

Université de Sherbrooke

Conception, synthèse et caractérisation biologique d'inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase

Par
Éloïc Colombo
Département de pharmacologie et physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiæ doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier 2016

Membres du jury d'évaluation:

Pr Éric Marsault,
Département de pharmacologie et physiologie, Université de Sherbrooke

Pr Richard Leduc,
Département de pharmacologie et physiologie, Université de Sherbrooke

Pr Michel Granbois,
Département de pharmacologie et physiologie, Université de Sherbrooke

Pr Martin Bisailon,
Département de biochimie, Université de Sherbrooke

Pr Donald Poirier,
Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval

© Éloïc Colombo, 2016

*À ma défunte tante Josette Colombo, mes parents et à tous les autres membres de
ma famille à qui ma réussite tient à coeur...*

«Two présé pa fè jou ouvè...»

RÉSUMÉ

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase

Par

Éloïc Colombo

Département de pharmacologie et physiologie

Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention de grade de *philosophiae doctor* (Ph.D) en pharmacologie

La matriptase est une enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine transmembranaires de type II (TTSPs) et joue un rôle physiologique important dans l'homéostasie des tissus épithéliaux. Elle représente l'une des TTSPs les plus étudiées, car elle est impliquée dans le développement de plusieurs maladies telles que les cancers, l'arthrite et l'influenza. L'implication de la matriptase dans ces maladies suggère que cette dernière représente une cible thérapeutique intéressante pour le développement d'outils pharmacologiques et de nouveaux agents thérapeutiques. L'objectif principal des travaux présentés dans cette thèse vise à développer des inhibiteurs spécifiques de la matriptase afin d'évaluer son potentiel thérapeutique pour le traitement de l'influenza.

Nous rapportons ici l'identification d'une nouvelle classe d'inhibiteurs peptidomimétiques puissants de la matriptase. Nous avons démontré que le composé R-Q-A-R-Kbt (IN-1) basé sur la séquence d'autoactivation (P4-P'4) R-Q-A-R⁶¹⁴↓V⁶¹⁵V-G-G de la matriptase, à laquelle a été ajouté un piège à sérine, le cétobenzothiazole (Kbt), constitue une classe d'inhibiteurs lents à liaison forte (*slow tight binding*) de la matriptase. Des études de Relation Structure-Activité (RSA) ont mené à la découverte de plus d'une cinquantaine d'inhibiteurs puissants de la matriptase, possédant des acides aminés naturels et non naturels. Certains de ces inhibiteurs ont montré une sélectivité élevée pour la matriptase par rapport à d'autres protéases à sérine (thrombine, furine et trypsine), y compris par rapport à d'autres TTSPs (matriptase-2, HAT et DESC1). L'étude de modèles moléculaires a permis de rationaliser la RSA et d'émettre des hypothèses sur les interactions clés entre ces inhibiteurs et la matriptase.

Dans le cadre d'une éventuelle application thérapeutique pour le traitement de l'influenza, nous avons également démontré que ces inhibiteurs sont efficaces pour bloquer la réplication des virus grippaux de sous-types H1 et H3 dans les cellules épithéliales respiratoires humaines. Nous avons pu observer qu'une meilleure stabilité des molécules possédant des acides aminés non naturels à l'extrémité N-terminale permet d'améliorer l'inhibition de la réplication des virus. De plus, la caractérisation du potentiel de IN-1 *in vivo* a révélé que ce térapeptide réduit de manière significative la morbidité et les titres viraux dans un modèle murin d'influenza H1N1 et ne présente pas de toxicité cellulaire ou tissulaire notables sur l'épithélium pulmonaire.

Mots clés: TTSPs, matriptase, inhibiteur peptidomimétique à liaison forte, sélectivité, anti-influenza

SUMMARY

Design, synthesis and biological evaluation of peptidomimetic inhibitors of matriptase

By

Éloïc Colombo

Department of pharmacology and physiology

University of Sherbrooke

Thesis presented to the faculty of medicine and health sciences for the obtention of the degree of *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) in pharmacology

Matriptase is an enzyme that belongs to the type II transmembrane serine protease family (TTSPs) and plays an important physiological role in the homeostasis of epithelial tissues. It represents one of the most studied TTSPs because it is involved in the development of several diseases such as cancers, arthritis and influenza. The implication of matriptase in these diseases suggests that it is a potential therapeutic target for the development of new drugs. The main objective of the work presented in this thesis is to develop potent and specific matriptase inhibitors and to evaluate their therapeutic potential as anti-influenza treatment.

Herein, we report the identification of a new class of potent peptidomimetic inhibitors of matriptase. We demonstrated that the compound R-Q-A-R-Kbt (IN-1), designed based on the autoactivation sequence (P4-P'4) R-Q-A-R⁶¹⁴↓V⁶¹⁵V-G-G of matriptase, to which was added a serine trap in the form of a ketobenzothiazole (Kbt), can be used to design slow tight binding inhibitors. Studies of the Structure-Activity Relationship (SAR) led to the discovery of >50 highly potent inhibitors bearing natural and unnatural amino acids. Several of these inhibitors showed a high specificity for matriptase vs other serine proteases (thrombin, furin and trypsin), including TTSPs (matriptase-2, HAT and DESC1). Molecular modeling studies helped rationalize the SAR and identified key interactions between the inhibitors and matriptase.

In the context of a possible therapeutic application in the treatment of influenza, we have also shown that these compounds are efficacious in blocking the replication of influenza A virus subtypes H1 and H3 in human respiratory epithelial cells. We observed that molecules made more stable with the help of unnatural amino acids at the N-terminal, improved efficacy to reduce influenza virus replication. The characterization of the potential of IN-1 *in vivo* indicated that it significantly reduces morbidity and viral titers in a mouse model of influenza H1N1. In addition, IN-1 did not exhibit significant cellular or tissue toxicity to the lung epithelium.

Keywords: TTSPs, matriptase, slow tight binding peptidomimetic inhibitors, specificity, anti-influenza

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	V
SUMMARY	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SCHÉMAS	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION	1
1.1 Les protéases et leur potentiel thérapeutique	1
1.2 Les protéases à sérine	4
1.2.1 Mécanisme d'action des protéases à sérine.....	4
1.2.2 Stratégie de développement d'inhibiteurs de protéases à sérine	5
1.3 Les protéases à sérine trans membranaires de type II	10
1.3.1 Fonctions physiologiques des TTSPs	13
1.3.2 Fonctions pathophysiologiques des TTSPs.....	15
1.4 La matriptase	23
1.4.1 Expression et activité protéolytique	23
1.4.2 Rôles physiologiques.....	26
1.4.3 Implications pathologiques.....	29
1.5 Les inhibiteurs naturels de la matriptase	31
1.5.1 Inhibiteurs endogènes	31
1.5.2 Anticorps monoclonaux.....	33
1.5.3 Inhibiteurs d'origine bactérienne et végétale	33
1.6 Les inhibiteurs synthétiques de la matriptase	36
1.6.1 Dérivés de la benzamidine.....	36

1.6.2	Peptides cycliques analogues du SFTI-1	37
1.6.3	Peptides dérivés de eglin C	39
1.6.4	CVS-3983	40
1.6.5	Dérivés d'amidinophénylalanine sulfonylés	41
1.7	Projet de recherche	46
1.7.1	Problématique/Hypothèse	46
1.7.2	Objectifs	47
CHAPITRE 1. DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX INHIBITEURS PEPTIDOMIMÉTIQUES DE LA MATRIPTASE.....		48
2.1	Article. Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Matriptase.....	48
2.1.1	Abstract.....	49
2.1.2	Introduction	49
2.1.3	Results and discussion.....	51
2.1.4	Conclusion.....	59
2.1.5	Experimental procedures-Supporting information.....	59
2.1.6	Acknowledgment.....	88
CHAPITRE 2. OPTIMISATION D'INHIBITEURS PEPTIDOMIMÉTIQUES DE LA MATRIPTASE		89
3.1	Procédures expérimentales	91
3.1.1	Matériels	91
3.1.2	Méthodes	93
3.2	Résultats.....	107
3.2.1	Synthèse de mimétiques d'arginine aux positions P1 et P4	107
3.2.2	Synthèse des tripeptides sur support solide	109
3.2.3	Synthèse de peptides <i>N</i> -méthylés sur support solide.....	110
3.2.4	Synthèse de tripeptides modifiés à l'extrémité N-terminale	112
3.2.5	Synthèse des produits finaux.....	113

3.2.6	Étude de la RSA des composés de première et seconde générations	115
3.2.7	Étude de la RSA des composés de troisième génération.....	119
3.2.8	Étude de la RSA des composés de la quatrième génération.....	122
3.2.9	Étude de la RSA des composés de la cinquième génération.....	124
3.2.10	Sélectivité matriptase vs matriptase-2	126
3.2.11	Sélectivité matriptase vs d'autres protéases à sérine	129
CHAPITRE 3. DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX AGENTS THÉRAPEUTIQUES ANTI-INFLUENZA.....		131
4.1	Procédures expérimentales	132
4.1.1	Matériels	132
4.1.2	Méthodes	133
4.2	Résultats.....	138
4.2.1	Inhibition de la réplication virale dans les cellules Calu-3.....	138
4.2.2	Inhibition des TTSPs impliquées dans l'influenza	145
4.2.3	Stabilité des composés dans les milieux d'essais biologique	146
4.2.4	Stabilité des composés en présence des cellules Calu-3	148
4.2.5	Étude de la toxicité des composés	152
4.2.6	Potentiel de IN-1 dans un modèle d'influenza <i>in vivo</i>	155
DISCUSSION.....		156
5.1	Conception et identification d'inhibiteurs de la matriptase	156
5.2	Profil de sélectivité des inhibiteurs de la matriptase	165
5.3	Découverte de nouveaux agents anti-influenza	170
CONCLUSION		175
REMERCIEMENTS		177
BIBLIOGRAPHIE		179
ANNEXE A		196
	Spectres RMN ¹H des produits intermédiaires.....	196

Spectres UV et MS des produits finaux	203
ANNEXE B.....	242
Brevet issus de ces travaux	242
Liste des publications issues de ces travaux	242
Liste des communications issues de ces travaux	243

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Preliminary SAR	55
Tableau 2. Selectivity profile	57
Tableau 3. Caractérisation des composés 32-40	104
Tableau 4. Caractérisation des composés 41-48	104
Tableau 5. Caractérisation des composés 49-55	104
Tableau 6. Caractérisation des composés 56-63	105
Tableau 7. Données de caractérisation des peptides 64-72	105
Tableau 8. Inhibition de la matriptase avec les composés 32-37	116
Tableau 9. Inhibition de la matriptase avec les composés 38-42	118
Tableau 10. Inhibition de la matriptase avec les composés 43-48	120
Tableau 11. Inhibition de la matriptase avec les composés 49-53	121
Tableau 12. Inhibition de la matriptase avec les composés 54-61	123
Tableau 13. Inhibition de la matriptase avec les composés 62-66	124
Tableau 14. Inhibition de la matriptase avec les composés 67-70	126
Tableau 15. Sélectivité matriptase vs matriptase-2	128
Tableau 16. Sélectivité matriptase vs thrombine et furine	129
Tableau 17. Condition analytique (c) du composé 41	134
Tableau 18. Condition analytique (d) du composé 51	135
Tableau 19. Condition analytique (f) des composés 44 et 51	135
Tableau 20. Inhibition de la réplication virale avec les composés 32-42	139
Tableau 21. Inhibition de la réplication virale avec les composés 43-53	141
Tableau 22. Inhibition de la réplication virale avec les composés 54-66	143
Tableau 23. Inhibition de la réplication virale avec les composés 67-70	144
Tableau 24. Inhibition des TTPS	145

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation d'une protéase liée à son substrat peptidique	2
Figure 2. Mécanisme catalytique des protéases	2
Figure 3. Distribution des cibles pharmacologiques des médicaments	3
Figure 4. Mécanisme catalytique des protéases à sérine	5
Figure 5. Inhibiteurs de protéases à sérine cliniquement approuvés par la FDA	7
Figure 6. État intermédiaire de la catalyse enzymatique des protéases à sérine	8
Figure 7. Exemple de groupes électrophiles utilisés comme piège à sérine	8
Figure 8. Structure des TTSPs	12
Figure 9. Matriptase-2 dans la régulation du métabolisme du fer	14
Figure 10. Structure du virus de l'influenza	18
Figure 11. Cycle de vie des virus	20
Figure 12. Clivage et activation de l'hémagglutinine	21
Figure 13. Matriptase et son inhibiteur endogène HAI-1	24
Figure 14. Processus de différenciation de l'épiderme	27
Figure 15. Structure de l'inhibiteur SFTI-1	34
Figure 16. Structure du complexe SFTI-1/matriptase	36
Figure 17. Structures des benzamidines	37
Figure 18. SFTI-1 et ses analogues	38
Figure 19. Eglin C et ses variantes	39
Figure 20. Le CVS-3983 et les inhibiteurs de calpain	41
Figure 21. La 3-amidinophénylalanine sulfonylée et ses dérivés en C-terminal	42
Figure 22. La 3-amidinophénylalanine sulfonylée et ses dérivés en N-terminal	43
Figure 23. Les autres dérivés de la 3-amidinophénylalanine sulfonylé	44
Figure 24. Chemical structure of inhibitor 1 (IN-1)	51
Figure 25. Dissociation of EI complex	54

Figure 26. Docking of IN-1 in the active site of matriptase	58
Figure 27. Modifications de IN-1 aux positions P4-P1	90
Figure 28. Épimérisation de IN-1 en position P1	147
Figure 29. Stabilité des composés 41 , 51 dans les milieux de culture	148
Figure 30. Stabilité des composés 44 et 51 en présence des cellules Calu-3	150
Figure 31. Stabilité des composés 1 , 33 , 37 , 39 et 51 dans l'homogénat de poumons	151
Figure 32. Cytotoxicité des composés	153
Figure 33. Toxicité <i>in vivo</i> de IN-1	154
Figure 34. Effet <i>in vivo</i> de IN-1 dans un modèle de souris infectées	155
Figure 35. Mécanisme proposé d'inhibition de IN-1	158
Figure 36. Interactions clés entre IN-1 et la matriptase	159
Figure 37. Arrimage des inhibiteurs 1 et 35 dans le site actif de la matriptase	160
Figure 38. Arrimage de l'inhibiteur 44 dans le site actif de la matriptase	162
Figure 39. Arrimage de l'inhibiteur 59 dans le site actif de la matriptase	163
Figure 40. Différence entre les poches de liaison S4-S1 de la matriptase et la matriptase-2	166
Figure 41. Différence entre les poches de liaison S4-S3 de la matriptase et la thrombine	169
Figure 42. Différence entre les poches de liaison S4-S3 de la matriptase et la furine	170

LISTE DES SCHÉMAS

Scheme 1. Synthesis of tripeptide 11	52
Scheme 2. Assembly of fragments 9 and 11	53
Schéma 3. Synthèse du désaminoarginine 16	107
Schéma 4. Synthèse de la β -hArg(Mtr)-Kbt 21	108
Schéma 5. Synthèse des intermédiaires tripeptides sur support solide	110
Schéma 6. Exemple de N-méthylation de peptides sur support solide en position P3	111
Schéma 7. Fonctionnalisation en N-terminal de peptides sur support solide	112
Schéma 8. Synthèse générale des tétrapeptides avec H-Arg(Pbf)-Hbt 9	114
Schéma 9. Synthèse du tétrapeptide 35 avec la β -hArg(Mtr)-Kbt 20	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α_1 -AT	α_1 -antitrypsin
α_1 -ACT	α_1 -antichymotrypsin
α_2 -AP	α_2 -antiplasmine
β hR	β -Homoarginine
Ala (A)	Alanine
AA	Acide aminé
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACN	Acétonitrile
AcCl	Chlorure d'acétyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AgOCOCF ₃	Trifluoracétate d'argent
AMC	<i>7-Amino-4-methyl-coumarine</i>
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>
ARIH	<i>Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis</i>
ARN	Acide ribonucléique
Asp (D)	Acide aspartique
AT III	<i>Antithrombin III</i>
Bip	Biphénylalanine
Boc	tert-Butoxycarbonyle
Bpa	Benzoylphénylalanine
BSA	Albumine de sérum bovine
<i>i</i> -BuOCOC1	Chloroformate d'isobutyle
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CH ₂ N ₂	Diazométhane

Cha	Cyclohexylalanine
CMK	<i>Chloromethylketone</i>
CUB	<i>C1r/C1s urchin embryonic growth factor, bone morphogenic protein 1</i>
Cys (C)	Cystéine
d	Doublet
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DIAD	Azodicarboxylate de diisopropyle
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D ₂ O	Oxyde de deutérium (eau deutérée)
DO	Densité optique
DPP-4	<i>Dipeptidyl peptidase-4</i>
Glu (E)	Acide glutamique
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
EDC	3-(Ethyliminométhyleamino)- <i>N,N</i> -diméthylpropan-1-amine
EMEM	<i>Eagle's Minimun Essential Medium</i>
EI	<i>Enzyme-Inhibitor complex</i>
éq	Équivalent(s)
Et ₂ NH	Diéthylamine
Et ₂ O	Éther diéthylique
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
Phe (F)	Phénylalanine
hPhe (hF)	Homophénylalanine
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
FU	Unités de fluorescence
Gln (Q)	Glutamine
Gly (G)	Glycine
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
h	Heure(s)
H ₂	Hydrogène
HA	Héماغglutinine
HAI	<i>Hepatocyte growth factor activator inhibitor</i>
HAT	<i>Human airway trypsin-like protease</i>
HATU	1-[bis(Diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxide hexafluorophosphate
HOBT	Hydroxybenzotriazole
HCl	Acide chlorhydrique
HCOOH	Acide formique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HF	Fluorure d'hydrogène
HgCl ₂	Chlorure de mercure
HGF/SF	<i>Hepatocyte growth factor/scatter factor</i>
HGF A	<i>Hepatocyte growth factor activator</i>
HN(Me)OMe	<i>N</i> -Méthoxyméthylamine
His (H)	Histidine
HJV	Hémojuvéline
hLys (hK)	Homolysine
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HOBT	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole
HRMS	<i>High Resonance Mass Spectrometry</i>
IN	Inhibitor

IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
Ile (I)	Isoleucine
IBX	Acide 2-iodoxybenzoïque
iPrOH	Isopropanol
IRIDA	<i>Iron-refractory iron deficiency anemia</i>
Lys (K)	Lysine
K _i	<i>Inhibition constant</i> , constante d'inhibition
Kbt	Cétobenzothiazole
KOH	Hydroxyde de potassium
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LDLRA	<i>Single low density lipoprotein receptor class A</i>
LDH	<i>Lactate deshydrogenase</i>
LiOH	Hydroxyde de lithium
LEKTI	<i>Lympho-epithelial-Kazal-Type related inhibitor</i>
m	Multiplet
MAM	<i>Meprin/A5 antigen/receptor protein phosphatase μ</i>
MDCK	<i>Mardin-Darby canine kidney</i>
MeOH	Méthanol
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MHz	Megahertz
min	Minutes
MMP	Matrix métalloprotéases
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
MOI	Multiplicity Of Infection
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MsCl	Chlorure de méthanesulfonyle
Mtr	4-Méthoxy-2,3,6-triméthylbenzène sulfonyle

MT-SP1	<i>Membrane-type serine-protease-1</i>
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NaBH ₄	Borohydrure de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
NA	Neuraminidase
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NP	Nucléoprotéine
Bn	Benzyle
<i>o</i> -NBSCl	Chlorure d'ortho-nitrobenzène sulfonyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
3Pal	3-Pyridylalanine
PA	Polymérase acide
PB	Polymérase basique
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyle
<i>PAI-1</i>	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAR-2	<i>Proteinase-activated receptor-2</i>
PB1	Polymérase basique 1
PB2	Polymérase basique 2
PBS	Tampon phosphate
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDB	<i>Protein data bank</i>

Pd/C	Palladium sur charbon
PF	Peptide de fusion
PFU	<i>Plaque forming units</i>
PhSO ₂ Cl	Chlorure de phénylsulfonyle
PhCOOH	Acide benzoïque
PPh ₃	Triphénylphosphine
P ₂ O ₅	Pentoxyde de phosphore
Pro (P)	Proline
pro-HGF/SF	<i>pro-Hepatocyte growth factor/scatter factor</i>
pro-uPA	<i>pro-urokinase Plasminogen</i>
Gln (Q)	Glutamine
r.t.	<i>Room temperature</i>
Arg (R)	Arginine
hArg (hR)	Homoarginine
RSA (SAR)	Relation Structure-Activité (<i>Structure Activity Relationship</i>)
s	Singulet
Ser (S)	Sérine
SEA	<i>Single sea urchin sperm protein, enteropeptidase, domain agrin</i>
SFTI-1	<i>Sunflower trypsin inhibitor-1</i>
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
SRCR	<i>Single scavenger receptor Cys-rich</i>
ST14	<i>Suppressor of tumorigenicity 14</i>
t	Triplet
tPA	<i>Tissue-type plasminogen activator</i>
TADG-15	<i>Tumor-associated differentially expressed gene-15</i>
TAPS	<i>[(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]-1-propanesulfonic acid, N [Tris(hydroxymethyl)methyl]- 3-aminopropanesulfonic acid</i>
TEA	Triéthylamine

TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofuranne
Thr (T)	Thréonine
tPa	<i>tissue-type Plasminogen activator</i>
Trp (W)	Tryptophane
Trt	Trityle
TTSP	<i>Type II Transmembrane Serine Protease</i>
uPAR	<i>urokinase Plasminogen receptor</i>
Val (V)	Valine
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Tyr (Y)	Tyrosine
Z (Cbz)	Carboxybenzyloxy

INTRODUCTION

1.1 LES PROTÉASES ET LEUR POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE

Les gènes codant pour les protéases représentent plus de 2 % du génome humain avec 561 membres. Le rôle des protéases est de cliver des substrats peptidiques ou protéiniques, et elles sont catégorisées en 5 grandes classes basé sur leur mécanisme catalytique: les métalloprotéases, les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases à thréonine, et les protéases à aspartate (Puente *et al.*, 2003), (Rawlings *et al.*, 2006). Les protéases clivent spécifiquement leurs substrats polypeptidiques respectifs au niveau de l'extrémité N-terminale (aminopeptidase), de l'extrémité C-terminale (carboxypeptidase) ou au milieu de la séquence (endopeptidase) (Turk, 2006). Au niveau du site de clivage, la poche de liaison des protéases accommodant les séquences peptidiques du substrat est numérotée de chaque côté du lien scissile S1-S5 vers l'extrémité N-terminale et S'1-S'5 vers l'extrémité C-terminale, de même que pour les résidus des substrats P1-P5 et P'1-P'5 respectivement (Figure 1) (Turk, 2006). Le lien scissile est situé entre les résidus P1 et P'1. Les protéases clivent leurs substrats spécifiques selon différents mécanismes. Les protéases à sérine, cystéine et thréonine utilisent un nucléophile dans leur site actif (résidu Ser, Cys et Thr, respectivement) qui crée un lien covalent lors de la catalyse enzymatique selon un mécanisme dit à catalyse covalente. En revanche, les métalloprotéases et les protéases à aspartate hydrolysent les liaisons peptidiques sans la formation d'un lien covalent avec la protéase, grâce à l'utilisation d'une molécule d'eau hautement réactive via un mécanisme dit non-covalent (Figure 2) (Drag et Salvesen, 2010).

Les protéases jouent un rôle essentiel dans une grande variété de processus biologiques, incluant la maturation des protéines, la digestion alimentaire et le remodelage des tissus (Turk, 2006). Toutefois, elles sont également impliquées dans de nombreuses maladies et représentent donc des cibles potentielles très intéressantes pour la découverte de nouveaux médicaments (Drag et Salvesen, 2010). D'ailleurs, sur les 113 médicaments approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) de 1999 à 2013, 11 médicaments ont comme cibles les protéases (10%), 9 les kinases (8%) et 26 d'autres enzymes (23%) (Figure 3) (Eder *et al.*, 2014).

Figure 1. Représentation d'une protéase liée à son substrat peptidique.

Les poches de liaison des protéases sont numérotées de chaque côté du lien scissile, S1-S5 vers l'extrémité N-terminale et S'1-S'5 vers l'extrémité C-terminale. La nomenclature des résidus des substrats est notée P1-P5 du côté N-terminal et P'1-P'5 du côté C-terminal. Figure inspirée de (Turk, 2006).

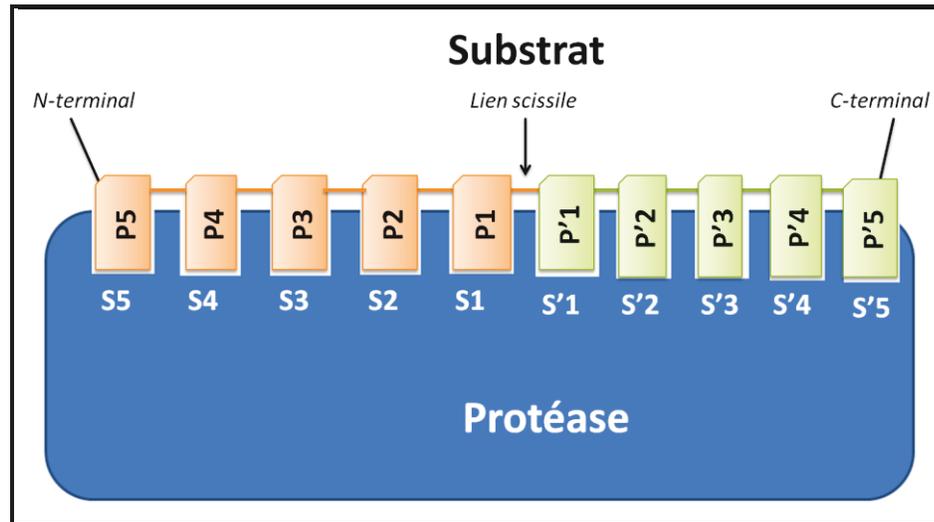


Figure 2. Mécanisme catalytique des protéases.

Les protéases dites à catalyse covalente créent un lien covalent avec le nucléophile (Nu) du site actif de l'enzyme (A), contrairement aux protéases dites à catalyse non-covalente (B). Figure modifié de (Drag et Salvesen, 2010).

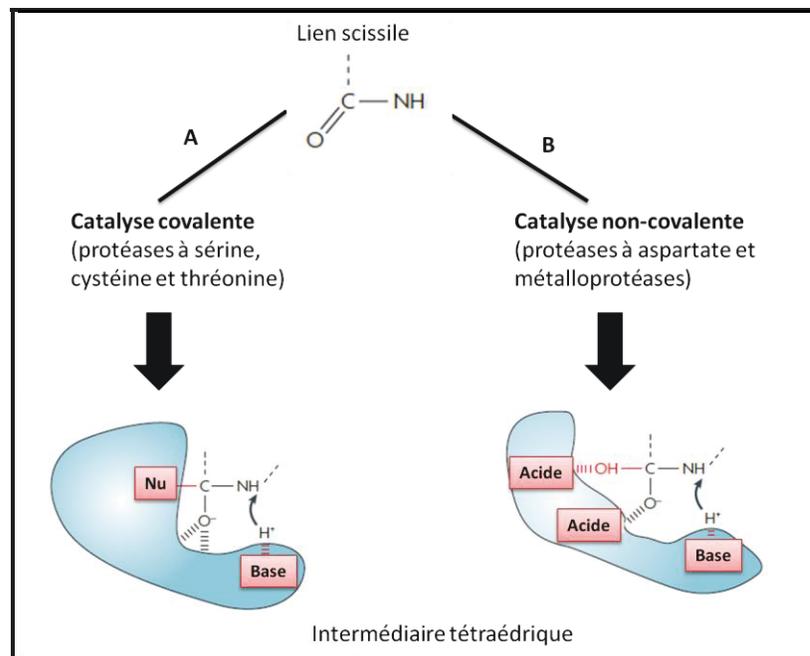
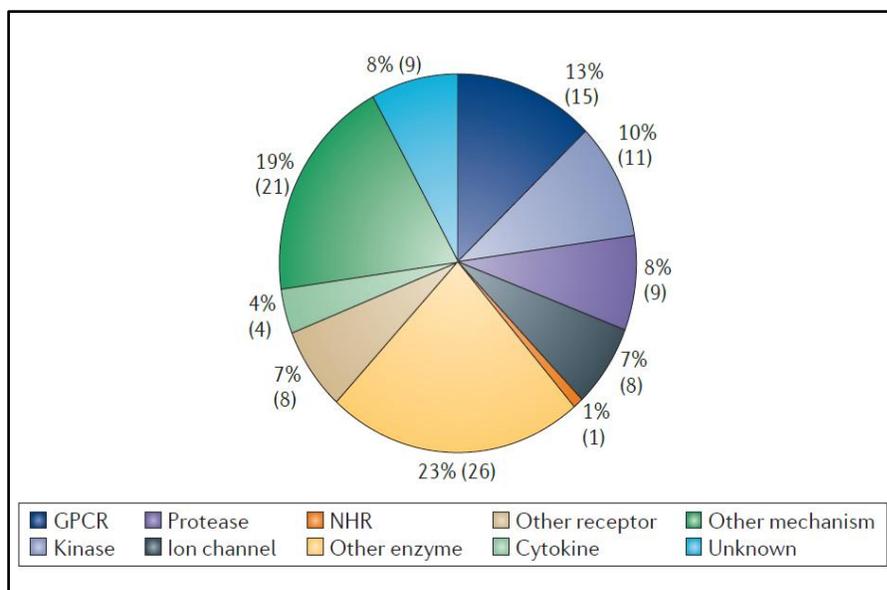


Figure 3. Distribution des cibles pharmacologiques des médicaments.

Les protéases, les kinases, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), les canaux ioniques représentent les principales cibles pharmacologiques des médicaments (Eder *et al.*, 2014).



Par exemple, l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), le captopril (Lopril[®]), a été approuvé par la FDA en 1981 pour le traitement de l'hypertension (Smith et Vane, 2003). En 1996, le ritonavir (Kaletra[®]), inhibiteur de la protéase du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), a été approuvé pour traiter les personnes atteintes du virus du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Flexner *et al.*, 2005). Depuis 2003, le bortézomib (Velcade[®]), inhibiteur du protéasome 26S, est prescrit pour le traitement du myélome multiple (Adams et Kauffman, 2004). Le développement de ces inhibiteurs de protéases a conduit à la découverte de nouveaux médicaments essentiels pour combattre une grande variété de maladies. Toutes ces découvertes démontrent le potentiel des protéases comme cibles pharmacologiques pour le développement d'agents thérapeutiques.

1.2 LES PROTÉASES À SÉRINE

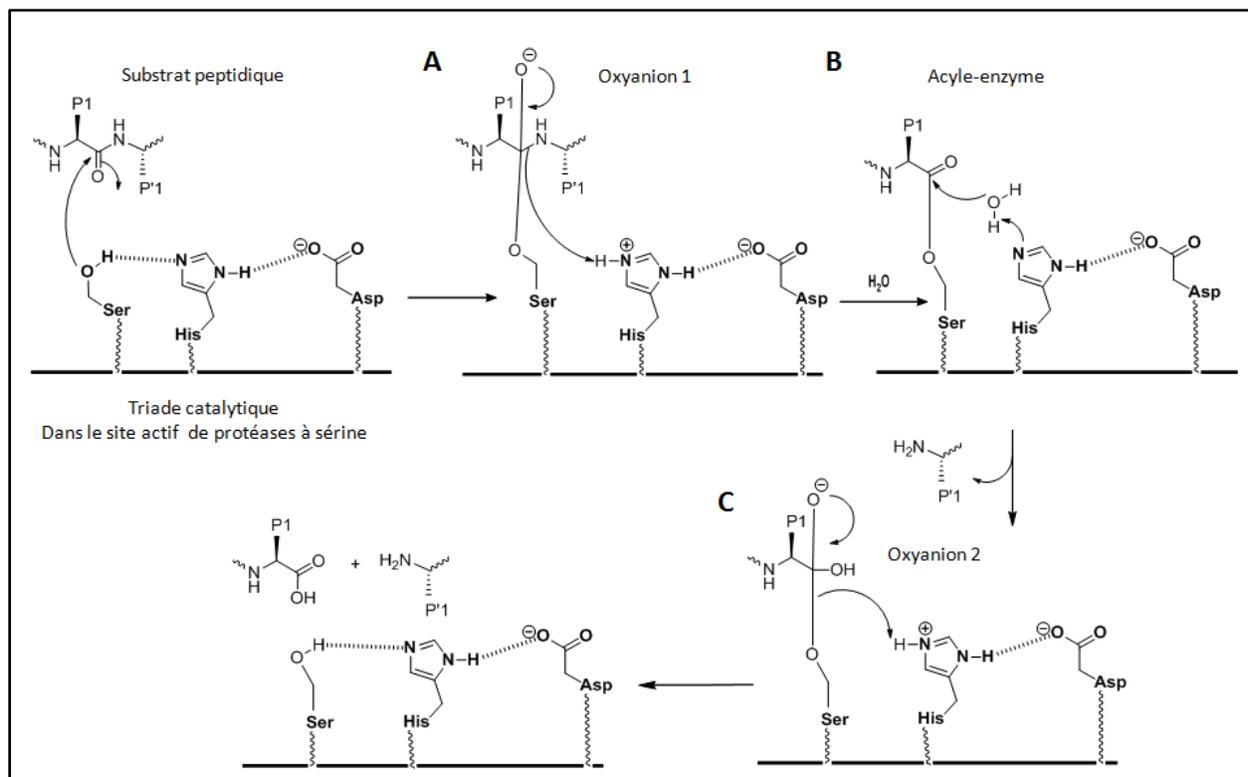
Avec 176 membres identifiés et caractérisés chez l'humain, les protéases à sérine représentent l'une des plus grandes classes de protéases (Puente *et al.*, 2003). Les protéases à sérine sont exprimées dans une variété de tissus où elles ont diverses fonctions physiologiques, comme la coagulation sanguine, la cicatrisation, la digestion et la réponse immunitaire (Hedstrom, 2002). Elles sont également impliquées dans le développement de maladies infectieuses, cardiovasculaires, dégénératives, inflammatoires et les cancers (Lopez *et al.*, 2007). Selon leur spécificité de substrat, les protéases à sérine se divisent en quatre sous-familles : trypsine, chymotrypsine, élastase et subtilisine (Rawlings *et al.*, 2006). La sous-famille trypsine clive préférentiellement les substrats contenant en position P1 des acides aminés basiques (Arg ou Lys) tandis que les sous-familles chymotrypsine, élastase et subtilisine ont une préférence pour les acides aminés hydrophobes (Di Cera, 2009).

1.2.1 Mécanisme d'action des protéases à sérine

Les protéases à sérine sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine dans leur site actif appartenant à la triade catalytique. Cette triade catalytique, hautement conservée dans toutes les protéases à sérine, est composée de trois acides aminés : Ser, His et Asp qui sont essentiels pour la catalyse enzymatique (Polgár, 2005). D'un point de vue mécanistique, c'est la fonction hydroxyle du résidu Ser, assistée par le résidu His comme base, qui joue le rôle de nucléophile et attaque le lien carboxamide scissile (P1-P1') du substrat polypeptidique pour donner l'intermédiaire tétraédrique (Figure 4A). Cet intermédiaire tétraédrique est transformé en acyle-enzyme par catalyse acide grâce au résidu His, assisté par le résidu Asp, du site actif (Figure 4B). Le lien enzyme-substrat est hydrolysé par une molécule d'eau via un intermédiaire tétraédrique permettant la formation du produit sous forme d'acide carboxylique et la régénération de l'enzyme active (Figure 4C). La décomposition de cet intermédiaire tétraédrique conduit à la formation du produit carboxylique et de l'enzyme active (Figure 4C) (Hedstrom, 2002). Toutes les protéases à sérine ont en commun ce type de mécanisme catalytique pour effectuer le clivage de leurs substrats spécifiques.

Figure 4. Mécanisme catalytique des protéases à sérine.

(A) Le groupement hydroxyle du résidu Ser du site actif attaque le lien carboxamide scissile pour conduire à un intermédiaire tétraédrique, l'oxyanion 1; (B) Cet intermédiaire tétraédrique se transforme en acyle-enzyme qui, en présence d'une molécule d'eau, conduit à la formation d'un deuxième oxyanion 2; (C) Cet oxyanion 2, une fois hydrolysé, permet la formation de l'acide carboxylique et la régénération du résidu Ser du site actif (Hedstrom, 2002).



1.2.2 Stratégie de développement d'inhibiteurs de protéases à sérine

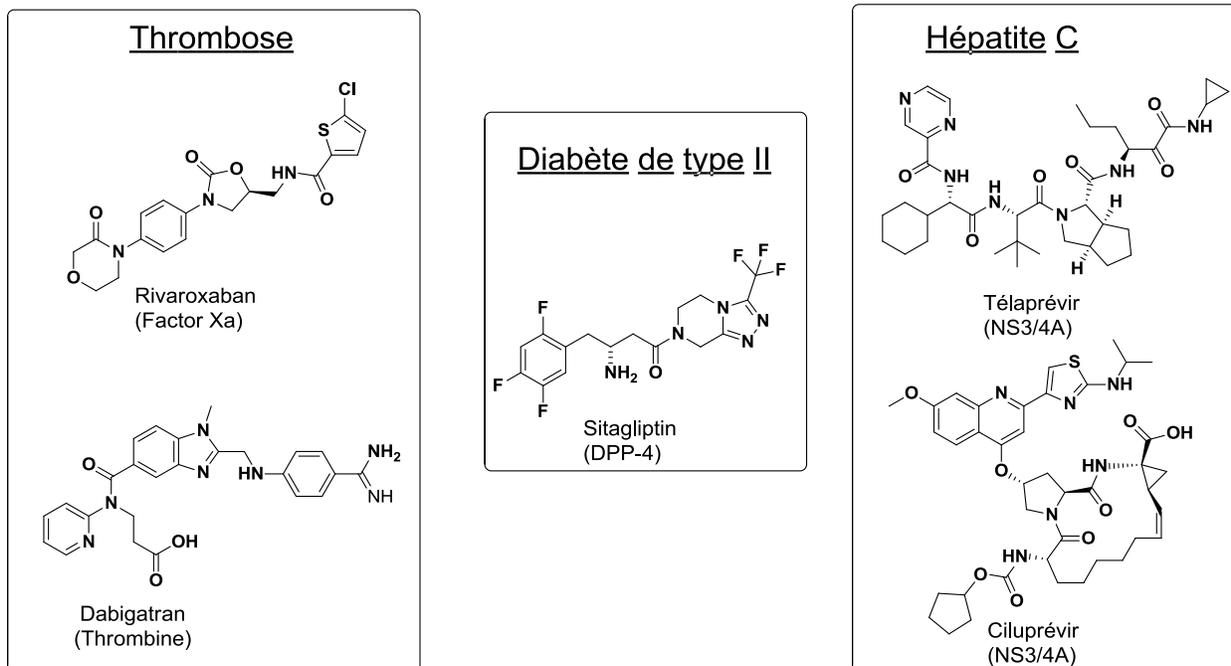
Un dérèglement de la fonction des protéases contribue au développement de nombreuses maladies. Les protéases sont donc considérées comme des cibles pharmacologiques très attrayantes pour la découverte de médicaments. En chimie médicinale, l'une des stratégies privilégiées pour cibler une enzyme est de développer des inhibiteurs spécifiques qui vont moduler l'activité de cette enzyme. Généralement, ce sont de petites molécules qui vont cibler soit le site actif de l'enzyme, soit un site allostérique (Drag et Salvesen, 2010). La conception et la synthèse d'inhibiteurs de protéases à sérine ont conduit à de nombreux médicaments approuvés pour une utilisation clinique (Figure 5). Par exemple, la thrombine et le facteur Xa sont des

protéases à sérine impliquées dans la régulation de la coagulation sanguine (Brummel *et al.*, 2002), (Shirk et Vlasuk, 2007). Toutefois, une activation anormale de ces protéases mène au développement de maladies associées à la coagulation sanguine, notamment la thrombose (Mackman, 2008).

Plusieurs stratégies ont été utilisées avec succès pour identifier des inhibiteurs de protéases à sérine (Copeland *et al.*, 2007) menant à la découverte de nouveaux médicaments telles que: l'exploration de mimétique de produits naturels, la conversion de substrats endogènes en inhibiteurs ou le criblage de bibliothèques de molécules. Des efforts considérables axés sur le développement de petites molécules bloquant sélectivement l'activité protéolytique de ces enzymes ont abouti au dabigatran et au rivaroxaban prescrits pour le traitement de la thrombose (Figure 5) (Kakar *et al.*, 2007) (Ericksson *et al.*, 2008). Le dabigatran (Pradaxa[®]) est un inhibiteur de type compétitif réversible de la thrombine avec une constante d'inhibition (K_i) de 4.5 nM, hautement sélectif, efficace par voie orale et disponible sous la forme de prodrogue, le *dabigatran etexilate* (Ericksson *et al.*, 2008). Le rivaroxaban (Xarelto[®]) est aussi un inhibiteur de type compétitif réversible, puissant et sélectif du facteur Xa avec un K_i de 0.4 nM (Perzborn *et al.*, 2010). La protéase à sérine DPP-4 joue un rôle important au niveau du diabète de type II via le clivage de l'incrétine GLP-1 (*glucagon like-peptide 1*), une protéine essentielle dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline et la fonction des cellules β du pancréas (Mentlein, 1999). DPP-4 est désignée comme cible thérapeutique contre le diabète de type II (Rosenblum et Kozarich, 2003). Son inhibition est réalisée à l'aide de plusieurs molécules synthétiques incluant le sitagliptin (Januvia[®]) (K_i 9 nM) (Figure 5), utilisé cliniquement (Kim *et al.*, 2005). Récemment, deux nouveaux médicaments, le télaprévir (Invicik[®]) (Figure 5) et le bocéprévir (Vitreli[®]) inhibant la protéase à sérine NS3/4A, ont été acceptés par la FDA pour traiter l'hépatite C (Njoroge *et al.* 2008).

Figure 5. Inhibiteurs de protéases à sérine approuvés cliniquement par la FDA.

Plusieurs inhibiteurs de protéases à sérine sont présentement utilisés pour traiter différentes maladies, tels que le rivaroxaban et le dabigatran (thrombose), le sitagliptin (diabète de type II), le ciluprévir et le télaprévir (hépatite C).



L'action de ces inhibiteurs de protéases est régie par différents mécanismes biochimiques. En effet beaucoup de médicaments ciblant les protéases s'associent à l'enzyme via des liaisons non covalentes (inhibiteurs réversibles) ou covalentes (inhibiteurs irréversibles). Toutefois, il existe une catégorie d'inhibiteurs intermédiaires qui se fixent à l'enzyme via la formation d'un lien covalent réversible. Une des approches courantes pour la conception d'inhibiteurs covalents dérive de leurs substrats peptidiques naturels dans lesquels la fonction amide au niveau du lien scissile est remplacée par un groupe électrophile. Le rôle de ce dernier est de piéger la fonction hydroxyle du résidu Ser, et qui peut inclure une fonction carbamate, urée, cétone, lactone ou lactame (Bachovchin et Cravatt, 2012). La principale raison de l'utilisation de ces électrophiles est que ces groupements chimiques réactifs appelés têtes actives (*warhead*) créent un lien covalent réversible ou irréversible avec le résidu Ser du site actif (Traube *et al.*, 2014). L'intermédiaire tétraédrique qui en découle passe par le même état de transition de l'hydrolyse du substrat illustré dans la figure 6. Un grand nombre d'inhibiteurs de protéases à sérine possédant des têtes actives et créant un lien covalent réversible avec l'enzyme ont été rapportés dans la

littérature (Walker et Lynas, 2001). Par exemple, les aldéhydes, les di-ou trifluorométhylcétones, les α -cétoacides, les α -cétohéterocyles, les α -cétoamides et les acides boroniques représentés dans la figure 7. Le bocéprévir et le télaprévir (Figure 5) en sont de parfaits exemples, qui confirment que l'utilisation de pièges à sérine, comme les α -cétoamides, sont très bien adaptés pour la conception d'agents thérapeutiques validés cliniquement.

Figure 6. État intermédiaire de la catalyse enzymatique des protéases à sérine.

L'hydroxyle du résidu Ser catalytique attaque au niveau du carbonyle du groupe électrophile pour conduire à l'état intermédiaire ou l'état de transition (A), qui est identique à l'état intermédiaire (B) formé lors de l'hydrolyse du substrat.

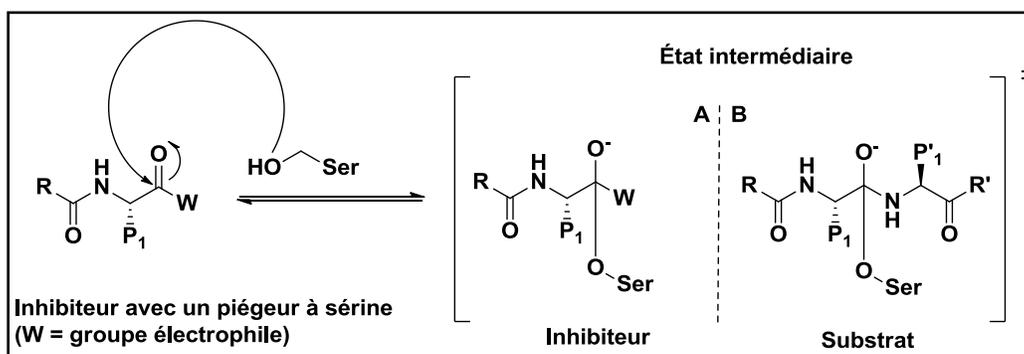
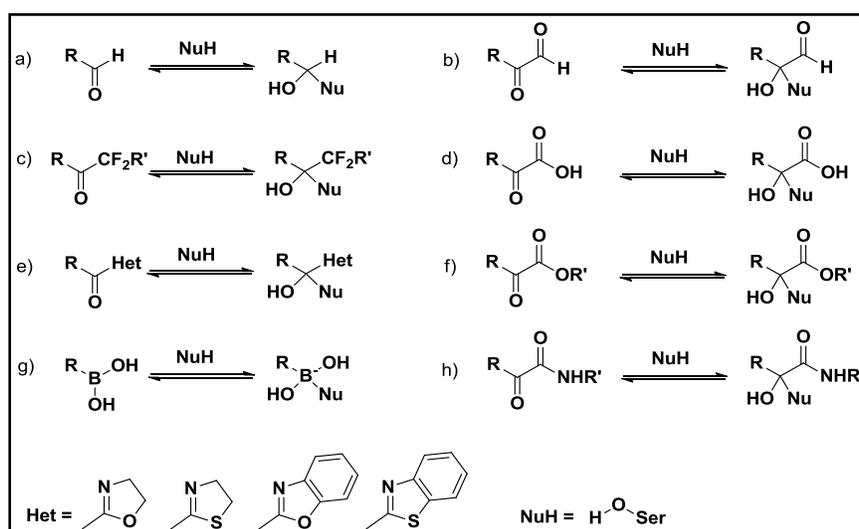


Figure 7. Exemple de groupes électrophiles utilisés comme piège à sérine.

Réaction entre la fonction hydroxyle du résidu sérine nucléophile et les pièges à sérine: a) aldéhyde, b) α -cétoaldéhyde, c) difluorométhylcétones, d) α -cétoacides, e) α -cétohéterocyles, f) α -cétoester, g) acide boronique, h) α -cétoamides.



En raison des risques de toxicité (réactions indésirables avec d'autres nucléophiles *in vivo*, génération de métabolites actives), des problèmes de stabilité chimique (racémisation du carbone en alpha du carbonyle au niveau du lien scissile de peptides), et une perte de spécificité (mécanisme catalytique identique), (Sanderson *et al.*, 1999), (Singh *et al.*, 1991), (Mah, *et al.*, 2014). Néanmoins, les inhibiteurs covalents avec une tête active affichent plusieurs avantages pharmacologiques par rapport aux inhibiteurs non covalents. Par exemple, le télaprévir ($K_i = 7$ nM) (Figure 5) ont été identifiés comme des inhibiteurs puissants de la protéase à sérine NS3/4A impliquée dans la réplication du virus de l'hépatite C (Flores *et al.*, 2009). Le ciluprévir se fixe à la protéase via des liaisons non-covalentes, tandis que le télaprévir se lie via la formation d'un lien covalent entre la sérine catalytique et le piège à sérine, α -cétoamides (tête active). Autre différence remarquable illustrée par l'étude du groupe de Corbau, le ciluprévir affiche une cinétique rapide de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur, caractérisée par une demi-vie de dissociation de 30 s (Flores *et al.*, 2009). Cette demi-vie de dissociation est directement reliée à un temps de résidence faible, suggérant qu'une dose élevée chez les patients est nécessaire pour obtenir une bonne efficacité biochimique. Par conséquent, cette forte concentration du médicament administré pourrait potentiellement augmenter les risques d'effets secondaires en raison du ciblage de protéines indésirables. À l'inverse, le télaprévir affiche un mode d'inhibition lent à forte liaison (*slow tight-binding*) résultant d'une inhibition covalente prolongée et réversible (Njoroge *et al.*, 2008). Ce type d'inhibition se caractérise par une cinétique lente du complexe enzyme-inhibiteur avec une demi-vie de dissociation de 58 min (Flores *et al.*, 2009), un temps de résidence plus élevé, évoquant qu'une faible concentration du médicament est requis pour que ce dernier ait une efficacité désirée. Ainsi, le risque d'effets secondaires est réduit lorsque le médicament est administré à faible concentration. Ces propriétés pharmacologiques d'une molécule sont souhaitables pour une application thérapeutique, et donc l'utilisation de tête active représente une stratégie intéressante pour la conception d'inhibiteurs de protéases à sérine.

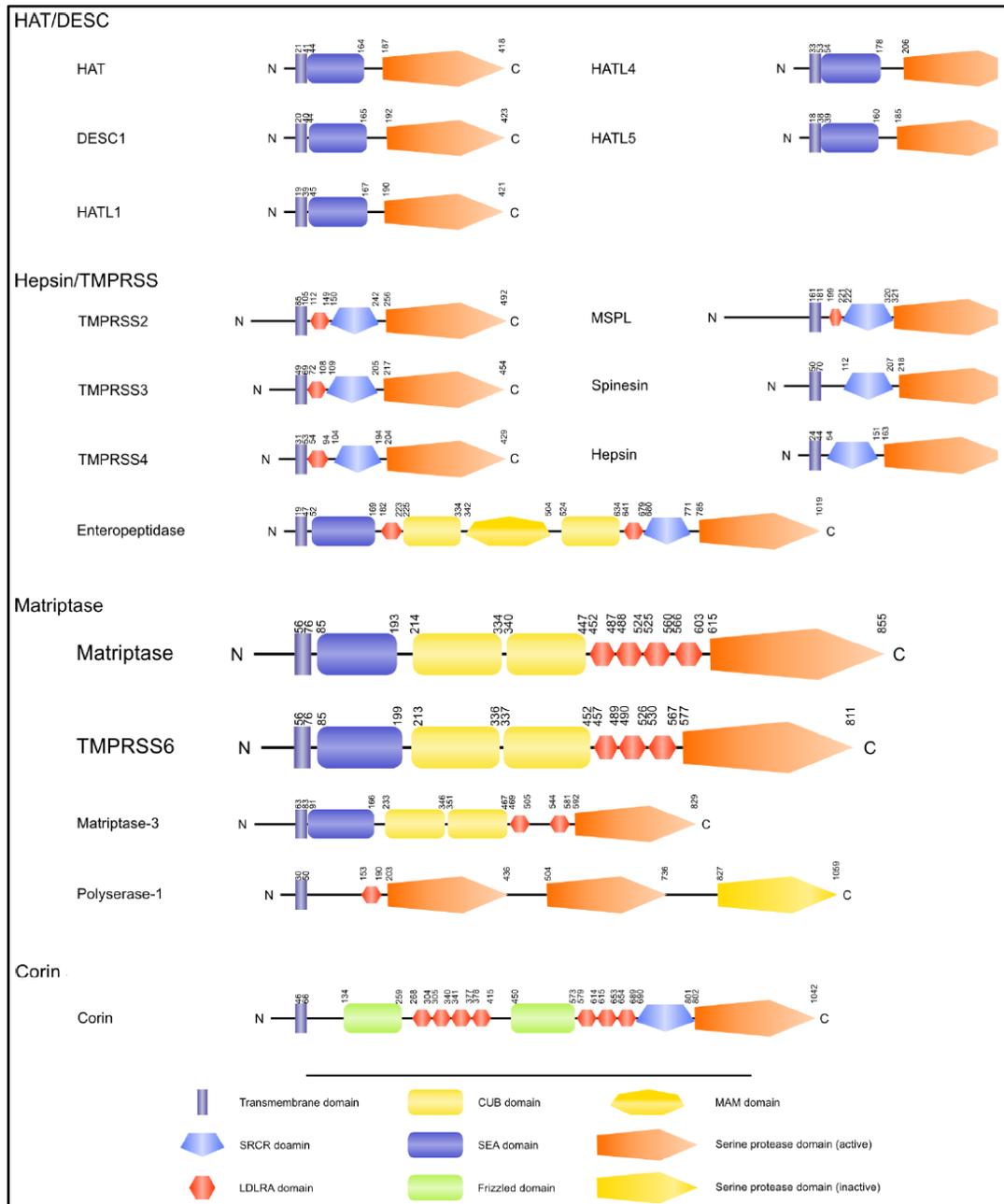
1.3 LES PROTÉASES À SÉRINE TRANSMEMBRANAIRES DE TYPE II

Récemment, le séquençage de plusieurs génomes de mammifères a révélé des gènes codant pour de nouvelles protéases (Hooper *et al.*, 2001). Parmi celles-ci, une nouvelle sous-famille de protéases à sérine de type trypsine possède la caractéristique d'être directement ancrée à la membrane plasmique de la cellule. Ces protéases sont fixées à la membrane soit via leur domaine C-terminal transmembranaire (type I), le glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), soit via leur domaine N-terminal transmembranaire (type II) (Szabo et Bugge, 2008). L'entéropeptidase fût la première protéase à sérine directement fixée à la membrane identifiée il y a plus d'un siècle par l'équipe de Palov. En 1994, le clonage de l'ADN de l'entéropeptidase révèle la présence d'une protéase fixée à la membrane plasmique, ce qui explique sa localisation à la surface cellulaire (Kitamoto *et al.*, 1994). La similarité de structure entre l'entéropeptidase et une autre protéase clonée, l'hepsine, ainsi que l'identification subséquente de TMPRSS2, HAT, corine et matriptase, ont permis l'identification d'une nouvelle famille de protéases à sérine extracellulaires directement fixées à la membrane via un domaine transmembranaire situé à l'extrémité N-terminale. Cette famille s'appelle protéases à sérine transmembranaires de type II (TTSPs) (Figure 8) (Bugge *et al.*, 2009). Les TTSPs sont hautement conservées et se retrouvent dans le génome de nombreuses espèces incluant les vertébrés et les invertébrés, notamment la drosophile (Rawlings *et al.*, 2014). À ce jour, 17 membres ont été identifiés chez la souris et l'humain et sont classés en 4 sous-familles selon l'analyse phylogénétique de leur domaine de protéase à sérine (Szabo *et al.*, 2003): HAT/DESC; Hepsine/TMPRSS/entéropeptidase; Matriptase et Corine. Au niveau structurel, elles se définissent par un domaine N-terminal intracellulaire, un domaine transmembranaire et une région C-terminale extracellulaire incluant différents domaines dont le site catalytique. HAT/DESC représente l'une des plus larges sous-familles des TTSPs, composée de HAT, DESC1-4 et HATL1-5. La sous famille Hepsine/TMPRSS/entéropeptidase comprend l'hepsine, MSPL, TMPRSS2-5 et l'entéropeptidase. La sous-famille matriptase se compose de 3 protéases homologues: matriptase, matriptase-2 et matriptase-3, tandis que la corine est le seul membre de la sous-famille corine.

De façon générale, ces TTSPs présentent différents domaines tels que: le domaine SEA (*single sea urchin sperm protein, enteropeptidase, domain agrin*), le domaine SRCR riche en cystéine (*a single scavenger receptor Cys-rich*), le domaine LDLRA (*a single low density lipoprotein receptor class A*), le domaine CUB (*bone morphogenic protein 1*), le domaine MAM (*a meprin, A5 antigen, and receptor protein phosphatase μ*), le domaine C1r/C1s (*urchin embryonic growth factor*) appelé aussi domaine CUB, les domaines de protéase à sérine actives ou inactives et le domaine *frizzled*. Les fonctions spécifiques de chacun de ces domaines ne sont pas encore bien élucidées, néanmoins, dans d'autres protéines le domaine SRCR contribue à la liaison de molécules polyanioniques, telles que les lipoprotéines modifiées ou les polysaccharides sulfatés (Resnick *et al.*, 1996). Le domaine *frizzled* est reconnu comme un domaine de liaison de la protéine Wnt (Cadigan et Nusse, 1997). Le domaine SEA est associé aux réactions de glycosylation (Bork et Patthy, 1995) et le domaine MAM est impliqué dans l'adhésion des protéines (Beckmann et Bork, 1993). En revanche, toutes ces TTSPs contiennent un domaine catalytique hautement conservé de la famille des protéases à sérine. Comme mentionner dans la section 1.2.1, l'activité protéolytique de ces TTSPs dépend de la présence des résidus de la triade catalytique. Certaines TTSPs sont synthétisées sous formes de pro-enzymes inactives dites zymogènes et subissent à l'intérieur d'un même motif précédant leur domaine de protéase à sérine, une activation protéolytique après le résidu Arg ou Lys en position P1 par d'autres protéases (Bugge *et al.*, 2009). Bien que les protéases impliquées dans l'activation protéolytique des TTSPs ne sont pas encore identifiées, plusieurs d'entre elles, telles que matriptase, matriptase-2, l'hepsine, TMPRSS2 ou encore TMPRSS5, ont démontré *in vitro* une activation auto-catalytique (Bugge *et al.*, 2009). Une autre caractéristique des TTSPs est qu'elles ont une préférence pour des substrats possédant des résidus basiques Arg ou Lys en position P1 (Hooper *et al.* 2001).

Figure 8. Structure des protéases à sérine transmembranaires de type II (TTSPs).

Les 17 membres de la famille des TTSPs se classent en 4 sous-familles: HAT/DESC; Hepsine/TMPRSS; Matriptase; Corine. Elles se caractérisent par une région N-terminale, une région transmembranaire et une région C-terminale composée de différents domaines protéiques. Figure tirée de la thèse de François Béliveau (Béliveau, 2012) inspirée de (Bugge *et al.*, 2009).



1.3.1 Fonctions physiologiques des TTSPs

Digestion des nutriments

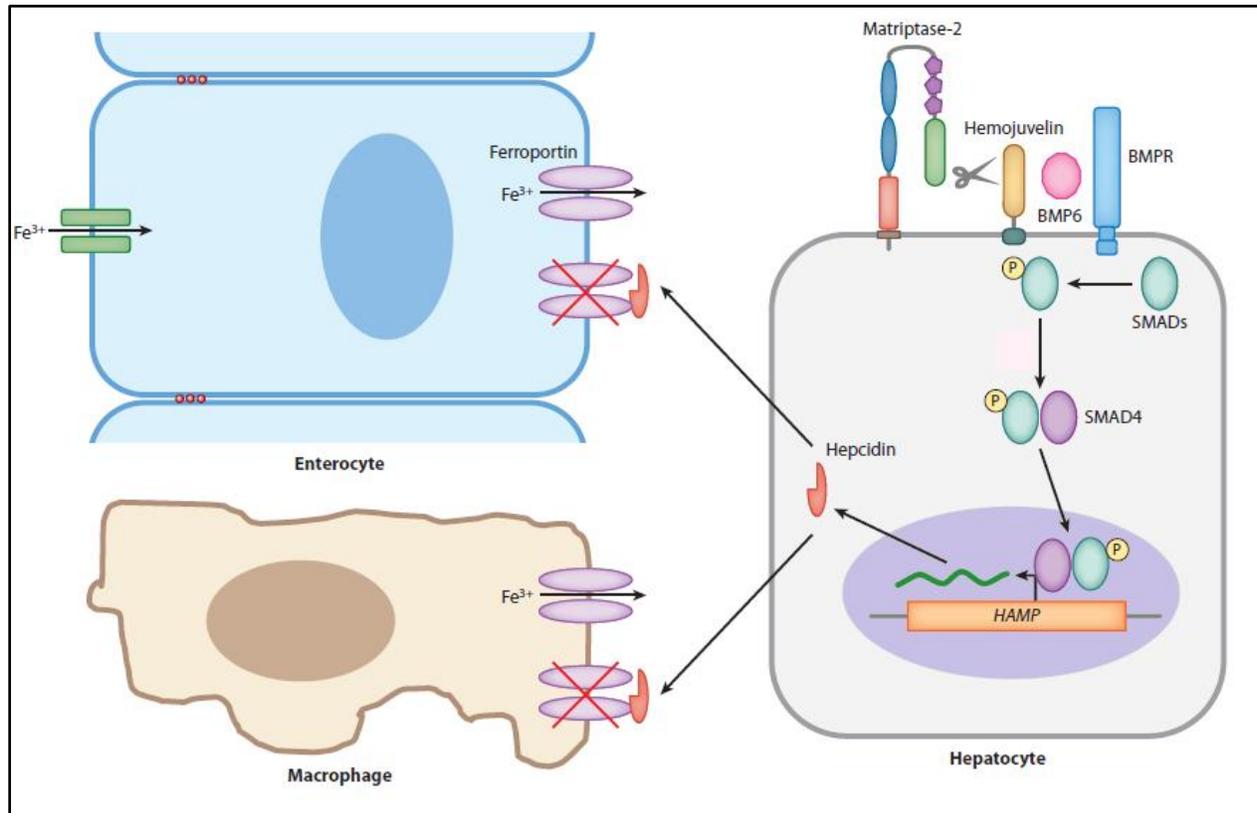
L'entéropeptidase, appelée également entérokinase, est l'une des premières TTSPs caractérisée comme protéase intestinale (Szabo et Bugge, 2008). Elle est exprimée à la surface des cellules épithéliales du duodénum où elle accomplit un rôle clé dans l'initiation de réactions protéolytiques d'enzymes digestives, dont la trypsine, qui sont sécrétées par le pancréas exocrine sous forme de zymogènes. L'entéropeptidase active le trypsinogène pancréatique en trypsine, une autre protéase à sérine responsable de la protéolyse des nutriments et l'activation de zymogènes en enzymes digestives (Eggermont *et al.*, 1971).

Régulation du fer

La matriptase-2 est exprimée principalement au niveau du foie chez l'humain et la souris (Velasco *et al.*, 2002). Elle a été identifiée comme un régulateur négatif de l'homéostasie du fer (Ramsay *et al.*, 2009). Elle clive son substrat, l'hémojuvéline (HJV), au niveau de la membrane plasmique, ce qui permet de diminuer l'expression d'une hormone hépatique, l'hepcidine. Cette hormone est essentielle pour la régulation du métabolisme du fer (Nemeth et Ganz, 2006). En abaissant le niveau d'hepcidine, la matriptase-2 permet d'augmenter le transit du fer emmagasiné dans la cellule en direction de la circulation (Folgueras *et al.*, 2008) (Figure 9).

Figure 9. Matriptase-2 dans la régulation du métabolisme du fer.

Matriptase-2 augmente le transit de fer cellulaire en dégradant l'hémojuvéline, ce qui engendre une diminution de la production d'hepcidine et augmente ainsi le niveau de fer. Figure tirée de (Roman Szabo et Bugge, 2011).



Homéostasie des tissus épithéliaux

De nombreuses TTSPs dont HAT, TMPRSS2 et matriptase sont exprimées par les tissus épithéliaux où elles assurent l'homéostasie de ces tissus. La protéase HAT se retrouve dans les voies respiratoires des tissus épithéliaux et accomplit diverses fonctions biologiques comme la fibrinogénolyse, la réponse inflammatoire via l'activation de PAR-2, l'adhésion et la motilité cellulaire grâce à l'activation de uPA (Bugge *et al.*, 2009) (Szabo et Bugge, 2008). TMPRSS2 régule le courant sodique épithélial au niveau des poumons via l'activation du canal sodique épithélial (Donaldson *et al.*, 2002), ainsi que la réponse inflammatoire de la prostate suite à l'activation de la protéase PAR-2 (Wilson *et al.*, 2005). Enfin, la matriptase a été associée à un rôle important dans l'homéostasie de tissus épithéliaux (voir section 1.4.1) (List *et al.*, 2006), (List *et al.*, 2002).

Régulation du volume et de la pression sanguine

La corine constitue un élément important dans la régulation du volume et de la pression sanguine. En effet, elle active la protéine pro-ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) en ANP (Jiang *et al.*, 2011) dans les cardiomyocytes. Cette hormone cardiaque permet de réduire la pression artérielle en favorisant l'excrétion de sel, ce qui diminue le volume sanguin (Yan *et al.*, 2000).

1.3.2 Fonctions pathophysiologiques des TTSPs

Mises à part les fonctions physiologiques variées des TTSPs, certains éléments tendent à montrer leur implication dans la progression de plusieurs maladies incluant, entre autres, les cancers, la surdité, les maladies associées au fer, et l'influenza.

Cancers

Plusieurs études suggèrent qu'une dérégulation de l'expression de certaines TTSPs est associée à la progression de cancers. L'hepsine a été identifiée comme un biomarqueur de pronostic du cancer de la prostate (Dhanasekaran *et al.*, 2001). En effet, il a été démontré qu'une régulation à la hausse du gène de l'hepsine est liée à une augmentation du risque de cancer de la prostate (Holt *et al.*, 2010). De plus, sa surexpression dans un modèle murin de cancer de la prostate induit une augmentation de sa progression et de formation de métastases à des organes distants, incluant le foie, les poumons et les os (Klezovitch *et al.*, 2004). D'ailleurs, les groupes de Vasioukhin et Leduc ont montré que l'inhibition de l'hepsine avec de petites molécules réduit la formation de métastases au niveau de l'os, du foie et des poumons dans un modèle murin de cancer métastatique de la prostate (Tang *et al.*, 2014). Il a également été montré qu'un niveau élevé de l'expression du gène de l'hepsine se retrouve dans d'autres types de cancers incluant le cancer des ovaires (Tanimoto *et al.*, 1997). Autre que l'hepsine, une surexpression de TMPRSS2-4 est reliée aux cancers de la prostate, des ovaires et du pancréas (Lin *et al.*, 1999) (Wallrapp *et al.*, 2000), (Choi *et al.*, 2008). En revanche, une sous-expression de DESC1 a été observée dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou (Sedghizadeh *et al.*, 2006). Enfin, une augmentation ou une diminution de l'expression de la matriptase a été également associée à un rôle important dans la progression de cancers épithéliaux. La section 1.4.2 traitera de ce rôle.

Les mécanismes à travers lesquels les TTSPs sont impliquées dans le développement de cancers restent à éclaircir. Cependant, il a été proposé que certaines TTSPs pourraient jouer un rôle dans l'invasion et la migration des cellules cancéreuses grâce à leur capacité à dégrader les composantes de la matrice extracellulaire (laminine, collagène, fibronectine) et à activer les précurseurs pro-HGF et pro-uPA (Szabo et Bugge, 2008). La contribution des TTSPs dans le développement de cancers suggèrent qu'elles représentent de nouvelles cibles pharmacologiques très intéressantes pour une intervention thérapeutique anti-cancers.

Surdité

L'hepsine et TMPRSS3 ont été liées à la surdité. En effet, un trouble auditif sévère a été observé chez des souris déficientes en hepsine, provoquant un développement anormal de la membrane tectoriale de la cochlée et une diminution de l'expression de la myéline au niveau du nerf auditif (Guipponi *et al.*, 2007). Dans le cas de TMPRSS3, des mutations au niveau du gène de ce dernier sont responsables d'une surdité autosomale récessive (Elbracht *et al.*, 2007).

Maladies associées au métabolisme du fer

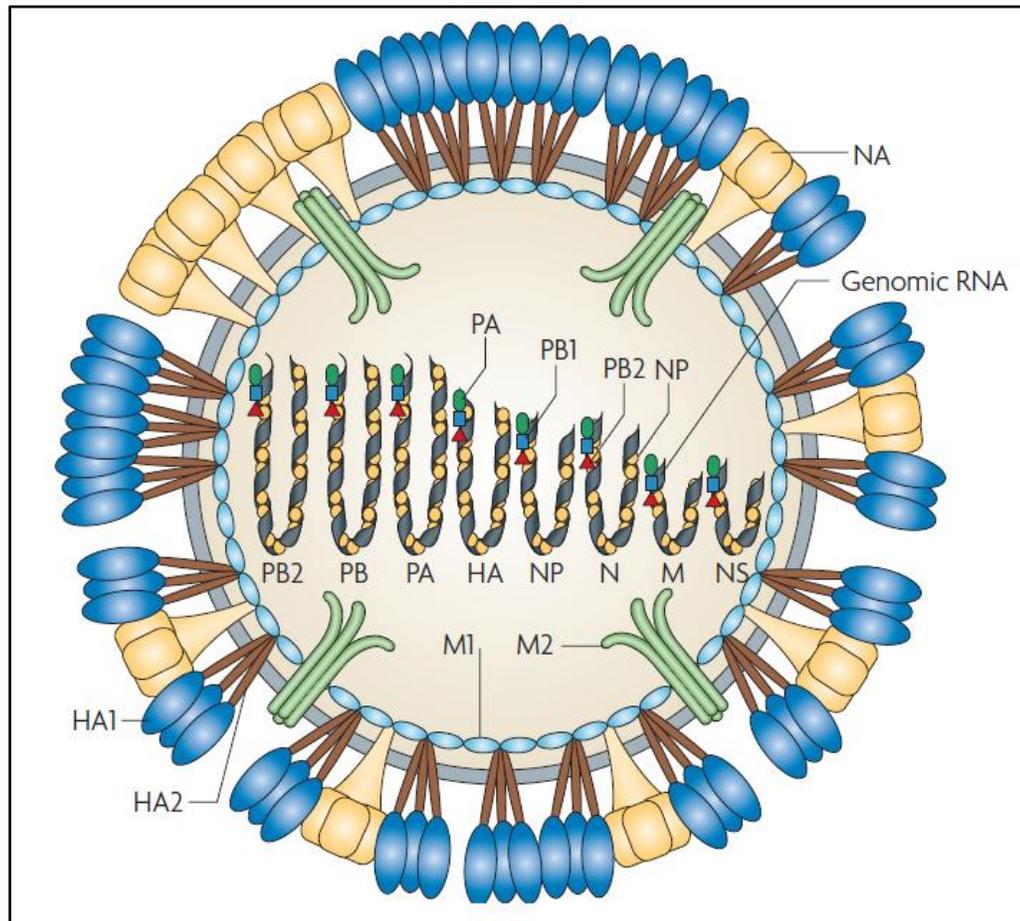
Différentes mutations de gènes codants pour la matriptase-2 chez l'humain favorisent une forme d'anémie connue sous le nom de IRIDA (*iron-refractory iron deficiency anemia*). Cette maladie se caractérise par une déficience en fer induite en raison d'une augmentation du niveau d'expression de l'hepcidine, régulateur central de l'équilibre du fer dans l'organisme (Finberg *et al.*, 2008), (Wang *et al.*, 2014). Par contre, de faible niveau d'expression d'hepcidine est la cause de maladies liées à une surcharge en fer, telles que la β -thalassémie et l'hémochromatose. Des études récentes ont démontré que dans des modèles murins de β -thalassémie et d'hémochromatose, l'utilisation de petits ARN interférents et d'oligonucléotides antisens, modulant négativement l'expression de la matriptase-2 pouvait mener à une diminution de la surcharge en fer (Guo *et al.*, 2013). En conséquence, la matriptase-2 apparaît comme une cible potentielle dans le traitement de maladies liées à la surcharge en fer.

Influenza

L'influenza est une maladie infectieuse très contagieuse affectant les voies respiratoires. L'agent causatif est un virus à ARN, le virus de l'influenza, qui fait partie de la famille des *orthomyxoviridae* (Bouvier et Palese, 2008). Le virus possède un génome segmenté composé d'ARN simple brin codant pour 12 protéines. Il existe 3 types de virus divisés selon leurs propriétés antigéniques: A, B et C. Le virus de type A est issu des oiseaux aquatiques, qui sont son réservoir naturel, mais a été également isolé à partir de diverses autres espèces, y compris les humains, les porcs, les chevaux et les mammifères marins. Considéré comme l'un des types de virus le plus fréquent et virulent, le virus de type A est classé en plusieurs sous-types suivant 17 variantes d'hémagglutinines et 10 variantes de neuraminidases (la nomenclature des virus réfère aux sous-types d'hémagglutinine et de neuraminidase; par exemple, H1N1 réfère à hémagglutinine de type 1 et neuraminidase de type 1) (World Health Organization, 1980). Quelques sous-types du virus de type A ont engendré un niveau de préoccupation élevé, notamment les virus pandémiques H1N1 (1918-1919; 1977 et 2009), H2N2 (1957) et H3N2 (1968) (Taubenberger et Morens, 2010). Le virus de type B infecte exclusivement les humains et provoque parfois des épidémies. Le virus de type C affecte à la fois les humains, les chiens et les porcs. Cependant, ce type est le moins régulier et provoque habituellement une pathologie bénigne chez l'enfant. Malgré leurs propriétés antigéniques variées, ces différents types de virus présentent des similarités au niveau structurel, tel qu'illustré à la figure 10. On retrouve à la surface de l'enveloppe virale: la neuraminidase (NA), l'hémagglutinine (HA), la protéine de transport M2 et le canal ionique M2. Le noyau central contient le complexe de ribonucléoprotéines incluant les segments d'ARN viral associés à la nucléoprotéine (NP) et trois protéines de la polymérase (PA, PB1 et PB2).

Figure 10. Structure du virus de l'influenza.

La surface des virus de types A, B et C présente plusieurs protéines distinctes: la protéine de transport (M1), le canal ionique (M2), la neuraminidase (NA), l'hémagglutinine (HA), les protéines de la polymérase (PA, PB1, PB2), la nucléoprotéine (NP) et la protéine d'export nucléaire (NS). Image tirée de (Karlsson Hedestam *et al.*, 2008).



Le cycle de vie du virus présenté à la figure 11 se décompose en 4 étapes (Min et Subbarao, 2010). Premièrement, le virus se fixe sur les récepteurs des cellules de l'hôte contenant les acides sialiques qui interagissent avec la glycoprotéine de surface HA du virus. Le virus entre alors dans la cellule par un mécanisme d'endocytose (Figure 11, étape 1). Deuxièmement, le clivage et l'activation de HA par les protéases de l'hôte est une étape essentielle pour l'infectivité et la réplication virale (ce dernier clivage peut en réalité avoir lieu à différentes étapes du processus). En effet, HA est exprimé à la surface du virus sous forme du précurseur HA0 (Figure 12A), qui subit un clivage protéolytique par les protéases de l'hôte, pour générer deux sous-unités HA1 et HA2 (Figure 12B). Il y a donc un changement de conformation de HA afin d'exposer son

peptide de fusion qui se situe au niveau de la sous-unité HA2 (Figure 12C). Le canal ionique M2 permet l'acidification de la vésicule endocytaire, ce qui déclenche l'étape de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome (Figure 11, étape 2). Troisièmement, après le processus de fusion, les ribonucléoprotéines virales sont libérées dans le cytoplasme de la cellule hôte et transportées vers le noyau où le génome viral et l'ARN messager sont synthétisés (Figure 11, étape 3), puis réassemblés avec les composantes de la paroi cellulaire virale, pour créer de nouveaux virions. Enfin, une fois les nouveaux virions formés, ils restent fixés à la membrane par interaction avec les acides sialiques, puis sont ensuite détachés de la membrane grâce à la neuraminidase qui hydrolyse les acides sialiques (Figure 11, étape 4). Les virions situés à l'extérieur de l'hôte vont à leur tour infecter les cellules avoisinantes et permettre la réplication virale.

Figure 11. Cycle de vie du virus de l'influenza.

Étapes du cycle de vie du virus de l'influenza : 1) Adhésion du virus à la membrane de la cellule de l'hôte; 2) Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire; 3) Synthèse de la protéine virale; 4) Libération du virus de la membrane cellulaire. Cette figure est inspirée de (Min et Subbarao, 2010).

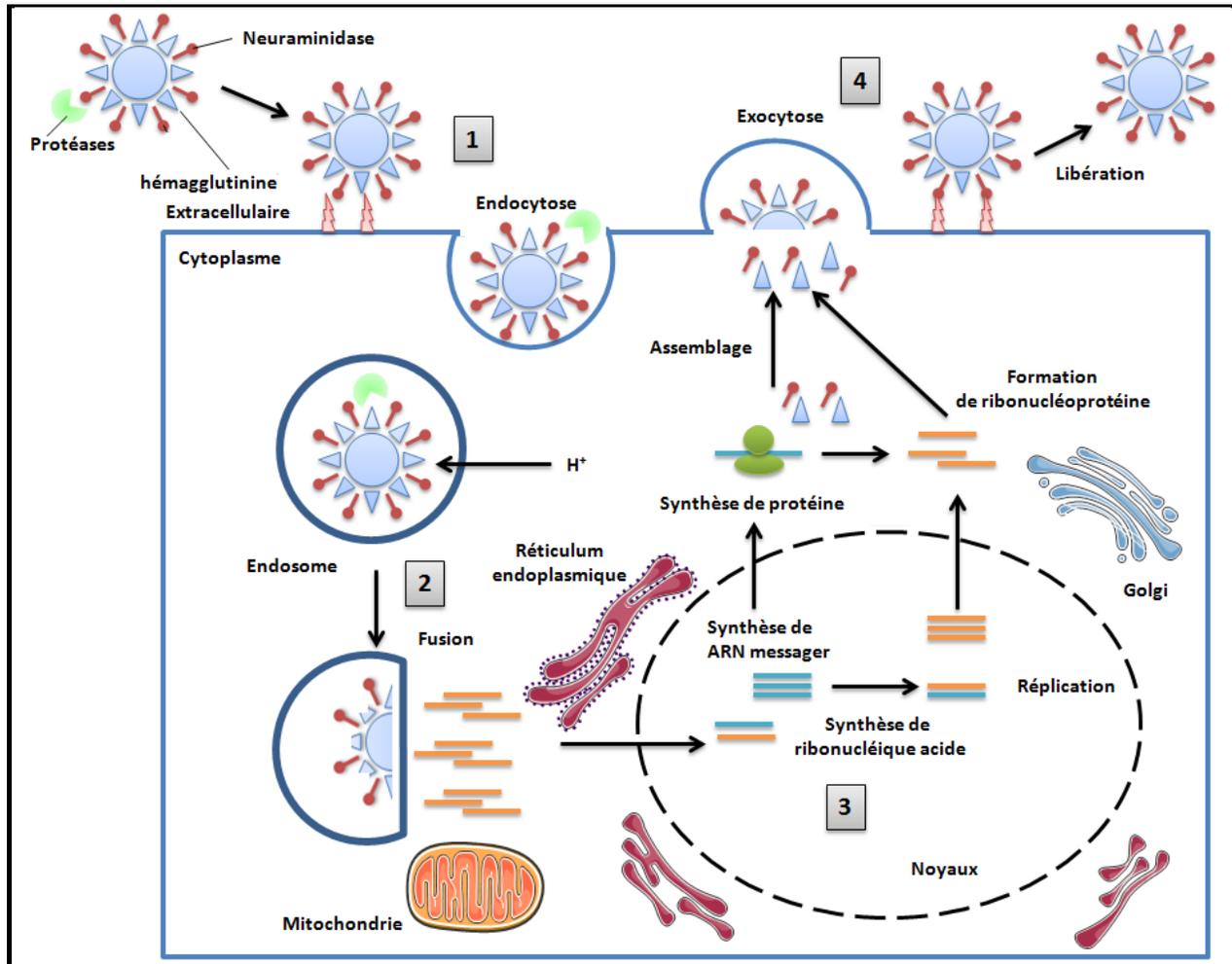
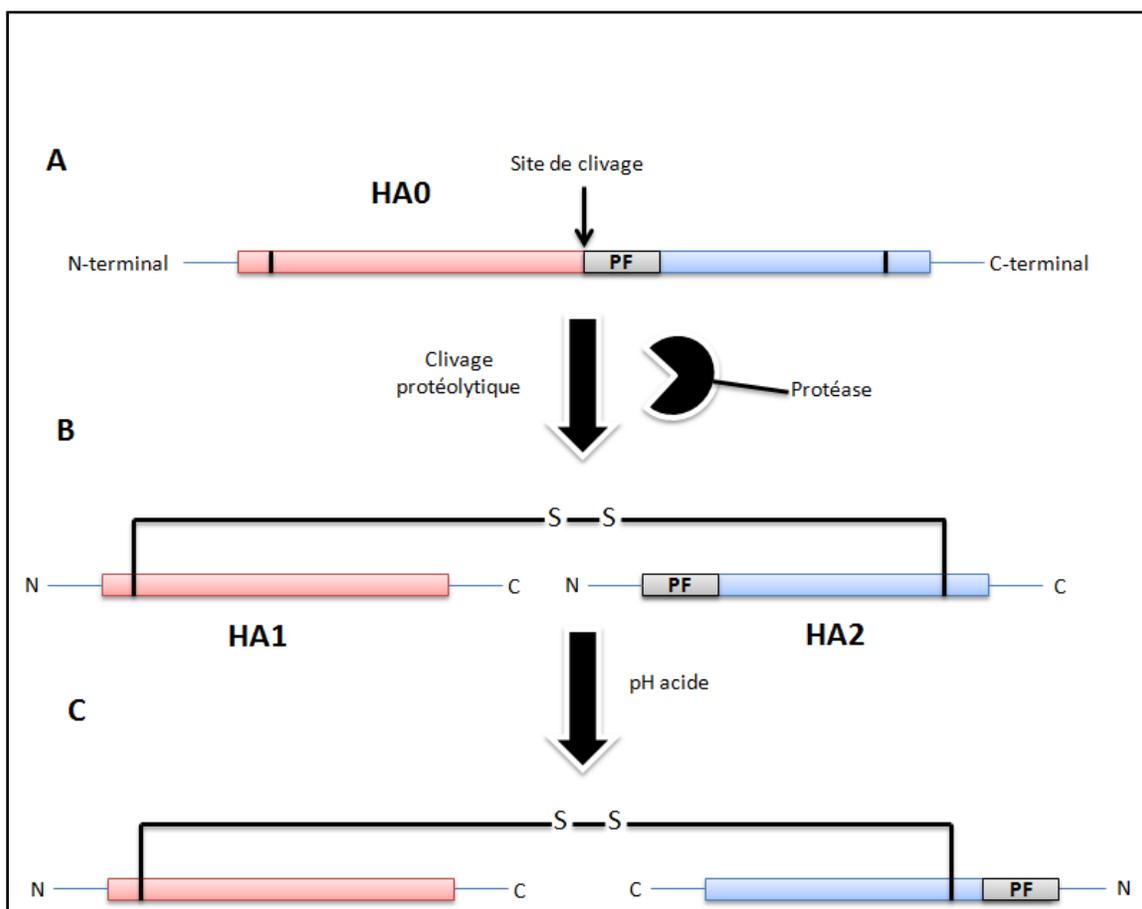


Figure 12. Clivage et activation de l'hémagglutinine.

Clivage protéolytique du précurseur HA0 en HA1 et HA2. (A) Clivage par les protéases de l'hôte du précurseur de l'hémagglutinine HA0. (B) HA0 est converti en deux sous-unités HA1 et HA2, reliées par un pont disulfure. (C) À pH acide, le changement conformationnel de l'extrémité N-terminale de HA2 permet l'exposition du peptide de fusion (PF). Figure adaptée de (Bertram *et al.*, 2010).



Les protéases à sérine de type trypsine de l'hôte capables d'effectuer ce clivage reconnaissent soit des séquences de clivage monobasiques, soit des séquences multibasiques dans une boucle entre HA1 et HA2. D'un côté, nous avons les convertases (furin, PC5, PC6), qui clivent les séquences multibasiques (R-X-X/K-R↓). Ce type de clivage se retrouve dans l'hémagglutinine des virus hautement pathogènes, comme par exemple le virus H5N1 (Bosch *et al.*, 1981), (Perdue *et al.*, 1997). D'un autre côté, les séquences de clivage monobasique (X-X-X/K-R↓) possèdent un seul résidu basique et sont accessibles aux protéases à sérine comme la trypsine. Ce type de clivage se retrouve dans HA de virus moins pathogènes tels que le virus

H1N1 (Bertram *et al.*, 2010). Le clivage permet d'hydrolyser le précurseur HA0 en deux sous-unités HA1 et HA2 reliées par un pont disulfure. La sous-unité HA2 contient le peptide de fusion, qui avant clivage est masqué par la conformation de HA2. Sous l'action du pH acide retrouvé dans les endosomes, la sous-unité HA2 subit un réarrangement conformationnel qui expose le peptide de fusion dans une conformation favorisant sa fusion avec la membrane plasmique de l'endosome (Figure 12C) (Galloway *et al.*, 2013). Le clivage de HA des virus faiblement pathogènes est réalisé par les protéases de type trypsine qui se trouvent à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires (Yasuoka *et al.*, 1997). Des protéases extracellulaires, telles que la tryptase et la trypsine peuvent cliver et activer HA *in vitro* (Klenk *et al.*, 1975). En plus des protéases extracellulaires, de récentes études suggèrent que des protéases directement ancrées à la membrane telles que les TTSPs incluant matriptase, HAT, TMPRSS2, TMPRSS4, DESC1 et MSPL sont exprimées au niveau des voies respiratoires et possèdent également la capacité de cliver HA (Choi *et al.*, 2009). En effet, il a été suggéré que ces TTSPs sont capables d'initier le clivage de HA0 et permettre ainsi l'activation du virus. Fait intéressant, ces protéases clivent efficacement les protéines contenant un résidu Arg à la position P1, ce qui les rend parfaitement adaptées au clivage du site monobasique de HA faiblement pathogène. Par exemple, l'hémagglutinine H1 (I-Q-S-R↓G-L-F-G) du virus H1N1 est activé par les protéases HAT, TMPRSS2, TMPRSS4, DESC1 et MSPL (Bertram *et al.*, 2010), (Hamilton *et al.*, 2012), (Beaulieu *et al.*, 2013), (Bertram *et al.*, 2014). Cependant certaines TTSPs telles que TMPRSS13 et MSPL peuvent aussi activer les hémagglutinines H5 (K-K-K-R↓G-L-F-G) et H7 (R-K-K-R↓G-L-F-G) des virus hautement pathogènes H5N1 et H7N1 (Okumura *et al.*, 2010). Le rôle de la matriptase dans l'influenza sera présenté dans la section 1.4.3.

1.4 LA MATRIPTASE

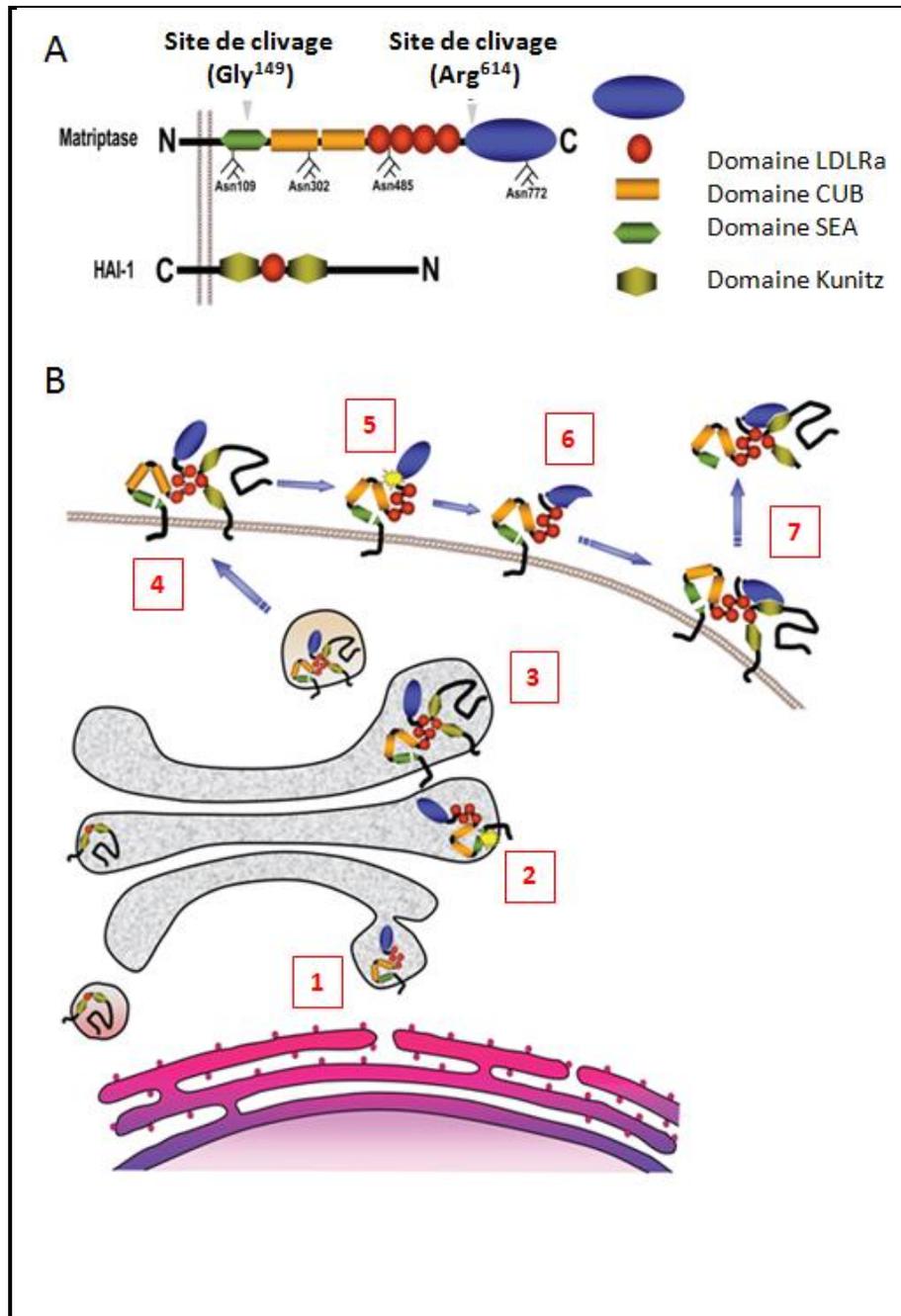
La matriptase représente l'une des TTSPs les plus étudiées, car une dérégulation de cette dernière est associée à la progression de maladies incluant les cancers épithéliaux (LeBeau *et al.*, 2013), (List, 2009), l'arthrose (Milner *et al.*, 2010) décrits dans la section 1.4.3 ci-dessous. Son rôle important au niveau de ces maladies a retenu notre attention, et nous a amené à considérer celle-ci comme une cible intéressante et prometteuse pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

1.4.1 Expression et activité protéolytique

La matriptase, appelée également MT-SP1 (*membrane-type serine-protease-1*), TADG-15 (*tumor-associated differentially expressed gene-15*) ou ST14 (*suppressor of tumorigenicity 14*) est composée de 855 acides aminés et possède une masse de 94.7 kDa. Elle est co-exprimée dans plusieurs tissus épithéliaux (Oberst *et al.*, 2003) avec son inhibiteur endogène apparenté HAI-1 (*hepatocyte growth factor inhibitor-1*), qui est une protéine transmembranaire (type I) (Figure 13). Cet inhibiteur endogène est impliqué dans l'activation, l'inhibition et l'expression de la matriptase (Kojima *et al.*, 2008), (Lee *et al.*, 2005). La matriptase est initialement synthétisée sous sa forme zymogène et subit une activation complexe et unique, tel que proposé par le groupe de List (List *et al.*, 2006) (Figure 13). En effet, sa forme zymogène est initialement produite dans le réticulum endoplasmique où elle subit un premier clivage endoprotéolytique au niveau de son domaine SEA après le résidu Gly¹⁴⁹ par une protéase non identifiée. Une fois clivée, le domaine SEA interagit avec le domaine Kunitz de HAI-1 pour former un complexe matriptase/HAI-1, qui facilite le transport de la matriptase à la surface cellulaire (Oberst *et al.*, 2005). Ensuite, le complexe matriptase/HAI-1 est activé par un clivage autocatalytique entre les résidus Arg⁶¹⁴ et Val⁶¹⁵ au niveau du site de clivage R-Q-A-R⁶¹⁴↓V⁶¹⁵V-G-G, hautement conservé dans le domaine de protéase à sérine de différentes espèces. La matriptase activée est ensuite rapidement inhibée par HAI-1, puis une partie du complexe matriptase/HAI-1 est libérée de la membrane plasmique. La matriptase fixée à la membrane ou circulante clive ensuite ses substrats respectifs.

Figure 13. Matriptase et son inhibiteur endogène HAI-1.

(A) Structures de la matriptase et de HAI-1. (B) Cycle de vie de la matriptase: (1) Synthèse de la matriptase au niveau du réticulum endoplasmique; (2) Premier clivage de la matriptase au niveau de son domaine SEA (résidu Gly¹⁴⁹); (3) Formation du complexe matriptase/HAI-1; (4) Translocation du complexe matriptase/HAI-1 à la membrane cellulaire; (5) Deuxième clivage au niveau du domaine catalytique (résidu Arg⁶¹⁴); (6) Inhibition de la matriptase active par HAI-1; (7) Complexe matriptase/HAI-1 libéré de la membrane plasmique. Image modifiée de (List *et al.*, 2006).



La découverte de substrats préférés de la matriptase a été déterminée à l'aide de la séquence d'autoactivation de la matriptase R-Q-A-R⁶¹⁴↓V⁶¹⁵V-G-G à laquelle les acides aminés aux positions P4, P3, P2 et P1' ont été remplacés par d'autres acides aminés de différentes natures (polaires, non polaires, neutres) (Béliveau *et al.*, 2009). Cette étude a démontré que les séquences de clivage préférées par la matriptase possèdent des acides aminés basiques (Arg ou Lys) ou non basiques en position P4, des acides aminés basiques ou le résidu Gln en position P3 et de petits résidus en position P2. Ce profil de séquence de clivage est en accord avec l'activation de plusieurs substrats clés possédant des fonctions physiologiques bien définies. Par exemple, PAR-2 est un récepteur couplé aux protéines G, qui subit un clivage et une activation par la matriptase au niveau de la séquence peptidique S-K-G-R↓S située à son extrémité N-terminale. Suite à son activation et à sa signalisation intracellulaire, PAR-2 permet ainsi l'adhésion et la motilité de cellules et apporte une importante contribution dans les processus inflammatoires (Shi *et al.*, 2004). La matriptase clive également le facteur de croissance pro-HGF/SF (K-Q-L-R↓V), qui active une cascade de signalisation intracellulaire dans laquelle interviennent des tyrosine kinases après sa liaison au récepteur c-Met (Lee *et al.*, 2000). Cette activation successive se traduit au niveau physiologique par une régulation de la croissance cellulaire, la motilité cellulaire et la morphogénèse (Organ et Tsao, 2011). Un autre substrat de la matriptase, la pro-uPA/uPAR (P-R-F-Q↓I) est connue pour réguler l'activation du système plasminogène comprenant la plasmine (Lee *et al.*, 2000), (Qiu *et al.*, 2007). La plasmine active à son tour les métalloprotéases liées à la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine) (Baricos *et al.*, 1995). Le complexe uPA/uPAR activé participe aussi à de nombreuses réponses cellulaires telles que l'adhésion, la différenciation, la prolifération ou encore la migration cellulaire (Uhlend, 2006). La prostasine a également été identifiée comme un substrat de la matriptase et joue un rôle au niveau du maintien de la barrière épithéliale via la différenciation de l'épiderme (Ahmed *et al.*, 2006), (Chen *et al.*, 2010).

La matriptase clive de manière efficace *in vitro* et *in vivo* (Takeuchi *et al.*, 2000) ses substrats. Cependant, ses substrats sont également clivés efficacement par d'autres protéases. En effet, les protéases à sérine incluant trypsine, tryptase et les facteurs Xa sont également des activateurs de PAR-2 (Takeuchi *et al.*, 2000). De plus, uPA, tPA (*tissue-type plasminogen activator*) (Mars *et al.*, 1995), HGFA (*hepatocyte growth factor activator*) (Miyazawa *et al.*,

1996), les facteurs de coagulation XIIa, FXIIa et FXIa activent pro-HGF/SF (Uhländ, 2006), (Shimomura *et al.*, 1995), (Miyazawa *et al.*, 1993). Il y a donc souvent une redondance de fonction entre plusieurs protéases, ce qui contribue à assurer une certaine robustesse des systèmes biologiques.

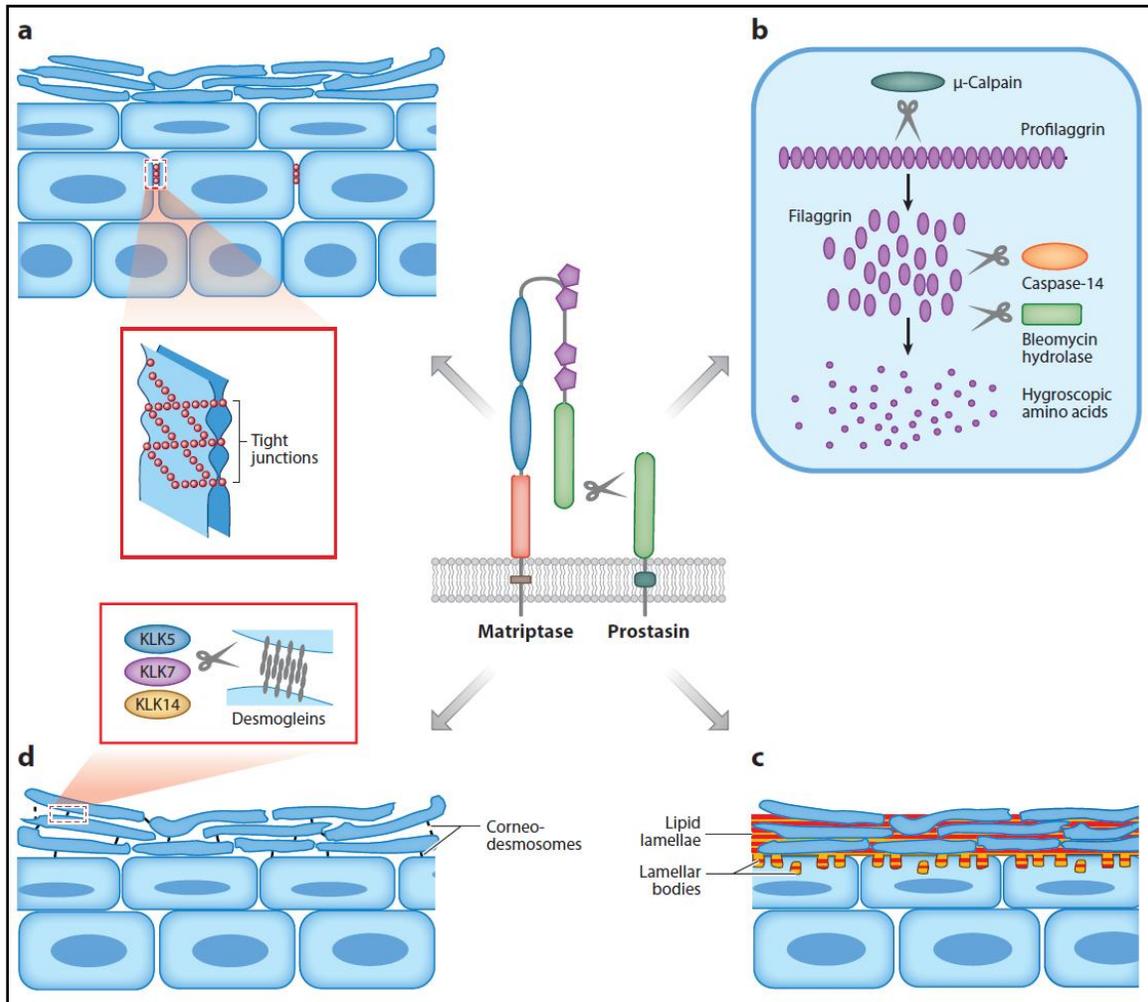
1.4.2 Rôles physiologiques

Développement de l'épithélium et survie post-natale

La génération de souris mutantes ou déficientes en matriptase a permis d'élucider les fonctions essentielles de cette enzyme au niveau du maintien de l'épithélium et la survie post-natale (List *et al.*, 2006), (List *et al.*, 2002). Une délétion du gène codant pour la matriptase chez les souris provoque, 48h après leur naissance, une mort rapide en raison d'une déshydratation. Cette déshydratation résulte d'une altération de la fonction de la barrière épithéliale de l'épiderme. Cette découverte a mis en évidence que la matriptase est indispensable pour un développement à terme, mais révèle également son rôle crucial dans la formation de la couche cornée, essentielle à une protection efficace de la barrière de l'épiderme (Bugge *et al.*, 2007), (Sales *et al.*, 2010). Cette couche est maintenue grâce au bon déroulement de plusieurs processus de différenciation de l'épiderme, comprenant la formation de jonctions entre cellules renforçant l'adhérence cellulaire, ainsi que l'accumulation d'un ensemble complexe de structures de protéines, de lipides et d'enzymes (Elias et Menon, 1991). La couche cornée se compose principalement de cellules mortes et de kératinocytes différenciés dites cornéocytes. Ces cellules sont connectées entre elles par des desmosomes et forment un réseau de cellules. La matriptase est exprimée dans la couche cornée au sein de laquelle elle régule l'expression et l'activation de l'enzyme kallikréine (Sales *et al.*, 2010), responsable de la dégradation protéolytique des jonctions cellule-cellule entre les cornéocytes. Ce processus dit de *desquamation* permet d'éliminer et de remplacer ces cellules par des cellules d'une couche inférieure de façon continue (Figure 14).

Figure 14. Processus de différenciation de l'épiderme.

(a) Formation de jonctions entre les kératinocytes; (b) Activation de la pro-filaggrine en monomères de filaggrine; (c) Synthèse de lipides de l'épiderme; (d) Processus de *desquamation*. Image inspirée de (Szabo et Bugge, 2011).



La matriptase facilite la protéolyse de la pro-filaggrine en des monomères de filaggrine, des composantes structurales de la couche cornée favorisant la différenciation épidermique. Un déficit d'expression de la matriptase altère la transformation protéolytique de la pro-filaggrine en filaggrine, ce qui engendre des défauts au niveau de la barrière épithéliale de l'épiderme (List *et al.*, 2003). De plus, de récentes études suggèrent qu'une protéase à sérine transmembranaire ancrée à la membrane via le motif glycosylphosphatidylinositol, la prostasine, est impliquée tout comme la matriptase dans le processus de différenciation épidermique, la formation de la couche cornée et donc le maintien de la barrière de l'épiderme (Miller et List, 2012). Le lien étroit entre

matriptase et prostasine de surface a été établi suite au même phénotype sévère au niveau de l'épiderme observé chez des souris déficientes en matriptase et/ou en prostasine (Miller et List, 2012). De plus, en raison de leur colocalisation dans une variété de tissus épithéliaux, il a été proposé qu'un complexe d'activation réciproque et unique entre ces protéases de surface pourrait initier la cascade protéolytique nécessaire au bon fonctionnement de la barrière épithéliale (Netzel-Arnett *et al.*, 2006). Les groupes de Antalis et Leduc ont précisé la relation entre la prostasine et la matriptase dans la fonction de la barrière épithéliale au niveau de l'intestin. La réduction de l'expression de la prostasine grâce à des ARN messagers interférents dans les cellules épithéliales Caco-2 inhibe le développement de la barrière épithéliale intestinale, comme lors de la perte de la matriptase (Buzza *et al.*, 2013). Des études réalisées chez les souris développant une colite sévère montrent une diminution d'expression de la matriptase, associée à une réduction de l'intégrité de la barrière intestinale. Une restauration de l'expression de la matriptase a permis de restaurer l'intégrité de la barrière intestinale (Netzel-Arnett *et al.*, 2011). La matriptase est aussi essentielle pour la régénération de la barrière épithéliale intestinale dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Bien qu'*in vitro* la matriptase active la forme zymogène de la prostasine (Netzel-Arnett *et al.*, 2006), le mécanisme spécifique à travers lequel le complexe d'activation matriptase/prostasine contribue au maintien de la barrière épithéliale reste à clarifier.

Développement des follicules pileux et l'homéostasie de thymocytes

La matriptase est aussi importante dans le développement de follicules pileux et l'homéostasie des thymocytes. En effet, il a été démontré qu'une délétion de l'expression de la matriptase induit une hypoplasie folliculaire et une déplétion des cellules du thymus, les thymocytes, responsables de la génération de lymphocytes T (List *et al.*, 2002).

1.4.3 Implications pathologiques

Cancers épithéliaux

L'intérêt porté à la matriptase est stimulé par son rôle dans le développement des tumeurs épithéliales incluant les cancers du sein, de la prostate, de l'ovaire, du col de l'utérus, du rein, de l'œsophage et du tractus gastro-intestinal (List *et al.*, 2006). Plusieurs études suggèrent qu'une dérégulation de l'expression de la matriptase serait associée à la progression de certains cancers. En effet, le groupe de Bugge a démontré qu'une surexpression de la matriptase dans la peau de souris transgéniques augmente le ratio matriptase/HAI-1 en faveur de la matriptase et potentialise la formation de tumeurs cancérigènes avec une faible expression de HAI-1 (List *et al.*, 2005). Une augmentation des niveaux d'expression de l'ARN messager de la matriptase a été observée dans les cancers du sein (Shi *et al.*, 1993), (Lin *et al.*, 1997), des ovaires (Jin *et al.*, 2006) et de la prostate (Riddick *et al.*, 2005). En revanche, l'étude du groupe de Zhang suggère qu'une sous-expression de la matriptase et de HAI-1 serait associée à la progression du cancer gastro-intestinal (Zeng *et al.*, 2005). L'expression de la matriptase et de HAI-1 lors du développement de tumeurs révèle leur potentiel comme des marqueurs pharmacologiques pour le diagnostic de divers cancers épithéliaux humains. La surexpression de la matriptase évoque que son activité catalytique est aussi augmentée, et que son rôle crucial dans la croissance et la progression de tumeurs serait possiblement attribué au clivage protéolytique de ses substrats comme pro-uPA/uPA, pro-HGF/SF et PAR-2. La matriptase peut activer uPA, qui favorise la dégradation des composantes de la matrice et du récepteur PAR-2, initiant la formation de métastases (Shi *et al.*, 2004). De plus, les travaux de List, en collaboration avec Leduc et Marsault, démontrent que la matriptase, dont le niveau d'expression est augmenté dans le cancer du sein, permet la carcinogénèse par l'intermédiaire de la signalisation c-Met, initiée par l'activation protéolytique du facteur de croissance pro-HGF/SF (Zoratti *et al.*, 2015). Ces facteurs suggèrent que le ciblage de la matriptase pourrait offrir une nouvelle alternative pour le traitement de ces cancers.

Maladies de la peau

L'importance de la matriptase dans l'intégrité de l'épiderme suggère qu'une mutation ou une altération de son expression pourrait conduire à des désordres au niveau de la peau. En effet, des études rapportées par les groupes de Leduc et Shohat ont associé la mutation G827R dans le domaine catalytique de la matriptase au développement de la maladie autosomale récessive ichthyose avec hypotrichose (ARIH) (Désilets *et al.*, 2008), (Basel-Vanagaite *et al.*, 2007). Les patients atteints de cette maladie ont une peau épaissie et grisâtre. Cette forme mutante induit une réduction de la cascade protéolytique matriptase-prostasine responsable du processus d'activation de la pro-filaggrine, qui est essentiel pour l'homéostasie de la barrière épithéliale (List *et al.*, 2007). Un autre exemple de maladie humaine de la peau est le syndrome de Netherton. Une déficience en LEKTI (*lympho-epithelial-Kazal-Type related inhibitor*), inhibiteur endogène de la kallikréine, est à l'origine de cette maladie génétique qui se traduit par une effusion prématurée de la couche cornée, avec une exposition directe de l'épiderme à l'environnement extérieur, et à des risques d'inflammation chronique (Aydın *et al.*, 2014), (Fortugno *et al.*, 2011). D'ailleurs, Bugge et son équipe ont démontré dans un modèle de souris déficiente en LEKTI, que la matriptase initie ce syndrome, à cause d'une activation prématurée de la cascade pro-kallikréine liée au détachement de la couche cornée (Sales *et al.*, 2010).

Arthrose

Le groupe de Rowan a observé une surexpression de la matriptase dans le cartilage arthrosique, ce qui pourrait jouer un rôle de médiateur dans le processus de destruction du cartilage osseux par induction de l'activation de pro-collagénases (Milner *et al.*, 2010). Leurs études ont confirmé que l'activation de PAR-2 par la matriptase dans le cartilage arthrosique a engendré la synthèse de MMP-1 et MMP-13, collagénases responsables de la dégradation du cartilage. L'inhibition de PAR-2 par un antagoniste ou un anticorps bloque la collagénolyse produit par la matriptase au niveau du cartilage. De plus, l'activité catalytique de la matriptase induit les MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-13) par activation de leurs formes zymogènes. Ainsi, la matriptase est considérée comme un nouvel initiateur de la destruction du cartilage dans l'arthrose et devient donc une nouvelle cible thérapeutique pour prévenir la dégradation du cartilage.

Activation des virus de l'influenza

Le pouvoir infectieux du virus de la grippe nécessite un clivage de la glycoprotéine de surface hémagglutinine (HA) par des protéases avant la fusion avec la membrane de la cellule hôte infectée. Plusieurs études ont montré l'implication de différents membres de la famille des sérines protéases transmembranaires de type II (TTSP), TMPRSS2, TMPRSS4 dans l'activation et la réplication des virus grippaux. Récemment, notre groupe et celui de Hamilton ont identifié la matriptase comme une nouvelle protéase activant l'hémagglutinine du virus de la grippe H1N1 et favorisant la réplication virale dans les cellules des voies respiratoires humaines (Beaulieu *et al.*, 2013), (Hamilton *et al.*, 2012). Premièrement, nous avons révélé que le gène codant pour la matriptase est fortement exprimée dans les poumons d'humain sain et dans les cellules épithéliales bronchiques (Calu-3). Deuxièmement, nous avons démontré que le domaine catalytique de la matriptase est capable de cliver spécifiquement l'hémagglutinine du virus H1N1 de manière dose dépendante. Troisièmement, nous avons montré que la matriptase promeut la réplication du virus H1N1. Enfin, nous avons décelé que le ciblage spécifique de la matriptase en utilisant un siRNA réduit de manière significative l'expression de la matriptase, ce qui a pour effet de diminuer l'expression de particules virales produites par les cellules infectées avec le virus H1N1. De plus, l'équipe de Baron a rapporté que la matriptase, HAT et TMPRSS2 et La matriptase active l'hémagglutinine du virus de l'influenza A (H9N2) (Baron *et al.*, 2013). Toute ces évidences suggèrent que la matriptase et d'autres TTSPs représentent de nouvelles cibles pharmacologiques attrayantes pour le développement d'agents thérapeutiques anti-influenza.

1.5 LES INHIBITEURS NATURELS DE LA MATRIPTASE

1.5.1 Inhibiteurs endogènes

Le rôle central des protéases dans la régulation de divers processus biologiques requiert que leur activité catalytique soit strictement régulée afin d'éviter la dégradation involontaire de protéines associées à des maladies. Il existe des inhibiteurs naturels de protéases comme HAI-1 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor-1*), inhibiteur endogène puissant de quelques TTSPs comme la matriptase, l'hepsine (Bugge *et al.*, 2009) et TMPRSS13 (Hashimoto *et al.*, 2010). HAI-1 a été initialement identifié et isolé à partir d'une lignée cellulaire de carcinome d'estomac

humain (MKN45) comme inhibiteur de HGFA (*hepatocyte growth factor activator*) et du facteur de coagulation sanguine XII, deux protéases à sérine activatrices du facteur de croissance pro-HGF/SF (Denda *et al.*, 2002). HAI-1 présente un domaine C-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire, et un domaine N-terminal extracellulaire dans lequel on retrouve deux domaines kunitz I et II séparés par un domaine LDLRA (Figure 13A). Les domaines kunitz ont été initialement découverts comme étant des inhibiteurs de trypsine pancréatique chez les bovins, et sont responsables de l'inhibition des protéases à sérine (Shimomura *et al.*, 1997). La spécificité de HAI-1 pour les protéases à sérine de type trypsine dépend des résidus des domaines kunitz dans le site actif. Il a été identifié que le résidu Arg²⁶⁰ pour le domaine kunitz I et le résidu Lys³⁸⁵ pour le domaine kunitz II sont importants pour une forte inhibition des protéases à sérine (Denda *et al.*, 2002). Peu après la découverte de HAI-1, la formation d'un complexe avec matriptase a été isolé à partir du surnageant de culture cellulaire, évoquant un rôle de HAI-1 dans l'inhibition de matriptase. Cette idée a été renforcée suite à de récentes études réalisées chez la souris qui ont révélé un rôle essentiel de l'inhibition de la matriptase dans le développement embryonnaire (Szabo *et al.*, 2008). L'utilisation d'un modèle moléculaire des domaines kunitz de HAI-1 au sein de la structure cristalline du site actif de la matriptase suggère que c'est le domaine kunitz I qui est responsable de l'inhibition de la matriptase (Zhao *et al.*, 2013). Cette étude montre que le résidu Arg²⁶⁰ du domaine kunitz I est responsable de l'activité inhibitrice envers la matriptase, en interagissant avec le second site de liaison chargé négativement avec le résidu Asp¹⁸⁹ dans la poche S1 de liaison de la matriptase. Ces prévisions ont été confirmées par des études de mutagenèse dirigée de HAI-1 et par l'effet inhibiteur du domaine kunitz sur la matriptase avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de 1.7 nM. La protéine HAI-2 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor-2*) a également été caractérisée comme un nouvel inhibiteur endogène puissant de type kunitz de la matriptase avec un IC₅₀ de 0.5 nM (Szabo *et al.*, 2008).

Les serpins sont également des inhibiteurs endogènes de protéases. La plupart des serpins ciblent les protéases à sérine (Bauman *et al.*, 2002). Il existe plusieurs membres de la famille des serpins comme α_1 -antitrypsin (*SERPINA1*), α_1 -antichymotrypsin (*SERPINA3*), antithrombin III (*SERPINC1*), plasminogen activator inhibitor-1 (*SERPINE1*) and α_2 -antiplasmin (*SERPINF2*). La matriptase a été identifiée dans le lait maternel en complexe avec les serpins AT III, α_1 -AT et α_2 -AP, suggérant que l'activité protéolytique de la matriptase

peut être contrôlée par des serpins sécrétées autres que HAI-1 et HAI-2 (Tseng *et al.*, 2008). L'activité enzymatique de la matriptase, évaluée *in vitro* en présence des serpins, renforce davantage l'idée que ces inhibiteurs s'ajoutent aux inhibiteurs endogènes de la matriptase (Béliveau *et al.*, 2009).

1.5.2 Anticorps monoclonaux

La localisation de la matriptase à la surface cellulaire fait de celle-ci une cible accessible pour les macromolécules. Par conséquent, les anticorps monoclonaux humanisés ont été utilisés comme inhibiteurs. Ces derniers ont l'avantage d'être en général plus affins et sélectifs que d'autres types d'inhibiteurs. De plus, plusieurs anticorps monoclonaux thérapeutiques principalement orientés vers les facteurs de croissance ou des récepteurs ont été approuvés par la FDA pour le traitement de différentes maladies incluant les cancers, les maladies inflammatoires ou les infections (Dimitrov et Marks, 2009). Les anticorps monoclonaux sont des protéines hétérodimériques possédant une simple chaîne variable (scFv) constituée uniquement de régions variables lourdes et légères (V_L et V_H) reliées entre elles par un espaceur peptidique. Une approche de *phage display* a permis d'identifier des protéines scFv qui bloquent efficacement le site actif de la matriptase et ce de manière sélective avec des valeurs de K_i allant de 50 pM à 130 nM (Sun *et al.*, 2003), (Farady *et al.*, 2007). Ces anticorps constituent une approche pour la découverte d'inhibiteurs de protéases puissants et sélectifs de différentes cibles ou encore comme outils diagnostiques ou thérapeutiques. Toutefois, les macromolécules, y compris les anticorps, présentent une biodisponibilité orale quasi nulle en raison de leur poids moléculaire élevé, leur polarité et leur nature peptidique, et sont administrés par voie intraveineuse. Pour pallier à ce problème de biodisponibilité orale, de nombreux groupes se sont donc intéressés à développer de petites molécules ayant des propriétés médicamenteuses adéquates.

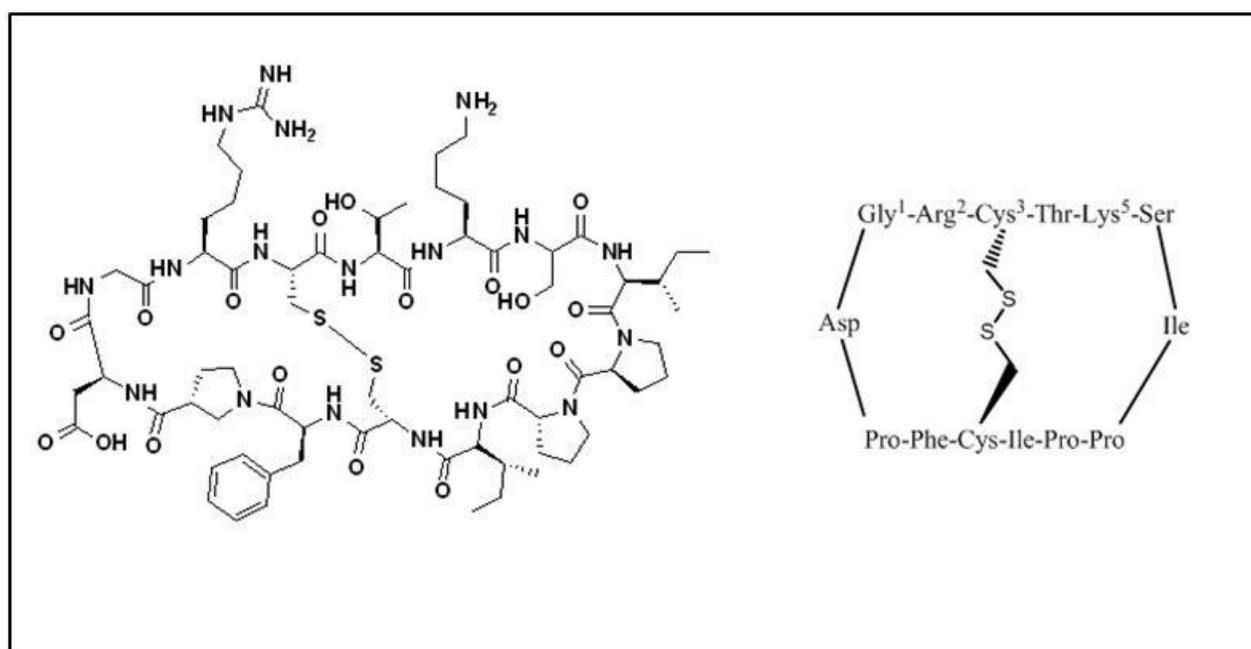
1.5.3 Inhibiteurs d'origine bactérienne et végétale

Il existe des inhibiteurs naturels de protéases d'origine végétale ou bactérienne, qui font partie des mécanismes de défenses des plantes ou des bactéries. L'écotine issue de la bactérie *Escherichia coli* s'est révélée être un inhibiteur puissant de diverses protéases à sérine (Chung *et*

al., 1983), dont la matriptase avec une valeur de K_i de 782 pM (Uhland, 2006). Les inhibiteurs de *Bowman-Birk* issus des graines de plantes sont également des inhibiteurs de protéases à sérine. Parmi les inhibiteurs de *Bowman-Birk*, le SFTI-1 (*sunflower trypsin inhibitor-1*) isolé à partir des plants de tournesol, un peptide bicyclique composé de 14 acides aminés possédant un pont disulfure, est un inhibiteur naturel puissant de la trypsine avec un K_i de 0.1 nM (Figure 15).

Figure 15. Structure de l'inhibiteur SFTI-1.

Image adaptée de (Long *et al.*, 2001).



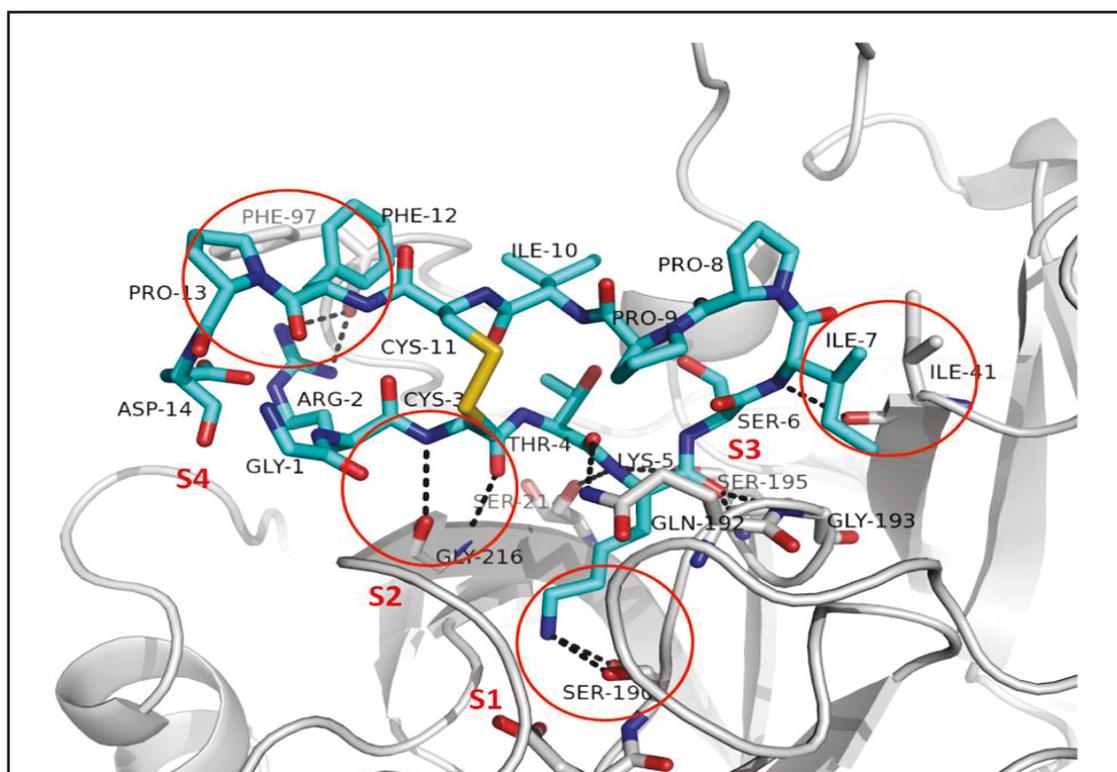
Récemment, le SFTI-1 s'est révélé également comme inhibiteur puissant de la matriptase avec une valeur de K_i de 0.92 nM (Long *et al.*, 2001). Le groupe de Ngo a réalisé une structure cristalline du complexe SFTI-1/matriptase (*Protein Data Banque* (PDB) ID: 1EAX) (Yuan *et al.*, 2011) (Figure 16). Ce complexe montre que le résidu Lys⁵ de SFTI-1 crée des ponts hydrogènes avec l'atome d'oxygène des résidus carbonyle et hydroxyle de la chaîne latérale du résidu Ser¹⁹⁰ dans le site actif S1 de la matriptase. Le résidu Cys³ est engagé dans une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle du résidu Gly²¹⁶ au niveau de la poche S2. Le résidu Arg², possédant un groupement guanidinium sur sa chaîne latérale, forme une liaison hydrogène avec le groupe carbonyle du résidu Phe⁹⁷ de la chaîne principale, ainsi que des interactions *cation- π* au niveau du

site S3/S4 de la matriptase avec le résidu Phe⁹⁷. Le remplacement du résidu Arg² de STFI-1 par une phénylalanine ou une glutamine réduit fortement l'inhibition, ce qui suggère l'importance de ce résidu (Li *et al.*, 2007). Cette structure du complexe SFTI-1/matriptase constitue un bon point de départ pour la conception de nouveaux inhibiteurs de la matriptase (Fittler *et al.*, 2014), (Quimbar *et al.*, 2013), (Avrutina *et al.*, 2012), (Yuan *et al.*, 2011).

Malgré le fait que ces produits naturels inhibent fortement la matriptase, ils possèdent une faible sélectivité pour cette enzyme. En effet, HAI-1 est aussi connu pour bloquer l'activité protéolytique de plusieurs protéases à sérine comme la trypsine (IC₅₀ 0.7 nM), l'hepsine (IC₅₀ 6.7 nM) et le HGFA (IC₅₀ 4.0 nM). La famille des serpinine inhibe aussi le domaine catalytique de plusieurs autres TTSPs (matriptase-2, matriptase-3, hepsine et DESC1) (Béliveau *et al.*, 2009), (Bugge *et al.*, 2009). Le SFTI-1 est également reconnu pour inhiber d'autres protéases à sérine comme les kallikréines (Shariff *et al.*, 2014), (Swedberg *et al.*, 2009). En raison de leur faible sélectivité pour la matriptase, des effets secondaires peuvent être associés à ces inhibiteurs. Par conséquent, l'utilisation de ces inhibiteurs endogènes comme des outils thérapeutiques demeure à ce jour limitée.

Figure 16. Structure du complexe SFTI-1/matriptase.

Modèle 3D de SFTI-1 (bleu) interagissant avec le site actif de la matriptase (gris). Interaction des résidus clés des poches S4-S1 de la matriptase avec les résidus aux positions P4-P1 de l'inhibiteur (cercle rouge). Image modifiée de (Yuan *et al.*, 2011)



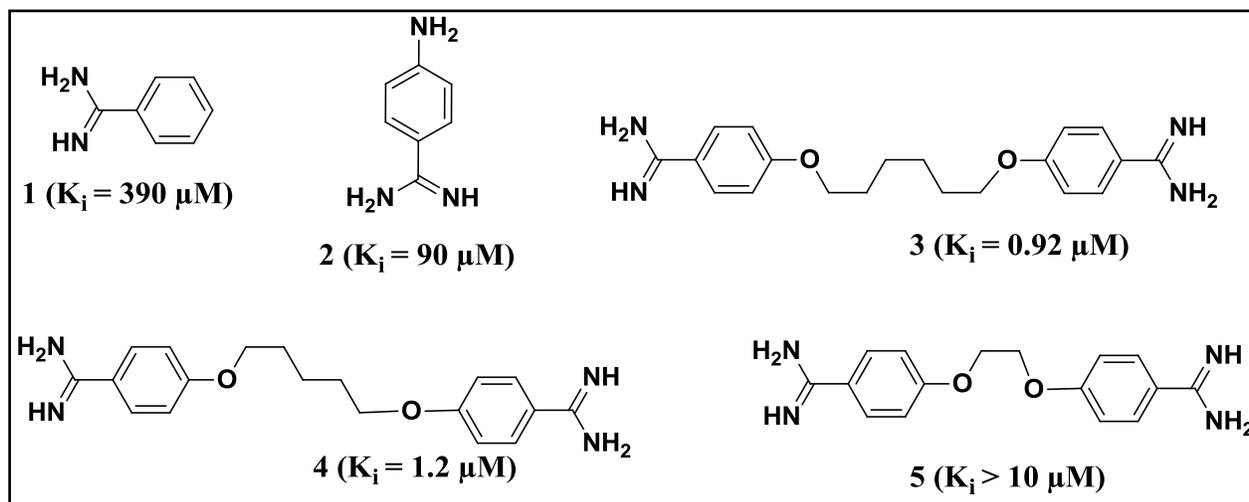
1.6 LES INHIBITEURS SYNTHÉTIQUES DE LA MATRIPTASE

1.6.1 Dérivés de la benzamidine

L'une des toutes premières classes de petites molécules inhibant la matriptase sont les benzamidines **1** et **2**, qui possèdent des valeurs de K_i respectives de 390 et 90 μM (Enyedy *et al.*, 2001) (Figure 14). La formation de dimères de benzamidine (bis-benzamidine ou hexamidine), composé **3**, permet d'améliorer l'inhibition de la matriptase (K_i 0.92 μM). De plus, la distance entre les deux benzamidines apparaît comme un facteur déterminant de l'inhibition, composé **4**: K_i 1.2 μM , composé **5**: $K_i > 10 \mu\text{M}$ (Enyedy *et al.*, 2001). Bien que certains composés montrent une légère sélectivité pour la matriptase vs la thrombine, la sélectivité demeure faible vs d'autres protéases à sérine.

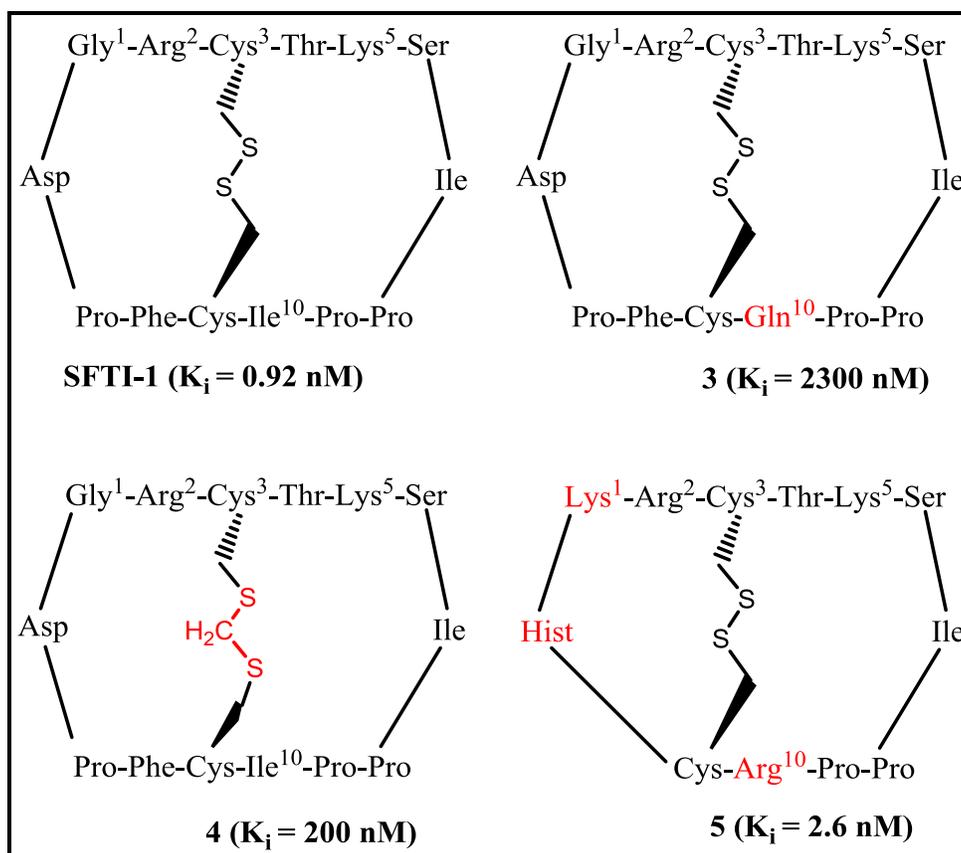
Figure 17. Structure des benzamidines.

Figure tirée de (Enyedy *et al.*, 2001).



1.6.2 Peptides cycliques analogues du SFTI-1

Basé sur SFTI-1 (Figure 18), l'équipe de Roller a exploré la RSA de peptides bicycliques dans le but d'améliorer d'une part la puissance d'inhibition, la sélectivité pour matriptase versus d'autres protéases, et d'autre part la stabilité métabolique des peptides, sachant que le pont disulfure est un point faible au niveau métabolique (Li *et al.*, 2007). Dans cette optique, leurs études démontrent l'importance des résidus Arg² et Lys⁵ de SFTI-1 (Figure 18), car de légères modifications de ces résidus peuvent affecter l'inhibition et la sélectivité pour la matriptase. Par exemple, le remplacement du résidu Lys⁵ par un résidu homolysine (hLys⁵) diminue l'inhibition de façon significative, ce qui démontre l'impact de la longueur de chaîne sur l'inhibition.

Figure 18. SFTI-1 et ses analogues.Structures tirées de (Fittler *et al.*, 2014).

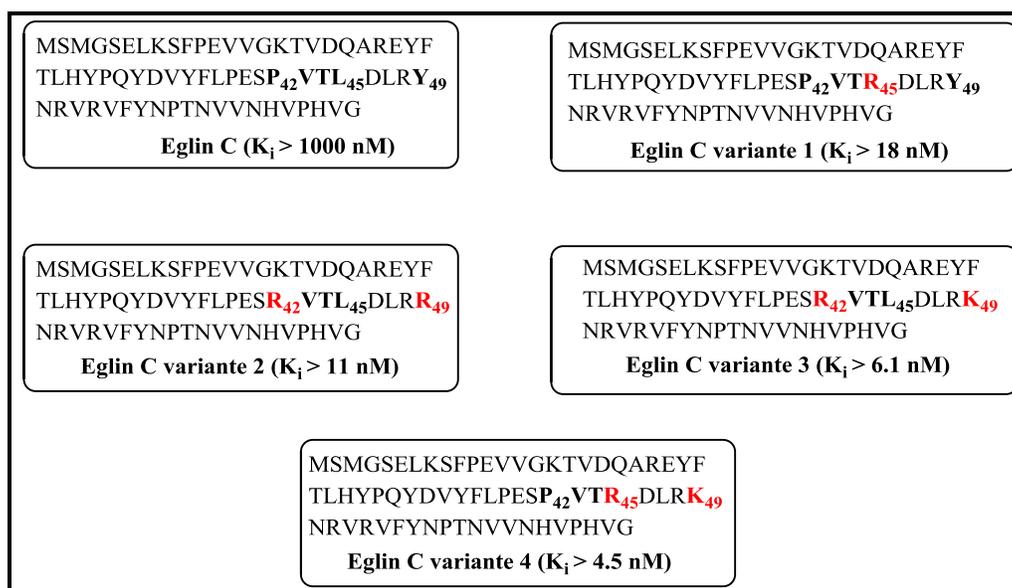
Autre point intéressant, le simple remplacement du résidu Ile¹⁰ par un résidu polaire tel que Gln¹⁰ (composé **3**) se traduit par une augmentation de la sélectivité pour la matriptase ($K_i = 2300$ nM) vs la thrombine ($K_i > 2500$ μ M). Ceci indique qu'à cet endroit, les résidus polaires sont moins préférés pour la thrombine. Cette différence offre une excellente opportunité d'ajuster la sélectivité pour la matriptase par rapport à la thrombine. En outre, le composé **4**, grâce à l'introduction d'un pont méthylènedithioéther, conserve une forte inhibition pour la matriptase ($K_i = 200$ nM) et une meilleure stabilité (Li *et al.*, 2007). L'optimisation d'inhibiteurs de matriptase basés sur le peptide cyclique SFTI-1 a récemment été rapportée par le groupe de Klomar, et a généré de puissants inhibiteurs, dont le composé **5** ($K_i = 2.6$ nM) (Fittler *et al.*, 2014), (Quimbar *et al.*, 2013), (Avrutina *et al.*, 2012), (Yuan *et al.*, 2011).

1.6.3 Peptides dérivés de eglin C

Les variantes de la protéine eglin C (Figure 19) ont été identifiées comme étant des inhibiteurs de plusieurs protéases à sérine, y compris élastase (Baici et Seemuler, 1984), chymotrypsine (Ascenzi *et al.*, 1988), trypsine (Heinz *et al.*, 1992) et la protéine pro-convertase (furine) (Komiyama et Fuller, 2000). L'équipe de Leduc ont exploré la RSA des variantes d'eglin C (séquence P4-P'4, P₄₂VTL₄₅-DLRY₄₉) dans le but de découvrir de puissants inhibiteurs de la matriptase (Figure 19) (Désilets *et al.*, 2006). Dans cette idée, leurs travaux ont démontré que le remplacement du résidu Leu (L₄₅) par le résidu Arg en position P1 améliore l'inhibition pour la matriptase ($K_i > 1000$ nM vs 18 nM). De plus, les variantes 2 et 3 de eglin C avec la substitution des résidus Pro(P₄₂) et Tyr(Y₄₅) par des résidus basiques (Arg ou Lys) aux positions P4 et P'4 augmentent également l'inhibition envers la matriptase avec K_i de 11 et 6.1 nM, respectivement. Ces résultats suggèrent que l'enzyme a une préférence pour des résidus basiques à ces positions. Autre fait intéressant, la variante 5 de eglin C avec un résidu Arg en P1 et une Lys en P'4 affiche une bonne sélectivité pour la matriptase (K_i 4.5 nM) par rapport à la furine ($K_i > 1000$ nM) et HAT ($K_i > 1000$ nM). Cette différence procure un point d'ancrage pour moduler la sélectivité pour la matriptase par rapport à la furine et HAT.

Figure 19. Eglin C et ses variantes.

Structures modifiées de (Désilets *et al.*, 2006).

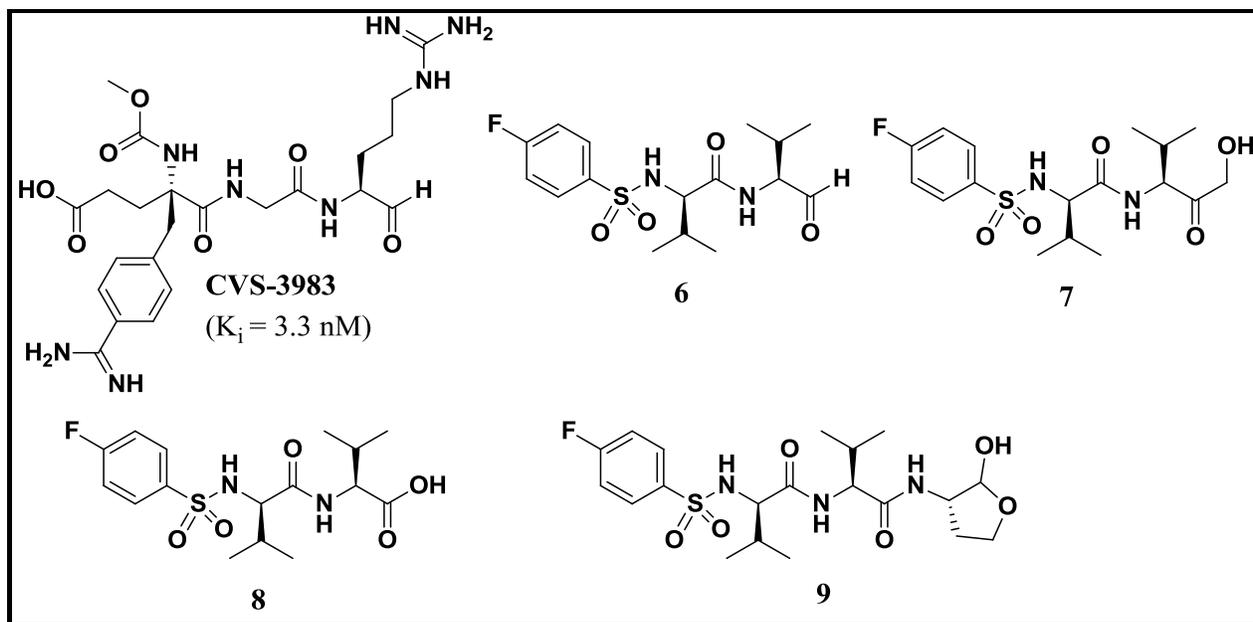


1.6.4 CVS-3983

Le composé CVS-3983 (Figure 20), a été décrit comme le tout premier inhibiteur peptidomimétique puissant et sélectif pour la matriptase, avec une valeur de K_i de 3.3 nM comparé aux autres protéases telles que facteur Xa, plasmine, tPA, et uPA avec des $K_i > 1 \mu\text{M}$ (Galkin *et al.*, 2004). L'introduction d'une fonction aldéhyde à l'extrémité C-terminale sert d'électrophile et permet de piéger le résidu Ser¹⁹⁵ catalytique pour créer un lien covalent réversible sous la forme d'une fonction hémiacétal. D'ailleurs, l'introduction de la fonction aldéhyde au niveau du domaine C-terminal est utilisée comme point de départ pour le design d'inhibiteurs compétitifs puissants de plusieurs protéases à sérine, comme dans le cas des inhibiteurs de la thrombine (Rebello *et al.*, 1997) ou des cathepsines L et K (Woo *et al.*, 1995), (Votta *et al.*, 1997). Outre ses propriétés inhibitrices, le CVS-3983 a démontré sa capacité à réduire la croissance tumorale dans un modèle murin de xéno greffe de cancer de la prostate où la matriptase est fortement surexprimée (Galkin *et al.*, 2004). Ce résultat supporte le ciblage de la matriptase pour le traitement du cancer de la prostate. Cependant, la présence d'un électrophile réactif tel que l'aldéhyde dans de nombreux inhibiteurs réversibles peut conduire à une instabilité chimique. L'étude pharmacocinétique du groupe de Inoue sur un inhibiteur de calpain possédant une fonction aldéhyde, le composé **6** (Figure 16), révèle que cette dernière est rapidement réduite en alcool, composé **7** ou oxydé en acide carboxylique, composé **8** (Shirasaki *et al.*, 2006). Pour pallier à ce problème d'instabilité, l'aldéhyde du composé **6** a été remplacé par un hémiacétal cyclique plus stable chimiquement, le composé **9**, et avec une meilleure stabilité *in vitro* (Shirasaki *et al.*, 2006).

Figure 20. Le CVS-3983 et les inhibiteurs de calpain.

Structures inspirées de (Galkin *et al.*, 2004), (Shirasaki *et al.*, 2006).

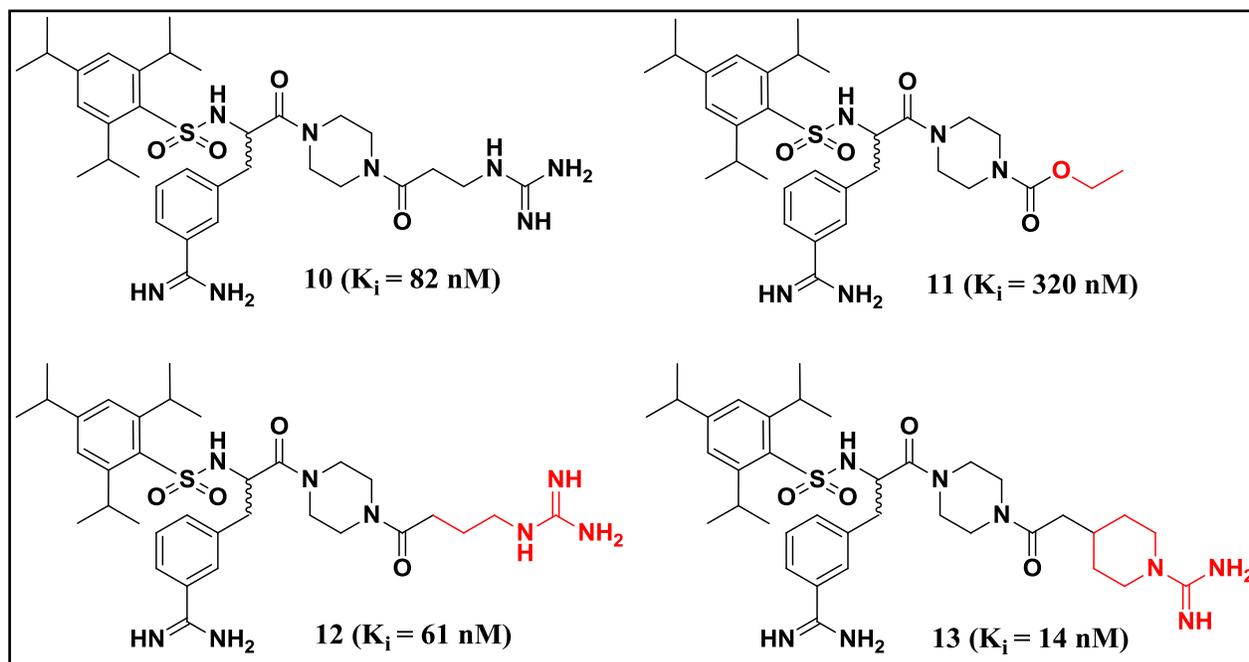


1.6.5 Dérivés d'amidinophénylalanine sulfonylés

Le dérivé 3-amidinophénylalanine **10**, décrit initialement comme inhibiteur d'urokinase (uPa) et de thrombine (Stürzebecher *et al.*, 1999), inhibe également la matriptase (K_i 82 nM) (Steinmetzer *et al.*, 2006) (Figure 21). À partir de cette structure, des modifications en C-terminal et N-terminal ont été réalisées dans le but d'améliorer l'inhibition et la sélectivité. La présence d'un résidu guanidine à l'extrémité C-terminale semble être importante pour conserver une forte inhibition puisque le simple changement de ce motif basique par un groupement éthyloxycarbonyle réduit fortement l'inhibition du composé **11** (K_i 0.32 μM). Ce résultat démontre l'importance du motif guanidine en C-terminal en plus de celui présent en N-terminal, ce qui est en accord avec la possibilité d'une interaction ionique avec le résidu Asp¹⁸⁹ dans la poche de liaison S1 de la matriptase. L'élongation de la chaîne alkyle du motif guanidine au niveau du C-terminal n'affecte pas la puissance de l'inhibiteur **12** (K_i 61 nM), alors que sa cyclisation l'améliore, comme illustré par le composé **13** qui possède une valeur de K_i de 14 nM.

Figure 21. La 3-amidinophénylalanine sulfonylée et ses dérivés en C-terminal.

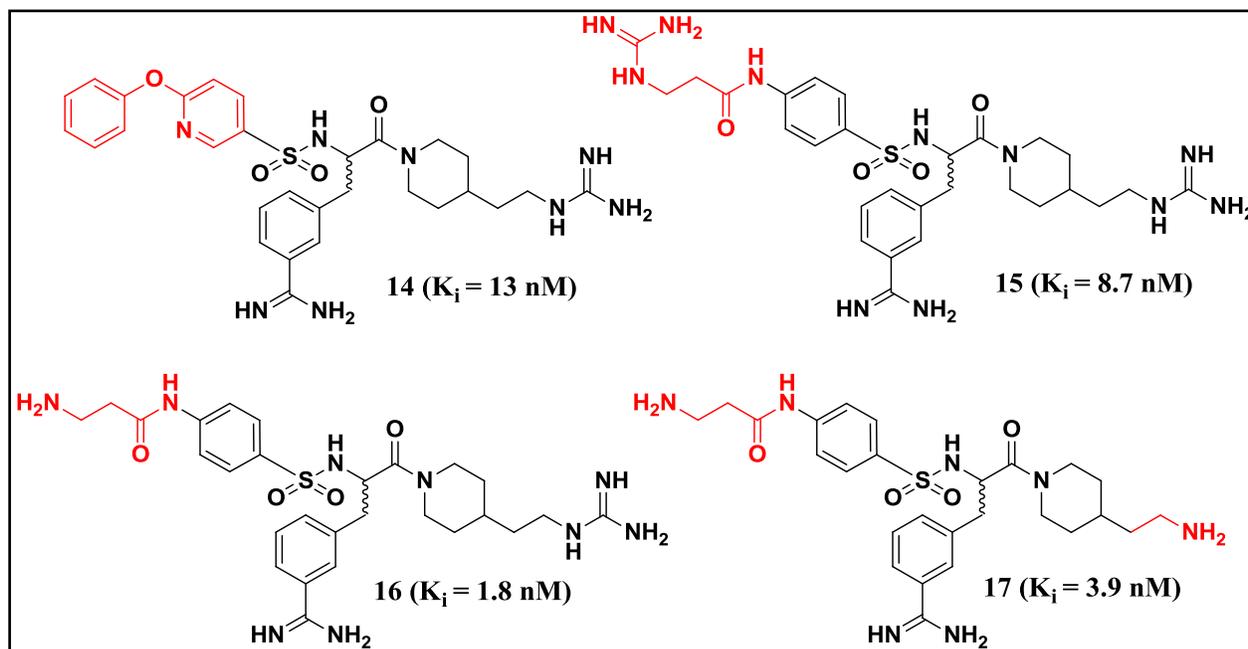
Structures inspirées de (Stürzebecher *et al.*, 1999) et (Steinmetzer *et al.*, 2006).



Par ailleurs, la synthèse d'analogues possédant des fonctions phénylesulfonamides substituées au niveau de l'extrémité N-terminale a permis de conserver la puissance inhibitrice, par exemple le composé **14** possédant deux groupements aryles séparés par un atome d'oxygène présente une valeur de K_i de 13 nM. Plus marqué encore est l'effet obtenu avec les résidus basiques des composés **15** et **16** (K_i 8.7 nM et 1.8 nM) (Figure 22). L'inhibition croissante envers la matriptase avec ces résidus basiques résulte des liaisons hydrogènes avec les atomes d'oxygène du carbonyle ou d'interactions *cations- π* avec les résidus Trp²¹⁵, Phe⁹⁹, et Phe⁹⁷ de la poche S4 (Steinmetzer *et al.*, 2006) (Yuan *et al.*, 2011). Outre la puissance, le profil de sélectivité pour la matriptase par rapport aux protéases à sérine de type trypsine a été nettement amélioré avec la 3-amidinophénylalanine tribasique **17**, inhibant la matriptase avec une valeur de K_i de 3.9 nM comparée à des valeurs supérieures à 1 μM pour thrombine, facteur Xa, plasmine et uPa.

Figure 22. La 3-amidinophénylalanine sulfonylée et ses dérivés en N-terminal.

Structures inspirées de (Steinmetzer *et al.*, 2009).

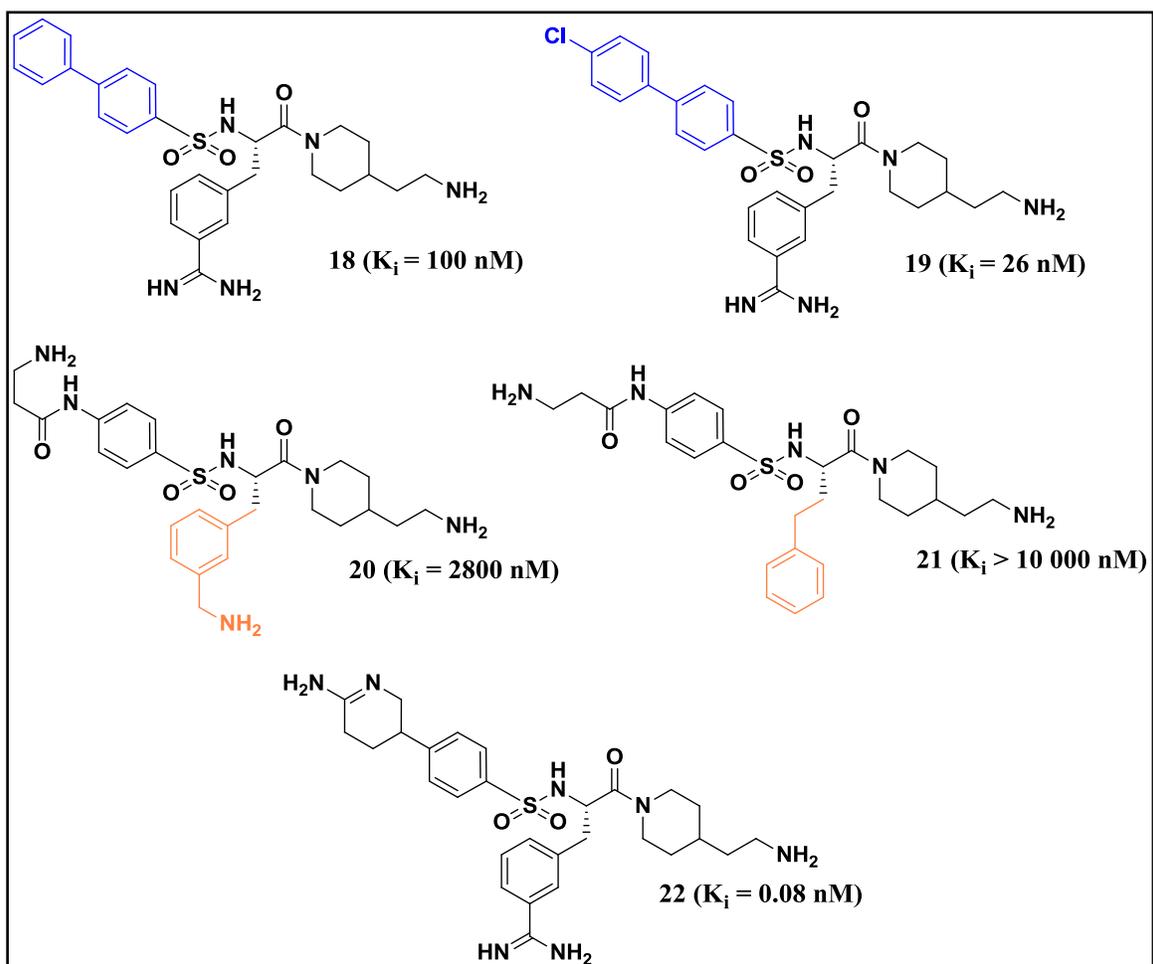


Cependant, les inhibiteurs possédant plusieurs motifs basiques présentent un niveau de biodisponibilité orale très limité. Par exemple, les inhibiteurs du facteur de coagulation FVII présentent une amidine ou une benzamidine hautement basique en position P1 et peuvent former un pont salin avec le résidu Asp¹⁸⁹ dans sa poche de liaison S1. Malgré la contribution significative des groupements fonctionnels basiques au niveau de l'inhibition, à pH physiologique, elles sont sous leur forme protonée et par conséquent présentent une faible biodisponibilité orale due à une absorption limitée dans le tractus-gastro-intestinal. Une des propositions suggérées (Steinmetzer *et al.*, 2009) pour réduire le caractère basique de ces molécules est d'incorporer au niveau du N-terminal une variété de groupements biphenyle sulfonyle substitués ou non substitués. L'ajout d'un phényle non substitué, composé **18** (K_i 100 nM), diminue la puissance d'inhibition et réduit la sélectivité vis à vis de la plasmine (K_i 500 nM), tandis que la substitution en position para du résidu phényle, composé **19**, montre un meilleur profil d'inhibition pour la matriptase (K_i 26 nM) (Figure 23). Dans le but de réduire la basicité, le remplacement du groupement amidine en P1 par des résidus aminométhylène en position para **20** (K_i 2800 nM) ou par un résidu homophénylalanine **21** ($K_i > 10\ 000 \text{ nM}$) diminue

considérablement la puissance inhibitrice. Cette perte d'inhibition pourrait s'expliquer par l'élimination du pont salin avec le résidu Asp¹⁸⁹ ou encore des interactions hydrogènes avec la Gly²¹⁹ ou la Ser¹⁹⁰ (Yuan *et al.*, 2011). Néanmoins, l'inhibiteur le plus puissant (K_i 80 pM) demeure l'analogue **22** avec les motifs multibasiques.

Figure 23. Les autres dérivés de la 3-amidinophénylalanine sulfonée.

Structures tirées de (Steinmetzer *et al.*, 2009)



En résumé, plusieurs inhibiteurs synthétiques de la matriptase ont été développés. Il faut noter que dans ces études, aucune donnée de sélectivité vs d'autres TTSPs n'a été rapportée. La sélectivité est une étude cruciale dans le développement d'inhibiteurs de protéases, car l'inhibition simultanée d'autres TTSPs peut être la cause d'effets indésirables. Il existe donc un besoin de développer de nouveaux inhibiteurs de la matriptase à la fois puissants mais sélectifs envers d'autres TTSPs.

1.7 PROJET DE RECHERCHE

1.7.1 Problématique/Hypothèse

La matriptase, protéase de la famille des TTSPs, est considérée comme une cible attrayante en raison de ses rôles importants dans le développement de différentes pathologies, incluant les cancers épithéliaux (LeBeau *et al.*, 2013), (List *et al.*, 2009), l'arthrose (Milner *et al.*, 2010) et l'influenza (Hamilton *et al.*, 2012), (Beaulieu *et al.*, 2013). Récemment, les études des Prs Richter, Leduc et Marsault ont montré l'implication de la matriptase dans le clivage et l'activation de l'hémagglutinine, une protéine virale clé dans l'infectivité du virus de l'influenza H1N1 (Beaulieu *et al.*, 2013). C'est donc vers cette cible que nos efforts se sont tournés.

Tel que résumé ci-dessus, plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur le développement d'inhibiteurs de la matriptase, toutefois la sélectivité de ces inhibiteurs est soit faible, soit elle n'a pas été étudiée contre d'autres TTSPs. Or, pour une application thérapeutique, la molécule désirée doit présenter une puissante inhibition, une forte sélectivité pour la matriptase par rapport à d'autres protéases, particulièrement au sein de la famille des TTSPs, et un bon profil de pharmacocinétique. Le travail présenté ci-après a comme objectif principal la découverte d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la matriptase possédant une excellente inhibition et une forte sélectivité, et s'inscrit plus particulièrement dans une approche visant à valider la matriptase comme cible potentielle dans la lutte contre l'influenza.

L'hypothèse de recherche de ce travail est que l'utilisation d'inhibiteurs de la matriptase permettrait de valider cette dernière comme une nouvelle cible pharmacologique pour le traitement de maladies (influenza, cancers, arthrose).

1.7.2 Objectifs

Objectif # 1. Développement de nouveaux inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase

Le premier objectif de ce travail (chapitre 1) est le développement d'inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase. Cet objectif se divise en deux sous-objectifs principaux :

- ❖ Sous-objectif # 1.1. Concevoir et synthétiser des inhibiteurs potentiels de la matriptase
- ❖ Sous-objectif # 1.2. Caractériser le profil d'inhibition et la sélectivité des composés envers la matriptase et d'autres protéases à sérine incluant les TTSPs

Objectif # 2. Optimisation d'inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase

Le deuxième objectif (chapitre 2) consiste à optimiser la puissance et la sélectivité pour la matriptase. Cet objectif se divise en trois sous-objectifs principaux :

- ❖ *Sous-objectif # 2.1. Synthèse de nouveaux inhibiteurs de la matriptase avec des acides aminés non naturels*
- ❖ *Sous-objectif # 2.2. Caractériser la puissance d'inhibition envers la matriptase*
- ❖ *Sous-objectif # 2.3. Étudier la sélectivité des inhibiteurs*

Objectif # 3. Découverte de nouveaux agents thérapeutiques anti-influenza

Le troisième objectif (chapitre 3) vise à caractériser l'efficacité des composés dans des modèles *in cellulo* et *in vivo* d'influenza. Cet objectif se divise en plusieurs sous-objectifs :

- ❖ *Sous-objectif # 3.1. Étudier l'inhibition de la réplication virale dans un modèle cellulaire d'influenza*
- ❖ *Sous-objectif # 3.2. Tester l'inhibition envers d'autres TTSPs activant les virus de l'influenza*
- ❖ *Sous-objectif # 3.3. Déterminer la stabilité et la toxicité des composés*
- ❖ *Sous-objectif # 3.4. Évaluer le potentiel des analogues dans un modèle murin d'influenza*

CHAPITRE 1. DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX INHIBITEURS PEPTIDOMIMÉTIQUES DE LA MATRIPTASE

2.1 ARTICLE. DESIGN AND SYNTHESIS OF POTENT, SELECTIVE INHIBITORS OF MATRIPTASE

Auteurs de l'article: Éloïc Colombo, Antoine Désilets, Dominic Duchêne, Félix Chagnon, Rafael Najmanovich, Richard Leduc and Éric Marsault.

Statut de l'article: Publié dans ACS Medicinal Chemistry Letters, le 11 avril 2012, édition 3, page 530-534. Disponible en ligne : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ml3000534>.

Avant-propos et implication dans le travail: Éloïc Colombo, Félix Chagnon et Éric Marsault, ont fait le design des inhibiteurs. Félix Chagnon a développé la synthèse du dérivé R-Q-A-R-Kbt (IN-1) de la première génération. Éloïc Colombo a optimisé la synthèse et la purification de tous les autres composés de l'article. Antoine Désilets a effectué les essais d'inhibition (cinétique enzymatique, constante d'inhibition, courbe de dissociation). Dominic Duchêne a fait la modélisation moléculaire du composé IN-1 dans le site actif de la matriptase. Éloïc Colombo a rédigé l'article avec l'aide des co-auteurs Antoine Désilet, Dominic Duchêne, Rafael Najmanovich, Richard Leduc, et Éric Marsault.

Résumé: La matriptase est une protéase à sérine transmembranaire de type II (TTSP) exprimée à la surface cellulaire des tissus épithéliaux. De nombreuses études démontrent qu'une dérégulation de l'expression de la matriptase est associée au développement de cancers épithéliaux. Elle apparaît comme une cible potentielle pour le traitement du cancer. Nous rapportons dans cette étude, l'identification d'une nouvelle classe d'inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase, basée sur sa séquence d'autoactivation peptidique P1-P4 (R-Q-A-R) de l'enzyme, à laquelle a été rajouté un piège à sérine de type céto benzothiazole, qui crée une liaison covalente réversible avec le résidu sérine catalytique de l'enzyme. Des études de RSA indiquent que IN-1 (composé 1) est un puissant inhibiteur de type lent et à forte liaison (*slow tight-binding*) et affiche un bon profil de sélectivité pour la matriptase versus d'autres protéases à sérine. Un modèle moléculaire de

l'inhibiteur **1** arrimé dans le site actif de la matriptase a été généré à partir de la structure cristalline publiée de la matriptase, montrant les interactions clés entre les résidus de l'inhibiteur et ceux de la pochette de liaison de matriptase.

2.1.1 Abstract

Matriptase belongs to the type II transmembrane serine protease (TTSP) family. Several studies have shown that the deregulation of matriptase expression is implicated in several types of epithelial cancers, suggesting that matriptase constitutes an attractive target for cancer therapy. We report herein a new series of slow, tight binding inhibitors, which mimic the P1-P4 substrate recognition sequence of matriptase. This series displays a high selectivity for matriptase versus other serine proteases.

2.1.2 Introduction

Cell-surface proteolysis is an important mechanism for the degradation or generation of biological effectors that engage various signalling pathways. Recently, a novel family of proteolytic enzymes called type II transmembrane serine proteases (TTSPs) have been found to play crucial roles in numerous physiological processes (Antalis *et al.*, 2011). In humans, the 17 members of this family are divided into four subfamilies: HAT/DESC, Hepsin/TMPRSS, Corin and matriptase (Antalis *et al.*, 2011). These transmembrane proteases are structurally defined by a cytoplasmic amino-terminal region, a transmembrane domain, a stem region that contains various functional domains, and a carboxyterminal extracellular serine protease domain of the chymotrypsin (S1) fold, characterized by the canonical histidine, aspartate, and serine catalytic triad essential for proteolytic activity. Matriptase, one of the most characterized TTSPs to date, is expressed in epithelial cells where it carries out essential functions in development, differentiation, and maintenance of epithelial barrier homeostasis. Matriptase knockout mice die shortly after birth due to severe dehydration caused by impaired epidermal barrier function, indicative of a crucial role in development (List *et al.*, 2002). Among the most recognized matriptase substrates are pro-hepatocyte growth factor (Lee *et al.*, 2000), pro-prostasin (Netzel-Arnett *et al.*, 2006), protease-activated receptor-2 (PAR-2), pro-urokinase plasminogen activator

(Takeuchi *et al.*, 2000), CUB domain-containing protein-1 (He *et al.*, 2010), and platelet-derived growth factor-D (Ustach *et al.*, 2010).

Like many other proteases, the inactive zymogen precursor of matriptase needs to be converted to its active form. This is achieved via an initial cleavage occurring at residue Gly¹⁴⁹, followed by an autoproteolytic cleavage at residue Arg⁶¹⁴ within the R-Q-A-R⁶¹⁴↓V-V-G-G sequence of the activation peptide of matriptase. Matriptase forms complexes with its cognate Kunitz type serine protease inhibitor, the hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1), which is involved in activation, inhibition, expression, and trafficking of the enzyme (Oberst *et al.*, 2005). Several studies have shown that the proteolytic activity of matriptase must be tightly regulated during development, and deregulated matriptase activity has been linked to various pathologies. For example, a rare genetic skin disorder, autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis (ARIH), was found to be caused by mutations in the matriptase coding region, leading to the production of an inactive protease (Basel-Vanagaite *et al.*, 2007), (Desilets *et al.*, 2008). Elevated levels of matriptase in osteoarthritis are thought to facilitate the induction of cartilage destruction (Milner *et al.*, 2010), while lowered levels have been detected in colonic epithelia of inflammatory bowel disease patients (Netzel-Arnett *et al.*, 2011). Matriptase is overexpressed in a variety of epithelial cancers (List *et al.*, 2009) and causes malignant transformations when orthotopically overexpressed in the skin of mice, suggesting a causal role in human carcinogenesis (List *et al.*, 2005). The latter findings suggest that deregulation of matriptase expression or activity is involved in the initiation and/or progression of cancer. Combined with its localization at the cellular surface of epithelial cells, matriptase appears as an attractive therapeutic target for the design and optimization of selective inhibitors to better understand its role in pathologies such as cancer. Several groups have been interested in the development of such inhibitors via different strategies (Galkin *et al.*, 2004), (Stoop et Craik, 2003), (Desilets *et al.*, 2006), (Li *et al.*, 2007), (Long *et al.*, 2001), (Enyedy *et al.*, 2001), (Jiang *et al.*, 2007), (Steinmetzer *et al.*, 2009), (Steinmetzer *et al.*, 2006), (Sisay *et al.*, 2010).

In this study, we report a new class of potent and selective peptidomimetic inhibitors of matriptase based on the P4–P1 (Arg-Gln-Ala-Arg) portion of the activation peptide of matriptase, to which was linked a carboxy-terminal serine trap in the form of a ketobenzothiazole group. The

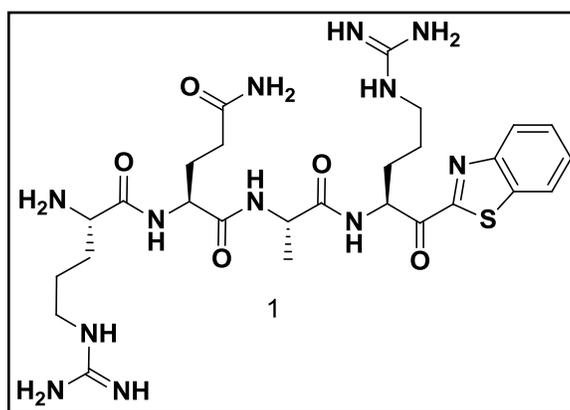
ketobenzothiazole serine trap was selected to form a covalent and reversible bond with the catalytic serine residue of the enzyme as reported by Costanzo *et al.* on thrombin (Costanzo *et al.*, 2005). The use of a serine trap is reminiscent of the recently approved HCV NS3-4A protease inhibitors Boceprevir and Telaprevir (Venkatraman *et al.*, 2006), (Kwong *et al.*, 2011). Herein, we report the synthesis, inhibitory activity, preliminary Structure–Activity Relationships (SARs), and selectivity of this new class of inhibitors and propose a molecular model of inhibitor **1** docked into the active site of matriptase.

2.1.3 Results and discussion

Synthesis

The inhibitor sequence is based on the natural autoactivation peptide sequence of matriptase Arg-Gln-Ala-Arg (R-Q-A-R) explored by our group (Béliveau *et al.*, 2009), to which was added a ketobenzothiazole serine trap (Figure 24).

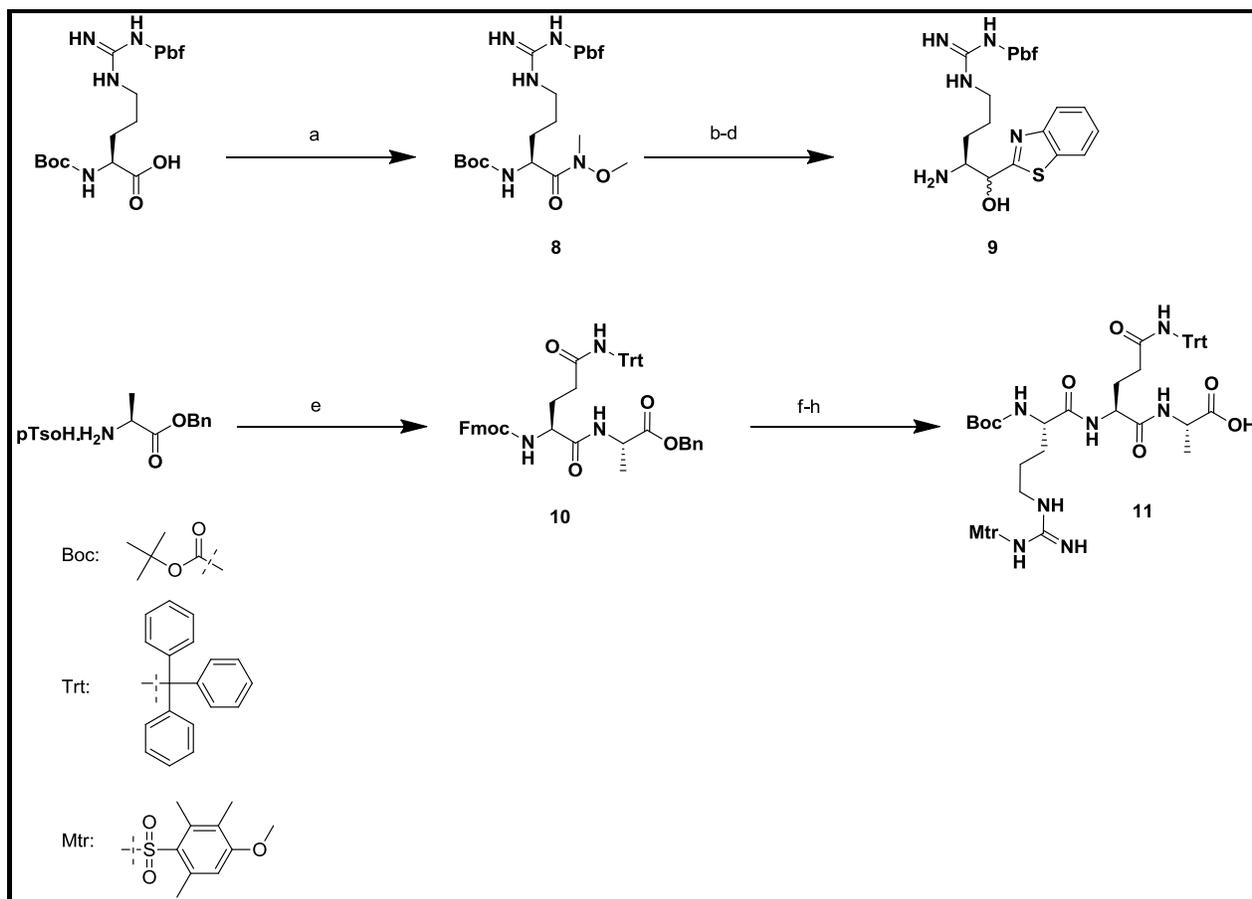
Figure 24. Chemical structure of inhibitor 1 (IN-1).



Synthetically, inhibitor **1** and its analogues were assembled similarly to the method reported by Costanzo *et al.* (Costanzo *et al.*, 2005) by peptide coupling of warhead-functionalized P1 fragment **9** with protected P4–P2 fragment **11** (Schemes 1 and 2). The synthesis of inhibitor **1** is shown as an example. First, fragment **9** carrying the serine trap was prepared from the corresponding Weinreb amide **8**, by addition of in situ generated 2-lithiobenzothiazole (Costanzo *et al.*, 2005). The resulting ketobenzothiazole was reduced in the same operation with NaBH₄ as a

means of protecting the electrophilic keto group, and then, the Boc group was deprotected by acidolysis. On the other hand, L-Ala benzyl ester tosylate was coupled with Fmoc-Gln(Trt)-OH using HATU to afford dipeptide **10**.

Scheme 1. Synthesis of tripeptide 11^a.

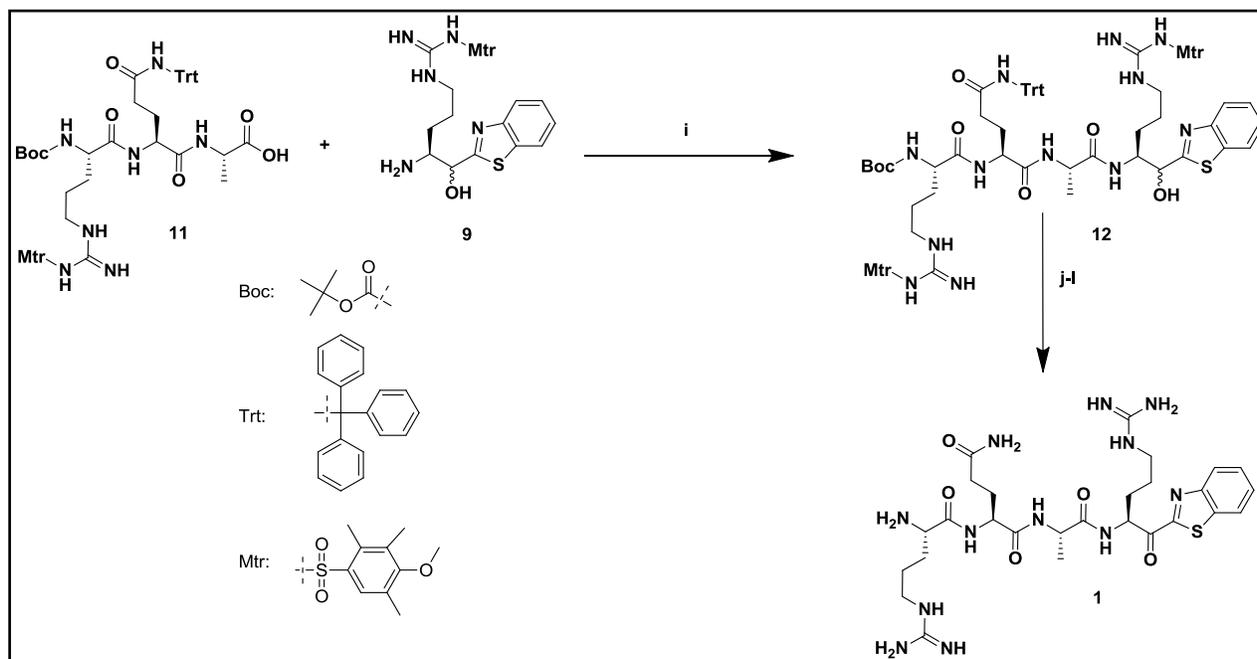


^aReagents and conditions : (a) HN(Me)OMe, HATU, DIPEA, THF, r.t; (b) Benzothiazole, n-Buli, THF, -78°C ; (c) NaBH₄ MeOH, -20°C ; (d) TFA/DCM 20:80, r.t; (e) Fmoc-Gln(Trt)-OH, HATU, DIPEA, THF, r.t; (f) Et₂NH/DCM 20:80, r.t; (g) Boc-Arg(Mtr)-OH, EDC-HOBt, DCM, r.t; (h) H₂, Pd/C (10%) EtOH, r.t.

After Fmoc removal, the crude dipeptide **10** was coupled with Boc-Arg(Mtr)-OH in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxybenzotriazole (HOBt) to give the corresponding fully protected tripeptide. Benzyl ester hydrogenolysis then generated the desired fragment **11**. Subsequent coupling of tripeptide **11** with warhead **9** provided intermediate **12** (Scheme 2). The tetrapeptide scaffold **12** was then

oxidized with 2-iodoxybenzoic acid (IBX) (Frigerio *et al.*, 1995) followed by final acidolysis of protective groups with HF. Compounds were generally obtained as a 8:2 mixtures of epimers (Costanzo *et al.*, 2005), which were separated by reverse-phase preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Structural analogues **2–7** (Table 1) were obtained according to the same synthetic method.

Scheme 2. Assembly of fragments 9 and 11^a.



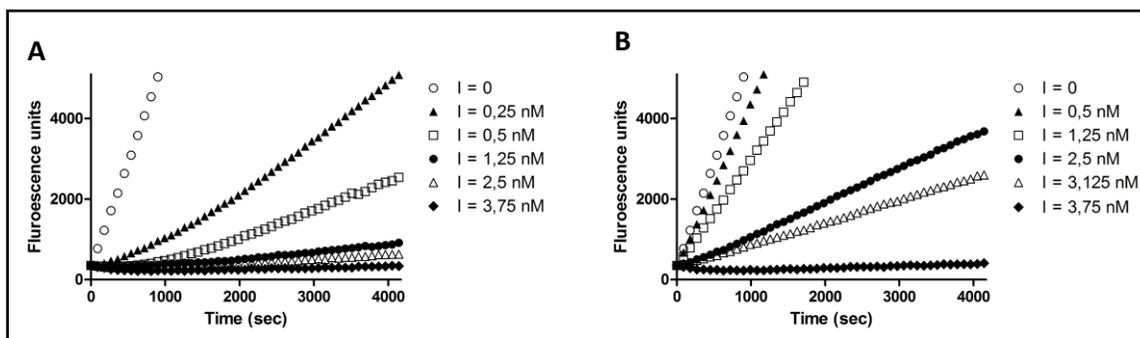
^aReagents and conditions : (i) HATU, DIPEA, DMF, r.t; (j) IBX, DMSO, r.t; (k) HF, anisole, 5 °C; (l) reverse phase prep HPLC.

Enzymatic kinetic

First, the inhibitory activity of tetrapeptide **1** toward matriptase was characterized. The progress curve for hydrolysis of a fluorogenic substrate (150 μ M) by matriptase (1 nM) in the presence of compound **1** (2.5 nM) displays a biphasic curve with a rapid initial phase and a slower, steady-state phase (data not shown), suggesting reversible slow, tight-binding, or irreversible inhibition. To further evaluate the inhibitor profile, the dissociation of the enzyme: inhibitor complex (EI) was investigated using dilution experiments (Bieth, 1995). Figure 24 reports the comparison of the dissociation curves for compound **1** (R-Q-A-R-Kbt) (Figure 25A)

and irreversible inhibitor Glu-Gly-Arg chloromethyl ketone (E-G-R-CMK) (Figure 25B). The dissociation curve of E-G-R-CMK displays a linear product versus time relationship, indicative of irreversible inhibition. Conversely, the dissociation curve of inhibitor **1** shows an exponential shape, suggesting dissociation of the EI complex. Together, these data confirm the formation of a slow, tight-binding, and reversible complex between inhibitor and enzyme, as initially designed.

Figure 25. Dissociation of EI complex^a.

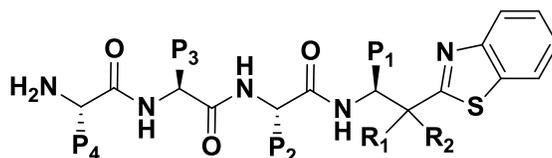


^aMatriptase and increasing concentrations of (A) IN-1 or (B) E-G-R-CMK were preincubated for 20 min at room temperature and diluted 2000 times in reaction buffer containing 400 μ M Boc-Q-A-R-AMC. The final concentration of matriptase is 0.25 nM and is varied as indicated for inhibitors. The proteolytic activity in the reaction buffer was measured as described in the materials and methods.

Inhibition

To further characterize matriptase inhibition by compound **1**, the inhibition constant (K_i) was determined using the Morrison equation for reversible tight-binding inhibition (Bieth, 1995). In these conditions, the R-Q-A-R-Kbt inhibitor **1** showed high potency for matriptase, with a K_i of 0.011 nM (Table 1). A preliminary analysis of SARs was subsequently performed by exploring the critical P1 position. To confirm the importance of the keto group for matriptase inhibition, we measured the inhibitory activity of a reduced form of the R-Q-A-R-Kbt toward matriptase (compound **2**, Table 1). Reduced analogue **2** (3:2 mixture of diastereomers at the alcohol position, undetermined absolute stereochemistry) displayed very weak inhibition, as expected. Indeed, a stoichiometric ratio of I/E > 1000 was required to observe substantial inhibition, as testified by a K_i of 6.1 μ M, which contrasts with the much more potent oxidized form **1** and is consistent with a functional serine trap mechanism.

Tableau 1. Preliminary SAR.



Composé		Matriptase	
Séquence	R ₁ , R ₂	K _i (nM) ^a	
1	R-Q-A-R-Kbt	=O	0.01 ^{tb}
2	R-Q-A-R-Hbt	H, OH ^b	6124 ^{mm}
3	R-Q-A-K-Kbt	=O	9.5 ^{tb}
4	Q-A-R-Kbt	=O	0.088 ^{tb}
5	(CH ₃ CO)A-R-Kbt	=O	1.4 ^{tb}
6	(CH ₃ CO)R-Kbt	=O	457 ^{mm}
7	R-Q-A-(D)R-Kbt	=O	4.6 ^{tb}

^aK_i values were determined as described in the materials and methods (tb, tight binding; mm, mixed model). Measurements of enzymatic activity were performed in triplicate and represent the means ± standard deviations of at least three independent experiments. ^bA 3:2 mixture of diastereomers, absolute stereochemistry undetermined.

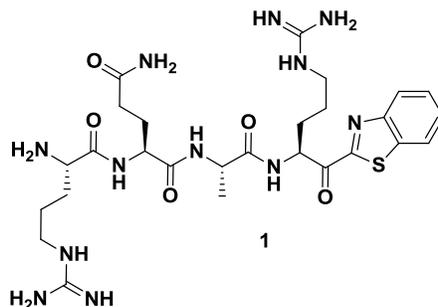
Table 1 reports the influence of structural variations of inhibitor **1** on matriptase inhibition. To ascertain the importance of stereochemistry at the P1 position, analogue R-Q-A-(D)R-Kbt **7** was tested and displayed a 400-fold lower inhibition. Next, it is known that the TTSPs have a preference for basic residues (Lys or Arg) in position P1 (Béliveau *et al.*, 2009). Accordingly, matriptase displays a preference for an Arg residue in position P1 by almost 3 orders of magnitude over Lys (**3** vs **1**, K_i 0.011 vs 9.5 nM). Furthermore, to better ascertain the respective contribution of the P4, P3, and P2 residues on the inhibitory profile, the peptidic portion was truncated by one, two, and three residues starting from the N-terminal extremity (analogues **4–6**). Deletion of the P4 residue gave a compound that conserves the profile of a tight-binding inhibitor, yet with an 8-fold decreased potency as compared to **1** (**4**, K_i 0.088 vs 0.011 nM). Inhibitor **5**, in which the P4 and P3 moieties were simultaneously deleted, remains a tight-binding inhibitor with 127-fold reduced potency as compared to **1** (K_i 1.4 vs 0.011 nM). Finally, inhibitor **6**, in which the P4–P2 tripeptide portion is removed, is dramatically less potent, with a K_i of 457 nM, over 30000-fold less potent than inhibitor **1**. Additionally, **6** no longer

behaves as a tight-binding inhibitor but as an inhibitor possessing a mixed mode of inhibition as determined by global fitting analysis for different modes of inhibition. Altogether, these results confirm the importance of residues at the P4–P2 positions for potent inhibition of matriptase.

Selectivity

The selectivity profile of inhibitor **1** for matriptase versus other serine proteases, including TTSPs, was subsequently determined (Table 2). Indeed, the selectivity of most published matriptase inhibitors has not been reported versus other TTSPs. Experimental K_i values were determined as described in the experimental procedures-supporting information (voir section ci-dessous 2.1.5) for inhibitor **1** against other TTSPs (hepsin, matriptase-2, HAT) and serine proteases (trypsin and thrombin). Selectivity was expressed as the ratio of K_i values. Compound **1** was found to be highly selective for matriptase versus other enzymes: trypsin (88-fold), hepsin (100-fold), matriptase-2 (300-fold), HAT (764-fold), thrombin (>30000-fold), and furin (no inhibition). This high level of selectivity of the R-Q-A-R-Kbt sequence for matriptase relative to other trypsin-like proteases is remarkable. Although at this stage the structural reasons for such selectivity are not elucidated, additional studies, including molecular modeling and crystallography, are underway to provide an explanation for this level of selectivity.

Tableau 2. Selectivity profile.



Proteases	K_i (nM) ^a	Selectivity (K_i other/ K_i matriptase)
Matriptase	0.011	
Matriptase-2	3.3	300
Hepsin	1.1	100
HAT (TMPRSS11D)	8.4	764
Trypsin	0.97	88
Thrombine	637	> 30 000
Furine	NI (10 μ M)	

^a K_i values were determined as described in the materials and methods (tb, tight binding; mm, mixed model; and NI, no inhibition). Enzymatic measurements were performed in triplicate and represent the mean \pm standard deviation of at least three independent experiments.

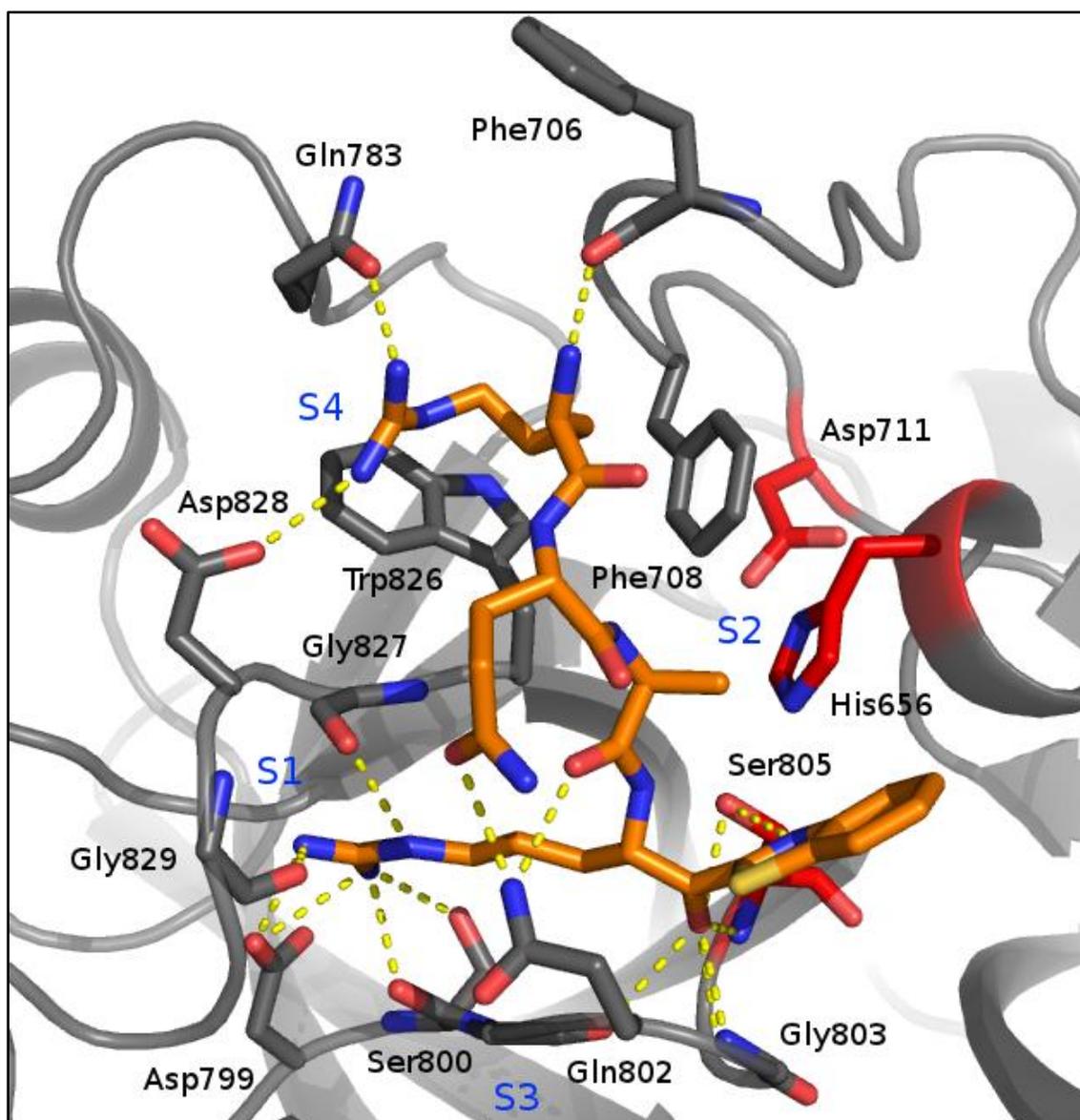
Molecular Modeling

To understand the preferred mode of docking of inhibitor **1** in the active site of matriptase and rationalize SARs, a molecular model of inhibitor **1** docked in the published X-ray structure of matriptase was built (Figure 26). According to this docking model, the side chain of residue Arg in P1 is highly stabilized in a network of hydrogen bonds, which includes a salt bridge with matriptase residue Asp⁷⁹⁹, a hydrogen bond with Ser⁸⁰⁵, and hydrogen bonds with the backbone amide of Gly⁸²⁷ and Gly⁸²⁹. This may account for the preference of Arg over Lys in P1, particularly since the S1 pocket seems to be best suited to accommodate the side chain of Arg instead of Lys, which is longer and possesses reduced hydrogen bond capability as compared to Arg. Residue Ala in P2 of inhibitor **1** lays over Phe⁷⁰⁸, which separates the S2 and the S4 pockets. This pocket is quite nonpolar due to the presence of the Phe⁷⁰⁸ residue. It can also accommodate larger residues, in agreement with our previous results on substrate preference, which

demonstrated that the S2 pocket could accommodate residues as large as Arg or Tyr (Béliveau *et al.*, 2009).

Figure 26. Docking of IN-1 in active site of matriptase.

Matriptase (Berman *et al.*, 2000) is shown in gray and residues within the active site. Inhibitor 1 is shown in orange. Catalytic triad residues are shown in red. The image was generated using Pymol (<https://www.pymol.org>). Numbers refer to matriptase numbering.



2.1.4 Conclusion

In conclusion, we herein report a new series of potent, peptidomimetic inhibitors of matriptase. We have demonstrated that a tetrapeptide scaffold based on the natural autoactivation sequence of matriptase is suitable for the design of potent slow, tight-binding inhibitors with sub-nanomolar potency. Moreover, inhibitor **1** possesses a high level of selectivity for matriptase versus other serine proteases, including TTSPs. Efforts are underway to further improve the profile of this inhibitor, to account for the observed level of selectivity and use it to validate the role of matriptase in several diseases.

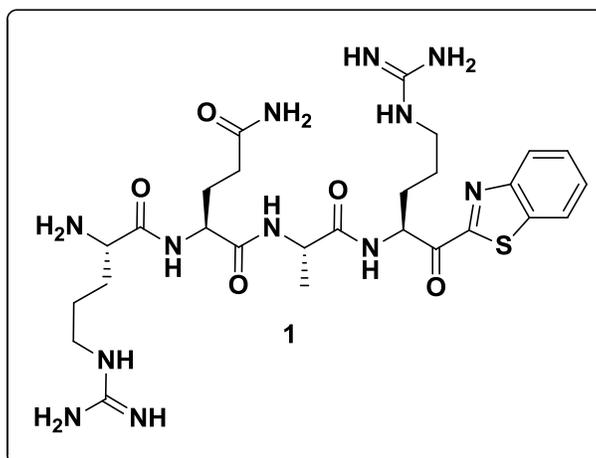
2.1.5 Experimental procedures-Supporting information

Chemistry-general methods

Amino acids and coupling reagents were obtained from Chem Impex International (USA) and used as received. All other reagents and solvents were purchased from Sigma–Aldrich (Canada) or Fisher Scientific (USA). Tetrahydrofuran (THF) was dried on sodium benzophenone ketyl; DCM on P₂O₅; Methanol on magnesium. Analytical HPLC experiments were performed on a Agilent 1100 series instrument equipped with UV detector set at 223 nm and an Agilent Eclipse Plus C18 column (3.0 x 50 mm, 1.8 mm spherical particle size column) with a linear gradient of 2-50% CH₃CN and H₂O containing 0.1% TFA (10 min), 50-100% (4 min), 100% (4 min), 100-2% (1 min) and 2% (3 min). Final products were purified to > 90% purity (HPLC-UV) by preparative HPLC (Beckman 126 instrument) using a Vydac C18, 250 x 22 mm ID, 5 μm particle size column and a linear gradient of acetonitrile containing 0.1% of TFA at a flow rate of 7 mL/min. All inhibitors were obtained as TFA salts after lyophilisation. Molecular weights of compounds were confirmed by mass spectrometry (Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on an ECX-300 (Bruker Inc., USA) at 300 MHz, and are referenced to internal solvent signals.

Synthetic methods

2-(2-Amino-5-carbamimidamidopentanamido)-N-(1-{[1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]carbamoyl}ethyl)pentanediamide (**1**)



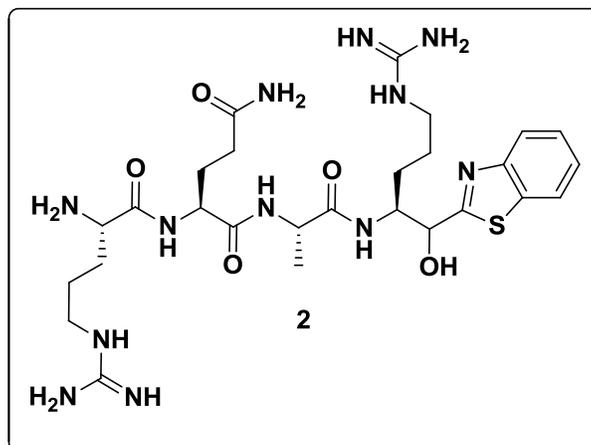
A mixture of Boc-Arg(Mtr)-Gln(Trt)-Ala-Arg(Mtr)-Kbt (1 eq, 206 mg, 0.15 mmol) and anhydrous anisole (200 μ L) was placed in a teflon reaction tube of an HF apparatus and cooled to -78°C . Anhydrous HF (15-20 mL) was condensed into the tube, and the temperature was increased to 0°C . The reaction mixture was stirred at 0°C for 3 h, concentrated *in vacuo*, and triturated with Et_2O (3 x 20 mL) to give a yellow solid. This solid was purified by reverse-phase HPLC, ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (70:30) + 0.1% TFA), which allowed the separation of two diastereoisomers (88:12). The major diastereomer **1** was obtained as a white solid after lyophilization (56 mg, 35%).

HPLC purity : 94%; HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_5\text{S}$, 647.3200, found 647.3228 ($(\text{M}+\text{H})^+$).

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 1.38 (d, 3 H) 1.49-1.58 (m, 2 H), 1.61-1.69 (m, 2 H), 1.73-1.92 (m, 2 H), 2.19-2.25 (m, 4 H), 3.09-3.23 (m, 1 H), 3.98 (t, 1 H), 4.23-4.32 (m, 2 H), 7.56-7.68 (m, 2 H), 8.11 (d, 1 H), 8.19 (d, 1 H).

^{13}C NMR (75.4 MHz, D_2O) δ 17.44, 24.12, 24.73, 25.02, 27.94, 33.22, 39.74, 54.66, 55.49, 74.38, 76.60, 121.76, 124.80, 125.94, 144.09, 173.49, 177.48, 177.96.

2-(2-Amino-5-carbamimidamidopentanamido)-N-(1-([1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-carbamimidamido-1-hydroxypentan-2-yl]carbamoyl)ethyl)pentanediamide (2)



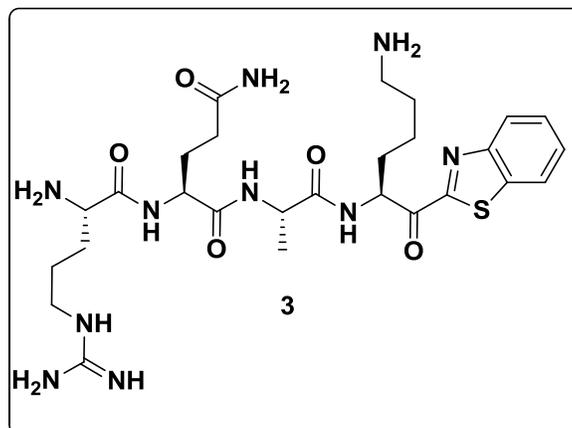
The same method as compound **1** was used to isolate compound **2**, which was obtained as a white solid (7.2 mg, 30%).

HPLC purity : 94%; HRMS calcd for C₂₇H₄₄N₁₂O₅S, 649.3351, found 649.3366 ((M + H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, D₂O). δ 1.07 (d, 3 H), 1.43-1.61 (m, 4 H), 1.70-1.99 (m, 4 H), 2.15-2.29 (m, 4 H), 3.00-3.18 (m, 1 H), 3.93 (t, 1 H), 4.04-4.13 (m, 1 H), 4.14-4.24 (m, 1 H), 5.02 (d, 1 H), 7.39-7.55 (m, 2 H), 7.89 (d, 1 H), 7.97-8.00 (m, 1 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, D₂O) δ 17.62, 23.37, 24.37, 26.86, 27.94, 30.82, 40.33, 52.50, 53.07, 73.44, 76.60, 121.76, 124.70, 125.90, 144.09, 172.36, 177.50, 177.90.

N-(1-{[6-Amino-1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-oxohexan-2-yl]carbamoyl}ethyl)-2-(2-amino-5-carbamimidamidopentanamido)pentanediamide (**3**)



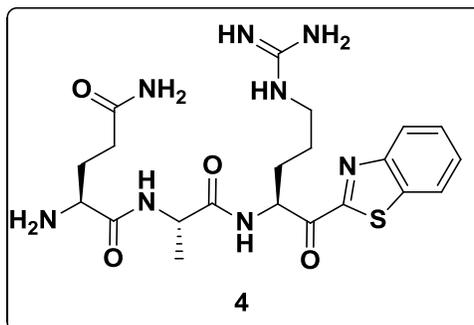
The same method as compound **1** was used to isolate compound **3**, which was obtained as a white solid (6 mg, 42%).

HPLC purity : 91%; HRMS calcd for $C_{27}H_{42}N_{10}O_5S$, 618.3060, found 310.1603 $((M+2H)^+/2)$.

1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 1.36 (d, 6 H), 1.42-1.54 (m, 4 H), 1.61-1.80 (m, 4 H), 1.98-2.12 (m, 4 H), 2.21-2.31 (m, 4 H), 2.94 (t, 1 H), 3.84-3.94 (m, 1 H), 4.23-4.32 (m, 1 H), 4.34-4.45 (m, 1 H), 7.59-7.70 (m, 2 H), 8.11 (m, 1 H), 8.19 (d, 1 H).

^{13}C NMR (75.4 MHz, D_2O) δ 17.64, 22.42, 26.31, 26.80, 30.35, 30.94, 39.06, 40.20, 52.44, 54.98, 122.96, 124.89, 136.2, 153.5, 165.9, 171.7, 173.6, 175.4, 197.6.

2-Amino-N-(1-{[1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]carbamoyl}ethyl)pentanediamide (**4**)



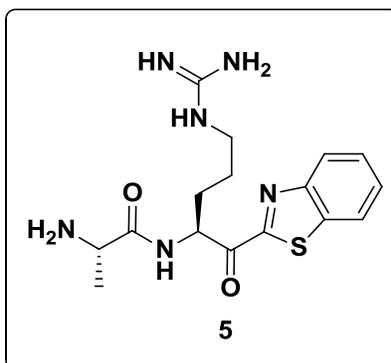
The same method as compound **1** was used to isolate compound **4**, which was obtained as a white solid (10.0 mg, 30%).

HPLC purity : 94%; HRMS calcd for C₂₇H₄₂N₁₀O₅S, 491.2189, found 491.2161 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 1.36 (d, 3 H) 1.58-1.62 (m, 2 H), 1.91-1.96 (m, 2 H), 2.11 (d, 2 H), 2.20- 2.25 (m, 2 H), 3.17 (d, 2 H), 3.97(d, 1 H), 4.14-4.25 (m, 1 H), 4.35 (q, 1 H), 7.43-7.57 (m, 2 H), 8.09 (d, 1 H), 8.14 (d, 1 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, D₂O) δ 16.47, 24.62, 26.44, 29.89, 30.22, 40.61, 52.13, 122.52, 122.89, 124.85, 127.81, 136.71, 152.61, 156.66, 163.98, 174.58, 176.80, 193.38.

(S)-2-Acetamido-*N*-((*S*)-1-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-5-guanidino-1-oxopentan-2-yl)propanamide (**5**)



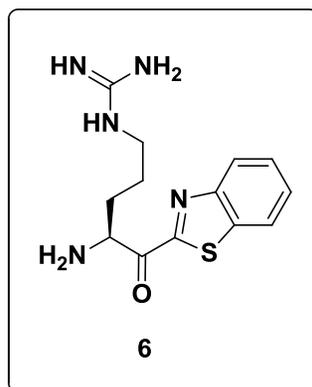
The same method as compound **1** was used to isolate compound **5**, which was obtained as a white solid (10.8 mg, 30%).

HPLC purity : 97%; HRMS calcd for C₁₈H₂₄N₆O₃S, 405.1709, found 405.1683 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 1.29 (d, 3 H), 1.52-1.63 (m, 2 H), 1.77-1.82 (m, 2 H), 1.86 (s, 3 H), 3.15 (t, 2 H), 4.07 (d, 1 H), 4.21 (q, 1 H), 7.43-7.59 (m, 2 H), 8.06 (d, 1 H), 8.12 (d, 1 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, D₂O) δ 16.51, 21.49, 24.34, 27.56, 40.36, 49.93, 55.22, 122.85, 124.77, 125.12, 136.66, 152.53, 156.66, 163.92, 173.99, 175.41, 193.26.

(S)-*N*-(1-(Benzo[*d*]thiazol-2-yl)-5-guanidino-1-oxopentan-2-yl)acetamide (**6**)



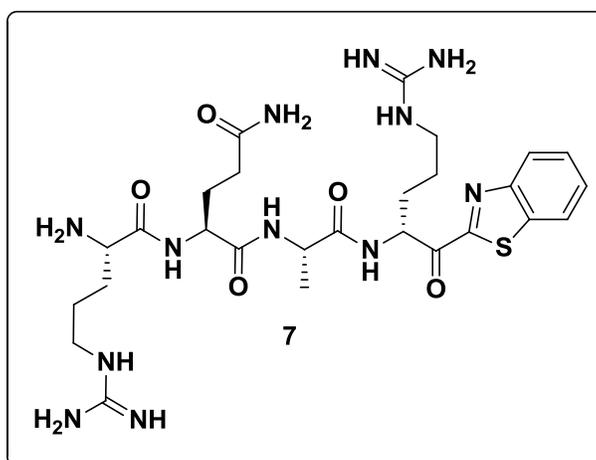
The same method as compound **1** was used to isolate compound **6**, which was obtained as a white solid (6.2 mg, 48%).

HPLC purity : 99%; HRMS calcd for C₁₅H₁₉N₅O₂S, 334.1332, found 334.1340 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.52-1.68 (m, 2 H), 1.97-2.08 (m, 2 H), 2.11 (s, 3 H), 3.16 (t, 2 H), 5.35-5.50 (m, 1 H), 7.43-7.59 (m, 2 H), 8.08 (d, 1 H), 8.17 (d, 1 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃) δ 21.47, 24.26, 27.76, 40.33, 55.36, 122.89, 124.84, 127.83, 136.78, 148.14, 152.66, 163.80, 174.27, 193.91.

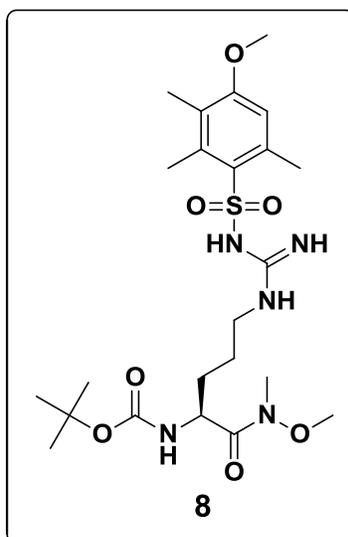
2-(2-Amino-5-carbamimidamidopentanamido)-*N*-(1-{[1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]carbamoyl}ethyl)pentanediamide (**7**)



The compound **7** is a diastereomer isolated at same time of compound **1** as a white solid product (8 mg, 8%).

HPLC purity : 98%.

tert-Butoxycarbonyl-*N*-{1-[methoxy(methyl)carbamoyl]-4-{3-[4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]carbamimidamido}butyl}carbamate (**8**)



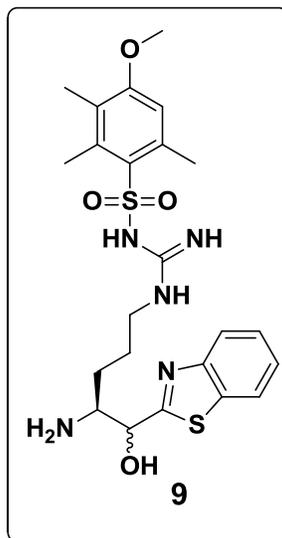
To a solution of Boc-Arg(Mtr)-OH (1 eq, 1.36 g, 2.79 mmol) in anhydrous THF (93 mL) were added HATU (1.2 eq, 1.27 g, 3.35 mmol), HN(Me)OMe•HCl(1.2 eq, 327 mg, 3.35 mmol) and 2.4 mL DIPEA (5 eq, 14 mmol, 2.4 mL) under nitrogen. The reaction mixture was stirred over 3 h at ambient temperature. After completion of the reaction, the mixture was concentrated *in vacuo* and directly purified by flash chromatography (EtOAc/Hexane 80:20 to 100:0) to give Weinreb amide **8** as a white solid (1.4 g, 93%).

HPLC purity : 90%; MS (ES) m/z 530.2 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (s, 9 H), 1.55-1.71 (m, 4 H), 2.59 (s, 3 H), 2.67 (s, 3 H), 2.80 (s, 3 H), 3.22 (s, 3 H), 3.29-3.33 (m, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 4.63 (t, 1 H), 5.47 (d, 2 H), 6.20-6.31 (m, 2 H) 6.53 (s, 3 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃) δ 11.94, 18.20, 24.12, 24.59, 28.34, 32.13, 41.00, 49.31, 55.46, 61.65, 80.38, 111.77, 120.20, 124.91, 136.25, 138.77, 155.74, 156.62, 158.54.

1-[4-Amino-5-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-oxopentyl]-3-[4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]guanidine (9)



A solution of benzothiazole (18 eq, 1.7 mL, 15.5 mmol) in 52 mL of anhydrous THF was cooled to -78°C with stirring under nitrogen. *n*-Butyllithium in 1.02 M in hexane (17.5 eq, 15.1 mmol 14.8 mL) was added dropwise over 30 min at -78°C and the mixture was stirred for an additional 30 min at the same temperature. To this solution was added dropwise over 50 min a solution of weinreb amide **8** (1 eq, 456 mg, 0.86 mmol) in 27 mL anhydrous THF at -78°C . The reaction mixture was stirred at -78°C for 2 h, then quenched with 20 mL of saturated aqueous NH_4Cl and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water (3 x 50 mL) then brine (2 x 50 mL), dried on anhydrous MgSO_4 , filtered through fritted glass, and then concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in anhydrous MeOH (17.2 mL), cooled to -20°C while stirring, and treated with NaBH_4 (6 eq, 198 mg, 5.2 mmol). After 1 h, acetone (20 mL) was added and the reaction mixture was warmed to room temperature over 30 min. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and partitioned between water and EtOAc. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 20 mL), and the combined organic extracts were washed with brine (2 x 20 mL), dried (MgSO_4), filtered through fritted glass and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/Hexane 80:20 to 100:0) to give intermediate as a yellow solid (322 mg, 63%).

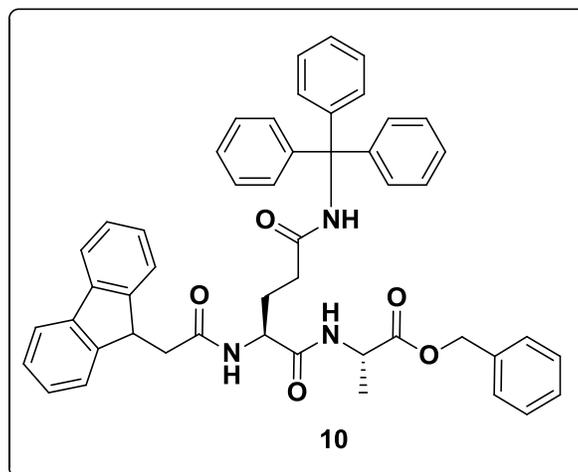
HPLC purity : 100%; MS (ES) m/z 606.1 (($\text{M}+\text{H}$) $^+$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.24 (s, 4 H), 1.37 (s, 5 H), 1.40-1.72 (m, 4 H), 2.58 (s, 3 H), 2.64 (s, 3 H), 2.66 (s, 3 H), 3.08-3.35 (m, 2 H), 3.80 (s, 3 H), 4.13 (t, 1 H), 5.16 (s, 1 H), 5.52 (d, 2 H), 6.21-6.38 (m, 3 H), 6.50 (s, 3 H), 7.90 (d, 1 H), 7.95 (d, 1 H).

^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3) δ 11.9, 19.1, 23.2, 24.1, 26.9, 28.8, 40.9, 55.5, 60.4, 80.2, 112.1, 121.6, 122.5, 124.8, 124.9, 125.0, 126.9, 134.7, 136.7, 138.6, 152.7, 156.6, 157.1, 158.5, 173.0.

The boc group of intermediate was removed in a mixture of 20% TFA in DCM during 30 min to give crude compound **9** (157 mg, 0.31 mmol) as yellow oil after concentration on rotavapor, and was used as such in the next step.

Benzyl-2-(2-([9H-Fluorenyl-methoxy]carbonyl)amino)-4-[(triphenylmethyl)carbamoyl]butanamido)propanoate (10)



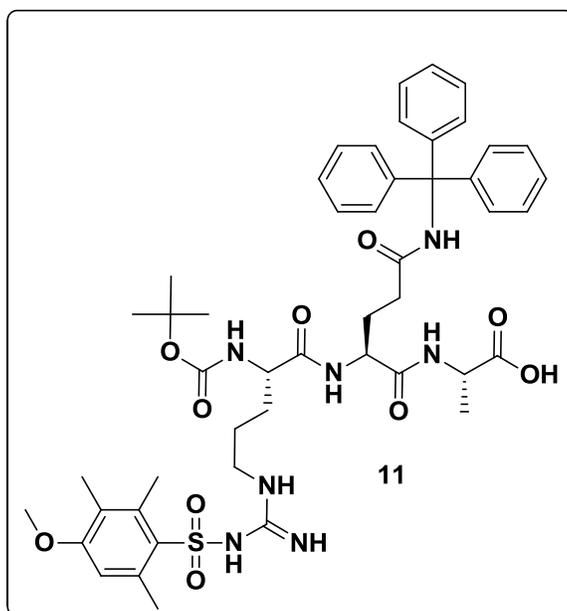
To a solution of Fmoc-Gln(Trt)-OH (1 eq, 1.83 g, 3.0 mmol) in 30 mL anhydrous THF were added HATU (1.2 eq, 1.37 g, 3.6 mmol), $\text{H}_2\text{N-Ala-OBn}$ (1 eq, 1.05 g 1.42 mmol), and DIPEA (5 eq, 15.0 mmol, 2.6 mL) under nitrogen. The reaction mixture was stirred over 3 h at room temperature. After completion of the reaction, the mixture was concentrated *in vacuo* and purified by flash chromatography (EtOAc/Hexane 50:50 to 70:30) to give compound **10** as a white solid (2.07 g, 90%).

HPLC purity : 100%; MS (ES) m/z 794 ($(\text{M}+\text{Na})^+$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (d, 1 H), 1.95-2.00 (m, 4 H), 4.10-4.20 (m, 2 H), 4.22-4.37 (m, 1 H), 4.47-4.52 (m, 1 H), 5.05-5.17 (m, 2 H), 7.10-7.41 (m, 26 H), 7.76 (d, 2 H).

^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3) δ 17.56, 30.00, 33.29, 47.16, 48.28, 53.35, 66.99, 77.49, 119.97, 125.19, 127.08, 128.22, 128.68, 141.30, 144.47, 144.52, 170.97.

2-[2-(2-[[*tert*-Butoxy]carbonyl]amino)-5-{3-[(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]carbamimidamido}pentanamido)-4-[(triphenylmethyl)carbamoy]butanamido]propanoic acid (**11**)



A solution of Fmoc-Gln(Trt)-Ala-OBn **10** (1 eq, 1.06 mg, 1.37 mmol) in 13.2 mL of DCM/ Et_2NH (90:10) was stirred for 3 h at room temperature, then concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL) and concentrated under *in vacuo* to give the intermediate free amine as a colorless oil. To a solution of Boc-Arg(Mtr)-OH (1.2 eq, 798 mg, 1.64 mmol) in 14 mL of DCM was added EDC (1.2 eq, 314 mg, 1.64 mmol), H_2N -Gln(Trt)-Ala-OBn **10** (1 eq, 1.37 mmol) and HOBT (1.2 eq, 222 mg, 1.64 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by flash chromatography (EtOAc/Hexane 80:20 to 100:0) to yield intermediate as a white solid (813 mg, 77%).

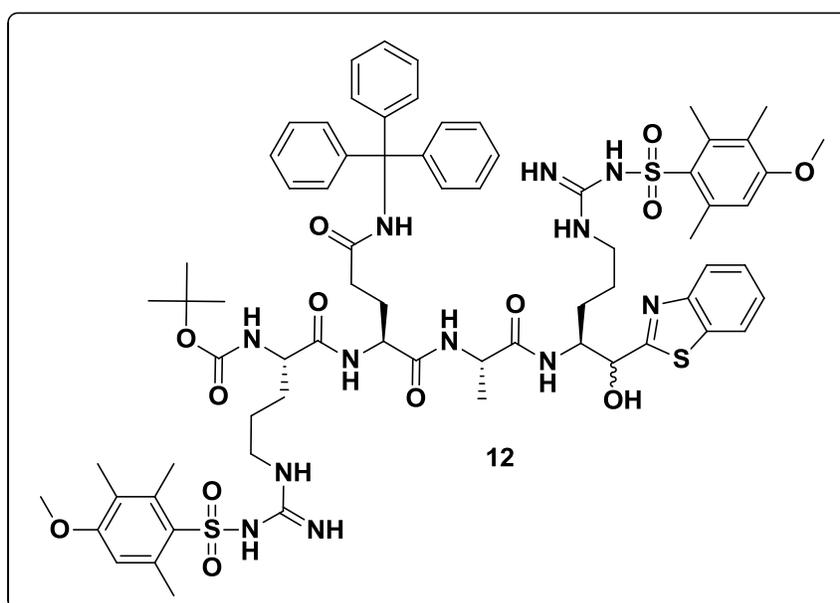
HPLC purity : 80%; MS (ES) m/z 1018.0 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (d, 2 H), 1.36 (s, 10 H), 1.58-1.66 (m, 1 H), 2.42 (s, 3 H), 2.59 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 3.02-3.18 (m, 1 H), 3.77 (s, 3 H), 4.08-4.15 (m, 1 H), 4.34-4.41 (m, 2 H), 4.95 (dd, 2 H), 5.35 (d, 2 H), 6.08- 6.30 (s, 3 H), 6.47 (s, 3 H), 7.14-7.36 (m, 20 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃) δ 11.0, 17.1, 18.4, 24.2, 25.2, 28.3, 29.8, 48.5, 52.7, 53.6, 55.4, 66.9, 77.5, 79.9, 111.7, 121.1, 126.9, 127.9, 128.9, 131.3, 135.3, 138.7, 144.3, 155.0, 155.6, 158.2, 172.5.

The intermediate (1.0 eq, 320.7 mg, 0.31 mmol), 10% Pd on activated carbon (140 mg), and absolute EtOH (3.1 mL) were stirred under an atmospheric pressure of hydrogen for 1 h at ambient temperature. The resulting mixture was filtered on diatomaceous earth through fritted glass and concentrated *in vacuo* to give compound crude compound **11**, which was used as such in the following step.

tert-Butoxycarbonyl-*N*-[1--({1-[(1-[[1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-hydroxy-5-{3-[(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]carbamimidamido}penta-2-yl]carbamoyl]ethyl)carbamoyl]-3-[(triphenylmethyl)carbamoyl]propyl}carbamoyl)-4-{1-[(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]carbamimidamido}butyl]carbamate (**12**)



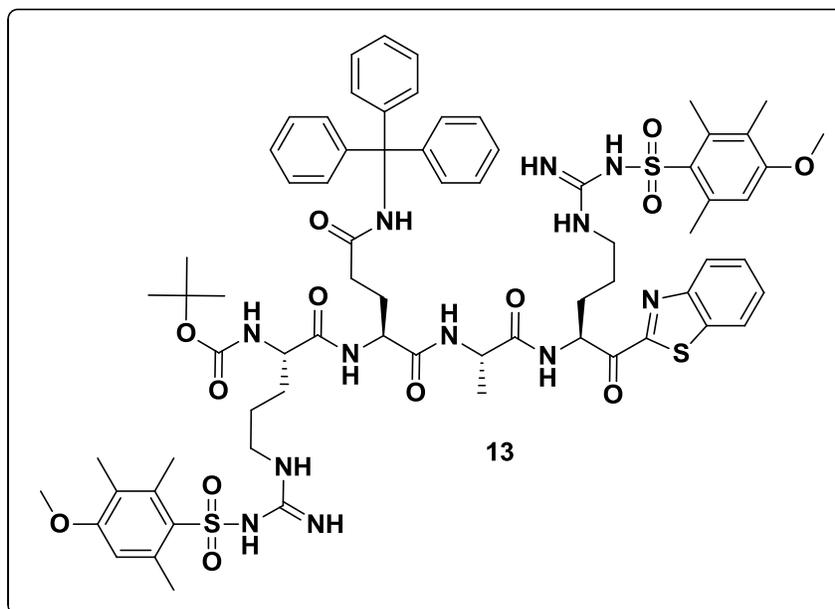
To a solution of Boc-Arg(Mtr)-Gln(Trt)-Ala-OH (**11**) (1.0 eq, 0.31 mmol) in anhydrous DMF were added HATU (3.0 eq, 354 mg, 0.93 mmol), hydroxybenzothiazole, compound **9** (1.0 eq, 157 mg, 0.31 mmol), and DIPEA (5.0 eq, 1.55 mmol, 0.3 mL). The mixture was stirred overnight, concentrated *in vacuo* and purified by flash chromatography (MeOH/EtOAc: 95:5, v/v) to give compound **12** (366.2 g, 84%).

HPLC purity : 83%; MS (ES) m/z 1415.0 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (s, 9 H), 1.39 (d, 3 H), 1.47-1.60 (m, 6 H), 2.04-2.15 (m, 2 H), 2.33-2.58 (m, 10 H), 2.84 (s, 6 H), 2.97(s, 6 H), 3.03-3.11 (m, 2 H), 3.82 (s, 9 H), 4.04-4.10 (m, 1H), 4.18-4.28 (m, 2 H), 4.30-4.49 (m,1 H), 5.15 (d, 1 H), 6.49 (s, 1 H), 7.07-7.53 (m, 15 H), 7.79-7.92 (m, 2 H), 8.32 (d, 1 H), 8.65 (d, 1 H).

¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃) δ 11.97, 17.23, 18.59, 24.17, 28.06, 43.24, 55.51, 76.59, 77.43, 127.02, 127.94, 128.94, 128.60, 128.73, 144.10, 154.9, 155.6, 158.0, 172.8.

tert-Butoxycarbonyl-N-[1-({1-[(1-[(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-{{1-[(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]carbamimidamido}-1-oxopentan-2-yl]carbamoyl}ethyl)carbamoyl]-3-[(triphenylmethyl)carbamoyl]propyl}carbamoyl)-4-{{1-[(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzene)sulfonyl]carbamimidamido}butyl]carbamate (**13**)



IBX (1.2 eq, 84 mg, 0.3 mmol) was added to a solution of compound **12** (1 eq, 355 mg, 0.25 mmol) in 2.5 mL of DMSO. The resulting mixture was stirred overnight at ambient temperature. The reaction mixture was washed with water (2 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL), dried (MgSO₄), filtered through fritted glass, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/Hexane: 80:20 to 100:0) to give compound **13** as a yellow solid (170 mg, 48%).

HPLC purity : 95%. MS (ES) m/z 1414.0 ((M+H)⁺).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (s, 9H), 1.41 (d, 3H), 1.44-1.87 (m, 4H), 2.00-2.15 (m, 4H), 2.30-2.61 (m, 10H), 2.87 (s, 6H), 2.95 (s, 6H), 3.03-3.36 (m, 2H), 3.79 (s, 9H), 4.03-4.15 (m, 2H), 4.30-4.99 (m, 2H), 6.46 (s, 1H), 7.03-7.20 (m, 15H), 7.41-7.52 (m, 2H), 7.86 (d, 1H), 8.16 (d, 1H).

¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃) δ 11.97, 17.23, 18.59, 24.17, 28.06, 43.24, 55.51, 76.59, 77.43, 127.02, 127.94, 128.60, 128.73, 144.10, 155.0, 155.4, 158.0, 172.5.

Biological methods

Matriptase cDNA was a generous gift from Dr. Chen-Yong Lin (Georgetown University, Washington, USA). Human matriptase-2 cDNA was a generous gift from C. López-Ótin (Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain). Human hepsin cDNA was cloned from a human liver cDNA library from Ambion (Foster City, CA, USA). Human TMPRSS11D (HAT) cDNA was from GeneCopoeia (Rockville, MD, USA). Purified human trypsin and thrombin were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). AMC-coupled fluorogenic peptides and the H-Glu-Gly-Arg-chloromethylketone irreversible inhibitor were from Bachem (Torrance, CA, USA).

Purification of active human serine proteases

Matriptase, Matriptase-2 and Hepsin were expressed and purified as previously described (Béliveau *et al.*, 2009). cDNA corresponding to amino acid 45-418 of HAT was amplified by PCR and subcloned in the pMT-BiP/V5-His vector (Life technologies, Burlington, ON, Canada) for expression and purification. Active HAT was purified using the same method as for matriptase-2 and Hepsin (Béliveau *et al.*, 2009). Matriptase, matriptase-2, Hepsin, HAT, trypsin

and thrombin were active-site titrated with the burst titrant 4-methylumbelliferyl-p-guanidino benzoate (MUGB). All enzymatic assays for these enzymes were performed at room temperature in a reaction buffer containing 50 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl and 500 µg/mL BSA at pH 7.4. Human soluble furin was expressed, purified, titrated and assayed as described previously (Désilets *et al.*, 2006). Enzyme activities were monitored by measuring the release of fluorescence from AMC-coupled peptides (excitation, 360 nm; emission, 441 nm) in a FLX-800 TBE microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) at room temperature.

Inhibition assays and K_i determination

To evaluate inhibition potency of the benzothiazoles compounds towards proteases, 1 nM of enzymes was added to the reaction buffer containing 0 nM, 10 nM or 10 µM of the different ketobenzothiazoles (0.4 µM, 4 µM and 400 µM for the reduced form of R-Q-A-R-Kbt) and 100 µM of Boc-Arg-Arg-Val-Arg-AMC for furin and 100 µM of Boc-Gln-Ala-Arg-AMC for the other proteases. If substantial inhibition occurred using a ratio of I/E < 10, compounds were treated as tight-binding inhibitors (Bieth, 1995). For K_i determination of tight-binding inhibitors, enzymes diluted to concentration ranging from 0.25 to 1 nM were pre-equilibrated with appropriate dilutions of the compounds for 15 min at room temperature. Residual enzyme activity was then measured by following the hydrolysis of the fluorogenic substrate Boc-Gln-Ala-Arg-AMC for 30 min at room temperature. Data from at least three independent experiments were averaged and residual velocities were plotted as a function of inhibitor concentration. Data were fitted by non-linear regression analysis to the Morrison K_i equation (1):

$$v_i/v_o = v_o * (1 - (((E_o + I_o + K_{iapp}) - ((E_o + I_o + K_{iapp})^2 - 4 * E_o * I_o)^{1/2}) / (2 * E_o))), \quad (1)$$

where v_o and v_i are the steady-state rates of substrate hydrolysis in the absence and presence of inhibitor, respectively, E_o , the initial concentration of enzyme, I_o , the initial concentration of inhibitor and K_{iapp} the substrate-dependent equilibrium dissociation constant. The substrate-independent constant K_i was calculated using the equation (2):

$$K_{iapp} = (K_i * (1 + (S/K_m))) \quad (2)$$

where S is the initial concentration of substrate and K_m the Michaelis–Menten constant for the enzyme–substrate interaction. If substantial inhibition occurred only when using a ratio of $I/E > 10$, compounds were treated as classical reversible inhibitors. In this case, inhibition assays used for K_i determination were initiated by the addition of 1 nM of protease to a reaction mixture containing the inhibitor and the fluorogenic substrate. Data generated from plots of enzyme velocity versus substrate concentration at several fixed inhibitor concentration were fitted by non-linear regression analysis to equations describing competitive, uncompetitive, noncompetitive and mixed model inhibition (Copeland RA (2000) *Enzymes*. Wiley-VCH, New York, NY, USA). For inhibition of matriptase by R-Kbt (**6**) and thrombin by RQAR-Kbt (**1**), the mixed model inhibition was the preferred model as determined by the goodness of fit (R^2) and the Akaike's information criteria (AICc) and therefore used for K_i determination. All non-linear regression and statistical analysis were performed using GraphPad Prism version 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Dilution recovery experiments

Dissociation of the enzyme-inhibitor (EI) complex was investigated using dilution recovery experiments. High concentration of matriptase (0.5 μM) with variable concentration of A) RQAR-Kbt or B) EGR-CMK was incubated for 20 min at room temperature in reaction buffer to allow for the formation of the EI complex. Complexes were rapidly (1:2000) diluted in a reaction buffer containing 400 μM of Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (~ 7 times K_m). Activity was continuously recorded for 75 min and fluorescence plotted as a function of time.

Modelling methods

Preparation of ligand structures

The 3D coordinates of the ligand with correct chirality were generated with Open Babel 2.30 (O'Boyle *et al.*, 2011) using SMARTS input format. The coordinates were export in PDB format and partial charges were calculated in Open Babel with the Partial Equalization of Orbital Electronegativities (PEOE) algorithm by (Gasteiger et Marsili, 1980). The general AMBER force field (gaff) parameters generated in Antechamber and convert to GROMACS (Van Der Spoel *et al.*, 2005) formats by ACPYPE (Silva et Vranken, 2012) were used for the ligand.

Preparation of the protein target

The structure of Matriptase (PDB code 3NCL) was obtained from the RCSB Protein Data Bank. Hydrogens and water molecules were removed from the structure. Flexible residues were located based on the detection of residues seen in different conformation in the binding sites of other Matriptase structures (PDB: 1EAW, 1EAX, 2GV6, 2GV7 and 3BN9). As a result, during the docking, Asp⁷⁰⁵, Phe⁷⁰⁸, Tyr⁷⁵⁵, Gln⁷⁸², Gln⁷⁸³, Gln⁸⁰², and Asp⁸²⁸ were set as flexible residues during docking simulations.

Docking parameter

The ligand was docked in the protein with our in house developed docking program FlexAID (Gaudreault *et al.*, 2014). FlexAID uses a genetic algorithm to optimize the relative position of the ligand with respect to the protein as well as dihedral angles of the ligand and flexible residues (optimized using an exhaustive search within library of side chain conformations at each step of the simulation). The population size and number of generation were both set at 300 used in the genetic algorithm. These values were seen empirically to offer a good balance between the precision and length of simulations. The ligand was set as semi-flexible. Arg in P1 and the warhead in P1' were set as rigid in a conformation like that found in the thrombin inhibitor (0ZE) in PDB structure 1B5G. All peptide bonds were also set as rigid to diminish the search space. The carbon making the covalent bond with the protein was fixed at a distance of 3.0 ± 0.1 Å of the catalytic Ser⁸⁰⁵. 100 different docking simulations were performed and rescored with a fast MM/GBSA (Molecular Mechanics/Generalised Born Surface Area) method (see below).

MM/GBSA

The MM/GBSA method is used to approximate the binding free energy (ΔG_{bind}) using equation (1):

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} \quad (1)$$

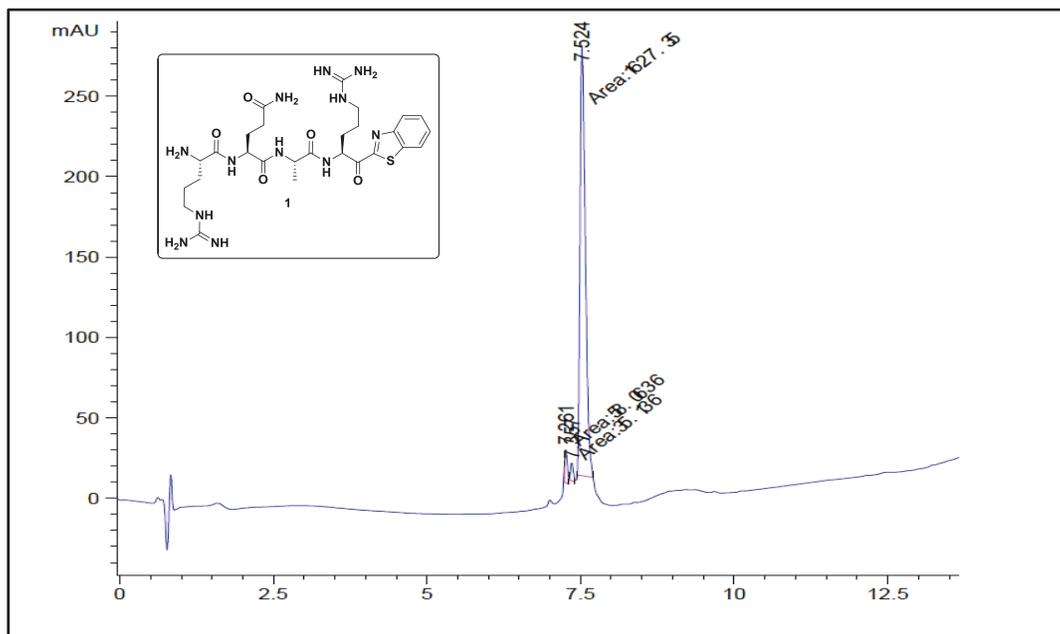
$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{internal}} + E_{\text{electrostatic}} + E_{\text{vdW}} \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad (3)$$

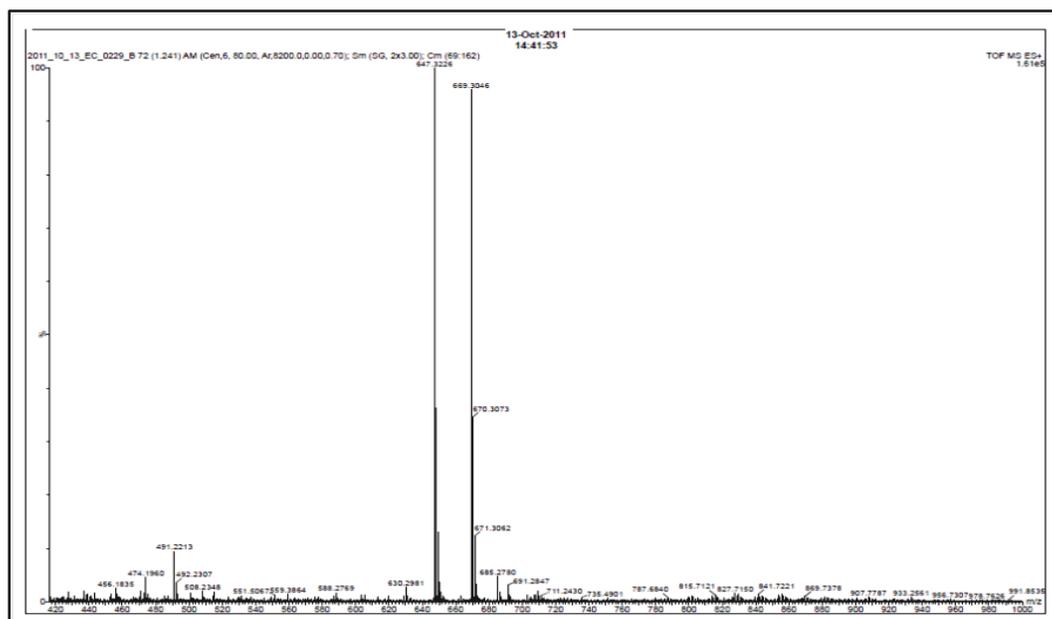
where ΔE_{MM} is the difference in energy between the protein-ligand complex and the protein and ligand alone calculate with basic molecular mechanic equations (2). ΔG_{solv} is the difference in solvation free energy calculated with GB implicit solvation model (ΔG_{GB}) and the nonpolar solvation free energy calculated with solvent accessible surface area (ΔG_{SA}). All protein-ligand complexes were first energy minimised with GROMACS 4.5.1 (Van Der Spoel *et al.*, 2005) using the conjugate gradient algorithm with AMBER03 force field in a TIP3P water box. All 100 different poses were then rescored with MM/GBSA using HCT model of the effective Born radii. The top 5 poses were then visually inspected with PyMOL (<https://www.pymol.org>) .

Chemical data (HPLC, MS, ¹H NMR, ¹³C NMR)**Compound 1. R-Q-A-R-Kbt**

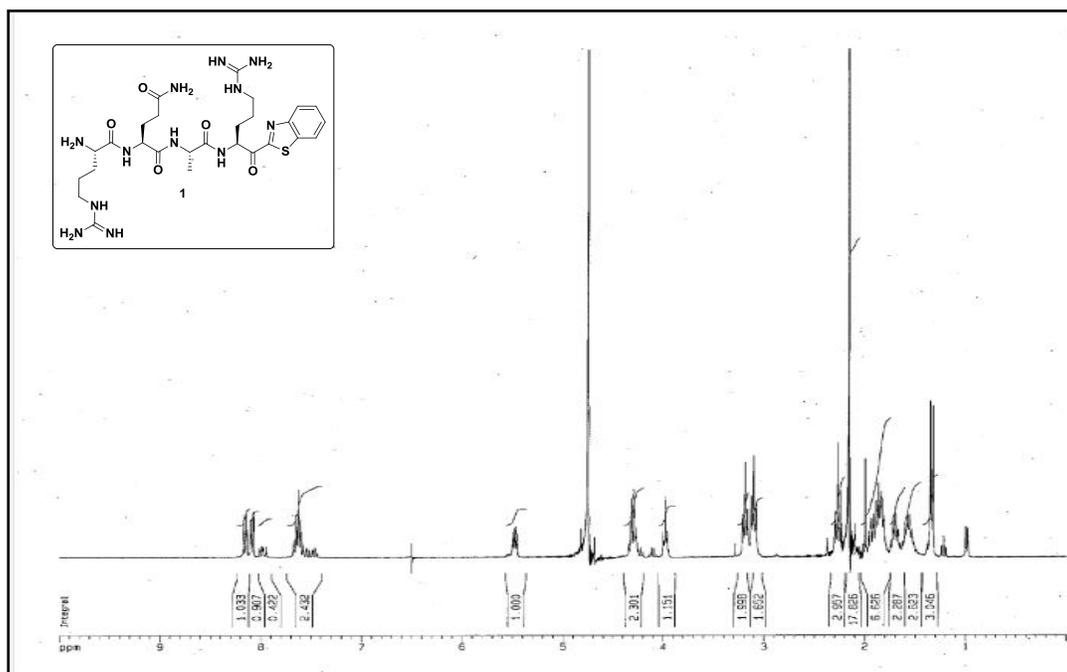
• HPLC



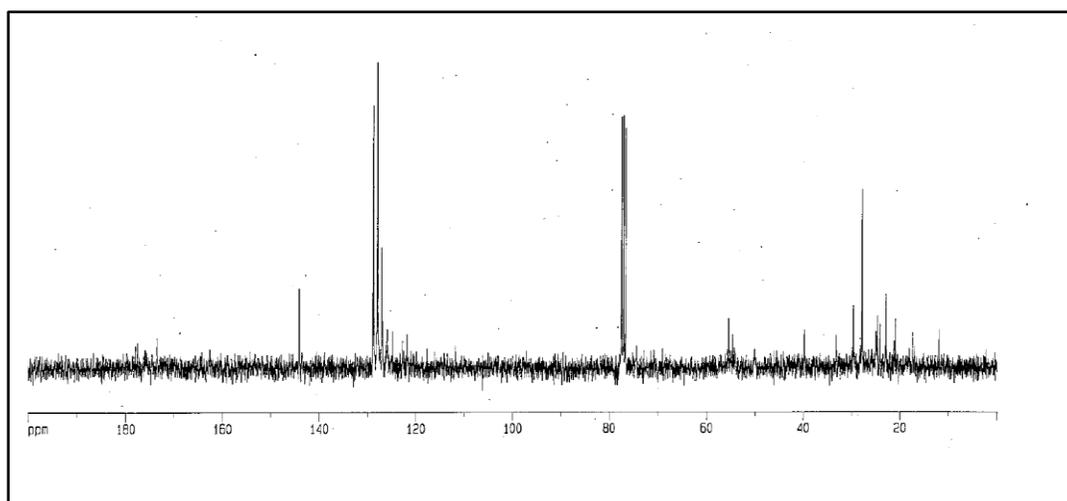
• MS



- ^1H NMR

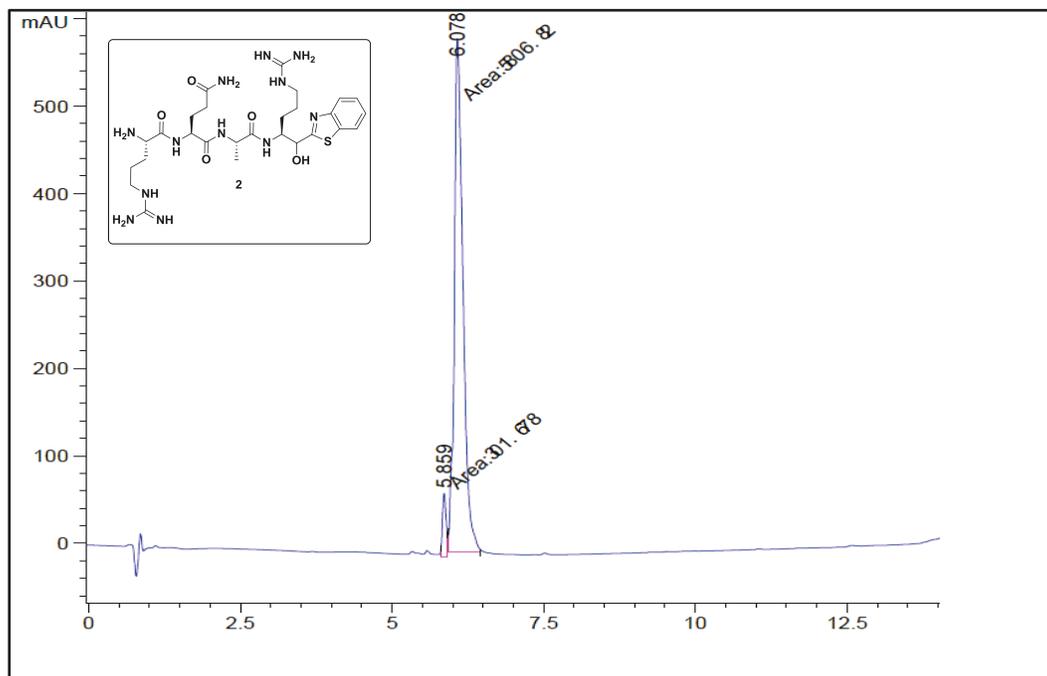


- ^{13}C NMR

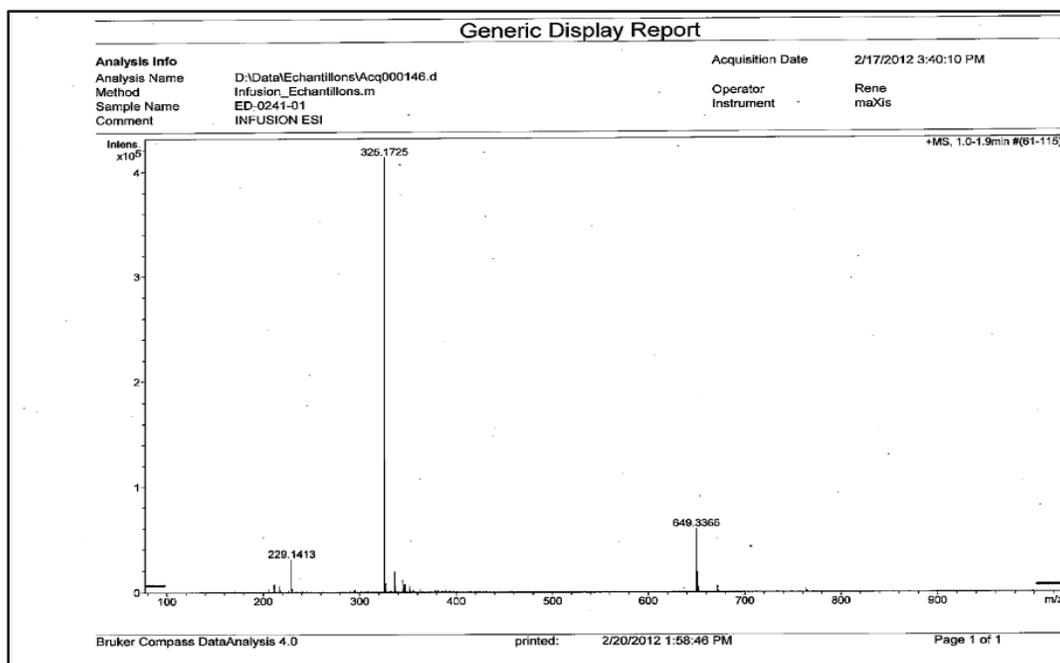


Compound 2. R-Q-A-R-Hbt

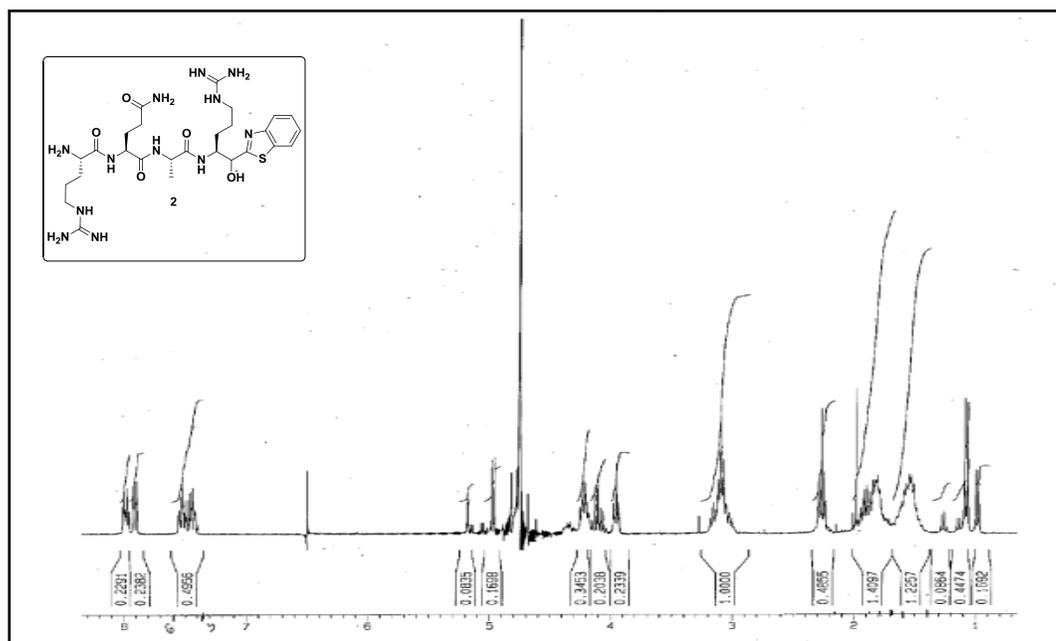
• HPLC



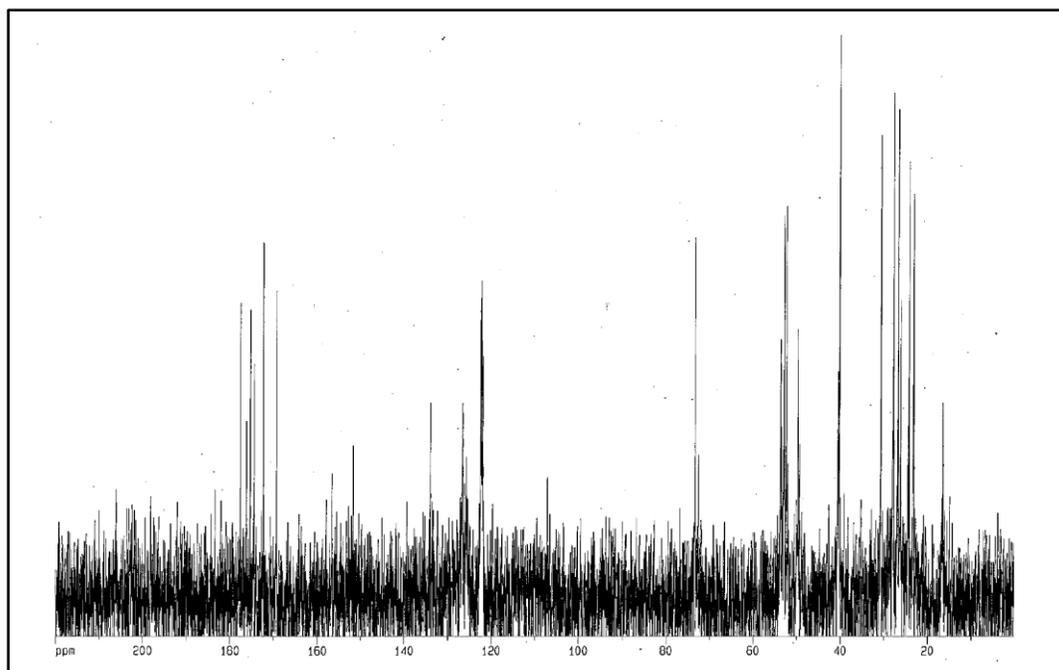
• MS



- ^1H NMR

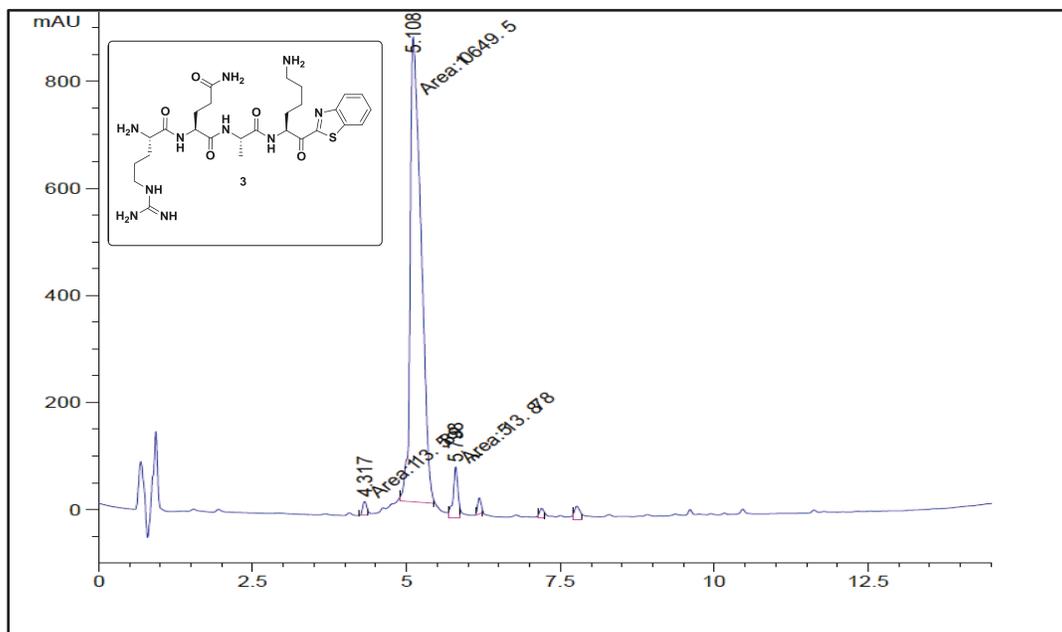


- ^{13}C NMR

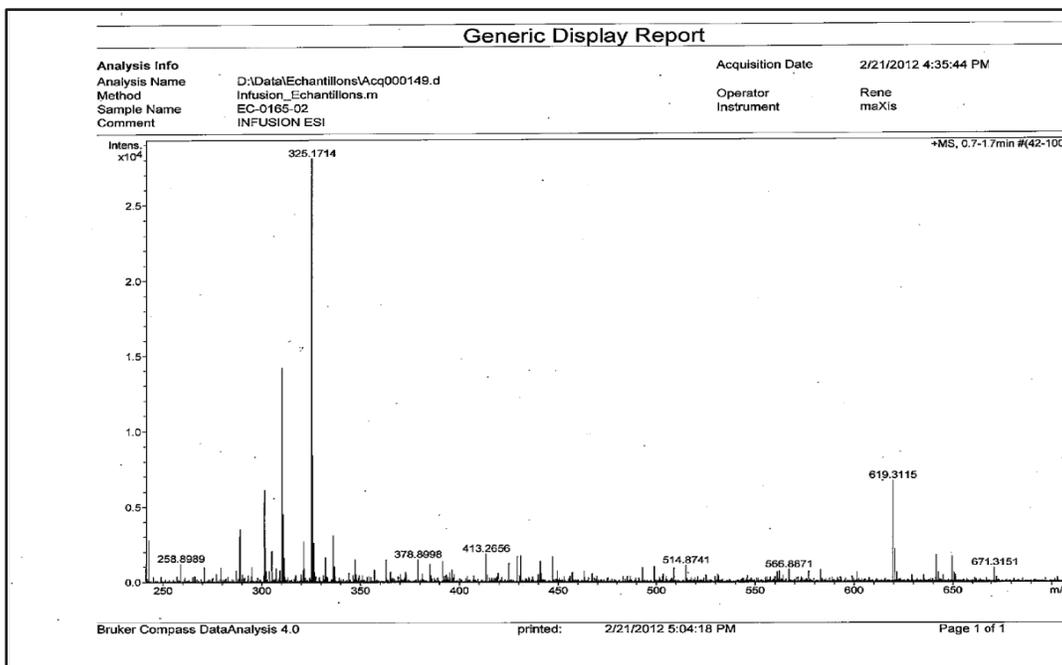


Compound 3. R-Q-A-K-Kbt

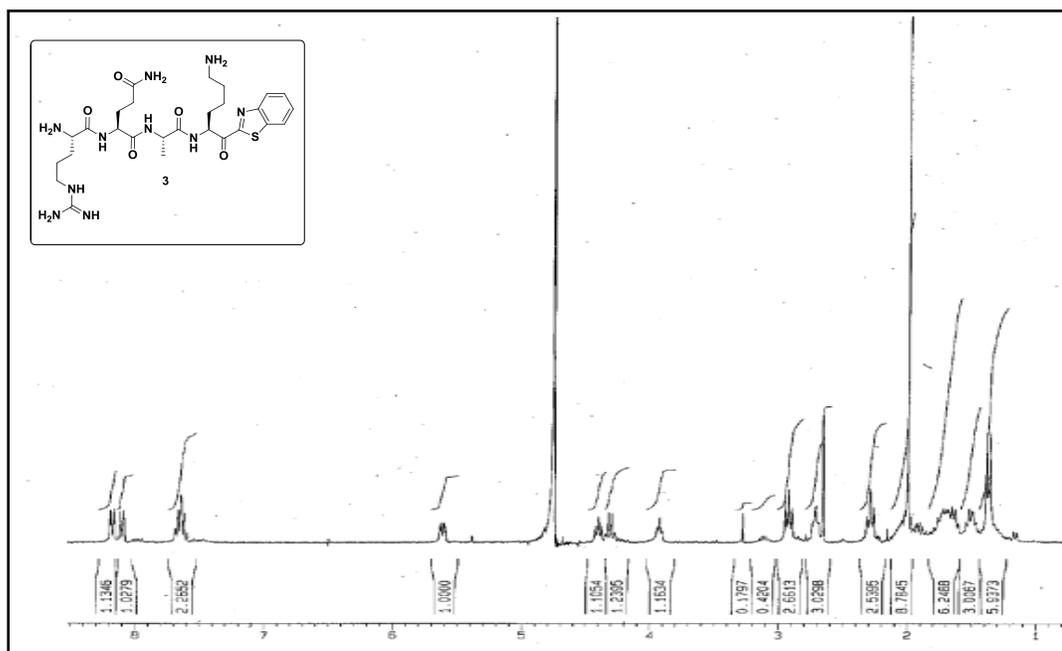
• HPLC



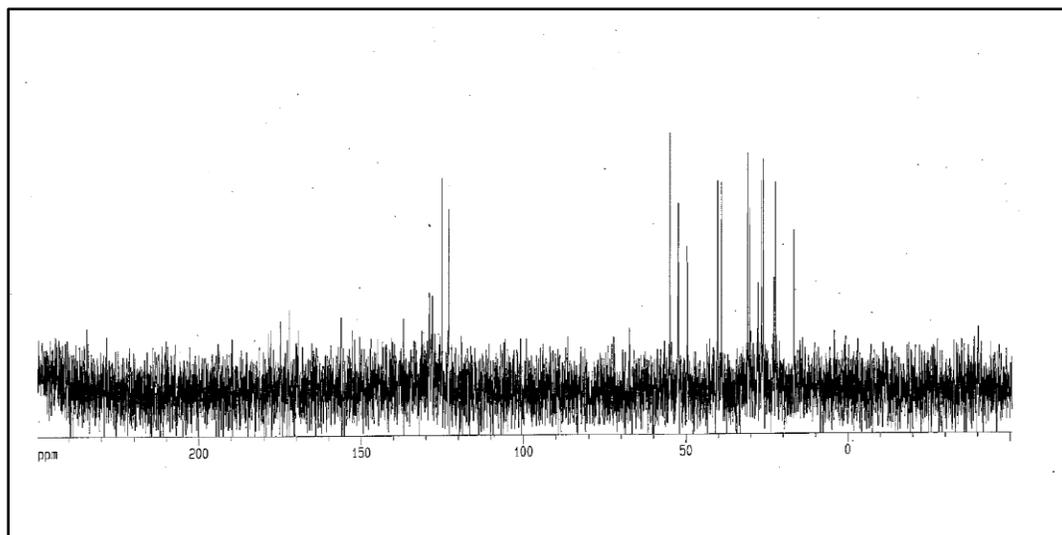
• MS



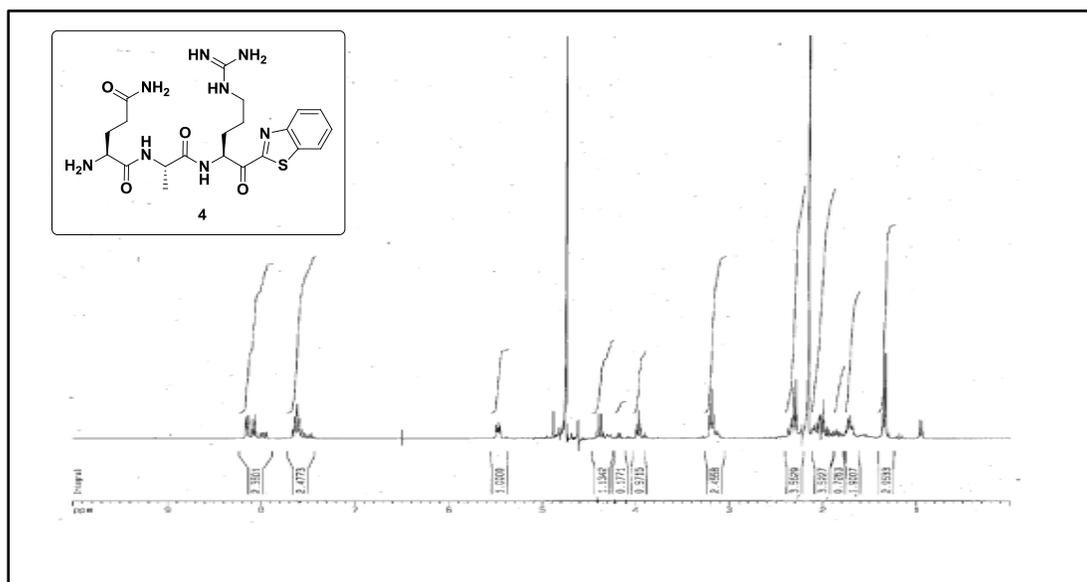
- ^1H NMR



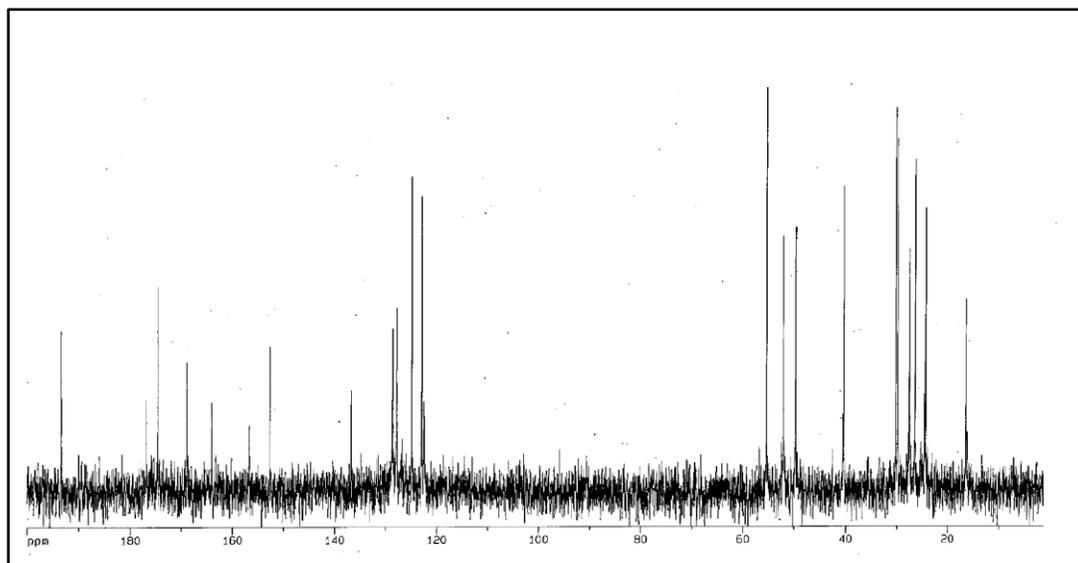
- ^{13}C NMR



- ^1H NMR

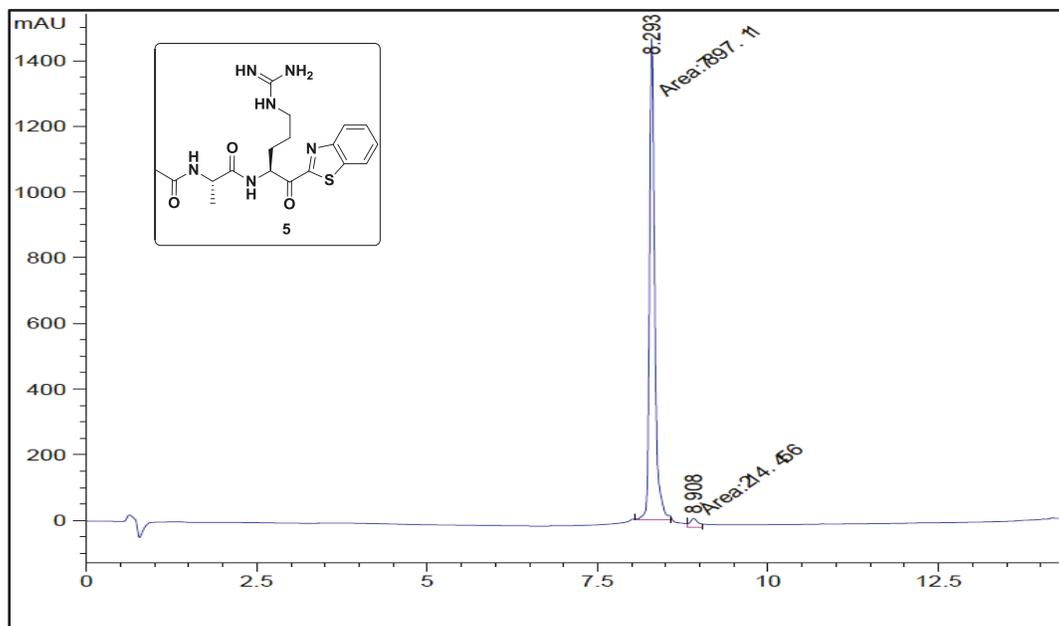


- ^{13}C NMR

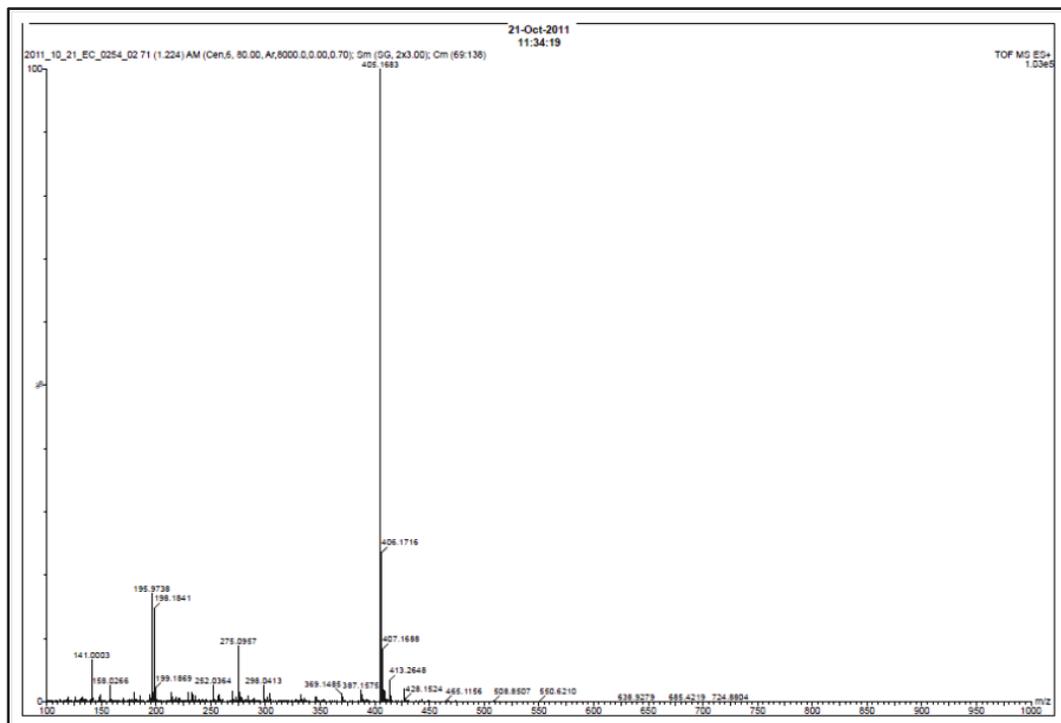


Compound 5. (CH₃CO)A-R-Kbt

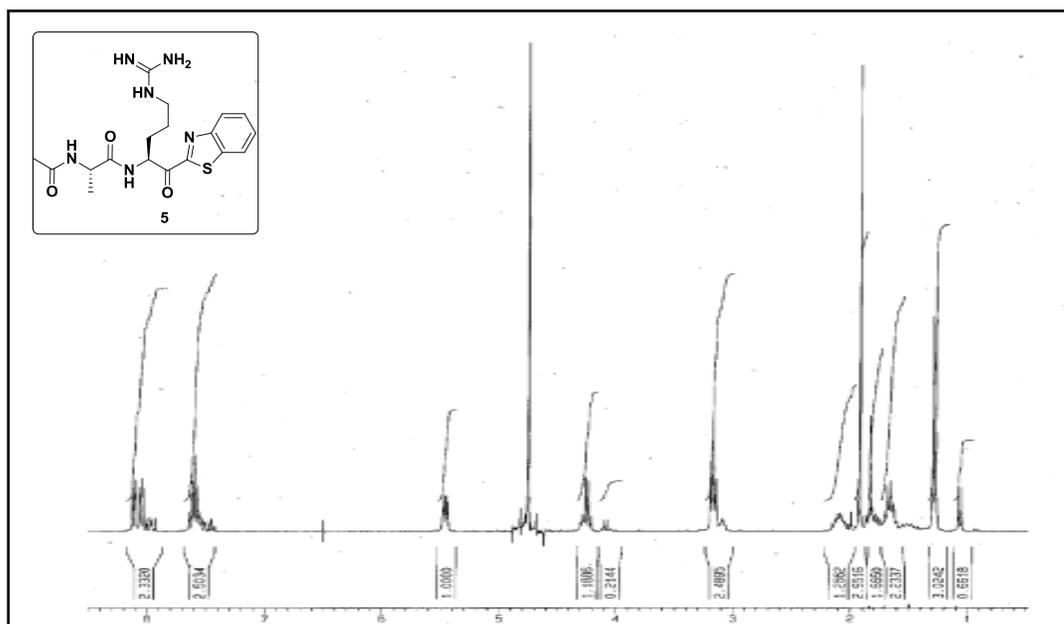
• HPLC



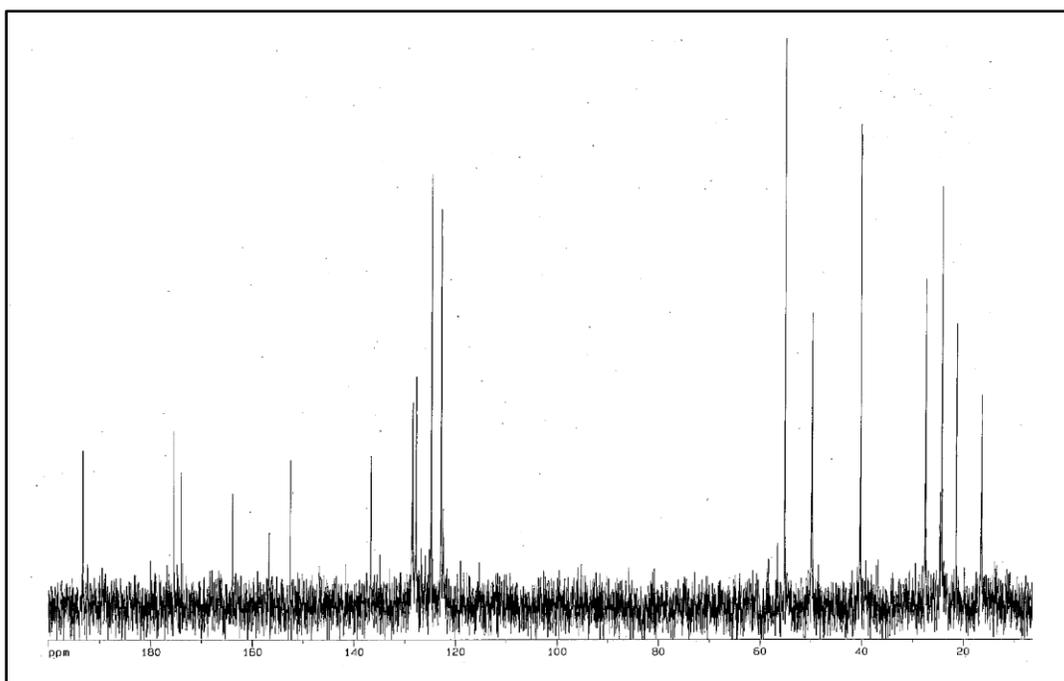
• MS



- ^1H NMR

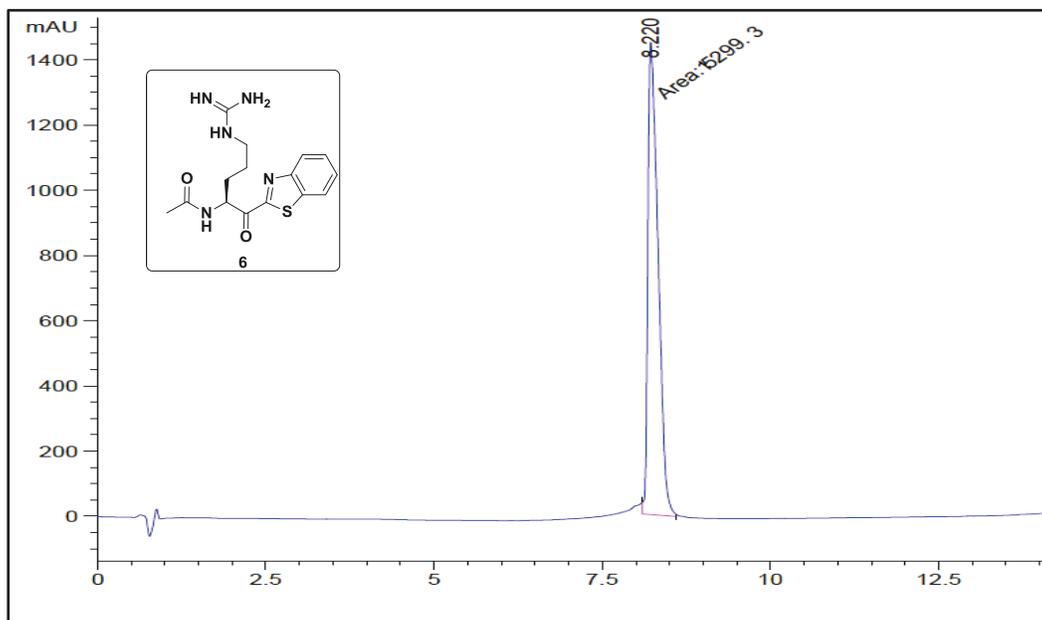


- ^{13}C NMR

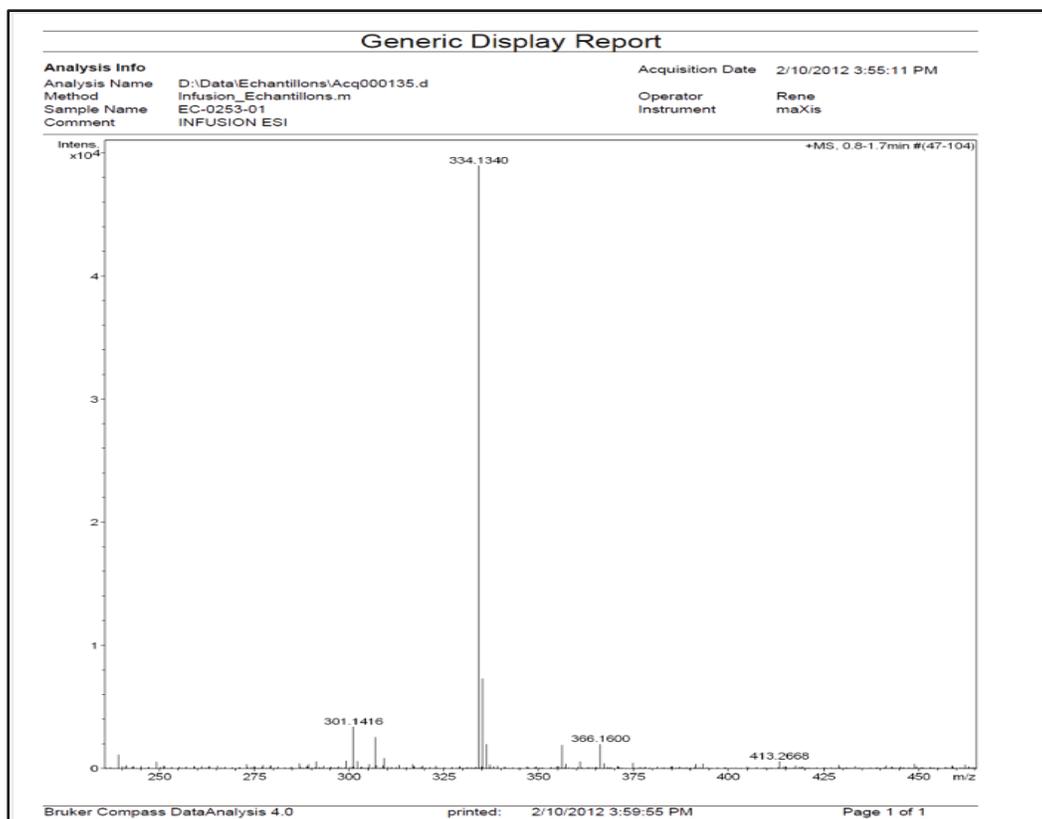


Compound 6. (CH₃CO)R-Kbt

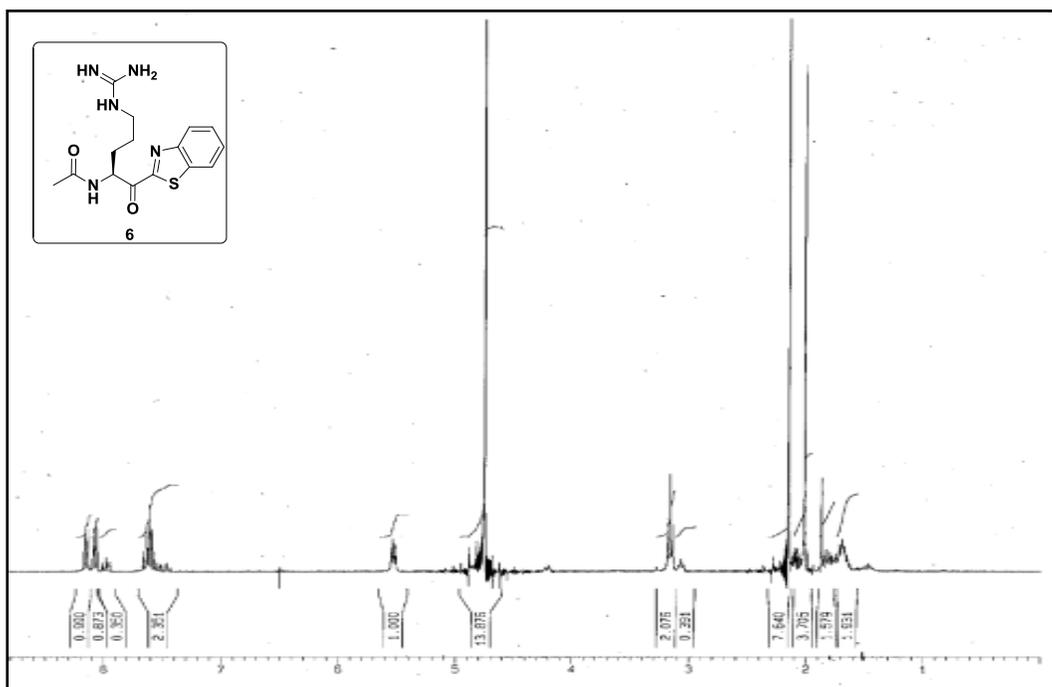
• HPLC



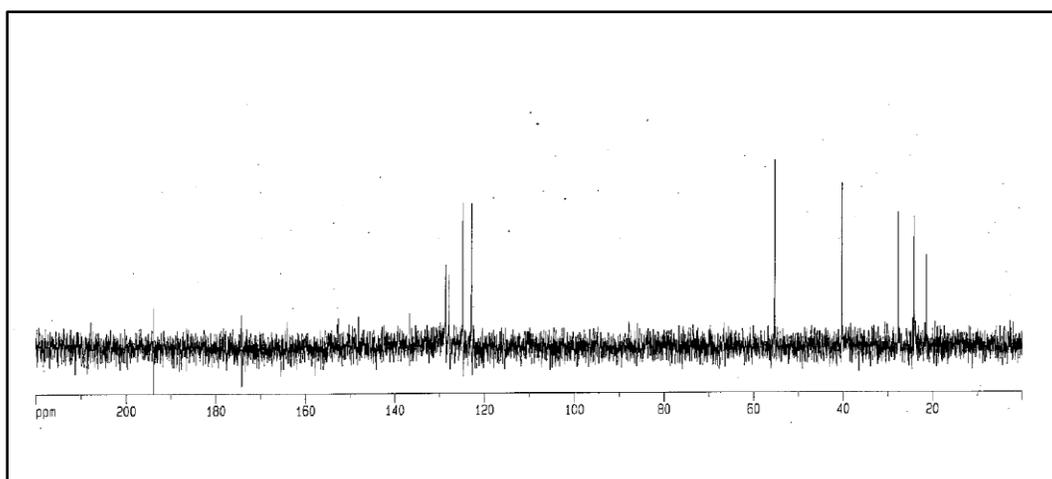
• MS



- ^1H NMR



- ^{13}C NMR



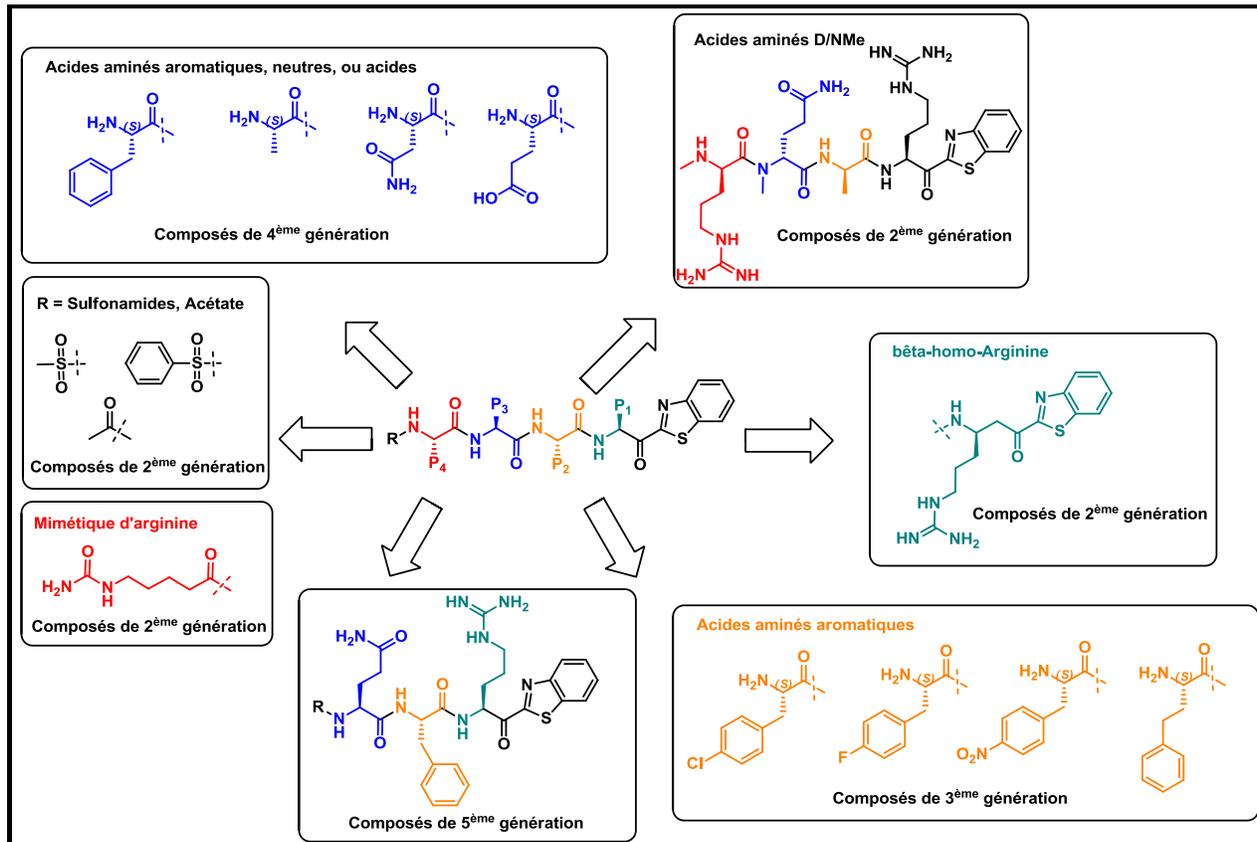
2.1.6 Acknowledgment

We wish to thank the Université de Sherbrooke and Canadian Institutes of Health Research for financial support (CIHR, MOP-97964). Professors B. Guerin and Y. Dory are acknowledged for sharing purification equipment.

CHAPITRE 2. OPTIMISATION D'INHIBITEURS PEPTIDOMIMÉTIQUES DE LA MATRIPTASE

Avant-propos et implication dans le travail: Éloïc Colombo, Pierre-Luc Boudreault, Pallavi Thakur du groupe Marsault ont fait le design, la synthèse et la purification des molécules de deuxième à la cinquième génération. Éloïc Colombo a réalisé les essais d'inhibition envers matriptase et matriptase-2 pour la deuxième génération de composés. Antoine Désilets du groupe Leduc a effectué les essais d'inhibition pour les autres générations de composés envers matriptase, HAT, DESC1, thrombine et furine.

Introduction: Les composés **1** et **4** (IN-1 et Q-A-R-Kbt) ont été identifiés comme des inhibiteurs puissants de la matriptase ($K_i < 1$ nM) (Colombo *et al.*, 2012). IN-1 représente un bon point de départ pour étudier la RSA et optimiser les propriétés pharmacologiques. Basé sur ce dernier, nous avons procédé aux modifications suivantes (Figure 27): (1) remplacer le résidu Arg en position P1 par un résidu β -hArg pour réduire l'épimérisation, et modifier la position P4 en incorporant des mimétiques d'arginine (Peterlin-Mašič et Kikelj, 2001), connus pour abaisser la basicité et potentiellement améliorer le profil pharmacocinétique; (2) incorporer des acides aminés naturels ou non naturels (aromatiques, basiques, acides et neutres) aux positions P4-P2 afin d'identifier les préférences de l'enzyme; (3) modifier les liens peptidiques par des liens N-alkyle, connus pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques (Chatterjee *et al.*, 2008); (4) introduire des groupements non peptidiques (acétates, carbamates, sulfonamides) à l'extrémité N-terminale pour contourner les problèmes de stabilité associés aux peptides.

Figure 27. Modifications de IN-1 aux positions P4-P1^a.

^aRouge = position P4; Bleu = position P3; Orange = position P2; Vert = position P1.

D'un point de vue synthétique, la synthèse des composés **1-7** (Tableau 1) a été réalisée uniquement en solution telle que décrit dans (Colombo *et al.*, 2012). Dans le but de générer des analogues rapidement et éviter des étapes de purification, les composés **32-72** ont été préparés à l'aide d'une combinaison de synthèse en phase solide et en solution. La synthèse de l'intermédiaire **9** (Schéma 1), qui porte le résidu Arg en position P1 modifié avec le cétothiazole, a été réalisée en solution comme décrite dans (Colombo *et al.*, 2012) alors que la synthèse des tripeptides (P4-P2) et dipeptides (P3-P2) intermédiaires ont été réalisées sur support solide. La synthèse des molécules et leurs propriétés pharmacologiques seront présentées.

3.1 PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

3.1.1 Matériels

Réactifs chimiques

Les acides aminés naturels, non naturels et les réactifs de couplage ont été commandés chez *ChemImpex International* (USA) et *Matrix Innovation* (Canada). Tous les autres réactifs et solvants ont été achetés auprès de *Sigma-Aldrich* (Canada), *Fisher Scientific* (USA), ou chez *Alfa Aesar* (USA) et utilisés tels que reçus. Les solvants anhydres ont été préalablement distillés en présence d'agents séchants avant utilisation. Le THF a été séché sur du sodium en présence de benzophénone, le DCM sur du pentoxyde de phosphore P₂O₅ et le MeOH sur du magnésium. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ (250 µm) de chez *Silicycle Inc* (Canada). Elles ont été éluées avec des mélanges binaires comme phase mobile: Hexane/EtOAc, EtOAc/MeOH, DCM/MeOH. Les composés UV-visible ont été visualisés par fluorescence (λ_{ex} 254 nm), par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (20 g de ninhydrine dans 600 mL de MeOH) pour identifier les amines primaires des acides aminés, ou d'une solution de cérium d'ammonium molybdate (CAM) (40 g de pentamolybdate d'ammonium et 1.6 g de sulfate de cérium IV dans 800 mL d'un mélange d'acide sulfurique/eau (1:9, v/v)) pour révéler les dérivés aromatiques, par exemple le groupe trityle après chauffage. La résine 2-chlorotrityle a été achetée auprès de *Matrix innovation* (Canada) et a été typiquement utilisée avec une charge de 1.2 mmol/g. Les réactions impliquant cette résine ont été effectuées soit dans des cartouches en polypropylène de 30-60 mL équipées d'un filtre fritté avec un robinet en téflon provenant de chez *Applied Separations* (USA), soit dans des réacteurs en verre de 50-100 mL provenant de *Chemglass Life Sciences* (USA).

Réactifs biologiques

L'ADN de matriptase et matriptase-2 humaines proviennent respectivement du laboratoire du Dr Chen Yong-Ling (Université de Georgetown, Washington, USA), C. López-Ótin (Université de Oviedo, Oviedo, Espagne). L'ADN TMPRSS11D (HAT) provient de *GenCopoeia* (USA). La thrombine et la trypsine humaines purifiées viennent de chez *Sigma Aldrich* (USA).

Les substrats peptidiques fluorogéniques (Cbz)R-R-AMC et (Boc)R-V-R-R-AMC ont été commandés chez *Enzo Life Sciences* (Canada) et (Boc)Q-A-R-AMC chez *Bachem* (USA).

Équipements

Chromatographie Ultraperformante couplée à un spectromètre de masse (UPLC-MS)

Les suivis réactionnels, la caractérisation des produits intermédiaires et finaux ont été réalisés par chromatographie à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse UPLC-MS ACQUITY TQD de Waters, équipé d'un détecteur UV fixé à une longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) de 223 nm, une longueur d'onde de détection ($\lambda_{\text{détéc}}$) de 210-400 nm et une colonne BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μm) avec un gradient linéaire de 5-95% MeCN/H₂O (condition A) ou de 50-95% MeCN/H₂O (condition B) contenant un pourcentage fixe de 0.1% d'acide formique pendant 2.5 min. L'appareil UPLC est couplé à un spectromètre de masse de type quadrapôle.

Chromatographie à haute performance préparative (HPLC-préparative)

Les produits finaux ont été purifiés à l'aide de l'HPLC préparative de *Waters* (Canada) en utilisant une colonne ACE C18 (250 x 21.2 mm), un gradient de 10-30% MeCN/H₂O + 0.1% de TFA durant 30 min avec un débit de 20 mL/min. Tous les produits finaux purifiés ont été obtenus sous forme de sels de TFA après lyophilisation. La pureté des produits finaux est supérieure ou égale à 89% et a été déterminée par UPLC/MS (Annexe A).

Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (HRMS)

La masse moléculaire exacte des composés finaux synthétisés a été déterminée à l'aide de la spectrométrie de masse Maxis 3G de *Bruker* (Canada) du département de chimie opérée par le Dr René Gagnon. Cet appareil à temps de vol est en mode électronébulisation et muni d'un quadrapôle. Typiquement, les échantillons sont dilués dans le DCM à 100 $\mu\text{g/mL}$ environ, puis une deuxième dilution par 10 dans le méthanol donne une concentration finale de 10 $\mu\text{g/mL}$, infusée directement dans le spectromètre de masse préalablement calibré avec une solution 0.5 mM de formate de sodium dans iPrOH/H₂O (9:1, v/v).

Lecteur de fluorescence

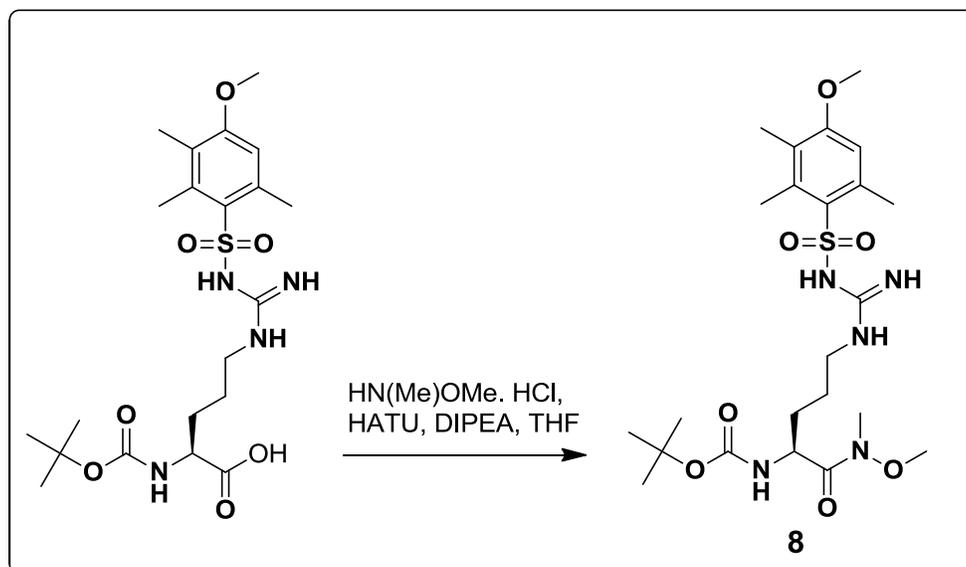
Les activités enzymatiques ont été évaluées en mesurant la libération de la fluorescence à partir de peptides couplés à un agent fluorescent (la 7-Amino-4-Méthylcoumarine (AMC)). La fluorescence a été détectée à des longueurs d'ondes d'excitation (λ_{ex}) de 360 nm et d'émission (λ_{em}) de 440 nm, sur un lecteur de fluorescence de chez *Bio-Tek Instruments* (USA) pour les microplaques FLX800 à température ambiante.

3.1.2 Méthodes

NB: Typiquement, les intermédiaires de synthèse ont été caractérisés en UPLC-MS et RMN ^1H (Annexe A). Les produits finaux ont été caractérisés en UPLC-MS (Annexe A) et HRMS.

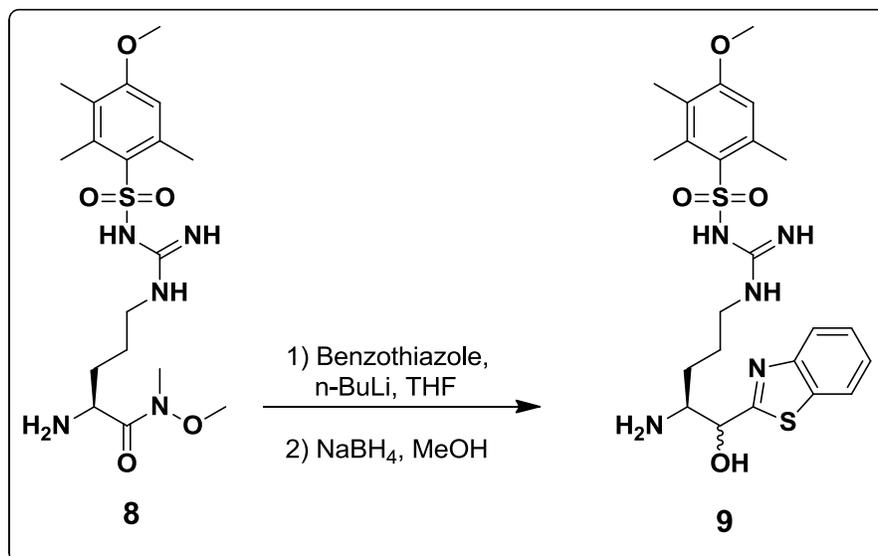
Synthèse en solution de dérivés arginine modifiés

(S)-tert-Butyl (1-(methoxy(methyl)amino)-5-(3-((4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)-1-oxopentan-2-yl)carbamate (8)



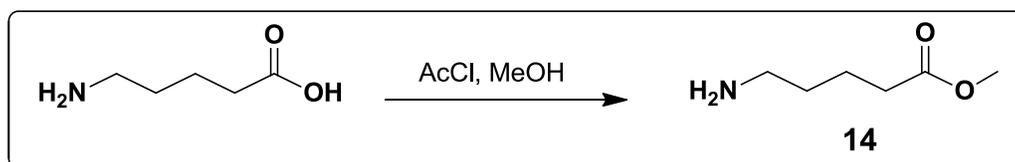
La synthèse du composé **8** a été effectuée en suivant le protocole décrit dans les informations supplémentaires de (Colombo *et al.*, 2012).

N-(*N*-((4*S*)-4-Amino-5-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-5 hydroxypentyl)carbamiimidoyl)-4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonamide (**9**)



La synthèse du composé **9** a été réalisée selon la procédure décrite dans les informations supplémentaires de (Colombo *et al.*, 2012).

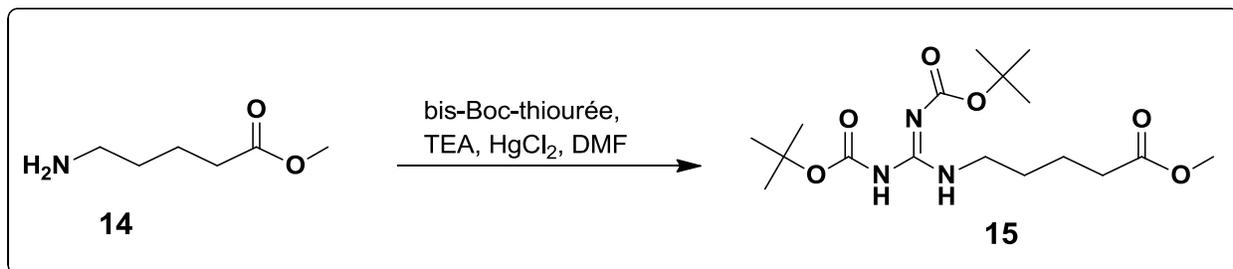
Méthyl 5-aminopentanoate (14)



À une solution de 75 mL de MeOH anhydre à 0°C a été ajouté lentement le chlorure d'acétyle (5 éq, 213 mmol, 15 mL). Après 15 min d'agitation, une solution de l'acide 5-aminopentanoïque (1 éq, 5 g, 43 mmol) dans 25 mL de MeOH sec a été additionnée lentement au milieu réactionnel, puis laissée sous agitation durant la nuit. Le mélange réactionnel a été évaporé sous pression réduite, séché sous vide, pour donner le composé **14** qui a été utilisé tel quel dans la réaction suivante.

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 3.55-3.66 (m, 3 H), 3.20-3.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.80-2.95 (s, 2 H), 2.30-2.45 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.55-1.75 (m, 4 H).

Methyl 5-(2,3-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidino)pentanoate (15)

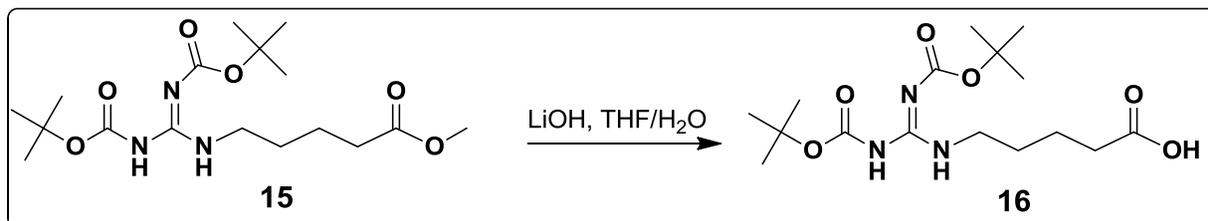


À une solution de l'amine **14** (1 éq, 5 g, 38 mmol) dans 50 mL de DMF refroidi à 0°C a été additionnée la *N,N'*-di-Boc-thiouree (1 éq, 11 g, 38 mmol), la triéthylamine (3.3 éq, 125.4 mmol, 18 mL) et HgCl₂ (1.1 éq, 11 g, 42 mmol). Après 2 h d'agitation le milieu réactionnel a été filtré sur celite et lavé avec EtOAc (50 mL). Le filtrat a été dilué dans 50 mL d'EtOAc, la phase organique a été lavée avec 5 x 100 mL d'H₂O. Les phases organiques ont été rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées sous pression réduite pour donner le composé **15** sous forme d'une poudre blanche (12 g, 82%).

Pureté HPLC : 99%; MS (ES) *m/z* 373.8 ((M+H)⁺).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 3.50-3.70 (s, 3 H), 3.20-3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 2.20-2.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 1.30-1.70 (m, 22 H).

5-(2,3-bis(tert-Butoxycarbonyl)guanidino)pentanoic acid (16)



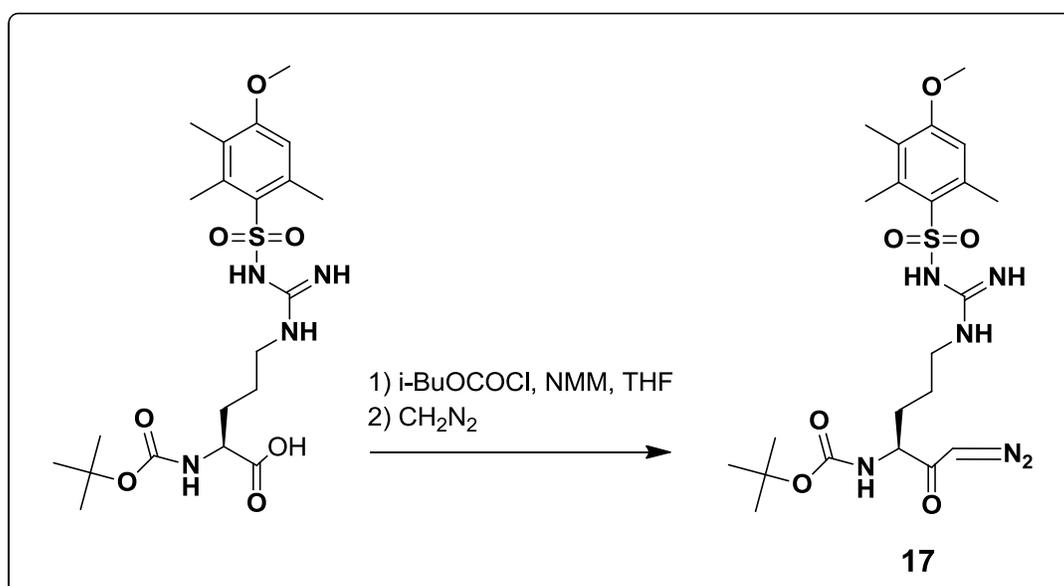
À une solution de LiOH (5 éq, 3 g, 65 mmol) dans un mélange THF/H₂O (50 mL, 1:1, v/v) a été ajouté le composé **15** (1 éq, 5 g, 13 mmol). Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 3 h. Une fois la réaction complétée, le THF a été évaporé sous vide. Le milieu a été refroidi à 0°C et une solution d'acide citrique à 1 M a été additionnée lentement jusqu'à pH 6-7. Le milieu réactionnel a été agité pendant 30 min à 0°C, filtré sur Büchner, lavé avec 3 x 100

mL d'H₂O puis séché sous vide. Le composé **16** a été obtenu sous forme d'un solide blanc (4 g, 78%).

Pureté HPLC : 99%; MS (ES) m/z 360.2 ((M+H)⁺).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.20-8.40 (s, 1 H), 3.40-3.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 2.30-2.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 1.60-1.80 (m, 4 H), 1.40-1.61 (s, 18 H).

(S)-*tert*-Butoxycarbonyl (1-diazo-6-(3-((4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)-2-oxohexan-3-yl)carbamate (**17**)



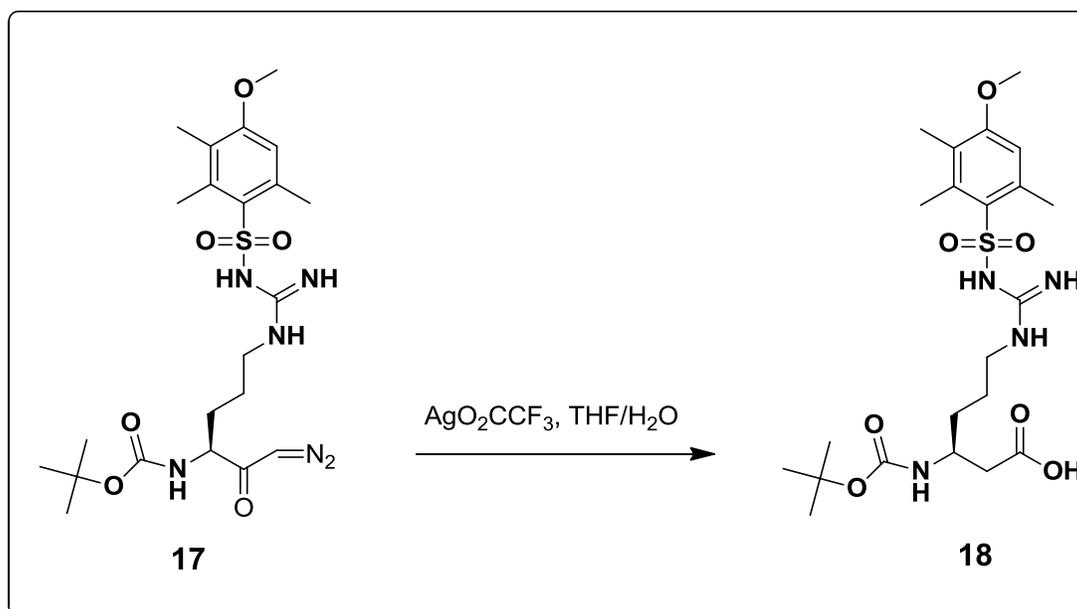
À une solution de Boc-Arg(Mtr)OH (1 éq, 10 g, 10.3 mmol) dans 50 mL de THF anhydre sous un flux d'argon refroidi à -16°C a été ajoutée la *N*-méthyl morpholine (1.1 éq, 11.3 mmol, 2.5 mL), et le chloroformiate d'isobutyle (1.1 éq, 11.3 mmol, 3 mL). Le mélange réactionnel a été agité pendant 20 min à -16°C puis filtré. Le diazométhane a été préparé fraîchement comme suit : 200 mL d'éther diéthylique ont été ajoutés à 88 mL d'une solution de KOH 40% refroidi à 0°C. La *N*-nitroso-*N*-méthyl-urée (6 éq, 12 g, 61.8 mmol) a été additionnée à la solution en agitant lentement. Après l'addition, la solution a été laissée à décanter et l'eau a été gelée à -78°C. La phase étherée contenant le diazométhane a été versée dans le mélange réactionnel contenant l'anhydride mixte et agitée 2 h à 0°C. Ensuite, un flux d'azote a été introduit dans le mélange afin d'évaporer le diazométhane en excès, suivi de l'ajout de quelques gouttes d'acide acétique. Le

milieu réactionnel a été concentré par évaporation sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans 100 mL d'Et₂O et 100 mL d'EtOAc. Les phases organiques ont été réunies et lavées successivement avec 50 mL d'une solution aqueuse de HCl à 1 M, 50 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1 M et 50 mL d'une solution de NaCl. Les phases organiques ont été séchées sur MgSO₄, filtrées sur fritté puis concentrées par évaporation sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant: MeOH/DCM, 1 à 5%) pour conduire à la diazocétone **17** sous forme d'un solide blanc (5.7 g, 60%, rendement en deux étapes).

Pureté UPLC : 95%; MS (ES) 511.51 ((M+H)⁺).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.44 (s, 9 H), 1.49-1.84 (m, 4 H), 1.92-2.1 (m, 1 H), 2.16 (s, 3 H), 2.61 (s, 3 H), 2.76 (s, 3 H), 3.09-3.25 (m, 2 H), 3.84 (s, 3 H), 4.02-4.20 (m, 1 H), 6.63-6.72 (m, 1 H).

(S)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-6-(3-((4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)hexanoic acid (**18**)



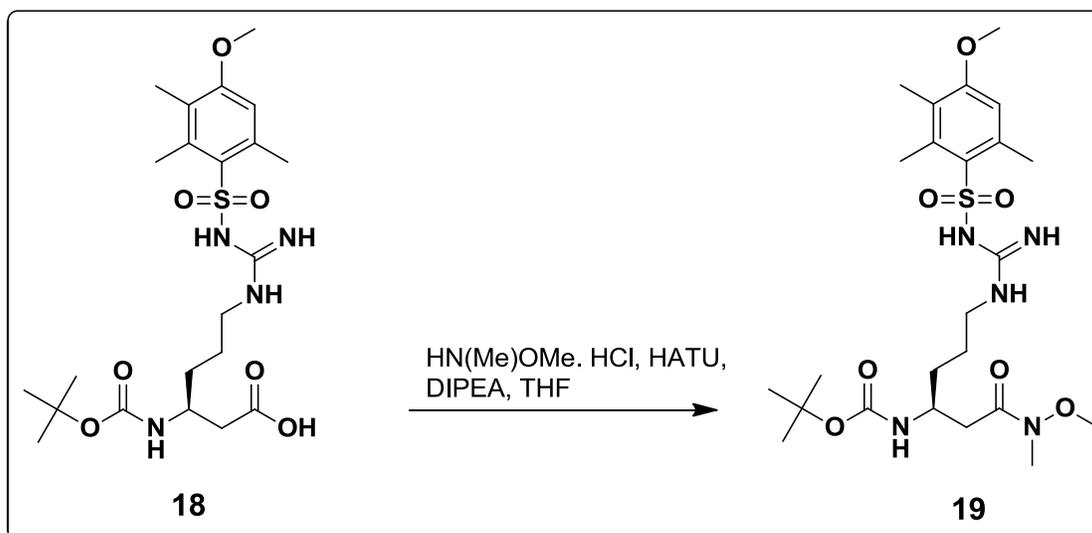
À une solution du diazocétone **17** (1.0 éq, 5.7 g, 11.2 mmol) dans un mélange THF/H₂O (50 mL, 9:1, v/v) refroidi à 0°C dans un bain de glace, a été additionnée le trifluoroacétate d'argent (0.11 éq, 270 mg, 1.2 mmol) suivi de la triéthylamine (2.9 éq, 32.3 mmol, 4.5 mL). Le

mélange a été agité pendant 2 h, puis dilué dans 100 mL d'EtOAc. Les phases organiques ont été rassemblées et lavées avec 50 mL d'une solution saturée de NH_4Cl et 50 mL d'une solution de NaCl . Les phases organiques ont été séchées sur MgSO_4 , filtrées puis concentrées sur un évaporateur rotatif. Le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant: MeOH/DCM, 1 à 5%) pour conduire au composé **18** sous forme d'un solide blanc (5.2 g, 95%).

Pureté UPLC : 85%; MS (ES) 501.34 ((M+H)⁺).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.40 (s, 9H), 1.45-1.71 (m, 4H), 1.96-2.1 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.62 (s, 3H), 2.7 (s, 3H), 3.07-3.23 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.00-4.21 (m, 1H), 6.61-6.73 (m, 1H).

(S)-tert-Butoxycarbonyl(1-(methoxy(methyl)amino)-6-(3-((4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)-1-oxohexan-3-yl)carbamate (**19**)



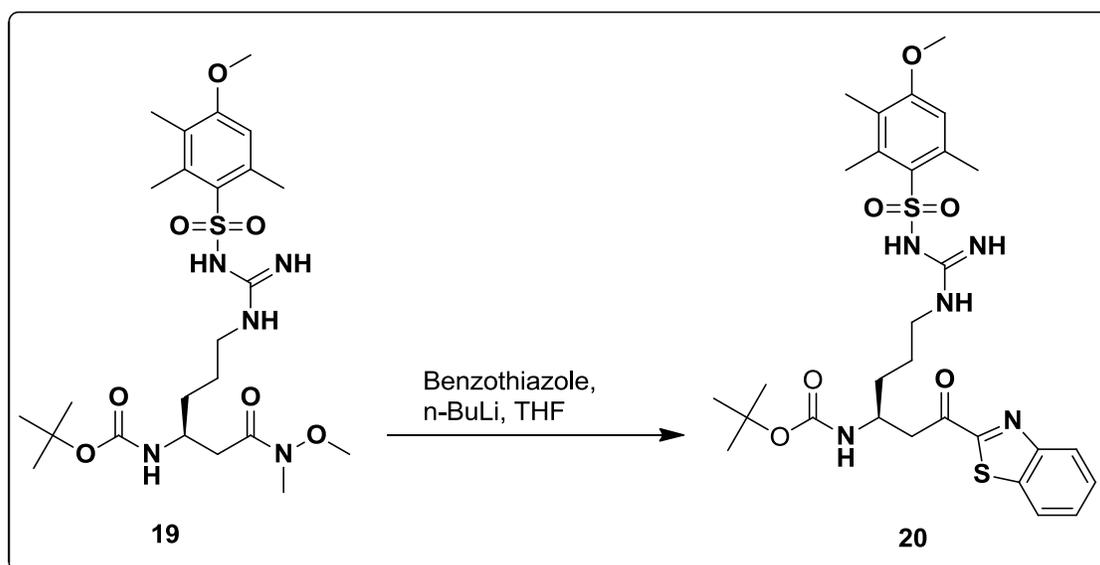
La synthèse du composé **19** est inspirée du protocole décrit dans les informations supplémentaires de (Colombo *et al.*, 2012). À une solution de Boc-Arg(Mtr)-OH (1 éq, 2.7 g, 5.4 mmol) dans du THF anhydre (60 mL) a été additionnée sous un flux d'argon, HATU (1.2 éq, 2.5 g, 6.46 mmol), $\text{HN}(\text{Me})\text{OMe} \cdot \text{HCl}$ (6.46 mmol, 1.2 éq) et 4.7 mL DIPEA (5 éq, 630 mg, 27 mmol). Le mélange réactionnel a été agité durant 3 h à température ambiante. Une fois la réaction complétée, le milieu réactionnel a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif et directement

purifié par chromatographie sur gel de silice selon le gradient EtOAc/Hexane (80:20 → 100:0) pour donner le composé **19** sous la forme d'un solide blanc (2.6 g, 95%).

Pureté UPLC : 88%; MS (ES) 544.92 ((M+H)⁺).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.42 (s, 9 H), 1.45-1.68 (m, 4 H), 1.91-2.07 (m, 2 H), 2.15 (s, 3 H), 2.45-2.60 (m, 2 H), 2.61 (s, 3 H), 2.68 (s, 3 H), 3.15-3.18 (m, 2 H), 3.71 (s, 3 H), 3.86 (s, 3 H), 4.01-4.21 (m, 1 H), 6.20-6.31 (m, 1 H).

(S)-N-(N-(4-Amino-6-(4-methyl-5-vinylthiazol-2-yl)-6-oxohexyl)carbamimidoyl)-4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonamide (**20**)



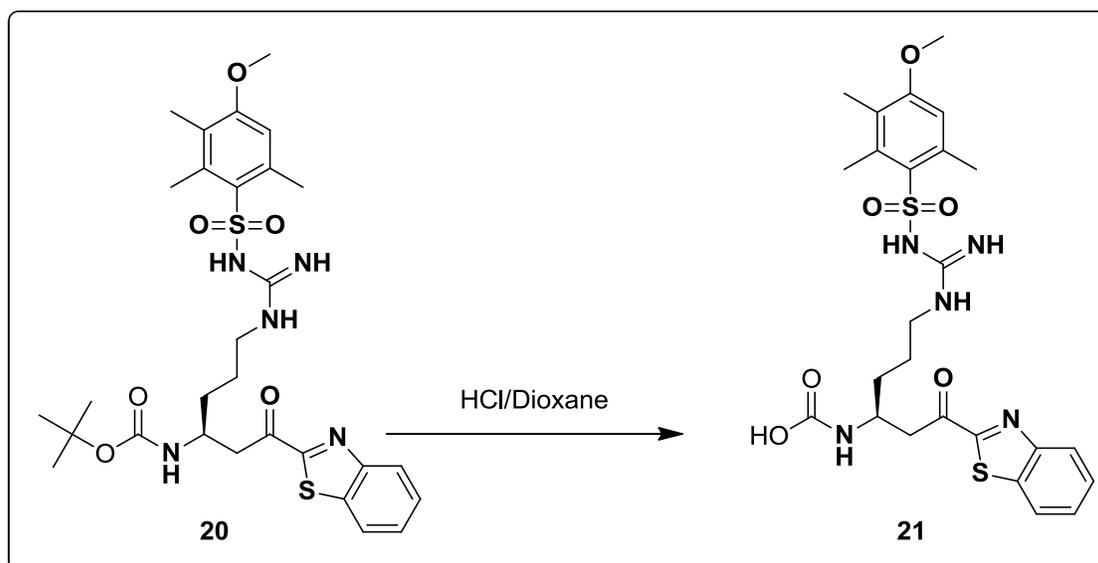
La synthèse du composé **20** est issue du protocole décrit dans les informations supplémentaires de (Colombo *et al.*, 2012). À une solution de benzothiazole (4.6 éq, 22.1 mmol, 2.41 mL) dans 50 mL de THF anhydre refroidi à -78°C sous un flux d'argon, le *n*-butyllithium à 1.02 M dans l'hexane (4.1 éq, 19.6 mmol, 7.84 mL) a été ajouté pendant 30 min à -78°C. Le milieu réactionnel a été agité durant 30 min. Une solution du composé **19** (1 éq, 4.8 mmol, 2.6 mg) dans 27 mL de THF anhydre à -78°C a été additionnée durant 30 min au mélange réactionnel. La réaction a été agitée pendant 15 min à -78°C, puis neutralisée doucement avec 20 mL de NH₄Cl. Les phases organiques ont été extraites avec EtOAc (3 x 50 mL). Les phases organiques combinées ont été lavées avec H₂O (3 x 50 mL), une solution saturée de NaCl (2 x 50

mL), séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées à l'évaporateur rotatif. Le résidu a été purifié par chromatographie sur gel de silice selon le gradient (EtOAc/Hexane 80:20 → 100:0) pour conduire au composé **20** sous la forme d'une poudre jaune (1.44 g, 49%).

Pureté UPLC : 100%; MS (ES) 618.41 ((M+H)⁺).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.30 (s, 9 H), 1.48-1.65 (m, 4 H), 2.0-2.04 (m, 2 H), 2.13 (s, 3 H), 2.61 (s, 3 H), 2.76 (s, 3 H), 3.15-3.27 (m, 2 H), 3.75 (s, 3 H), 4.06-4.17 (m, 1 H), 6.51-6.69 (m, 1 H), 7.53-7.75 (m, 2 H), 8.05-8.13 (m, 1 H), 8.15-8.27 (m, 1 H).

(S)-N-(N-(4-Amino-6-(4-methyl-5-vinylthiazol-2-yl)-6-oxohexyl)carbamimidoyl)-4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonamide (21)



À une solution de HCl/dioxane (4M, 16 mL) refroidie à 0°C a été ajoutée le composé **20** (1 éq, 1.62 mmol, 1 g) sous argon. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Une fois la réaction complétée, le milieu réactionnel a été concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu a été trituré dans Et₂O (20 mL), le précipité formé a été récupéré par filtration, séché sous-vide, pour donner le composé **21** sous la forme d'une poudre jaune (838 mg, 100%) qui a été utilisé tel quel dans la réaction de couplage peptidique.

Pureté UPLC : 98% ; MS (ES) 562.18 ((M+H)⁺).

Synthèse des tripeptides intermédiaires (P4-P2) sur support solide

La synthèse des tripeptides sur support solide a été effectuée en utilisant la résine 2-chlorotriptyle selon la méthodologie décrite dans (Athanasopoulos *et al.*, 1995), (Albericio *et al.*, 1998) (Barlos *et al.*, 1995), (Duchene *et al.*, 2014). Les lavages ont été faits avec une quantité de 10 mL par g de résine, sous agitation pendant 5 min.

Méthode A: Attachement de l'acide carboxylique sur la résine 2-chlorotriptyle

À 1 g de la résine 2-chlorotriptyle (1.2 mmol/g) a été ajouté 3 éq d'acide carboxylique dissous dans du DCM (environ 10 mL/g de résine), et 2.5 éq de DIPEA. Le mélange a été agité vigoureusement pendant 30-60 min. Pour neutraliser les sites actifs de la résine restant, du MeOH de qualité HPLC (0.8 mL/g de résine) a été additionné dans le milieu réactionnel contenant la résine, qui a été agitée durant 15 min. La résine a été ensuite filtrée et lavée respectivement avec 3 x DCM, 2 x DMF, 2 x DCM, 3 x iPrOH, 3 x DCM, puis séchée sous vide.

Méthode B: Déprotection du groupement protecteur fluorénylméthylloxycarbonyl (Fmoc)

À la résine sèche a été ajoutée une solution de 20% de pipéridine dans du DMF, puis le mélange réactionnel a été agité pendant 30 min. La résine a été ensuite filtrée et lavée respectivement avec 3 x DMF, 3 x iPrOH, 3 x DCM puis séchée sous vide.

Méthode C: Réaction de couplage peptidique avec HATU

À une solution d'acide carboxylique (3 éq) et HATU (2 éq) dissous dans du DMF (environ 10 mL/g de résine) a été ajoutée la DIPEA (5 éq). Le mélange réactionnel a été additionné dans le réacteur contenant la résine et agité vigoureusement pendant 2 h. Après filtration, la résine a été lavée avec 3 x DMF, 3 x iPrOH, 3 x DCM puis séchée sous vide. Une petite quantité de résine a été clivée avec 20% de HFIP dans du DCM pendant 10 min. Le produit récupéré a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

Méthode D: Réaction de clivage de la résine 2-chlorotrityle

Une solution de 20% de HFIP dans du DCM (10 mL/g de résine, v/v) a été ajoutée à la résine. Après 30 min d'agitation, la résine a été lavée avec une solution fraîche de 20% de HFIP dans du DCM puis 3 x DCM. Le filtrat a été évaporé dans un évaporateur rotatif et séché sous vide pour donner le tripeptide correspondant. Le tripeptide a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

N-méthylation de peptides supportés

La procédure d'introduction de *N*-méthyle a été réalisée sur la résine 2-chlorotrityle tel que décrit par le groupe de Biron (Biron *et al.*, 2006).

Méthode E: Introduction du groupe protecteur ortho-nitrobenzène sulfonyle (o-NBS)

À la résine 2-chlorotrityle a été ajoutée une solution de chlorure d'ortho-nitrobenzène sulfonyle (*o*-NBSCl) (4 éq) et de collidine (10 éq) dans la NMP. Après 15 min d'agitation, la résine a été lavée avec 5 x NMP, 3 x DCM, puis séchée sous vide. Une petite quantité de résine a été clivée avec 20% de HFIP dans du DCM pendant 10 min. Le produit récupéré a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

Méthode F: N-méthylation par réaction de Fukuyama-Mitsunobu

Le peptide nosylé sur résine a été agité pendant 10 min dans une solution contenant 5 éq de PPh₃ et 10 éq de MeOH dans du THF sec. Une solution de DIAD (5 éq) dans du THF anhydre a été additionnée lentement au milieu réactionnel, qui a ensuite été agité pendant 10 min. La résine a été lavée avec 5 x NMP, 3 x DCM, puis séchée sous vide. Une petite quantité de résine a été clivée avec 20% de HFIP dans du DCM pendant 10 min. Le produit obtenu a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

Méthode G: Déprotection du groupe protecteur o-NBS

La résine a été traitée avec une solution de mercaptoéthanol (10 éq) et DBU (5 éq) dans du NMP pour une durée de 15 min. Cette procédure de déprotection a été répétée une seconde fois et la résine a été lavée avec 5 x NMP, 3 x DCM, puis séchée sous vide.

Méthode H: Réaction de couplage peptidique avec HATU/HOAt

À une solution de Boc-AA-OH ou Fmoc-AA-OH (3 éq), HATU (3 éq), HOAt (3 éq), DIPEA (6 éq) dans la NMP a été ajouté le peptide fixé sur la résine. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h. La résine a été lavée avec 5 x NMP, 3 x DCM, puis séchée sous vide. Une petite quantité de résine a été clivée avec 20% de HFIP dans du DCM pendant 10 min. Le produit récupéré a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

Fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de peptides sur support solide

La fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de peptides a été réalisée sur la résine 2-chlorotriptyle selon les différentes méthodes ci-dessous :

Méthode I: Acétylation et benzylation

À une solution d'acide acétique ou d'acide benzoïque (5 éq), HATU (2 éq), DIPEA (5 éq) dans le DMF a été ajouté le peptide sur résine. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 1 h. La résine a été lavée avec 3 x DMF, 3 x iPrOH, 3 x DCM puis séchée sous vide. Une petite quantité de résine a été clivée avec 20% de HFIP dans du DCM pendant 10 min. Le produit récupéré a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

Méthode J: Sulfonylation avec MsCl et PhSO₂Cl

Une solution de DIPEA (5 éq) diluée dans le DCM (10 mL/g de résine) a été ajoutée à la résine. Le chlorure de méthanesulfonyle (MsCl, 2 éq) ou de benzène sulfonyle (PhSO₂Cl, 5 éq) a été additionné lentement à la résine, puis le mélange a été agité vigoureusement pendant 1 h. Cette procédure a été répétée une nouvelle fois si la réaction était incomplète. La résine a été lavée avec 3 x DMF, 3 x iPrOH, 3 x DCM puis séchée sous vide. Une petite quantité de résine a été clivée avec 20% de HFIP dans du DCM pendant 10 min. Le produit obtenu a été analysé par UPLC-MS selon la condition B.

Synthèses des produits finaux en solution

La synthèse des produits finaux **32-72** a été effectuée selon le protocole décrit dans (Colombo *et al.*, 2012). Les composés ont été obtenus sous forme de solides blancs et les données

de caractérisation sont présentées dans les tableaux ci-dessous. L'analyse UPLC-MS a été réalisée selon la condition A.

Tableau 3. Caractérisation des composés 32-40.

Composé	Masse (mg)	Rendement (%)	Pureté UPLC	HRMS théorique (m/z)	HRMS expérimentale (m/z)
32. R-(D)Q-A-R-Kbt	5.3	4	98	647.3200 (M+H) ⁺	647.3228 (M+H) ⁺
33. (D)R-Q-A-R-Kbt	6	46	99	647.3200 (M+H) ⁺	647.3228 (M+H) ⁺
34. (D)R-(D)Q-A-R-Kbt	3.8	4	99	647.3200 (M+H) ⁺	647.3228 (M+H) ⁺
35. R-Q-A-βhR-Kbt	28	61	99	323.6657 (M+2H) ^{+/2}	323.6670 (M+2H) ^{+/2}
36. R-(NMe)Q-A-R-Kbt	13	7	99	331.1712 (M+2H) ^{+/2}	331.1725 (M+2H) ^{+/2}
37. (NMe)R-Q-A-R-Kbt	4	13	99	331.1712 (M+2H) ^{+/2}	331.1725 (M+2H) ^{+/2}
38. (CH ₃ CO)R-Q-A-R-Kbt	25	55	96	345.1687 (M+2H) ^{+/2}	345.1701 (M+2H) ^{+/2}
39. (CH ₃ SO ₂)R-Q-A-R-Kbt	20	44	98	363.1521 (M+2H) ^{+/2}	363.1528 (M+2H) ^{+/2}
40. (PhSO ₂)R-Q-A-R-Kbt	5	11	99	394.1600 (M+2H) ^{+/2}	394.1615 (M+2H) ^{+/2}

Tableau 4. Caractérisation des composés 41-48.

Composé	Masse (mg)	Rendement (%)	Pureté UPLC	HRMS théorique (m/z)	HRMS expérimentale (m/z)
41. (H)R-Q-A-R-Kbt	30	15	98	316.6579 (M+2H) ^{+/2}	316.6602 (M+2H) ^{+/2}
42. (H)R-(D)Q-A-R-Kbt	29	63	96	647.3200 (M+H) ⁺	647.3228 (M+H) ⁺
43 ^a . R-Q-Y-R-Kbt	25	40	99	370.1765 (M+2H) ^{+/2}	370.1792 (M+2H) ^{+/2}
44 ^a . R-Q-F-R-Kbtb	16	14	99	362.1790 (M+2H) ^{+/2}	362.1801 (M+2H) ^{+/2}
45. R-Q-hF-R-Kbt	10	21	95	369.1868 (M+2H) ^{+/2}	369.1883 (M+2H) ^{+/2}
46. R-Q-F(4NO ₂)-R-Kbt	0.4	0.2	99	384.6716 (M+2H) ^{+/2}	384.6725 (M+2H) ^{+/2}
47. R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	20	13	95	379.1595 (M+2H) ^{+/2}	379.1628 (M+2H) ^{+/2}
48. R-Q-F(4F)-R-Kbt	16	8	98	371.1743 (M+2H) ^{+/2}	371.1749 (M+2H) ^{+/2}

^aDonnées publiées dans (Duchêne *et al.*, 2014).

Tableau 5. Caractérisation des composés 49-55.

Composé	Masse (mg)	Rendement (%)	Pureté UPLC	HRMS théorique (m/z)	HRMS expérimental (m/z)
49. (H)R-(D)Q-F-R-Kbt	150	14	99	354.6736 (M+2H) ^{+/2}	354.6764 (M+2H) ^{+/2}
50. (D)R-(D)Q-F-R-Kbt	25	15	99	362.1790 (M+2H) ^{+/2}	362.1801 (M+2H) ^{+/2}
51. (H)R-Q-F-R-Kbt	20	11	99	354.6736 (M+2H) ^{+/2}	354.6762 (M+2H) ^{+/2}
52. (CH ₃ SO ₂)R-Q-F-R-Kbt	5	6	99	401.167 (M+2H) ^{+/2}	401.1712 (M+2H) ^{+/2}
53. (PhSO ₂)R-Q-F-R-Kbt	5	6	99	432.1756 (M+2H) ^{+/2}	432.1792 (M+2H) ^{+/2}
54. (H)R-Q-hF-R-Kbt	10	30	99	360.6741 (M+2H) ^{+/2}	360.6767 (M+2H) ^{+/2}
55. (H)R-Q-Bip-R-Kbt	35	37	98	392.6892 (M+2H) ^{+/2}	392.6907 (M+2H) ^{+/2}

Tableau 6. Caractérisation des composés 56-63.

Composé	Masse (mg)	Rendement (%)	Pureté UPLC	HRMS théorique (m/z)	HRMS expérimental (m/z)
56. (H)R-Q-Bpa-R-Kbt	12	26	99	406.6867 (M+2H) ^{+/2}	406.6888 (M+2H) ^{+/2}
57. (H)R-Q-Cha-R-Kbt	17	37	97	357.6970 (M+2H) ^{+/2}	357.6987 (M+2H) ^{+/2}
58. (H)R-Q-F(4NH ₂)-R-Kbt	5	9.4	95	362.1790 (M+2H) ^{+/2}	362.124 (M+2H) ^{+/2}
59. (H)R-Q-F(4CH ₂ NH ₂)-R-Kbt	20	33	95	369.1868 (M+2H) ^{+/2}	369.1900 (M+2H) ^{+/2}
60. (H)R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	33	72	99	371.6541 (M+2H) ^{+/2}	371.6562 (M+2H) ^{+/2}
61. (H)R-Q-Y-R-Kbt	10	10	90	379.1595 (M+2H) ^{+/2}	379.1628 (M+2H) ^{+/2}
62. (H)R-Q(N(Me) ₂)-F-R-Kbt	12	9	99	368.6892 (M+2H) ^{+/2}	368.6920 (M+2H) ^{+/2}
63. (H)R-N-F-R-Kbt	12	18	89	347.6657 (M+2H) ^{+/2}	347.6685 (M+2H) ^{+/2}

Tableau 7. Caractérisation des composés 64-72.

Composé	Masse (mg)	Rendement (%)	Pureté UPLC	HRMS théorique (m/z)	HRMS expérimental (m/z)
64. (H)R-F-F-R-Kbt	12	17	99	355.1656 (M+2H) ^{+/2}	355.1682 (M+2H) ^{+/2}
65. (H)R-E-F-R-Kbt	70	14	99	355.1656 (M+2H) ^{+/2}	355.1682 (M+2H) ^{+/2}
66. (H)R-A-F-R-Kbt	30	15	99	326.1628 (M+2H) ^{+/2}	326.1654 (M+2H) ^{+/2}
67. (H)Q-F-R-Kbt	5	11	99	552.2388 (M+H) ⁺	552.22415 (M+H) ⁺
68. (CH ₃) ₂ Q-F-R-Kbt	30	66	99	298.1441 (M+2H) ^{+/2}	298.1456 (M+2H) ^{+/2}
69. (CH ₃ CO)Q-F-R-Kbt	30	66	99	609.2602 (M+H) ⁺	609.2621 (M+H) ⁺
70. (CH ₃ SO ₂)Q-F-R-Kbt	20	44	99	645.2272 (M+H) ⁺	645.2305 (M+H) ⁺
71. R-Q-3Pal-R-Kbt	5	30	99	723.3387(M+H) ⁺	723.3415 (M+H) ⁺
72. hR-Q-A-R-Kbt	4	9	95	331.1712 (M+2H) ^{+/2}	331.1729 (M+2H) ^{+/2}

Expression, purification et dosage enzymatique des protéases

Matriptase, matriptase-2, hepsine, HAT et DESC1 ont été exprimées dans la bactérie *Escherichia Coli* M15 et purifiées à l'aide de la chromatographie d'affinité par immobilisation d'ions métalliques (IMAC) et la chromatographie par échange d'ions Mono-Q comme précédemment décrit dans (Colombo *et al.*, 2012), (Béliveau *et al.*, 2009). Le dosage enzymatique de ces enzymes a été réalisé à température ambiante dans une solution tampon contenant 50 mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl et 500 µg/mL de BSA à pH 7.4.

Inhibition de la matriptase et calcul de la constante d'inhibition K_i

Les essais d'inhibition ont été réalisés comme décrit dans (Colombo *et al.*, 2012). En bref, dans une plaque de 96 puits noirs a été incubé 1nM de l'enzyme, 2 µM de son substrat fluorogénique, les composés à différentes concentrations dans le DMSO, et une solution tampon

HEPES. La plaque est ensuite déposée dans le lecteur de fluorescence pendant 30 min. L'activité protéolytique de l'enzyme a été évaluée par la mesure de la libération de fluorescence détectée sur le lecteur de fluorescence. Une courbe de l'activité relative de l'enzyme en fonction de la concentration de l'inhibiteur est tracée et représente une régression linéaire correspondant soit à l'équation de Morrison (inhibiteurs compétitifs *slow tight binding* ou *tight binding*) ou l'équation de Michaelis-Menten (inhibiteurs compétitifs classiques) pour le calcul du K_i comme détaillé dans (Colombo *et al.*, 2012).

Modélisation moléculaire

La structure cristallographique de la matriptase (PDB code 3NCL) a été tirée de RCSB Protein Data Bank. La structure 3D des molécules arrimées dans la matriptase a été construite à l'aide du programme MOE (*Molecular Operating Environment* 2012, www.chemcomp.com) selon les paramètres suivants:

- les atomes d'hydrogène de la molécule ont été ajoutés et leurs positions ont été optimisées en utilisant l'algorithme Protonate 3D;
- le champ de force *Amber 10* avec la solvation *R-Field* ont été utilisés;
- le calcul des charges a été réalisé à l'aide de la fonction *Partial charge*;
- l'énergie de la molécule a été minimisée en utilisant la commande *Energy minimize*;
- la fonction guanidine a été fixée à une distance de $3 \pm 0.1 \text{ \AA}$, et le carbonyle du lien covalent est également fixé à $3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ du résidu catalytique Ser²⁰⁸;
- la simulation des conformations a été effectuée via *conformational* → *search* ;
- les différentes conformations ont été classées en fonction de l'énergie totale.

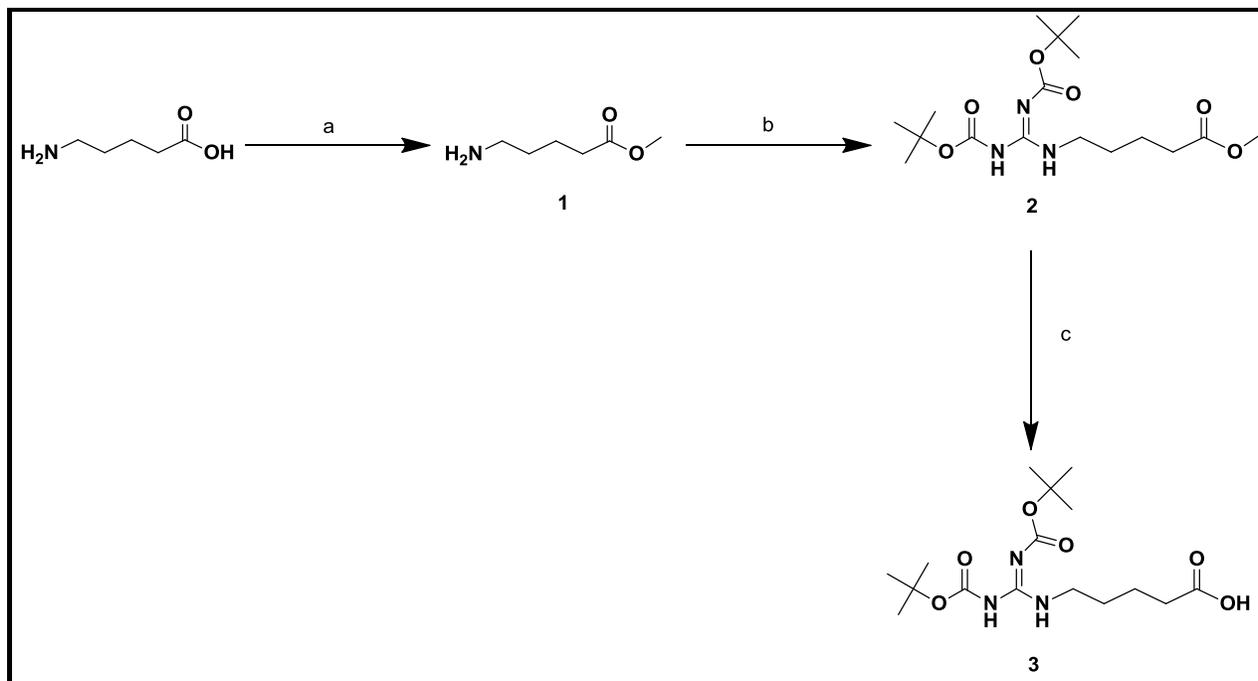
Les structures cristallographiques de la thrombine (PDB code 4AYV) et de la furine (PDB code 1P8J) ont été tirées de RCSB Protein Data Bank. La structure de la matriptase-2 a été obtenue par homologie de séquence avec la structure cristalline de la matriptase en utilisant le logiciel MODELER tel que décrit dans (Duchêne *et al.*, 2014). La superposition de la matriptase avec la matriptase-2, la thrombine et la furine a été réalisée en utilisant les fonctions *Superpose* → *Alignment* du logiciel MOE.

3.2 RÉSULTATS

3.2.1 Synthèse de mimétiques d'arginine aux positions P1 et P4

La synthèse en solution du désaminoarginine (Schéma 3) a été réalisée à partir de l'acide aminovalérique. Tout d'abord, l'acide carboxylique de l'extrémité C-terminale de l'acide aminovalérique a été protégé avec un ester méthylique en utilisant le chlorure d'acétyle et le méthanol pour donner l'intermédiaire **14** avec un rendement quantitatif. Ensuite, le motif guanidine a été introduit via la réaction entre l'amine et l'agent de guanidinylation (la bis-Boc-thiourée), en présence de triéthylamine et du chlorure de mercure pour générer l'analogue **15** avec un rendement de 82% (Kim *et al.*, 1993). Enfin, l'ester méthylique de l'analogue **15** a été transformé en acide carboxylique par hydrolyse basique avec LiOH pour conduire au composé désaminoarginine **16** avec un rendement de 78%. Ce composé **16** a été utilisé comme acide aminé modifié en position P4 pour la synthèse de tripeptide sur support solide.

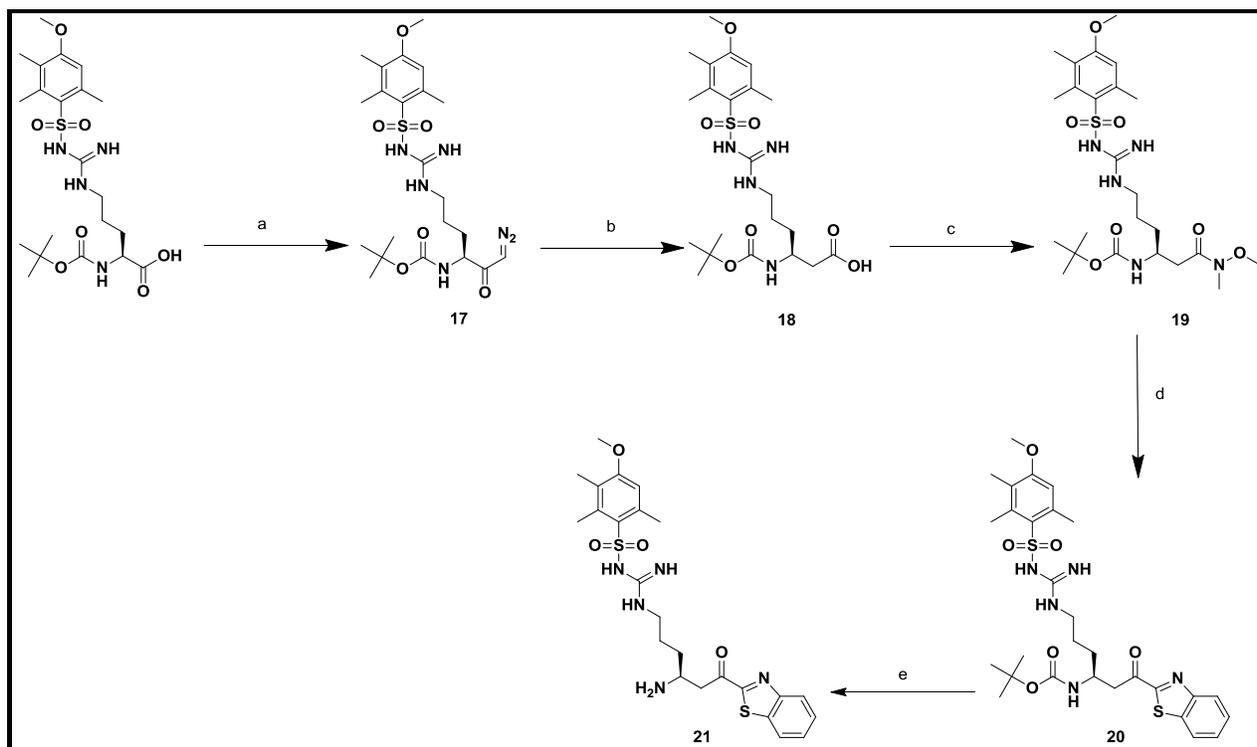
Schéma 3. Synthèse de la désaminoarginine **16**^a.



^aRéactifs : (a) AcCl, MeOH, r.t, 100%; (b) bis-Boc-thiourée, TEA, HgCl₂, DMF, r.t, 82%; (c) LiOH, THF/H₂O (1:1, v/v), r.t, 78%.

La synthèse de la β hArg-Kbt (Schéma 4) a été réalisée selon la procédure décrite par (Guichard *et al.*, 1998). L'acide aminé Boc-Arg(Mtr)-OH, commercialement disponible, a été converti en diazocétone **17** via la réaction de l'anhydride mixte, préparé par réaction avec *i*-BuOCOCi/NMM en présence du diazométhane CH_2N_2 . Le réarrangement de Wolf du diazocétone **17** avec AgOCOCF_3 , a donné l'intermédiaire **18** avec un rendement de 60% en deux étapes. Ce dernier a été transformé en amide de Weinreb **19** (Nahm et Weinreb, 1981) par couplage avec $\text{HN}(\text{Me})\text{OMe}\cdot\text{HCl}$, HATU et DIPEA. L'addition du lithiobenzothiazole sur l'amide de Weinreb **19** a mené au composé Boc- β hArg-Kbt **20**. La déprotection du groupe Boc du composé **20** avec HCl /dioxane a donné la β hArg-Kbt **21**.

Schéma 4. Synthèse de la β hArg(Mtr)-Kbt **21**^a.

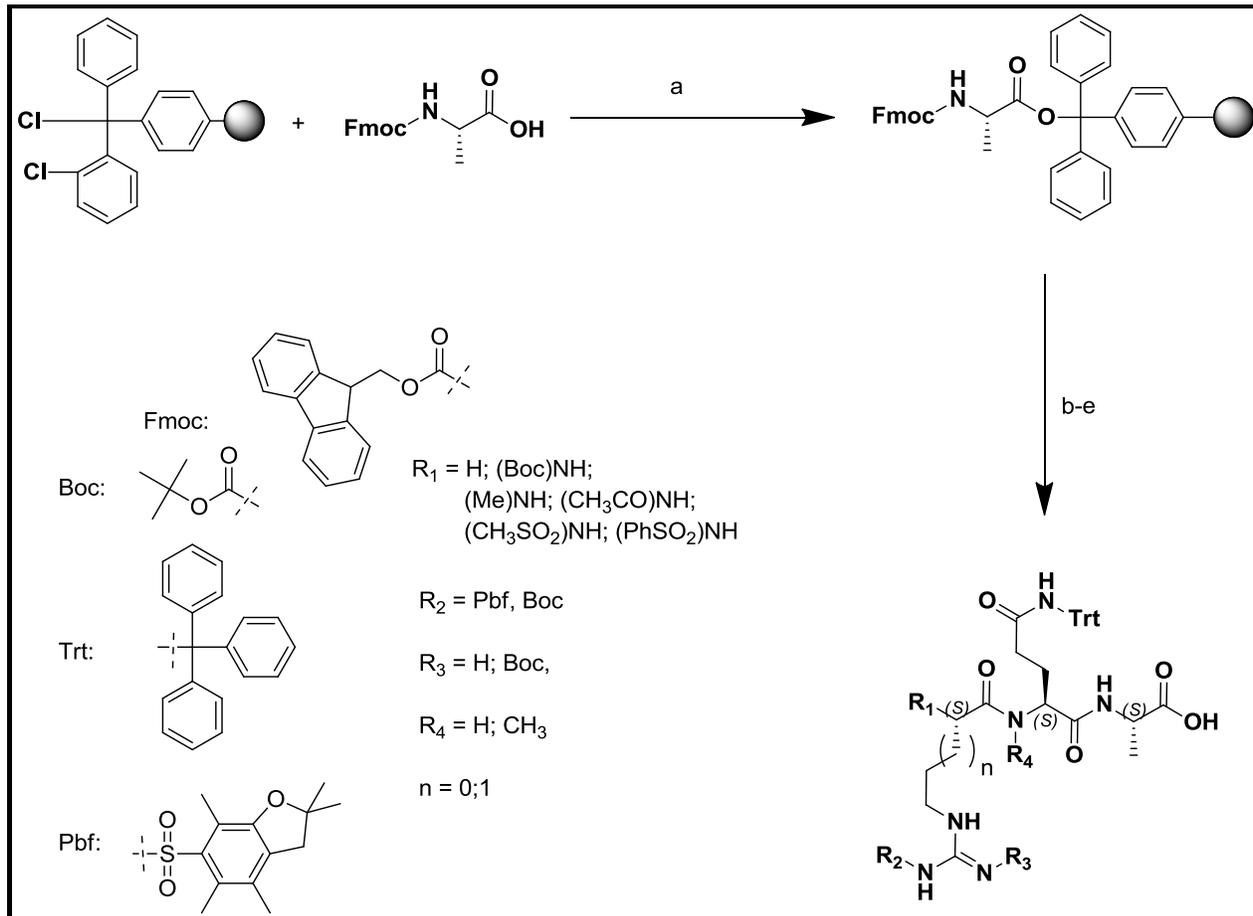


^aRéactifs : (a) i. *i*-BuOCOCi, NMM, THF, r.t.; ii. CH_2N_2 , r.t, 60% (2 étapes); (b) AgOCOCF_3 , THF/ H_2O , r.t, 95%; (c) $\text{HN}(\text{Me})\text{OMe}\cdot\text{HCl}$, HATU, DIPEA, THF, r.t, 89%; (d) Benzothiazole, *n*-BuLi, THF, -78°C , 49%; (e) HCl /dioxane, r.t, 100%.

3.2.2 Synthèse des tripeptides sur support solide

La résine 2-chlorotrityle est largement utilisée en synthèse de peptides sur support solide et le peptide est décroché de la résine dans des conditions acides faibles (Barlos *et al.*, 1991). Ce type de résine est parfaitement adapté à notre stratégie de synthèse supportée puisque l'extrémité N-terminale des tripeptides intermédiaires doit être protégée avec un groupe Boc pour la suite de la synthèse, qui est stable dans les conditions de clivage acides douces. Ainsi, les tripeptides intermédiaires (P4-P2) ont été synthétisés en phase solide en utilisant la résine 2-chlorotrityle (Schéma 5). Tout d'abord, l'ancrage du premier acide aminé en C-terminal de la résine a été effectué en présence de DIPEA, selon la méthode A (voir matériels et méthodes). La synthèse a été poursuivie par une déprotection du groupe Fmoc en N-terminale avec une solution de pipéridine dans le DMF (méthode B). L'amine libre a ensuite été engagée dans une réaction de couplage peptidique avec un acide aminé protégé par un groupement fmoc, en utilisant HATU et DIPEA (méthode C). Suite à la déprotection du groupe Fmoc du dipeptide sur résine, le dernier couplage peptidique a été effectué en utilisant l'acide aminé protégé par un groupe Boc. Les tripeptides intermédiaires ont été clivés de la résine avec une solution de 20% de HFIP dans du DCM (méthode D) puis utilisés directement.

Schéma 5. Synthèse des intermédiaires tripeptides sur support solide^a.



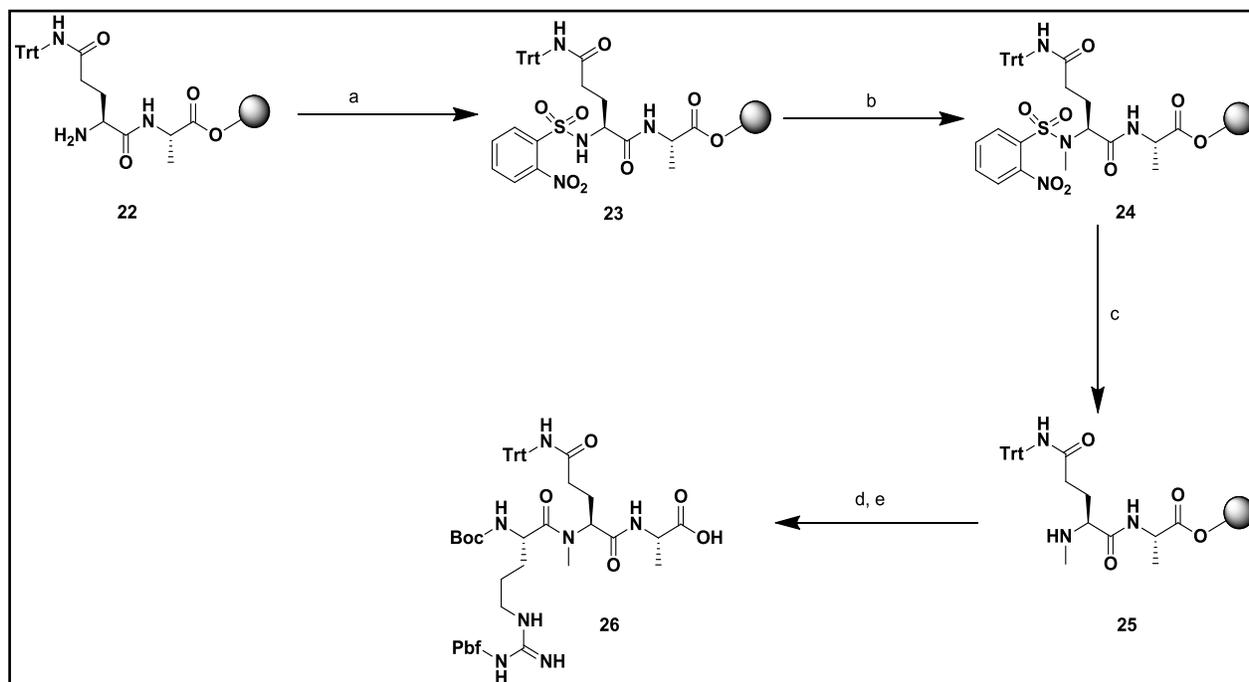
^aRéactifs : (a) DIPEA, DMF, r.t; (b) 20% Pipéridine/DMF, r.t; (c) Fmoc-AA-OH, HATU, DIPEA, DMF, r.t; (d) Boc-AA-OH, HATU, DIPEA, DMF, r.t; (e) HFIP/DCM (20:80, v/v), r.t.

3.2.3 Synthèse de peptides *N*-méthylés sur support solide

La *N*-méthylation sélective d'acides aminés a été réalisée sur la résine 2-chlorotrityle (Schéma 6) selon la méthodologie décrite par (Miller *et al.*, 1997). La procédure implique trois étapes. La première étape, développée par (Fukuyama *et al.*, 1995) pour la préparation d'amines secondaires, implique l'activation de l'amine primaire via l'introduction du groupe *ortho*-nitrobenzène sulfonyle (*o*-NBS) en présence de la collidine pour donner l'analogue **23** (méthode E). La deuxième étape (méthode F) est une réaction de Fukuyama-Mitsunobu (Fukuyama *et al.*, 1995), en utilisant PPh₃, DIAD et MeOH pour conduire à l'intermédiaire **24**. Enfin, la troisième étape est une déprotection sélective du groupe *o*-NBS avec le mercaptoéthanol et la DBU

(méthode G) pour générer l'intermédiaire **25**. Ce dernier a ensuite été couplé avec le dernier acide aminé, protégé avec un groupe Boc en présence de HATU, HOAt et DIPEA (méthode H). Le clivage de la résine avec une solution de 20% HFIP dans du DCM (méthode D) a conduit au tripeptide **26**.

Schéma 6. Exemple de *N*-méthylation de peptides sur support solide en position P3^a.

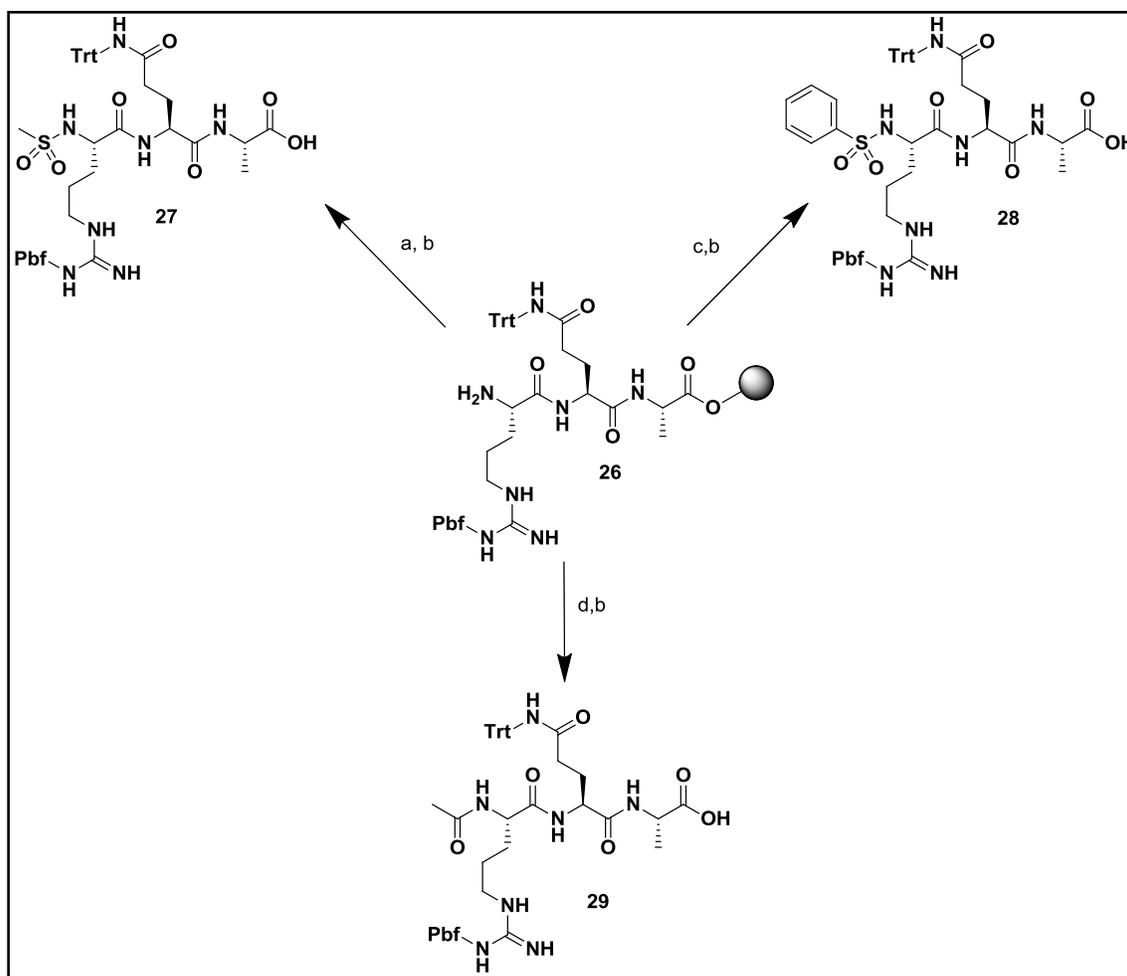


^aRéactifs : (a) *o*-NBSCl, Collidine, NMP, r.t.; (b) PPh₃, DIAD, MeOH, THF, r.t.; (c) HSCH₂CH₂OH, DBU, NMP, r.t.; (d) Boc-AA-OH, HATU, HOAt, DIPEA, NMP, r.t.; (e) HFIP/DCM (20:80, v/v), r.t.

3.2.4 Synthèse de tripeptides modifiés à l'extrémité N-terminale

La fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale des tripeptides et des dipeptides intermédiaires a été réalisée sur la résine 2-chlorotrityle (exemple sur le schéma 5). L'acétylation et la benzylation de l'extrémité N-terminale ont été effectuées en utilisant respectivement une solution d'acide acétique ou d'acide benzoïque en présence de HATU et DIPEA (méthode I). La sulfonylation du N-terminal a été préparée à l'aide de MsCl ou PhSO₂Cl en présence de DIPEA (méthode J). Les tripeptides ont été clivés de la résine avec une solution de 20% de HFIP dans du DCM (méthode D). Les tripeptides **27-29** fonctionnalisés en position N-terminale ont ensuite été couplés avec l'arginine modifiée d'après le schéma 8.

Schéma 7. Fonctionnalisation en N-terminal de peptides sur support solide^a.

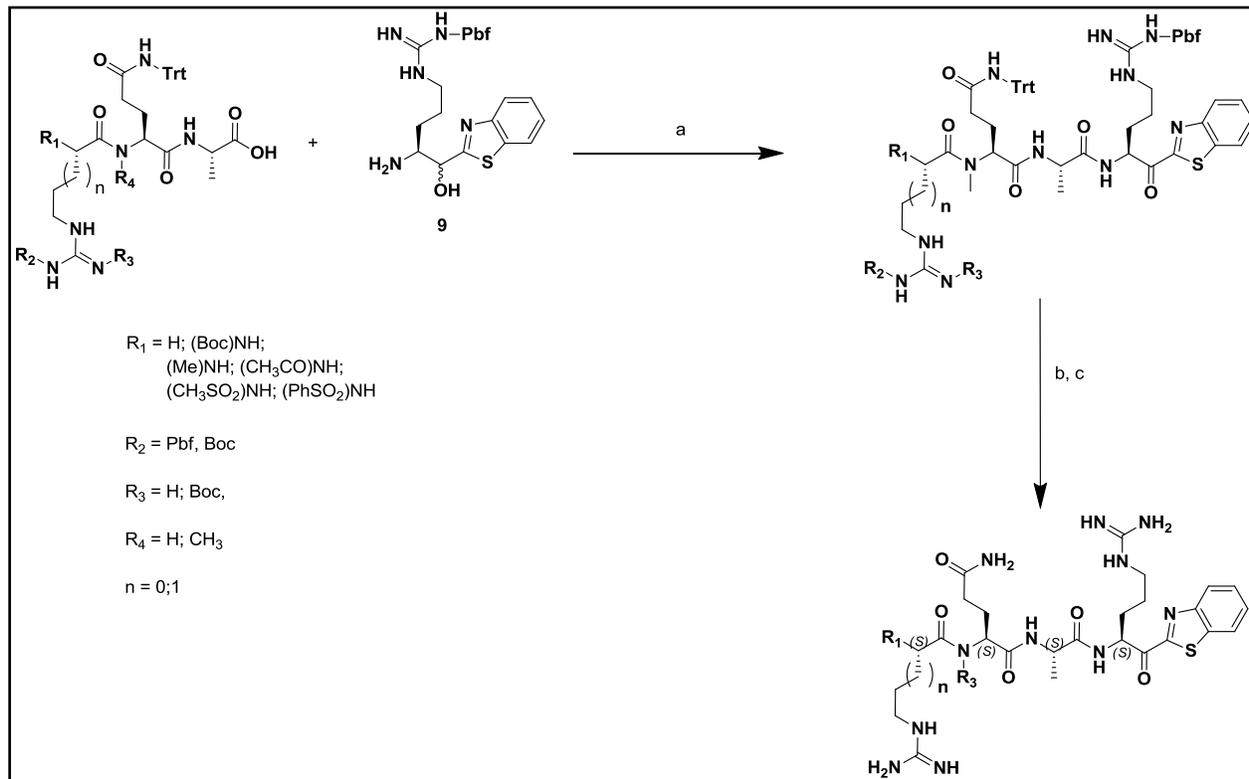


^aRéactifs : (a) MsCl, DIPEA, r.t; (b) HFIP/DCM (20:80, v/v), r.t; (c) PhCOOH, HATU, DIPEA, DMF, r.t; (d) AcOH, HATU, DIPEA, DMF, r.t.

3.2.5 Synthèse des produits finaux

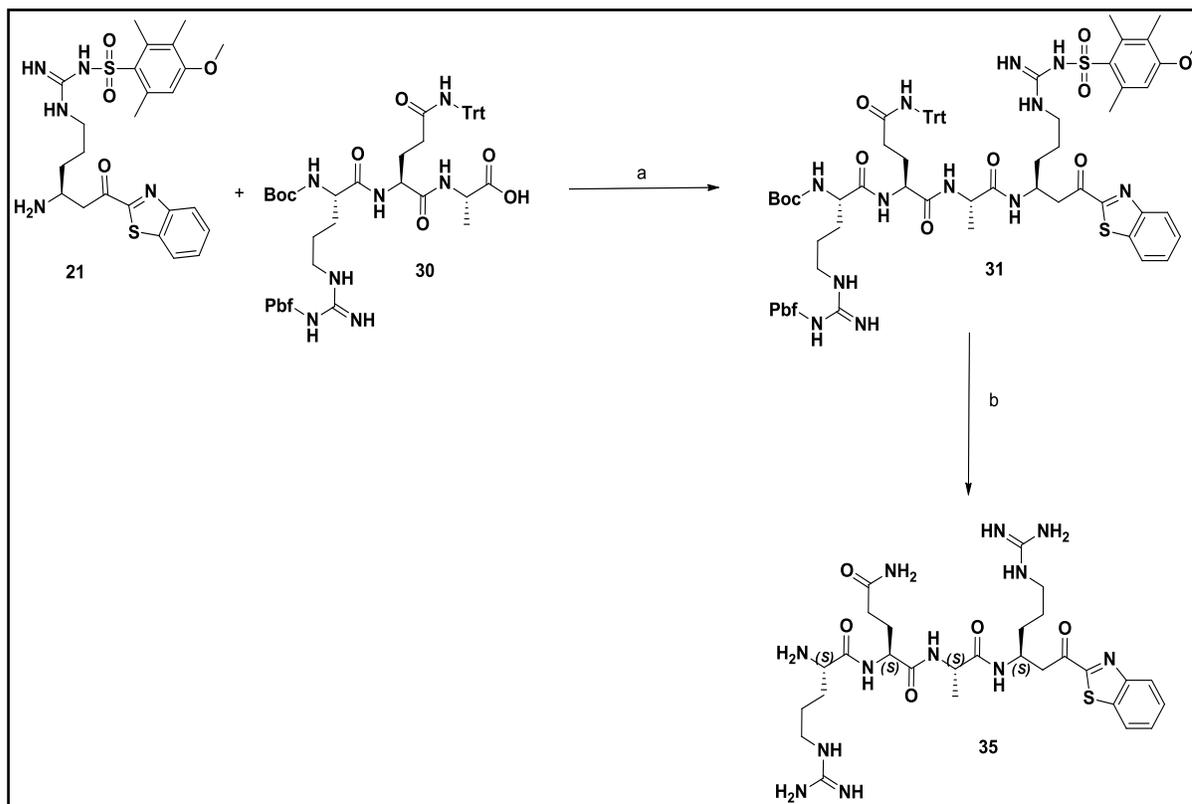
La synthèse des tétrapeptides et des tripeptides finaux a été réalisée en solution, d'après la procédure décrite dans (Colombo *et al.*, 2012). La synthèse des tétrapeptides est montrée comme exemple (schéma 8). Tout d'abord, le fragment **9** a été préparé à partir de l'amide de Weinreb **8** par addition du lithiobenzothiazole généré *in situ* (Costanzo *et al.*, 2008), (Colombo *et al.*, 2012). Le céto-benzothiazole résultant a ensuite été réduit avec NaBH₄ en hydroxycéto-benzothiazole, puis la fonction amine a été déprotégée par hydrolyse acide (TFA/DCM) pour donner le composé **9**. La réaction de couplage peptidique entre le dérivé hydroxybenzothiazole **9** et les différents tripeptides intermédiaires en présence de HATU et DIPEA dans le DMF a conduit aux tétrapeptides désirés avec un rendement de 80%. L'alcool secondaire des tétrapeptides a ensuite été oxydé en cétone à l'aide d'IBX avec un rendement de 50%, puis les groupements protecteurs des chaînes latérales et de l'amine terminale ont été déprotégés en milieu acide avec une solution de TFA/H₂O (95:5), générant un mélange d'épimères (en général 3:1). Le mélange d'épimères a été séparé avec l'HPLC préparative (ACN/H₂O 5:95 → 30:70) pour donner les produits finaux correspondant dans des rendements de 5-72%. La synthèse du produit finale R-Q-A-βhArg-Kbt **35**, illustrée dans le schéma 9 ci-dessous, passe par deux étapes: une réaction de couplage avec l'arginine modifiée βhArg-Kbt **21** et le tripeptide intermédiaire **30** pour conduire au tétrapeptide **31**, suivi d'une réaction de déprotection des groupes protecteurs des chaînes latérales avec une solution de TFA/H₂O (95:5) pour donner uniquement l'épimère désiré du composé **35** après purification avec l'HPLC préparative (ACN/H₂O 5:95 → 30:70).

Schéma 8. Synthèse générale des térapeptides avec Arg(Pbf)-Hbt 9^a.



^aRéactifs : (a) HATU, DIPEA, DMF, 0°C → r.t, 80%; (b) IBX, acétone, 55°C; 50%; (c) i. TFA/H₂O (95:5, v/v), r.t; ii. HPLC prep, ACN/H₂O (5:95 → 30:70), 30 min, 5-72%.

Schéma 9. Synthèse du térapeptide 35 avec la β -hArg(Mtr)-Kbt 21^a.



^aRéactifs : (a) HATU, DIPEA, DMF, 0°C → r.t; (b) i. TFA/H₂O (95:5, v/v), r.t; ii. HPLC prep, ACN/H₂O (5:95 → 30:70), 30 min, 61%.

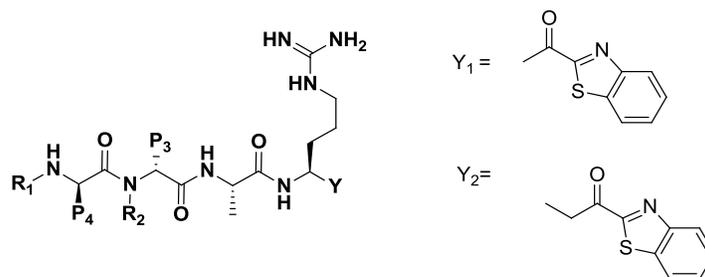
3.2.6 Étude de la RSA des composés de première et seconde générations

L'analyse de RSA de la première génération de composés a démontré que le térapeptide **1** R-Q-A-R-Kbt, est un inhibiteur de la matriptase puissant et à forte liaison (*slow-tight binding*) (Colombo *et al.*, 2012). Dans le but de mieux comprendre la RSA, nous avons étudié l'effet des peptides synthétisés avec des acides aminés non naturels, des liens peptidiques *N*-méthylés, la délétion ou la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de peptides sur l'inhibition de la matriptase.

Effet des acides aminés non naturels et de la N-méthylation de liens peptidiques

Dans le cadre d'une éventuelle application thérapeutique, il est nécessaire de développer des peptides potentiellement plus stables biologiquement. Ainsi, nous avons introduit des acides aminés (D) et des groupes N-Me, aux positions P4 et P3, et évalué leur capacité à inhiber la matriptase *in vitro* en calculant leurs constantes d'inhibitions K_i , présentées dans le tableau 8.

Tableau 8. Inhibition de la matriptase avec les composés 32-37.



Composé		Matriptase	
Séquence	R ₁ , R ₂	Y	K _i (nM) ^a
1 R-Q-A-R-Kbt (IN-1)	H, H	Y ₁	0.01 ^b
32 R-(D)Q-A-R-Kbt	H, H	Y ₁	0.15
33 (D)R-Q-A-R-Kbt	H, H	Y ₁	0.11
34 (D)R-(D)Q-A-R-Kbt	H, H	Y ₁	0.43
35 R-Q-A-βhR-Kbt	H, H	Y ₂	1600
36 R-(NMe)Q-A-R-Kbt	H, Me	Y ₁	0.90
37 (NMe)R-Q-A-R-Kbt	Me, H	Y ₁	1.3

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. ^b K_i publiés dans (Colombo *et al.*, 2012).

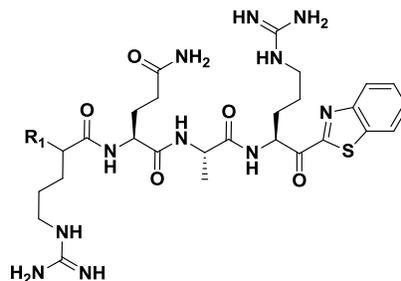
Les composés **32** et **33** avec les résidus (L)-Arg et (L)-Gln respectifs aux positions P4 et P3 ont démontré une forte inhibition de la matriptase avec des K_i de 0.15 et 0.11 nM. Le composé **34** possédant les deux acides aminés (D) successifs aux positions P4 et P3, les résidus (D)-Arg et la (D)-Gln, a également été très puissant (K_i 0.43 nM). Toutefois, le composé **1** (K_i 0.01 nM) a été 10 fois plus puissant que les composés **32-34**. En méthylant les liens amides aux positions P4 et P3 (composés **36** et **37**), nous avons obtenu encore une forte inhibition de la matriptase avec des K_i de 0.9 et 1.3 nM. Cependant, l'inhibition des composés avec les groupes N-Me a demeuré 100 fois moins importante que celle obtenue avec le térapeptide **1**. Par ailleurs, la synthèse des

tétrapeptides en solution a conduit à un mélange d'épimères en position P1 (Tableau 1, composés **1** et **7**), ce qui a compliqué la synthèse, la purification et l'évaluation biologique des composés. Afin de prévenir l'épimérisation, une des approches réalisées ici a été d'éliminer le proton acide en position α du carbonyle. Par conséquent, nous avons synthétisé le tétrapeptide **35** (R-Q-A- β h-R-Kbt) portant le résidu β hArg en position P1. Bien que cette stratégie nous a permis de générer uniquement l'épimère désiré, le composé **35** a été de cinq ordre de grandeur moins puissant que le composé **1** (K_i 1600 nM vs 0.01 nM). Il faut garder en tête que le remplacement du résidu Arg en position P1 par un résidu (D)-Arg ou Lys a mené à une diminution très importante de l'inhibition (Colombo *et al.*, 2012).

Effets de la délétion et de la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale

Une autre stratégie couramment utilisée pour améliorer la stabilité biologique des peptides est de supprimer et/ou modifier l'extrémité N-terminale des peptides avec des groupements acétyle, sulfonyle, ou *N*-Me (Orwig *et al.*, 2009). Ainsi, nous avons évalué l'effet de l'acétylation, la sulfonylation et la délétion de l'extrémité N-terminale, sur l'inhibition de la matriptase *in vitro* (Tableau 9).

Tableau 9. Inhibition de la matriptase avec les composés 38-42.



Composé	Matriptase		
	Séquence	R ₁	K _i (nM) ^a
38	(CH ₃ CO)R-Q-A-R-Kbt	(CH ₃ CO)NH	0.17
39	(CH ₃ SO ₂)R-Q-A-R-Kbt	(CH ₃ SO ₂)NH	0.20
40	(PhSO ₂)R-Q-A-R-Kbt	(PhSO ₂)NH	0.48
41	(H)R-Q-A-R-Kbt	H	0.15
42	(H)R-(D)Q-A-R-Kbt	H	0.45

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Les composés **38-40** portant une fonction acétyle, méthylsulfonamide et phénylsulfonamide ont été des inhibiteurs puissants de la matriptase avec des K_i respectifs de 0.17, 0.20 et 0.48 nM. Nous avons observé que le composé **41**, qui a subi une délétion de l'extrémité N-terminale, a également inhibé fortement la matriptase avec un (K_i 0.15 nM), tout comme le composé **42** (K_i 0.45 nM) avec en plus, le résidu (D)-Gln en position P3. Cependant, ils ont été d'un ordre de grandeur moins puissants que le composé **1** (Tableau 9).

En résumé de cette étude de RSA sur la première et deuxième générations de composés, nous avons pu démontrer que les composés avec des acides aminés (D) et des groupes *N*-Me ont permis de bien conserver la puissance d'inhibition (K_i < 1 nM), tandis que le composé avec l'acide aminé β en position P1 a causé une baisse importante de l'inhibition de la matriptase. De plus, tous les peptides ayant des modifications au niveau de l'extrémité N-terminale sont restés de puissants inhibiteurs (K_i < 1nM). Toutefois, IN-1 (composé **1**) est resté le plus puissant de cette série.

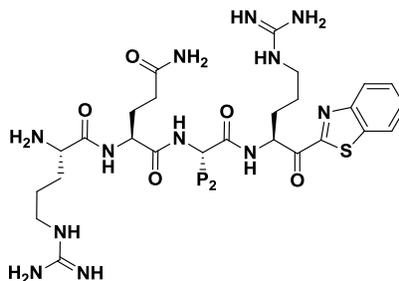
3.2.7 Étude de la RSA des composés de troisième génération

L'étude du profil de préférence des substrats de la matriptase réalisée précédemment par notre groupe a révélé que la matriptase clive préférentiellement les peptides possédant des résidus aromatiques (Phe, Tyr) en position P2 (Béliveau *et al.*, 2009). En accord avec cette étude, nous avons montré récemment que les térapeptides **43** et **44** modifiés avec les résidus Tyr et Phe en position P2 respectivement, ont été des inhibiteurs puissants de la matriptase (Duchêne *et al.*, 2014). Nous avons donc voulu voir l'effet des dérivés de Phe substitués ou non sur l'inhibition de la matriptase (Tableau 10).

Dérivés de la phénylalanine en position P2

Le composé **45** avec le résidu hPhe en position P2 a conduit à une inhibition quatre fois supérieure à celle du composé **44** avec le résidu Phe (K_i 0.06 vs 0.23 nM). Les composés **46-48** substitués en *para* du cycle aromatique du résidu Phe respectivement avec un groupe nitro ou des halogènes tels que le chlore et le fluore, ont présenté le même profil d'inhibition que le composé **44** (K_i 0.23 nM).

Tableau 10. Inhibition de la matriptase avec les composés 43-48.



	Composé	Matriptase	
		Séquence	K_i (nM) ^a
43	R-Q-Y-R-Kbt	Tyr	0.18 ^b
44	R-Q-F-R-Kbt	Phe	0.23 ^b
45	R-Q-hF-R-Kbt	homoPhe	0.06
46	R-Q-F(4NO ₂)-R-Kbt	Phe(4NO ₂)	0.20
47	R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	Phe(4Cl)	0.20
48	R-Q-F(4F)-R-Kbt	Phe(4F)	0.21

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. ^b K_i publiés dans (Duchêne *et al.*, 2014).

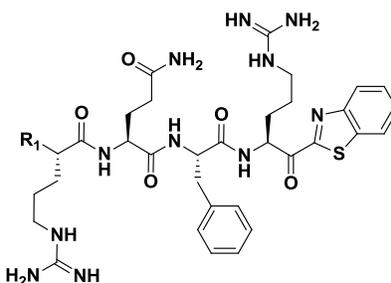
Modifications aux positions P3 et P4

Les précédents résultats nous ont permis de voir que les résidus aromatiques comme le résidu Phe en position P2 du composé **44** (Tableau 10) ont été favorables pour réduire l'activité catalytique de la matriptase. En fixant le résidu Phe en position P2, nous avons effectué des modifications aux positions P4 et P3, puis évalué leur potentiel d'inhibition de la matriptase (Tableau 11).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la délétion de l'extrémité N-terminale ou la présence d'acides aminés (D) sur l'inhibition de la matriptase, comme réalisé avec le composé **1** (Tableau 11). Le composé **51** avec l'extrémité N-terminale tronquée, a conduit à une inhibition proche de celle du composé **44** (K_i 0.13 vs 0.23 nM). De plus, nous avons noté que le composé **50**, qui possède deux acides aminés (D) consécutifs aux positions P4 et P3, a été onze fois moins puissant que le composé **44** (K_i 2.45 vs 0.23 nM). De façon similaire, le composé **49** portant le résidu (D)-Gln en position P3 et l'extrémité N-terminale supprimée, a été environ

quatre-vingt-dix fois moins puissant que le composé **51** pour inhiber la matriptase (K_i 11.29 vs 0.13 nM).

Tableau 11. Inhibition de la matriptase avec les composés 49-53.



	Composé	Matriptase	
Séquence	R ₁	K _i (nM) ^a	
49	(H)R-(D)Q-F-R-Kbt	H	11.29
50	(D)R-(D)Q-F-R-Kbt	NH ₂	2.45
51	(H)R-Q-F-R-Kbt	H	0.13
52	(CH ₃ SO ₂)R-Q-F-R-Kbt	(CH ₃ SO ₂)NH	2.03
53	(PhSO ₂)R-Q-F-R-Kbt	(PhSO ₂)NH	15.32

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Dans un deuxième temps, l'introduction de sulfonamides à l'extrémité N-terminale nous a semblé réduire l'inhibition envers la matriptase. En effet, nous avons obtenu une inhibition neuf fois moins puissante avec le composé **52** par rapport au composé **44** (K_i 2.03 vs 0.23 nM). Cette diminution a été d'autant plus remarquable avec le composé **53**, qui a mené à une inhibition environ soixante fois plus faible que le composé **44** (K_i 15.32 vs 0.23 nM).

En résumé, cette étude de RSA des composés de la troisième génération nous a indiqué que la matriptase tolère bien en position P2 les dérivés de phénylalanine substitués en position *para* avec le chlore, le fluore et le nitro. En outre, la délétion du résidu N-terminal a peu d'influence sur la puissance vis-à-vis de la matriptase. Au contraire, la présence d'acides aminés (D) en positions P4 et P3 ou la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale avec des groupements sulfonamides diminuent l'inhibition pour la matriptase.

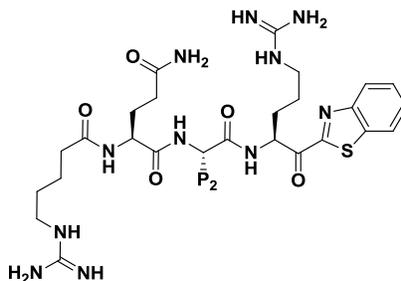
3.2.8 Étude de la RSA des composés de la quatrième génération

Dans le but de mieux sonder les poches S2/S4 de la matriptase, qui possèdent des résidus Phe¹⁰⁴ et Asp¹⁰¹ respectivement, et en se basant sur la structure du composé **51** (Tableau 11), nous avons effectué des modifications au niveau de la position P2. Dans un premier temps, nous avons remplacé le résidu Phe en position P2 par d'autres groupements aromatiques (par exemple, le biphényle) ou non aromatiques (par exemple, le cyclohexyle). Dans un deuxième temps, nous avons substitué le résidu Phe en position *para* avec une fonction amine ou une méthylamine. Par ailleurs, en vue d'étudier l'importance de la nature des résidus en position P3 sur l'inhibition de la matriptase, nous avons échangé le résidu Gln en position P3 par des acides aminés aromatiques, neutres et acides. L'effet de toutes ces modifications a été évalué sur l'inhibition de la matriptase (Tableaux 12).

Étude des modifications en position P2

Comme montré précédemment, la présence du résidu hPhe en position P2 du composé **54** est tolérée par la matriptase avec un K_i comparable au composé **51** (K_i 0.28 vs 0.13 nM). En changeant le résidu Phe en position P2 du composé **51** par des groupements aromatiques hydrophobes et encombrants tels que les résidus Bip (composé **55**) et Bpa (composé **56**), nous avons identifié des inhibiteurs puissants avec des valeurs de K_i inférieures à 1 nM. De plus, le composé **57** avec la cyclohexylamine (Cha), acide aminé non aromatique, a conduit également à un inhibiteur puissant (K_i 0.8 nM). Par ailleurs, le composé **58**, qui porte une fonction amine en position *para* du résidu Phe, a été vingt-cinq fois moins puissant que le composé **51** (K_i 3.2 vs 0.13 nM). Cependant, le composé **59** contenant la méthylamine en position *para* du résidu Phe a favorisé avec un facteur supérieur à dix l'inhibition de la matriptase par rapport au composé **58** (K_i 0.26 vs 3.2 nM). Nous avons remarqué également que le composé **60**, substitué par un chlore, et le composé **61** substitué par un hydroxyle (résidu Tyr) en position P2 ont également été dix fois plus efficaces que l'amine (composé **58**).

Tableau 12. Inhibition de la matriptase avec les composés 54-61.



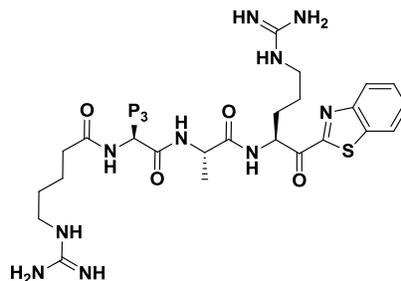
Composé	Matriptase	
Séquence	P ₂	K _i (nM) ^a
54 (H)R-Q- hF -R-Kbt	homoPhe	0.28
55 (H)R-Q- Bip -R-Kbt	Bip	0.66
56 (H)R-Q- Bpa -R-Kbt	Bpa	0.9
57 (H)R-Q- Cha -R-Kbt	Cha	0.81
58 (H)R-Q- F(4NH₂) -R-Kbt	Phe(4NH ₂)	3.20
59 (H)R-Q- F(4CH₂NH₂) -R-Kbt	Phe(4CH ₂ NH ₂)	0.26
60 (H)R-Q- F(4Cl) -R-Kbt	Phe(4Cl)	0.33
61 (H)R-Q- Y -R-Kbt	Tyr	0.28

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Étude d'acides aminés aromatiques, acides et neutres en position P3

L'étude d'inhibition au niveau de la position P3 répertoriée dans le tableau 13, ont montré que les composés **65** (K_i 0.3 nM) et **62** (K_i 0.4 nM) avec le résidu Ala et la diméthylation de la chaîne latérale du résidu Gln respectivement, ont permis de conserver une forte inhibition comparable à celle du composé **51** (K_i 0.13 nM) avec le résidu Gln (Tableau 11) envers la matriptase. Cependant, les composés **63** (K_i 0.58 nM), **64** (K_i 0.86 nM) et **66** (K_i 1.11 nM) avec les résidus Asn, Phe et Glu respectifs, ont inhibé la matriptase avec une puissance moindre comparé au composé **1**.

Tableau 13. Inhibition de la matriptase avec les composés 62-66.



Composé	Matriptase	
Séquence	P ₃	K _i (nM) ^a
62 (H)R-Q(N(CH ₃) ₂)-F-R-Kbt	Gln(N(CH ₃) ₂)	0.4
63 (H)R-N-F-R-Kbt	Asn	0.58
64 (H)R-F-F-R-Kbt	Phe	0.86
65 (H)R-A-F-R-Kbt	Ala	0.3
66 (H)R-E-F-R-Kbt	Glu	1.11

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

En bref, cette étude de RSA des composés de la quatrième génération nous a montré que les composés modifiés en position P2 avec des acides aminés aromatiques, non aromatiques, ou des substituants (méthylamine et amine) en *para* du résidu Phe, permettent de maintenir la puissance pour l'inhibition de la matriptase. De plus, les composés avec le résidu Phe fixé en position P2 et des acides aminés aromatiques, neutres ou acides en position P3 ont été tout aussi puissant envers la matriptase (K_i ≤ 1 nM).

3.2.9 Étude de la RSA des composés de la cinquième génération

L'élimination des résidus du peptide IN-1 (composé **1**) à partir de son extrémité N-terminale nous a permis de mieux cerner la contribution des positions P4 à P2 sur le profil d'inhibition de la matriptase. En effet, nous avons constaté que le résidu Arg en position P4 n'est pas nécessaire pour conserver l'inhibition, puisque nous avons identifié le tripeptide **4** (Q-A-R-Kbt) comme un inhibiteur puissant (K_i 0.088 nM) (Colombo *et al.*, 2012). Les études de RSA précédentes ont indiqué que les dérivés du peptide IN-1 (composé **1**) possédant les résidus aromatiques en position P2, la modification de l'extrémité N-terminale (sulfonamides, acétate), la

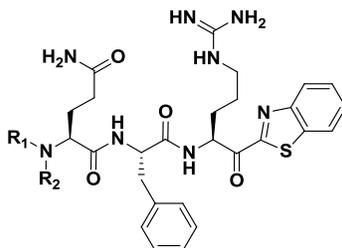
N-méthylation ou la délétion de l'amine permettent de conserver la puissance d'inhibition envers la matriptase. Dans cette optique, des changements structuraux comme le résidu Phe en position P2 ou encore la modification de l'extrémité N-terminale du tripeptide Q-A-R-Kbt ont été réalisés, et leur profil d'inhibition des molécules a été déterminé à l'aide du K_i (Tableau 14).

Étude du résidu Phe en position P2 et de l'extrémité N-terminale modifiée

L'étude de la RSA du résidu Phe en P2 et la modification de l'extrémité N-terminale autour de la structure Q-A-R-Kbt est représentée avec les valeurs de K_i dans le tableau ci-dessous. Nous avons constaté que le composé **67** avec le résidu Phe en position P2 et la délétion de l'extrémité N-terminale a été cent-cinquante fois moins puissant avec un K_i de 13.76 nM par rapport au composé **4**, Q-A-R-Kbt (K_i 0.088 nM) (Tableau 1). De plus, nous avons observé que le composé **68** avec le résidu N((CH₃)₂)Gln en position P3 a été également cent fois moins puissant avec un K_i de 12 nM. Par contre, les composés **69** et **70** portant une fonction acétate ou méthylsulfonamide à l'extrémité N-terminale ont affiché une perte d'inhibition moins importante, six à trente fois moins puissants (K_i 0.51 et 2.63 nM).

En résumé, cette étude de la RSA des composés de la cinquième génération nous a montré que les dérivés du tripeptide Q-A-R-Kbt avec la délétion, l'acétylation, la sulfonylation ou la di-*N*-méthylation, à l'extrémité N-terminale, ont permis de conserver l'inhibition envers la matriptase.

Tableau 14. Inhibition *in vitro* de la matriptase avec les peptides 67-70.



Composé		Matriptase
Séquence	R ₁ , R ₂	K _i (nM) ^a
67 (H)Q-F-R-Kbt	-	13.76
68 (CH ₃) ₂ Q-F-R-Kbt	(CH ₃) ₂ , H	12
69 (CH ₃ CO)Q-F-R-Kbt	(CH ₃ CO), H	0.51
70 (CH ₃ SO ₂)Q-F-R-Kbt	(CH ₃ SO ₂), H	2.63

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

3.2.10 Sélectivité matriptase vs matriptase-2

La matriptase et la matriptase-2 (TMPRSS6) appartiennent à la même sous-famille de TTSPs. En raison de leurs rôles importants dans des maladies différentes (voir sections 1.3.2 et 1.4.3), ces TTSPs sont considérées comme des cibles pharmacologiques très attrayantes. Compte tenu du niveau élevé d'homologie entre ces TTSPs, l'un des défis de notre étude est d'identifier des inhibiteurs à la fois puissants et hautement sélectifs de la matriptase par rapport à la matriptase-2. Récemment, nous avons identifié IN-1 (composé **1**) comme un inhibiteur puissant et possédant une sélectivité de trois cents (K_i 0.01 nM) pour la matriptase par rapport à la matriptase-2 (K_i 3.3 nM) (Colombo *et al.*, 2012). IN-1 représente un bon point de départ pour étudier la sélectivité envers la matriptase et la matriptase-2. Dans cette optique, nous avons regardé l'effet des résidus aromatiques substitués en P2, des acides aminés (D) ou (L) aux positions P4 et P3, des dérivés d'arginine en position P4, et la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale sur l'inhibition de ces deux TTSPs. La sélectivité est représentée par le rapport des valeurs de K_i (Tableau 15).

Nos travaux précédents nous ont démontré que le composé **44** avec le résidu Phe en position P2 a mené à une légère perte d'inhibition pour la matriptase par rapport au composé **1** avec le résidu Ala (K_i 0.2 vs 0.01 nM). À l'inverse pour la matriptase-2, nous avons observé une augmentation de l'inhibition (K_i 1.4 vs 3.3 nM) (Duchêne *et al.*, 2014). Le composé **43**, dans lequel le résidu Phe est substitué par un résidu Tyr, a permis d'augmenter d'un facteur quatre l'inhibition pour matriptase-2 comparé au composé **1** (K_i 0.7 vs 3.3 nM) (Duchêne *et al.*, 2014). Cependant, le composé **43** a réduit la sélectivité pour matriptase par rapport à matriptase-2 (K_i 0.2 vs 0.7 nM). Le composé **45**, quant à lui, avec le résidu hPhe en position P2 a été 38 fois plus sélectif pour matriptase par rapport à matriptase-2 (K_i 0.06 vs 2.3 nM). Les composés **46**, **47** et **48** avec les résidus Phe substitués respectivement en *para* avec le chlore, le fluore et le nitro ont été en moyenne vingt fois plus sélectifs pour la matriptase. Le composé **71** portant le résidu 3-Pal en position P2 à la place du résidu Ala (composé **1**) a été trente fois plus sélectif pour la matriptase vs la matriptase-2 (K_i 0.4 vs 13 nM). Toutefois, nous avons noté que le composé **71** a engendré une perte d'inhibition d'un facteur quatre pour la matriptase 2 par rapport au composé **1** (K_i 13 vs 3.3 nM). Au contraire, les composés **32-34** avec des acides aminés (D) et/ou (L) aux positions P4 et P3 ont amélioré l'inhibition envers la matriptase-2 avec des K_i respectifs de 4.3, 0.2 et 1.2 nM. Mais, la sélectivité de ces composés pour la matriptase par rapport à la matriptase-2 a été grandement réduite puisqu'ils ont fortement inhibé la matriptase avec des $K_i \leq 1$ nM. Le composé **38** avec l'acétylation au niveau de l'extrémité N-terminale a été trente-cinq fois plus sélectif pour la matriptase par rapport à la matriptase-2 (K_i 0.2 vs 7 nM). De plus, le composé **41** avec la délétion de l'extrémité N-terminale a augmenté la sélectivité pour la matriptase comparé à la matriptase-2 (K_i 0.2 vs 3.7 nM). Au final, le composé **72** avec le résidu hArg en position P4 a été deux-cent-cinquante fois plus sélectif pour la matriptase vs la matriptase-2 (K_i 0.03 vs 7.6 nM).

Tableau 15. Sélectivité matriptase vs matriptase-2.

Composé		Matriptase	Matriptase-2	
Séquence		K _i (nM) ^a		Sélectivité ^b
1	R-Q-A-R-Kbt	0.01 ^c	3.3 ^c	300
44	R-Q-F-R-Kbt	0.2 ^d	1.4 ^c	7
45	R-Q-hF-R-Kbt	0.06	2.3	38
43	R-Q-Y-R-Kbt	0.2 ^d	0.7 ^d	4
46	R-Q-F(4NO ₂)-R-Kbt	0.2	6.0	30
47	R-Q-F(4Cl)R-Kbt	0.2	3.3	17
48	R-Q-F(4F)R-Kbt	0.1	1.7	17
71	R-Q-3Pal-R-Kbt	0.4	13	30
32	R-(D)Q-A-R-Kbt	0.6	4.3	7
33	(D)R-Q-A-R-Kbt	0.1	0.2	2
34	(D)R-(D)Q-A-R-Kbt	0.4	1.2	3
38	(CH ₃ CO)R-Q-A-R-Kbt	0.2	7.0	35
41	(H)R-Q-A-R-Kbt	0.2	3.7	19
72	hR-Q-A-R-Kbt	0.03	7.6	250

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. ^bLa sélectivité est représentée par le rapport de K_i (matriptase-2)/K_i (matriptase). ^{c,d}K_i publié dans (Colombo *et al.*, 2012) et (Duchêne *et al.*, 2014).

En somme, nous avons identifié de nouveaux inhibiteurs sélectifs pour la matriptase par rapport à la matriptase-2, ainsi que de nouveaux inhibiteurs puissants de la matriptase-2, le composé **33** étant le plus puissant.

3.2.11 Sélectivité matriptase vs d'autres protéases à sérine

Lors de la première étude de sélectivité, nous avons démontré le haut niveau de sélectivité du peptide IN-1 (composé **1**) envers la matriptase (K_i 0.01 nM) versus d'autres protéases à sérine telles que la thrombine (K_i 635 nM) et la furine ($K_i > 10\ 000$ nM) (Colombo *et al.*, 2012). Nous avons donc étudié le profil de sélectivité des nouveaux inhibiteurs de la matriptase vs thrombine et furine. La constante d'inhibition K_i des composés présentés dans le tableau 16 envers chacune de ces protéases permettra d'évaluer la puissance d'inhibition. Le ratio des K_i nous donnera une indication sur la sélectivité des composés envers la matriptase par rapport à la thrombine et la furine.

Tableau 16. Sélectivité matriptase vs thrombine et furine.

Composé	Matriptase	Thrombine	Furine
Séquence	K_i (nM) ^a		
33 (D)R-Q-A-R-Kbt	0.1	1 411	>10 000
39 (CH ₃ SO ₂)R-Q-A-R-Kbt	0.1	2 296	>2 000
40 (PhSO ₂)R-Q-A-R-Kbt	0.5	825	>10 000
41 (H)R-Q-A-R-Kbt	0.2	350	>2 000
51 (H)R-Q-F-R-Kbt	0.1	6385	>10 000
60 (H)R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	0.3	8 890	>10 000
61 (H)R-Q-Y-R-Kbt	0.5	>10 000	541.5
49 (H)R-(D)Q-F-R-Kbt	11.3	>10 000	>10 000
50 (D)R-(D)Q-F-R-Kbt	2.5	13 436	>10 000
67 (H)Q-F-R-Kbt	13.8	>10 000	>10 000
69 (CH ₃ CO)Q-F-R-Kbt	0.5	10514	>10 000
70 (CH ₃ SO ₂)Q-F-R-Kbt	2.6	8766	>10 000

^a Les valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Nous avons constaté que les peptides modifiés ont permis de conserver une bonne sélectivité pour la matriptase vs la thrombine. Par exemple, le composé **69** a été plus de vingt-mille fois plus sélectif pour la matriptase par rapport à la thrombine (K_i 0.5 vs 10514 nM). Ce niveau élevé de sélectivité a été aussi marqué vis-à-vis de la furine, puisque les composés dans le tableau ci-dessus ont été plus de mille fois plus sélectifs pour la matriptase.

En résumé, à travers cette étude de sélectivité, nous avons montré que ces peptides sont hautement sélectifs envers la matriptase par rapport à d'autres protéases à sérine (thrombine et furine).

CHAPITRE 3. DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX AGENTS THÉRAPEUTIQUES ANTI-INFLUENZA

Avant-propos et implication dans le travail: Ce projet est au centre d'une collaboration multidisciplinaire impliquant des groupes de recherche des Prs Marsault, Leduc et Richter, ainsi que l'Institut Néomed. Éloïc Colombo, Pierre-Luc Boudreault, Pallavi Thakur du groupe Marsault ont fait le design, la synthèse et la purification des molécules de deuxième à la cinquième générations. Émilie Gravel, Isabelle Marrois, Dominic Cliche et Olivier Morisseau du groupe de Richter ont effectué les essais d'inhibition de la réplication virale dans des modèles cellulaires et les modèles animaux, ainsi que les études de toxicité cellulaire et tissulaire. Le groupe de Richter avec Pascal Turcotte de l'Institut Néomed ont développé les études de stabilité des composés dans des milieux organiques et de culture cellulaire.

Introduction: La vaccination est la première stratégie pour prévenir la grippe saisonnière et la grippe pandémique, mais le virus de la grippe mute fréquemment et il est difficile de produire un vaccin efficace pour la prévention (Nichol et Treanor, 2006). Outre les stratégies de vaccination, il existe deux classes d'antiviraux actuellement disponibles pour traiter l'influenza: les inhibiteurs de la protéine M2, l'amantadine (Symmetrel[®]) et la rimantadine (Flumadine[®]), et les inhibiteurs de la neuraminidase, le zanamivir (Relenza[®]) et l'oseltamivir (Tamiflu[®]) (Clercq, 2006), (Burch *et al.*, 2009). Malgré leur efficacité, ces deux classes de médicaments font présentement face à des problèmes de résistance importants dus aux mutations des virus (Smee *et al.*, 2012). Par conséquent, de nouvelles stratégies sont nécessaires pour contourner ces problèmes de mutation. Une des stratégies proposées consiste à cibler des éléments de la cellule hôte infectée qui sont essentiels pour la réplication ou l'infectivité. En effet, le virus mute mais pas l'hôte. Tel que décrit ci-dessus, la matriptase et les autres TTSPs sont reconnues comme des protéases de l'hôte importantes pour la maturation du virus H1N1, et constituent donc des cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement de l'influenza. Le développement d'inhibiteurs de la matriptase et de d'autres TTSPs émerge donc comme un outil pharmacologique prometteur pour diminuer la réplication virale.

Lors de précédents travaux, nous avons montré que IN-1 (composé **1**) est efficace pour diminuer la propagation des virus H1N1 et H3N2 (Beaulieu *et al.*, 2013). Suite à la découverte de

nouveaux inhibiteurs de matriptase dérivés de IN-1 dans le chapitre précédent, l'objectif présenté dans ce chapitre 3 consiste à caractériser le potentiel thérapeutique des composés dans des modèles cellulaires et d'animaux infectés avec les virus H1N1 et H3N2. Pour ce faire, premièrement, nous avons évalué la capacité des composés à inhiber la réplication virale dans les cellules épithéliales bronchiques, les cellules Calu-3, infectées avec les virus H1N1 et H3N2. Ces résultats ont été obtenus par Émilie Gravel du groupe de Martin Richter et sont présentés ici pour fin de déterminer l'activité pharmacologique des composés dans un modèle cellulaire d'influenza. Ils seront également révélés comme des résultats originaux dans le mémoire de celle-ci. Deuxièmement, nous avons déterminé la puissance d'inhibition *in vitro* des analogues envers d'autres TTSPs impliqués dans l'activation de ces deux types de virus. Troisièmement, nous avons étudié la stabilité biologique des composés dans les milieux de culture cellulaire et en présence des cellules Calu-3. Enfin, nous avons regardé l'efficacité de IN-1 dans un modèle murin d'infection à l'influenza.

4.1 PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1.1 Matériels

Réactifs biologiques

Les souches virales A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) et A/Hong Kong/X-31 (H3N2; X-31) proviennent du laboratoire du Dr David Topham (Université du centre médical de Rochester, Rochester, USA).

Équipements

Chromatographie Ultraperformante couplée à un spectromètre de masse (UPLC-MS)

L'analyse des échantillons des essais de stabilité biologique des produits finaux dans les solutions de milieu de culture (HEPES, EMEM) et en présence des cellules Calu-3 a été réalisée dans le laboratoire de Pascal Turcotte à l'Institut Néomed en utilisant un UPLC-MS ACQUITY TQD de la compagnie *Waters* (Canada), équipé d'une colonne HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 μm) ou d'une colonne BEH SHIELD RP18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μm), d'un détecteur UV fixé à des λ_{ex} et $\lambda_{\text{détec}}$ de

310 nm, avec un gradient spécifique pour chaque composé utilisant H₂O + 0.1% HCOOH (éluant A) et MeCN (éluant B).

Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse en tandem (LC-MS/MS)

L'analyse des échantillons des essais de stabilité biologique des produits finaux dans l'homogénat de poumons de souris, a été réalisée à l'aide d'un appareil LC-MS/MS ACQUITY TQD de la compagnie *Waters* (Canada). Cet instrument est équipé d'un injecteur automatique *CTC Pal*, et couplé à un appareil UPLC *Thermo Accela* et un spectromètre de masse de type triple quadrupôle, avec un mode d'ionisation positif par électronébulisation. Les échantillons ont été injectés dans une colonne C18 en utilisant un gradient phase inverse avec H₂O + 0.1% HCOOH /MeOH + 0.1% HCOOH. Le dipropionate de béclo méthasone a été analysé comme contrôle en utilisant H₂O + 0.1% HCOOH/iPrOH/MeOH +0.1% HCOOH (20:80; v/v).

Spectrophotomètre

Pour l'étude de cytotoxicité, la quantification de la réaction de la lactate déshydrogénase a été réalisée par la mesure de la densité optique (DO), à l'aide du spectrophotomètre DU-7 de la compagnie *Beckman* (USA).

4.1.2 Méthodes

Inhibition de la réplication des virus H1N1 et H3N2 dans les cellules épithéliales bronchiques (Calu-3)

Les essais d'inhibition de la réplication virale ont été effectués dans des plaques à 96 puits transparentes dans lesquelles les cellules Calu-3 cultivées jusqu'à confluence ont été infectées avec le virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1) ou A/Hong Kong/X-31 (X-31; H3N2) à une MOI de 0.003. Les cellules ont ensuite été incubées avec les composés à différentes concentrations dans une solution de PBS pendant 48 h comme détaillé dans (Beaulieu *et al.*, 2013).

Dosage des titres viraux dans les cellules MDCK

Le dosage des titres viraux a été réalisé dans une lignée de cellules rénales de chiens, les cellules MDCK (*mardin-darby canine kidney*), qui ne possèdent pas de TTSPs endogènes et sont incapables de cliver l'hémagglutinine de ces virus sans addition d'une enzyme exogène (Beaulieu *et al.*, 2013). Brièvement, les cellules MDCK ont été incubées avec les surnageants des cellules Calu-3 contenant les virus PR8 ou X31 et les composés à différentes concentrations pendant 1 h. L'apparition de plages de lyse indique une infection par les virus. Les niveaux de PFU virales sont déterminés en comptant les plages de lyses. À partir des niveaux de PFU virale, on élabore une courbe dose-réponse qui permet de déterminer une valeur d'EC₅₀, qui correspond à la concentration à laquelle 50% de la réplication virale est observée par rapport au contrôle.

Stabilité des composés dans les solutions de milieu de culture, HEPES et EMEM

Les composés et leurs diastéréoisomères respectifs ont été préparés séparément dans le DMSO (10 mg/mL) comme solution standard, après optimisation des conditions de chromatographie pour permettre la séparation des diastéréomères. Un volume de 25 µL de chaque solution standard a été dilué dans 975 µL d'une solution de HEPES ou EMEM pour obtenir une concentration finale de 0.25 mg/mL. Les échantillons ont été incubés à 37 °C, et des aliquots de 100 µL ont été collectés à différents temps: 0, 15, 30, 60 min, 5 h et 24 h. 5 µL prélevés de chaque aliquot ont été injectés sur le UPLC-MS. En parallèle, un volume de 25 µL de la solution standard de chaque composé a été dilué dans 975 µL de DMSO, conservé à température ambiante puis injecté à l'UPLC-MS aux temps 0 et 24 h selon les gradients spécifiques pour chaque composé dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17. Condition analytique (c) du composé 41.

Temps (min)	Éluant A (%)	Éluant B (%)	Débit (mL/min)
0.00	95	5	0.7
0.50	95	5	0.7
2.10	72	28	0.7
2.12	0	100	0.8
3.50	0	100	0.8

Tableau 18. Condition analytique (d) du composé 51.

Temps (min)	Éluant A (%)	Éluant B (%)	Débit (mL/min)
0.00	95	5	0.7
0.50	95	5	0.7
2.10	46	54	0.7
2.12	0	100	0.8
3.50	0	100	0.8

Stabilité des composés en présence des cellules Calu-3

À des cellules Calu-3 confluentes lavées deux fois au PBS dans une plaque de 24 puits a été incubé en triplicata (t = 0, 30 min, 5 h, 24 h, et 48 h) l'inhibiteur dilué (750 µL/puits, 500 µM) dans le milieu EMEM. Après incubation, un volume de 750 µL du milieu a été prélevé et ajouté à un tube contenant 833 µL d'une solution d'acétonitrile 75%. Le milieu a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant a été prélevé puis conservé à -80°C. Les échantillons ont été analysés par ULPC-MS selon le gradient décrit dans le tableau 19 ci-dessous.

Tableau 19. Condition analytique (f) des composés 44 et 51.

Temps (min)	Éluant A (%)	Éluant B (%)	Débit (mL/min)
0.00	95	5	0.7
0.50	95	5	0.7
3.60	0	100	0.7
3.62	0	100	0.8
5.00	0	100	0.8

Stabilité des composés dans l'homogénat de poumons de souris

À une fraction S9 de broyat de poumons de souris (1 mg/mL) dans une solution tampon de phosphate de potassium (100 mM, pH 7,4) contenant du NADPH (1 mM), ont été incubés les composés (1 µM) à 37°C pour une durée de 30 min. Afin de détecter la dégradation de la NADPH libre, des échantillons en absence de NADPH ont été également préparés. Aux temps t = 0 et t = 30 min, des aliquots de 40 µL ont été prélevés pour chaque expérience puis dilués dans une solution d' ACN à 0°C contenant 1 µM de labetalol et 1 µM de furosemide. Après agitation, les échantillons ont été centrifugés pour éliminer les protéines précipitées. Un volume de 50 µL du surnageant a été recueilli, puis dilué dans H₂O (1:4, v/v). Les échantillons ont été analysés par LC-MS/MS avec comme composés de référence le dipropionate de béclo méthasone et la

phénacétine. Le calcul du pourcentage du composé parent restant a été déterminé en utilisant Microsoft Excel (2007). Ces expériences ont été réalisées en duplicata.

Analyse de la cytotoxicité par mesure de la lactate déshydrogénase (LDH)

Dans des plaques 24 puits transparentes, les cellules Calu-3 (environ 300 000 cellules/puits) ont été traitées avec les inhibiteurs dissous dans la solution EMEM incomplète à une concentration de 30 ou 300 μM , ou bien 200 μM d'amodiaquine. Après 48 h d'incubation, le surnageant a été récupéré, centrifugé 5 min à 800 rpm à température ambiante puis transféré dans un autre tube. Les cellules ont été lavées 3 fois avec une solution de PBS 1X. Dans des plaques 24 puits, 250 μL d'une solution de triton 1% ont été ajoutés dans chaque puit et incubés 10 min à température ambiante sous agitation. Le lysat cellulaire a été récupéré, centrifugé 5 min à 800 rpm à température ambiante puis transféré dans un autre tube. À chaque échantillon, un volume de 200 μL du surnageant contenu dans des cuves a été ajouté à 300 μL de la solution de NAD (0.66 g, 10 mM) préparée dans une solution tampon de TAPS (2.07 g, 85 mM) et d'acide lactique (0.63 g, 70 mM) dans 100 mL d'eau. Le pH a été ajusté à 8.5 avec une solution de NaOH. À chaque échantillon, un volume de 25 μL de lysat de cellules mis dans des cuves a été ajouté à 500 μL de la solution de NAD. En présence de LDH, le lactate est transformé en pyruvate et la NAD est alors modifiée en NADH. La quantification de la réaction a été effectuée par mesure de densité optique (DO) à 340 nM sur le spectrophotomètre de 0 à 2 min. Pour le blanc, un volume de 200 μL du surnageant a été remplacé par 200 μL de milieu de culture, et un volume de 25 μL de lysat cellulaire a été remplacé par une solution de triton 1%.

Les calculs de conversion en U/mL ont été faits comme suit:

- Pour $v = 25 \mu\text{L}$ de lysat de cellules : valeur $\times 8$ (facteur de dilution pour 200 μL) $\times 1.25$ (pour 250 μL de volume total du triton)
- Pour surnageant de cellules (modifier le facteur en fonction du volume du surnageant) : valeur $\times 2.78$ (pour 556 μL du volume total du surnageant)
- % mortalité = $(V_{\text{surnageant}} / (V_{\text{surnageant}} + V_{\text{lysate cellulaire}})) \times 100$

Toxicité tissulaire

Du jour 1 au jour 6, des souris femelles (19-21 g) ont été anesthésiées avec l'isoflurane (induction à 5%, maintient à 2.5% tout au long du traitement, volume de 15 μ L), puis traitées par voie intranasale avec 10 μ L de PBS ou 20 mg/kg de l'inhibiteur R-Q-A-R-Kbt, soit 4 fois la dose utilisée pour les titres viraux pulmonaires et les courbes de poids. Les protocoles portant sur les expériences effectuées sur les animaux ont été approuvés par le comité éthique de l'Université de Sherbrooke. Au jour 7, les souris ont été sacrifiées afin d'analyser les poumons par microscopie. Pour ce faire, elles ont été pesées puis euthanasiées avec une solution d'avertin 1.2 % dans de l'eau saline injectée de façon intrapéritonéale. La peau de l'abdomen puis la section de la veine cave inférieure ont été découpées afin de dégager la cage thoracique. Le diaphragme et les côtes ont été coupés soigneusement sans toucher aux poumons. Le cœur a été dégagé et les poumons perfusés avec 10 mL de PBS ont été prélevés. Les tissus ont été fixés à l'aide de formaldéhyde (solution 10% dans l'eau) et conservés dans la paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées au microtome et les lames ont été colorées suivant un protocole de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine pour être ensuite observées au microscope.

Modèle murin d'infection à l'influenza

Au jour 0, les souris femelles (19-21 g) ont été pesées et anesthésiées avec une solution d'avertin (1.2 % dans de l'eau saline) injectée de façon intrapéritonéale (volume total de 35 μ L). Les souris ont ensuite été infectées avec 25 PFU du virus PR8 (H1N1) dilué avec une solution de PBS, puis traitées avec l'inhibiteur dilué dans l'eau saline (5 mg/kg/jr) (volume final de 35 μ L) par voie intranasale. Du jour 1 au jour 3, les souris ont été anesthésiées à l'aide de l'isoflurane (induction à 5%, maintient à 2.5% tout au long du traitement, volume de 15 μ L), puis traitées par voie intranasale avec l'inhibiteur. En parallèle, les souris contrôles ont également été traitées par voie intranasale avec de l'eau saline. Au jour 3, le prélèvement des poumons des souris a été effectué de la manière suivante: les souris ont été pesées puis euthanasiées avec une solution d'avertin à 1.2 % dans de la saline injectée de façon intrapéritonéale. La peau de l'abdomen et la veine cave inférieure ont été découpées afin de dégager la cage thoracique. Le diaphragme et les côtes ont été découpés soigneusement sans toucher aux poumons. Le cœur a été dégagé et les poumons perfusés avec 10 mL d'eau saline. Un lobe des poumons à la fois a été prélevé et

conservé immédiatement dans un tube sur glace. Une fois les poumons prélevés, ils ont été broyés puis rincés avec 1 mL de milieu EMEM vierge. L'homogénat de poumons a été récupéré dans un tube, puis centrifugé à 4°C pendant 8 min. 1 mL du surnageant a été recueilli et transféré dans les cellules MDCK pour le dosage des titres viraux selon la procédure décrite dans (Beaulieu *et al.*, 2013) et résumée ci-dessus.

4.2 RÉSULTATS

4.2.1 Inhibition de la réplication virale dans les cellules Calu-3

Dans le but d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques anti-influenza, nous avons déterminé l'efficacité des cinq générations de composés à inhiber la réplication des virus H1N1 et H3N2 dans les cellules Calu-3, à l'aide du calcul de l'EC₅₀ selon le protocole décrit dans matériels et méthodes. Les valeurs de K_i des composés envers la matriptase ont été rajoutées en rappel pour la discussion.

Composés de première et deuxième générations

Premièrement, nous avons remarqué que le composé **33** avec le résidu (D)-Gln en position P3 a amélioré l'inhibition de la réplication du virus H1N1 par rapport à IN-1 avec le résidu (L)-Gln (EC₅₀ 1100 vs 5000 nM) (Tableau 20). Nous avons également observé le même effet avec le composé **36** *N*-méthylé à cette position (EC₅₀ 1100 nM). Au niveau de la position P4, nous avons remarqué que le composé **33** possédant le résidu (D)-Arg (EC₅₀ 400 nM) a affiché une efficacité d'inhibition environ treize fois supérieure sur le virus H1N1 comparé à son homologue, IN-1 avec le résidu (L)-Arg (EC₅₀ 5000 nM) et vis-à-vis du composé **37** avec la fonction *N*-Me (EC₅₀ 5500 nM). Le composé **34** avec le remplacement simultané des résidus (L)-Arg et (L)-Gln par les résidus (D)-Arg et (D)-Gln aux positions P4 et P3 respectif, a aussi permis de conserver l'inhibition de la propagation du virus H1N1 (EC₅₀ 3800 nM). Toutefois, nous avons noté que le composé **35** portant le résidu βhArg en position P1 a été cinq-mille fois moins efficace que IN-1 à réduire la réplication du virus H1N1, avec un EC₅₀ supérieur à 10000 nM. Par ailleurs, nous avons constaté que le composé **41** avec l'extrémité N-terminale supprimée, a été cinquante-cinq fois plus efficace que IN-1 à inhiber la réplication virale (EC₅₀ 100 vs 5500 nM). Mais, le

composé **42** avec l'extrémité N-terminale tronquée et le résidu (D)-Gln en position P3 a affiché une efficacité proche du composé **1** (EC_{50} 2700 vs 5500 nM). Les composés **39** et **40** avec la sulfonylation de l'extrémité N-terminale ont été jusqu'à soixante-huit fois plus efficaces que IN-1 (EC_{50} 200 et 80 vs 5500 nM). En revanche, le composé **38** acétylé au niveau de l'extrémité N-terminale a été moins efficace (EC_{50} 700 vs 5500 nM).

Tableau 20. Inhibition de la réplication virale avec les composés 32-42.

Composé	Matriptase	PR8	X31
		(H1N1)	(H3N2)
Séquence	K_i (nM) ^a	EC_{50} (nM) ^a	
1 R-Q-A-R-Kbt (IN-1)	0.01 ^b	5000 ^b	7700 ^b
32 R-(D)Q-A-R-Kbt	0.15	1100	700
33 (D)R-Q-A-R-Kbt	0.11	400	200
34 (D)R-(D)Q-A-R-Kbt	0.43	3800	3400
35 R-Q-Aβh-R-Kbt	1600	>10000*	>10000*
36 R-(NMe)Q-A-R-Kbt	0.90	1000	700
37 (NMe)R-Q-A-R-Kbt	1.3	5500	3800
38 (CH ₃ CO)R-Q-A-R-Kbt	0.17	700	300
39 (CH ₃ SO ₂)R-Q-A-R-Kbt	0.20	200	200
40 (PhSO ₂)R-Q-A-R-Kbt	0.48	80	70
41 (H)R-Q-A-R-Kbt	0.15	100	200
42 (H)R-(D)Q-A-R-Kbt	0.45	2700*	3000*

^aLes cellules Calu-3 confluentes ont été infectées avec les virus PR8 (H1N1) et X31 (H3N2) à une MOI de 0.003 avec ou sans inhibiteur à différentes concentrations. Les titres viraux ont été évalués 48 h après l'infection. Une courbe de régression non linéaire a été ajustée aux données, et la concentration effective (EC_{50}) a été calculée pour chaque inhibiteur en utilisant le logiciel *GraphPad Prism*. Les données représentent trois expériences indépendantes. *n = 1; n.d.: non déterminé.^b EC_{50} publiée dans (Beaulieu *et al.*, 2013).

Deuxièmement, les résultats obtenus sur le virus H3N2 nous ont montré que les composés **34** et **37** ont été deux fois plus efficaces que IN-1 (EC_{50} 3400 et 3800 vs 7700 nM). La capacité à inhiber la propagation de ce virus a été augmentée de plus d'un ordre de grandeur avec les

composés **32**, **33** et **36** (EC_{50} 200 et 700 vs 7700 nM). Cependant, le composé **35** a affiché une baisse importante de l'inhibition de la réplication avec un $EC_{50} > 10000$ nM. Les composés **38-41**, quant à eux, ont démontré une forte inhibition de la réplication virale et ont été plus de cent fois plus efficaces que IN-1 (EC_{50} 200, 300 et 70 vs 7700 nM). Alors que, le composé **42** a conduit à une efficacité moindre que IN-1 (EC_{50} 3000 vs 7700 nM).

En bref, cette étude nous a permis d'optimiser l'inhibition de la réplication virale et de porter une attention toute particulière vis-à-vis de ces peptides modifiés. En effet, les peptides avec des acides aminés (D), *N*-méthylés ou avec l'extrémité N-terminale modifiée ont mené à une meilleure efficacité que le composé de référence IN-1 à réduire la réplication des virus H1N1 et H3N2.

Composés de troisième génération

L'inhibition de la propagation des virus H1N1 et H3N2 par les composés de troisième génération a été évaluée (Tableau 21). En considérant en premier lieu les données sur le virus H1N1, nous avons noté que les composés **43** et **44** possédant les résidus Tyr et Phe en position P2 diminuent la réplication virale avec des EC_{50} de 10000 et 12000 nM. Les composés **46** et **47** dont le résidu Phe est substitué en position *para* avec un nitro ou un chlore ont été deux à six fois plus efficaces que le composé **44** avec un EC_{50} de 2 000 nM, 7200 vs 12000 nM, respectivement. Par contre, le composé **48** avec la substitution en position *para* avec un fluore a baissé l'efficacité d'un facteur 2 (EC_{50} 21700 nM). La puissance d'inhibition de la propagation du virus H1N1 est illustrée davantage avec le composé **45**, qui possède le résidu hPhe, et a été quarante fois plus efficace que le peptide **44** (EC_{50} 300 vs 12000 nM). Mais encore, nous avons observé que le composé **51**, sans l'extrémité N-terminale, a été de deux ordre de grandeur plus efficace que le composé **44** pour inhiber la propagation virale (EC_{50} 30 vs 12000 nM). Les composés **49**, **50**, **52** et **53** ont été également plus efficaces que le composé **44** (EC_{50} 200, 100, 160 et 680 vs 12000 nM).

Tableau 21. Inhibition de la réplication virale avec les composés 43-53.

Composé	Matriptase	PR8 (H1N1)	X31 (H3N2)
Séquence	K _i (nM)	EC ₅₀ (nM) ^a	
43 R-Q-Y-R-Kbt	0.18	10 000	4700
44 R-Q-F-R-Kbt	0.23	12000	4800
45 R-Q-hF-R-Kbt	0.06	300	1500
46 R-Q-F(4NO ₂)-R-Kbt	0.20	7200	2800
47 R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	0.20	2000	4400
48 R-Q-F(4F)-R-Kbt	0.21	21700	19000
49 (H)R-(D)Q-F-R-Kbt	11.29	200	100
50 (D)R-(D)Q-F-R-Kbt	2.45	100	200
51 (H)R-Q-F-R-Kbt	0.13	30	20
52 (CH ₃ SO ₂)R-Q-F-R-Kbt	2.03	160	n.d.
53 (PhSO ₂)R-Q-F-R-Kbt	15.32	680	n.d.

^aLes cellules Calu-3 confluentes ont été infectées avec les virus PR8 (H1N1) et X31 (H3N2) à une MOI de 0.003 avec ou sans inhibiteur à différentes concentrations. Les titres viraux ont été évalués 48 h après l'infection. Une courbe de régression non linéaire a été ajustée aux données, et la concentration effective (EC₅₀) a été calculée pour chaque inhibiteur en utilisant le logiciel *GraphPad Prism*. Les données représentent trois expériences indépendantes. n.d: non déterminé.

En second lieu, pour le virus H3N2, les composés **43**, **44** et **47** ont affiché des valeurs d'EC₅₀ de 4700, 4800 et 4400 nM respectivement. Les composés **45** et **46** ont permis d'accroître jusqu'à trois fois l'efficacité (EC₅₀ 1500, 2800 vs 4800 nM) par rapport au composé **44**, tandis que le composé **48** est quatre fois moins efficace (EC₅₀ 19000 nM). Pour les composés **49-51**, nous avons remarqué que ces derniers ont bloqué fortement la propagation du virus avec des EC₅₀ de 100, 200 et 20 nM, respectivement.

L'ensemble de ces résultats nous ont démontré que les peptides possédant le résidu Phe et ses dérivés en position P2 combiné avec des acides aminés (D) et/ou l'extrémité N-terminale modifiée inhibent de manière importante la réplication des virus H1N1 et H3N2. Le composé **51** étant le plus efficace à la fois sur les deux types de virus.

Composés de quatrième génération

La capacité des composés de la quatrième génération à inhiber la réplication des virus H1N1 et H3N2 a été également étudiée (Tableau 22). Nous avons remarqué que le composé **54**, qui porte un résidu hPhe en position P2, a diminué la réplication des virus H1N1 avec un EC₅₀ de 390 nM. De plus, les composés **55** et **56** avec les résidus Bip ou Bpa ont réduit également la propagation du virus avec des EC₅₀ de 1880 et 387 nM respectivement. Toutefois, les composés **54-56** sont environ de deux à dix fois moins efficaces que le composé **51** (EC₅₀ 30 nM). De même que les composés **56-61** avec des valeurs d'EC₅₀ de 387, 333, 117, 89, 270 et 90 nM ont été plus de dix fois moins efficaces que le composé **51**. Par contre, le composé **57** portant un résidu Cha a été onze fois moins efficace que l'analogue **51** (EC₅₀ 333 vs 30 nM). Par ailleurs, les composés **62**, **63**, **65** et **66** portant respectivement les résidus Gln(N(CH₃)₂), Asn, Ala, ou Glu en position P3, ont été aussi efficaces que le composé **51** pour diminuer la réplication du virus H1N1, avec des EC₅₀ de 24-113 nM. Cependant, nous avons constaté que le composé **64**, qui porte un résidu Phe en position P3, a été neuf fois moins puissant que le composé **51** (EC₅₀ 280 vs 30 nM).

Tableau 22. Inhibition de la réplication virale avec les composés 54-66.

Composé	Matriptase	PR8 (H1N1)	X31 (H3N2)
Séquence	K _i (nM)	EC ₅₀ (nM) ^a	
54 (H)R-Q-hF-R-Kbt	0.28	390	710
55 (H)R-Q-Bip-R-Kbt	0.66	1880*	n.d.
56 (H)R-Q-Bpa-R-Kbt	0.9	387	260
57 (H)R-Q-Cha-R-Kbt	0.81	333	210
58 (H)R-Q-F(4NH ₂)-R-Kbt	3.20	117	114
59 (H)R-Q-F(4CH ₂ NH ₂)-R-Kbt	0.26	89	189
60 (H)R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	0.33	270	380
61 (H)R-Q-Y-R-Kbt	0.28	90	130
62 (H)R-Q(N(Me) ₂)-F-R-Kbt	0.4	45	51
63 (H)R-N-F-R-Kbt	0.58	31	580 [#]
64 (H)R-F-F-R-Kbt	0.86	280*	n.d.
65 (H)R-A-F-R-Kbt	0.3	113	98 [#]
66 (H)R-E-F-R-Kbt	1.11	24	22

^aLes cellules Calu-3 confluentes ont été infectées avec les virus PR8 (H1N1) et X31 (H3N2) à une MOI de 0.003 avec ou sans inhibiteur à différentes concentrations. Les titres viraux ont été évalués 48 h après l'infection. Une courbe de régression non linéaire a été ajustée aux données, et la concentration effective (EC₅₀) a été calculée pour chaque inhibiteur en utilisant le logiciel *GraphPad Prism*. Les données représentent trois expériences indépendantes. *n = 1; [#]n = 2. n.d.: non déterminé.

Maintenant, pour les résultats obtenus sur le virus H3N2, les composés **54**, **56**, **57**, **58**, **59**, **60**, **61** et **63** ont été plus de dix fois moins efficaces à inhiber la réplication virale que le composé **51** (EC₅₀ 710, 260, 210, 114, 189, 380, 130, 580 vs 20 nM). À l'inverse, les composés **62**, **65** et **66** sont tout aussi efficaces que le composé **51** (EC₅₀ 51, 98 et 22 vs 30 nM).

En résumé, nous avons montré que les composés avec des acides aminés aromatiques (positions P2 et P3), non aromatiques (position P2), acides et neutres (position P3) peuvent également diminuer la réplication virale.

Composés de cinquième génération

La capacité des dérivés de tripeptide Q-F-R-Kbt modifié à réduire la réplication du virus H1N1 et H3N2 est représentée dans le tableau 23. Nous avons constaté que les composés **67** et **68** portant une délétion ou une diméthylation de l'extrémité N-terminale, ont été efficaces à réduire la propagation du virus H1N1 avec une valeur d'EC₅₀ identique de 200 nM. De plus, les composés **69** et **70** modifiés acétylés ou sulfonylés à l'extrémité N-terminale ont été cent fois plus efficaces sur la réplication du virus H1N1 avec des EC₅₀ de 2 et 1 nM respectivement.

Tableau 23. Inhibition de la réplication virale avec les composés 67-70.

Composé	Matriptase	PR8 (H1N1)	X31 (H3N2)
Séquence	K _i (nM)	EC ₅₀ (nM) ^a	
67 (H)Q-F-R-Kbt	13.76	20	60
68 (CH ₃) ₂ Q-F-R-Kbt	12	210	30
69 (CH ₃ CO)Q-F-R-Kbt	0.51	2	30
70 (CH ₃ SO ₂)Q-F-R-Kbt	2.63	1	9

^aLes cellules Calu-3 confluentes ont été infectées avec les virus PR8 (H1N1) et X31 (H3N2) à une MOI de 0.003 avec ou sans inhibiteur à différentes concentrations. Les titres viraux ont été évalués 48 h après l'infection. Une courbe de régression non linéaire a été ajustée aux données, et la concentration effective (EC₅₀) a été calculée pour chaque inhibiteur en utilisant le logiciel *GraphPad Prism*. Les données représentent trois expériences indépendantes.

Maintenant, si l'on se concentre sur le virus H3N2, nous avons noté que les tripeptides **67-70** bloquent également de manière significative la propagation du virus, avec des EC₅₀ de 9-60 nM.

Tous ces résultats nous ont révélé que les tripeptides Q-F-R-Kbt modifiés sont également capables d'inhiber considérablement la réplication des virus H1N1 et H3N2.

4.2.2 Inhibition des TTSPs impliquées dans l'influenza

Plusieurs TTSPs: TMRSS2, HAT, DESC1 et MSPL sont exprimées dans les tissus pulmonaires humains et clivent l'hémagglutinine HA des virus de type H1N1 et H3N2 (Hatesuer *et al.*, 2013), (Zmora *et al.*, 2014), (Betram *et al.*, 2010). Par conséquent, notre objectif a été de caractériser l'inhibition *in vitro* de HAT et DESC1 en présence des meilleurs composés inhibant la réplication de ces virus avec comme référence IN-1. La constante d'inhibition K_i des composés envers chacune de ces protéases a été rapportée dans le tableau 24. Les valeurs de K_i des composés vis-à-vis de la matriptase ont été rajoutées à titre de comparaison.

Tableau 24. Inhibition des TTSPs.

	Composé	Matriptase	HAT	DESC1
	Séquence	K_i (nM) ^a		
1	R-Q-A-R-Kbt	0.01 ^a	8.4	n.d.
33	(D)R-Q-A-R-Kbt	0.1	27.9	66.6
39	(CH ₃ SO ₂)R-Q-A-R-Kbt	0.1	8.5	90.9
40	(PhSO ₂)R-Q-A-R-Kbt	0.5	11.4	184.3
41	(H)R-Q-A-R-Kbt	0.2	4.3	43.5
51	(H)R-Q-F-R-Kbt	0.1	1.8	28.2
60	(H)R-Q-F(4Cl)-R-Kbt	0.3	7.5	33.4
61	(H)R-Q-Y-R-Kbt	0.5	1.3	25.4
49	(H)R-(D)Q-F-R-Kbt	11.3	51.5	284.5
50	(D)R-(D)Q-F-R-Kbt	2.5	11.4	65.6
67	(H)Q-F-R-Kbt	13.8	227.3	305.8
69	(CH ₃ CO)Q-F-R-Kbt	0.5	4.3	9.1
70	(CH ₃ SO ₂)Q-F-R-Kbt	2.6	9.1	25.6

^aLes valeurs de K_i ont été déterminées comme décrit dans matériels et méthodes. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées en triplicata et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

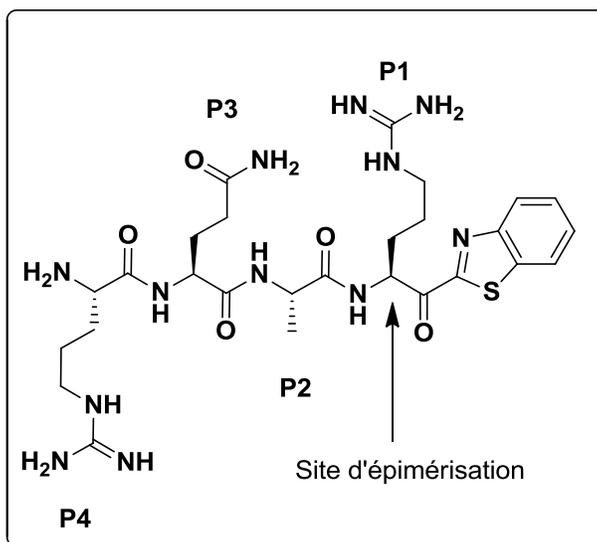
En considérant l'inhibition des composés envers HAT, nous avons remarqué que les composés **51** (K_i 1.8 nM) et **61** (K_i 1.3 nM) ont été environ quatre fois plus puissants que le composé **1** sur HAT (K_i 8.4 nM). Au contraire, le composé **49** (K_i 51.5 nM) est resté six fois moins puissant sur HAT. Cette perte d'inhibition envers HAT est plus élevée avec le composé **77** avec une valeur de K_i 227.3 nM. Pour l'inhibition envers DESC1, la plupart des composés inhibent son activité protéolytique. Par exemple, les composés **51** et **61** (K_i 28.2 et 25.4 nM respectivement), sont les inhibiteurs les plus puissants, mais nous avons aussi observé une perte d'inhibition illustrée avec le composé **49** (K_i 284.5 nM). Toutefois, il est important de noter que tous ces composés sont restés plus puissants envers la matriptase.

En somme, nous avons démontré ici que les composés ci-dessous sont également de puissants inhibiteurs des autres TTSPs (HAT, DESC1) impliqués dans la propagation des virus H1N1 et H3N2. Dans le cadre du développement d'agents contre l'influenza, cette inhibition peut être souhaitable, afin d'éviter que le virus ne change de partenaire pour cliver son hémagglutinine. À ce jour, nous n'avons pas encore une idée précise d'un profil de sélectivité idéal, cependant la gamme de composés rapportée dans ces travaux permettra par la suite d'étudier ce point précis.

4.2.3 Stabilité des composés dans les milieux d'essais biologique

Durant la synthèse en solution des dérivés du peptide IN-1 (composé **1**), nous avons pu noter l'épimérisation au niveau du résidu Arg en position P1 (Figure 28), menant à un mélange de diastéréomères dans un ratio 3:1 avec les stéréochimies (D) et (L) correspondantes séparées par HPLC-préparative.

Figure 28. Épimérisation de IN-1 en position P1.

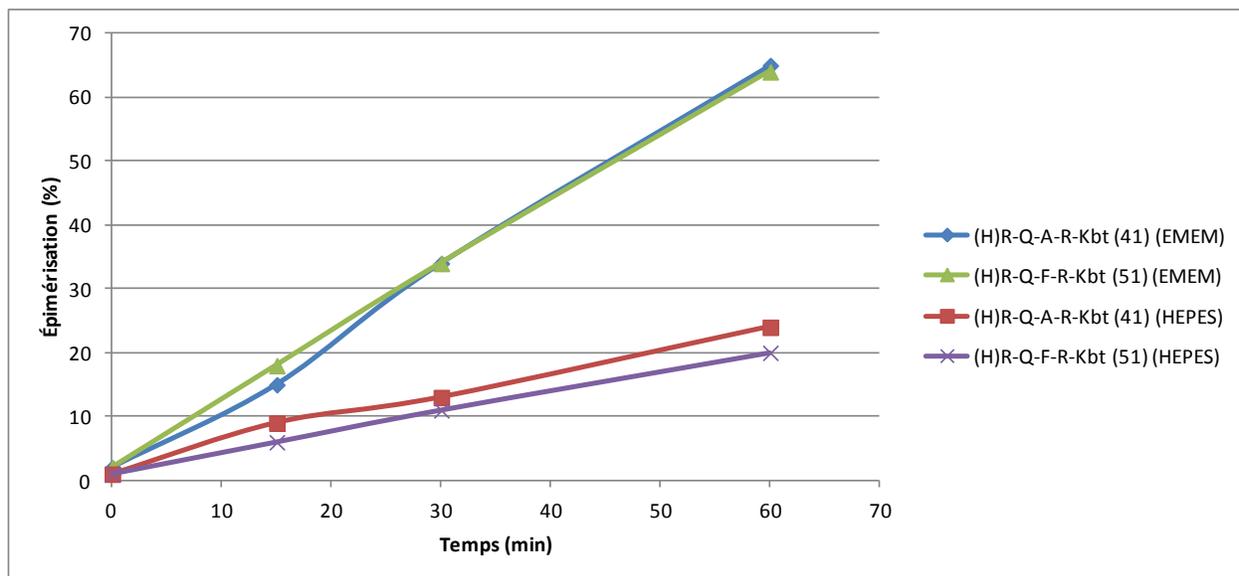


Notre étude préliminaire de RSA nous a indiqué que le composé **1**, qui porte le résidu (L)-Arg en position P1, est préféré par rapport à son homologue (D)-Arg pour l'inhibition de la matriptase (K_i 0.01 vs 4.6 nM) (Colombo *et al.*, 2012). L'objectif de la présente étude, a été d'évaluer l'épimérisation potentielle des nouveaux inhibiteurs dans les différents milieux dans lesquels ont été réalisés les essais d'inhibition de la réplication virale (EMEM et HEPES). Les tétrapeptides **41**, **51** ont été sélectionnés en raison de leur forte inhibition envers la matriptase (K_i 0.2 et 0.1 nM) et leur capacité à réduire la propagation du virus H1N1 (EC_{50} de 100 et 30 nM). Le pourcentage d'épimérisation de ces composés en fonction du temps et dans chaque milieu est représenté dans la figure 29. Au bout de 60 min d'incubation dans les milieux de culture EMEM et HEPES, nous avons obtenus un pourcentage d'épimérisation de 64 à 24%, respectivement. Nous avons également noté que le pourcentage d'épimérisation de ces peptides est plus élevé dans le milieu de culture EMEM que dans la solution HEPES.

En bref, ces résultats nous ont montré qu'il y a une épimérisation apparente des composés **41**, **51** dans les solutions EMEM et HEPES en fonction du temps.

Figure 29. Stabilité des composés 41 et 51 dans les milieux de culture (EMEM et HEPES).

Les droites tracées représentent le pourcentage d'épimérisation (stéréochimie (L) à (D)) de ces composés dans le milieu de culture EMEM et la solution HEPES en fonction du temps. Ces études ont été réalisées en *triplicata* et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.



4.2.4 Stabilité des composés en présence des cellules Calu-3

Les peptides sont des médiateurs naturels et des régulateurs de nombreux processus physiologiques, ils possèdent donc un vaste potentiel thérapeutique. Toutefois, l'utilisation pharmaceutique de peptides est limitée par plusieurs facteurs, notamment leur instabilité en milieu biologique, principalement à cause de la dégradation par les protéases. Plusieurs modifications du peptide **1**, y compris la *N*-méthylation, l'ajout d'acides aminés (D), la délétion ou la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale, ont été effectuées avec le but ultime d'améliorer leur stabilité biologique. De plus, ces modifications ont permis d'augmenter l'inhibition de la répllication des virus H1N1 et H3N2, phénomène qui serait lié à une meilleure stabilité biologique dans les cellules Calu-3. L'objectif de l'étude présentée ici a été d'étudier la stabilité des inhibiteurs de la matriptase en présence des cellules Calu-3 et dans l'homogénat de poumons de souris.

Les études de RSA *in vitro* précédentes nous ont montré que l'absence ou la présence du N-terminal a eu peu d'influence sur l'inhibition de la matriptase. Par exemple, le composé **51**, (H)R-Q-F-R-Kbt avec une délétion de l'extrémité N-terminale et le composé **44**, R-Q-F-R-Kbt présentent une forte inhibition pour la matriptase avec un K_i de 0.13 et 0.23 nM, respectivement. Cependant, les résultats sur la capacité de ces composés à inhiber la réplication virale dans les cellules Calu-3 nous ont démontré l'influence majeure de l'extrémité N-terminale. En effet, le composé **51** a été plus efficace que le composé **44** à diminuer la réplication du virus H1N1 (EC_{50} 30 vs 12000 nM), ce qui contraste avec leur différence de K_i minime. Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que cette différence en EC_{50} pourrait être due à une meilleure stabilité du composé **51** dans les cellules Calu-3. Il faut savoir que l'essai dans les cellules Calu-3 dure 48 h, et qu'une instabilité dans le milieu de culture (EMEM) pourrait se traduire par une efficacité moins élevée. Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des essais de stabilité biologique où ces composés ont été incubés en présence des cellules Calu-3 à différents temps allant de 0 h à 48 h. Nous avons regardé la dégradation des molécules de départ (H)R-Q-F-R-Kbt (composé **51**) et R-Q-F-R-Kbt (composé **44**) en fonction du temps (Figure 30). Les résultats nous ont révélé que ces molécules se sont dégradées au cours du temps. Toutefois, nous avons noté que le composé **44** s'est dégradé beaucoup plus rapidement que son homologue **51**. En effet, après 48 h d'incubation, nous avons observé 50% du composé **51** alors que le composé **44** a été seulement présent à 3%.

Par ailleurs, au cours de l'étude de stabilité dans l'homogénat de poumons (Figure 31), nous avons remarqué que IN-1 s'est dégradé rapidement puisqu'il n'en reste en moyenne que 38% après 30 min d'incubation. En revanche, le composé **34** ((D)R-Q-A-R-Kbt) avec le résidu (D)-Arg en position P4 a doublé la stabilité dans l'homogénat de poumons par rapport à IN-1. Cet effet s'applique aussi aux composés **37** ((NMe)R-Q-A-R-Kbt) et **39** ((CH₃SO₂)R-Q-A-R-Kbt) dont l'extrémité N-terminale a été fonctionnalisée par la N-méthylamine ou la méthylsulfonamide, respectivement. De même que pour le composé **51** ((H)R-Q-F-R-Kbt) avec l'amine N-terminale supprimée. Par ailleurs, parmi les sous-produits formés, l'apparition de l'épimère (D) a été observée. Il est important de noter que l'étude dans l'homogénat de poumons (fraction S9) de souris a été réalisée avec NADPH ou sans NADPH. La NADPH joue un rôle important dans une variété de processus biologiques incluant le métabolisme. Elle participe en tant que co-facteur

dans le processus oxydatif de métabolisme de médicament lors de la phase I (Ying, 2008). Les résultats n'ont révélé aucune différence significative en absence ou en présence de NADPH, ce qui semble nous indiquer que la dégradation des composés ne passe pas par un processus oxydatif.

Figure 30. Stabilité des composés 44 et 51 en présence des cellules Calu-3.

Les droites tracées représentent le pourcentage de la molécule de départ en fonction du temps. Ces études de stabilités dans les cellules Calu-3 ont été réalisées en *triplicata* (R-Q-F-R-Kbt) et *duplicata* ((H)R-Q-F-R-Kbt) représentent la moyenne de trois et deux expériences indépendantes.

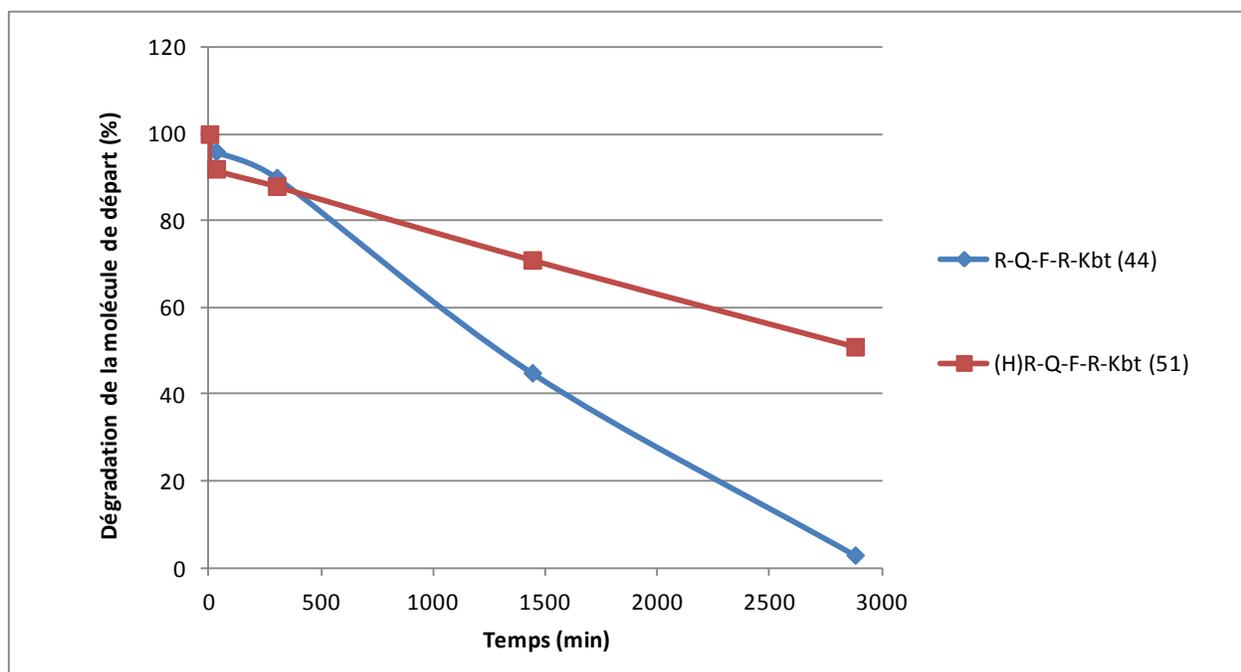
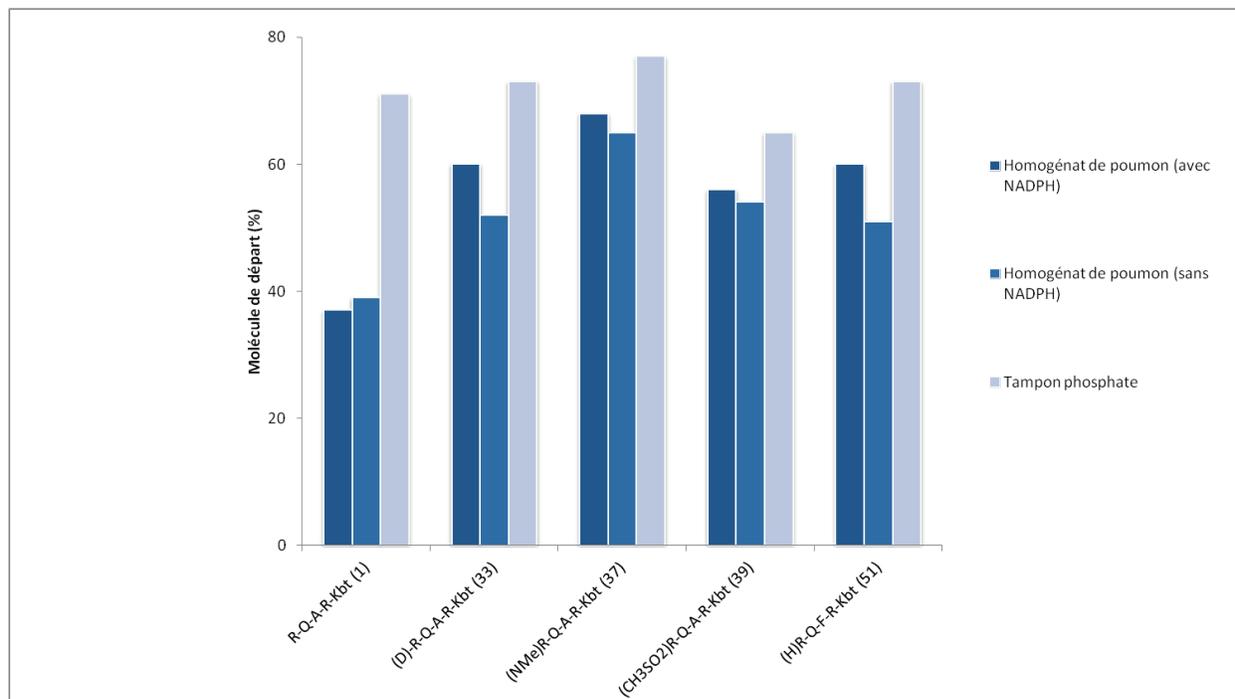


Figure 31. Stabilité des composés 1, 33, 37, 39 et 51 dans l'homogénat de poumons de souris.

Les histogrammes représentent le pourcentage de la molécule de départ dans l'homogénat de poumons de souris et une solution de tampon phosphate à $t = 30$ min. Ces études de stabilités ont été réalisées *duplicata* représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.



La stabilité de ces composés a aussi été mesurée dans la solution tampon phosphate dans laquelle ils ont été dissous (Figure 31). Nous avons observé en moyenne 70% des molécules de départ après 30 min, et l'autre portion (30%) représentant l'épimère (D).

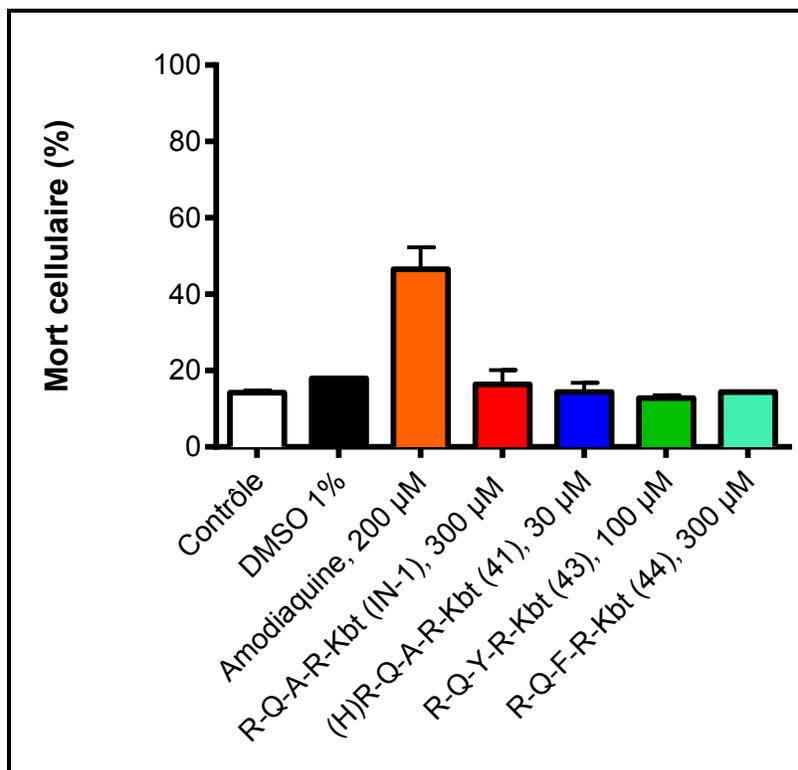
En résumé, nous avons montré que le composé **51** (sans le N-terminal) a été plus stable que le composé **44** (avec le N-terminal) dans les cellules Calu-3, ce qui a souligné l'effet de l'extrémité N-terminale sur la stabilité biologique. De plus, les composés **1, 33, 37, 39, 51** ont été relativement stables dans l'homogénat de poumons de souris après 30 min. La modification de l'extrémité N-terminale, l'introduction d'acides aminés (D) et la N-méthylation ont permis d'améliorer la stabilité biologique des composés dans l'homogénat de poumons de souris.

4.2.5 Étude de la toxicité des composés

Avant d'évaluer l'effet des composés *in vivo* et en vue d'une application clinique potentielle, il est important de réaliser des études de toxicité pour s'assurer que les cellules et les tissus ciblés par la molécule ne sont pas endommagés par cette dernière. Ainsi, l'objectif de cette étude ici a été d'évaluer la toxicité des composés. L'une des premières études de toxicité des composés peptidiques a été la cytotoxicité, par mesure de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), tel qu'illustré dans la figure 32 ci-dessous. Cette technique de viabilité cellulaire fréquemment utilisée mesure l'intégrité membranaire. Les cellules dont la membrane a été endommagée relâchent leur contenu cytosolique, notamment la LDH dans le milieu extracellulaire. La quantité de LDH libérée dans le milieu de culture est proportionnelle à la mort cellulaire. D'après les résultats présentés dans la figure 32, les cellules Calu-3 traitées avec 200 μM d'amodiaquine comme contrôle positif, ont montré un pourcentage de mort cellulaire de 50% au bout de 48 h. Cependant, les cellules Calu-3 traitées avec IN-1, les composés **41** ((H)R-Q-A-R-Kbt), **43** (R-Q-Y-R-Kbt) et **44** (R-Q-F-R-Kbt) à des concentrations de 300 μM et 30 μM (soit 10-1000 fois supérieures à leur EC_{50}) ont démontré un pourcentage de mort cellulaire inférieure de 20%, identique aux cellules contrôle ou traitées avec 1% de DMSO.

Figure 32. Cytotoxicité des composés.

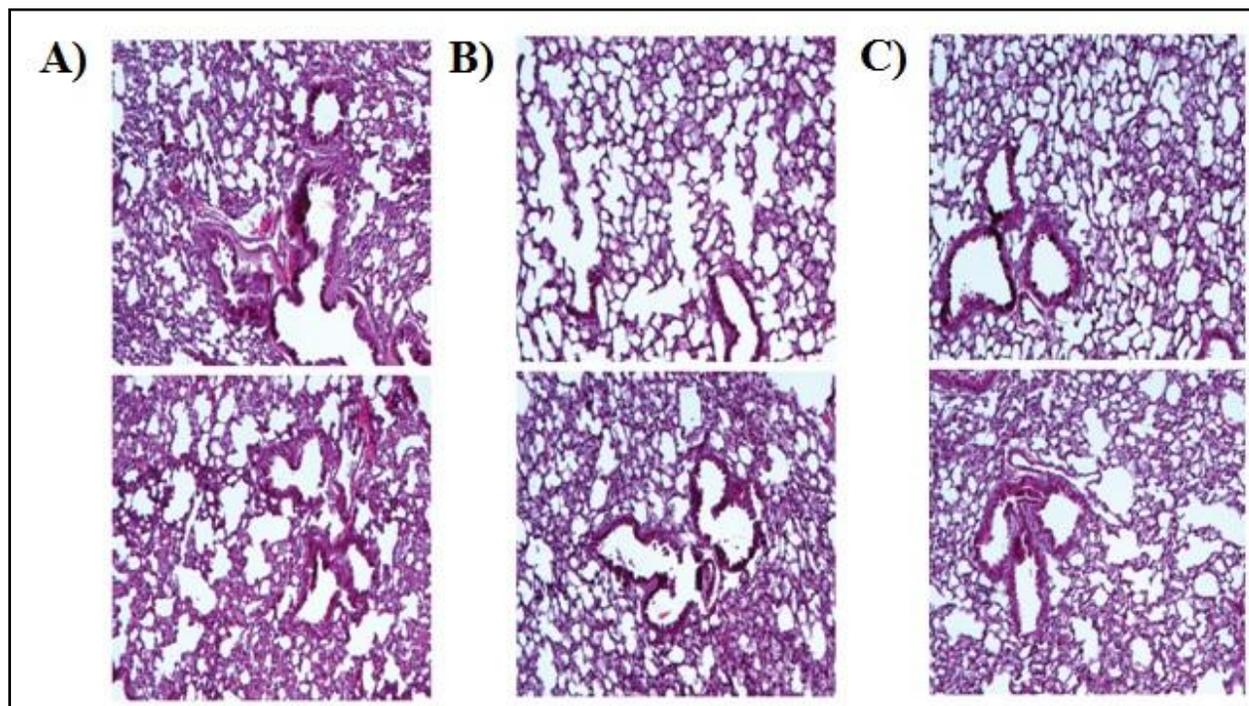
Les cellules Calu-3 ont été incubées pendant 48 h avec chacun des inhibiteurs et la cytotoxicité des composés a été déterminée en mesurant l'activité de la LDH comme décrit dans la section matériels et méthodes.



La deuxième étude de toxicité a été effectuée sur les tissus de poumons de souris non infectées et traitées pendant 7 jours avec IN-1, à une dose de 20 mg/kg (soit 4 fois supérieure à la dose efficace). Les coupes de tissus pulmonaires de souris prises au microscope confocal représentées dans la figure 33 ci-dessous, nous ont indiqué qu'il n'y pas de différence significative au niveau des tissus pulmonaires entre les souris non traitées (Figure 33A), traitées avec une solution d'eau saline (Figure 33B), ou avec IN-1 (Figure 33C).

Figure 33. Toxicité *in vivo* de IN-1.

Les souris ont été non traitées (A) ou traitées par voie intranasale avec soit une solution d'eau saline (B), soit avec IN-1 (20 mg/kg) pendant 7 jours (C). Les poumons ont été prélevés et les sections de paraffine ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine, des coupes de sections de poumons de souris ont été analysées. n = 3 souris/groupe.



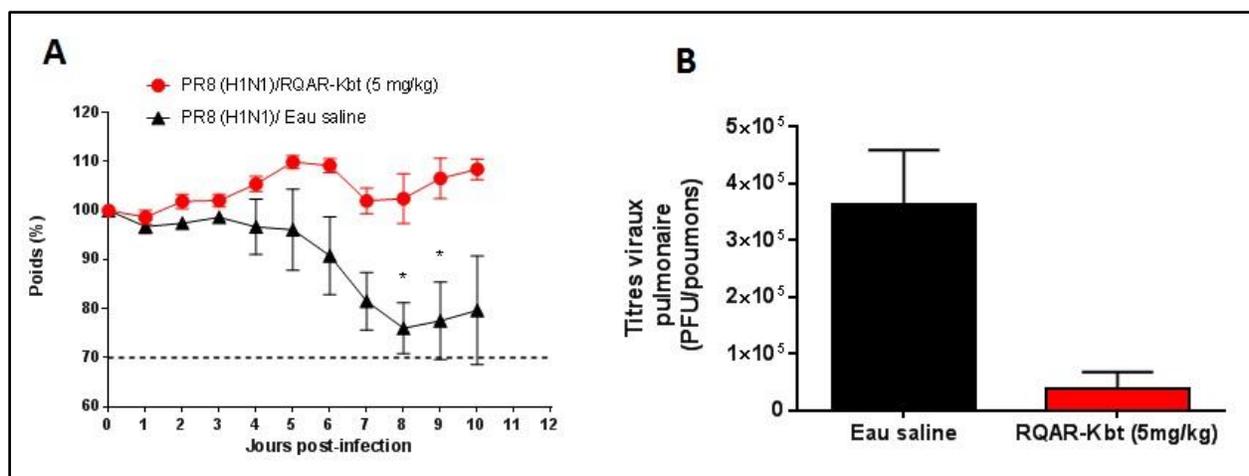
Ces premiers résultats nous ont révélé que IN-1, les composés **41**, **43** et **44** n'ont pas induit de toxicité cellulaire notable aux concentrations choisies. De plus, IN-1 n'a pas causé d'effet toxique au niveau du tissu pulmonaire à une dose de 20 mg/kg. Bien évidemment, ces études de toxicité sont préliminaires, mais les résultats sont très encourageants.

4.2.6 Potentiel de IN-1 dans un modèle d'influenza *in vivo*

Dans le but de déterminer l'efficacité *in vivo* des composés, le poids des souris a été mesuré pour établir la morbidité liée à l'infection. La mesure du poids des souris dans la figure 34A nous a indiqué qu'au bout du jour 3, les souris témoins ont perdu du poids très rapidement jusqu'à atteindre le seuil critique de 25% de leur poids initial au bout du jour 9. À l'inverse, les souris traitées avec IN-1 n'ont pas affiché de perte de poids. Au bout du troisième jour, la mesure des titres viraux pulmonaires a été également évaluée, nous avons noté une différence significative entre les souris témoins et les souris traitées. En effet, IN-1 a réduit fortement la réplication virale au niveau des poumons des souris infectées comparé aux souris contrôle (Figure 34B).

Figure 34. Effet *in vivo* de IN-1 dans un modèle de souris infectées.

A) Courbes de poids des souris traitées soit avec IN-1 (en rouge), soit avec de l'eau saline (en noir) 10 jours après l'infection. n = 3 souris/groupe. B) Titres viraux pulmonaires des souris traitées avec IN-1 (en rouge) et de l'eau saline (en noir). Le dosage des titres viraux a été déterminé au jour 3 sur des cellules MDCK comme décrit dans matériels et méthodes.



En somme, cette première étude *in vivo* a démontré que IN-1 a été efficace pour réduire la réplication virale pulmonaire chez des souris infectées par la grippe. Cette étude reste préliminaire, mais les résultats sont très prometteurs.

DISCUSSION

Une dérégulation de la matriptase est impliquée dans le développement de diverses pathologies. Par exemple, des niveaux élevés de l'expression de la matriptase dans un modèle d'arthrose favorisent l'induction de la destruction du cartilage osseux (Milner *et al.*, 2010). La matriptase est également surexprimée dans une variété de cancers épithéliaux et de nombreux travaux ont mis en évidence que cette protéase occupe un rôle crucial dans la progression de cancers épithéliaux (LeBeau *et al.*, 2013), (List *et al.*, 2009). En collaboration avec le groupe de List, nous avons montré que la matriptase joue un rôle critique dans la progression de carcinome mammaire dans des modèles cellulaires, *in vivo* et *ex vivo* (Zoratti *et al.*, 2015). De plus, notre groupe a démontré que la matriptase favorise également la réplication du virus H1N1, grâce à sa capacité à cliver et à activer spécifiquement l'hémagglutinine des virus de l'influenza de sous-type H1, y compris le virus H1N1 pandémique de 2009 (Beaulieu *et al.*, 2013). Puisque la matriptase apparaît comme une cible pharmacologique intéressante, le développement d'inhibiteurs puissants et sélectifs permettrait de comprendre plus précisément son rôle dans ces maladies et de démontrer son potentiel thérapeutique, ce qui constitue l'objet de cette thèse.

5.1 CONCEPTION ET IDENTIFICATION D'INHIBITEURS DE LA MATRIPTASE

Depuis quelques années, nous assistons à une croissance de médicaments peptidiques cliniquement approuvés par la FDA (Lax, 2010). En 2003, le nombre annuel de peptides entrant dans les essais cliniques était de 20. Dix années plus tard, 500-600 candidats peptidiques étaient en études précliniques et 128 en études cliniques (Uhlir *et al.*, 2014). Les peptides ont de nombreux avantages, par exemple, une bonne spécificité d'action, une faible toxicité. Toutefois, ils présentent également des inconvénients, qui ont limité leur utilisation thérapeutique, tels qu'une faible biodisponibilité orale ou une stabilité métabolique faible (Pernot *et al.*, 2011). En chimie médicinale, la recherche d'alternatives peptidomimétiques (qui cherchent à mimer les peptides afin de n'en garder que les avantages) est un objectif recherché. D'ailleurs, plusieurs inhibiteurs peptidomimétiques de protéases ont été approuvés comme médicaments ou sont actuellement en essais cliniques (Goodwin *et al.*, 2012). L'utilisation de motifs

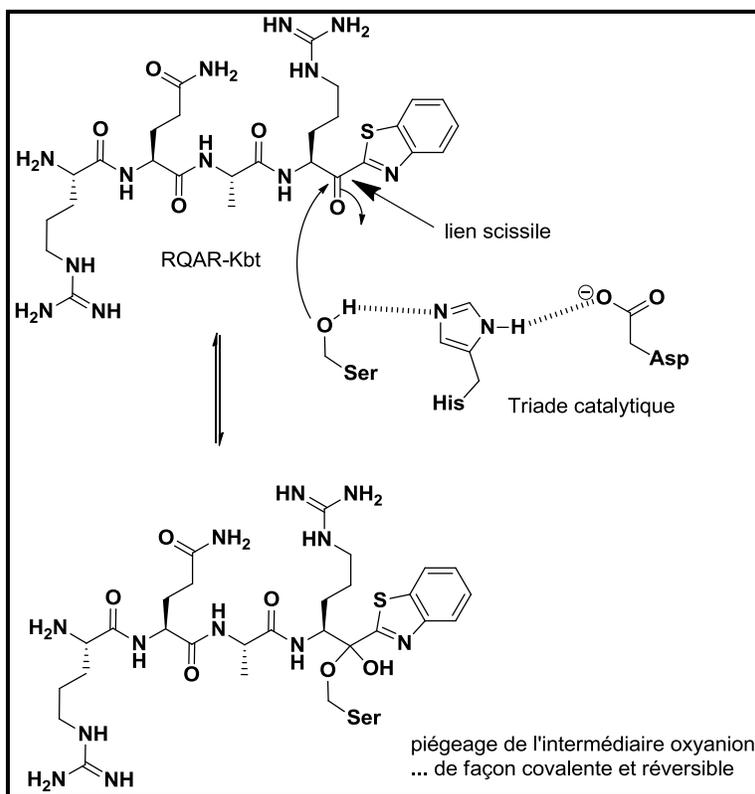
peptidomimétiques apparaît donc comme une approche intéressante pour le design d'inhibiteurs de la matriptase.

La matriptase possède la particularité de s'auto-activer grâce à sa capacité à reconnaître puis cliver sa séquence peptidique (P4-P4') R-Q-A-R⁶¹⁴↓V⁶¹⁵-G-G. La matriptase possède un K_m de 104 μM pour cette séquence peptidique (Béliveau *et al.*, 2009), ce qui représente un point de départ attrayant pour le développement d'inhibiteurs. Ainsi, pour le design des inhibiteurs présentés dans cette étude, nous nous sommes inspirés de cette séquence, à laquelle a été ajouté un groupe céto benzothiazole au niveau de l'extrémité C-terminale du résidu Arg en position P1. Ce céto benzothiazole joue le rôle d'un piège à sérine et a été rapporté par le groupe de Maryanoff pour la conception d'inhibiteurs peptidiques de la thrombine (Costanzo *et al.*, 2008). Ce type de piège à sérine très électroattracteurs rend le carbonyle au niveau du lien scissile plus électrophile et donc plus sensible à l'attaque du nucléophile, l'hydroxyle de la sérine catalytique. L'équipe de Davis a montré que les peptides possédant des céto hétérocycles comme l'oxazolone, le benzoxazole sont de plus puissants inhibiteurs de la protéase à sérine, l'élastase, que les peptides modifiés avec d'autres pièges à sérine tels que l'aldéhyde ou encore la trifluorométhylcétone (Edwards *et al.*, 1995). Par conséquent les céto hétérocycles améliorent de manière considérable la puissance d'inhibition. Autre point intéressant, les substituants hétérocycliques peuvent aussi contribuer à la formation du complexe enzyme-inhibiteur via la formation d'une liaison hydrogène avec le groupe imidazole du résidu Hist de la triade catalytique. En effet, l'étude cristallographique réalisée par le groupe de Maryanoff a démontré que l'azote du céto benzothiazole crée une liaison hydrogène avec le résidu Hist dans le site actif de la thrombine, et pourrait possiblement participer à la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique hémiacétale (Costanzo *et al.*, 2008). Cette interaction a été également rapportée par le groupe d'Edwards (Edwards *et al.*, 1992) avec d'autres céto hétérocycles comme le benzoxazole. L'utilisation de céto hétérocycle, notamment le céto benzothiazole (Kbt) constitue donc une approche optimale pour le design d'inhibiteurs puissants de la matriptase. Dans le but d'obtenir une connaissance approfondie des déterminants de la reconnaissance moléculaire et de développer des inhibiteurs peptidomimétiques, des études de RSA ont été menées avec différents acides aminés naturels et/ou non naturels introduits dans la séquence peptidique (P4-P1) R-Q-A-R-Kbt.

Lors de l'étude de RSA de première génération, IN-1 (composé **1**) (Figure 28) a été identifié comme un puissant inhibiteur à forte liaison et réversible avec une valeur de K_i de 0.011 nM (Colombo *et al.*, 2012) (Tableau 1). Ce type d'inhibition donne un certain nombre d'avantages comprenant: une forte liaison des composés pour l'enzyme avec un K_i très faible et un temps de résidence élevé, qui se traduit par une cinétique lente de dissociation du complexe entre l'inhibiteur et l'enzyme (Figure 25). Ainsi, ceci entraîne une longue inhibition réversible de l'enzyme, et pourrait contribuer à prolonger l'effet d'une molécule dont les propriétés pharmacocinétiques sont sous-optimales. Nous avons noté que la cétone au niveau de la position P1 du composé **1**, lorsque ce dernier a été réduit en alcool (composé **2**) a diminué la puissance de l'inhibition de 4 ordres de grandeur (Tableau 1). Ceci a suggéré l'importance de la cétone à cette position pour une forte inhibition envers la matriptase, et renforcé son rôle important dans le mécanisme de piège à sérine (Figure 35).

Figure 35. Mécanisme proposé d'inhibition de IN-1.

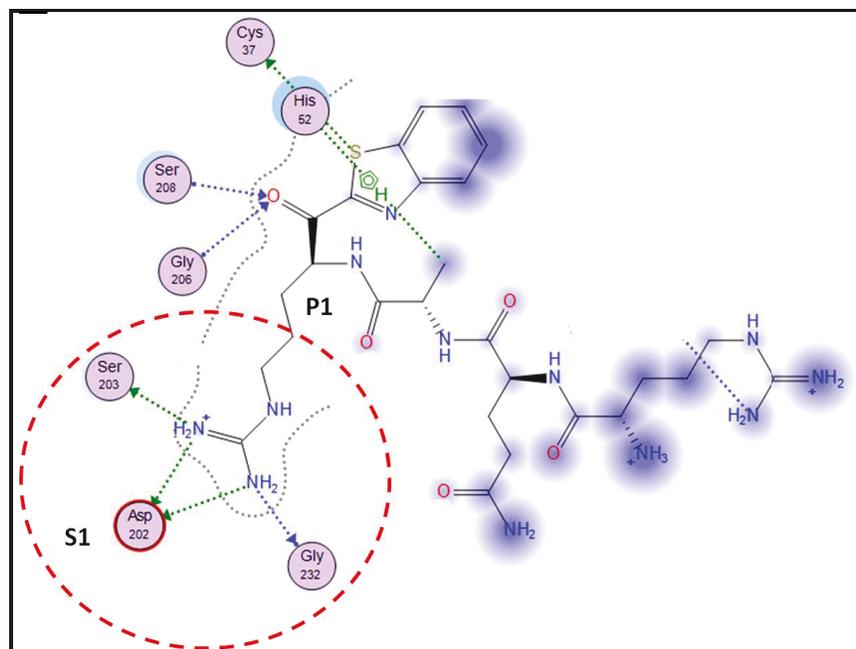
L'hydroxyle de la sérine catalytique attaque la cétone au niveau du lien scissile et forme un lien covalent. Ce faisant, une fonction hémiacétale est formée, qui est réversible en milieu aqueux.



Il a été rapporté dans la littérature que les TTSPs clivent spécifiquement les substrats possédant des résidus basiques en position P1 (Arg ou Lys) (Barre *et al.*, 2014). Par conséquent, nous avons remplacé le résidu Arg en position P1 du composé **1** par un résidu Lys (composé **4**), ce qui a diminué l'inhibition d'un facteur 1000 (Tableau 1), confirmant que la matriptase a une préférence pour le résidu Arg. Notre modèle moléculaire de IN-1 (composé **1**) dans le site actif de la matriptase (Figure 36) a montré que le motif guanidine dans la chaîne latérale du résidu Arg en position P1 a été hautement stabilisé dans un réseau de liaisons hydrogènes ou ioniques avec les résidus Asp²⁰², Ser²⁰³ et Gly²³². Ceci a permis d'expliquer la préférence pour le résidu Arg en position P1 par rapport au résidu Lys, qui possède une capacité de liaison hydrogène plus faible. Ce même type d'interaction a été retrouvé dans la structure cristalline du complexe de la matriptase avec son inhibiteur endogène HAI-1. En effet, le domaine Kunitz-1 de HAI-1 possédant un résidu Arg en position P1 est responsable de l'inhibition de la matriptase, contrairement au domaine Kunitz-2 qui présente un résidu Lys (Zhao *et al.*, 2013).

Figure 36. Interactions clés entre IN-1 et la matriptase.

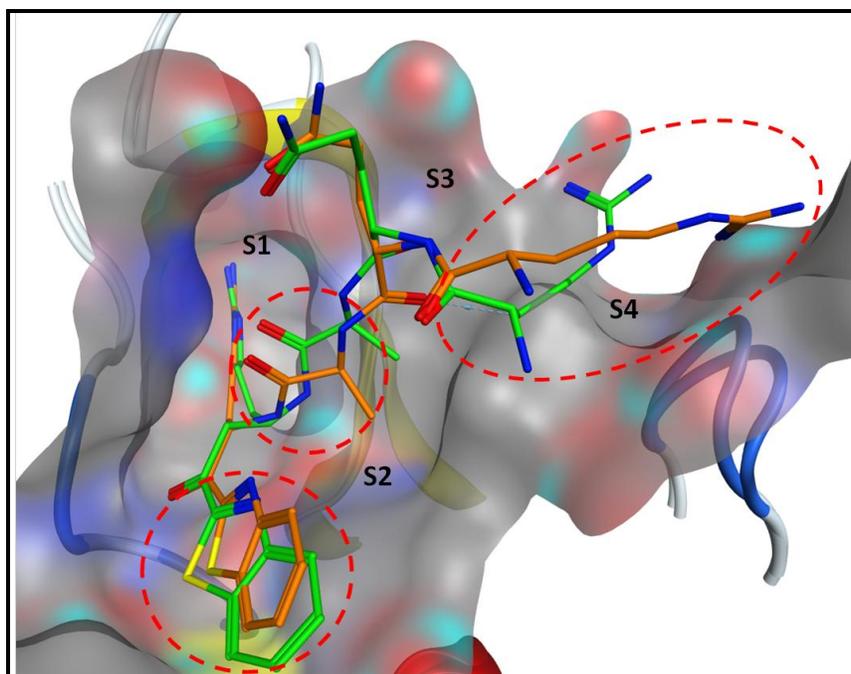
Image 2D montrant un pont salin entre le groupe guanidinium du résidu Arg en position P1 et le résidu Asp²⁰², ainsi que des liaisons hydrogènes avec les résidus Ser²⁰³ et Gly²³² dans la poche S1 de la matriptase (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX). Pourpre = résidus hydrophiles; anneaux rouges = résidus acides; bleu = surface de contact; flèches = liaisons hydrogènes. Les résidus sont numérotés avec le numéro PDB. Cette image 2D a été obtenue à partir du logiciel MOE.



L'épimérisation est une réaction secondaire courante en synthèse peptidique, et passe par la formation d'oxazolone, aussi appelée azalactone. Dans le cas où une fonction cétone est adjacente (à la place d'un amide), cette épimérisation est d'autant plus facile. Afin de pallier à ce problème, nous avons montré que l'ajout d'un carbone de plus en position bêta du céto-benzothiazole (composé **35**), a diminué la racémisation puisque seulement l'isomère désiré a été obtenu. Cependant, cette modification a entraîné une grande perte d'inhibition de la matriptase (Tableau 8). D'après le modèle moléculaire (Figure 37), la superposition dans la poche de liaison de la matriptase des composés **1** et **35**, nous a révélé que l'atome de carbone supplémentaire du composé **35** a provoqué un décalage au niveau du céto-benzothiazole à l'extrémité C-terminale, du résidu Ala en position P2 et du résidu Arg en position P4 par rapport à celle du composé **1**. Par conséquent, ces changements ont possiblement défavorisé les interactions clés avec les résidus des poches S1, S2 et S4 de la matriptase, ce qui pourrait expliquer cette faible inhibition du composé **35**.

Figure 37. Arrimage des inhibiteurs 1 et 35 dans le site actif de la matriptase.

Les composés **1** (IN-1, vert) et **35** (R-Q-A-βhR-Kbt, orange) sont superposés dans la poche de liaison de la matriptase (surface grise) (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX). L'image 3D a été générée à partir du logiciel MOE.

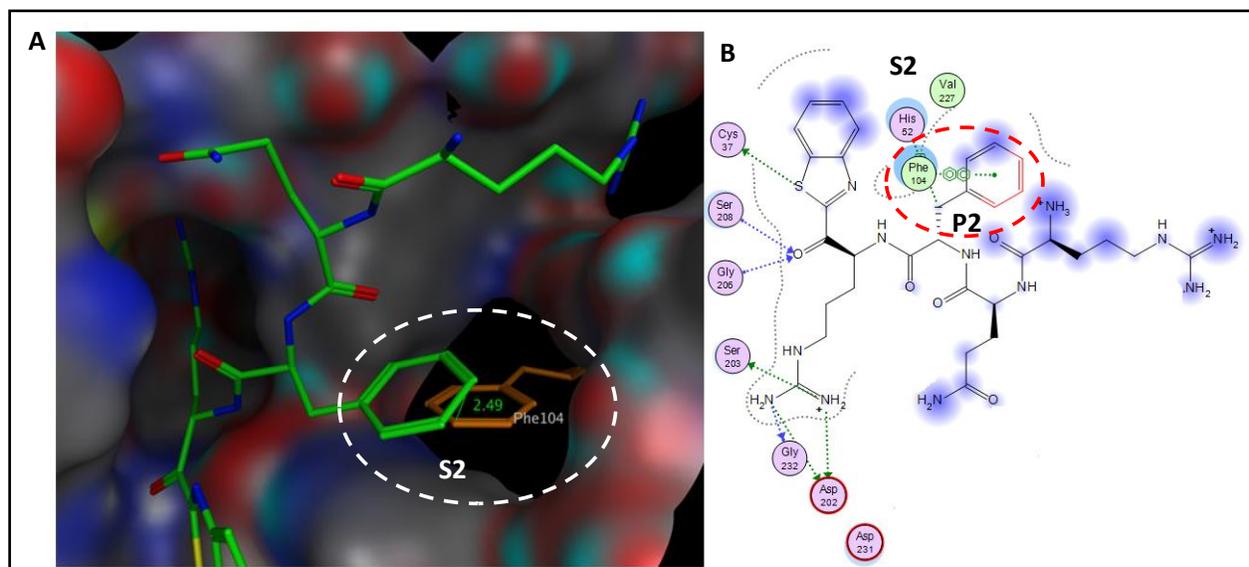


Autre observation intéressante, l'analogue **7**, possédant le résidu (D)-Arg en position P1, a réduit l'inhibition envers la matriptase (Tableau 1). Ce résultat nous a indiqué que l'insertion d'acides aminés (D) dans le squelette du peptide a modifié sa configuration et réduit possiblement les interactions avec les résidus dans la poche de liaison S1. En conséquence, la stéréochimie (L) du résidu Arg en position P1 est préférée par rapport à son homologue de stéréochimie (D). En outre, les analogues **4-6** avec la délétion des résidus aux positions P2-P4 ont diminué l'inhibition de la matriptase comparativement au composé **1**. Ainsi, la présence des résidus aux positions P2-P4 a été cruciale pour une inhibition puissante.

Une forte inhibition de la matriptase a également été observée avec les composés **43-48** (Tableau 10) qui possèdent des dérivés Phe à la place du résidu Ala au niveau de la position P2. Dans la poche S2 de la matriptase a été identifiée le résidu Phe¹⁰⁴ (Figure 38), ce qui nous a amené à penser que le résidu Phe en position P2 serait favorable à une interaction de type π - π . D'ailleurs, d'après notre modèle moléculaire (Figure 38), la distance entre ces deux acides aminés aromatiques est inférieure à 3 Å, ce qui a renforcé notre idée de départ. De plus, ce résultat a été en accord avec l'étude du groupe de Madison montrant que le substrat R-Q-F-R s'est parfaitement inséré dans la poche de liaison S2 via une interaction favorable avec le Phe¹⁰⁴ (Friedrich *et al.*, 2002). sc-uPA, un substrat connu de la matriptase, a comme séquence de clivage Pro-Arg-Phe-Lys qui possède également un résidu Phe en P2. Ces données ont souligné la tolérance de la matriptase pour le résidu Phe en position P2 (Takeuchi *et al.*, 2000).

Figure 38. Arrimage de l'inhibiteur 44 dans le site actif de la matriptase.

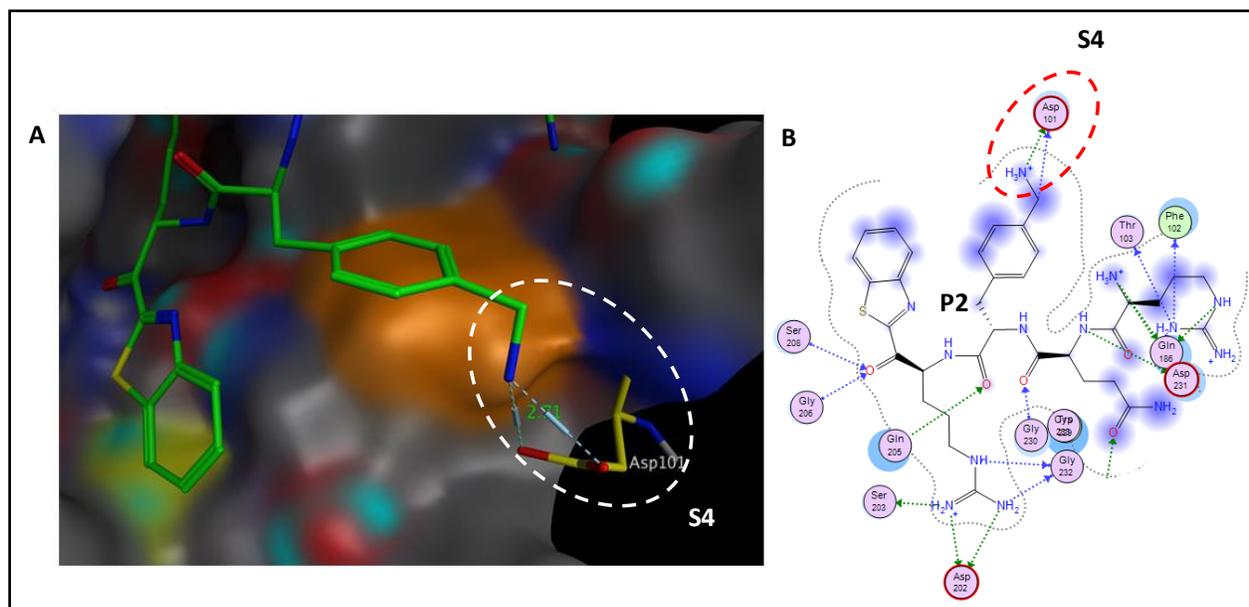
A) Image 3D montrant une interaction π - π entre le résidu Phe en position P2 du composé **44** (R-Q-F-R-Kbt, vert) et le résidu Phe¹⁰⁴ à une distance de 2.49 Å dans la poche S2 de la matriptase (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX). B) Image 2D illustrant les interactions clés. Pourpre = résidus hydrophiles; anneaux rouges = résidus acides; vert = résidus hydrophobes; bleu = surface de contact; flèches = liaisons hydrogènes. Les résidus sont numérotés avec le numéro PDB. Ces images 3D et 2D ont été obtenues à partir du logiciel MOE.



Autre fait intéressant, le composé **45** avec l'ajout du résidu hPhe en position P2 a amélioré l'inhibition de la matriptase par rapport au composé **44** avec le résidu Phe. La substitution en position *para* du cycle aromatique du résidu Phe en position P2 avec le nitro (composé **46**), le chlore (composé **47**), le fluore (composé **48**), l'amine (composé **58**) et la 4-méthylamine (composé **59**) sont également tolérés pour une inhibition de la matriptase (Tableaux 10 et 12). Le modèle moléculaire du composé **59** dans le site actif de la matriptase (Figure 39) nous a révélé une interaction hydrogène possible entre l'amine et le dérivé Asp¹⁰¹ dans la poche S4 à une distance inférieure à 3 Å.

Figure 39. Arrimage de l'inhibiteur 59 dans le site actif de la matriptase.

A) Image 3D illustrant une liaison hydrogène entre la 4-méthylamine en position P2 du composé **59** (R-Q-F(4CH₂NH₂)-R-Kbt, vert) et le résidu Asp¹⁰¹ à une distance de 2.71 Å dans la poche S4 de la matriptase (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX). B) Image 2D montrant les interactions clés. Pourpre = résidus hydrophiles; anneaux rouges = résidus acides; vert = résidus hydrophobes; bleu = surface de contact; flèches = liaisons hydrogènes. Les résidus sont numérotés avec le numéro PDB. Ces images 3D et 2D ont été obtenues à partir du logiciel MOE.



L'inhibition de la matriptase a été également illustrée avec les analogues possédant des acides aminés aromatiques non naturels en position P2 tels que les résidus Bip (composé **56**) et Bpa (composé **57**) (Tableau 12). Ceci nous a suggéré que les acides aminés aromatiques hydrophobes et encombrants sont tolérés dans la poche de liaison S2 de la matriptase.

La matriptase a également une préférence pour les substrats ayant un résidu Gln aussi bien que les résidus basiques (Arg ou Lys) en position P3. D'ailleurs, sc-uPA (P-R-F-K↓I) et pro-HGF (K-Q-L-R↓V) sont des substrats clés de la matriptase et présentent ces résidus dans leurs séquences de clivage en position P3 (Friedrich *et al.*, 2002). Cependant, nous avons également montré que les composés **63-66** possédant des acides aminés aromatiques (Phe), neutres (Ala, Asn), et acides (Glu) en position P3 ont pu également être utilisés pour le design d'inhibiteurs puissants de la matriptase (Tableau 13). Notre groupe et celui de Craik ont suggéré que les substrats avec un résidu Ala, Phe, Asn ou Glu en position P3 sont tolérés dans la poche de liaison

S3 de la matriptase (Béliveau *et al.*, 2009), (Takeuchi *et al.*, 2000). Le groupe de Graik a aussi montré que la matriptase a une préférence pour les substrats ayant un résidu Lys ou Arg en position P4, à cause de l'interaction ionique potentielle avec le résidu Asp²³¹ présent dans son site actif (Takeuchi *et al.*, 2000). Le remplacement des résidus aux positions P4 et P3 par leurs acides aminés (D) respectifs a également engendré une diminution de l'inhibition de matriptase. Ce résultat a démontré que l'insertion d'acides aminés (D) a provoqué un changement de conformation du peptide, ce qui a causé une réduction des interactions possibles avec les résidus des poches de liaison S4 et S3. En conséquence, la stéréochimie (L) des résidus aux positions P4 et P3 a été préférable par rapport à la stéréochimie (D) pour une forte inhibition de la matriptase. D'après le modèle moléculaire (Figure 25) la fonction guanidine du résidu (L)-Arg en position P4 a pu induire un pont salin avec le résidu Asp⁸²⁸ de la poche S4. L'amine du résidu (L)-Gln en position P3 a créé une liaison hydrogène avec le carbonyle du résidu Gln⁸⁰² de la poche S3. Ces différents types d'interactions ont été également soulignés dans le modèle moléculaire de l'hexapeptide R-Q-A-R↓V-V arrimé dans le site actif de la matriptase (Friedrich *et al.*, 2002).

La *N*-méthylation du lien amide des composés **36** et **37** aux positions P3 et P4 a réduit l'inhibition pour la matriptase (Tableau 8). Cet effet de la *N*-méthylation s'explique soit par l'encombrement stérique généré par le groupe *N*-méthyle, ou bien par une perte de liaison hydrogène dans le site actif de la matriptase. En revanche, la délétion ou la modification de l'extrémité N-terminale des composés **38-42** a eu peu d'influence sur l'inhibition de la matriptase (Tableau 9). Ceci représente une excellente opportunité pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques des composés, autrement dit de réduire leur polarité ou améliorer leur stabilité protéolytique vis-à-vis des protéases sans toutefois diminuer l'inhibition de la matriptase.

Par ailleurs, le tripeptide **4** (Q-A-R-Kbt) avec la délétion du résidu Arg en position P4 est un inhibiteur à forte liaison (*tight-binding*) et réversible (Tableau 1). Ce résultat nous a révélé que le résidu Arg en position P4 semble moins important. La délétion ou la diméthylation de l'extrémité N-terminale des composés **67** et **68** (Tableau 14) en présence du résidu Phe en position P2, a entraîné une diminution de la puissance d'inhibition pour la matriptase. Le composé **70**, dont l'extrémité N-terminale est modifiée avec la méthylsulfonamide, a aussi réduit

l'inhibition envers la matriptase, tandis que le composé **69** avec l'acétyle a été le meilleur inhibiteur de cette série (Tableau 14). Ceci nous a indiqué que l'extrémité N-terminale des tripeptides joue un rôle important dans l'inhibition de la matriptase.

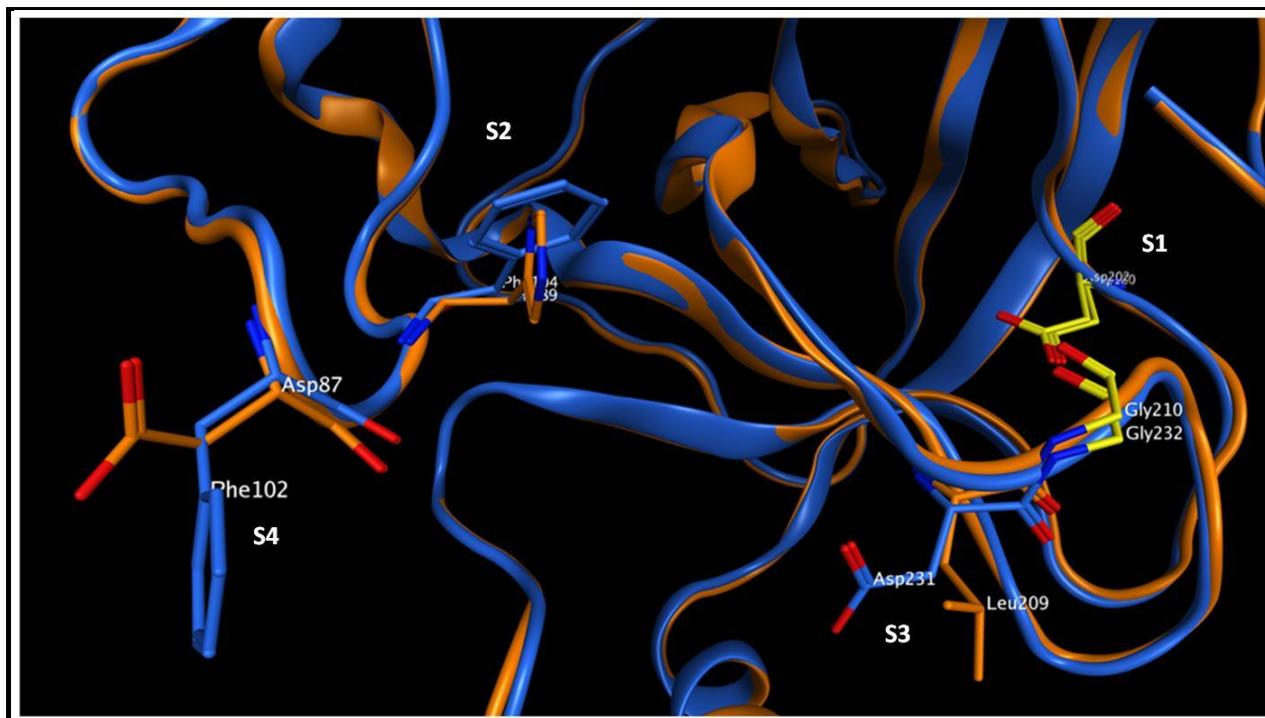
4.2 PROFIL DE SÉLECTIVITÉ DES INHIBITEURS DE LA MATRIPTASE

La matriptase est l'un des 17 membres de la famille des TTSPs. Bien que le rôle de plusieurs de ces TTSPs demeure à élucider, la matriptase-2 a été identifiée comme un régulateur essentiel de l'homéostasie du fer (Folgueras *et al.*, 2008), alors que la matriptase est impliquée dans l'homéostasie des tissus épithéliaux (Bugge *et al.*, 2009). Les inhibiteurs peptidomimétiques développés dans cette étude affichent un vaste potentiel thérapeutique en ciblant la matriptase. Toutefois, l'inhibition de protéases ayant des fonctions biologiques bien déterminées et appartenant à la même famille de protéases à sérine que la matriptase peut engendrer de sérieux effets secondaires. C'est pourquoi le développement d'agents thérapeutiques ciblant la matriptase nécessite une étude de sélectivité par rapport à d'autres protéases à sérine, particulièrement les TTSPs.

Notre étude de sélectivité a démontré que les composés sont hautement sélectifs pour la matriptase comparativement à d'autres TTSPs (matriptase-2, HAT, hepsine). Malgré le niveau élevé d'homologie entre ces TTSPs, notamment entre matriptase et matriptase-2 avec 44% d'homologie de la séquence globale, nous avons montré que IN-1 est 300 fois plus sélectif pour la matriptase que la matriptase-2 (Tableau 15). Il représente un bon point d'ancrage pour étudier la sélectivité d'un composé vis-à-vis de ces deux protéases. La génération d'un modèle 3D de la poche catalytique de la matriptase-2 en utilisant la structure de la matriptase comme modèle a été réalisée et nous a permis d'identifier des différences dans les poches de liaison S4-S1 qui pourraient être exploitées pour moduler la sélectivité. En utilisant cette approche, nous avons identifié trois sites intéressants (Figure 40).

Figure 40. Différences entre les poches de liaison S4-S1 de la matriptase et la matriptase-2.

Illustration 3D des poches de liaison S1-S4 de la matriptase (bleue) (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX) et matriptase-2 (orange) (modèle d'homologie réalisée avec MODELLER). À gauche: S1. Matriptase (Asp²⁰²), matriptase-2 (Asp¹⁸⁰). S2. Matriptase (Phe¹⁰⁴), matriptase 2 (His⁸⁹). À droite : S3. Matriptase (Asp²³¹), matriptase-2 (Leu²⁰⁹). S4. Matriptase (Phe¹⁰²), matriptase-2 (Asp⁸⁷). Les résidus sont numérotés avec leurs numéros PDB. Ces images 3D ont été obtenues à partir du logiciel MOE.



Premièrement, dans la poche S2, le résidu Phe¹⁰² de la matriptase est remplacé par le résidu His⁸⁹ dans la matriptase-2. L'incorporation de résidus chargés positivement en position P2 tels que les résidus His et 3-Pal devrait défavoriser l'interaction avec la matriptase-2 et par conséquent, favoriser la sélectivité pour la matriptase. C'est le cas du composé **71** avec le résidu 3-Pal au niveau de la position P2, qui a induit une perte d'inhibition pour matriptase-2, et donc a amélioré la sélectivité pour la matriptase. En revanche, la présence de résidus neutres en position P2 permettrait de moduler négativement la sélectivité de la matriptase versus matriptase-2. En effet, la présence de résidus aromatiques comme le résidu Phe (composé **44**) a accru la puissance d'inhibition pour la matriptase-2, par conséquent a réduit la sélectivité pour la matriptase. Ceci a révélé également que les résidus aromatiques en position P2 sont tolérés dans la poche de liaison de la matriptase-2. Ce résultat a été supporté avec l'étude du groupe Rolka qui a suggéré que les

peptides possédant des résidus aromatiques en position P2 sont clivés par la matriptase-2 (Wysocka *et al.*, 2014). De plus, la présence de résidus aromatiques riches en électrons en position P2 favoriserait la matriptase-2 via une interaction π - π avec le résidu His⁸⁹. En effet, les composés **43** et **48** avec les résidus Tyr et Phe(4F) en position P2 ont affiché une meilleure inhibition de la matriptase-2, et ont baissé ainsi la sélectivité pour la matriptase. À l'inverse, la présence de résidus aromatiques pauvres en électrons en position P2 favoriserait la matriptase, possiblement via une interaction π - π avec le résidu Phe¹⁰⁴. En effet, le composé **46** avec le résidu Phe(4NO₂) a provoqué une perte d'inhibition pour la matriptase-2 et a été plus sélectif pour la matriptase.

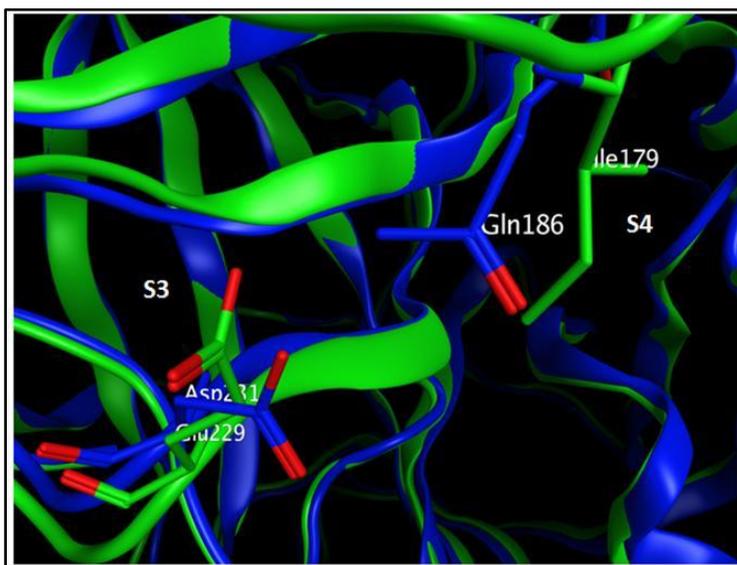
Deuxièmement, dans la poche S4, le résidu Phe¹⁰² dans la matriptase est remplacée par le résidu Asp⁸⁷ dans la matriptase-2 et dans la poche S3, le résidu Asp²³¹ dans la matriptase est substitué par le résidu Leu¹⁰⁹ dans la matriptase-2. Dans le cas du composé **76** ayant le résidu hArg en position P4, son motif guanidine a pu créer un pont ionique avec le résidu Asp²³¹ dans la poche S3 de la matriptase, tandis que ce type d'interaction est défavorisé dans le cas de la matriptase-2 avec le résidu Leu²⁰⁹. Ceci pourrait expliquer la perte d'inhibition observée pour la matriptase-2. Par contre, le composé **33** avec le résidu (D)-Arg en position P4 pourrait interagir avec le résidu Asp⁸⁷ de la poche S4 de la matriptase, ce qui justifierait une meilleure inhibition de la matriptase-2. Aussi, nous avons noté que la délétion de l'extrémité N-terminale a eu peu d'influence sur l'activité inhibitrice de la matriptase-2, et a permis de garder la sélectivité pour la matriptase vs la matriptase-2. Cependant, la modification de l'extrémité N-terminale avec un acétyle a entraîné une perte d'inhibition pour la matriptase-2. Elle a augmenté également la sélectivité pour la matriptase par rapport à la matriptase-2. Ceci a révélé que les composés modifiés au niveau de leur extrémité N-terminale ont été beaucoup mieux tolérés dans la pochette catalytique de la matriptase que dans celle de la matriptase-2.

Par ailleurs, les composés rapportés dans le tableau 16 ont affiché un très bon profil de sélectivité pour la matriptase versus d'autres protéases à sérine (thrombine, furine). La thrombine est une protéase à sérine de type trypsine qui a montré son rôle majeur dans la coagulation sanguine (Brummel *et al.*, 2002). Comme pour la matriptase, elle possède la caractéristique de cliver les substrats possédant des résidus basiques (Arg ou Lys) en position P1. Le résidu Arg en

position P1 peut créer un pont salin avec les résidus Asp²⁰² et Asp¹⁹⁹ situés dans les poches S1 de la matriptase et de la thrombine respectivement. En raison de cette similarité, il est important de discriminer ces deux protéases. Il a été montré que les substrats ou les inhibiteurs avec un résidu Pro au niveau de la position P2 sont hautement préférés par la thrombine (Quimbar *et al.*, 2013). Cependant, le remplacement du résidu Pro par d'autres acides aminés, par exemple le résidu Ala a permis d'améliorer l'inhibition et la sélectivité pour la matriptase par rapport à la thrombine (Hammami, 2012). Une étude du profil de substrats de la thrombine humaine réalisée par le groupe de Hellman a révélé que les substrats avec les résidus Ala ou Phe en position P2 ne sont pas clivés efficacement par la thrombine (Gallwitz *et al.*, 2012). Or, les substrats avec les résidus Ala ou Phe en position P2 sont clivés par la matriptase (Béliveau *et al.*, 2009). Au niveau des positions P3 et P4, à l'inverse de la matriptase, les résidus aliphatiques ou aromatiques sont privilégiés par la thrombine, par rapport aux résidus polaires ou basiques qui sont préférés par la matriptase. Ceci s'explique par le fait que les résidus Glu²²⁹ et Ile¹⁷⁹ confèrent un caractère hydrophobe aux poches de liaison S3-S4 de la thrombine, contrairement à celles de la matriptase chargées négativement avec les résidus Asp²³¹, Gln¹⁸⁶ (Figure 41). Toutes ces différences peuvent expliquer le haut niveau de sélectivité des composés pour la matriptase versus la thrombine (Tableau 16).

Figure 41. Différences entre les poches de liaison S4-S3 de la matriptase et la thrombine.

Illustration 3D des poches S1-S4 de la matriptase (bleue) (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX) et de la thrombine (PDB code 4AYV) (vert). À gauche: S3. Matriptase (Asp²³¹, Trp²²⁹), thrombine (Glu²²⁹, Trp²²⁷). À droite S4. Matriptase (Gln¹⁸⁶), thrombine (Ile¹⁷⁹). Les résidus sont numérotés avec leurs numéros PDB. Ces images 3D ont été obtenues à partir du logiciel MOE.

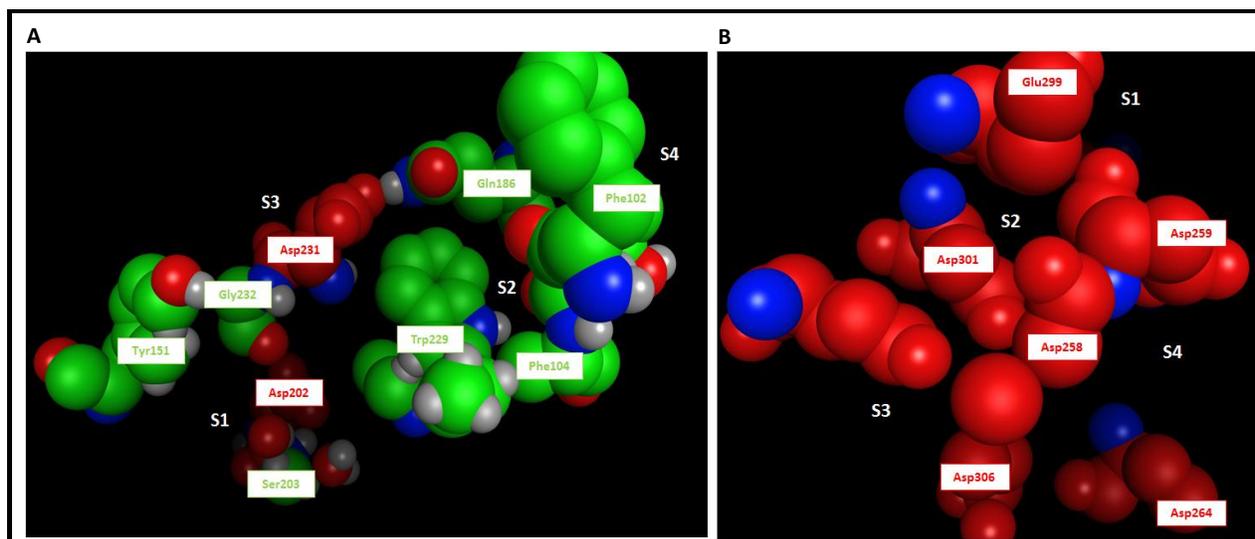


La furine est une protéase transmembranaire de type I qui convertit les pro-protéines en protéines matures. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus biologiques, notamment durant l'embryogénèse (Roebroek *et al.*, 1998). Elle clive spécifiquement les substrats qui présentent une séquence multibasique (P4-P1'), (R-X-R/K-R↓X). Cette séquence de clivage est proche de la séquence d'auto-activation de la matriptase (P4-P1') R-Q-A-R↓V sur laquelle est basée la structure des inhibiteurs proposés dans cette étude. En effet, elles ont en commun le résidu Arg aux positions P4 et P1. Basé sur un modèle de la structure cristalline de la furine développé par le groupe de Than (Henrich *et al.*, 2005), il a été montré que les motifs guanidines de la chaîne latérale du résidu Arg aux positions P4 et P1 sont engagés dans une interaction électrostatique avec le carboxylate des résidus Asp³⁰⁶ et Asp²⁶⁴ dans les poches de liaison S1 et S4 (Figure 42B). De plus, cette étude a suggéré que les résidus Lys et Arg sont également fortement préférés en position P2, en raison d'une interaction ionique avec le carboxylate du résidu Asp³⁰¹ (Figure 42B). À travers notre modèle moléculaire (Figure 42), nous avons remarqué que dans le site catalytique de la furine, les régions chargées négativement (en rouge) sont situées dans les poches de liaison S1-S4 (Figure 42B). En revanche, pour la

matriptase, les régions chargées négativement sont localisées uniquement dans les poches de liaison S1 et S3 (Figure 42A) et les régions hydrophobes sont situées aux poches de liaison S2 et S4. En outre, il a été démontré que les peptides avec le résidu Ala ou des résidus aromatiques (Phe, His) à la place du résidu Lys en position P2 réduisent l'affinité pour la furine (Tian, 2009). Ainsi, le haut profil de sélectivité des composés (Tableau 16) pour la matriptase par rapport à la furine peut s'expliquer par ces différences.

Figure 42. Différences entre les pochettes de liaison S1-S4 de la matriptase et la furine.

Illustration 3D des poches S1-S4 de la matriptase (A) (PDB code 3NCL; 1EAW, 1EAX) et la furine (B) (PDB code 1P8J). Rouge = régions chargées négativement, vert = régions hydrophobes. Les résidus de la poche de liaisons sont numérotés avec leurs numéros PDB. Ces images 3D ont été obtenues à partir du logiciel MOE.



4.3 DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX AGENTS ANTI-INFLUENZA

L'oseltamivir (Tamiflu[®]) et l'amantadine (Symmetrel[®]) sont les traitements actuellement disponibles et couramment utilisés pour combattre les virus grippaux humains. L'oseltamivir inhibe une protéase du virus, la neuraminidase, qui libère les particules virales des acides sialiques situés à la surface des cellules infectées. L'amantadine, quant à elle, se fixe au canal ionique M2 et empêche l'acidification nécessaire de l'endosome afin de favoriser sa fusion avec la paroi virale. Toutefois, les virus grippaux humains développent une résistance face aux antiviraux ciblant les protéines du virus. En effet, il a été rapporté que 28 souches du virus de

l'influenza A (H1N1) saisonnière collectées de 2008 à 2010 sont résistantes à l'oseltamivir et l'amantadine (Sheu *et al.*, 2011). Ainsi, il existe un besoin crucial de développer de nouveaux agents antiviraux à la fois efficaces et résistants pour traiter les infections grippales. L'infectivité du virus de la grippe nécessite le clivage de l'hémagglutinine virale HA par les protéases de l'hôte, permettant la fusion avec la cellule de l'hôte infectée. La matriptase exprimée dans les tissus pulmonaires a été identifiée comme une nouvelle protéase qui favorise le cycle de réplication du virus, grâce à sa capacité à cliver l'hémagglutinine des virus H1N1 et H9N2 (Beaulieu *et al.*, 2013), (Baron *et al.*, 2013). Suite à ces récentes découvertes, nous avons émis l'hypothèse que cibler la matriptase avec des inhibiteurs pharmacologiques serait potentiellement une nouvelle stratégie pour une thérapie anti-influenza. L'une des forces de cette approche est de cibler une protéase de l'hôte, génétiquement stable, contrairement aux protéines du virus sujettes à des mutations. Par conséquent, les risques que le virus développe une résistance aux traitements pourraient être réduits. Pour déterminer l'effet anti-influenza des inhibiteurs dans un modèle cellulaire, les cellules épithéliales bronchiques Calu-3 ont été utilisées. C'est dans ce type de cellule, entre autres, que le virus se réplique. Ces cellules expriment de façon stable plusieurs TTSPs dont la matriptase (Beaulieu *et al.*, 2013). Lors de précédents travaux, nous avons montré que IN-1 bloque efficacement la propagation des virus H1N1 et H3N2 avec des EC_{50} de 5 et 7 μ M dans les cellules Calu-3 (Tableau 20), ce qui représente un point de départ intéressant pour développer une nouvelle classe de molécules anti-influenza. Vu ce résultat, notre objectif a été d'évaluer l'effet des composés dérivés de la structure de IN-1 sur la réplication des virus H1N1 et H3N2, afin de découvrir des molécules hautement plus efficaces que IN-1.

Tout d'abord, cette étude a révélé que les composés **43-48** ayant des dérivés de la phénylalanine au niveau de la position P2, ont été efficaces pour bloquer la réplication des virus H1N1 et H3N2 (Tableau 21). Dans le but d'améliorer la stabilité protéolytique des composés, des acides aminés (D), la *N*-méthylation de liens peptidique et la modification de l'extrémité N-terminale ont été introduites dans la séquence peptidique aux positions P3 et P4. D'ailleurs, les travaux du groupe de Xu ont montré que l'introduction d'acides aminés (D) dans des séquences peptidiques résistent à l'hydrolyse enzymatique catalysée par la protéinase K, une puissante endopeptidase (Li *et al.*, 2012). Une étude similaire a rapporté que la modification de l'extrémité N-terminale du fragment peptidique actif de la neurotensine (NT 8-16) avec des carbamates a

augmenté sa résistance au clivage par les aminopeptidases, qui clivent des substrats possédant une extrémité N-terminale libre (Orwig *et al.*, 2009). Dans cette optique, nous avons remarqué que les composés **33** et **36** avec la stéréochimie (D), ou avec la *N*-méthylamine au niveau des positions P4 et P3, (Tableau 20) sont plus efficaces que IN-1 à inhiber la propagation virale, bien qu'étant de moins puissants inhibiteurs *in vitro*. De plus, nous avons constaté que les composés **38-42** avec une simple délétion, acétylation ou sulfonylation du N-terminal sont beaucoup plus efficaces que le composé **1** (Tableau 20). Ces observations nous ont mené à émettre l'hypothèse que la stabilité des composés est importante pour une efficacité antivirale. Des essais de stabilité nous ont permis de valider cette hypothèse puisque nous avons remarqué que le composé **39** a été plus stable que IN-1 dans l'homogénat de poumons de souris (Figure 27). Ainsi, ces résultats ont souligné l'importance de la stabilité des composés à inhiber la réplication virale. L'augmentation de l'efficacité qu'a engendrée la délétion ou la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale ainsi que l'utilisation des acides aminés (D) aux positions P3 et P4 ont retenus notre attention. Par conséquent, l'ajout de ces modifications aux positions P3 et P4 en présence de dérivés Phe en position P2 a donné naissance à de nouveaux composés **49-53** ayant une bonne capacité à réduire la propagation des virus (Tableau 21), notamment le composé **51** (H)R-Q-F-R-Kbt qui est considéré comme le plus efficace. De plus, ce composé **51** modifié à l'extrémité N-terminale a été plus stable que son homologue, le composé **44** R-Q-F-R-Kbt, dans les cellules Calu-3 (Figure 29). Basé sur le composé **51**, nous avons pu montrer que l'ajout de substituants au cycle aromatique de la phénylalanine (composés **58-61**), ainsi que la présence d'acides aminés aromatiques ou non (composés **54-57**) en position P2 sont aussi efficaces (Tableau 22). Par ailleurs, au niveau de la position P3, le résidu Phe du composé **64** a été moins préférable que les résidus Gln (composés **51** et **62**), Ala (composé **65**), Glu (composé **66**) ou encore Asn (composé **63**) pour réduire la réplication virale (Tableau 22). Ceci a suggéré que la position P3 supporte les acides aminés de natures différentes (polaires, non polaires et acides). Précédemment, nous avons identifié les tripeptides **67-70** comme des d'inhibiteurs peptidomimétiques puissants de la matriptase (Tableau 14). Nous avons également démontré le potentiel de ces tripeptides à diminuer fortement la propagation des virus H1N1 et H3N2 (Tableau 23). De plus, les tripeptides **67**, **69** et **70** ont été très stables dans l'homogénat de poumons, ce qui a prolongé la capacité de ces composés à baisser efficacement la réplication virale (résultat non montré).

Toutefois, d'autres TTSPs, particulièrement TMPRSS2, TMPRSS4, HAT, DESC1 et MSPL sont également reconnues comme capables de cliver l'hémagglutinine des virus H1N1 et H3N2 (Hatesuer *et al.*, 2013), (Zmora *et al.*, 2014), (Betram *et al.*, 2010). Le rôle prédominant des TTSPs reste à élucider, mais la forte capacité des composés à réduire la propagation de ces deux virus nous a porté à croire qu'ils peuvent aussi inhiber l'activité protéolytique de ces protéases. Les K_i des composés présentés dans le tableau 24 nous ont indiqué que ces composés inhibent également HAT et DESC1. Néanmoins, ils sont plus puissants et plus sélectifs pour la matriptase. La structure des inhibiteurs avec les résidus Arg, Gln, Ala et Arg aux positions respectives P4, P3, P2, et P1 a été parfaitement en lien avec l'étude de spécificité de substrats de HAT réalisée par le groupe de Rolka (Wysocka *et al.*, 2010) et celle de DESC1 effectuée par notre groupe (Béliveau *et al.*, 2009). Par conséquent, ces composés peuvent être utilisés comme point de départ pour le design d'inhibiteurs de HAT et DESC1 impliqués dans la propagation du virus de l'influenza H1N1 et H3N2.

Avant d'évaluer le potentiel anti-influenza *in vivo* des inhibiteurs, des études de toxicité ont été effectuées en présence des cellules Calu-3 et sur les tissus de poumons de souris. D'après les essais de toxicité, nous avons montré que IN-1 n'a pas provoqué de signe apparent de toxicité au niveau des cellules Calu-3 à une dose 60 fois supérieure à la dose efficace (Figure 32). De plus, IN-1 n'a pas engendré d'effet toxique au niveau de tissus pulmonaires de souris à une dose 4 fois supérieure à la dose efficace (Figure 33). Suite à ces résultats, nous avons étudié l'effet anti-influenza de IN-1 dans un modèle murin d'influenza. Sachant que la matriptase contribue à la réplication du virus H1N1 qui infecte fréquemment les humains, nous avons décidé d'infecter les souris avec ce type de virus. L'infection avec le virus H1N1 et l'administration du composé ont été réalisées par voie intranasale, sous anesthésie partielle, ce qui constitue une approche couramment utilisée dans les modèles précliniques d'influenza (Fernandes *et al.*, 2009). Ainsi, des essais *in vivo* ont été réalisés dans des modèles de souris H1N1 traitées avec IN-1. Plusieurs paramètres ont été évalués lors de ces essais. Premièrement, en évaluant la perte de poids (Figure 34A), les résultats ont démontré que les souris traitées ne perdent pas de poids par rapport aux souris contrôles, par conséquent, nous avons déduit que IN-1 a diminué la morbidité chez les souris traitées. Deuxièmement, au 3^{ème} jour après l'infection, le virus H1N1 atteint son niveau maximal de réplication avec un niveau élevé des titres viraux dans les essais cellulaires. Par

conséquent, nous avons étudié les titres viraux au bout du 3^{ème} jour et nous avons montré que IN-1 a entraîné une baisse importante des titres viraux (Figure 34B) et de l'expression de la polymérase virale des souris traitées (résultat non montré). Toutes ces études ont démontré que IN-1 a diminué la réplication du virus dans ce modèle murin. Ces résultats ont été en accord avec l'étude du groupe de Schughart, qui a également montré que l'utilisation d'inhibiteurs de protéases à sérine, comme AEBSF inhibant la matriptase et d'autres TTSPs (Béliveau *et al.*, 2009), ont bloqué la réplication virale chez les souris infectées avec le virus H1N1 (Bahgat *et al.*, 2011).

À l'aide de toutes ces informations, nous avons montré que le ciblage de la matriptase, une protéase exprimée dans l'épithélium pulmonaire de l'hôte, constitue une stratégie efficace pour contrôler le virus de l'influenza. Nous croyons fortement que ces inhibiteurs peptidomimétiques de la matriptase pourrait être utilisés comme de nouveaux agents anti-influenza administrés par inhalation afin d'exposer uniquement l'organe à traiter.

CONCLUSION

En conclusion, ces travaux ont conduit à l'identification d'une nouvelle classe d'inhibiteurs peptidomimétiques puissants et sélectifs de la matriptase. Nous avons démontré que le composé **1**, R-Q-A-R-Kbt (IN-1), basé sur la séquence d'auto-activation de la matriptase (R-Q-A-R⁶¹⁴↓V⁶¹⁵V-G-G) à laquelle a été ajouté un piège à sérine, est adapté pour l'optimisation d'inhibiteurs réversibles à forte liaison (*slow tight binding*) de la matriptase, avec une constante d'inhibition de 11 pM. La synthèse d'analogues dérivés de IN-1 modifiés aux positions P4-P1 a conduit à la découverte de plusieurs générations d'inhibiteurs très puissants de la matriptase avec des K_i inférieurs à 1 nM. Ces inhibiteurs affichent également un haut niveau de sélectivité pour la matriptase vs d'autres protéases à sérine, y compris plusieurs TTSPs.

Plusieurs études, incluant les nôtres, suggèrent que la matriptase est compétente pour cliver l'hémagglutinine du virus H1N1, une étape clé lors du cycle de vie du virus. Ces travaux confirment donc que la matriptase représente une cible pharmacologique potentielle pour le traitement de l'influenza. Nous avons montré que les inhibiteurs de la matriptase sont très efficaces pour bloquer la réplication des virus grippaux de type A incluant les virus H1N1 et H3N2 dans les cellules épithéliales respiratoires humaines Calu-3. Les composés **51** ((H)R-Q-F-R-Kbt), **66** ((H)R-E-F-R-Kbt), **69** ((CH₃CO)Q-F-R-Kbt) et **70** ((CH₃SO₂)Q-F-R-Kbt) ont été identifiés comme étant les plus puissants à inhiber la réplication des deux virus. Nous avons également montré que la stabilité protéolytique des composés est un facteur important pour conférer une efficacité antivirale à ces composés. De plus, l'évaluation *in vivo* de IN-1 a démontré que lorsque ce dernier est administré par voie intranasale dans un modèle murin d'infection par le virus H1N1, il permet de diminuer considérablement la réplication virale et la morbidité. L'ensemble de ces travaux indique que le développement d'inhibiteurs de la matriptase constitue une nouvelle approche dans le traitement de l'influenza. Cette classe d'inhibiteur possède un grand potentiel thérapeutique et des études précliniques plus approfondies sont en cours pour conduire éventuellement à un développement clinique pour le traitement de l'influenza.

Ces nouveaux inhibiteurs constituent également des outils pharmacologiques intéressants pour mieux comprendre le rôle de la matriptase dans d'autres maladies comme les cancers épithéliaux. En effet, en collaboration avec le groupe de List, nous avons récemment montré que l'inhibition de l'activité catalytique de la matriptase avec IN-1 dans des lignées cellulaires de cancer du sein est efficace pour réduire l'activation de la voie de signalisation pro-HGF/c-Met, impliquée dans le développement du cancer du sein (Zoratti *et al.*, 2015). Ainsi, cette étude démontre également la pertinence des inhibiteurs de la matriptase dans le traitement du cancer du sein.

Outre l'affinité pour la matriptase, nous avons également identifié le composé **34** (D)R-Q-A-R-Kbt comme un nouvel inhibiteur de la matriptase-2. Des efforts sont en cours pour optimiser la sélectivité pour la matriptase-2 par rapport à la matriptase. Ces inhibiteurs seraient utilisés pour mieux caractériser le rôle de la matriptase-2, dans la régulation du métabolisme du fer et la valider comme une cible thérapeutique potentielle pour les maladies associées à une surcharge en fer, telles que l'hémochromatose ou la β -thalassémie.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, c'est avec beaucoup d'émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet multidisciplinaire.

Tout d'abord j'exprime mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse Pr Éric Marsault et Pr. Richard Leduc, de m'avoir confié ce projet de doctorat et de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. Votre aide précieuse, vos conseils bien avisés, vos remarques constructives, votre encadrement, votre disponibilité et votre patience ont contribué à mon enrichissement scientifique.

Je veux exprimer ma reconnaissance envers mes collègues du laboratoire du Pr Éric Marsault qui ont amplement participé à l'élaboration de ce projet, plus particulièrement Pierre-Luc, Pallavi, Catherine, Félix, Baptiste, Dominic, ainsi que mon stagiaire Étienne Cuierrier. J'ai eu l'opportunité de travailler au sein d'une équipe dynamique, motivée et solidaire. Je remercie également tous les autres membres du laboratoire que j'ai eu plaisir à côtoyer ou avec qui j'ai partagé de bons moments.

Je remercie vivement les membres du laboratoire du Pr Richard Leduc, Antoine, François, Xavier, Élie, Philippe, Brian, Amel et Sandrine. J'accorde une mention spéciale à mon collègue Antoine pour son implication dans ce projet, sa disponibilité, ses suggestions, nos multiples discussions, et son soutien sans faille.

Un grand Merci à l'équipe du Pr Martin Richter, Isabelle, Émilie, Dominic, Olivier, Alexandre Beaulieu et Alexandre Cloutier pour leurs importantes contributions, leurs disponibilités et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et discuter.

Un grand Merci à nos collaborateurs, Pr Martin Richter, Pr Rafael Najmanovich, l'Institut Néomed, Intellisyn, Piramal et Paraza Pharma.

Je tiens à témoigner ma gratitude aux membres du jury, Pr Donald Poirier du Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval, Pr Martin Bisailon du département de biochimie ainsi que Pr Michel Grandbois du département de pharmacologie-physiologie de l'Université de Sherbrooke, pour avoir accepté de réviser ma thèse.

Je remercie tous les membres du département de pharmacologie-physiologie que j'ai eu le plaisir de cotoyer de près ou de loin.

Je remercie les Instituts de Recherche en Santé Canada (IRSC) et Néomed pour leur support financier, ainsi que PROTÉO et Mitacs pour les bourses d'études. Merci au conseil général de la région Guadeloupe (Marie-Yveline Theobald Ponchateau) pour la bourse de prêt d'études.

Je veux aussi remercier tous mes amis Français (Johanna, Marine, Fabien...) et Québécois (Mylène, Philippe, David, Alex...) pour leurs encouragements. Constance d'avoir toujours su m'écouter, me motiver et de m'avoir soutenu durant la période de rédaction.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements aux familles Colombo, Echevin et Ficadière, particulièrement à Énide, Michel, Sahel et Josette d'avoir été présents aussi bien dans les mauvais que les bons moments, d'avoir cru en moi, de m'avoir toujours soutenu, encouragé et écouté tout au long de ma thèse.

BIBLIOGRAPHIE

- A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. (1980). *Bulletin of the World Health Organization*, 58(4), 585–91.
- Adams, J., & Kauffman, M. (2004). Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Investigation*, 22(2), 304–11.
- Ahmed, S., Jin, X., Yagi, M., Yasuda, C., Sato, Y., Higashi, S., Lin, C.Y., & Miyazaki, K. (2006). Identification of membrane-bound serine proteinase matriptase as processing enzyme of insulin-like growth factor binding protein-related protein-1 (IGFBP-rP1/angiomodulin/mac25). *The Federation of European Biochemical Journal Societies*, 273(3), 615–27.
- Ascenzi, P., Amiconi, G., Menegatti, E., Guarneri, M., Bolognesi, M., & Schnebli, H.P. (1988). Binding of the Recombinant Proteinase Inhibitor Eglin C from Leech *Hirudo Medicinalis* to Human Leukocyte Elastase, Bovine α -Chymotrypsin and Subtilisin Carlsberg: Thermodynamic Study. *Journal of Enzyme Inhibition*, 2(3), 167–72.
- Avrutina, O., Fittler, H., Glotzbach, B., Kolmar, H., & Empting, M. (2012). Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redox-stable SFTI-1 variants at near physiological pH. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(38), 7753–62.
- Aydın, B. K., Baş, F., Tamay, Z., Kılıç, G., Süleyman, A., Bundak, R., Saka, N., Özkaya, E., Güler, N., & Darendeliler, F. (2014). Netherton syndrome associated with growth hormone deficiency. *Pediatric dermatology*, 31(1), 90–94.
- Bachovchin, D.A., & Cravatt, B. F. (2012). The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 52–68.
- Baici, A., & Seemuller, U. (1984). Kinetics of the inhibition of human leucocyte elastase by eglin from the leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemical Journal*, 218, 819–33.
- Bahgat, M. M., Błazejewska, P., & Schughart, K. (2011). Inhibition of lung serine proteases in mice: a potentially new approach to control influenza infection. *Virology Journal*, 8: 27.
- Baricos, W. H., Cortez, S. L., El-Dahr, S. S., & Schnaper, H. W. (1995). ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney International*, 47(4), 1039–47.
- Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., & Stavropoulos, G. (1991). 2-Chlorotriyl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37(6), 513–20.

- Baron, J., Tarnow, C., Mayoli-Nüssle, D., Schilling, E., Meyer, D., Hammami, M., Schwalm, F., Steinmetzer, T., Guan, Y., Garten, W., Klenk, H.D., & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2013). Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *Journal of Virology*, 87(3), 1811–20.
- Barre, O., Dufour, A., Eckhard, U., Kappelhoff, R., Beliveau, F., Leduc, R., & Overall, C. M. (2014). Cleavage Specificity Analysis of Six Type II Transmembrane Serine Proteases (TTSPs) Using PICS with Proteome-Derived Peptide Libraries. *PloS ONE*, 9(9), e105984.
- Basel-Vanagaite, L., Attia, R., Ishida-Yamamoto, A., Rainshtein, L., Ben Amitai, D., Lurie, R., Pasmanik-Chor, M., Indelman, M., Zvulunov, A., Saban, S., Nagal, N., Sprecher, E., & Shohat, M. (2007). Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis caused by a mutation in ST14, encoding type II transmembrane serine protease matriptase. *American Journal of Human Genetics*, 80(3), 467–77.
- Beaulieu, A., Gravel, É., Cloutier, A., Marois, I., Colombo, É., Désilets, A., Verreault, C., Leduc, R., Marsault, E., & Richter, M.V. (2013). Matriptase Proteolytically Activates Influenza Virus and Promotes Multicycle Replication in the Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*, 87, 4237–51.
- Beckmann, G., & Bork, P. (1993). An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(2), 40–1.
- Béliveau, F. (2012). Spécificité enzymatique et régulation fonctionnelle de la matriptase-2, une protéase à sérine transmembranaire de type II essentielle à l'homéostasie du fer (Thèse (de doctorat)-Université de Sherbrooke).
- Béliveau, F., Désilets, A., & Leduc, R. (2009). Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *The Federation of European Biochemical Journal Societies*, 276(8), 2213–26.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–42.
- Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Kühl, A., & Pöhlmann, S. (2010). Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Reviews in Medical Virology*, 20(5), 298–310.
- Bieth, J. G. (1995). Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. *Methods in Enzymology*, 248, 59–84.
- Bork, P., & Patthy, L. (1995). The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 4(7), 1421–25.

- Bosch, F. X., Garten, W., Klenk, H. D., & Rott, R. (1981). Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology*, 113(2), 725–35.
- Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26 Suppl 4, D49–53.
- Brummel, K. E., Paradis, S. G., Butenas, S., & Mann, K. G. (2002). Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 100(1), 148–52.
- Bugge, T. H., Antalis, T. M., & Wu, Q. (2009). Type II transmembrane serine proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23177–81.
- Bugge, T. H., List, K., & Szabo, R. (2007). Proteases and Tissue Remodeling Unit, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD. *BioScience*, 15, 5060–70.
- Burch, J., Paulden, M., Conti, S., Stock, C., Corbett, M., Welton, N. J., Ades, A.E., Sutton, A., Cooper, N., Elliot, A.J., Nicholson, K., Duffy, S., McKenna, C., Stewart, L., Westwood, M., & Palmer, S. (2009). Antiviral drugs for the treatment of influenza: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 13(58), 1–265, iii–iv.
- Buzza, M. S., Martin, E. W., Driesbaugh, K. H., Désilets, A., Leduc, R., & Antalis, T. M. (2013). Prostatin is required for matriptase activation in intestinal epithelial cells to regulate closure of the paracellular pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10328–37.
- Cadigan, K. M., & Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development*, 11(24), 3286–3305.
- Chatterjee, J., Gilon, C., Hoffman, A., & Kessler, H. (2008). N-Methylation of peptides: A new perspective in medicinal chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 41(10), 1331–42.
- Chen, Y.-W., Wang, J.-K., Chou, F.-P., Chen, C.-Y., Rorke, E. A., Chen, L.-M., Chai, K.X., Eckert, R.L., Johnson, M.D., & Lin, C.-Y. (2010). Regulation of the matriptase-prostatin cell surface proteolytic cascade by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 during epidermal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31755–62.
- Choi, S. Y., Bertram, S., Glowacka, I., Park, Y. W., & Pohlmann, S. (2009). Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends in Molecular Medicine*, 15(7), 303–12.
- Choi, S. Y., Shin, H. C., Kim, S. Y., & Park, Y. W. (2008). Role of TMPRSS4 during cancer progression. *Drug News & Perspectives*, 21(8), 417–23.

- Colombo, E., Désilets, A., Duchêne, D., Chagnon, F., Najmanovich, R., Leduc, R., & Marsault, E. (2012). Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Matriptase. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(7), 530-34.
- Copeland, R. A., Harpel, M. R., & Tummino, P. J. (2007). Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(7), 967–78.
- Costanzo, M. J., Almond Jr, H. R., Hecker, L. R., Schott, M. R., Yabut, S. C., Zhang, H. C., Andrade-Gordon, P., Corcoran, T.W., Giardino, E.C., Kauffman, J.A., Lewis, J.M., de Garavilla, L., Haertlein, B.J., & Maryanoff, B. E. (2005). In-depth study of tripeptide-based alpha-ketoheterocycles as inhibitors of thrombin. Effective utilization of the S1' subsite and its implications to structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(6), 1984–2008.
- De Clercq, E. (2006). Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(12), 1015–25.
- Denda, K., Shimomura, T., Kawaguchi, T., Miyazawa, K., & Kitamura, N. (2002). Functional characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14053–59.
- Desilets, A., Beliveau, F., Vandal, G., McDuff, F. O., Lavigne, P., & Leduc, R. (2008). Mutation G827R in matriptase causing autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis yields an inactive protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10535–42.
- Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, A.M., & Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 412(6849), 822–26.
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 61(5), 510–15.
- Dimitrov, D. S., & Marks, J. D. (2009). Therapeutic antibodies: current state and future trends--is a paradigm change coming soon? *Methods in Molecular Biology*, 525, 1–27, xiii.
- Donaldson, S. H., Hirsh, A., Li, D. C., Holloway, G., Chao, J., Boucher, R. C., & Gabriel, S. E. (2002). Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8338–45.
- Drag, M., & Salvesen, G. S. (2010). Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(9), 690–701.
- Duchene, D., Colombo, E., Desilets, A., Boudreault, P.-L., Leduc, R., Marsault, E., & Najmanovich, R. (2014). Analysis of sub-pocket selectivity and identification of potent selective inhibitors for matriptase and matriptase-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), 10198–204.

- Eder, J., Sedrani, R., & Wiesmann, C. (2014). The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(8), 577–87.
- Edwards, P.D., Wolanin, D.J., Andisik, D.W., & Davis, M. (1995). Peptidyl α -Ketoheterocyclic Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. Effect of Varying the Heterocyclic Ring on in Vitro Potency. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(1), 76-85.
- Edwards, P.D., Meyer Jr, E.F., Vijayalakshmi, J., Tuthill, P.A., Andisik, D.A., Gomes, B., & Strimpler, A. (1992). Design, synthesis, and kinetic evaluation of unique class of elastase inhibitors, the peptidylapla.-ketobenzoxazole, and the x-ray crystal structure of the covalent complex between porcine pancreatic elastase and Ac-Ala-Pro-Val-2-benzoxazole. *Journal of American Chemical Society*, 114(5), 1854-63.
- Elbracht, M., Senderek, J., Eggermann, T., Thürmer, C., Park, J., Westhofen, M., & Zerres, K. (2007). Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel TMPRSS3 mutations in German siblings. *Journal of Medical Genetics*, 44(6), e81.
- Elias, P. M., & Menon, G. K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in Lipid Research*, 24, 1–26.
- Enyedy, I. J., Lee, S. L., Kuo, A. H., Dickson, R. B., Lin, C. Y., & Wang, S. (2001). Structure-based approach for the discovery of bis-benzamidines as novel inhibitors of matriptase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(9), 1349–55.
- Fernandes, C.A., & Vanbever, R. (2009). Preclinical models for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(11), 1231–45.
- Finberg, K. E., Heaney, M. M., Campagna, D. R., Aydinok, Y., Pearson, H. A., Hartman, K. R., Mayo, M.M., Samuel, S.M., Strousse, J.J., Markianos, K., Andrews, N.C., & Fleming, M. D. (2008). Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature Genetics*, 40(5), 569–71.
- Fittler, H., Avrutina, O., Empting, M., & Kolmar, H. (2014). Potent inhibitors of human matriptase-1 based on the scaffold of sunflower trypsin inhibitor. *Journal of Peptide Science*, 20(6), 415–20.
- Flores, M.V., Strawbridge, J., Guiseppe, C., & Corbau, R. (2009). HCV-NS3 inhibitors: determination of their kinetic parameters and mechanism. *Biochimica Biophysica Acta*, 1794(10), 1441-48.
- Folgueras, A. R., de Lara, F. M., Pendas, A. M., Garabaya, C., Rodriguez, F., Astudillo, A., Bernal, T., Cabanillas, R., López-Otín, C., & Velasco, G. (2008). Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*, 112(6), 2539–45.

- Fortugno, P., Bresciani, A., Paolini, C., Pazzagli, C., El Hachem, M., D'Alessio, M., & Zambruno, G. (2011). Proteolytic activation cascade of the Netherton syndrome-defective protein, LEKTI, in the epidermis: implications for skin homeostasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(11), 2223–32.
- Friedrich, R., Fuentes-Prior, P., Ong, E., Coombs, G., Hunter, M., Oehler, R., Pierson, D., Gonzalez, R., Huber, R., Bode, W., & Madison, E. L. (2002). Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2160–68.
- Fukuyama, T., Jow, C.-K., & Cheung, M. (1995). 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines. *Tetrahedron Letters*, 36(36), 6373–74.
- Galkin, A. V., Mullen, L., Fox, W. D., Brown, J., Duncan, D., Moreno, O., Madison, E.L., & Agus, D. B. (2004). CVS-3983, a selective matriptase inhibitor, suppresses the growth of androgen independent prostate tumor xenografts. *Prostate*, 61(3), 228–35.
- Gallwitz, M., Enoksson, M., Thorpe, M., & Hellman, L. (2012). The extended cleavage specificity of human thrombin. *PLoS ONE*, 7(2), e31756.
- Gasteiger, J., & Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22), 3219–28.
- Goodwin, D., Simerska, P., & Toth, I. (2012). Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(26), 4451–61.
- Guipponi, M., Tan, J., Cannon, P. Z. F., Donley, L., Crewther, P., Clarke, M., Wu, Q., Shepherd, R.K., & Scott, H. S. (2007). Mice deficient for the type II transmembrane serine protease, TMPRSS1/hepsin, exhibit profound hearing loss. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 608–16.
- Guo, S., Casu, C., Gardenghi, S., Booten, S., Aghajan, M., Peralta, R., Watt, A., Freier, S., Monia, B.P., & Rivella, S. (2013). Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(4), 1531–41.
- Hashimoto, T., Kato, M., Shimomura, T., & Kitamura, N. (2010). TMPRSS13, a type II transmembrane serine protease, is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 and activates pro-hepatocyte growth factor. *The Federation of European Biochemical Journal Societies*, 277(23), 4888–900.
- Hatesuer, B., Bertram, S., Mehnert, N., Bahgat, M. M., Nelson, P. S., Pöhlman, S., & Schughart, K. (2013). Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003774.

- He, Y., Wortmann, A., Burke, L. J., Reid, J. C., Adams, M. N., Abdul-Jabbar, I., Quigley, J.P., Kirchhofer, D., & Hooper, J. D. (2010). Proteolysis-induced N-terminal ectodomain shedding of the integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by tyrosine phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26162–73.
- Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–24.
- Heinz, D.W., Hyberts, S.G., Peng, J.W., Priestle, J.P., Wagner, G., & Grutter, M.G. (1992) Changing the inhibitory specificity and function of the proteinase inhibitor eglin c by site-directed mutagenesis: functional and structural investigation. *Biochemistry*, 31, 8755–66.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., & Than, M. E. (2005). Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation of their specificity. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), 211–27.
- Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P., & Antalis, T. M. (2001). Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 857–60.
- Jiang, J., Wu, S., Wang, W., Chen, S., Peng, J., Zhang, X., & Wu, Q. (2011). Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10066–72.
- Jiang, S., Li, P., Lee, S. L., Cheng, Y. L., Long, Y. Q., Johnson, M. D., Dickson R.B., & Roller, P. P. (2007). Design and synthesis of redox stable analogues of sunflower trypsin inhibitors (SFTI-1) on solid support, potent inhibitors of matriptase. *Organic Letters*, 9(1), 9–12.
- Jin, J.-S., Hsieh, D.-S., Loh, S.-H., Chen, A., Yao, C.-W., & Yen, C.-Y. (2006). Increasing expression of serine protease matriptase in ovarian tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Modern Pathology*, 19(3), 447–52.
- Karlsson Hedestam, G. B., Fouchier, R. A. M., Phogat, S., Burton, D. R., Sodroski, J., & Wyatt, R. T. (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 143–55.
- Kim, D., Wang, L., Beconi, M., Eiermann, G. J., Fisher, M. H., He, H., Hickey, G.J., Kowalchik, J.E., Leiting, B., Lyons, K., Marsilio, F., McCann, M., Patel, R.A., Petrov, A., Scapin, G., Patel, S.B., Sinha Roy, R., Wu, J.K., Wyvratt, M.J., Zhang, B.B., Zhu, L., Thornberry, N.A., & Weber, A. E. (2005). (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(1), 141–51.

- Kim, S. (1993). Improved methods for the Preparation of guanidines. *Tetrahedron Letters*, 34(48), 7677–80.
- Klenk, H.-D., Rott, R., Orlich, M., & Blödorn, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, 68(2), 426–39.
- Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R. L., Matusik, R. J., & Vasioukhin, V. (2004). Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Cell*, 6(2), 185–95.
- Komiyama, T., & Fuller, R.S. Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry*, 39, 15156-65.
- Lax, R. (2010). The Future of Peptide Development in the Pharmaceutical Industry. *PharManufacturing: The International Peptide Review*, 10–15.
- LeBeau, A. M., Lee, M., Murphy, S. T., Hann, B. C., Warren, R. S., Delos Santos, R., Kurhanewicz, J., Hanash, S.M., VanBrocklin, H.F., & Craik, C. S. (2013). Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 93–8.
- Lee, M.-S., Kiyomiya, K., Benaud, C., Dickson, R. B., & Lin, C.-Y. (2005). Simultaneous activation and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1-mediated inhibition of matriptase induced at activation foci in human mammary epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(4), C932–41.
- Lee, S. L., Dickson, R. B., & Lin, C. Y. (2000). Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36720–5.
- Li, P., Jiang, S., Lee, S. L., Cheng, Y. L., Johnson, M. D., Dickson, R. B., Michejda, C.J., & Roller, P. P. (2007). Design and synthesis of novel and potent inhibitors of the type II transmembrane serine protease, matriptase, based upon the sunflower trypsin inhibitor-1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(24), 5976–83.
- Li, X., Du, X., Li, J., Gao, Y., Pan, Y., Shi, J., Zhou, N., & Xu, B. (2012). Introducing D-amino acid or simple glycoside into small peptides to enable supramolecular hydrogelators to resist proteolysis. *Langmuir*, 28(37), 13512–17.
- Lin, B., Ferguson, C., White, J. T., Wang, S., Vessella, R., True, L. D., Hood, L.D., & Nelson, P. S. (1999). Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Research*, 59(17), 4180–84.
- Lin, C. Y., Wang, J. K., Torri, J., Dou, L., Sang, Q. A., & Dickson, R. B. (1997). Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from

- human breast cancer cells. Monoclonal antibody production, isolation, and localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(14), 9147–52.
- List, K. (2009). Matriptase: a culprit in cancer? *Future Oncology*, 5(1), 97–104.
- List, K., Bugge, T. H., & Szabo, R. (2006). Matriptase: Potent Proteolysis on the Cell Surface. *Molecular Medicine*, 12(1-3), 1–7.
- List, K., Currie, B., Scharschmidt, T. C., Szabo, R., Shireman, J., Molinolo, A., Cravatt, B.F., & Bugge, T. H. (2007). Autosomal ichthyosis with hypotrichosis syndrome displays low matriptase proteolytic activity and is phenocopied in ST14 hypomorphic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36714–23.
- List, K., Haudenschild, C. C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S. M., Swaim, W., Engelholm, L.H., Behrendt, N., & Bugge, T. H. (2002). Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene*, 21(23), 3765–79.
- List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Sriuranpong, V., Redeye, V., Murdock, T., Burke, B., Nielson, B.S., Gutkind, J.D., & Bugge, T. H. (2005). Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. *Genes and Development*, 19(16), 1934–50.
- List, K., Szabo, R., Wertz, P. W., Segre, J., Haudenschild, C. C., Kim, S.-Y., & Bugge, T. H. (2003). Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *The Journal of Cell Biology*, 163(4), 901–10.
- Long, Y. Q., Lee, S. L., Lin, C. Y., Enyedy, I. J., Wang, S., Li, P., Dickson, R.B., & Roller, P. P. (2001). Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(18), 2515–19.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914–18.
- Mah, R., Thomas, J.R., & Shafer, C.M. (2014). Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 33–39.
- Mars, W. M., Liu, M. L., Kitson, R. P., Goldfarb, R. H., Gabauer, M. K., & Michalopoulos, G. K. (1995). Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology*, 21(6), 1695–701.
- Maya Hammami. (2012). Development of new inhibitors for the type II transmembrane serine protease matriptase (Thèse (de doctorat)-Philipps-Universität Marburg).

- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides*, 85(1), 9–24.
- Miller, G. S., & List, K. (2012). The matriptase-prostasin proteolytic cascade in epithelial development and pathology. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 245–53.
- Milner, J. M., Patel, A., Davidson, R. K., Swingler, T. E., Desilets, A., Young, D. A., Kelso, E.B., Donell, S.T., Cawston, T.E., Clark, I.M., Ferrell, W.R., Plevin R., Lockhart, J.C., Leduc, R., & Rowan, A. D. (2010). Matriptase is a novel initiator of cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(7), 1955–1966.
- Min, J.-Y., & Subbarao, K. (2010). Cellular targets for influenza drugs. *Nature Biotechnology*, 28(3), 239–40.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., & Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10024–28.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., & Kitamura, N. (1996). Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3615–18.
- Nahm, S., & Weinreb, S. M. (1981). N-Methoxy-N-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters*, 22(39), 3815–18.
- Nemeth, E., & Ganz, T. (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual Review of Nutrition*, 26, 323–42.
- Netzel-Arnett, S., Buzza, M. S., Shea-Donohue, T., Desilets, A., Leduc, R., Fasano, A., Bugge, T.H., Antalis, T. M. (2011). Matriptase protects against experimental colitis and promotes intestinal barrier recovery. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(7), 1303-14.
- Netzel-Arnett, S., Currie, B. M., Szabo, R., Lin, C. Y., Chen, L. M., Chai, K. X., Antalis, T.M., Bugge, T.H., & List, K. (2006). Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 32941–45.
- Nichol, K. L., & Treanor, J. J. (2006). Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *The Journal of Infectious Diseases*, 194 Suppl, S111–18.
- Njoroge, F. G., Chen, K. X., Shih, N.-Y., & Piwinski, J. J. (2008). Challenges in modern drug discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 50–59.

- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3, 33.
- Oberst, M. D., Chen, L. Y., Kiyomiya, K., Williams, C. A., Lee, M. S., Johnson, M. D., Dickson, R.B., & Lin, C. Y. (2005). HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289(2), C462–70.
- Oberst, M. D., Singh, B., Ozdemirli, M., Dickson, R. B., Johnson, M. D., & Lin, C. Y. (2003). Characterization of matriptase expression in normal human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 51(8), 1017–25.
- Okumura, Y., Takahashi, E., Yano, M., Ohuchi, M., Daidoji, T., Nakaya, T., Böttcher, E., Garten, W., Klenk, H.D., & Kido, H. (2010). Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *Journal of Virology*, 84(10), 5089–96.
- Organ, S. L., & Tsao, M.-S. (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3, S7–S19.
- Orwig, K. S., Lassetter, M. R., Hadden, M. K., & Dix, T. A. (2009). Stability but Not Binding Affinity with in Vivo Efficacy. *Peptides*, 1803–13.
- Perdue, M. L., García, M., Senne, D., & Fraire, M. (1997). Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Research*, 49(2), 173–86.
- Pernot, M., Vanderesse, R., Frochot, C., Guillemin, F., & Barberi-Heyob, M. (2011). Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(7), 793–802.
- Perzborn, E., Roehrig, S., Straub, A., Kubitza, D., Mueck, W., & Laux, V. (2010). Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(3), 376–81.
- Peterlin-Mašič, L., & Kikelj, D. (2001). Arginine mimetics. *Tetrahedron*, 57(33), 7073–7105.
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19-20), 2161–72.
- Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M., & López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 544–58.

- Qiu, D., Owen, K., Gray, K., Bass, R., & Ellis, V. (2007). Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 3), 583–87.
- Quimbar, P., Malik, U., Sommerhoff, C. P., Kaas, Q., Chan, L. Y., Huang, Y. H., Grundhuber, M., Dunse, K., Craik, D.J., Anderson, M.A., & Daly, N. L. (2013). High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13885–896.
- Ramsay, A. J., Hooper, J. D., Folgueras, A. R., Velasco, G., & López-Otín, C. (2009). Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica*, 94(6), 840–49.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 34, D270–72.
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42, D503–09.
- Riddick, A. C. P., Shukla, C. J., Pennington, C. J., Bass, R., Nuttall, R. K., Hogan, A., Sethia, K.K., Ellis, V., Collins, A.T., Maitland, N.J., Ball, R.Y., & Edwards, D. R. (2005). Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *British Journal of Cancer*, 92(12), 2171–80.
- Roebroek, A. J., Umans, L., Pauli, I. G., Robertson, E. J., van Leuven, F., Van de Ven, W. J., & Constam, D. B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proproteolytic convertase Furin. *Development*, 125(24), 4863–76.
- Rosenblum, J. S., & Kozarich, J. W. (2003). Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(4), 496–504.
- Sales, K. U., Masedunskas, A., Bey, A. L., Rasmussen, A. L., Weigert, R., List, K., Szabo, R., Overbeek, P.A., & Bugge, T. H. (2010). Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. *Nature Genetics*, 42(8), 676–83.
- Sanderson P.E.J. (1999). Small, noncovalent serine protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 19(2), 179-97.
- Sedghizadeh, P. P., Mallery, S. R., Thompson, S. J., Kresty, L., Beck, F. M., Parkinson, E. K., Biancamano, J., & Lang, J. C. (2006). Expression of the serine protease DESC1 correlates directly with normal keratinocyte differentiation and inversely with head and neck squamous cell carcinoma progression. *Head Neck*, 28(5), 432–40.
- Shariff, L., Zhu, Y., Cowper, B., Di, W.-L., & Macmillan, D. (2014). Sunflower trypsin inhibitor (SFTI-1) analogues of synthetic and biological origin via N→S acyl transfer: potential inhibitors of human Kallikrein-5 (KLK5). *Tetrahedron*, 70(42), 7675–80.

- Sheu, T. G., Fry, A. M., Garten, R. J., Deyde, V. M., Shwe, T., Bullion, L., Peebles, P.J., Li, Y., Klimov, A.I., & Gubareva, L. V. (2011). Dual resistance to adamantanes and oseltamivir among seasonal influenza A(H1N1) viruses: 2008-2010. *Journal of Infectious Diseases*, 203(1), 13–17.
- Shi, X., Gangadharan, B., Brass, L. F., Ruf, W., & Mueller, B. M. (2004). Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Molecular Cancer Research*, 2(7), 395–402.
- Shi, Y. E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M. E., & Dickson, R. B. (1993). Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Research*, 53(6), 1409–15.
- Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kayaga, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., & Kitamura, N. (1997). Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6370–76.
- Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., & Kitamura, N. (1995). Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator. *European Journal of Biochemistry*, 229(1), 257–61.
- Shirasaki, Y., Nakamura, M., Yamaguchi, M., Miyashita, H., Sakai, O., & Inoue, J. (2006). Exploration of orally available calpain inhibitors 2: peptidyl hemiacetal derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(13), 3926–32.
- Shirk, R. A., & Vlasuk, G. P. (2007). Inhibitors of Factor VIIa/tissue factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(9), 1895–900.
- Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A., & Whitty, A. (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 307-17.
- Sisay, M. T., Steinmetzer, T., Stirnberg, M., Maurer, E., Hammami, M., Bajorath, J., & Gütschow, M. (2010). Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(15), 5523–35.
- Smith, C. G., & Vane, J. R. (2003). The discovery of captopril. *The federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(8), 788–9.
- Sousa da Silva, A. W., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes*, 5(1), 367.

- Steinmetzer, T., Dönnecke, D., Korsonewski, M., Neuwirth, C., Steinmetzer, P., Schulze, A., Saupe, S.M., & Schweinitz, A. (2009). Modification of the N-terminal sulfonyl residue in 3-amidinophenylalanine-based matriptase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(1), 67–73.
- Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., Steinmetzer, P., Müller, F., Friedrich, R., Than, M.E., Bode, W., & Stürzebecher, J. (2006). Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(14), 4116–26.
- Stoop, A. A., & Craik, C. S. (2003). Engineering of a macromolecular scaffold to develop specific protease inhibitors. *Nature Biotechnology*, 21(9), 1063–68.
- Stürzebecher, J., Vieweg, H., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stubbs, M. T., Renatus, M., & Wikström, P. (1999). 3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(21), 3147–52.
- Swedberg, J. E., Nigon, L. V., Reid, J. C., de Veer, S. J., Walpole, C. M., Stephens, C. R., Walsh, T.P., Takayama, T.K., Hooper, J.D., Clements, J.A., Buckle, A.M., & Harris, J. M. (2009). Substrate-Guided Design of a Potent and Selective Kallikrein-Related Peptidase Inhibitor for Kallikrein 4. *Chemistry and Biology*, 16(6), 633–43.
- Szabo, R., & Bugge, T. H. (2008). Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6-7), 1297–1316.
- Szabo, R., & Bugge, T. H. (2011). Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 213–35.
- Szabo, R., Hobson, J. P., List, K., Molinolo, A., Lin, C.-Y., & Bugge, T. H. (2008). Potent inhibition and global co-localization implicate the transmembrane Kunitz-type serine protease inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 in the regulation of epithelial matriptase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29495–504.
- Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M., & Bugge, T. H. (2003). Type II transmembrane serine proteases. *Thrombosis and Haemostasis*, 90(2), 185–93.
- Takeuchi, T., Harris, J. L., Huang, W., Yan, K. W., Coughlin, S. R., & Craik, C. S. (2000). Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26333–42.
- Tanimoto, H., Yan, Y., Clarke, J., Korourian, S., Shigemasa, K., Parmley, T. H., Parham, G.P., & O'Brien, T. J. (1997). Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer. *Cancer Research*, 57(14), 2884–7.

- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2010). Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Reports*, 125 Suppl , 16–26.
- Tian, S. (2009). A 20 Residues Motif Delineates the Furin Cleavage Site and its Physical Properties May Influence Viral Fusion. *Biochemistry Insights*, 2, 9–20.
- Traube, T., Shokhen, M., & Albeck, A. (2014). A new method for filtering of reactive “warheads” of transition-state analog protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, 134–8.
- Tseng, I.-C., Chou, F.-P., Su, S.-F., Oberst, M., Madayiputhiya, N., Lee, M.-S., Wang, J.K., Sloane, D.E., Johnson, M., & Lin, C.-Y. (2008). Purification from human milk of matriptase complexes with secreted serpins: mechanism for inhibition of matriptase other than HAI-1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(2), C423–31.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(9), 785–99.
- Uhland, K. (2006). Matriptase and its putative role in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(24), 2968–78.
- Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Oppici, C. A., Heiligers, D., Hills, D., Calvo, X.R., & Verhaert, P. (2014). The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*, 4, 1–12.
- Ustach, C. V, Huang, W., Conley-LaComb, M. K., Lin, C.-Y., Che, M., Abrams, J., & Kim, H.-R. C. (2010). A novel signaling axis of matriptase/PDGF-D/ β -PDGFR in human prostate cancer. *Cancer Research*, 70(23), 9631–40.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–18.
- Velasco, G., Cal, S., Quesada, V., Sánchez, L. M., & López-Otín, C. (2002). Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37637–46.

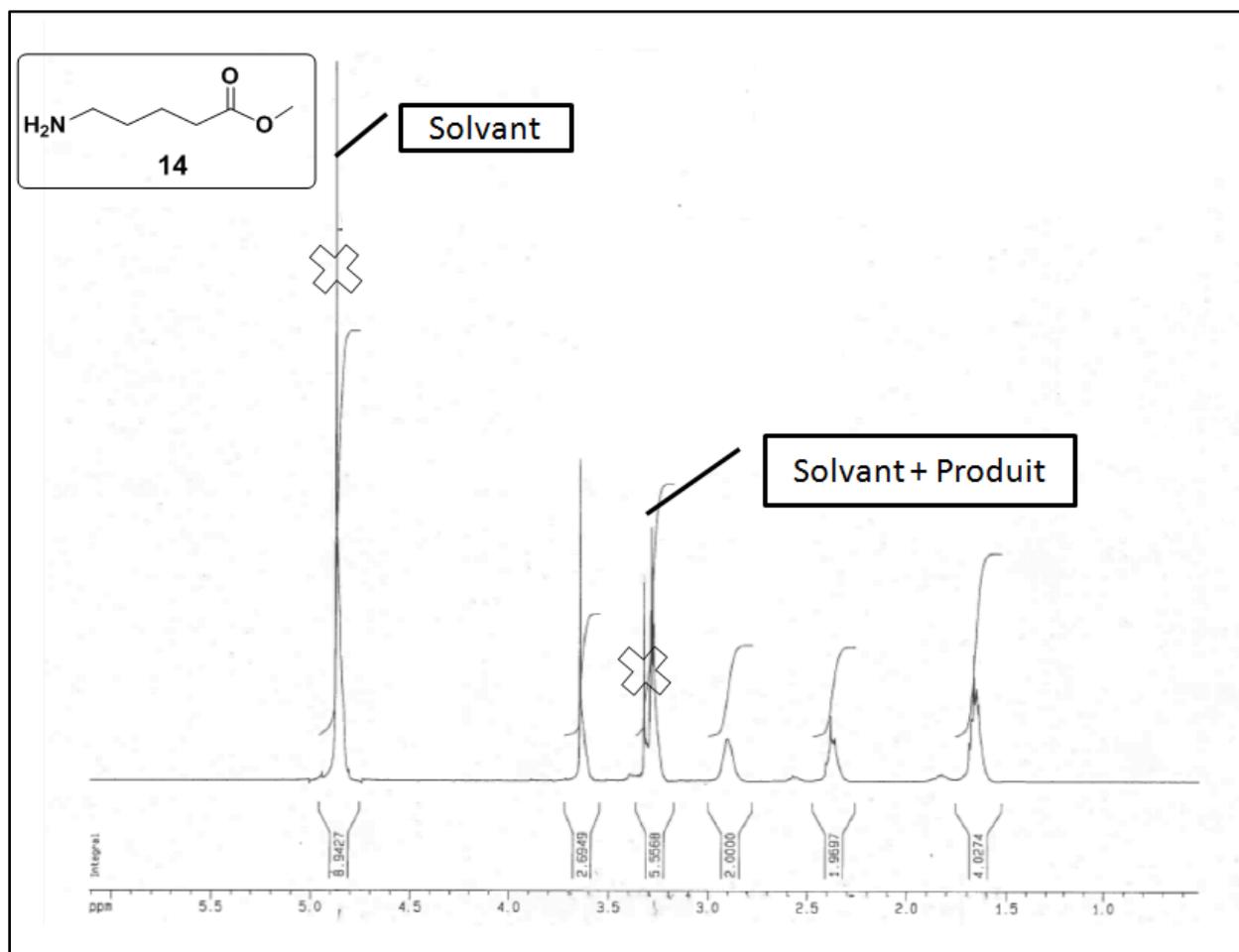
- Venkatraman, S., Bogen, S. L., Arasappan, A., Bennett, F., Chen, K., Jao, E., Liu, R., Butkiewicz, N., Chase, R., Hart, A., Agrawal, S., Ingravallo, P., Pichardo, J., Kong, R., Baroudy, B., Malcom, B., Guo, Z., Prongay, A., Madison, V., Broske, L., Ciu, X., Cheng, K.C., Hsieh, Y., Brisson, J.M., Prelusky, D., Korfmacher, W., White, R., Bogdanowich-Knipp, S., Palovsky A., Bradley, P., Saksena, A.K., Ganguly, A., Piwinski, J., Girijavallaban, V., & Njoroge, F. G. (2006). Discovery of (1R,5S)-N-[3-amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (SCH 503034), a selective, potent, orally bioavailable. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(20), 6074–86.
- Votta, B. J., Levy, M. A., Badger, A., Bradbeer, J., Dodds, R. A., James, I. E., Thompson, S., Bossard, M.J., Carr, T., Connor, J.R., Tomaszek, T.A., Szewczuk, L., Drake, F.H., Veber, D.F., & Gowen, M. (1997). Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(9), 1396–1406.
- Walker, B., & Lynas, J. F. (2001). Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Science*, 58, 596–624.
- Wallrapp, C., Hähnel, S., Müller-Pillasch, F., Burghardt, B., Iwamura, T., Ruthenbürger, M., Lerch, M.M., Alder, G., & Gress, T. M. (2000). A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 60(10), 2602–6.
- Wilson, S., Greer, B., Hooper, J., Zijlstra, A., Walker, B., Quigley, J., & Hawthorne, S. (2005). The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *The Biochemical Journal*, 388(Pt 3), 967–72.
- Woo, J.-T., Sigeizumi, S., Yamaguchi, K., Sugimoto, K., Kobori, T., Tsuji, T., & Kondo, K. (1995). Peptidyl aldehyde derivatives as potent and selective inhibitors of cathepsin L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5(14), 1501–1504.
- Wysocka, M., Gruba, N., Miecznikowska, a, Popow-Stellmaszyk, J., Gütschow, M., Stirnberg, M., Furtmann N., Bajorath, J., Lesner, A., & Rolka, K. (2014). Substrate specificity of human matriptase-2. *Biochimie*, 97, 121–7.
- Wysocka, M., Spichalska, B., Lesner, A., Jaros, M., Brzozowski, K., Łgowska, A., & Rolka, K. (2010). Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(15), 5504-9.
- Yan, W., Wu, F., Morser, J., & Wu, Q. (2000). Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8525–9.

- Yasuoka, S., Ohnishi, T., Kawano, S., Tsuchihashi, S., Ogawara, M., Masuda, K., Yamaoka, K., & Sano, T. (1997). Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 16(3), 300–8.
- Ying, W. (2008). NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), 179–206.
- Yuan, C., Chen, L., Meehan, E. J., Daly, N., Craik, D. J., Huang, M., & Ngo, J. C. (2011). Structure of catalytic domain of Matriptase in complex with Sunflower trypsin inhibitor-1. *BMC Structural Biology*, 11, 30.
- Zeng, L., Cao, J., & Zhang, X. (2005). Expression of serine protease SNC19/matriptase and its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in normal and malignant tissues of gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology*, 11(39), 6202–7.
- Zhao, B., Yuan, C., Li, R., Qu, D., Huang, M., & Ngo, J. C. K. (2013). Crystal structures of matriptase in complex with its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11155–64.
- Zmora, P., Blazejewska, P., Moldenhauer, A. S., Welsch, K., Nehlmeier, I., Wu, Q., Schneider, H., Pölmann, S., & Bertram, S. (2014). DESC1 and MSPL Activate Influenza A Viruses and Emerging Coronaviruses for Host Cell Entry. *Journal of Virology*, 88(20), 12087–97.
- Zoratti, G. L., Tanabe, L. M., Varela, F. A., Murray, A. S., Bergum, C., Colombo, É., Lang, J.E., Molinolo, A.A., Leduc, R., Marsault, E., Boerner, J., & List, K. (2015). Targeting matriptase in breast cancer abrogates tumour progression via impairment of stromal-epithelial growth factor signalling. *Nature Communications*, 6:6776.

ANNEXE A

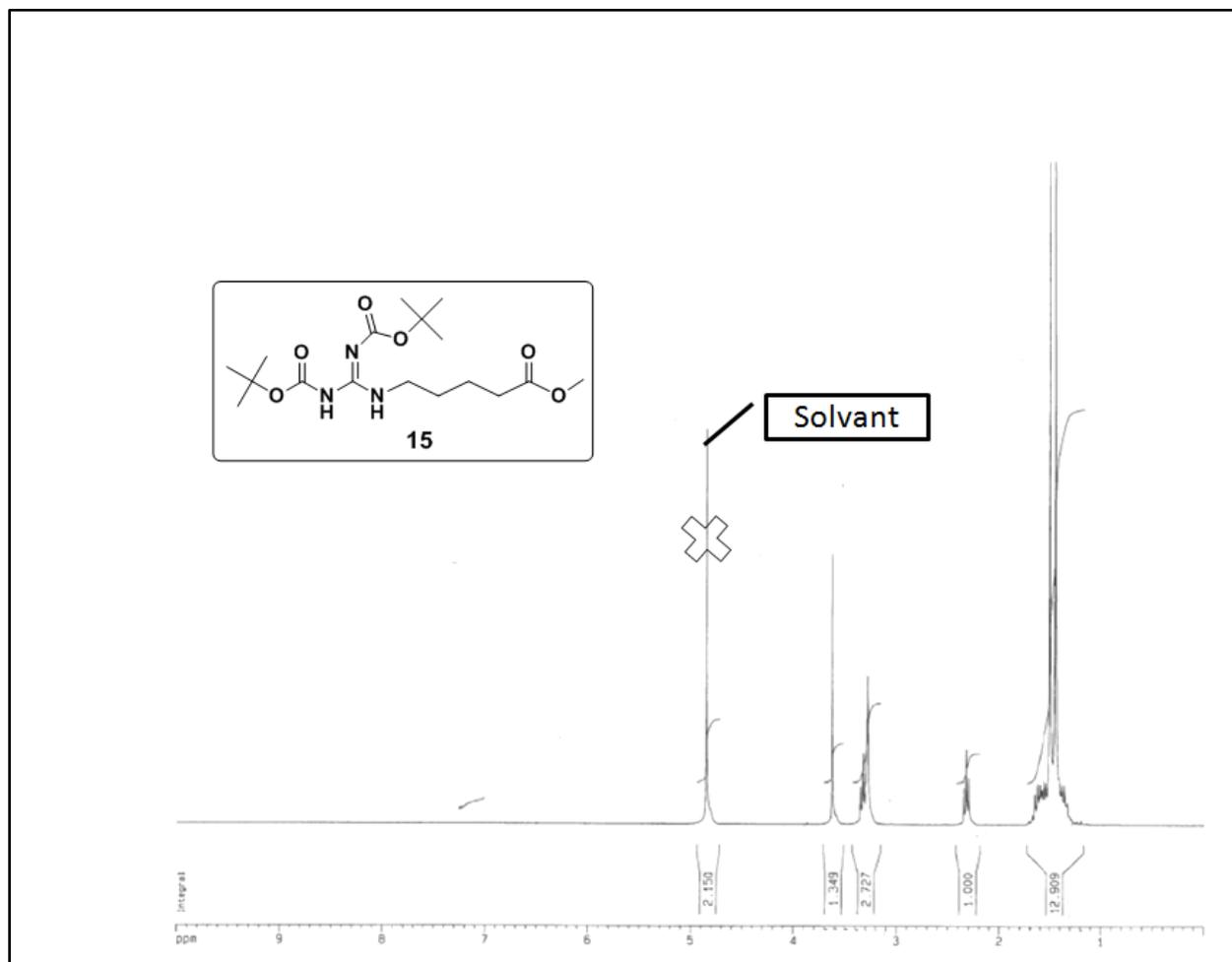
SPECTRES RMN ^1H DES PRODUITS INTERMÉDIAIRES*Composé 14. Methyl 5-aminopentanoate*

- RMN ^1H



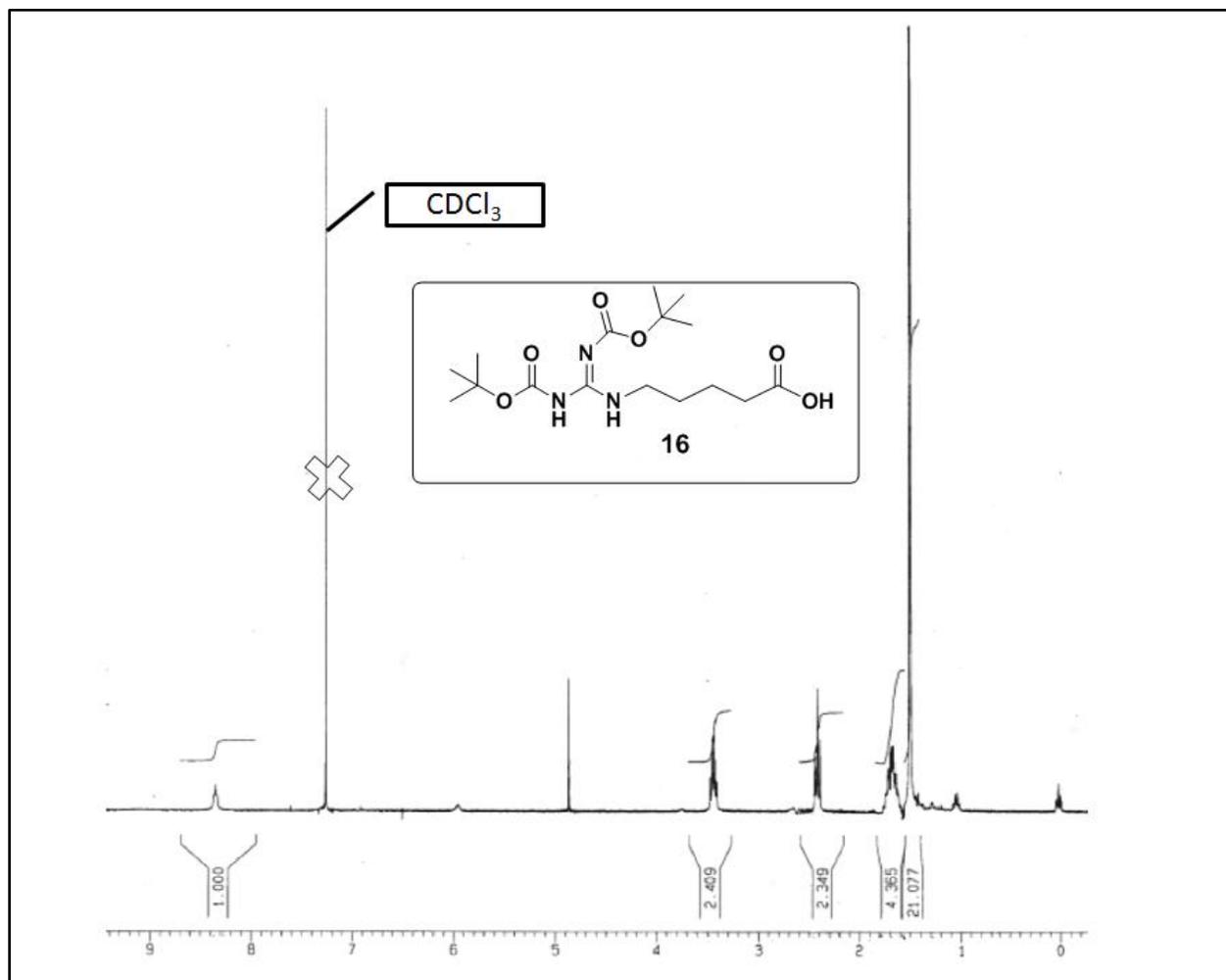
Composé 15. Methyl 5-(2,3-bis(tert-Butoxycarbonyl)guanidino)pentanoate

- RMN ^1H



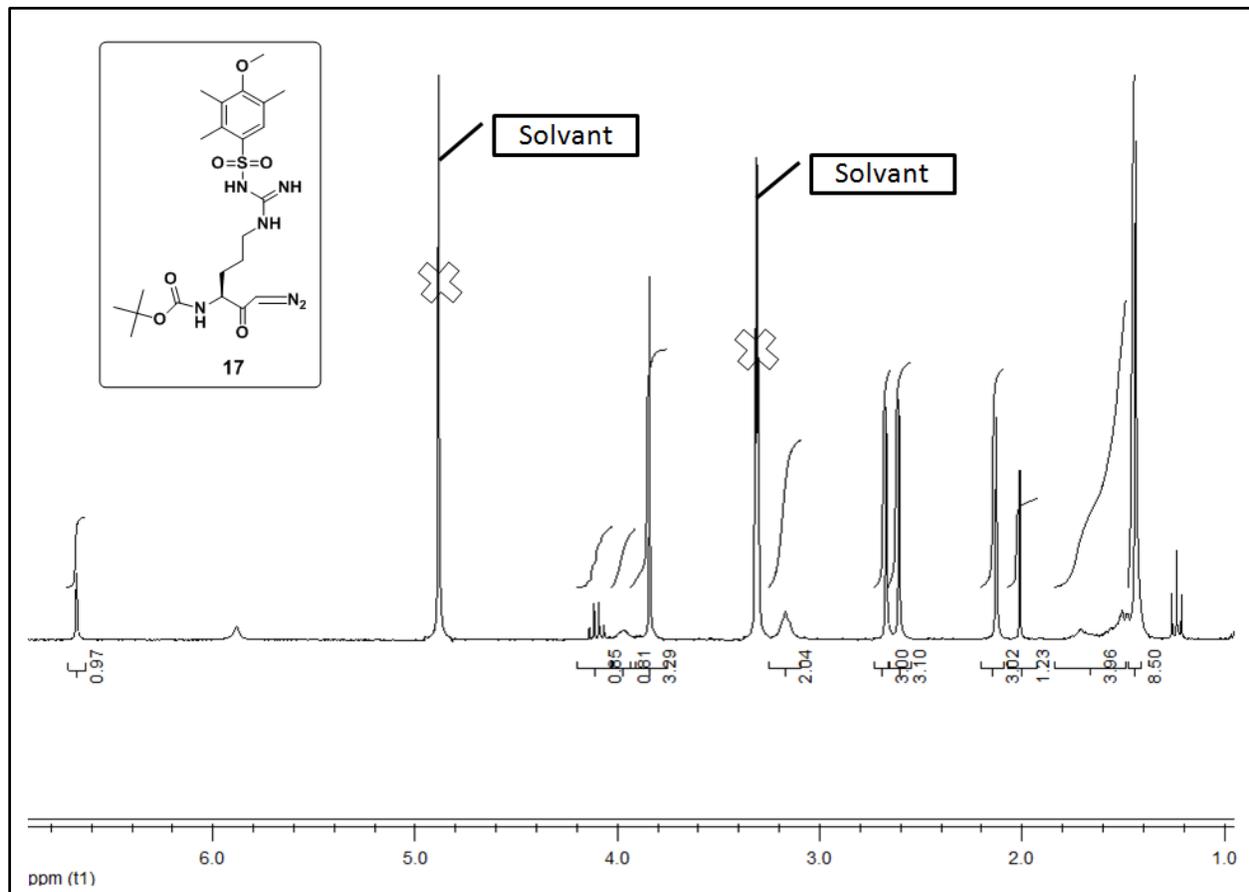
Composé **16**. 5-(2,3-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidino)pentanoic acid

- RMN ^1H



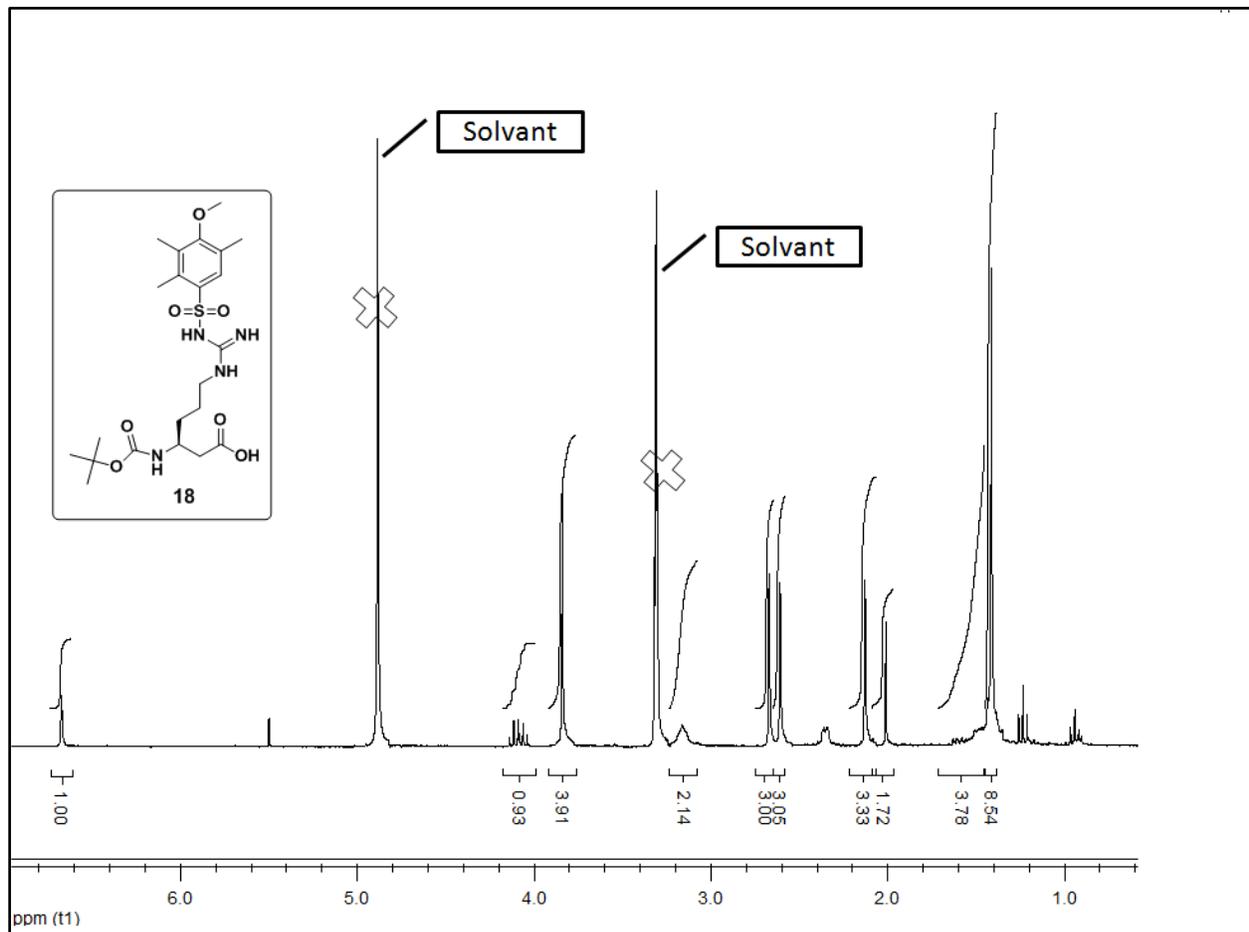
Composé 17. (*S*)-*tert*-Butoxycarbonyl (1-diazo-6-(3-((4-methoxy-2,3,5-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)-2-oxohexan-3-yl)carbamate

- RMN ^1H



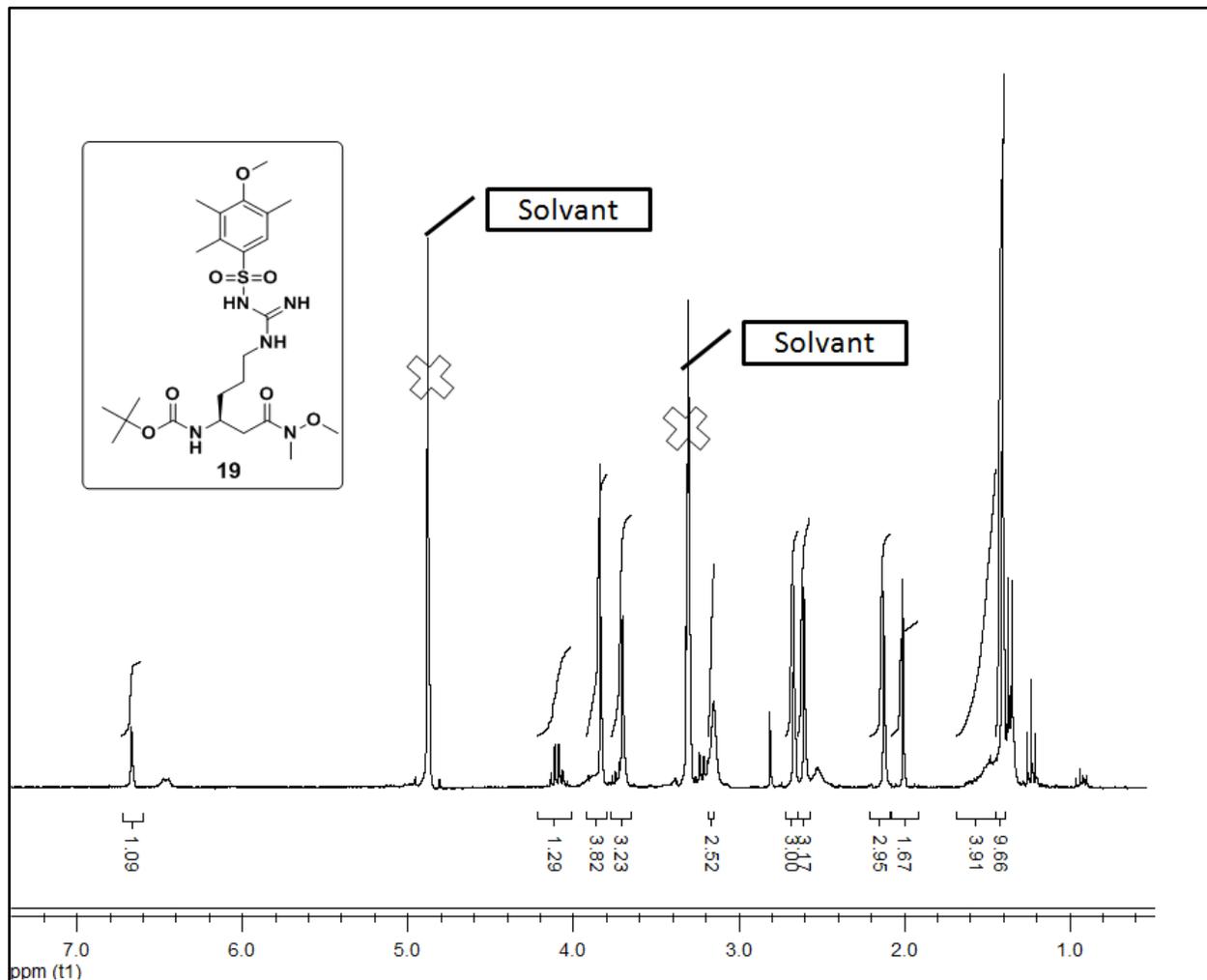
Composé **18**. (*S*)-3-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-6-(3-((4-methoxy-2,3,5-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)hexanoic acid

• RMN ^1H



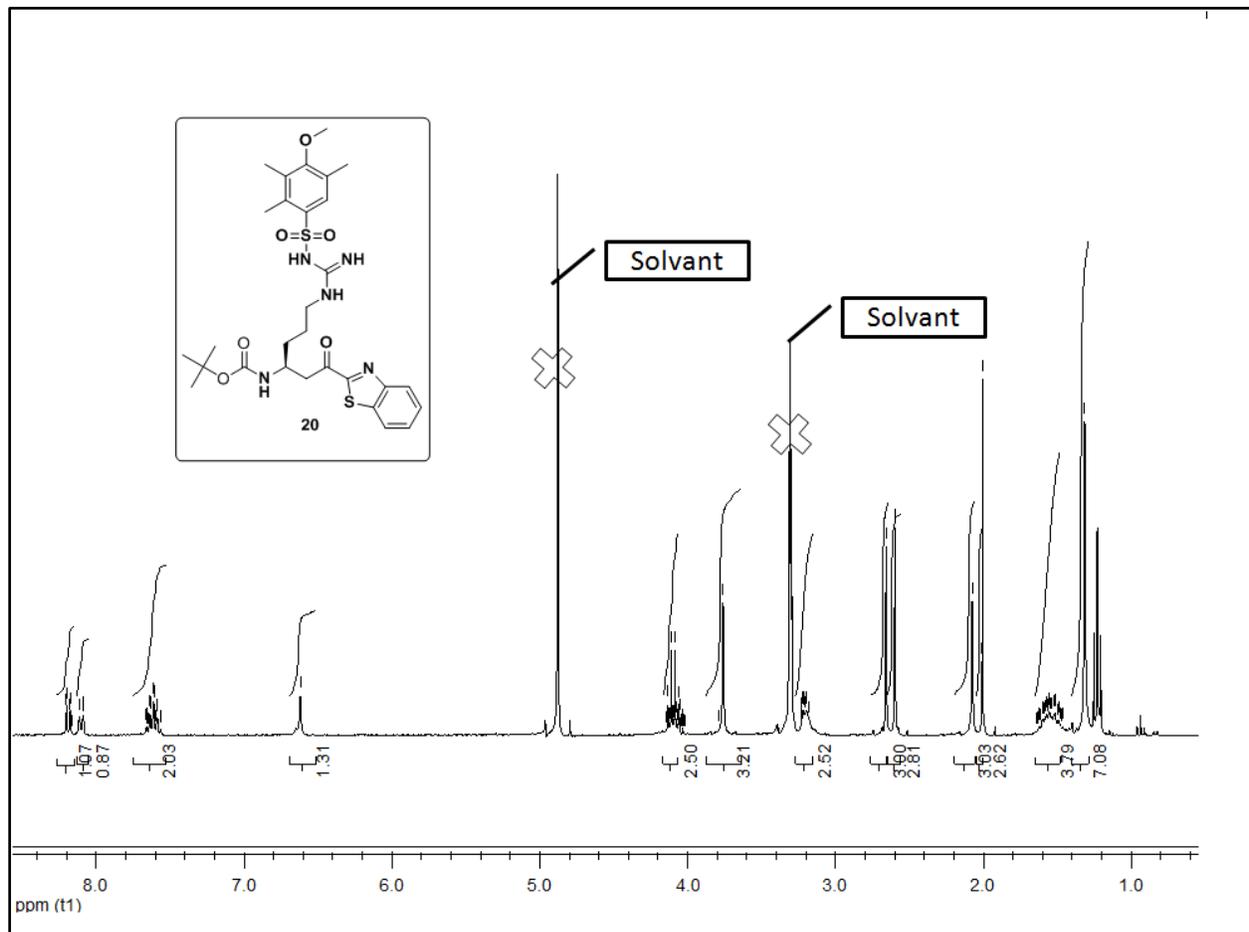
Composé **19**. *(S)*-tert-Butoxycarbonyl 1-(methoxy(methyl)amino)-6-(3-((4-methoxy-2,3,5-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)-1-oxohexan-3-yl)carbamate

- RMN ^1H



Composé **20**. *(S)*-tert-Butoxycarbonyl (1-(benzo[d]thiazol-2-yl)-6-(3-((4-methoxy-2,3,5-trimethylphenyl)sulfonyl)guanidino)-1-oxohexan-3-yl)carbamate

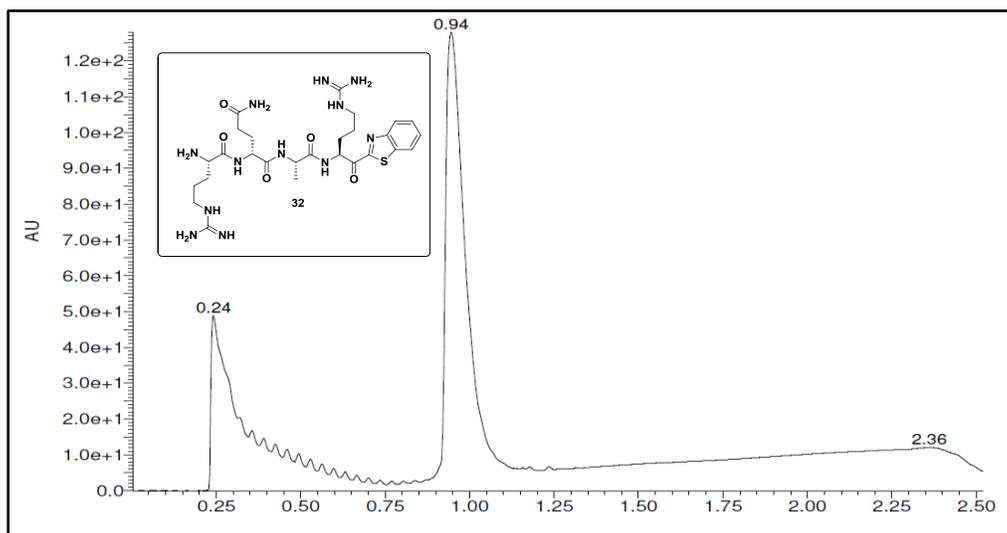
• RMN ^1H



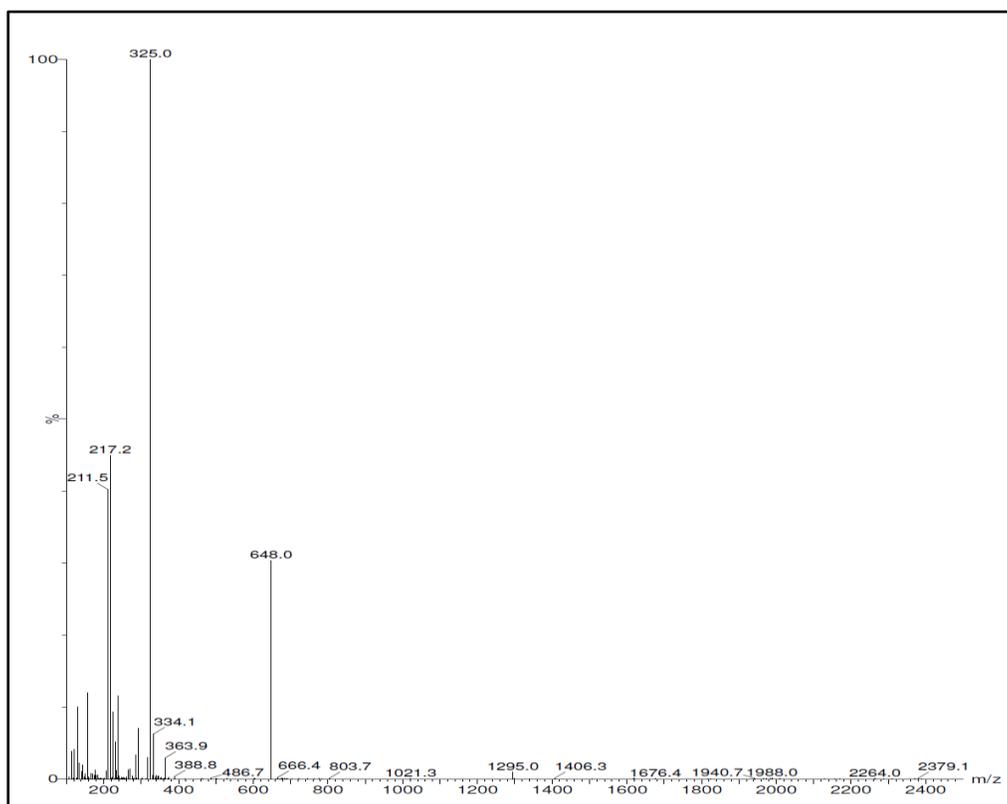
SPECTRES UV ET MS DES PRODUITS FINAUX

Composé 32. *R*-(D)Q-A-R-Kbt

• UPLC

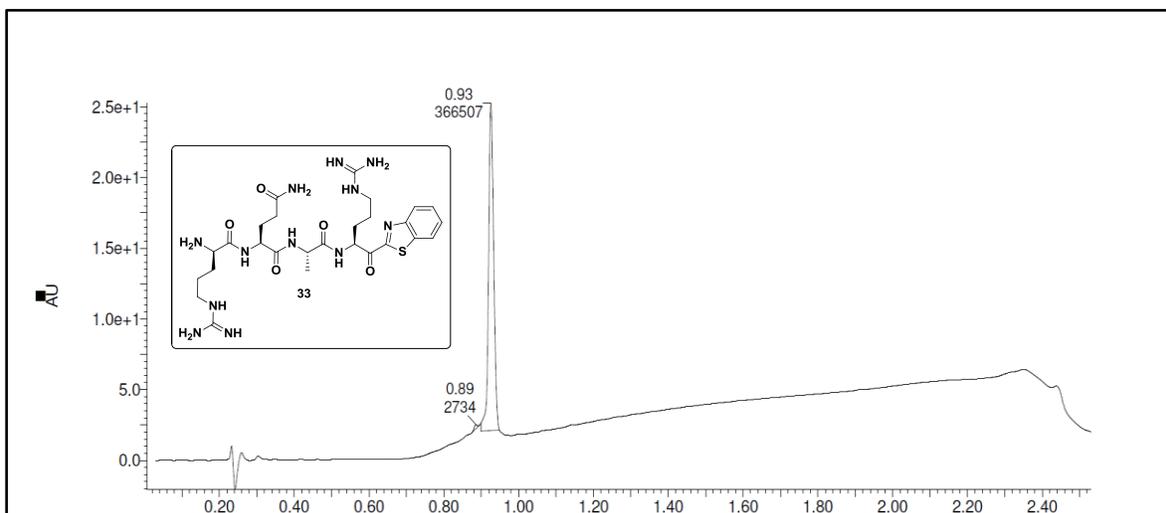


• MS

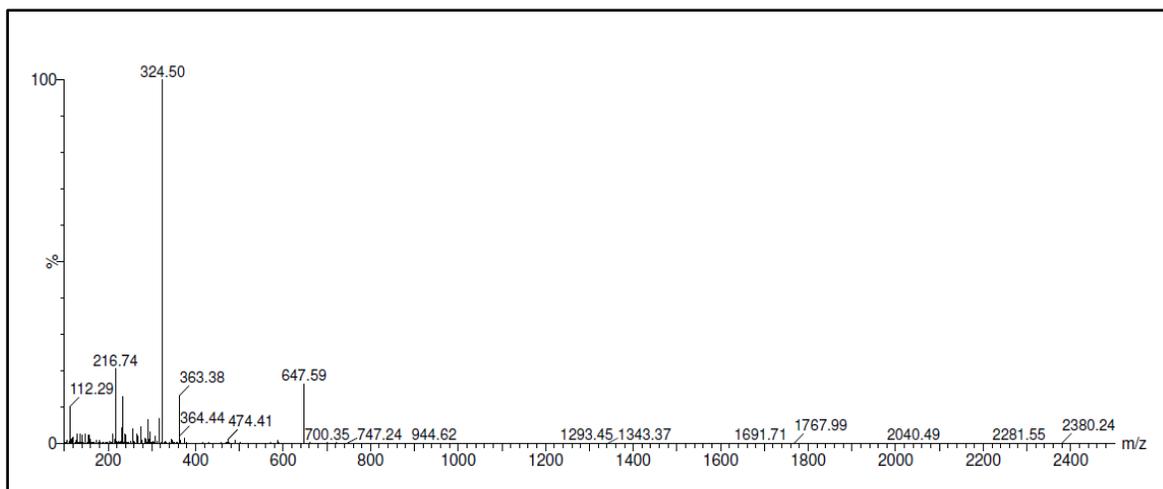


Composé 33. (D)R-Q-A-R-Kbt

• UPLC

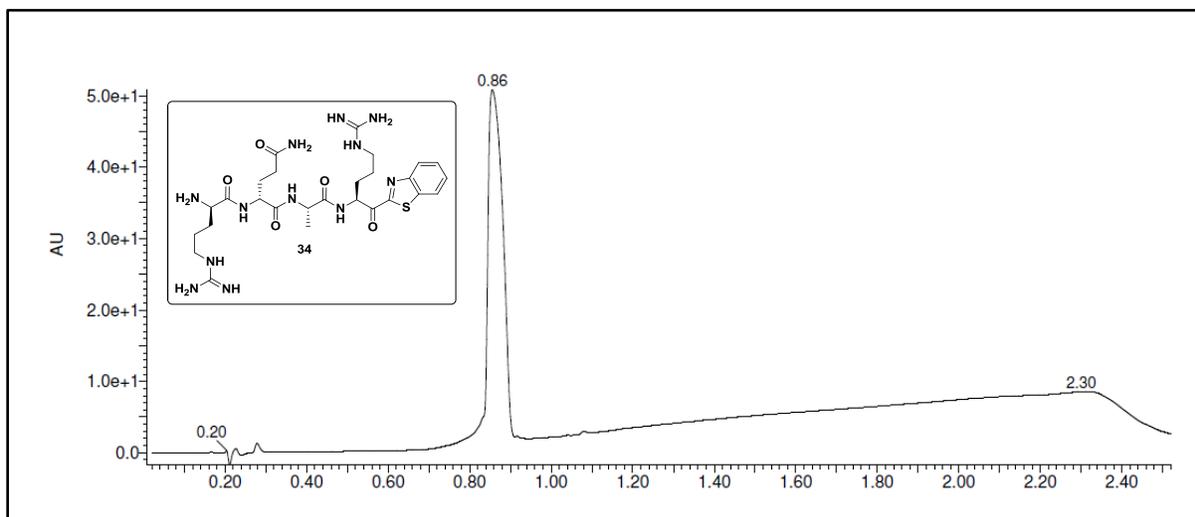


• MS

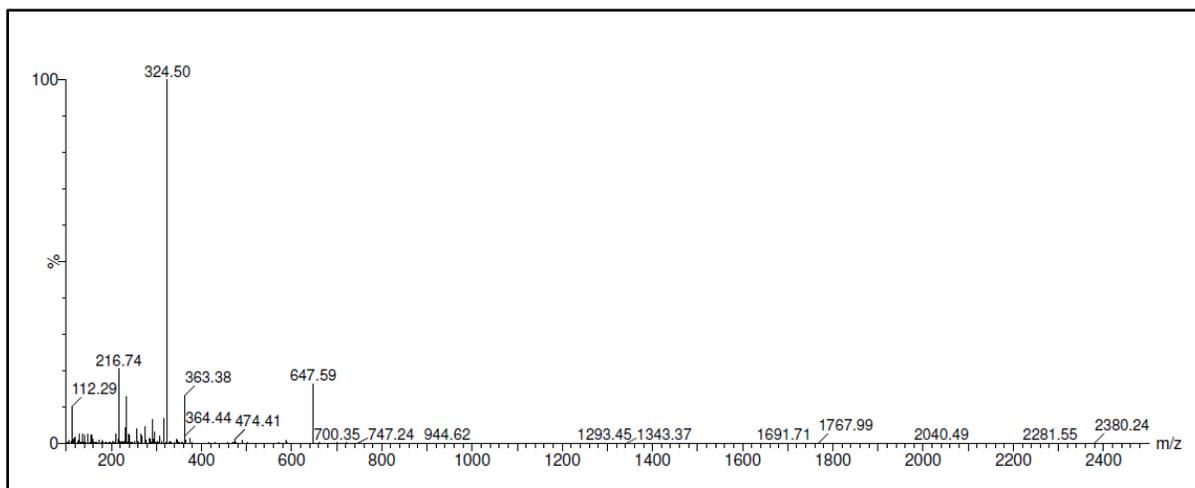


Composé 34. (D)R-(D)Q-A-R-Kbt

• UPLC

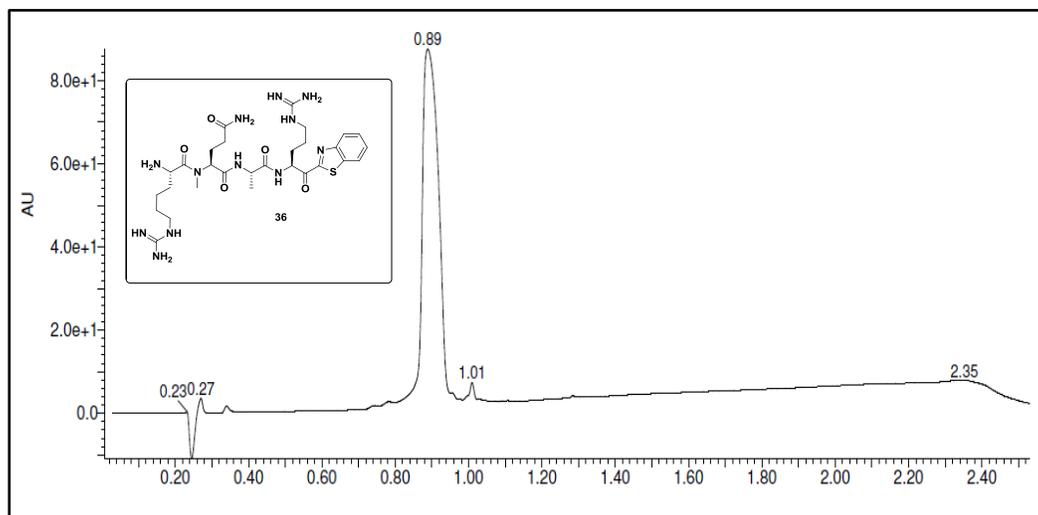


• MS

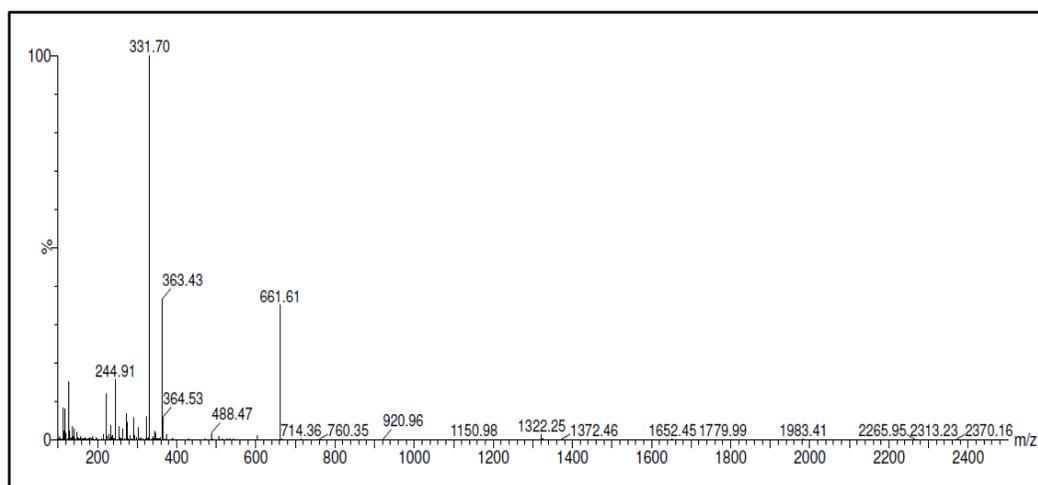


Composé 36. R-(NMe)Q-A-R-Kbt

• UPLC

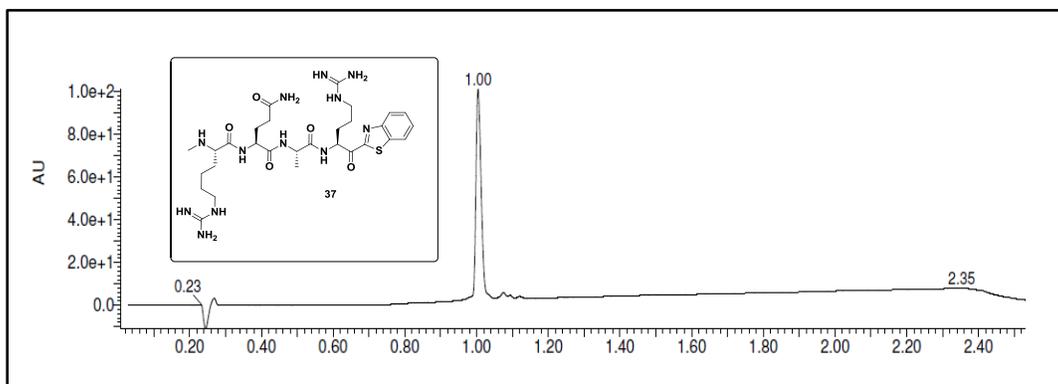


• MS

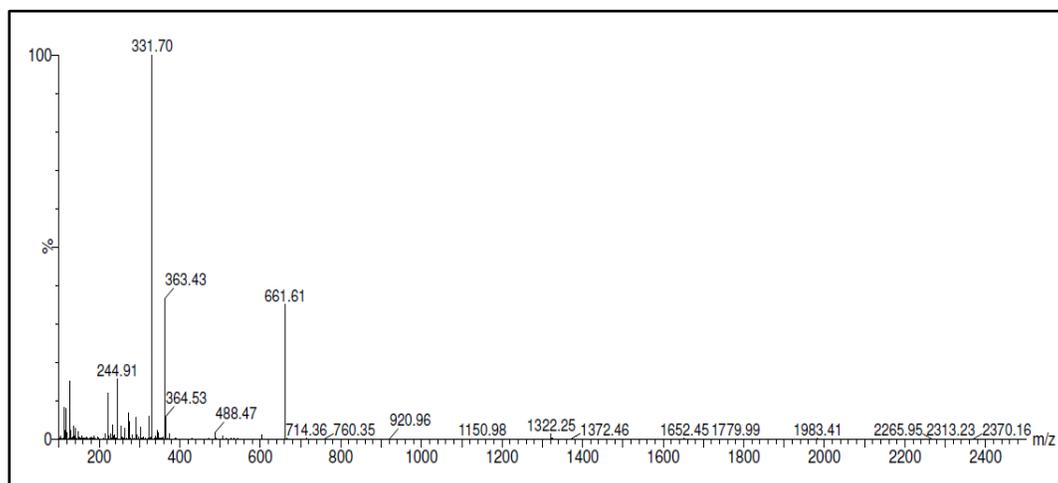


Composé 37. (NMe)R-Q-A-R-Kbt

• UPLC

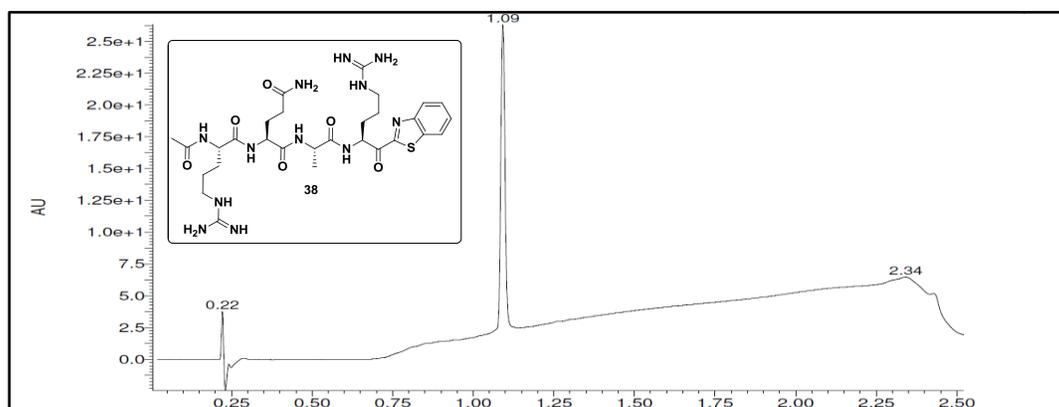


• MS

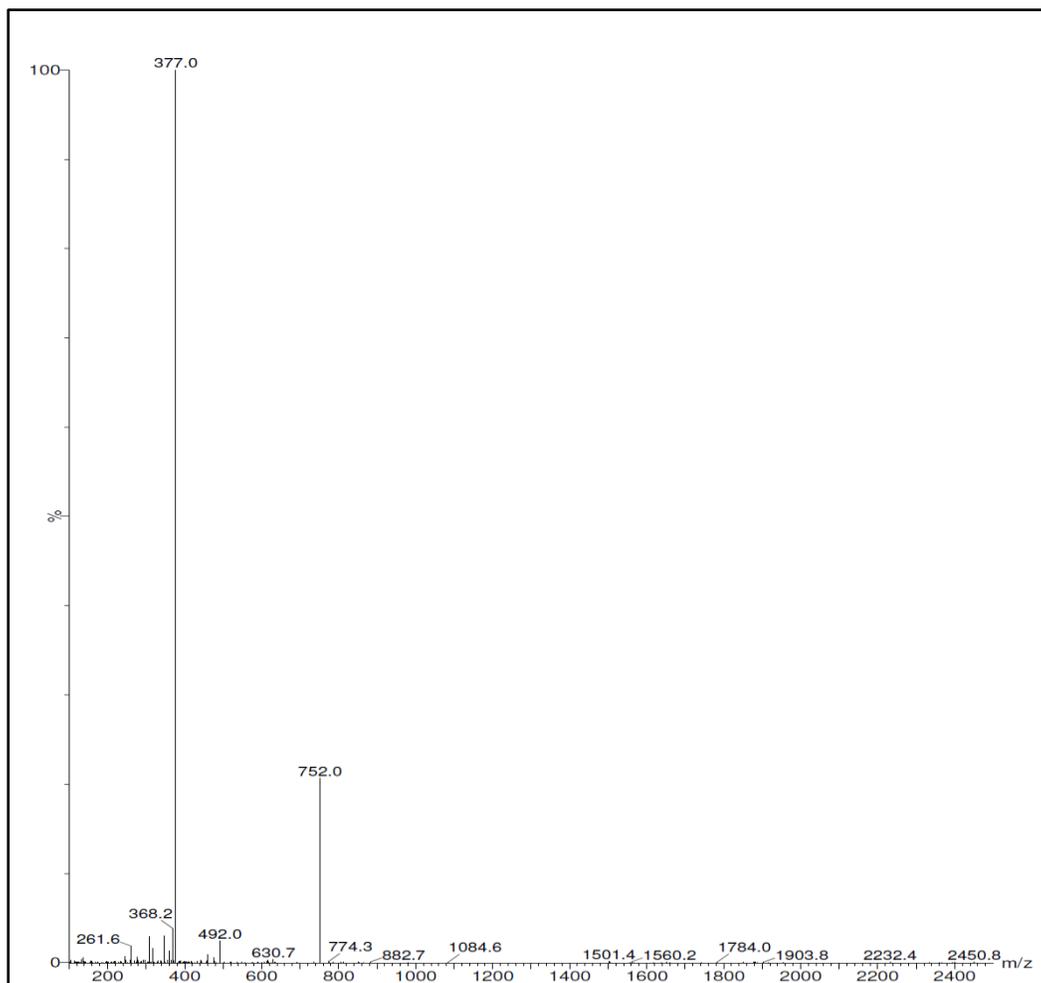


Composé 38. (CH₃CO)R-Q-A-R-Kbt

• UPLC

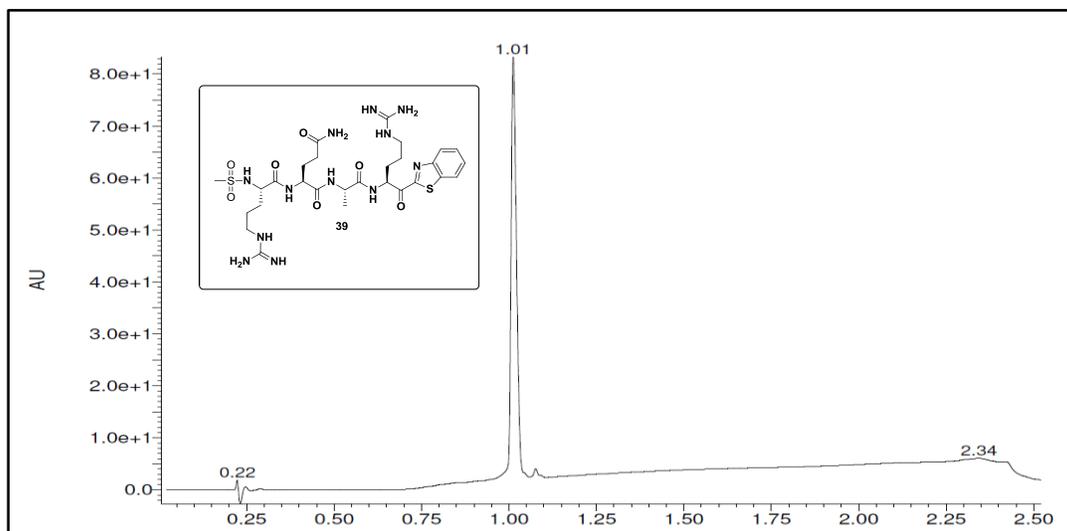


• MS

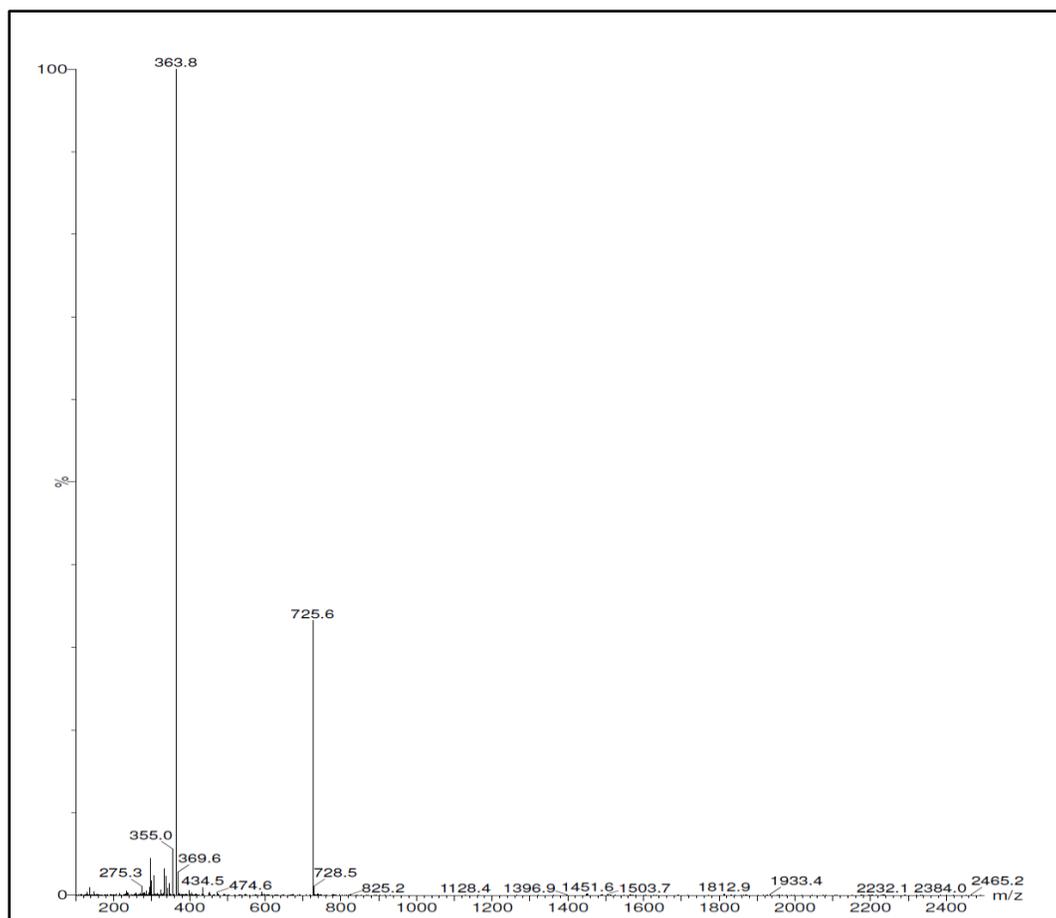


Composé 39. (CH₃SO₂)R-Q-A-R-Kbt

• UPLC

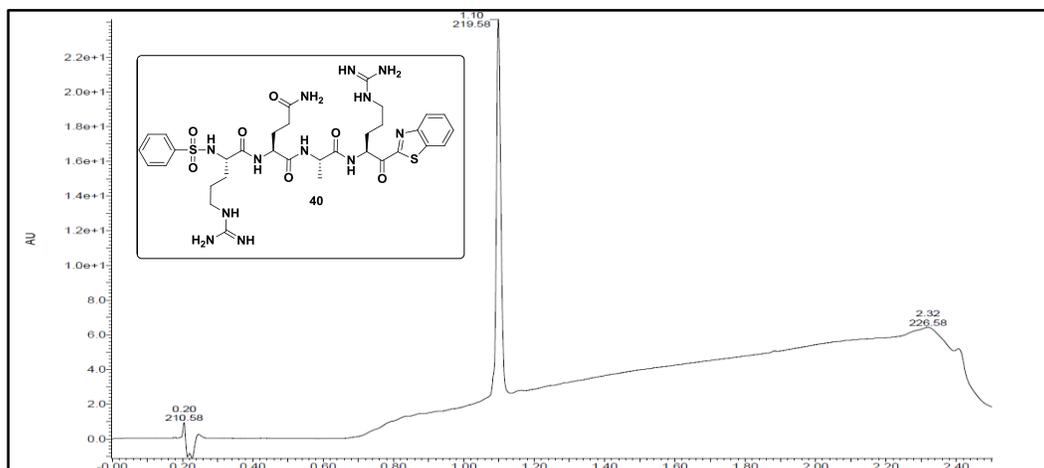


• MS

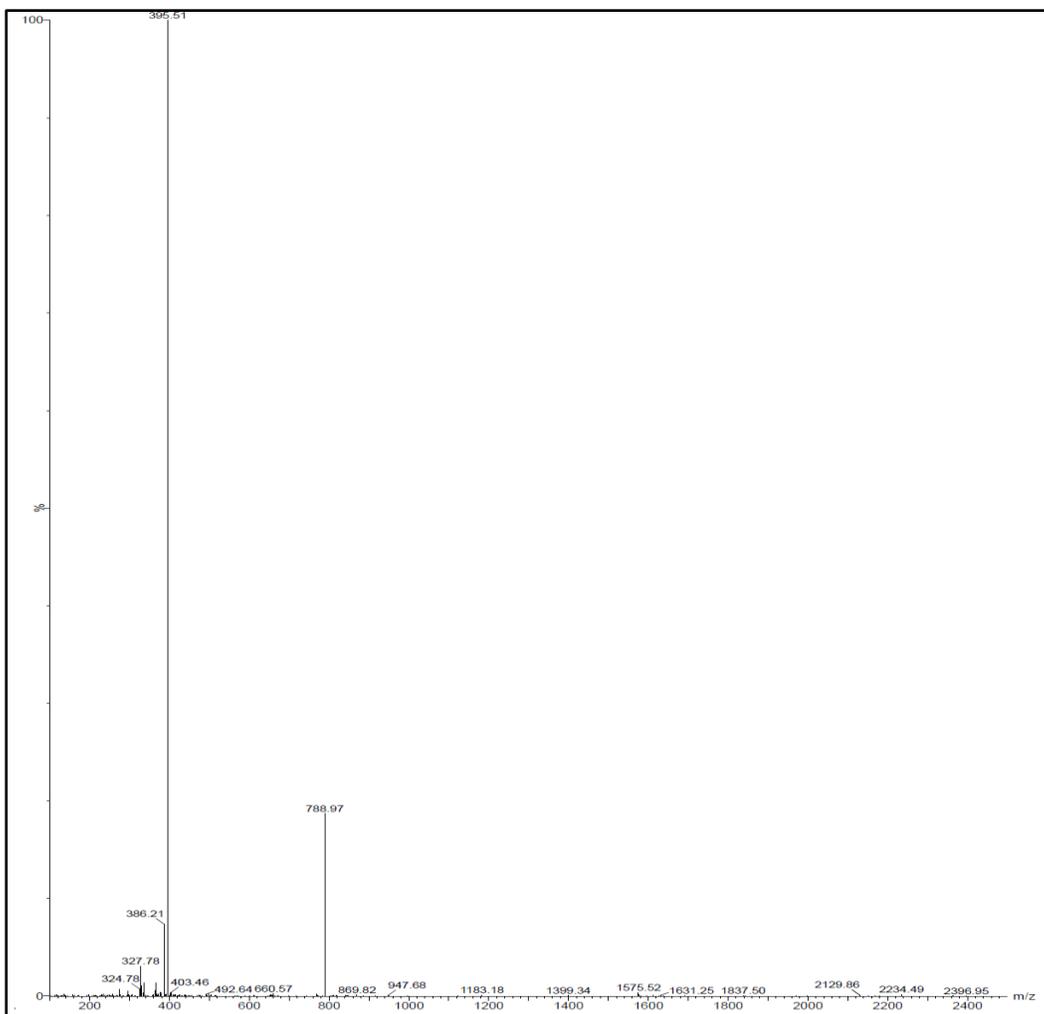


Composé 40. (PhSO₂)R-Q-A-R-Kbt

• UPLC

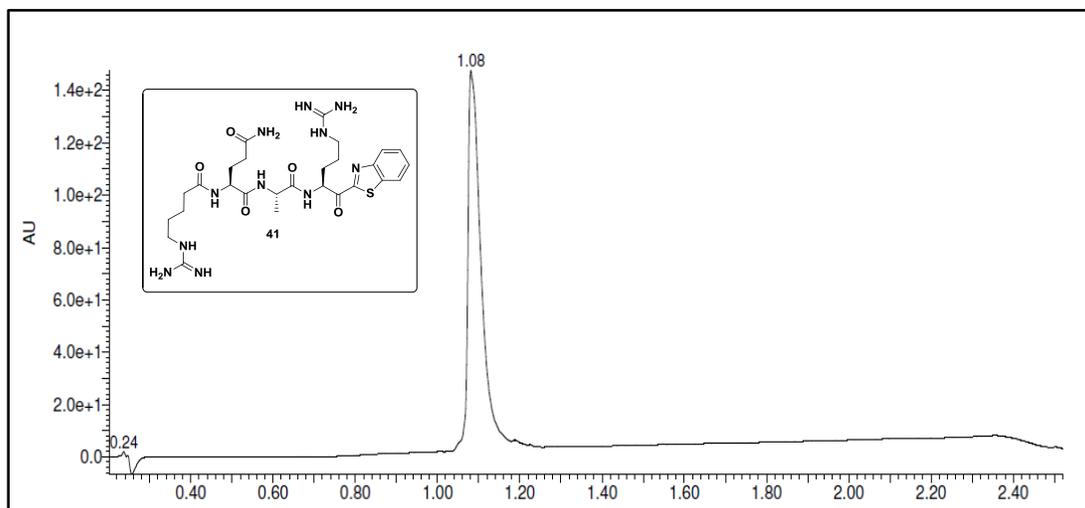


• MS

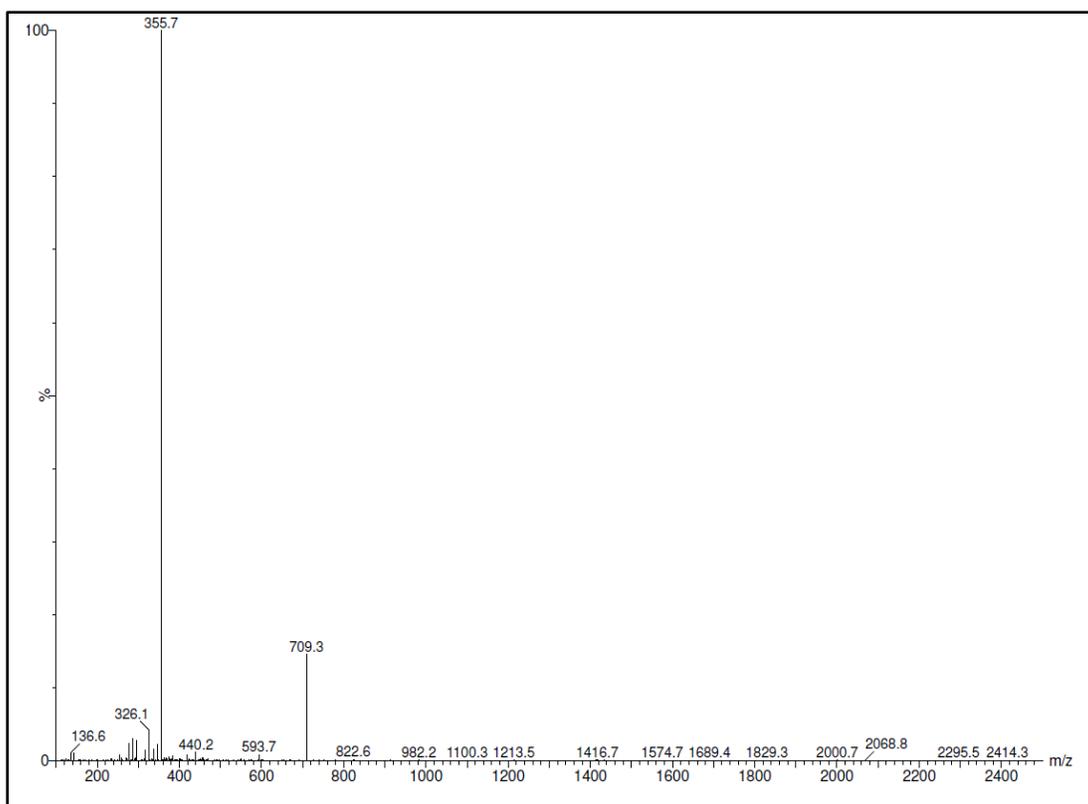


Composé 41. (H)R-Q-A-R-Kbt

• UPLC

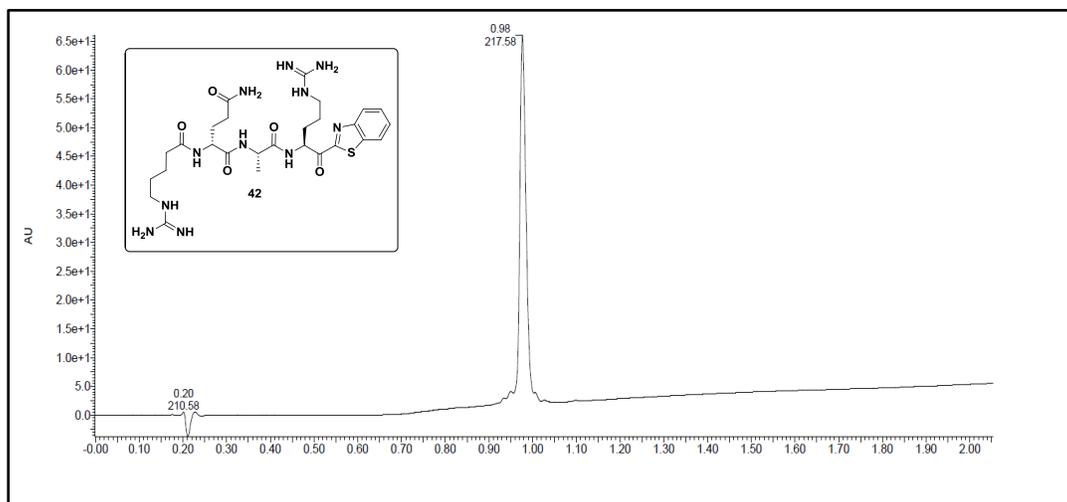


• MS

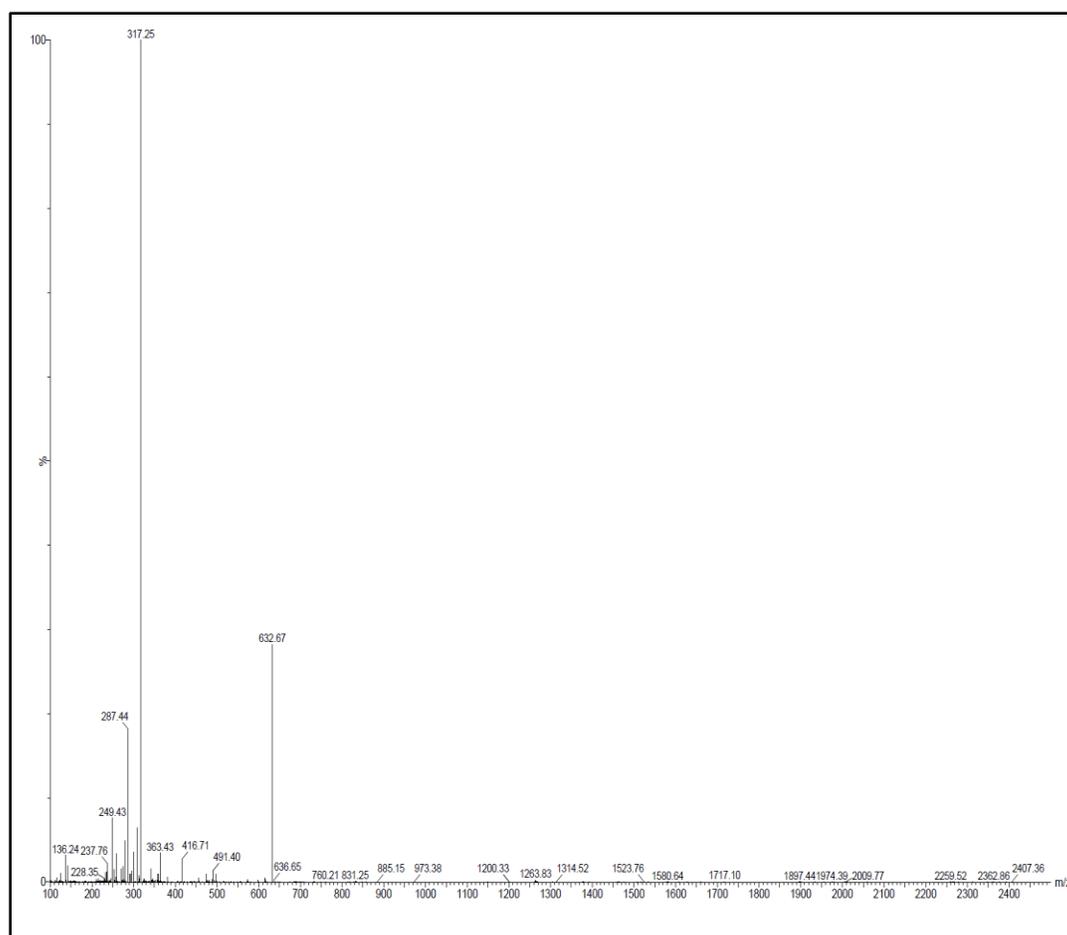


Composé 42. (H)R-(D)Q-F-R-Kbt

• UPLC

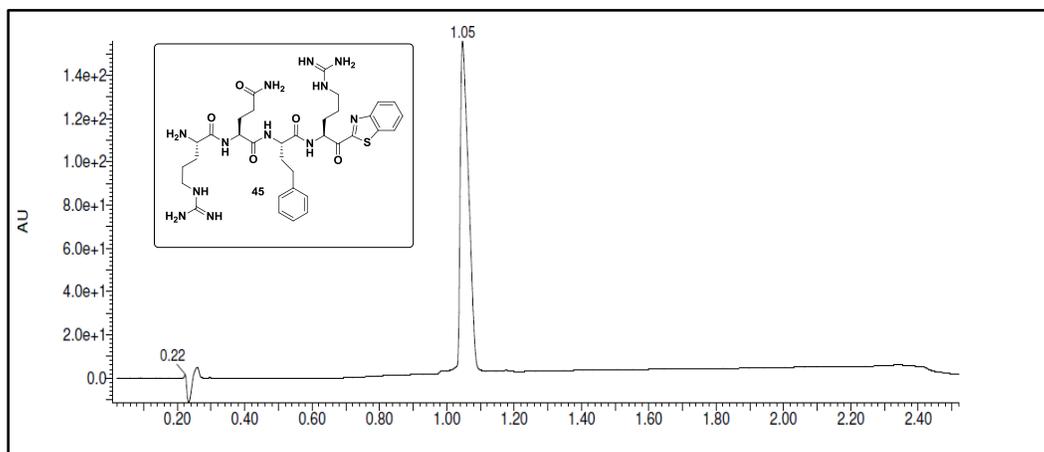


• MS

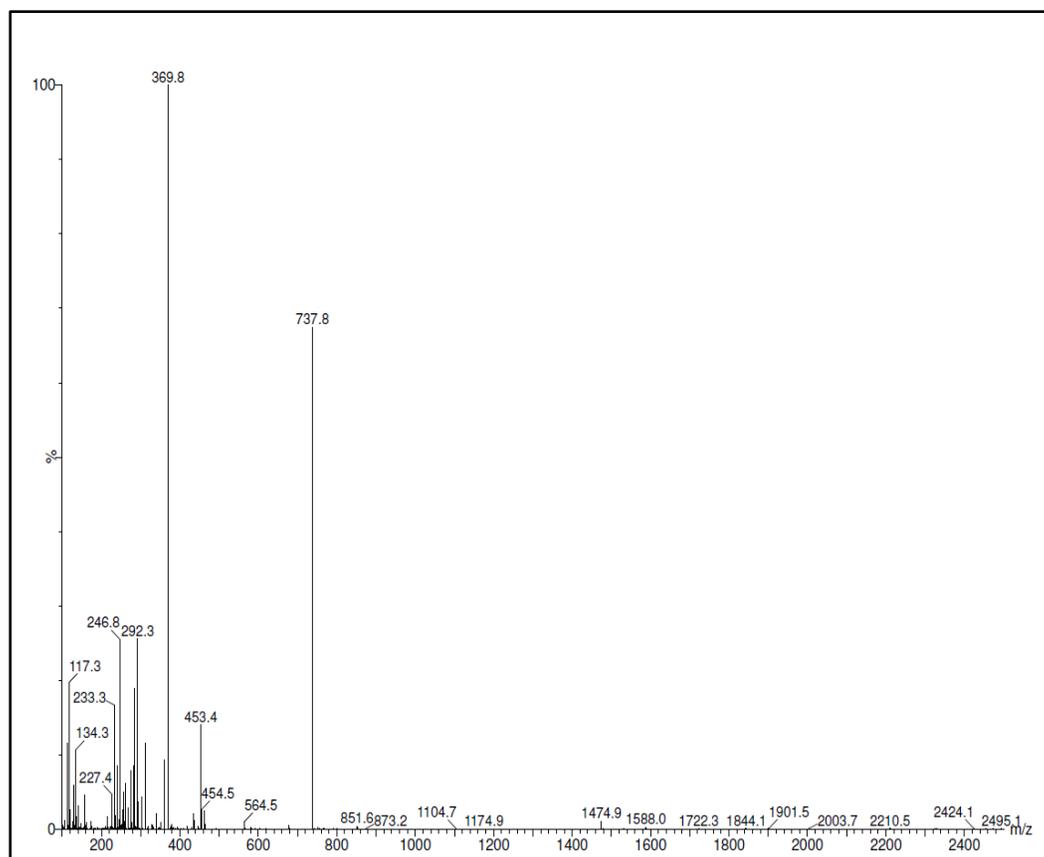


Composé 45. R-Q-hF-R-Kbt

• UPLC

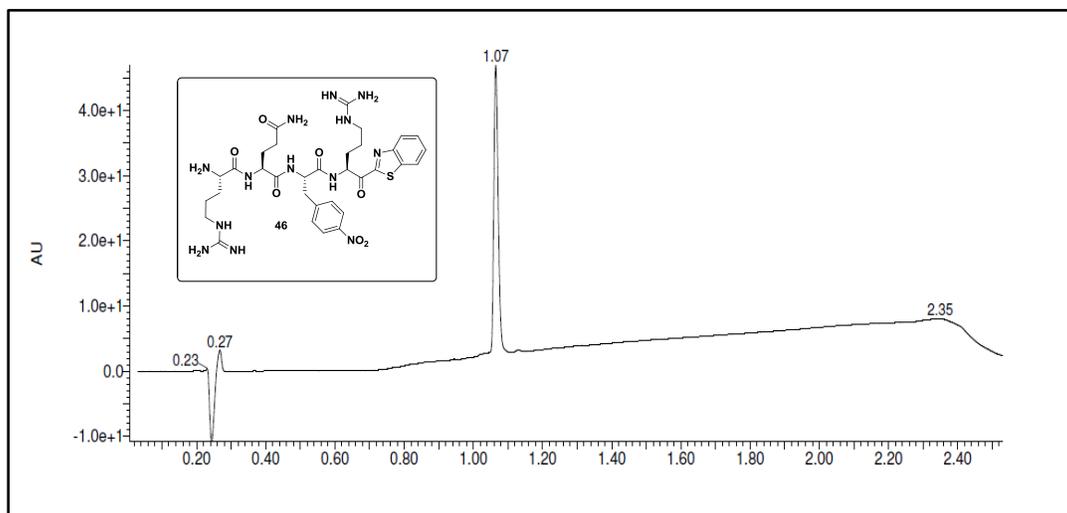


• MS

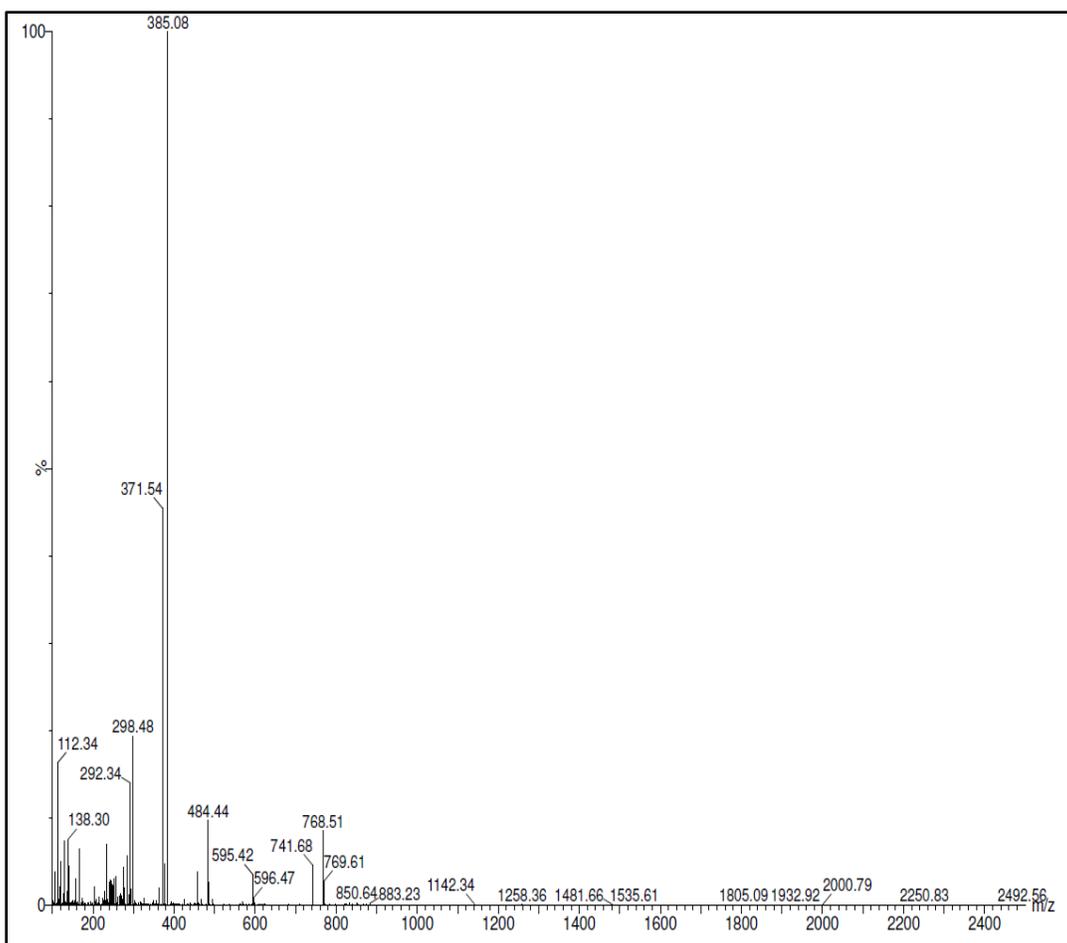


Composé 46. R-Q-F(4NO₂)-R-Kbt

• UPLC

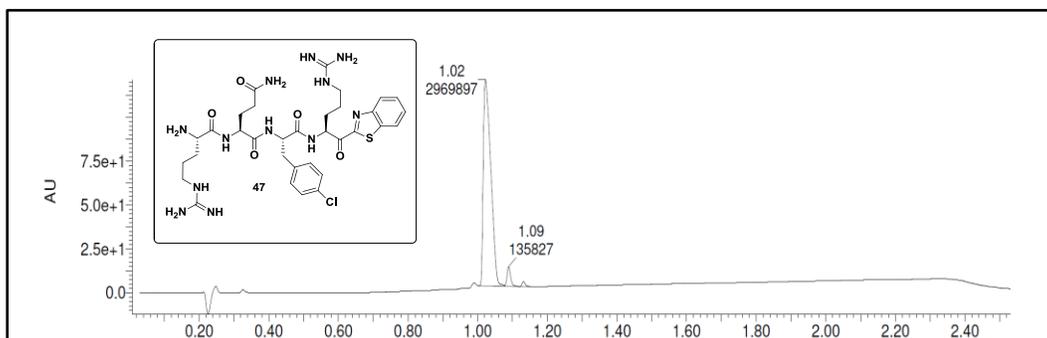


• MS

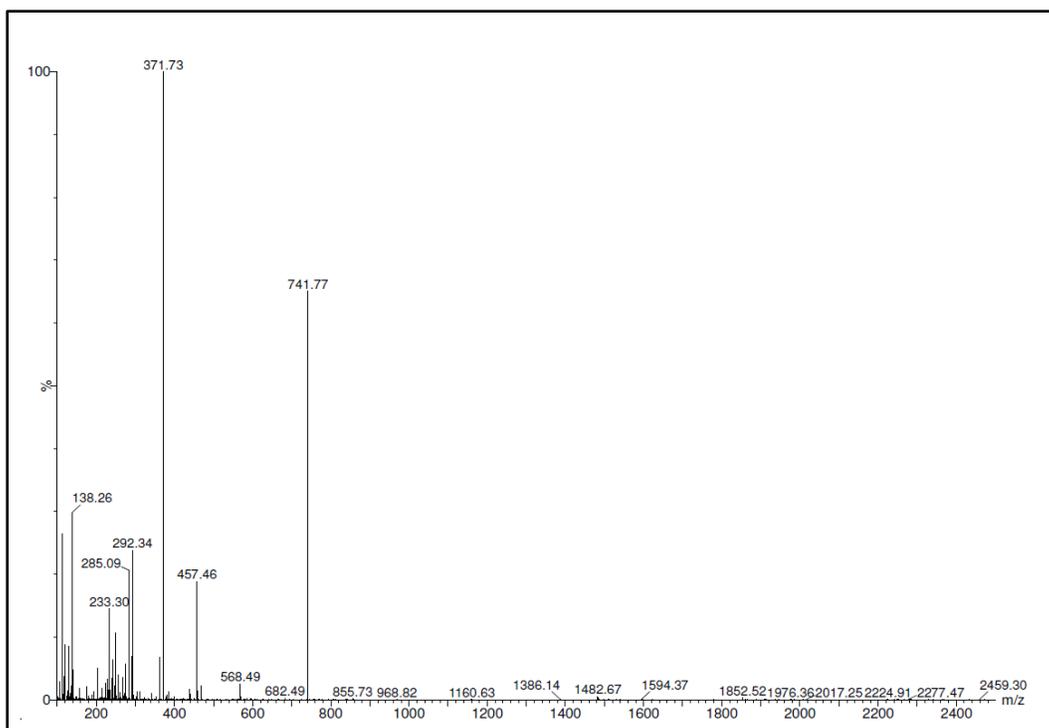


Composé 47. R-Q-F(4Cl)-R-Kbt

• UPLC

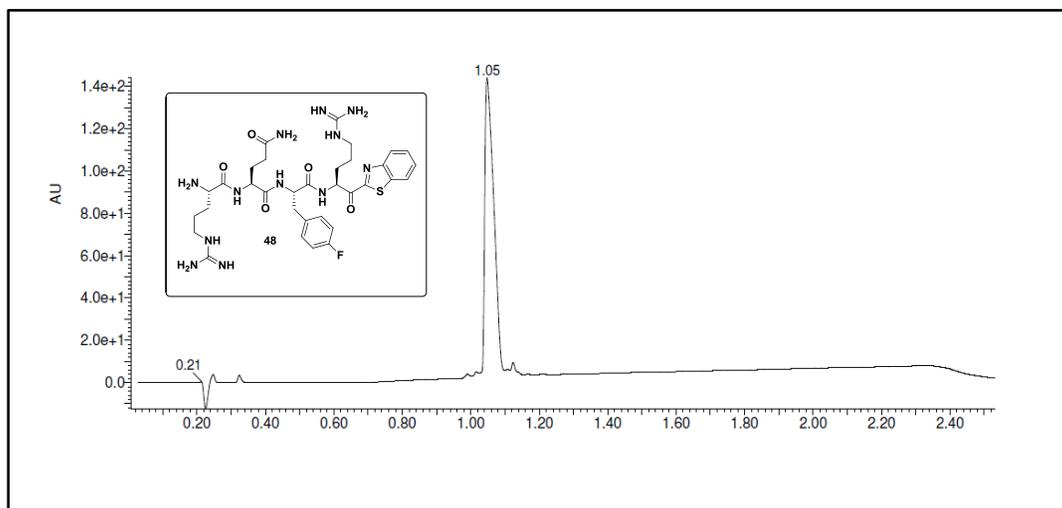


• MS

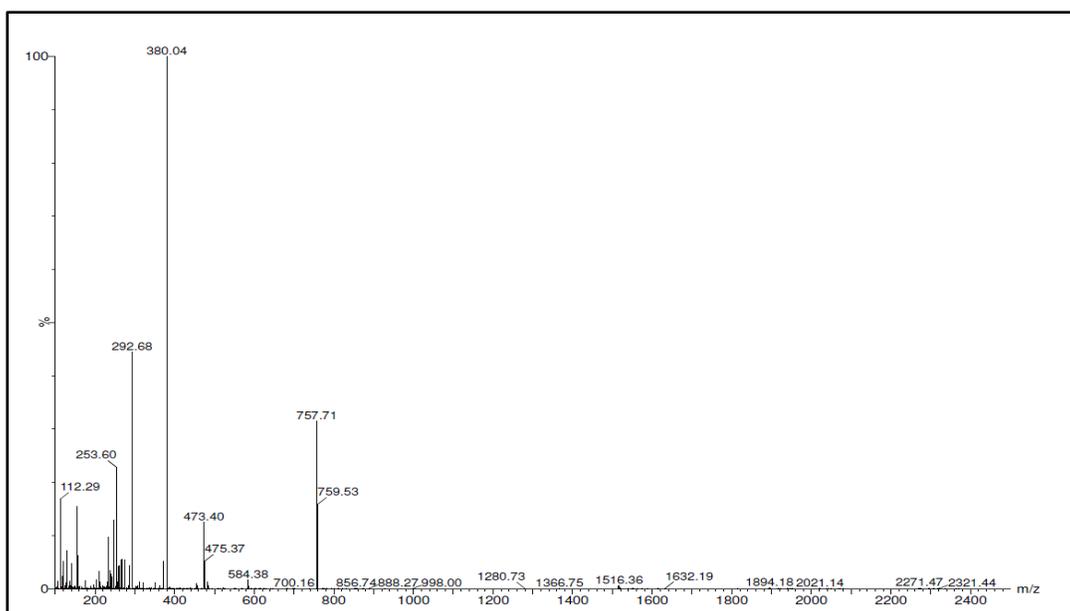


Composé 48. R-Q-F(4F)-R-Kbt

• UPLC

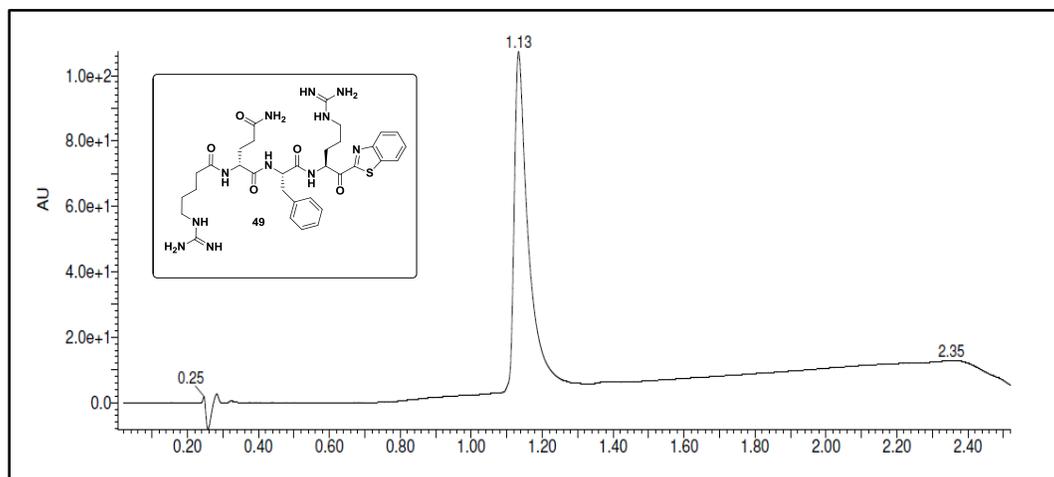


• MS

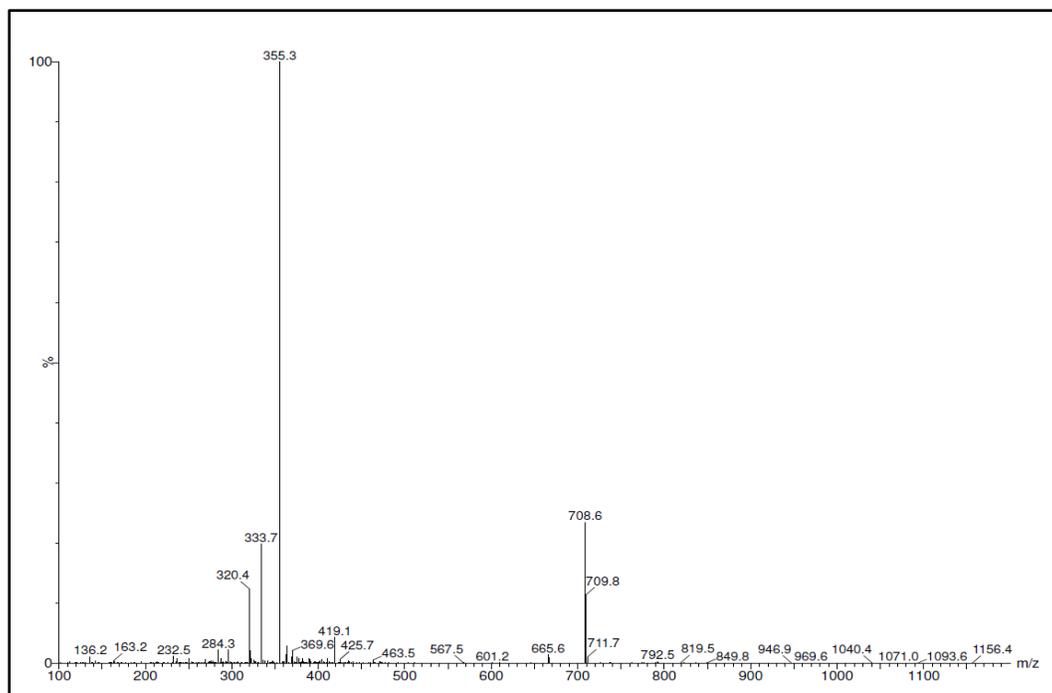


Composé 49. (H)R-(D)Q-F-R-Kbt

• UPLC

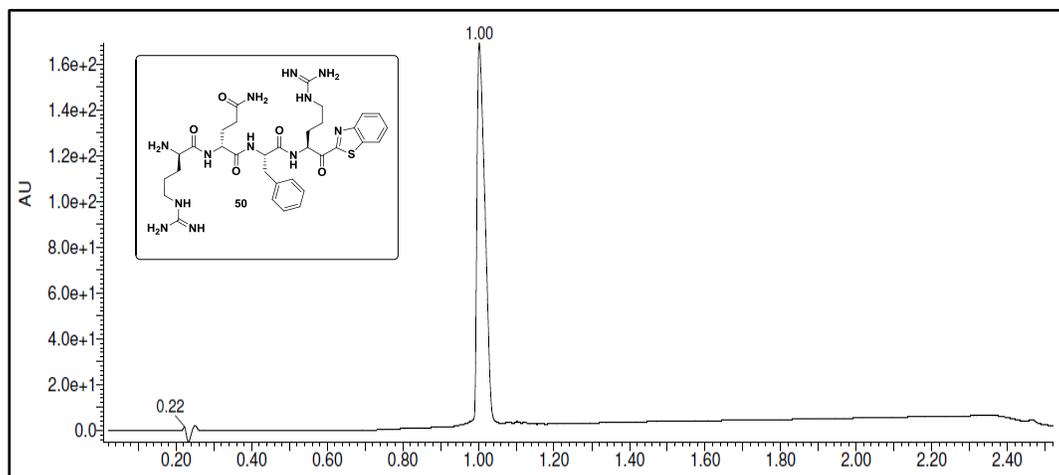


• MS

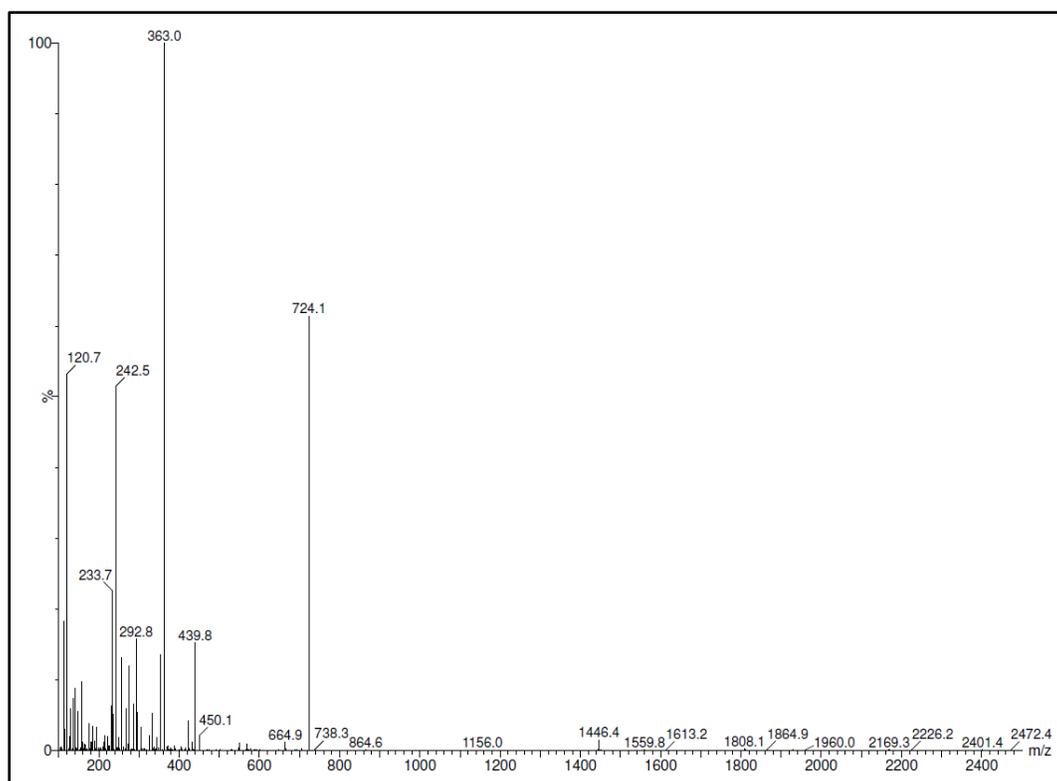


Composé 50. (D)R-(D)Q-F-R-Kbt

• UPLC

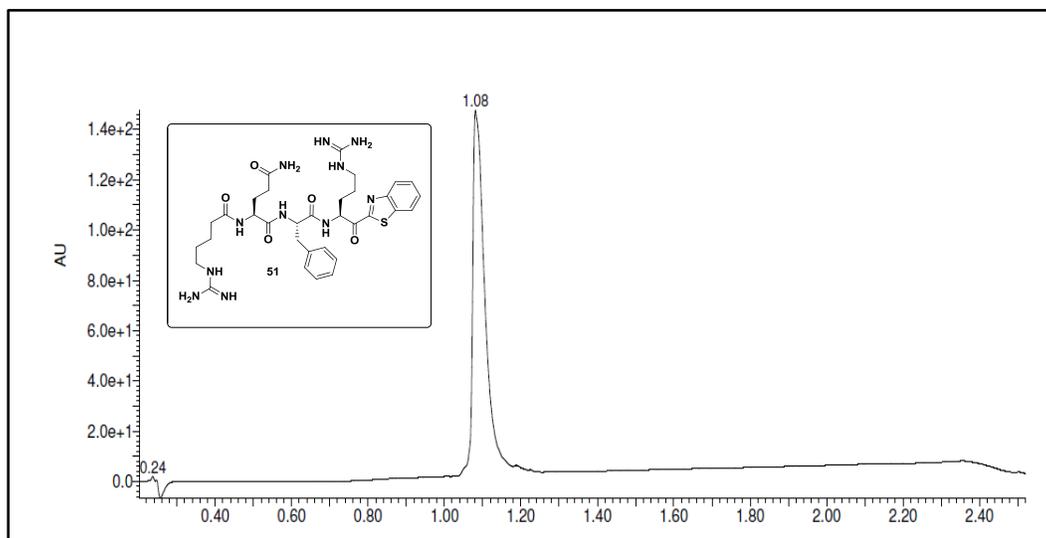


• MS

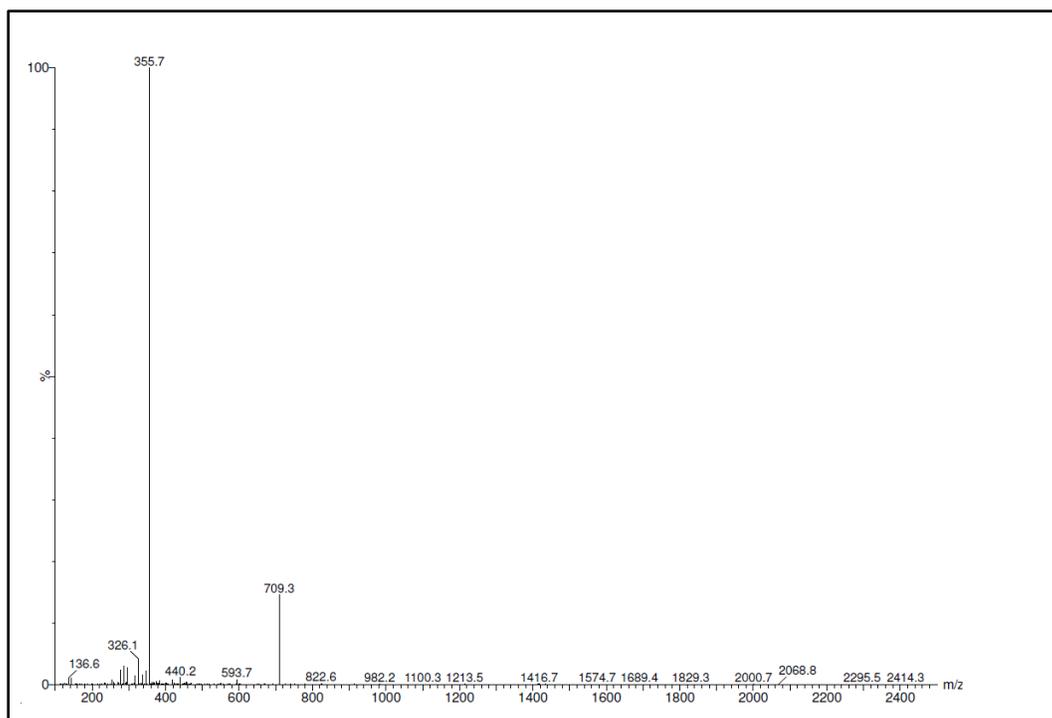


Composé 51. (H)R-Q-F-R-Kbt

• UPLC

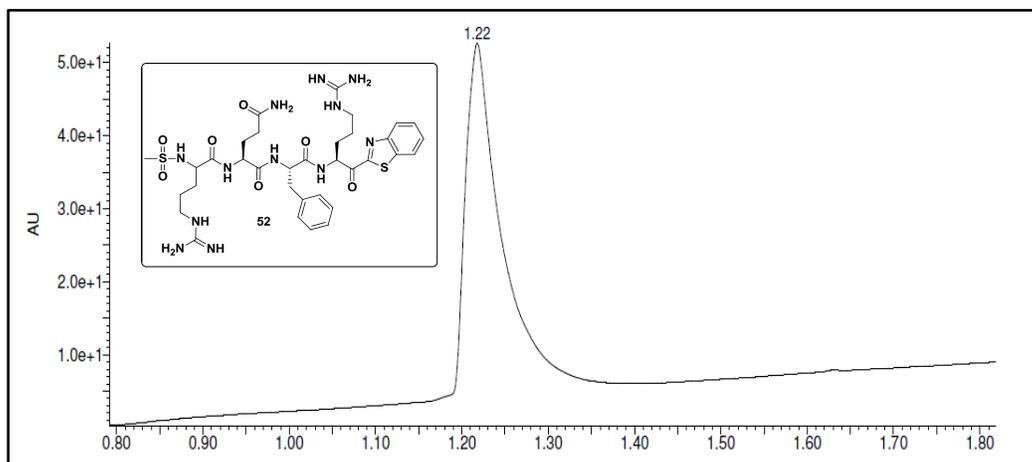


• MS

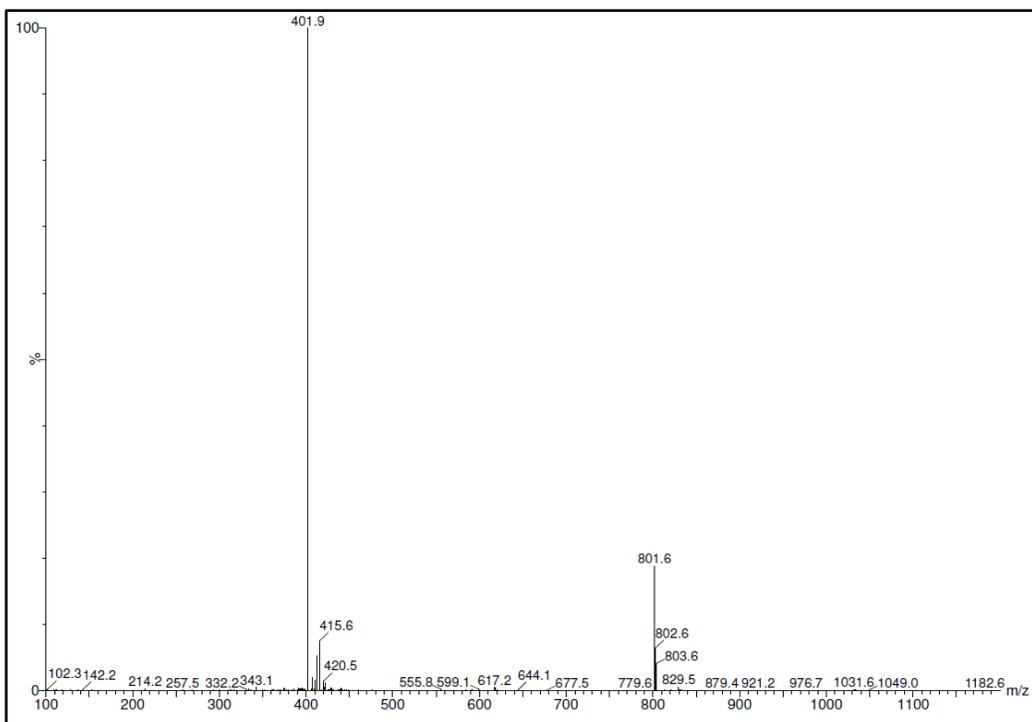


Composé 52. (CH₃SO₂)R-Q-F-R-Kbt

• UPLC

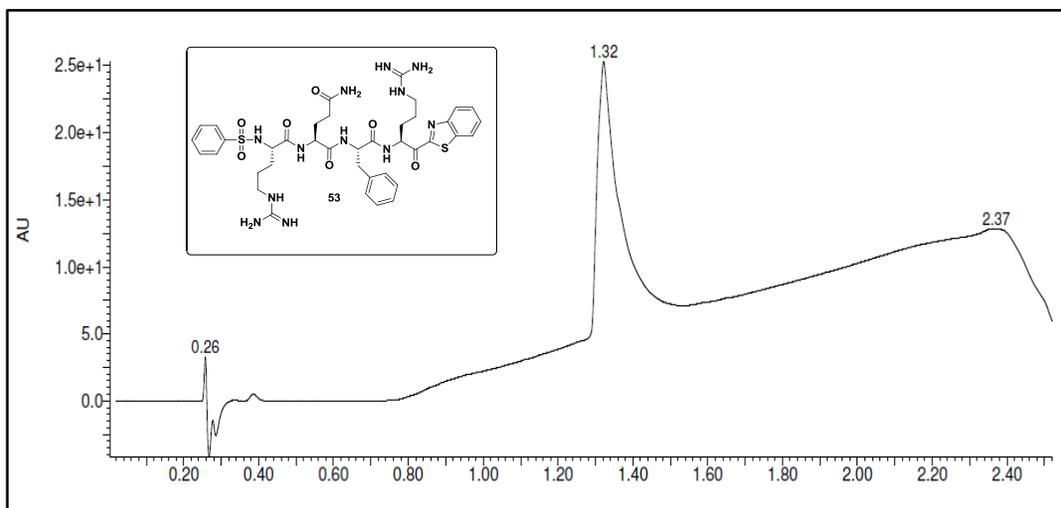


• MS

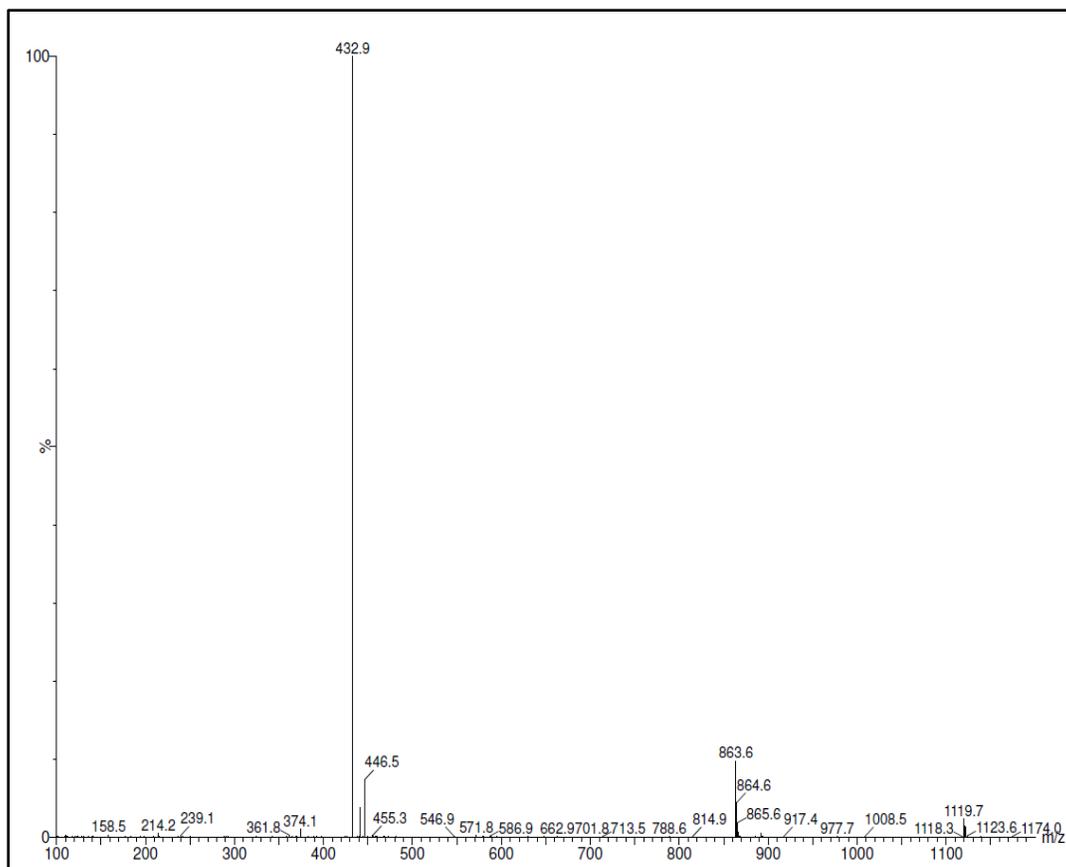


Composé 53. (PhSO₂)R-Q-F-R-Kbt

• UPLC

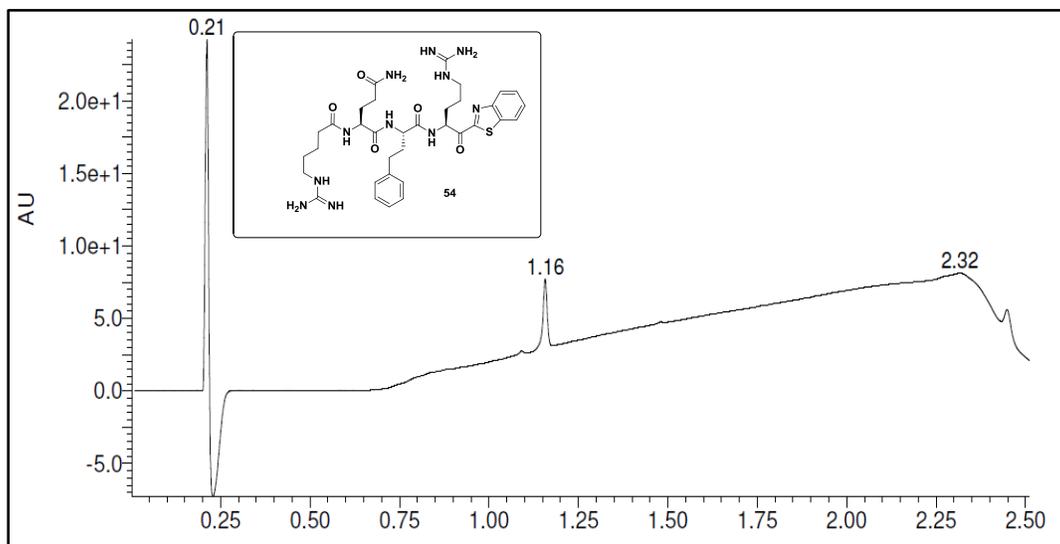


• MS

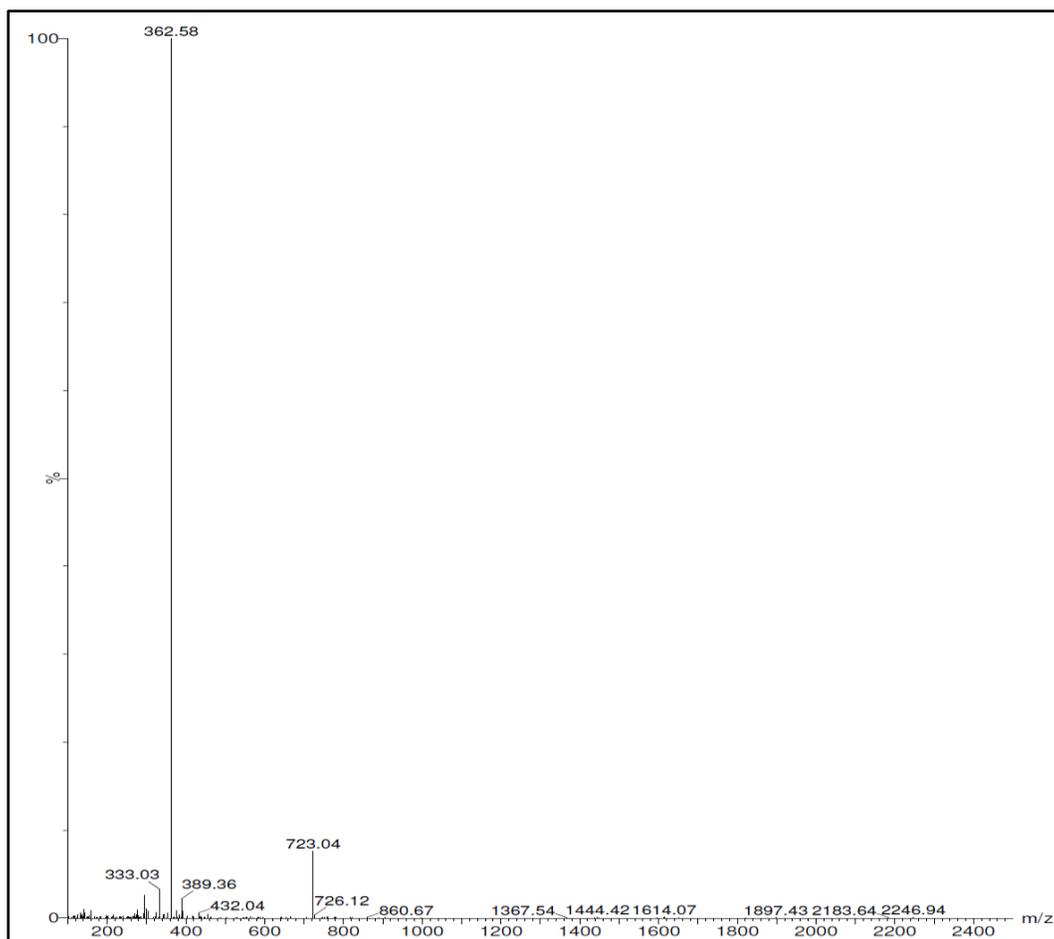


Composé 54. (H)R-Q-hF-R-Kbt

• UPLC

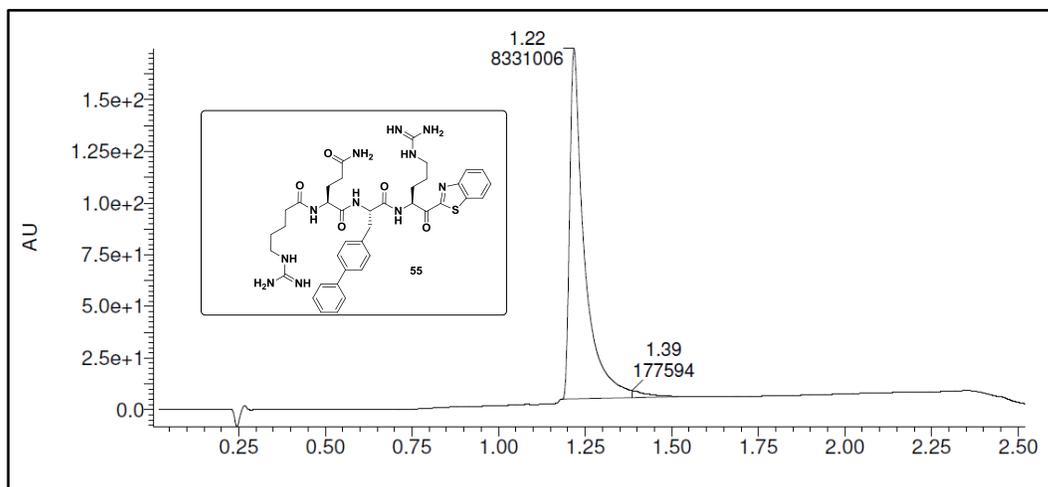


• MS

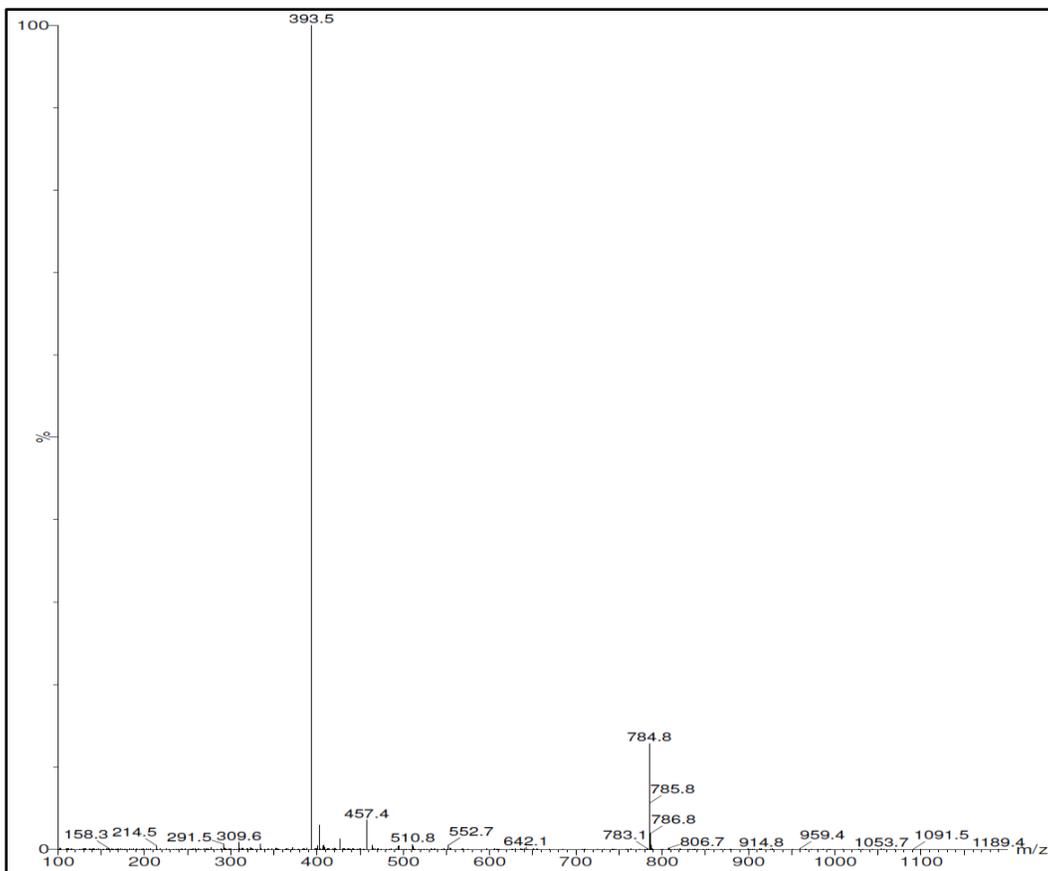


Composé 55. (H)R-Q-Bip-R-Kbt

• UPLC

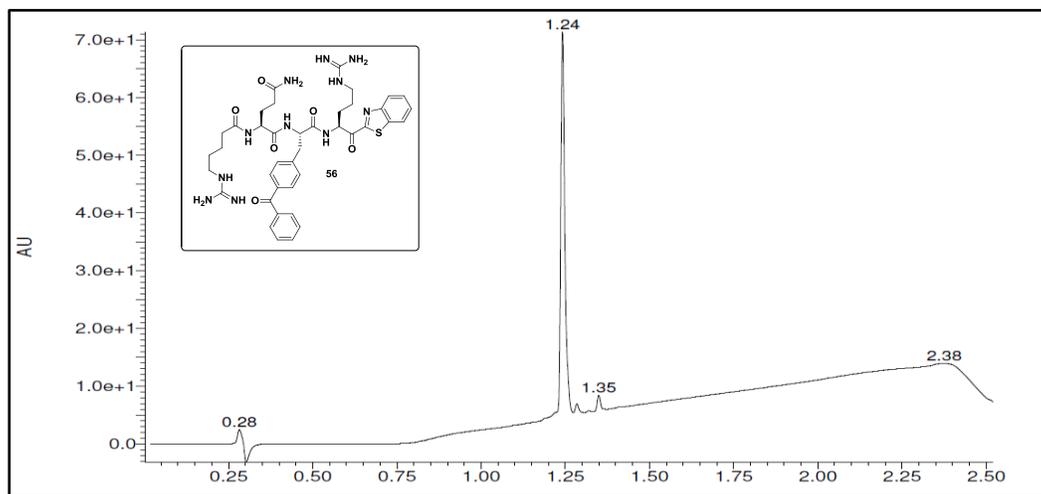


• MS

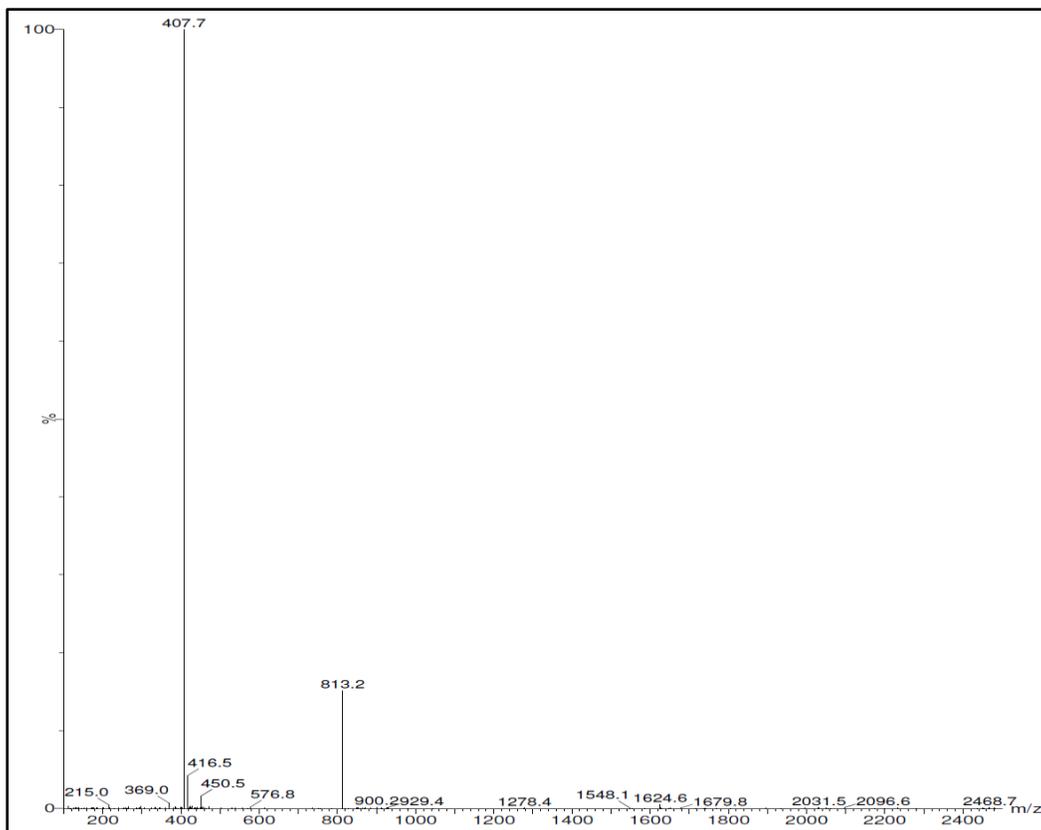


Composé 56. (H)R-Q-Bpa-R-Kbt

• UPLC

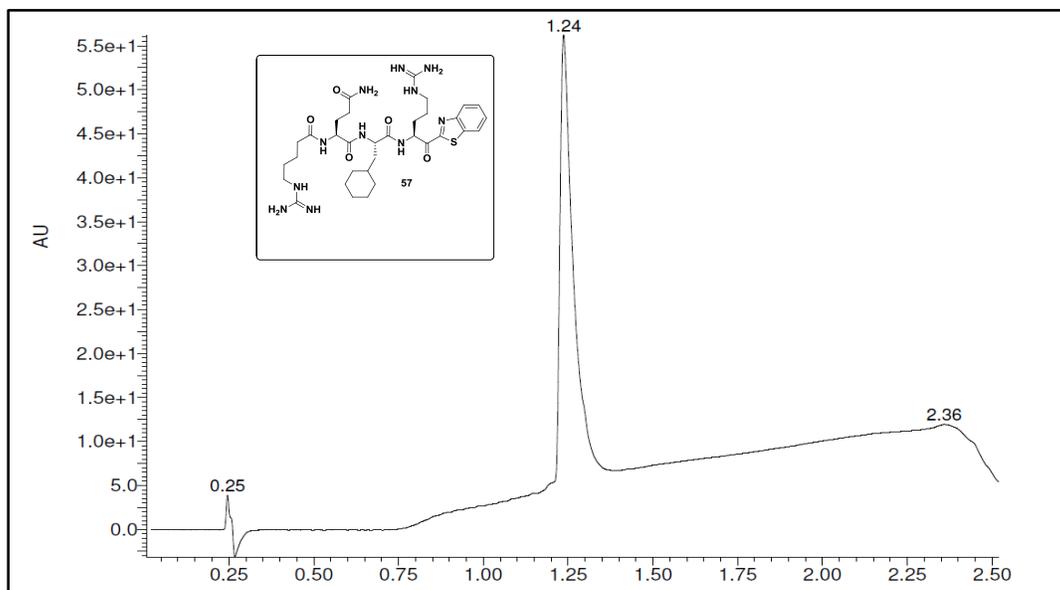


• MS

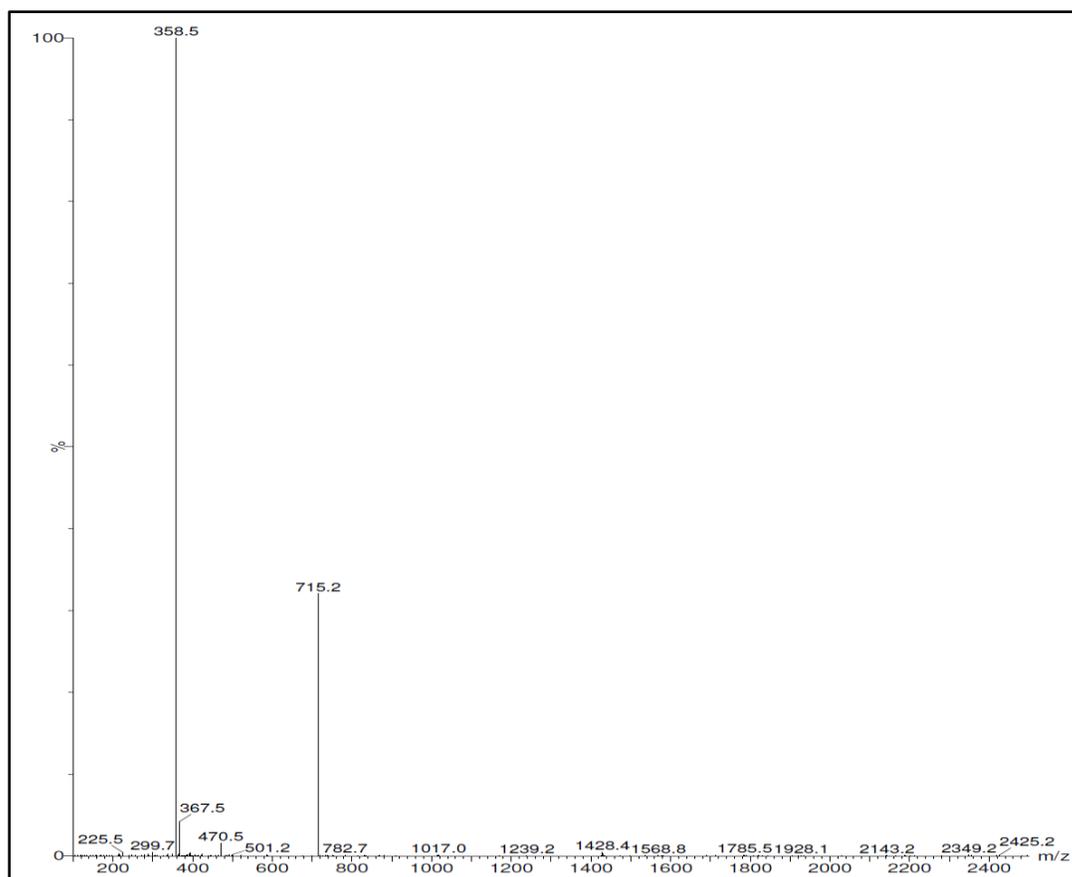


Composé 57. (H)R-Q-Cha-R-Kbt

• UPLC

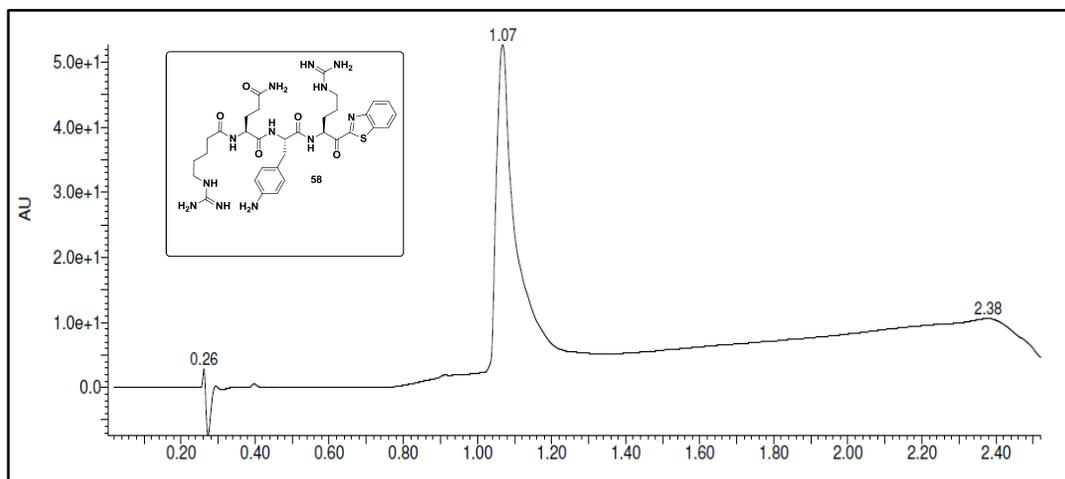


• MS

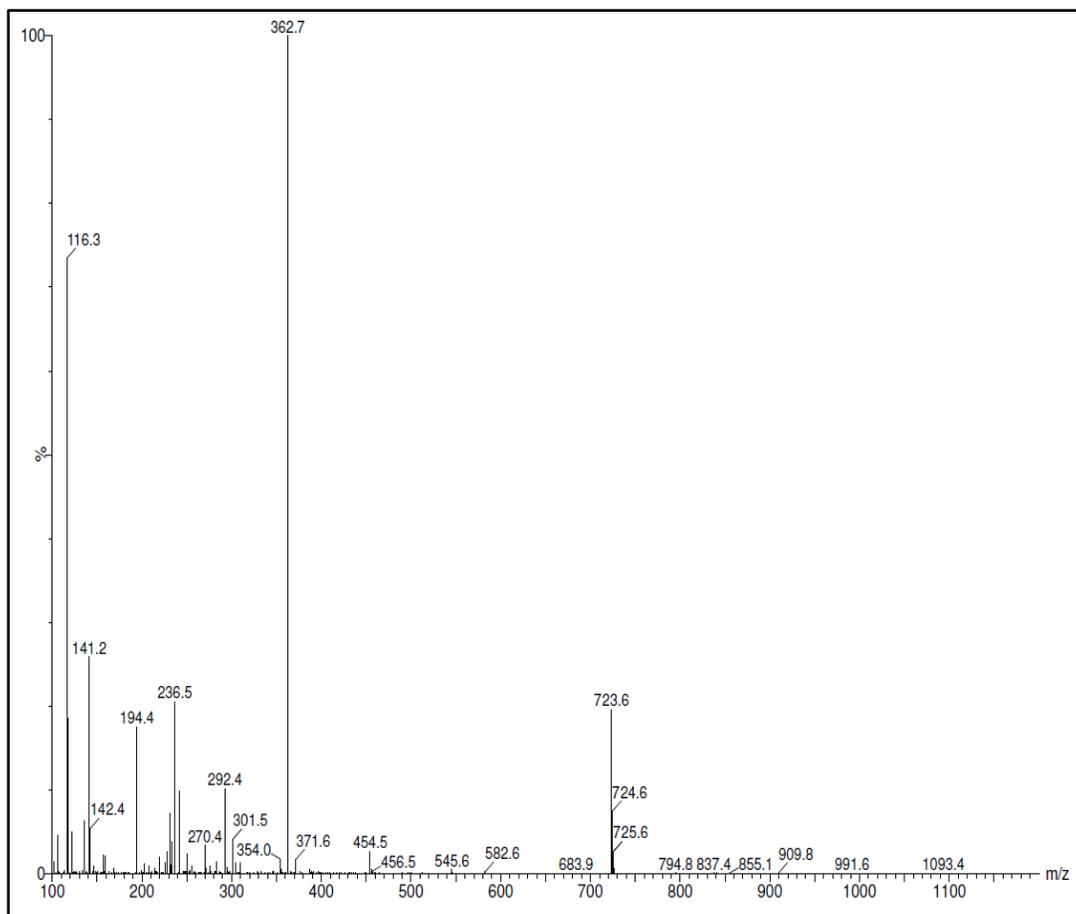


Composé 58. (H)R-Q-F(4NH₂)-R-Kbt

• UPLC

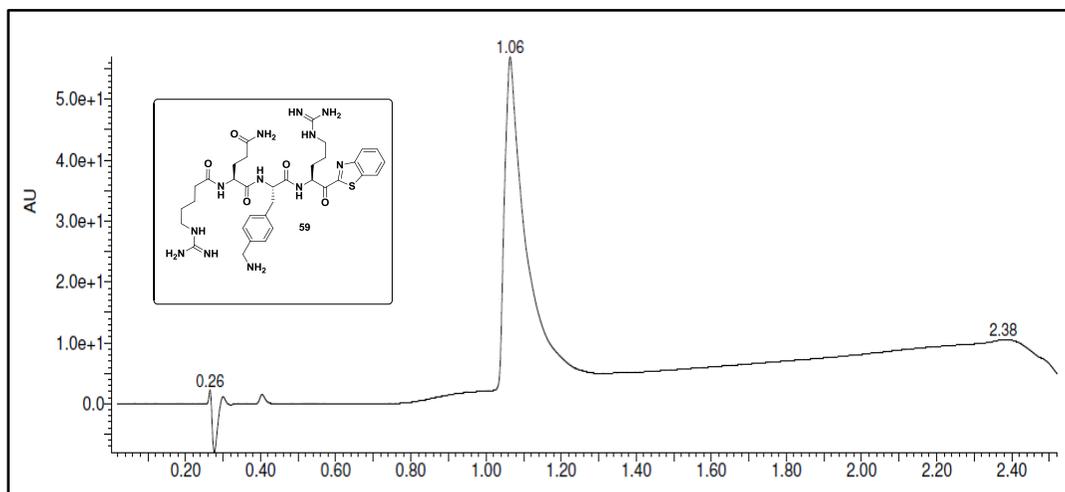


• MS

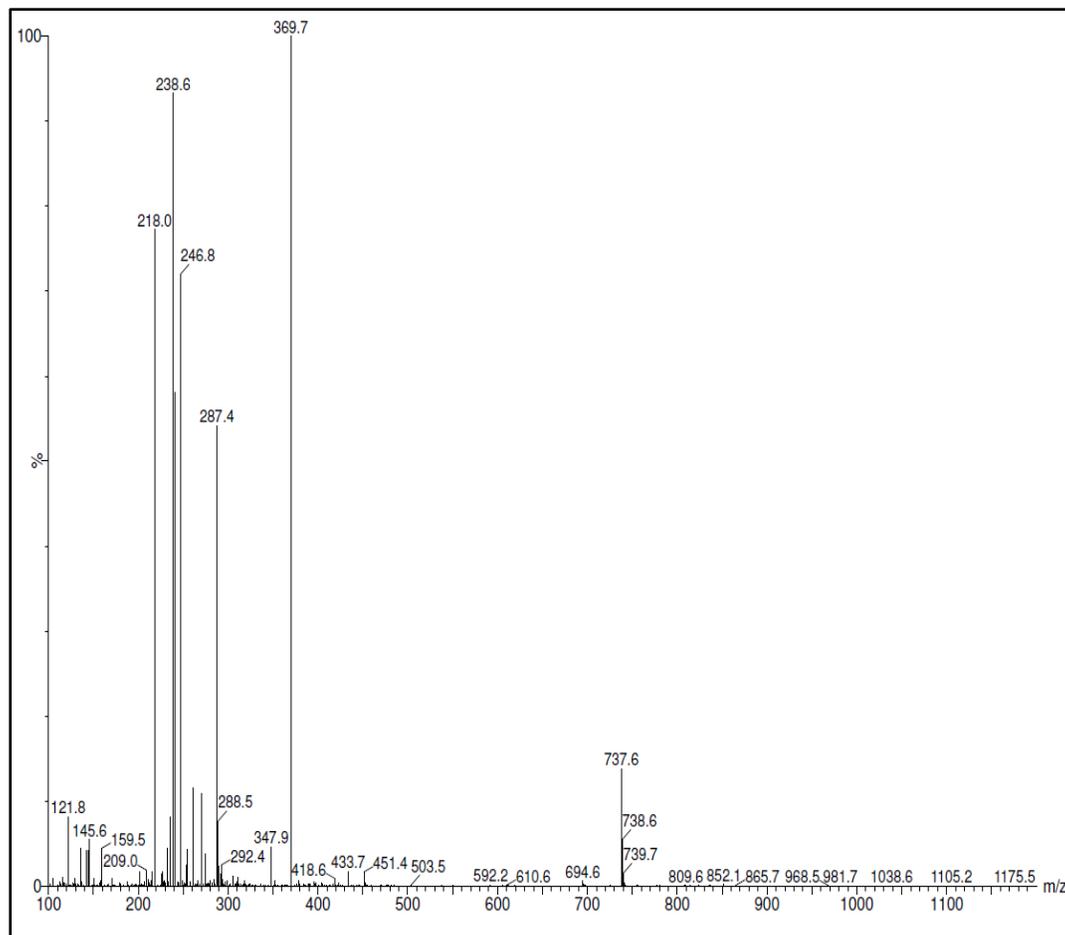


Composé 59. (H)R-Q-F(4CH₂NH₂)-R-Kbt

• UPLC

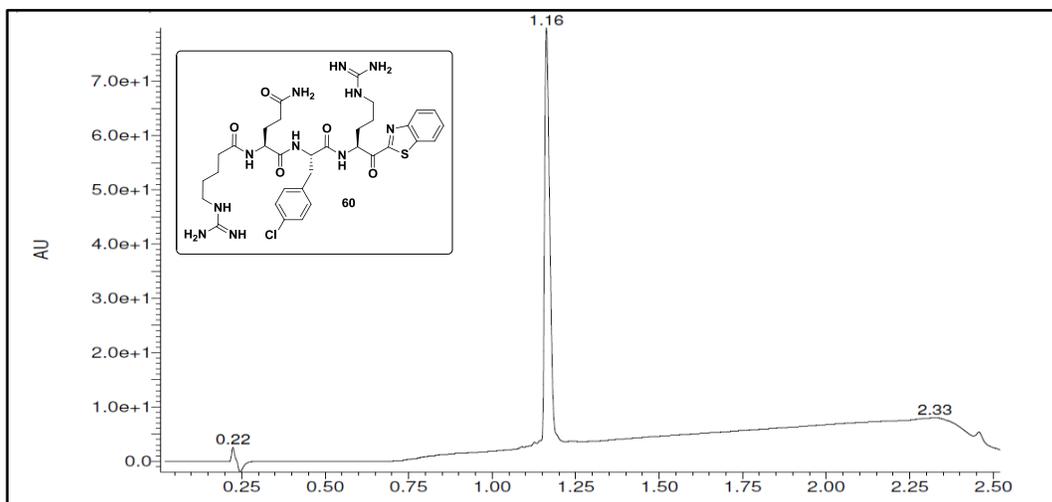


• MS

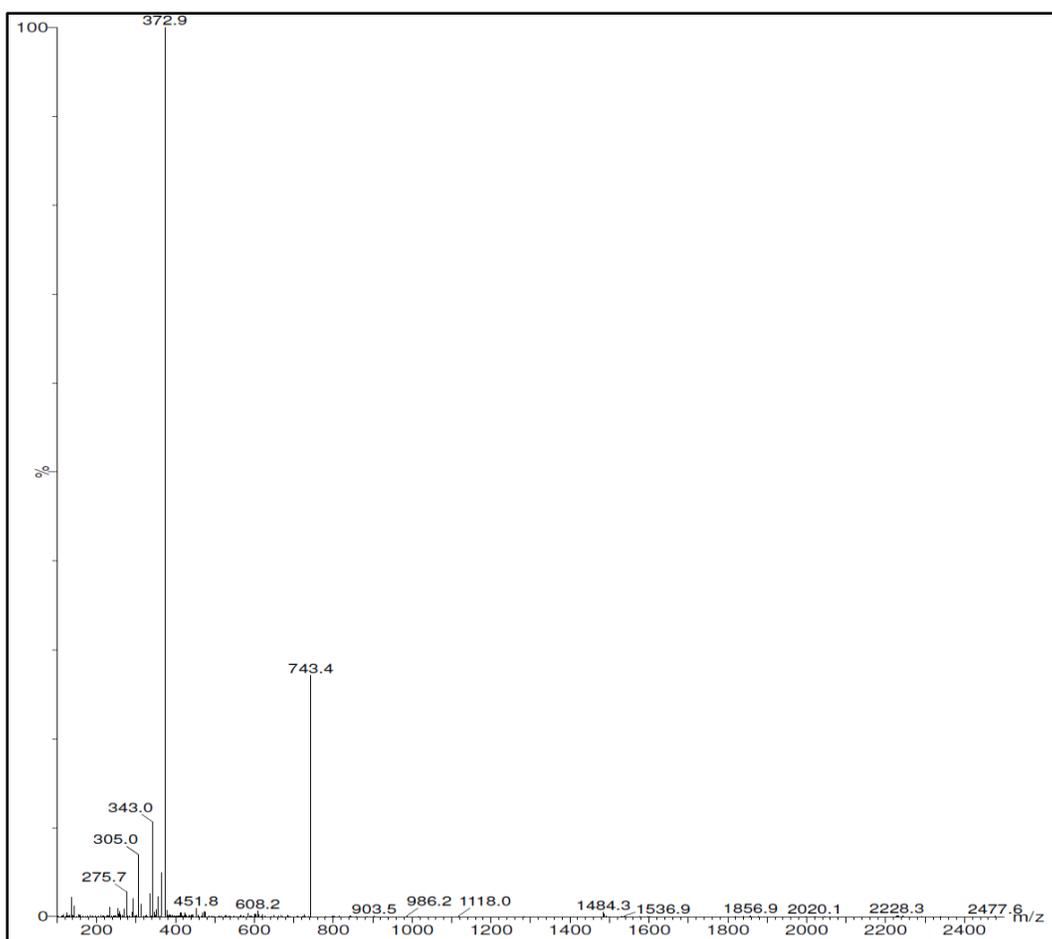


Composé 60. (H)R-Q-F(4Cl)-R-Kbt

• UPLC

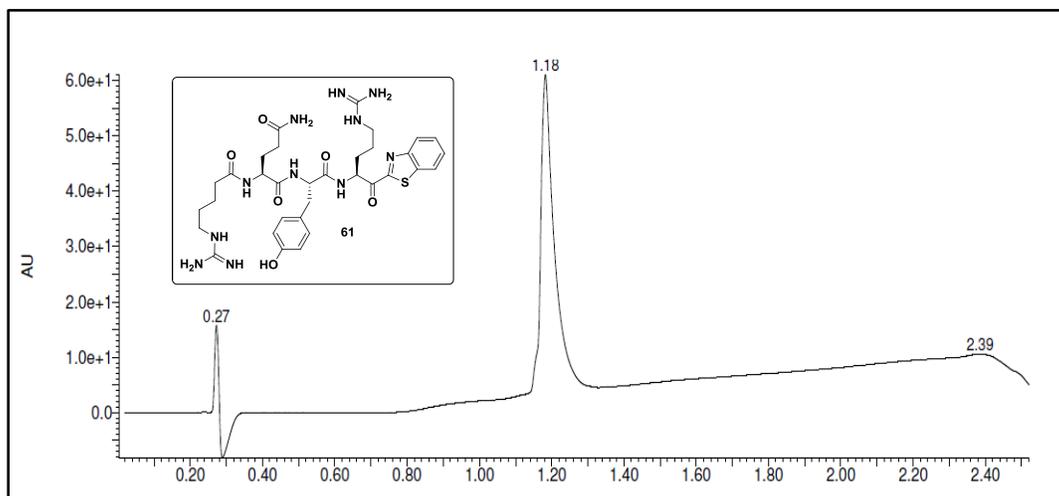


• MS

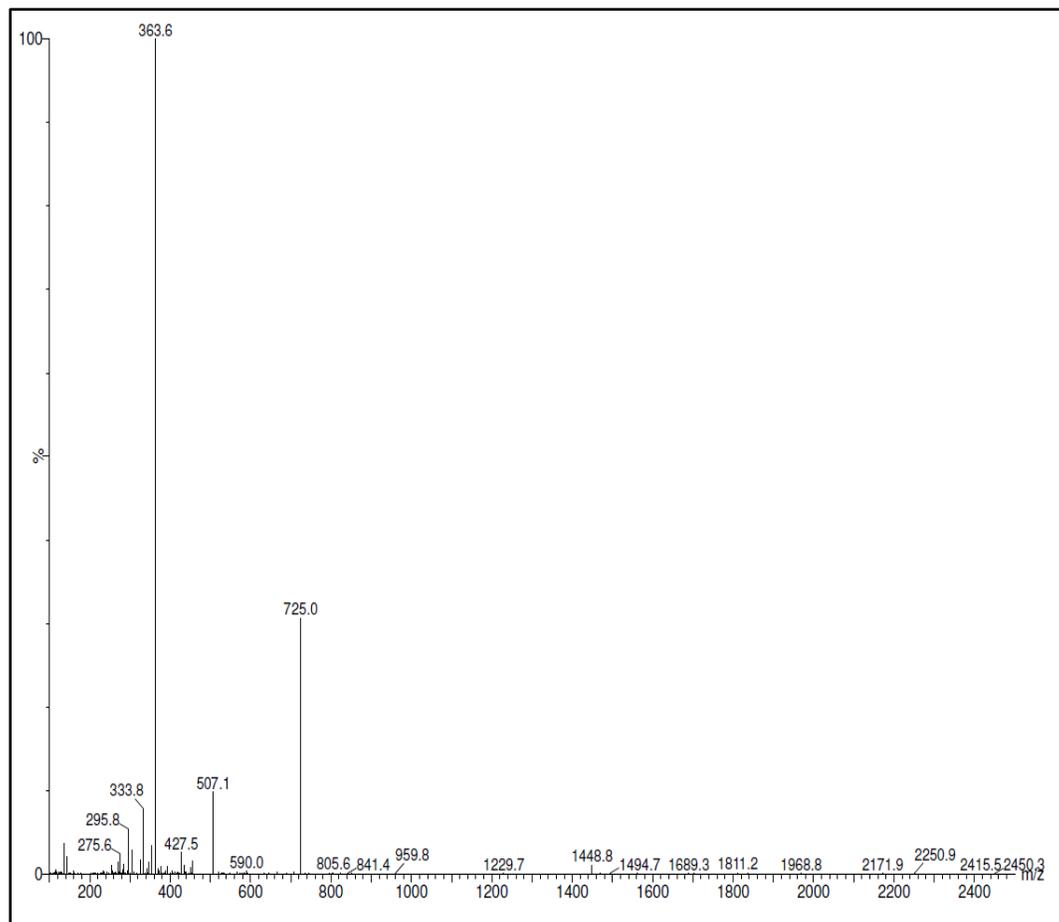


Composé 61. (H)R-Q-Y-R-Kbt

• UPLC

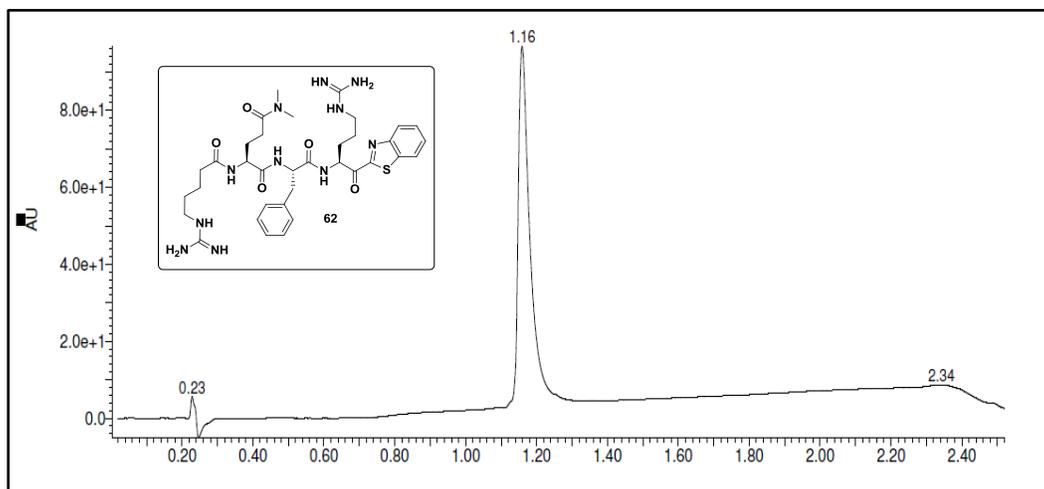


• MS

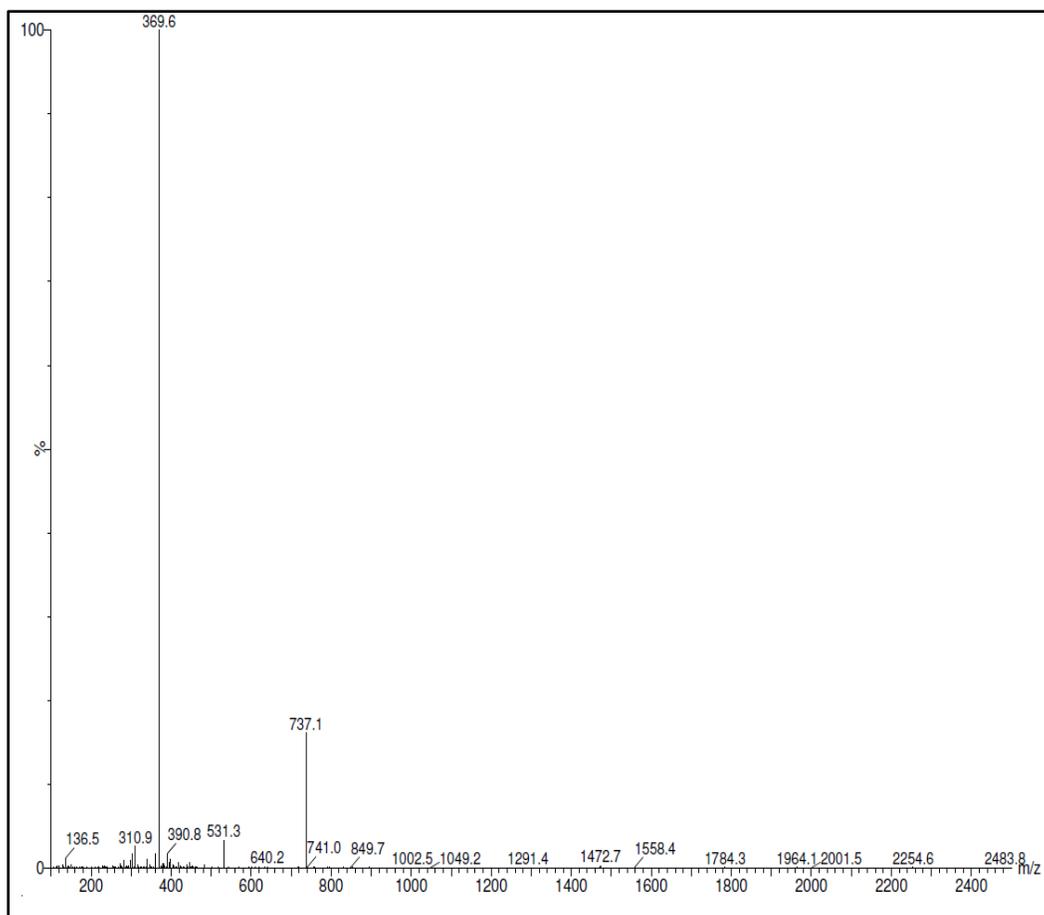


Composé 62. (H)R-Q(N(Me)₂)-F-R-Kbt

• UPLC

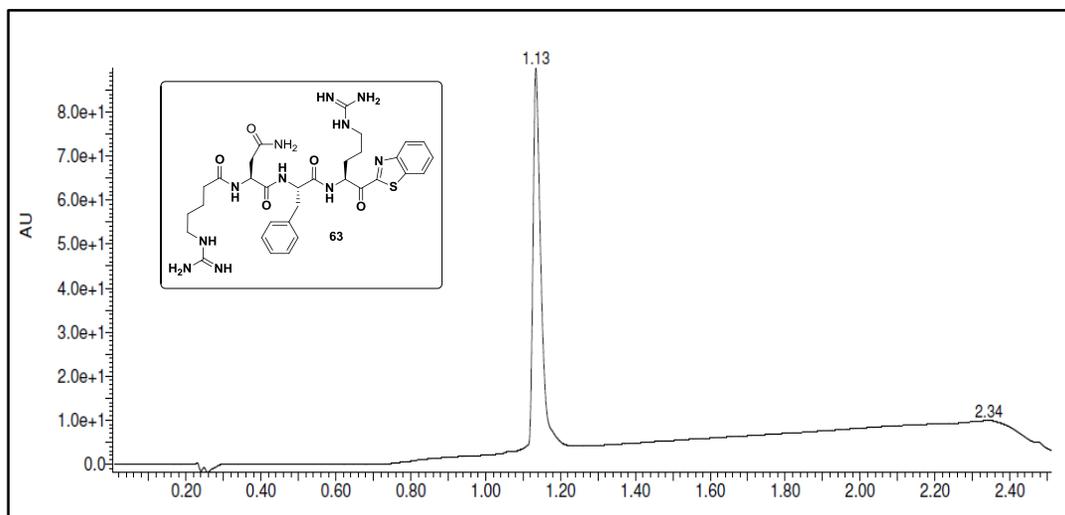


• MS

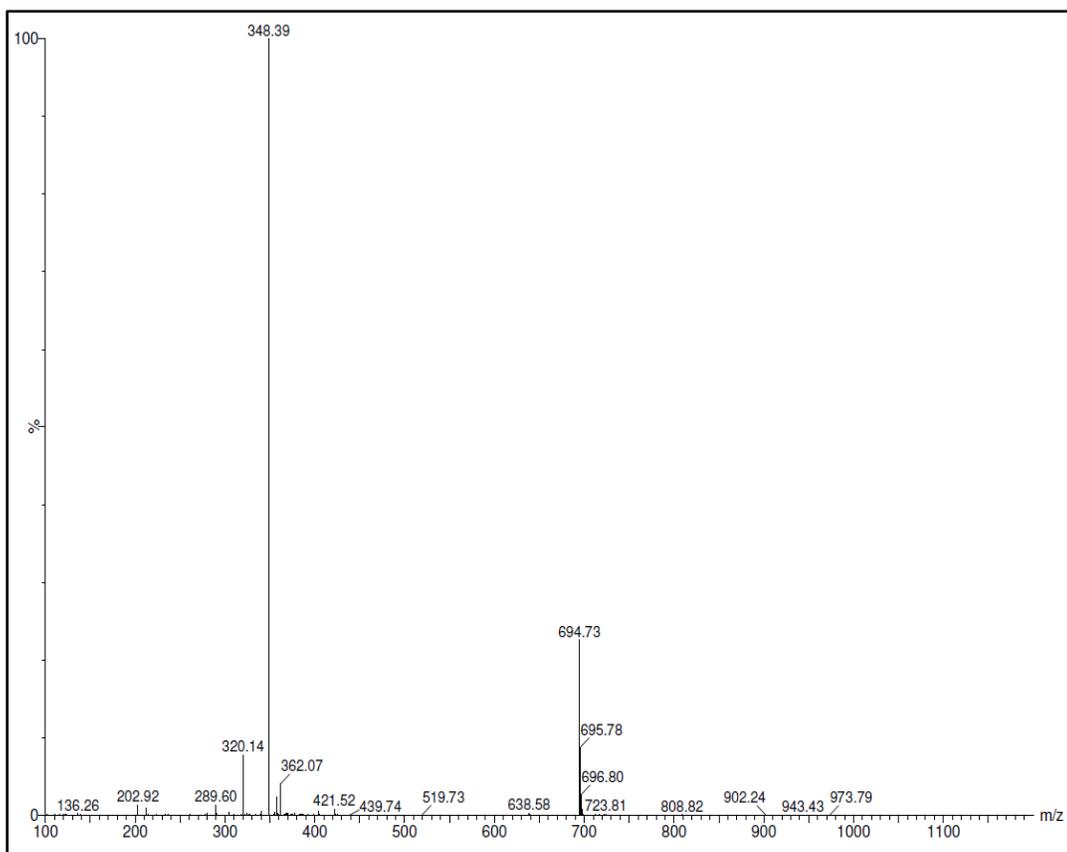


Composé 63. (H)R-N-F-R-Kbt

• UPLC

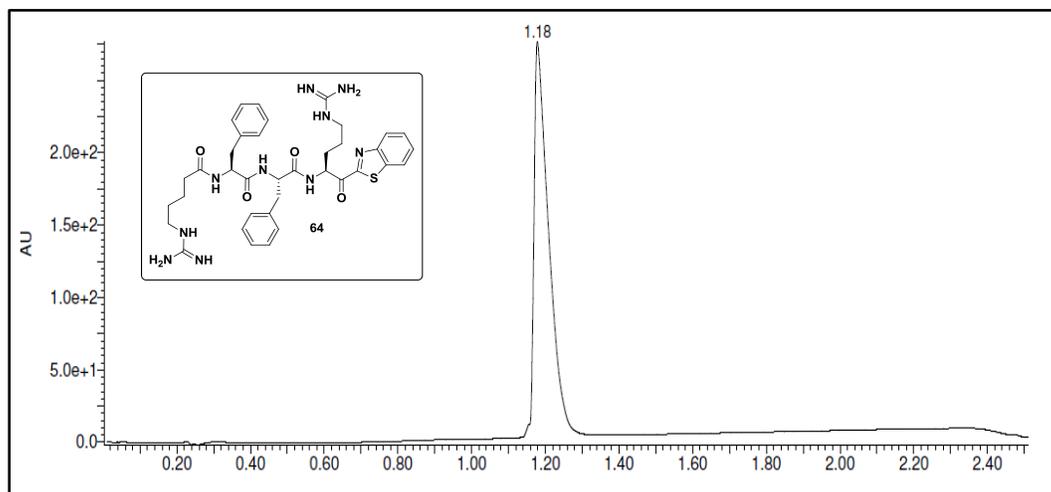


• MS

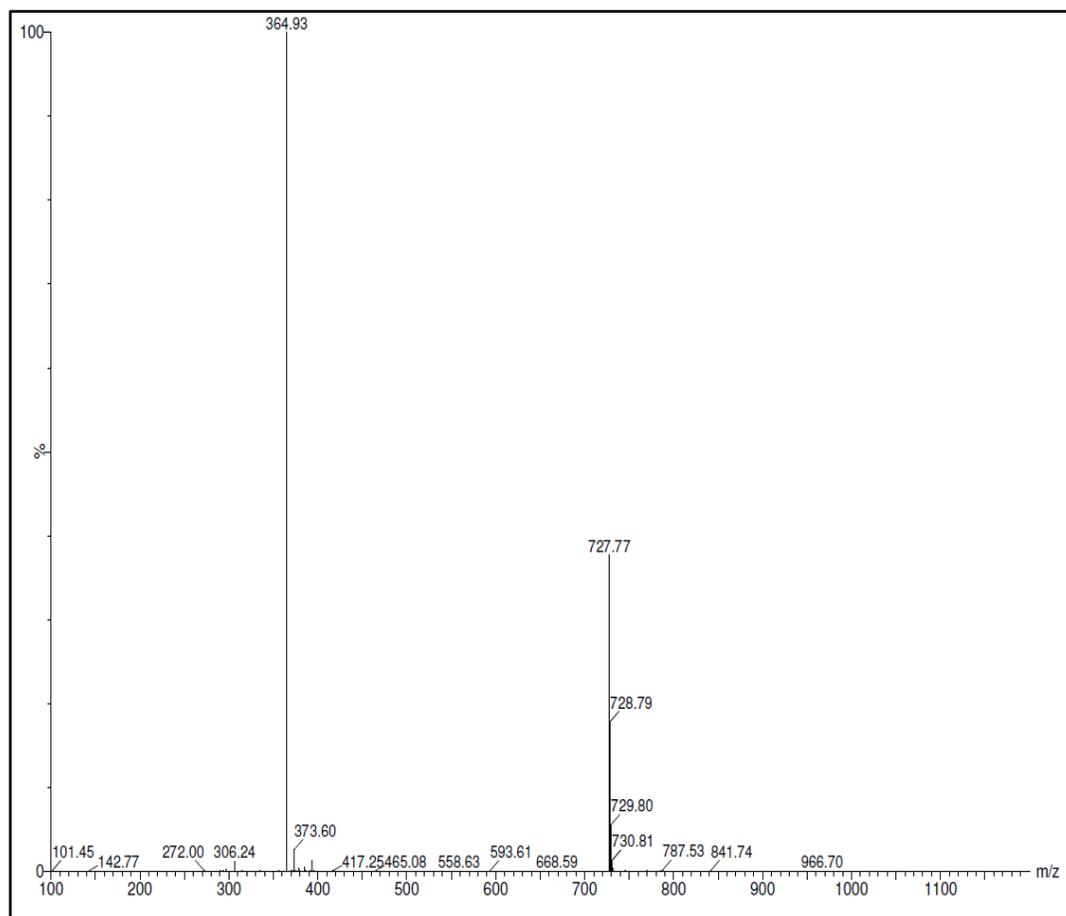


Composé 64. (H)R-F-F-R-Kbt

• UPLC

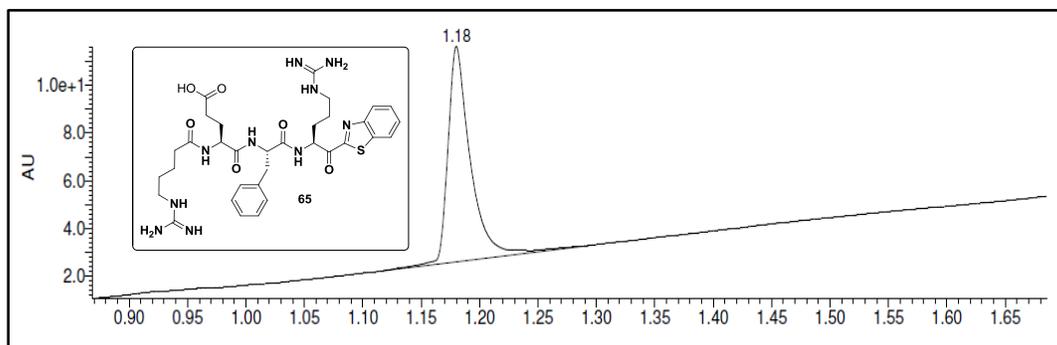


• MS

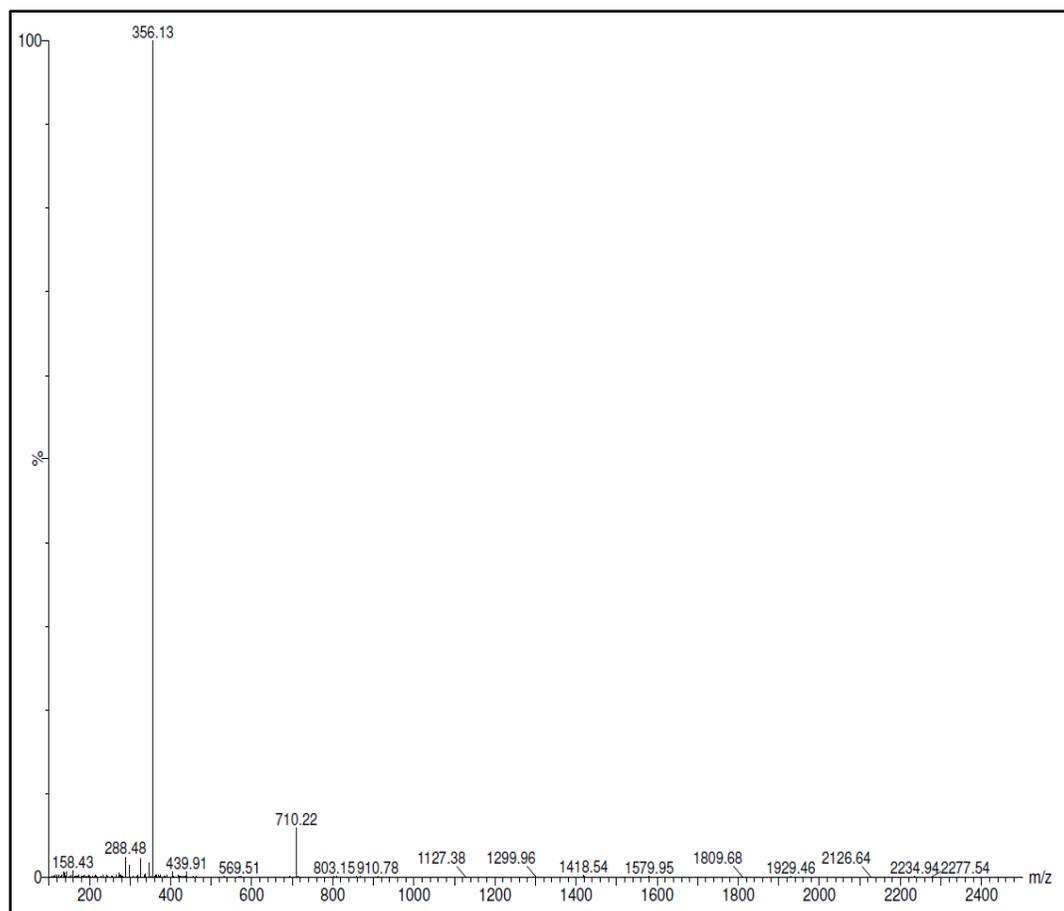


Composé 65. (H)R-E-F-R-Kbt

• UPLC

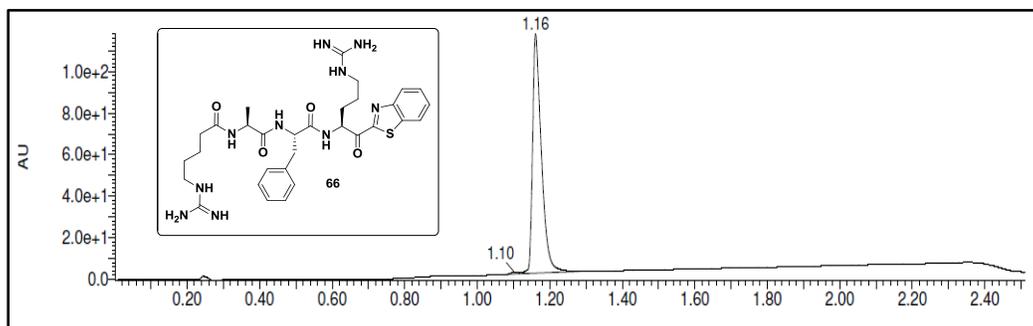


• MS

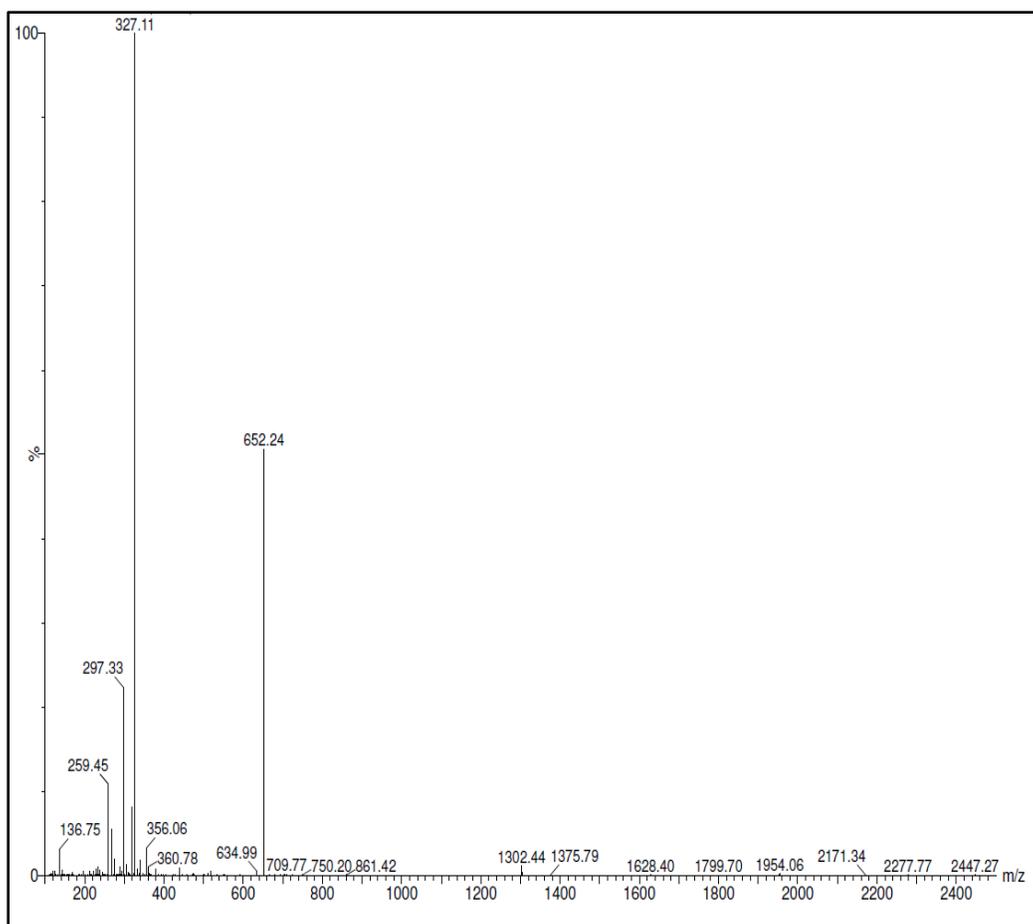


Composé 66. (H)R-A-F-R-Kbt

• UPLC

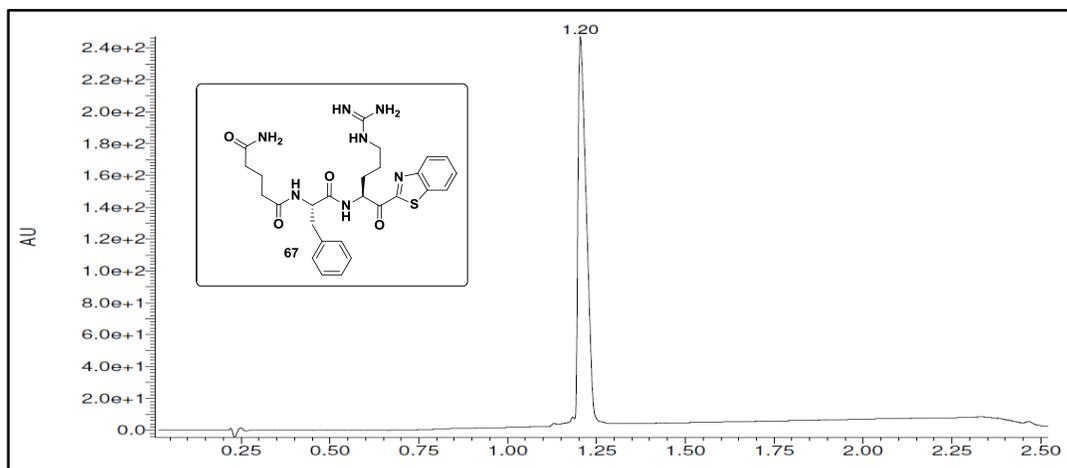


• MS

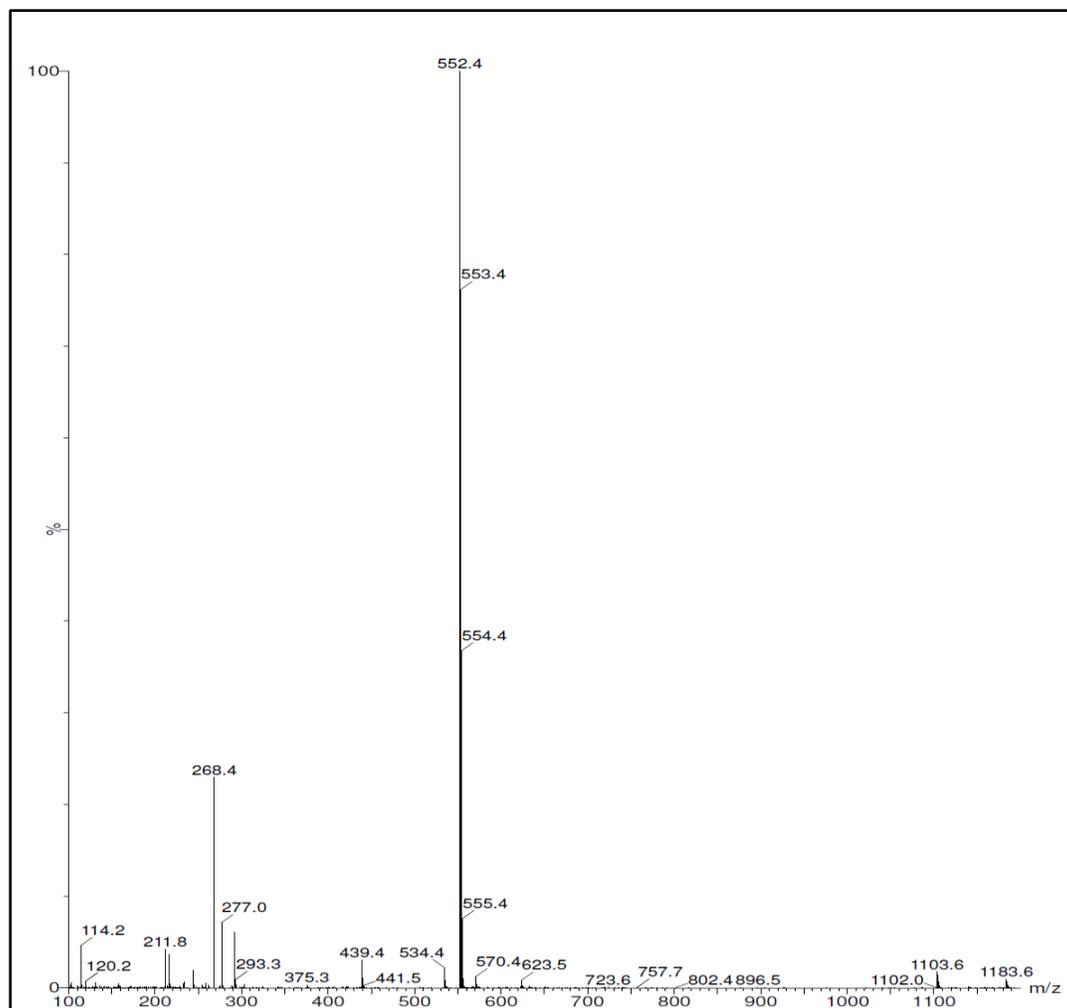


Composé 67. (H)Q-F-R-Kbt

• UPLC

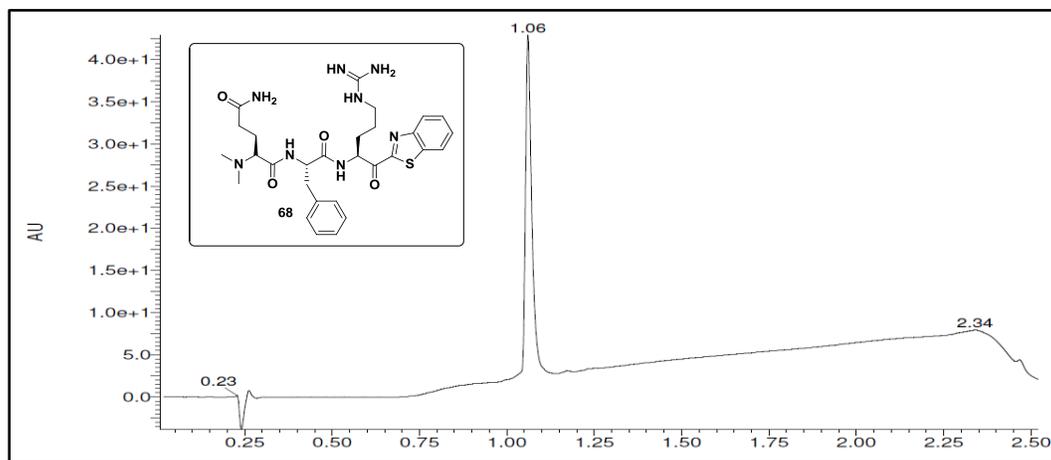


• MS

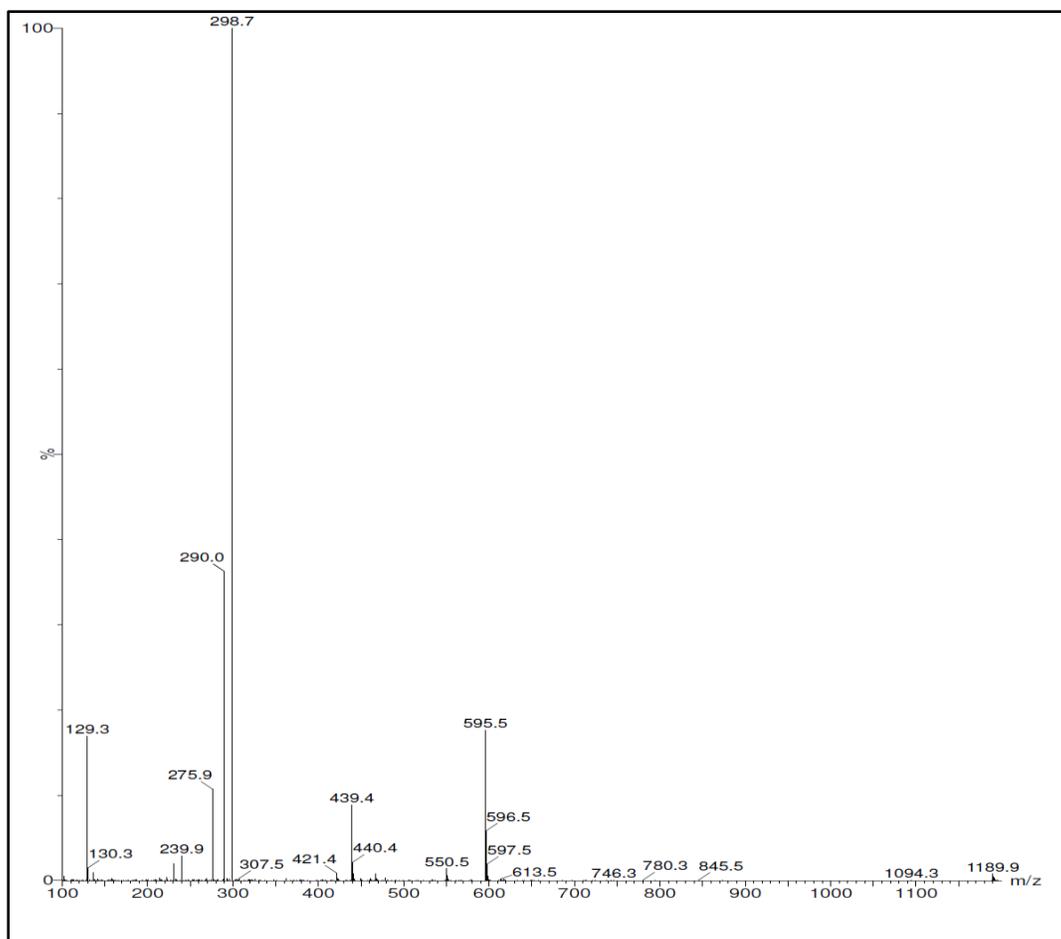


Composé 68. (N(Me)₂)Q-F-R-Kbt

• UPLC

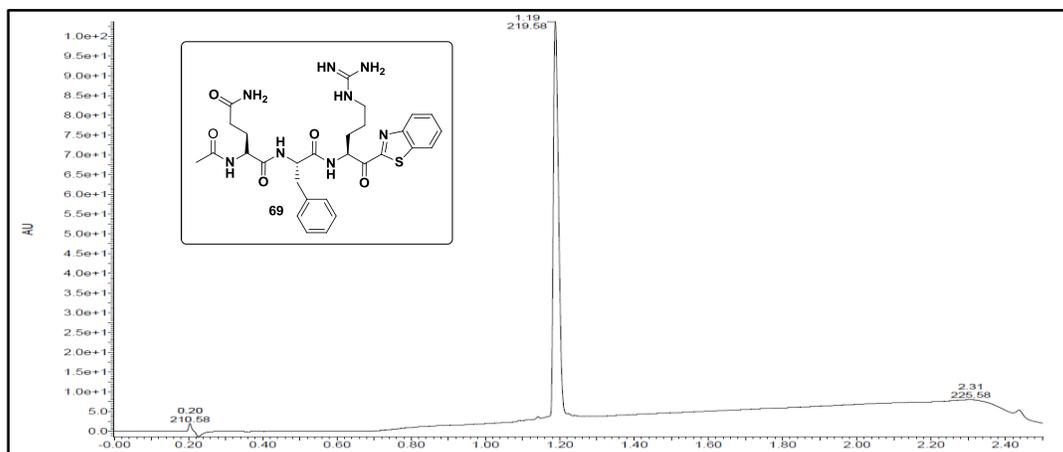


• MS

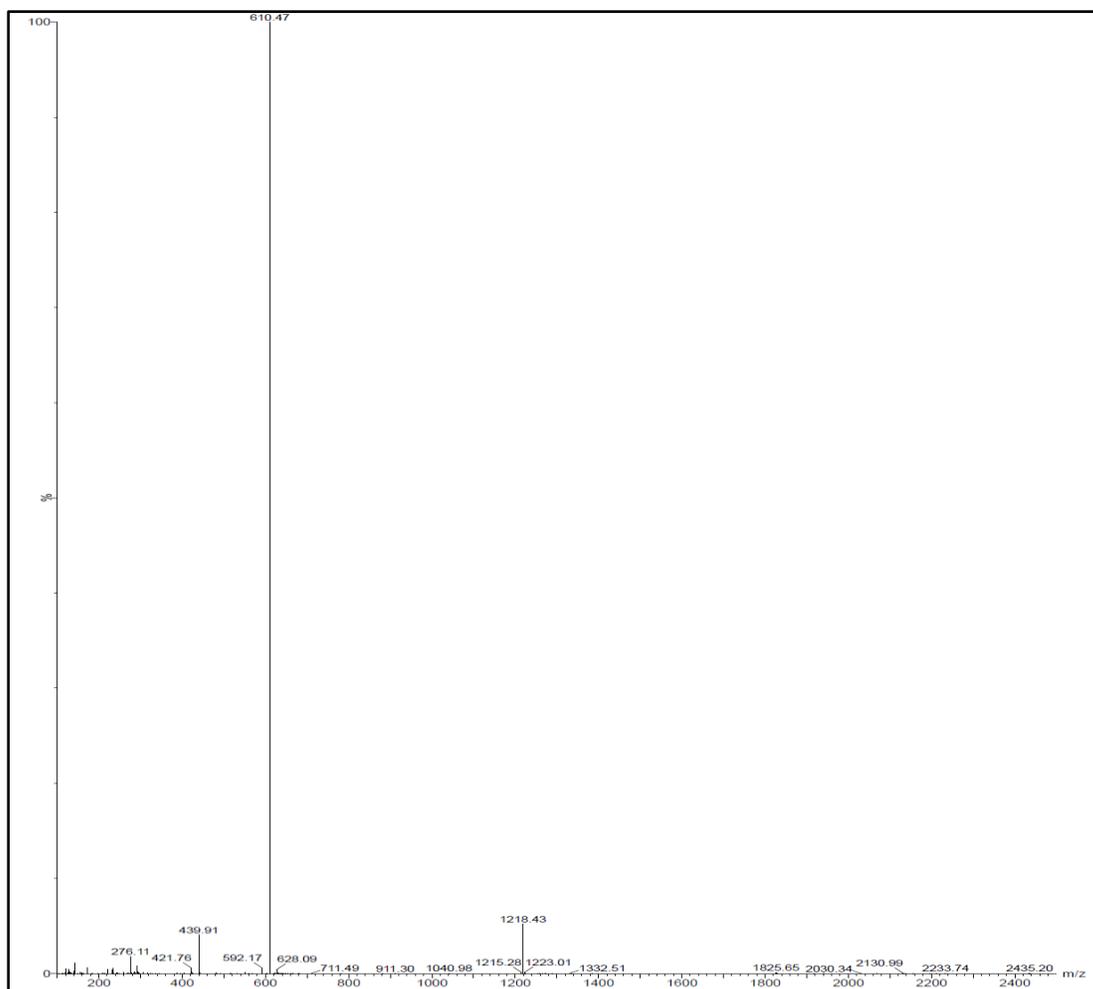


Composé 69. (CH₃CO)Q-F-R-Kbt

• UPLC

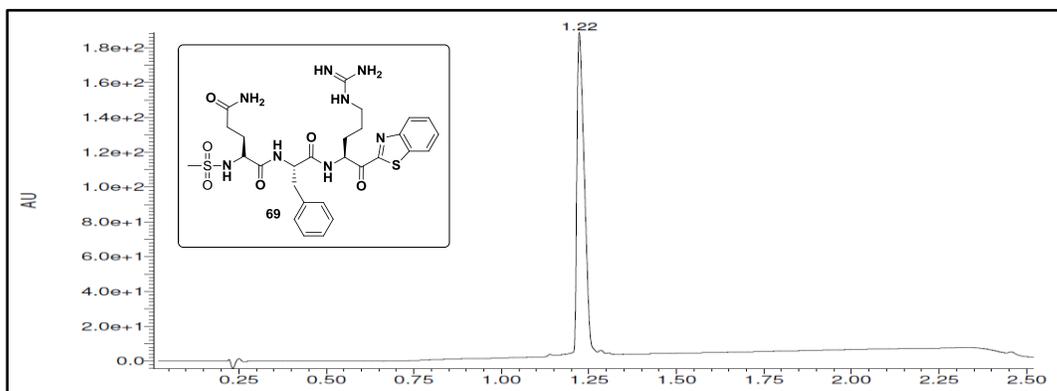


• MS

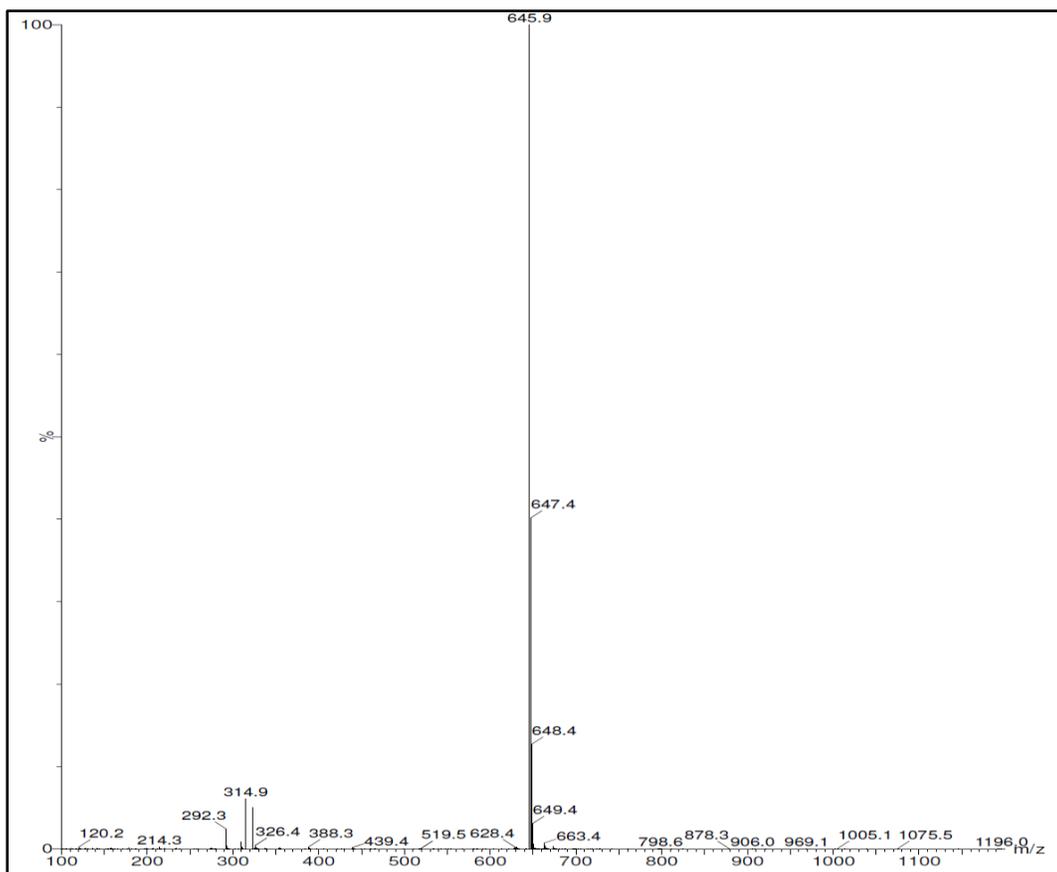


Composé 70. (CH₃SO₂)Q-F-R-Kbt

• UPLC

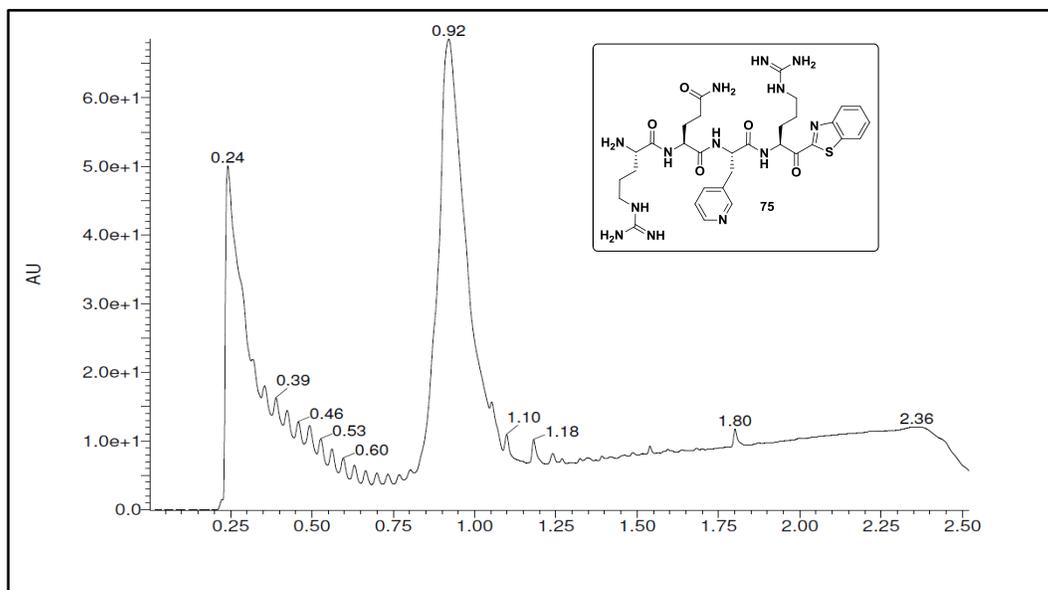


• MS

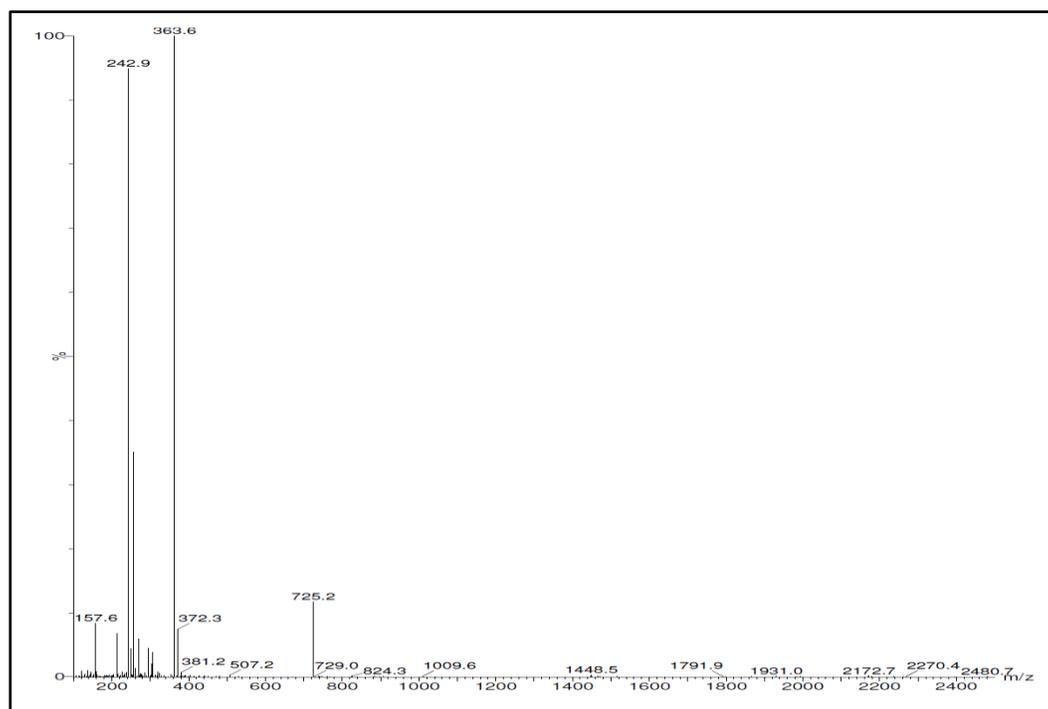


Composé 71. R-Q-3Pal-R-Kbt

• UPLC

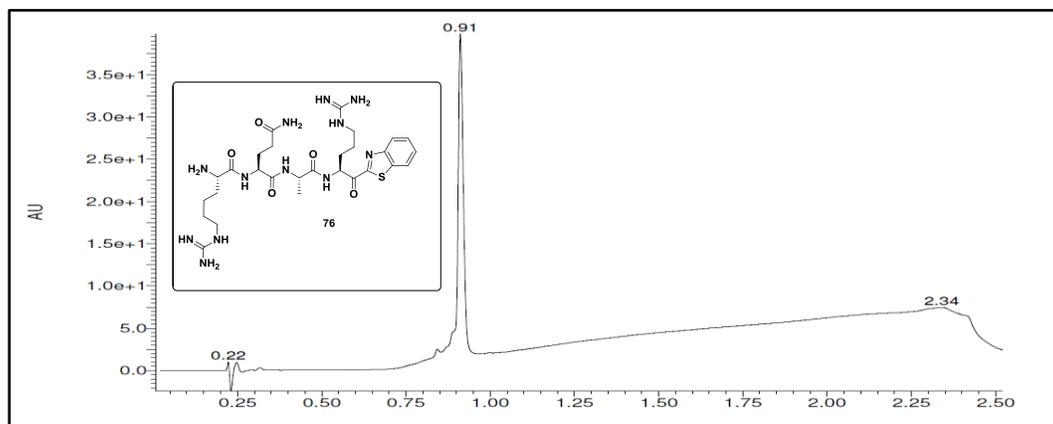


• MS

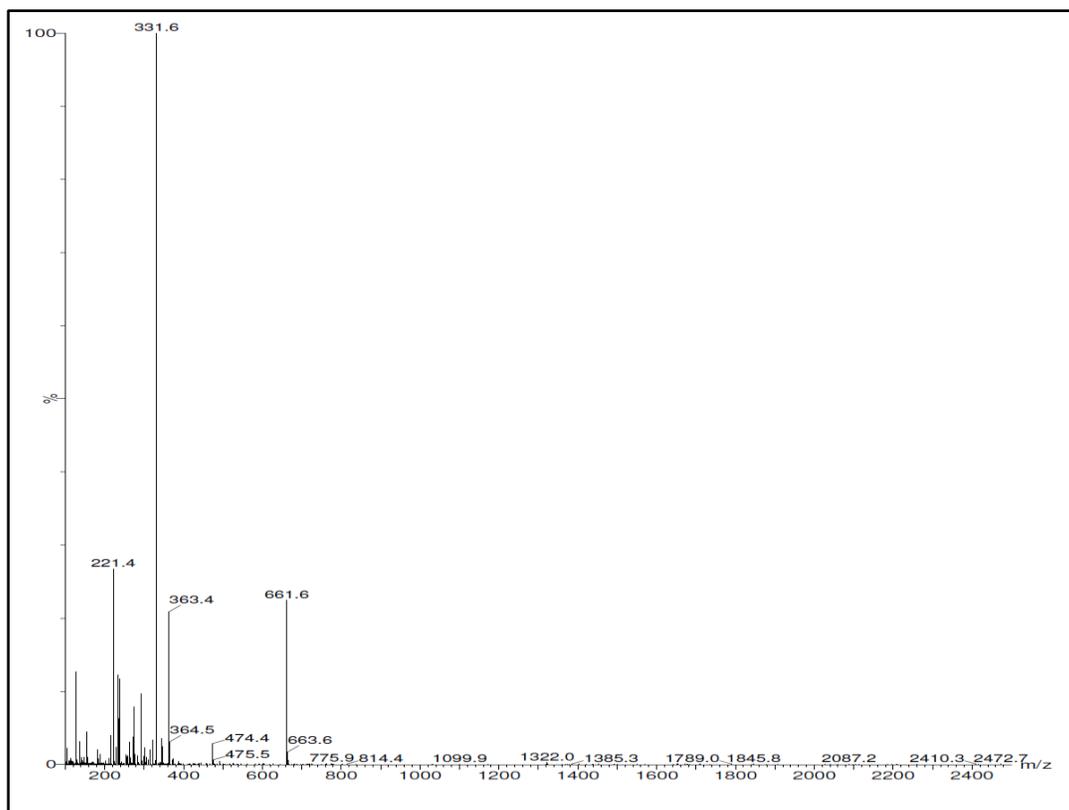


Composé 72. hR-Q-A-R-Kbt

• UPLC



• MS



ANNEXE B

BREVET ISSUS DE CES TRAVAUX

Martin V. Richter, Éric Marsault, Richard Leduc and Éloïc Colombo. Matriptase Inhibitors and uses thereof against orthomyxoviridae infections. WO/2012/162828.

Liste des publications issues de ces travaux

Zoratti, G., Tanabe L., Varela, F.A., Murray, A.S., Bergum, C., Colombo, E., Lang, L., Alfredo Molinolo, A., Leduc, R., Marsault, E., Boerner, J., List, K. (2015). Targeting matriptase in breast cancer abrogates tumor progression via impairment of stromal-epithelial growth factor signaling. *Nature Communications*, 6:6776.

Duchêne, D., Colombo, E., Désilets, A., Boudreault, PL., Leduc, R., Marsault, E., Najmanovich, R.(2014). Analysis of sub-pocket drugability and the détection of potent selective inhibitors for the matriptase-2 human protease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57 (23), 10198-204.

Beaulieu, A., Gravel, E., Cloutier, A., Marois, I., Colombo, E., Désilets, A., Verreault, C., Leduc, R., Marsault, E., M.V. Richter. Matriptase Proteolytically Activates Influenza Virus and Promotes Multicycle Replication in the Human Airway Epithelium. (2013). *Journal of Virology*, 87 (8), 4237-4251.

Colombo, E., Désilets, A., Duchêne, D., Chagnon, F., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Matriptase. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2012, 3 (7), 530–534.

LISTE DES COMMUNICATIONS ISSUES DE CES TRAVAUX

Colombo, E., Boudreault, P.L., Thakur, P., Désilets, A., Béliveau, F., Duchêne, D., Najmanovich, R., Marsault, E., Leduc, R. Development towards potent and selective Matriptase and TMPRSS6 inhibitors. *The XIV International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological*. Septembre 2014, Portoroz, Slovénie.

Colombo, E., Désilets, A., Marois, I., Duchêne, D., Najmanovich, R., Richter, M.V., Leduc, R., Marsault, E. New potent peptidomimetics inhibitors of matriptase for treatment of influenza viruses. *International Proteolysis Society (IPS) Meeting*. Octobre 2013, Le Cap, Afrique du Sud.

Colombo, E., Duchêne, D., Désilets, A., Marois, I., Morisseau, O., Beaulieu, A., Gravel, E., Najmanovich, R., Richter, M.V., Leduc, R., Marsault, E. New matriptase inhibitors as a potential treatment against influenza. *245TH American Chemical Society (ACS) National Meeting*. Avril 2013, Nouvelle-Orléans, Louisiane, État-Unis.

Colombo, E., Désilets, A., Marois, I., Duchêne, D., Najmanovich, R., Richter, M.V., Leduc R. New potent peptidomimetics inhibitors of matriptase for treatment of influenza viruses. *Congrès et exposition de la Société Canadienne de Chimie (CSC)*. Mai 2013, Québec, Québec, Canada.

Colombo, E., Duchêne, D., Désilets, A., Beaulieu, A., Gravel, E., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. New matriptase inhibitors as a potential treatment against influenza. *Congrès du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ)*, 54^{ème} édition. Octobre 2012, Orford, Québec, Canada.

Colombo, E., Désilets, A., Duchêne, D., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. Nouveaux inhibiteurs de la matriptase : Structure, Synthèse, Activité biologique. *Symposium Faculté de Médecine*, 41^{ème} édition, département de pharmacologie, Université de Sherbrooke. Mars 2012, Sherbrooke, Québec, Canada.

Colombo, E., Désilets, A., Duchêne, D., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. Nouveaux inhibiteurs de la matriptase : Structure, Synthèse, Activité biologique. *Journée Phare 2011*, 3^{ème} édition. Novembre 2011, Orford, Québec, Canada.

Colombo, E., Désilets, A., Duchêne, D., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. Nouveaux inhibiteurs de la matriptase : Structure, Synthèse, Activité biologique. *Congrès du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ)*, 53^{ème} édition. Septembre 2011, Saint-Adèle, Québec, Canada.

Colombo, E., Chagon F., Désilets, A., Duchêne, D., Najmanovich, R., Leduc, R., Marsault, E. Synthesis of new potent and selective peptidomimetic inhibitors of matriptase. *Congrès et*

exposition de la Société Canadienne de Chimie (CSC), 93ème édition. Juin 2010, Montréal, Québec, Canada.