



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Chimie-Biologie-Santé*

Présentée et soutenue par *HO-A-KWIE Franciane*
Le 11 Mai 2009

Titre : *Histones Acétyltransférases : Conception, synthèse et étude d'inhibiteurs*

JURY

Pr. FALLER Peter
Pr. PLOUX Olivier
Dr. BADET Bernard
Dr. BLONSKI Casimir

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences De la Matière*

Unité de recherche : *Laboratoire de Synthèse et Propriétés physicochimiques de Molécules d'Intérêt Biologique_UMR 5068_Université Toulouse III - 118 Route de Narbonne - 31062 Toulouse cédex 9*

Directeur(s) de Thèse : *BLONSKI Casimir*
Rapporteurs : *Pr. PLOUX Olivier ; Dr. BADET Bernard*

Auteur : HO-A-KWIE Franciane

Titre : Histones Acétyltransférases : Conception, synthèse et étude d'inhibiteurs

Directeur de thèse : Blonski Casimir

Soutenue le 11 Mai 2009 à l'Université Toulouse III- Paul SABATIER (France)

L'ADN contenu dans les cellules eucaryotes se complexe avec des protéines nommées histones, et l'ensemble forme une structure compacte appelée chromatine. Ces histones subissent diverses modifications post-traductionnelles afin que l'ADN soit accessible et que l'expression des gènes soit possible. Ces modifications incluent la réaction d'acétylation catalysée par les histones acétyltransférases (HATs). Ces enzymes sont impliquées dans divers processus cellulaires et fonctionnent principalement comme co-activateurs transcriptionnels. Or, la dérégulation de l'acétylation et/ou l'altération génétique des HATs sont à l'origine de diverses maladies et notamment de cancers. Ces enzymes constituent une cible potentielle pour des thérapies anticancéreuses. Le travail de recherche effectué durant cette thèse a abouti à la conception et à l'évaluation d'inhibiteur de deux HAT, p300 et PCAF, appartenant à deux familles différentes.

Mots-Clés : Histone Acétyltransférase, p300, acétylation histone, inhibiteur bi-substrat

Discipline : Chimie-Biologie-Santé

A Mathieu et Rose-Marie HO-A-KWIE

Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction de Blonski C.

Je tiens à remercier le Pr Faller, le Pr Ploux et le Dr Badet de s'être intéressé à mon travail et de l'avoir jugé.

Je remercie Mr Baltas pour son accueil au sein du SPCMIB et pour son implication dans ma thèse. Je remercie Mr Martino, pour sa patience, sa disponibilité, son aide et ses conseils dans les moments difficiles.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Vincent guillou, Chantal Zedde, Marie Maturano, aux personnes du service RMN et de spectrométrie de masse pour leur gentillesse et leurs précieux conseils.

Merci à Valérie Jullian, tes encouragements m'ont mené sur le chemin du doctorat. Merci à Igor, qui, malgré la distance m'a toujours encouragé. Merci à Lucia, Bénédicte et Amélie des docteurs si heureuses pendant leurs thèses qu'elles m'ont donnée envie de faire pareil.

.....
Merci à Pascal hoffmann qui a toujours eu le conseil qu'il faut quand il faut. Merci à Colette Denier d'avoir partagé ses connaissances et sa gaieté avec moi !

Un grand merci à Martine Briet, grâce à qui j'ai obtenu 2/3 de mes résultats ! La biologie conté par toi a des allures de contes de fée ! Je te suis extrêmement reconnaissante.

Je te remercie, ô grande Cécile BAUDOIN pour avoir été un véritable mentor, une source de sagesse, d'encougement et une encadrante hors pair !!!! Merci également à Jérémie, mon petit stagiaire, je garde un bon souvenir de toi !

Thank you dear Christian LHERBET, because you've been so brave during all these years. I've been your PhD student too, and you took responsibility for that. You taught me so many things, I owe you one.

Merci à Cyrilinouet (alias Mr Inard), un puits de savoir caché derrière une cagoule et un pistolet à eau... Je n'oublie pas ton aide si précieuse surtout à la fin de mon périple.

Merci à Fred Rodriguez, tu es celui qui m'a fait comprendre que j'avais progressé... eh oui... à mon arrivée je ne saisisais rien à ce que tu disais et à la fin, je parlais le « Fred » !!!!

Merci à Eric Benoist, guide spirituel, « metteur de coup de pied aux fesses » pour la bonne cause ! Tu es quelqu'un de bien et j'espère que la flamme qui t'anime ne s'éteindra pas.

Sandra D., ahhh Sandra, que dire. Si j'avais une jumelle, elle s'appellerait Sandra. La thèse est une mini vie qui a ses hauts et ses très bas. Tu as été là quand j'étais tout en haut et tout en bas. Merci d'avoir été une amie au delà du laboratoire. (Ps : on aura toujours des choses à oublier Mdr)

Merci aux « anciens » & Co : Laurent C., Angélique DDM., Virginie V., Caroline L., Léïla I. Sabine G. Faire votre connaissance a été un réel plaisir ! Vous étiez là au début et m'avez montré comment résister au stress de la thèse...

Merci à mes sœurs (Eveline, Marlène, Guylène), mes frères (Emile, Roland, Sylvain, Jano) mes oncles et tantes. Mo pa gain papa, mo pa gain manman, mè mo fanmille toujou la pou mo. Mo sur ki zot fièr di mo.

Tu es le dernier arrivant de cette aventure, mais pas un des moindres. Tu m'as supportée avec le sourire et tu as tenu jusqu'au bout ! A mon homme, JYB.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE I.....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. La chromatine	19
1. Le nucléosome et les degrés de compaction supérieurs.....	20
2. Les histones.....	21
2.1 Le cœur d’histones.....	21
2.2 La région inter-nucléosomale : l’histone H1	23
2.3 Les parties N-terminales des histones	24
II. Les facteurs de remodelage de la chromatine	26
1. Les complexes de remodelage ATP-dépendant	26
2. Les modifications post-traductionnelles des histones	28
2.1 L’acétylation	30
2.2 La méthylation des histones.....	32
(a) La méthylation des arginines.....	32
(b) La méthylation des lysines	34
(c) La déméthylation des lysines	35
2.3 La phosphorylation des histones.....	36
2.4 L’ubiquitinylation.....	36
2.5 Mais encore.....	37
3. L’hypothèse du « code histone ».....	38
III. Les histones acétyltransférases (HATs).....	39
1. La famille p300/CBP	39
2. La famille GNAT.....	46

3. La famille MYST	51
4. Quelques autres HATs	53
IV. Les histones désacétylases (HDACs)	55
V. HATs et pathologies associées.....	56
VI. Objectifs du projet.....	58
CHAPITRE II	61
SYNTHESE D'INHIBITEURS DE L'ACTIVITÉ HAT DE P300.....	61
I. Revue bibliographique des inhibiteurs de HATs	63
1. Les inhibiteurs conçus selon une approche rationnelle.....	63
(a) Les spermidine-CoA	63
(b) Lys-CoA, H3-CoA-20 et dérivés.....	66
(c) H4K16-CoA	71
2. Les inhibiteurs d'origine naturelle.....	72
(a) L'acide anacardique et ses dérivés.....	72
(b) Le garcinol et ses dérivés	75
(c) Le curcumin et ses dérivés	77
(d) Autres dérivés des molécules naturelles	79
3. Les inhibiteurs issus de criblage	79
4. Récapitulatif.....	81
II. Synthèse de nouveaux effecteurs de type bi-substrat	83
1. Objectifs de synthèse	84
2. Stratégie de synthèse des nouveaux effecteurs.....	86
III. Synthèse des spermidine-CoA 1a et 1b	88
IV. Synthèse des diamine-CoA linéaires et cycliques.....	94
1. Monoprotection des diamines.....	94
(a) Par le groupement tert-butyloxycarbonyle.....	94
(b) Par le groupement benzoyle.....	95

2. Couplage à l'espaceur.....	97
3. Couplage au coenzyme A.....	99
4. Déprotection des dérivés protégés par le groupement Boc.....	102
V. Synthèse de Lys-CoA.....	103
VI. Conclusion.....	107
CHAPITRE III.....	109
PRODUCTIONS ET PURIFICATIONS D'HISTONES ACETYLTRANSFÉRASES.....	109
I. Introduction.....	111
II. Description des méthodes utilisées.....	111
1. Méthode de purification des enzymes de fusion.....	111
2. Détection de l'activité HAT.....	113
3. Témoins positifs et négatifs.....	115
III. Mise au point de la production de p300 (1284-1660).....	116
1. Protocole de référence.....	116
2. Production de p300 (1284-1660) avec le protocole de référence.....	119
3. Influence de la souche bactérienne sur la production de p300 (1284-1660).....	120
3.1 Productions et purifications.....	120
3.2 Mesure de l'activité enzymatique.....	121
3.3 Conclusions.....	122
4. Influence de la température sur la production de p300 (1284-1660).....	122
4.1 Productions et purifications.....	122
4.2 Mesure de l'activité enzymatique.....	124
4.3 Conclusions.....	124
5. Influence de la durée d'induction sur production de p300 (1284-1660).....	125
5.1 Productions et purifications.....	125
5.2 Mesure de l'activité enzymatique.....	126
5.3 Conclusions.....	126
6. Influence de la purification.....	126

6.1 Productions et purifications	126
6.2 Mesure de l'activité enzymatique.....	128
6.3 Conclusions.....	129
7. Conclusions générales	129
IV. Production de PCAF.....	130
1. Production et purification.....	130
2. Mesure de l'activité enzymatique.....	131
3. Conclusion.....	132
CHAPITRE IV	133
ÉVALUATION DU POUVOIR INHIBITEUR DES EFFECTEURS SYNTHÉTISÉS.....	133
I. Évaluation de l'inhibition de p300 (1284-1673)	135
1. Mesure de la constante de Michaelis de p300 <i>vs</i> H4-8.....	135
2. Mesure des IC ₅₀ par une méthode non radioactive.....	136
2.1 Mesures des IC ₅₀	136
2.2 Analyse des résultats.....	138
2.2.1 Les spermidine-CoA 1a et 1b	138
2.2.2 Influence de la nature de la diamine des composés diamine-CoA	139
2.2.3 Influence du groupement porté par la partie diamine des diamine-CoA	142
2.3 Conclusions.....	144
3. Mesure des IC ₅₀ par une méthode radioactive.....	145
II. Évaluation de l'inhibition de PCAF (1-832).....	148
1. Mesure des IC ₅₀	148
2. Analyse des résultats	149
3. Conclusions.....	150
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	153
MATERIELS ET METHODES : CHIMIE	159
MATERIELS ET METHODES : ENZYMOLOGIE	211

ANNEXES 233

BIBLIOGRAPHIE..... 239

ABREVIATIONS

AcétylCoA	ou AcCoA Acétylcoenzyme A
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdoHcy	S-adénosylhomocystéine
AdoMet	S-adénosylméthionine
ADP	Adénosine diphosphate
Ala (A)	Alanine
Arg (R)	Arginine
ATP	Adénosine triphosphate
Asp (D)	Acide aspartique
Boc	Ter-butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate
Bz	Benzoyle
CBP	Creb binding protein
CHD	Chromodomain Helicase/ATPase DNA binding protein
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CoA	ou HSCoA coenzyme A
Cys (C)	Cystéine
Da	Dalton
DIC	diisopropylcarbodiimide
Dde	4,4-diméthyl-2, 6-dioxocyclohexylidène)éthyle
DMF	Diméthylformamide
DTNB	Acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eq	Equivalent
EP	Ether de pétrole
ESI	Electrospray ionisation
Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyle
GCN5	General control nonderepressible 5
Gln (Q)	Glutamine

Glu (E)	Acide glutamique
Gly (G)	Glycine
GNAT	General control nonderepressible 5 N-acetyltransférase
GST	Glutathion S-transférase
HAT	Histone acétyltransférase
HCl	Acide chlorhydrique
HDAC	Histone désacétylase
HMT	Histone méthyltransférase
HNE	HeLa nuclear extract
HOBT	N-hydroxybenzotriazole
HP1	Hétérochromatine protéine 1
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside
ISW1	Imitation of SWItch
kDa	Kilodalton
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LB	Lennox Broth base
LB agar	Lennox Broth Agar
LSD	Lysine specific demethylase
Lys (K)	Lysine
M9	Milieu de culture minimal 9
MART	Mono-ADP ribosyltransférase
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
Mmole	Millimole
MYST	MOZ, Ybf2, Sas2, Tip60
NAD⁺	Nicotinamide adénosine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide adénosine dinucléotide (forme réduite)
NMM	N-méthylmorpholine
NMP	N-méthylpyrrolidinone
NTB	Acide 2-nitro-5-thiobenzoïque
P300	Adenovirus E1A protein of 300 kDa
PART	Poly-ADP ribosyltransférase
Pb	Paire de base
PCAF	P300/CBP associated factor

Ph	Phényle
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PRMT	Protéine arginine méthyltransférase
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAM	ou AdoMet S-adénosylméthionine
Ser (S)	Serine
SM	Spectrométrie de masse
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SWI/SNF	Mating type SWItching/Sucrose Non Fermenting
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIS	Triisopropylsilane
T_R	Temps de rétention
Trp (W)	Tryptophane
Tyr (Y)	Tyrosine

INTRODUCTION

Le noyau d'une cellule humaine contient environ 3 milliards de paires de bases réparties en 23 chromosomes. Non compacté, la taille de l'ADN est estimée à 2 mètres. Il requiert donc une compaction importante afin d'être contenu dans un noyau de 6 micromètres de diamètre. Pour que cette compaction soit possible, l'ADN s'enroule autour de petites protéines, dont des histones, et l'ensemble forme un complexe appelé chromatine. La chromatine, en recrutant d'autres protéines, peut atteindre divers niveaux de compaction, le plus élevé étant le chromosome.

La chromatine est une structure dynamique et son degré de compaction influence directement l'activité de l'ADN. En effet, lorsqu'une voie de signalisation est activée, la cellule traduit ce signal en produisant les protéines appropriées. Ceci nécessite l'expression des gènes conduisant à la transcription puis à la traduction de la(les) protéine(s) voulue(s). Or, une ouverture de la chromatine est requise pour que les opérateurs permettant la transcription accèdent à l'ADN. Certaines enzymes et complexes protéiques interagissent avec la chromatine afin de permettre l'accès à l'ADN.

Les **histones acétyltransférases (HATs)** font partie des enzymes pouvant décondenser et donc « ouvrir » localement la chromatine et ainsi permettre la transcription. Compte tenu de l'importance du rôle des HATs dans l'expression des gènes, il n'est pas surprenant que le dysfonctionnement de ces enzymes soit associé à diverses maladies chez l'homme, et notamment à des cancers. Afin de contrôler la dérégulation de ces enzymes et de les étudier, des inhibiteurs de HATs ont été mis au point.

Ce projet de thèse a consisté à élaborer des analogues des substrats d'une HAT cible. La démarche suivie pour la conception de ces analogues fait intervenir entre autres des données issues de la chimie physique. De tels composés permettront d'accéder à une meilleure connaissance de l'enzyme et, peuvent trouver des applications dans le développement d'anticancéreux.

Dans un premier chapitre, des généralités sur la chromatine seront présentées. Dans un second chapitre, un inventaire des inhibiteurs de HATs existants sera fait, suivi de la description des nouveaux effecteurs élaborés. Le troisième chapitre traitera de la production de l'enzyme cible, c'est-à-dire p300 et le quatrième chapitre sera dédié aux études cinétiques

effectuées. Enfin, en conclusion, un bilan des travaux et des résultats obtenus permettra d'établir les perspectives de recherche à venir.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un consortium comprenant le Pr. Parello (Université de Vanderbilt), le Dr. Gjerset (centre de cancérologie Sidney Kimmel, San Diego), le Dr. Banères (Institut des biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier), Mme Martin (Université de Montpellier). D'autre part, des contacts avec le Dr. Briet (Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, équipe du Dr. Trouche, Toulouse) ont permis l'étude par radioactivité des HATs p300 et PCAF.

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. La chromatine

En 1880, Flemming fut le premier à réussir à colorer ce qu'il nomma la chromatine (du grec khroma: couleur et sôma: corps). Localisée dans le noyau des cellules eucaryotes, la chromatine est une structure complexe constituée d'ADN (notre matériel génétique) et de protéines. Elle existe sous deux formes :

- L'hétérochromatine, composée de séquences répétées d'ADN non codantes (*Figure 1*). Sa formation implique de nombreuses protéines telle que la protéine HP1 (**H**étérochromatine **P**rotéine 1). L'hétérochromatine est la partie de la chromatine inactive au niveau transcriptionnel.
- L'euchromatine, correspond à des zones de gènes actifs. L'euchromatine (ou plus précisément les protéines (histones) de celle-ci) est hyperacétylée et hypométhylée par rapport à l'hétérochromatine. Elle est la partie de chromatine active au niveau transcriptionnel (*Figure 1*).

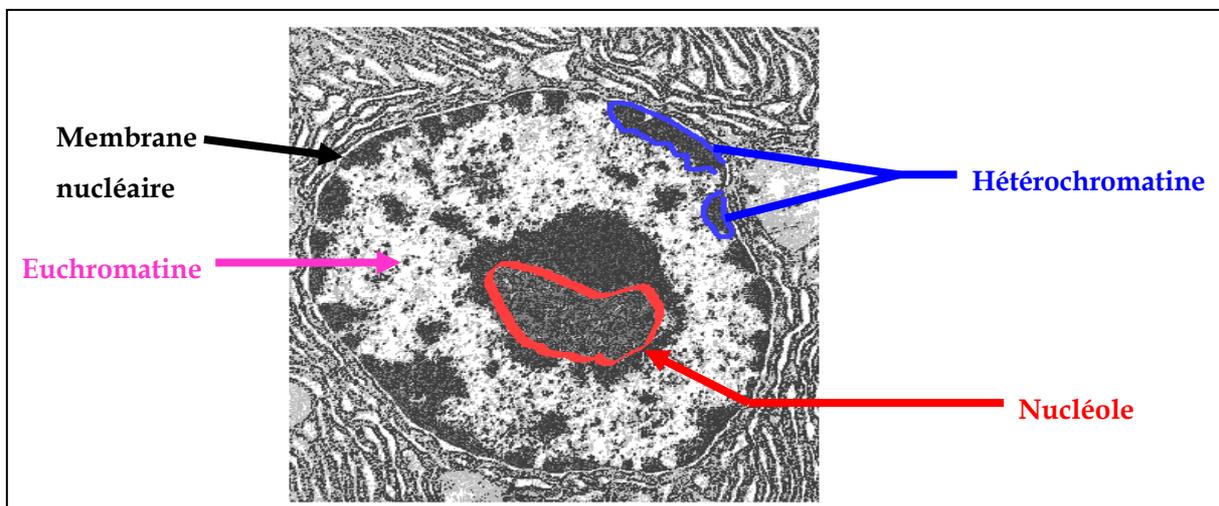


Figure 1 : Noyau d'une cellule à l'interphase du cycle cellulaire

Cette organisation de l'ADN en chromatine permet à environ 2 mètres d'ADN d'être contenus, grâce à une compaction efficace, dans un noyau cellulaire de quelques micromètres de diamètre.

1. Le nucléosome et les degrés de compaction supérieurs

La chromatine présente plusieurs niveaux organisationnels (Kornberg & Thomas, 1974) dont l'unité fondamentale est une structure appelée nucléosome (Figure 2). Ce terme a été proposé pour la première fois en 1975 (Oudet et al, 1975), et cette unité de base de la chromatine est composée d'un complexe ADN/protéine, comprenant un cœur protéique autour duquel s'enroule de l'ADN. La région de liaison qui relie les particules cœurs adjacentes est nommée région inter-nucléosomale (Figure 6).

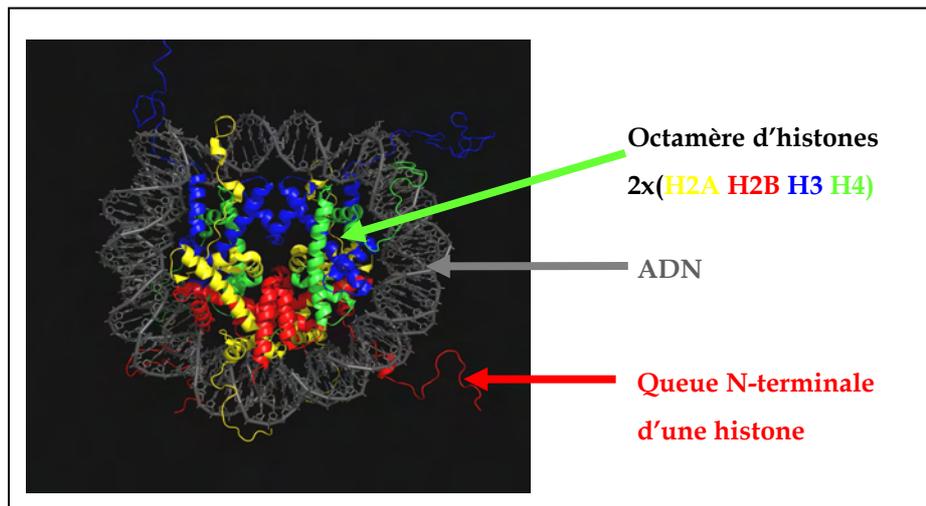


Figure 2: Structure du nucléosome (les queues flexibles N-terminales des histones figurant sur cette structure ont été rajoutées) (Luger et al, 1997)

En 1997, le groupe de Timothy Richmond (Luger et al, 1997) a publié la structure du nucléosome avec une résolution de 2,8 Å (Figure 2) puis en 2002 à 1,9 Å (Davey et al, 2002). Le nucléosome est ensuite régulièrement répété pour former des fibres de 11 nm (collier de perles) (Figure 3). Les fibres de 11 nm s'empilent pour former la fibre de 30 nm (solénoïde de six nucléosomes par tour) qui s'organise en boucles plus ou moins grandes, pour atteindre un niveau de compaction maximum dans le chromosome.

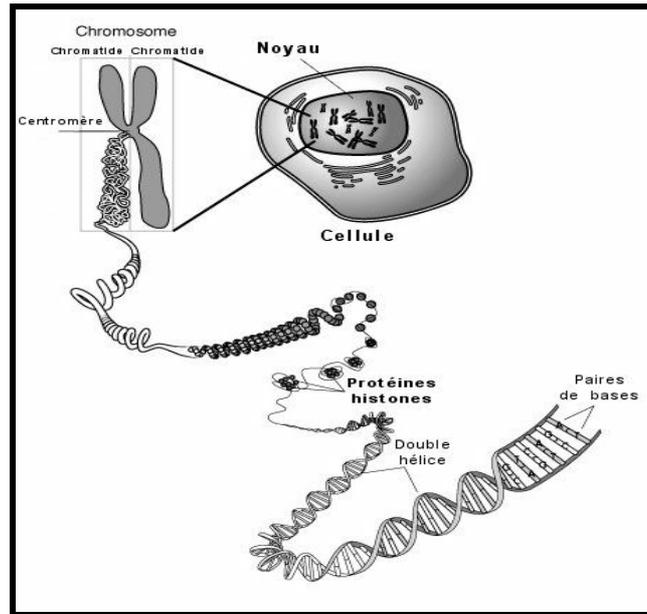


Figure 3 : Les différents niveaux de compaction de la chromatine

2. Les histones

Nous avons vu précédemment que le nucléosome est composé d'ADN et d'une particule cœur globulaire composée de protéines. Ces protéines comportent 1/3 de protéine histones dont les extrémités N-terminales sont situées à l'extérieur du nucléosome (Figure 2). Dans les cellules eucaryotes, on observe 5 classes de protéines histones : H2A, H2B, H3, H4 (les histones nucléosomales) et l'histone H1 (histone inter-nucléosomale) qui permet la liaison entre les particules cœurs (Felsenfeld & Groudine, 2003). Ce sont de petites protéines basiques car composées de plus de 20% d'arginine et de lysine. De ce fait, elles font partie des protéines les plus basiques existantes. Elles ont une masse molaire comprise entre 12 et 20 kDa et sont également extrêmement bien conservées soulignant ainsi leur importance biologique.

2.1 Le cœur d'histones

La particule cœur du nucléosome, dont la structure est très conservée parmi les espèces, comprend deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B ; elles

forment ainsi un tétramère (H3-H4)-(H3-H4) central et deux dimères H2A-H2B venant s'associer de chaque côté du tétramère. Autour de cet octamère protéique s'enroulent environ 1,8 tours d'ADN soit environ 146 pb d'ADN. L'enroulement de l'ADN autour de la particule cœur est assuré par des interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupes phosphates de l'ADN et les charges positives des acides aminés des histones. En plus des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes permettent de stabiliser la structure histone-ADN.

Les histones de la particule cœur du nucléosome présentent des structures secondaires identiques nommées « histone fold » (Figure 4) composées d'une grande hélice alpha centrale ($\alpha 2$) entourée de deux petites hélices alpha ($\alpha 1$ et $\alpha 3$) ainsi que de boucles (L1 et L2) en contacts avec l'ADN (Figure 5).

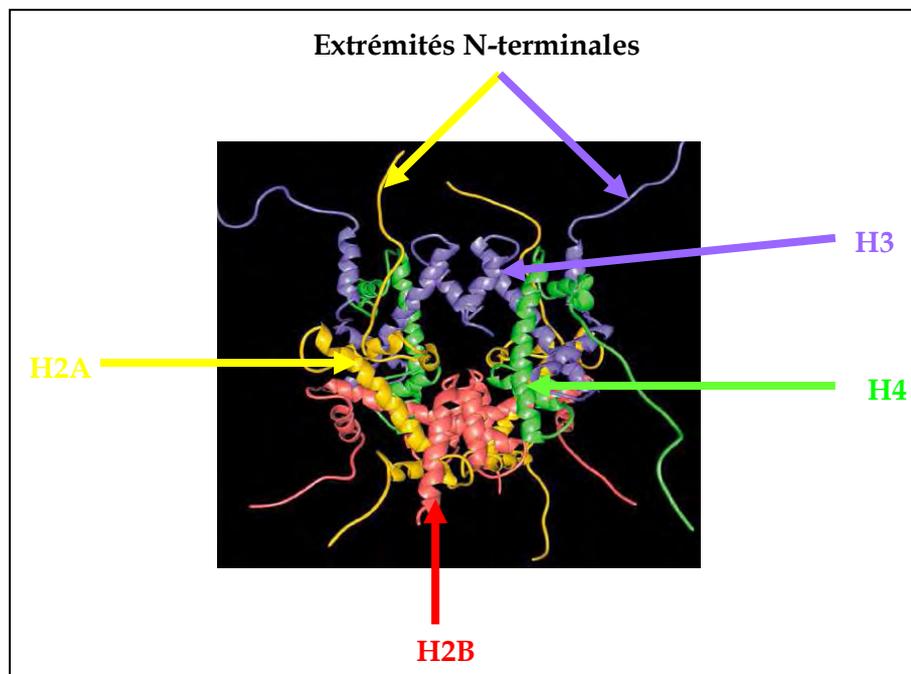


Figure 4 : La structure secondaire des histones « histone fold » (Luger et al, 1997)

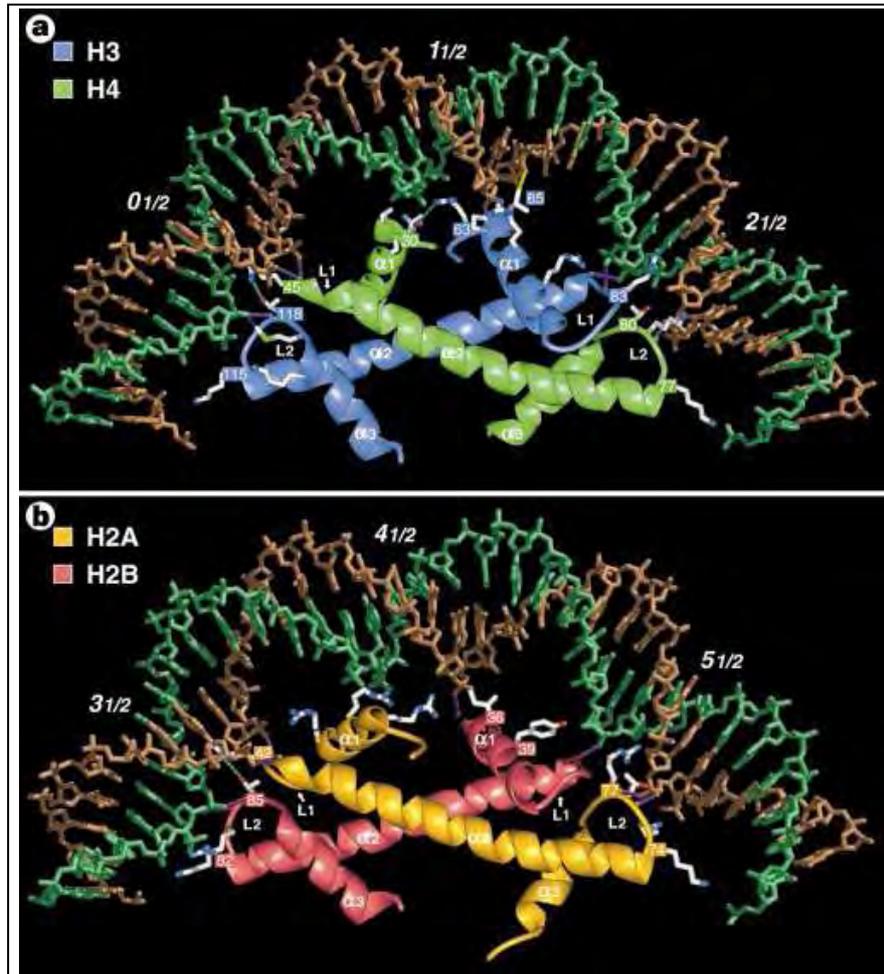


Figure 5: Interaction histones/ADN (Luger et al, 1997)

2.2 La région inter-nucléosomale : l'histone H1

La région inter-nucléosomale (Figure 6) est composée d'une portion d'ADN de longueur variable selon l'espèce et le type cellulaire. L'histone H1 (histone inter-nucléosomale) adhère à cette région et permet à l'ADN d'atteindre des degrés de compaction supérieurs (Noll & Kornberg, 1977).

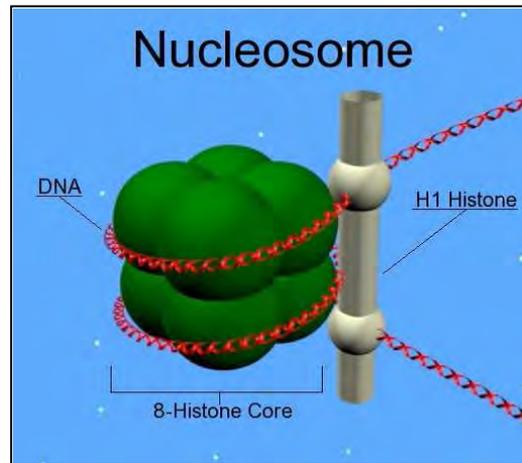


Figure 6 : Le nucléosome et sa région inter-nucléosomale

(voir (Kornberg, 1977))

L'histone H1 est donc impliquée dans la formation de la chromatine mais également dans sa stabilisation. Outre cette propriété, des études ont montré que la présence de cette histone pouvait inhiber la transcription, en effet, il a été remarqué, dans certains cas, que la suppression de H1 serait associée avec une activation de la transcription (Bresnick et al, 1992; Laybourn & Kadonaga, 1991; Paranjape et al, 1994).

Cependant, H1 a été trouvée en présence de gènes actifs transcriptionnellement (Ericsson et al, 1990) bien que ce soit dans une chromatine à l'organisation altérée (Shick et al, 1985). Ceci s'explique par le fait que l'acétylation des histones altère la capacité de H1 à condenser la chromatine (Ridsdale et al, 1990). De plus, la présence de H1 affecte les interactions entre l'ADN et les facteurs de transcription (Juan et al, 1994; Schultz et al, 1996). Il a aussi été remarqué que la phosphorylation de H1, se traduisant par une perte d'affinité vis-à-vis de la chromatine, est impliquée dans l'activation de gènes (Lee & Archer, 1998). Ces données suggèrent donc que l'activation des gènes nécessite une réorganisation de H1 dans la chromatine.

2.3 Les parties N-terminales des histones

Tandis que la partie centrale du nucléosome adopte une conformation stable, les extrémités N-terminales (Figure 4) des histones présentent une plus grande flexibilité

structurale. Elles n'interagissent pas avec la partie centrale du nucléosome, à la surface duquel elles émergent.

H2A	Vertébrés	¹SGRGKQGGKARAKAK¹⁵...
	Levure	¹ SGGKGGKAGSAAKAS ¹⁵ ...
H2B	Vertébrés	¹PEPAKSAPAPKKGSKKAVTKT²¹...
	Levure	¹ SSAAEKKPASKAPAEKKPAAKK ²² ...
H3	Vertébrés	¹ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAA²⁵...
	Levure	¹ ARTKQTARKSTGGKAPRKQLASKAA ²⁵ ...
H4	Vertébrés	¹SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK²⁰...
	Levure	¹ SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK ²⁰ ...

Figure 7 : Premiers acides aminés des parties N-terminales chez les vertébrés et chez *Saccharomyces cerevisiae* (levure) (Roth et al, 2001)

Bien que des travaux sur la conformation éventuelle des parties N-terminales des histones ait été menés, il n'a pas été démontré que celles-ci possèdent une organisation structurale (Grant, 2001), exception faite des histones H3 et H4 qui adoptent une structure en hélice α dans le nucléosome (Baneres et al, 1997). Ces extrémités N-terminales jouent un rôle important au niveau des degrés de compaction supérieurs de la chromatine ainsi que dans la formation des domaines chromatiniens (euchromatine et hétérochromatine). De plus, il apparaît clairement qu'elles jouent un rôle régulateur de la transcription car l'ADN sous forme de chromatine est inaccessible aux facteurs de transcription. En effet, celui-ci étant compacté dans la chromatine, une « ouverture » de cette dernière est donc nécessaire afin que divers processus tels que la réplication, la recombinaison ou la transcription soient possibles. Cette organisation de l'ADN en chromatine joue donc un rôle déterminant dans toutes les fonctions du génome. Initialement, on pensait que la répression seulement due à l'inaccessibilité de l'ADN du fait de la présence des histones. Pourtant depuis peu, il a été démontré que ces extrémités jouent un rôle à part entière dans la régulation des mécanismes touchant à l'ADN (Wu & Grunstein, 2000) et une délétion de ces parties N-terminales est létale (Ling et al, 1996; Schuster et al, 1986).

Pour rendre l'ADN accessible, des changements structuraux doivent être opérés au niveau de la chromatine et plus précisément au niveau de son unité de base, le nucléosome. Pour cela, des facteurs interviennent pour rendre la structure de la chromatine beaucoup plus dynamique. Principalement, deux familles de facteurs sont connues pour remplir cette fonction : les facteurs de remodelage de la chromatine et les protéines qui modifient les extrémités des histones (ces deux familles seront décrites dans les sections II et III respectivement). L'action de ces familles permet à divers processus nucléaires d'avoir lieu, mais nous nous focaliserons sur la transcription des gènes.

II. Les facteurs de remodelage de la chromatine

1. Les complexes de remodelage ATP-dépendant

L'ADN, compacté sous forme de chromatine, présente une structure défavorable à l'interaction avec les facteurs de transcription et les complexes initiateurs, essentiels dans l'activation de la transcription. Un remodelage de la chromatine est donc nécessaire pour que cette activation soit réalisable. Le remodelage de la chromatine se traduit par une altération contrôlée de sa structure (Aalfs & Kingston, 2000). Il peut s'effectuer à l'aide de facteurs utilisant l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP. De façon générale, l'activation de la transcription implique la fixation d'un facteur de transcription qui recrute le complexe de remodelage. Ces facteurs sont des complexes multiprotéiques qui peuvent altérer les liens histones/ADN. Les modifications induites par ces complexes se réalisent de manière non covalente et conduisent à un changement de la localisation et de la conformation du nucléosome (Kingston & Narlikar, 1999) permettant ainsi à la machinerie transcriptionnelle d'atteindre l'ADN (*Figure 8*).

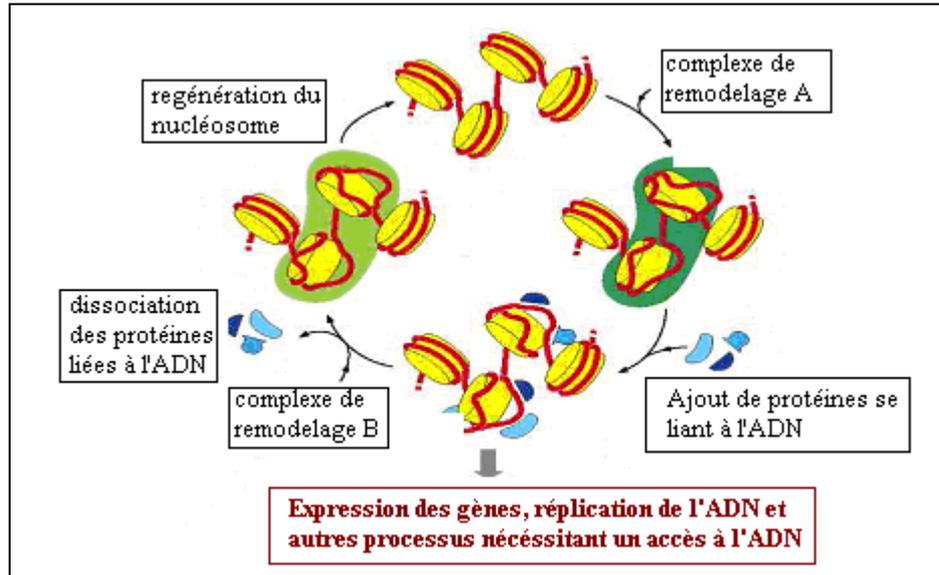


Figure 8 : Schématisation générale du remodelage de la chromatine

A l'heure actuelle, une dizaine de complexes sont impliqués dans le remodelage dépendant de l'ATP. Ils sont regroupés en 4 grandes familles (Figure 9) suivant les similarités de leur sous-unité catalytique ATPase: SWI/SNF (mating type **SWI**tching/**Su**crose **N**on **F**ermenting), ISW1 (**I**mitation of **SWI**tch) (Aalfs & Kingston, 2000), CHD (**C**hromodomain **H**elicase/**A**T Pase **D**N A binding protein) et INO (**I**NOsitol).

Bien que ces facteurs de remodelage aient en commun la présence de nombreuses sous-unités protéiques dont l'ATPase (Figure 9), ils présentent toutefois des différences dans leur quantité et dans leur activité.

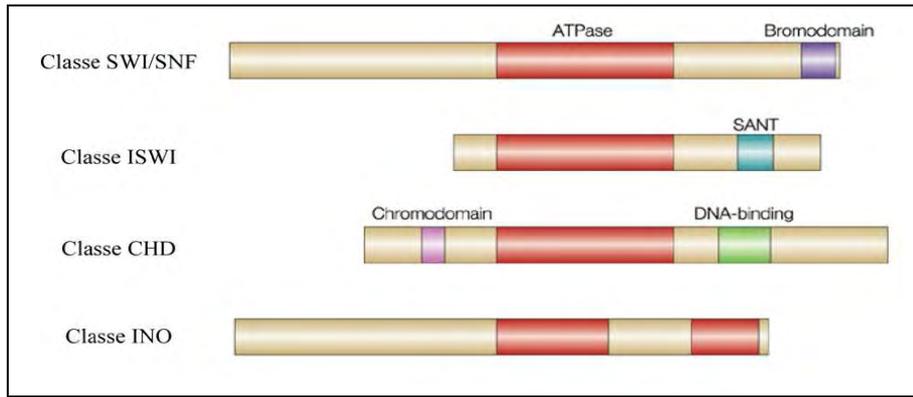


Figure 9: Les 4 grandes familles de complexes ATP-dépendant de remodelage de la chromatine (Modifié de Tsukiyama, 2002). Le domaine ATPase est représenté en rouge. Les bromodomains (reconnaissent les résidus acétylés) sont représentés en violet, les chromodomains (reconnaissent les résidus méthylés) en rose, les domaines SANT en bleu (proposés comme domaine de reconnaissance des histones) et les domaines liant l'ADN en vert.

La spécificité de chacun des complexes dans l'activation d'un gène donné n'est pas évidente. Toutefois, ces complexes de remodelage ATP-dépendant jouent un rôle dans la régulation de la transcription des gènes.

2. Les modifications post-traductionnelles des histones

Le remodelage de la chromatine peut également s'effectuer par modification des parties N-terminales des histones (Berger, 2001; Wu & Grunstein, 2000). En effet, ces extrémités sont le siège de diverses modifications post-traductionnelles. Il y a au moins 8 types de modifications épigénétiques différentes mises en évidence (Tableau 1) et ces modifications ont été détectées sur plusieurs résidus d'histones (Figure 10).

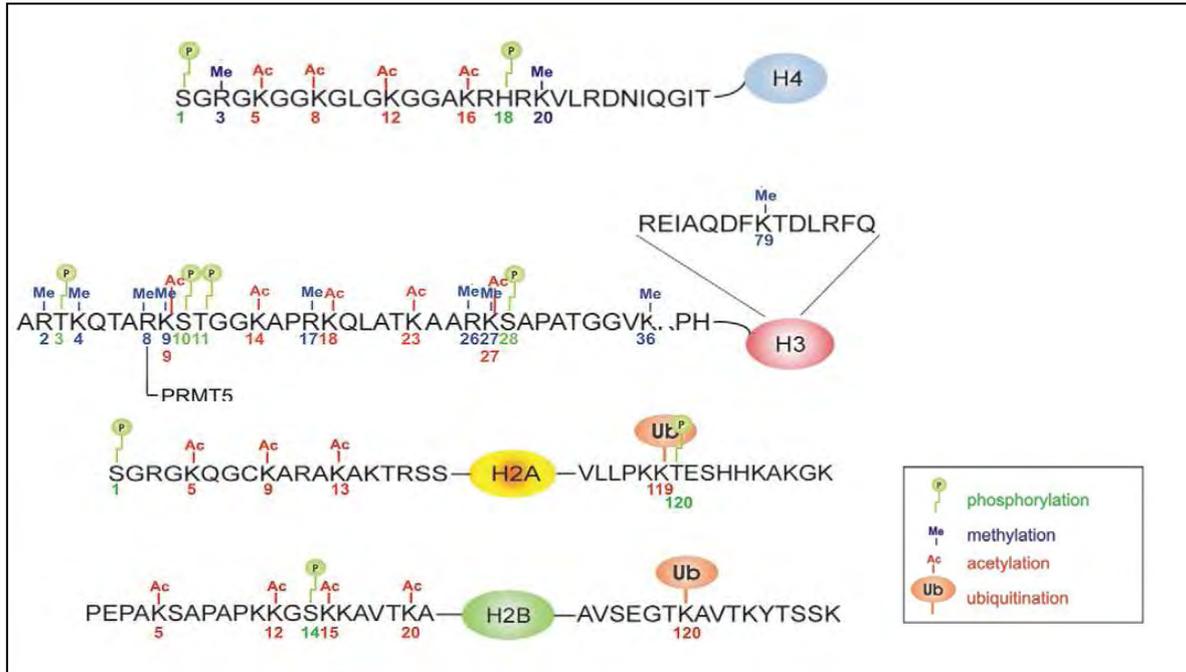


Figure 10 : Les 4 principales modifications et la localisation des résidus modifiés sur les parties N-terminales des histones humaines (Margueron et al, 2005)

Modifications	Résidus modifiés	Fonctions régulées
Acétylation	Lysine	Transcription, réparation, réplication, condensation
Méthylation	Lysine, arginine	Transcription, réparation
Phosphorylation	Sérine, thréonine	Transcription, réparation, condensation
Ubiquitinylation	Lysine	Transcription, réparation
Sumoylation	Lysine	Transcription
ADP ribosylation	Acide glutamique	Transcription
Deimination	Arginine	Transcription
Isomérisation de la proline	Proline	Transcription

Tableau 1 : Quelques modifications post-traductionnelles d'histones identifiées (Kouzarides, 2007)

Dans un premier temps, nous allons passer en revue les principales modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation...) qui peuvent avoir lieu sur les extrémités N-terminales des histones.

2.1 L'acétylation

Découverte en 1964 par Allfrey et al. (Allfrey et al, 1964), l'acétylation est une modification post-traductionnelle majeure des parties N-terminales des histones (Marmorstein, 2001a; Marmorstein, 2001b). Elle a lieu sur la fonction amine en position ϵ des résidus lysines des histones (*Figure 11*) (Marvin et al, 1990; Thorne et al, 1990). Bien que les histones soient généralement acétylées sur leurs parties N-terminales, il a été observé que la lysine 56 de H3, une lysine de la particule cœur, peut également être acétylée (Driscoll et al, 2007; Han et al, 2007).

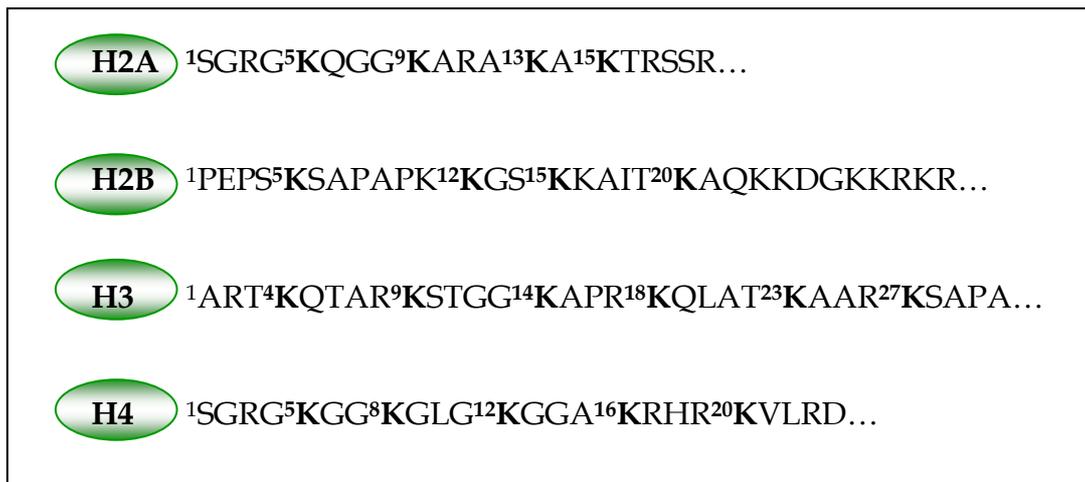


Figure 11 : En gras, sites d'acétylation *in vivo* des branches N-terminales des histones de cellules humaines (Marvin et al, 1990; Thorne et al, 1990)

L'acétylation des histones est une réaction catalysée par des enzymes, les **histones acétyltransférases** (HATs) (Roth et al, 2001) (*Figure 12*). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement acétyle de l'acétylcoenzyme A vers des résidus lysine des parties N-terminales des histones.

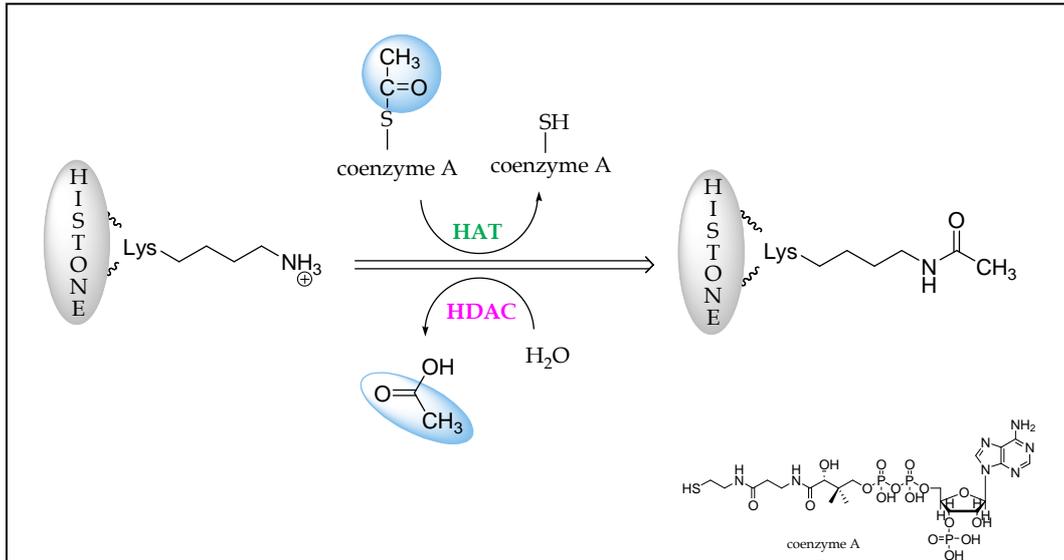


Figure 12: Réactions d'acétylation et de désacétylation d'une lysine, catalysées par les HATs et les HDACs, respectivement

L'acétylation des histones engendre la neutralisation de la charge positive portée par l'atome d'azote de la fonction amine en ϵ de certaines lysines localisées sur la queue N-terminale des histones. Ainsi les contacts histones/ADN sont affaiblis et les interactions entre nucléosomes voisins sont également affectées. Les contacts inter-nucléosomaux sont importants pour la stabilisation de la structure hautement ordonnée de la chromatine. Ainsi, un changement de la charge des histones a des conséquences sur l'architecture de la chromatine. Les fonctions de cette modification sont diverses, mais généralement elle est associée à l'activation de la transcription (Hebbes et al, 1988; Turner, 1993).

L'acétylation est une modification épigénétique réversible et les histones désacétylases (HDACs, Figure 12), qui catalysent la réaction inverse, sont également impliquées dans la transcription des gènes. En effet, la désacétylation est associée à la répression des gènes.

L'activité antagoniste des HATs et des HDACs régule l'expression des gènes. Cette activité corrèle avec l'activation (pour les HATs) et la répression/silence (pour les HDACs) des gènes (Brownell & Allis, 1996; Mizzen & Allis, 1998). Une revue plus détaillée des HATs et des HDACs est donnée dans les sections III et IV de ce chapitre.

2.2 La méthylation des histones

La méthylation des histones a été décrite pour la première fois en 1964 (Murray, 1964). Cette modification a lieu principalement sur les histones H3 et H4 (Figure 10). La méthylation ne change pas la charge globale du résidu mais augmente progressivement le poids moléculaire et l'hydrophobie. Ceci pourrait provoquer l'interruption des interactions de type liaison hydrogène intra- ou intermoléculaire, créant ainsi de nouveaux sites de liaison pour les protéines se liant préférentiellement aux protéines méthylées. La méthylation des histones régule des processus fondamentaux tels que la formation de l'hétérochromatine, l'inactivation du chromosome X, la mémoire génétique, ainsi que la transcription et la réparation de l'ADN (Lachner & Jenuwein, 2002; Margueron et al, 2005).

(a) La méthylation des arginines

Les résidus arginine peuvent être monométhylés ou diméthylés de façon symétrique ou asymétrique (Figure 13) par les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs). Elles catalysent le transfert d'un groupement méthyle de la S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet) sur la fonction amine du groupement guanidine des résidus arginine. Dix PRMTs ont été identifiées chez les mammifères (Bedford, 2007) : PRMT1 (Lin et al, 1996) , PRMT2, PRMT3 (Tang et al, 1998), CARM1/PRMT4, JBP1/PRMT5, PRMT6, PRMT7 , PRMT 8, PRMT9 et FBXO11. Huit d'entre elles catalysent le transfert d'un groupement méthyle de AdoMet vers un résidu arginine, générant ainsi la S-adénosylhomocystéine (AdoHcy) et une arginine méthylée. En revanche, aucune activité n'a encore été démontrée *in vitro* pour PRMT9 et PRMT2.

Ces enzymes ont été divisées en 4 groupes. Les enzymes de type I (PRMT 1, 3, 4, 6 et 8) catalysent la formation de résidus N^G-monométhylarginine intermédiaires puis la formation de N^G,N^G-diméthylarginine asymétriques. Les enzymes de type II (PRMT5, PRMT7 et FBXO11) catalysent la formation de résidus N^G-monométhylarginine intermédiaires puis la formation de N^G,N^G-diméthylarginine symétriques. Un troisième type catalyserait la formation de N^G-monométhylarginine uniquement (PRMT2). Toutefois, PRMT7 dans certains cas, peut ne procéder qu'à une monométhylation et constituerait un quatrième type de PRMT.

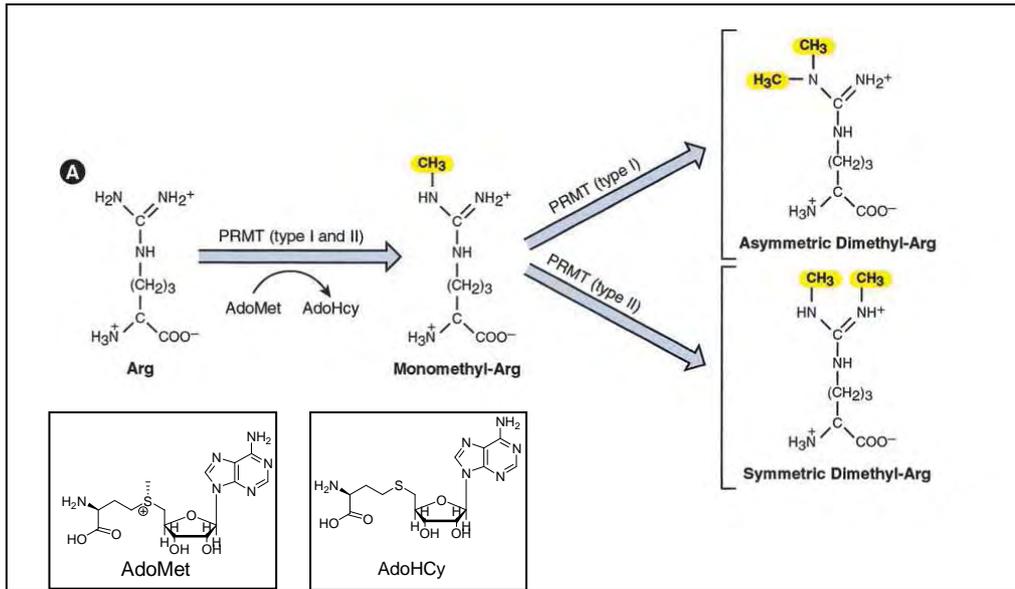


Figure 13: Réaction de méthylation catalysée par les PRMT de type I et II

Le site de liaison d'AdoMet, très conservé chez les mammifères, correspond également au site catalytique. Les régions C-terminales et N-terminales des PRMTs ne sont pas conservées et leurs fonctions sont inconnues.

Les structures cristallines de la PRMT Hmt1 de la levure (Weiss et al, 2000), de PRMT3 du rat (Zhang et al, 2000) et de PRMT1 (Zhang & Cheng, 2003) ont été publiées, toutefois le mécanisme de reconnaissance des substrats reste indéterminé.

L'ensemble des fonctions liées à la méthylation n'a pas encore été déterminé. Cependant, la méthylation peut être répressive ou activatrice vis-à-vis de la transcription (Tableau 2), les PRMTs étant recrutées auprès des promoteurs par des facteurs de transcription (Lee et al, 2005).

Enzymes	Résidus/histones modifiés	Fonctions régulées
PRMT1	H4-R3, H2A	Coactivateur transcriptionnel
PRMT2	Inconnu	Coactivateur du récepteur à l'œstrogène
PRMT3	Inconnu	Coactivateur transcriptionnel
PRMT4/CARM1	H3-R2, H3-R17, H3-R26, H2A	Coactivateur transcriptionnel
PRMT5	H3, H4, H2A	Répresseur transcriptionnel
PRMT6	H4, H3, H2A	Réparation de l'ADN
PRMT7	H4, H2A	?

Tableau 2 : Sites de méthylation et fonctions régulées connues (Bedford, 2007)

Il faut noter que des arginines déméthylases n'ont pas encore été identifiées. Cependant, les peptidylarginine déiminases 4 (PAD4/PADI4) peuvent inverser la méthylation des résidus arginine (Cuthbert et al, 2004; Wang et al, 2004b).

(b) La méthylation des lysines

De façon similaire la monométhylation, la diméthylation, la triméthylation des lysines peuvent également avoir lieu. A ce jour, les lysines 4, 9, 27, 36 et 79 de H3 et les lysines 20 et 59 de H4 peuvent être méthylées (Berger, 2002; Strahl & Allis, 2000; Zhang et al, 2002; Zhang et al, 2003a; Zhang & Reinberg, 2001) (Figure 10). Cette modification peut soit réprimer soit activer la transcription (Bannister & Kouzarides, 2005).

La méthylation des lysines des histones est catalysée par les histones méthyltransférases (HMTs) (Figure 14).

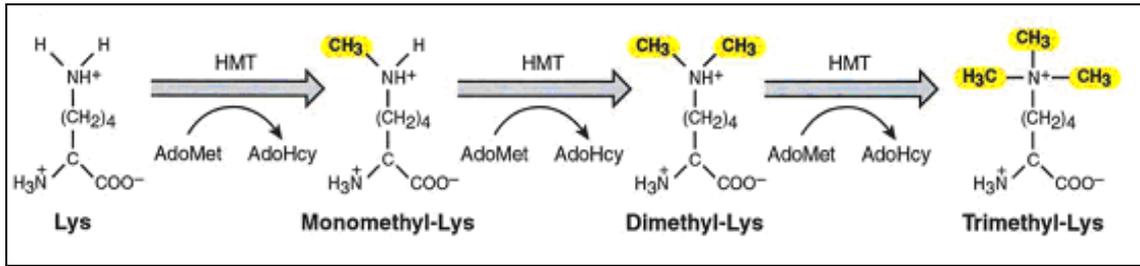


Figure 14: La réaction de méthylation des lysines

Toutes les HMTs contiennent un domaine SET, à l'exception de l'HMT Dot1. Ce domaine constitue à la fois le domaine de liaison de AdoMet et le domaine catalytique (Lee et al, 2005). Ce motif d'environ 130 résidus est très conservé.

La méthylation des lysines 4, 36, 79 de H3 est généralement impliquée dans l'activation de la transcription et participe à l'établissement de l'euchromatine (Krogan et al, 2003; Martin & Zhang, 2005; Schubeler et al, 2004). Les méthylation des lysines 9 et 27 de H3 et de la lysine 20 de H4 sont généralement impliquées dans la répression de la transcription (Cao et al, 2002; Nielsen et al, 2001; Peters et al, 2003; Reinberg et al, 2004; Rice et al, 2003; Schotta et al, 2004)

(c) La déméthylation des lysines

La méthylation étant un processus important impliqué dans la régulation des gènes, l'identification du processus permettant d'inverser cette méthylation a été un challenge. Ainsi en 1964, l'équipe de Paik a isolé une enzyme du rat, la N6-méthyle-lysine-oxidase, capable d'ôter un ou deux groupements méthyle de lysines d'histones libres (Kim et al, 1964). Depuis, deux types de lysines déméthylases ont été identifiées : LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1) et la famille des protéines à domaine JmjC (Jumonji C) ; LSD1 étant la première lysine déméthylase à avoir été caractérisée (Shi et al, 2004).

La découverte d'histones déméthylases a mis en évidence la réversibilité de cette modification. Toutefois, seuls quelques résidus sont substrats des déméthylases décrites. Par exemple, LSD1 déméthyle H3-K4 et H3-K9 (Shi et al, 2004). Il faut noter que la méthylation

est souvent associée à d'autres modifications et particulièrement à la phosphorylation et à l'acétylation.

2.3 La phosphorylation des histones

La phosphorylation fait partie des modifications post-traductionnelles se produisant sur les parties N-terminales des histones (Paulson & Taylor, 1982).

Les histones kinases sont les enzymes catalysant le transfert du groupement γ -phosphate d'une molécule d'ATP sur l'hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine : c'est la réaction de phosphorylation (Figure 15).

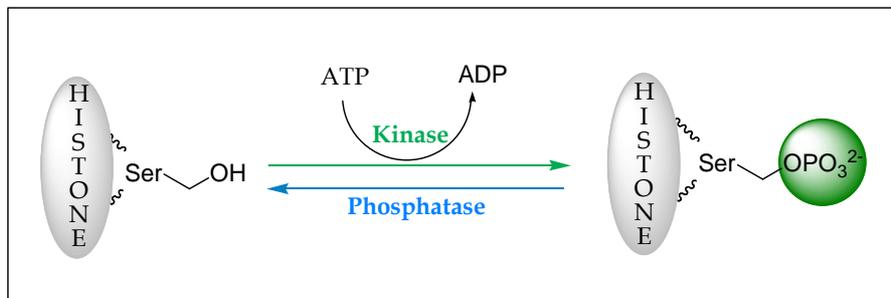


Figure 15: La réaction de phosphorylation d'une sérine

Chez les eucaryotes supérieurs, la phosphorylation a lieu sur : les thréonines 3 et 11 , la sérine 10 et la sérine 28 de H3, la sérine 1 de H2A et de H4, et les sérines 14 et 32 de H2B (Wu et al, 1986). Cette modification semble jouer un rôle dans divers processus tels que la condensation des chromosomes (de la Barre et al, 2000; Goto et al, 1999; Sauve et al, 1999; Van Hooser et al, 1998), la transcription (Nowak & Corces, 2004), la réparation de l'ADN (Cheung et al, 2005; Downs et al, 2000; Fillingham et al, 2006) et l'apoptose (Loury & Sassone-Corsi, 2003).

2.4 L'ubiquitinylation

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés que l'on retrouve dans toutes les cellules eucaryotes. En général, la fixation d'ubiquitine sur une protéine sert à marquer cette dernière en vue d'une destruction par une protéase.

Dans le cas des histones, la fonction de l'ubiquitination est autre. Elle aurait un rôle dans la régulation de la transcription, la recombinaison et dans le contrôle des réponses aux dommages de l'ADN (Giannattasio et al, 2005; Osley, 2004; Wang et al, 2004a). Cette modification touche entre autres la lysine 119 de l'histone H2A (H2A-K119) et la lysine 120 de l'histone H2B (H2B-K120) chez l'Homme (correspond à la lysine 123 (H2B-K123) chez la levure *S. cerevisiae*).

L'ubiquitination de H2A-K119 est catalysée par la protéine Bmi/Ring1A et est associée à la répression de la transcription (Wang et al, 2006). Cette modification n'est pas conservée chez la levure contrairement à l'ubiquitination de H2B-K120. Elle est modérée par les protéines RNF20/RNF40 et UbcH6 chez l'homme et par les protéines Rad6 et Bre1 chez la levure (Robzyk et al, 2000; Wood et al, 2003).

L'ubiquitination de H2B contrairement à celle de H2A, active la transcription (Zhu et al, 2005). En plus de la transcription, l'ubiquitination est impliquée dans la recombinaison méiotique en réponse aux dommages de l'ADN (Giannattasio et al, 2005; Yamashita et al, 2004).

Chez la levure, deux enzymes capables d'inverser l'ubiquitination de H2B-K123 ont été identifiées : Ubp8 et Ubp10. L'enzyme Ubp8 fait partie du complexe multiprotéique SAGA acétyltransférase. Elle est requise pour l'activation de la transcription, indiquant ainsi que l'ubiquitination et sa réaction inverse sont impliquées dans la stimulation de la transcription (Henry et al, 2003).

2.5 Mais encore...

Les parties N-terminales des histones sont sujettes à bien d'autres modifications post-traductionnelles. Parmi celles-ci, on peut noter l'ADP-ribosylation et la sumoylation.

L'ADP ribosylation est le transfert d'un groupement ADP ribose de la nicotinamide adénine dinucléotide sur un résidu arginine, acide aspartique ou glutamique. C'est une modification épigénétique dont la fonction est mal connue. Toutefois, elle semble impliquée dans des processus nucléaires tels que la réparation et la transcription de l'ADN. Il peut y

avoir mono- ou poly-(ADP ribosylation), réaction catalysée par les mono-ADP ribosyltransférases (MARTs) et les poly-ADP ribosyltransférases (PARTs) respectivement (Hassa et al, 2006).

La sumoylation des histones n'a été que très récemment identifiée chez les mammifères (Shiio & Eisenman, 2003). Cette modification aboutit à la liaison d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier, 12 kDa, ~100 acides aminés) sur une lysine. Elle peut avoir lieu sur les 4 histones de la particule cœur, et des sites spécifiques de sumoylation ont été identifiés sur H2A (K126), H2B (K6, K7, K16, K17) et H4 (K5, K8, K12, K16, K20) (Nathan et al, 2006). Cette modification est antagoniste de l'acétylation et de l'ubiquitination, et de ce fait elle est associée à la répression de la transcription chez la levure (Shiio & Eisenman, 2003).

3. L'hypothèse du « code histone »

Les modifications se réalisant au niveau des parties N-terminales semblent se produire de façon coordonnée. En effet, il a été observé qu'une modification influait une autre modification. Par exemple, certaines HATs tels que GCN5, PCAF, et p300 ont plus d'affinité pour H3 lorsque la sérine 10 de H3 est phosphorylée (Cheung et al, 2000; Clements et al, 2003; Lo et al, 2000) et l'acétylation de la lysine 14 de H3 par GCN5 en est stimulée (Clements et al, 2003). La phosphorylation de la serine 10 de H3 empêche la méthylation de l'arginine 9 de H3 (Rea et al, 2000). L'ubiquitination de H2B-K123 est nécessaire à la méthylation de H3-K4 et H3-K79 (Briggs et al, 2002; Sun & Allis, 2002). La méthylation de l'arginine 3 de H4 facilite l'acétylation des résidus lysine 8 et 12 de H4 par p300 (Zhang & Reinberg, 2001).

Cette grande diversité de modifications reliées à des processus biologiques a conduit à proposer l'hypothèse d'un langage appelé «code histone » (Margueron et al, 2005; Strahl & Allis, 2000). Ce « code » serait lu par d'autres protéines ou complexes protéiques capables de reconnaître ces profils de modifications. Cette hypothèse a été proposée afin d'expliquer comment cette succession de modifications régule la structure et les fonctions de la chromatine.

III. Les histones acétyltransférases (HATs)

Dans cette section, les 3 grandes familles d'HATs ainsi que d'autres protéines possédant une activité HAT vont être présentées.

Les histones acétyltransférases englobent un panel d'enzymes dont certaines ont pu être regroupées en fonction de l'homologie de séquence dans leur domaine HAT. La famille des GNATs et MYST et p300/CBP sont les familles de HATs prédominantes. Toutefois, il existe d'autres protéines possédant une activité HAT tels que les co-activateurs de récepteurs nucléaires ou les facteurs associés aux protéines liant la boîte TATA (TAFII250).

On retrouve certains domaines chez diverses HATs de différentes familles, bien que les similarités entre les familles de HATs soient faibles:

- Le bromodomaine est un domaine conservé et son interaction avec les résidus acétylés a été montrée,
- Le chromodomaine, motif conservé structurellement, interagit avec la chromatine en se liant aux lysines méthylées des histones,
- Le domaine Tudor, à l'origine identifié comme étant un motif se liant à l'ARN, son interaction avec les arginines et les histones méthylées a été montrée,
- Le doigt PHD (**P**lant **H**omeodomain), motif que l'on retrouve chez plusieurs protéines liés à la transcription chez les eucaryotes, est caractérisé par un motif liant le zinc.

Notre intérêt s'est porté dans un premier temps sur la famille de HAT p300/CBP qui sera l'objet de notre travail. Puis, nous passerons en revue les autres familles de HATs (GNAT, MYST et autres).

1. La famille p300/CBP

p300 (adenovirus E1A protein of 300 kDa) et CBP (**C**REB **B**inding **p**rotein) sont des enzymes possédant une activité HAT (Ogryzko et al, 1996) et dont les similarités ont très tôt été remarquées (Arany et al, 1994) (*Figure 16*).

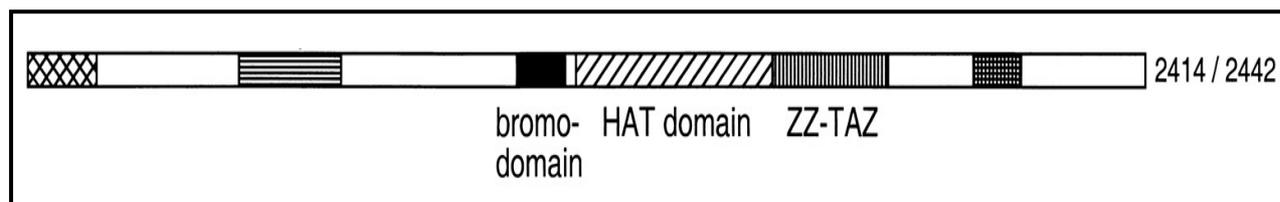


Figure 16 : Représentation de l'alignement de séquence de p300(2414 acide aminés) et CBP (2442 acides aminés) (Sterner & Berger, 2000)

Elles sont présentes dans plusieurs organismes multicellulaires tels que les mouches, les vers, les plantes, les mammifères (Arany et al, 1994; Bordoli et al, 2001; Yuan & Giordano, 2002).

p300/CBP sont de larges protéines de 300 kDa et de plus de 2400 résidus. Ces enzymes présentent des identités de séquences :

- dans leurs trois régions riches en cystéines et en histidines, nommées CH1, CH2, CH3
- dans le site de liaison du facteur de transcription CREB, le domaine KIX
- dans le bromodomaine
- dans le domaine HAT, qui contient le motif A commun aux GNATs et aux MYST, et un domaine PHD de type doigt de zinc
- le domaine d'interaction avec le co-activateur de récepteurs nucléaires stéroïdien (SRC-1).

Les autres régions sont peu conservées (Arany et al, 1994).

L'activité HATs de ces enzymes a été mise en évidence (Bannister & Kouzarides, 1996) *in vivo* (Martinez-Balbas et al, 1998) et des tests *in vitro* ont montré qu'elles acétylent les histones avec une préférence pour les lysines 12 et 15 de H2B, les lysines 14 et 18 de H3, et les lysines 5 et 8 de H4 (Schiltz et al, 1999). Contrairement aux autres HATs, p300 et CBP ont la capacité d'acétyler les 4 histones nucléosomales aussi bien que les histones libres (Sterner & Berger, 2000).

Ces enzymes stimulent la transcription de gènes spécifiques en interagissant, directement ou non, avec divers facteurs de transcription tels que CREB, les récepteurs nucléaires d'hormones ou encore les activateurs d'oncoprotéines (Sterner & Berger, 2000). Ainsi p300 et CBP sont des co-activateurs transcriptionnels globaux qui possèdent des rôles biologiques importants dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose

(Giordano & Avantaggiati, 1999; Kalkhoven, 2004; Shiama, 1997). Outre cela, p300/CBP interagit avec d'autres HATs telles que PCAF et ACTR.

L'importance de l'activité HAT de p300/CBP implique que ces enzymes soient régulées. Elles possèdent la capacité de s'autoacétyle (Ogryzko et al, 1996), une propriété qui semble réguler l'activité HAT (Thompson et al, 2004). De plus, d'autres modifications telles que la phosphorylation (Yuan et al, 2002), la sumoylation (Girdwood et al, 2003) et la méthylation (Zhang & Reinberg, 2001) semblent réguler l'activité HAT de ces deux enzymes.

D'un point de vue mécanistique, il a été proposé et pratiquement admis que ces enzymes procédaient *via* un mécanisme enzymatique « ping pong » (Thompson et al, 2001) (Figure 17). Dans un tel mécanisme (« ping pong »), l'acétylcoenzyme A se lierait en premier puis un premier produit, le coenzyme A, serait libéré. L'« enzyme-acétyle » modifiée lierait l'histone, formant un complexe ternaire de faible durée de vie, l'acétylation aurait lieu et le second produit, l'histone acétylée, serait relâchée.

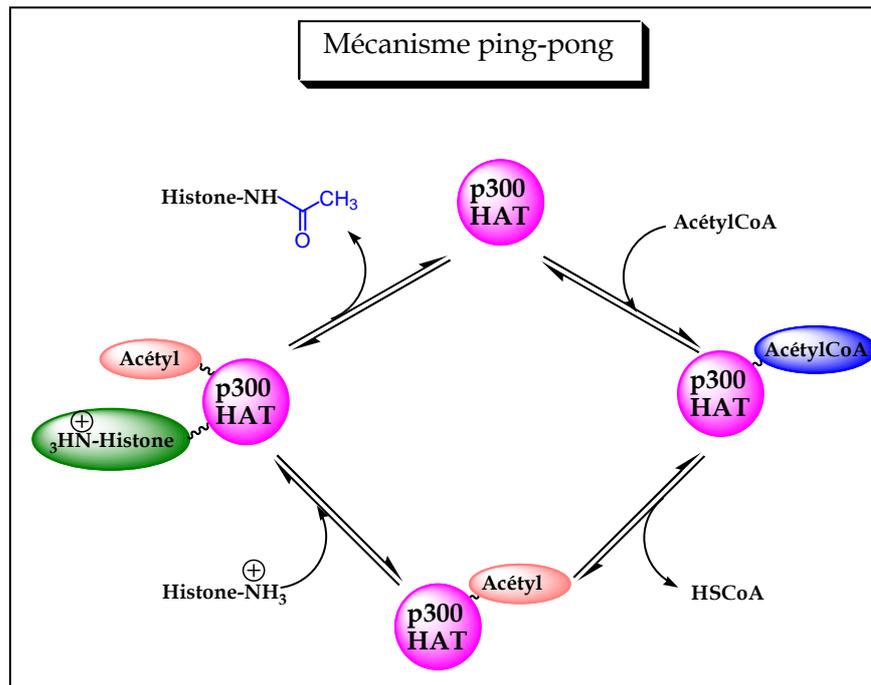


Figure 17 : Mécanisme de type « ping pong »

Récemment, la structure du domaine HAT de p300 a été publiée par l'équipe de P.A. Cole (Liu et al, 2008). Un hétérodimère constitué de Lys-CoA et du domaine HAT de p300 a été cristallisé. Dans cette construction, p300 est composé d'un sous-domaine de la partie N-

terminale et de la partie C-terminale de p300. De plus, les acides aminés 1523-1554 ont été éliminés afin de limiter le phénomène d'autoacétylation. Outre la proposition d'un mécanisme réactionnel de type Theorell-Chance, cette étude a fourni plusieurs informations sur la structure du site actif d'une part et sur les résidus impliqués dans le transfert du groupement acétyle et dans la reconnaissance du substrat d'autre part (Figure 18).

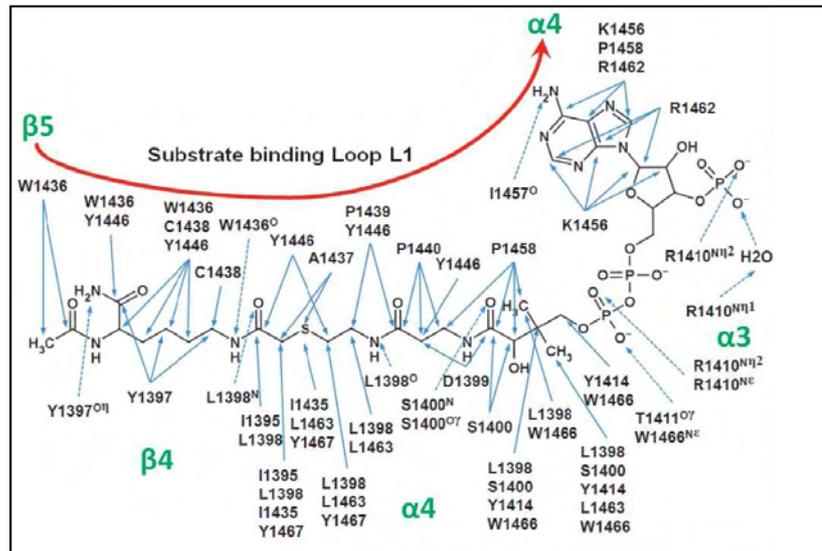


Figure 18 : Site de reconnaissance de Lys-CoA par le domaine HAT de p300 (Liu et al, 2008)

Ainsi, de l'étude cristallographique publiée, les données liées à la reconnaissance du substrat sont les suivantes :

- La région du domaine HAT liant l'acétylcoenzyme A (motif A), conservée chez GNC5 et Esa1, semble également conservée chez p300 (Figure 19);

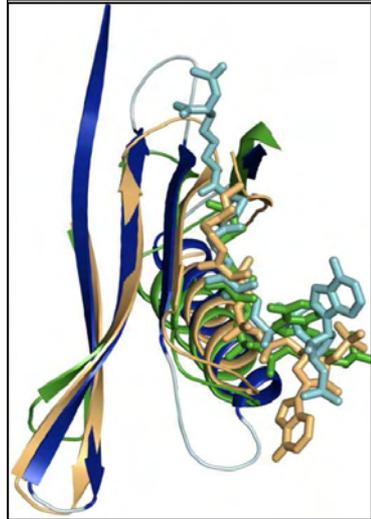


Figure 19 : Superposition du cœur du domaine HAT de GCN5, Esa1 et p300 (en bleu clair : p300, en vert : GCN5, en beige : Esa1, en bleu foncé : motifs A, B et D commun à p300 et aux GNAT, cf chapitre III) (Liu et al, 2008)

- Une boucle appelée L1 apparaît comme encapsulant Lys-CoA et semble influencer les interactions substrat /enzymes (Figure 20);

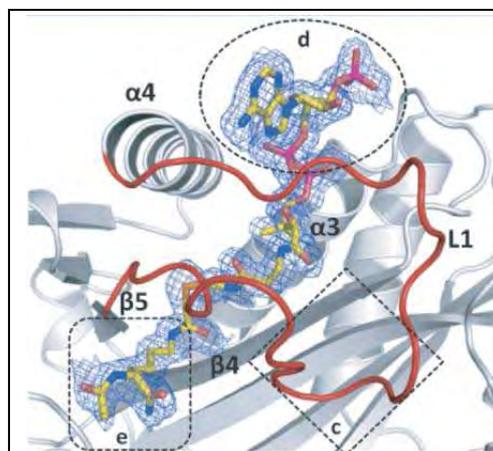


Figure 20 : Une vue de l'interaction de p300/Lys-CoA. La boucle L1 est représentée en rouge (Liu et al, 2008)

- Le bras pantéthéine de la partie coenzyme A se positionne, par rapport à la région cœur, de façon similaire chez GCN5 et Esa1 ; la partie adénosine adopte une conformation

différente et plus ordonnée que celle adoptée chez les deux autres HAT avec le résidu Arg 1410 qui établit des liaisons hydrogènes avec les groupements phosphates (Figure 18);

- L'azote ϵ -N de la lysine de Lys-CoA établit des liaisons hydrogènes avec le résidu Trp 1436 (Figure 21) et les résidus Tyr 1397, Trp 1436, Tyr 1446 et Cys 1438 forment un couloir hydrophobe qui interagit avec la chaîne carbonée de la partie lysine de Lys-CoA (Figure 21).

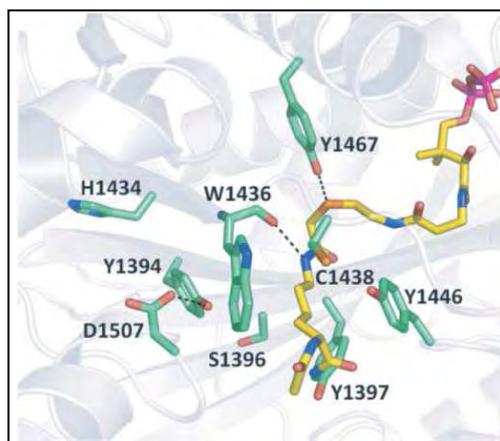


Figure 21 : Une vue de l'interaction de p300/Lys-CoA. Les résidus nucléophiles sont représentés en vert (Liu et al, 2008)

- De plus, ce site hydrophobe pourrait avoir comme rôle d'abaisser le pKa de la lysine du substrat afin qu'il soit sous forme d'amine $-NH_2$, cette forme étant requise pour attaquer l'acétylcoenzyme A (Liu et al, 2008) ;

- Une poche riche en électron a été décelée près de ce couloir hydrophobe, formé par les résidus Tyr 1397, Trp 1436, Tyr 1446 et Cys 1438, et ces deux cavités sont liées par un sillon étroit et peu profond composé sur une face par les résidus Ser 1396 et Tyr 1397. Cette poche contient les résidus Thr 1357, Glu 1505, Asp 1625 et Asp 1628, résidus nécessaires pour que l'activité HAT soit optimale (Figure 22). Ils sont supposés participer à la reconnaissance du substrat en interagissant avec les résidus basiques de ce dernier, tels que la lysine ou l'arginine;

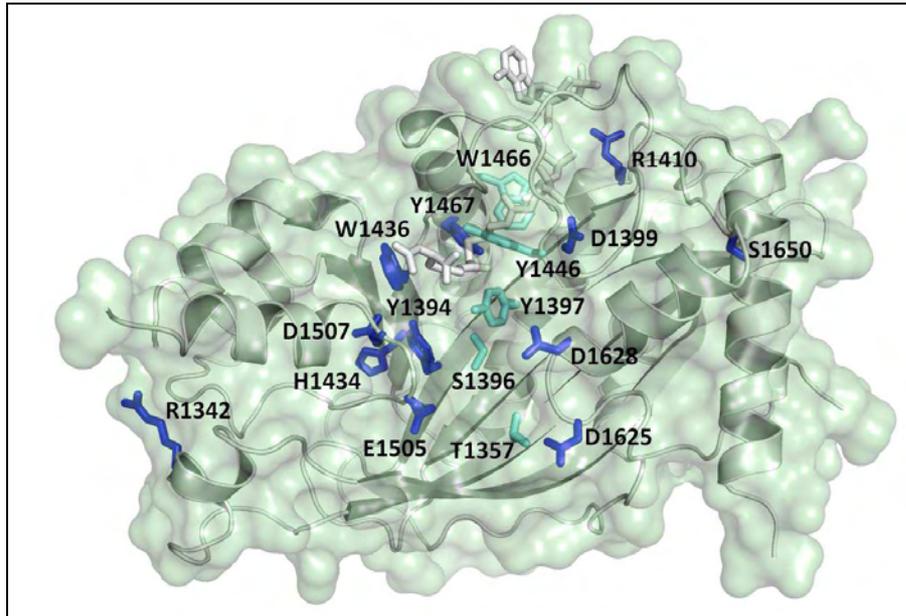


Figure 22 : Résidus étudiés influençant l'activité enzymatique de p300 (en bleu turquoise : résidus ayant un effet modeste sur l'activité enzymatique, en bleu foncé : activité enzymatique sensible aux résidus)(Liu et al, 2008)

Des expériences menées par mutagenèse dirigée suggèrent que les résidus Tyr 1467, Trp 1436 facilitent le transfert du groupement acétyle (Liu et al, 2008) :

- Le résidu Tyr 1467 établit une liaison hydrogène avec le soufre de Lys-CoA et son rôle supposé est celui d'un acide qui protonerait le coenzyme A libéré à la fin de la réaction d'acétylation ;
- Le remplacement du résidu Trp 1436 par un résidu Ala se traduit par une perte d'efficacité catalytique d'un coefficient de 50.

De plus, un mécanisme séquentiel, passant par un complexe ternaire intermédiaire de courte durée de vie, a été proposé comme mécanisme catalytique. Dans ce mécanisme, nommé Theorell-Chance, l'acétylcoenzyme A se fixerait étroitement à p300 puis l'histone se lierait faiblement et l'acétylation aurait lieu, libérant également le premier produit, l'histone acétylée et générant un complexe « enzyme-coenzyme A »(Liu et al, 2008) (Figure 23). Enfin, le second produit, le coenzyme A est libéré et l'enzyme libre régénérée.

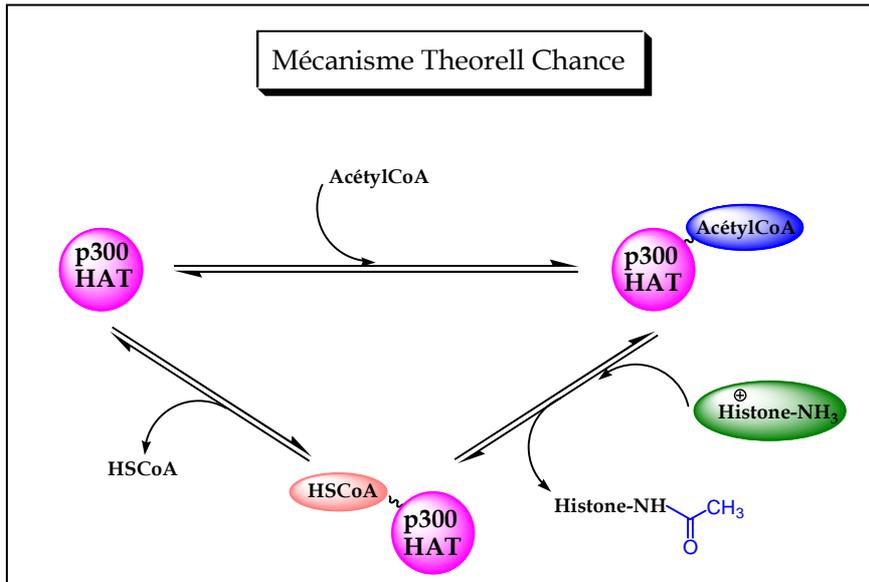


Figure 23 : Mécanisme Theorell-Chance proposé pour p300 (Liu et al, 2008)

p300 et CBP sont des co-activateurs transcriptionnelles dont nous ne venons de voir qu'un échantillon des processus dans lesquels elles sont impliquées. Avec les MYST et les HATs de la famille des GNATs, ces enzymes représentent la majorité des HATs. Toutefois il existe d'autres HATs de natures diverses.

2. La famille GNAT

La superfamille des GNATs (General control nonderepressible 5 (Gcn5)-related N-acetyltransferase, (Neuwald & Landsman, 1997) se compose de plusieurs acétyltransférases dont les HATs qui présentent une homologie de séquence limitée (Tableau 3, Figure 24) en dehors de leur domaine HAT.

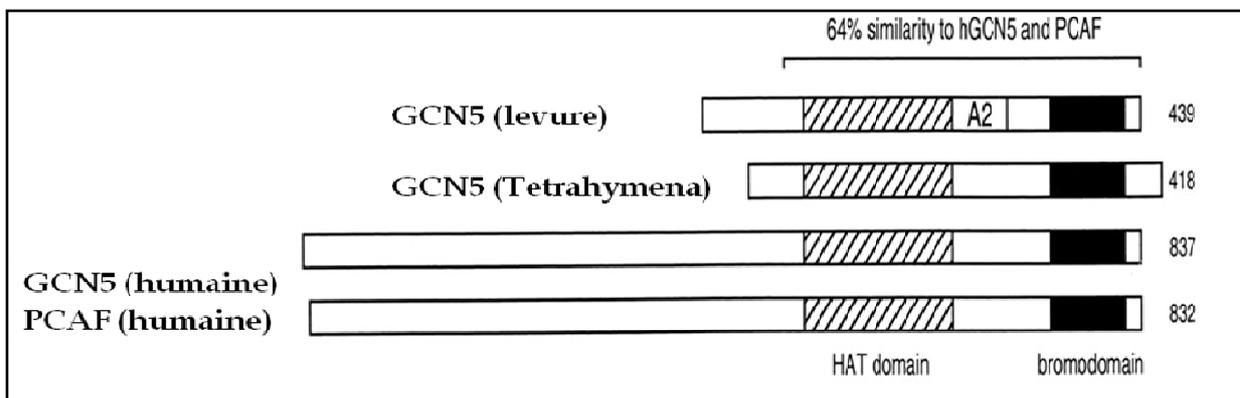


Figure 24 : Représentation de l'alignement de séquences de quelques GNATs (Sterner & Berger, 2000)

Cette famille est caractérisée par 4 motifs, C, D, B, A, allant de la partie N-terminale à la partie C-terminale respectivement (*Figure 25*). Le motif A est le plus conservé et il est présent également dans une autre famille de HAT : les MYSTs. Ce motif est caractérisé par un segment Arg/Gln-XX-Gly-X-Gly/Ala qui reconnaît et lie l'acétylcoenzyme A (Dutnall et al, 1998a; Wolf et al, 1998). Ces enzymes possèdent un domaine HAT constitué d'environ 160 résidus et un bromodomaine du côté C-terminal. En plus de ces régions, les membres de cette famille possèdent des similarités dans le motif lié à l'acétylation, notamment un résidu acide glutamique dont le rôle supposé est celui d'une base.

Les GNATs sont très conservés et comptent, chez les eucaryotes et chez les procaryotes, une grande variété d'acétylases, dont des HATs, ainsi qu'une grande variété de substrats.

Les HATs de la famille des GNATs					
	Hat1	Gcn5	PCAF	Elp3	Hpa2
Organismes	De la levure à l'Homme	De la levure à l'Homme	Homme, souris	levure	De la levure aux mammifères
Fonction	Réparation de l'ADN	Co-activateur de la Transcription, réparation de l'ADN	Co-activateur de la transcription	Elongation lors de la transcription	/
Substrat (s) préférentiel(s)	H4-K5, 12	H3-K9, 14, 18, 36 H4-K8, 16 H2B	H3-K14 H4-K8	H3	H3-K14 H4

Tableau 3 : Les principales HATs de la famille des GNATs (Sternier & Berger, 2000; Yang, 2004)
(ND : Non Déterminé)

- GCN5

GCN5 est la première HAT nucléaire à avoir été identifiée (Brownell et al, 1996). Elle a plusieurs homologues dans divers organismes tels que la souris (Xu et al, 1998), l'Homme

(Candau et al, 1996) et les levures (yGCN5)(Smith et al, 1998). Elle présente une spécificité vis-à-vis de ses substrats, il a été montré que la lysine 14 de H3 et les lysines 8 et 16 de H4 sont préférentiellement acétylées *in vitro* (Neuwald & Landsman, 1997). *In vivo*, yGCN5 acétyle les lysines 9, 14 et 18 de H3, 8 et 16 de H4 et les lysines de H2B (Grant et al, 1999).

Cette enzyme, *in vivo*, est une sous-unité de complexes multiprotéiques tels que ADA et SAGA (Grant et al, 1997) chez la levure. Son domaine catalytique est conservé de la levure à l'Homme. Des études structurales de HATs d'origines différentes ont fourni des éléments concernant les interactions entre GCN5 et son substrat (Clements et al, 1999; Dutnall et al, 1998a; Dutnall et al, 1998b; Lin et al, 1999; Rojas et al, 1999; Vetting et al, 2005). GCN5 possède un domaine globulaire très conservé constitué d'hélices α et de feuillets β et où deux cavités hydrophobes presque orthogonales sont situées à la surface de la protéine (Figure 25). L'acétylcoenzyme A se lierait dans une cavité tandis que le peptide se lierait dans l'autre cavité. Le site actif, quant à lui, se situerait à la jonction des deux cavités, et on y retrouverait dans la plupart des cas, un résidu acide glutamique.

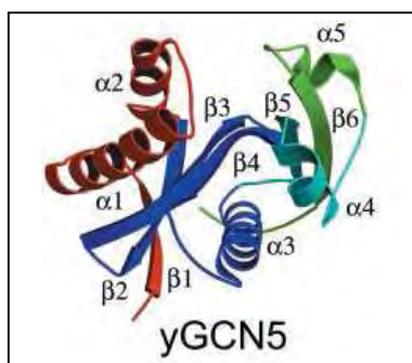


Figure 25 : Structure du domaine HAT de yGCN5 (en bleu, motif A et D ; en turquoise, motif B ; en rouge et vert, parties N-terminale et C-terminale respectivement)(Trievoel et al, 1999)

Les premières études cinétiques ont été faites avec GCN5 issue de la levure (Tanner et al, 1999). Les études sur cette dernière ont permis de déterminer le type de mécanisme catalytique utilisé par les GNATs. Dans le cas de GCN5, il s'agit d'un mécanisme séquentiel ordonné (Tanner et al, 2000b). L'acétylcoenzyme A se fixe en premier suivi du peptide ; le premier produit libéré est l'histone acétylée puis le coenzyme A est à son tour libéré (Figure 26).

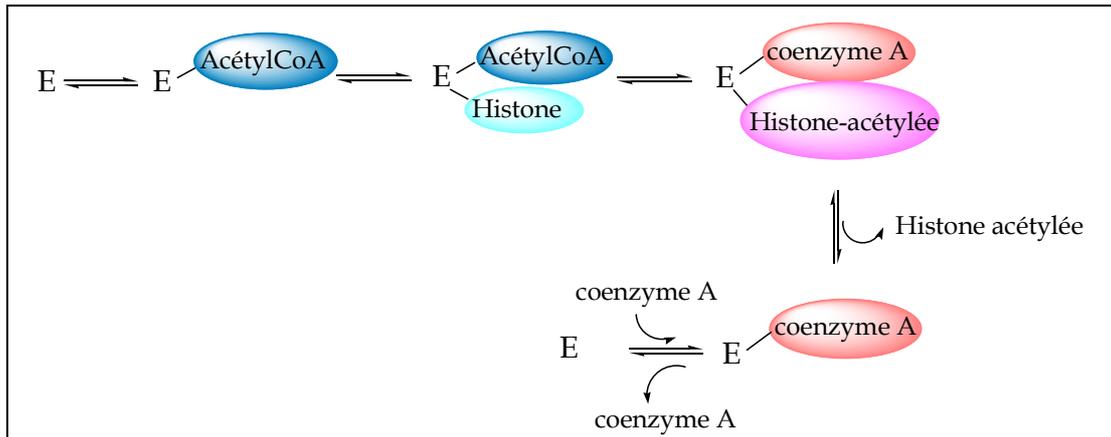


Figure 26 : Représentation schématique du mécanisme enzymatique de GCN5

Il a été montré que le résidu acide glutamique (E173 chez l'Homme) présent dans le site catalytique sert de base et catalyse la déprotonation de la fonction amine ϵ du résidu lysine de l'histone (Tanner et al, 1999).

Cette enzyme est essentielle à l'activation de la transcription de plusieurs gènes chez la levure (Brownell & Allis, 1996; Brownell et al, 1996; Grunstein, 1997; Roth et al, 2001; Wade et al, 1997). Elle est également requise pour l'activation de gènes durant la mitose (Fry & Peterson, 2001; Krebs et al, 2000). Chez les mammifères, elle est nécessaire au développement cellulaire et à la prolifération (Xu et al, 2000; Yamauchi et al, 2000). Cependant, il existe un cas où GCN5 a été impliquée dans la répression de la transcription (Ricci et al, 2002). En effet, des expériences menées *in vitro* indiqueraient que l'acétylation de la lysine 16 de H4 aurait un rôle dans la condensation de la chromatine (Shogren-Knaak et al, 2006).

▪ PCAF

PCAF (p300/CBP-associated factor) fut identifiée du fait de son aptitude à activer la transcription de divers gènes en interagissant avec p300 et CBP (Bannister & Kouzarides, 1996; Ogryzko et al, 1996; Yang et al, 1996).

Bien que la lysine 14 de l'histone H3 semble être son site préférentiel (Schiltz et al, 1999; Trievel et al, 2000b; Xu et al, 1998), elle acétyle également H2B, les lysines 9, 18 de H3, la lysine 8 de H4, et des protéines non histones. *In vivo*, PCAF se présente comme une sous-unité d'un complexe multiprotéique (STAGA)(Ogryzko et al, 1998), et c'est dans ce contexte qu'elle acétyle efficacement le nucléosome.

Structuralement, PCAF est une protéine de 832 résidus qui possède un domaine N-terminal homologue à celui de GCN5 des mammifères (Figure 27). Ce domaine est requis lors d'interactions avec p300/CBP (Xu et al, 1998). Son domaine C-terminal a été identifié comme étant un bromodomaine. Le domaine HAT de PCAF présente 43 % d'identité de séquence avec celui de GCN5 de *Tetrathymena* et yGCN5 (Brownell et al, 1996). Des études cristallographiques sur ce domaine (résidu 493-658) et des comparaisons avec d'autres HAT de la même famille (Clements et al, 1999) ont permis d'établir l'existence de deux cavités, comme pour yGCN5. Une de ces cavités lie le coenzyme A et il a été supposé que l'autre servait à lier le substrat. De plus, le résidu acide glutamique (Glu 570) a été identifié près des cavités liant les substrats. Le mécanisme enzymatique de cette enzyme est similaire à celui de GCN5 : un mécanisme séquentiel ordonné (Lau et al, 2000a; Tanner et al, 2000a) (Figure 26).

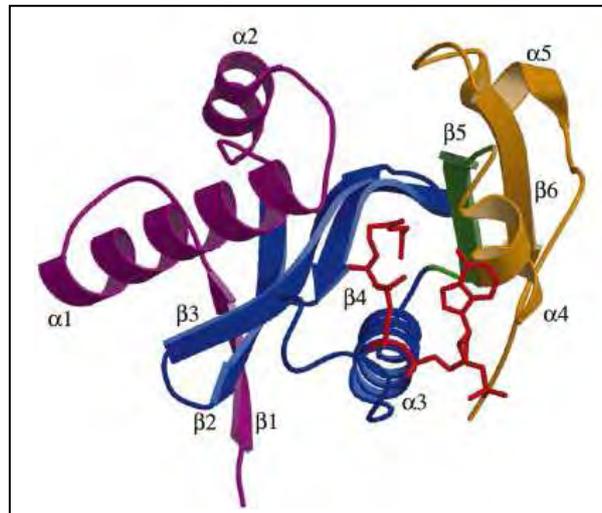


Figure 27 : Structure du complexe PCAF-coenzyme A (En bleu et vert, motif A et motif D respectivement ; en magenta et doré, domaines N- et C-terminaux respectivement ; en rouge, coenzyme A)(Clements et al, 1999)

PCAF, après avoir été recrutée par des facteurs de transcription, stimule leur activité auprès de certains promoteurs (Struhl, 1998). Toutefois, elle possède également un rôle dans la différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire durant la formation des tissus musculaires lors du développement de l'embryon (myogenèse)(Puri et al, 1997).

- **Hat1, Elp3, Hpa2**

L'histone acétyltransférase γ Hat1 de levure est la première HAT à avoir été identifiée et structurellement caractérisée (Dutnall et al, 1998b; Kleff et al, 1995). Elle acétyle préférentiellement la lysine 12 de H4 mais chez d'autres espèces, ses orthologues peuvent également acétyle la lysine 5 de H4 (Parthun et al, 1996). C'est une HAT cytoplasmique, elle est responsable de l'acétylation des histones lors de la formation de la chromatine. Elle est la principale source d'activité HAT dans le cytoplasme de *S.cerevisiae*. Elle est associée à une autre protéine Hat2 qui lui permet de se lier à H4 (Parthun et al, 1996). Bien que généralement associées à une activité cytoplasmique, il a été montré que Hat 1 et Hat 2 participent à l'acétylation d'histones nucléaires libres (Ruiz-Garcia et al, 1998). En outre, Hat1 semble impliquée dans la réparation de l'ADN (Qin & Parthun, 2006) et dans l'inactivation des gènes (Kelly et al, 2000).

Elp3, est une HAT nucléaire de levure. Elle apparaît comme ayant un rôle direct dans la transcription car elle se complexe à l'ARN polymérase II (Wittschieben et al, 1999). Du fait de son homologie avec les GNATs, elle a été produite à partir de cellules d'insectes et son activité HAT a été testée. Dans ces conditions, Elp3 a été capable d'acétyle les 4 histones de la particule cœur (Wittschieben et al, 1999). Les fonctions liées à son activité HAT n'ont pas été mises en évidence et restent à déterminer.

Hpa2, est une HAT de levure. Faisant partie de la famille des GNATs, son activité a été testée *in vitro* et il s'est avéré qu'elle acétyle H3 et H4, avec une préférence pour la lysine 14 de H3, comme GCN5 (Angus-Hill et al, 1999). Toutefois ces fonctions n'ont été pas encore été élucidées.

3. La famille MYST

Le nom de cette famille de HAT provient de certains de ces membres : **MOZ** (monocytic leukemia finger protein), Ybf2 de la levure (renommée Sas3 : something about silencing), Sas2 de la levure et Tip60 des mammifères. Elle possède d'autres membres dont les plus étudiés sont indiqués dans le Tableau 4, Esa1 étant la seule à avoir été cristallisée à ce jour (Yan et al, 2000). Ces protéines existent *in vivo* sous forme de complexes multiprotéiques (ex : **Nucleosome acétyltransférase de l'histone H4** (NuA4) contient Tip 60).

HATs	Organisme(s)	Rôles biologiques connus	Substrat(s) préférentiel(s)
Sas2	Levure	Répression de la transcription, réplication	H4-K16
Sas3	Levure	Répression de la transcription, réplication	H3-K14, 23
Esa1	Levure	Réparation de l'ADN, progression du cycle cellulaire, activation de la transcription	H4-K5, 8, 12, 16 H2A
MOF	Homme/ Drosophile	Réparation de l'ADN	H4-K16
Tip60	Homme/Drosophile	Activation de la transcription, réparation de l'ADN	H4-K5, 8, 12, 16 H2A
MOZ	Homme	Répression et activation de la transcription	H3-K14
MORF	Homme	Répression et activation de la transcription	H3-K14
HBO1	Homme	Régulation de l'initiation de la transcription	H4-K5, 8, 12 H3

Tableau 4 : Les principales HATs de la famille MYST

(Sternier & Berger, 2000)

Les membres de cette famille présentent un domaine MYST hautement conservé (Figure 28), constitué d'environ 370 résidus, et qui est le site de liaison de l'acétylcoenzyme A. En plus de ce domaine MYST, certains membres de cette famille partagent d'autres domaines structuraux tels que le chromodomaine, le domaine C₂HC et le domaine PHD (Plant Homeodomain Linked). Le domaine C₂HC est présent chez toutes les MYSTs, excepté Esa1. Chez Sas3, Mof et MOZ, ce domaine est essentiel à l'activité HAT (Akhtar & Becker, 2001; Deguchi et al, 2003; Takechi & Nakayama, 1999), et chez Mof le nucléosome se lie à ce motif, *in vitro*.

Le chromodomaine est conservé chez Esa1, Mof et Tip60 (Jones et al, 2000).

Chez MORF et MOZ, on retrouve le domaine PHD, dans la partie N-terminale (Aasland et al, 1995; Champagne et al, 1999) de ces enzymes. Du côté C-terminale, MOZ et MORF présentent un domaine riche en résidu cystéine et méthionine, domaine possédant un puissant potentiel dans l'activation de la transcription (Champagne et al, 1999; Champagne et al, 2001).

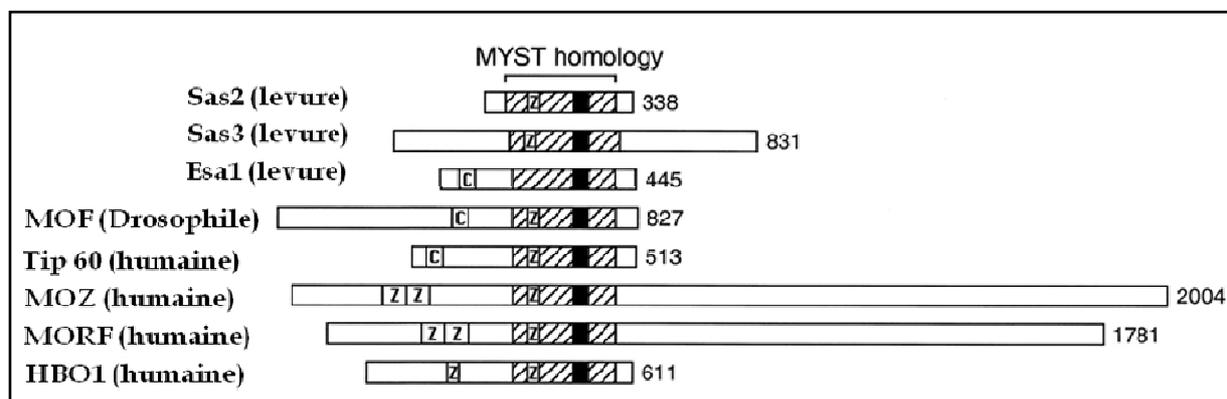


Figure 28 : Représentation de l'alignement de séquence des HATs de la famille des MYST (Sterner & Berger, 2000)

Au niveau du mécanisme réactionnel, des études structurales faites sur Esa1 ont montré que cette famille adopte un mécanisme séquentiel, probablement semblable à celui des GNATs (Berndsen et al, 2007; Yan et al, 2002).

Malgré leurs similarités de séquence, ces enzymes arborent des fonctions régulatrices différentes (Tableau 4).

La famille MYST présente une diversité au niveau des domaines qui composent ces HATs, les complexes auxquels appartiennent ces enzymes et des variétés de fonctions biologiques associées.

4. Quelques autres HATs

Outre les trois grandes familles de HATs décrites précédemment, il existe d'autres protéines possédant une activité HAT. Parmi celles-ci, on peut noter SPT10, une enzyme de levure, qui semble moduler l'acétylation de la lysine 56 de H3, au niveau du promoteur du gène codant pour les histones (Xu et al, 2005). Cette acétylation est la seule de son genre du fait qu'il s'agit d'un résidu ne se situant sur la partie N-terminale des histones mais se situant dans la région cœur.

L'acétyltransférase Rtt109 de la levure module également l'acétylation de cette lysine H3-K56 (Driscoll et al, 2007; Han et al, 2007; Schneider et al, 2006). Récemment, il a été montré que cette enzyme est impliquée dans la stabilité du génome, dans la réplication de l'ADN et dans le processus de résistance aux dommages de l'ADN (Schneider et al, 2006). Outre cela, elle s'est avérée être un homologue structural de p300/CBP (Tang et al, 2008). Cependant, malgré cette similarité structurale entre p300 et Rtt109, ces enzymes présentent une faible identité de séquence et des propriétés biologiques différentes suggérant des fonctions non similaires pour ces deux enzymes. Par exemple, elles présentent une sélectivité de substrats différente, et aucune inhibition de Rtt109 par un inhibiteur de p300 (Lys-CoA) n'a été détectée (Tang et al, 2008). De plus, contrairement aux autres HATs, l'activité catalytique de Rtt109 nécessite un chaperon d'histone (protéines qui escortent les histones jusqu'à l'ADN lors de la formation de la chromatine).

Les cofacteurs SRC-1 et ACTR (Roth et al, 2001) sont des co-activateurs humains de récepteurs nucléaires hormonaux. Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription, ils peuvent se fixer directement à l'ADN et induisent l'expression des gènes. Les co-activateurs tels SRC-1 ou ACTR participent donc à la régulation de l'expression des gènes en interagissant avec ces récepteurs nucléaires. SRC-1 acétyle les histones H3 et H4 *in vitro* (Spencer et al, 1997). Il interagit avec p300/CBP et PCAF (Kamei et al, 1996; Smith et al, 1996; Spencer et al, 1997; Yao et al, 1996), suggérant ainsi que la transcription résultant de signaux hormonaux est régulée par plusieurs HATs. ACTR (Chen et al, 1997), comme SRC-1, interagit avec des récepteurs nucléaires et active la transcription. Il a la capacité d'acétyle les histones H3 et H4 libres aussi bien que le nucléosome (Chen et al, 1997). Il interagit également avec CBP et PCAF et est d'ailleurs acétylé par CBP. Cette acétylation empêche les interactions avec les récepteurs et empêche donc l'activation de la transcription (Chen et al, 1999).

Le lien entre acétylation et activation de la transcription a été une fois de plus démontré avec la découverte de l'activité HAT de TAFII un élément de la machinerie basale de la transcription. TAFII, une sous-unité d'un facteur de transcription général (TFIID), s'associe à la protéine TBP, protéine se liant à la boîte TATA des promoteurs. TAFII250 chez l'homme, TAFII230 chez la *Drosophile* et TAFII145/130 ont montré une activité HAT *in vitro* (Mizzen et al, 1996). TBP, seule, est capable de se lier aux promoteurs et d'activer la transcription mais en présence de TAFII, cette activation est stimulée.

L'état d'acétylation des histones dépend également de la famille d'enzyme qui catalyse la réaction inverse : les histones désacétylases (HDACs), qui vont être présentées.

IV. Les histones désacétylases (HDACs)

Les histones désacétylases catalysent la réaction de départ d'un groupement acétyle situé sur l'amine ϵ d'un résidu lysine d'une histone au sein du nucléosome, restituant ainsi la charge positive de ces lysines. Ces enzymes ont été divisées en deux familles et quatre classes en fonction de leurs domaines constitutifs et de leur homologie de séquence (Blander & Guarente, 2004; Cress & Seto, 2000; Gregoret et al, 2004; Grozinger & Schreiber, 2002) (Tableau 5) :

Deux familles de désacétylases			
HDACs classiques			protéines relatives à Sir2 ou sirtuins
Classe I	Classe II	Classe IV	Classe III
HDAC1 à HDAC3	HDAC4 à HDAC7	HDAC11	SIRT1 à SIRT7
HDAC8	HDAC9		

Tableau 5: Les différentes HDACs répertoriées chez l'Homme (Hodawadekar & Marmorstein, 2007)

Les enzymes des ces deux familles sont conservées évolutivement des procaryotes à l'homme (Grozinger & Schreiber, 2002). Toutes ces HDACs semblent exister dans la cellule sous forme de sous-unités de complexes multiprotéiques.

Les Sirtuins et les HDACs classiques ne partagent pas d'homologie de séquence ou structurale, et utilisent des mécanismes catalytiques différents. Les HDACs classiques fonctionnent à l'aide d'un cofacteur, l'ion Zn^{2+} et les sirtuins utilisent NAD^+ comme substrat (Landry et al, 2000). Malgré ces différences mécanistiques, les deux familles sont recrutées auprès des promoteurs et causent une désacétylation locale de la chromatine induisant une non-expression des gènes au niveau de promoteurs spécifiques ou du domaine

chromosomique. Ainsi, l'activité de ces enzymes est généralement associée à la répression des gènes.

Ces enzymes désacétylent également des protéines non histones et sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation. Il a été suggéré qu'elles auraient un rôle dans la prolifération cellulaire et le développement du cœur par exemple (Paris et al, 2008). Les sirtuins modulent le silence des gènes mais aussi les phénotypes liés à l'âge (Cole, 2008).

V. HATs et pathologies associées

Nous avons vu que les régions de la chromatine, actives transcriptionnellement, sont associées à l'hyperacétylation et au recrutement d'HATs.

La balance entre acétylation et désacétylation est un facteur important dans la régulation de l'expression des gènes. Ainsi une hyperacétylation de régions normalement silencieuses et la désacétylation de régions actives peuvent mener au développement de diverses maladies. De plus, les substrats des HATs et des HDACs ne se limitent pas aux histones, une large gamme de facteurs de transcription est incluse. Ainsi, un état d'acétylation inapproprié de ces facteurs de transcription, causé par l'activité enzymatique anormale des HATs et/ou des HDACs, est à l'origine de diverses maladies dont des cancers.

Rappelons que p300/CBP joue un rôle important dans la croissance, la différenciation, l'apoptose et la transformation cellulaire (Giordano & Avantaggiati, 1999). Rappelons également que mise à part les histones, p300/CBP acétylent une grande variété de protéines régulatrices de la transcription telles que p53, CREB, GATA-1 et HIV-1 Tat (Sternier & Berger, 2000).

p300 possède un rôle de suppresseur de tumeur et des mutations dans le gène de p300 ont été associées à divers cancers (Gayther et al, 2000; Iyer et al, 2004; Muraoka et al, 1996). De plus, p300 participe à la croissance et à la survie des cellules cancéreuses par son interaction avec la protéine HIF-1 α (**Hypoxia Inducible Factor**, *Figure 29*). En effet, lorsque les cellules cancéreuses sont en état d'hypoxie, le complexe HIF-1 α /p300 se forme, et conduit à la production d'enzymes glycolytiques d'une part, et aux protéines nécessaires à l'angiogénèse d'autre part.

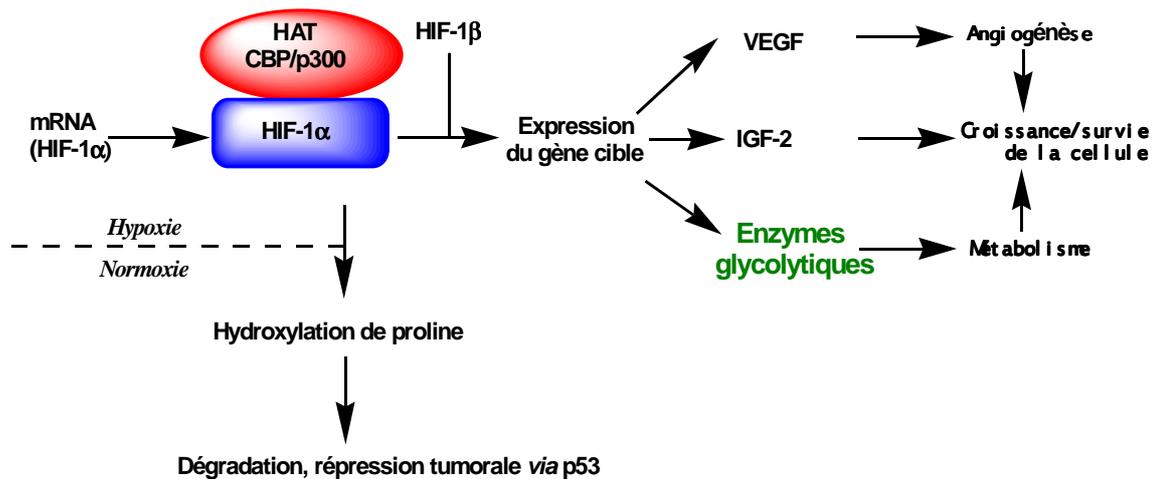


Figure 29 : Exemple d'implication de p300 dans la survie des cellules cancéreuses (Semenza, 2002)

Des mutations dans le gène de CBP ont été associées au syndrome de Rubinstein-Taybi, syndrome dysmorphique associant retard mental et déformations de la face et des extrémités (Petrij et al, 1995). Des translocations chromosomales impliquant p300 ou CBP ont été remarquées dans les cas de leucémie myéloïde aigüe (Ida et al, 1997). De plus, l'inactivation de p300/CBP est liée à diverses maladies neurodégénératives (Kalkhoven, 2004; Rouaux et al, 2003).

Outre ceci, p300/CBP s'associe avec la protéine Tat, une protéine stimulant la transcription du virus HIV-1, et il a été proposé que p300 serait recruté auprès du promoteur du virus afin d'exercer son activité HAT (Ott et al, 1999). A cela s'ajoute que p300 est impliquée dans d'autres maladies telles que l'hypertrophie cardiaque, l'asthme et le diabète (Barnes et al, 2005; McKinsey & Olson, 2004; Morimoto et al, 2008).

Les HATs de la famille des GNATs, comprenant GCN5 et PCAF, sont également impliquées dans la régulation de la transcription et dans le contrôle du cycle cellulaire. PCAF peut promouvoir la progression du cycle cellulaire en activant E2F et mener à l'arrêt du cycle cellulaire en activant p53 ; p53 et E2F étant des facteurs de transcription et deux importants régulateurs du cycle cellulaire. La surexpression de PCAF, entraînant l'acétylation de p53 et E2F, stimule l'activité antagoniste de ces deux enzymes. Le déséquilibre des interactions entre PCAF, p53 et E2F peut avoir des répercussions importantes sur la prolifération cellulaire et conduire à la formation de tumeurs (Timmermann et al, 2001).

Parmi les membres de la famille MYST (Avvakumov & Cote, 2007), Tip60 a été identifiée à cause de ses interactions avec Tat. De ce fait, Tip60 a été liée à cette infection et donc au SIDA, et plusieurs observations supportent ce fait (Col et al, 2005; Creaven et al, 1999). A cela s'ajoute son implication dans le développement du cancer de la prostate (Brady et al, 1999; Halkidou et al, 2003) et de la maladie d'Alzheimer (Baek et al, 2002; Cao & Sudhof, 2004; Kinoshita et al, 2002).

Les co-activateurs de récepteurs nucléaires, tel que TIF2 ou AIB-1, sont des protéines possédant une activité HAT et recrutées par des récepteurs nucléaires afin de permettre une ouverture locale de la chromatine pour que la machinerie transcriptionnelle se mette en place. TIF2 peut fusionner avec MOZ et cette fusion est impliquée dans certains types de leucémie (Carapeti et al, 1998; Liang et al, 1998). AIB-1 est surexprimée dans les cas de cancer du sein, des ovaires et de l'estomac (Anzick et al, 1997; Sakakura et al, 2000).

Les divers dysfonctionnements de ces enzymes sont impliqués dans un grand nombre de pathologies et ces enzymes sont donc devenues des cibles thérapeutiques. Des inhibiteurs de HATs permettraient de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de ces enzymes dans les diverses maladies à laquelle elles sont associées, d'une part, et dans les processus sains où elle intervient, d'autre part. De tels composés seraient donc des outils d'études mais aussi des composés de base pour le développement de thérapies anticancéreuses.

VI. Objectifs du projet

La chromatine, structure complexe sous laquelle l'ADN des cellules eucaryotes est compactée, est le siège de diverses modifications entraînant la décompaction de cet ADN. Cette décompaction permet l'expression des gènes, cependant, l'activité anormale des enzymes modifiant la chromatine est la cause de diverses maladies. Les histones acétyltransférases et les histones désacétylases (Glozak & Seto, 2007) font partie de ces enzymes.

Afin de traiter les maladies liées à ces deux familles d'enzymes et de mieux comprendre leur fonctionnement, la recherche s'est orientée dans l'élaboration d'inhibiteurs

de celles-ci (Hodawadekar & Marmorstein, 2007; Schafer & Jung, 2005). Ainsi des inhibiteurs d'HDACs (Trichostatin A) ont montré une activité anticancéreuse puissante et spécifique lors d'études pré-cliniques (Bolden et al, 2006; Kelly et al, 2002; Marks & Jiang, 2005). Toutefois, les études concernant les inhibiteurs de HATs n'ont pas connu la même progression.

Ainsi, la synthèse et l'étude de composés dont la structure s'apparente aux substrats naturels de l'enzyme va être entreprise. Ce travail s'inscrit dans un projet dont la première étape consiste à synthétiser et à étudier de nouveaux effecteurs d'histones acétyltransférases dont la cible est le co-activateur transcriptionnel global, p300. L'utilisation d'effecteurs permettrait de sonder le site actif de l'enzyme et conduirait à une meilleure connaissance de l'enzyme cible. Par la suite, ces effecteurs pourraient constituer, ou servir de modèle, pour une nouvelle gamme de molécules pouvant trouver des applications en thérapie anticancéreuse.

Le chapitre suivant établit une revue des inhibiteurs de HATs existants à ce jour et précisera la conception puis la synthèse d'une nouvelle famille d'inhibiteurs.

CHAPITRE II

SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DE L'ACTIVITÉ HAT

DE p300

I. Revue bibliographique des inhibiteurs de HATs

Diverses approches ont été utilisées afin de développer des inhibiteurs de HATs :

- ↳ En élaborant des molécules selon une approche rationnelle,
- ↳ En isolant des molécules d'origine naturelle à partir de plantes à l'activité anticancéreuse connue,
- ↳ Par criblage de chimiothèques.

Ces méthodes ont menées à la découverte de plusieurs inhibiteurs plus ou moins efficaces que nous allons exposer ci-dessous.

1. Les inhibiteurs conçus selon une approche rationnelle

(a) Les spermidine-CoA

Avant l'isolation des HATs, Cullis et Wolfenden ont imaginé des inhibiteurs de la réaction d'acétylation en se basant sur un intermédiaire possible dans le cas où un mécanisme passant par un complexe ternaire (histone-enzyme-acétylcoenzyme A) serait mis en jeu (Figure 30)(Cullis et al, 1982).

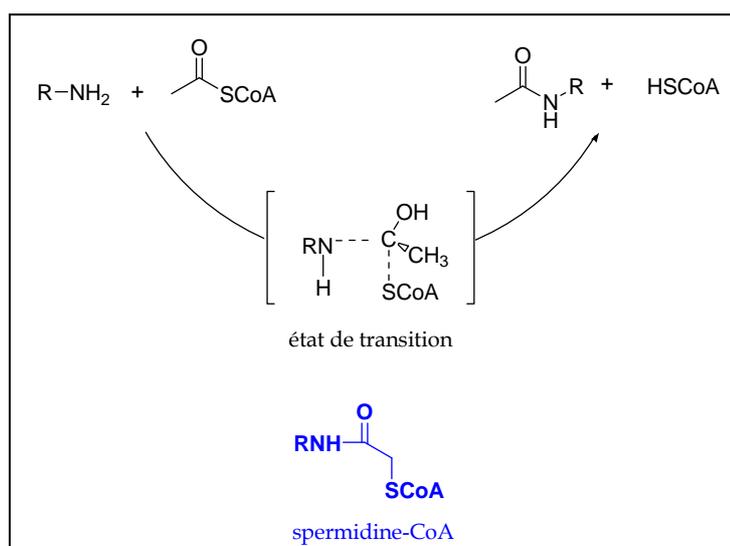


Figure 30 : Ressemblance entre l'intermédiaire possible de la réaction d'acétylation et la structure des spermidine-CoA (Cullis et al, 1982)

La synthèse de ces molécules a été réalisée de manière non régiosélective, générant ainsi un mélange de composés (Figure 31). Avec une concentration de 16 nM, ces molécules ont conduit à une inhibition supérieure à 50% de l'activité histone acétyltransférase d'extraits nucléaires (Cullis et al, 1982). Ces inhibiteurs sont appelés inhibiteurs de type bi-substrat, c'est-à-dire, des molécules composées de parties semblables aux substrats (ici, lysine des histones) et co-substrats naturels (ici, acétylcoenzyme A) de l'enzyme cible. Ainsi, la partie polyamine est censée mimer la lysine de la partie N-terminale des histones.

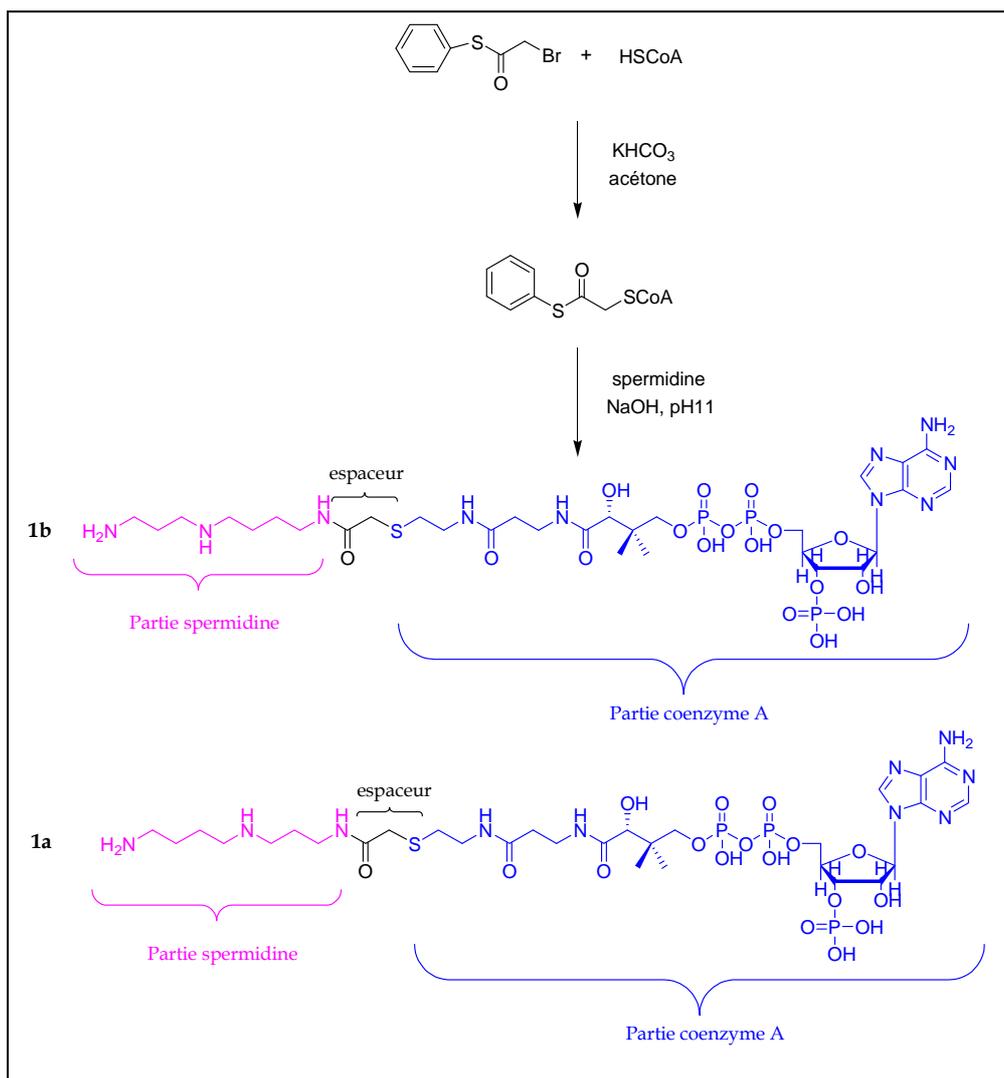


Figure 31: Synthèse des spermidine-CoA (**1a** et **1b**) selon Cullis et al. (Cullis et al, 1982)

Durant les expériences réalisées, les auteurs ont observé une inhibition spécifique des histones H2A et H2B : 46% d'inhibition pour H2A avec 0,2 μM de spermidine-CoA, 90% d'inhibition pour H2B avec 1,6 μM de spermidine-CoA, l'acétylation de H3 et H4 étant peu

affectée par les mêmes concentrations en inhibiteur. Ils ont supposé que les spermidine-CoA ciblaient préférentiellement les HATs responsables de l'acétylation de H2A et H2B.

Dans les années 90, Parello et al. ont mis au point une synthèse régiosélective, différente de celle de Cullis et al., et permettant d'obtenir individuellement chacune des spermidine-CoA (**1a** et **1b**) (Roblot et al, 1993). Parello et al ont également montré que l'intermédiaire thiophénylcarboxylméthyl-CoA mentionné par Cullis et al. n'est pas produit (Roblot et al, 1993). Ils ont donc élaboré une nouvelle voie de synthèse utilisant un intermédiaire réactionnel bromoacétylé (R-NHCOCH₂Br, Figure 32).

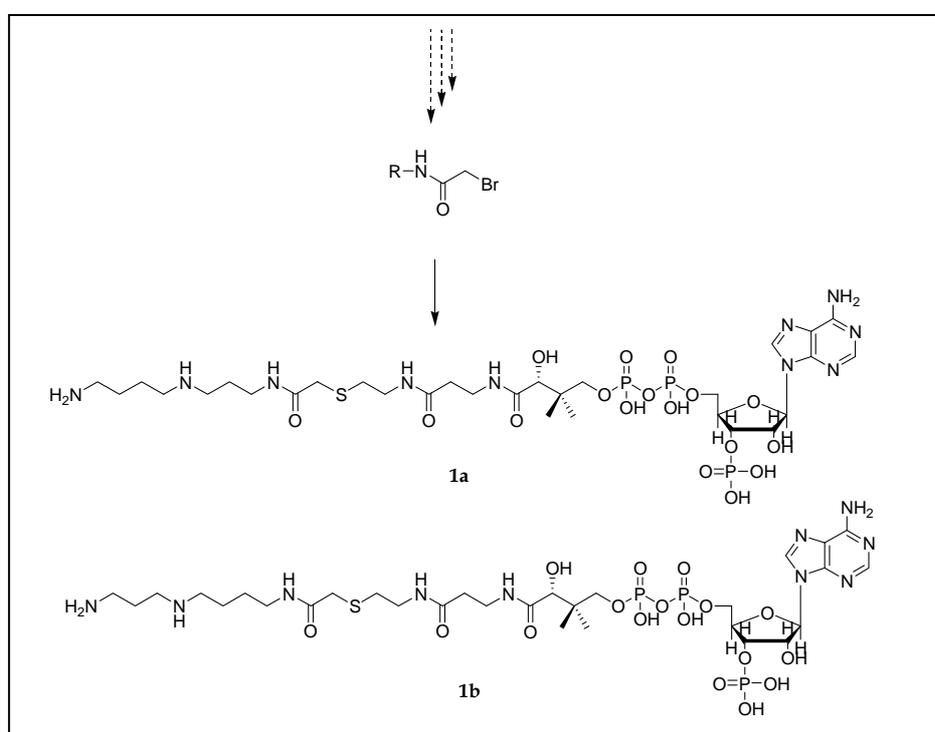


Figure 32 : Spermidine-CoA et dérivés (Roblot et al, 1993)

Ils ont également entrepris de vérifier si l'inhibition de l'activité HAT nécessitait que la partie coenzyme A soit entière. Pour cela, les molécules nommées **2a** et **3a** ont été conçues (Parello et al, 1990) (Figure 33).

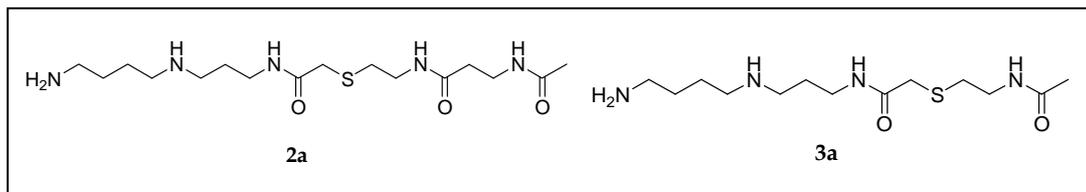


Figure 33 : **2a** et **3a**, dérivés des spermidine-CoA **1a** et **1b**

Les tests d'inhibition effectués *in vitro*, sur des polynucléosomes avec des HATs nucléaires, ont donné les résultats suivants : l'effet inhibiteur de **1a** est supérieur à celui de **2a**, lui-même supérieur à **3a** (**1a**>**2a**>**3a**). Lors de ces tests, **1b** n'a pas été testé. Cependant, **1a** et **1b** inhibe l'acétylation des histones de la chromatine de façon similaire (données non publiées fournies par le Dr. Martin et le Pr. Parello)

(b) *Lys-CoA, H3-CoA-20 et dérivés*

Par la suite, d'autres inhibiteurs de type bi-substrat ont été préparés. Ainsi l'équipe de Cole a synthétisé une première série de molécules contenant des fragments de 7 ou 20 acides aminés, fragments composant la partie N-terminale des histones H3 et H4 (Lau et al, 2000b; Zheng et al, 2004). Trois molécules se sont démarquées : Lys-CoA, H3-CoA-20 et H3-(Me)-CoA-20 (Figure 34).

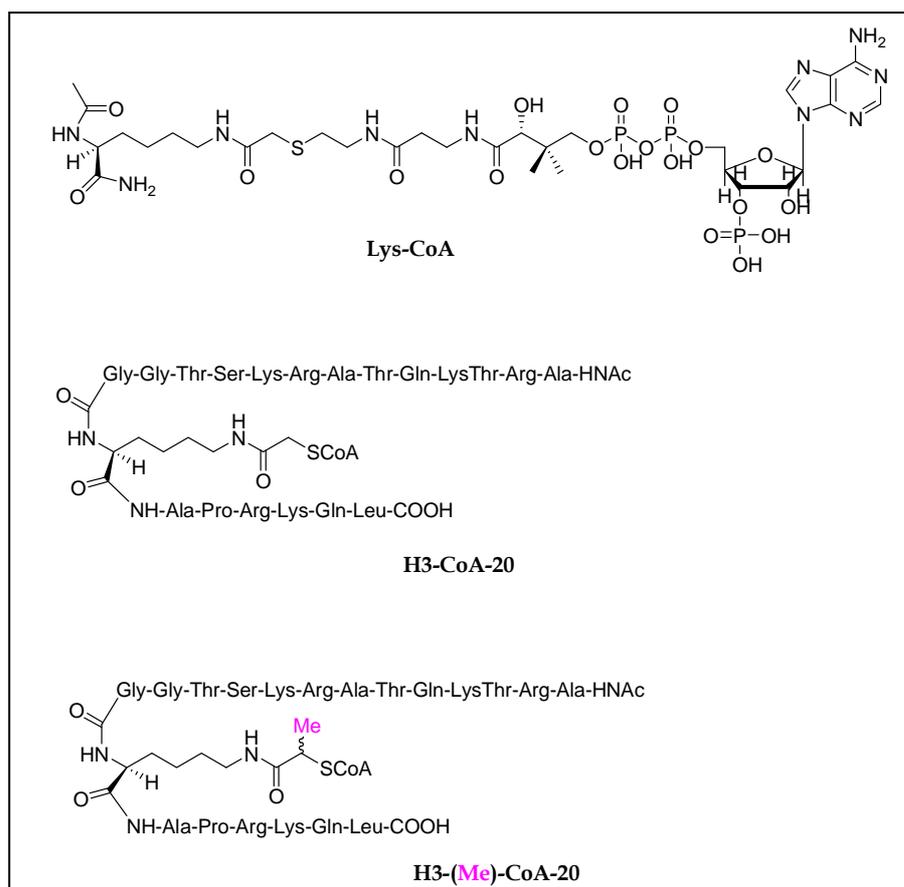


Figure 34 : Les peptide-CoA : Lys-CoA, H3-CoA-20 et H3-(Me)-CoA-20 (Lau et al, 2000b; Zheng et al, 2004)

En effet, ces composés ont été testés sur p300, PCAF et GCN5, et Lys-CoA inhibe efficacement et sélectivement p300 tandis que H3-CoA-20 et H3-(Me)-CoA-20 montrent une forte efficacité envers PCAF et GCN5 (Tableau 6).

Valeurs d'IC₅₀ (en μM)			
Composés	p300	PCAF	GCN5
Lys-CoA	0,5	200	200
H3-CoA-20	200	0,75 ^a	0,5 ^a
H3-(Me)-CoA-20	60	0,36	0,3^a

Tableau 6 : Valeurs d'IC₅₀ mesurées avec les inhibiteurs de type peptide-CoA (Tests réalisés avec un mélange d'histones, p300 (1-2414), PCAF (1-832), GCN5 (1-427). ^aTests réalisés avec le domaine HAT de PCAF (493-676) ou le domaine HAT de GCN5 (48-210) et avec le peptide H3-20) (Zheng et al, 2004)

Compte tenu des résultats obtenus, cette équipe a élaboré une seconde série de peptide-CoA dérivé de Lys-CoA afin d'étudier et d'établir des relations structures/activité (Sagar et al, 2004). Plusieurs sites ont été modifiés (Figure 35) et les tests réalisés avec le domaine HAT de p300 démontrent que :

- En faisant varier la longueur de l'espaceur ($n = 4$ ou $n = 7$), le dérivé obtenu est moins efficace que Lys-CoA ;
- En ajoutant, un groupement $X = \text{Me}$ sur l'espaceur, le dérivé est meilleur que Lys-CoA, mais si $X = \text{Ph}$, une perte d'efficacité est observée par rapport à Lys-CoA ;
- En changeant le groupement en position Y ($Y = \text{Me}$) par $Y = \text{Ph}$, le composé résultant montre une capacité d'inhibition supérieure à celle de Lys-CoA. Cependant, un dérivé comportant à la fois $X = \text{Me}$ et $Y = \text{Ph}$ ne conduit pas à un inhibiteur meilleur que Lys-CoA.

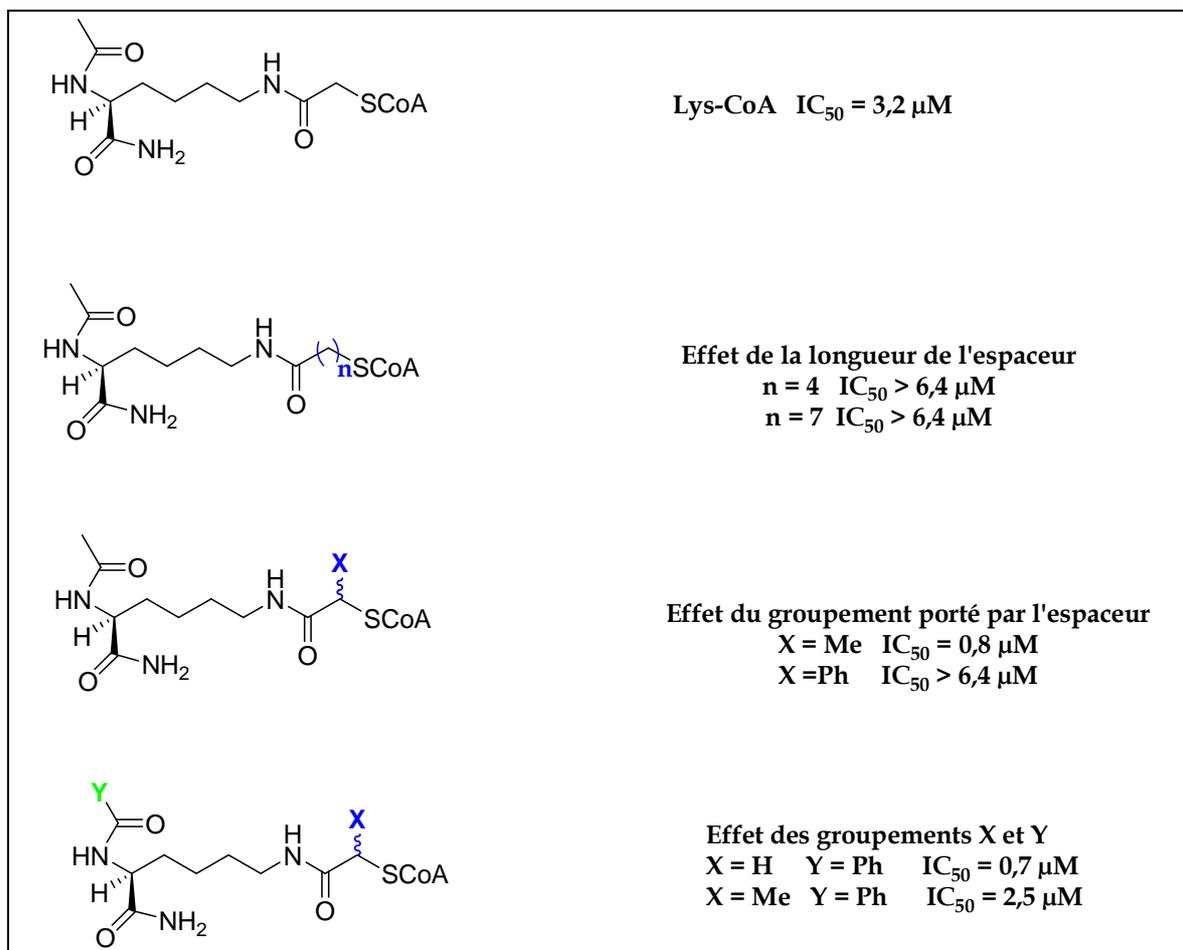


Figure 35 : Les sites modifiés sur Lys-CoA pour l'étude de la relation structure/activité (Tests réalisés avec H4-12 comme substrat et p300 (1284-1673)) (Sagar et al, 2004)

Bien que Lys-CoA, par micro-injection, puisse réduire l'activité HAT d'un système biologique donné, les dérivés du coenzyme A, en général, ne franchissent pas la membrane cellulaire (Robishaw & Neely, 1985). Une première tentative pour pallier ce problème, a consisté à préparer une prodrogue qui générerait Lys-CoA *in situ*, en utilisant les enzymes de la biosynthèse du coenzyme A. Cette méthode ne conduisit pas aux résultats espérés (Cebrat et al, 2003). Par ailleurs, lors de cette étude, des molécules dont la partie coenzyme A a été « tronquée » ont été testées sur p300 (1284-1673) (Figure 36), révélant que la partie coenzyme A entière était nécessaire à l'efficacité de Lys-CoA.

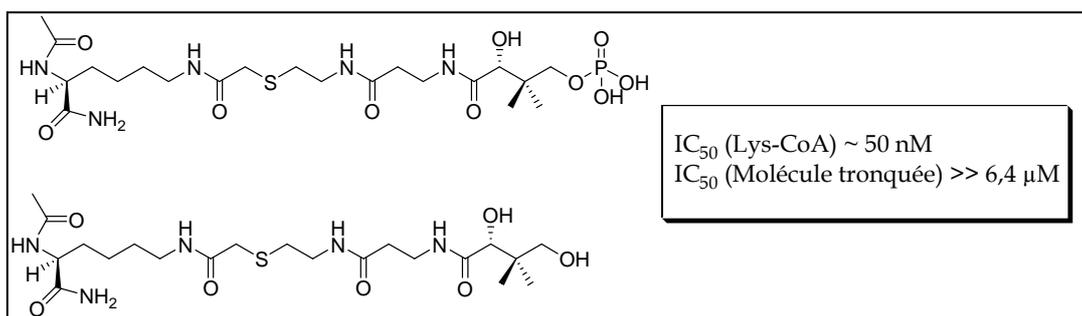


Figure 36 : Dérivés de Lys-CoA tronqués (Tests réalisés avec le peptide H4-20 comme substrat)
(Cebrat et al, 2003)

Les études visant à trouver un dérivé de Lys-CoA pouvant passer la membrane cellulaire ont été poursuivies, et, une troisième génération d'analogues de Lys-CoA et de H3-CoA-20 a été réalisée (Figure 37, Figure 38). Une séquence peptidique (ex : Tat) a été greffée sur ces molécules afin de rendre leur passage à travers la membrane cellulaire possible. Ainsi, les composés H3-CoA-20-Tat, Lys-CoA-Tat et Lys-CoA-SS-R10 ont été conçus. H3-CoA-20-Tat inhibe p300 et PCAF avec une inhibition marquée pour PCAF (Cleary et al, 2005; Guidez et al, 2005) et Lys-CoA-Tat présente une sélectivité modérée pour p300 (Figure 37). Ces composés, Lys-CoA-Tat et H3-CoA-20-Tat, ont été testés sur des cellules KG1, conduisant à l'inhibition de p300 et de PCAF respectivement, montrant ainsi que ces molécules franchissent la membrane cellulaire (Guidez et al, 2005).

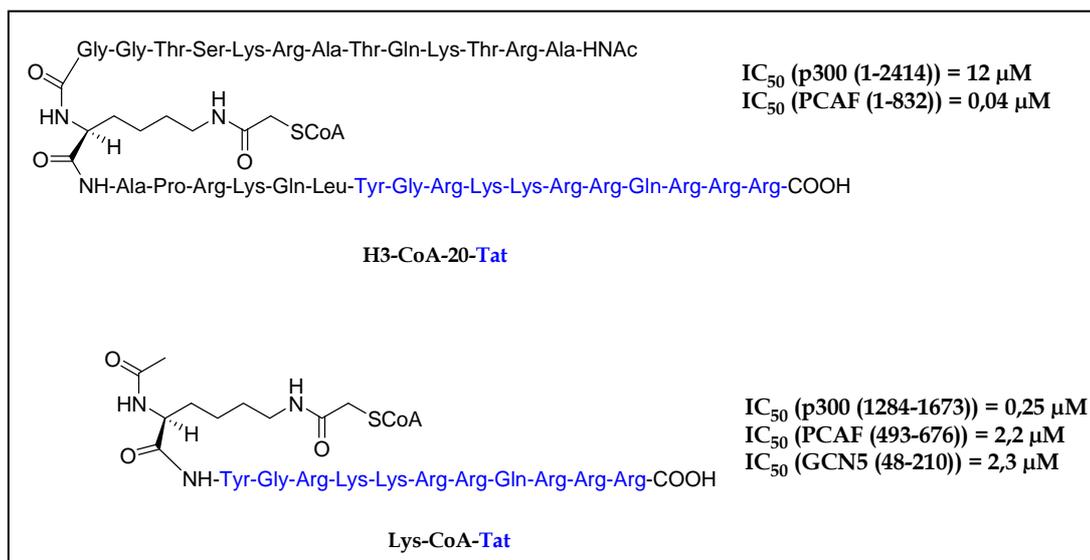


Figure 37 : H3-CoA-20-Tat et Lys-CoA-Tat (Tests réalisés avec H4-20 comme substrat de p300, et H3-20 comme substrat PCAF et GCN5)(Cleary et al, 2005; Guidez et al, 2005)

Un autre composé, Lys-CoA-SS-R10, a été conçu dans le but de produire un composé capable de passer la membrane cellulaire d'une part, et de libérer Lys-CoA dans la cellule d'autre part (Zheng et al, 2005) (Figure 38). Ce composé inhibe p300 et PCAF *in vitro*, et des tests réalisés avec des cellules 293T ont montré une inhibition de la transcription liée à l'activité HAT de p300. Ces résultats indiquent que Lys-CoA-SS-R10 franchit la membrane cellulaire, et suggèrent fortement que l'activité de p300 est inhibée dans les cellules.

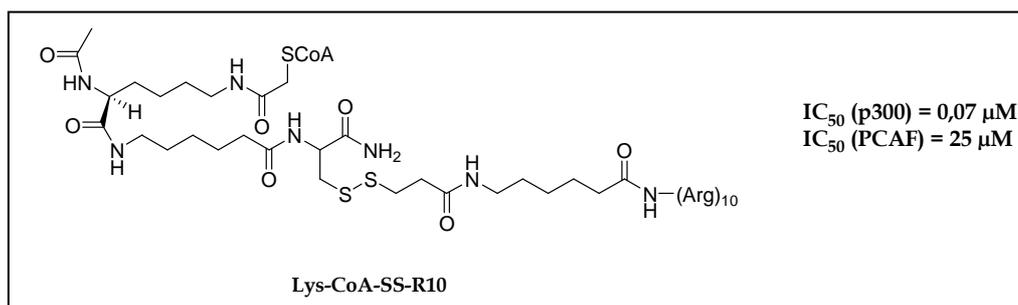


Figure 38 : Lys-CoA-SS-R10 (Tests réalisés avec p300 (1-2414) et H4-20 comme substrat ; PCAF (493-676) et H3-20 comme substrat)

(c) H4K16-CoA

Les inhibiteurs de type bi-substrat présentés ci-dessus sont généralement testés et efficaces contre les HATs p300, PCAF et GCN5. Des inhibiteurs de type bi-substrat de la famille MYST n'ont pas été répertoriés jusqu'à ce jour. De ce fait, l'équipe de Wu et al. a mis au point une série d'analogues de type bi-substrat pour l'inhibition de HATs de la famille des MYSTs (Wu et al, 2009). Ces analogues ont été conçus similairement à Lys-CoA et H3-CoA-20 (Lau et al, 2000b), avec des séquences peptidiques contenant les sites des histones H4, H3 et H2A préférentiellement acétylés par Esa1 et Tip60. Ces composés ont été testés sur les enzymes Esa1 (105-445), Tip60 (1-513), p300 (1284-1673) et PCAF (493-658). Il apparaît que H4K16-CoA (Figure 39) est un inhibiteur de Esa1, Tip60 et p300 (Tableau 7). Ce composé pourra être utilisé afin de compléter les études sur les enzymes Esa1 et Tip60.

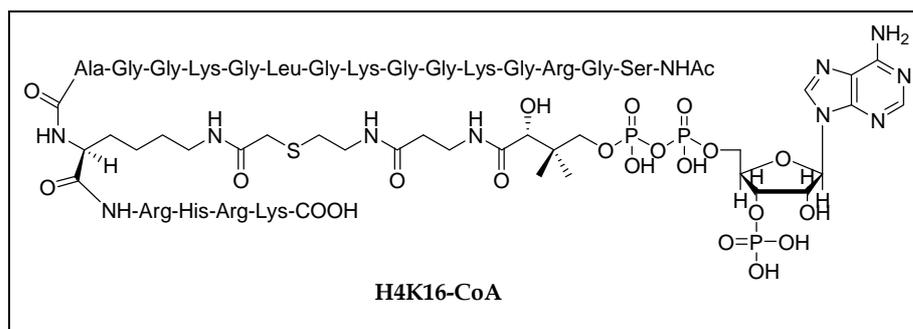


Figure 39 : H4K16-CoA, inhibiteur de type bi-substrat de Esa1, Tip60 et p300 (Wu et al, 2009)

	IC ₅₀ (en μM)			
	Esa1	Tip60	P300	PCAF
H4K16-CoA	5,51	17,30	6,62	58,47

Tableau 7 : Résultats d'inhibition avec H4K16-CoA (Le substrat utilisé pour les tests avec Esa1, Tip60 et p300 est le peptide H4-20 ; pour PCAF, le peptide H3-31)

2. Les inhibiteurs d'origine naturelle

Certaines plantes sont connues pour leur propriété anticancéreuse, et l'étude de certaines d'entre elles a mené à l'isolation de molécules possédant une activité anti-HAT. Ainsi l'acide anacardique issu de la noix de cajou, le garcinol issu du fruit du *garcinia indica* et le curcumin issu du safran, ont montré une activité anti-HAT. Ces molécules constituant une autre catégorie d'inhibiteur vont être présentées.

(a) L'acide anacardique et ses dérivés

Le premier de cette série est l'acide anacardique (Balasubramanyam et al, 2003) issu de la noix de cajou (Figure 40). Il inhibe efficacement l'activité HAT de p300 et PCAF *in vitro*. En effet, des tests réalisés avec l'histone H3 comme substrat ont montré que l'acide anacardique inhibe p300 avec un $IC_{50} \sim 0,5 \mu M$.

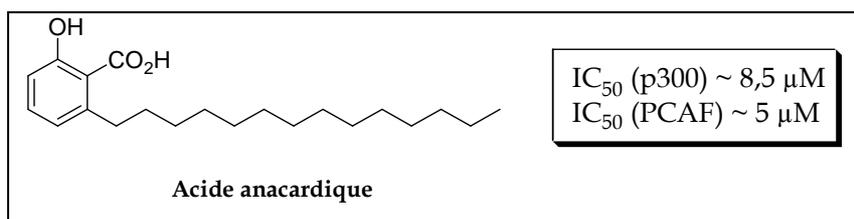


Figure 40 : L'acide anacardique (Tests effectués avec un mélange d'histones) (Balasubramanyam et al, 2003)

Dans le but d'améliorer la spécificité de l'acide anacardique, le même groupe a mis au point un dérivé de cette molécule nommé CTBP (Figure 41), qui au lieu de bloquer p300, au contraire, a conduit à une augmentation de son activité HAT.

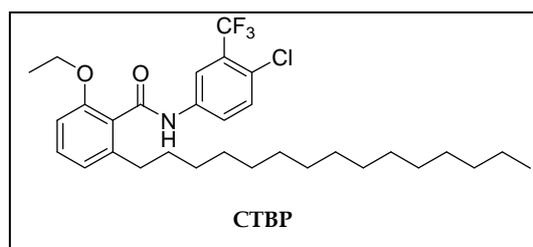


Figure 41 : CTBP, activateur de la fonction HAT de p300 (Balasubramanyam et al, 2003)

Des études complémentaires réalisées par l'équipe de Kundu, ont révélé que les cellules sont peu ou pas perméables à ces deux composés (Varier et al, 2004).

Par ailleurs, Sun et al. ont montré que l'acide anacardique inhibe l'activité HAT de Tip60 *in vitro* avec une $IC_{50} = 9 \mu M$ (Sun et al, 2006). L'activité HAT de Tip60 est requise auprès de régulateurs activés en réponse aux dommages causés à l'ADN. Il a été montré que l'acétylation de ces régulateurs est bloquée en présence d'acide anacardique et que donc, Tip60 est inhibée dans les cellules (Sun et al, 2006). Compte tenu de ces résultats, des expériences ont été menées sur des cellules cancéreuses. Ces cellules ont été soumises à des radiations ionisantes en présence d'acide anacardique. En effet, ces radiations étant génotoxiques, elles sont employées pour traiter des cancers. Il résulte qu'en présence d'acide anacardique, la sensibilité des cellules tumorales aux radiations est accrue. Contrairement à l'équipe de Kundu, cette équipe a aussi montré que l'acide anacardique agit sur des cultures cellulaires. Ce composé pourrait être employé afin d'améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux. De plus, ces résultats montrent qu'en plus de p300 et PCAF (Balasubramanyam et al, 2003), l'acide anacardique est aussi un inhibiteur de Tip60.

Les résultats encourageants obtenus avec l'acide anacardique ont conduit une équipe de chercheurs américains et allemands, à synthétiser 28 analogues (Eliseeva et al, 2007). Ces composés induisent une diminution de l'activité HAT *in vitro*. Ils induisent également une diminution de croissance de cellules cancéreuses (cellule de type MCF7, avec H4 comme substrat). Toutefois, ces molécules sont moins efficaces que l'acide anacardique, à l'exception du composé **4g** (Figure 42), et la corrélation entre leur cytotoxicité et leur effet sur l'activité HAT, *in vitro*, a été mise en évidence (Eliseeva et al, 2007).

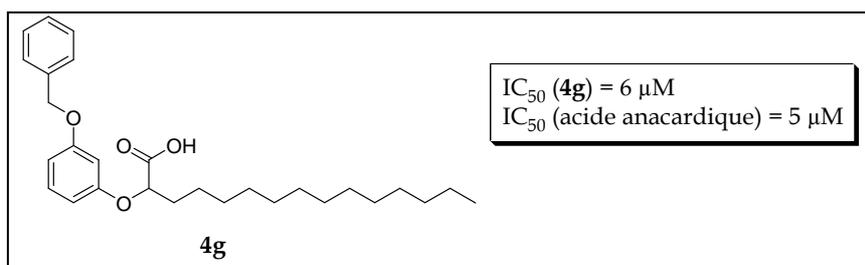


Figure 42 : Structure de **4g**, un dérivé de l'acide anacardique (Tests réalisés avec un extrait nucléaire de cellules HeLa, *in vitro*) (Eliseeva et al, 2007)

Une autre série de dérivés de l'acide anacardique a été étudiée (Sbardella et al, 2008). Des études préliminaires sur ces composés ont permis aux chercheurs de se focaliser sur un seul composé nommé **1b** (Figure 43). Ce dernier (à 50 μM) inhibe p300 et CBP (Tableau 8), mais n'a aucun effet sur GCN5 avec la même concentration. En outre, une augmentation significative de l'acétylation du substrat (H3) a été observée lors des tests effectués avec PCAF. Cette molécule constitue le second activateur d'activité HAT répertorié.

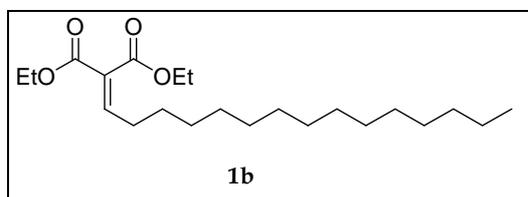


Figure 43 : **1b**, modulateur d'HAT dérivé de l'acide anacardique

Inhibition en présence de 50 μM d'inhibiteur 1b			
	1b	Curcumin	Acide anacardique
P300	74%	46%	87%
CBP	81%	0%	62%

Tableau 8 : Résultats des tests d'inhibition avec **1b** réalisés avec p300 et CBP (HATs extraites de cellules U937), le curcumin (cf I.2.c de ce chapitre) et l'acide anacardique servent de référence (Sbardella et al, 2008)

(b) Le garcinol et ses dérivés

Peu de temps après la découverte de l'acide anacardique en tant qu'inhibiteur de HAT, le garcinol, une benzophénone polyisoprénylée a été isolée. Il a été montré que cette molécule est un inhibiteur de p300 et de PCAF *in vitro* d'une part et lors de tests réalisés sur cellules HeLa d'autre part (Balasubramanyam et al, 2004a) (Figure 44). *In vitro*, l'acétylation de H4 par p300 est préférentiellement bloquée par rapport à celle de H3 : 1 μM de garcinol inhibe totalement l'acétylation de H4 par p300 alors que 20 μM de garcinol ne peuvent inhiber totalement l'acétylation de H3. Durant les tests réalisés sur cultures cellulaires, la transcription des gènes p300-dépendante fut bloquée en présence de garcinol (20 et 50 μM) (Balasubramanyam et al, 2004a). Ainsi ce composé possède une activité *in vitro* et sur cultures cellulaires.

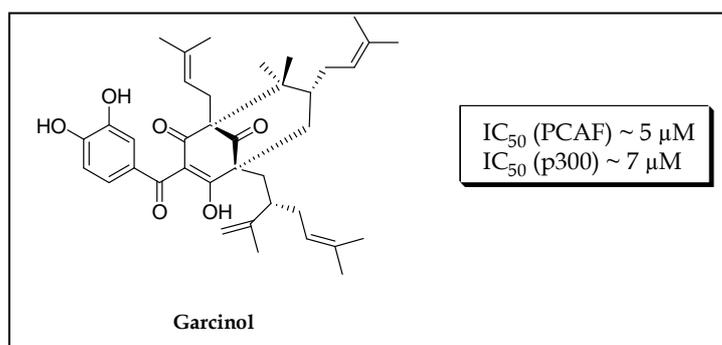


Figure 44 : Le garcinol, inhibiteur de l'activité HAT de p300 et PCAF (les valeurs d'IC₅₀ correspondent à des tests effectués avec un mélange d'histones, *in vitro*)

Cependant, le garcinol est un composé toxique et il ne présente pas de spécificité vis-à-vis des HATs testées. Afin de résoudre ce problème, l'équipe qui l'a isolé a conçu presque 50 dérivés de ce dernier (Mantelingu et al, 2007). Plus précisément, ce sont des dérivés de l'isogarcinol, un produit de la cyclisation du garcinol, qui ont été synthétisés. Trois molécules de cette série, nommées **LTK-13**, **LTK-14** et **LTK-19** (Figure 45) ont inhibé p300 *in vitro*. En effet, 10 μM de chacun de ces composés inhibent entre 85 et 90% de l'acétylation de H3 et H4. Toutefois, ces composés se sont révélés inefficaces contre PCAF et GCN5 (aucun effet n'a été observé en présence de 10 μM de composés, et aucun effet sur PCAF en présence de 50 μM de **LTK-14**) (Tableau 9).

Des recherches approfondies avec **LTK-14** ont montré que celui-ci inhibe l'activité HAT de p300 dans des cellules HeLa. De plus, **LTK-13**, **LTK-14** et **LTK-19**, contrairement au garcinol, ne présentent pas de cytotoxicité.

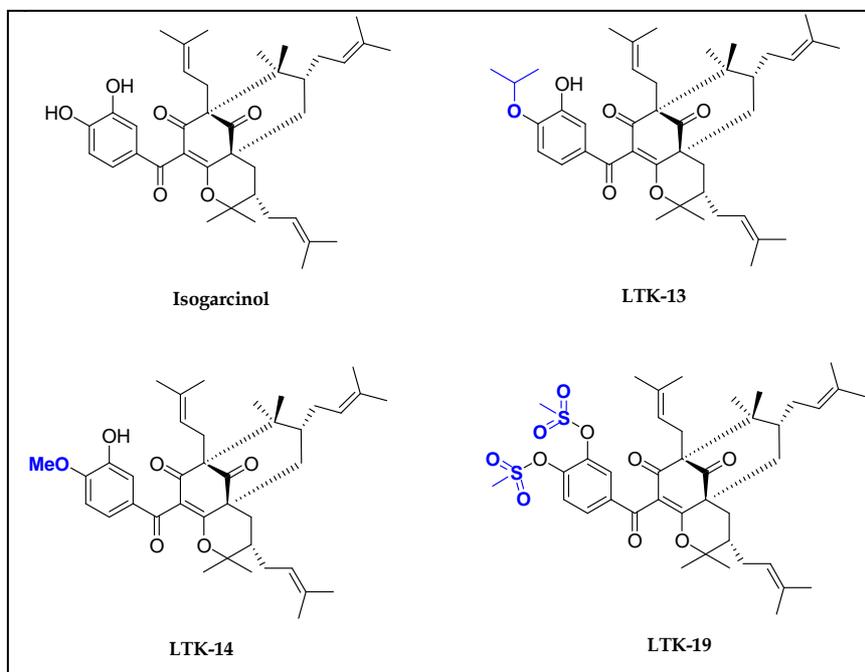


Figure 45 : L'isogarcinol et ses dérivés (Mantelingu et al, 2007)

Valeurs d'IC ₅₀ (en μM)				
	Isogarcinol	LTK-13	LTK-14	LTK-19
	Cytotoxique	Non cytotoxique	Non cytotoxique	Non cytotoxique
p300	7	5-7	5-7	5-7
PCAF	5	Pas d'inhibition*	Pas d'inhibition*	Pas d'inhibition*

Tableau 9 : Inhibition *in vitro* par l'isogarcinol et ses dérivés (Tests réalisés en présence d'un mélange d'histones, *avec 10 μM d'inhibiteurs)

(c) Le curcumin et ses dérivés

Un autre inhibiteur d'origine naturelle (Figure 46) se trouve être le curcumanoïde principal du safran, le curcumin (Balasubramanyam et al, 2004b). Il inhibe préférentiellement l'activité HAT de p300 et n'affecte pas l'activité HAT de PCAF (Tests réalisés avec 100 μM de curcumin). Il s'est montré efficace *in vitro* et sur cellules HeLa, avec des protéines histones et non histones comme substrat. De plus, il réprime la transcription de la chromatine dépendante de l'activité HAT de p300. Il a également la faculté d'inhiber l'acétylation de la protéine Tat-HIV, protéine essentielle à la réplication du virus HIV (Balasubramanyam et al, 2004b).

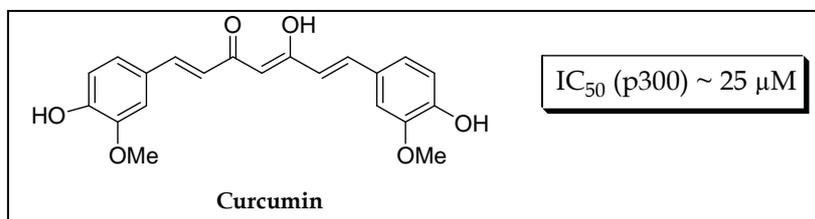


Figure 46 : Le curcumin (la valeur d' IC_{50} indiquée correspond à des tests effectués *in vitro* avec un mélange d'histones)

Outre son effet sur l'activité HAT de p300, le curcumin a été testé sur des cellules tumorales HL-60 et cette expérience a conduit à l'inhibition de la prolifération des cellules et à l'induction de l'apoptose (avec une concentration en curcumin de 20 μM) (Pan et al, 2001).

Compte tenu de ses propriétés, des dérivés du curcumin ont été produits afin d'en augmenter l'efficacité (Costi et al, 2007) (Figure 47). Leur activité inhibitrice a été testée sur p300 et il en ressort que les composés **2a-d** sont moins efficaces que les composés **1a-c**, exception faite du composé **2c**. De façon surprenante, dans ce test, le curcumin (concentration utilisée > 400 μM), utilisé comme référence, n'a montré aucune activité anti-HAT, et ce, bien que du curcumin de provenance différente ait été utilisé (Tableau 10).

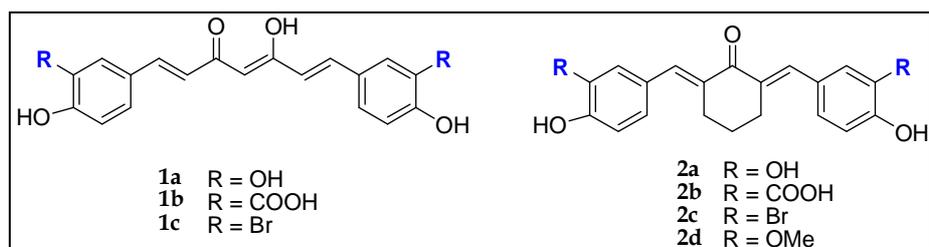


Figure 47 : Structure des dérivés du curcumin (Costi et al, 2007)

Valeurs d'IC ₅₀ (en μM)									
	1a	1b	1c	curcumin	2a	2b	2c	2d	Lys-CoA
p300	46	21	33	> 400	233	168	5	111	30

Tableau 10 : Résultats des tests d'inhibition *in vitro* effectués avec les dérivés **1a-c** et **2a-d** et un mélange d'histones (Costi et al, 2007)

Parmi les 7 composés, **1b** et **2c** ont été retenus pour la suite des investigations. Ces molécules ont été testées sur PCAF et GCN5, montrant ainsi que parmi les enzymes testées, **2c** inhibe préférentiellement p300, **1b** inhibe d'autres HATs et n'est donc pas sélectif (Tableau 11).

Activité HAT résiduelle			
Composés	p300	PCAF	GCN5
1b (21 μM)	50%	68%	38%
2c (5 μM)	50%	100%	70%

Tableau 11 : Inhibition de PCAF et GCN5 par les dérivés du curcumin (Tests réalisés sur un mélange d'histones) (Costi et al, 2007)

Les études réalisées avec **1b** et **2c** ont été complétées par des tests sur des cellules HeLa. Il est apparu que 200 μM de **1b** n'altèrent pas l'acétylation de H3 par p300, alors que la diminution de l'acétylation de H3 par p300 a été observée avec 20 μM de **2c**. **2c** agit donc sur l'acétylation en milieu cellulaire.

(d) Autres dérivés des molécules naturelles

Les molécules naturelles décrites ci-dessus ont inspiré l'équipe de Mai et al. qui a synthétisé 22 composés dont les structures sont basées sur celle de l'acide anacardique, du garcinol et du curcumine (Mai et al, 2006). Parmi les composés testés, seuls 3 se sont distingués (Figure 48) ; en effet, les tests effectués sur des HATs issues d'extraits nucléaires (cellules U937) ne montrent qu'une faible inhibition (Tableau 12).

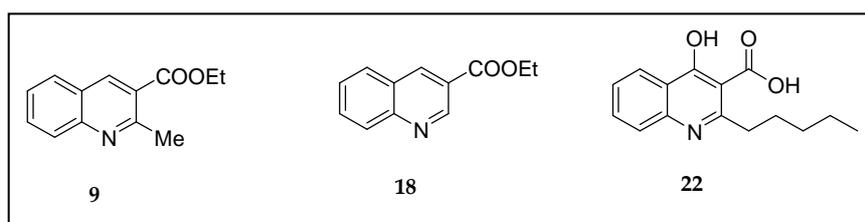


Figure 48 : Composés 9, 18 et 22 (Mai et al, 2006)

Inhibition par les dérivés de molécules naturelles							
	9	18	22	22	Acide anacardique	Curcumine	MB-3
	500 μ M	500 μ M	25 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M
HATs nucléaires	32%	25%	24%	30%	15%	17,5%	44%

Tableau 12 : Inhibition de HATs nucléaires (Mai et al, 2006)

De plus, des études réalisées sur des levures ont montré que le composé 9 inhibe la transcription dépendante de GCN5 *in vitro*, ainsi que l'acétylation de H3 par GCN5, *in vivo* (Ornaghi et al, 2005).

3. Les inhibiteurs issus de criblage

Suite à ces avancées dans le domaine des inhibiteurs d'HATs, d'autres molécules possédant une activité anti-HAT ont été découvertes. Ces molécules proviennent soit de

criblages de bibliothèques de molécules chimiques ou sont inspirées des inhibiteurs existants. Ainsi 35 isothiazolones (Stimson et al, 2005) d'une part et des α -méthylène- γ -butyrolactones (Biel et al, 2004) d'autre part ont été testées (Figure 49).

Les isothiazolones inhibent p300 (résidus 1096-1721 ; 30 à 95% d'inhibition avec 35 μ M de composé), PCAF (IC₅₀ de 1,1 à 100 μ M) ainsi que la croissance de plusieurs types de cellules cancéreuses mais montrent également une cytotoxicité significative (Stimson et al, 2005).

Les dérivés de la γ -butyrolactones sont connus pour leurs diverses propriétés biologiques. Ainsi, parmi les molécules synthétisées par Biel et al., **MB-3** (R = n-C₃H₇) s'est révélée inhibitrice de GCN5 humaine (Biel et al, 2004).

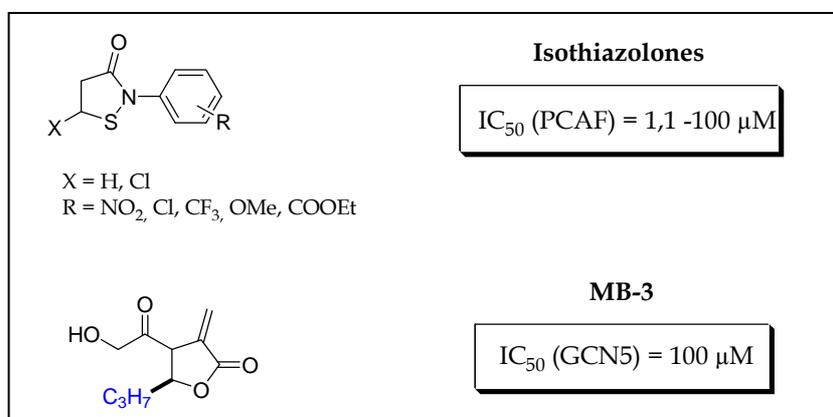


Figure 49 : Les isothiazolones (Stimson et al, 2005), Résultats d'inhibition pour la γ -butyrolactones MB-3 (Tests réalisés avec un mélange d'histones) (Biel et al, 2004)

Suivant ce principe, la molécule **2** (Figure 50), possédant la capacité de traverser la membrane cellulaire, a été testée sur GCN5 en présence de l'histone H3 (Chimenti et al, 2009). Les tests réalisés *in vitro* avec 800 μ M de ce composé montrent une inhibition comparable à la référence utilisée, l'acide anacardique (200 μ M).

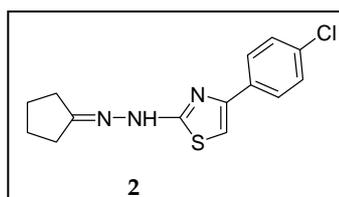


Figure 50 : « Composé **2** », synthétisé à la suite d'un criblage chimique

4. Récapitulatif

Les figures qui suivent regroupent les principaux inhibiteurs de HATs de la littérature (Figure 51, Figure 52, Tableau 13)

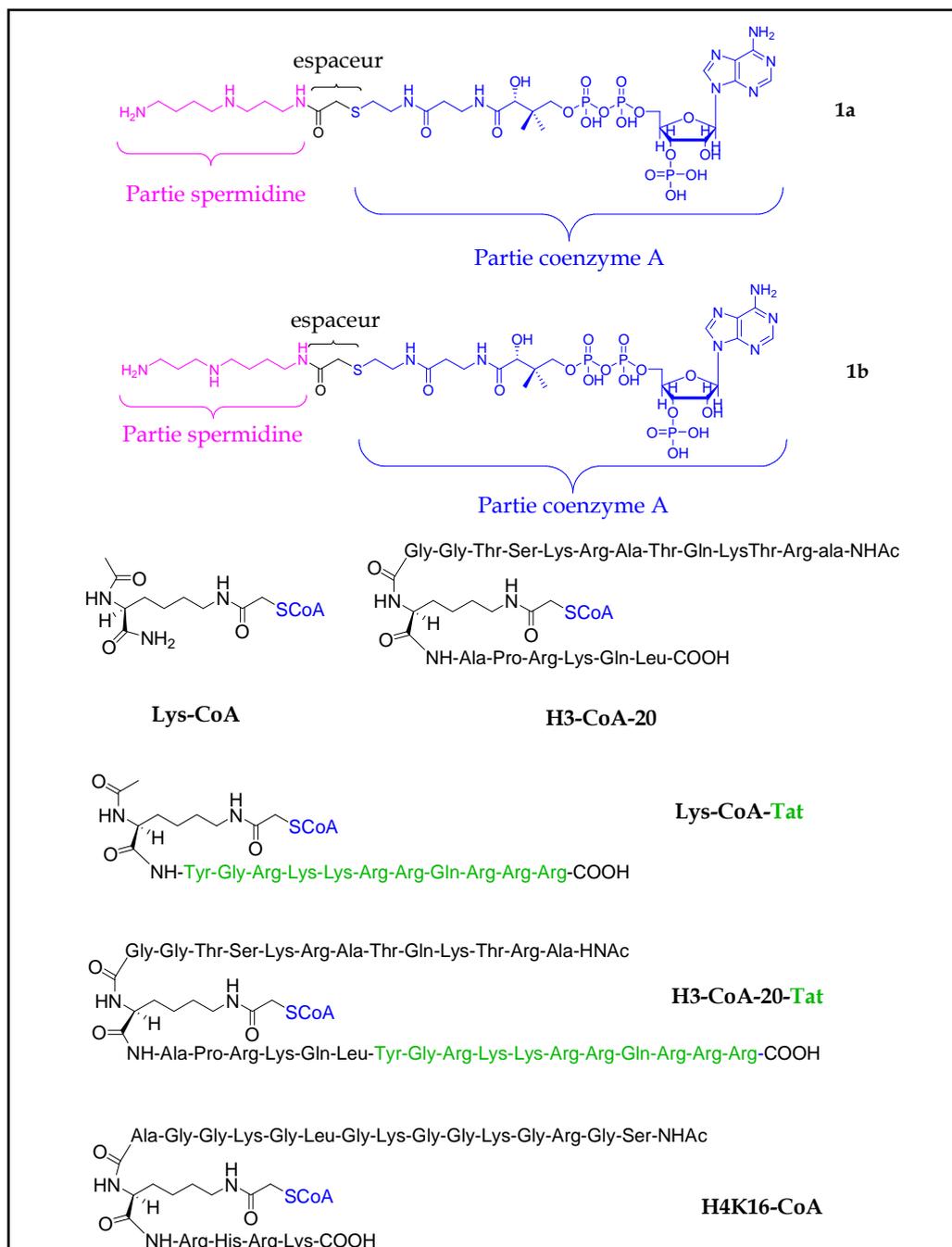


Figure 51 : Les spermidine-CoA (**1a** et **1b**) (Cullis et al, 1982), Lys-CoA et H3-CoA-20 (Lau et al, 2000b; Zheng et al, 2004), H3-CoA-20-Tat et Lys-CoA-Tat (Cleary et al, 2005; Guidez et al, 2005), H4K16-CoA (Wu et al, 2009)

Valeurs d'IC ₅₀ (en µM)						
Composés	p300	PCAF	GCN5	Esa1	Tip60	Extrait nucléaires
(1a+1b) ⁽¹⁾	ND	ND	ND	ND	ND	< 0,016
Lys-CoA ⁽²⁾	0,5	200	200	ND	ND	ND
H3-CoA-20 ⁽²⁾	200	0,75 ^a	0,5 ^a	ND	ND	ND
H3-CoA-Tat ⁽³⁾	12	0,04	ND	ND	ND	ND
Lys-CoA-Tat ⁽³⁾	0,25	2,2	2,3			
H4K16-CoA ⁽⁴⁾	6,62	58,47	ND	5,51	17,30	ND

Tableau 13 : Valeurs d'IC₅₀ mesurées avec les inhibiteurs de type bi-substrat (1) 16 nM de **(1a+1b)** inhibe plus de 50% de l'acétylation d'extrait nucléaire (Cullis et al, 1982) (2) Tests réalisés avec un mélange d'histones, p300 (1-2414), PCAF (1-832), GCN5 (1-427). ^aTests réalisés avec le domaine HAT de PCAF (493-676) ou le domaine HAT de GCN5 (48-210) et avec le peptide H3-20 (Zheng et al, 2004) (3) H3-CoA-20-Tat : tests réalisés avec H4-20 comme substrat de p300 (1-2414) et H3-20 comme substrat de PCAF (1-832), Lys-CoA-Tat : tests réalisés avec H4-20 comme substrat de p300 (1284-1673), H3-20 comme substrat de PCAF (493-676) et GCN5 (48-210) (Cleary et al, 2005; Guidez et al, 2005) (4) H4K16-CoA : le substrat utilisé pour les tests avec Esa1, Tip60 et p300 est H4-20 ; pour PCAF, le peptide H3-31, ND : Non Déterminé

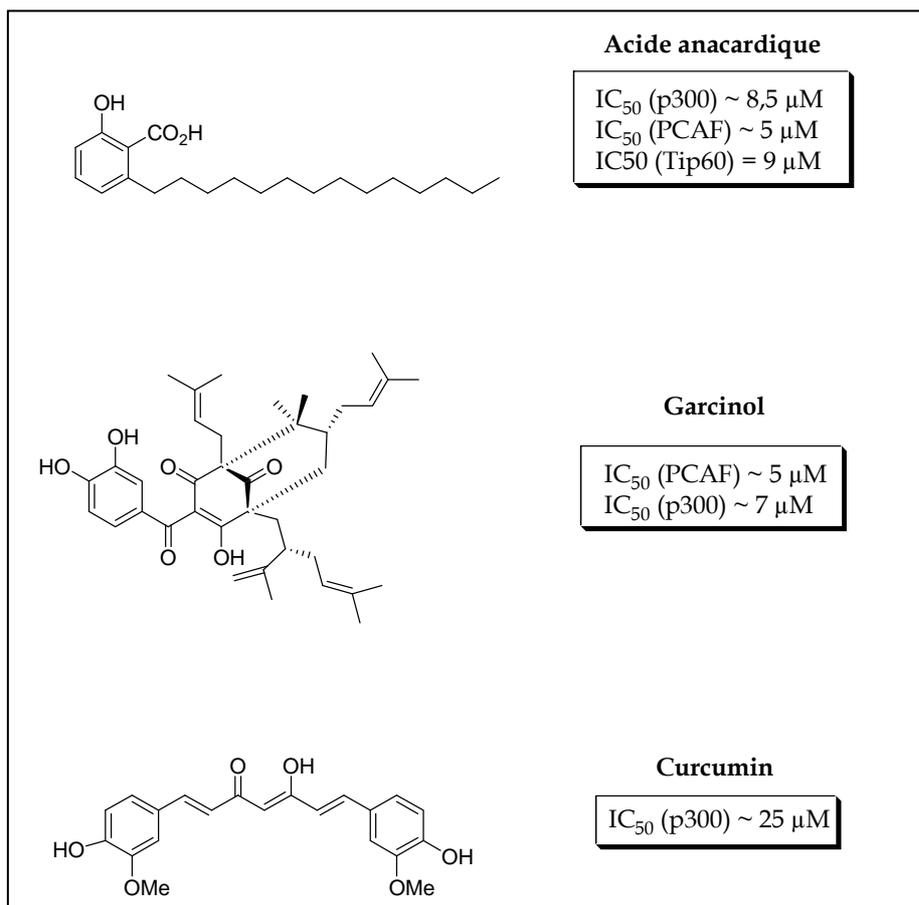


Figure 52 : L'acide anacardique (Tests effectués avec un mélange d'histones, *in vitro*) (Balasubramanyam et al, 2003) (Sun et al, 2006), le garcinol (les valeurs d'IC₅₀ correspondent à des tests effectués avec un mélange d'histones, *in vitro*) (Balasubramanyam et al, 2004a), le curcumin (la valeur d'IC₅₀ indiquée correspond à des tests effectués *in vitro* avec un mélange d'histones)

II. Synthèse de nouveaux effecteurs de type bi-substrat

Parmi tous les inhibiteurs décrits dans la section précédente, les inhibiteurs de type bi-substrat, tel que Lys-CoA, sont les plus efficaces. Afin de poursuivre les investigations concernant les spermidine-CoA (**1a** et **1b**, Figure 51), leurs synthèses ont été reproduites. De plus, la synthèse de nouveaux effecteurs de p300 de type bi-substrat a été développée. Par la suite, des tests d'inhibition ont été réalisés avec le composé Lys-CoA comme référence, qui a également été synthétisé.

1. Objectifs de synthèse

Chaque partie constitutive de ces inhibiteurs a été choisie sur la base des informations apportées par l'étude des inhibiteurs existants. Ainsi, ces molécules seront composées d' (Figure 53) :

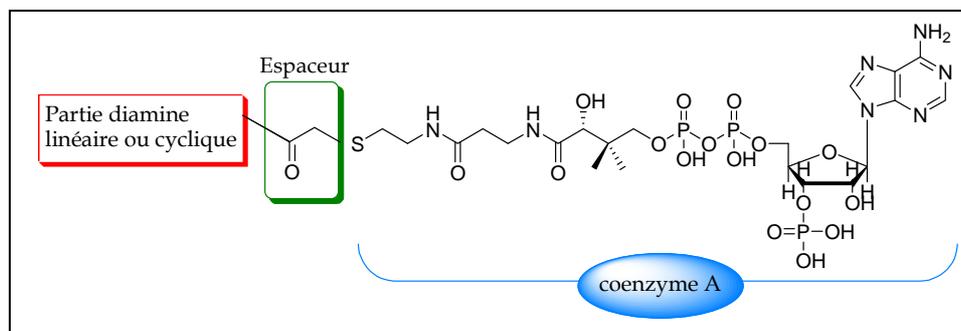


Figure 53 : Représentation schématique des nouveaux inhibiteurs de type bi-substrat

- une partie coenzyme A entière, en effet des dérivés de Lys-CoA avec la partie coenzyme A tronqués ont montré une efficacité au moins 100 fois inférieure à elle de Lys-CoA (tests avec des enzymes isolées) (Cebrat et al, 2003). De plus, Parello et al. (Parello et al, 1990) ont montré que les spermidine-CoA tronquées sont également moins efficaces (tests avec des polynucléosomes);

- un espaceur carboxyméthylène, augmenter la longueur de l'espaceur conduit à une perte d'efficacité comme cela a été montré pour des dérivés de Lys-CoA (Sagar et al, 2004);

- une partie diamine linéaire ou cyclique ;

Les diamines choisies sont le 1,3-diamine propane, la putrescine et la cadavérine, en raison de leurs structures proches de la chaîne latérale de la lysine. Par ailleurs, il sera possible de faire varier le groupement protecteur porté par la diamine (Boc, Bz) qui peut avoir une influence sur la pénétration cellulaire.

La pipérazine sera également utilisée, sur la base sur les études de co-cristallisation de GCN5 avec H3-11, montrant que la chaîne latérale de la lysine 314 adopte une forme repliée

proche d'un cycle à six, car lors de l'élaboration de ces molécules, la structure cristalline de p300 n'avait pas encore été publiée (Figure 54).

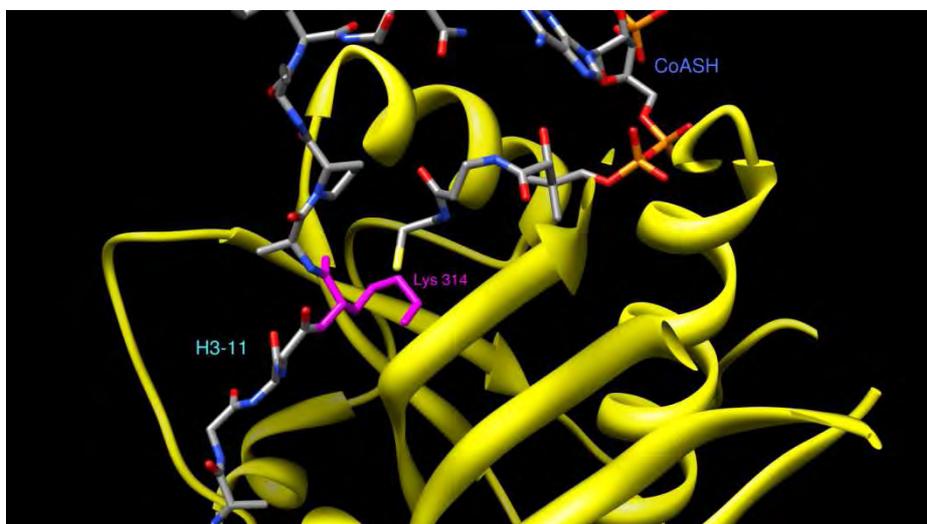


Figure 54 : Vue de GCN5 (*tetrahymena*, 48-210) co-cristallisé avec le coenzyme A et H3-11 (Rojas et al, 1999)

D'autre part, lors d'études portant sur les relations structure/activité, Cole et al. ont synthétisé une molécule comportant une fonction amine (Figure 55), à la place de l'espaceur, qui serait protonée dans le milieu réactionnel (Sagar et al, 2004).

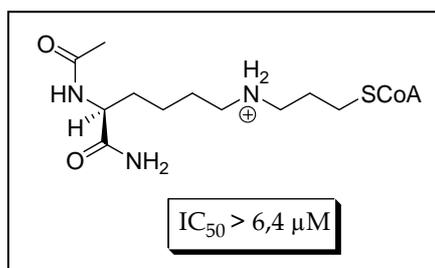


Figure 55 : Molécule étudiée par Cole et al. (Sagar et al, 2004)

Cette molécule n'est pas un bon inhibiteur de p300 (1284-1673). Ces données prises ensemble suggèrent une cavité hydrophobe, d'où l'idée de composés cycliques.

La Figure 56 donne un récapitulatif de nos objectifs de synthèse :

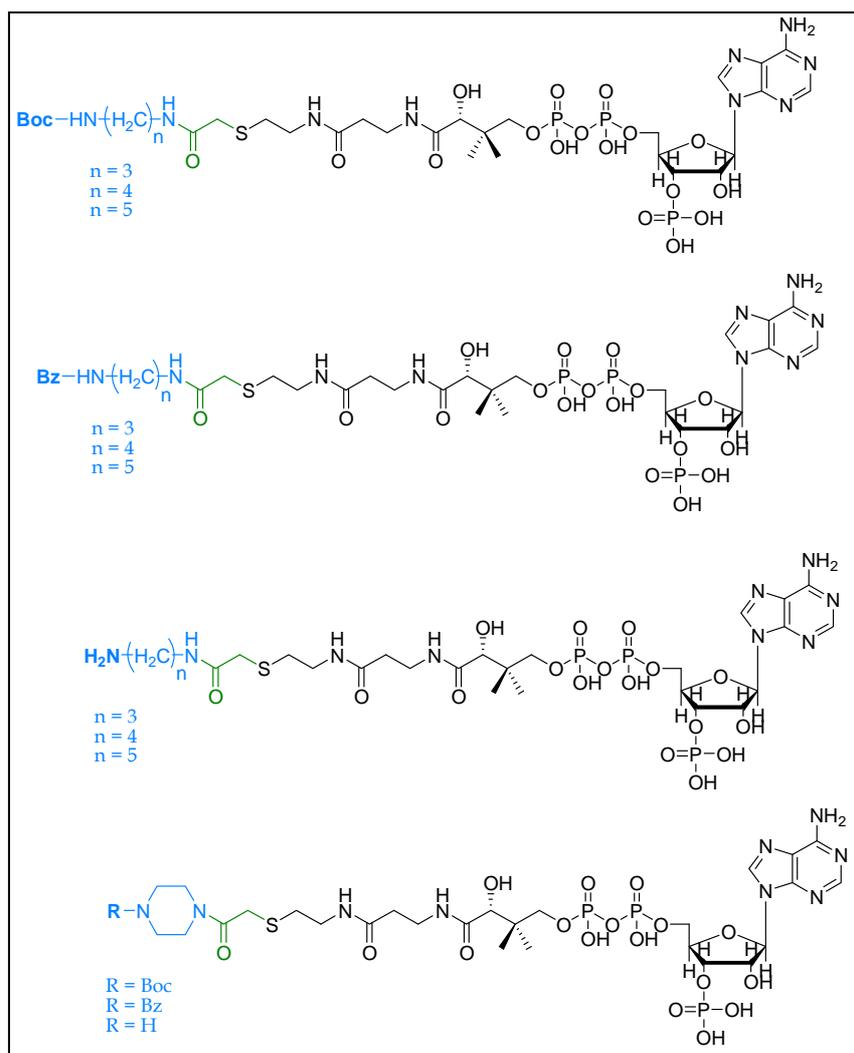


Figure 56 : Structures envisagées pour les nouveaux inhibiteurs de type bi-substrat

2. Stratégie de synthèse des nouveaux effecteurs

La synthèse des nouveaux composés (Figure 57), inspirée de la synthèse des spermidine-CoA établie par Parello et al. (Roblot et al, 1993), débutera par une étape de monoprotection d'une des fonctions amine de la diamine de départ. Puis, l'espaceur carboxyméthylène sera couplé aux molécules obtenues. Enfin, la réaction avec le coenzyme A sera effectuée afin d'obtenir une première gamme d'effecteur. Une étape supplémentaire de déprotection conduira aux composés sans groupements protecteurs. Ces molécules seront récupérées sous forme de sel de trifluoroacétate, mais seront représentées sous forme non

chargée. De plus, les composés **1a**, **1b** (Roblot et al, 1993) et Lys-CoA (Cebrat et al, 2003) seront également synthétisés.

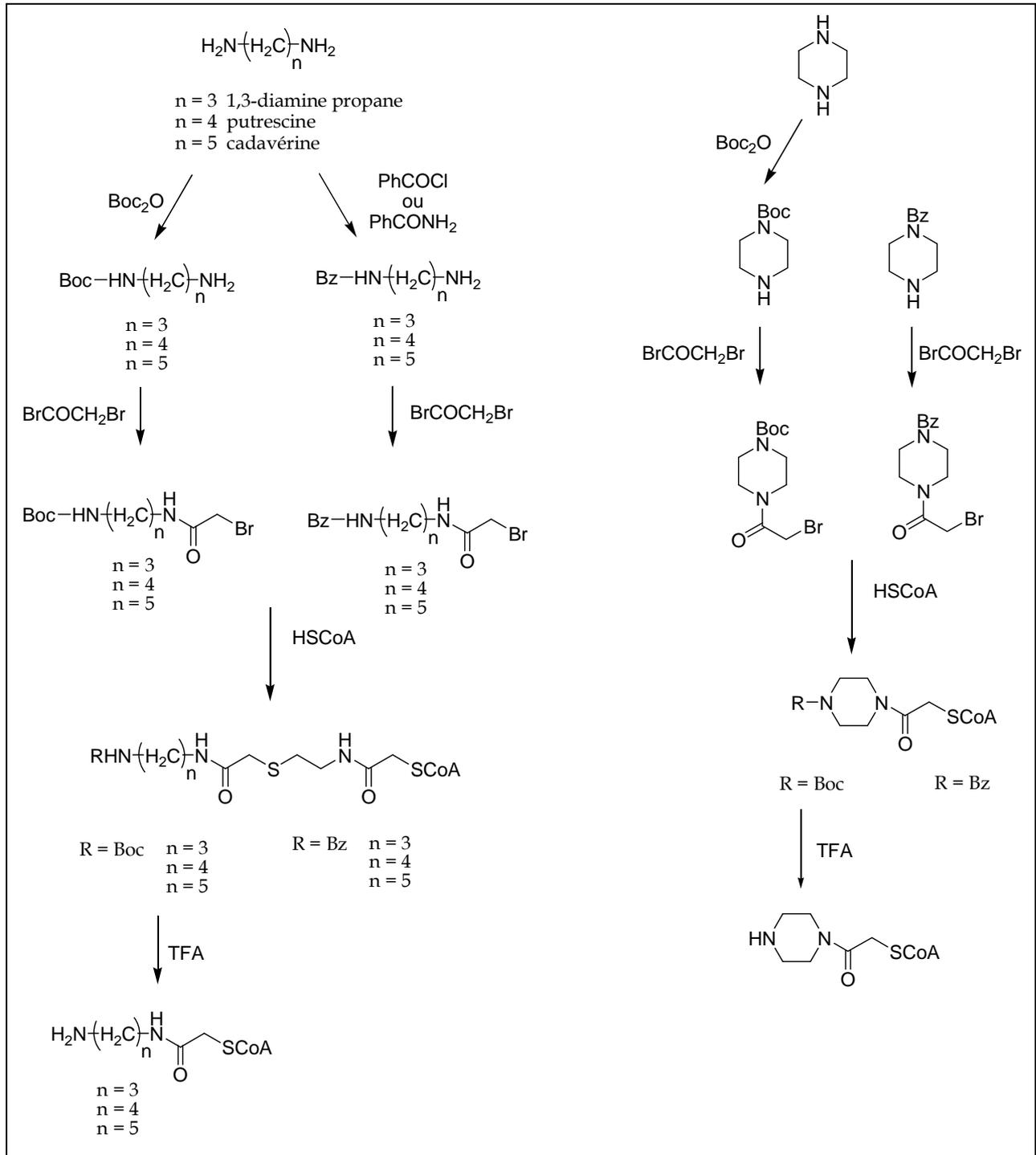
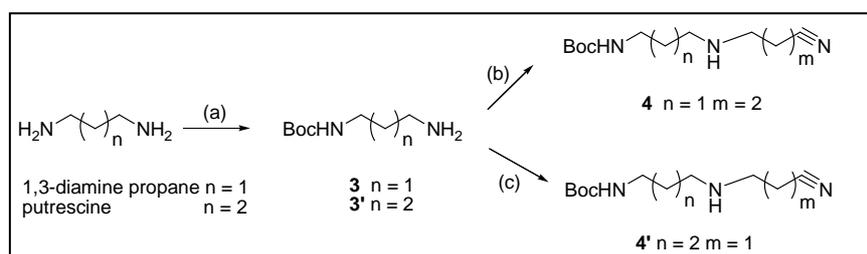


Figure 57 : Représentation non détaillée de la stratégie de synthèse des nouveaux effecteurs de p300

III. Synthèse des spermidine-CoA **1a** et **1b**

La méthode de synthèse de ces composés est très proche de celle décrite par Roblot et al. (Roblot et al, 1993) certaines modifications ont toutefois été apportées et seront précisées dans le texte. Afin d'obtenir les composés **1a** et **1b**, le 1,3-diaminopropane et la putrescine, respectivement, ont été utilisées comme produits de départ.

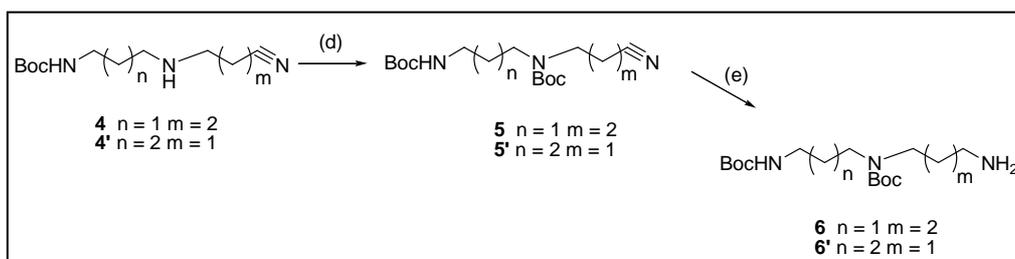
La réaction de monoprotection des diamines de départ a été réalisée en ajoutant une solution de Boc_2O dans le 1,4 dioxanne, à l'aide d'un goutte-à-goutte très lent et sous agitation. La formation du produit diprotégé est observée mais ce produit n'est pas gênant pour l'étape suivante car il peut être éliminé facilement par filtration. On obtient ainsi les composés **3** et **3'** avec des rendements de 70% et 54% respectivement. Les composés **3** et **3'** sont utilisés bruts et sont N-alkylés à l'aide de chlorobutyronitrile et d'acrylonitrile, respectivement, pour conduire aux composés **4** et **4'** avec des rendements bruts de 72% et 100% respectivement (Figure 58).



- (a) Boc_2O 1/8 éq., 1,4 dioxanne (b) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ 1,2 éq., Na_2CO_3 2,8 éq., KI 1,3 éq., CH_3CN
 (c) acrylonitrile 1 éq., MeOH

Figure 58 : Monoprotection des diamines de départ suivi d'une N-alkylation

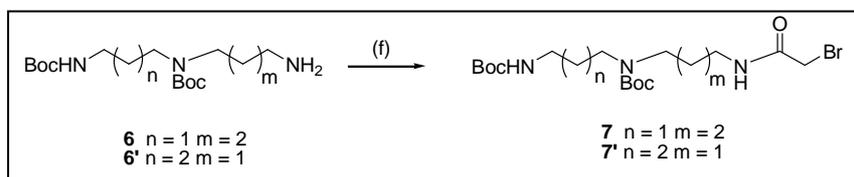
La fonction amine centrale libre des composés **4** et **4'** est protégée par un groupement Boc puis la fonction nitrile réduite par hydrogénation catalytique (Figure 59). Les composés **5** et **5'** sont obtenus, après purification sur colonne de silice, avec 34% et 58% de rendement respectivement ; les composés **6** et **6'** sont obtenus avec 71% et 80% de rendement, respectivement, après filtration sur celite. Grâce à cette méthode, 2 spermidines protégées par un groupement Boc en N^1 et N^4 d'une part et en N^4 et N^8 d'autre part sont obtenues.



(d) Boc_2O 1,2 éq., 1,4 dioxane (e) H_2 , Ni Raney, NaOH 1M, MeOH

Figure 59 : Spermidines protégées en N^1/N^4 et N^4/N^8 par le groupement Boc suivi de l'hydrogénation de la fonction nitrile

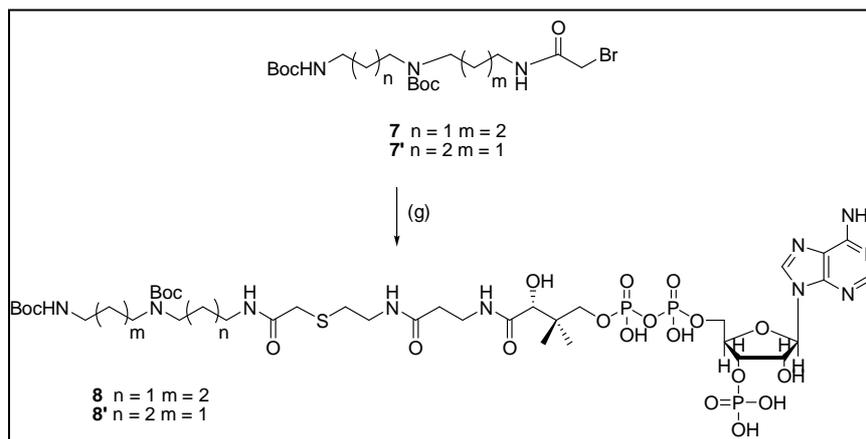
L'étape de couplage à l'espaceur carboxyméthylène, initialement réalisée avec de l'acide bromoacétique et des activateurs de fonction acide (BOP et HOBT), a été modifiée. En effet, des traces d'activateurs d'acide (BOP, HOBT) subsistaient dans les produits finaux (**1a** et **1b**), et ce, même après purification par CLHP. De ce fait, le couplage avec l'espaceur a été réalisé par réaction avec le bromure de bromoacétyle (Weaver & Whaley, 1947) pour donner les composés **7** et **7'** avec 41% de rendement dans les deux cas, après purification sur colonne de silice (Figure 60).



(f) BrCOCH_2Br 1,5 éq., NEt_3 1,5 éq., CH_2Cl_2 , -10°C

Figure 60 : Couplage à l'espaceur

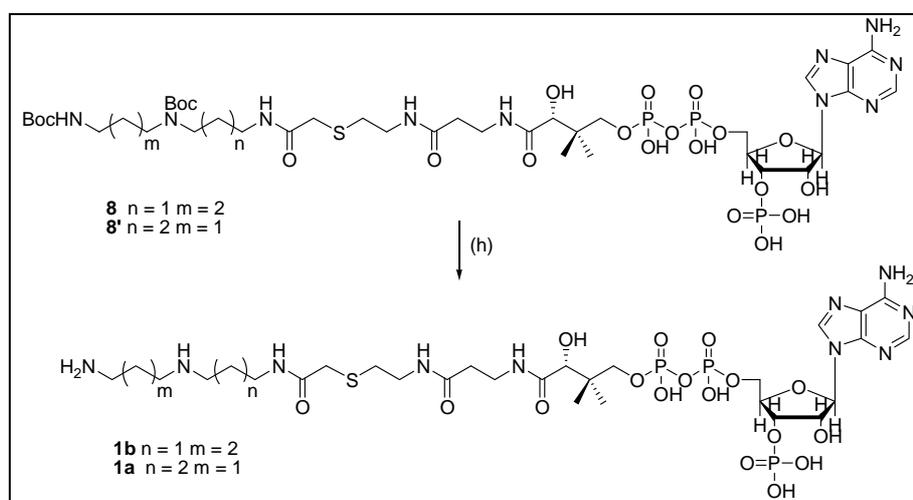
Les composés **7** et **7'** sont ensuite couplés au coenzyme A, par substitution nucléophile, pour fournir les produits **8** et **8'**. Ces derniers sont purifiés par CLHP en phase inverse et les composés **8** et **8'** sont obtenus avec 66% et 46% de rendement respectivement (Figure 61). Ces composés sont obtenus avec des rendements inférieurs à ceux obtenus par Roblot et al., ces derniers n'ayant pas réalisé d'étape de purification.



(g) coenzyme A 1/2 éq., H₂O pH8, MeOH

Figure 61 : Couplage au coenzyme A

La déprotection en milieu acide fort (TFA) des deux fonctions amines a conduit aux composés **1a** et **1b**, après purification par CLHP et lyophilisation, avec 73% et 39% de rendement respectivement (Figure 62).



(h) 50% TFA / 50% CH₂Cl₂, 10 min

Figure 62 : Déprotection des fonctions amines par le TFA

Les spermidine-CoA **1a** et **1b** ont été obtenues, pour cette étape, avec des rendements inférieurs à ceux obtenus par Roblot et al. (rendements quantitatifs), ces derniers n'ayant pas réalisé d'étape de purification.

Les données RMN ^1H ont été comparées avec celles de la littérature et correspondent à celles des produits synthétisés (Hu & Hesse, 1996; Roblot et al, 1993). Mais lors de l'analyse RMN ^1H de ces composés, des signaux représentant 30% de **1a** et 10% de **1b** ont été observés (Figure 65). Nous avons émis l'hypothèse que ces signaux sont probablement ceux de la spermidine-iso-CoA (Figure 63) (Burns et al, 2005). En effet, en milieu acide fort, le groupement phosphate situé en 3' sur la partie adénosine migre en position 2' (Moffatt & Khorana, 1961).

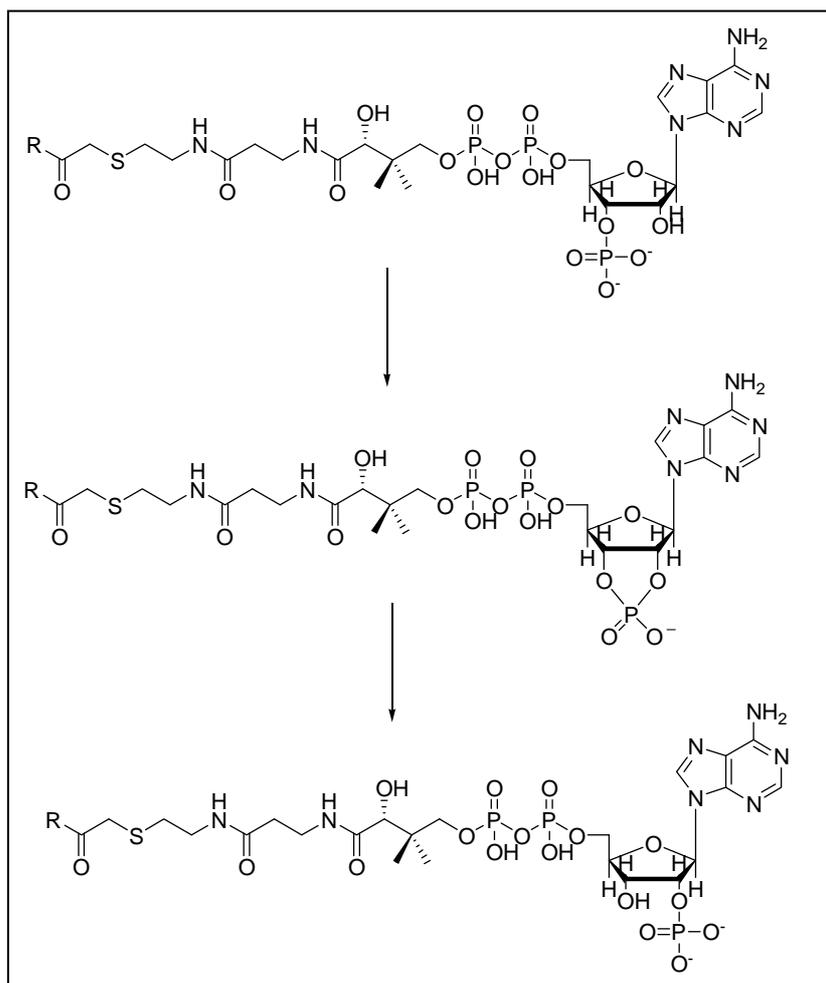


Figure 63 : Mécanisme de la migration du phosphate de la position 3' en 2', en milieu acide fort (Burns et al, 2005)

Ces composés ne sont pas distinguables en CLHP et donc non séparables. Il se peut que cette migration ne soit pas gênante, car l'équipe de Cole a montré que Lys-CoA, sans ce groupement phosphate en 3', restait un bon inhibiteur (Cebrat et al, 2003). De plus, la superposition d'environ 60 protéines, liant des composés possédant une partie coenzyme A,

ont montré que les ligands se superposaient également (Figure 64). Parmi ces protéines figurent des GNATs. Nous avons pu observer que la partie adénosine du coenzyme A est très mobile. Il se pourrait alors que la position du groupement phosphate en 2' ou 3' n'ait pas d'influence.

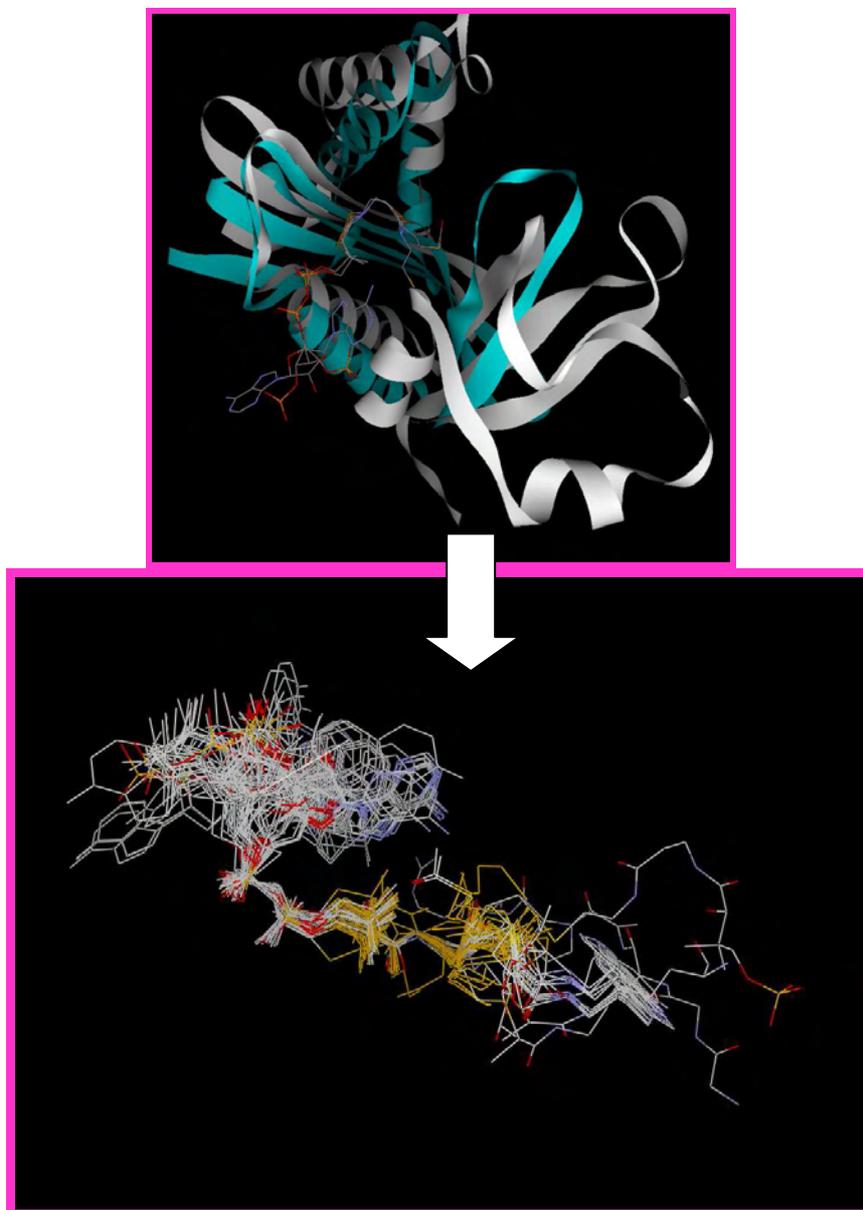


Figure 64 : Superposition de protéines liant des composés-CoA (Dr Rodriguez, 2009)

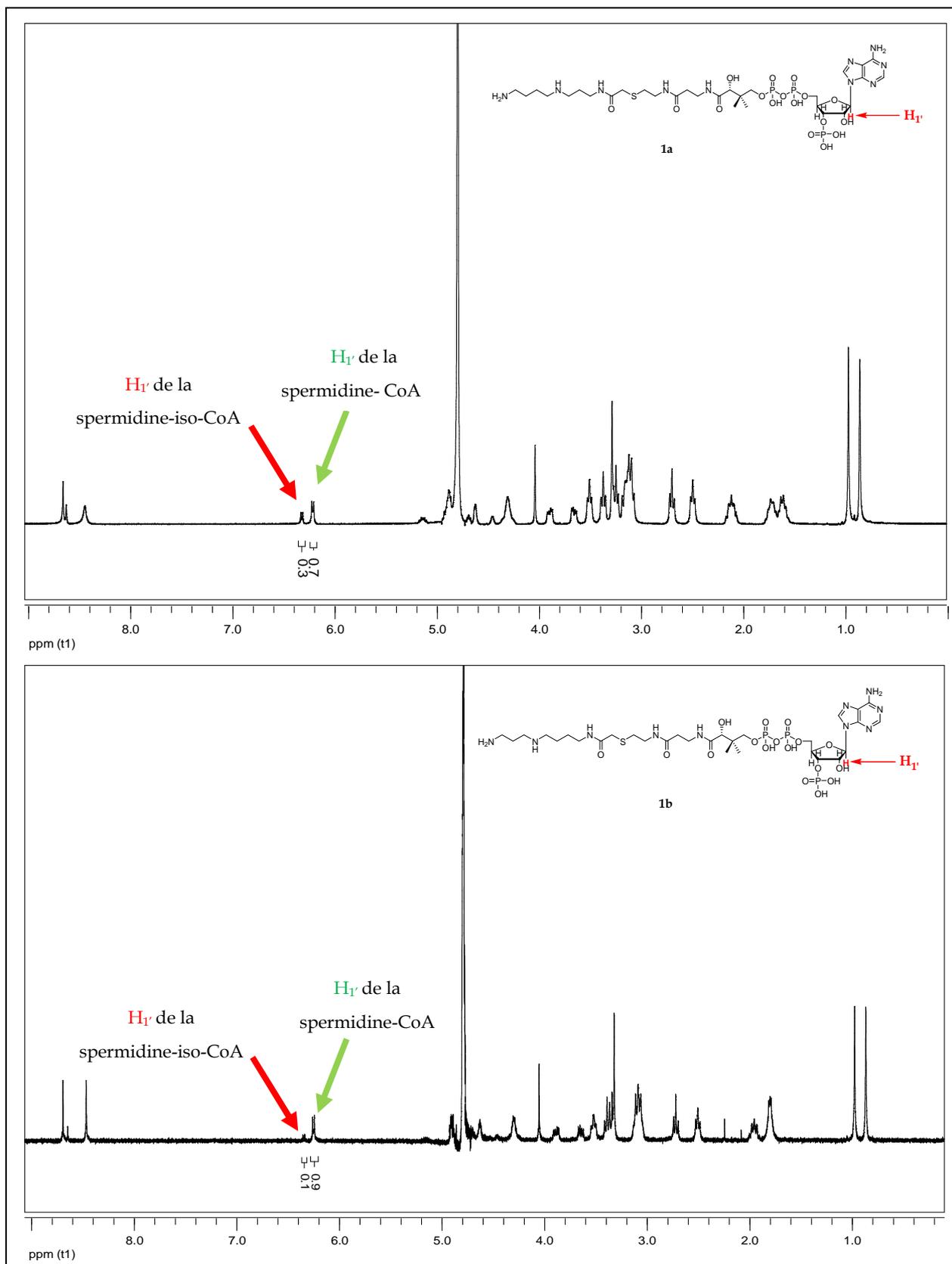


Figure 65 : Spectres RMN ^1H de **1b** et **1a**, les signaux utilisés pour la détermination de la quantité de spermidine-iso-CoA sont signalés par des flèches

IV. Synthèse des diamine-CoA linéaires et cycliques

Ces synthèses sont réalisées à partir des diamines suivantes : la 1,3-diaminepropane, la putrescine, la cadavérine et la pipérazine.

La synthèse de la 1,3-diaminepropane-CoA et de la 1,4-diaminebutane-CoA a été décrite auparavant (Erwin et al, 1984), utilisant la méthode de synthèse de Cullis et Wolffenden (Cullis et al, 1982; Erwin et al, 1984). Ici, la synthèse de ces composés est réalisée suivant une autre approche (Roblot et al, 1993).

1. Monoprotection des diamines

(a) Par le groupement *tert*-butyloxycarbonyle

Cette étape est semblable à la première étape de la synthèse des spermidine-CoA **1a** et **1b**. Une solution de Boc₂O dans le 1,4 dioxanne est très lentement ajoutée à une solution de diamine en excès, afin de favoriser la formation du produit de monoprotection. Une légère optimisation a été apportée, 6 éq. de diamine de départ sont utilisés au lieu de 8 éq. utilisés pour la synthèse des spermidine-CoA. Nous avons obtenu de cette manière les composés **10** (= composé **3**), **11** et **12** avec des rendements (61%, 72% et 76% respectivement) comparables à ceux obtenus avec 8 éq. de diamine (Figure 66).

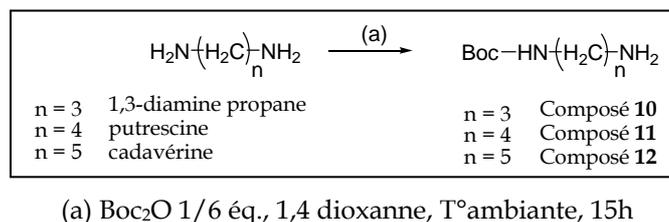


Figure 66 : Monoprotection des diamines de départ par le groupement Boc

En ce qui concerne la monoprotection de la pipérazine, elle est réalisée avec 5 éq. de diamine et l'addition de la solution de Boc₂O se fait à 0°C (Tahtaoui et al, 2004). Le composé

13 est ainsi obtenu avec 59% de rendement après purification sur colonne de silice (*Figure 67*).

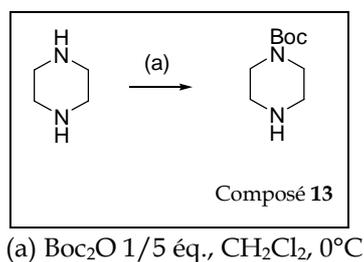


Figure 67 : Monoprotection de la pipérazine par le groupement Boc

(b) Par le groupement benzoyle

L'obtention des composés monobenzoylés en quantité suffisante a nécessité plusieurs essais. Dans une première approche, la 1,3-diaminepropane, la putrescine et la cadavérine ont été traitées avec du 9-borabicyclo(3,3,1)nonane (9-BBN) avant de les faire réagir avec du chlorure de benzoyle (Zhang et al, 2003b). Le 9-BBN se complexe à l'une des deux fonctions amine, conduisant à l'encombrement stérique de la fonction amine en question. Ainsi, la benzoylation peut se faire sélectivement sur une seule fonction amine. Bien que cette méthode permette d'obtenir les produits désirés, elle est onéreuse (le 9-BBN est coûteux) et les produits sont obtenus en quantités insuffisantes (*Figure 68*).

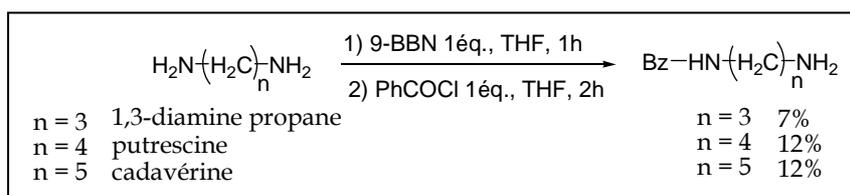


Figure 68 : Monobenzoylation avec pré-traitement au 9-BBN

Une autre approche a alors été tentée. Celle-ci requiert de l'anhydride benzoïque et se réalise dans des conditions dites de basse réactivité (Jacobson et al, 1987). En effet, dans le but de favoriser la monoacylation, plusieurs paramètres ont été combinés. La diamine a été introduite en excès, dans des conditions de haute dilution (0,083 M), et l'anhydride

benzoïque a été ajouté au goutte à goutte, sous vive agitation. De plus, la réaction a été réalisée à -78°C . Cette méthode cependant n'a pas abouti aux résultats espérés. En effet, l'expérience a été réalisée avec la 1,3-diaminepropane et seulement 7% de rendement ont été obtenu (Figure 69).

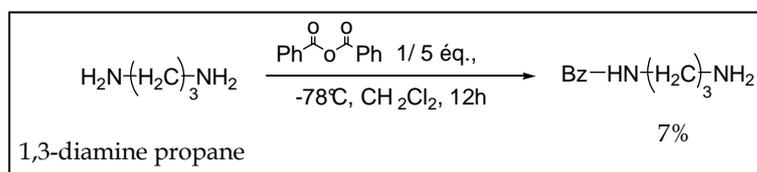


Figure 69 : Monobenzoylation de la 1,3-diaminepropane dans des conditions de haute dilution (Jacobson et al, 1987)

En adaptant le protocole précédent, nos rendements ont pu être améliorés. Des solutions plus concentrées ont été utilisées et le chlorure de benzoyle a été utilisé comme agent acylant au lieu de l'anhydride. Le composé **14** a été obtenu avec 17% de rendement soit une augmentation de 143% (pour ce composé) par rapport aux méthodes précédentes (Figure 70). La diamine en excès a été éliminée par des lavages à l'eau.

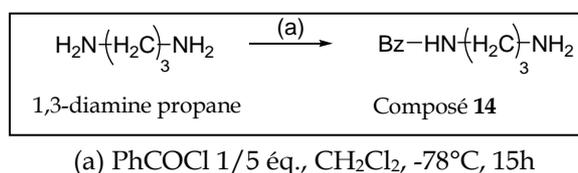
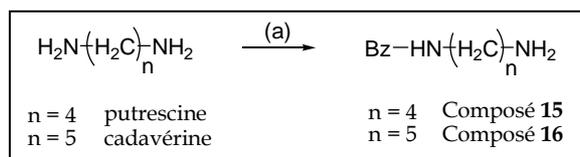


Figure 70 : Monobenzoylation de la 1,3-propanediamine

Ce mode opératoire ne conduisant pas à des rendements très élevés, un autre protocole a été adopté pour obtenir les composés **15** et **16**. Cette réaction a été faite sans solvant et à reflux pendant 15h (Zaragoza-Dörwald & Von Kiedrowski, 1988). Les composés **15** et **16** sont obtenus avec 35% et 56% de rendement respectivement après purification sur colonne ouverte (Figure 71).



(a) PhCONH₂ 1/3 éq., à reflux, 15h

Figure 71 : Monobenzoylation par transamidation

Malgré les diverses tentatives de synthèse de la benzoylpipérazine, nous ne sommes pas parvenus à la produire. La méthode utilisée pour le composé **14** (adaptée de (Jacobson et al, 1987), réalisée à -78°C avec le chlorure de benzoyle comme agent acylant, n'a conduit à aucune réaction. La transamidation utilisée pour la synthèse des composés **15** et **16** n'a donné aucun résultat (Zaragoza-Dörwald & Von Kiedrowski, 1988). La benzoylpipérazine utilisée dans les étapes suivantes est un produit commercial.

2. Couplage à l'espaceur

Les composés **10** à **16** ont réagi avec le bromure de bromoacétyle afin de permettre la fixation de l'espaceur. Dans un premier temps, cette réaction se fera selon le protocole décrit par Weaver et Whaley, c'est à dire en utilisant 2 éq. d'amine et 1 éq. de bromure de bromoacétyle (Weaver & Whaley, 1947). Ce protocole est appliqué aux composés **10** à **13** et ainsi les composés **17** à **20** sont obtenus avec 96%, 31%, 23% et 57% respectivement (*Figure 72*) après purification sur colonne de silice.

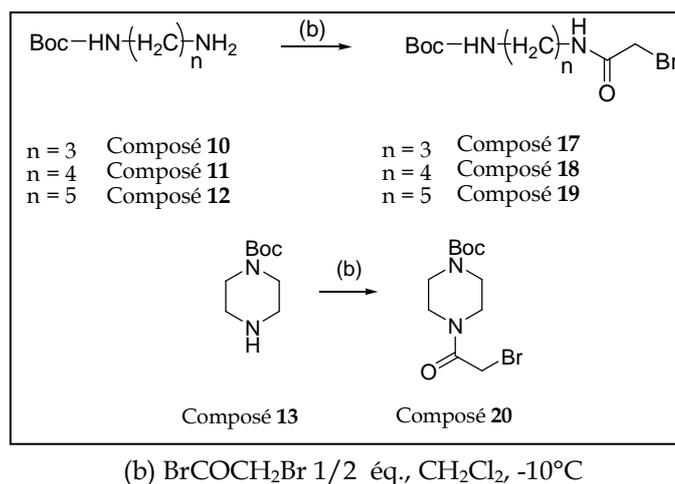


Figure 72 : Fixation de l'espaceur carboxyméthylène

Ce protocole nécessite 2 éq. d'amine dont un sert à neutraliser l'acide bromhydrique qui se forme au cours de la réaction. Par la suite, 1 éq. d'amine a été remplacé par 1 éq. de triéthylamine. Les composés **21**, **22**, **23**, **24** sont obtenus avec 11%, 66%, 15% et 63% de rendement respectivement, après purification sur colonne de silice (Figure 73).

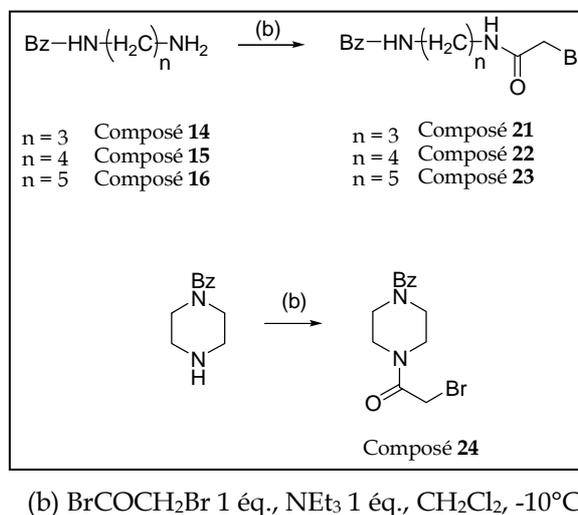


Figure 73 : Fixation de l'espaceur sur les dérivés benzoylés

3. Couplage au coenzyme A

Cette étape de couplage permet de fixer la partie coenzyme A des nouveaux inhibiteurs et conduira aux premiers composés de la nouvelle série d'effecteurs de type bi-substrat (Figure 74). Ce couplage se réalise à l'aide d'une solution de coenzyme A dans l'eau, à pH 8. Ce pH est important, car au delà, le coenzyme A se dégrade. En effet, des essais de couplage à pH10-11 ont été réalisés et la dégradation du produit a été observée. Les produits de dégradation n'ont pu être identifiés du fait de la superposition des signaux des produits dégradés et du produit voulu.

Cette réaction est réalisée avec ~2 éq. des composés **17** à **23**, solubilisées dans le méthanol dans le cas des composés benzoylés et dans le THF dans le cas des molécules Boc.

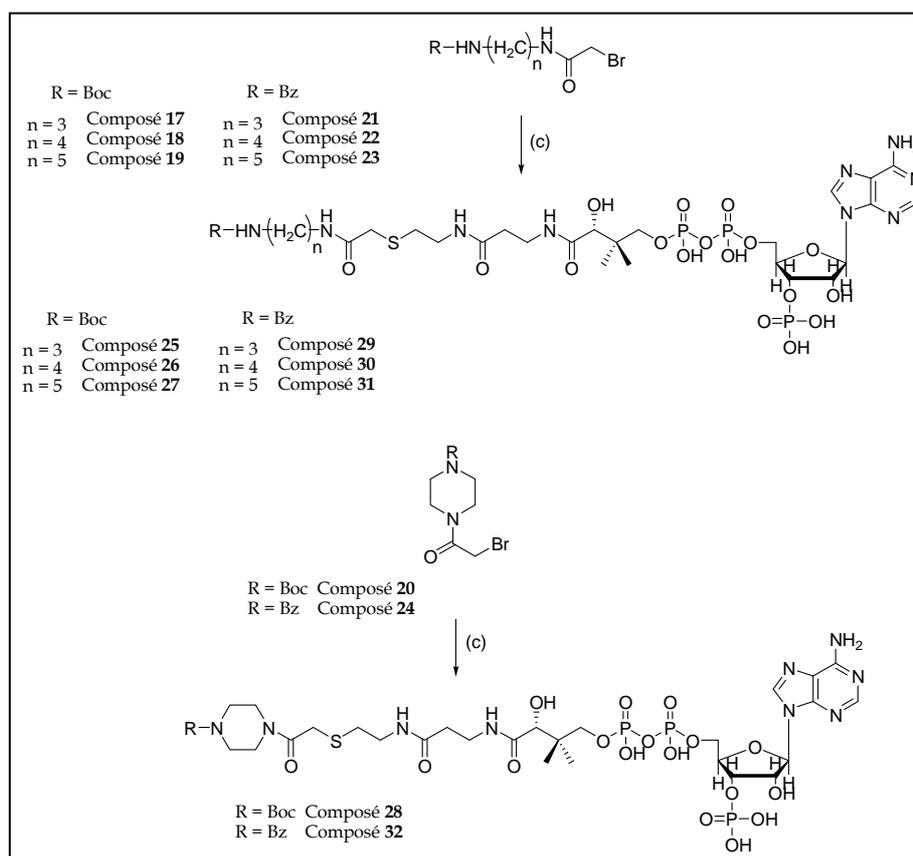


Figure 74 : Première série d'effecteurs de type bi-substrat

Les rendements obtenus à la fin de cette étape sont bons (83-89%) et 8 composés ont ainsi été obtenus (Figure 74, Tableau 14).

Composés aliphatiques			Composés cycliques	
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	
	Composé 25	Composé 26	Composé 27	Composé 28
Rdt	83%	77%	89%	98%
t_R	6,88 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)	7,02 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)	7,42 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)	7,39 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)
	Composé 29	Composé 30	Composé 31	Composé 32
Rdt	74%	83%	91%	35%
t_R	6,57 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)	6,67 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)	6,92 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)	6,71 min (TFA 0,05%/CH ₃ CN, 95/5)

Tableau 14 : Rendements des réactions de couplage au coenzyme A (les conditions de départ du gradient appliqué lors de l'analyse par CLHP sont indiquées)

Les produits issus du couplage ont été analysés par RMN ¹H, par CLHP analytique en phase inverse et par spectrométrie de masse (Les spectres ¹H RMN des composés **25** et **29** sont donnés comme exemple dans l'Annexe 1). Celui du composé **32**, au premier abord, laissait à penser que le produit s'était dégradé (*Figure 75, spectre du haut*). Toutefois, ce composé comporte à la fois un groupement benzoyle et un cycle pipérazine et une interconversion de cycle pourrait être à l'origine d'un dédoublement des pics. Afin de vérifier cette hypothèse, le spectre de ce composé a été réalisé à différentes températures : 25°C, 35°C et 45°C. En effet, dans le cas de dédoublements de signaux dus à la rotation d'un cycle, l'augmentation de la température entraîne des mouvements rapides du cycle et conduit à une superposition des signaux de RMN. L'expérience de RMN réalisée à 45°C a permis de conclure que le produit voulu a été obtenu.

Ci-dessous les spectres du composé **32** à 20°C et à 45°C, les dédoublements des signaux les plus flagrants sont encadrés (*Figure 75*).

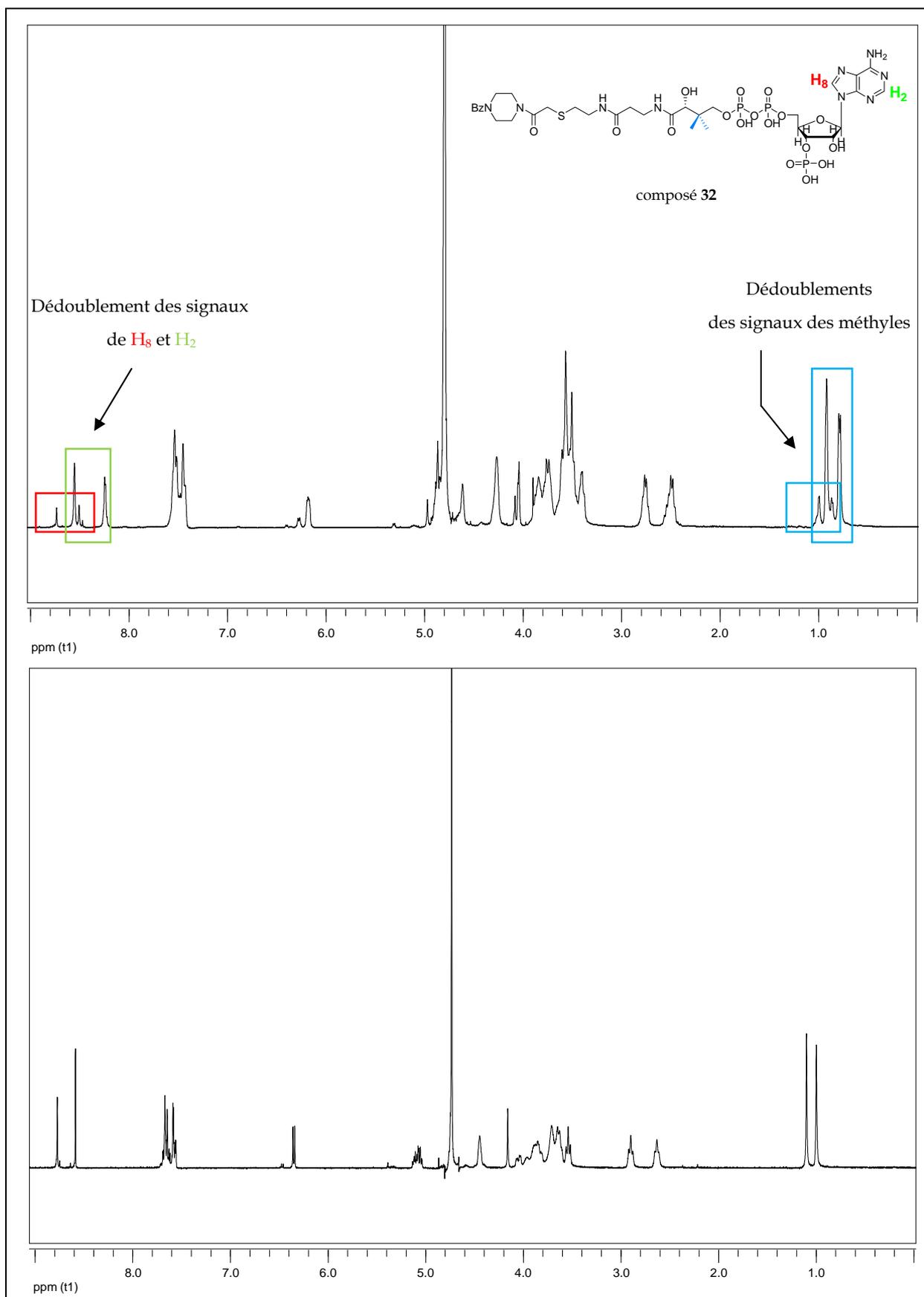


Figure 75 : Spectre RMN ¹H du composé 32 réalisé à 20 °C (spectre du haut) et à 45°C (spectre du bas) à 300 MHz dans D₂O

Les chromatogrammes réalisés par CLHP analytique ont montré un pic pour chacun des produits et les RMN effectuées ont permis de conclure à 95% de pureté. Ainsi, les molécules n'ont pas nécessité de purification à l'exception du composé **32** qui a été purifié par CLHP.

4. Déprotection des dérivés protégés par le groupement Boc

La fonction amine des produits **25**, **26**, **27**, **28** a été déprotégée par action de l'acide trifluoroacétique (TFA) en solution dans CH_2Cl_2 . La réaction est rapide (10 min) et conduit aux composés **33**, **34**, **35** et **36** (Figure 76). Ces produits ont été purifiés par CLHP et les rendements après purifications sont consignés dans le Tableau 15.

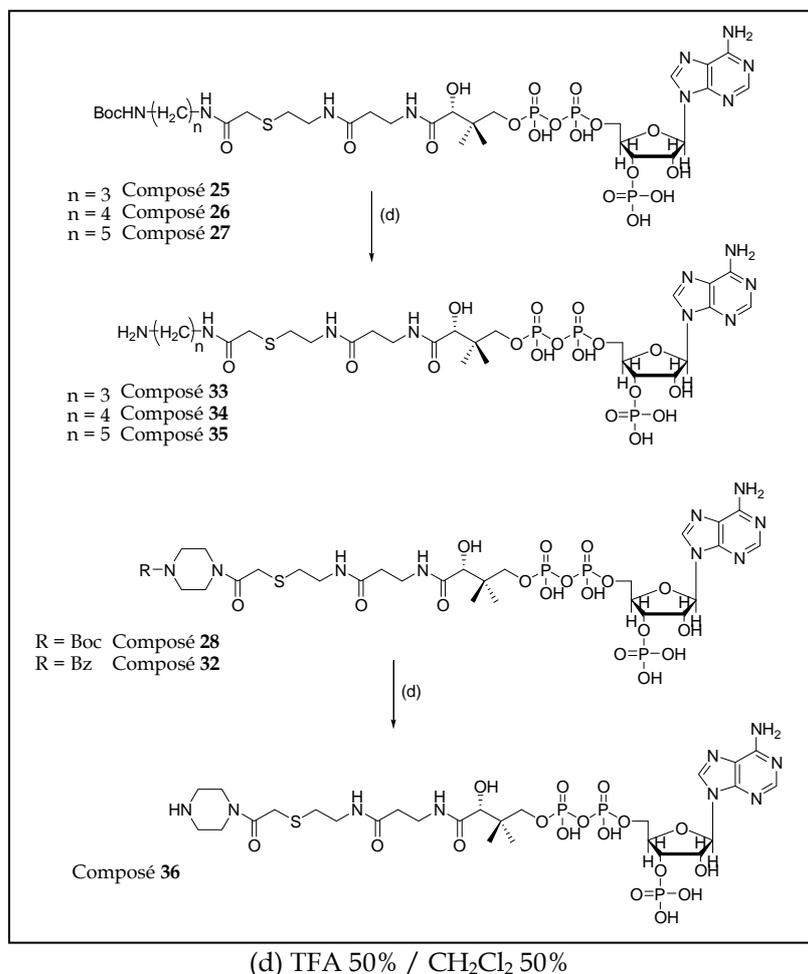


Figure 76 : Déprotection de la fonction amine

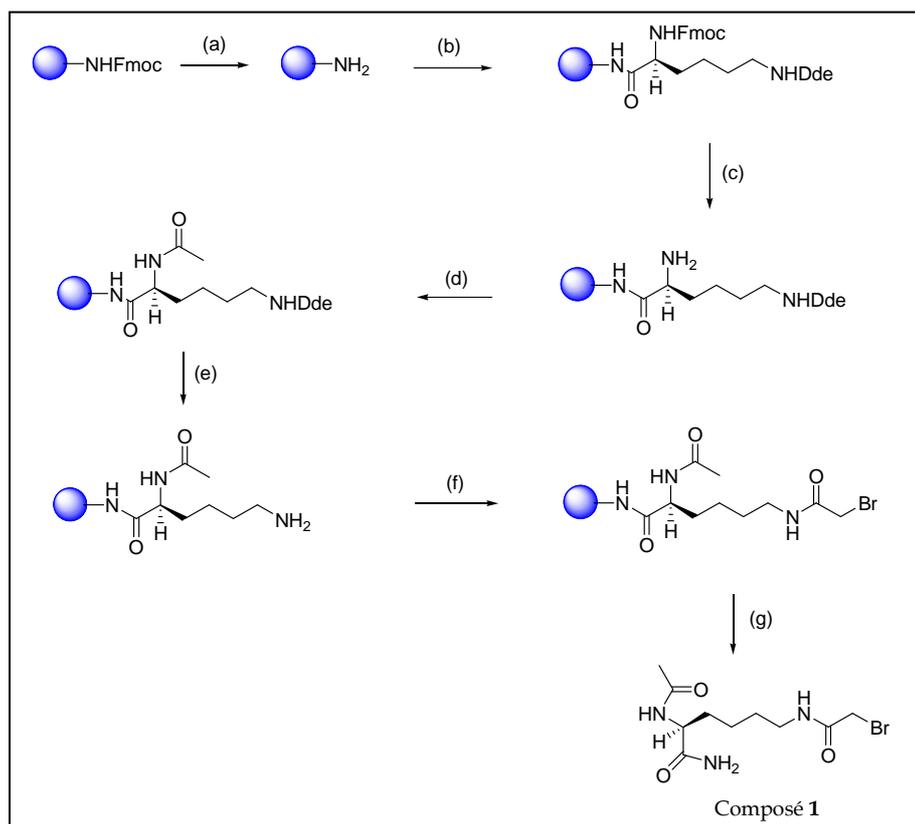
Composés aliphatiques			Composé cyclique
	n = 3	n = 4	n = 5
	Composé 33	Composé 34	Composé 35
Rdt	40 %	41 %	28 %
t_R	19,20 min (TFA 0,05%)	15,54 min (TFA 0,05%)	15,45 min (TFA 0,05%)
			Composé 36
			35 %
			15,67 min (TFA 0,05%)

Tableau 15 : Rendements de la déprotection des composés **25**, **26**, **27** et **28** (les conditions de départ du gradient appliqué lors de la purification par CLHP sont indiquées)

Le traitement en milieu acide fort des dérivés du coenzyme A entraîne, comme dans le cas des spermidine-CoA, à une migration du groupement phosphate du ribose de l'adénosine. Les produits désirés restent toutefois majoritaires et représentent dans chaque cas 80% du produit final (le spectre RMN ¹H du composé **33** est donné comme exemple dans l'Annexe 2).

V. Synthèse de Lys-CoA

La synthèse de ce composé a été décrite pour la première fois en 2000 (Lau et al, 2000b). En 2003, cette synthèse a été modifiée et se déroule essentiellement sur support solide. Elle s'effectue en huit étapes et seule l'étape menant au produit final est réalisée en solution. Lys-CoA a été synthétisé selon le protocole de Cebrat et al. (Figure 77) (Cebrat et al, 2003).

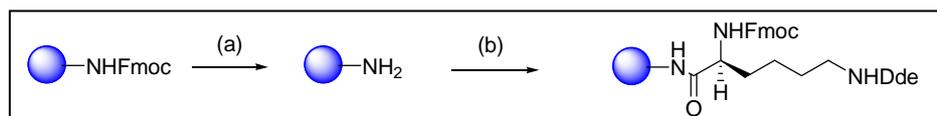


(a) pipéridine 20%, DMF (b) Fmoc-Lys(Dde)OH 3 éq., BOP et HOBT 3 éq. (c) pipéridine 20%, DMF
 (d) 0,4 M (CH₃CO)OCOCH₃, 0,4 M NMP, DMF (e) NH₂NH₂ 2%, DMF (f) BrCH₂COOH 5 éq., DIC 5
 éq., DMF (g) TFA 95% / H₂O 2,5% / TIS 2,5%

Figure 77 : Etapes de la synthèse de Lys-CoA effectuées sur support solide

La résine utilisée est une résine amide. La lysine de départ possède deux groupements amines protégés orthogonalement, par un groupement Dde (4,4-diméthyl-2, 6-dioxocyclohexylidène)éthyle) d'une part et par un groupement Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyle) d'autre part.

La résine est déprotégée puis couplée au peptide Fmoc-Lys(dde)OH par formation d'une liaison amide (Figure 78).



(a) pipéridine 20%, DMF (b) Fmoc-Lys(Dde)OH 3 éq., BOP 3éq., HOBT 3 éq.

Figure 78 : Fonctionnalisation de la résine avec la lysine diprotégée

Le groupement Fmoc est ôté par traitement avec de la pipéridine (solution dans le DMF) puis la résine est traitée avec de l'anhydride acétique pour obtenir l'amine α acétylée (Figure 79).

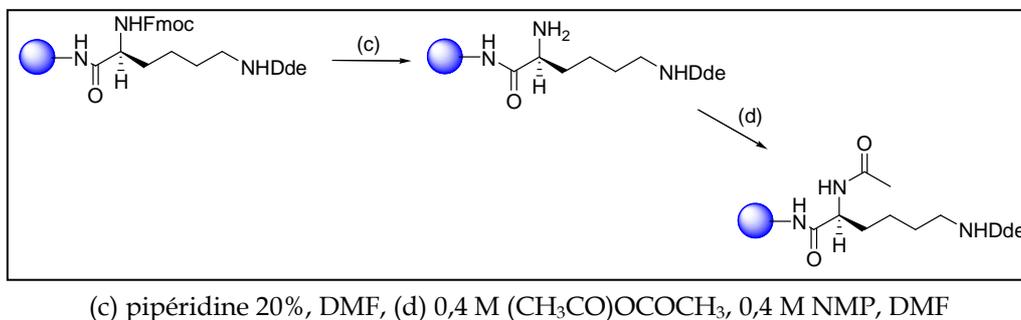


Figure 79 : Fixation du groupement acétyle

Le groupement Dde est à son tour clivé par action de l'hydrazine, et la fonction amine ainsi libérée peut réagir avec l'acide bromoacétique, en présence de diisopropylcarbodiimide (DIC), pour fournir l'intermédiaire 6-(2-bromoacétamido)-2-acétamidohexanamide (composé **1**, Figure 80).

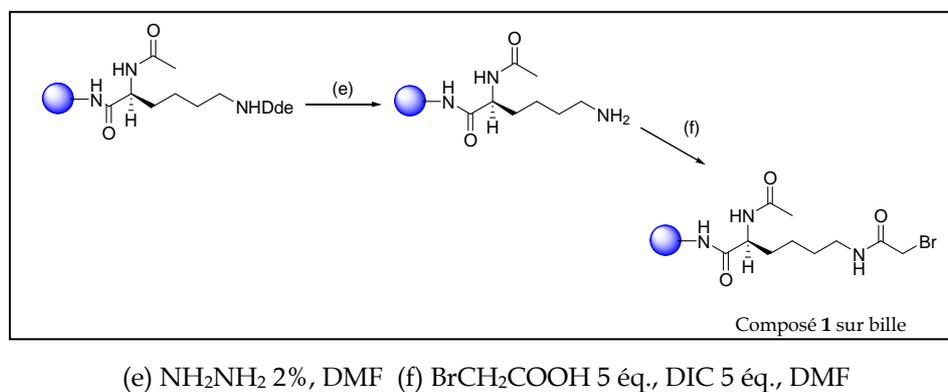
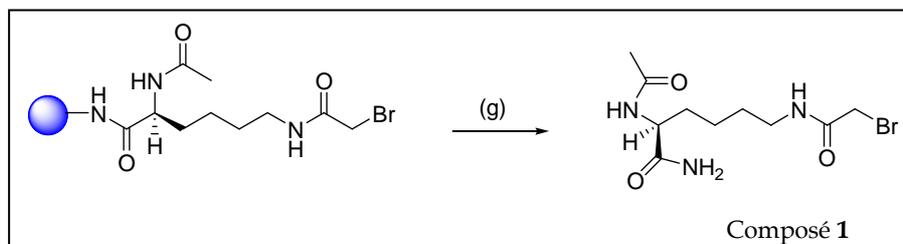


Figure 80 : Obtention du composé **1** fixé à la résine

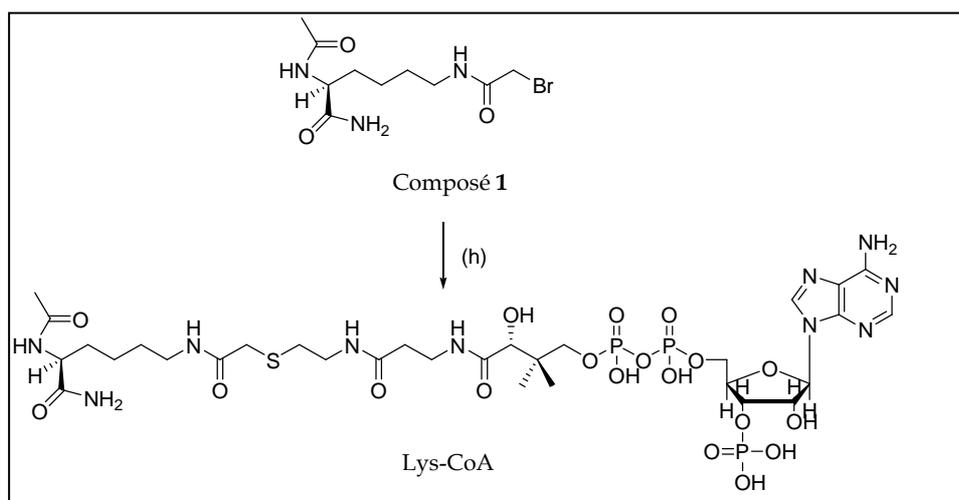
Puis, le composé **1** est clivé de la résine par action d'une solution de TFA (Figure 81).



(g) TFA 95% / H₂O 2,5% / TIS 2,5%

Figure 81 : Le composé 1, précurseur de Lys-CoA

Le composé 1 est obtenu avec un rendement de 42% et après analyse par RMN ¹H, sa pureté a été jugée suffisante pour qu'il soit couplé au coenzyme A (Figure 82). Chaque étape de la synthèse supportée a été contrôlée à l'aide d'un test de Kaiser afin de vérifier la présence ou non d'amine libre.



(h) composé 1 2 éq., MeOH, coenzyme A 1 éq., H₂O pH 8, 15 h

Figure 82 : Réaction de couplage avec le coenzyme A

Lys-CoA, est obtenu avec un rendement de 3% après purification par CLHP, et les analyses RMN et de spectrométrie de masse correspondent à la structure ci-dessus et aux données de la publication (Cebrat et al, 2003).

VI. Conclusion

Une gamme de composés comprenant des molécules Boc, des molécules benzoylées et des molécules sans groupements protecteurs ont été synthétisés. Ces composés, consignés dans la Figure 83, seront testés sur les HATs p300 et certains d'entre eux sur PCAF. La production de ces protéines est décrite dans le chapitre suivant.

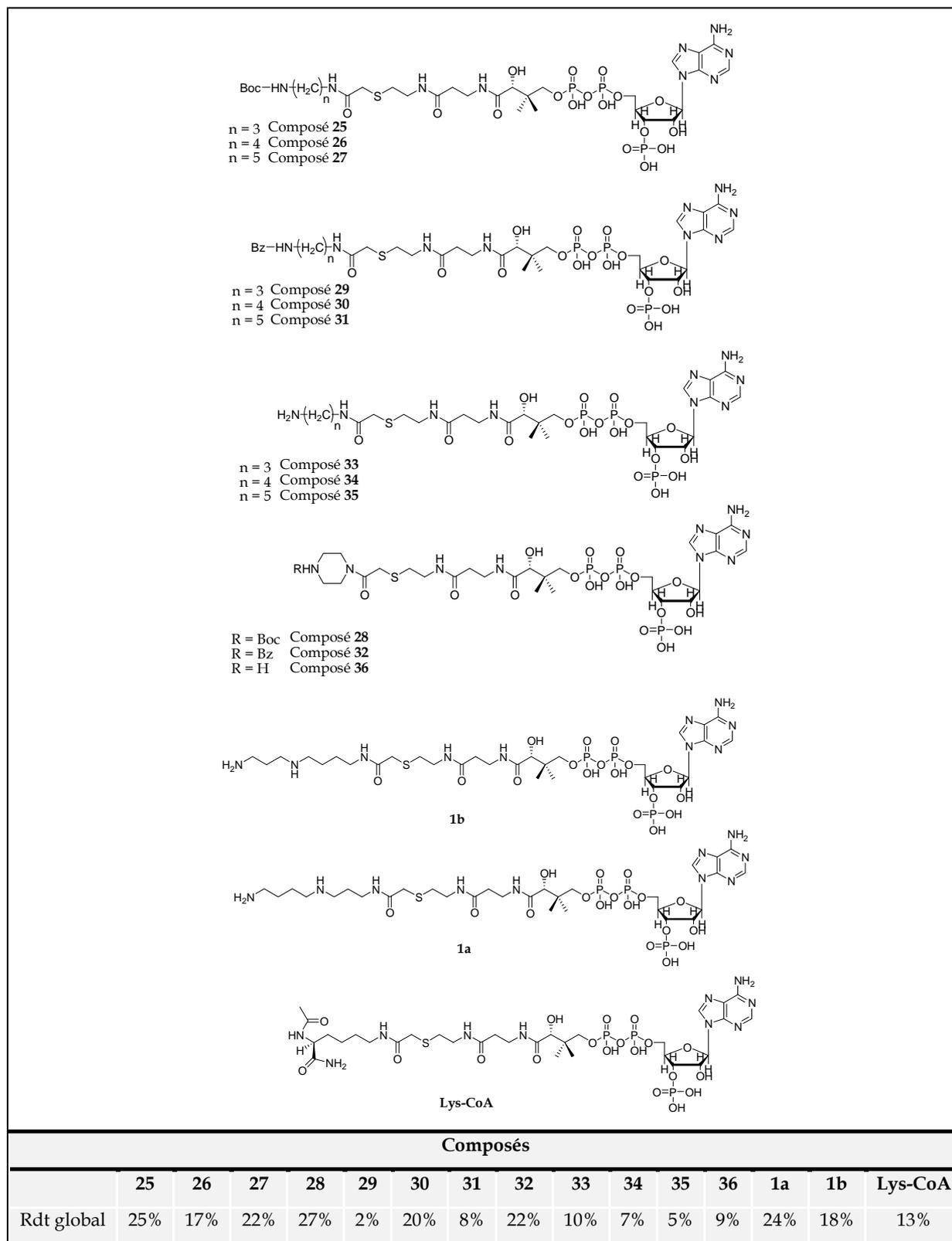


Figure 83 : Récapitulatif des composés synthétisés et rendements globaux

CHAPITRE III

PRODUCTIONS ET PURIFICATIONS D'HISTONES ACÉTYLTRANSFÉRASES

I. Introduction

Au début de ce travail, la HAT p300 n'était pas commerciale, c'est pourquoi j'ai produit et purifié cette enzyme. Le plasmide utilisé pour la transformation des bactéries hôtes (Rosetta(DE3) et BL21) a été construit à Montpellier par le Dr. Banères (Institut des biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier). Ce plasmide code pour l'enzyme p300 (1284-1660) avec une étiquette Glutathion S-Transférase (GST) dans la partie N-terminale et une étiquette 6-Histidines dans la partie C-terminale. Des colonies de bactéries *Escherichia coli* (*E.coli*) de souche BL21 contenant de l'ADN recombinant de PCAF (1-832, étiquette GST en N-terminale), nous ont été données par le Dr. Briet (Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, équipe du Dr. Trouche).

Dans un premier temps les méthodes de purification d'enzymes et de détection de l'activité enzymatique seront décrites. Puis la mise au point du protocole de production de p300 (1284-1660) sera détaillée. Enfin, la production, la purification et les tests enzymatiques concernant une autre HAT, PCAF, seront présentés.

II. Description des méthodes utilisées

1. Méthode de purification des enzymes de fusion

Le système de purification utilisé pour isoler l'enzyme d'intérêt (p300 ou PCAF) est un système dit « en batch ». La purification est effectuée par chromatographie d'affinité sur billes d'agarose couplées au glutathion (billes-glutathion), puis par chromatographie de chélation sur billes d'agarose couplées *via* un lien acide nitriloacétique à l'ion Ni^{2+} (billes-Ni-NTA, Qiagen) (Figure 84). L'étiquette GST interagit avec son substrat, le glutathion, fixé aux billes d'agarose, et ainsi une première étape de purification est accomplie.

L'ion Ni^{2+} des billes Ni-NTA complexe l'étiquette polyhistidine et conduit à une seconde étape de purification.

Dans le premier cas, la protéine doit être correctement repliée pour que la GST reconnaisse son ligand, alors que la seconde étape étant basée sur la reconnaissance d'une

séquence d'histidine, ne nécessite pas que la protéine soit correctement repliée. Ces deux méthodes de purification ne seront pas systématiquement utilisées.

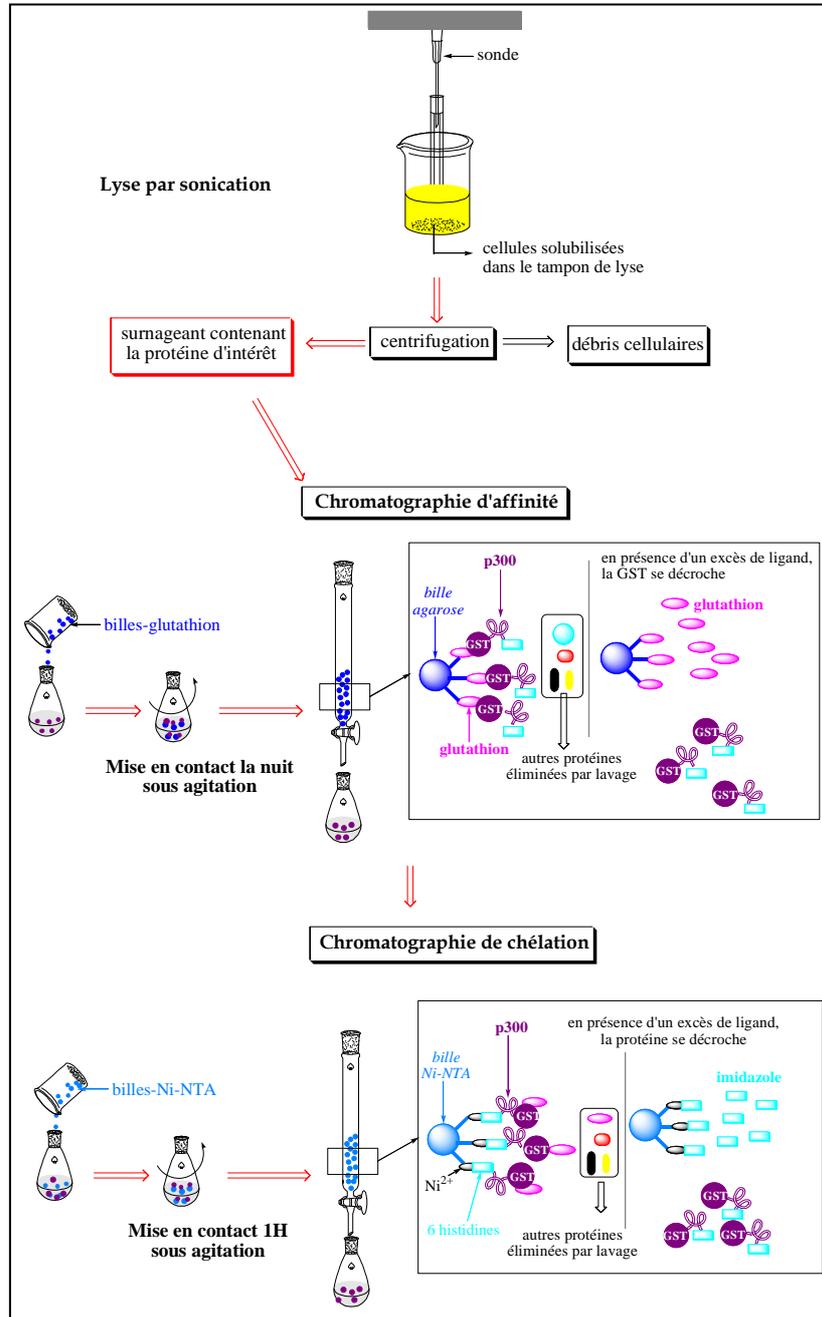


Figure 84 : Brève représentation de la purification en batch sur colonnes glutathion et Ni-NTA

La protéine purifiée ainsi que des échantillons prélevés au cours de la purification sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines déposées migrent sous l'effet d'un courant électrique. La protéine ainsi qu'un marqueur de

tailles sont chacun mélangés à une solution dénaturante puis déposés dans les puits du gel. Après migration, on peut observer le contenu protéique des échantillons séparés en fonction de leurs poids moléculaire. A l'issue de cette migration, le gel est visualisé suite à sa coloration au bleu de coomassie suivi de sa décoloration, la coloration des protéines étant irréversible. Enfin, la protéine subit des dialyses, à l'issue desquelles elle est dosée à l'aide de la technique de Bradford afin d'évaluer la concentration protéique totale.

2. Détection de l'activité HAT

Après expression de la protéine, l'activité enzymatique de cette dernière est évaluée. Plusieurs méthodes permettent de déceler l'activité HAT d'enzyme recombinante : par une méthode radioactive, par une méthode spectrophotométrique en continu ou en discontinu et enfin par une méthode de fluorescence.

➤ La méthode radioactive (Mizzen et al, 1999), implique l'utilisation d'³[H]-acétylcoenzyme A ou d'¹⁴[C]-acétylcoenzyme A. Cette méthode détecte la quantité de substrat ³[H]-acétylé ou ¹⁴[C]-acétylé à la fin de la réaction d'acétylation. Cette réaction est stoppée en déposant le milieu réactionnel sur du papier filtre P81 (Whatman) qui retient les histones basiques. Ce papier est lavé puis mis en contact avec du liquide de scintillation avant le comptage de la radioactivité. Cette méthode est très sensible mais nécessite une organisation spécifique à la manipulation de la radioactivité (personne habilitée, établissement agréé)

➤ La méthode spectrophotométrique en continu, où système d'enzyme couplée (Kim et al, 2000), permet de doser indirectement le coenzyme A formé au cours de la réaction d'acétylation (*Figure 85*). Pour cela, la réaction d'acétylation est réalisée en présence d'une autre enzyme, l' α -cétoglutarate déshydrogénase (ou la pyruvate déshydrogénase), de son substrat, l' α -cétoglutarate (ou le pyruvate) et de son co-facteur, la nicotinamide adénosine dinucléotide NAD⁺. Lors de la réaction, NAD⁺ est réduit en NADH. Ce produit absorbe à 340 nm ($\epsilon = 6230 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et sa formation est suivie par spectrophotométrie UV-visible. Ce protocole a été mis au point pour les HATs GCN5 et PCAF. Dans le cas d'une autre HAT, il serait nécessaire de mettre au point les conditions optimales d'expérience. Ce test présente

l'avantage d'être en continu, mais il est fort possible qu'en présence d'inhibiteur de HAT, l'enzyme couplée soit également inhibée.

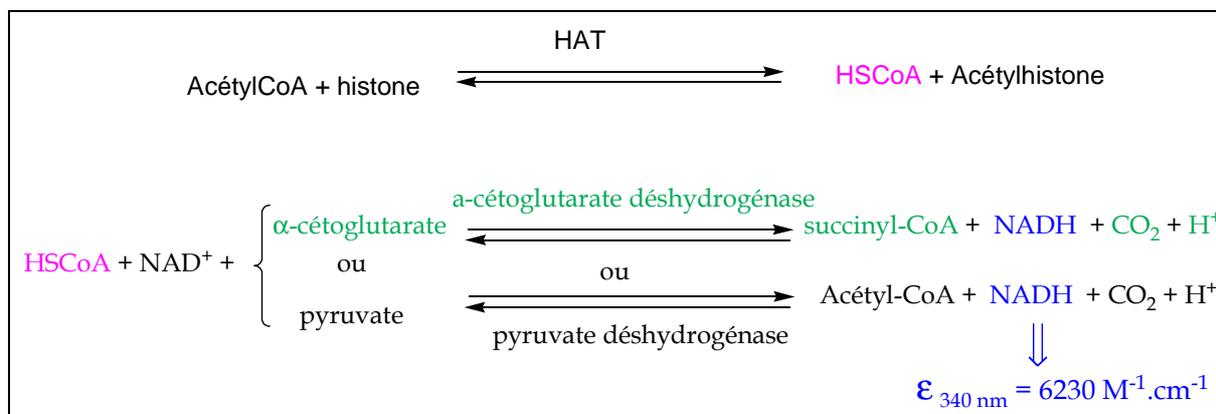


Figure 85 : Détection de l'activité HAT à l'aide du système d'enzyme couplée (Kim et al, 2000)

➤ La méthode de détection par fluorescence met en jeu un fluorophore qui est couplé soit au substrat (Wu & Zheng, 2008), soit avec le coenzyme A formé (Trievel et al, 2000a). Dans le cas du peptide fluorescent, l'acétylation du peptide entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence. Dans le second cas, le produit de réaction entre le coenzyme A et le fluorophore (ex : 7-diéthylamino-3-(49-maléimidylphényl)-4-méthylcoumarine CPM) donne un adduit qui fluoresce fortement. La détection de l'activité HAT par fluorescence est une méthode sensible mais qui nécessite un matériel et un protocole adapté.

➤ La dernière méthode présentée est spectrophotométrique, elle permet de suivre, de façon discontinue, la formation du coenzyme A formé au cours de la réaction d'acétylation. L'activité de l'enzyme est décelée à l'aide d'un test basé sur la réaction entre l'acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) et le groupement thiol du coenzyme A libéré lors de la réaction d'acétylation catalysée par p300 (Thompson et al, 2004) (Figure 86). L'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (NTB, $\epsilon = 13\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) produit est jaune vif et peut être détecté $\lambda = 412 \text{ nm}$.

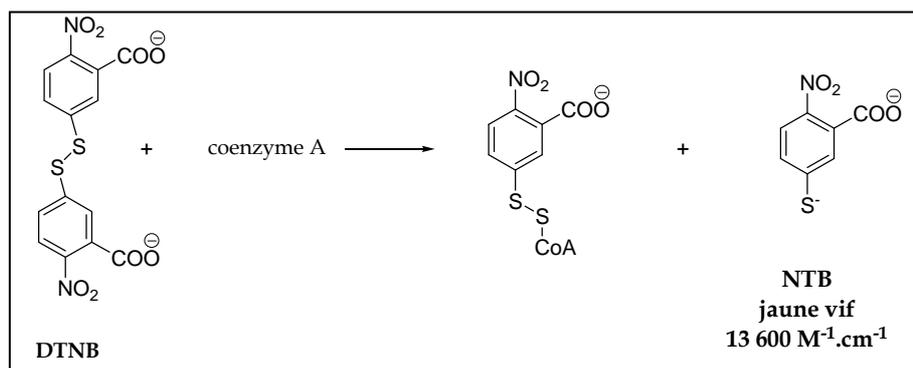


Figure 86 : Réaction du DNTB en présence de thiols

La méthode utilisée pour détecter l'activité HAT de p300 est celle employant le DTNB. Cette méthode est simple et le protocole a été décrit pour p300 (Thompson et al, 2004).

3. Témoins positifs et négatifs

Afin d'écartier toute erreur au niveau du test d'activité et ainsi rendre fiables les résultats qui en découlent, plusieurs contrôles ont été réalisés (Tableau 16).

↳ La solution d'acétylcoenzyme A est préparée dans le tampon PCAB (cf partie expérimentale) puis est stockée. Un test constitué de tampon PCAB (pH 7,9), d'acétylcoenzyme A et d'un mélange d'histones permet de vérifier d'une part que l'acétylcoenzyme A n'est pas hydrolysé et d'autre part qu'il n'y a pas d'hydrolyse pendant la durée de l'expérience. Ce test est réalisé régulièrement pour contrôler les solutions d'acétylcoenzyme A stockée à -80°C. Les solutions d'acétylcoenzyme A se conservent plusieurs mois à -80°C et aucune hydrolyse spontanée n'a été observée durant les expériences.

↳ L'étape suivante consiste à vérifier que le test fonctionne dans nos conditions. Pour cela, un test HAT est réalisé avec un mélange d'HATs (extrait nucléaire de cellules HeLa, HNE), en présence d'un mélange d'histones et d'acétylcoenzyme A. Ce test s'est révélé positif et cette expérience a servi de témoin positif.

↳ Un témoin négatif est aussi nécessaire. Pour cela, la solution de guanidinium dénaturante (solution Q) est ajoutée avant l'extrait à tester et le milieu est ensuite incubé à 30°C. Puis, seule la solution de DTNB est ajoutée et la DO est alors relevée. Le témoin négatif peut aussi être réalisé avec de l'enzyme dénaturée par chauffage (10 min à 95°C).

↳ Lors de la purification, du surnageant, obtenu après lyse et séparation de l'enzyme des débris cellulaires, est prélevé. Ainsi, avant de poursuivre avec l'étape de purification, l'activité HAT du surnageant est contrôlée.

Contrôle 1	PCAB + acétylCoA + histones
Contrôle 2 : témoin positif	PCAB + acétylCoA + histones + HNE
Contrôle 3 : témoin négatif	PCAB + acétylCoA + histones (ou substrats) + dénaturant + extrait à tester
	PCAB + acétylCoA + histones (ou substrats) + extrait à tester dénaturé
Contrôle 4 : témoin positif	PCAB + acétylCoA + histones + surnageant

Tableau 16 : Les différents contrôles et témoins (à ces solutions sont ajoutées la solution Q et la solution de DTNB avant la mesure de DO)

Par la suite, le mélange d'histones ne sera plus utilisé comme substrat. En effet, la composition du mélange d'histones n'est pas connue avec précision et le substrat doit être identifié pour les expériences d'enzymologie. Le peptide qui sera utilisé est issu de l'histone H4 et contient les acides aminés 14 à 21 (H4-8 : Ac-GA¹⁶KRHR²⁰KV-NH₂) de sa partie N-terminale. Il a été vérifié que ce peptide est substrat de p300 (Kervabon et al, 1979).

III. Mise au point de la production de p300 (1284-1660)

1. Protocole de référence

Le plasmide de type pGEX-6P-3, construit à Montpellier par le Dr Banères (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier I), contient la séquence codante

pour le domaine HAT de p300, domaine compris entre les acides aminés 1284 et 1660. Ce plasmide conduit à une protéine possédant deux étiquettes (ou tag) : une étiquette Glutathion S-Transférase (GST) localisée dans la partie N-terminale et une étiquette 6-Histidines dans la partie C-terminale.

La mise au point de la méthode de production de p300 (1284-1660, 68 kDa avec les tags) et sa validation ont également été réalisées à Montpellier par le Dr Banères. Les conditions de production sont brièvement récapitulées dans le tableau ci-dessous (Tableau 17). Lors d'un stage effectué à Montpellier, j'ai réalisé la surexpression de p300 (1284-1660) dans des souches Rosetta(DE3) de *E.coli*. Le milieu de culture est un milieu minimal 9 (M9) auquel deux antibiotiques sont ajoutés (ampicilline et chloramphénicol). La culture a été réalisée en erlenmeyer et la production de la protéine est initiée par l'isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG). Une fois les cellules récoltées et lysées, l'enzyme est purifiée par chromatographie d'affinité, avec une suspension de billes d'agarose couplées au glutathion, *via* un système composé d'une pompe péristaltique (Biorad Biologic Lb) et d'un collecteur (Pharmacia Biotech). La protéine a ensuite été analysée par électrophorèse sur gel, permettant ainsi son identification (Figure 87). Cette méthode de production, conduit à partir de 5L de culture, à 1 mg d'enzymes dans un volume de 1 mL après dialyse. Cette enzyme, active, présente une activité spécifique de 50 pmoles/min/ug (Tests réalisés avec [H4] = 0,2 mM, [p300] = 2,94 μ M).

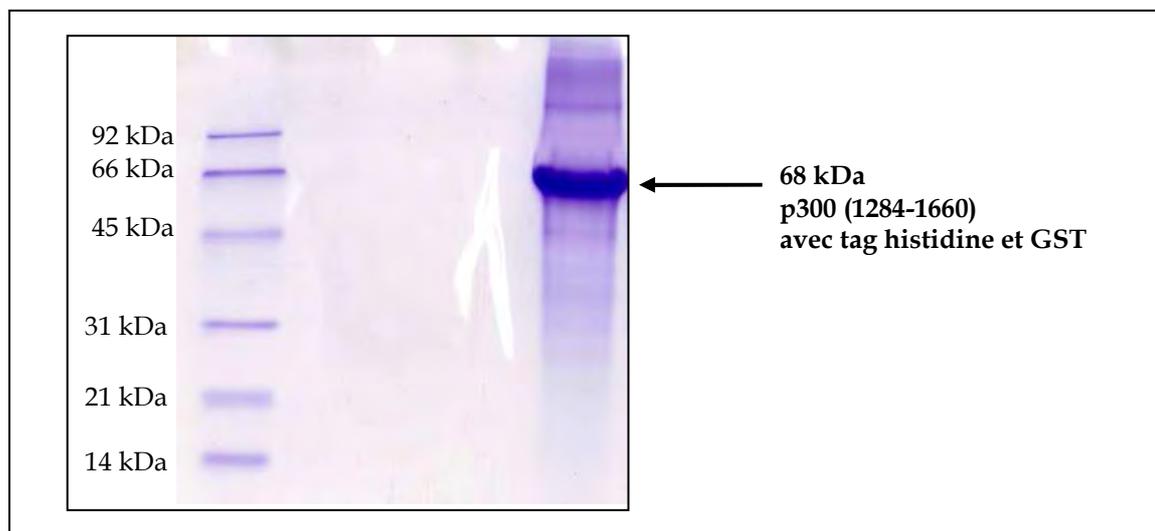


Figure 87 : Gel de polyacrylamide montrant p300 après purification sur colonne de billes-glutathion

Production de p300 (1284-1660, Montpellier)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9+ampicilline+ chloramphénicol	11 h à 30 °C	0,1 mM d'IPTG La nuit à 35°C
Purification de p300 (Montpellier)			
sur billes-glutathion + dialyse			

Tableau 17 : Conditions de production et de purification de p300 de Montpellier

Au LSPCMIB de Toulouse, le protocole de production a été répété afin d'obtenir p300 (1284-1660). Ne disposant d'un système de purification semblable à celui de Montpellier, la purification de p300 a été réalisée en batch.

Le schéma de la Figure 88 récapitule les diverses étapes de production de p300.

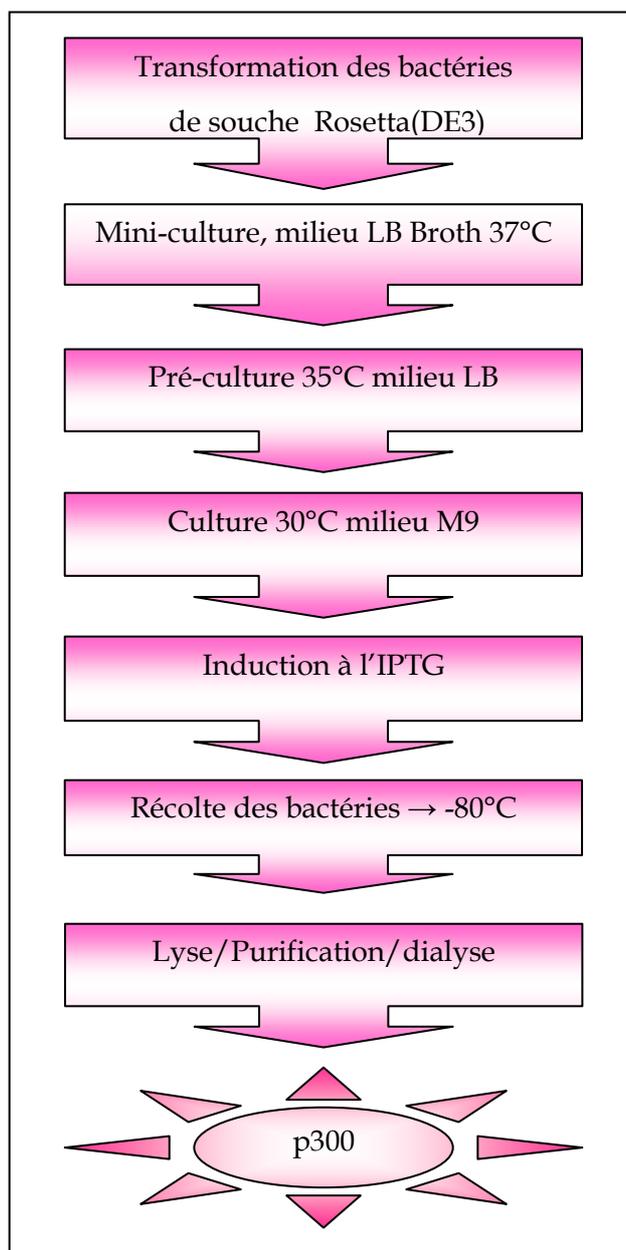


Figure 88 : Schéma général de production de p300 (1284-1660)

2. Production de p300 (1284-1660) avec le protocole de référence

Le protocole élaboré et mis en œuvre à Montpellier, a été appliqué à Toulouse. La production a été réalisée suivant le même protocole afin d'obtenir p300 (Tableau 18). Les purifications ont été réalisées selon les protocoles décrits précédemment (Figure 84).

Production de p300			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9 + ampicilline+ chloramphénicol	6 h à 30°C	0,1 mM d'IPTG La nuit à 35°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + sur billes-Ni-NTA + dialyse			
Activité non décelée			

Tableau 18 : Production selon le protocole de Montpellier et purifications de p300

Or, la production réalisée à Toulouse conduit à un rendement inférieur à celui de Montpellier d'une part (estimation qualitative), et d'autre part, l'activité HAT de l'enzyme n'a pas été décelée. Les rendements protéiques étant variables et pouvant dépendre de la nature de la cellule hôte et des conditions de cultures, certains paramètres de production et de purification ont été modifiés afin de générer une enzyme active et d'améliorer le rendement protéique. Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de la souche bactérienne, de la température de production, la durée d'induction et le nombre de purification.

3. Influence de la souche bactérienne sur la production de p300 (1284-1660)

3.1 Productions et purifications

Dans un premier temps, nous avons modifié la souche bactérienne à partir de laquelle la protéine est produite. En effet, la nature de l'hôte peut affecter l'expression d'une protéine et les souches BL21 sont connues pour exprimer fortement les protéines de fusion GST. Ainsi, des bactéries *E.coli* de souche BL21(DE3) ont été transformées et le plasmide construit à Montpellier inséré dans ces souches. La production de p300 a ainsi été réalisée avec ces nouvelles souches (Tableau 19).

Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9 + ampicilline+ chloramphénicol	7h30 à 30°C	0,1 mM d'IPTG La nuit à 30°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + sur billes Ni-NTA + dialyse ➡ 200 µg			
Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
BL21 (DE3)	M9 + ampicilline+ chloramphénicol	7h30 à 30°C	0,1 mM d'IPTG La nuit à 30°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + sur billes Ni-NTA + dialyse ➡ 96 µg			
Activité non décelée			

Tableau 19 : Conditions de productions et de purifications de p300 (la quantité d'enzyme signalée correspond à 1L de culture)

Il en résulte que l'enzyme exprimée avec les souches Rosetta(DE3) mène à une quantité d'enzyme plus importante qu'une production réalisée avec les souches BL21 (Tableau 19)

3.2 Mesure de l'activité enzymatique

L'enzyme issue de chacune des productions, recueillie après dialyse, a été testée. Pour l'enzyme de souche Rosetta(DE3), deux tests d'activité au DTNB ont été réalisés avec comme substrat le peptide H4-20 contenant les résidus 1-19 du peptide H4 (AcNH-SGRG⁵KGG⁸KGLG¹²KGGA¹⁶KRHR-CONH₂, fourni par le Pr. Parello, Université de Vanderbilt).

Test d'activité	Tampon PCAB	H4-20 200 µM	acétylCoA 2 mM	p300 5 µM
-----------------	----------------	-----------------	-------------------	--------------

Les concentrations choisies sont du même ordre de grandeur que les conditions utilisées par Thompson et al.(Thompson et al, 2004). Bien que la quantité d'enzyme du test soit très supérieure à celle utilisée dans la publication, la protéine produite ne montra aucune activité. L'enzyme provenant de la souche BL21(DE3) a été testée avec les histones totales, le peptide H4-20 et le peptide H4-8. L'activité de l'enzyme n'a été détectée dans aucun des 3 tests.

Souche BL21(DE3)	Tampon PCAB	histones 0,4 µg/µL	acétylCoA 200 µM	p300 0,16 µM
	Tampon PCAB	H4-20 200 µM	200 µM	0,16 µM
	Tampon PCAB	H4-8 200 µM	200 µM	0,16 µM

3.3 Conclusions

De cette étude, il ressort que les souches Rosetta(DE3) semblent mieux adaptées à la production de p300. En effet, la production à travers cette souche a permis d'obtenir 6,5 fois plus d'enzymes que la production à travers les souches BL21(DE3). Ces expériences n'ayant été réalisées qu'une fois, nous ne pouvons nous permettre de généraliser quant à l'efficacité d'une souche par rapport à l'autre. Toutefois, nous utiliserons les souches Rosetta(DE3) lors des prochaines productions de p300.

Les tests d'activité sont réalisés, dans le cas de protéines issues des souches BL21(DE3), avec trois substrats. Ces expériences ont été réalisées afin d'identifier le meilleur substrat pour p300. L'activité de p300 n'ayant pas été décelée, nous pouvons conclure que le substrat n'est pas en cause dans cette absence d'activité HAT.

4. Influence de la température sur la production de p300 (1284-1660)

4.1 Productions et purifications

La formation de corps d'inclusion est un phénomène souvent observé lors de culture cellulaire. En effet, si la protéine est instable ou si sa vitesse de repliement est lente, les protéines s'agrègent en corps d'inclusion et deviennent alors des corps insolubles. Ces corps d'inclusion peuvent être à l'origine de faible rendement. Un des paramètres de production qui peut être modifié afin de pallier ce problème est la température d'induction. Ainsi, des productions ont été réalisées afin de tester l'effet de la température d'induction (Tableau 20). Un autre paramètre influant sur le rendement de production est la durée d'induction, qui sera exploité dans la section suivante.

Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9 + ampicilline+ chloramphénicol	6h à 30°C	0,1 mM d'IPTG La nuit à 25°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + dialyse ➔ 261 µg			
Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9 + ampicilline+ chloramphénicol	6h à 30°C	0,1 mM d'IPTG 5h à 30°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + dialyse ➔ 212 µg ➔ 186 µg			
Activité non décelée			

Tableau 20 : Conditions de productions et de purifications de p300 (les quantités de protéines indiquées correspondent à des productions distinctes de 1L)

Deux températures ont été testées : 25°C et 30°C. Les rendements obtenus sont du même ordre de grandeur.

4.2 Mesure de l'activité enzymatique

L'enzyme dialysée est par la suite soumise à un test d'activité. Un mélange d'histones (0,5 µg/mL) est utilisé comme substrat dans un premier temps, et ce, jusqu'à ce qu'une activité HAT soit décelée. La concentration en acétylcoenzyme A est à 250 µM et la concentration en enzyme est semblable aux tests précédents. Pour les productions dont l'induction a été réalisée à 30 °C, les tests ont été effectués avec une quantité d'enzyme 6 fois supérieure. Dans tous les cas de figure, l'activité HAT n'a pas été observée.

4.3 Conclusions

Afin d'optimiser les rendements de production, la température d'induction a été modifiée. Dans un premier cas, elle s'est faite à 25°C durant une nuit et dans l'autre cas elle s'est faite 5 h à 30°C. Les rendements obtenus dans les deux cas sont semblables, 262 µg sont obtenus pour une induction à 25°C la nuit et pour une induction à 30°C durant 5h, 212 µg sont obtenus lors d'une première production et 186 µg lors d'une seconde production. La différence de température n'est peut être pas suffisante, cependant nous n'avons pas pu abaisser davantage la température de l'incubateur. Toutefois cette expérience met en avant un autre paramètre qui peut être étudié et qui est la durée d'induction.

Un autre paramètre a été modifié, il se situe au niveau de la purification. Les billes utilisées pour la purification étant onéreuses, nous avons décidé de vérifier si l'activité HAT est présente à la fin d'une purification avant d'en entamer une autre.

Le test d'activité de l'enzyme produite après l'induction à 25°C est réalisé avec un mélange d'histones. En effet, on sait que ce mélange contient les substrats de p300 et il est préférable de vérifier l'activité avec ce mélange avant de tester des substrats mieux identifiés. L'enzyme produite par induction à 30°C a également été testée mais avec des concentrations en enzymes supérieures à celles utilisées précédemment. L'activité HAT n'a cependant pas été détectée.

5. Influence de la durée d'induction sur production de p300 (1284-1660)

5.1 Productions et purifications

Le plasmide pGEX-6P-3 utilisé contient le gène laq I_q, qui produit une protéine se liant en aval du promoteur réprimant ainsi l'expression de p300. L'IPTG agit en se fixant à cette protéine et en inhibe l'effet. Ainsi, la production de p300 dans *E.coli* est induite par ajout d'IPTG. Or, les promoteurs inductibles ont une activité basale, qui même faible, conduit à l'expression de p300 sans induction préalable. Cette production prématurée de p300 peut être nuisible à la bactérie et mener à de faible rendement protéique. Ainsi des cultures ont été réalisées avec 3 durées d'induction différentes : 3h, 5h et une nuit (Tableau 21).

Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9+ampicilline +chloramphénicol	5h à 30°C	0,1 mM d'IPTG 3h à 30°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + dialyse ➡ 147 µg ➡ Activité décelée			
Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9+ampicilline +chloramphénicol	6h à 30°C	0,1 mM d'IPTG 5h à 30°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + dialyse ➡ 309 µg ➡ Activité décelée			
Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9+ampicilline +chloramphénicol	6h à 30°C	0,1 mM d'IPTG la nuit à 25°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + dialyse ➡ 261 µg			

Tableau 21 : Conditions de productions de p300 réalisées avec des temps d'induction différents (les quantités d'enzymes indiquées correspondent à des productions distinctes de 1L)

5.2 Mesure de l'activité enzymatique

Après dialyse, l'enzyme est récupérée et son activité HAT est testée à l'aide du test au DTNB. L'enzyme obtenue après une nuit d'induction ne montra pas d'activité. L'activité HAT de l'enzyme issue de 5h d'induction n'a pas été observée non plus.

L'enzyme obtenue après 3h et 5h d'induction ont été testées avec une quantité d'enzyme 20 fois supérieure à celle utilisée dans les précédents tests. Ce changement a été positif car l'activité HAT de p300 a été clairement observée pour une concentration de 3 μM d'abord, puis pour une concentration moindre de 1,9 μM . L'activité spécifique de l'enzyme calculée est de 7 pmoles/min/ μg .

5.3 Conclusions

Concernant les rendements protéiques, les quantités d'enzymes obtenues n'atteignent pas le mg en dépit des investigations menées et des tentatives d'optimisation. Les quantités d'enzymes obtenues dans les productions avec des durées d'induction variables laissent à penser que la meilleure combinaison serait une induction à 30 °C pendant 5h.

Au niveau des tests au DTNB, l'activité de l'enzyme a été observée pour des concentrations en enzyme de 1,9 μM minimum. Nous sommes donc parvenus à produire une enzyme active.

Certains paramètres restent à vérifier : l'enzyme testée provient d'une seule étape de purification, retrouvera t'on cette activité après la seconde purification ? Comment se comportera l'enzyme en présence du peptide H4-8 ?

6. Influence de la purification

6.1 Productions et purifications

Afin de répondre aux questions précédemment posées, des productions de p300, suivies d'une ou deux étapes de purifications, ont été entreprises (Tableau 22).

Production de p300 (1284-1660)			
Souche	Milieu de culture	Durée de culture	Induction
Rosetta(DE3)	M9+ampicilline +chloramphénicol	5h à 30°C	0,1 mM d'IPTG 5h à 30°C
Purification de p300			
sur billes-glutathion + billes Ni-NTA + dialyse ➡ 76 µg ➡ Activité non décelée			
sur billes-glutathion + billes Ni-NTA + dialyse ➡ 32 µg ➡ Activité non décelée			
sur billes-glutathion + dialyse ➡ 186 µg ➡ Activité décelée			

Tableau 22 : Conditions de productions et de purifications (les quantités d'enzymes indiquées correspondent à des productions distinctes de 1L)

On constate que la quantité d'enzyme récoltée est faible après purification sur billes-glutathion et sur billes Ni-NTA. Afin de vérifier si cette faible quantité d'enzyme est le résultat de perte au cours de la purification, un lot de cellules a été purifié sur billes-glutathion uniquement. La quantité d'enzyme obtenue après une seule purification est plus importante. Toutefois, on obtient une enzyme pure après deux étapes de purification (sur billes-glutathion et sur billes Ni-NTA, Figure 89).

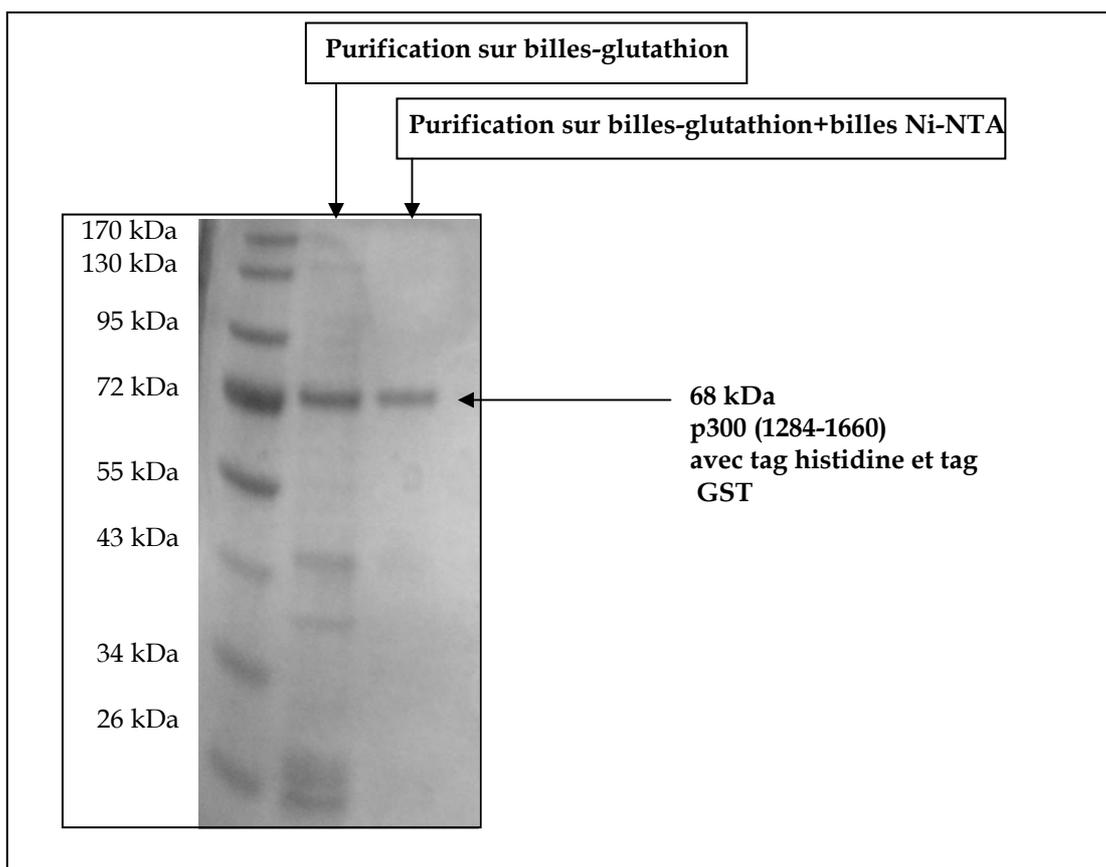


Figure 89 : Gel de polyacrylamide obtenu après électrophorèse

6.2 Mesure de l'activité enzymatique

Dans un premier temps, l'enzyme issue des cellules purifiées uniquement par l'étiquette GST a été testée avec le peptide H4-8 au lieu du mélange d'histones, (250 μ M de peptide) et 500 μ M d'acétylcoenzyme A. Ce test s'est révélé être positif, confirmant ainsi que p300 produite est active. L'enzyme active présentait une activité spécifique de 38 pmoles/min/ μ g.

Dans un deuxième temps, l'enzyme provenant d'une double purification a été testée. Cette enzyme ne montra pas d'activité.

6.3 Conclusions

Ces dernières expériences avec p300 nous montrent que la production de p300 peut se montrer assez aléatoire. En effet, 32 μg et 76 μg de protéines ont été obtenus après 2 étapes de purification, et d'une production à l'autre la quantité d'enzyme a été doublée.

Les tests d'activité réalisés confirment que l'enzyme est active après une purification sur billes-glutathion et que cette activité se perd lorsque la seconde purification, sur billes Ni-NTA, est effectuée. Faut de temps, l'origine de cette perte d'activité n'a pas été déterminée. De plus, la concentration en enzyme introduite a une grande importance. Trois concentrations en enzyme ont été testées : 0,4 μM , 1,5 μM , 2,9 μM . Ces expériences montrent qu'il faut au moins 1,5 μM d'enzymes pour que l'activité HAT soit observée.

7. Conclusions générales

Cette étude a nécessité la réalisation de plusieurs productions de p300 qui n'ont pas toutes abouties à la production d'enzymes. En effet, certaines précautions sont à prendre. La matrice d'agarose couplée au glutathion est à conserver à -20°C . Sa conservation à 4°C a conduit à une dégradation de la résine qui nous a laissé croire à plusieurs reprises que l'enzyme n'était pas produite et ce, bien que des échantillons de lysat et de surnageant aient été analysés par électrophorèse sur gel.

Plusieurs paramètres ont été modifiés afin de produire une quantité d'enzyme suffisante pour effectuer des tests cinétiques. Parmi ces paramètres, la nature de la souche bactérienne, la température d'induction, le temps d'induction ont été modifiés afin d'améliorer le rendement en protéine. Les caractéristiques qui peuvent être retenues sont une culture avec des souches Rosetta(DE3), suivie d'une induction de 5h à 30°C .

Le système de purification utilisé doit se limiter à la chromatographie d'affinité sur billes-glutathion. Il semblerait qu'un passage par la chromatographie de chélation s'accompagne d'une perte d'activité. La protéine obtenue est toutefois moins propre que celle obtenue après passage sur billes-glutathion et billes Ni-NTA (*Figure 89*).

Les quantités d'enzymes utilisées pour détecter l'activité HAT de p300 sont cruciales dans nos conditions. Lors des tests d'activité réalisés, la différence observée, entre le bruit de fond (témoin négatif) et le test d'activité, fut suffisante pour attester de l'activité de l'enzyme mais cet écart n'était pas assez important pour des tests d'inhibition. De plus, la quantité d'enzyme que nécessitent de telles expériences est très supérieure à celle produite. Pour la suite des expériences, p300 commerciale (1284-1673) sera donc utilisée.

Afin de déceler une éventuelle spécificité des effecteurs synthétisés, une autre HAT a été produite. Ainsi, la production de PCAF a été entreprise.

IV. Production de PCAF

1. Production et purification

La production de l'enzyme PCAF (résidu 1-832, 119 kDa) a été réalisée suivant le protocole utilisé pour la production de p300. Des boîtes de pétris contenant des bactéries BL21(DE3), transformée avec le plasmide contenant le gène codant pour l'enzyme PCAF, nous ont été données par le Dr. Briet (Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, équipe du Dr. Trouche, Université de Toulouse III). Le plasmide possède également un gène de résistance à l'ampicilline et une séquence codante pour une étiquette GST (en N-terminale). L'enzyme produite n'est pas dialysée et est déposée sur un gel de polyacrylamide afin d'être caractérisée (*Figure 90*). On observe deux bandes caractéristiques, l'une correspond à l'enzyme avec le tag GST et l'autre à un arrêt de traduction du gène de l'enzyme conduisant une protéine plus courte.

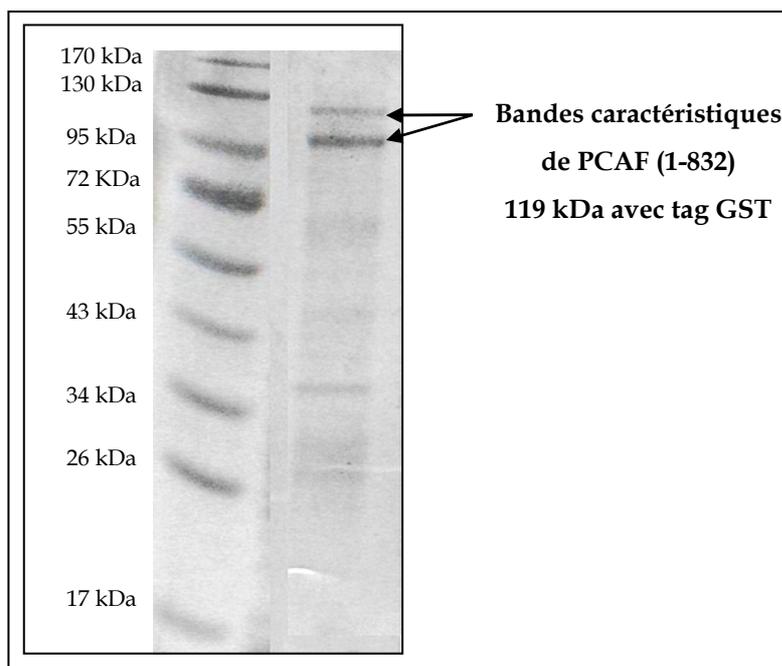


Figure 90 : Gel de polyacrylamide présentant PCAF

La quantité d'enzyme produite est de 30 μg à partir d'1L de culture. Il faut noter qu'une partie de l'enzyme est restée accrochée aux billes-glutathion.

2. Mesure de l'activité enzymatique

La méthode employée pour détecter l'activité HAT de PCAF est une méthode radioactive qui consiste à compter la radioactivité émise par le substrat [^3H]-acétylé. Le milieu réactionnel se compose du tampon IPH (pH 8), d' [^3H]acétylcoenzyme A, de substrat (mélange d'histones ou peptide H3-19 : résidus 1 à 19 de la partie N-terminale de l'histone H3, Ac-QTAR⁹KSTGG¹⁴KAPR¹⁸KQLAT²³K-NH₂) et d'enzyme. La réaction est initiée par ajout d' [^3H]acétylcoenzyme A et se déroule à 30°C.

L'enzyme produite a été testée avec un mélange d'histones et comparée à un témoin négatif constitué de tampon IPH, d' [^3H]acétylcoenzyme A et d'histones. L'enzyme active présentait une activité spécifique de 0,13 pmoles/min/ μg .

Enfin, un test est effectué avec le peptide H3-19 qui sera utilisé lors de cinétiques enzymatiques. PCAF a montré une activité HAT avec le peptide H3-19 et l'enzyme présentait une activité spécifique de 0,12 pmoles/min/ μ g.

3. Conclusion

Par rapport à p300, la production de PCAF fut aisée. Nous sommes parvenus à produire une enzyme active et en quantité suffisante pour effectuer des cinétiques enzymatiques dans nos conditions. En effet, à partir d'1L de culture nous obtenons 30 μ g d'enzymes.

L'enzyme PCAF produite ainsi que les conditions mises au point pourront être utilisées lors d'études de cinétiques d'inhibition.

CHAPITRE IV

**ÉVALUATION DU POUVOIR INHIBITEUR DES
EFFECTEURS SYNTHÉTISÉS**

Un inhibiteur est une substance capable d'altérer et de réduire l'activité d'une enzyme. Une telle activité inhibitrice est attendue de la part des molécules conçues et présentées dans le chapitre II. Afin d'évaluer l'effet de ces molécules, nous déterminerons la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique mesurée en l'absence d'inhibiteur. Un IC_{50} est un paramètre qui dépend des conditions d'expérience, tels que le protocole, la source d'enzyme, la concentration en substrat, la température et le type d'inhibition mis en jeu. Pour des conditions d'expériences similaires, cette valeur donne une information sur l'efficacité d'un inhibiteur par rapport à un autre.

I. Évaluation de l'inhibition de p300 (1284-1673)

1. Mesure de la constante de Michaelis de p300 vs H4-8

Dans un premier temps, la valeur de la constante apparente de Michaelis K_M a été déterminée pour p300 vs H4-8 (Ce peptide a été utilisé auparavant comme substrat d'acétylases nucléaires (Kervabon et al, 1979)). Pour cela, une enzyme commerciale p300 (1284-1673, activité spécifique 500 pmoles/min/ μ g) a été utilisée, car la production faite au laboratoire fournissait trop peu d'enzyme.

Pour atteindre cette valeur, la vitesse initiale V_0 a été mesurée lors d'expérience où le mélange réactionnel contenait une concentration en enzyme fixée, une concentration en [3 H]acétylcoenzyme A fixée et des concentrations en peptide H4-8 variables. Le graphe correspondant à l'équation de Michaelis-Menten a été tracé et modélisé avec les valeurs obtenues (*Figure 91*).

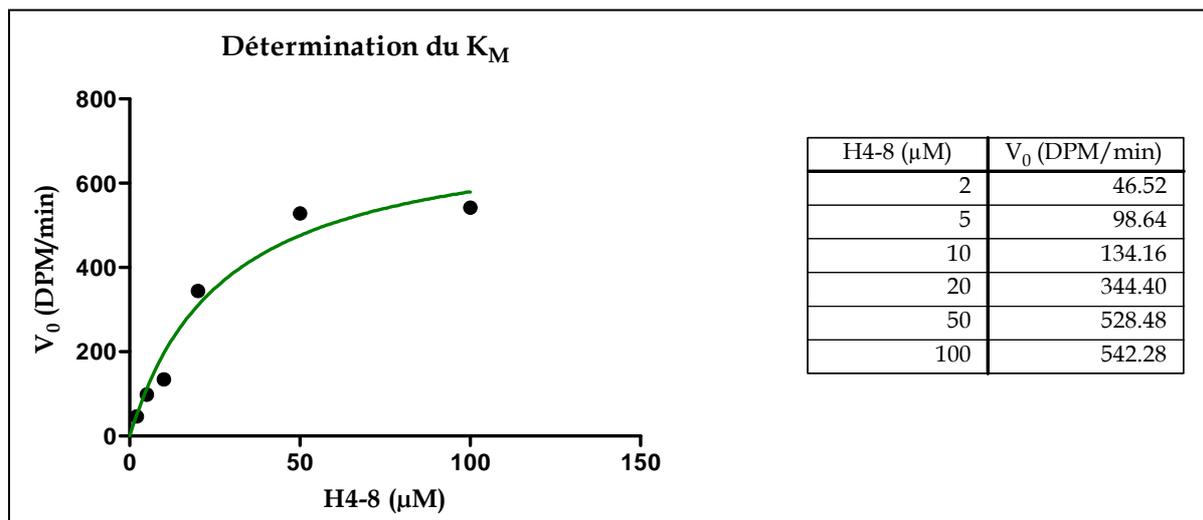


Figure 91 : Tracé généré après modélisation de la courbe tracée selon l'équation $V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$

La valeur de K_M relevée, 28,9 μM, est du même ordre de grandeur que les valeurs de K_M de la littérature (Tableau 23). Ainsi le peptide H4-8 possède une affinité correcte envers l'enzyme cible et sera utilisé lors des tests d'inhibition.

	Séquence peptidique du substrat H4	K_M (μM)
p300 (1284-1673) vs H4-8	Ac-GA ¹⁶ KRHR ²⁰ KV-NH ₂	28,9 ± 9,4
p300 (1287-1666) vs H4-15 (Thompson et al, 2004)	GRG ⁵ KGG ⁸ KGLG ¹² KGGA ¹⁶ K	40 ± 8
p300 (1284-1673) vs H4-15 (Hwang et al, 2007)	GRG ⁵ KGG ⁸ KGLG ¹² KGGA ¹⁶ K	30 ± 6

Tableau 23 : Valeurs de K_M déterminées lors de l'expérience et relevées dans la littérature

2. Mesure des IC₅₀ par une méthode non radioactive

2.1 Mesures des IC₅₀

Une série de mesures d'IC₅₀ a été réalisée par la méthode au DTNB. Les tests sont réalisés de la façon suivante : le mélange réactionnel contenant le tampon PCAB (pH 7,9), le peptide H4-8, l'acétylcoenzyme A et p300 est thermostaté à 30°C. La réaction est initiée par l'ajout d'enzyme. La réaction est par la suite stoppée par ajout d'une solution dénaturante de guanidine. Le coenzyme A formé est dosé par une solution de DTNB qui est ajoutée juste après la solution dénaturante. Les expériences débutent avec un test sans inhibiteur, le résultat de ce test représente l'activité maximum de l'enzyme, soit « 100% d'activité ». Puis, la même expérience est menée avec des quantités croissantes d'effecteurs, qui sont incorporées au milieu réactionnel. A la fin de chaque expérience réalisée en présence d'effecteurs, l'activité résiduelle de p300 est déterminée. Des courbes représentant l'activité de p300 en fonction de la concentration en inhibiteur sont alors tracées (%activité résiduelle = f(log[I])). Puis, la concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité HAT de p300 est déterminée soit par régression non linéaire à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5, soit graphiquement sur les courbes d'inhibition. Ces mesures ont été réalisées pour les composés **25** à **36**, **1a** et **1b**. Pour comparaison, une molécule synthétisée au sein du laboratoire, **DS1** (Soupaya, 2007, *Figure 94*), a également été testée. Cette molécule a été conçue suivant la stratégie de synthèse décrite au chapitre II de ce manuscrit. De plus, Lys-CoA a également été testée afin de servir de référence.

Les résultats obtenus présentés dans la figure suivante (*Figure 92*) vont être analysés dans la section 2.2:

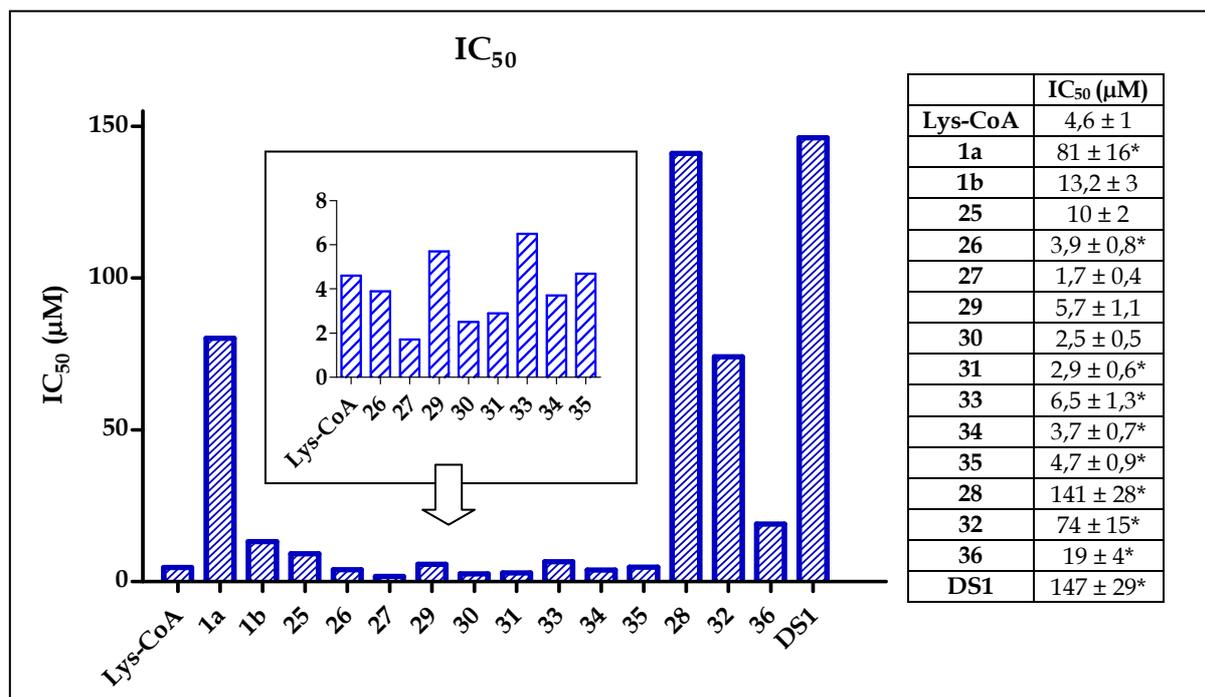


Figure 92 : Représentation graphique des IC₅₀ (en µM) de l'ensemble des composés (*valeurs déterminées graphiquement, tests réalisés avec H4-8 250 µM, l'AcétylCoA 500 µM et p300 0,35 µM)

2.2 Analyse des résultats

2.2.1 Les spermidine-CoA 1a et 1b

Des expériences réalisées avec les composés **1a** et **1b** ont été menées afin de compléter les études réalisées par Cullis et al. (Cullis et al, 1982). La Figure 93 schématise les résultats obtenus avec ces deux molécules ainsi qu'avec la référence Lys-CoA.

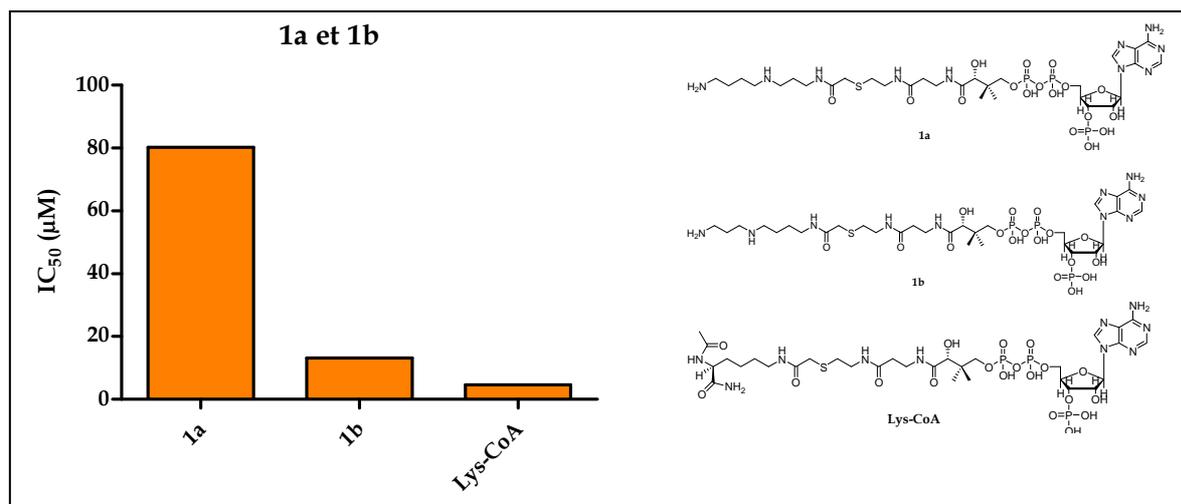


Figure 93 : Représentation graphique de l'inhibition de p300 par **1a**, **1b** et Lys-CoA

Ces résultats montrent que le pouvoir inhibiteur de **1b** ($IC_{50} = 13,2 \pm 3 \mu M$) est 6 fois supérieur à celui de **1a** ($IC_{50} = 81 \pm 16 \mu M$). Toutefois **1a** et **1b** sont, respectivement, environ 3 fois et 18 fois moins efficaces que Lys-CoA ($IC_{50} = 4,6 \pm 1 \mu M$).

Lors des tests réalisés par Cullis et al., **1a** et **1b** ont été testés sur un mélange de HATs nucléaires (Cullis et al, 1982). On peut supposer que **1b** a inhibé une ou plusieurs autres HATs du mélange et n'est pas spécifique de p300.

2.2.2 Influence de la nature de la diamine des composés diamine-CoA

Les expériences d'inhibition ont été réalisées pour les composés comportant une partie diamine de 3 (composé **33**), 4 (composé **34**) et 5 (composé **35**) carbones et également pour deux composés cycliques, aromatique ou non (composés **36** et **DS1**). Ces expériences aboutissent aux résultats ci dessous (Figure 94).

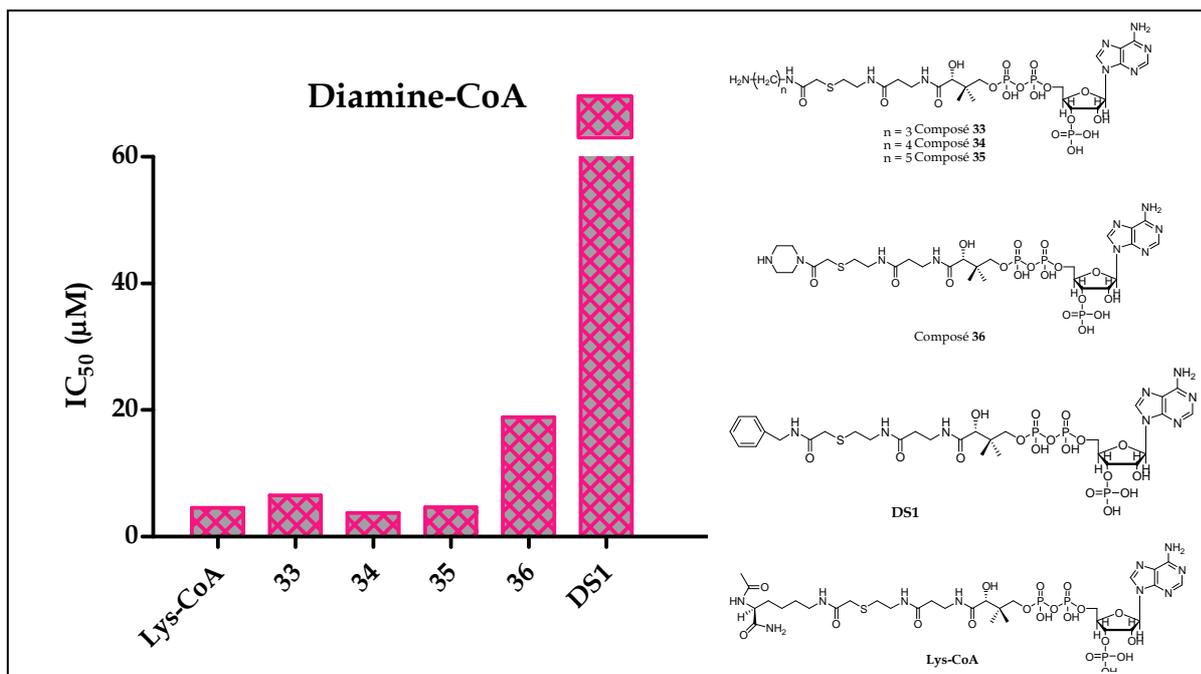
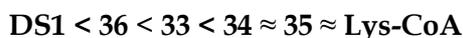


Figure 94 : Les dérivés diamine-CoA et DS1

Ces molécules peuvent être classées selon leur efficacité :



Les composés **34** ($\text{IC}_{50} = 3,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$) et **35** ($\text{IC}_{50} = 4,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$) présentent une inhibition semblable à celle de Lys-CoA ($\text{IC}_{50} = 4,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$). Le composé **33** ($\text{IC}_{50} = 6,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$) est légèrement moins efficace. Ainsi, des structures plus simples que celle de Lys-CoA, qui est l'inhibiteur le plus efficace connu, permettent d'obtenir une efficacité semblable à cette dernière.

Le test réalisé avec le composé **36** ($\text{IC}_{50} = 19 \pm 4 \mu\text{M}$) conduit à une inhibition moins efficace. Cette information laisse supposer que le cycle pipérazine, se retrouverait dans le couloir hydrophobe formé par les résidus Tyr 1397, Trp 1436, Tyr 1446 et Cys 1438. Ce couloir serait le site d'interaction avec la partie lysine de Lys-CoA. Ainsi, en supposant que le cycle de la pipérazine se positionne dans le même site que celui de la partie lysine de Lys-CoA, une gêne stérique est probablement occasionnée. Cette gêne se traduirait alors par une perte d'efficacité. De plus, le composé **DS1**, hydrophobe, présente un $\text{IC}_{50} = 147 \pm 29 \mu\text{M}$. Cette valeur élevée corrobore l'hypothèse de la gêne stérique créée par le cycle, mais ne s'accorde pas avec le fait que la poche où se loge la partie lysine de Lys-CoA constitue un

environnement hydrophobe. Le composé **36**, dont le cycle est plus hydrophile que celui de **DS1**, est meilleur inhibiteur que ce dernier. Il est possible que le groupement méthylène de **DS1**, situé entre le cycle et l'espaceur, génère un encombrement supplémentaire et donc une perte d'efficacité plus grande que celle observée pour le composé **36**.

Afin d'étayer cette hypothèse, une superposition des composés **36**, **DS1**, Lys-CoA, de l'acétylcoenzyme A et du coenzyme A a été réalisée. La superposition a été faite par rapport à Lys-CoA, co-cristallisé avec p300 (Figure 95). Cependant, cette figure ne permet pas de conclure sur l'hypothèse de la gêne stérique.



Figure 95 : Superposition des composés **36**, **DS1** et Lys-CoA dans la structure de p300 publiée par Liu et al. (Liu et al, 2008)(Superposition réalisée au sein du laboratoire par le Dr Rodriguez, en rose Lys-CoA, en orange le composé **36**, en bleu **DS1**, en vert l'acétylCoA, en gris le coenzyme A)

Les conclusions que l'on peut tirer de ces expériences sont :

- Des deux isomères de spermidine-CoA testés, **1b** est 6 fois plus efficace que **1a**. Cette information indique que **1b** contribue plus fortement que **1a** à l'inhibition de p300. Les spermidine-CoA sont sous forme protonée, contrairement à Lys-CoA. On pourrait penser que cela les rend moins efficaces que Lys-CoA. Or ce phénomène n'est pas observé pour les diamine-CoA qui sont elles aussi protonées dans le milieu réactionnel.
- Les composés **34** et **35**, avec une partie diamine de 4 et 5 carbones respectivement, conduisent à une meilleure inhibition de l'activité HAT de p300 que les composés cycliques (composés **36** et **DS1**). Ils sont un peu meilleurs que le composé à 3 carbones (composé **33**).
- Les composés cycliques (composés **36** et **DS1**) présentent une inhibition moins importante que les composés aliphatiques, ceci serait en accord avec une gêne stérique occasionnée par le cycle.

2.2.3 Influence du groupement porté par la partie diamine des diamine-CoA

Les molécules comportant soit un groupement benzoyle (Bz), soit un groupement tert-butylloxycarbonyle (Boc), ont été testées afin d'évaluer leur efficacité en tant qu'inhibiteur (*Figure 96*).

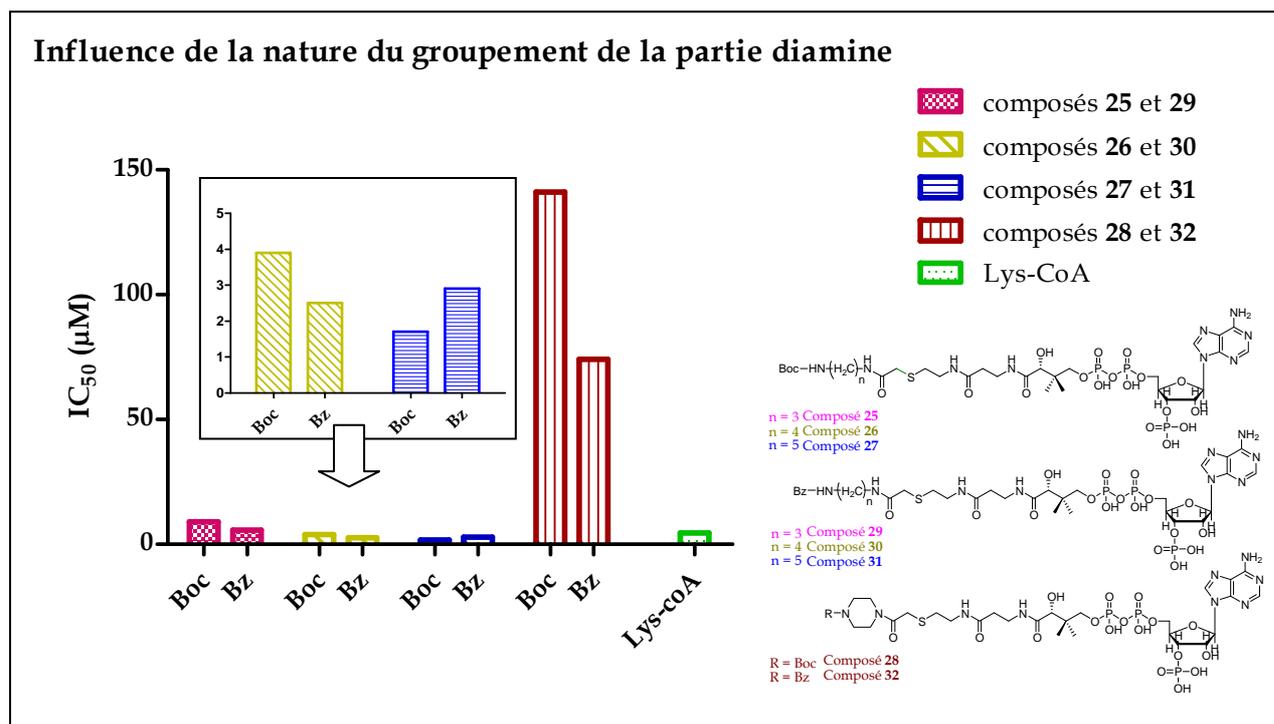


Figure 96 : Influence des groupements Boc et Bz portés par les divers composés

La tendance qui se dégage des expériences menées est que les molécules avec un groupement Bz sont de meilleurs inhibiteurs que les molécules équivalentes avec un groupement Boc :

$$29 \text{ (Bz)} > 25 \text{ (Boc)}$$

$$30 \text{ (Bz)} > 26 \text{ (Boc)}$$

$$31 \text{ (Bz)} \sim 27 \text{ (Boc)}$$

$$32 \text{ (Bz)} > 28 \text{ (Boc)}$$

Parmi ces molécules, les composés **26** ($IC_{50} = 3,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$), **30** ($IC_{50} = 2,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$) et **31** ($IC_{50} = 2,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$) sont aussi inhibiteurs que Lys-CoA ($IC_{50} = 4,6 \pm 1 \mu\text{M}$) et le composé **27** ($IC_{50} = 1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$), présente une meilleure inhibition que Lys-CoA.

De plus, l'inhibition due aux composés ne portant pas de groupement (composés **33**, **34**, **35**) se situe entre celle des composés portant un groupement Bz ou Boc (ex : IC_{50} (**25**) = $10 \pm 2 \mu\text{M}$, IC_{50} (**33**) = $6,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$, IC_{50} (**29**) = $5,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$).

Le composé **36** ($IC_{50} = 19 \pm 4 \mu\text{M}$), inversement, est meilleur que les composés **32** ($IC_{50} = 74 \pm 15 \mu\text{M}$) et **28** ($IC_{50} = 141 \pm 28 \mu\text{M}$). Dans ce dernier cas, l'ajout d'un groupement Bz ou Boc sur ces composés les rend plus encombrant et cela semble être la cause de cette perte d'efficacité.

2.3 Conclusions

En comparant les résultats obtenus pour tous les composés, certaines hypothèses peuvent être émises :

- Les composés cycliques tels que les composés **36** et **DS1** sont moins efficaces que les composés dont la partie diamine est aliphatique. Ces composés sont susceptibles d'induire une gêne stérique qui entraîne une inhibition inférieure à celle des composés **33**, **34** et **35**. Si l'augmentation du degré d'encombrement des composés **28** et **32** est liée à la perte d'efficacité observée, alors l'hypothèse d'une gêne stérique limitant l'affinité entre l'enzyme et l'inhibiteur est une explication possible.

- Le composé **27** ($IC_{50} = 1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$) est ~ 3 fois plus efficace que Lys-CoA ($IC_{50} = 4,6 \pm 1 \mu\text{M}$), et les composés **30** ($IC_{50} = 2,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$) et **31** ($IC_{50} = 2,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$) présentent une efficacité semblable à celle de Lys-CoA. Ces composés contiennent une partie diamine de 4 ou 5 carbones suivie d'un groupement Bz ou Boc. Ces données supportent l'hypothèse émise au paragraphe 2.2.2, selon laquelle une chaîne carbonée de quatre ou cinq carbones semble être un atout pour un inhibiteur.

- De plus, les groupements terminaux des composés **27**, **30** et **31** présentent une polarité variée et ceci suggère que ces composés recrutent probablement des résidus différents de ceux interagissant avec Lys-CoA, et que ces résidus participent à la stabilisation de l'inhibiteur dans le site actif. Ceci nous laisse entrevoir la grande complexité des mécanismes mis en jeu et le besoin de mieux connaître ces enzymes.

- La comparaison entre les composés avec et sans groupements terminaux (Bz ou Boc) indique que la taille des groupements étudiés n'influe pas sur le pouvoir inhibiteur (cf *Figure 96*). Toutefois, les composés avec un groupement Bz sont « meilleurs » inhibiteurs que les composés avec un groupement Boc. En regardant la *Figure 18*, on observe que les groupements acétamide et amide portés par la partie lysine de Lys-CoA prennent la forme d'un cycle. Ces groupements sont peut être orientés de façon favorable, ce qui expliquerait que les composés avec un groupement Bz soit meilleurs que les composés avec un groupement Boc.

- Les composés **26**, **29**, **30**, **31**, **33**, **34** et **35** présentent une inhibition similaire ou meilleure que celle de Lys-CoA. Or, la synthèse de ces composés est plus simple et moins coûteuse que celle de Lys-CoA. Dans le cadre de l'étude de p300, ils présentent donc un avantage par rapport à Lys-CoA. De plus, le groupement benzoyle confère un caractère hydrophobe à cette partie des molécules, alors que les composés sans groupement présentent une fonction amine libre, protonée et très hydrophile. Or, à la suite de la co-cristallisation de Lys-CoA et du domaine HAT de p300, l'équipe de Cole a mis en avant le fait que la partie lysine de Lys-CoA était logée dans une poche hydrophobe (Liu et al, 2008). L'explication à ces données réside dans la réalisation d'études complémentaires sur p300.

En résumé, des inhibiteurs plus simples que Lys-CoA ont été synthétisés et ils présentent une efficacité similaire à celle de Lys-CoA. Les composés **28**, **32**, **36** et **DS1** bien qu'étant des inhibiteurs moins efficaces, apportent des informations sur le site de liaison de p300. Enfin, les études sur les composés avec ou sans groupements sur la partie diamine des diamine-CoA indiquent que la taille du groupement porté n'influe pas de façon marquée sur l'inhibition.

3. Mesure des IC₅₀ par une méthode radioactive

Dans la suite des expériences, le comportement des effecteurs vis-à-vis de p300 et de PCAF va être étudié. Pour cela, les conditions utilisées lors de la détermination des IC₅₀ avec p300 doivent être les mêmes pour PCAF. Or, la méthode au DTNB requiert une quantité d'enzyme dont nous ne disposons pas pour mesurer les IC₅₀ avec PCAF. De ce fait, les IC₅₀ mesurées en présence de p300 vont être déterminées par une méthode radioactive plus sensible, donc nécessitant moins d'enzyme (et des concentrations en substrat différentes) et qui pourra être appliquée à PCAF.

Le principe est le même que celui des expériences réalisées au DTNB. Une première expérience est réalisée sans inhibiteur et correspondra à 100% d'activité enzymatique. Puis, les expériences sont effectuées avec des quantités croissantes d'inhibiteurs et les valeurs d'IC₅₀ sont obtenues après régression non linéaire (logiciel GraphPad Prism5) des courbes d'inhibition. Les tests sont réalisés dans un milieu réactionnel qui se compose du tampon

IPH (pH 8), d' [³H]acétylcoenzyme A, de peptide H4-8 et de p300 (1284-1673). La réaction est initiée par ajout d' [³H]acétylcoenzyme A et se déroule à 30°C.

Les valeurs d'IC₅₀ obtenues par la méthode radioactive (*Figure 97*), globalement, présentent un profil d'efficacité semblable à celui obtenu par la méthode au DTNB. En effet, le profil d'inhibition établit selon la nature de la partie diamine des diamines-CoA et selon la nature du groupement porté par la diamine-CoA est le même pour les deux méthodes.

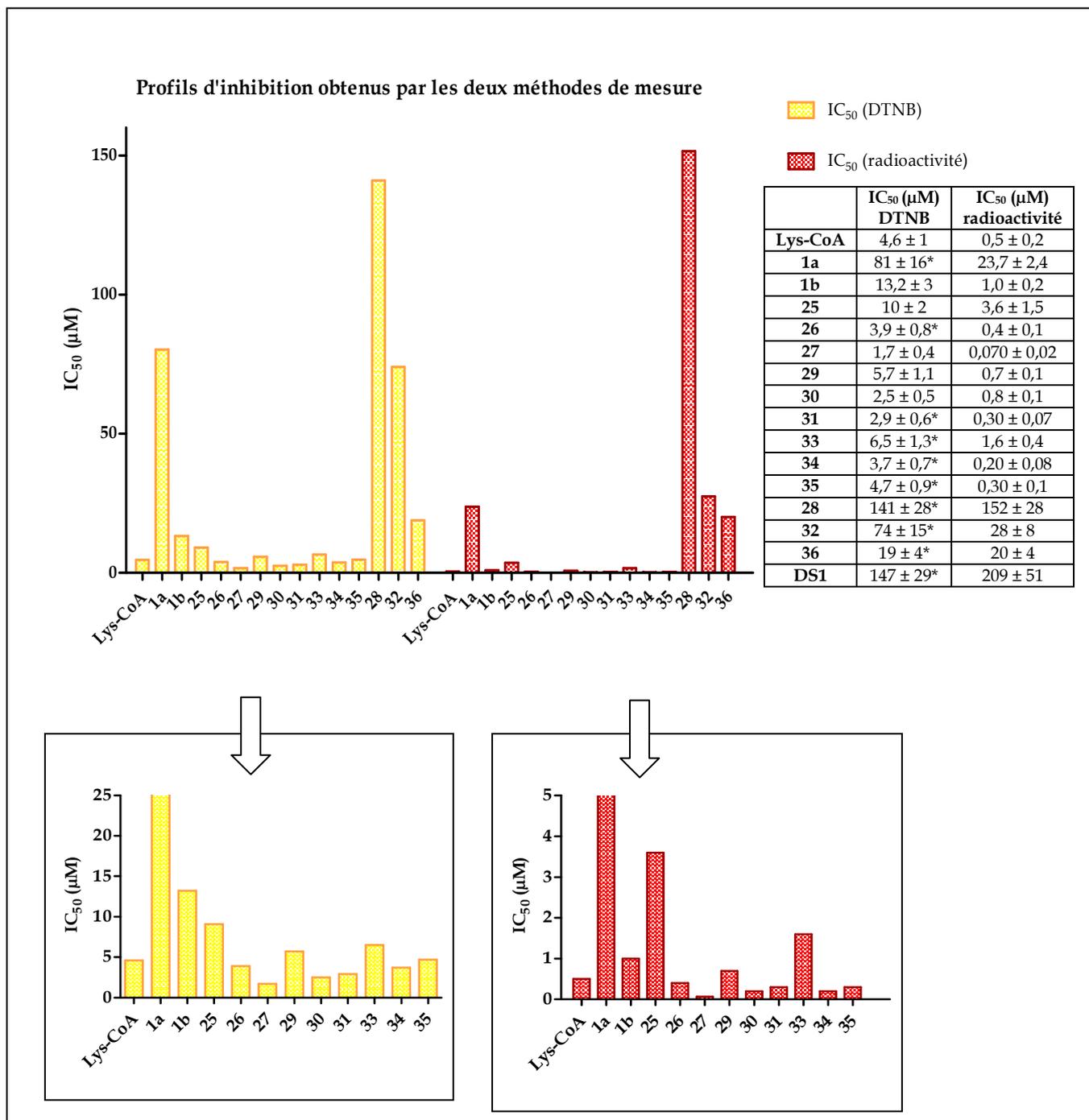


Figure 97 : Représentation graphique des valeurs d'IC₅₀ obtenues par la méthode au DTNB et par la méthode radioactive (*valeurs déterminées graphiquement à partir des courbes d'inhibition, tests réalisés avec H4-8 267 µM, l'AcétylCoA 2 µM et p300 296 nM)

D'autres part, des composés synthétisés au sein du laboratoire ont également été testés (Saoupya, 2007, Dr. Lherbet, LSPCMIB, université Toulouse III, Figure 98). Il s'agit de molécules conçues suivant la stratégie de synthèse utilisée pour les composés cycliques (cf

chapitre II). De plus **CLI.46** porte un groupement azoture photoactivable pouvant se lier de façon irréversible à l'enzyme après irradiation. Les résultats obtenus pour ces composés sont représentés dans la Figure 98.

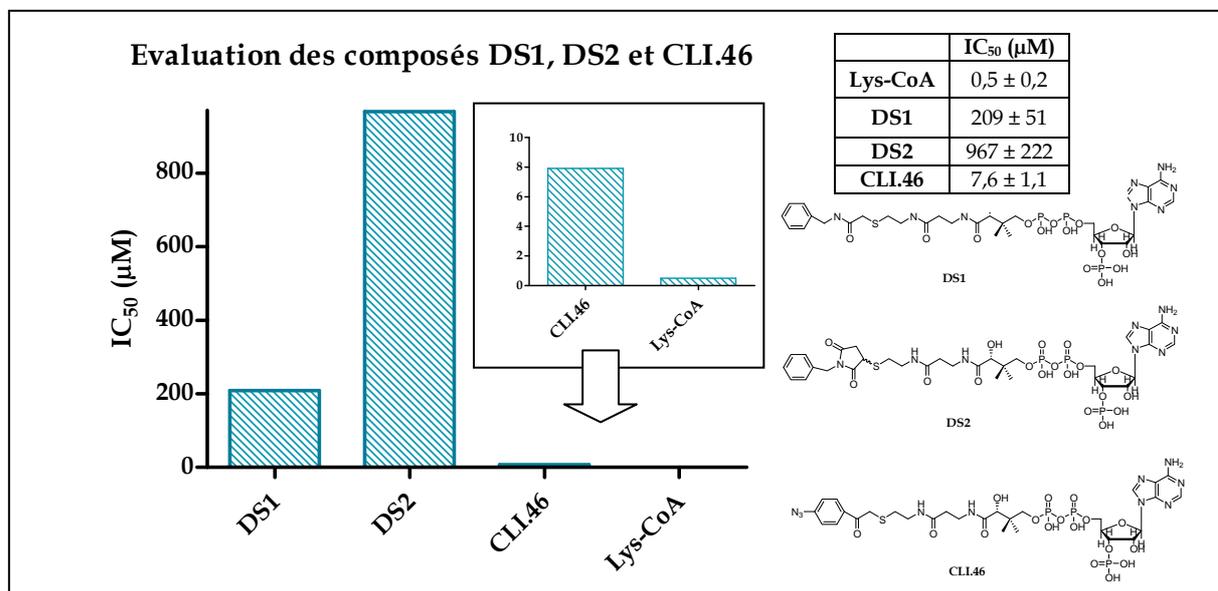


Figure 98 : Résultats d'inhibition par les composés **DS1**, **DS2** et **CLI.46**

Ces résultats supportent l'interprétation faite à la section 1.2.2. Comme précédemment, les composés cycliques (**DS1** et **DS2**) sont des inhibiteurs moins performants comparativement aux autres composés. De façon surprenante, le composé **CLI.46** conduit à une bonne inhibition de p300.

II. Évaluation de l'inhibition de PCAF (1-832)

1. Mesure des IC₅₀

A partir de l'étude menée précédemment, certaines molécules ont été sélectionnées et testées contre PCAF. Comme précédemment, la méthode utilisée emploie la radioactivité. Le test est réalisé dans un milieu réactionnel qui se compose du tampon IPH (pH 8), de [³H]acétylcoenzyme A, de peptide H3-19 (résidus 1 à 19 de la partie N-terminale de l'histone

H3, Ac-QTAR⁹KSTGG¹⁴KAPR¹⁸KQLAT²³K-NH₂) et de PCAF (1-832). La réaction est initiée par ajout de [³H]acétylcoenzyme A et se déroule à 30°C. Lys-CoA sert de référence et les molécules retenues pour cette étude sont les composés **27,31, 36** et **DS1** ; soit un composé avec un groupement Boc, un composé avec un groupement benzoyle, deux composés cycliques dont un est un des inhibiteurs les moins efficaces de p300 (1284-1673). Les profils des courbes d'inhibition à partir desquelles sont calculées les IC₅₀ sont présentés Figure 99 et les valeurs d'IC₅₀ sont données dans la Figure 100.

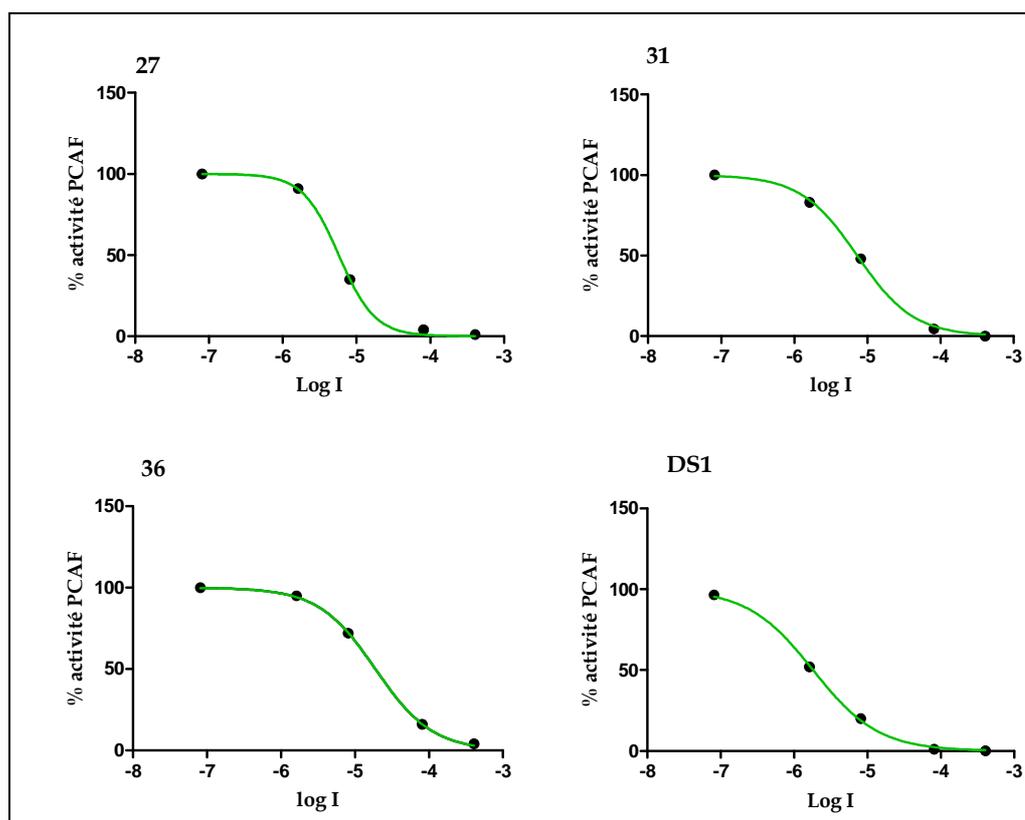


Figure 99 : Courbes d'inhibition de PCAF (en abscisse : log de la concentration en mol.L⁻¹ de l'inhibiteur, en ordonné : l'activité enzymatique résiduelle de PCAF mesurée par rapport au témoin sans inhibiteur)

2. Analyse des résultats

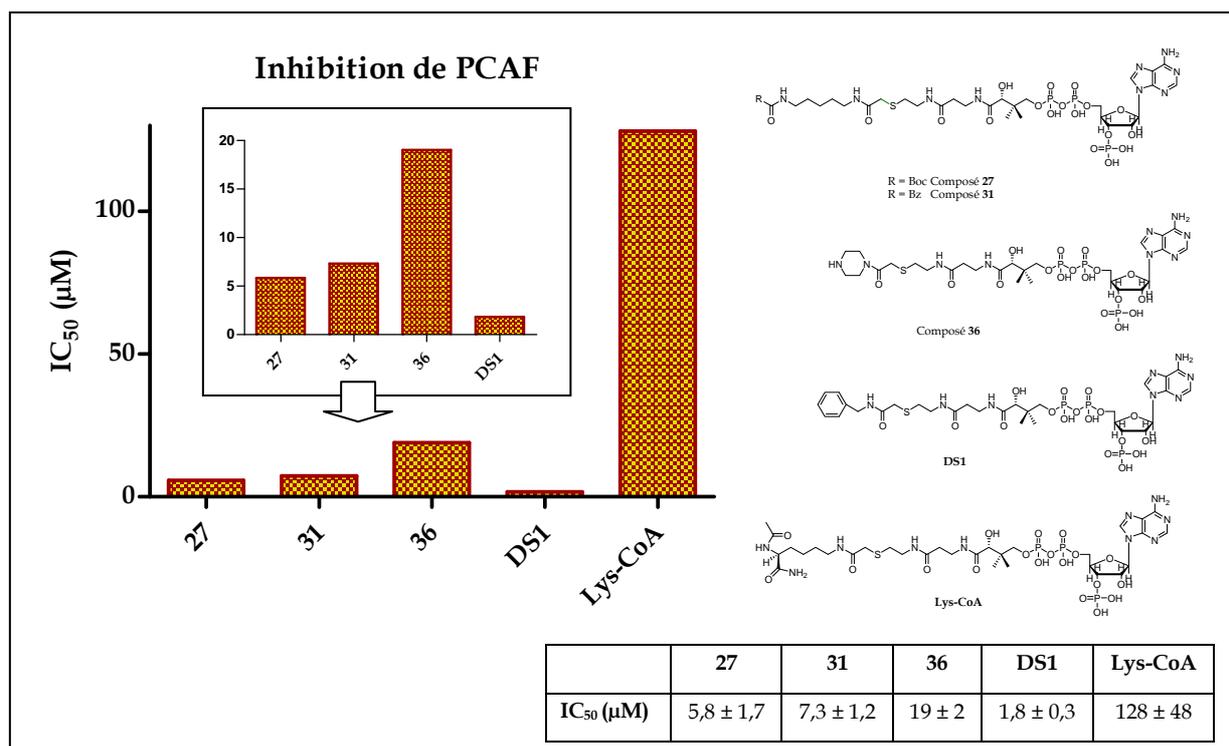
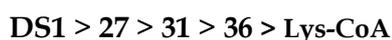


Figure 100 : Valeurs d'IC₅₀ (en μM) déterminées avec PCAF (1-832, 144 nM) et H3-19 comme substrat (50 μM) (Tests réalisés avec 2 μM d'acétylCoA)

Le composé de référence, Lys-CoA n'est pas un bon inhibiteur de PCAF, comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Zheng et al, 2004).

Le classement de ces inhibiteurs en fonction de leur efficacité est le suivant :



Les composés **27** et **31** sont de bons inhibiteurs de PCAF mais c'est **DS1** qui s'avère être le meilleur des composés testés. Comme pour p300, la nature du groupement (Boc ou Bz) porté par la partie diamine des effecteurs a peu d'influence sur l'inhibition de PCAF. Le composé **36** présente une inhibition similaire pour p300 et PCAF.

3. Conclusions

De ces expériences, il ressort que :

- Le composé **DS1** s'avère être un inhibiteur puissant et sélectif de PCAF. Il est intéressant de remarquer que sa structure est très différente de celle de H3-CoA-20, inhibiteur puissant de PCAF (Lau et al, 2000b; Zheng et al, 2004).
- Les composés **27** et **31** sont sélectifs de p300 par rapport à PCAF.
- De plus, le composé **36** est plus hydrophile que **DS1** et cette différence se traduit par une perte d'efficacité d'un facteur 10, on peut supposer que ce paramètre est essentiel pour qu'un inhibiteur de PCAF soit efficace.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les histones acétyltransférases sont des co-activateurs transcriptionnels essentielles à la régulation d'une grande variété de facteurs de transcription. Elles interviennent dans plusieurs processus cellulaires et la dérégulation de ces enzymes est impliquée dans un grand nombre de maladies. L'histone acétyltransférase p300 a été la cible principale de ce travail d'étude. Dans le but d'inhiber cette enzyme, responsable de divers cancers notamment, une stratégie de synthèse basée sur le concept d'inhibiteur de type bi-substrat a été élaborée. Des spermidine-CoA (**1a** et **1b**), inhibiteurs de l'activité histone acétyltransférase, ont été synthétisés afin d'approfondir les recherches déjà réalisées par Roblot et al. De plus, 12 nouveaux inhibiteurs de type bi-substrat ont été réalisés. Ces molécules comportent une partie diamine, dont la fonction amine est soit libre soit porteuse d'un groupement Boc ou Bz, liée par un pont carboxyméthylène au coenzyme A. Les différentes étapes de synthèse menant à ces composés ont été détaillées dans le chapitre II. Un inhibiteur de référence, Lys-CoA a également été produit. L'enzyme cible, p300 a été produite mais les faibles quantités obtenues n'ont pas permis son utilisation. De plus, afin d'établir si ces composés présentaient une spécificité vis-à-vis de p300, certains d'entre eux ont été testés sur une autre HAT, PCAF, produite au sein du laboratoire.

Les résultats obtenus ont montré que 7 inhibiteurs (composés **26**, **29**, **30**, **31**, **34**, **33**, **35**) ont une efficacité équivalente, voire supérieure, à celle de Lys-CoA, inhibiteur de référence de p300 et le meilleur connu à ce jour. Ces molécules de type bi-substrat présentent à leurs extrémités soit un groupement Bz soit un groupement Boc soit une fonction amine libre.

D'autre part, les inhibiteurs **33** et **34** ont une structure plus simple que celle de Lys-CoA et sont aussi efficaces que ce dernier. Dans l'ensemble, ces inhibiteurs (composés **26**, **29**, **30**, **31**, **34**, **33**, **35**) sont plus facilement accessibles par la synthèse que Lys-CoA et nécessitent des produits de base moins complexes et commercialement disponibles.

Le composé **27** est l'inhibiteur le plus efficace de tous les composés réalisés dans le cadre de ces travaux de recherche, et il est également plus efficace que Lys-CoA. L'étude comparative d'une sélection d'effecteurs testés sur p300 et PCAF démontre une nette préférence des inhibiteurs **27** et **31** pour p300 et une inhibition par **DS1** dirigée sélectivement sur PCAF. Ces résultats étant encourageants, l'évaluation des autres composés avec PCAF pourrait être envisagée. De plus, l'étude de ces composés pourrait s'étendre à d'autres HATs et notamment aux HATs de parasites tels que *Trypanosoma cruzi* et *Plasmodium falciparum*.

Enfin, les spermidine-CoA **1a** et **1b**, initialement étudiées par Cullis et Wolfenden ont été testées sur p300. Il a été établi que **1b** inhibe plus efficacement l'acétylation de H4-8

catalysée par p300 que **1a**. Cullis et Wolfenden (Cullis et al, 1982) ont émis l'hypothèse que ces composés visaient probablement les enzymes acétylant les histones H2A et H2B. Or, p300 acétyle les 4 histones. **1a** ayant montré une efficacité moyenne vis-à-vis de p300, et Cullis et Wolfenden ayant montré que **1a** et **1b** inhibent efficacement l'acétylation de H2A et de H2B, on peut supposer que ces composés ont une préférence pour d'autres HATs, plus spécifiques des histones H2A et H2B. En outre, les composés **1a** et **1b** adoptent un comportement d'inhibition similaire vis-à-vis de la chromatine (données non publiées fournies par le Dr. Martin et le Pr. Parello).

Récemment, au sein du consortium, des expériences réalisées avec les composés **1a** et **1b** ont permis de montrer que bien que ces composés manifestent un effet inhibiteur très faible vis-à-vis de la croissance cellulaire, dans le cas de cellules cancéreuses en culture, il a été établi que **1a** pénètre la membrane cellulaire et induit un arrêt transitoire de la synthèse de l'ADN (Bandyopadhyay et al, manuscrit soumis pour publication ; études réalisées au laboratoire du Dr. Ruth Gjerset, Centre de Cancérologie Sidney Kimmel, San Diego). A cela s'ajoute le fait que **1a** fragilise ces mêmes cellules cancéreuses, rendant celles-ci plus sensibles à certains composés utilisés dans des traitements anticancéreux existants, comme le cisplatine, le 5-fluorouracil et la camptothécine (Bandyopadhyay et al, op.cit.), sans qu'apparemment la spermidine-CoA **1a** sensibilise les cellules normales traitées dans les mêmes conditions (Bandyopadhyay et Gjerset : communication personnelle). Certains composés synthétisés durant cette thèse, notamment la diamine-CoA **33** et la pipérazine-CoA **36**, manifestent, d'une façon semblable, un effet sensibilisateur aux mêmes drogues anticancéreuses (Bandyopadhyay et Gjerset : communication personnelle). Toutefois, on remarquera que les composés **33** et **36**, un composé aliphatique et un composé cyclique de la série diamine-CoA, respectivement, s'ils présentent de tels effets de sensibilisation, comme dans le cas de spermidine-CoA **1a**, n'en demeurent pas moins nettement inférieurs au composé **1a** (Bandyopadhyay et Gjerset : communication personnelle). Ces observations nous amènent à nous demander si les autres diamines-CoA synthétisées durant cette thèse auront les mêmes propriétés. En effet, la pénétration de la membrane cellulaire est le facteur limitant de la plupart des inhibiteurs existants. Or, si la spermidine-CoA **1a** pénètre la membrane cellulaire, il est fort possible que des composés tels que les autres inhibiteurs synthétisés dans cette thèse puissent aussi franchir la membrane cellulaire. Une étude approfondie des propriétés de ces molécules constitue une prochaine étape dans ce travail d'étude.

De plus, le concept d'inhibiteur bi-substrat, initialement proposé par Cullis et Wolfenden en 1982, trouve ici un développement avec des inhibiteurs efficaces de p300 mais aussi de PCAF, deux HATs appartenant à deux familles différentes.

On peut également remarquer qu'il est difficile de rendre totalement compte, à partir de systèmes isolés (fragment d'enzyme recombinante et peptide de synthèse), de la complexité des phénomènes mis en jeu lors d'inhibition de l'acétylation des histones.

Ce travail de recherche a donc abouti à la découverte de nouveaux inhibiteurs de p300, plus simples et aussi efficaces que Lys-CoA. Il faut surtout retenir que le composé **27** présente une efficacité supérieure à celle de Lys-CoA. Les spermidine-CoA, les 12 nouveaux inhibiteurs et **DS1** présentent des propriétés uniques et innovantes. Ces composés pourront servir de base pour l'élaboration d'inhibiteurs plus efficaces et spécifiques, afin de mieux comprendre le rôle biologique de cette enzyme et ainsi développer de nouvelles approches pour la conception de stratégies thérapeutiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES : CHIMIE

Indications générales

Solvants

Les solvants utilisés (tétrahydrofurane THF, Dichlorométhane CH₂Cl₂, diméthylformamide DMF, méthanol MeOH) ont été distillés et rendus anhydres selon les méthodes décrites par D.D.Perrinet W.L.F. Amarego, Purification of laboratory chemicals, Pergamon Press, London, 1988.

Réactifs

Les produits nécessaires aux synthèses ont été fournis par Sigma-Aldrich, Fluka et Alfa-Aesar. La résine amide (rink amide™ 200-400 mesh, 0,68 mmoles/g) et le peptide Fmoc-Lys(Dde)OH ont été achetés chez Novabiochem. Le coenzyme A (sel de sodium ou de trilithium) a été commandé chez Sigma et Calbiochem.

Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse sont réalisés au service commun de spectrométrie de masse de l'université Paul SABATIER (Toulouse), sur un appareil TSQ 7000 thermoelectron pour l'ionisation chimique DCI/NH₃ et sur un appareil API 365 Perkin-Elmer Sciex ou Applied biosystems pour l'ionisation par électrospray.

Chromatographie sur couche mince

Des plaques d'aluminium recouvertes de silice (MERCK 60-F₂₅₄) ont été utilisées pour déterminer l'avancement des réactions, les rapports frontaux (Rf) et les conditions de purification sur colonne ouverte ou flash. Les révélations sont faites à la ninhydrine (solution dans l'éthanol) pour les dérivés aminés ou par irradiation UV à 254 nm pour les molécules possédant des groupements chromophores.

Chromatographie sur colonne ouverte

Les purifications sont réalisées avec de la silice normale (SDS, 60 Å, 70-200 µm) ou fine (60 Å, 35-70 µm). Les colonnes utilisées ont un diamètre de 1 ou 2 centimètres et une hauteur de 40 cm.

Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les purifications sont effectuées sur une chaîne CLHP composée d'une pompe (Waters 600), d'un injecteur (Waters™ 717 plus autosampler) et d'un détecteur à barrette de diode (Waters 996).

Les conditions de purifications sont déterminées à l'aide d'une colonne analytique en phase inverse C18 Hyperprep 250 x 4,6 mm, 12 µ, avec un débit de 1 mL/min, le détecteur opérant à 260 et 254 nm. Les gradients sont réalisés sur 30 min.

Les purifications ont été effectuées à l'aide d'une colonne préparative en phase inverse C18 Hyperprep 250 x 21 mm, 8 µ, avec un débit de 15 mL/min à une longueur d'onde dépendante du produit. L'éluant utilisé est composé d'acide trifluoroacétique TFA à 0,05% dans l'eau et d'acétonitrile CH₃CN. Les gradients sont également réalisés sur 30 min.

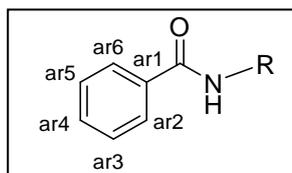
Spectroscopie RMN

Les expériences de RMN sont réalisées avec un appareil Brüker Avance 300 MHz.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane comme signal de référence.

Les constantes de couplages J sont en Hz et la multiplicité des signaux est signalée par les lettres *s* (singulet), *d* (doublet), *dd* (doublet dédoublé), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *qt* (quintuplet), *m* (multiplet). Les carbones quaternaires seront signalés par C_q et la notation C_{qA} sera utilisée pour les carbones quaternaires de la partie adénosine des molécules couplées au coenzyme A.

Pour les dérivés aromatiques, le cycle a été numéroté de la façon suivante :



Cette numérotation apparaîtra pour les composés **14-16** puis l'abréviation Bz sera utilisée.

Lyophilisateur

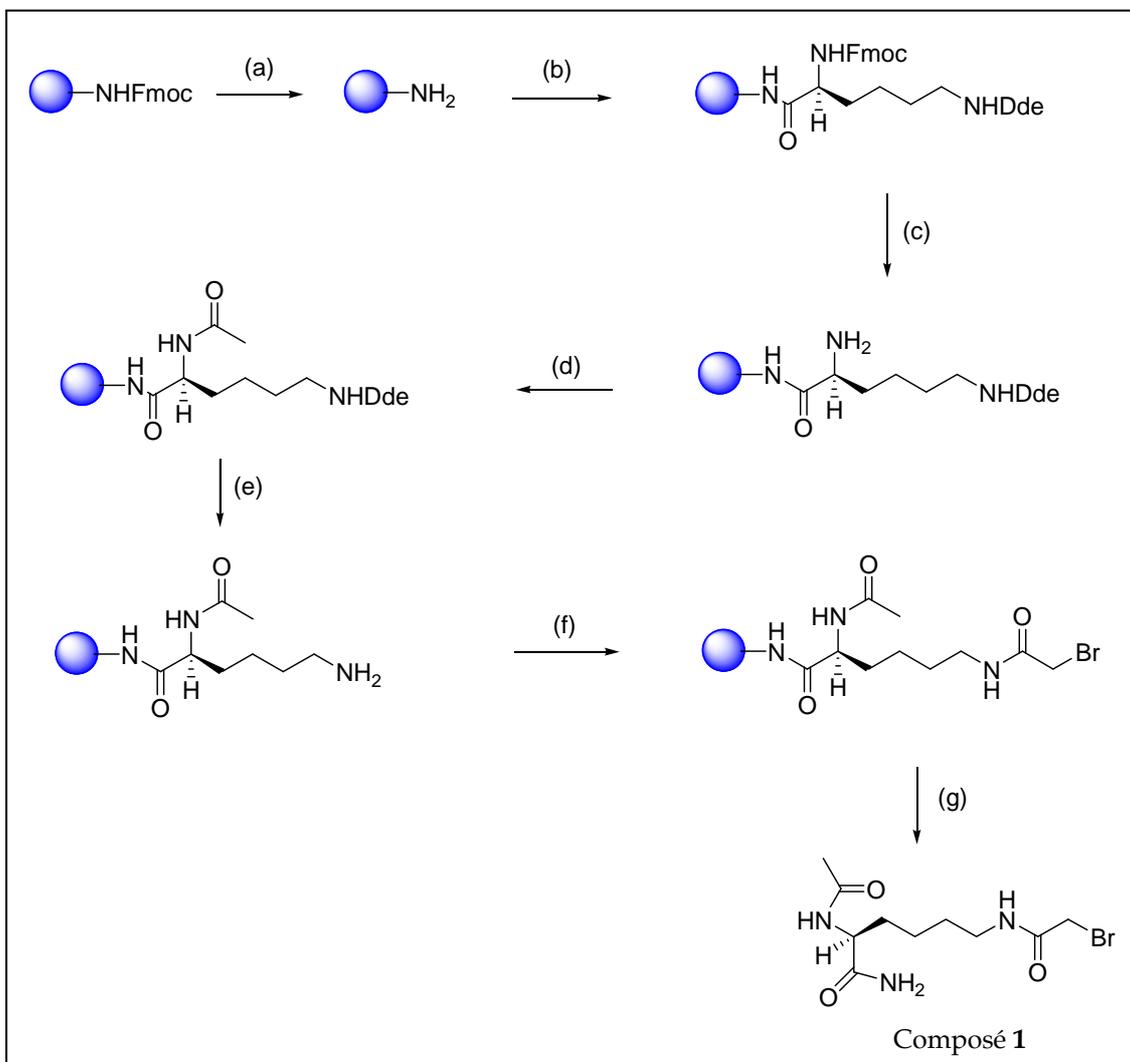
Les produits des réactions réalisées dans l'eau ont été lyophilisés avec un appareil Edwards.

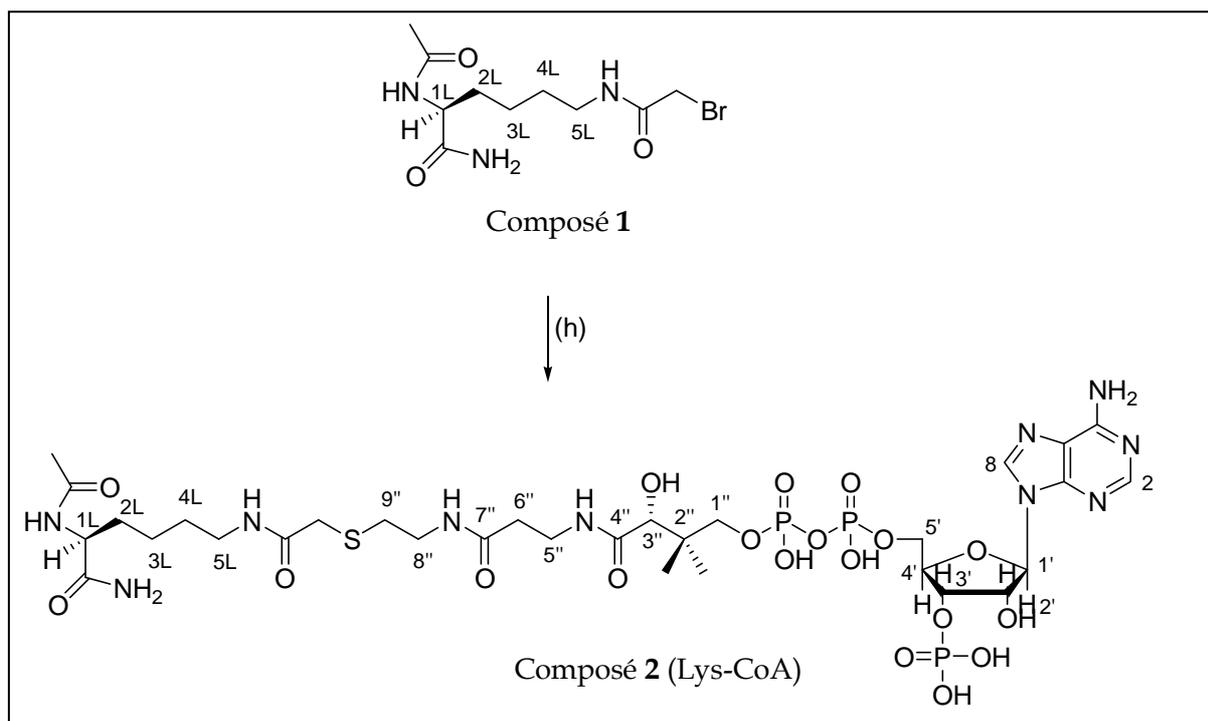
Filtration

Certaines filtrations ont été faites sur silice (SDS, 60Å, 70-200 µm) ou sur Celite (SDS, Celite 545).

Synthèse de Lys-CoA

Cette synthèse est réalisée à partir d'un protocole établi par Cebrat et al. (Cebrat et al, 2003), partiellement effectuée sur support solide et suit le schéma suivant :





(a) La résine amide (0,57 g, 1 éq, taux de substitution : 0,68 mmoles/g) est placée dans un réacteur et est gonflée avec 5 mL de CH_2Cl_2 puis déprotégée par 1 mL d'une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF pendant 5 min. La résine est lavée 2 fois au N-méthylpyrrolidinone (NMP) puis 3 fois au DMF. La résine est mise en contact de nouveau avec 1 mL de solution de pipéridine à 20 % dans le DMF, pendant 30 min. La résine est ensuite lavée 3 fois au DMF avant de passer à l'étape suivante.

(b) L'acide aminé Fmoc-Lys(Dde)OH (0,57 g, 1,07 mmoles, 3 éq) est solubilisé dans une solution de N-méthylmorpholine (NMM) à 0,4 M dans le DMF. Du Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (0,47 g, 1,07 mmoles, 3 éq) et du N-hydroxybenzotriazole (HOBT) (0,14 g, 1,07 mmoles, 3 éq) sont ajoutés à cette solution et le mélange obtenu est mis en contact avec la résine. Le réacteur est agité la nuit.

(c) La résine est lavée 3 fois au DMF puis le groupement 9-fluorénylméthoxycarbone (Fmoc) est enlevé par 2 traitements à la pipéridine (5 min puis 30 min, solution à 20% dans le DMF). La résine est lavée 3 fois au DMF avant de passer à l'étape suivante.

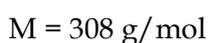
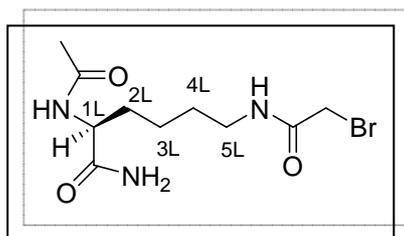
(d) Une solution d'anhydride acétique (0,4 M) et de NMM (0,4 M) dans le DMF est préparée. La fonction amine ainsi libérée est acétylée par ajout de cette solution. La réaction dure la nuit sous agitation.

(e) La résine est lavée 3 fois au DMF et le groupement (4,4-diméthyl-2, 6-dioxocyclohexylidène)éthyle (Dde) est clivé à l'aide d'une solution d'hydrazine à 2% dans le DMF. La réaction a lieu avec un minimum de solution d'hydrazine, 2h sous agitation.

(f) De l'acide bromoacétique (0,25 g, 1,80 mmoles, 5 éq), du (DIC) (0,28 mL, 1,80 mmoles, 5 éq) sont solubilisés dans un minimum de DMF. Cette solution est ajoutée à la résine préalablement lavée. La réaction de couplage dure la nuit.

(g) Le composé **1** est clivé de la résine par traitement avec une solution d'acide trifluoroacétique (TFA 95%), d'eau (2,5%) et de triisopropylsilane (TIS) (2,5%), sous agitation pendant 3 h. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat est récupéré. Ce dernier est lyophilisé et donne le composé **1** brut. Ce composé est purifié par CLHP (gradient linéaire, 0,14 g, t_R = 12,22 min).

Composé **1** 6-(2-bromoacétamido)-2-acétamidohexanamide



Condition de purification : TFA 0,05 % / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 42%

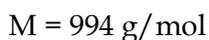
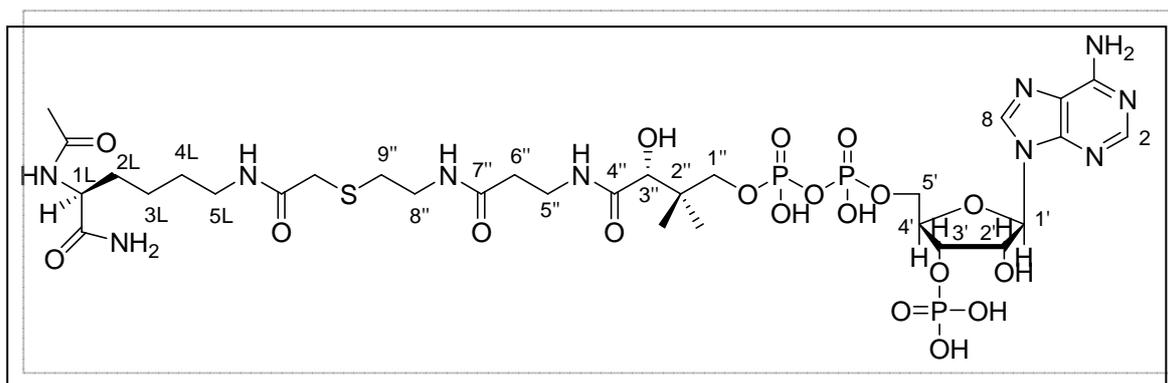
RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

1,38 (m, 2H, H_{3L}), 1,52 (m, 2H, H_{4L}), 1,73 (m, 2H, H_{2L}), 2,02 (s, 3H, Me), 3,20 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{5L}), 3,86 (s, 2H, CH₂Br), 4,19 (m, 1H, H_{1L})

(h) Le composé **1** (39,00 mg, 0,13 mmoles, 2 éq) est solubilisé dans 1 mL de MeOH. Une solution de coenzyme A (50,00 mg, 0,06 mmoles, 1 éq) dans 3,7 mL d'eau est amené à pH 8

avec de la soude à 1M. Cette solution est ajoutée à la solution du composé et le milieu réactionnel est agité la nuit. Le milieu est extrait au CH₂Cl₂ (5 x 10 mL) puis la phase aqueuse est lyophilisée pour donner le composé **2** (81,00 mg). Après purification par CLHP (gradient linéaire) le composé **2** est obtenu pur (4,00 mg, $t_R = 14,92$) sous forme d'une poudre blanche.

Composé 2 Lys-CoA



Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 3%

SM : (ESI, m/z) 993,5 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,85 (s, 3H, Me), 0,97 (s, 3H, Me), 1,41 (m, 2H, H_{3L}), 1,55 (m, 2H, H_{4L}), 1,75 (m, 2H, H_{2L}), 2,05 (s, 3H, Me), 2,50 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{6''}), 2,70 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{9''}), 3,22 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, H_{5L}), 3,28 (s, 2H, CH₂S), 3,39 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{8''}), 3,50 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,4 Hz, H_{5''}), 3,65 (m, 1H, H_{1''}), 3,90 (m, 1H, H_{1''}), 4,05 (s, 1H, H_{3''}), 4,21 (m, 2H, H_{1L}), 4,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,63 (m, 1H, H_{4'}), 4,92 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,25 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, H_{5'}), 8,47 (s, 1H, H₂), 8,70 (s, 1H, H₈)

Synthèse des inhibiteurs N¹-[2-(S-coenzyme A)acétyl] spermidine amide (1a) et de la N⁸-[2-(S-coenzyme A)acétyl] spermidine amide (1b)

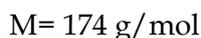
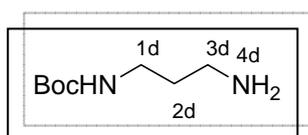
Cette synthèse a été réalisée selon le protocole de Roblot et al. (Roblot et al, 1993), seule l'étape 5, d'acylation de la fonction amine libre, diffère.

□ Etape 1 : Monoprotection d'une fonction amine par le groupement Boc

Synthèse du composé 3 (= composé 10)

A une solution de 1,3-propanediamine commerciale (15,00 g, 0,20 moles, 8 éq) dans 120 mL de 1,4-dioxane est additionnée, à T° ambiante sous courant d'argon et au goutte à goutte, une solution de diterbutyloxycarbonyle (Boc₂O) (5,40 g, 24,74 mmoles, 1 éq) dans 120 mL de dioxane. Une fois le goutte à goutte terminé, l'agitation est maintenue pendant 15 h. Le solvant est évaporé et la diamine diprotégée est précipitée par ajout de 50 mL d'eau distillée. La solution obtenue est filtrée et le filtrat est extrait avec 3 x 40 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium (MgSO₄) puis concentrée pour donner 3,04 g de composé 3, une huile jaune clair.

Composé 3 tert-butyl-3-aminopropylcarbamate



Rdt : 70%

Rf : 0,10 (MeOH / AcOEt 4/6)

SM : (ESI, m/z) 175,2 (M+H)⁺

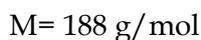
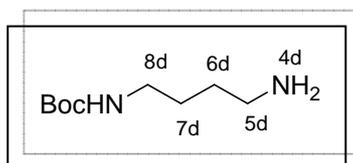
RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

1,36 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,54 (qt, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$ Hz, 2H, $\text{H}_{2\text{d}}$), 1,72 (s, 2H, NH_2), 2,67 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$ Hz, 2H, $\text{H}_{3\text{d}}$), 3,11 (m, 2H, $\text{H}_{1\text{d}}$), 5,62 (s, 1H, NH_{Boc})

Synthèse du composé 3' (= composé 11)

La synthèse de ce composé est semblable à celle du composé 3. La diamine utilisée, la putrescine (9,10 g, 0,10 moles, 8 éq), est solubilisée dans 60 mL de 1,4-dioxanne. Le Boc_2O (2,82 g, 12,92 mmoles, 1 éq) utilisé est également mis en solution dans 60 mL de 1,4 dioxanne. 1,32 g de composé 3', une huile jaune clair sont obtenus.

Composé 3' tert-butyl-4-aminobutylcarbamate



Rdt : 54%

Rf : 0,10 (MeOH / AcOEt 3/7)

SM : (ESI, m/z) 189,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

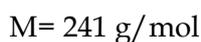
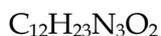
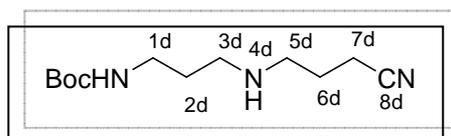
1,33-1,48 (m, 15H, Me_{Boc} $\text{H}_{6\text{d}}$ $\text{H}_{7\text{d}}$), 2,63 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$ Hz, 2H, $\text{H}_{5\text{d}}$), 3,05 (m, 2H, $\text{H}_{8\text{d}}$), 4,64 (s, 1H, NH_{Boc})

□ Etape 2 : Alkylation de la fonction amine primaire

Synthèse du composé 4

Sous argon, à une solution du composé **3** (3,04 g, 17,47 mmol, 1 éq) dans 70 mL de CH₃CN anhydre, sont ajoutées 5,20 g de Na₂CO₃, 3,80 g de KI et du 4-chlorobutyronitrile (2 mL, 0,02 mol, 1,2 éq). Ce mélange est chauffé à reflux pendant 6h. Les sels sont éliminés par filtration sur fritté. Le filtrat est ensuite concentré, puis repris dans 25 mL de CH₂Cl₂. Cette solution est lavée 3 fois à l'eau (3 x 20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée sous pression réduite et conduit à 3,05 g de composé **4**, une huile jaune clair.

Composé 4 tert-butyl 3-(3-cyanopropylamino)propylcarbamate



Rdt : 72%

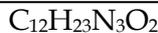
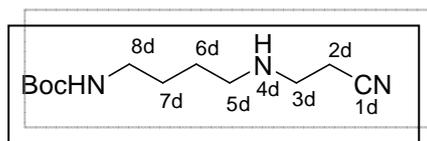
Rf : 0,41 (MeOH / AcOEt 4/6)

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,38 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,72 (m, 4H, H_{2d} H_{6d}), 2,36 (m, 4H, H_{3d} H_{5d}), 2,47 (t, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, 2H, H_{7d}), 3,06 (m, 2H, H_{1d}), 4,58 (s, 1H, NH_{Boc})

Synthèse du composé 4'

Sous argon, à une solution du composé **3'** (1,32 g, 7,02 mmol, 1 éq) dans 30 mL de MeOH anhydre est ajoutée au goutte à goutte une solution d'acrylonitrile (0,5 mL, 7,54 mmol, ~1 éq) dans 40 mL de MeOH anhydre. Ce mélange est agité la nuit à T° ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu (1,69 g), une huile jaune clair, ainsi obtenu est utilisé pour la synthèse du composé **5'**.

Composé 4' tert-butyl 4-(2-cyanoethylamino)butylcarbamate

$$M = 241 \text{ g/mol}$$

Rdt : 100%

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

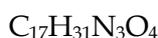
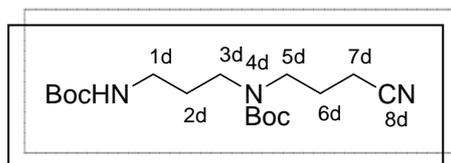
1,38 (s, 9H, Me_{Boc}) , 1,46 (m, 4H, $\text{H}_{6\text{d}}$ $\text{H}_{7\text{d}}$) , 2,46 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ Hz, 2H, $\text{H}_{2\text{d}}$), 2,60 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$ Hz, 2H, $\text{H}_{5\text{d}}$), 2,86 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ Hz, 2H, $\text{H}_{3\text{d}}$), 3,06 (m, 2H, $\text{H}_{8\text{d}}$), 4,67 (s, 1H, NH_{Boc})

□ **Etape 3 : Protection de la fonction amine secondaire par le groupement Boc**

Synthèse du composé 5

Une solution du composé 4 (3,05 g, 12,66 mmol, 1 éq) dans le 1,4-dioxane (55 mL) est préparée, et une solution de Boc_2O (3,40 g, 15,58 mmol, 1,2 éq) dans le 1,4-dioxane (30 mL) y est ajoutée, au goutte à goutte sous argon. A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est agité pendant 15 h. Le solvant est évaporé et le résidu repris dans 30 mL de CH_2Cl_2 . Cette phase organique est lavée 3 fois à l'eau (3 x 25 mL), séchée sur MgSO_4 puis concentrée. Le brut réactionnel (4,66 g) est purifié sur colonne ouverte de silice et 1,48 g de composé 5 sont obtenus, sous forme d'une huile rose.

Composé 5 N^1, N^3 -di-ter-butylloxycarbonyl- N^3 -(3-cyanopropyl)-1,3-diaminopropane



$$M = 341 \text{ g/mol}$$

Condition de purification : silice 35-70 μm , EP / AcOEt 8/2

Rdt : 34 %

Rf : 0,22 (EP/ AcOEt 8/2)

SM : (ESI, m/z) 342,2 (M+H)⁺

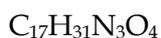
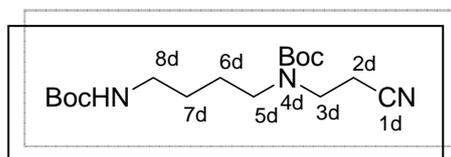
RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,37 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,41 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,61 (m, 2H, H_{2d}), 1,82 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, H_{6d}), 2,29 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, H_{7d}), 3,04 (m, 2H, H_{1d}), 3,21 (m, 4H, H_{3d} H_{5d}), 4,70 (s, 1H, NH_{Boc})

Synthèse du composé 5'

Le mode opératoire est similaire à celui du composé 5, réalisé avec le composé 4' (1,69 g, 7,01 mmoles, 1 équ) et du Boc₂O (1,83 g, 8,38 mmoles, 1,2 équ). Le composé 5' brut (2,36 g) est purifié sur colonne de silice et procure 1,39 g de composé 5' sous forme d'une huile marron clair.

Composé 5' N⁴,N⁸-di-ter-butylloxycarbonylN⁴-(2-cyanoéthyl)1,4-diaminobutane



M = 341 g/mol

Condition de purification : silice 35-70 μm EP / AcOEt 7/3

Rdt : 58%

Rf : 0,15 (EP/ AcOEt 7/3)

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

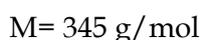
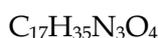
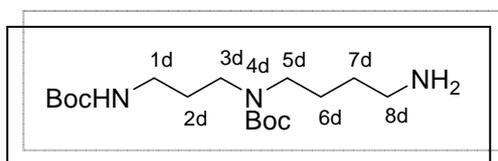
1,38 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,41 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,42-1,60 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 2,54 (m, 2H, H_{2d}), 3,07 (m, 2H, H_{8d}), 3,22 (m, 2H, H_{5d}), 3,40 (t, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, 2H, H_{3d}), 4,51 (s, 1H, NH_{Boc})

□ Etape 4 : Hydrogénation catalysée de la fonction nitrile

Synthèse du composé 6

Le composé **5** (1,48 g, 4,34 mmoles) est placé dans un ballon avec du MeOH (40 mL), de la soude 1 M (2 mL), et quelques gouttes d'une solution de Ni de Raney en suspension dans l'eau. L'air est chassé par de l'argon puis celui-ci est chassé par de l'hydrogène en effectuant plusieurs cycles vide/hydrogène. Le milieu est agité la nuit puis filtré sur celite. La celite est lavée au MeOH et le filtrat est concentré sous vide et donne une huile jaune (1,07 g).

Composé 6 N¹,N⁴-di-ter-butylloxycarbonylspermidine



Rdt : 71%

Rf : 0,15 (AcOEt/ MeOH 6/4)

SM : (ESI, m/z) 346,6 (M+H)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

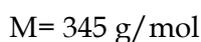
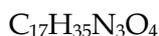
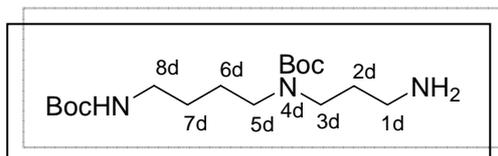
1,43-1,45 (2s, 18H, Me_{Boc}), 1,56 (m, 2H, H_{2d}), 1,68 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 2,63 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, H_{8d}), 3,03 (m, 2H, H_{1d}), 3,21 (m, 4H, H_{3d} H_{5d}), 4,64 (s, 1H, NH_{Boc})

Synthèse du composé 6'

Le composé **5'** (1,39 g, 4,08 mmoles) est dissous dans 45 mL d'une solution de soude 1 M dans EtOH. Quelques gouttes d'une solution de Ni en suspension dans l'eau sont ajoutées au milieu réactionnel. L'air est chassé par de l'argon puis celui-ci est chassé par de l'hydrogène

en effectuant plusieurs cycles vide/hydrogène. Le milieu est agité la nuit puis une filtration sur celite est réalisée. La celite est rincée au MeOH et le filtrat est concentré sous vide. Le composé **6'** est obtenu sous forme d'une huile jaune (1,12 g).

Composé 6' N⁴,N⁸-di-ter-butylloxycarbonylspérimidine



Rdt : 80%

Rf : 0,24 (AcOEt/ MeOH 6/4)

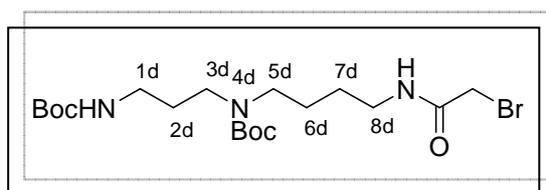
RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,39 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,38 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,57-1,63 (m, 6H, H_{2d} H_{6d} H_{7d}), 2,63 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{1d}), 3,07 (m, 2H, H_{8d}), 3,20 (m, 4H, H_{3d} H_{5d}), 4,52 (s, 1H, NH_{Boc})

□ **Etape 5 : Acylation de la fonction amine primaire libre**

Synthèse du composé 7

Sous atmosphère d'argon, une solution du composé **6** (0,20 g, 0,58 mmoles, 1 éq) dans un minimum de CH₂Cl₂ (~ 2 mL) à laquelle est ajoutée du NEt₃ (76 µL, 1,5 éq), est refroidie à -10°C. Une solution de BrCOCH₂Br (120 µL, 0,87 mmoles, 1,5 éq) dans du CH₂Cl₂ (~1 mL) y est ajoutée au goutte à goutte sous agitation. Après une agitation de 45 min, la solution devient noire. Celle-ci est lavée avec 5 x 5 mL d'eau puis séchée sur MgSO₄. Le solvant est ensuite évaporé pour donner 0,28 g de produit brut. Après purification sur colonne ouverte, 0,11 g de composé **7** purs sont obtenus sous forme d'une huile jaune.

Composé 7 N⁸-(2-bromoacétyl)N¹, N⁴-di-ter-butylloxycarbonylspermidine amide

Condition de purification : silice 70-200 μm , EP / AcOEt 7/3

Rdt : 41%

Rf : 0,38 (EP / AcOEt 7/3)

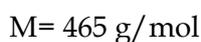
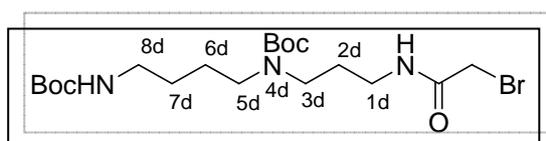
SM : (ESI, m/z) 464,6 (M-H)⁻

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,39 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,42 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,50 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 1,62 (m, 2H, H_{2d}), 3,07 (m, 2H, H_{1d}), 3,16 (m, 4H, H_{3d} H_{5d}), 3,27 (m, 2H, H_{8d}), 3,83 (s, 2H, CH₂Br)

Synthèse du composé 7'

La synthèse de ce composé est semblable à celle du composé 7 avec comme produit de départ le composé 6' (0,18 g, 0,52 mmoles, 1 éq) et BrCOCH₂Br (68 μL , 0,78 mmoles, 1,5 éq). Le produit brut est purifié et donne 0,10 g de composé 7' pur sous forme d'une huile jaune.

Composé 7' N¹-(2-bromoacétyl)N⁴,N⁸-di-ter-butylloxycarbonylspermidine amide

Condition de purification : silice 70-200 μ m, EP / AcOEt 4/6

Rdt : 41%

Rf : 0,42 (EP / AcOEt 4/6)

SM : (ESI, m/z) 466,4 (M+H)⁺

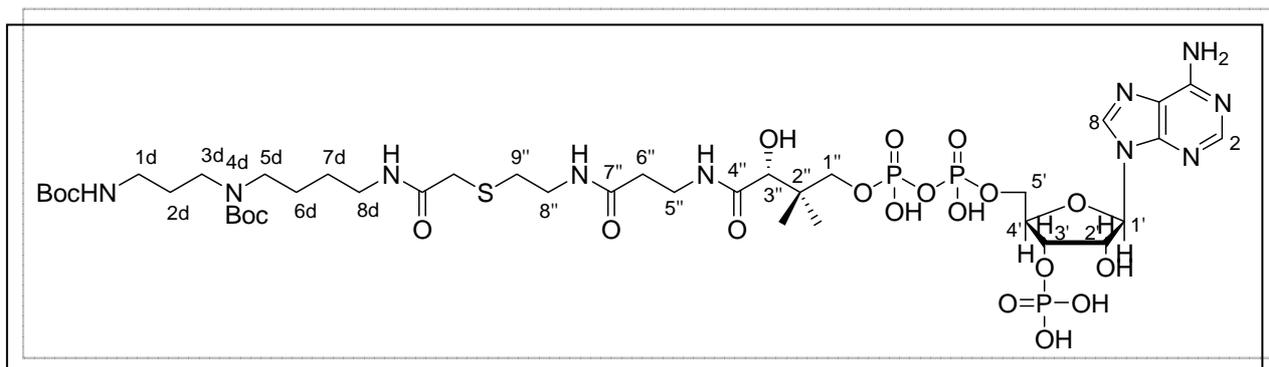
RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,36 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,34 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,45 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 1,59 (m, 2H, H_{2d}), 3,04 (m, 4H, H_{8d} H_{1d}), 3,17 (m, 4H, H_{3d} H_{5d}), 3,76 (s, 2H, CH₂Br)

□ Etape 6 : Substitution nucléophile du brome par le coenzyme A

Synthèse du composé 8

Une solution du composé 7 (59,00 mg, 0,13 mmoles, 2 éq) est préparée par dissolution de ce dernier dans du MeOH (1 mL). A celle ci, est ajoutée une solution de coenzyme A (50,00 mg, 0,06 mmoles, 1 éq) dans l'eau (3,7 mL) basifiée à pH 8 à l'aide de soude 1M. Le mélange est agité toute la nuit. La phase aqueuse est extraite avec 5 x 5 mL de CH₂Cl₂ puis lyophilisée. Le produit de réaction est purifié par CLHP (gradient linéaire) pour donner une poudre blanche (48,00 mg). Cette synthèse est répétée afin d'obtenir ce composé en plus grande quantité (80,00 mg).

Composé 8 N⁸-[2-(S-coenzyme A)acétyl]N¹,N⁴-di-ter-butylloxycarbonylspermidine amide

Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 66%

SM : (ESI, m/z) 1151,7 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

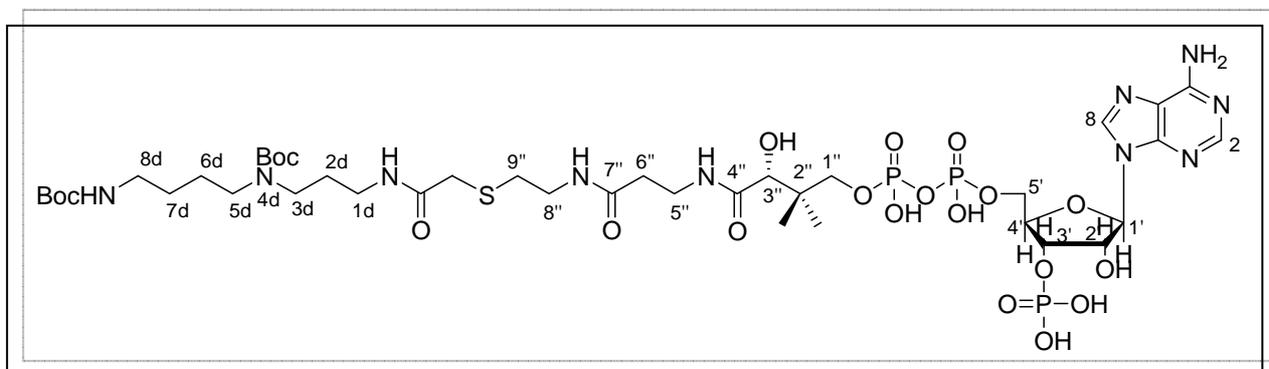
0,84 (s, 3H, Me), 0,97 (s, 3H, Me), 1,43 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,44 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,52 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 1,71 (m, 2H, H_{2d}), 2,49 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{6''}), 2,70 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{9''}), 3,06 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{1d}), 3,23 (m, 6H, H_{3d} H_{5d} H_{8d}), 3,27 (s, 2H, CH₂S), 3,38 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{8''}), 3,50 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{5''}), 3,65 (m, 1H, H_{1''}), 3,89 (m, 1H, H_{1''}), 4,06 (s, 1H, H_{3''}), 4,28 (m, 2H, H_{5'}), 4,62 (m, 1H, H_{4'}), 4,91 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,22 (d, 1H, ³J_{H-H} = 5,6 Hz, H_{1'}), 8,47 (s, 1H, H₂), 8,71 (s, 1H, H₈)

Synthèse du composé 8'

Cette synthèse a été réalisée suivant le protocole du composé **8**, à partir du composé **7'** (54,00 mg, 0,12 mmoles, 2 éq) en utilisant 1 éq de coenzyme A (45,10 mg, 0,06 mmoles). Après purification par CLHP (gradient linéaire), le composé **8'** pur est obtenu (30,00 mg) sous

forme d'une poudre blanche. Cette synthèse est répétée afin d'obtenir ce composé en quantité plus importante (50,00 mg).

Composé 8' N¹-[2-(S-coenzyme A)acétyl]N⁴,N⁸-di-ter-butylloxycarbonylspermidine amide



Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 46 %

SM : (ESI, m/z) 1151,1 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

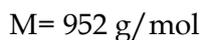
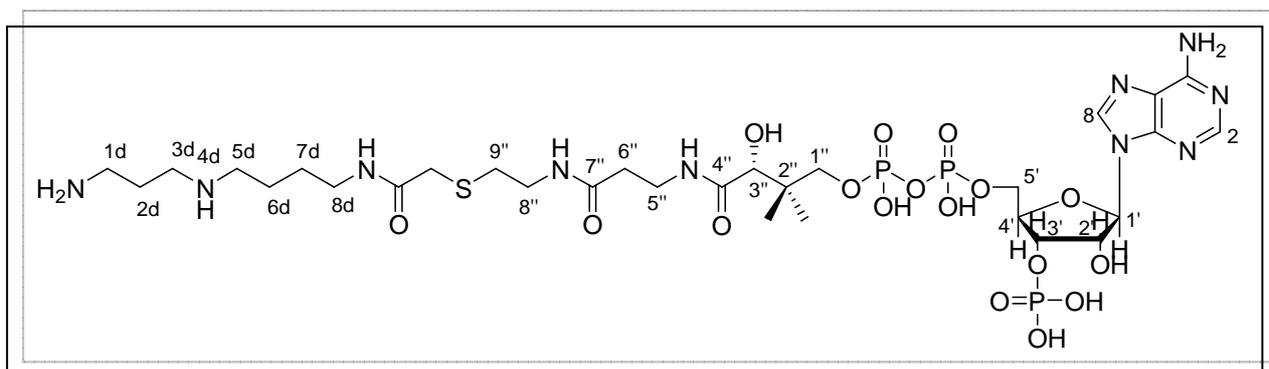
0,83 (s, 3H, Me), 0,95 (s, 3H, Me), 1,39 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,41 s, 9H, Me_{Boc}), 1,50 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 1,74 (m, 2H, H_{2d}), 2,47 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{6''}), 2,69 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{9''}), 3,04 (m, 2H, H_{8d}), 3,20 (m, 6H, H_{1d} H_{3d} H_{5d}), 3,26 (s, 2H, CH₂S), 3,36 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,3 Hz, H_{8''}), 3,47 (t, 2H, ³J_{H-H} = 5,8 Hz, H_{5''}), 3,68 (m, 1H, H_{1''}), 3,89 (m, 1H, H_{1''}), 4,02 (s, 1H, H_{3''}), 4,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,61 (m, 1H, H_{4'}), 4,88 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,19 (d, 1H, ³J_{H-H} = 5,7 Hz, H_{1'}), 8,43 (s, 1H, H₂), 8,63 (s, 1H, H₈)

□ Etape 7 : Déprotection des fonctions amines protégées par le groupement Boc

Synthèse du composé 9

Le composé **8** (80,00 mg, 0,07 mmoles) est déprotégé par 1 mL d'une solution de TFA à 50% dans CH₂Cl₂. La déprotection dure 10 min, puis, le TFA est évaporé sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans de l'eau (10 mL) puis lyophilisé. Le produit déprotégé est purifié par CLHP (gradient linéaire) et donne une poudre blanche (48,00 mg, t_R = 13,27 min).

Composé 9 N⁸-[2-(S-coenzyme A) acétyle] spermidine amide **1b**



Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 73%

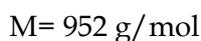
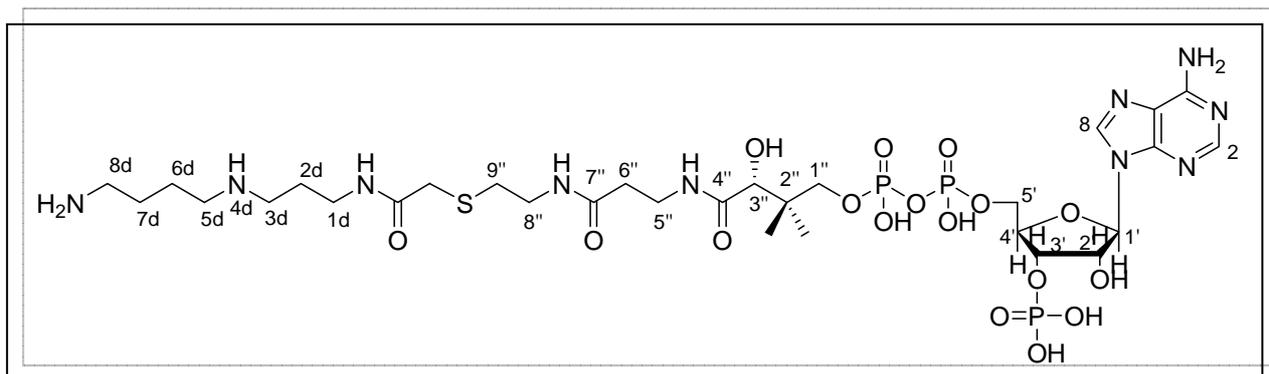
SM : (ESI, m/z) 951,4 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,85 (s, 3H, Me), 0,96 (s, 3H, Me), 1,61 (m, 2H, H_{6d}), 1,72 (m, 2H, H_{7d}), 2,11 (m, 2H, H_{2d}), 2,49 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,0 Hz, H_{6''}), 2,69 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{9''}), 3,06-3,18 (m, 6H, H_{1d} H_{3d} H_{5d}), 3,24 (m, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{8d}), 3,28 (s, 2H, CH₂S), 3,36 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, H_{8''}), 3,50 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,0 Hz, H_{5''}), 3,65 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,8 Hz, ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 3,89 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,6 Hz, ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 4,03 (s, 1H, H_{3''}), 4,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,61 (m, 1H, H_{4'}), 4,88 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,21 (d, 1H, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, H_{1'}), 8,45 (s, 1H, H₂), 8,66 (s, 1H, H₈)

Synthèse du composé 9'

Le protocole de cette synthèse est semblable à celui du composé **9**. Le composé **8'** (50,00 mg, 0,04 mmoles) conduit au composé **9'** (69,00 mg) qui est purifié par CLHP (gradient linéaire) sous forme d'une poudre blanche (16,00 mg, $t_R = 10,17$ min).

Composé 9' N¹-[2-(S-coenzyme A) acétyl] spermidine amide **1a**

Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 98/2 → 60/40

Rdt : 39%

SM : (ESI, m/z) 951,5 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,85 (s, 3H, Me), 0,96 (s, 3H, Me), 1,79 (m, 4H, H_{6d} H_{7d}), 1,94 (m, 2H, H_{2d}), 2,50 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, H_{6''}), 2,71 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{9''}), 3,08 (m, 6H, H_{3d} H_{5d} H_{8d}), 3,31 (s, 2H, CH₂S), 3,34 (m, 4H, H_{8''} H_{1d}), 3,51 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,4 Hz, H_{5''}), 3,64 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 5,0 Hz, ²J_{H-H} = 9,9 Hz, H_{1''}), 3,88 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,9 Hz, ²J_{H-H} = 9,9 Hz, H_{1''}), 4,05 (s, 1H, H_{3''}), 4,29 (m, 2H, H_{5'}), 4,62 (m, 1H, H_{4'}), 4,90 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,25 (d, 2H, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, H_{1'}), 8,47 (s, 1H, H₂), 8,70 (s, 1H, H₈)

Synthèse des inhibiteurs à chaînes courtes et cycliques**Composés 25 à 36**

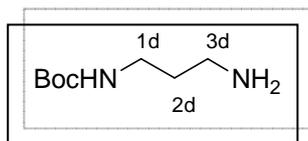
La synthèse de ces composés débute par une étape de monoprotection, soit par un groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) soit par un groupement benzoyle (Bz), d'une des deux fonctions amine de la diamine de départ. L'étape suivante consiste à fixer l'espaceur par réaction avec le bromure de bromoacétyle BrCOCH₂Br. Une première gamme de composés est obtenue par réaction avec le coenzyme A. Une seconde gamme de composés est obtenue en déprotégeant les fonctions amine protégées par le groupement Boc.

□ Etape 1 : Monoprotection de la diamine de départ par le groupement Boc ou Bz**Protocoles de monoprotection par le groupement Boc**

Une solution de Boc₂O (1,7 M, 1 éq) dans le 1,4-dioxane (60 mL) est ajoutée au goutte à goutte à une solution de diamine commerciale (0,3 M, 6 éq) dans le 1,4-dioxane (~60 mL) également. Le goutte à goutte s'effectue lentement, à T° ambiante et sous atmosphère d'azote. La solution est agitée durant l'addition du Boc₂O et cette agitation est maintenue toute la nuit. Le solvant est ensuite évaporé et le mélange réactionnel est repris dans 50 mL d'eau. Le milieu est filtré et le filtrat est extrait au CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide pour donner les composés **10**, **11**, **12** sous forme d'une huile jaune clair. Ces composés seront utilisés dans l'étape suivante sans purification préalable.

Synthèse du composé 10 (= composé 3)

Cette synthèse est effectuée avec la 1,3-propanediamine (7,53 g, 0,10 moles), du Boc₂O (3,70 g, 17,00 mmoles) et mène au composé **10** (1,81 g).

Composé 10 tert-butyl-3-aminopropylcarbamate

$$M = 174 \text{ g/mol}$$

Rdt : 61%

Rf : 0,10 (MeOH / AcOEt 4/6)

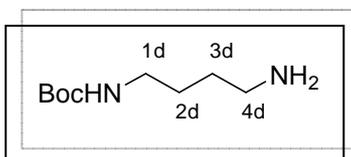
SM : (ESI, m/z) 175,2 (M+H)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,36 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,54 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{2d}), 1,72 (s, 2H, NH₂), 2,67 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{3d}), 3,11 (m, 2H, H_{1d}), 5,62 (s, 1H, NH_{Boc})

Synthèse du composé 11 (= composé 3')

Cette synthèse est réalisée à partir de la putrescine (9,00 g, 0,10 moles), du Boc₂O (3,70 g, 17,00 mmoles) et permet d'obtenir le composé **11** (2,30 g).

Composé 11 tert-butyl-4-aminobutylcarbamate

$$M = 188 \text{ g/mol}$$

Rdt : 72%

Rf : 0,10 (MeOH / AcOEt 3/7)

SM : (ESI, m/z) 189,3 (M+H)⁺

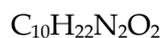
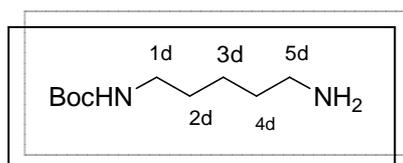
RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,33-1,48 (m, 15H, H_{2d} H_{3d} NH₂ Me_{Boc}), 2,63 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{4d}), 3,05 (m, 2H, H_{1d}), 4,64 (s, 1H, NH_{Boc})

Synthèse du composé 12

Cette synthèse est réalisée avec de la cadavérine (10,02 g, 0,10 moles) et du Boc₂O (3,70 g, 17,00 mmoles) et conduit au produit **12** (2,62 g).

Composé 12 ter-butyl-5-aminopentylcarbamate



M = 202 g/mol

Rdt : 76%

Rf : 0,10 (MeOH/ AcOEt 4/6)

SM : (ESI, m/z) 203,1 (M+H)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

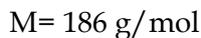
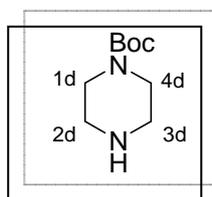
1,24-1,47 (m, 17H, Me_{Boc} NH₂ H_{2d} H_{3d} H_{4d}), 2,62 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{5d}), 3,04 (m, 2H, H_{1d}), 4,63 (s, 1H, NH_{Boc})

RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

24,0 (C₃), 28,4 (Me_{Boc}), 32,7 29,8 (C_{2d} C_{4d}), 40,4 (C_{1d}), 41,8 (C_{5d}), 78,9 (C_{qBoc}), 156,1 (CO_{Boc})

Synthèse du composé 13

Sous argon, une solution de pipérazine (3,00 g, 34,00 mmoles, 5 éq) dans le CH₂Cl₂ sec (50 mL) est refroidie jusqu'à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Au goutte à goutte, une solution de Boc₂O (1,52 g, 7,00 mmoles, 1 éq) dans le CH₂Cl₂ sec (25 mL) y est additionnée. Le mélange est agité la nuit à T° ambiante puis filtré et concentré. Le résidu obtenu est dissous dans de l'eau (30 mL) et la solution aqueuse obtenue est extraite à l'éther (3 x 20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis l'éther est évaporé pour donner 0,98 g de composé **13** brut et 0,76 g de composé **13** pur.

Composé 13 ter-butylpipérazine-1-carboxylate

Condition de purification : silice 70-200 μm, MeOH / AcOEt 7/3

Rdt : 59%

SM : (ESI, m/z) 187,2 (M+H)⁺

Rf : 0,35 (MeOH / AcOEt 3/7)

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

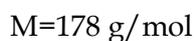
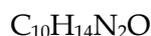
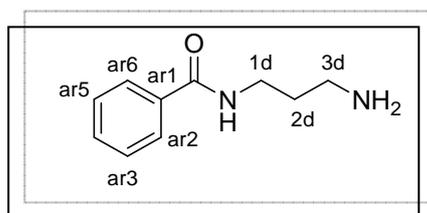
1,38 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,90 (s, 1H, NH), 2,74-2,71 (m, 4H, H_{2d} H_{3d}), 3,32-3,39 (m, 4H, H_{1d} H_{4d})

Protocoles de monobenzoylation des diamines

Synthèse du composé 14

Une solution de 1,3-propanediamine (10,55 g, 0,14 moles, 5 éq) diluée dans du CH₂Cl₂ sec (60 mL) est portée à -78°C à l'aide d'un mélange de carboglace et d'acétone. Le chlorure de benzoyle PhCOCl (3,3 mL, 28,00 mmoles, 1 éq) dilué dans du CH₂Cl₂ sec (30 mL) y est ajouté au goutte à goutte. Le mélange est agité la nuit à T° ambiante puis extrait à l'eau (3 x 50 mL). La phase aqueuse est à son tour extraite au CH₂Cl₂ (3 x 100 mL) et la phase organique obtenue est concentrée pour donner le composé **14** sous forme d'une huile jaune (0,88 g).

Composé 14 N-(3-aminopropyl)benzamide



Rdt : 17%

SM : (ESI, m/z) 179,1 (M+H)⁺

RMN ¹H : (MeOD, 300 MHz, δ ppm)

1,65 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, H_{2d}), 1,76 (s, 2H, NH₂), 2,80 (m, 2H, H_{3d}), 3,48 (m, 2H, H_{1d}), 7,36 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,72 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6})

RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

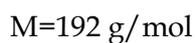
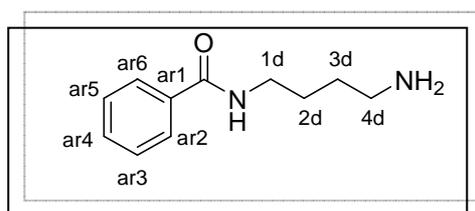
31,1 (C_{2d}), 38,5 (C_{1d}), 39,8 (C_{3d}), 127,1 128,4 (C_{ar2} C_{ar3} C_{ar5} C_{ar6}), 131,3 (C_{ar4}), 134,5 (C_{ar1}), 167,8 (CO_{Ph})

Sous argon et sous agitation, de la benzamide PhCONH₂ (1 éq) et la diamine commerciale (3 éq) sont chauffées à reflux pendant 15h. La diamine est ensuite évaporée sous pression réduite et le résidu obtenu repris dans 50 mL d'eau. La solution aqueuse est acidifiée jusqu'à pH=1 avec HCl concentré, puis filtrée. Le filtrat est extrait avec 2 x 30 mL de CH₂Cl₂ puis il est basifié jusqu'à pH=14. La phase aqueuse est extraite à nouveau avec 2 x 50 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec de la saumure pour être ensuite séchée sur MgSO₄. Cette dernière est alors concentrée sous vide puis purifiée pour donner les produits **15** et **16** sous forme d'une huile marron.

Synthèse du composé **15**

A partir de putrescine (4,41 g, 45,00 mmoles) et de PhCONH₂ (2,00 g, 16,50 mmoles) le composé **15** pur (1,12 g) est obtenu après purification.

Composé **15** N-(4-aminobutyl)benzamide



Condition de purification : silice 70-200 μm , CH₃COCH₃ / MeOH 6/4

Rdt : 35%

Rf : 0,18 (CH₃COCH₃ / MeOH 6/4)

SM : (ESI, m/z) 193,3 (M+H)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,43-1,93 (m, 6H, H_{2d} H_{3d} NH₂), 2,68 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{4d}), 3,39 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{1d}), 7,36 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,80 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6})

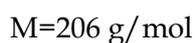
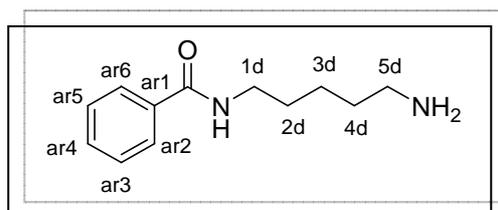
RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

26,9 (C_{2d}), 30,4 (C_{3d}), 39,7 (C_{1d}), 41,4 (C_{4d}), 127,0 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,5 (C_{ar3} C_{ar5}), 131,3 (C_{ar4}), 134,8 (C_{ar1}), 167,8 (CO_{Ph})

Synthèse du composé 16

Cette synthèse est réalisée avec de la cadavérine (5,00 g, 49,0 mmoles) et de la benzamide (2,00 g, 16,50 mmoles) afin d'obtenir le composé **16** pur après filtration sur silice (1,92 g).

Composé 16 N-(5-aminopentyl)benzamide



Condition de purification : silice 70-200 μm, EP / AcOEt 1/9

Rdt : 56%

Rf : 0,24 (EP / AcOEt 1/9)

Masse : (ESI, m/z) 207,2 (M+H)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,28-1,60 (m, 8H, H_{2d} H_{3d} H_{4d} NH₂), 2,62 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{5d}), 3,37 (q, 2H, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, H_{1d}), 7,36 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,70 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6})

RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 75 MHz, δ ppm)

24,2 ($\text{C}_{3\text{d}}$), 29,4 ($\text{C}_{2\text{d}}$), 32,6 ($\text{C}_{4\text{d}}$), 40,0 ($\text{C}_{1\text{d}}$), 41,7 ($\text{C}_{5\text{d}}$), 127,0 ($\text{C}_{\text{ar}2}$ $\text{C}_{\text{ar}6}$), 128,5 ($\text{C}_{\text{ar}3}$ $\text{C}_{\text{ar}5}$), 131,4 ($\text{C}_{\text{ar}4}$), 134,8 ($\text{C}_{\text{ar}1}$), 167,8 (CO_{Ph})

□ Etape 2 : Acylation de la fonction amine primaire libre

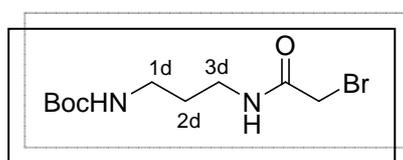
Protocoles de couplage de l'espaceur carboxyméthylène

Une solution de BrCOCH_2Br (1 éq) dans un minimum de solvant ($\sim 1,5$ mL) de CH_2Cl_2 sec est ajoutée au goutte à goutte sous vive agitation à une solution d'amine mono-protégée (2 éq, composés **10** à **13**) dans 2 mL de CH_2Cl_2 porté à -10°C . L'agitation est maintenue à -10°C pendant 30 min. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est lavé avec HCl dilué (1% dans l'eau). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne ouverte de silice pour conduire au composé désiré (composé **17** à **20**) sous la forme d'une huile marron foncé.

Synthèse du composé **17**

Cette synthèse est réalisée avec du BrCOCH_2Br (0,62 g, 3,08 mmoles) et le composé **10** (1,10 g, 6,20 mmoles) afin d'obtenir le composé **17** pur après purification (0,87 g).

Composé 17 tert-butyl 3-(2-bromoacétamido)propylcarbamate



$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{Br}$

$M=294$ g/mol

Condition de purification : silice 70-200 μm , CH_2Cl_2 / MeOH 98/2

Rdt : 96%

Rf : 0,55 (CH₂Cl₂ / MeOH 98/2)

SM : (DCI/NH₃, m/z) 312,2 (M+NH₄)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,28 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,52 (m, 2H, H_{2d}), 3,02 (m, 2H, H_{1d}), 3,18 (m, 2H, H_{3d}), 3,71 (s, 2H, CH₂Br), 5,13 (s, 1H, NH_{Boc}), 7,27 (s, 1H, NH_{3d})

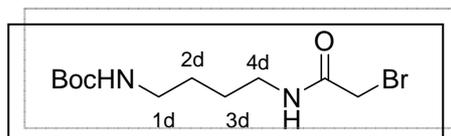
RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

28,0 (Me_{Boc}), 28,6 (C_{2d}), 29,4 (CH₂Br), 36,3 36,7 (C_{1d} C_{3d}), 79,0 (C_{qBoc}), 156,1 (CO_{Boc}), 165,6 (COCH₂Br)

Synthèse du composé 18

Ce produit (0,18 g) est obtenu à partir du composé **11** (0,71 g, 3,76 mmoles) et de BrCOCH₂Br (0,38 g, 1,88 mmoles), après purification.

Composé 18 tert-butyl 4-(2-bromoacétamido)butylcarbamate



C₁₁H₂₁N₂O₃Br

M=308 g/mol

Condition de purification : silice 70-200 μm, CH₂Cl₂ / MeOH 98/2

Rdt : 31%

Rf : 0,27 (CH₂Cl₂ / MeOH 98/2)

SM : (DCI/NH₃, m/z) 326,2 (M+NH₄)⁺

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

1,33 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,45 (m, 4H, $\text{H}_{2\text{d}}$ $\text{H}_{3\text{d}}$), 3,01 (m, 2H, $\text{H}_{1\text{d}}$), 3,20 (m, 2H, $\text{H}_{4\text{d}}$), 3,76 (s, 2H, CH_2Br), 4,65 (s, 1H, NH_{Boc}), 6,69 (s, 1H, $\text{NH}_{4\text{d}}$)

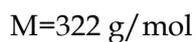
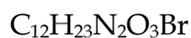
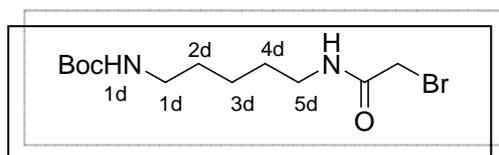
RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 75 MHz, δ ppm)

26,5 27,5 ($\text{C}_{2\text{d}}$ $\text{C}_{3\text{d}}$), 28,4 (Me_{Boc}), 29,2 (CH_2Br), 39,8 40,0 ($\text{C}_{1\text{d}}$ $\text{C}_{4\text{d}}$), 79,3 (C_{qBoc}), 156,1 (CO_{Boc}), 165,6 (COCH_2Br)

Synthèse du composé 19

Cette synthèse est réalisée à partir du composé **12** (2,02 g, 10,00 mmol) et de BrCOCH_2Br (1,00 g, 5,00 mmol). Le produit **19** (0,92 g brut) est obtenu pur (0,36 g) après purification sur colonne.

Composé 19 tert-butyl 5-(2-bromoacétamido)pentylcarbamate



Condition de purification : silice 70-200 μm , CH_2Cl_2 / MeOH 98/2

Rdt : 23%

Rf : 0,35 (CH_2Cl_2 / MeOH 98/2)

SM : (ESI, m/z) 323,4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

1,15 - 1,44 (m, 6H, H_{3d} H_{2d} H_{4d}), 1,27 (s, 9H, Me_{Boc}), 2,93 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,2$ Hz, H_{1d}), 3,10 (q, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,9$ Hz, H_{5d}), 3,70 (s, 2H, CH_2Br), 4,78 (s, 1H, NH_{Boc}), 6,90 (s, 1H, NH_{5d})

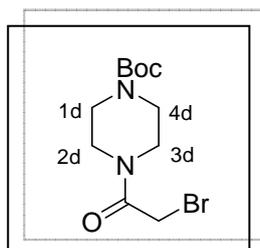
RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 75 MHz, δ ppm)

23,9 (C_{3d}), 28,4 (Me_{Boc}), 28,9 29,3 29,7 (C_{2d} C_{4d} CH_2Br), 40,3 40,0 (C_{1d} C_{5d}), 79,1 (C_{qBoc}), 156,1 (CO_{Boc}), 165,5 (COCH_2Br)

Synthèse du composé 20

Cette synthèse est réalisée à partir du composé **13** (0,30 g, 1,61 mmoles) et de BrCOCH_2Br (0,16 g, 0,80 mmoles). Le composé **20** brut (0,15 g) est par la suite purifié sur colonne (0,14 g).

Composé 20 ter-butyl 4-(2-bromoacétyl)pipérazine-1-carboxylate



$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{Br}$

$M=306$ g/mol

Condition de purification : silice 70-200 μm , CH_2Cl_2 / MeOH 99/1

Rdt : 57%

Rf : 0,49 (CH_2Cl_2 / MeOH 99/1)

Masse : (DCI/ NH_3 , m/z) 324,1 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

1,37 (s, 9H, Me_{Boc}), 3,32-3,51 (m, 8H, H_{1d} H_{2d} H_{3d} H_{4d}), 3,77 (s, 2H, CH_2Br)

RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 75 MHz, δ ppm)

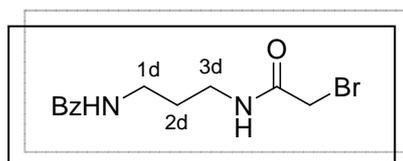
28,2 (Me_{Boc}), 29,5 (CH_2Br), 41,8 46,4 ($\text{C}_{1\text{d}}$ $\text{C}_{2\text{d}}$ $\text{C}_{3\text{d}}$ $\text{C}_{4\text{d}}$), 80,3 (C_{qBoc}), 154,3 (CO_{Boc}), 165,3 (COCH_2Br)

Sous argon, une solution d'amine (1 éq) monobenzoylée (composés **14** à **16**) dans un minimum de solvant (~1 mL de CH_2Cl_2 sec) et de NEt_3 (3,4 M, 1 éq) est portée à -10°C . Une solution de BrCOCH_2Br (2,2 M, 1 éq) dans un minimum de solvant (~1,5 ml de CH_2Cl_2 sec) y est ajoutée au goutte à goutte. Le milieu est agité 15 min à 0°C puis lavé 4 fois à l'eau (4 x 3 mL). La phase organique est séchée sur Mg SO_4 puis évaporée pour donner le produit voulu sous forme d'un solide marron.

Synthèse du composé **21**

Le composé **21** est obtenu par réaction entre le composé **14** (0,60 g, 3,37 mmol), BrCOCH_2Br (0,67 g, 3,32 mmol) et NEt_3 (0,47 mL, 3,35 mmol). Ce composé brut (0,30 g) est purifié sur colonne (0,11 g purs).

Composé 21 N-(3-(2-bromoacétamido)propyl)benzamide



$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$

$M=298 \text{ g/mol}$

Condition de purification : silice 70-200 μm , EP / AcOEt 2/8

Rdt : 11%

Rf : 0,20 (EP / AcOEt 2/8)

SM : (ESI, m/z) 299,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm)

1,74 (m, 2H, H_{2d}), 3,37 (m, 2H, H_{1d}), 3,47 (m, 1H, H_{3d}), 3,87 (s, 2H, CH_2Br), 6,95 7,11 (2s, 1H+1H, NH_{1d} NH_{3d}), 7,43 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,80 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6})

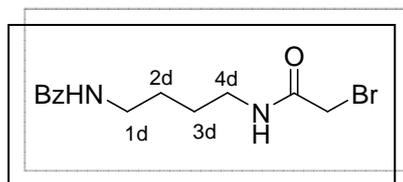
RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 75 MHz, δ ppm)

29,1 29,7 (C_{2d} CH_2Br), 36,2 36,8 (C_{1d} C_{3d}), 127,1 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,7 (C_{ar3} C_{ar5}), 131,7 (C_{ar4}), 134,2 (C_{ar1}), 166,8 (COCH_2Br), 168,1 (CO_{Ph})

Synthèse du composé 22

Cette synthèse est réalisée par réaction entre le composé **15** (0,30 g, 1,56 mmoles) et BrCOCH_2Br (0,32 g, 1,60 mmoles), en présence de NEt_3 (0,22 mL, 1,58 mmoles). Le composé **22** est obtenu pur (0,32 g) après purification.

Composé 22 N-(4-(2-bromoacétamido)butyl)benzamide



$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$

$M=312$ g/mol

Condition de purification : silice 70-200 μm , EP / AcOEt 1/9

Rdt : 66%

Rf : 0,26 (EP/ AcOEt 1/9)

SM : (ESI, m/z) 313,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

RMN ^1H : (MeOD, 300 MHz, δ ppm)

1,62 (m, 4H, H_{2d} H_{3d}), 3,25 (m, 2H, H_{1d}), 3,41 (m, 2H, H_{4d}), 3,81 (s, 2H, CH₂Br), 7,47 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,80 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6}), 8,37 8,48 (2s, 1H+1H, NH_{1d} NH_{4d})

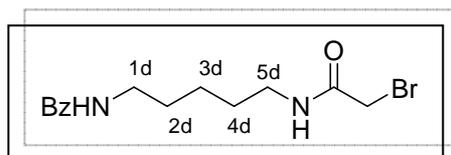
RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

26,2 26,4 27,5 (C_{2d} C_{3d} CH₂Br), 39,1 39,2 (C_{1d} C_{4d}), 126,9 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,2 (C_{ar3} C_{ar5}), 131,2 (C_{ar4}), 134,4 (C_{ar1}), 168,1 (COCH₂Br), 168,9 (CO_{Ph})

Synthèse du composé 23

Cette synthèse est effectuée à partir du composé **16** (0,50 g, 2,42 mmoles), BrCOCH₂Br (0,49 g, 2,43 mmoles) et de NEt₃ (0,34 mL, 2,44 mmoles). Le produit **23** est obtenu pur (0,12 g), après purification.

Composé 23 N-(5-(2-bromoacétamido)pentyl)benzamide



C₁₄H₁₉N₂O₂Br

M=326 g/mol

Condition de purification : silice 70-200 μm, EP / AcOEt 1/9

Rdt : 15 %

Rf : 0,31 (EP/ AcOEt 1/9)

SM : (ESI, m/z) 327,1 (M+H)⁺

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm)

1,36 (m, 2H, H_{3d}), 1,57 (m, 4H, H_{2d} H_{4d}), 3,25 (m, 2H, H_{1d}), 3,41 (m, 2H, H_{5d}), 3,78 (s, 2H, CH₂Br), 6,23 6,56 (2s, 1H+1H, NH_{1d} NH_{5d}), 7,39 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,71 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6})

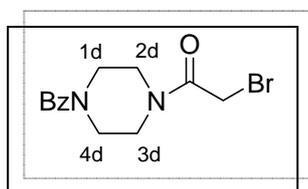
RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

23,8 (C_{3d}), 27,5 28,5 28,7 (C_{2d} C_{4d} CH₂Br), 39,4 (C_{1d} C_{5d}), 126,8 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,1 (C_{ar3} C_{ar5}), 131,2 (C_{ar4}), 134,5 (C_{ar1}), 168,8 (COCH₂Br), 168,0 (CO_{Ph})

Synthèse du composé 24

La synthèse de ce composé se fait à partir de la benzoylpipérazine commerciale (0,50 g, 2,63 mmoles), BrCOCH₂Br (0,53 g, 2,63 mmoles) et NEt₃ (0,37 mL, 2,66 mmoles). Le composé 25 est obtenu pur (0,51 g), après purification sur colonne de silice.

Composé 24 2-bromo-1-[4-(phénylcarbonyl)pipérazin-1-yl]éthanone



C₁₃H₁₅N₂O₂Br

M=310 g/mol

Condition de purification : silice 70-200 μm, éluant EP / AcOEt 1/9

Rdt : 63%

Rf : 0,30 (EP/ AcOEt 1/9)

SM : (ESI, m/z) 311,2 (M+H)⁺

RMN ¹H : (MeOD, 300 MHz, δ ppm)

3,38 - 3,88 (m, 8H, H_{1d} H_{2d} H_{3d} H_{4d}), 4,05 (s, 2H, CH₂Br), 7,47 (m, 5H, H_{ar})

RMN ¹³C : (CDCl₃, 75 MHz, δ ppm)

42,0 46,3 (C_{1d} C_{2d} C_{3d} C_{4d} CH₂Br), 126,8 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,5 (C_{ar3} C_{ar5}), 130,0 (C_{ar4}), 135,0 (C_{ar1}), 166,7 (COCH₂Br), 171,3 (CO_{Ph})

□ Etape 3 : Substitution nucléophile du brome par le coenzyme A

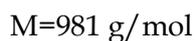
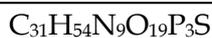
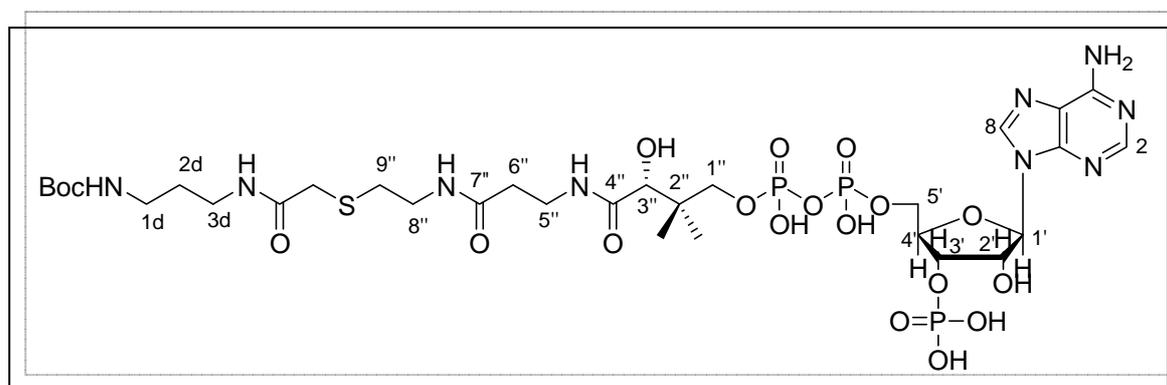
Protocoles de couplage au coenzyme A

Les dérivés bromés (composés **17** à **24**) sont dissous dans 1 mL de THF. A cette solution est ajoutée une solution de coenzyme A (17,60 mM, 1 éq) dans l'eau (3,7 mL) basifiée jusqu'à pH=8 à l'aide de soude 1M. Le mélange est agité toute la nuit puis le THF ou le MeOH est évaporé. La phase aqueuse restante est diluée avec 10 mL d'eau puis extraite au CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). La phase aqueuse est lyophilisée pour donner les produits finaux sous la forme d'une poudre blanche hygroscopique. Ces composés ont été analysés par CLHP (gradient linéaire), RMN ¹H, RMN ¹³C et SM.

Synthèse du composé **25**

Cette synthèse est réalisée avec le composé **17** (31,00 mg, 0,10 mmoles, 1,6 éq) et du coenzyme A (50,00 mg, 65,14 μmoles, 1 éq). Le composé **25** est obtenu pur (53,00 mg, t_R = 6,88 min).

Composé **25** N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]-N-(ter-butyloxycarbonyl)propanamide



Condition de contrôle : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 83 %

SM : (ESI, m/z) 489,9 (M-2H)²⁻

Condition de contrôle : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 77%

SM : (ESI, m/z) 497,0 (M-2H)²⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

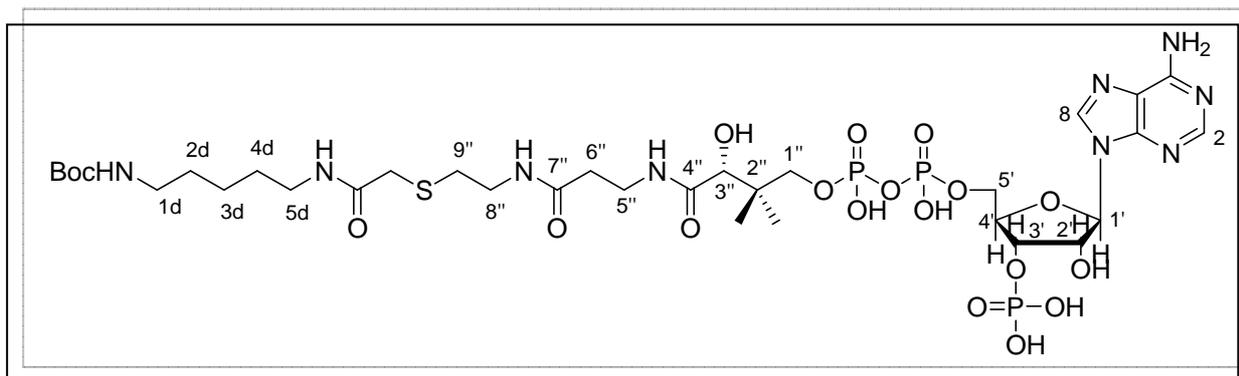
0,76 (s, 3H, Me), 0,89 (s, 3H, Me), 1,42 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,51 (m, 4H, H_{2d} H_{3d}), 2,48 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, H_{6''}), 2,70 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{9''}), 3,07 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{1d}), 3,22 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, H_{4d}), 3,28 (s, 2H, CH₂S), 3,37 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{8''}), 3,49 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{5''}), 3,56 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,9 Hz ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 3,84 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,9 Hz ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 4,03 (s, 1H, H_{3''}), 4,26 (m, 2H, H_{5'}), 4,60 (m, 1H, H_{4'}), 4,83 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,19 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, H_{1'}), 8,27 (s, 1H, H₂), 8,57 (s, 1H, H₈)

RMN ¹³C : (D₂O, 75 MHz, δ ppm)

18,6 (Me), 21,4 (Me), 26,2 27,0 (C_{2d} C_{3d}), 28,2 (Me_{Boc}), 31,7 (C_{9''}), 35,3 35,9 36,0 (CH₂S C_{6''} C_{5''}), 38,8 (C_{8''}), 39,9 40,1 (C_{1d} C_{4d}), 66,3 (C_{5'}), 72,3 (C_{1''}), 74,2 74,6 74,8 (C_{2'} C_{3'} C_{3''}), 84,5 (C_{4'}), 87,0 (C_{1'}), 119,1 (C_{qA}), 140,4 (C₈), 149,9 (C_{qA}), 153,4 (C₂), 156,1 (CO_{Boc}), 172,8 174,4 175,2 (C_{4''} COCH₂S C_{7''})

Synthèse du composé 27

Cette synthèse est effectuée à partir du composé **19** (24,60 mg, 0,08 mmoles, 1,1 éq) et du coenzyme A (50,00 mg, 65,14 μmoles, 1 éq). Le composé **27** est alors obtenu pur (59,00 mg, t_R = 7,42 min).

Composé 27 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]-N-(ter-butyloxycarbonyl)pentanamide

Condition de contrôle : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 89%

SM : (ESI, m/z) 1008,5 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,76 (s, 3H, Me), 0,89 (s, 3H, Me), 1,30 (m, 2H, H_{3d}), 1,42 (s, 9H, Me_{Boc}), 1,51 (m, 4H, H_{2d} H_{4d}), 2,47 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, H_{6''}), 2,69 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{9''}), 3,04 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{1d}), 3,20 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{5d}), 3,26 (s, 2H, CH₂S), 3,37 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{8''}), 3,48 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{5''}), 3,56 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,7 Hz ²J_{H-H} = 9,9 Hz, H_{1''}), 3,84 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,8 Hz ³J_{H-H} = 9,9 Hz, H_{1''}), 4,03 (s, 1H, H_{3''}), 4,25 (m, 2H, H_{5'}), 4,60 (m, 1H, H_{4'}), 4,85 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,18 (d, 1H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{1'}), 8,26 (s, 1H, H₂), 8,56 (s, 1H, H₈)

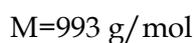
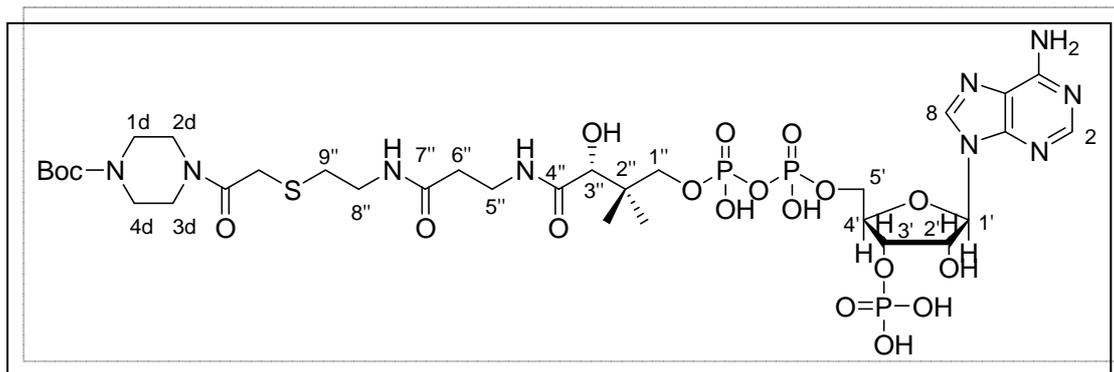
RMN ¹³C : (D₂O, 75 MHz, δ ppm)

18,6 (Me), 21,4 (Me), 28,3 (Me_{Boc}), 28,5 29,1 (C_{2d} C_{4d}), 31,7 (C_{9''}), 35,4 35,9 36,0 (CH₂S C_{6''} C_{5''}), 38,8 38,9 (C_{8''}), 40,1 40,4 (C_{1d} C_{5d}), 66,2 (C_{5'}), 72,4 (C_{1''}), 74,4 74,6 74,7 (C_{2'} C_{3'} C_{3''}), 84,3 (C_{4'}), 87,0 (C_{1'}), 119,1 (C_{qA}), 140,5 (C₈), 149,9 (C_{qA}), 153,4 (C₂), 156,1 (CO_{Boc}), 172,8 174,4 175,2 (C_{4''} COCH₂S C_{7''})

Synthèse du composé 28

Cette synthèse est effectuée à partir du composé **20** (20,00 mg, 65,36 μ moles, 1 éq) et du coenzyme A (50,00 mg, 65,14 μ moles, 1 éq). Le composé **28** est ainsi obtenu pur (64,00 mg, t_R = 7,39 min).

Composé 28 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]-N-(ter-butyl)piperazine-1-carboxylate



Condition de contrôle : TFA 0,05 % / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 98%

SM : (ESI, m/z) 496,0 (M-2H)²⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,76 (s, 3H, Me), 0,90 (s, 3H, Me), 1,46 (s, 9H, Me_{Boc}), 2,48 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,4 Hz, H_{6''}), 2,74 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, H_{9''}), 3,39 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, H_{8''}), 3,46-3,58 (m, 13H, H_{1d} H_{2d} H_{3d} H_{4d} CH₂S H_{1''} H_{5''}), 3,85 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,6 Hz ²J_{H-H} = 9,6 Hz, H_{1''}), 4,03 (s, 1H, H_{3''}), 4,26 (m, 2H, H₅), 4,60 (m, 1H, H_{4'}), 4,85 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,18 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{1'}), 8,25 (s, 1H, H₂), 8,56 (s, 1H, H₈)

Rdt : 74%

SM : (ESI, m/z) 984,3 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

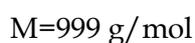
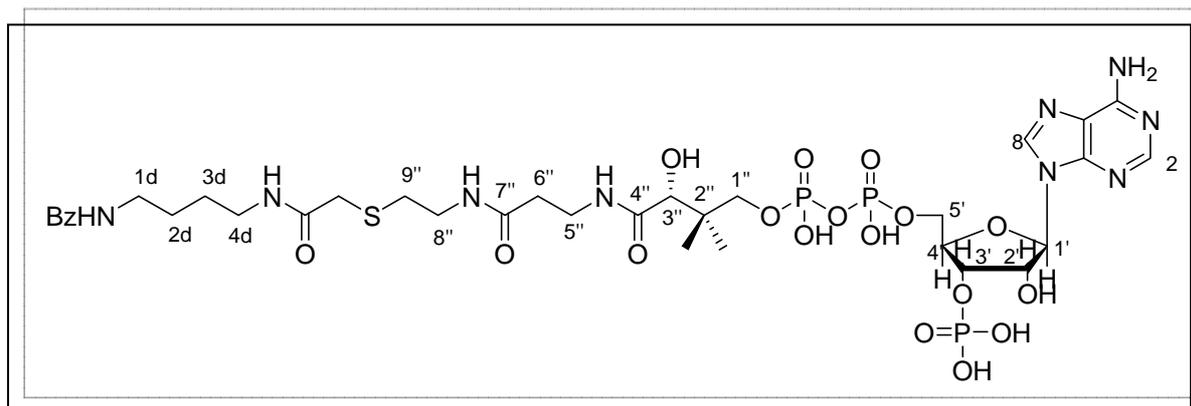
0,72 (s, 3H, Me), 0,86 (s, 3H, Me), 1,83 (qt, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{2d}), 2,42 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{6''}), 2,66 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{9''}), 3,25 (s, 2H, CH₂S), 3,28 - 3,45 (m, 8H, H_{1d} H_{3d} H_{8''} H_{5''}), 3,53 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,8 Hz, ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 3,82 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,8 Hz ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 4,00 (s, 1H, H_{3''}), 4,24 (m, 2H, H_{5'}), 4,58 (m, 1H, H₄), 4,83 (m, 2H, H₂ H_{3'}), 6,13 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, H_{1'}), 7,48 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,68 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6}), 8,18 (s, 1H, H₂), 8,51 (s, 1H, H₈)

RMN ¹³C : (D₂O, 75 MHz, δ ppm)

18,1 (Me), 20,9 (Me), 28,0 (C_{2d}), 31,2 (C_{9''}), 34,9 35,3 35,4 (C_{5''} C_{6''} CH₂S), 37,3 37,4 (C_{1d} C_{3d}), 38,3 (C_{8''}), 65,5 (C_{5'}), 71,9 (C_{1''}), 73,8 73,9 74,1 (C_{2'} C_{3'} C_{3''}), 83,7 (C_{4'}), 86,4 (C_{1'}), 118,5 (C_{qA}), 126,8 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,6 (C_{ar3} C_{ar5}), 132,0 (C_{ar4}), 133,3 (C_{ar1}), 139,5 (C₈), 149,1 (C_{qA}), 152,7 (C₂), 155,4 (C_{qA}), 170,5 172,4 173,8 174,6 (COPh COCH₂S C_{7''} C_{4''})

Synthèse du composé 30

Le composé **30** est obtenu par réaction du composé **22** (41,00 mg, 0,13 mmoles) et du coenzyme A (50,00 mg, 65,14 μmoles). Le composé désiré est obtenu pur (54,00 mg, t_R = 6,67 min).

Composé 30 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]-N-benzoylbutanamide

Condition de contrôle : TFA 0,05% / CH₃CN 95/5 → 60/40

Rdt : 83%

SM : (ESI, m/z) 998,5 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,73 (s, 3H, Me), 0,87 (s, 3H, Me), 1,62 (m, 2H, H_{2d} H_{3d}), 2,40 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{6''}), 2,64 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{9''}), 3,23 (s, 2H, CH₂S), 3,23 - 3,44 (m, 8H, H_{1d} H_{4d} H_{8''} H_{5''}), 3,54 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 4,4 Hz, ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 3,82 (dd, 1H, ³J_{H-P} = 5,0 Hz ²J_{H-H} = 9,8 Hz, H_{1''}), 4,01 (s, 1H, H_{3''}), 4,25 (m, 2H, H_{5'}), 4,58 (m, 2H, H_{4'}), 4,83 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,15 (d, 2H, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,51 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,68 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6}), 8,21 (s, 1H, H₂), 8,54 (s, 1H, H₈)

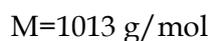
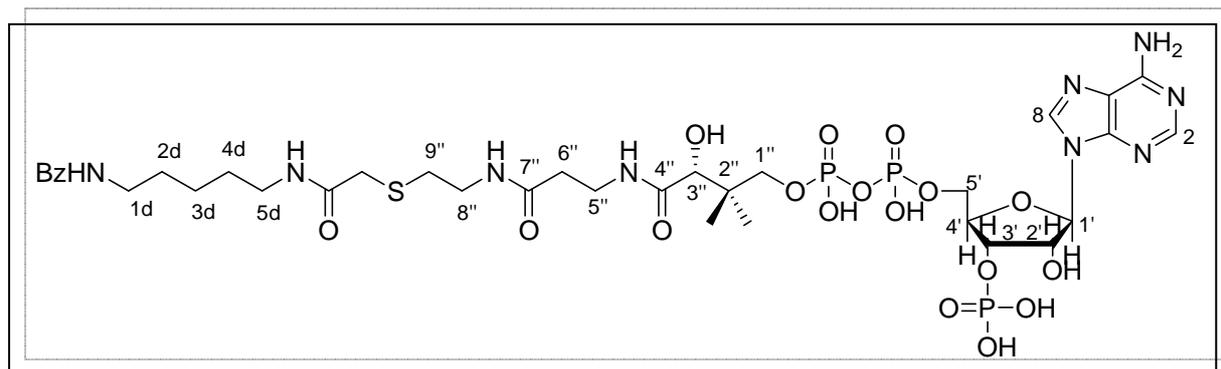
RMN ¹³C : (D₂O, 75 MHz, δ ppm)

18,0 (Me), 20,9 (Me), 25,9 26,0 (C_{2d} C_{3d}), 31,2 (C_{9''}), 34,8 35,3 35,4 (C_{5''} C_{6''} CH₂S), 38,3 (C_{8''}), 39,3 39,5 (C_{1d} C_{4d}), 65,8 (C_{5'}), 71,8 (C_{1''}), 73,7 74,0 74,3 (C_{2'} C_{3'} C_{3''}), 84,0 (C_{4'}), 86,5 (C_{1'}), 118,5 (C_{qA}), 126,8 (C_{ar2} C_{ar6}), 128,6 (C_{ar3} C_{ar5}), 131,9 (C_{ar4}), 133,5 (C_{ar1}), 139,6 (C₈), 149,2 (C_{qA}), 152,8 (C₂), 155,5 (C_{qA}), 170,5 172,4 173,8 174,6 (COPh COCH₂S C_{7''} C_{4''})

Synthèse du composé 31

La synthèse du composé **31** a été réalisée à partir du composé **23** (42,50 mg, 0,13 mmoles) et du coenzyme A (50,00 mg, 65,14 μ moles). Le composé **31** est obtenu pur (60,00 mg, $t_R = 6,92$ min).

Composé 31 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]-N-benzoylpentanamide



Condition de contrôle : TFA 0,05% / CH_3CN 98/2 \rightarrow 60/40

Rdt : 91%

SM : (ESI, m/z) 1012,4 (M-H)⁻

RMN 1H : (D_2O , 300 MHz, δ ppm)

0,75 (s, 3H, Me), 0,89 (s, 3H, Me), 1,35 (m, 2H, H_{3d}), 1,56 (m, 4H, H_{2d} H_{4d}), 2,43 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 6,5$ Hz, $H_{6''}$), 2,58 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 6,6$ Hz, $H_{9''}$), 3,17 - 3,22 (m, 4H, CH_2S H_{1d}), 3,26 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 6,7$ Hz, H_{5d}), 3,26 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 6,7$ Hz, $H_{8''}$), 3,45 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 6,8$ Hz, $H_{5''}$), 3,57 (dd, 1H, $^3J_{H-P} = 4,7$ Hz, $^2J_{H-H} = 9,6$ Hz, $H_{1''}$), 3,85 (dd, 1H, $^3J_{H-P} = 4,9$ Hz $^2J_{H-H} = 9,7$ Hz, $H_{1''}$), 4,03 (s, 1H, $H_{3''}$), 4,26 (m, 2H, $H_{5'}$), 4,60 (m, 2H, $H_{4'}$), 4,85 (m, 2H, $H_{2'}$ $H_{3'}$), 6,14 (d, 2H, $^3J_{H-H} = 6,2$ Hz, $H_{1'}$), 7,49 (m, 3H, H_{ar3} H_{ar4} H_{ar5}), 7,68 (m, 2H, H_{ar2} H_{ar6}), 8,18 (s, 1H, H_2), 8,52 (s, 1H, H_8)

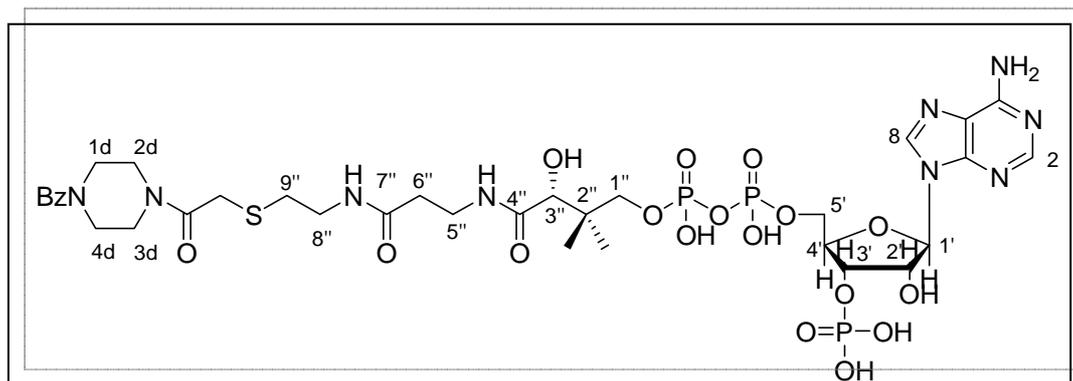
RMN ^{13}C : (D_2O , 75 MHz, δ ppm)

18,1 (Me), 20,9 (Me), 23,4 ($\text{C}_{3\text{d}}$), 28,0 28,1 ($\text{C}_{2\text{d}}$ $\text{C}_{4\text{d}}$), 31,1 ($\text{C}_{9''}$), 34,8 35,3 35,4 ($\text{C}_{5''}$ $\text{C}_{6''}$ CH_2S), 38,2 ($\text{C}_{8''}$), 39,5 39,7 ($\text{C}_{1\text{d}}$ $\text{C}_{5\text{d}}$), 65,5 ($\text{C}_{5'}$), 71,9 ($\text{C}_{1''}$), 73,9 74,0 74,1 ($\text{C}_{2'}$ $\text{C}_{3'}$ $\text{C}_{3''}$), 83,5 (C_4'), 86,4 (C_1'), 118,5 (C_{qA}), 126,8 ($\text{C}_{\text{ar}2}$ $\text{C}_{\text{ar}6}$), 128,6 ($\text{C}_{\text{ar}3}$ $\text{C}_{\text{ar}5}$), 131,9 ($\text{C}_{\text{ar}4}$), 133,5 ($\text{C}_{\text{ar}1}$), 139,6 (C_8), 149,1 (C_{qA}), 152,6 (C_2), 155,3 (C_{qA}), 170,4 172,2 173,7 174,7 (COPh COCH_2S $\text{C}_{7''}$ $\text{C}_{4''}$)

Synthèse du composé 32

Cette synthèse est effectuée avec le composé **24** (40,00 mg, 0,13 mmoles) et du coenzyme A (50,00 mg, 65,14 μmoles). Le composé **32** est par la suite purifié et conduit à 23 mg de produits purs (gradient linéaire, $t_{\text{R}} = 6,71$ min).

Composé 32 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]-N-pényl(piperazin-1-yl)-1-méthanone



$\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}_3\text{S}$

$M=997$ g/mol

Condition de purification : TFA 0,05% / CH_3CN 98/2 \rightarrow 60/40

Rdt : 35%

SM : (ESI, m/z) 996,8 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,76 (s, 3H, Me), 0,90 (s, 3H, Me), 2,46 (m, 2H, H_{6'}), 2,73 (m, 2H, H_{9'}), 3,23 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{8''}), 3,36 - 3,60 (m, 13H, H_{1d} H_{2d} H_{3d} H_{4d} CH₂S H_{1''} H_{5''}), 3,88 (m, 1H, H_{1''}), 4,03 (s, 1H, H_{3''}), 4,26 (m, 2H, H_{5'}), 4,61 (m, 1H, H_{4'}), 4,86 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,16 (d, 2H, ³J_{H-H} = 5,6 Hz, H_{1'}), 7,47 (m, 5H, H_{ar}), 8,23 (s, 1H, H₂), 8,55 (s, 1H, H₈)

RMN ¹³C : (D₂O, 75 MHz, δ ppm)

18,1 (Me), 20,7 (Me), 31,0 (C_{9''}), 32,5 (CH₂S), 35,3 35,4 (C_{5''} C_{6''}), 38,2 (C_{8''}), 41,9 42,2 45,4 46,9 (C_{1d} C_{2d} C_{3d} C_{4d}), 65,3 (C_{5'}), 71,7 (C_{1''}), 73,7 73,8 74,0 (C_{2'} C_{3'} C_{3''}), 83,4 (C_{4'}), 86,3 (C_{1'}), 118,3 (C_{qA}), 126,6 (C_{ar2} C_{ar2} C_{ar6}), 128,7 (C_{ar3} C_{ar5}), 130,5 (C_{ar4}), 133,8 (C_{ar1}), 139,8 (C₈), 149,0 (C_{qA}), 152,4 (C₂), 155,1 (C_{qA}), 170,4 172,6 173,7 174,6 (COPh COCH₂S C_{7''} C_{4''})

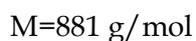
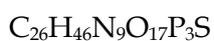
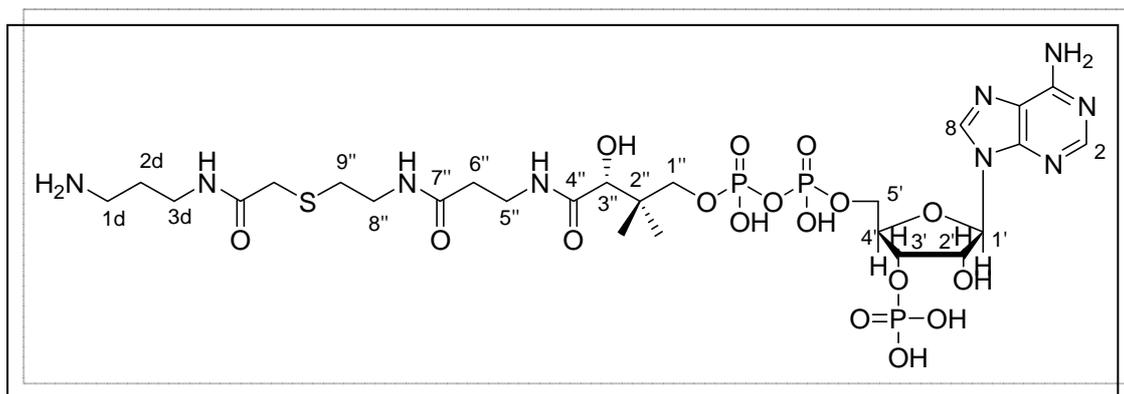
□ **Etape de déprotection des molécules protégées par un groupement Boc**

Protocole de déprotection de la fonction amine

Les molécules **25** à **28** sont déprotégées par 1 mL d'une solution de TFA (0,5 mL) dans le CH₂Cl₂ (0,5 mL). Cette solution est agitée 10 min puis le TFA est évaporé sous vide. Les résidus obtenus sont dissous dans de l'eau (10 mL) puis lyophilisés. Les produits déprotégés sont purifiés par CLHP et donnent les produits de déprotection sous forme d'une poudre blanche.

Obtention du composé 33

Ce composé est réalisé à partir du composé **25** (0,13 g, 0,13 mmoles). Il est ensuite purifié par CLHP (46,00 mg, gradient linéaire, t_R = 19,20 min).

Composé 33 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]propane-1,3-diamine

Condition de purification : TFA 0,05% / CH_3CN 100/0 \rightarrow 60/40

Rdt : 40%

SM : (ESI, m/z) 880,4 (M-H)⁻

RMN ^1H : (D_2O , 300 MHz, δ ppm)

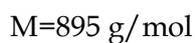
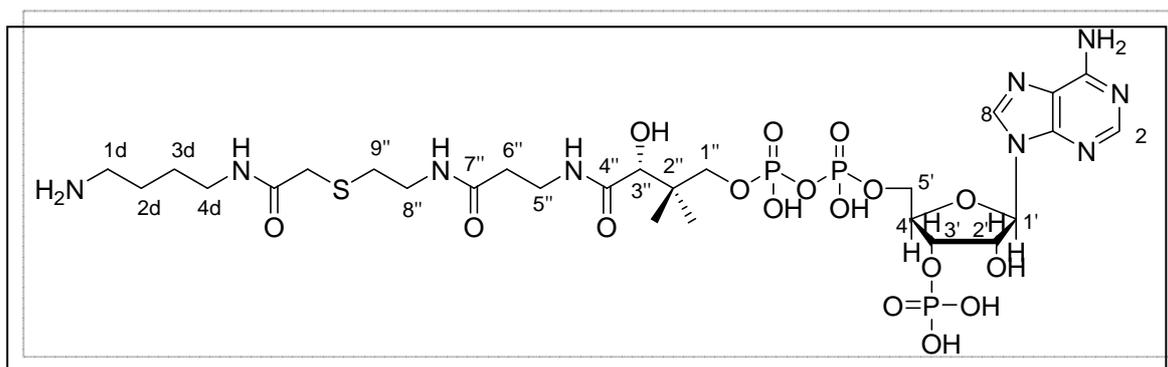
0,86 (s, 3H, Me), 0,97 (s, 3H, Me), 1,91 (m, 2H, H_{2d}), 2,49 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,8 \text{ Hz}$, $\text{H}_{6''}$), 2,71 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,8 \text{ Hz}$, $\text{H}_{9''}$), 3,03 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7,6 \text{ Hz}$, H_{1d}), 3,31 (s, 2H, CH_2S), 3,33 - 3,40 (m, 4H, H_{3d} , $\text{H}_{8''}$), 3,51 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,3 \text{ Hz}$, $\text{H}_{5''}$), 3,65 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-P}} = 4,4 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-H}} = 9,9 \text{ Hz}$, $\text{H}_{1''}$), 3,89 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-P}} = 5,0 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H-H}} = 9,8 \text{ Hz}$, $\text{H}_{1''}$), 4,05 (s, 2H, $\text{H}_{3''}$), 4,30 (m, 2H, $\text{H}_{5''}$), 4,63 (m, 1H, $\text{H}_{4''}$), 4,90 (m, 2H, H_2 , H_3), 6,24 (d, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7 \text{ Hz}$, $\text{H}_{1'}$), 8,46 (s, 1H, H_2), 8,68 (s, 1H, H_8)

RMN ^{13}C : (D_2O , 75 MHz, δ ppm)

18,6 (Me), 21,0 (Me), 26,8 (C_{2d}), 31,4 ($\text{C}_{9''}$), 35,0 35,5 35,6 (CH_2S $\text{C}_{6''}$ $\text{C}_{5''}$), 36,7 37,2 (C_{1d} C_{3d}), 38,5 ($\text{C}_{8''}$), 65,3 ($\text{C}_{5''}$), 72,3 ($\text{C}_{1''}$), 74,0 74,1 74,4 (C_2' C_3' $\text{C}_{3''}$), 83,4 ($\text{C}_{4'}$), 87,8 ($\text{C}_{1'}$), 118,6 (C_{qA}), 142,8 (C_8), 145,4 (C_2), 150,0 (C_{qA}), 173,1 174,1 174,8 ($\text{C}_{4''}$ COCH_2S $\text{C}_{7''}$)

Obtention du composé 34

Ce composé est issu du composé **26** (67,00 mg, 67,32 μ moles). Après purification par CLHP, 25 mg de produits purs sont obtenus (gradient linéaire, t_R = 15,54 min).

Composé 34 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]butane-1,4-diamine

Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 100/0 → 60/40

Rdt : 41%

SM : (ESI, m/z) 894,5 (M-H)⁻

RMN ¹H : (D₂O, 300 MHz, δ ppm)

0,84 (s, 3H, Me), 0,95 (s, 3H, Me), 1,63 (m, 4H, H_{2d} H_{3d}), 2,48 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,3 Hz, H_{6''}), 2,68 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{9''}), 3,00 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7,2 Hz, H_{1d}), 3,24 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,7 Hz, H_{4d}), 3,27 (s, 2H, CH₂S), 3,36 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{8''}), 3,49 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,3 Hz, H_{5''}), 3,64 (m, 1H, H_{1''}), 3,90 (m, 1H, H_{1''}), 4,03 (s, 1H, H_{3''}), 4,29 (m, 2H, H_{5'}), 4,61 (m, 1H, H_{4'}), 4,88 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,21 (d, 2H, ³J_{H-H} = 5,3 Hz, H_{1'}), 8,44 (s, 1H, H₂), 8,67 (s, 1H, H₈)

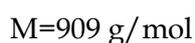
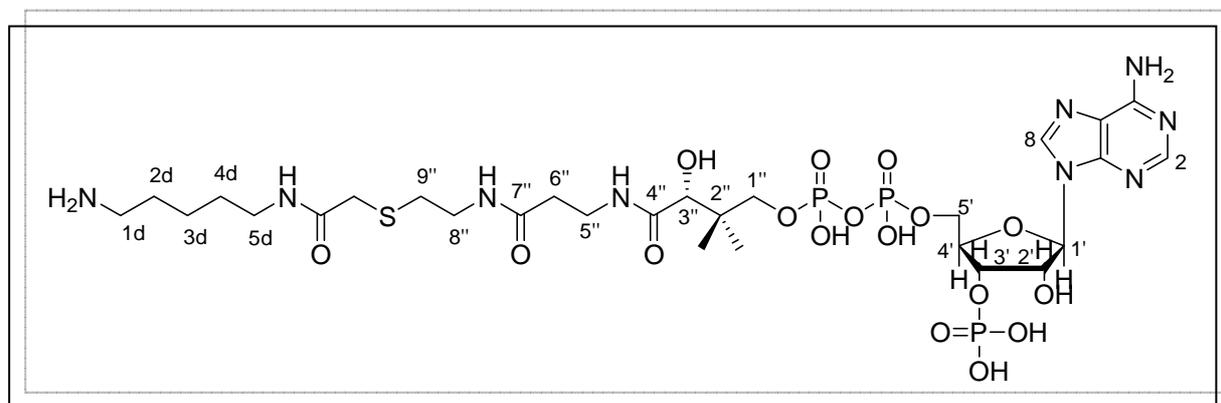
RMN ^{13}C : (D_2O , 75 MHz, δ ppm)

18,6 (Me), 21,1 (Me), 24,4 25,6 ($\text{C}_{2\text{d}}$ $\text{C}_{3\text{d}}$), 31,4 ($\text{C}_{9''}$), 35,1 35,6 35,7 (CH_2S $\text{C}_{6''}$ $\text{C}_{5''}$), 38,6 ($\text{C}_{8''}$), 39,2 39,3 ($\text{C}_{1\text{d}}$ $\text{C}_{4\text{d}}$), 65,3 (C_5'), 72,2 ($\text{C}_{1''}$), 74,2 74,4 74,5 ($\text{C}_{2'}$ C_3' $\text{C}_{3''}$), 83,3 (C_4'), 87,7 ($\text{C}_{1'}$), 143,0 (C_8), 144,8 (C_2), 150,1 (C_{qA}), 174,9 174,2 172,8 ($\text{C}_{4''}$ COCH_2S $\text{C}_{7''}$)

Obtention du composé 35

Le composé 35 est obtenu à partir du composé 27 (67,00 mg, 66,40 μmoles). Ce composé est purifié par CLHP pour donner 17 mg de produits purs (gradient linéaire, t_{R} = 15,45 min).

Composé 35 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]pentane-1,5-diamine



Condition de purification : TFA 0,05% / CH_3CN 100/0 \rightarrow 60/40

Rdt : 28%

SM : (ESI, m/z) 908,5 (M-H) $^-$

RMN ^1H : (D_2O , 300 MHz, δ ppm)

0,85 (s, 3H, Me), 0,96 (s, 3H, Me), 1,39 (m, 2H, $\text{H}_{3\text{d}}$), 1,55 (m, 2H, $\text{H}_{2\text{d}}$), 1,67 (m, 2H, $\text{H}_{4\text{d}}$), 2,49 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,3 \text{ Hz}$, $\text{H}_{6''}$), 2,69 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7 \text{ Hz}$, $\text{H}_{9''}$), 2,99 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7,6 \text{ Hz}$, $\text{H}_{1\text{d}}$), 3,21 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,9 \text{ Hz}$, $\text{H}_{5\text{d}}$), 3,26 (s, 2H, CH_2S), 3,36 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6 \text{ Hz}$, $\text{H}_{8''}$), 3,49 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}}$

= 6,3 Hz, H_{5''}), 3,65 (m, 1H, H_{1''}), 3,90 (m, 1H, H_{1''}), 4,04 (s, 1H, H_{3''}), 4,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,62 (m, 1H, H_{4'}), 4,90 (m, 2H, H_{2'} H_{3'}), 6,21 (d, 2H, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, H_{1'}), 8,44 (s, 1H, H₂), 8,67 (s, 1H, H₈)

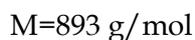
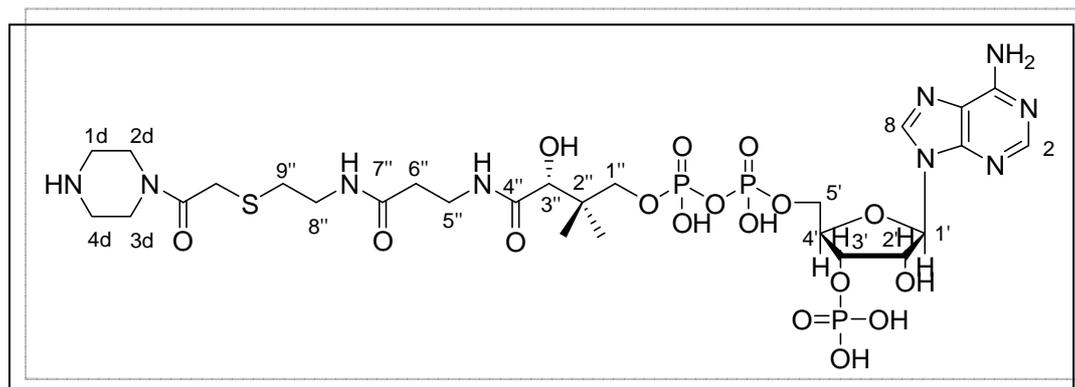
RMN ¹³C : (D₂O, 75 MHz, δ ppm)

18,6 (Me), 21,1 (Me), 23,2 (C_{3d}), 26,6 (C_{4d}), 28,0 (C_{2d}), 31,4 (C_{9''}), 35,1 35,6 35,7 (CH₂S C_{6''} C_{5''}), 38,6 (C_{8''}), 39,5 39,6 (C_{1d} C_{5d}), 65,2 (C_{5'}), 72,2 (C_{1''}), 74,1 74,4 74,5 (C_{2'} C_{3'} C_{3''}), 83,5 (C_{4'}), 87,7 (C_{1'}), 143,2 (C₈), 144,9 (C₂), 150,0 (C_{qA}), 172,7 174,2 175,0 (C_{4''} COCH₂S C_{7''})

Obtention du composé 36

Ce composé est préparé à partir du composé **28** (64,00 mg, 64,45 μmoles). Il est obtenu pur (20,00 mg) après purification par CLHP (gradient linéaire, t_R = 15,67 min).

Composé 36 N-[2-(S-coenzyme A)acétyl]pipérazine



Condition de purification : TFA 0,05% / CH₃CN 100/0 → 60/40

Rdt : 35%

SM : (ESI, m/z) 892,4 (M-H)⁻

RMN ^1H : (D_2O , 300 MHz, δ ppm)

0,85 (s, 3H, Me), 0,97 (s, 3H, Me), 2,50 (m, H_6''), 2,74 (m, 2H, H_9''), 3,27 - 3,53 (m, 8H, H_{1d} H_{2d} H_{3d} H_{4d}), 3,48 - 3,59 (m, 4H, CH_2S H_8''), 3,65 (m, 1H, $\text{H}_{1''}$), 3,87 (m, 3H, $\text{H}_{1''}$ $\text{H}_{5''}$), 4,04 (s, 1H, $\text{H}_{3''}$), 4,30 (m, 2H, H_5), 4,62 (m, 1H, H_4), 4,89 (m, 2H, H_2' H_3'), 6,23 (d, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 5,2$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 8,46 (s, 1H, H_2), 8,68 (s, 1H, H_8)

RMN ^{13}C : (D_2O , 75 MHz, δ ppm)

18,3 (Me), 20,9 (Me), 31,1 (C_9''), 32,5 (CH_2S), 35,4 35,5 (C_6'' C_5''), 38,2 38,9 42,9 43,1 (C_{1d} C_{2d} C_{3d} C_{4d} C_8''), 64,9 (C_5'), 72,0 ($\text{C}_{1''}$), 74,1 74,2 74,3 (C_2' C_3' C_3''), 82,8 (C_4'), 87,5 ($\text{C}_{1'}$), 142,3 (C_8), 144,4 (C_2), 149,8 (C_{qA}), 170,5 174,0 174,7 (C_4'' COCH_2S C_7'')

MATÉRIELS ET MÉTHODES : ENZYMOLOGIE

Matériels

☐ Matériels communs aux expériences

L'eau utilisée pour la préparation des milieux et des diverses solutions est déminéralisée à l'aide d'un appareil de filtration Millipore (PURELAB maxima, ELGA labwater).

La stérilisation du matériel est effectuée en autoclave.

☐ Produits et Matériels pour la production et la purification d'enzyme de fusion

Un plasmide de type pGEX-6P-3 porteur du gène de résistance au chloramphénicol, du gène codant pour p300 (1284-1660), d'un gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur inductible à l'isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) a été construit à Montpellier par le Dr. Banères (Institut des biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier). Ce plasmide code pour l'enzyme p300 (1284-1660) avec une étiquette Glutathion S-Transférase (GST) dans la partie N-terminale et une étiquette 6-Histidines dans la partie C-terminale.

p300 (résidus 1284-1660) avec une étiquette 6-Hist et GST	Séquence (Annexe 3)	68 000 Da $\varepsilon = 69\,070\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
--	---------------------	---

Des colonies de bactéries *Escherichia coli* (*E.coli*) de souche BL21 contenant de l'ADN recombinant de PCAF (1-832, étiquette GST en N-terminale) et ampicilline résistant, des extraits nucléaires de cellules HeLa (mélange d'HATs) ainsi que de la protéine PCAF accrochée sur des billes d'agarose-GST nous ont été données par une collaboratrice, le Dr. Briet (Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, équipe du Dr. Trouche).

PCAF (résidus 1-832) avec une étiquette GST	Séquence (Annexe 4)	93 013 Da sans la GST 119 013 Da avec la GST
--	---------------------	---

Les différents sels utilisés pour la préparation du milieu de culture minimal 9 (milieu M9) ou des tampons proviennent de plusieurs fournisseurs : Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa-Aesar, Accros et SDS.

Les cellules bactériennes *E.coli* de souche rosetta(DE3) ainsi que le milieu enrichi SOC (composé de 2% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM de glucose) sont fournis par VWR.

Les milieux de cultures Lennox Broth Base® (LB) et Lennox Broth Agar (LB agar) ont été commandés chez Invitrogen. Les antibiotiques, ampicilline (sel de sodium) et chloramphénicol, proviennent de chez Sigma. L'IPTG vient de chez Acros et le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) a été fourni par Alfa-aesar.

La chromatographie d'affinité est réalisée à l'aide d'une suspension de billes d'agarose couplées au glutathion (Glutathione Sepharose 4 Fast flow, capacité de liaison : 10 mg de protéine/mL, taille des particules : 90 µM) commandée chez Amersham.

Les gels de polyacrylamide à 10% utilisés viennent de chez Gene application LTD (protein GeBaGel, 8 cm x 7,5 cm, 10 puits). La coloration des protéines du gel est réalisée avec un révélateur à base de bleu de Coomassie en provenance de chez Fermentas. Le marqueur de taille, mélange de protéines colorées de poids moléculaire connu, provient également de chez Fermentas.

La membrane de dialyse (Spectra/Por 4 dialysis membrane, MWCO : 12 000-14 000 Da) est fournie par Spectrumlabs®.

Le réactif de Bradford a été commandé chez Sigma. Le sérum albumine bovin a été commandé chez Bio-Rad.

Les tubes de concentration (Nanosep, filtre 30 kDa) proviennent de chez Pall corporation.

❑ Produits et matériels pour l'enzymologie

L'acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) a été commandé chez Alfa-aesar.

Les histones totales sont issues du thymus du veau (type IIA) et ont été fournies par Sigma.

L'[³H]acétylcoenzyme A (250 µCi, 4,1 Ci/mmol) provient de chez Amersham.

Le papier de chromatographie Whatman est de type P-81, nous y ferons référence sous le nom de papier Whatman.

Le liquide de scintillation Ecolume™ provient de chez MP Biomedicals.

L'enzyme p300 (1284-1673) commerciale et le peptide H3-19 ont été fournis par Biomol. International. Le peptide H4-8 a été commandé chez Millegen et il a également été synthétisé sur support solide au sein de l'équipe (Dr. Baudoin C.).

	Séquence	Poids moléculaire
p300 (résidus 1284-1673)	(Annexe 5)	45 100 Da
H4-8 (résidus 14-21 de la partie N-terminale de l'histone humaine H4)	Ac-GA ¹⁶ KRHR ²⁰ KV-NH ₂	991,6 Da
H3-19 (résidus 5- 23 de la partie N-terminale de l'histone humaine H3)	Ac-QTAR ⁹ KSTGG ¹⁴ KAPR ¹⁸ KQLAT ²³ K-NH ₂	2068,4 Da

❑ Milieux de culture et tampons

Le milieu de culture LB est préparé comme indiqué par le fabricant.

Le milieu de culture minimal M9 est composé de : Na₂HPO₄·7H₂O (48 mM), KH₂PO₄ (22 mM), NaCl (8,6 mM), NH₄Cl (18,7 mM), MgSO₄ (3 mM) et CaCl₂ (100 µM).

Les différents tampons utilisés sont décrits ci-dessous :

Tampon phosphate (PBS) pH 7,3	Tampon d'éluion pH 8
140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄	50 mM Tris-HCl 25 mM glutathion réduit
Tampon de dialyse pH 7,9	Tampon PCAB pH 7,9
20 mM Tris-HCl 0,5 mM EDTA 100 mM KCl 10% de glycérol	50 mM HEPES 0,1 mM EDTA 50 µg/mL BSA
Tampon IPH pH 8	Tampon carbonate
50 mM Tris base 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% NP40	NaHCO ₃ 50 mM, pH 11,5 Na ₂ CO ₃ 50 mM, pH 7,8
Solution pour l'électrophorèse	Tampon Q
25 mM Tris base 192 mM glycine 0,1% SDS	3,2 M guanidinium-HCl (agent dénaturant) dans un tampon phosphate (Na ₂ HPO ₄ 100 mM + NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 6,8)

La solution de PMSF est préparée dans de l'éthanol absolu et conservée à -20°C. Les solutions de glucose (solution à 20%), d'IPTG (solution à 0,1 M) et d'antibiotiques (solutions à 100 mg/mL pour l'ampicilline et à 34 mg/mL pour le chloramphénicol) sont préparées dans l'eau.

Avant dépôt des échantillons sur le gel, ces derniers sont mélangés à une solution dénaturante composée de Tris base (200 mM), de glycérol (10%), de SDS (2%), de β-mercaptoéthanol (0,2%) et de bleu de bromophénol (0,2%).

La solution de DTNB utilisée dans les tests est à 20 mM. Elle est préparée dans un tampon phosphate (Na₂HPO₄ 100 mM + NaH₂PO₄ 100 mM) à pH 6,8 et contient 10 mM d'EDTA.

Méthodes

N.B : Les expériences utilisant l'élément radioactif ont été réalisées par le Dr. Briet, habilitée à manipuler la radioactivité, et ont été effectuées dans établissement agréé, l'IBCG.

□ Transformation des cellules rosetta(DE3) compétentes par choc thermique

La transformation est un transfert génétique au cours duquel l'ADN libre, nu en solution est introduit dans une bactérie réceptrice. *E.coli*, la bactérie réceptrice, n'est pas naturellement compétente, c'est-à-dire qu'elle n'est pas apte à capturer l'ADN environnant. Afin de permettre la pénétration du plasmide dans la bactérie, nous avons utilisé une technique qui consiste à placer les bactéries dans un milieu riche en calcium et à faire subir au mélange un choc thermique.

Protocole

Les manipulations ont été faites sous une atmosphère stérilisée par la flamme d'un bec Bunsen. Le tube, les pointes de pipetman et la boîte de pétri contenant le LB Agar ont été stérilisés. Les bactéries et le plasmide sont placés dans la glace pendant 15 min. Dans un tube :

- 20 μ L de cellules sont introduites,
- 2 μ L d'ADN recombinant sont ajoutés, le tube est agité, centrifugé et placé dans la glace 5 min,
- le tube est placé exactement 30 s dans un bain marie à 42°C,
- puis le tube est placé 2 min dans la glace.

Une fois ce laps de temps écoulé, 80 μ L de SOC sont ajoutés dans le tube et celui-ci est incubé, sous agitation, à 35°C pendant 1h. Dans une boîte de pétri contenant une gélose de LB-Agar-Ampicilline à 100 μ g/mL, 100 μ L de bactéries transformées y sont déposées et étalées, puis la boîte est incubée à 37°C toute la nuit.

□ Production de p300 (1284-1660) fusionnée à la GST

Le matériel utilisé a été stérilisé et les manipulations sont effectuées sous atmosphère stérilisée par un bec Bunsen. La mise au point du protocole de production de cette enzyme ainsi que les tests de viabilité de cette méthode ont été réalisés à Montpellier par le Dr. Banères.

Protocole

Deux ou trois colonies sont prélevées sur le gel de LB Agar et sont inoculées à une mini-culture constituée de 5 mL de LB, de chloramphénicol à 34 µg/mL et d'ampicilline à 100 µg/mL. Le milieu est agité la journée à 37°C. Par la suite, une pré-culture est débutée par ensemencement de 50 µL de mini-culture dans 50 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et du chloramphénicol (34 µg/mL). Le milieu est agité la nuit à 35°C.

La culture de p300 est réalisée dans 2 x 500 mL de milieu M9, auquel est ajouté une solution de glucose (0,2% finale), du chloramphénicol (34 µg/mL), de l'ampicilline (100 µg/mL) et 500 µL de pré-culture. La croissance des cellules s'effectue à 35°C, jusqu'à la phase de croissance exponentielle ($DO_{600nm} = 0,5-0,7$). La production de p300 est induite par l'IPTG (0,1 mM finale) et du glucose est ajouté au milieu de culture (0,2% finale). L'induction s'effectue à 25°C et dure 5h à la suite desquelles les cellules sont centrifugées 10 min à 7500 rpm, à 4°C. Les culots cellulaires sont repris dans du tampon PBS froid (4°C), centrifugés à nouveau et placés à -80°C.

□ Purification de p300 (1284-1660) de fusion par chromatographie d'affinité

Toutes les manipulations sont réalisées à 4°C.

Protocole

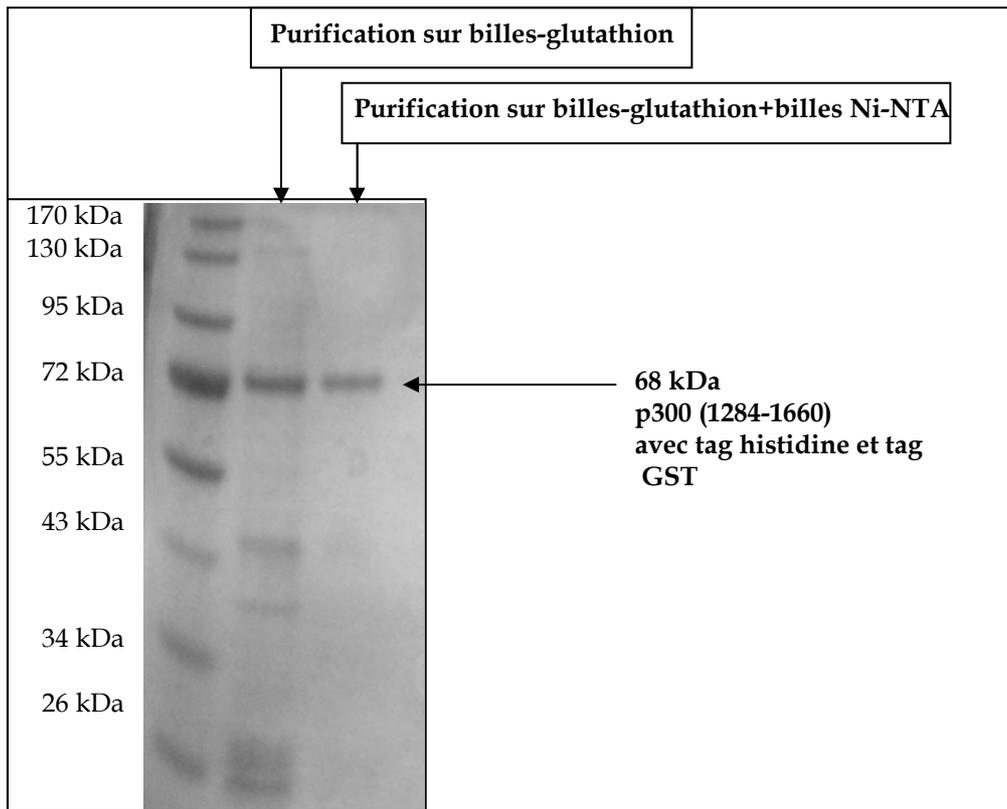
Les culots cellulaires initialement à -80°C, sont décongelés dans de la glace pendant 30 min. Puis ils sont solubilisés dans 20 mL de tampon PBS auquel une solution de PMSF (1mM finale) est ajoutée. Les cellules de la solution obtenues sont lysées en discontinu 5 x 30 secondes avec 30 secondes de pause entre chaque pulsation (sonicateur Vibra cell-Bioblock Scientific, 50% du cycle actif, puissance 3). Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation pendant 30 min à 10 000 rpm. Le surnageant est récupéré et est mis en contact,

sous agitation douce, durant une nuit avec 400 μ L de la suspension de bille d'agarose couplée au glutathion, préalablement lavées avec du tampon PBS (5 x 1 mL). Cette mise en contact permet à la partie GST de p300 de se fixer à son substrat, le glutathion. Le mélange surnageant+bille est déposé dans une colonne ouverte munie d'un robinet. Les billes-glutathion-GST-p300 sont lavées avec 2 x 20 mL de tampon PBS. Les billes sont ensuite éluées avec 1,7 mL (fraction 1) + 1,7 mL (fraction 2) d'une solution de glutathion (tampon d'élué). Les fractions sont réunies et placées dans un tube de dialyse d'une longueur appropriée. La membrane est ensuite placée dans 1L de tampon de dialyse sous agitation. Deux dialyses sont réalisées, la première d'une durée de 7h, l'autre dure toute la nuit. Suite à la dialyse, la protéine en solution (1,5 mL) est récupérée et une électrophorèse sur gel est alors effectuée. Un premier gel montre que la protéine est contenue dans la fraction 1 qui est alors concentrée 10 fois par centrifugation (8000 rpm) dans un tube de concentration. La protéine est ensuite conservée à -80°C.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire, par migration sous l'effet d'un courant électrique. Le protocole suivi est celui fourni avec l'appareil à électrophorèse (appareil GebaRunner, Gene Bio-Application Ltd). Les échantillons sont préparés et déposés sur le gel. La migration a lieu sous une tension de 160 mV pendant 1h30. Le gel est ensuite séparé de sa cassette et lavé à l'eau 3 x 15 min. Puis il est recouvert de colorant et teinté sous agitation pendant 1h. Enfin, le gel est décoloré à l'eau et seuls les complexes protéines-Bleu de Coomassie restent teintés.

Sur le gel ci-dessous, on peut voir la fraction protéique concentrée et la bande correspondant à p300 (1284-1660).



Gel de polyacrylamide après électrophorèse (à gauche : échelle de taille, à droite : échantillon contenant p300 purifiée)

□ Production de PCAF (1-832) fusionnée à la GST

Le matériel utilisé a été stérilisé et les manipulations sont effectuées sous une atmosphère stérilisée par un bec Bunsen. Les bactéries contiennent l'ADN codant pour la protéine PCAF entière fusionnée avec la GST.

Protocole

Deux ou trois colonies sont prélevées sur le gel de LB Agar et sont inoculées à une mini-culture constituée de 3 ml de LB d'ampicilline à 100 µg/mL. Cette mini-culture est agitée la journée à 37°C. Une pré-culture est préparée en inoculant 50 µL de mini-culture à 50 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL finale). La croissance des cellules se déroule sous agitation pendant une nuit à 35°C.

La culture de PCAF est effectuée dans 3 x 500 mL de milieu LB auxquels sont ajoutés une solution de glucose (20% finale), de l'ampicilline (100 µg/mL) et 500 µL de pré-culture. La

croissance des cellules s'effectue à 35°C jusqu'à la phase de croissance exponentielle ($DO_{600nm} = 0,5-0,7$). La production de PCAF est induite par ajout d'IPTG (0,1 mM finale). L'induction s'effectue à 25°C et dure 5h à la suite desquelles les cellules sont récoltées par centrifugation 10 min à 7500 rpm. Les culots cellulaires sont suspendus dans du tampon PBS, centrifugés à nouveau et placés à -80°C.

□ Purification de PCAF (1-832) de fusion par chromatographie d'affinité

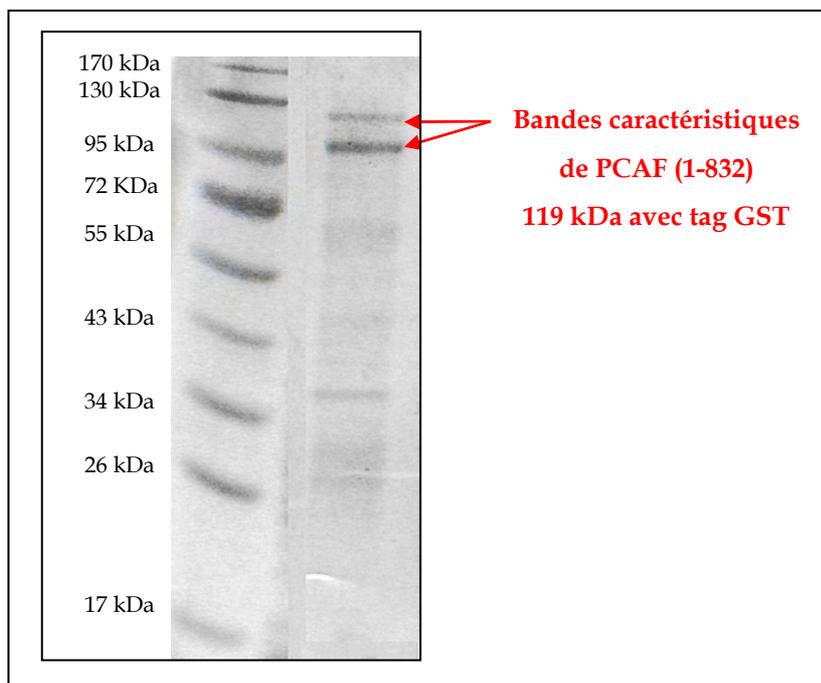
Chaque étape de la procédure de purification est réalisée à 4°C.

Protocole

Les culots cellulaires initialement à -80°C, sont décongelés dans de la glace pendant 30 min. Les culots de cellules sont repris dans 20 mL de tampon PBS+PMSF (1 mM finale) et lysés en discontinu 5 x 30 secondes avec 30 secondes de pause entre chaque pulsation (sonicateur Vibra cell-Bioblock Scientific, 50% du cycle actif, puissance 3). Le lysat obtenu est centrifugé 30 min à 10 000 rpm afin de séparer les débris cellulaires de la protéine qui se retrouvera dans le surnageant. La purification démarre avec l'ajout de 400 µL de bille-glutathion au surnageant. Le contact entre bille et surnageant est maintenu sous agitation durant une nuit. Ce mélange est ensuite placé dans une colonne et le surnageant est évacué. Les billes restées sur la membrane de la colonne, sont lavées avec 4 x 30 mL de tampon PBS. Le décrochage de PCAF est effectué par élution avec 1,7 mL (fraction 1) + 1,7 mL (fraction 2) + 1mL (fraction 3) de tampon d'élution. Aucune dialyse n'est réalisée pour PCAF. Une première électrophorèse sur gel est effectuée et montre que la protéine est contenue dans la première fraction qui est alors concentrée 10 fois, par centrifugation, à l'aide d'un tube de concentration. La protéine est introduite dans un tube, 20 µL de glycérol y sont ajoutés et la tube est placé à -80°C.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le protocole est le même que celui appliqué pour p300. Les bandes caractéristiques de PCAF sont observées entre 95 et 130 kDa, une bande correspondant à l'enzyme avec l'étiquette GST, l'autre correspondant à l'enzyme sans étiquette.



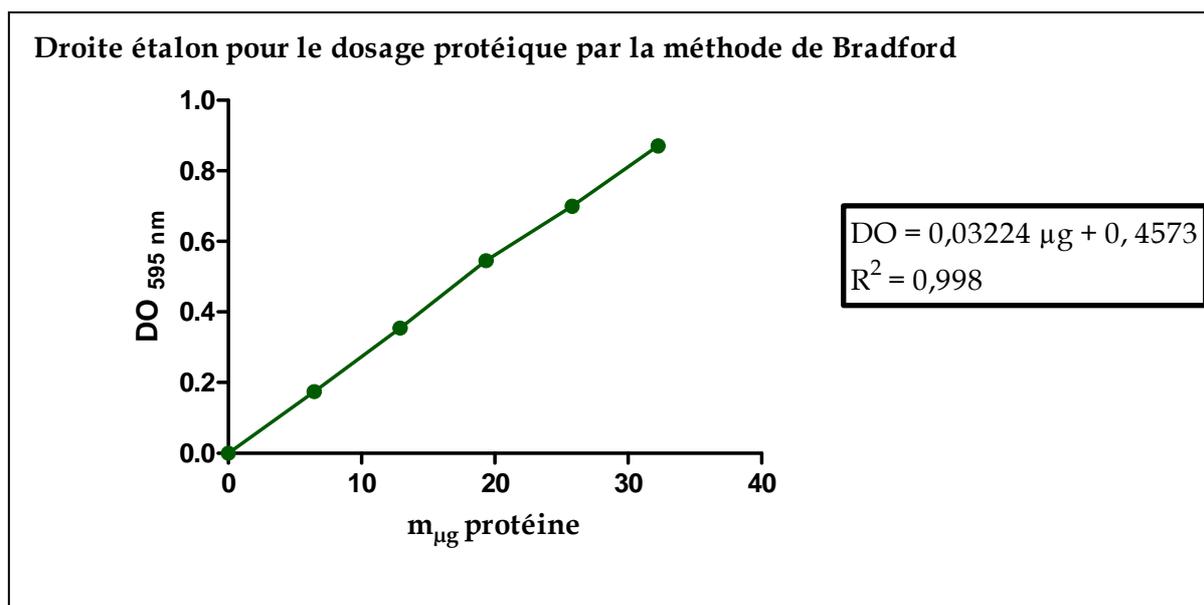
Gel de polyacrylamide après électrophorèse (à gauche : échelle de taille, à droite : échantillon contenant pCAF purifiée)

□ Dosage des protéines p300 (1284-1660) et PCAF (1-832)

La méthode de dosage utilisée pour quantifier p300 et PCAF est la technique de Bradford. Cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction qui se produit entre le réactif, le bleu de coomassie et les protéines. Le réactif rouge/brun donne une coloration bleue en présence de protéines. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon. Cette méthode est sensible et permet de détecter des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$.

Protocole

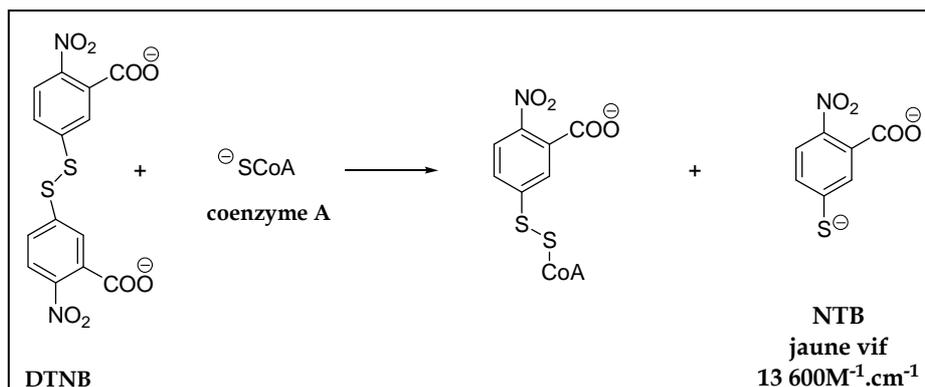
Afin de déterminer la quantité d'enzyme obtenue à l'issue de la production, une courbe étalon est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA). La gamme d'étalonnage préparée contient 750 μL de réactif de Bradford + 0, 5, 10, 15, 20, 25 μg de BSA et chaque échantillon est complété à 775 μL avec de l'eau. Après 10 min d'incubation, la DO est mesurée à 595 nm. La droite étalon typique obtenue est la suivante :



Le dosage de l'enzyme produite (p300 ou PCAF) se fait par la mesure de la DO d'une solution contenant 750 μL de réactif de Bradford et 25 μL de solution contenant la protéine.

□ Test de l'activité catalytique de p300 (1284-1660)

Afin de vérifier si l'enzyme produite est active, un test HAT a été réalisé suivant une méthode colorimétrique décrite par Thompson et al. (Thompson et al, 2004). Cette technique, non radioactive consiste à doser la quantité de coenzyme A produite à l'issue de la réaction d'acétylation par p300. Il s'agit d'un dosage indirect, le groupement thiol du coenzyme A réagit avec le DTNB (réactif d'Ellman) produisant du 5'-thionitrobenzoate (NTB) qui est dosé par spectrophotométrie UV-visible à 412 nm. Un test composé du tampon PCAB, du peptide H4-8 (250 μM, 12,5 nmoles) et de l'acétylcoenzyme A (500 μM, 25 nmoles) dans un volume total de 50 μL a été effectué et sert de témoin négatif.



Réaction entre le DNTB et le coenzyme A

Protocole

Des solutions d'acétylcoenzyme A dans le tampon PCAB et de peptide H4-8 dans le tampon PCAB également, sont préparées. Le test est réalisé avec 250 μM (12,5 nmoles) de H4-8 et 500 μM (25 nmoles) d'acétylcoenzyme A, p300 (1,8 à 2,9 μM , 88 à 147 pmoles) dans un volume complété à 50 μL avec le tampon PCAB. La réaction est initialisée par l'ajout d'enzyme et dure 1h à 30°C. Ce laps de temps écoulé, la réaction est stoppée avec 100 μL de tampon Q et 50 μL de solution de DTNB sont immédiatement ajoutées. Le mélange est placé à 30°C pendant 5 min au bout desquelles 200 μL d'eau sont incorporés au milieu. La DO est alors relevée à 412 nm.

□ Tests d'activité HAT de PCAF (1-832)

L'activité enzymatique de PCAF a été vérifiée par une méthode radioactive utilisant le [³H]acétylcoenzyme A. Le test est réalisé dans le tampon IPH. Une solution du peptide H3-19 dans le tampon IPH est préparée et PCAF est diluée, si nécessaire, dans ce même tampon. Ce test consiste à mesurer la quantité de [³H]acétyl-peptide produite lors de la réaction d'acétylation par PCAF. La réaction est initiée par l'ajout d' [³H]acétylcoenzyme A. Le témoin négatif de ce test est constitué de tampon IPH, de peptide H3-19 (50 μM , 1,5 nmoles) et de [³H]acétylcoenzyme A (2 μM , 60 pmoles).

Protocole

Le milieu réactionnel, d'un volume total de 30 μL , composé de H3-19 (50 μM , 1,5 nmoles), de PCAF (144 nM, 4,3 pmoles) et de [³H]acétylcoenzyme A (2 μM , 60 pmoles) est incubé à 30 °C pendant 25 min. Après incubation, le milieu réactionnel est déposé sur du papier Whatman

P-81. Après deux lavages rapides au tampon carbonate (volume suffisant pour couvrir le papier), le papier est rincé pendant 30 min sous agitation à T° ambiante. Le papier est lavé rapidement à l'acétone et séché. Ce dernier est introduit dans un tube à scintillation contenant 4 mL de liquide de scintillation. Enfin le comptage est effectué.

□ Détermination du K_M pour le peptide H4-8 et p300 (1284-1660)

La valeur de la constante de Michaelis-Menten K_M permettant d'évaluer l'affinité de p300 pour son substrat H4-8 a été déterminée. Pour atteindre K_M , l'équation de Michaelis-Menten va être utilisée et nécessite que des valeurs de vitesse initiales V_0 soient déterminées. La méthode employée est radioactive et utilise de l' [3H]acétylcoenzyme A.

Equation de Michaelis - Menten : $V_0 = V_{max} [S]/K_M + [S]$

Ces tests seront réalisés avec l'enzyme commerciale p300 (1284-1673). La réaction d'acétylation se réalise dans le tampon IPH et dans un volume de réaction de 30 μ L. Les différentes valeurs de vitesses initiales V_0 ont été obtenues pour une concentration fixe d' [3H]acétylcoenzyme A à 2 μ M et pour les concentrations en peptide H4-8 suivantes : 2, 5, 10, 20, 50, 100 et 250 μ M (0,06 ; 0,15 ; 0,3 ; 0,6 ; 1,5 ; 3 ; 7,5 nmoles). La réaction est initiée par l'ajout d' [3H]acétylcoenzyme A.

Protocole

Le milieu réactionnel, d'un volume total de 30 μ L, composé de tampon IPH, H4-8, de p300 (296 nM, 8,9 pmoles) et d' [3H]acétylcoenzyme A (2 μ M, 60 pmoles) est incubé à 30 °C pendant 25 min. Après incubation, le milieu réactionnel est déposé sur du papier Whatman P-81. Après deux lavages rapides au tampon carbonate, le papier est rincé pendant 30 min sous agitation à température ambiante. Le papier est lavé rapidement à l'acétone et séché. Ce dernier est introduit dans un tube à scintillation contenant 4 mL de liquide de scintillation. Enfin le comptage est effectué.

Les données obtenues ont été modélisées par régression non-linéaire à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. La valeur obtenue de K_{est} est de $29 \pm 9 \mu$ M.

□ Détermination de la concentration en inhibiteur nécessaire à l'inhibition de 50% de l'activité HAT (IC₅₀) de p300 (1284-1673)

Méthode non radioactive

Les concentrations nécessaires pour inhiber 50% de l'activité HAT de p300 ont été déterminées pour chacun des inhibiteurs à l'aide du test avec le DTNB. La concentration en inhibiteur a été déterminée par dosage spectrophotométrique en assumant $\epsilon = 16\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le coefficient d'extinction molaire à 259 nm. Les valeurs de DO sont relevées à 412 nm, et il a été vérifié que les inhibiteurs n'absorbent pas à cette longueur d'onde. Des tests réalisés avec de l'enzyme dénaturée (par chauffage, 10 min à 95°C) montrent que cette dernière n'apporte aucune contribution à la valeur d'absorbance relevé à 412 nm. Pour chaque inhibiteur, un témoin négatif composé du tampon PCAB, du peptide H4-8 (250 μM , 12,5 nmoles) et de l'acétylcoenzyme A (500 μM , 25 nmoles) dans un volume total de 50 μL a été effectué. De plus, pour chaque série de mesures correspondant à un inhibiteur, un témoin positif sans inhibiteur comprenant le tampon PCAB, du peptide H4-8 (250 μM , 12,5 nmoles), de l'acétylcoenzyme A (500 μM , 25 nmoles) et p300 (0,35 μM , 17,7 pmoles) dans un volume total de 50 μL a été mis en place.

Protocole

L'enzyme commerciale p300 (1284-1673), le peptide H4-8 et les divers inhibiteurs sont préalablement dilués ou préparés dans le tampon PCAB et conservés dans la glace. Le milieu réactionnel d'un volume total de 50 μL est constitué :

- De peptide H4-8 (250 μM , 12,5 nmole)
- D'acétylcoenzyme A (500 μM , 25 nmoles)
- D'inhibiteur (Lys-CoA, **1a**, **1b**, composés **25** à **36**, **DS1** (Soupaya D., 2007))
- De p300 (0,35 μM , 17,7 pmoles)
- De tampon PCAB,

Les réactifs sont introduits dans l'ordre dans lequel ils sont cités. La réaction est initiée par l'enzyme. Le milieu réactionnel est incubé 1h à 30°C puis la réaction est stoppée avec 100 μL de tampon Q et 50 μL de solution de DTNB sont ajoutées juste après. Le mélange est placé à 30°C pendant 5 min au bout desquelles 200 μL d'eau sont ajoutés au milieu. La DO est alors mesurée à 412 nm. Les inhibiteurs testés, les concentrations utilisées et l'activité HAT résiduelle mesurée en présence d'inhibiteur (%AR), sont consignés dans le tableau suivant :

Inhibiteur		Concentration en μM						
Lys-CoA	2	4	6	10	25			
% AR	10	25	100	150				
1a	10	25	100	150				
% AR	92	73	49	19				
1b	10	25	50	100	150			
% AR	54	51	25	19	6			
25	1	25	50	100				
% AR	51	35	17	7				
26	0,5	2	10	25	100			
% AR	74	62	27	15	5			
27	2	6	10	25	100			
% AR	51	23	18	5	3			
28	10	25	100	200				
% AR	97	80	66	26				
29	0,5	1	10	25	100			
% AR	100	91,5	38	18	5			
30	2	6	10	25	100			
% AR	57	39	31	16	7			
31	6	10	25	100				
% AR	22	10	5,5	1				
32	10	20	60	100	200			
% AR	90	84	46	49	25			
33	2	10	25	100				
% AR	63	46	32,5	13				
34	2	10	25	100				
% AR	55	38	17	4				
35	2	6	10	25	100			
% AR	65	43	41,5	18	3			
36	25	50	75	150				
% AR	45	39	18	1				
DS1	10	25	100	150	200	300	400	500
% AR	87,5	84,5	69,5	65	44,5	36	28	27

Méthode radioactive

L'enzyme commerciale p300 (1284-1673), le peptide H4-8 et les divers inhibiteurs sont préalablement dilués dans le tampon IPH dans lequel les réactions ont lieu. Les composés **25** à **36**, **DS1** (Soupaya D., 2007), **DS2** (Soupaya D., 2007), **CLI.46** (Dr. Lherbet C.) ainsi que la référence Lys-CoA ont été testés. Les tests sont réalisés avec des concentrations en inhibiteurs aléatoires, non prises dans l'ordre, sur 2 jours différents en tenant de l'activité de l'enzyme du jour. Un témoin négatif contenant le tampon IPH, le peptide H4-8 (267 μM , 8 nmoles) et le [^3H]acétylcoenzyme A (2 μM , 60 pmoles) ainsi qu'un contrôle positif constitué de tampon IPH, de peptide H4-8 (267 μM , 8 nmoles), de [^3H]acétylcoenzyme A (2 μM , 60 pmoles) et de p300 commerciale (296 nM, 8,9 pmoles), dans un volume total de 30 μL , ont été réalisés pour chaque série de mesure associée à un inhibiteur.

Protocole

Dans un tube en plastique, sont introduits dans l'ordre, le tampon IPH, le peptide H4-8 (267 μM , 8 nmoles), l'inhibiteur (concentrations variables), p300 (296 nM, 8,9 pmoles) et l'acétylcoenzyme A (2 μM , 60 pmoles). La réaction est initiée avec l'ajout de [^3H]acétylcoenzyme A. Le milieu, d'un volume total de 30 μL , est placé 25 min à 30 °C à l'issue desquelles il est déposé sur du papier Whatman P-81. Ce papier est lavé rapidement deux fois avec du tampon carbonate puis lavé durant 30 min sous agitation avec ce même tampon, à T° ambiante. Puis, le papier est rincé rapidement à l'acétone et séché. Enfin, le papier est introduit dans un tube à scintillation contenant 4 mL de liquide de scintillation et le comptage est effectué.

Le tableau suivant donne l'activité HAT observée (%AR) après 25 min d'incubation avec l'inhibiteur.

Inhibiteur	Concentration en μM						
DS1	1	10	50	100	200	500	1000
% AR	100	100	100	74	64	18	8
DS2	1	10	50	100	200	1000	2000
% AR	100	100	100	100	100	41	26
CLI.46	0,1	1	5	10	50	100	500
% AR	100	92	90	39,5	11	17	10

Inhibiteur		Concentration en μM					
Lys-CoA	0,25	0,5	1	2	10		
% AR	67	61	35	25			
1a	10	30	50	100	200		
% AR	98	27	30	15	6,5		
1b	1	2	5	10	20	50	100
% AR	55	37	16	15	5	2	2
25	0,5	2	5	10	20	100	
% AR	84	71	42	25,5	17	6	
26	0,2	0,5	1	10			
% AR	59	51	23	0			
27	0,1	0,5	2	10			
% AR	40	26	13	0			
28	5	10	30	40	50	200	500
% AR	100	100	89	97	83	45	27
29	0,5	1	5	10	20		
% AR	60	38	1	9	0		
30	0,1	0,25	0,5	2	10		
% AR	64	55	59	32	6,5		
31	0,1	0,2	0,5	2	10		
% AR	80	63	35	14	1		
32	5	10	15	20	40	100	200
% AR	84	97	79	67	41	20	12
33	0,1	0,3	0,5	1	10		
% AR	100	100	37	54	10		
34	0,1	0,2	0,5	2	10		
% AR	70	62	26	9,5	3		
35	0,2	0,3	0,5	1	10		
% AR	100	55	26	21	20		
36	1	2	5	10	20	100	200
% AR	100	100	74	72	43	12	9

□ Détermination de la concentration en inhibiteur nécessaire à l'inhibition de 50% de l'activité HAT de PCAF (IC₅₀)

L'enzyme produite PCAF (1-832), le peptide H3-19 et les divers inhibiteurs sont préalablement dilués ou préparés dans le tampon IPH dans lequel les réactions sont réalisées. Les composés **27**, **31**, **36**, **DS1**, ainsi que la référence Lys-CoA ont été testés avec des concentrations en inhibiteurs prise de façon aléatoire, sur 2 jours différents en tenant compte de l'activité de l'enzyme du jour. Un témoin négatif composé du tampon IPH, du peptide H3-19 (50 µM, 1,5 nmoles) et d'³H]acétylcoenzyme A (2 µM, 60 pmoles); ainsi qu'un contrôle positif constitué de tampon IPH, de peptide H3-19 (50 µM, 1,5 nmoles), d'³H]acétylcoenzyme A (2 µM, 60 pmoles) et de PCAF (144 nM, 4,3 pmoles) ont été effectués pour chaque série de mesure correspondant à un inhibiteur.

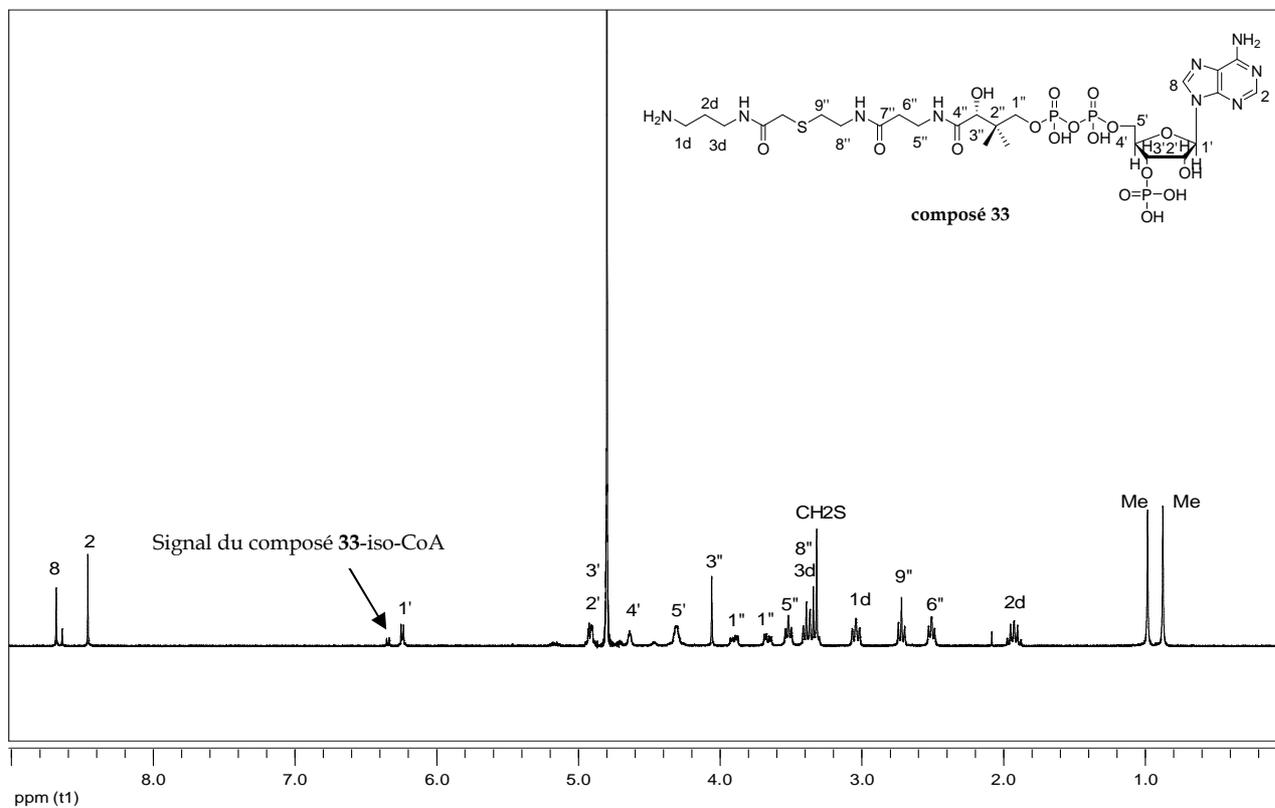
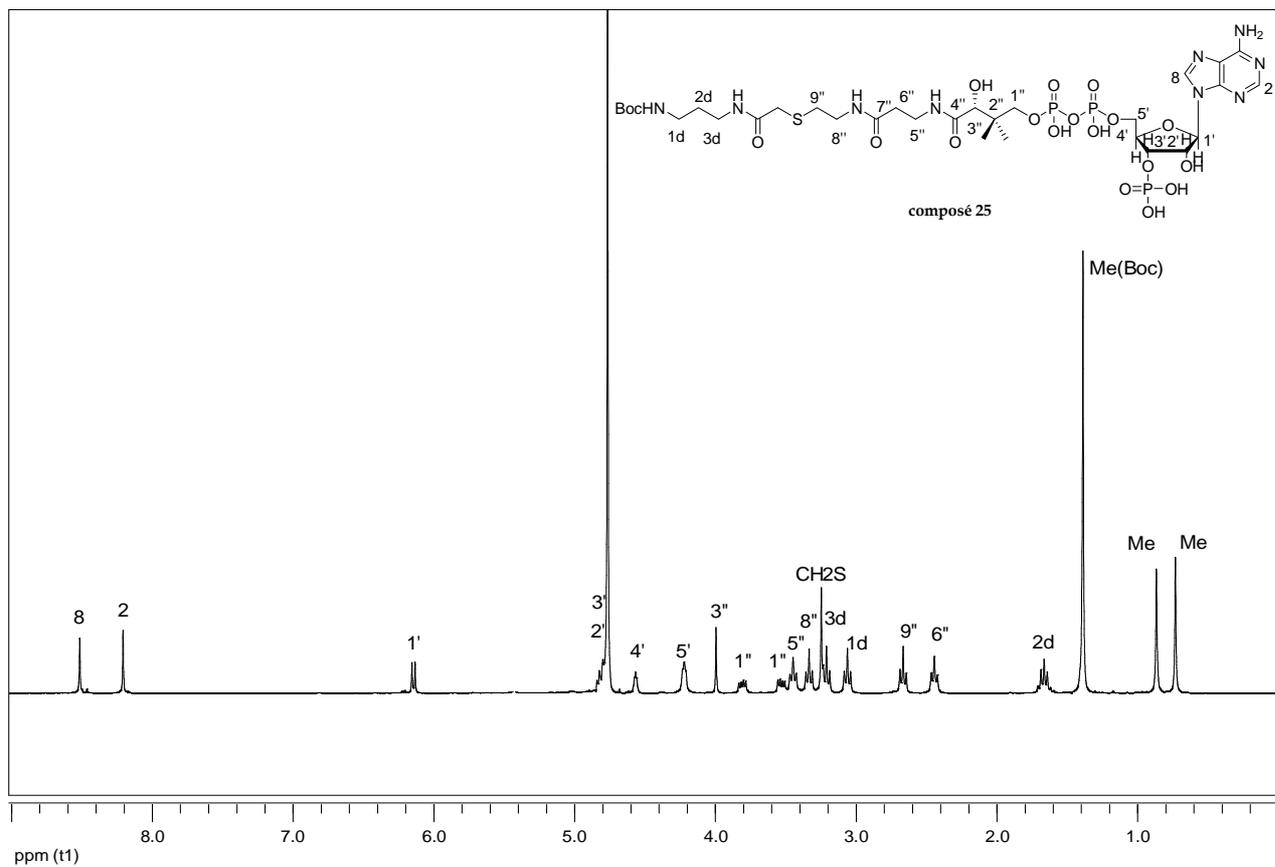
Protocole

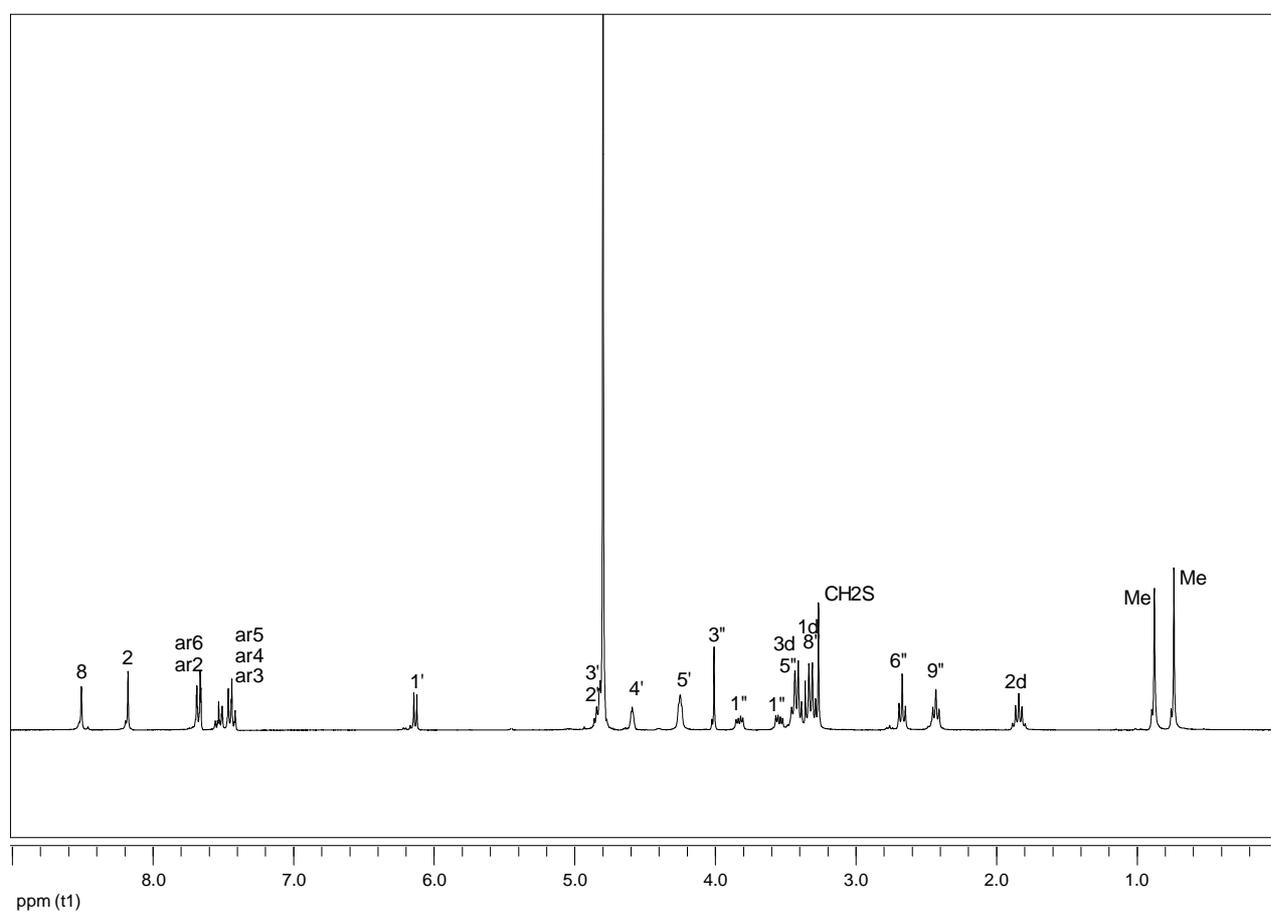
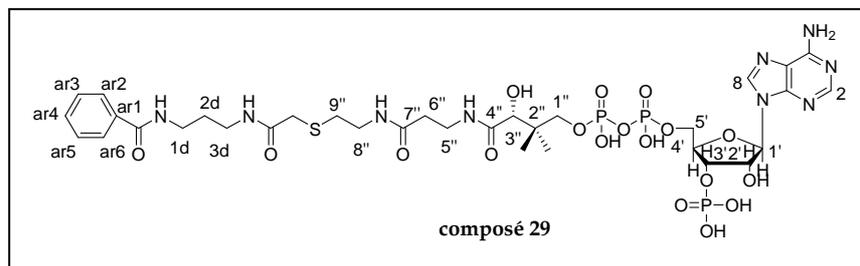
Le milieu réactionnel contenant du tampon IPH, du peptide H3-19 (50 µM, 1,5 nmoles), l'inhibiteur (concentrations variables), PCAF (144 nM, 4,3 pmoles), dont la réaction est initiée avec l'ajout d'³H]acétylcoenzyme A (2 µM, 60 pmoles), est placé 25 min à 30 °C. Puis, ce milieu est déposé sur du papier Whatman P-81. Ce papier est lavé rapidement deux fois au tampon carbonate puis lavé durant 30 min sous agitation avec ce même tampon, à température ambiante. Le papier est ensuite rincé rapidement à l'acétone et séché. Enfin, ce dernier est introduit dans un tube à scintillation contenant 4 mL de liquide de scintillation et le comptage est entrepris.

L'activité HAT observée (%AR) après 25 min d'incubation avec l'inhibiteur a été relevée et figure dans le tableau suivant :

Inhibiteur		Concentration en μM				
Lys-CoA	10	100	200	500	1000	
% AR	100	74	32	19	4	
27	0,1	2	10	100	500	
% AR	100	91	35	4	1	
31	0,1	2	10	100	500	
% AR	100	83	48	4,5	0	
36	0,2	2	10	100	500	
% AR	100	95	72	16	4	
DS1	0,1	2	10	100	500	
% AR	96,5	52	20	1	0	

ANNEXES

Annexe 1 : Spectre RMN ^1H des composés 25 et 33 (300 MHz, D_2O)

Annexe : 2 Spectre RMN ^1H du composé 29 (300 MHz, D_2O)

Annexe 3: Séquence du domaine HAT de p300 (1284-1660) (Montpellier, Dr. Banères)

1284-

KENKFSAKRLPSTRLGTFLENRVNDFLRRQNHPESEVTVRVVHASDKTVEVKPGM
KARFVDSGEMAESFPYRTKALFAFEEIDGVDLCCFFGMHVQEYGSDCPPPNQRRVYISYLD
VHFFRPKCLRTAVYHEILIGYLEYVKKLGYTTGHIWACPPSEGDDYIFHCHPPDQKIPKPKR
LQEWYKKMLDKAVSERIVHDYKDIFKQATEDRLTSAKELPYFEGDFWPNVLEESIKELEQE
EEERKREENTSNESTDVTKGDSKNAKKNNKTSKNKSSLSRGNKKKPGMPNVSNDLSQ
KLYATMEKHKEVFFVIRLIAGPAANSLPPIVDPDPLIPCDLMDGRDAFLTLARDKHLEFSSL
RRAQWSTMCMLVELHT-1660

Annexe 4 : Séquence de PCAF (1-832) (Toulouse, Dr. Briet)

1-

MSEAGGAGPGGCGAGAGAGAGPGALPPQPAALPPAPPQGSPCAAAAGGSGACGPATA
VAAAGTAEGPGGG GSARIAVKKA QLRAPRAKK LEKLGVYSAC KAEESCKCNG
WKNPNPSPTPPRADLQQIIV SLTESCRSCS HALAAHVSHL ENVSEEEMNR LLGIVLDVEY
LFTCVHKEEDADTKQVYFYL FKLLRKSILQ RGKPVVEGSL EKKPPFEKPS IEQGVNNFVQ
YKFSHLPAKERQTIVELAKMFLNRINYWHLEAPSQRRLRSPNDDISGYKE NYTRWLCYCN
VPQFCDSLPRYETTQVFGRT LLRSVFTVMR RQLLEQARQE KDKLPLEKRT LILTHFPKFL
SMLEEEVYSQNSPIWDQDFLSASSRSQLG IQTVINPPPV AGTISYNSTS SSLEQPNAGS
SSPACKASSGLEANPGEKRRKMTDSHVLEEAKKPRVMGDIPMELINEVMST ITDPAAMLGP
ETNFLSAHSARDEAARLEERRGVIEFHVVGNSLNQKPNKKILMWLVGLQNVFSQLPRM
PKEYITRLVFDPKHKTALALI DGRVIGGICFRMFPSQGFTE IVFCAVTSNE QVKGYGTHLM
NHLKEYHIKHDILNFLTYAD EYAIGYFKKQ GFSKEIKIPK TKYVGYIKDY EGATLMGCEL
NPRIPYTEFSVIIKKQKEIHKLIERKQAQIRKVYPGLSCFKDGVRQIPIESIPGIRETGWKPSGK
EKSKEPRDPDQLYS TLKSILQQVK SHQSAWPFME PVKRTEAPGY YEVIRFPMDL
KTMSERLKNRYVSKKLFMA DLQRVFTNCK EYNPPESEYY KCANILEKFF FSKIKEAGLI

DK-832

Annexe 5 : Séquence de l'enzyme p300 (1284-1673) commerciale

1284-

KENKFSAKRLPSTRLGTFLNVRVNDLRRQNHPESEVTVRVVHASDKTVEVKPGMKARF
VDSGEMAESFPYRTKALFAFEEIDGVD LCFFGMHVQEYGSDCPPPNQ RRVYISY LDS
VHFFRPKCLRTAVYHEILIGYLEYVKKLGYTTGHIWACPPSEGDDYIFHCHPPDQKIPKPKR
LQEWYKKMLDKAVSERIV HDYKDIFKQA TEDRLTSAKELPYFEGDFWP NVLEESIKEL
EQEEEERKREENTSNESTDVTKGDSKNAKKKNNKKT SKNKSSLSRGNKKKPGMPNVSND
LSQKLYATMEKHKEVFFVIRLAGPAANSLPPIVDPDPLIPCDLMDGRDAFLTLARDKHLEF
SSLRRAQWSTMCMLVELHT QSQDRFVYTC NEC-1673

BIBLIOGRAPHIE

Figure 1: Modifié de <http://academics.hamilton.edu/biology/kbart/image/nucleus.jpg>

Figure 3 : <http://cell.sio2.be/noyau/5.php>

Figure 6: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromatinEducFr.html>

Figure 8 : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Histone>

Aalfs JD, Kingston RE (2000) What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci* **25**(11): 548-555

Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* **20**(2): 56-59

Akhtar A, Becker PB (2001) The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep* **2**(2): 113-118

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794

Angus-Hill ML, Dutnall RN, Tafrov ST, Sternglanz R, Ramakrishnan V (1999) Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *J Mol Biol* **294**(5): 1311-1325

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**(5328): 965-968

Arany Z, Sellers WR, Livingston DM, Eckner R (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* **77**(6): 799-800

Avvakumov N, Cote J (2007) Functions of myst family histone acetyltransferases and their link to disease. *Subcell Biochem* **41**: 295-317

Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* **110**(1): 55-67

Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK (2004a) Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem* **279**(32): 33716-33726

Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK (2003) Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem* **278**(21): 19134-19140

Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK (2004b) Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of

- acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* **279**(49): 51163-51171
- Baneres JL, Martin A, Parello J (1997) The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J Mol Biol* **273**(3): 503-508
- Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**(6610): 641-643
- Bannister AJ, Kouzarides T (2005) Reversing histone methylation. *Nature* **436**(7054): 1103-1106
- Barnes PJ, Adcock IM, Ito K (2005) Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* **25**(3): 552-563
- Bedford MT (2007) Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* **120**(Pt 24): 4243-4246
- Berger SL (2001) An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. *Oncogene* **20**(24): 3007-3013
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 142-148
- Berndsen CE, Albaugh BN, Tan S, Denu JM (2007) Catalytic mechanism of a MYST family histone acetyltransferase. *Biochemistry* **46**(3): 623-629
- Biel M, Kretsovali A, Karatzali E, Papamatheakis J, Giannis A (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of a small-molecule inhibitor of the histone acetyltransferase Gcn5. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**(30): 3974-3976
- Blander G, Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* **73**: 417-435
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 769-784
- Bordoli L, Netsch M, Luthi U, Lutz W, Eckner R (2001) Plant orthologs of p300/CBP: conservation of a core domain in metazoan p300/CBP acetyltransferase-related proteins. *Nucleic Acids Res* **29**(3): 589-597
- Brady ME, Ozanne DM, Gaughan L, Waite I, Cook S, Neal DE, Robson CN (1999) Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem* **274**(25): 17599-17604
- Bresnick EH, Bustin M, Marsaud V, Richard-Foy H, Hager GL (1992) The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucleic Acids Res* **20**(2): 273-278
- Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Strahl BD (2002) Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**(6897): 498

- Brownell JE, Allis CD (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**(2): 176-184
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**(6): 843-851
- Burns KL, Gelbaum LT, Sullards MC, Bostwick DE, May SW (2005) Iso-coenzyme A. *J Biol Chem* **280**(17): 16550-16558
- Candau R, Moore PA, Wang L, Barlev N, Ying CY, Rosen CA, Berger SL (1996) Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol* **16**(2): 593-602
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**(5595): 1039-1043
- Cao X, Sudhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* **279**(23): 24601-24611
- Carapeti M, Aguiar RC, Goldman JM, Cross NC (1998) A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood* **91**(9): 3127-3133
- Cebat M, Kim CM, Thompson PR, Daugherty M, Cole PA (2003) Synthesis and analysis of potential prodrugs of coenzyme A analogues for the inhibition of the histone acetyltransferase p300. *Bioorg Med Chem* **11**(15): 3307-3313
- Champagne N, Bertos NR, Pelletier N, Wang AH, Vezmar M, Yang Y, Heng HH, Yang XJ (1999) Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* **274**(40): 28528-28536
- Champagne N, Pelletier N, Yang XJ (2001) The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene* **20**(3): 404-409
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**(3): 569-580
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**(5): 675-686
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**(6): 905-915
- Cheung WL, Turner FB, Krishnamoorthy T, Wolner B, Ahn SH, Foley M, Dorsey JA, Peterson CL, Berger SL, Allis CD (2005) Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **15**(7): 656-660

- Chimenti F, Bizzarri B, Maccioni E, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, Fioravanti R, Granese A, Carradori S, Tosi F, Ballario P, Vernarecci S, Filetici P (2009) A novel histone acetyltransferase inhibitor modulating Gcn5 network: cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone. *J Med Chem* **52**(2): 530-536
- Cleary J, Sitwala KV, Khodadoust MS, Kwok RP, Mor-Vaknin N, Cebrat M, Cole PA, Markovitz DM (2005) p300/CBP-associated factor drives DEK into interchromatin granule clusters. *J Biol Chem* **280**(36): 31760-31767
- Clements A, Poux AN, Lo WS, Pillus L, Berger SL, Marmorstein R (2003) Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol Cell* **12**(2): 461-473
- Clements A, Rojas JR, Trievel RC, Wang L, Berger SL, Marmorstein R (1999) Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *Embo J* **18**(13): 3521-3532
- Col E, Caron C, Chable-Bessia C, Legube G, Gazzeri S, Komatsu Y, Yoshida M, Benkirane M, Trouche D, Khochbin S (2005) HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *Embo J* **24**(14): 2634-2645
- Cole PA (2008) Chemical probes for histone-modifying enzymes. *Nat Chem Biol* **4**(10): 590-597
- Costi R, Di Santo R, Artico M, Miele G, Valentini P, Novellino E, Cereseto A (2007) Cinnamoyl compounds as simple molecules that inhibit p300 histone acetyltransferase. *J Med Chem* **50**(8): 1973-1977
- Creaven M, Hans F, Mutskov V, Col E, Caron C, Dimitrov S, Khochbin S (1999) Control of the Histone-Acetyltransferase Activity of Tip60 by the HIV-1 Transactivator Protein, Tat. *Biochemistry* **38**(27): 8826-8830
- Cress WD, Seto E (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* **184**(1): 1-16
- Cullis P, Wolfenden R, Cousens L, Alberts B (1982) Inhibition of histone acetylation by N-[2-(S-coenzyme A)acetyl] spermidine amide, a multisubstrate analog. *J Biol Chem* **257**(20): 12165-12169
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**(5): 545-553
- de la Barre AE, Gerson V, Gout S, Creaven M, Allis CD, Dimitrov S (2000) Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *Embo J* **19**(3): 379-391
- Deguchi K, Ayton PM, Carapeti M, Kutok JL, Snyder CS, Williams IR, Cross NC, Glass CK, Cleary ML, Gilliland DG (2003) MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell* **3**(3): 259-271

- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**(6815): 1001-1004
- Driscoll R, Hudson A, Jackson SP (2007) Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* **315**(5812): 649-652
- Dutnall RN, Tafrov ST, Sternglanz R, Ramakrishnan V (1998a) Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell* **94**(4): 427-438
- Dutnall RN, Tafrov ST, Sternglanz R, Ramakrishnan V (1998b) Structure of the yeast histone acetyltransferase Hat1: insights into substrate specificity and implications for the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 501-507
- Eliseeva ED, Valkov V, Jung M, Jung MO (2007) Characterization of novel inhibitors of histone acetyltransferases. *Mol Cancer Ther* **6**(9): 2391-2398
- Ericsson C, Grossbach U, Bjorkroth B, Daneholt B (1990) Presence of histone H1 on an active Balbiani ring gene. *Cell* **60**(1): 73-83
- Erwin BG, Persson L, Pegg AE (1984) Differential inhibition of histone and polyamine acetylases by multisubstrate analogues. *Biochemistry* **23**(18): 4250-4255
- Felsenfeld G, Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**(6921): 448-453
- Fillingham J, Keogh MC, Krogan NJ (2006) GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol* **84**(4): 568-577
- Fry CJ, Peterson CL (2001) Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* **11**(5): R185-197
- Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C (2000) Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* **24**(3): 300-303
- Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M (2005) The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem* **280**(11): 9879-9886
- Giordano A, Avantaggiati ML (1999) p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* **181**(2): 218-230
- Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, Garcia-Wilson E, Perkins ND, Hay RT (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**(4): 1043-1054
- Glozak MA, Seto E (2007) Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* **26**(37): 5420-5432

- Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M (1999) Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* **274**(36): 25543-25549
- Grant PA (2001) A tale of histone modifications. *Genome Biol* **2**(4): REVIEWS0003
- Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**(13): 1640-1650
- Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* **274**(9): 5895-5900
- Gregoretto IV, Lee YM, Goodson HV (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**(1): 17-31
- Grozinger CM, Schreiber SL (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* **9**(1): 3-16
- Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**(6649): 349-352
- Guidez F, Howell L, Isalan M, Cebrat M, Alani RM, Ivins S, Hormaeche I, McConnell MJ, Pierce S, Cole PA, Licht J, Zelent A (2005) Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol* **25**(13): 5552-5566
- Halkidou K, Gnanapragasam VJ, Mehta PB, Logan IR, Brady ME, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN (2003) Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene* **22**(16): 2466-2477
- Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu RM, Zhang Z (2007) Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* **315**(5812): 653-655
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(3): 789-829
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* **7**(5): 1395-1402
- Henry KW, Wyce A, Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, Kao CF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**(21): 2648-2663
- Hodawadekar SC, Marmorstein R (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* **26**(37): 5528-5540

- Hu W, Hesse M (1996) Synthese der p-Cumaroylspermidine. *Helvetica Chimica Acta* **79**(2): 548-559
- Hwang Y, Thompson PR, Wang L, Jiang L, Kelleher NL, Cole PA (2007) A selective chemical probe for coenzyme A-requiring enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(40): 7621-7624
- Ida K, Kitabayashi I, Taki T, Taniwaki M, Noro K, Yamamoto M, Ohki M, Hayashi Y (1997) Adenoviral E1A-associated protein p300 is involved in acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q13). *Blood* **90**(12): 4699-4704
- Iyer NG, Ozdag H, Caldas C (2004) p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**(24): 4225-4231
- Jacobson AR, Makris AN, Sayre LM (1987) Monoacylation of symmetrical diamines. *J Org Chem* **52**(12): 2592-2594
- Jones DO, Cowell IG, Singh PB (2000) Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays* **22**(2): 124-137
- Juan LJ, Utley RT, Adams CC, Vettese-Dadey M, Workman JL (1994) Differential repression of transcription factor binding by histone H1 is regulated by the core histone amino termini. *Embo J* **13**(24): 6031-6040
- Kalkhoven E (2004) CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1145-1155
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**(3): 403-414
- Kelly TJ, Qin S, Gottschling DE, Parthun MR (2000) Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Mol Cell Biol* **20**(19): 7051-7058
- Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* **11**(12): 1695-1713
- Kervabon A, Parello J, Mery J (1979) Chemical studies on histone acetylation using a synthetic peptide fragment of histone H4. *FEBS Lett* **98**(1): 152-156
- Kim S, Benoiton L, Paik WK (1964) Epsilon-Alkyllysine. Purification and Properties of the Enzyme. *J Biol Chem* **239**: 3790-3796
- Kim Y, Tanner KG, Denu JM (2000) A Continuous, Nonradioactive Assay for Histone Acetyltransferases. *Analytical Biochemistry* **280**(2): 308-314
- Kingston RE, Narlikar GJ (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* **13**(18): 2339-2352
- Kinoshita A, Whelan CM, Berezovska O, Hyman BT (2002) The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem* **277**(32): 28530-28536

- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R (1995) Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* **270**(42): 24674-24677
- Kornberg RD (1977) Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* **46**: 931-954
- Kornberg RD, Thomas JO (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* **184**(139): 865-868
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4): 693-705
- Krebs JE, Fry CJ, Samuels ML, Peterson CL (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* **102**(5): 587-598
- Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Emili A, Boone C, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt J (2003) Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **23**(12): 4207-4218
- Lachner M, Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 286-298
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5807-5811
- Lau OD, Courtney AD, Vassilev A, Marzilli LA, Cotter RJ, Nakatani Y, Cole PA (2000a) p300/CBP-associated factor histone acetyltransferase processing of a peptide substrate. Kinetic analysis of the catalytic mechanism. *J Biol Chem* **275**(29): 21953-21959
- Lau OD, Kundu TK, Soccio RE, Ait-Si-Ali S, Khalil EM, Vassilev A, Wolffe AP, Nakatani Y, Roeder RG, Cole PA (2000b) HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* **5**(3): 589-595
- Laybourn PJ, Kadonaga JT (1991) Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science* **254**(5029): 238-245
- Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* **26**(2): 147-170
- Lee HL, Archer TK (1998) Prolonged glucocorticoid exposure dephosphorylates histone H1 and inactivates the MMTV promoter. *Embo J* **17**(5): 1454-1466
- Liang J, Prouty L, Williams BJ, Dayton MA, Blanchard KL (1998) Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2. *Blood* **92**(6): 2118-2122
- Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem* **271**(25): 15034-15044

- Lin Y, Fletcher CM, Zhou J, Allis CD, Wagner G (1999) Solution structure of the catalytic domain of GCN5 histone acetyltransferase bound to coenzyme A. *Nature* **400**(6739): 86-89
- Ling X, Harkness TA, Schultz MC, Fisher-Adams G, Grunstein M (1996) Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev* **10**(6): 686-699
- Liu X, Wang L, Zhao K, Thompson PR, Hwang Y, Marmorstein R, Cole PA (2008) The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* **451**(7180): 846-850
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**(6): 917-926
- Loury R, Sassone-Corsi P (2003) Histone phosphorylation: how to proceed. *Methods* **31**(1): 40-48
- Luger K, Mader AW, Richmond R, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251 - 260
- Mai A, Rotili D, Tarantino D, Ornaghi P, Tosi F, Vicidomini C, Sbardella G, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Filetici P (2006) Small-molecule inhibitors of histone acetyltransferase activity: identification and biological properties. *J Med Chem* **49**(23): 6897-6907
- Mantelingu K, Reddy BA, Swaminathan V, Kishore AH, Siddappa NB, Kumar GV, Nagashankar G, Natesh N, Roy S, Sadhale PP, Ranga U, Narayana C, Kundu TK (2007) Specific inhibition of p300-HAT alters global gene expression and represses HIV replication. *Chem Biol* **14**(6): 645-657
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**(2): 163-176
- Marks PA, Jiang X (2005) Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle* **4**(4): 549-551
- Marmorstein R (2001a) Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **58**(5-6): 693-703
- Marmorstein R (2001b) Structure of histone acetyltransferases. *J Mol Biol* **311**(3): 433-444
- Martin C, Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-849
- Martinez-Balbas MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *Embo J* **17**(10): 2886-2893

- Marvin KW, Yau P, Bradbury EM (1990) Isolation and characterization of acetylated histones H3 and H4 and their assembly into nucleosomes. *J Biol Chem* **265**(32): 19839-19847
- McKinsey TA, Olson EN (2004) Cardiac histone acetylation--therapeutic opportunities abound. *Trends Genet* **20**(4): 206-213
- Mizzen CA, Allis CD (1998) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* **54**(1): 6-20
- Mizzen CA, Brownell JE, Cook RG, Allis CD (1999) Histone acetyltransferases: preparation of substrates and assay procedures. *Methods Enzymol* **304**: 675-696
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**(7): 1261-1270
- Moffatt JG, Khorana HG (1961) Nucleoside Polyphosphates. X.1 The Synthesis and Some Reactions of Nucleoside-5' Phosphoromorpholidates and Related Compounds. Improved Methods for the Preparation of Nucleoside-5' Polyphosphates1. *J Am Chem Soc* **83**(3): 649-658
- Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K (2008) The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest* **118**(3): 868-878
- Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, Iwama T, Miyaki M (1996) p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* **12**(7): 1565-1569
- Murray K (1964) The Occurrence of ϵ -N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* **3**(1): 10-15
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* **20**(8): 966-976
- Neuwald AF, Landsman D (1997) GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* **22**(5): 154-155
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**(6846): 561-565
- Noll M, Kornberg RD (1977) Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J Mol Biol* **109**(3): 393-404
- Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**(4): 214-220

- Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**(1): 35-44
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**(5): 953-959
- Ornaghi P, Rotili D, Sbardella G, Mai A, Filetici P (2005) A novel Gcn5p inhibitor represses cell growth, gene transcription and histone acetylation in budding yeast. *Biochem Pharmacol* **70**(6): 911-917
- Osley MA (2004) H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 74-78
- Ott M, Schnolzer M, Garnica J, Fischle W, Emiliani S, Rackwitz HR, Verdin E (1999) Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* **9**(24): 1489-1492
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**(4): 281-300
- Pan MH, Chang WL, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK (2001) Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. *J Agric Food Chem* **49**(3): 1464-1474
- Paranjape SM, Kamakaka RT, Kadonaga JT (1994) Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **63**: 265-297
- Parello J, Roblot G, Wylde R, Martin A (1990) Synthèse chimique d'inhibiteurs multisubstrat de l'acétyltransférase des histones associant de façon covalente la spermidine à un fragment S-terminal du coenzyme A. *C R Acad Sci Paris* **t. 310, Série II**: 1441-1446
- Paris M, Porcelloni M, Binaschi M, Fattori D (2008) Histone deacetylase inhibitors: from bench to clinic. *J Med Chem* **51**(6): 1505-1529
- Parthun MR, Widom J, Gottschling DE (1996) The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**(1): 85-94
- Paulson JR, Taylor SS (1982) Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J Biol Chem* **257**(11): 6064-6072
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**(6): 1577-1589
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, et al. (1995) Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **376**(6538): 348-351

- Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, Kedes L, Wang JY, Graessmann A, Nakatani Y, Levrero M (1997) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* **1**(1): 35-45
- Qin S, Parthun MR (2006) Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **26**(9): 3649-3658
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**(6796): 593-599
- Reinberg D, Chuikov S, Farnham P, Karachentsev D, Kirmizis A, Kuzmichev A, Margueron R, Nishioka K, Preissner TS, Sarma K, Abate-Shen C, Steward R, Vaquero A (2004) Steps toward understanding the inheritance of repressive methyl-lysine marks in histones. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **69**: 171-182
- Ricci AR, Genereaux J, Brandl CJ (2002) Components of the SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of ARG1 in rich medium. *Mol Cell Biol* **22**(12): 4033-4042
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**(6): 1591-1598
- Ridsdale J, Hendzel M, Delcuve G, Davie J (1990) Histone acetylation alters the capacity of the H1 histones to condense transcriptionally active/competent chromatin. *J Biol Chem* **265**(9): 5150-5156
- Robishaw JD, Neely JR (1985) Coenzyme A metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **248**(1): E1-9
- Roblot G, Wylde R, Martin A, Parello J (1993) Regioselective synthesis of inhibitors of histone acetyl transferase covalently linking spermidine to the s-terminus of coenzyme a and fragments. *Tetrahedron* **49**(29): 6381-6398
- Robzyk K, Recht J, Osley MA (2000) Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**(5452): 501-504
- Rojas JR, Trievel RC, Zhou J, Mo Y, Li X, Berger SL, Allis CD, Marmorstein R (1999) Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature* **401**(6748): 93-98
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL (2003) Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *Embo J* **22**(24): 6537-6549

- Ruiz-Garcia AB, Sendra R, Galiana M, Pamblanco M, Perez-Ortin JE, Tordera V (1998) HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *J Biol Chem* **273**(20): 12599-12605
- Sagar V, Zheng W, Thompson PR, Cole PA (2004) Bisubstrate analogue structure-activity relationships for p300 histone acetyltransferase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **12**(12): 3383-3390
- Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, Kimura A, Nakamura Y, Inazawa J, Abe T, Yamagishi H (2000) Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* **89**(3): 217-223
- Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, Roberge M (1999) Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol* **145**(2): 225-235
- Sbardella G, Castellano S, Vicidomini C, Rotili D, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Mai A (2008) Identification of long chain alkylidenemalonates as novel small molecule modulators of histone acetyltransferases. *Bioorg Med Chem Lett* **18**(9): 2788-2792
- Schafer S, Jung M (2005) Chromatin modifications as targets for new anticancer drugs. *Arch Pharm (Weinheim)* **338**(8): 347-357
- Schiltz RL, Mizzen CA, Vassilev A, Cook RG, Allis CD, Nakatani Y (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* **274**(3): 1189-1192
- Schneider J, Bajwa P, Johnson FC, Bhaumik SR, Shilatifard A (2006) Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II. *J Biol Chem* **281**(49): 37270-37274
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**(11): 1251-1262
- Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* **18**(11): 1263-1271
- Schultz TF, Spiker S, Quatrano RS (1996) Histone H1 enhances the DNA binding activity of the transcription factor EmBP-1. *J Biol Chem* **271**(42): 25742-25745
- Schuster T, Han M, Grunstein M (1986) Yeast histone H2A and H2B amino termini have interchangeable functions. *Cell* **45**(3): 445-451
- Semenza GL (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* **8**(4 Suppl): S62-67

- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-953
- Shiama N (1997) The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol* **7**(6): 230-236
- Shick VV, Belyavsky AV, Mirzabekov AD (1985) Primary organization of nucleosomes. Interaction of non-histone high mobility group proteins 14 and 17 with nucleosomes, as revealed by DNA-protein crosslinking and immunoaffinity isolation. *J Mol Biol* **185**(2): 329-339
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13225-13230
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**(5762): 844-847
- Smith CL, Onate SA, Tsai MJ, O'Malley BW (1996) CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(17): 8884-8888
- Smith ER, Belote JM, Schiltz RL, Yang XJ, Moore PA, Berger SL, Nakatani Y, Allis CD (1998) Cloning of *Drosophila* GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res* **26**(12): 2948-2954
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**(6647): 194-198
- Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459
- Stimson L, Rowlands MG, Newbatt YM, Smith NF, Raynaud FI, Rogers P, Bavetsias V, Gorsuch S, Jarman M, Bannister A, Kouzarides T, McDonald E, Workman P, Aherne GW (2005) Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Mol Cancer Ther* **4**(10): 1521-1532
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**(5): 599-606
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Price BD (2006) Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett* **580**(18): 4353-4356
- Sun ZW, Allis CD (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**(6893): 104-108

- Tahtaoui C, Parrot I, Klotz P, Guillier F, Galzi J-L, Hibert M, Ilien B (2004) Fluorescent Pirenzepine Derivatives as Potential Bitopic Ligands of the Human M1 Muscarinic Receptor. *J Med Chem* **47**(17): 4300-4315
- Takechi S, Nakayama T (1999) Sas3 is a histone acetyltransferase and requires a zinc finger motif. *Biochem Biophys Res Commun* **266**(2): 405-410
- Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR (1998) PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem* **273**(27): 16935-16945
- Tang Y, Holbert MA, Wurtele H, Meeth K, Rocha W, Gharib M, Jiang E, Thibault P, Verreault A, Cole PA, Marmorstein R (2008) Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat Struct Mol Biol* **15**(9): 998
- Tanner KG, Langer MR, Denu JM (2000a) Kinetic mechanism of human histone acetyltransferase P/CAF. *Biochemistry* **39**(39): 11961-11969
- Tanner KG, Langer MR, Kim Y, Denu JM (2000b) Kinetic mechanism of the histone acetyltransferase GCN5 from yeast. *J Biol Chem* **275**(29): 22048-22055
- Tanner KG, Trievel RC, Kuo MH, Howard RM, Berger SL, Allis CD, Marmorstein R, Denu JM (1999) Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem* **274**(26): 18157-18160
- Thompson PR, Kurooka H, Nakatani Y, Cole PA (2001) Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem* **276**(36): 33721-33729
- Thompson PR, Wang D, Wang L, Fulco M, Pediconi N, Zhang D, An W, Ge Q, Roeder RG, Wong J, Levrero M, Sartorelli V, Cotter RJ, Cole PA (2004) Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* **11**(4): 308-315
- Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C (1990) Patterns of histone acetylation. *Eur J Biochem* **193**(3): 701-713
- Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, Harel-Bellan A (2001) Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* **58**(5-6): 728-736
- Trievel RC, Li F-Y, Marmorstein R (2000a) Application of a Fluorescent Histone Acetyltransferase Assay to Probe the Substrate Specificity of the Human p300/CBP-Associated Factor. *Analytical Biochemistry* **287**(2): 319-328
- Trievel RC, Li FY, Marmorstein R (2000b) Application of a fluorescent histone acetyltransferase assay to probe the substrate specificity of the human p300/CBP-associated factor. *Anal Biochem* **287**(2): 319-328
- Trievel RC, Rojas JR, Sterner DE, Venkataramani RN, Wang L, Zhou J, Allis CD, Berger SL, Marmorstein R (1999) Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 8931-8936

- Turner BM (1993) Decoding the nucleosome. *Cell* **75**(1): 5-8
- Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA (1998) Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* **111** (Pt **23**): 3497-3506
- Varier RA, Swaminathan V, Balasubramanyam K, Kundu TK (2004) Implications of small molecule activators and inhibitors of histone acetyltransferases in chromatin therapy. *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1215-1220
- Vetting MW, LP SdC, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**(1): 212-226
- Wade PA, Pruss D, Wolffe AP (1997) Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* **22**(4): 128-132
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2004a) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**(7010): 873-878
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* **22**(3): 383-394
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004b) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* **306**(5694): 279-283
- Weaver WE, Whaley WM (1947) Organic Fungicides. I. The Preparation of Some a-Bromoacetamides. *J Am Chem Soc* **69**(3): 515-516
- Weiss VH, McBride AE, Soriano MA, Filman DJ, Silver PA, Hogle JM (2000) The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat Struct Biol* **7**(12): 1165-1171
- Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, Fellows J, Erdjument-Bromage H, Ohba R, Li Y, Allis CD, Tempst P, Svejstrup JQ (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **4**(1): 123-128
- Wolf E, Vassilev A, Makino Y, Sali A, Nakatani Y, Burley SK (1998) Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell* **94**(4): 439-449
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A (2003) Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**(1): 267-274

- Wu J, Grunstein M (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* **25**(12): 619-623
- Wu J, Xie N, Wu Z, Zhang Y, Zheng YG (2009) Bisubstrate Inhibitors of the MYST HATs Esa1 and Tip60. *Bioorg Med Chem* **17**(3): 1381-1386
- Wu J, Zheng YG (2008) Fluorescent reporters of the histone acetyltransferase. *Anal Biochem* **380**(1): 106-110
- Wu RS, Panusz HT, Hatch CL, Bonner WM (1986) Histones and their modifications. *CRC Crit Rev Biochem* **20**(2): 201-263
- Xu F, Zhang K, Grunstein M (2005) Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**(3): 375-385
- Xu W, Edmondson DG, Evrard YA, Wakamiya M, Behringer RR, Roth SY (2000) Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat Genet* **26**(2): 229-232
- Xu W, Edmondson DG, Roth SY (1998) Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* **18**(10): 5659-5669
- Yamashita K, Shinohara M, Shinohara A (2004) Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11380-11385
- Yamauchi T, Yamauchi J, Kuwata T, Tamura T, Yamashita T, Bae N, Westphal H, Ozato K, Nakatani Y (2000) Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11303-11306
- Yan Y, Barlev NA, Haley RH, Berger SL, Marmorstein R (2000) Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. *Mol Cell* **6**(5): 1195-1205
- Yan Y, Harper S, Speicher DW, Marmorstein R (2002) The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nat Struct Biol* **9**(11): 862-869
- Yang XJ (2004) The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* **32**(3): 959-976
- Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**(6589): 319-324
- Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10626-10631
- Yuan LW, Giordano A (2002) Acetyltransferase machinery conserved in p300/CBP-family proteins. *Oncogene* **21**(14): 2253-2260

Yuan LW, Soh JW, Weinstein IB (2002) Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKCdelta. *Biochim Biophys Acta* **1592**(2): 205-211

Zaragoza-Dörwald F, Von Kiedrowski G (1988) A Simple and Economic Synthesis of Monoacylated Alkanediamines by Thermal Transamidation. *Synthesis*(11): 917-918

Zhang K, Tang H, Huang L, Blankenship JW, Jones PR, Xiang F, Yau PM, Burlingame AL (2002) Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **306**(2): 259-269

Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Freitas MA (2003a) Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**(2): 77-86

Zhang X, Cheng X (2003) Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* **11**(5): 509-520

Zhang X, Zhou L, Cheng X (2000) Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *Embo J* **19**(14): 3509-3519

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**(18): 2343-2360

Zhang Z, Yin Z, Meanwell NA, Kadow JF, Wang T (2003b) Selective Monoacylation of Symmetrical Diamines via Prior Complexation with Boron. *Org Lett* **5**(19): 3399-3402

Zheng Y, Balasubramanyam K, Cebrat M, Buck D, Guidez F, Zelent A, Alani RM, Cole PA (2005) Synthesis and evaluation of a potent and selective cell-permeable p300 histone acetyltransferase inhibitor. *J Am Chem Soc* **127**(49): 17182-17183

Zheng Y, Thompson PR, Cebrat M, Wang L, Devlin MK, Alani RM, Cole PA (2004) Selective HAT inhibitors as mechanistic tools for protein acetylation. *Methods Enzymol* **376**: 188-199

Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2005) Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* **20**(4): 601-611

Auteur : HO-A-KWIE Franciane

Directeur de thèse : BLONSKI Casimir

Université Toulouse III- Paul SABATIER (France)

Histone Acetyltransferases : Design, synthesis and evaluation of inhibitors

Chromatin is the state in which DNA and histone proteins are packaged within eukaryotic cells. Post-translational modifications of histones permit localized decondensation and remodeling that facilitates the progress of transcriptional activity. Histone acetylation, regulated by histone acetyltransferases, is one of these modifications. HATs play a key role in a variety of cellular processes and function as transcriptional co-activator. Deregulation or mutation of these enzymes is associated with the manifestation of several diseases, predominantly cancer. Here, we describe the development and biological evaluation of bisubstrate inhibitors of p300 and PCAF, which may have therapeutic applications for the treatment of HAT-mediated cancers.

Key words : HAT, p300, histone acetylation, bisubstrate inhibitor

Université Toulouse III – Paul SABATIER

Laboratoire de synthèse et physicochimie de molécules d'intérêt biologique, UMR 5068

118 Route de Narbonne 31062 Toulouse cedex (France)