂Cl₂ (3 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 90/10), to afford 205 mg (79%) of **MeI57**.

¹H NMR: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.06 (3H, m, CH_{ar}), 7.06-6.48 (1H, m, CH_{ar}), 5.02-4.63 (2H, m, CH₂), 4.47 (2H, s, CH₂), 4.19-3.71 (2H, m, CH₂), 3.06-2.90 (2H, m, CH₂), 2.89-2.66 (2H, m, CH₂), 2.51 (4H, s, 2CH₂), 1.94 (1H, br s, NH), 1.59 (3H, s, CH₃), 1.44 (3H, s, CH₃).

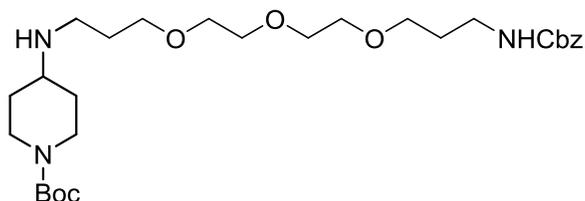
LC-MS: LC-MS: *m/z* calcd. for C₂₄ H₂₅ F₅ N₆ O (M+H)⁺: 509.2010; found: 509.086.

Partie expérimentale

Linker synthesis



Tert-butyl 4-((3-oxo-1-phenyl-2, 8, 11, 14-tetraoxa-4-azaheptadecan-17-yl)amino)piperidine-1-carboxylate (C)

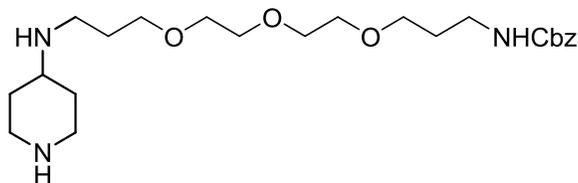


Partie expérimentale

Sodium triacetoxymethylborohydride (204 mg, 0.96 mmol, 1.6 equiv) was added portionwise over 1 h to a solution of amine **A** (255 mg, 0.72 mol), *N*-Boc-piperidin-4-one (**B**) (12 mg, 0.6 mmol) and acetic acid (0.01 mL, 1.8 mmol) in dichloromethane (5 mL) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to RT over 5 h and then slowly poured into cold 3.3N NaOH (1ml) with stirring. The reaction mixture was then separated and the organics dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/MeOH: 80/20), to afford 321 mg (82 %) of the titled compound.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.13 (5H, m, CH_{ar}), 5.39 (1H, br s, NH), 5.00 (2H, s, CH₂), 3.97 (2H, br s, CH₂), 3.59-3.36 (12H, m, 6CH₂), 3.23 (2H, q, *J*=6.0 Hz, CH₂), 3.15-2.96(1H, m, CH), 2.60-2.50 (4H, m, 2CH₂), 1.93-1.74 (2H, m, CH₂), 1.74-1.58 (4H, m, 2CH₂), 1.51(1H, br s, NH), 1.39-1.33 (9H, m, 3CH₃), 1.32-1.07 (2H, m, CH₂)

Benzyl (3-(2-(2-(3-(piperidin-4-ylamino)propoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamate (D)

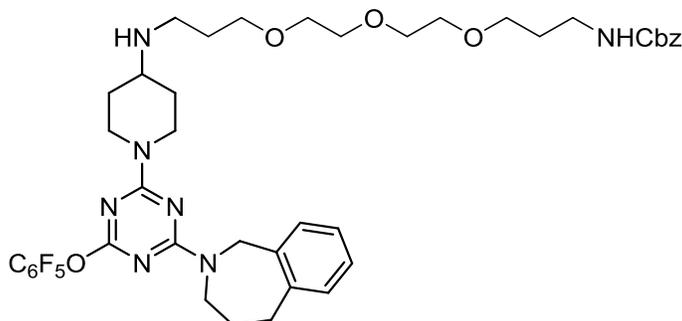


Trifluoroacetic acid (10 ml, 0.13 mol) was added to a solution of compound **C** (268 mg, 0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL). The mixture was then stirred at RT for 2 h, concentrated under reduced pressure, to afford 228 mg (88 %) of monoprotected triamine **D**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.50-7.10 (5H, m, CH_{ar}), 5.58 (1H, br s, NH), 5.24-4.91 (2H, m, CH₂), 3.63-3.32 (12H, m, 6CH₂), 3.26-3.14 (2H, m, CH₂), 2.93 (2H, d, *J*=12 Hz, CH₂), 2.72-2.55(2H, m, CH₂), 2.55-2.39 (2H, m, CH₂), 2.35 (1H, br s, NH), 1.77 (2H, d, *J*=10.9 Hz, CH₂), 1.74-1.61(4H, m, CH₂), 1.61-1.48 (1H, m, CH), 1.15 (1H_a, dd, *J*=12, 3.5 Hz, CH₂), 1.09 (1H_b, dd, *J*=11.8, 3.6 Hz, CH₂).

Partie expérimentale

Benzyl(3-(2-(2-(3-((1-(4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[c]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)piperidin-4-yl)amino)propoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamate (E)

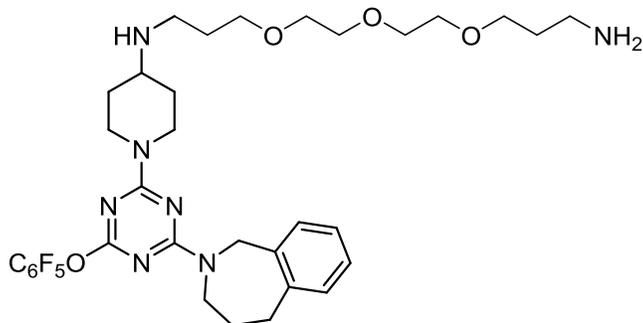


DIPEA (57 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of triazine **4e** (236 mg, 0.4 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (10 mL) cooled in an ice water bath. After 5 min, a solution of piperidine **D** (175 mg, 0.4 mmol) in CH₂Cl₂ (5 ml) was added dropwise for 5 min at 0°C. The mixture was then stirred and heated to 40°C for 24 h, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel, (CH₂Cl₂/EtOH: 90/10), to afford 267 mg (88 %) of adduct **E**.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.30 (4H, m, CH_{ar}), 7.30-7.27 (1H, m, CH_{ar}), 7.25-7.05 (3H, m, CH_{ar}), 7.05-6.47 (1H, m, CH_{ar}), 5.45 (1H, br s, NH), 5.07 (2H, s, CH₂), 4.71 (1H_a, s, CH₂), 4.45 (1H_b, s, CH₂), 4.02 (1H_a, s, CH₂), 3.89 (1H_b, s, CH₂), 3.65-3.45 (12H, m, 6CH₂), 3.29 (2H, qt, *J*=5.8 Hz, CH₂), 2.96 (4H, q, *J*=5.8 Hz, 2CH₂), 2.89 (1H, m, CH), 2.87-2.73 (2H, m, CH₂), 2.05 (1H, br s, NH), 2.00-1.78 (4H, m, 2CH₂), 1.74 (4H, qt, *J*=6.4 Hz, 2CH₂), 1.63-1.28 (4H, m, 2CH₂).

N-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-1-(4-(perfluorophenoxy)-6-(1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzo[c]azepin-2-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)piperidin-4-amine (F)

Partie expérimentale



A solution of Mel-Cbz (100 mg, 0.13 mmol) in EtOH (15 mL) was hydrogenated over Pd/C (10 mg) at 40 psi in a Parr apparatus for 24 h. The catalyst was removed by filtration and EtOH evaporated to afford the titled compound (**F**) (81 mg, 70%) as a solid.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.28 (1H, m, CH_{ar}), 7.18-6.96 (3H, m, CH_{ar}), 6.94-6.43 (1H, m, CH_{ar}), 4.87-4.56 (2H, m, CH₂), 4.47 (1H, br s, NH), 4.12-3.81 (2H, s, CH₂), 3.67-3.39 (12H, m, 6CH₂), 3.29 (1H_a, s, CH₂), 3.16 (1H_b, s, CH₂), 3.12-3.06 (1H, m, CH), 3.06-2.94 (4H, m, 2CH₂), 2.94-2.65 (4H, m, 2CH₂), 2.11-1.92 (4H, m, 2CH₂), 1.88-1.69 (4H, m, 2CH), 1.68-1.46 (2H, br s, NH₂).

Mel55-conjugated affinity matrix

A volume of 1 mL of packed Affigel-10 (Bio-Rad) was washed on a glass filter with CH₃CN and added to a solution of amine **F** (12 mg, 20 μmol) in CH₃CN (0.8 mL) and triethylamine (20 μL). This suspension was gently rotated for 12 h at room temperature. HPLC analysis of the supernatant indicated that the coupling was quantitative. Ethanolamine (50 μL) was added and after 4 h, the resin was thoroughly washed with water and ethanol, and conserved in ethanol.

7. ANNEXES

7 Annexes

Principe de la chromatographie d'affinité

Cette technique permet de faire une séparation par affinité d'ordre biologique ou fonctionnel entre la molécule d'intérêt (protéine) et une composante de l'adsorbant (ligand).

Cette technique comporte trois grandes étapes (Figure) :

- Dans un premier temps, le ligand doit être fixé sur une matrice via un bras espaceur.
- Ensuite, l'étape d'adsorption consiste à mettre en présence un mélange contenant la molécule d'intérêt et la résine contenant le ligand, dans des conditions favorables à la liaison ligand-molécule spécifique. Les molécules n'ayant pas d'affinité pour le ligand ne se fixeront évidemment pas sur la résine et pourront être éluées, tandis que celles ayant une affinité y resteront attachées.
- Finalement, quand toutes les molécules sans affinité auront été complètement éliminées, on pourra procéder à la désorption des molécules restées attachées au ligand.

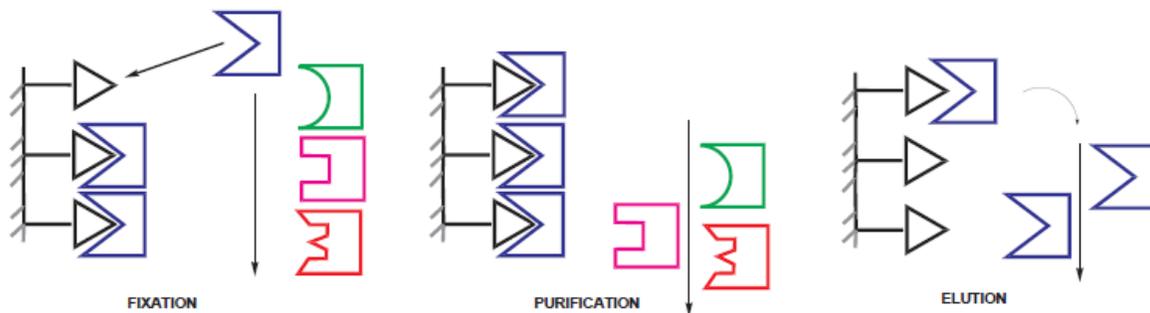


Figure : Principe de la chromatographie d'affinité.

Annexes

Afin que l'adsorption puisse avoir lieu, le bras espaceur doit posséder des propriétés adaptées :

- Il doit être suffisamment long pour ne pas provoquer de gêne stérique entre la matrice et la protéine.
- Il doit être suffisamment hydrophile pour éviter toute autoaggrégation. En effet, lors du passage du lysat cellulaire, donc en milieu aqueux, il faut éviter le repliement du bras espaceur.
- Il doit posséder un groupement terminal qui lui permet d'être fixé de façon covalente à la matrice.

Annexes

1. Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Nebigil, C. G.; Desaubry, L., Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chemistry & biology* **2013**, *20* (3), 316-31.
2. Tatsuta, T.; Model, K.; Langer, T., Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular biology of the cell* **2005**, *16* (1), 248-59.
3. Workman, P.; Collins, I., Probing the probes: fitness factors for small molecule tools. *Chemistry & biology* **2010**, *17* (6), 561-77.
4. Schreiber, S. L., Small molecules: the missing link in the central dogma. *Nature chemical biology* **2005**, *1* (2), 64-6.
5. Weiss, W. A.; Taylor, S. S.; Shokat, K. M., Recognizing and exploiting differences between RNAi and small-molecule inhibitors. *Nature chemical biology* **2007**, *3* (12), 739-44.
6. Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Nebigil, C.; Desaubry, L., Recent advances in the biology and chemistry of the flavaglines. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20* (6), 1857-64.
7. Basmadjian, C.; Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Desaubry, L., Flavaglines: potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase eIF4A. *Future medicinal chemistry* **2013**, *5* (18), 2185-97.
8. Gupta, S. V.; Sass, E. J.; Davis, M. E.; Edwards, R. B.; Lozanski, G.; Heerema, N. A.; Lehman, A.; Zhang, X.; Jarjoura, D.; Byrd, J. C.; Pan, L.; Chan, K. K.; Kinghorn, A. D.; Phelps, M. A.; Grever, M. R.; Lucas, D. M., Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *The AAPS journal* **2011**, *13* (3), 357-64.
9. Polier, G.; Neumann, J.; Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Gelhaus, C.; Schmidt, H.; Giaisi, M.; Kohler, R.; Muller, W. W.; Proksch, P.; Leippe, M.; Janssen, O.; Desaubry, L.; Krammer, P. H.; Li-Weber, M., The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chemistry & biology* **2012**, *19* (9), 1093-104.
10. Thuaud, F.; Bernard, Y.; Turkeri, G.; Dirr, R.; Aubert, G.; Cresteil, T.; Baguet, A.; Tomasetto, C.; Svitkin, Y.; Sonenberg, N.; Nebigil, C. G.; Desaubry, L., Synthetic analogue of rocaglaol displays a potent and selective cytotoxicity in cancer cells: involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52* (16), 5176-87.
11. Fahrig, T.; Gerlach, I.; Horvath, E., A synthetic derivative of the natural product rocaglaol is a potent inhibitor of cytokine-mediated signaling and shows neuroprotective activity in vitro and in animal models of Parkinson's disease and traumatic brain injury. *Molecular pharmacology* **2005**, *67* (5), 1544-55.
12. Bernard, Y.; Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Türkeri, G.; Dirr, R.; Boulberdaa, M.; Nebigil, C. G.; Désaubry, L., Flavaglines alleviate doxorubicin cardiotoxicity: implication of Hsp27. *PLoS one* **2011**, *6* (10), e25302.
13. Qureshi, R.; Yildirim, O.; Gasser, A.; Basmadjian, C.; Zhao, Q.; Wilmet, J.-P.; Désaubry, L.; Nebigil, C. G., FL3, a synthetic flavagline and ligand of prohibitins, protects cardiomyocytes via STAT3 from doxorubicin toxicity. *PLoS one* **2015**, *10* (11), e0141826.
14. Snyder, J. R.; Hall, A.; Ni-Komatsu, L.; Khersonsky, S. M.; Chang, Y. T.; Orlow, S. J., Dissection of melanogenesis with small molecules identifies prohibitin as a regulator. *Chemistry & biology* **2005**, *12* (4), 477-84.
15. Bettayeb, K.; Oumata, N.; Zhang, Y.; Luo, W.; Bustos, V.; Galons, H.; Greengard, P.; Meijer, L.; Flajolet, M., Small-molecule inducers of Abeta-42 peptide production share a common mechanism of action. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2012**, *26* (12), 5115-23.
16. Pomares, H.; Palmeri, C. M.; Iglesias-Serret, D.; Moncunill-Massaguer, C.; Saura-Esteller, J.; Núñez-Vázquez, S.; Gamundi, E.; Arnan, M.; Preciado, S.; Albericio, F., Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (40), 64987.

17. Perez-Perarnau, A.; Preciado, S.; Palmeri, C. M.; Moncunill-Massaguer, C.; Iglesias-Serret, D.; Gonzalez-Girones, D. M.; Miguel, M.; Karasawa, S.; Sakamoto, S.; Cosialls, A. M.; Rubio-Patino, C.; Saura-Esteller, J.; Ramon, R.; Caja, L.; Fabregat, I.; Pons, G.; Handa, H.; Albericio, F.; Gil, J.; Lavilla, R., A trifluorinated thiazoline scaffold leading to pro-apoptotic agents targeting prohibitins. *Angewandte Chemie* **2014**, *53* (38), 10150-4.
18. Seiji, M.; Shima, K.; Birbeck, M. S.; Fitzpatrick, T. B., Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1963**, *100*, 497-533.
19. Brown, D. A., Skin pigmentation enhancers. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2001**, *63* (1-3), 148-61.
20. Candelario-Jalil, E.; Alvarez, D.; Merino, N.; León, O. S., Delayed treatment with nimesulide reduces measures of oxidative stress following global ischemic brain injury in gerbils. *Neuroscience research* **2003**, *47* (2), 245-253.
21. Bennett, D. C.; Lamoreux, M. L., The color loci of mice--a genetic century. *Pigment cell research* **2003**, *16* (4), 333-44.
22. Im, S.; Moro, O.; Peng, F.; Medrano, E. E.; Cornelius, J.; Babcock, G.; Nordlund, J. J.; Abdel-Malek, Z. A., Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer research* **1998**, *58* (1), 47-54.
23. Slominski, A.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Wortsman, J., Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews* **2004**, *84* (4), 1155-228.
24. Kruithof, E.; Van den Bossche, V.; De Rycke, L.; Vandooren, B.; Joos, R.; Canete, J. D.; Tak, P. P.; Boots, A. M.; Veys, E. M.; Baeten, D., Distinct synovial immunopathologic characteristics of juvenile-onset spondylarthritis and other forms of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism* **2006**, *54* (8), 2594-604.
25. Goding, C. R., Melanocytes: the new Black. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2007**, *39* (2), 275-9.
26. Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Jung, S.-H., Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular signalling* **2017**.
27. Hodgkinson, C. A.; Moore, K. J.; Nakayama, A.; Steingrímsson, E.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Arnheiter, H., Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* **1993**, *74* (2), 395-404.
28. Hughes, M. J.; Lingrel, J.; Krakowsky, J.; Anderson, K., A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (28), 20687-20690.
29. Opdecamp, K.; Nakayama, A.; Nguyen, M.; Hodgkinson, C. A.; Pavan, W. J.; Arnheiter, H., Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development* **1997**, *124* (12), 2377-2386.
30. Yasumoto, K.-i.; Yokoyama, K.; Takahashi, K.; Tomita, Y.; Shibahara, S., Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (1), 503-509.
31. Hearing, V. J.; Tsukamoto, K., Enzymatic control of pigmentation in mammals. *The FASEB Journal* **1991**, *5* (14), 2902-2909.
32. Jimenez-Cervantes, C.; Solano, F.; Kobayashi, T.; Urabe, K.; Hearing, V. J.; Lozano, J. A.; Garcia-Borron, J. C., A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (27), 17993-18000.
33. Cooper, G. M., *La cellule: une approche moléculaire*. De Boeck Supérieur: 1999.
34. Cowley, S.; Paterson, H.; Kemp, P.; Marshall, C. J., Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **1994**, *77* (6), 841-852.

35. Marshall, C., Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **1995**, *80* (2), 179-185.
36. Englaro, W.; Bertolotto, C.; Brunet, A.; Pagès, G.; Ortonne, J.-P.; Ballotti, R., Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (16), 9966-9970.
37. Hemesath, T. J.; Price, E. R.; Takemoto, C.; Badalian, T.; Fisher, D. E., MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **1998**, *391* (6664), 298.
38. Kim, D.-S.; Kim, S.-Y.; Chung, J.-H.; Kim, K.-H.; Eun, H.-C.; Park, K.-C., Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cellular signalling* **2002**, *14* (9), 779-785.
39. Son, Y. O.; Lee, S. A.; Kim, S. S.; Jang, Y. S.; Chun, J. C.; Lee, J. C., Acteoside inhibits melanogenesis in B16F10 cells through ERK activation and tyrosinase down-regulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *63* (10), 1309-1319.
40. Drira, R.; Sakamoto, K., Sakuranetin induces melanogenesis in b16bl6 melanoma cells through inhibition of erk and pi3k/akt signaling pathways. *Phytotherapy Research* **2016**, *30* (6), 997-1002.
41. Fink, J. K.; Jones, S. M.; Esposito, C.; Wilkowski, J., Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: genomic organization, cDNA sequence, and developmental-and tissue-specific expression. *Genomics* **1996**, *35* (3), 577-585.
42. Yun, W. J.; Kim, E.-Y.; Park, J.-E.; Jo, S. Y.; Bang, S. H.; Chang, E.-J.; Chang, S. E., Microtubule-associated protein light chain 3 is involved in melanogenesis via regulation of MITF expression in melanocytes. *Scientific reports* **2016**, *6*, 19914.
43. Wei, Y.; Chiang, W.-C.; Sumpter, R.; Mishra, P.; Levine, B., Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. *Cell* **2017**, *168* (1), 224-238. e10.
44. Bang, S.; Won, K. H.; Moon, H. R.; Yoo, H.; Hong, A.; Song, Y.; Chang, S. E., Novel regulation of melanogenesis by adiponectin via the AMPK/CRTC pathway. *Pigment cell & melanoma research* **2017**, *30* (6), 553-557.
45. Ni-Komatsu, L.; Orlow, S. J., Identification of novel pigmentation modulators by chemical genetic screening. *The Journal of investigative dermatology* **2007**, *127* (7), 1585-92.
46. Chang, Y. T.; Moon, H. S.; Khersonsky, S. M., Triazine library with linkers. Google Patents: 2003.
47. Blotny, G., Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. *Tetrahedron* **2006**, *62* (41), 9507-9522.
48. Masquelin, T.; Meunier, N.; Gerber, F.; Rosse, G., Solution-and solid-phase synthesis of combinatorial libraries of trisubstituted 1, 3, 5-triazines. *Heterocycles* **1998**, *48* (12), 2489-2505.
49. Bork, J. T.; Lee, J. W.; Khersonsky, S. M.; Moon, H. S.; Chang, Y. T., Novel orthogonal strategy toward solid-phase synthesis of 1,3,5-substituted triazines. *Organic letters* **2003**, *5* (2), 117-20.
50. Reichenbacher, K.; Süß, H. I.; Stoeckli-Evans, H.; Bracco, S.; Sozzani, P.; Weber, E.; Hulliger, J., Modification of channel structures by fluorination. *New Journal of Chemistry* **2004**, *28* (3), 393-397.
51. Ghosh, A. K.; Kumaragurubaran, N.; Liu, C.; Devasamudram, T.; Lei, H.; Swanson, L.; Ankala, S.; Tang, J.; Bilcer, G., Compounds which inhibit beta-secretase activity and methods of use thereof. Google Patents: 2006.
52. Krayem, M.; Journe, F.; Wiedig, M.; Morandini, R.; Sales, F.; Awada, A.; Ghanem, G., Prominent role of cyclic adenosine monophosphate signalling pathway in the sensitivity of WTBRF/WTNRAS melanoma cells to vemurafenib. *European journal of cancer* **2014**, *50* (7), 1310-1320.
53. Cosialls, A. M.; Pomares, H.; Iglesias-Serret, D.; Saura-Esteller, J.; Núñez-Vázquez, S.; González-Gironès, D. M.; de la Banda, E.; Preciado, S.; Albericio, F.; Lavilla, R., The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through the upregulation of NOXA and synergizes with ibrutinib, AICAR or venetoclax. *haematologica* **2017**, haematol. 2016.162958.
54. Wierz, M.; Pierson, S.; Chouha, N.; Désaubry, L.; François, J.-H.; Berchem, G.; Paggetti, J.; Moussay, E., The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic

leukemia cells ex vivo but fails to prevent leukemia development in a murine model. *haematologica* **2018**, *103* (4), e154-e157.

55. Slade, L.; Pulinilkunnil, T., The MiTF/TFE family of transcription factors: master regulators of organelle signaling, metabolism and stress adaptation. *Molecular Cancer Research* **2017**, molcanres. 0320.2017.

56. Wu, M.; Hemesath, T. J.; Takemoto, C. M.; Horstmann, M. A.; Wells, A. G.; Price, E. R.; Fisher, D. Z.; Fisher, D. E., c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes & development* **2000**, *14* (3), 301-312.

57. Khaled, M.; Larribere, L.; Bille, K.; Aberdam, E.; Ortonne, J. P.; Ballotti, R.; Bertolotto, C., Glycogen synthase kinase 3b is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **2002**.

58. Aude, S. R.; Xu, Y. X. Z.; Mishra, S., Prohibitin: a potential therapeutic target in tyrosine kinase signaling. *Signal transduction and targeted therapy* **2017**, *2*, 17059.

59. Peng, Y.-T.; Chen, P.; Ouyang, R.-Y.; Song, L., Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis* **2015**, *20* (9), 1135-1149.

60. Sato, S.-i.; Murata, A.; Orihara, T.; Shirakawa, T.; Suenaga, K.; Kigoshi, H.; Uesugi, M., Marine natural product aurilide activates the OPA1-mediated apoptosis by binding to prohibitin. *Chemistry & biology* **2011**, *18* (1), 131-139.

61. Moncunill-Massaguer, C.; Saura-Esteller, J.; Perez-Perarnau, A.; Palmeri, C. M.; Nunez-Vazquez, S.; Cosialls, A. M.; Gonzalez-Girones, D. M.; Pomares, H.; Korwitz, A.; Preciado, S.; Albericio, F.; Lavilla, R.; Pons, G.; Langer, T.; Iglesias-Serret, D.; Gil, J., A novel prohibitin-binding compound induces the mitochondrial apoptotic pathway through NOXA and BIM upregulation. *Oncotarget* **2015**, *6* (39), 41750-65.

62. Pomares, H.; Palmeri, C. M.; Iglesias-Serret, D.; Moncunill-Massaguer, C.; Saura-Esteller, J.; Nunez-Vazquez, S.; Gamundi, E.; Arnan, M.; Preciado, S.; Albericio, F.; Lavilla, R.; Pons, G.; Gonzalez-Barca, E. M.; Cosialls, A. M.; Gil, J., Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (40), 64987-65000.

63. Pérez-Perarnau, A.; Preciado, S.; Palmeri, C. M.; Moncunill-Massaguer, C.; Iglesias-Serret, D.; González-Gironès, D. M.; Miguel, M.; Karasawa, S.; Sakamoto, S.; Cosialls, A. M., A Trifluorinated Thiazoline Scaffold Leading to Pro-apoptotic Agents Targeting Prohibitins. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (38), 10314-10318.

64. Yurugi, H.; Marini, F.; Weber, C.; David, K.; Zhao, Q.; Binder, H.; Désaubry, L.; Rajalingam, K., Targeting prohibitins with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours. *Oncogene* **2017**, *36* (33), 4778.

65. Tortelli, T. C.; Junior, L. M. F. d. G.; de Souza, G. A.; Bonatto, D.; Otake, A. H.; de Freitas Saito, R.; Rosa, J. C.; Greene, L. J.; Chammas, R., Accumulation of prohibitin is a common cellular response to different stressing stimuli and protects melanoma cells from ER stress and chemotherapy-induced cell death. *Oncotarget* **2017**, *8* (26), 43114.

66. Choi, D.; Lee, S.; Hong, S.; Kim, I.; Kang, S., Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene* **2008**, *27* (12), 1716.

67. Wang, S.; Zhang, B.; Faller, D. V., Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *The EMBO Journal* **2002**, *21* (12), 3019-3028.

68. Rajalingam, K.; Rudel, T., Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell cycle* **2005**, *4* (11), 1503-1505.

69. Rajalingam, K.; Wunder, C.; Brinkmann, V.; Churin, Y.; Hekman, M.; Sievers, C.; Rapp, U. R.; Rudel, T., Prohibitin is required for Ras-induced Raf–MEK–ERK activation and epithelial cell migration. *Nature cell biology* **2005**, *7* (8), 837.

70. Wintachai, P.; Thuaud, F.; Basmadjian, C.; Roytrakul, S.; Ubol, S.; Désaubry, L.; Smith, D. R., Assessment of flavaglines as potential chikungunya virus entry inhibitors. *Microbiology and immunology* **2015**, *59* (3), 129-141.
71. Han, J.; Zhao, Q.; Basmadjian, C.; Désaubry, L.; Theiss, A. L., Flavaglines ameliorate experimental colitis and protect against intestinal epithelial cell apoptosis and mitochondrial dysfunction. *Inflammatory bowel diseases* **2015**, *22* (1), 55-67.
72. Blanchard, M. G.; de Baaij, J. H.; Verkaart, S. A.; Lameris, A. L.; Basmadjian, C.; Zhao, Q.; Désaubry, L.; Bindels, R. J.; Hoenderop, J. G., Flavaglines stimulate transient receptor potential melastatin type 6 (TRPM6) channel activity. *PloS one* **2015**, *10* (3), e0119028.
73. Chang, S.-Y.; Bae, S. J.; Lee, M. Y.; Baek, S.-h.; Chang, S.; Kim, S. H., Chemical affinity matrix-based identification of prohibitin as a binding protein to anti-resorptive sulfonyl amidine compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21* (2), 727-729.
74. Li, A.; Yang, L.; Geng, X.; Peng, X.; Lu, T.; Deng, Y.; Dong, Y., Rocaglamide-A Potentiates Osteoblast Differentiation by Inhibiting NF- κ B Signaling. *Molecules and cells* **2015**, *38* (11), 941.

Résumé

Les Prohibitines 1 et 2 (PHB1 / 2) sont des protéines d'échafaudage impliquées à la fois dans la mélanogénèse et dans les voies oncogènes.

Nous avons proposé l'hypothèse qu'un ligand de PHB1- mélanogénine, pourrait avoir des effets anticancéreux en plus de son activité mélanogénique connue dans les mélanocytes. Ici, nous décrivons une synthèse commode de mélanogénine et ses analogues.

Nous avons constaté que, parmi les 57 nouveaux analogues de la mélanogénine synthétisés, deux analogues (Mel9 et Mel41) induisent significativement la mélanogénèse dans les mélanocytes en activant l'une des protéines qui interagissent avec PHB2, à savoir les microtubules protéine légère associée 3 (LC3), et régulant positivement l'expression de la microphthalmie associée facteur de transcription (MITF). Ces analogues activent également ERK.

Nous avons découvert que la mélanogénine et ses analogues actifs induisent l'apoptose dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses, y compris les cellules de mélanome. Nos découvertes présentent une nouvelle fonction supposée pour les PHB en tant que régulateurs de la signalisation mélanogénique LC3 / ERK / MITF, et suggèrent que Mel9 et Mel41 pourraient servir de base au développement de nouveaux médicaments candidats pour traiter mélanome et autres types de cancers.

Abstract :

Prohibitins 1 and 2 (PHB1/2) are scaffold proteins that are involved in both melanogenesis and oncogenic pathways. We hypothesized that a PHB1 ligand, melanogenin, may display anti-cancer effects in addition to its known melanogenic activity in melanocytes. Here, we disclose a convenient synthesis of melanogenin, and its analogs. We found that, among 57 new melanogenin analogs, two (Mel9 and Mel41) significantly promoted both melanogenesis in melanocytes by activating one of the PHB2-interacting proteins, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), and upregulating the expression of microphthalmia associated transcription factor (MITF). These analogs also activate ERK. Besides, in addition to their promelanogenic activities, we uncovered that melanogenin and its active analogs induce apoptosis in several cancer cell lines, including melanoma cells, and that this effect is caused by an inhibition of AKT survival pathway. Our findings present a new putative function for PHBs as regulators of LC3/ERK/MITF melanogenic signaling, and suggest that Mel9 and Mel41 may provide the basis for the development of new drugs candidates to treat melanoma and other types of cancers.

ملخص:

Prohibitins 1 و 2 (PHB1 / 2) هي بروتين سقالة تشارك في كل من الميلانوجينيز ومسارات أنجين. افترضنا أنه يمكن أن يكون رابط بروتين PHB1-melanogenin سبب تأثيرات مضادة للسرطان بالإضافة إلى نشاطه الميلانوجين المعروف في الخلايا الصباغية. نحن هنا نصف توليف مريحة من الميلانوجين ونظائرها. لقد لاحظنا أن من بين 57 نظائر جديدة توليفها البروتين mélanogénine نظيران (Mel9) و (Mel41) حيث تؤدي استحداث كبير للميلانوجينيز في الخلايا الصباغية من خلال تفعيل واحد من البروتينات التي تتفاعل مع PHB2 ، بمعنى أنابيب بروتين خفيفة المربوطة بـ 3 (LC3) ، والتنظيم الإيجابي للتعبير عن الميكروفتالمي المرتبط بعامل النسخ (MITF) ، هذه النظائر تنشط أيضا ERK.

لقد اكتشفنا أن الميلانوجين ونظائرها النشطة تحرض على موت الخلايا المبرمج في العديد من مجموعات الخلايا السرطانية ، بما في ذلك خلايا الميلانوم. اكتشافاتنا احتواء وظيفة جديدة لـ PHB كمنظم لإرسال الإشارات الميلانوجينية LC3 / ERK / MITF ، و تقترح بأن Mel9 و Mel41 يمكن أن تكون أساسا لتطور أدوية جديدة مرشحة لعلاج سرطان الجلد وغيرها من أنواع السرطان.